

SEPT9 基因甲基化在直结肠癌早期诊断中应用的临床意义

张立营 陈 朴 高 鹏 沈 伟

摘 要 **目的** 集中探讨 SEPT9 基因甲基化对于直结肠癌早期诊断中的临床应用意义。**方法** 随机选取 2015 年 3 ~ 12 月因患结直肠癌于笔者医院普外科进行手术治疗的患者 100 例,从术中切取的癌灶、其癌旁组织和术前粪便样本中提取 DNA,应用多重置换扩增(MDA)结合巢式甲基化特异性 PCR 扩增技术(nMPS)检测患者术前粪便样本中 SEPT9 基因的甲基化水平,同时比较粪便同癌灶组织中 SEPT9 基因甲基化在诊断结直肠癌中的敏感度及特异性。**结果** 针对 100 例患者的癌灶组织的 SEPT9 基因的分析的过程中,基因甲基化的发生率为 84.0%;在针对癌旁组织的 SEPT9 基因的过程中,基因甲基化的发生率为 8.0%。患者癌灶及癌旁组织 SEPT9 基因甲基化发生率的比较差异有统计学意义($P < 0.01$);临床分期为 I、II 期的结直肠癌患者,采用 SEPT9 基因甲基化诊断的准确率为 87.5%;临床分期为 III、IV 期的结直肠癌患者,采用 SEPT9 基因甲基化诊断的准确率为 80.0%。针对不同的临床分期,采用 SEPT9 基因甲基化诊断结直肠癌的准确率差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 因粪便中 SEPT9 基因甲基化检测在结直肠癌患者中的特异性和敏感度较高,可在临床中应用于直结肠癌的早期诊断。

关键词 SEPT9 基因 直结肠癌 早期诊断

中图分类号 R446

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.037

Study of Early Diagnosis of Colorectal Cancer by Analysis of Stool SEPT9 Gene Methylation. Zhang Liying, Chen Pu, Gao Peng, et al. Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Yibin, Sichuan 644000, China

Abstract **Objective** To investigate the diagnosis of colorectal cancer by analysis of SEPT9 methylation in stool DNA. **Methods** The stool SEPT9 gene methylation were detected by multiple displacement amplification/ nested methylation specific PCR, MDA - nMSP in 100 colorectal cancer tissues, para - cancer tissues and stool DNA. The sensitivity and specificity of SEPT9 methylation marker in colorectal cancer diagnosis were analyzed. **Results** Among 100 colorectal cancers, SEPT9 gene methylation was found in 84.0% of cancer tissues and 8.0% of para - cancer tissues respectively. The sensitivity and specificity of SEPT9 for diagnosis of colorectal cancer were 84.0% and 92.0%, respectively, and the stool SEPT9 had similar sensitivity as cancer tissues in diagnosis of colorectal cancer. There were no any differences for incidence of SEPT9 methylation among different clinical stages. **Conclusion** The abnormal methylation of SEPT9 happened frequently in colorectal cancer. Hypermethylation of SEPT9 gene methylation in stool DNA can be used as a candidate of tumor marker for early diagnosis of colorectal cancer.

Key words Septin9 gene; Colorectal neoplasms; Early diagnosis

相关临床数据表明,近年来我国患有直结肠癌的患者比例逐年攀升,发生率占据各种肿瘤疾病发生的前 5 位。目前临床上针对早期发现的直结肠癌患者主要采用手术治疗的方式,并且疗效较好^[1,2]。而对于直结肠癌晚期的患者在采用化疗联合分子靶向治疗后临床效果依然不佳^[3]。因此临床上能否对直结肠癌患者进行早期诊断对于疾病的治疗就显得尤为重要。常规采用大便潜血实验和结肠镜等检测手段对结直肠癌的患者进行确诊,但是前者存在特异性较

差的问题,同时结肠镜检查在临床操作中存在一定的局限性,上述情况对于疾病的早期诊断造成一定的障碍。随着对于疾病的深入研究,相关研究发现,直结肠癌患者患病的过程中体内的部分基因发生甲基化,将甲基化的异常基因作为分子标志物对于疾病的筛查具有一定的可操作性^[4,5]。考虑到患者粪便中存在正常及癌变的细胞及其游离的 DNA,同时肠道内的环境呈碱性,有利于 DNA 的保存和提取。本实验主要针对粪便中的 SEPT9 (Septin9) 基因甲基化在疾病诊断应用中的意义进行研究,现报道如下。

