

基于粪便DNA甲基化检测的结直肠癌早期诊断

肖白丁 尧晨光 李涵沛 胡康洪*

DOI:10.12238/bmtr.v6i3.7511

[摘要] 粪便DNA甲基化检测是一种基于DNA甲基化在正常细胞和癌变细胞之间差异的结直肠癌 (Colorectal Cancer, CRC) 早期诊断方法。该技术简单、无创伤,具有较高的敏感度和特异性。用于检测的标志分子,包括隔膜蛋白9(Septin 9 gene, SEPT9)、波形蛋白(Human Vimentin, VIM)、分泌型卷曲相关蛋白2(Secreted Frizzled Related Protein 2, SFRP2)等已在一些地区被批准用于筛查和诊断,而其他的标志分子如人肿瘤高甲基化1基因(Hypermethylated in Cancer1,HIC-1)、组织因子通道抑制因子2(Tissue Factor Pathway Inhibitor2,TFPI2)和黏结蛋白聚糖2(Syndecan-2,SDC2)也显示出了潜在价值。尽管仍需要更多的临床验证,但粪便DNA甲基化检测为提高结直肠癌的早期筛查检出率和早期治疗率提供了重要工具。

[关键词] 结直肠癌; 早期诊断; 粪便DNA甲基化检测; 黏结蛋白聚糖2

中图分类号: R735.3+7 **文献标识码:** A

Early diagnosis of colorectal cancer based on stool DNA methylation

Baiding Xiao Chenguang Yao Hanluo Li Kanghong Hu*

[Abstract] Stool DNA methylation detection is a method for the early diagnosis of Colorectal Cancer(CRC) based on differences in DNA methylation between normal cells and cancerous cells. It is simple, non-invasive and of high sensitivity and specificity. Marker molecules such as Septin 9 gene (SEPT9), Human Vimentin (VIM), Secreted Frizzled Related Protein 2 (SFRP2), etc. are used for detection and have been approved for screening and diagnosis in some regions. Other biomarkers such as Hypermethylated in Cancer 1 (HIC-1), Tissue Factor Pathway Inhibitor 2 (TFPI2), and Syndecan-2 (SDC2) have also shown potential value. Although more clinical validation is needed, stool DNA methylation testing provides an important tool for improving screening rates and early detection of CRC.

[Key words] Colorectal Cancer (CRC); Early diagnosis; Stool DNA methylation detection; Syndecan-2(SDC2)

前言

结直肠癌 (Colorectal Cancer, CRC) 是一种常见的恶性肿瘤,全球发病率排第三,死亡率排第二位^[1]。每年有数百万人被诊断,其中一半以上患者在发现时已进入晚期,治疗效果较差,且生存率低。CRC早期形态较小,不引起明显的周围组织变化,患者往往不会感到任何不适。因此,定期筛查是早期CRC发现和治疗的關鍵,例如大便隐血试验或结肠镜检查。随着CRC的发展及变大,开始侵犯周围组织,相关症状就会出现,包括:排便习惯的改变(如便秘、腹泻或交替性),明显的血便,持续的腹部不适或疼痛,体重减轻,疲劳和乏力。上述症状可能是由于肿瘤在物理上阻碍了肠道,或者是由出血造成的贫血。当CRC进展到更晚的阶段,肿瘤可能已经扩散到结肠或直肠的深层组织,或者转移到其他器官,如肝脏、肺部或腹膜。晚期CRC的治疗要复杂得多,通常需要结合手术、放疗和化疗,其治愈率下降,且复发和死亡的风险增加。为了提高生存率和减少死亡风险,对于高风险人群

或者到了一定年龄的人,推荐进行定期的结肠癌筛查。通过筛查,许多CRC可以在无症状的早期阶段被发现,从而获得更高的治疗成功率。

结直肠癌的发生通常经历腺瘤-不典型增生-癌这一演变过程,这一过程大概10-15年。而干预越早生存率越高,到了疾病进展期,生存率就会随着时间的推移而显著下降,手术效果也不佳,治疗费用反而越来越高。(引用自文献^[2-3],有修改)

一般,结直肠癌经历腺瘤-不典型增生-癌这一演变过程,约为10-15年。干预越早,患者的生存率越高。据统计,当CRC在早期被发现并治疗时,5年生存率可超过90%(如图(1),而当CRC在晚期才发现时,该比例将大幅度下降。此外,早期的CRC患者可以有更多的治疗选择,包括内镜下治疗、手术切除、化疗、放疗等^[2-3]。这些治疗在早期癌症上往往更为有效且副作用更小,且早期治疗可以降低复杂手术和其他高风险治疗的需要,从而降低并发症的风险。

