

血浆 Septin9 甲基化检测在结直肠癌中的诊断价值

陈 培, 邓钦木, 李丹丹

(重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

摘要: **目的** 探讨血浆游离 DNA 中 Septin9 甲基化(mSEPT9)检测在结直肠癌中的诊断意义。**方法** 收集2019年6~11月在重庆医科大学附属第二医院接受肠镜检查的患者共100例,包括确诊为结直肠癌的患者45例,非结直肠癌对照组55例,对其进行mSEPT9检测、大便隐血试验(FOBT)和癌胚蛋白(CEA)检测,评价其在结直肠癌中的应用价值。**结果** ①mSEPT9筛查结直肠癌的敏感度为82.22%(95%CI: 70.60%~93.83%),明显高于CEA(42.2%, 95%CI: 27.22%~57.23%),特异度为89.09%(95%CI:80.58%~97.60%),高于FOBT(75%, 95%CI:60.98%~89.02%)。②结直肠癌组mSEPT9阳性率为82.22%(37/45),非结直肠癌对照组mSEPT9阳性率为10.91%(6/55),结直肠癌组和非结直肠癌组相比,mSEPT9检测结果差异有统计学意义($\chi^2=4.917, P<0.05$)。③mSEPT9检测结果与患者性别、年龄、病理分化程度无相关性($\chi^2=0.020, 1.142, 1.649, P<0.05$)。**结论** mSEPT9检测在结直肠癌诊断中有较高的敏感度和特异度,并且具有无创、采样方便、方法稳定等优势,可以作为临床诊断结直肠癌的辅助手段。

关键词: Septin9 甲基化; 结直肠癌; 大便隐血; 癌胚蛋白

中图分类号: R735.3; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2020)04-010-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.04.003

Diagnostic Value of Plasma Septin9 Methylation in Screening of Colorectal Cancer

CHEN Pei, DENG Qin-mu, LI Dan-dan

(Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To determine the diagnostic accuracy of methylated Septin9(mSEPT9) for colorectal cancer(CRC). **Methods** A total of 100 patients who underwent colonoscopy in the second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from June 2019 to November 2019 were collected, including 45 patients diagnosed with CRC and 55 patients in the control group, and mSEPT9, fecal occult blood test(FOBT) and carcinoembryonic antigen(CEA) were detected, and evaluated the diagnostic value of each test in CRC. **Results** ① The sensitivity of mSEPT9 to screen colorectal cancer was 82.22% (95%CI: 70.60%~93.83%), significantly higher than CEA (42.2%, 95%CI: 27.22%~57.23%), and the specificity was 89.09% (95%CI:80.58%~97.60%), higher than FOBT (75%, 95%CI:60.98%~89.02%). ② The positive rate of mSEPT9 in the colorectal cancer group was 82.22% (37/45), and that in the non-colorectal cancer control group was 10.91% (6/55). The difference in the detection results of mSEPT9 in the colorectal cancer group and the non-colorectal cancer group was statistically significant ($\chi^2=4.917, P<0.05$). ③ There was no correlation between the detection results of mSEPT9 and the patient's gender, age, and differentiation degree ($\chi^2=0.020, 1.142, 1.649, P<0.05$). **Conclusion** mSEPT9 has the advantages of high sensitivity and specificity, non-invasive, convenient sampling and stable methods, and can be used as an auxiliary means for the clinical diagnosis of CRC.

Keywords: mSEPT9; CRC; FOBT; CEA

根据2017全球癌症数据库,结直肠癌在恶性肿瘤中的发病率和死亡率分别为第四位和第二位^[1]。2018年我国结直肠癌的新发病例数为52.15万人,因结直肠癌死亡患者4.79万人^[2],并随着经济的发展和居民生活方式的西方化在不断增加^[3-4]。研究数据表明,如果每年对居民定期筛查,可以避免结直肠癌中60%的死亡,并且其五年生存率可以从46%提高至73%^[5]。因此,结直肠癌标志物的