资料与方法

1. 一般资料:纳入 2015 年 3 ~ 12 月因患结直肠

作者单位:644000 宜宾市第一人民医院检验科

通讯作者:张立营,电子信箱:zhangli23ty@163.com

癌于笔者医院普外科进行手术治疗的患者 100 例,其中,男性 53 例,女性 47 例,患者年龄 38 ~ 79 岁,平均年龄 48.6 ± 4.3 岁;100 例患者术中癌灶及其癌旁组织的病理学检查结果显示,结肠癌患者 57 例,另 43 例为直肠癌患者,同时将组织标本放在 -80°C 的环境下保存。此外,对于 100 例患者在术前进行粪便标本收集,并在之后的 0.5h 内进行 DNA 提取操作,提取完成后 -20°C 保存。以上患者在术前均未接受其他与疾病相关的治疗,同时本次实验经过笔者医院的伦理协会审核批准,实验前均取得患者及其患者家属的知情同意,可进行实验研究。

2. 主要试剂与仪器:实验过程中需要组织、全血和粪便 3 种 DNA 试剂提取盒(前两种试剂盒选用天根公司、后一种选用 Bioneer 公司),试剂需要亚硫酸盐处理试剂(Promega 公司)和 PCR 扩增试剂(德国 Qiagen 公司),另外还需要对亚硫酸氢盐转化的 DNA 进行全基因组扩增试剂盒(德国 Qiagen 公司)和 X - Sss I 内切酶(英国 NEB 公司)。

3. 实验方法:(1)基因组 DNA 的提取:组织 DNA 的提取:将术中选取的组织置于液氮中进行研磨处理,完成后加入 DNA 提取液和蛋白酶 K,之后放入 37°C 的环境下保存。待液体变得清亮后根据说明书的要求提取 DNA,过程中选用饱和苯酚提取液。之后选用紫外分光光度仪进行指标的检测。粪便 DNA 的提取:在患者的粪便样本中提取 100 ~ 200mg,选用粪便 DNA 试剂提取盒并且按照说明进行 DNA 提取操作。另外按照与组织 DNA 检测相同的方法对于粪便 DNA 进行检测。全血 DNA 的提取:提取患者的外周血,选用全血 DNA 实际提取盒按照说明书进行 DNA 提取操作。另外,将血液中未经处理的淋巴细胞基因组设置为阴性对照,经 X - Sss I 内切酶处理的健康人的淋巴细胞基因组为阳性对照。(2)基因组 DNA 的亚硫酸氢盐修饰:DNA 经过亚硫酸氢盐修饰,CpG 中未甲基化的胞嘧啶将被转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不发生变化。组织基因组 DNA 参照试剂盒进行修饰;血、粪便基因组 DNA 的亚硫酸氢钠修饰:参照试剂盒说明书进行。(3)多重置换扩增:对亚硫酸氢盐转化的 DNA 进行全基因组扩增,按照试剂盒的说明进行具体的操作,去 $5\mu\text{l}$ 亚硫酸氢钠修饰的 DNA,之后加入相同剂量的蒸馏水。按照 1:29 的比例配置 $30\mu\text{l}$ 反应混合液,混合液中含有 REPLI - g Mi - di DNA polymerase EpiTect WBA Reaction Buffer 两种成分,混匀后放在 28°C 的环境中

进行时长为 8h 的基因组扩增。随后调节反应温度至 95°C 持续 5min。反应结束后,放置在 4°C 的环境中保存。(4)巢式甲基化特异性 PCR 和电泳分析:PCR 体系具体包括 $10 \times \text{Buffer } 2.5\mu\text{l}$, $0.2\mu\text{l}$ DNA 聚合酶, $2\mu\text{l}$ 的 dNTP,1 对外侧上下游引物 $1\mu\text{l}$, $2\mu\text{l}$ 未经(或经)MDA 扩增的基因组, $15.8\mu\text{l}$ 蒸馏水。按照上述剂量设置 3 组,分别为阳性、阴性及空白 3 种对照组。针对外侧引物 PCR 扩增的过程中,先将环境温度调整至 95°C ,持续 15.5min;随后将环境温度分别调至 55°C 和 72°C ,各持续 30s。上述过程为 1 个循环,反应持续 35 个循环,另外在 72°C 的环境中持续 7min 进行延伸处理。对于内侧引物 PCR 扩增过程中添加的 Buffer、TaqDNA 聚合酶、dNTP 和蒸馏水的剂量同外侧引物 PCR 扩增的剂量。另外上下游引物在甲基化和未甲基化状态下各准备 $1\mu\text{l}$,外侧经 PCR 扩增完成后的产物 $2\mu\text{l}$ 为模板。针对内侧引物 PCR 扩增的过程中,先将环境温度调整至 95°C ,持续 15min;之后将温度调节至 97°C ,持续 30s;随后依次调节环境温度至 63°C 和 72°C ,各持续 30s。上述过程为 1 个循环,反应持续 30 个循环,另外在 72°C 的环境中持续 7min 进行延伸处理。待内外侧引物经过 PCR 扩增处理后,取 $5\mu\text{l}$ 的扩增产物在 2% 的琼脂凝胶上进行电泳处理。

