

外周血 SEPT9 DNA 甲基化检测在结直肠癌的临床应用

陈德望, 陈君填(汕头大学医学院第一附属医院, 广东 汕头 515041)

The application of methylated SEPT9 in the diagnosis and treatment of colorectal cancer CHEN De-wang, CHEN Jun-tian (The First Affiliated Hospital, Medical college of Shantou University, Guangdong province Shantou, 515041)

Corresponding author: CHEN Jun-tian, E-mail: chenjuntian2002@aliyun.com

结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)是结直肠黏膜上皮在多种致癌因素作用下发生的恶性肿瘤,发病率位居常见恶性肿瘤第3位,预后差,病死率较高。早期CRC的五年生存率可达90%,而晚期CRC则降为5%。因此,早诊断、早治疗是防治CRC的关键,可显著降低其死亡率^[1-3]。理想的CRC筛查方法应具备精确、方便、无创、便宜、快速等特点。目前,肠镜检查是筛查诊断CRC的重要手段,特异性可达95%,但其作为一种有创性检查,对肠道准备的要求较高,且有发生肠穿孔等并发症的风险,患者依从性较低,对易感人群行大规模筛查受限,难以完全实现CRC的二级预防。CRC筛查指南为易患人群提供了多种筛查方法,除肠镜外,还有粪便潜血试验(Fecal Occult Blood Test, FOBT)、粪便DNA检查、癌胚抗原(CEA)等临床常用方法,但上述方法均存在敏感性低、假阳性率高的缺点,难以作为CRC早期筛查的金标准^[4,5]。近年来,大量临床试验证实外周血SEPT9 DNA甲基化检测技术用于CRC的筛查具有较高的敏感性和特异性,本文就相关研究进展和应用前景进行综述。

1 SEPT9 基因的一般认识

SEPT 基因家族最早由 Hartwell 等学者在 1971 年从酿酒酵母中筛选可影响细胞分裂周期的温度敏感性突变基因时意外发现。SEPT9 是 SEPT 基因家族成员之一,广泛存在于除植物以外的所有真核细胞,其编码的 Septin9 蛋白由位于中央的 P-loop GTP 结合域、可变的 N 端和 C 端结构域组成^[6]。大量文献提示 Septin9 蛋白参与了细胞分裂、细胞极化、囊泡运输和细胞膜重构等生物过程^[7]。近年来,有研究指出 SEPT9 可能作为致癌基因或抑癌基因参与肿瘤的发生发展过程,但其表达调控过程和具体作用机制尚未清楚^[7]。

2 SEPT9 DNA 甲基化用于 CRC 筛查

SEPT9 基因高甲基化水平可作为大肠癌早期诊断的

生物标志物^[6]。多种基因的 DNA 甲基化与 CRC 的发生、发展密切相关^[7],其中,SEPT9 在 CRC 中的检出率远高于其他肿瘤^[8]。Su 等^[9]采用甲基化特异性聚合酶链反应(Methylation Specific Polymerase Chain Reaction, MSP)-变性高效液相色谱法(Denaturing High Performance Liquids Chromatography, DHPLC)检测了 234 份大肠癌组织(172 例 CRC, 62 例对照)SEPT9 基因的甲基化状态,并分析该基因与肠癌病理特征的关系。研究结果显示:152 例 CRC 组织的 SEPT9 基因呈高甲基化状态,而健康对照组中仅有 4 例呈高甲基化状态,两组检出率有显著差异(88.4% vs. 6.4%, $P < 0.001$),且癌组织 SEPT9 基因的甲基化状态与患者年龄、性别、Duke's 分期、TNM 分期、肿瘤分化程度和肿瘤部位无关。其他临床研究同样证实了 CRC 组织中可检出高度甲基化的 SEPT9 基因^[10,11],且甲基化后的 SEPT9 基因可被癌组织释放入外周血,故可通过早期检测血浆中 SEPT9 的甲基化程度实现 CRC 的早期筛查。

