

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.03.036

DNA 甲基化水平检测在胃癌早期诊断中的研究进展*

陈锐泽¹综述,张 勇^{2△}审校

1. 厦门医学院临床医学系, 福建厦门 361023; 2. 机能与临床转化福建省高校重点实验室, 福建厦门 361023

关键词: DNA 甲基化; 胃癌; 早期诊断

中图分类号: R735.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)03-0413-04

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 目前其发病率在人体恶性肿瘤中排名第五, 死亡率更是高居第三^[1]。由于缺乏特异性的早期检测手段, 绝大多数患者确诊时往往因病情恶化、延误治疗而丧失生命。绝大多数患者由于胃癌早期症状轻微而未重视, 当身体出现明显不适时才就诊, 此时多已发展至进展期胃癌, 从而延误最佳治疗时机。据肿瘤数据统计显示, 早期胃癌患者 5 年生存率可达 91%, 随着病情进展, 肿瘤细胞侵袭至更深层组织时(如浆膜层、肌层), 患者 5 年生存率则降至 26%^[2]。当前, 临床胃癌诊断仍主要依赖于侵入性内镜检查和病理活检^[3]。利用侵入性内镜能直观地发现并评估病灶且相对无创, 但成本及操作要求较高, 同时也存在诸多禁忌证, 且在孕妇、老年人等特殊群体中依从性不高且易发生并发症, 因此无法作为胃癌早期筛查的有效手段。而病理活检虽然能够准确判断肿瘤大小及其分化程度, 但无法较好评估患者整体病情发展状况, 再者活检为有创检查, 容易出现并发症, 很难作为人群胃癌早期筛查的手段。这些检测手段的局限性给早期胃癌的诊断造成不少困扰。近年来, 血清肿瘤标志物的检测广泛应用到临床, 通过检测血清中相关肿瘤标志物如癌胚抗原(CEA)、糖类抗原(CA)125、CA19-9, 可对部分恶性肿瘤进行筛查^[4], 但由于胃癌缺乏特异性标志物, 所以该技术在早期胃癌诊断中仍存在局限性。

CHEN 等^[5]研究发现, 多数消化道肿瘤患者血浆中的脱落循环肿瘤细胞 DNA(ctDNA)具有特异的甲基化水平, 能够及时且高效地对胃癌、结直肠癌等多种消化系统常见肿瘤进行早期诊断, 从而极大提高癌症患者早期生存率。同时, PHALLEN 等^[6]检测结直肠癌患者的血浆发现, 患者血浆中 ctDNA 水平明显高于健康个体, 因此对血浆中 ctDNA 进行分析可能有利于识别肿瘤相关特异性改变^[6]。随着对表观遗传学研究的不断深入, 人们在胃癌细胞中也能检测到 DNA 异常甲基化, 部分调控细胞基因启动子区异常高甲基化可导致细胞中的抑癌基因失活^[7], 从而导致

细胞异常生长, 而这对早期胃癌的诊断和预后意义重大。通过检测体内特异性基因异常甲基化程度有望成为一种胃癌早期无创性的检测手段, 从而较大程度提高胃癌患者早期检出率。本文拟就当前 DNA 甲基化水平检测在胃癌早期诊断中的研究进展进行综述, 以期寻找胃癌早期诊断分子标志物提供新思路。

1 DNA 甲基化概述

DNA 甲基化指甲基基团在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的催化作用下添加至胞嘧啶第 5 号碳的残基上的修饰过程^[8], 该过程多发生于富含胞嘧啶和尿嘧啶的 CpG 岛(即具有高密度胞嘧啶-鸟嘌呤 2 种核苷酸的 DNA 区域)中。DNA 甲基化是细胞生长发育过程重要的调控机制。有研究表明, DNA 异常甲基化与多种恶性肿瘤的发生之间关系密切, 尤其与细胞分裂相关的原癌基因、抑癌基因和 DNA 损伤修复基因^[7]。DNA 异常甲基化即抑癌基因启动子区的高甲基化及原癌基因广泛区域的低甲基化, 其中高甲基化多发生于抑癌基因的 5' 端启动子区域的 CpG 岛上^[9], 该区域上累积的高水平甲基胞嘧啶使抑癌基因失活, 或致使调控细胞周期机制的相关蛋白如 p27 表达下调, 从而导致细胞过度生长^[10]; 而低甲基化多发生于全基因组的原癌基因区域^[11], 大量的原癌基因低甲基化导致原本应当沉默的基因被异常激活, 从而增加 DNA 信息传递过程中的不稳定性, 加速肿瘤的演进。通常 DNA 低甲基化与抑癌基因高甲基化往往是相伴发生的, 只是发生区域有所不同。目前对人类 Runt 相关转录因子-3(RUNX3)基因、hMLH1 基因、RASSF1A 基因和 SEPTIN9 基因的高甲基化与胃癌的发生机制研究较多。