4. 观察指标:针对 100 例患者癌灶及癌旁组织 SEPT9 基因分析的过程中基因甲基化的发生率进行观察;另外针对不同临床分期中结直肠癌患者中 SEPT9 基因中甲基化诊断的准确率进行观察比较。

5. 统计学方法:应用 SPSS 15.0 软件分析,计量数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料采用百分比 (%) 表示,数据对比采取 χ^2 校验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 100 例患者癌灶及其癌旁组织 SEPT9 基因的甲基化变化:针对 100 例患者的癌灶组织的 SEPT9 基因的分析中,基因甲基化的发生率为 84.0% (84/100);在针对癌旁组织的 SEPT9 基因的分析中,其中基因甲基化的发生率 8.0% (8/100)。患者癌灶及癌旁组织 SEPT9 基因甲基化发生率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。另外针对结直肠癌诊断的敏感度为 84.0% (84/100),特异性为 92.0% (92/100)。

2. 结直肠癌的临床分期同 SEPT9 基因甲基化的关系:100 例患者中,有 48 例患者结直肠癌的临床分期为 I、II 期,采用 SEPT 基因甲基化诊断的准确率

为 87.5% (42/48); 另 52 例结直肠癌患者的临床分期为Ⅲ、Ⅳ期,采用 SEPT 基因甲基化诊断的准确率为 80.0% (42/52)。针对不同的临床分期,采用 SEPT 基因甲基化诊断结直肠癌的准确率差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.100 例患者粪便中 DNA SEPT9 基因甲基化变化:针对 100 例患者粪便 DNA 的 SEPT9 基因甲基化诊断的操作过程中,因 1 例在 PCR 扩增中操作失败,另 99 例患者粪便的 SEPT9 甲基化结果同癌

灶组织中的检测结果相一致,诊断率为 84.8% (84/99)。

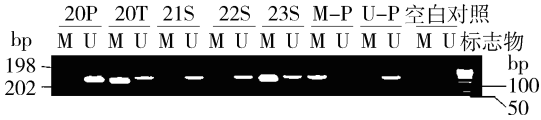


图 1 MDA - nMSP 检测直肠癌组织和粪便 SEPT9 基因甲基化

P. 癌旁组织;T. 癌组织;S. 粪便;E - p. 甲基化的阳性对照;
U - p. 未甲基化的阳性对照;标志物. 50bp DNA 标准分子质量

表 1 SEPT9 基因的超市甲基化特异性 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	片段(bp)
SEPT9F	GGTTAGTTTTGTATTGTAGGAC	55℃	382
SEPT9R	AATACCCCTAACAAAATCCCC		
SEPT - MF	TATTAGTTATTATGTCGGATTTCGC	63℃	198
SEPT - MR	GCCTAAATTAACCCGTC		
SEPT - UF	ATTAGTTATTATGTTGGATTTTGTGC	63℃	202
SEPT - UR	AAAACACCTAAATTAACCCATC		

讨 论

因 SEPT9 基因的 5'调控序列中存在 CpG 岛,直结肠癌患者在患病的过程中约 90% 的患者 SEPT9 基因中的该序列发生甲基化^[6,7]。对比癌灶旁及大肠周围的正常组织,该序列发生甲基化的比例约为1/10。作为直结肠癌发生的相关基因的特征性表现,可将 SEPT9 基因的检测用在临床直结肠癌的诊断中。