血浆 SEPT9 DNA 甲基化的检测方法目前主要采用 PCR 荧光探针法,包括 2 个步骤,第一步,从不少于 2 ml 血浆中提取游离的 DNA 并用亚硫酸盐进行转化;第二步,将转化 DNA 进行多重 PCR 扩增,从而检测发生甲基化的 SEPT9 基因 DNA 片段。几乎所有研究都采用多重 PCR 检测方式,且大多数采用三次重复 PCR。Adler 等^[12]选择了 172 例符合 CRC 筛查的志愿者并建议全部接受肠镜检查,其中只有 63 例(37%)愿意接受肠镜检查,而另外 109 例志愿者中,有 90 例(83%)选择外周血 SEPT9 DNA 检测,16 例(15%)选择粪便 FOBT 检测,3 例拒绝任何检查,可见血浆检测由于具有方便快捷和非侵入性的特点,更容易被接受。

目前,国外已开始通过检测外周血中游离 DNA SEPT9 基因甲基化水平来筛查 CRC,且有研究者将其与组织检测进行对比^[13]。Toth^[14]等对 26 例结直肠腺瘤患者、34 例 CRC 患者及 24 例无病对照组志愿者分别进行大肠组织和外周血 SEPT9 基因甲基化检测。结果显示在组织检测中,敏感性分别为腺瘤 100%(26/26)、肠癌 97.1%(33/34)、对照组

4.2%(1/24),对照组分别与腺瘤组和肠癌组比较均有显著性差异($P<0.001$),但腺瘤组与肠癌组比较则无明显差异。此外,血浆检测的敏感性分别为腺瘤 30.8%(8/26)、肠癌 88.2%(30/34)、对照组 8.3%(2/24)。对照组与 CRC 组之间有显著性差异($P<0.01$),且腺瘤组与肠癌组之间比较有显著性差异($P<0.01$)。此结果说明大肠癌患者 *SEPT9* 基因甲基化在组织与外周血的检测中,后者更具有特异性。

Kang^[15]等研究发现血浆 *SEPT9* 基因甲基化检测在 CRC 的敏感性为 75.0%,特异性为 98.1%,其中 55 例同时接受血浆 *SEPT9* 基因甲基化和 FOBT 检测,结果显示前者明显优于后者,敏感性分别为 79.5%和 53.8%($P<0.05$)。Johnson 等人^[16]将 102 例结肠癌患者进行血浆 *SEPT9* 基因甲基化检测与粪便免疫化学检测(FIT)的比较,结果显示敏感性分别为 73.3%和 68%,血浆检测敏感性高于 FIT,且两种联合检测的敏感性更高为 88.7%,同样证实了血浆游离 DNA *SEPT9* 基因甲基化检测可作为 CRC 新的筛查方式。

Song 等^[17,18,26]的系统回顾和 meta 分析进一步表明,该方法采用 2/3 算法(3 次检测中至少 2 次阳性)适用于 CRC 的诊断,而 1/3 算法则在筛查中表现出更高的灵敏度,且结合 FIT 或 CEA 的检测能提高 CRC 的检出率。Tanzer 等^[19]研究表明血浆 *SEPT9* 基因甲基化检出率在正常人约为 9%(3/33),在大肠癌的癌前病变(腺瘤等)患者中则上升至 29%(27/94),而大肠癌患者则高达 73%(24/33),且 *SEPT9* 与 *ALX4*(Aristaless-like homeobox-4)基因联合检测对大肠癌癌前病变的敏感性和特异性更高,分别为 51%和 82%,特别是在中晚期腺瘤、直径 ≥ 10 毫米或有恶变可能者(高级别上皮内瘤变,含绒毛成分的腺瘤等)敏感性更高。该研究证实了血浆 *SEPT9* DNA 甲基化水平的检测不仅可用于 CRC 的筛查,更可作为 CRC 癌前病变的筛查。Song^[20]等的临床研究同样为该筛查方法的应用提供有力证据。

3 *SEPT9* DNA 甲基化水平在 CRC 的临床应用价值

目前已有较多研究探讨了血浆 *SEPT9* DNA 甲基化阳性率与患者临床和病理特征之间的相关性。Potter 等^[21]在一项前瞻性研究中发现血浆 *SEPT9* DNA 甲基化检测在 CRC 患者中的敏感性为 68%,其中 I 期-III 期结肠癌总体敏感性为 64%,早期(I~II 期)和晚期(III~IV 期)分别为 59%和 87%,特异性为 79%;同时指出,腺瘤患者与健康组的检测敏感性相似,分别为 14%和 21%,对重度不典型增生的息肉和腺瘤(>1 cm)的检测价值较大。

