

DNA 甲基化生物标志物在结直肠癌早期诊断与治疗中的应用进展

Advances in DNA methylation biomarkers for early diagnosis and treatment of colorectal cancer

旦真甲¹, 曹钦兴¹, 严力¹, 庞明辉^{1,2△}

DAN Zhen-jia, CAO Qin-xing, YAN Li, PANG Ming-hui

1. 电子科技大学医学院, 四川 成都 610054; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学附属医院)老年综合外科, 四川 成都 610072

【摘要】 结直肠癌是我国乃至全球最常见的恶性肿瘤之一,是导致死亡的一个重要原因。由于结直肠癌患者早期无特异性症状,绝大多数就诊患者已处于中晚期,早期发现早期治疗可以显著提高患者的生存质量,降低结直肠癌的病死率。近年来随着表观遗传学研究的深入,逐渐改变了人们对于肿瘤发生发展的认知。DNA 甲基化是结直肠癌最常见的表观遗传学改变,DNA 甲基化生物标志物是一种非侵入性的,崭新的,高效的检测手段。此外,大量研究也证实了 DNA 甲基化标志物在预测治疗反应、辅助治疗及耐药性评估上具有独特优势,在未来可以用于增强化疗方案的疗效和改善患者的化疗反应,甚至治疗多重耐药等。本文对 DNA 甲基化生物标志物在结直肠癌早期诊断与治疗的研究进展进行综述。

【关键词】 结直肠癌;DNA 甲基化;生物标志物;早期筛查

【中图分类号】 R735.3

【文献标志码】 B

【文章编号】 1672-6170(2024)04-0176-05

结直肠癌作为全球公共卫生问题,其发病率受饮食和生活习惯改变的影响呈上升趋势。早期检测和诊断对提高生存率至关重要。常规的结肠镜和粪便免疫化学试验(FIT)在结直肠癌筛查中存在局限。当前,DNA 甲基化分析作为一种新兴筛查手段,可用于分子诊断的补充。DNA 甲基化是结直肠癌发病过程中的关键表观遗传改变,与基因表达的改变及癌症特异性生物标志物的潜力相关。它帮助识别肿瘤亚型,指导个体化治疗。然而,甲基化酶抑制剂的非特异性作用需注意,诱发致癌基因表达。本综述评估了 DNA 甲基化标志物在结直肠癌诊断、预后和治疗响应预测中的应用,并探讨其作为开发表观遗传治疗靶点的潜力,指向未来精准医疗的发展^[1,2]。

1 DNA 甲基化与结直肠癌发生发展的关系

结直肠肿瘤的 DNA 甲基化状态改变,可能与衰老、慢性炎症和缺乏维生素和其他营养素的饮食有关^[3]。

1.1 炎症刺激导致 DNA 甲基化 由于慢性炎症的长期刺激导致异常 DNA 甲基化,是结直肠癌发生的一个重要原因,这些变化加速转化,并通过激活与致癌有关的各种信号通路进一步导致肿瘤进展和转移。当慢性炎症持续时,免疫监视机制失效,然后抑制抗肿瘤免疫应答导致肿瘤发展。患有慢

性肠道炎症的患者患结直肠癌的风险要高得多,例如患有克罗恩病及溃疡性结肠炎的患者,其结直肠癌发病率远高于正常人^[4,5]。

1.2 衰老因素导致 DNA 甲基化 DNA 甲基化可导致 DNA 的内源性损伤突变发生,进而影响细胞凋亡、衰老和死亡。重要的是,年龄相关性 DNA 甲基化的改变可能在腺瘤向结直肠的转变过程中发挥了重要作用,如 ESR 1、SFRP 1 和 SYNE 1 等年龄相关性基因常表现为高甲基化,这可能解释了高龄患者出现结直肠癌的可能原因^[6]。

1.3 营养及心身问题导致 DNA 甲基化 除年龄外,已知代谢和营养因素也会影响表观遗传机制,如 B 族维生素在 DNA 代谢中起着关键作用,在维持 DNA 甲基化方面有重要作用。容易忽视的是,身心疾病可能与甲基化状态的改变相关,如创伤后应激障碍、抑郁症、创伤后成长和复原力,但其甲基化改变的具体机制和是否促进癌症的发生发展尚不明确^[7,8]。