相关研究发现,在对患者外周血中游离 DNA 中的 SEPT9 基因进行甲基化检测的过程中,诊断的敏感度超过 70%,同时特异性在 90% 以上^[8]。另外,在最近的结直肠癌的大鼠模型中,研究者在针对粪便和外周血中 SEPT9 基因甲基化检测的比较中发现,粪便中提取的 SEPT9 基因的甲基化的诊断率更高,对于临床早期诊断结直肠癌具有一定的应用意义^[9]。针对本次实验,笔者发现针对 100 例患者的癌灶组织的 SEPT9 基因的分析中,其中基因甲基化的发生率为 84.0%;在针对癌旁组织的 SEPT9 基因的分析中,其中基因甲基化的发生率 8.0%。在患者癌灶及癌旁组织 SEPT9 基因甲基化发生率的比较中,二者差异有统计学意义($P<0.01$)。另外针对结直肠癌诊断的敏感度为 84.0%,特异性为 92.0%,这与之之前的相关报道结果相一致,再次验证了 SEPT9 基因甲基化在结直肠癌诊断中特异性高的特点^[10,11]。

本实验针对不同临床分期的结直肠癌患者的研究发现,临床分期为Ⅰ、Ⅱ期的结直肠癌患者,采用 SEPT 基因甲基化诊断的准确率为 87.5%;临床分期

为Ⅲ、Ⅳ期的结直肠癌患者,采用 SEPT 基因甲基化诊断的准确率为 80.0%。针对不同的临床分期,采用 SEPT 基因甲基化诊断结直肠癌的准确率差异无统计学意义($P>0.05$)。笔者认为癌变的器官因具有与外界相同的特点,在一定程度上造成了癌细胞易脱落。同时,癌变器官呈碱性,有利于细胞和基因的保存^[12]。另外,针对 100 例患者粪便 DNA 的 SEPT9 基因甲基化诊断的操作过程中,因 1 例在 PCR 扩增中操作失败,另 99 例患者粪便的 SEPT9 甲基化结果同癌灶组织中的检测结果相一致,诊断率为 84.8%,该结果与之前组织中 SEPT9 基因甲基化检测的结果基本一致,验证了粪便同癌灶中 SEPT9 基因甲基化的改变具有高度的相关性^[13]。

回顾本次实验的操作过程,笔者将 MDA 技术联合 nMSP 检测患者粪便中 SEPT9 基因的甲基化,仅有 1 例患者的粪便中的基因因操作的原因造成提取失败,同时粪便中 SEPT9 基因呈甲基化的患者数同在癌灶中提取的 SEPT9 基因显示甲基化的患者数完全一致,取得了非常理想的效果,在一定程度上提高了 SEPT9 基因检测的敏感度,可在临床上推广使用^[14,15]。最后,本项实验因样本量选取较少,可能会对数据造成一定的局限性。

参考文献

1 Hart AR, Kennedy HJ. Preventing bower cancer: an insight of clinicians[J]. Ther Adv Med Oncol, 2011, 3: 269 - 277

(下转第 152 页)

显著提高了在年龄 > 50 岁患者的特异性, 特异性增加了 9.78%, 同时没有降低敏感度, Youden 指数比较证实了两者的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。特异性的提高可以减少患者一些不必要的检查, 降低住院日期和住院费用。这表明年龄校正 D - 二聚体临界值标准在国人疑似肺栓塞确诊过程中同样适用。

参考文献

- Pollack CV, Schreiber D, Goldhaber SZ, *et al.* Clinical characteristics, management, and outcomes of patients diagnosed with acute pulmonary embolism in the emergency department: initial report of EMPEROR (Multicenter Emergency Medicine Pulmonary Embolism in the Real World Registry) [J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 57(6): 700 - 706
- 赵梦华, 石建平, 张学强. 急性肺栓塞临床研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2012, 41(6): 179 - 181
- 陈灏珠, 钟南山, 陆再影. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 99 - 106
- Rezaie SR, Swaminathan A, Chan T, *et al.* Global emergency medicine journal club: a social media discussion about the Age - Adjusted D - Dimer Cutoff Levels To Rule Out Pulmonary Embolism Trial [J]. Ann Emerg Med, 2015, 65(5): 604 - 613
- 中华医学会心血管病学分会肺血管病学组. 急性肺血栓栓塞症诊断治疗专家共识 [J]. 中华内科杂志, 2010, 49(1): 75 - 81
- 张金彪, 代荣琴. D - 二聚体检测的研究进展及其临床价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9): 1152 - 1153
- 董怀平, 李庆敏. D - 二聚体检测的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1134 - 1135
- Konstantinides S, Torbicki A, Agnelli G, *et al.* Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism [J]. Eur Heart J, 2014, 35(45): 3033 - 3080
- Wells PS, Anderson DR, Rodger M, *et al.* Excluding pulmonary em-

bolism at the bedside without diagnostic imaging: management of patients with suspected pulmonary embolism presenting to the emergency department by using a simple clinical model and D - dimer [J]. Ann Intern Med, 2001, 135(2): 98 - 107