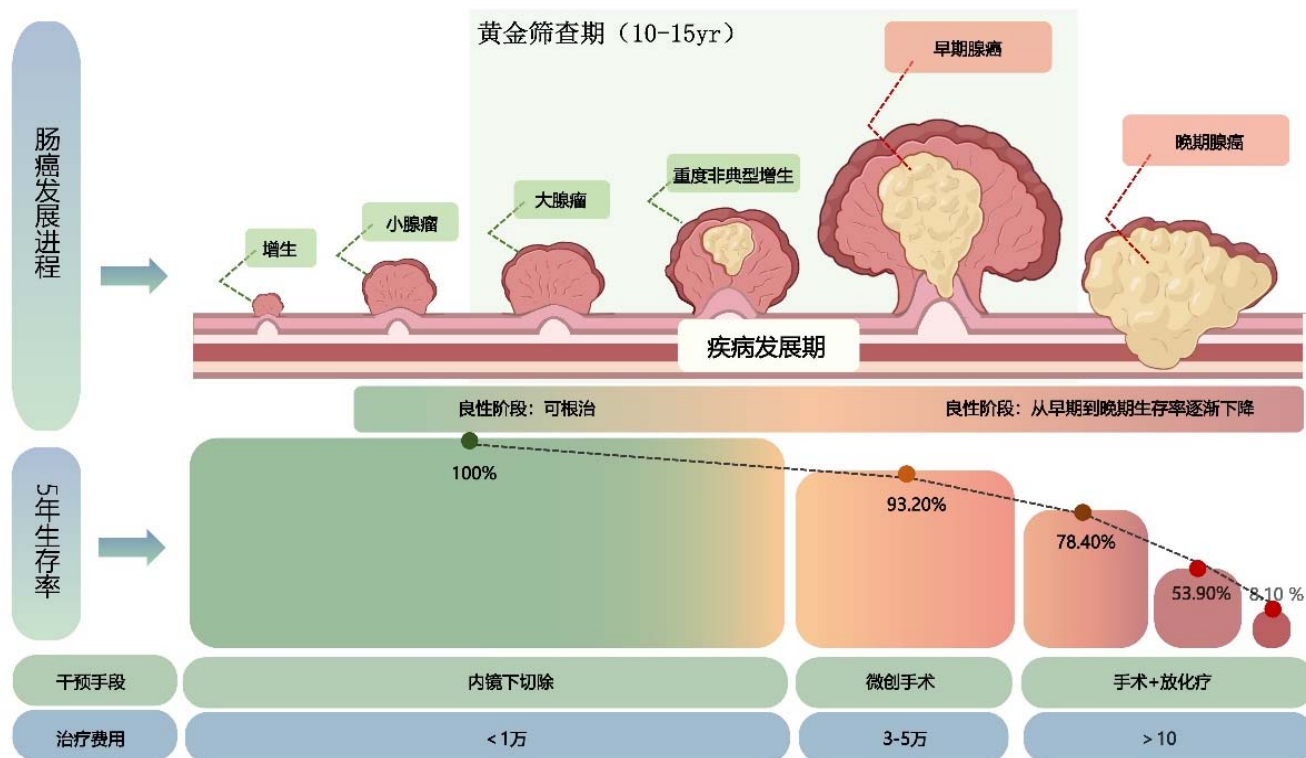


图1 结直肠癌的演变过程：腺瘤-不典型增生-癌

当前CRC诊断方法的金标准仍然是结肠镜检查,该方法较为准确,可以查看结直肠的内部并取组织样本进行活检。然而,该方法属于侵入性操作,相对复杂,且患者的肠道准备较为麻烦,可能对患者造成不适,使得患者依从性较低。另外,由于结直肠管在检查时可能出现皱缩,导致内镜所见肿物与肛缘距离可能产生误差,需要结合计算机断层扫描(computed tomography, CT)、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)等方法明确病灶部位^[4]。除此之外,粪便潜血试验是一种非创伤性检测,可检出粪便隐血,但其可能出现假阳性或假阴性的结果。CT结肠造影,是一种图像诊断方法,可以查看大肠的组织形态,但一般只能看到中晚期占位性病变,不适用于CRC的早筛。因此,寻找新的诊断方法极为迫切,它应具有非创伤性、准确性、可及性,以减少对患者的身体和心理压力,同时确保尽量少的假阳性和假阴性结果。简单、准确和无创的早期诊断CRC的方法不仅可以鼓励更多人群定期进行筛查,提高早期发现率和患者生存率,还能为医疗体系带来更大的经济效益。粪便基因检测,无侵入性、敏感度高、特异度高,结果不受肿瘤所在位置的影响,对近端肠癌和远端肠癌都能够有效检出,并且腺瘤的检出率远高于粪便隐血试验,是具有前景的CRC癌前病变筛查方法^[5]。本文综述了CRC早期诊断中粪便DNA甲基化检测技术的基本原理、标志分子及其应用现状的研究进展。

1 结直肠癌早期诊断手段

CRC是全球癌症发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一。早期诊断和治疗是提高CRC患者生存率的关键。目前,CRC的常规筛查

方法主要包括粪便潜血试验、结肠镜检查 and 影像学检查等。然而,这些方法都存在一定的局限性。粪便潜血试验虽然简单易行,但其准确性较低,很容易产生误诊和漏诊。结肠镜检查虽然准确性较高,但其侵入性较强,存在穿孔、出血等风险,患者普遍对此感到不适和抵触^[6]。影像学检查则主要用于确定肿瘤的位置和分期,并不能直接检测肿瘤的早期变化。因此,研究人员一直在寻找更准确、非侵入性的早期诊断方法。

DNA甲基化是一种表观遗传学修饰方式,具体表现为一个甲基基团(CH₃)加到DNA分子的胞嘧啶(C)碱基上,形成5-甲基胞嘧啶。这种修饰通常发生在CpG岛上(cytosine-Phosphoric acid-guanine, CpG),是一个富含胞嘧啶和鸟嘌呤的DNA序列区域。当CpG岛发生甲基化时,与之相关的基因通常会被沉默或其表达受到抑制。在某些癌症中,特定基因的异常甲基化与癌症的发生和发展密切相关。在CRC中,研究表明某些与癌症抑制相关的基因会发生异常甲基化,如锯齿状肿瘤的表现基因组不稳定性依赖于CpG岛甲基化的失调。抑制基因启动子区域的异常高甲基化导致基因沉默并促进了肿瘤进展^[7]。随着科学技术的进步,现在我们可以从粪便样本中提取DNA,并检测其甲基化状态。通过对这些DNA进行甲基化分析,可以评估是否存在与CRC相关的异常甲基化,从而来早期诊断结直肠癌,粪便DNA甲基化检测技术便应运而生。

