

外周血 Septin9 基因甲基化检测在结直肠腺瘤中的预测价值

邓菊庆, 于璐, 廖丽琼, 杨忠存
(昆明市第一人民医院病理科, 云南昆明 650011)

[摘要] 目的 探讨外周血 Septin9 基因甲基化(mSEPT9)检测在结直肠腺瘤诊断中的预测意义。方法 收集 2020 年 10 月至 2022 年 5 月在昆明市第一人民医院病理科诊断为结直肠腺瘤的 31 名患者作为实验组, 21 例肠镜阴性受试者(消化科门诊患者)作为对照组。对 2 组人员进行外周血 mSEPT9 检测, 并收集其相应外周血 CEA 检测结果, 对检测结果采用受试者特征曲线进行统计分析。结果 mSEPT9 检测对腺瘤的曲线下预测面积(AREA of the ROC: AUC)为 0.7205($P < 0.05$), 分界值(CT 值)为 39.55, 此时对应的敏感度为 90.91%, 特异度为 56.67%; CEA 检测对腺瘤的 AUC 为 0.5333($P > 0.05$)。结论 外周血 mSEPT9 检测筛查结直肠腺瘤效果优于外周血 CEA 肿瘤标记物, 具有较好的敏感度及特异度, 一定程度上对 mSEPT9 筛查阳性人群再行侵入性肠镜检查, 更易为该类人群接受且可早期筛查结直肠腺瘤。

[关键词] Septin9 基因; 甲基化检测; 结直肠腺瘤

[中图分类号] R736.1 [文献标志码] A [文章编号] 2095-610X(2024)03-0151-06

Predictive Value of Peripheral Blood Septin9 Gene Methylation Assay in Colorectal Adenoma

DENG Juqing, YU Lu, LIAO Liqiong, YANG Zhongcun
(Dept. of Pathology, The 1st People's Hospital of Kunming City,
Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] Objective To investigate the predictive significance of Septin9 gene methylation(mSEPT9) in peripheral blood in the diagnosis of colorectal adenoma. Methods A total of 52 subjects were included, 31 patients with colorectal adenomas were collected as the experimental group in the Department of Pathology and 21 subjects with negative colonoscopy in the gastroenterology outpatient clinic were used as the control group from October 2020 to May 2022. mSEPT9 was detected in the two groups, and the results of CEA level in peripheral blood were collected. All the results were statistically analyzed using the Receiver Operating Characteristic(ROC). Results The area under the curve(area of the ROC: AUC) of mSEPT9 detection to predict the development of adenoma was 0.7205($P < 0.05$), And the cut-off value(CT value) was 39.55, the corresponding sensitivity was 90.91% and the specificity was 56.67%. The AUC of CEA detection for predicting adenoma was 0.5333($P > 0.05$). Conclusions The detection of mSEPT9 is better than that of CEA tumor marker detection in peripheral blood for screening colorectal adenomas with good sensitivity and relative specificity. Invasive colonoscopy for people with positive mSEPT9 screening results can be easier to accept by the general population.

[Key words] Septin9 Gene; Methylation detection; Colorectal adenoma

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)目前是消化道最常见的恶性肿瘤, 在 2020 年世界癌症报告数据中显示, 新发的结直肠癌病例数位居第二, 死

亡人数位居第五^[1]。在我国, 大部分结直肠癌确诊时多为中晚期, 5 a 生存率不足 50%。因此, 结直肠癌早期诊断率的提高显得尤为重要。结直肠

[收稿日期] 2023-11-20

[基金项目] 昆明市卫生健康委员会卫生科研课题项目(2020-01-04-001)