2 DNA 高甲基化与胃癌发生的相关机制

DNA 异常甲基化可能与肿瘤细胞的发生、转移和侵袭关系密切^[12]。正常机体内的各种细胞新陈代谢受多种基因共同调控, 其中与肿瘤细胞密切相关的包括原癌基因和抑癌基因。后者在细胞周期、DNA 损伤修复、细胞分化等过程中均起到重要作用。体内

* 基金项目: 福建省大学生创新创业训练计划项目(201912631001)。

△ 通信作者, E-mail: zyong@xmcc.edu.cn。

本文引用格式: 陈锐泽, 张勇. DNA 甲基化水平检测在胃癌早期诊断中的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(3): 413-416.

DNA 异常甲基化主要发生在富含 CpG 岛的启动子区域,该区域的异常高甲基化会阻碍转录因子与启动子结合,从而使抑癌基因无法转录或者转录水平降低。抑癌基因的沉默易导致胃癌细胞生长分裂不受控制,甚至使肿瘤细胞有更多机会脱离原位细胞基质侵袭扩散至外周,从而促进胃癌的进一步发展^[12]。

3 胃癌中几种常见异常甲基化的基因

3.1 RUNX3 基因 RUNX3 基因主要位于人染色体 1p36.11,其表达的 RUNX3 蛋白是转化生长因子- β (TGF- β)信号转导通路中 Runt 转录因子的重要组成部分^[13],同时 RUNX3 蛋白也是重要的肿瘤抑制因子^[14],其在细胞分化、细胞周期调控、细胞凋亡和恶性转移过程中意义重大。有研究表明,RUNX3 蛋白能够调节胃黏膜上皮细胞的增殖和凋亡过程^[15],抑制正常胃组织细胞过度生长。而 RUNX3 基因启动子区域高甲基化会导致该蛋白表达下降,同时降低 TGF- β 信号转导通路敏感性。LU 等^[16]对胃癌患者血清中游离 RUNX3 基因启动子区 DNA 甲基化程度检测发现,该基因在胃癌细胞血清中的甲基化水平高达 75.2%。HU 等^[17]对比正常胃上皮组织与胃肿瘤组织发现,RUNX3 基因启动子区域甲基化程度与胃肿瘤细胞侵袭深度呈正相关。因此,RUNX3 基因有望成为胃癌早期诊断的重要标志物^[18]。

3.2 hMLH1 基因 hMLH1 基因位于人染色体 3q21-23,是人类 DNA 修复基因中的重要成员^[19],它能够编码 DNA 错配修复酶,从而调控细胞内源性修复功能,维持基因组的稳定性。同时,当机体 DNA 大量损伤时,hMLH1 基因编码的修复酶能够进一步被激活,修复错配的碱基对,防止 DNA 损伤的累积,从而抑制癌细胞的发展。有研究表明,hMLH1 基因启动子区异常高甲基化是正常胃黏膜细胞发生微卫星不稳定性(MSI)现象,甚至发展为胃癌的重要因素^[20]。因此,检测标本中 hMLH1 基因甲基化程度对胃癌早期诊断有重要意义。WANI 等^[21]研究发现,hMLH1 基因在胃癌中的甲基化率为 72.9%,同时 YE 等^[22]对 2 182 例胃癌病例及对照组进行 Meta 分析发现,胃癌组织或血清中 hMLH1 基因启动子异常甲基化与胃癌发生呈正相关,且在肿瘤中晚期(发展至淋巴结转移)表达明显下调,表明 hMLH1 基因启动子甲基化常发生在胃癌的发展阶段,且随着胃癌由癌前病变到肿瘤的发展过程中甲基化程度不断升高。因此,hMLH1 基因甲基化程度或可作为胃癌诊断的指标之一。

3.3 RASSF1A 基因 RASSF1A 基因属于 ras 家族的重要组成部分,其主要通过抑制细胞周期蛋白 D1 从而引起细胞周期阻滞,限制细胞无限制地分裂生长^[23]。以胃癌为主的原发性肿瘤细胞中常能够捕捉到 RASSF1A 基因的高甲基化^[24],而在肠化生、胃腺瘤等其他胃疾病中均未发现其异常甲基化的发生。