2 粪便DNA甲基化检测

人类肠道每时每刻都有许多肠道上皮细胞脱落进入肠腔,随粪便一起排出体外。粪便DNA检测便是基于肠道上皮细胞不断脱

落的一种新的肠道肿瘤筛查方法^[8],通过收集粪便中脱落的肿瘤细胞进行DNA分离,可以检测出异常的遗传和表观遗传改变。通过这种方式,KRAS突变和一些特定基因(如BMP3,NDRG4,TFP12和vimentin等)的异常甲基化被用于鉴别肠道肿瘤^[9-11]。鉴于粪便DNA检测无创、便捷和性能优异等特性,非常适合用于一般风险人群的大规模筛查。2016年,粪便DNA检测首次被美国预防服务工作组认可成为结直肠癌筛查策略^[12]。此后,粪便DNA检测又陆续被美国多学会工作组、NCCN和美国癌症协会颁发的CRC筛查指南当中推荐^[13-15]。

DNA异常低甲基化一般发生在癌症的早期阶段,如炎症、腺瘤、早期腺癌等阶段(如图2)。几乎75%的CRC病例有肿瘤抑制基因APC(adenomatous polyposis coli)突变,引起Wnt信号激活,导致肠内腺瘤性息肉的发展^[16]。有研究表明,泛素化末端水解酶L1(ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1,UCHL1)可能通过其去泛素化活性激活 β 连环蛋白/T细胞因子(β -catenin/TCF)途径,使得人回盲肠癌细胞(Human Return Cystic Cancer Cells,HCT-8)增殖、侵袭和转移增强,从而促进了结直肠癌的进展^[17]。腺瘤细胞中的Kras G12D突变可导致息肉形成增加,甚至引发晚期恶性表型^[16]。CRC表现一致的基因组改变亚型特征模式,显著突变的基因包括APC、TP53、SMAD4、PIK3CA和KRAS等^[18]。DNA甲基化是指DNA序列中的CpG位点(胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤位点)在DNA甲基转移酶催化下,通过将胞嘧啶转化为5-甲基胞嘧啶,以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体的过程。DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式,它在基因调控、细胞分化以及疾病发生中起着重要的作用^[19]。特别是在癌症的发生和发展中,DNA甲基化的异常变化往往与基因的沉默、失活以及细胞增殖的异常有关^[20]。因此,通过检测DNA甲基化的状态,可以为癌症的早期诊断、预后评估和治疗提供重要的信息。

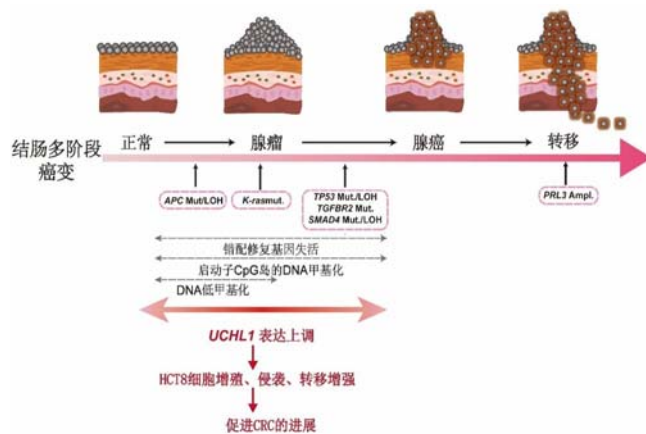


图2 基因突变和甲基化参与早期腺癌的形成

肠癌发生的各个阶段参与突变的基因如图所示。DNA异常低甲基化一般发生在癌症的早期阶段(炎症、腺瘤、早期腺癌等阶段)。另外有研究表明,UCHL1可能通过其去泛素化活性激活 β -catenin/TCF途径,使HCT-8增殖、侵袭和转移增强,从而促进结直肠癌的进展。(引用自文献^[16-18],有修改)

粪便DNA甲基化检测是一种新兴的CRC早期诊断方法,具有许多优势。首先,这种检测方法是非侵入性的,不需要进行手术或者其他创伤性的操作,只需要收集患者的粪便样本即可进行检测。相比之下,传统的CRC诊断方法,如结肠镜检查或者组织活检,需要插入器械进入患者体内,给患者带来一定的不适和风险。其次,粪便DNA甲基化检测具有简便快捷的特点。患者只需要在家中或者医院收集一份粪便样本,无需复杂的操作或者特殊的设备,将样本送至实验室进行检测即可。相比之下,传统的CRC诊断方法需要预约和前往医院进行检查,可能需要花费较长的时间和精力。最后,粪便DNA甲基化检测还具有低成本的优势。相比传统的CRC诊断方法,如结肠镜检查或者CT,粪便DNA甲基化检测的费用更为低廉。这是因为粪便DNA甲基化检测不需要昂贵的医疗器械和专业人员的操作,只需要一些基本的实验室设备和技术即可完成。根据检测原理,粪便DNA甲基化检测可分为单基因和多基因两大类。

2.1 单基因甲基化检测

单基因甲基化检测,本文列举了目前最主要的5个检测靶标,分别是分泌型卷曲相关蛋白2(Secreted Frizzled Related Protein 2,SFRP2)、肿瘤高甲基化1基因(Hypermethylated in Cancer1,HIC-1)、波形蛋白(Human Vimentin,VIM)、组织因子途径抑制剂(Tissue Factor Pathway Inhibitor 2,TFPI2)、黏结蛋白聚糖2(Syndecan-2,SDC2)。各靶标分子的作用以及检测的优势和局限性如表1所示。其中,SFRP2、TFPI2、SDC2这3个基因具有双高的特性(CRC高敏感度和高特异性),使得相关的CRC筛查检测产品备受关注。