精准检测对临床治疗、预后评估具有重要意义。

目前,结直肠癌的常见筛查方法为Septin9甲基化(methylated Septin 9, mSEPT9)检测、大便隐血试验(fecal occult blood test, FOBT)、癌胚蛋白(carcino embryonic antigen, CEA)检测以及肠镜检查。其中FOBT和CEA的敏感度和特异度较低,在结直肠癌的早期筛查中应用价值有限^[6],肠镜作为结直肠癌诊断的金标准,其特异度高,但是早期

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81702083)。

作者简介: 陈培(1993-),女,本科,初级检验技师,研究方向:结直肠癌的临床诊断与疗效监测, E-mail:ppmeier@163.com。

通讯作者: 李丹丹,女,研究方向:肿瘤的诊断和治疗, E-mail:ldd696@126.com。

诊断不够敏感,并且因其侵入性操作以及肿瘤异质性而应用有限。近年来,液体活检在临床上得到推广,其具有非侵入式、易重复取样以及无肿瘤异质性等优点^[7]。尤其是循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA),它与肿瘤的发生、发展密切相关^[8]。既往文献报道,Septin9基因甲基化与结直肠癌变过程密切相关^[5]。本次研究拟通过荧光定量PCR方法检测血浆中mSEPT9水平,探讨mSEPT9对结直肠癌的诊断意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2019年6~11月在重庆医科大学附属第二医院接受肠镜检查的患者共100例。将45例经肠镜和病理检测确诊为结直肠癌的患者作为结直肠癌组,纳入标准:参照《中国临床肿瘤学会(ESCO)结直肠癌诊疗指南(2019版)》综合诊断为结直肠癌的患者。排除标准:既往其他肿瘤病史,已接受放化疗、手术治疗或全身治疗,妊娠期、哺乳期妇女。将55例经肠镜和病理检测未诊断为结直肠癌的患者作为非结直肠癌对照组,包括结直肠腺瘤患者18例,结直肠息肉患者27例,结直肠无异常发现患者10例。本次研究入选患者100例,男性45例,女性55例,年龄37~85岁,平均年龄 62.33 ± 11.37 岁。45例结肠癌患者均接受了mSEPT9和CEA检测,其中31例接受了FOBT检查。55例非结直肠癌患者均接受了mSEPT9检测,其中39例患者接受了FOBT检查,43例患者进行了CEA检测。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂:Septin9甲基化检测试剂盒(北京博尔诚),大便隐血(FOBT)检测试剂盒(四川沃文特),癌胚蛋白检测试剂盒(上海罗氏)。

1.2.2 仪器:SLAN-96S荧光定量PCR仪(上海宏

石),沃文特全自动分析仪FA160(四川沃文特),Cobas 6000型化学发光分析仪(上海罗氏)。

1.3 方法

1.3.1 Septin9甲基化检测:检测流程按照试剂说明书进行,具体步骤如下:(1)提取血浆DNA;(2)亚硫酸盐转化;(3)SLAN-96S PCR仪上机;(4)按照试剂盒说明书对结果进行判读。

1.3.2 大便隐血试验:使用沃文特公司生产的自动化粪便分析仪上机检测。

1.3.3 癌胚蛋白检测:CEA采用化学发光法检测,结果由本院核医学科提供。

1.4 统计学分析 采用SPSS Statistics 20.0软件进行统计分析,组间数据比较采用 t 检验,组间率的比较采用 χ^2 检验,不同诊断方法符合率的比较采用ROC曲线。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者年龄和性别分布情况 在100例接受肠镜检查的患者中,结直肠癌组45例,其中男性22例,女性23例,年龄35~82岁,平均年龄 61.89 ± 12.50 岁;非结直肠癌组55例,其中男性23例,女性32例,年龄43~85岁,平均年龄 62.69 ± 10.48 岁。两组间患者年龄差异无统计学意义($t=0.349, P=0.728$),两组间患者性别差异无统计学意义($\chi^2=0.500, P=0.480$)。

2.2 结直肠癌组和非结直肠癌组中mSEPT9检测结果 见表1。结直肠癌组患者mSEPT9阳性率为82.22%(37/45)。非结直肠癌组患者mSEPT9阳性率为10.91%(6/55),结直肠癌患者和非结直肠癌患者之间mSEPT9检测结果比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.917, P < 0.05$)。将mSEPT9检测结果与临床数据进行相关性分析显示,mSEPT9检测结果与患者性别、年龄以及肿瘤部位无相关性(均 $P > 0.05$)。