[作者简介] 邓菊庆(1983~), 女, 云南镇雄人, 医学硕士, 主管技师, 主要从事分子病理学研究工作。

[通信作者] 于璐, E-mail: 1772192143@qq.com

癌的主要发生途径为腺瘤癌变途径,传统腺瘤癌变途径导致 70%~90% 的结直肠癌,锯齿状新生物导致 10%~20% 的结直肠癌^[2]。目前主要筛查方法为肠镜、血清癌胚抗原检测、粪便潜血实验及近年来逐步开展使用的 mSEPT9 检测、多靶点粪便 FIT-DNA 检测等。上述方法各有优势及不足,特别是对于结直肠癌发生的早期病变-结直肠腺瘤的检测敏感性及其特异性差异较大。而结直肠癌的发生途径主要为腺瘤癌变而来,因此,如能通过提高对结直肠腺瘤早期诊断率从而进行无创-有创的分层递进检查,不仅结直肠癌的早期诊断率能显著提高,也易于在健康人群中进行推广筛查,从而可以显著提高结直肠癌筛查的可操作性。笔者通过对结直肠腺瘤实验组(包括低、高级别上皮内瘤变)和对照组(肠镜检查阴性)外周血 mSEPT9 检测结果分析并探讨其在结直肠腺瘤发生中的预测意义,并将其与外周血 CEA 结果进行对比,以期获得结直肠腺瘤早期诊断中最优化的筛查方案,并对是否进行侵入性肠镜做一定程度的分流作用,减少患者因行侵入性肠镜检查并发病风险及增加结直肠腺瘤筛查的可操作性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 10 月至 2022 年 5 月期间在昆明市第一人民医院病理科行结肠镜检查镜下取材送检诊断为大肠腺瘤的 30 名患者作为实验组研究对象,将 22 例肠镜检查结果阴性受试者作为对照组研究对象。该研究中受试者均签署知情同意书,并经本院医学伦理委员会审查批准通过,伦理批件号: YLS-53。

1.1.1 纳入标准 (1)实验组:受试者均经肠镜及组织活检病理诊断,依据诊断标准^[3]确诊为结直肠腺瘤,含 25 例低级别腺瘤(包含管状腺瘤伴低级别上皮内瘤变、绒毛状-管状腺瘤伴低级别上皮内瘤变;5 例高级别腺瘤(包含绒毛状-管状腺瘤伴高级别上皮内瘤变、管状腺瘤伴高级别上皮内瘤变、锯齿状腺瘤伴高级别上皮内瘤变);(2)对照组:经结肠镜检查检测无结直肠腺瘤受试者。

1.1.2 排除标准 (1)受试者存在全身感染性疾病、精神疾病,以及其他严重器质性病变;(2)女性受试者处于妊娠状态;(3)受试者年龄大于 75 岁。

1.1.3 观测指标: 实验组及对照组受试者均检测有外周血外周血 mSEPT9 及 CEA 血清浓度。

1.2 研究方法

本检测是运用实时荧光定量 PCR 平台,采用甲基化特异性引物和 Taqman 特异性荧光检测技术,偏向扩增和检测甲基化片段。利用重亚硫酸盐处理 DNA 可将未甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶,而甲基化特异性引物特异识别甲基化片段,并偏向扩增甲基化模板,利用 Taqman 探针特异性识别甲基化片段,以鉴别甲基化片段的存。另外通过 Blocker 与非甲基化片段的结合,抑制高浓度野生型 DNA 可能存在的翘尾现象。本试剂盒选择 Sep 和内参基因 ACTB 同时扩增的双重 PCR 受控体系,通过阳性质控品和阴性质控品与样本平行提取、纯化、PCR 检测,可对样本的检测过程进行质控。