2.1.1 SFRP2

SFRP2是关键的细胞信号调节蛋白,参与多种生物学过程,包括细胞增殖、分化和凋亡。其核心作用在于与Wnt信号通路进行交互,从而调节细胞功能。在正常情况下,SFRP2与Wnt配体和卷曲受体结合,维持细胞的稳态。然而,早期的研究结果显示,CRC中SFRP2基因出现明显的甲基化改变。这些改变导致SFRP2的表达减少,进而影响其功能。最关键的发现是,当SFRP2基因发生甲基化,Wnt信号通路会被其激活,引起细胞功能失调,特别是促进了癌细胞的增殖和生长,是CRC发生的关键步骤^[21]。在CRC细胞中,SFRP2表现出高度的甲基化。而这种甲基化状态与CRC的早期发现和预后评估有很强的相关性。为了进一步利用这一发现,有研究者尝试使用粪便DNA甲基化检测技术来检测SFRP2基因的甲基化水平。这种技术为CRC的早期诊断和筛查提供了新的方法^[22]。

2.1.2 HIC-1

HIC-1基因,作为一种肿瘤抑制基因,扮演着至关重要的角色。首先,HIC-1基因位于第17号染色体的p13.3位点,这一定位使其容易受到甲基化的影响。在健康组织中,HIC-1基因被普遍表达,并在细胞功能中扮演重要角色。该基因不仅能够调节正常细胞系,也可影响多种肿瘤细胞系的细胞增殖、存活和生长停滞。在肝癌和CRC等恶性肿瘤中,甲基化使得HIC-1基因的表达显

表1 单基因甲基化检测靶标分子

标志分子	作用	优势	局限性
分泌型卷曲相关蛋白2 (SFRP2)	调节细胞功能, 与 Wnt 信号通路交互	早期诊断和预后评估有很强的相关性; CRC 的早期筛查的新方法	只是基于甲基化检测
肿瘤高甲基化 1 基因 (HIC-1)	调节细胞增殖、存活和生长停滞	非常有前景的 CRC 早期诊断方法	敏感度偏低, 只是基于甲基化检测
波形蛋白 (VIM)	维持细胞完整性, 上皮-间质转化的标志	早期诊断率可能会大大提高; 有望成为 CRC 筛查的重要工具	敏感度偏低, 需进一步研究验证其作为 CRC 治疗靶点的可能性
组织因子途径抑制剂 (TFPI2)	防止细胞外基质被降解, 抑制癌细胞体外增殖及集落形成	早期识别出患有 CRC 的病人的强有力工具	仍需验证在不同阶段和类型的 CRC 中的应用性
黏结蛋白聚糖 2 (SDC2)	调节细胞黏附、迁移、增殖及血管生成	改变 CRC 的早期诊断模式, 为患者提供更为精准的治疗选择	SDC2 的过度表达与其 DNA 的甲基化共存可能造成的复杂性需要进一步研究

著下降, 而且甲基化的HIC-1基因在某些肿瘤的早期阶段就可以被检测到。因此, HIC-1基因甲基化可能是促进这些肿瘤发展的关键机制之一^[23]。

为了进一步证实这一假设, 研究者对CRC患者的粪便进行了检测, 结果显示HIC-1启动子的甲基化阳性。相反, 健康人的粪便样本中并没有检测到这种甲基化的改变。通过粪便中的DNA甲基化检测, 我们可以早期检测到HIC-1基因的甲基化状态, 为患者提供早期治疗并评估其预后。这一发现进一步强调了HIC-1基因甲基化水平在CRC中的重要临床意义^[24]。

2.1.3 VIM

波形蛋白是一种关键蛋白质, 在正常间质细胞中广泛表达, 并在维持细胞完整性中起到核心作用^[25]。一项研究揭示, VIM基因的启动子区域的异常甲基化现象可能是导致结直肠癌发生的重要环节, 并且对CRC具有高敏感性(83%)和特异性(82%)^[9]。更为关键的是, 检测人类粪便DNA中异常的波形蛋白外显子1甲基化发现了近一半的结肠癌患者, 特异性为90%。这种异常甲基化并不仅仅是CRC的一个简单标记, 而是与CRC的发生和发展有着深刻的关联。这意味着, VIM可能是一个CRC的潜在治疗靶点^[26]。

此外, 科学家基于这一研究成果开发出了一个粪便DNA甲基化检测技术, 可以非常精确地检测VIM基因启动子区域的甲基化水平。初步的实验数据表明, 这种检测方法不仅非常敏感, 而且特异度也很高。因此, 它有可能成为未来CRC筛查的重要工具, 有望大大提高CRC的早期诊断率^[27]。

2.1.4 TFPI2

TFPI2, 作为Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的一员, 在细胞外基质中扮演着关键的角色。它的存在可以防止细胞外基质被降解, 并对癌细胞的体外增殖及集落形成产生抑制作用。但值得关注的是, TFPI2基因的甲基化会导致该基因的沉默, 为细胞的侵袭性行为打开大门, 并在癌症的形成与扩展中发挥核心作用^[28]。早期的研究成果进一步突显了这一点。对于CRC的检测而言, 研究人员发现, 通过对粪便样本中TFPI2的甲基化进行检测, 可以达到令人瞩目的95%的准确率^[29]。这不仅表明该检测手段在敏感度上表现出众, 其特异度也极高, 为临床提供了一个强有力的工具, 用于早期识别出患有CRC的病人。如此高的准确率意味着我们可以更早地、更准确地定位并诊断CRC, 从而赋予患者接受早期治疗的机会, 这对于提高治疗效果及预后评估都是极为关键的。

2.1.5 SDC2

SDC2是细胞表面的关键蛋白多糖,涉及多种生物过程,如细胞黏附、迁移、增殖及血管生成。最新研究证实,SDC2与多种癌症类型,特别是上皮性肿瘤,密切相关^[30]。在CRC中,SDC2的功能尤为受到关注,它通过调节癌细胞与其微环境的相互作用,显著促进肿瘤的生长及转移。SDC2基因甲基化是理想的早期肠癌标志物,一项研究显示,利用血液样本检测SDC2,97.8%的结直肠癌患者SDC2甲基化水平显著增高^[31]。另一项近期的研究中,粪便SDC2基因甲基化在癌前病变及癌症各阶段稳定地高表达^[32]。这些研究都同样验证了作为一个潜在的基因标志物,SDC2有着很高的结直肠癌的检测的敏感度和特异度。这为临床辅助诊断早期结直肠癌又提供了一个有力的武器。