表1 mSEPT9检测结果与临床特征关系 [$n=100, n(\%)$]

| 类 别 | <i>n</i> | 阳性 | 阴性 | χ^2 | <i>P</i> |
|--------|----------|------------|------------|----------|--------------------|
| 总计 | 100 | 43 (43.00) | 57 (57.00) | | |
| 性别 | | | | 0.020 | 0.887 |
| 男性 | 45 | 19 (42.22) | 26 (57.78) | | |
| 女性 | 55 | 24 (43.64) | 31 (56.36) | | |
| 年龄 | | | | 1.142 | 0.235 |
| < 60岁 | 44 | 16 (36.36) | 28 (63.64) | | |
| ≥ 60岁 | 56 | 27 (48.21) | 29 (51.79) | | |
| 肿瘤部位 | | | | 2.22 | 0.136 ^a |
| 结肠 | 22 | 20 (90.91) | 2 (9.09) | | |
| 直肠 | 23 | 17(73.91) | 6(26.09) | | |
| 总计 | 45 | 37(82.22) | 8(17.78) | 4.917 | 0.027 ^b |
| 非结直肠癌 | | | | 1.649 | 0.438 |
| 结直肠腺瘤 | 18 | 2(11.11) | 16(88.89) | | |
| 结直肠息肉 | 27 | 4(14.81) | 23(85.19) | | |
| 结直肠无异常 | 10 | 0 | 10(100.00) | | |
| 总计 | 55 | 6(10.91) | 49(89.09) | | |

注:^a结肠癌患者和直肠癌患者之间的比较;^b结直肠癌患者和非结直肠癌患者的比较。

2.3 mSEPT9, FOBT 和 CEA 在结直肠癌筛查中应用价值的比较 见表2。mSEPT9在结直肠癌筛查中的特异度(89.09%)和阳性预测值(86.04%)高

于FOBT(75.00%, 75.61%), 其敏感度(82.22%)和阴性预测值(85.96%)高于CEA(42.22%, 60.61%)。

表2 三种检测方法在结直肠癌筛查中的应用价值 [% (95%CI)]

| 检测项目 | 敏感度 | 特异度 | 阳性预测值 | 阴性预测值 | AUC |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| mSEPT9 | 82.22(70.60~93.83) | 89.09(80.58~97.60) | 86.04(75.26~96.84) | 85.96(76.67~95.26) | 85.7(77.6~93.7) |
| FOBT | 100 | 75.00(60.98~89.02) | 75.61(61.89~89.33) | 100 | 87.5(79.0~96.0) |
| CEA | 42.22(27.22~57.23) | 93.02(85.09~99.99) | 86.36(70.79~99.99) | 60.61(48.50~72.71) | 67.6(56.3~78.9) |

2.4 mSEPT9 检测结果与临床病理分化程度关系 在低分化结直肠癌、中分化结直肠癌和高分化结直肠癌患者中, mSEPT9的阳性率分别为80%(4/5), 82.76%(24/29)和100%(2/2), 另外, 有9例分化程度不明的结直肠癌患者, 其mSEPT9阳性率为78.78%(7/9)。统计学分析显示, mSEPT9检测结果与临床病理分化程度无相关性($\chi^2=0.447$, $P=0.800$)。

3 讨论

结直肠癌的发病率和死亡率在我国恶性肿瘤中分别位列第二和第五, 大多数结直肠癌发现时已进入晚期, 错过了最佳治疗时机。如果定期对居民筛查, 可以显著降低结直肠癌患者死亡率。液体活检作为一种新兴的检测技术, 在肿瘤的精准诊断和疗效检测中具有广阔的前景, 与传统的穿刺活检相比, 其具有无创、低风险、低成本和高频率检测疾病进展等优势^[7]。目前已发现DNA甲基化在基因表达及细胞增殖等过程中起重要作用, 为肿瘤的无创诊断和疗效监测提供了新的手段^[8]。