对比不同肿瘤 TNM 分期患者胃癌细胞 RASSF1A 甲基化程度发现,Ⅲ和Ⅳ期胃癌患者胃癌细胞甲基化频率明显高于Ⅰ和Ⅱ期胃癌患者胃癌细胞^[25],因此 RASSF1A 基因甲基化程度可能与胃癌分期联系密切,可作为胃癌诊断及治疗效果的监测指标之一。

3.4 SEPTIN9 基因 SEPTIN 基因可分为 13 种亚型,其中位于 17q25.3 的 SEPTIN9 基因与多种原发性肿瘤的发生密切相关。肿瘤细胞 SEPTIN9 基因 5'端的 CpG 岛多可检测出异常高甲基化^[26]。由 SEPTIN9 基因表达的 SEPTIN9 蛋白能调控细胞生长,防止其生长过快或不受控制性生长。而当 SEPTIN9 基因启动子区因高水平甲基化而沉默时,基因表达停止,正常细胞便不断向肿瘤细胞方向发展。SEPTIN9 基因高甲基化的检测已应用于结直肠癌的早期筛查、诊断、病理分期乃至术后预后判断中^[27]。有研究发现,胃癌的发生与 SEPTIN9 基因联系密切,这可能与 SEPTIN9 蛋白参与胃癌发展中的 MSI 现象密切相关^[26]。随着对该基因与胃癌关系更深入的研究,SEPTIN9 基因有望成为胃癌早期诊断的指标之一。

4 DNA 甲基化水平检测技术的进展

4.1 甲基化特异性聚合酶链反应(MSP) MSP 是传统的 DNA 甲基化水平检测技术,其针对特定甲基化位点两端设计引物,以亚硫酸盐化的待测样品为模板(亚硫酸化可将未甲基化的胞嘧啶可转化为尿嘧啶),利用实时定量 PCR 技术,实现待测标本甲基化水平的定量分析。由于 DNA 异常甲基化在肿瘤细胞中常有发生^[28],因此 MSP 在肿瘤监测中简便快捷,灵敏度较高。但由于定量 PCR 技术依赖于标准曲线进行绝对定量,因此要求所测基因需要有标准品。这给甲基化水平检测造成了一定的局限性。

4.2 数字 PCR(dPCR) dPCR 技术能够将标本均匀分隔后随机分配至不同腔室内进行检测,依据泊松分布的原理实现检测结果绝对定量^[29]。dPCR 能够不依赖标准品实现甲基化水平检测结果的绝对定量。同时,dPCR 能够极大地提高 DNA 甲基化水平检测的特异度和灵敏度。但是,dPCR 局限于测定 DNA 上单一一位点的甲基化水平,不能实现高通量的多位点甲基化水平测定。

4.3 二代测序(NGS) NGS 主要依据 DNA 测序技术能够检测标本中的 DNA 片段的序列及其含量,具有极高的检测通量及灵敏度。对标本进行亚硫酸盐处理后能够实现特定基因的甲基化水平检测。该技术能有效克服待测标本 DNA 含量少、检测位点单一等问题,实现甲基化水平检测微量、高通量,压缩了检测时间。此外,随着基于分子条形码(UMI)超深度 NGS(即针对不同标本加入特异性碱基序列,从而分辨识别假阳性标本)的发展,NGS 检验的灵敏度和特异度也在不断提高^[30]。然而,该方法成本高昂,不

适宜大规模推广^[31]。

5 小结与展望

随着对表观遗传学的深入探讨,越来越多的研究支持人体内 DNA 异常甲基化与胃癌的发生关系密切。然而,异常甲基化导致胃癌的机制尚未完全阐明,仍需要大量的随机对照研究来佐证。此外,DNA 异常甲基化与不同肿瘤发生之间也存在非特异性和不统一性。因此,胃癌的早期诊断仍需更高特异度的 DNA 异常甲基化水平模型支持辅助诊断。加强对胃癌 DNA 异常甲基化位点的研究,更深入研究特异性分子标志物在胃癌发生中的机制意义重大。此外,DNA 甲基化水平检测缺少同时具备高特异度和灵敏度的分析方法,MSP、dPCR 及 NGS 法检测基因甲基化水平各有短板,深入探索更多特定甲基化位点,定制胃癌特异性 DNA 甲基化水平检测基因芯片或有望克服现阶段的弊端。同时,DNA 异常甲基化水平的检测不仅对胃癌早期诊断有帮助,在相关肿瘤的治疗、预后判断中也发挥重要作用^[26]。目前,SEPTIN9 基因异常甲基化水平已运用于判断结直肠癌治疗的预后^[27]。因此,进一步阐明 DNA 异常甲基化在胃癌中的机制,探索特异性的分子标志物不仅能提高胃癌的早期诊断率,还能够辅助判断癌症进展,为临床治疗提供更多帮助。