标准化操作规程:(1)含 EDTA 抗凝剂的采血管进行采血 5 mL、温度为 2~8 °C 保存;(2)血浆游离 DNA 提取:采用磁珠法进行血浆游离 DNA 的提取;① DNA 纯化:采用纯化试剂进行血浆游离 DNA 的纯化,利用纯化试剂对纯化后的产物进行纯化,作为 mSEPT9 检测的模板;② 血浆样品中 SEP9 甲基化检测(荧光 PCR 法);③ 分析 PCR 结果: FAM CP ≤ 47.93,有扩增信号,且呈 S 型扩增曲线趋势,并且 VIC CP ≤ 40.21 则结果为阳性; FAM CP > 47.93,并且 VIC CP ≤ 40.21 则结果为阴性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 及 GraphPad Prism 9 软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用受试者特征曲线(ROC)进行外周血 mSEPT9 检测结果及外周血 CEA 结果对特异性及敏感性进行统计分析,采用 Fisher 精确检验对 mSEPT9 结果与腺瘤级别进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者基本信息

实验组(腺瘤组 30 例):(1)低级别腺瘤组 25 例:绒毛状-管状腺瘤伴低级别上皮内瘤变 7 例,男性 6 例,其中 mSEPT9 阳性 5 例,平均年龄(51.80 ± 13.85)岁;阴性 1 例:69 岁;女性 1 例:mSEPT9 阴性;管状腺瘤伴低级别上皮内瘤变 18 例:男性 9 例,其中 mSEPT9 阳性 4 例,平均年龄(53.00 ± 5.35)岁;阴性 5 例:平均年龄(50.80 ± 22.65)岁;女性 9 例:其中 mSEPT9 阳性 7 例,平均年龄(59.43 ± 10.75)岁;阴性 2 例,平

均年龄(66.50 ± 6.36)岁。(2)高级别腺瘤组: 5例: 绒毛状-管状腺瘤伴高级别上皮内瘤变2例: 男性1例, mSEPT9 阴性, 72岁; 女性1例, mSEPT9 阳性, 49岁, 管状腺瘤伴高级别上皮内瘤变2人: 男性1例 mSEPT9 阴性, 67岁; 其中, 女性, 1例, mSEPT9 阳性, 73岁; 锯齿状腺瘤伴高级别上皮内瘤变, 女性1例, mSEPT9 阳性, 49岁。对照组: 男性7例, 女性15例, 平均年龄(47.77 ± 12.01)岁。

2.2 CEA 血清浓度

实验组2例大于 3.4 ng/mL , 分别为 5.44 及 8.88 ng/mL ; 对照组: CEA 血清浓度均小于 3.4 ng/mL 。

2.3 结直肠低、高级别腺瘤的病理形态

低级别管状腺瘤及绒毛状管状腺瘤共计25例, 高级别绒毛管状及锯齿状腺瘤共计5例, 其病理形态见图1: 低级别管状腺瘤: 见增生的腺管, 腺上皮细胞核柱状, 排列紧密; 低级别绒毛状管状腺瘤: 见增生的腺体, 呈乳头状及腺管状, 腺上皮细胞核柱状, 排列紧密; 高级别绒毛状腺瘤: 见增生的乳头状结构, 腺体上皮细胞核卵圆形、圆形, 有异型, 核分裂像可见; 锯齿状腺瘤: 见增生的腺体呈锯齿状, 腺上皮细胞核圆形、卵圆形, 有异型, 可见核分裂。对照组为肠镜阴性门诊患者, 因此无病理形态图。图1所显示的病理形态图是本次研究实验组入组对象的病理形态图, 代表了入实验组研究对象的主要镜下结构。

2.4 外周血 mSEPT9 检测比 CEA 检测有更高的敏感度、特异度的预测价值

外周血 mSEPT9 检测, 受试者特征曲线显示: 曲线下面积为 0.7205 , $P=0.0070$, 差异具有统计学意义, 利用约登指数计算其分界值(Cut-off 值)即 CT 值是 39.55 , 对应的敏感度为 90.91% , 特异度为 56.67% ; 外周血 CEA 血清浓度检测受试者特征曲线显示: 曲线下面积为 0.533 , $P=0.6837$, 见图2。