Septin9基因位于人类染色体17q25.3, Septin9蛋白能够调节细胞成长, 防止细胞分裂过快或以不受控制的方式进行分裂增殖, 具有相应的抑癌作用^[9]。在结直肠癌变过程中, Septin9-v2启动子区的CpG岛发生高度甲基化, 并且基因DNA从凋亡坏死的癌细胞释放入外周血。因此, 通过检测外周血中Septin9特殊启动子区域的甲基化水平可以推测患结直肠癌的风险^[3, 5, 9]。既往研究发现mSEPT9检测结直肠癌的敏感度为36.6%~95.6%, 特异度为77%~98.9%, 其中在我国结直肠癌患者中, mSEPT9的敏感度为69%~88%, 特异度为87%~98%^[3]。本次研究结果显示, mSEPT9检测结直肠癌的敏感度为82.22%, 特异度为89.09%, 与上述文献报道结果一致。mSEPT9检测诊断结直肠癌的敏感度明显高于CEA(42.22%), 特异度高于FOBT(75%)。但是, mSEPT9诊断结直肠癌的敏感度低于FOBT(100%), 与YAN等^[6]分析结果相反, 可能是因为未对所有患者进行FOBT检测, 以及患者采集粪便样本时依从性较差, 其采集手法对结

果影响较大。mSEPT9筛查结直肠癌特异度略低于CEA(93.02%), 可能是因为没有对全部患者进行CEA检测。另外, 本次研究还发现mSEPT9检测结果与患者性别、年龄、病例分化程度等没有相关性($P<0.05$)。

本次研究存在一些不足之处, 未对所有纳入病例进行FOBT和CEA检测, 未分析mSEPT9水平与结直肠癌临床分期的关系。另外, 本次研究中在部分胃癌、肝癌、肺癌和胰腺癌患者中发现mSEPT9检测结果为阳性, 但由于样本量不足, 未做详细分析。

综上所述, mSEPT9作为一个新的结直肠癌标志物, 具有较高的灵敏度和特异度, 并且具有无创、采样方便、方法稳定等优势, 可以作为临床诊断结直肠癌的辅助手段。

参考文献:

- [1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, year of life lost, years lived with disability, and Disability-Adjusted Life-Years of 29 cancer groups, 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. JAMA Oncol, 2019, 5(12): 1749-1768.
- [2] FENG Ruimei, ZONG Yinan, CAO Sumei, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics[J]. Cancer Common(Lond). 2019, 39(1):22.
- [3] XIE Li, JIANG Xiyi, LI Qian, et al. Diagnostic value of methylated septin9 for colorectal cancer detection[J]. Front Oncol, 2018, 8:247.
- [4] 史敏, 郭晓波, 李思远, 等. 结直肠癌患者组织中K-ras和BRAF基因突变与不同病理特征的相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(3): 27-30. SHI Min, GUO Xiaobo, LI Siyuan, et al. Correlation of K-ras and BRAF mutations with pathological features in patients with colorectal cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(3):27-30.
- [5] SONG Lele, JIA Jia, PENG Xiumei, et al. The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screening tests: A meta-analysis [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 3032-3043.

- [6] YAN Shirong, LIU Zijiang, YU Shuang, et al. Diagnostic value of methylated Septin9 for colorectal cancer screening: a meta-analysis [J]. Med Sci Monit, 2016, 22:3409-3418.
- [7] MADER S, PANTEL K. Liquid biopsy: current status and future perspectives [J]. Oncol Res Treat, 2017, 40(7/8): 404-408.
- [8] 马丽颜, 梁静, 周建龙. 腺瘤样结肠息肉易感基因 (APC) 及结直肠癌缺失基因 (DCC) 基因甲基化在肺癌早期诊断的意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31 (1): 17-20.
- MA Liyan, LIANG Jing, ZHOU Jianlong. Evaluation of the combination of APC and DCC gene methylation in the early diagnosis of lung cancer [J]. J Mod Lab Med, 2016 31(1):17-20.
- [9] 杨宁, 李鸿雁, 吴常青, 等. SEPTIN9 基因与结直肠癌诊断及预后的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (12): 127-132.
- YANG Ning, LI Hongyan, WU Changqing, et al. Advances in the research of SEPTIN9 gene in diagnosis and prognosis of colorectal [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 127-132.
- [10] 张春燕, 于正麟, 王蓓丽, 等. 血浆 Septin9 基因甲基化检测性能评价及对结直肠癌患者的筛查价值 [J]. 临床检验杂志, 2019, 37 (2): 152-155.
- ZHANG Chunyan, YU Zhenglin, WANG Beili, et al. Performance evaluation of methylation detection of plasma Septin9 gene and its diagnostic value in patients with colorectal cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2019 37(2): 152-155.
- 收稿日期: 2020-03-23
修回日期: 2020-04-26