2 DNA 甲基化生物标志物在结直肠癌早期诊断中的应用

结直肠癌的传统检测方法包括粪便隐血试验、血液肿瘤标志物检测,如癌胚抗原(CEA)和 CA19-9 并以肠镜检查作为诊断的金标准。肠镜检查能发现早期病变,但由于其有创性和一定风险,非侵入性的液体活检成为了另一选择,尤其是在粪便中检测循环游离 DNA 进行早期筛查。DNA 甲基化改变是结直肠癌早期可检测的标志物,如 Wnt 信号通路、DNA 修复过程、细胞周期调节相关基因的甲基化状态,为早筛提供了可能。单靶点甲基化标志物虽然在敏感性和特异性上有所提高,但多靶点组合

【基金项目】四川省科技厅重点研发项目(编号:2022YFS0220; 2023YFS0185;2023YFS0197);电子科技大学医工交叉联合基金(编号:ZYGX2021YGLH212)四川省自然科学基金(编号:2022NSFSC1541);电子科技大学-四川省人民医院“医工交叉联合基金”(编号:ZYGX2021YGLH022)

△通讯作者

检测能够提供更高准确性。例如, FDA 批准的多位点 DNA 试剂盒 Cologuard 在筛查结直肠癌中表现出较高的敏感性和 FIT 方法相比更优的结果。此外, 粪便和血液样本中的 DNA 甲基化检测提供了革新的筛查手段, 如 ColonES 检测显示了较高的敏感性和特异性。此外, 心理因素和疾病认知对于筛查依从性仍有显著影响, 特别是在年轻人中, 防御性心理可能降低筛查率。因此, 在发展新的早筛手段时, 可能需要心理干预以提高筛查效果。综上所述, 表观遗传学变化对于结直肠癌筛查具有重要作用, 多标志物联合筛查策略显示了很大潜力, 但需要更多研究以提高筛查方法的灵敏性、特异性, 并考虑心理和社会因素对筛查依从性的影响。

2.1 DNA 甲基化生物标志物在结直肠癌早期诊断中的基因及载体 在结直肠肿瘤中, 其甲基化改变通常在肿瘤处于腺瘤阶段或癌症的早期阶段就已经发生, 而从腺瘤阶段或者早癌阶段, 发展为进展期肿瘤通常需要较长的时间, 这个时间段为结直肠肿瘤的筛查提供了重要的窗口期^[9]。目前已在结直肠癌患者的组织和体液中研究了各种基因的异常甲基化, 这些基因有望作为结直肠癌筛查的潜在生物标志物。例如与 Wnt 信号通路相关的基因^[10] (APC、AXIN2、DKK1、SFRP1、SFRP 2、WNT5A), 影响 DNA 修复过程的基因 (MGMT、MSH 2)^[11]; 影响细胞周期调节的基因 (CDKN 2A、CDKN2B)^[12]; 影响 RAS 信号级联通路的 RASSF 基因^[12], 这些与信号通路或 DNA 损伤修复等相关的基因甲基化改变可能作为结直肠癌早筛的潜在诊断工具。

粪便、血液、组织等中的 DNA 甲基化标志物都可以作为结直肠癌早期诊断载体选择, 粪便作为一种极具前途的胃肠道癌症检测样本已被大量研究证实, 而血液检测用于筛查结直肠癌人群也极具前景。Mo 等^[13]针对“传统”结直肠癌筛查手段敏感度欠佳的尖锐问题进行攻坚, 成功研发并验证了一种新的 ctDNA 甲基化单倍型检测手段 ColonES。数据表明 ColonES 对于进展期结直肠腺瘤和结直肠癌的检测敏感性分别达到了 79.0% 和 86.6%, 在健康人群中的特异性达到 88.1%。此外研究还证实了术前 ctDNA 甲基化水平高低与结直肠癌患者的预后密切相关, 可用于预测结直肠癌的预后。且有研究显示相较于提供粪便样本, 患者更倾向提供血液样本^[14], 这意味着在健康人群中采取血液检查所获得依从性可能会更高, 更有利于筛查计划的开展。

2.2 单基因与多基因 DNA 甲基化生物标志物在结直肠癌早期诊断的应用 DNA 甲基化生物标志物在多项研究中展现极佳的筛查能力。如多项研

究报告了 NDRG4 甲基化筛查结直肠癌和结直肠腺瘤的能力, 在各种样本类型中的敏感性为 27.8% ~ 81%, 特异性为 78.1% ~ 91.7%^[15, 16]。此外多项研究报告了血液、粪便和组织样本中 BMP 3 基因的启动子甲基化情况, 其对结直肠癌和晚期腺瘤的筛查灵敏度为 33.3% ~ 56.66%, 特异性为 85% ~ 94%^[17]。单靶点的甲基化标志物的筛查能力优劣不一, 难以在临床实践中取得满意的效果。