2.5 低、高级别腺瘤组 mSEPT9 检测结果

在本研究中腺瘤高级别受试者有5例, 阳性3例, 阴性2例, 阳性率 60% , 腺瘤低级别受试者有25例, 阳性17例, 阴性8例, 阳性率 68.00% , 将2组腺瘤对应的 mSEPT9 阳性例数进行 Fisher 精确检验($P>0.05$), 见图3。

3 讨论

Septin 是一类具有鸟苷三磷酸活性的保守基因家族, 广泛存在于生物中, 其中 Septin9 基因是 Septin 基因家族的一员, 位于人类染色体 $17q25.3$, 是一种细胞周期相关蛋白, 参与许多生物过程, 如细胞分裂、胞膜重建、极化、囊泡运输、脱氧核糖核酸修复、细胞迁移及凋亡^[4], 与人类很多疾病尤其是肿瘤相关, 在其发生发展中发挥重要作用。目前, 已有多项研究通过检测受检者外周血游离 Septin9 异常甲基化发生情况, 从而判断受检者患结直肠癌的可能性, 但其作为

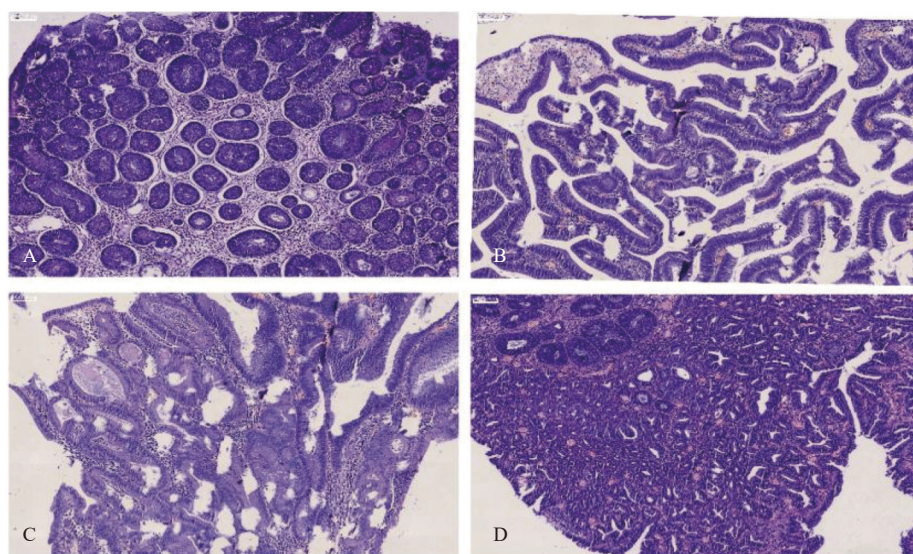


图1 结直肠低、高级别腺瘤的 HE 病理形态($\times 20$)

Fig. 1 Pathological morphology of colorectal low- and high-grade adenoma by HE staining ($\times 20$)

A: 低级别管状腺瘤; B: 低级别绒毛状管状腺瘤; C: 高级别绒毛管状腺瘤; D: 高级别锯齿状腺瘤。

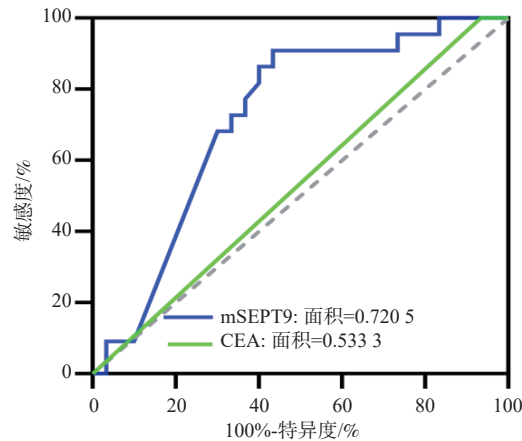


图 2 外周血 mSEPT9 检测结果与 CEA 血清浓度的 ROC 曲线比较

Fig. 2 The ROC comparison between the detection of mSEPT9 and CEA in peripheral blood

