

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2022.03.04

# 血浆游离 DNA 甲基化靶向测序在结直肠癌中的应用价值\*

张丽静<sup>1</sup>, 万智毅<sup>2</sup>, 孙利群<sup>1</sup>, 徐岩<sup>1</sup>, 王霞<sup>2</sup>, 张倩倩<sup>1</sup>, 周长江<sup>1</sup> (1. 大连大学附属新华医院消化科, 辽宁大连 116011; 2. 上海琨远生物技术有限公司, 上海 201318)

**摘要:**目的 检测结直肠癌(CRC)患者血浆游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 的甲基化水平, 并分析其临床应用价值。方法 收集 38 例大连大学附属新华医院就诊的 CRC 患者(I~III 期)及 38 例体检健康者的血液标本, 采用化学发光法检测血清癌胚抗原(CEA)水平; 提取 CRC 组及体检健康者血浆 cfDNA, 行高通量甲基化靶向测序检测, 计算甲基化评分, 并分析其与 CRC 患者临床病理参数的关系; ROC 曲线评估 cfDNA 和 CEA 单独及联合检测筛查 CRC 的临床价值。结果 与健康人对照组相比, CRC 组 cfDNA 浓度差异无统计学意义(34.41±5.00 vs 36.59±4.46,  $t=0.326$ ,  $P=0.745$ ), 而 cfDNA 甲基化评分显著升高(0.53±0.27 vs 0.26±0.18,  $t=6.134$ ,  $P<0.001$ )。伴有淋巴结转移的 CRC 患者 cfDNA 甲基化阳性率较无淋巴结转移者显著升高(88.9% vs 60%,  $\chi^2=4.323$ ,  $P=0.038$ ), 但在不同性别、年龄、肿瘤位置分组中的差异均无统计学意义( $P$ 均>0.05)。ROC 曲线分析结果显示, cfDNA 甲基化检测筛查 CRC 的 ROC 曲线下面积(AUC<sup>ROC</sup>)为 0.892(95%CI: 0.814~0.970), 血清 CEA 为 0.810(95%CI: 0.707~0.909), 二者联合检测的 AUC<sup>ROC</sup>为 0.930(95%CI: 0.867 4~0.996 7)。cfDNA 甲基化检测的敏感性为 84.21%, 特异性为 86.84%(cut-off 值为 0.280 5); CEA 单独检测的敏感性为 42.1%, 特异性为 97.3%(cut-off 值为 4.0 ng/mL); 二者联合检测的敏感性显著升高(89.47%), 特异性为 91.89%, 准确性为 90.67%。结论 血浆 cfDNA 甲基化检测在 CRC 筛查中的敏感性和特异性较高, 并且与淋巴结转移相关, 具有较好的临床应用价值。

**关键词:** 结直肠癌; 血浆游离 DNA; 甲基化; 靶向测序

中图分类号: R446; R735.3

文献标志码: A

## Application of targeted methylation sequencing of plasma cell-free DNA in the screening of colorectal cancer

ZHANG Lijing<sup>1</sup>, WAN Zhiyi<sup>2</sup>, SUN Liqun<sup>1</sup>, XU Yan<sup>1</sup>, WANG Xia<sup>2</sup>, ZHANG Qianqian<sup>1</sup>, ZHOU Changjiang<sup>1</sup> (1. Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital Affiliated to Dalian University, Dalian 116011, Liaoning; 2. Singlera Genomics Inc., Shanghai 201318, China)

**Abstract: Objective** To detect the methylation level of plasma cell-free DNA (cfDNA) in patients with colorectal cancer (CRC), and analyze its clinical significance. **Methods** The blood samples from 38 CRC patients (Stage I-III) and 38 healthy controls were collected, and serum carcinoembryonic antigen (CEA) levels were detected by a chemiluminescence assay. Plasma cfDNA was extracted from blood samples, and detected by high-throughput targeted methylation sequencing. Then, the methylation score of cfDNA was calculated and its relationship with the clinicopathological parameters of CRC patients was analyzed. The clinical values of cfDNA alone and combined with CEA in the screening of CRC were evaluated by the ROC curve. **Results** There was no significant difference in the concentration of cfDNA between CRC patients and healthy controls (34.41±5.00 vs 36.59±4.46,  $t=0.326$ ,  $P=0.745$ ), but the methylation score of cfDNA in CRC patients was significantly higher than that of healthy controls (0.53±0.27 vs 0.26±0.18,  $t=6.134$ ,  $P<0.001$ ). The positive rate of cfDNA methylation in CRC patients with lymph node metastasis was significantly higher than that in patients without lymph node metastasis (88.9% vs 60%,  $\chi^2=4.323$ ,  $P=0.038$ ), but there was no significant difference between different gender, age and tumor location groups ( $P>0.05$ ). The ROC curve analysis showed that the areas under the ROC curve (AUC<sup>ROC</sup>) of cfDNA methylation, serum CEA and the combination of them in the screening of CRC were 0.892 (95%CI: 0.814-0.970), 0.810 (95%CI: 0.707-0.909) and 0.930 (95%CI: 0.867 4-0.996 7), respectively. The sensitivity, specificity and cut-off value of cfDNA methylation in the screening of CRC were 84.21%, 86.84% and 0.280 5, respectively, and those of serum CEA alone were 42.1%, 97.3% and 4.0, respectively. The sensitivity, specificity and accuracy of cfDNA methylation combined with serum CEA in the screening of CRC were 89.47%, 91.89% and 90.67%, respectively. **Conclusion** The detection of plasma cfDNA methylation has high sensitivi-