生物标志物组, 即多个甲基化标志物联合筛查可获得更高的灵敏度和特异性。Imperiale 等^[18]在 2014 年的研究中选取了 9989 名无症状对象进行研究, 发现多位点 DNA 检测检出结直肠癌的敏感性为 92.3%, FIT 为 73.8%, 展现了多靶点液体活检在筛查中的重要作用。基于此研究, FDA 批准了用于筛查结直肠癌的多位点 DNA 试剂盒 (Cologuard), 2018 年 Cologuard 被纳入美国癌症协会更新的结直肠癌筛查指南^[19]。在 Ahlquist 等^[20]的研究中, 收集了 252 例结直肠癌患者、133 例腺瘤直径 ≥ 1 cm 的腺瘤患者、293 例健康受试者的粪便, 通过四个甲基化基因 (VIM、NRG4、BMP3 和 TFPI2) 联合检测, 显示其灵敏度为 87%, 特异性为 93%, 基于这些研究, 最终成功设计了 ColoGaurdTM 试剂盒。此外, 后续开发的 TriMeth (C9orf50、KCNQ 5 和 CLIP 4) 检测, 以及生物标志物组 (GDNF、SNAP 91 和 NDRG 4) 在早期检测结直肠癌上也展现出了巨大的潜力。

总之, 表观遗传学变化在结直肠肿瘤发生的各个方面、从肿瘤发生到进展, 都发挥着重要作用。不同癌症类型的每个阶段都会产生独特的表观遗传特征, 这使得它们成为当前临床检测方法的有利补充。多种生物标志联合分析可显著提高结直肠息肉和结直肠癌的诊断准确性, 因此使用表观遗传或遗传和表观遗传生物标志物组合似乎是早期结直肠癌诊断的非常有希望的策略。此外, 粪便样本及血液样本甲基化检测均具有极高的灵敏性和特异度, 这为丰富筛查手段起到了重要作用。

3 DNA 甲基化在结直肠癌复发转移评估中的应用

3.1 DNA 甲基化与结直肠癌复发转移的关联 在全基因组水平上, 各种研究表明, 某些逆转录因子低甲基化与结直肠癌的存活率相关联。例如, 肿瘤 LINE-1 低甲基化与 II 期结肠癌较差的总体生存率相关。此外, 某些抑癌基因的高甲基化状态与不良的临床结果显著相关^[21]。例如, CDKN 2A 高甲基化与结直肠癌患者的不良预后和复发和转移风险增加相关。同时, 细胞外基质重塑途径相关的关键基因亚组的甲基化状态与结直肠癌患者预后显著相关^[22]。

3.2 DNA 甲基化在结直肠癌复发转移评估中的应用 DNA 甲基化在结直肠癌的复发转移评估中发挥着重要作用。研究表明,DNA 甲基化模式的改变与结直肠癌的发展和进展密切相关。通过检测特定基因的甲基化状态,可以预测潜在的结直肠癌复发转移风险。

Huang 等^[23]的研究中选取了 94 例为 II ~ III 期结直肠癌患者,通过评估组织及血清中 mSEPT9 表达程度,发现 SEPT 9 是 II 期和 III 期结直肠癌患者的独立预后标志物。SEPT 9 表达阳性患者的术后 DFS 低于 SEPT 9 表达阴性者。血清中 SEPT 9 表达阳性与结直肠癌的晚期密切相关。通过对肿瘤组织中 septin 9 蛋白的检测,发现当肿瘤组织中 septin 9 蛋白低表达时,其基因甲基化水平在血浆中往往偏高,肿瘤组织中 septin 9 蛋白高表达往往与预后不良相关。提示血清中 Septin 9 基因甲基化是导致患者预后不良的重要因素。Lu 等^[24]的研究中比较了 CEA、CA19-9 与 mSEPT9 在结直肠癌患者的预后预测效能,结论表明,与 CEA 和 CA 19-9 相比,SEPT 9 可能是结直肠癌预后的潜在生物标志物。术后 SEPT 9 状态可能代表结直肠癌复发或转移的非侵入性标志物。

目前的研究揭示了部分基因的 DNA 甲基化状态与结直肠癌患者的晚期疾病阶段或不良结局相关,但还没有足够的证据用于结直肠癌的常规临床实践。这些标志物对预测患者的复发转移显示出了极高的价值,值得进一步在前瞻性队列中进行研究。在未来,通过评估 DNA 的甲基化状态可能有助于确定有效的诊断标志物,用于设计个体化策略以改善结直肠癌患者的预后。