A: 外周血 mSEPT9 甲基化 ROC 曲线; B: 血清 CEA 表达水平 ROC 曲线。

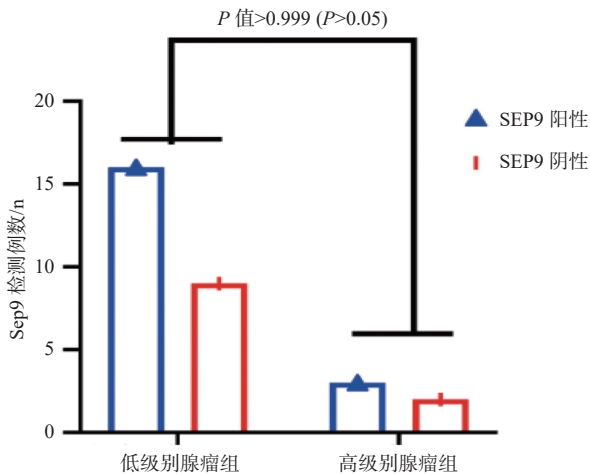


图 3 低、高级别腺瘤组 mSEPT9 阳性数的比较

Fig. 3 Comparison of mSEPT9 positivity in the low- and high-grade adenoma groups

预测早期结直肠癌报道的敏感性及其特异性却各不相同^[5-7]。

3.1 SEP9 基因甲基化在结直肠腺瘤中的敏感性及其特异性

WARREN JD、CHURCH TR 等^[8-9] 研究显示, 血浆 mSEPT9 在结直肠腺瘤/息肉组中的阳性检出率(11.5% 和 11.2%)与对照组(10.0% 和 9.1%)相比, ($P > 0.05$), 提示血浆 mSEPT9 及血清 CEA 对结直肠良性肿瘤(如腺瘤与息肉)的检出率不高, 这与笔者的研究结果不一致。本研究显示外周血 mSEPT9 检测显示 ROC 曲线下面积为 0.7205, P 值为 0.0070 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义。敏感度为 90.91%, 特异度为 56.67% ($0.9000 > 0.7205 > 0.7000$), 说明其敏感性高、特异性相对较好, 这与吴东等^[10] 研究结果显示的诊断进展期腺瘤的敏感度为 67.6%, 特异度为 47.4% 相似。说明

mSEPT9 检测可以用于结直肠腺瘤筛查, 并且因为其检测方法便捷、患者依从性较好, 从而对结直肠癌的早期诊断具有良好的临床推广作用。

3.2 检测平台, 检测方法灵敏性, 特异性及临床应用

本研究利用甲基化特异性引物和 Taqman 特异性荧光检测技术基于实时荧光定量 PCR 平台对外周血进行 mSEPT9 的检测, 证实了其在结直肠腺瘤中的敏感性及其特异性。也有部分学者通过改进或创新, 研究新的检测平台以达到更好的操作接受度和更多的临床应用。如 Ma Z Y 等^[11] 研究显示 mSEPT9 率、甲基化丰度及 CEA 的水平在结直肠癌患者中比正常对照组高, 有统计学差异, 在 CRC 中甲基化发生率及丰度的曲线下面积分别为 0.707 和 0.710。甲基化丰度从近端到远端结直肠癌中有增加的趋势, 差异具有统计学意义; 术后 3 个月, 甲基化率、甲基化丰度都有下降, 尤其在三期及直肠癌中明显, 差异均具有统计学意义。另外也有学者研制出一个微滴式数字 PCR 平台可对结直肠癌病人血浆 SEP9 进行定量的检测。SEP9 甲基化丰度早期术后下降, 这可能用于监测术后治疗反应的有效性^[12]。Qiu Liang 等^[13] 研制了一种检测双链 DNA 的新型 mSEPT9 检测方法, 在这个方法中甲基化 DNA 连同质控基因的特异序列能够在一次反应中得到扩增及检测, 对结直肠癌发生的敏感性及其特异性分别为 77.4%, 97.8%, 对于临床早期结直肠癌检测有更好的诊断价值。此外, 也有研究者探索 mSEPT9 检测联合不同的标记物, 检测其在肿瘤中的表达情况。如 LEI ZHANG 等^[12] 通过联合 SEPT9 甲基化与编码蛋白基因 Synuclein Gamma(SNCG)检测, 发现其在食道癌中不同分期表达存在差异, 联合检测敏感性有所提高。总之, 甲基化在部分癌症发生的过程