除以上标志物以外,还有一些甲基化标志物如N-Myc下游调节基因4(N-myc downstream-regulated gene4, NDRG4)^[51],骨形态发生蛋白3(bone morphogenic protein 3, BMP3)^[51],Wnt抑制因子-1(Wnt inhibitory Factor 1, WIF-1)被证实也可应用于结直肠癌的早期诊断^[22]。

2.2多基因联合检测

近年来,多种肠癌基因甲基化标志物被发现。为了避免单基因检测的局限性,将这些基因甲基化标志物联合来筛查肠癌成为了一种新思路。如VIM与SFRP2联合,T淋巴细胞成熟相关蛋白(T-lymphocyte maturation associated protein, MAL)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子2A(Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, CDKN2A)和6-氧-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(6-Methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)联合,黏结蛋白聚糖2(SDC2)、蛋白磷酸酶2调控亚基B' γ 基因(protein phosphatase2regulatory subunit B' gamma Gene, PPP2R5C)及含铁的乙醇脱氢酶1(alcohol dehydrogenase iron containing 1 Gene, ADHFE1)联合,SDC2和SFRP2联合,SDC2和TFPI2联合,各个靶标分子联合的作用以及检测的优势和局限性如表2所示,下面我们分别来了解一下这些组合的特点。

2.2.1 VIM和SFRP2

VIM维持细胞的完整性、影响细胞粘附和迁移、参与细胞信号传导、调节细胞凋亡和调节基因组DNA的表达,在肠癌患者粪便中很容易检测到;结直肠癌中SFRP2甲基化,可导致SFRP2表达水平下降或沉默,进而导致Wnt通路激活,导致结直肠癌发生。甲基化特异性聚合酶链反应(Methylation-Specific Polymerase chain reaction, MSP)法是一种常用的甲基化检测方法,通过设计甲基化和非甲基化特异性引物,可以将甲基化和非甲基化DNA分别扩增出来,从而确定基因的甲基化状态。通过应用MSP法检测患者粪便中VIM和SFRP2基因的甲基化状态,并与单个基因甲基化检测的诊断性能进行比较,研究发现,两基因联合检测组的灵敏度明显高于单纯检测VIM或SFRP2基因甲基化状态的检测组,其原因是VIM和SFRP2基因在大肠癌中的甲基化状态可能具有互补性,联合检测可以更全面地评估大肠癌的发展和进展,避免漏检。因此,在大肠癌筛查中联合检测粪便中VIM和SFRP2基因的甲

基化状态比单个基因检测更为优越,更具有潜在的应用价值。研究结果为大肠癌的早期诊断和治疗提供了新的方法和策略,有望提高大肠癌的筛查准确性,并帮助早期发现和治疗大肠癌患者^[33]。

2.2.2 MAL、CDKN2A和MGMT

MAL启动子甲基化在结直肠癌和腺瘤中高表达,很少在正常组织中表达^[40];CDKN2A是抑癌基因,与P53基因表达成负相关^[41],且与结直肠癌复发及转移有关^[42];MGMT是一种DNA修复酶,该酶如果存在甲基化则导致基因修复受阻而导致肿瘤发生^[43]。在CRC的早期诊断和筛查中,MSP法被应用于联合检测MAL、CDKN2A和MGMT基因的甲基化状态,并与单个基因的甲基化检测和粪便隐血试验(Fecal Occult Blood Test, FOBT)的诊断性能进行比较。研究结果显示,三个基因联合检测结直肠癌和腺瘤的敏感度高于单个基因和FOBT检测的敏感度^[34]。这三个基因的甲基化状态在CRC中可能存在互补性,联合检测可以提高早期筛查的准确性和更全面地评估CRC的发展和进展。同为粪便检测方法,该联合基因甲基化检测亦具有简便、无创、依从性好及敏感度高的特点,有望取代FOBT作为结直肠癌的筛查手段之一。

2.2.3 SDC2、PPP2R5C及ADHFE1

SDC2通过syntenin-1介导的Rac激活实现迁移,通过重组肌动蛋白,并通过与CASK的结合控制粘附和迁移^[30]。ADHFE1启动子的DNA甲基化是区分结直肠腺瘤和癌与正常组织的潜在生物标志物^[44]。PPP2R5C编码PP2A磷酸酶的一个调节亚基,是细胞生长及增殖的负调控因子,从而抑制肠癌细胞的生长,PPP2R5C基因的过甲基化与肠癌的发生发展密切相关^[36]。最近有学者联合SDC2、PPP2R5C及ADHFE1基因甲基化检测与FOBT进行比较,结果显示无论是CRC还是腺瘤,受试者在SDC2、PPP2R5C及ADHFE1联合检测结果的阳性率均高于FOBT。该研究发现尤其对腺瘤的检测,三基因联合检测比FOBT对腺瘤预测的优势更为显著,这一结果提示我们SDC2、PPP2R5C及ADHFE1基因联合检测对于结直肠病变有更好地早期诊断价值^[35]。另一项研究结果显示,联合检测SDC2/ADHFE1/PPP2R5C甲基化预测CRC(0-IV)的敏感度为84.8%,特异度为98.0%,AUC为0.930(95%CI:0.889-0.970)。与粪便免疫潜血试验(fecal immunochemical test, FIT)和血清肿瘤生物标志物相比,它对不同阶段的结直肠癌有更好的诊断效果^[36]。