\* 基金项目: 国家自然科学基金(81902466); 大连市医学科学研究计划项目(1911123、1911122); 大连大学博士启动基金项目(20181QL006)。

作者简介: 张丽静, 1980 年生, 女, 副主任医师, 博士, 主要从事消化道肿瘤的研究。

通信作者: 周长江, 主任医师, E-mail: endozhou@163.com。

ty and specificity in the screening of CRC, and is related to lymph node metastasis, which has a good clinical application value.

**Key words:** colorectal cancer; plasma cell-free DNA; methylation; targeted sequencing

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化道常见的恶性肿瘤之一。我国 CRC 发病率、病死率在恶性肿瘤中均位居前 5 位,且保持上升趋势<sup>[1]</sup>。半数以上 CRC 患者确诊时已是中晚期,且目前缺乏敏感性高、特异性强的 CRC 肿瘤标志物,因此,寻找有效的早期诊断标志物具有重要的意义。循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是由肿瘤细胞在坏死、凋亡后释放到血浆中的游离 DNA(cell-free DNA, cfDNA),其携带的遗传信息与原发肿瘤组织保持着高度一致性,能克服常规组织活检所无法突破的肿瘤异质性问题<sup>[2]</sup>。同时 ctDNA 能在外周血循环中直接检出,可以实时、动态地了解肿瘤的状态,已成为新一代肿瘤标志物<sup>[3]</sup>。郑照正等<sup>[4]</sup>研究发现,结直肠癌组 cfDNA 浓度显著高于健康人对照组,且血浆 cfDNA 水平与 TNM 分期密切相关。在 II/III 期大肠癌患者中,术后连续进行 ctDNA 检测可预测高复发风险<sup>[5]</sup>。因此,血浆 cfDNA 在肿瘤的诊断、治疗及预后等方面发挥重要的作用,可能作为一种新的无创检测方法。本研究通过提取 CRC 患者和健康人对照组血浆 cfDNA,采用高通量 cfDNA 甲基化靶向测序技术检测血浆 cfDNA 甲基化水平,并分析其对 CRC 筛查的价值及临床意义。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取 2018 年 6 月至 2019 年 9 月大连大学附属新华医院消化内镜中心行肠镜检查,随后在肛肠科行手术治疗,术后病理组织学确定为 CRC 的患者。纳入标准:(1)年龄 45~80 岁;(2)入组患者为初诊、经结肠镜或术后病理组织学确诊;(3)未接受手术、放疗、化疗、靶向治疗或其他肿瘤相关干预;(4)肝、肾功能正常或基本正常;(5)停用华法林、阿司匹林、硫酸氢氧吡格雷片等抗凝药物 1 周;(6)临床病历资料完整。排除标准:(1)既往肠癌病史,经历过结、直肠切除手术;(2)有其他癌症史;(3)妊娠期和哺乳期妇女;(4)有凝血功能障碍或血小板异常者;(5)严重心血管病史。共纳入 CRC 患者 38 例,年龄 46~80 岁,中位年龄为 65 岁,男性 13 例,女性 25 例。选取同期体检健康者 38 例作为健康人对照组,年龄 49~78 岁,中位年龄 63 岁,男性 16 例,女性 22 例。两组性别构成差异

无统计学意义( $\chi^2 = 0.502, P = 0.479$ ),年龄差异亦无统计学意义( $t = 0.628, P = 0.534$ )。本研究经大连大学附属新华医院医学伦理委员会审核批准(No.XH2018A006),各研究对象均知情同意。