4 DNA 甲基化在结直肠癌治疗中的应用

局部进展期结直肠癌的新辅助治疗是一种有充分证据的疗法,然而部分患者对新辅助治疗抗药或耐药。迄今为止缺乏应用于临床实践的标志物,以指导特定患者亚组的个体化治疗。因此,尽管在结直肠癌患者中应用新辅助治疗取得了长足的进步,仍迫切需要确定新的潜在生物标志物。对于 III 期结直肠癌患者来说,患者复发转移风险高,需要接受后续治疗。然而,II 期结直肠癌患者辅助治疗的决定一直是肿瘤学领域最具挑战性和争议性的临床议题之一。如何识别具备高复发风险的患者,目前缺乏有效区分预后不良患者和无复发患者的生物标志物。

4.1 DNA 甲基化标志物在结直肠癌治疗中的基因 在目前的研究中,De Maat 等^[25]在 2010 年的研究中首次指出 DNA 甲基化在直肠癌新辅助治疗预

后中的重要性,发现 MINT3 的高甲基化和 MINT17 的低甲基化与降低复发风险相关。Ebert 等^[26]的研究进一步证明了 TFAP2 E 基因高甲基化和直肠癌患者对新辅助治疗的无应答之间的关联。此外,Molinari 等^[27]在分析了直肠癌患者的肿瘤组织中 24 种肿瘤抑制基因后发现,只有 TIMP3 甲基化状态与治疗反应有显著差异,未响应新辅助治疗的患者展现出 TIMP3 低甲基化。Sun 等^[28]则从血清样本中 MGMT 的甲基化状态揭示了其与治疗响应性的关联。然而,尽管有这些前期发现,关于 DNA 甲基化在预测新辅助治疗反应方面的研究仍然较少。Liu 的研究通过多中心试验,突显了新辅助治疗后个体化检测在预测复发风险上的潜在价值。未来研究需扩增样本量,以验证 DNA 甲基化作为新辅助治疗响应的预测标志物,以及其在术后治疗决策和耐药性评估中的应用潜力^[29]。

4.2 DNA 甲基化标志物在结直肠癌治疗中的评估 Gao 等^[30]借助结合癌症生物标志物和基因特征集的方法,为 II 期结直肠癌患者提供了无复发生存期的预测,并识别出可能从氟尿嘧啶辅助化疗中获益的亚群。Li 等^[31]通过分析 DNA 甲基化,开发了一个八个 CpG 位点组成的分类器,成功预测了辅助化疗后的复发风险,此分类器将高风险患者与不良预后显著相关联。同时,其他研究发现特定基因甲基化状态与 II 期结直肠癌的肝转移风险有关。随着 DNA 甲基化风险评估模型提供比传统临床病理学标准更精确的风险信息,其在预测 II 期结直肠癌患者的复发风险方面表现出潜力,有助于区分高低风险患者群体以及指导辅助化疗的决策。未来研究需要更大规模的样本以进一步确认 DNA 甲基化的临床应用价值。

4.3 DNA 甲基化标志物在结直肠癌治疗中的耐药性评估 研究发现化疗耐药性主要与 DNA 甲基化有关,纠正异常甲基化模式可以改善化疗反应。Wong 等^[32]的研究中发现在 KRAS 阳性表达的结直肠癌细胞中,溶质载体家族 25 成员 22 (SLC 25 A22)可以促进琥珀酸的积累,导致 DNA 甲基化增加,进而出现对 5-氟尿嘧啶的耐药。抑制这一途径有望用于治疗结直肠癌。表观遗传变化的可塑性为设计针对参与表观遗传修饰的蛋白质的特异性靶向治疗抑制剂提供了可能。FDA 已经批准了这些化合物中的几种用于治疗某些癌症,例如氮杂胞苷(商品名 Vidaza)^[33]。最近的研究强调开发靶向组蛋白脱乙酰酶和 DNA 甲基转移酶抑制剂的药物,作为一种新兴的抗癌策略,可能成为未来精准医学的基础。

5 DNA 甲基化生物标志物面临的挑战与展望

表观遗传调控在结直肠癌的发生发展中扮演关键角色,特别是 DNA 甲基化修饰在肿瘤发展中极为重要。表观遗传学改变被证明对结直肠癌的早期检测、治疗反应监测及预后评估具有重要价值。为深化其临床应用,需在肿瘤各发展阶段检查特定标志物,但在实际临床应用中验证这些标志物的有效性仍是挑战。虽然单一标志物相对传统肿瘤标志物更为敏感和特异,但更准确的筛查可能需结合多种标志物。现阶段研究大多基于小样本和回顾性分析,缺少大样本和前瞻性研究,导致选择偏倚,急需高质量研究。早期发现结直肠癌可显著提高生存率和生活质量,而在晚期需要 DNA 甲基化标志物来预测治疗反应、选择治疗方案及预测耐药性,以指导治疗。然而,要将表观遗传标志物常规用于早期检测、复发监测和治疗效果预测,还需更多数据支撑。