2.2.4 SDC2和SFRP2

SDC2基因参与细胞分裂、迁移,肿瘤组织SDC2目标区域的甲基化水平要显著高于相邻非肿瘤组织区域,因此SDC2基因甲基化异常可作为结直肠癌早期检测的肿瘤标志物^[31]。SFRP2是肿瘤发生通路Wnt信号通路的信号拮抗因子之一,在结直肠癌、腺瘤中发生频繁的超甲基化,从而激活Wnt信号通路,促进了癌细胞的增殖和生长^[21]。SDC2和SFRP2是近年来研究很广相对成熟的结直肠癌基因甲基化标记物,两者都是在结直肠癌组织中高表达的甲基化基因,有研究者尝试将这两者联合来筛查结直肠癌,效果非常明显。无论是结直肠癌还是进展期腺瘤,SDC2和SFRP2联合检测的敏感度都要高于单基因检测,同时显著高于对

表 2 多基因联合甲基化检测靶标分子

标志分子	作用	优势	局限性
波形蛋白 (VIM)/分泌型卷曲相关蛋白 2 (SFRP2)	VIM 影响细胞粘附和迁移、参与细胞信号传导、调节细胞凋亡； SFRP2 甲基化导致 Wnt 通路激活，导致结肠癌发生。	VIM/SFRP2 联合检测比粪便潜血的敏感度和特异度有明显优势。	在伴有高级别上皮内瘤变中检出情况的优势不明显 ^[39] 。
T 淋巴细胞成熟相关蛋白 (MAL)/细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 2A (CDKN2A)/6-氧-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (MGMT)	MAL 启动子甲基化在结肠癌和腺瘤中高表达 ^[40] ； CDKN2A 是抑癌基因，与 P53 基因表达成负相关 ^[41] ，与结肠癌复发及转移有关 ^[42] ； MGMT 甲基化则导致基因修复受阻而导致肿瘤发生 ^[43] 。	粪便 DNA 中 MAL、CDKN2A 及 MGMT 基因启动子甲基化状态与结肠癌患者的性别、年龄、肿瘤部位、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期均无关 ^[34] ，可达到与检测结肠癌组织甲基化相近的水平。	检测腺瘤患者粪便 DNA 甲基化的敏感度则低于检测组织样本 ^[34] 。
黏结蛋白聚糖 2 (SDC2)/蛋白磷酸酶 2 调控亚基 B' γ 基因 (PPP2R5C)/含铁的乙醇脱氢酶 1 (ADHFE1)	SDC2 控制细胞黏附、迁移、增殖及血管生成 ^[30] 。ADHFE1 启动子的 DNA 甲基化是区分结肠腺瘤和癌与正常组织的潜在生物标志物 ^[44] 。PPP2R5C 抑制肠癌细胞的生长，PPP2R5C 基因的过甲基化与肠癌的发生发展密切相关 ^[36] 。	粪便中 SDC2、PPP2R5C 及 ADHFE1 基因甲基化水平在结肠癌和腺瘤患者中高。基因甲基化联合检测预测结肠癌+腺瘤的效能优于 FIT 和一些血清肿瘤生物标志物 ^[36] 。	缺乏大样本临床研究数据，同时相关研究中腺瘤病例较少，没有足够的证据来评价其在腺瘤人群中的诊断价值 ^[36] 。
黏结蛋白聚糖 2 (SDC2)/分泌型卷曲相关蛋白 2 (SFRP2)	SDC2 参与细胞分裂、迁移 ^[31] 。SFRP2 超甲基化，激活 Wnt 信号通路，促进了癌细胞的增殖和生长 ^[21] 。	通过联合检测粪便中 SDC2 和 SFRP2 基因甲基化，弥补了单基因检测灵敏度不足的缺陷，同时仍保持了较高水平的特异度 ^[37] 。	SDC2 和 SFRP2 的升高并不仅仅与结肠癌相关，也可能与其他疾病如其他癌症或炎症反应有关，因此在特异性方面存在一定的局限性 ^[32] 。 [70-72]。
黏结蛋白聚糖 2 (SDC2)/组织因子通道抑制因子 2 (TFPI2)	SDC2 启动子区高甲基化是结肠癌发生过程中常见的表观遗传变化 ^[31] 。TFPI2 基因的甲基化会导致该基因的沉默，与肿瘤的恶性程度和不良预后有关 ^[28] 。	在大多数 SDC2 低甲基化的结肠癌样本中，TFPI2 发生高甲基化。SDC2/TFPI2 联合检测提高了诊断的准确性、监测疾病进展和预测复发风险，同时保持较高的特异度，特别是减少了结肠癌和腺瘤的漏检 ^[38] 。	不能很好地区分 CRC 与腺瘤；缺乏大规模前瞻性临床研究验证 ^[28] 。

照的FIT检测^[37]。FIT无法区分结肠癌、腺瘤与良性息肉、其他癌种和非肿瘤引起的消化道病变，而粪便基因甲基化SDC2和SFRP2联合检测很好地弥补了这一缺陷，在结肠癌早期筛查和节约肠镜资源方面有很好的应用前景^[37]。

2.2.5 SDC2和TFPI2

SDC2启动子区高甲基化是结肠癌发生过程中常见的表观遗传变化^[31]。TFPI2是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂，对癌细胞的体外增殖及集落形成产生抑制作用，TFPI2基因的甲基化会导致该基因的沉默，与肿瘤的恶性程度和不良预后有关^[28]。SDC2基因甲基化虽然在结肠癌病变组织中高表达，但也有少部分患者中这一基因甲基化很低或者不表达，有研究者尝试从SDC2甲基化检测假阴性的标本(甲基化水平低于0.2的样本)中寻找其他高度甲基化标记物，结果在SDC2低表达的样本中发现了高甲基化的TFPI2。再将SDC2和TFPI2联合进行检测，发现TFPI2不