**1.2 主要仪器及试剂** QIAamp 血清血浆核酸纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司), ZYMO EZ DNA Methylation-Gold 试剂盒(上海吉泰公司),癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)检测试剂盒(美国 Roche 公司)。Qubit3.0 荧光定量仪(美国 Thermo Fisher 公司),高通量靶向测序仪(Hiseq, 美国 Illumina 公司),LabChip GX Touch 微流控毛细管电泳系统(美国 PerkinElmer 公司),电化学发光分析仪(E-801, 美国 Roche 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 标本采集** CRC 患者于手术前采集血液标本,健康人对照组于体检时采集血液标本。清晨空腹抽取各研究对象肘静脉血(EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝)约 4 mL,置于 4 °C 温育 30 min,1 600×g 离心 10 min,小心吸取上清转入 2 mL 离心管中,4 °C、16 000×g 离心 10 min,分离血浆标本分装于 0.5 mL 离心管中,置于-80 °C 保存。处理过程在 4 h 内完成,应用时所有样本冻融≤2 次。

**1.3.2 血浆 cfDNA 的提取** 按照 QIAamp 血清血浆核酸纯化试剂盒说明书进行血浆 cfDNA 提取。血浆 cfDNA 浓度使用 Qubit3.0 荧光定量仪进行检测,质控标准:片段大小的主峰为 100~300 bp,通过质控的 cfDNA 样本用于后续甲基化检测及二代测序文库构建。

**1.3.3 DNA 亚硫酸盐处理** 将上述提取的 cfDNA 产物进行亚硫酸盐处理,按 EZ-DNA Methylation-Gold 试剂盒说明书操作。采用 2 μg/mL 载体 RNA 处理 cfDNA,以避免核酸的损失;重亚硫酸盐处理时间为 95 °C 10 min,64 °C 20 min。

**1.3.4 甲基化文库构建测序及分析** 构建及测序均由上海鸚远生物技术公司完成。基于单链单特异性引物扩增建库<sup>[6]</sup>,采用高通量靶向测序 cfDNA 进行检测。文库大小分析采用 LabChip GX Touch 微流控毛细管电泳系统检测。所用 Panel 共包括 2 478 条引物,检测覆盖基因组约 0.5 Mb,包含约 2 000 个甲基化区域(包含 *Sept9*、*MGMT*、*IGIF2*、*BUB3*、*FOXD3*、*HOXD9*、*PAX6* 等基因)进行靶向捕

获。每个样本测序数据量应大于 400 万条序列。以上区域主要基于 TCGA 数据库中全基因组甲基化数据以及文献<sup>[7-8]</sup>报道的癌症甲基化数据,筛选出 CRC 特异性高甲基化的区域<sup>[7]</sup>。根据测序结果计算出每个靶区域的平均甲基化水平(AMF)。利用逻辑回归(logistic regression, LR)分类的方法计算出每个样本的甲基化得分<sup>[6]</sup>。

**1.3.5 CEA 检测** 采用化学发光法,由本院检验科采用 CEA 检测试剂盒及配套的电化学发光分析仪检测,参考区间:0~4.0 ng/mL。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行分析。数据经正态性检验,非正态分布的计量数据用  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,数据间比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验;符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示,组间的比较采用配对或独立样本  $t$  检验;计数资料采用卡方检验或 Fisher's 精确检验。ROC 曲线评价血浆 cfDNA 甲基化及 CEA 单独及联合检测对 CRC 的筛查价值。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CRC 组及健康人对照组血浆 cfDNA 甲基化评分** CRC 组与健康人对照组血浆 cfDNA 含量差异无统计学意义 ( $34.41 \pm 5.00$  vs  $36.59 \pm 4.46$ ,  $t = 0.326$ ,  $P = 0.745$ )。此外,CRC 组中 cfDNA 甲基化评分 ( $0.53 \pm 0.27$ ) 显著高于健康人对照组 ( $0.26 \pm 0.18$ ),差异有统计学意义 ( $t = 6.134$ ,  $P < 0.001$ )。

**2.2 CRC 组及健康人对照组 CEA 检测结果** CRC 组 CEA 的表达水平显著高于健康人对照组 [ $3.93 (0.42, 72.34)$  ng/mL vs  $2.01 \pm 0.99$  ng/mL],差异有统计学意义 ( $U = 269.5$ ,  $P < 0.001$ )。