中发挥着重要作用, 通过单独或联合筛查筛出早期病变如腺瘤等是笔者努力探索的方向。

3.3 mSEPT9 阳性界定值及如何提高检测敏感度及特异度

本研究中, 外周血 mSEPT9 检测受试者特征曲线显示 SEP9 在 CT 值为 39.55 是分界值, 这与试剂盒建议的小于 41 为阳性有一定的差异, 笔者分析这与本研究总体样本量较小, 而且是单中心研究结果有一定的关系, 而且可能与本研究结果主要针对的是结直肠癌早期病变-结直肠腺瘤有关, 尚需增大样本量、多中心的研究进一步证实。同时, 在 39.55 分界值时候敏感度为 90.91%, 特异度为 56.67%, 敏感度较高、而特异度不是很强。因此, 在结直肠腺瘤或结直肠癌早筛的过程中, 可以通过多个标记物的联合检测以提高敏感性及特异性, FEI XU 等^[14]通过联合检测 mSEP9 和支链氨基酸转氨酶 1 (branched chain amino acid transaminase 1, BCAT1) 对于结直肠癌的诊断敏感性可达 83.7%, 特异性可达 93.9%, 曲线下面积为 0.908。目前, 报道稍多的是 SEP9 基因甲基化联合大便隐血免疫法 (fecal immunochemical test, FIT) 检测, H. W 等^[15]联合 FIT 和 DNA 甲基化检测 (包括 mSEPT9), 对结直肠癌敏感性提高到 81.5%, 曲线下面积为 0.93, 优于单独的 FIT, 差异具有统计学意义, 而对腺瘤的敏感性为 27.8%, 特异性为 94.4%, 多维检测在不同阶段的肿瘤中的敏感性及特异性也不同。因此, 探讨更便捷和经济的联合检测方式筛查结直肠腺瘤依然是待解决的问题。可以通过多中心、大样本、多分层的研究得到更加经济有效的检测方法, 使阴性检测者不必接受肠镜等侵入性检查, 而结直肠腺瘤患者能够更有针对性接受肠镜检查, 从而大范围减少由腺瘤恶变为癌的可能。

3.4 结直肠腺瘤中 mSEPT9 与外周血 CEA 敏感性及其特异性的比较

目前, 临床常用筛查结直肠癌的方法主要是检测外周血肿瘤标记物, 如 CEA、CA19-9、CA125 等, 而这些标记物一般可在多种恶性肿瘤中有不同程度的升高因此对结直肠癌的诊断特异性较差。尤其是在结直肠癌发生的早期病变-腺瘤中的敏感性及特异性则更不明显, 这在笔者的研究中也得到证实。本研究在结直肠腺瘤中外周血 CEA 检测的受试者特征曲线显示曲线下面积为 0.533, P 值为 0.6837 (> 0.05), 差异无统计学意义, 因此, 不能单独将外周血 CEA 检测用于结

直肠腺瘤的筛查。

3.5 低级别与高级别腺瘤 mSEPT9 的比较

在结果中经过 Fisher 精确统计, 低级别与高级别腺瘤 mSEPT9 阳性例数差异无统计学意义, 这也许并不能完全代表真实的客观情况, 因为此次受试者样本量少尤其高级别腺瘤组受试者样本量很少, 只有 5 例, 通过这次研究入组对象等分析在后续的研究中纳入腺瘤更细分类入组及增加入组样本数量, 并进行多中心研究对于得到更加客观的结论非常重要, 只有这样得到的结论才更能分层分类指导临床推广应用。