【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Navarro M, Nicolas A, Ferrandez A, et al. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2017, 23(20):3632-3642.
- [3] Tiffon C. The impact of nutrition and environmental epigenetics on human health and disease [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3425.
- [4] Yang ZH, Dang YQ, Ji G. Role of epigenetics in transformation of inflammation into colorectal cancer [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(23): 2863-2877.
- [5] Rhodes JM. Nutrition and gut health: the impact of specific dietary components-it's not just five-a-day [J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2020, 80(1): 9-18.
- [6] Galamb O, Kalmár A, Bartók BK, et al. Aging related methylation influences the gene expression of key control genes in colorectal cancer and adenoma [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(47):10325-10340.
- [7] Al Jowf GI, Snijders C, Rutten BPF, et al. The molecular biology of susceptibility to post-traumatic stress disorder: highlights of epigenetics and epigenomics [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19):10743.
- [8] Mehta D, Miller O, Bruenig D, et al. A systematic review of DNA methylation and gene expression studies in posttraumatic stress disorder, posttraumatic growth, and resilience [J]. *Journal of Traumatic Stress*, 2020, 33(2): 171-180.
- [9] Corley DA, Jensen CD, Marks AR, et al. Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death [J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 370(14): 1298-1306.
- [10] Lo AWI, Amiot A, Mansour H, et al. The detection of the methylated wif-1 gene is more accurate than a fecal occult blood test for colorectal cancer screening [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(7): e99233.
- [11] Chen W, Xiang J, Chen DF, et al. Screening for differentially methylated genes among human colorectal cancer tissues and normal mucosa by microarray chip [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(5): 3457-3464.
- [12] Azuara D, Rodriguez-Moranta F, de Oca J, et al. Novel methylation panel for the early detection of colorectal tumors in stool DNA [J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2010, 9(3): 168-176.
- [13] Mo S, Dai W, Wang H, et al. Early detection and prognosis prediction for colorectal cancer by circulating tumour DNA methylation haplotypes: a multicentre cohort study [J]. *eClinicalMedicine*, 2023, 55: 101717.
- [14] 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 Gastroenterology*, 2014, 14(1):183.
- [15] Park SK, Baek HL, Yu J, et al. Is methylation analysis of SFRP2, TFPI2, NDRG4, and BMP3 promoters suitable for colorectal cancer screening in the Korean population? [J]. *Intestinal Research*, 2017, 15(4):495-501.
- [16] Xiao W, Zhao H, Dong W, et al. Quantitative detection of methylated NDRG4 gene as a candidate biomarker for diagnosis of colorectal cancer [J]. *Oncology Letters*, 2015, 9(3): 1383-1387.
- [17] Rokni P, Shariatpanahi AM, Sakhinia E, et al. BMP3 promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA in colorectal cancer patients [J]. *Genes & Genomics*, 2018, 40(4): 423-428.
- [18] Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening [J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 370(14): 1287-1297.
- [19] Worm Ørntoft M-B. Review of blood-based colorectal cancer screening: how far are circulating cell-free dna methylation markers from clinical implementation? [J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2018, 17(2): e415-e33.
- [20] Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(2): 248-256.
- [21] Kim SH, Park KH, Shin SJ, et al. CpG island methylator phenotype and methylation of Wnt pathway genes together predict survival in patients with colorectal cancer [J]. *Yonsei Medical Journal*, 2018, 59(5):588-594.
- [22] Yi J M, Dhir M, Van Neste L, et al. Genomic and epigenomic integration identifies a prognostic signature in colon cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(6): 1535-1545.
- [23] Huang M, He J, Lai W, et al. Methylated septin 9 gene is an important prognostic marker in stage II and stage III colorectal cancer for evaluating local recurrence or distant metastasis after surgery [J]. *BMC Gastroenterology*, 2022, 22(1):87.
- [24] Lu P, Zhu X, Song Y, et al. Methylated septin 9 as a promising biomarker in the diagnosis and recurrence monitoring of colorectal cancer [J]. *Disease Markers*, 2022, 2022: 1-8.
- [25] de Maat MFG, van de Velde CJH, Benard A, et al. Identification of a quantitative MINT locus methylation profile predicting local regional recurrence of rectal cancer [J]. *Clinical Cancer Research*,