(上接 5 页)

- [8] HOFSTRA J M, DEBIEC H, SHORT C D, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy [J]. Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 2012, 23(10): 1735-1743.
- [9] LI Weihao, GUO Yaping, ZHANG Zhiping, et al. Comparison of 2 anti-PLA2R immunoassays for the diagnosis of primary membranous nephropathy [J]. Laboratory Medicine, 2018, 46 (4): 316-322.
- [10] TOTH-MANIKOWSKI S M, BECK L H. PLA2R- and THSD7A-associated primary membranous nephropathy [M] // Glomerulonephritis. 2016: 301-331.
- [11] 陈瑞颖, 鲁鉴达, 谢琼虹, 等. 成人磷脂酶 A2 受体相关特发性膜性肾病的自然病程和治疗反应的影响因素 [J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35 (1): 1-8.
- CHEN Ruiying, LU Jianda, XIE Qionghong, et al. The clinical outcome and risk factors of phospholipase A2 receptor-associated idiopathic membranous nephropathy in adults [J]. Chinese Journal of Nephrology, 2019, 35(1): 1-8.
- [12] GRANATA F, PETRAROLI A, BOILARD E, et al. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor [J]. Journal of Immunology, 2005, 174(1): 464-474.
- [13] SILLIMAN C C, MOORE E E, ZILLEN G, et al. Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion [J]. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 2002, 283(4): C1102-C1113.
- [14] HOXHA E, THIELE I, ZAHNER G, et al. Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2014, 25(6): 1357-1366.
- [15] YEO M K, KIM Y H, CHOI D E, et al. The usefulness of phospholipase A2 receptor and IgG4 detection in differentiation primary membranous nephropathy from secondary membranous nephropathy in renal biopsy [J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2018, 26(8): 591-598.
- [16] 唐琦, 邬碧波, 李林, 等. 特发性膜性肾病血清抗磷脂酶 A2 受体抗体与免疫治疗关系的研究 [J]. 药学服务与研究, 2019, 19 (3): 180-184.
- TANG Qi, WU Bibo, LI Lin, et al. Relationship between serum anti-phospholipase A2 receptor antibodies and immunotherapy of the patients with idiopathic membranous nephropathy [J]. Pharmaceutical Care and Research, 2019, 19(3): 180-184.
- [17] 伍小香, 文思, 朱雪婧, 等. 肾组织磷脂酶 A2 受体和血清抗磷脂酶 A2 受体抗体在膜性肾病中的诊断价值 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2017, 42 (4): 395-399.
- WU Xiaoxiang, WEN Si, ZHU Xuejing, et al. Diagnostic value of renal phospholipase A2 receptor and serum anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy [J]. Journal of Central South University (Medical Science), 2017, 42 (4): 395-399.
- [18] DAI Huanzi, ZHANG Huhai, HE Yani. Diagnostic accuracy of PLA2R autoantibodies and glomerular staining for the differentiation of idiopathic and secondary membranous nephropathy: an updated meta-analysis [J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 8803.
- [19] RADICE A, PIERUZZI F, TREZZI B, et al. Diagnostic specificity of autoantibodies to M-type phospholipase A2 receptor in differentiating idiopathic membranous nephropathy from secondary forms and other glomerular disease [J]. Journal of Nephrology, 2018, 31(2): 271-278.
- [20] AKIYAMA S, AKIYAMA M, IMAI E, et al. Prevalence of anti-phospholipase A2 receptor antibodies in Japanese patients with membranous nephropathy [J]. Clin Exp Nephrol, 2015, 19(4): 653-660.
- 收稿日期: 2020-04-17
修回日期: 2020-05-06