血浆 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化检测对结直肠癌诊断的临床价值

李 建¹, 樊 华², 贺晓斌¹, 吴耀禄², 李晓勇^{3*}

(延安大学附属医院 1. 腺体血管外科, 2. 胃肠外科, 3. 肝胆外科, 陕西 延安, 716000)

摘要: 探讨 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化对结直肠癌的诊断价值, 收集结肠镜检查和组织病理学确诊为结直肠癌的患者 47 例, 非结直肠癌的对照组 33 例; 测定两组外周血浆中 SFRP1 和 Septin9 基因的甲基化状态, 并且进行粪隐血检测。结果显示, SFRP1 和 Septin9 基因甲基化诊断结直肠癌的敏感度为 80.0%, 特异度为 95.3%, 粪便免疫学检测的敏感度为 86.3%, 特异度为 54.3%, 两者结合后敏感度为 97.6%, 特异度为 96.8%, 且明显高于单独检测。故 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化联合粪免疫学检查可提高结直肠癌诊断的敏感度和特异度, 而且具有无创、采样简单、依从性强、实验方法稳定等特点, 适宜于临床推广使用。

关键词: SFRP1; Septin9; DNA 甲基化; 结直肠癌; 诊断

中图分类号: R73-37

文献标识码: A

早期筛查和科学的干预能够降低结直肠癌的发病率和病死率, 传统使用的筛查方法为粪隐血试验、乙状结肠癌和直接肠镜检查等, 而肠镜筛查由于自身侵入、取样不便、特异性低等因素得不到广泛的应用^[1-2]。因此寻求一种较为简便、快捷、灵敏度高、特异性强的标志物成为目前研究的重点和难点^[3-6]。国外学者报道, 结直肠癌患者组织中 SFRP1 和 Septin9 基因的启动子区域 CpC 岛的嘧啶发生甲基化, 而在正常人体内不会发生这种变化, 因此可将这两种基因甲基化作为诊断结直肠癌的一个特异性标志物。本研究将本院近两年收治的 47 例结直肠癌患者作为研究对象, 分析 SFRP1 和 Septin9 甲基化筛查结直肠癌和癌前病变的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

将我院自 2016 年 6 月至 2018 年 6 月间接受结肠镜检查的患者 80 例作为研究对象, 男性 49 例, 女性 31 例, 年龄 35 ~ 83 岁, 平均年龄 (61.75 ± 7.13) 岁; 所有对象接受荧光定量 PCR 检查外周血浆中 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化的状态, 并使用胶体金免疫化学法进行粪隐血检测。本次研究经

医院伦理委员会批准, 患者知情并签署同意书。

1.2 纳入和排除标准

纳入标准: (1) 语言表达能力正常, 能与调查人员进行正常的沟通; (2) 研究对象自愿参与本研究, 并签署知情同意书。排除标准: (1) 既往有其他肿瘤疾病史者; (2) 已接受放射疗法和化学疗法; (3) 既往腹部外科手术史; (4) 妊娠期或哺乳期妇女; (5) 排除脑卒中、老年痴呆等神经系统疾病导致的无法采集相关信息和精神分裂症的患者; (6) 患者或患者家属不愿意参与研究, 及未签署知情同意书者。

1.3 血浆制备

采集 10 mL 外周静脉血置于 EDTA 抗凝真空采血管中, 1 350 g 离心机 (离心半径为 10 cm) 离心 12 min, 吸取 3.5 mL 血浆进行检测, 或者置于 -20 °C 冰箱并在四周内完成检测。

1.4 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化检测

选择 PCR 荧光探针法试剂盒 Epi proColon2.0 CE (EpiGenomics AG 公司生产), 操作严格按照试剂盒说明书进行, 共分为 DNA 提取、亚硫酸盐转化、Bis-DNA 结合、洗脱、PCR 反应、判定等几个步骤, 尤为注意的是每一个样本连续进行三次 PCR 反应, 2 次或以上阳性判读为阳性。

1.5 粪隐血筛查

使用胶体金免疫化学法对每一个对象进行检测。

1.6 统计学方法

使用 SPSS19.0 对获得的数据进行统计学分析处理,基于确切的二项式分布计算敏感度和特异度的 95% 可信区间,计数资料和计量资料分别以百分率和 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 χ^2 或 t 检验, $P < 0.05$ 为表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 检测结果

结果显示,80 例接受结肠镜检查和组织病理学确诊为结直肠癌的患者有 47 例(58.75%),其中男性 29 例,女性 18 例,年龄 36 ~ 83 岁,平均年龄 63.36 ± 6.82 岁;非结直肠癌的对照组 33 例(41.25%),男性 20 例,女性 13 例,年龄 35 ~ 81 岁,平均年龄 (59.86 ± 6.72) 岁,两组患者性别比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.571, P > 0.05$),年龄比较差异具有统计学意义($t = 3.458, P < 0.05$)。