参考文献

- [1] YAO K, DOYAMA H, GOTODA T, et al. Diagnostic performance and limitations of magnifying narrow-band imaging in screening endoscopy of early gastric cancer: a prospective multicenter feasibility study [J]. *Gastric Cancer*, 2014, 17(4): 669-679.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [3] LEVY I, GRALNEK I M. Complications of diagnostic colonoscopy, upper endoscopy, and enteroscopy [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2016, 30(5): 705-718.
- [4] VIRGILIO E, PROIETTI A, D'URSO R, et al. Measuring intragastric tumor markers in gastric cancer patients: a systematic literature review on significance and reliability [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(6): 2817-2821.
- [5] CHEN X, GOLE J, GORE A, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3475.
- [6] PHALLEN J, SAUSEN M, ADLEFF V, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(403): eaan2415.
- [7] OH J H, JUNG S H, HONG S J, et al. DNA methylation as surrogate marker for gastric cancer [J]. *J Cancer Prev*, 2015, 20(3): 172-178.
- [8] JONES P A, BAYLIN S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(6): 415-428.
- [9] FERNANDEZ A F, ASSENOV Y, MARTIN-SUBERO J I, et al. A DNA methylation fingerprint of 1 628 human samples [J]. *Genome Res*, 2012, 22(2): 407-419.
- [10] JOO M K, KIM K H, PARK J J, et al. CpG island promoter hypermethylation of Ras association domain family 1A gene contributes to gastric carcinogenesis [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 3039-3046.
- [11] WANG K, YUEN S T, XU J, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(6): 573-582.
- [12] TAMURA G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(2): 192-198.
- [13] CHEN F, LIU X, BAI J, et al. The emerging role of RUNX3 in cancer metastasis (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1227-1236.
- [14] BALMAIN A. Cancer: new-age tumour suppressors [J]. *Nature*, 2002, 417(6886): 235-237.
- [15] LI Q L, ITO K, SAKAKURA C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer [J]. *Cell*, 2002, 109(1): 113-124.
- [16] LU X X, YU J L, YING L S, et al. Stepwise cumulation of RUNX3 methylation mediated by *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinoma progression [J]. *Cancer*, 2012, 118(22): 5507-5517.
- [17] HU S L, HUANG D B, SUN Y B, et al. Pathobiologic implications of methylation and expression status of Runx3 and CHFR genes in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(2): 447-454.
- [18] 唐国华, 孙少卫, 贺修胜. Runx3 基因 CpG 岛甲基化与胃癌发生的关系 [J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41(5): 314-319.
- [19] XIAO X Q, GONG W D, WANG S Z, et al. Polymorphisms of mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 and risk of gastric cancer in a Chinese population [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(3): 591-598.
- [20] DUVAL A, HAMELIN R. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers [J]. *Ann Genet*, 2002, 45(2): 71-75.
- [21] WANI M, AFROZE D, MAKHDOOMI M, et al. Promoter methylation status of DNA repair gene (hMLH1) in gastric carcinoma patients of the Kashmir valley [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 4177-4181.
- [22] YE P, SHI Y, LI A. Association between hMLH1 promoter methylation and risk of gastric cancer: a meta-analysis [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 368.
- [23] SATO F, MELTZER S J. CpG island hypermethylation in progression of esophageal and gastric cancer [J]. *Cancer*, 2006, 106(3): 483-493.
- [24] ZHOU S L, CUI J, FAN Z M, et al. Polymorphism of A133S and promoter hypermethylation in Ras association domain family 1A gene (RASSF1A) is associated with risk of esophageal and gastric cardia cancers in Chinese