**2.3 血浆 cfDNA 甲基化与 CRC 患者临床病理参数之间的关系** 伴有淋巴结转移者 cfDNA 甲基化阳性率较无淋巴结转移者明显升高 ( $\chi^2 = 4.323$ ,  $P = 0.038$ ),但在不同性别、年龄、肿瘤位置等参数中的差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。见表 1。

**2.4 血浆 cfDNA 甲基化检测对 CRC 的筛查价值** 以 CRC 患者作为疾病组,健康人作为对照组,绘制 ROC 曲线。cfDNA 甲基化评分筛查 CRC 的 ROC 曲线下面积 ( $AUC^{ROC}$ ) 为 0.892 (95%  $CI$ : 0.814 ~ 0.970),当 cut-off 值为 0.280 5 时,其敏感性为 84.21%,特异性为 86.84%,阳性预测值为 86.49%,阴性预测值为 84.62%,准确性为 85.53%。CEA 筛查 CRC 的  $AUC^{ROC}$  为 0.810 (95%  $CI$ : 0.707 ~ 0.909),

当 cut-off 值为 4.0 ng/mL 时,其敏感性为 42.1%,特异性为 97.3%,阳性预测值为 94.12%,阴性预测值为 62.07%,准确性为 69.33%。二者联合检测筛查 CRC 的  $AUC^{ROC}$  为 0.930 (95%  $CI$ : 0.867 4 ~ 0.996 7),其敏感性为 89.47%,特异性为 91.89%,阳性预测值为 91.89%,阴性预测值为 89.47%,准确性为 90.67%。见图 1。

表 1 血浆 cfDNA 甲基化水平与 CRC 患者临床病理参数的关系 [ $n(\%)$ ]

参数	n	cfDNA 甲基化		$\chi^2$	P 值
		阳性	阴性		
性别				0.108	0.742
女	25	18 (72)	7 (28)		
男	13	10 (76.9)	3 (23.1)		
年龄(岁)				1.683	0.194
≤65	18	15 (83.3)	3 (16.7)		
>65	20	13 (65)	7 (35)		
肿瘤位置				0.777	0.378
直肠	27	21 (77.8)	6 (22.2)		
结肠	11	7 (63.6)	4 (36.4)		
淋巴结转移				4.323	0.038
无	20	12 (60)	8 (40)		
有	18	16 (88.9)	2 (11.1)		
TNM 分期				5.987	0.050
I 期	9	4 (44.4)	5 (55.6)		
II 期	11	8 (72.7)	3 (27.3)		
III 期	18	16 (88.9)	2 (11.1)		

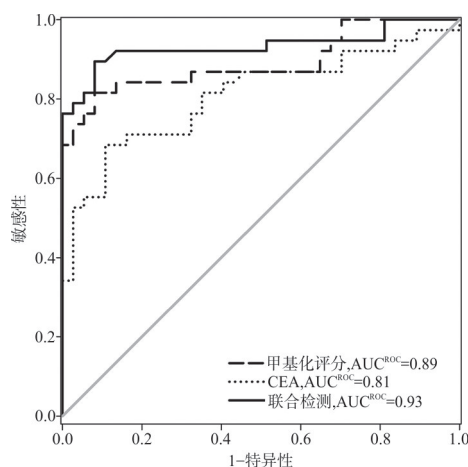


图 1 血浆 cfDNA 甲基化、CEA 单独及联合检测筛查 CRC 的 ROC 曲线

## 3 讨论

本研究收集 I ~ III 期 CRC 患者和健康人对照组血浆标本,检测结果证实二者血浆 cfDNA 浓度差异无统计学意义,分析其原因可能与 CRC 分期有关。有学者发现,通过检测 ctDNA 突变来诊断早期 CRC 的效果亦不理想, I ~ III 期 CRC 患者中 ctDNA 突变的检出率  $< 60\%$ ,即使测序深度达到 60 000

×<sup>[9]</sup>。分析原因首先考虑 CRC 本身存在异质性,并不是所有的 CRC 组织都存在 DNA 突变。其次,血浆中 ctDNA 含量很低,临床取样时采集的血液量有限(一般 10 mL),很可能无法检出带有突变信息的 DNA 片段。