综上所述, 在结直肠癌早期病变-腺瘤的早期筛查中, 本研究结果一定程度上为临床优先进行 mSEPT9 检测进行有效分层管理, 再对阳性人群进行侵入性肠镜检查提供了一定的理论基础, 这样一定程度上可增加结直肠癌或腺瘤早期筛查的阳性诊断率, 并可增加该类筛查人群对肠镜检查的接受度及相应减少肠镜侵入性检查的有可能造成的并发症风险。

本研究有一定的局限性, 首先是样本量相对较少, 其次是没有进行多因素的分析, 因此研究结果外周血 mSEPT9 检测对预测结直肠腺瘤有较高的敏感性, 和相对较好特异性的结论要慎重解读, 后续项目组可通过优化如纳入更细分层, 入组更多样本量、多中心、多因素分析及联合其他检测项目对结直肠腺瘤进行早期预测及诊断研究, 以期对结直肠癌早期病变-腺瘤筛查诊断及管理提供更好的检测保障。

[参考文献]

- [1] Wild C P, Weiderpass E, Stewart B W. World cancer report: Cancer research for cancer prevention [EB/OL]. (2020-06-20). <https://publications.iarc.fr/586>
- [2] E S Lander. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer[J]. *Nature*, 2012, 487 (7407): 330-337.
- [3] 黄丹 朱雄增 盛伟琪. 2019版《WHO消化系统肿瘤分类》胃肠上皮性肿瘤部分解读[J]. 2020, 49(3): 209-213.
- [4] Sun J, Zheng M Y, Li Y W, et al. Structure and function of Septin 9 and its role in human malignant tumors[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2020, 12(6): 619-631.
- [5] Kang Q, Jin P, Yang L, et al. Significance of Septin9 gene

- methylation detection of plasma circulation DNA in colorectal cancer screening[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2014, 94(48): 3839–3841.
- [6] Loomans-kropp H A, Song Y, Gala M, et al. Methylated septin9 (mSEPT9): A promising blood-based biomarker for the detection and screening of early-onset colorectal cancer[J]. *Cancer Res Commun*, 2022, 2(2): 90–98.
- [7] Lu D C, Zhang Q F, Li L, et al. Methylated Septin9 has moderate diagnostic value in colorectal cancer detection in Chinese population: A multicenter study[J]. *BMC Gastroenterol*, 2022, 22(1): 232.
- [8] Warren J D, Xiong W, Bunker A M, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer [J]. *BMC Med*, 2011, 14: 9: 133.
- [9] Church T R, Wandell M, Lofton-day C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer[J]. *Gut*, 2014, 63(2): 317–325.
- [10] 吴东, 杨红. 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]. *中华消化杂志*, 2016, 36(2): 107–112.
- [11] Ma Z Y, Chan C S Y, Lau K S, et al. Application of droplet digital polymerase chain reaction of plasma methylated septin 9 on detection and early monitoring of colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23446.
- [12] Zhang L, Yang X Y, Zhang T L, et al. Noninvasive detection of esophageal cancer by the combination of mSEPT9 and SNGG[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2022, 26(1): 8–16.
- [13] Liang Q, Huang Z, Xu Q, et al. A newly developed Septin9 gene methylation assay detecting double DNA strands for screening of colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13): 3329.
- [14] Xu F, Yu S S, Han J Y, et al. Detection of circulating tumor DNA methylation in diagnosis of colorectal cancer[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2021, 12(8): e00386.
- [15] Mo S B, Wang H, Han L Y, et al. Fecal multidimensional assay for non-invasive detection of colorectal cancer: Fecal immunochemical test, stool DNA mutation, methylation, and intestinal bacteria analysis[J]. *Front Oncol*, 2021, 36(2): 643136.