仅可以提高SDC2的敏感度，还提高了左侧结肠病变的检出率，同时还保持了很高的特异度。这种联合检测有望更准确、更早地筛查出结肠癌和腺瘤^[38]。

综上所述，这5组基因甲基化联合检测比较有代表性，相关研究无一例外都显示联合基因甲基化检测的敏感度要优于单基因或者粪便潜血实验。联合检测粪便中基因的甲基化检测在CRC的早期诊断和筛查中具有潜在的应用价值。相关研究结果为CRC的早期诊断提供了更新的方法和策略，有望提高CRC的筛查准确性，并帮助早期发现和治疗CRC患者。不过，联合基因甲基化检测会降低检测的特异度，也就是会增加假阳性的比例。而且，联合检测还会增加实验室的检测成本和检测时间，最终会增加受试者的检测费用。另外，联合检测目前缺乏大规模人群的临床筛查研究数据，也缺乏长期随访研究数据，今后应开展大样本人群筛查以明确粪便基因联合检测在结肠癌筛查中的确切价值。

3 现状及优化策略

3.1 缺乏理想DNA甲基化基因

目前对于CRC早期诊断,还没有找到理想的DNA甲基化基因。虽然已经有一些潜在的候选基因,如SEPT9和VIM,但它们的甲基化水平在早期CRC中的变化仍然不够明确。因此,需要进一步的研究来寻找更准确、特异的DNA甲基化基因,以提高早期诊断的准确性和可靠性。

最近有研究者尝试在CpG岛寻找新的甲基化位点,研究者选择了两个候选CpG位点分别是来自SDC2启动子区的cg13096260,和来自矮小同源盒基因2(Short Stature Homeobox 2, SHOX2)区的cg12993163^[45]。我们发现这两个位点的甲基化在结直肠癌患者中无论是粪便标本还是血液标本都呈现高表达。癌组织中cg13096260和cg12993163的甲基化水平明显高于正常组织($P < 0.001$)。cg13096260、cg12993163和二者联合诊断模型在CRC中的灵敏度分别达到91.35%、89.5%和93.83%;而在进展期腺癌(Advanced Adenoma, AA)中的敏感度则分别达到63.04%、82.6%和71.74%;特异度分别达到93.33%、85.83%和92.5%。由此看来,敏感度和特异度均高的DNA甲基化基因并不缺乏,但还需要我们进一步通过更多研究数据来验证。近年来,已有大量研究证实SDC2基因的甲基化对CRC和进展期腺癌的敏感度和特异度是非常高的,具有很高的早期临床诊断价值。粪便SDC2基因甲基化技术注册临床研究其对肠癌的敏感度总体达到84.22%(315/374),特异度达到97.85%(821/839),其中对于可根治的I-II期CRC的检出率可达到86.7%(137/158)^[46]。另一项SDC2的研究也提示对于进展期腺癌(癌前病变)的敏感度也可达到52%^[47]。这些基因标记物无论是检测结直肠癌的敏感度、特异度还是在腺癌的敏感度上已展现出非常理想的临床结果,未来需要在无症状人群中进行大规模前瞻性筛查研究以期验证其在临床病例以外社区人群中的检测性能。

3.2 影响粪便DNA提取质量的因素

粪便中的DNA复杂性高。粪便主要由消化残渣、细菌、病毒、真菌、寄生虫、人体细胞等组成,这意味着粪便样本中包含了大量的基因信息,不仅仅是来自于人体,还有许多来自微生物DNA。由于大量的细菌和其他微生物存在,外源DNA的存在可能会影响到检测的准确性。例如,进行DNA甲基化检测时,如果提取的样本中含有大量的细菌DNA,那么这些细菌的甲基化DNA可能会干扰检测结果,导致数据解读的不准确。在提取方法的选择上面,目前市面上有许多针对粪便样本的DNA提取试剂盒。这些试剂盒的工作原理通常基于物理破碎、化学裂解、温度变化和离心等方法,从样本中提取DNA。但有研究发现不同的试剂盒,提取效果不一样。研究者借助实时荧光定量核酸扩增检测系统(Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR)技术,以DNA提取纯度、浓度,以及对肠道中特定种属微生物基因组DNA的提取丰度为指标,对5种DNA提取方法进行比较分析。结果表明,某试剂盒的提取效果最佳,其他4种试剂盒提取效果要比该试剂盒浓度偏低或不及该试剂盒^[48]。而不同

的提取方法也可能导致DNA质量和纯度的差异。考虑到外源DNA的问题,可能需要针对性地开发新的提取方法,这些方法需要能够有效地分离人体来源的DNA和微生物DNA。污染也会影响检测的准确性,常用的降低污染的策略有:使用无菌技术在采样、储存和处理过程中降低污染的风险,以及在DNA提取过程中使用选择性的裂解剂或结合条件,以优先提取人体细胞的DNA。这其中包括防止粪便DNA降解的粪便DNA保存,基于磁珠的序列特异性捕获技术该技术有效地消除了MSP分析中大量污染植物、动物和细菌基因组DNA的背景噪声,并优化了引物和探针设置以及检测条件^[49]。另外,还可以利用特异性的分子标记或PCR技术,对提取的DNA进行后续的选择性扩增,一旦提取了DNA,还需要考虑下一步的DNA质量检查、测序及数据分析等,确保最后得到的数据是准确、可靠的。探索新技术,使用纳米技术、生物技术或其他先进技术也能有助于更有效地从粪便中提取DNA,这些技术有可能提供更高的选择性和更低的污染率。