与 DNA 突变不同,DNA 甲基化的修饰具有组织特异性、变化范围广、高敏感性等特点,非常适合作为癌症早期检测的标志物<sup>[10-11]</sup>。张春燕等<sup>[12]</sup>研究发现,血浆 *Septin 9* 基因甲基化检测对于 CRC 的检出率为 62.5%,明显高于粪便隐血试验(FIT)及 CEA。笔者与上海鸚远基因公司合作,基于血浆 cfDNA 的无创甲基化检测技术<sup>[6,8]</sup>,进行高通量的靶向甲基化测序,一次性检测超过 2 000 个特异性甲基化区域。其中包括常见的 CRC 相关甲基化基因如 *Septin9*、*SHOX2*、*AP*、*GATA*、*HOX*、*ONECUT* 等,结果发现 CRC 组 cfDNA 甲基化阳性率较健康人对照组明显增加。进一步分析其与 CRC 患者临床病理参数之间的关系,结果发现伴有淋巴结转移患者的 cfDNA 甲基化阳性率较无淋巴结转移者明显升高,提示 cfDNA 甲基化程度与 CRC 的转移、进展和预后相关;而与患者性别、年龄、肿瘤位置等无明显关系,但该结论需进一步扩大样本量深入分析。

血清肿瘤标志物 CEA、CA199 是目前临床常用的 CRC 的筛查指标,有学者发现血细胞炎性指标如中性粒细胞与淋巴细胞比值、血小板与淋巴细胞比值、红细胞分布宽度等联合 CEA 和 CA199 有助于 CRC 早期筛查<sup>[11]</sup>。张春燕等<sup>[12]</sup>研究表明,*Septin 9* 基因甲基化检测的 AUC<sup>ROC</sup> 为 0.762。笔者采用高通量的靶向甲基化测序分析血浆 cfDNA 甲基化筛查 CRC 效能,结果发现 AUC<sup>ROC</sup> 为 0.892,敏感性为 84.21%,特异性为 86.84%,准确性为 85.33%。此外,与血清 CEA 相比,其敏感性和准确性显著升高。提示血浆 cfDNA 甲基化可以作为 CRC 早筛的辅助手段。本研究分析发现,血浆 cfDNA 甲基化、血清 CEA 联合检测可显著提高筛查 CRC 的敏感性和准确性,在 CRC 早筛中具有较好的应用价值。

本研究的不足之处主要有 2 个方面:一是样本量较小,二是未纳入结直肠腺瘤等其他一些良性病变。在今后的研究中需增加样本例数,同时开展结肠腺瘤、炎症性肠病患者血浆 cfDNA 甲基化检测,进一步验证其诊断效能。综上所述,CRC 患者外周血中的 cfDNA 浓度与健康人群无差异,不能通过 cfDNA 浓度区分二者。而通过高通量测序检测

cfDNA 中特定多区域的甲基化,可以有效地区分 CRC 患者与健康人群。血浆 cfDNA 水平与 CRC 淋巴结转移相关,且检测敏感性优于 CEA、*Septin9* 甲基化。cfDNA 无创甲基化多靶点检测联合血清 CEA 可显著提高 CRC 筛查的敏感性和准确性,在 CRC 早筛中具有较好的临床价值,可作为潜在的 CRC 辅助诊断指标。

#### 4 参考文献

- [1] Chen W, Sun K, Zheng R, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(1): 1-12.
- [2] Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, *et al.* Fragment length of circulating tumor DNA[J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(7): e1006162.
- [3] Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 48832-48841.
- [4] 郑照正, 闵雨珊, 钱福初, 等. 定量分析结直肠癌患者血浆循环游离 DNA 的临床价值[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(3): 529-532.
- [5] Chen G, Peng JJ, Xiao Q, *et al.* Postoperative circulating tumor DNA as markers of recurrence risk in stages II to III colorectal cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 1-11.
- [6] 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.
- [7] Zhang H, Sun X, Lu Y, *et al.* DNA-methylated gene markers for colorectal cancer in TCGA database[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(4): 3042-3050.
- [8] Guo S, Diep D, Plongthongkum N, *et al.* Identification of methylation haplotype blocks aids in deconvolution of heterogeneous tissue samples and tumor tissue-of-origin mapping from plasma DNA[J]. *Nat Genet*, 2017, 49(4): 635-642.
- [9] Liu MC, Klein E, Hubbell E, *et al.* Plasma cell-free DNA (cfDNA) assays for early multi-cancer detection: The circulating cell-free genome atlas (CCGA) study[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29: vii14.
- [10] Lippman SM, Abate-Shen C, Colbert Maresso KL, *et al.* AACR white paper: shaping the future of cancer prevention-A roadmap for advancing science and public health[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2018, 11(12): 735-778.
- [11] 章维维, 邹红, 杨蓉, 等. 常规临床检验指标与结直肠癌临床病理参数的关联分析及诊断预测价值[J]. *临床检验杂志*, 2021, 39(3): 172-177.
- [12] 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.

(收稿日期:2021-08-26)

(本文编辑:许晓蒙)