- Schouten HJ, Geersing GJ, Koek HL, *et al.* Diagnostic accuracy of conventional or age adjusted D - dimer cut - off values in older patients with suspected venous thromboembolism: systematic review and Meta - analysis [J]. BMJ, 2013, 346: f2492
- Anderson DR, Kovacs MJ, Dennie C, *et al.* Use of spiral computed tomography contrast angiography and ultrasonography to exclude the diagnosis of pulmonary embolism in the emergency department [J]. J Emerg Med, 2005, 29(4): 399 - 404
- Sohne M, Kamphuisen PW, van Mierlo PJ, *et al.* Diagnostic strategy using a modified clinical decision rule and D - dimer test to rule out pulmonary embolism in elderly in - and outpatients [J]. Thromb Haemost, 2005, 94(1): 206 - 210
- Righini M, Goehring C, Bounameaux H, *et al.* Effects of age on the performance of common diagnostic tests for pulmonary embolism [J]. Am J Med, 2000, 109(5): 357 - 361
- Flores J, Garcia de Tena J, Galipienzo J, *et al.* Clinical usefulness and safety of an age - adjusted D - dimer cutoff levels to exclude pulmonary embolism: a retrospective analysis [J]. Intern Emerg Med, 2015, 9(7): 1123 - 1134
- Penaloza A, Roy PM, Kline J, *et al.* Performance of age - adjusted D - dimer cut - off to rule out pulmonary embolism [J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(7): 1291 - 1296
- Righini M, Van Es J, den Exter PL, *et al.* Age - adjusted D - dimer cut off levels to rule out pulmonary embolism: the Adjust - PE study [J]. JAMA, 2014, 311(11): 1117 - 1124

(收稿日期: 2016 - 01 - 25)

(修回日期: 2016 - 01 - 26)

(上接第 144 页)

- Kalimutho M, Di Cecilia S, Del Vecchio Blanco G, *et al.* Epigenetically silenced miR - 34b/c as a novel faecal - based screening marker for colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2011, 104: 1770 - 1778
- Hibi K, Goto T, Shirahata A, *et al.* Detection of TFPI2 methylation in the serum of colorectal cancer patients. Cancer Lett, 2011, 311: 96 - 100
- Mori Y, Oлару AV, Cheng Y, *et al.* Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by methylation microarray - based scanning [J]. Endocr Relat Cancer, 2011, 18: 465 - 478
- Ahlquist DA, Taylor WR, Mahoney DW, *et al.* The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 tests in detecting colorectal neoplasia [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012, 10: 272 - 277
- Ding C, Li X, Ge Y, *et al.* Fluorescence detection of telomerase activity in cancer cells based on isothermal circular strand displacement polymerization reaction [J]. Anal Chem, 2010, 82: 2850 - 2855
- Tanzer 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: e9061
- Coppede F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation [J]. Cancer Lett, 2014, 342(2): 238 - 247
- Ashktorab H, Brim H. DNA methylation and colorectal cancer [J]. Curr Colorectal Cancer Rep, 2014, 10(4): 425 - 430

- Kostin PA, Zakharchevskaia NB, Generozov EV, *et al.* Hypermethylation of the CDH1, SEPT9, HMTF and ALX4 genes and their diagnostic significance in colorectal cancer [J]. Vopr Onkol, 2010, 56(2): 162 - 168
- Toth K, 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
- Kang Q, Jin P, Yang L, *et al.* Significance of Septin 9 gene methylation detection of plasma circulation DNA in colorectal cancer screening [J]. Zhonghua Yixue Zazhi, 2014, 94(48): 3839 - 3841
- Tanzer 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
- Olkhov - Mitsel E, Zdravic D, Kron K, *et al.* Novel multiplex MethyLight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids [J]. Sci Rep, 2014, 4: 4432
- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 - 90

(收稿日期: 2016 - 01 - 26)

(修回日期: 2016 - 02 - 17)