Grtzmann 等^[22]检测了 252 例 CRC 患者和 102 例健康对照者外周血 *SEPT9* DNA 甲基化水平,结果显示 *SEPT9* DNA 甲基化检测 CRC 的敏感性为 72%,特异性为 90%~93%,而在健康对照者中,*SEPT9* DNA 甲基化阳性率极低。同时,该研究证实外周血 *SEPT9* DNA 甲基化水平不受患者年龄、性别以及肿瘤位置的影响。Warren 等^[23]的研究得出了更敏感的结果:血浆 *SEPT9* DNA 甲基化检测对 CRC

的敏感性为 90%(45/50),特异性为 88%(83/94),对早期(I 和 II 期)敏感性为 87%(33/38),晚期(III 和 IV 期)敏感性为 100%。而在正常人和腺瘤患者中,甲基化检出率极低,且假阳性率仅 3%。

Toth 等^[24]的研究发现,若以 1/3 算法检测血浆 *SEPT9* DNA 甲基化,正常人阳性率为 15.2%(14/92),CRC 患者为 95.6%(88/92),其中 I 期 84%(21/25),II~IV 期 100%(67/67);若以 2/3 算法,则特异性提高到 99%,而敏感性为 79.3%(73/92)。同时该研究指出左右半结肠癌患者血浆 *SEPT9* 基因甲基化阳性率分别为 96.4%(54/56)和 94.4%(34/36),无明显差异。而应用愈创木脂化学法粪便潜血试验(guaiac-based fecal occult blood tests, gFOBT)对左、右半结肠癌的阳性率分别为 83.3%(10/12)和 50%(5/10),CEA 升高分别为 60%(9/15)和 41.7%(5/12),表明 *SEPT9* 检测率比 gFOBT、CEA 均高,且对于右半结肠癌敏感性更高。另外,Chen 等^[25]的研究发现血浆 *SEPT9* DNA 甲基化检测 CRC 患者的敏感性和特异性分别为 47%和 89%,而免疫法粪便潜血试验(immuochemical fecal occult blood tests, i-FOBT)检测虽有更高的敏感性(84%),但特异性(55%)较低,两者联合检测的检出率最高。Nian 等^[26]分析认为其检测敏感性与肿瘤组织分化程度有关,高、中、低分化相应的敏感性为 31%、73%、90%。Song^[27]等研究认为血浆 *SEPT9* DNA 甲基化阳性率与癌症分期和年龄有关,分期越晚、年龄越大者阳性率越高,而与性别和肿瘤的位置无明显关系。

血浆 *SEPT9* DNA 甲基化水平不仅可用于 CRC 的筛查与诊断,还可用于监测术后复发和预测远期生存等方面。Tham 等^[28]对 150 例 I~III 期 CRC 患者进行 3 次采血,分别于术前 1 周、术后 6 个月及术后 1 年通过定量甲基化特异性聚合酶链反应对多个基因进行检测,同时测量血清 CEA 水平。结果显示随访 1 年出现高甲基化水平 *SEPT9* DNA 的患者复发风险较高,且 *SEPT9* DNA 甲基化水平升高出现的时间比血清 CEA 升高至少早 2 个月。因此,血清 *SEPT9* DNA 甲基化水平检测可用于 CRC 患者术后复发的监测。Song^[17]等进行系统回顾分析后同样得出,血浆 *SEPT9* DNA 甲基化水平的检测可有效地监测治疗效果并能预测 CRC 的复发和生存结局。

4 结论

综上所述,外周血 *SEPT9* DNA 甲基化水平检测用于 CRC 筛查具有较高的敏感性和特异性,且具有精确、可靠、快速、简便、依从性高、创伤小等优点,可在易感人群中广泛应用。*SEPT9* DNA 甲基化检测还可与其他多种标志物联合检测用作 CRC 患者术后复发的监测。总之,外周血 *SEPT9* DNA 甲基化检测在 CRC 早期筛查中具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Kuipers EJ, Rosch T, Breithauer M. Colorectal cancer screen-