结直肠癌组检测 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化阳性为 34 例,阳性率为 72.34%,结直肠癌组患者 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化检测结果详见表 1。

2.2 SFRP1 和 Septin9 基因和粪隐血筛查检测对结直肠癌的诊断情况

甲基化 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化诊断结直

肠癌的敏感度为 80.0%,特异度为 95.3%,粪便免疫学检测的敏感度为 86.3%,特异度为 54.3%,两者结合后敏感度为 97.6%,特异度为 96.8%,明显高于单独检测,详见表 2。

表 1 结直肠癌组患者 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化检测结果

项目	阳性(34 例)	阴性(13 例)
性别		
男	21	8
女	13	5
年龄(岁)		
>60 岁	19	7
≤60 岁	15	6
病变部位		
盲肠	1	2
升结肠	3	0
降结肠	2	1
横结肠	1	2
乙状结肠	7	2
直肠	20	6
癌变分化程度		
低分化	8	1
中分化	24	10
高分化	2	2

表 2 SFRP1 和 Septin9 基因和粪隐血筛查检测对结直肠癌的诊断情况

(%)

组别	敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
SFRP1 和 Septin9 甲基化阳性	80.0(67.3 ~ 91.3)	95.3(92.1 ~ 97.6)	76.8(63.4 ~ 86.2)	96.5(93.1 ~ 98.7)
粪便免疫学阳性	86.3(79.8 ~ 96.3)	54.3(45.2 ~ 63.7)	28.2(19.7 ~ 34.1)	96.8(93.6 ~ 99.9)
两者结合	97.6(88.5 ~ 99.9)	96.8(89.7 ~ 98.5)	30.1(23.7 ~ 36.4)	99.4(98.4 ~ 99.9)

3 讨 论

SFRP1 是一种新发现的抑癌基因,其表观遗传学修饰如甲基化与恶性肿瘤的发生发展密切相关。既往研究表明,SFRP1 的甲基化会抑制 SFRP1 基因的表达,降低 SFRP1 蛋白水平,且这一现象与肺腺癌组织及结直肠癌的发生发展密切相关^[4-5]。Septin9 基因是在 2008 年首次报道的对结直肠癌筛查的特异性基因^[6]。Septin9 基因是 septin 基因家族的成员之一^[7],在除了植物细胞之外的真核生物中广泛存在,其主要参与细胞分裂、细胞计划、囊泡运输和细胞膜重构等生物学过程,在这个过程中由于基因转录物质所含翻译起点和变异等不同,产生

了很多个亚型^[8-9]。对于 Septin9 基因来说,N 末端的特点是拥有较长的脯氨酸区域,C 端午卷曲结构,研究该基因的生物学结构发现,主要借助与中央区域的鸟核苷酸相互作用的序列,和肌动蛋白、微管蛋白等主要的细胞骨架成分之间相互作用,不断衔接实现将其他蛋白募集至细胞质的定位功能^[10]。如果 Septin9 蛋白正常表达受到干扰后细胞就不能完全分裂,会产生双核细胞;细胞基因不稳定后容易向肿瘤转化^[11]。有资料显示,血浆甲基化 Septin9 基因甲基化在结直肠癌患者中的表达明显高于健康人群、也高于其他系统恶性肿瘤和非恶性病变患者,而且在使用亚硫酸盐转化 DNA 进行 10 倍稀释后进行检测方式改进后,能够明显的提高结直肠癌的检测率和特异度^[12-13]。

本研究中使用的检测试剂盒是在 PCR 试验方法的基础上进行了几项改进,如减少洗脱液的量提高提取 DNA 的浓度,去除 PCR 抑制物、增加引物浓度、降低内参照的浓度、使用不同荧光探针等,从而提高检测的敏感度和特异性^[9]。由研究结果可以看出,检测 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化联合粪隐血免疫胶体金进行检查具有一定的互补性,能够提高检测的敏感度和特异度。本研究的不足之处是没有对进展期的结直肠癌患者 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化程度进行观察,而且样本数量偏少;再者结直肠癌患者属于高危人群,验前概率偏高,具有转诊偏倚,这个结果是否符合一般风险人群,需要进一步深入研究进行验证。而且在临床实际检查过程中,使用结肠镜检查的费用偏低,使用试剂盒检查费用昂贵,对于经济条件较差的患者来说需要承担的经济压力比较大^[14-15]。

综上所述,SFRP1 和 Septin9 基因甲基化联合粪免疫学检查可提高结直肠癌和癌前病变诊断的敏感度和特异度,而且具有无创、采样简单、依从性强、实验方法稳定等特点,适宜于临床推广使用。

参考文献:

- [1] 康倩,金鹏,杨浪,等.外周血清游离 DNA 中 Septin9 基因甲基化在结直肠癌筛查中的意义[J].中华医学杂志,2014,94(48):3839-2.
- [2] 李士杰,刘艳刚,王警,等.外周血 Septin9 基因甲基化检测在结直肠癌筛查中的应用[J].中国普通外科杂志,2015,24(12):1756-4.
- [3] ROKNI P, SAKHINIA E, KERACHIAN MA. BMP3, promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA in colorectal cancer patients[J]. Gen, 2018, 40(4):423-5.
- [4] 蔡克银,徐梅华,王晓.粪便 DNA 中联合 SFRP1 及 SEPT9 基因甲基化检测对老年性结直肠癌早期诊断的临床研究[J].临床肿瘤学杂志,2018(1):25-4.
- [5] 李小杰,殷桂林,董永强,等. SFRP1 基因甲基化及其蛋白在肺腺癌中的表达及临床意义[J].肿瘤防治研究,2017,44(5):320-3.
- [6] 陈纪飞,戴盛明.血浆甲基化 Septin9 基因:一个有潜力的结直肠癌早期筛查标志物[J].分子诊断与治疗杂志,2017,9(2):132-4.
- [7] LIN Z, LUO M, CHEN X, et al. Combined detection of plasma ZIC1, HOXD10 and RUNX3 methylation is a promising strategy for early detection of gastric cancer and precancerous lesions[J]. J Can, 2017, 8(6):1038-6.
- [8] ZWINK N, STOCK C, BIRKNER B, et al. Screening colonoscopy volume and detection of colorectal neoplasms: a state-wide study from Bavaria, Germany[J]. J Can, 2016, 26(3):181.
- [9] CHOTIVITAYATARAKORN P, VILAICHONE RK. Colorectal cancer and precancerous lesions associated with ulcerative colitis in thailand [J]. Asian Pacific J Can, 2017, 18(8):2123.
- [10] MAIDA M, CAMILLERI S, MANGANARO M, et al. New endoscopy advances to refine adenoma detection rate for colorectal cancer screening: none is the winner[J]. J Gas Onc, 2017, 9(10):402-4.
- [11] 束新华,潘志文,包叶江,等. Septin9 基因甲基化检测方法的建立及在结直肠癌血浆标本检测中的应用探讨[J].国际检验医学杂志,2018(1):17-3.
- [12] 郭婉,汪钰翔,丁先锋. Septin9 基因及甲基化检测在结直肠癌中的研究进展[J].临床检验杂志,2018(2):133-2.
- [13] LE L, SONG, YUE M. Current noninvasive tests for colorectal cancer screening: an overview of colorectal cancer screening tests [J]. J Gas Onc, 2016, 8(11):793-2.
- [14] 吴东,杨红,李玥,等.外周血甲基化 Septin9 基因联合粪便免疫化学试验对专科门诊患者结直肠癌和腺瘤的筛查[J].中华消化志,2016,36(2):107-5.
- [15] ROKNI P, SAKHINIA E, KERACHIAN MA. BMP3, promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA in colorectal cancer patients[J]. Gen Gen, 2018, 40(4):423-5.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 516 页)

- [13] HAN J, MENICANIN D, MARINO V, et al. Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model[J]. J Perio Res, 2014, 49(3):333-45.
- [14] 余国玺,张帆,王乐,等.绿原酸对内毒素介导的人牙周膜细胞生物活性的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2016,26(6):343-7.
- [15] 呼海燕,刘彩宏.信号传导及转录激活因子 1 基因沉默促进人牙周膜细胞成骨细胞分化[J].口腔医学,2016,36(10):884-9.
- [16] NINOMIYA T, HIRAGA T, HOSOYA A, et al. Enhanced bone-forming activity of side population cells in the periodontal ligament [J]. Cell Transplantation, 2014, 23(6):691-701.
- [17] 郑秀梅,黄文霞.巨噬细胞介导的炎性微环境对牙周膜细胞增殖和成骨分化的影响[J].口腔疾病防治,2018,26(5):297-303.
- [18] 王婧,祝强,李学盛,等. PELP1 在炎性牙周膜细胞中的表达及与细胞增殖和成骨分化的相关性研究[J].临床口腔医学杂志,2017,33(11):643-7.
- [19] 谭咏梅,侯晋,杨小军,等.侵入细胞内的牙龈卟啉单胞菌影响人牙周膜细胞的增殖及成骨分化[J].南方医科大学学报,2016,36(4):525-31.
- [20] 朱东望,薛栋,赖文,等.微 RNA-146a 反转牙龈卟啉单胞菌脂多糖对人牙周膜细胞成骨的抑制作用[J].中华口腔医学杂志,2018,53(11):753-9.
- [21] 张雄,陈良娇,兰泽栋,等.基因芯片筛选人牙周膜干细胞成骨分化生物学标记物的研究[J].广东医学,2016,37(14):2080-3.

(本文编辑:蒋湘莲)