- population from high incidence area in northern China [J]. BMC Cancer, 2013, 13: 259.
- [25] GUO W, DONG Z, CHEN Z, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of RASSF1A in gastric cardia adenocarcinoma[J]. Cancer Invest, 2009, 27(4): 459-465.
- [26] FU B, YAN P, ZHANG S, et al. Cell-free circulating methylated SEPTIN9 for noninvasive diagnosis and monitoring of colorectal cancer [J]. Dis Markers, 2018, 2018: 6437104.
- [27] LI Y, SONG L, GONG Y, et al. Detection of colorectal cancer by DNA methylation biomarker SEPTIN9: past, present and future [J]. Biomark Med, 2014, 8(5): 755-769.
- [28] FORSHEW T, MURTAZA M, PARKINSON C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(136): 136ra68.
- [29] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: a technology review [J]. Sensors (Basel), 2018, 18(4): 1271.
- [30] SMITH T, HEGER A, SUDBERY I. UMI-tools: modeling sequencing errors in unique molecular identifiers to improve quantification accuracy [J]. Genome Res, 2017, 27(3): 491-499.
- [31] NEWMAN A M, BRATMAN S V, TO J, et al. An ultra-sensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. Nat Med, 2014, 20(5): 548-554.
- (收稿日期: 2021-01-29 修回日期: 2021-11-12)
- 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.03.037

近红外光谱仪在早产儿脑损伤方面的研究进展

向鑫宇 综述, 韦 红[△]审校

重庆医科大学附属儿童医院/中国儿童发育与危重症国际科学技术合作基地/国家儿童健康与疾患临床医学研究中心新生儿科/教育部儿童发育与疾患重点实验室重庆市儿科重点实验室, 重庆 400014

关键词: 近红外光谱仪; 早产儿; 脑损伤

中图分类号: R722.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)03-0416-03

近年来,随着医学技术的不断发展,早产儿的存活率明显增加,同时可存活早产儿的胎龄也越来越小,随之早产儿脑损伤发生风险越来越高,引起人们对这些患儿远期神经系统预后的担忧。目前研究显示,导致早产儿脑损伤的病因主要是脑的缺血缺氧及炎症^[1]。目前应用最广泛的机体氧合状态监测方法是外周脉搏血氧饱和度监测及动脉血气分析,但它们主要反映机体小动脉的氧分压及氧饱和度^[2],不能反映脑组织局部的氧合状态。运用多普勒技术可以进行脑灌注的评估及动态测量^[3],但使用多普勒技术进行大脑灌注变化的持续测量仍是比较困难的。而近红外光谱技术(NIRS)提供了一种连续监测大脑氧合状态的方法^[4]。通过将传感器放置于额部,NIRS可以监测脑局部血氧饱和度(rScO₂),同时还可以估计脑血流(CBF)和脑组织氧提取(cTOE)^[5]。这些NIRS的相关指标也可以与持续的血压测量相结合来监测大脑的自动调节功能^[6]。NIRS不仅可以监测大脑的氧合状态,也可以监测局部的内脏氧合,在贫血、高血流动力学改变的动脉导管未闭(hsPDA)、喂养不耐受、新生儿坏死性小肠结肠炎等方面均有所应用^[7-10]。

NIRS具有无创、无辐射的优点,且能在床旁实时

监测大脑氧合状态的变化及间接测量脑灌注。更重要的是,NIRS可用于评估病情危重、临床状态不稳定及使用呼吸机的患儿。但NIRS在临床应用中也存在某些缺陷,比如局部头皮的损伤及对远期神经系统预后影响的不确定性,此外,造价昂贵及一次性探针的使用也是NIRS至今仍未成为新生儿重症监护病房(NICU)中常规的辅助监测手段的原因之一。本文拟就NIRS在早产儿脑损伤方面的研究进展展开综述。

1 NIRS应用于大脑监测的原理

NIRS主要是基于朗伯比尔定律的原理。近红外光(波长在700~1 000 nm)能穿透新生儿的软组织及骨骼,但会被体内的一些物质所吸收,同时吸收的程度根据其的氧化状态不同也随之不同。这些物质包括血红蛋白(Hb)、组织细胞色素aa3和肌红蛋白、黑色素及胆红素^[11]。以Hb为例,NIRS可以实时测量氧合血红蛋白(O₂Hb)和脱氧血红蛋白(HHb)水平的变化^[12],可以得出以下信息:(1)rScO₂,反映机体实时的脑组织氧合状态;(2)组织氧合指数(TOI),结合TOI和rScO₂能间接反映脑血流情况^[13];(3)脑组织氧提取分数(cFTOE),反映脑组织摄取氧的能力,以及氧供给与氧消耗之间的平衡关系^[14];(4)将rScO₂

[△] 通信作者, E-mail: waehong@yahoo.com。

本文引用格式: 向鑫宇, 韦红. 近红外光谱仪在早产儿脑损伤方面的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(3): 416-418.