- ing-optimizing current strategies and new directions [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(3):130-142.
- [2] Li Y, Song L, Gong Y, et al. Detection of colorectal cancer by DNA methylation biomarker SEPT9: past, present and future [J]. *Biomark Med*, 2014, 8(5):755-769.
- [3] Moore JS, Aulet TH. Colorectal Cancer Screening[J]. *Surg Clin North Am*, 2017, 97(3):487-502.
- [4] Toth K, Sipos F, Kalmár A, et al. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left and right-sided colon cancers [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(9):e46000.
- [5] 褚文慧, 吴开春. 外周血 SEPT9 DNA 甲基化检测在结直肠癌筛查中的应用[J]. *胃肠病学*, 2015, 20(10):622-624.
- [6] Reinhold W, Alexandra K, Valcz G, et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island[J]. *BMC Cancer*, 2013, 30(13):398.
- [7] Coppede F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation[J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(2):238-247.
- [8] Paska AV, Hudler P. Aberrant methylation patterns in cancer a clinical view[J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2015, 25(2):161-176.
- [9] Su XL, Wang YF, Li SJ, et al. High methylation of the SEPT9 gene in Chinese colorectal cancer patients [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2):2513-2520.
- [10] Ahmed D, Danielsen SA, Aagesen TH, et al. A tissue-based comparative effectiveness analysis of biomarkers for early detection of colorectal tumors[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2012, 3:e27.
- [11] 庄璐, 李兆申. 血浆 SEPT9 基因甲基化对结直肠癌诊断价值的研究进展[J]. *胃肠病学*, 2015, 20(9):556-559.
- [12] Adler A, Geiger S, Keil A, et al. Improving compliance to colorectal cancer screening using blood and stool based tests in patients refusing screening colonoscopy in Germany [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 17(14):183.
- [13] Pratt VM. Are We Ready for a Blood-Based Test to Detect Colon Cancer[J]. *Clin Chem*, 2014, 60(9):1141-1142.
- [14] Tóth K1, Wasserkort R, Sipos F, et al. Detection of Methylated Septin 9 in Tissue and Plasma of Colorectal Patients with Neoplasia and the Relationship to the Amount of Circulating Cell-Free DNA[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12):e115415.
- [15] Kang Q, Jin P, Yang L, et al. Significance of Septin9 gene methylation detection of plasma circulation DNA in colorectal cancer screening [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2014, 94(48):3839-3841.
- [16] Johnson DA, Barclay RL, Mergener K, et al. Plasma Septin9 versus Fecal Immunochemical Testing for Colorectal Cancer Screening A Prospective Multicenter Study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e98238.
- [17] Song L, Yu H, Jia J, et al. A systematic review of the performance of the SEPT9 gene methylation assay in colorectal cancer screening, monitoring, diagnosis and prognosis [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 18(4):425-432.
- [18] Song L, Jia J, Peng X, et al. The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screening tests: A meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):3032.
- [19] Tänzer M, Balluff B, Distler J, et al. Performance of Epigenetic Markers SEPT9 and ALX4 in Plasma for Detection of Colorectal Precancerous Lesions[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9061.
- [20] Song L, Peng X, LiY, et al. The SEPT9 gene methylation assay is capable of detecting colorectal adenoma in opportunistic screening[J]. *Epigenomics*, 2017, 9(5):599-610.
- [21] Potter NT, Hurban P, White MN, et al. Validation of a Real-Time PCR - Based Qualitative Assay for the Detection of Methylated SEPT9 DNA in Human Plasma [J]. *Clin Chem*, 2014, 60(9):1183-1191.
- [22] Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11):e3759.
- [23] Warren JD, Xiong W, Bunker AM, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer [J]. *BMC Med*, 2011, 14(9):133.
- [24] Tóth K1, Sipos F, Kalmár, et al. A Detection of Methylated SEPT9 in Plasma Is a Reliable Screening Method for Both Left- and Right-Sided Colon Cancers [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e46000.
- [25] Chen CH, Yan SL, et al. The Relationship between the Methylated Septin-9 DNA Blood Test and Stool Occult Blood Test for Diagnosing Colorectal Cancer in Taiwanese People [J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 31(1):1-7.
- [26] Nian J, Sun X. Diagnostic Accuracy of Methylated SEPT9 for Blood-based Colorectal Cancer Detection: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2017, 8(1):e216.
- [27] Song L, Jia J, Yu H, et al. The performance of the mSEPT9 assay is influenced by algorithm, cancer stage and age, but not sex and cancer location [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(6):1093-1101.
- [28] Tham C, Chew M, Soong R, et al. Postoperative Serum Methylation Levels of TAC1 and SEPT9. Are Independent Predictors of Recurrence and Survival of Patients with Colorectal Cancer [J]. *Cancer*, 2014, 120(20):3131-3141.

(收稿日期:2018-02-15)