3.3 灵敏度有待提升改进

尽管基于粪便DNA甲基化的CRC早期诊断具有潜力,但目前的方法在灵敏度方面仍然有待提升改进。早期CRC的甲基化水平较低,因此检测方法需要具备足够高的灵敏度,才能准确地检测到早期的病变。目前的方法可能会存在一定的漏诊率,需要进一步优化技术,提高灵敏度,以提高早期CRC的检测率和准确性。过去一些联合甲基化基因的方法效果不错。浙大医学院研究者开发了一种基于粪便DNA甲基化-联合粪便潜血检测的联检方法。研究团队选取了骨形态发生蛋白3(Bone Morphogenetic Protein3, BMP3), N-Myc 下游调节基因4(N-Myc downstream-regulated gene4, NDRG4)和SDC2基因组合作为CRC特异度的甲基化基因,用Actin作为参考基因,联合粪便潜血检测的联检方法^[50]。该方法提高了粪便检测筛查CRC的灵敏度和特异度。其实这种多基因联合粪便潜血检测的联检方法早在2012年就有研究者开发出一款粪便DNA检测产品Cologuard™,并进行了大规模多中心临床试验^[51]。该产品为多靶点粪便DNA检测,包括BMP3和NDRG4启动子序列区域的异常甲基化, KRAS突变和β-肌动蛋白(DNA定量的参考基因),应用分子检测联合FIT进行测定。该方法DNA检测大肠癌敏感度(92.3%)和进展期癌前病变敏感度(42.4%)均高于FIT。2016年,马志刚等人开始在健康体检人群和已确诊结直肠癌或腺瘤患者中使用多靶点粪便FIT-DNA联合检测技术筛查诊断结直肠癌,该技术也是通过检测人粪便样本中的KRAS基因突变、BMP3和NDRG4基因甲基化及血红蛋白来检测结直肠癌。在已确诊的结直肠癌和腺瘤患者中的敏感度分别为92.3%和42.8%。这一研究提示多靶点粪便FIT-DNA联合检测不仅可以提高肠镜的依从率,还可以提高结直肠癌的检出率^[52]。用粪便DNA多靶点联合FIT,不失为一种提高检测的敏感度的方法,但是也会降低检测的特异度,这会带来误诊率(假阳性)的升高。近年来,以牛津纳米孔测序技术Oxford Nanopore Technologies(ONT)为代表的纳米孔测序技术日渐成熟,其在DNA甲基化检测的准确性上也被证实,可以产生高分辨率的单碱基对。ONT还可获取长读

的长序列,而捕获更长cfDNA片段,这也有助于发现新的生物标志物^[53-54]。另外,通过肠道微生物群的变化对结肠直肠癌进行诊断可能较其他方式更为敏感,实现癌症的早期发现^[55]。也有研究提出在CRC的筛查中,肠道菌群可与肿瘤标志物检测、免疫组织化学等联合,相互联合检测能互补优势,提高其敏感度及特异度,从而提供更多有用的临床信息^[56]。因此,如何优化粪便DNA甲基化检测还有待于更多的探索。

3.4 对不同途径与分型的CRC检测策略

结肠直肠癌的演变目前主流认为存在占70%~90%的腺瘤-癌途径(也被称为染色体不稳定序贯途径)与10%~20%的锯齿状癌变途径^[57]。这些途径代表了序贯发生的不同的基因水平和表观遗传水平的改变^[58]。染色体不稳定表型发生前通常会先有APC突变和RAS激活或TP53功能缺失。相反,锯齿状癌变通路通常表现为KRAS和BRAF突变,以CpG岛甲基化为主要特点的表现遗传学的不稳定,以及其所导致的染色体稳定和染色体不稳定型肿瘤^[57]。

肿瘤抑制基因启动子如错配修复基因(MLH1)的高甲基化已经被确定为散发性大肠癌中微卫星不稳定(MSI)的主要原因^[59]。MGMT启动子的高甲基化被证明是锯齿状途径的特征性表现之一^[60]。BRAF突变导致丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路激活,伴随着最初的增殖爆发,随后p16INK4a上调,胰岛素样生长因子结合蛋白7(IGFBP7)分泌增加,导致细胞衰老。在CpG岛甲基化表型(CIMP)细胞中,通过甲基化沉默p16INK4a或IGFBP7可促进衰老和向无蒂锯齿状腺瘤(SSA)进展^[61]。近年来,对以上这些标志物的基因甲基化的研究也证实他们与肠癌发生密切相关。潘等人的研究显示结肠癌组织中APC、MLH1基因甲基化阳性率显著高于癌旁组织^[62]。蔡等人通过检测老年结肠癌患者DNA中hMLH1,肠癌组粪便DNA中hMLH1基因甲基化检出率显著高于较高对照组,明显优于传统的血清CEA检测,提示hMLH1基因甲基化可作为早期无创诊断老年性CRC的重要手段^[63]。高等人研究了胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白1(IGFBP-rP1)基因甲基化联合粪便潜血定量试验对结肠癌的确诊价值,研究结果显示结肠癌组IGFBP-rP1基因甲基化比例明显低于对照组,提示IGFBP-rP1基因甲基化是结肠癌发生的独立保护因素^[64]。这些研究提示我们,未来基因甲基化技术应结合结肠癌的不同发生途径进行有针对性地开发,对上面提到的不同途径中的标志物进行甲基化检测,这样可以更精准地为临床诊断和治疗提供依据。

此外,在结肠癌的分子分型(CMS分型)和MSI分型中,粪便DNA甲基化检测的应用也可能有所不同。CMS分型将结肠癌分为四种不同的分子亚型,即共识分子亚型(consensus molecular subtypes, CMS1-4),每种亚型具有不同的生物学特征和预后^[65]。MSI分型则主要关注错配修复基因的状态,分为MSI-H(高频微卫星不稳定)和MSS(微卫星稳定)两种类型。右半结肠癌通常为MSI-免疫型和代谢型肿瘤,这些CMS分子分型和MSI分型对于指导治疗和预测预后具有重要意义^[66]。在不同分子分型和MSI分型中,粪便DNA甲基化检测的应用可能存在异同。

某些甲基化标记物可能更适用于某一特定的分子亚型或MSI类型。例如,SDC2对右半结肠癌检测灵敏度更高,而TFPI2对左半结肠癌的灵敏度相对高一些。张等人的研究提示TFPI2可提高SDC2在左结肠、乙状结肠和直肠的检测灵敏度^[38]。因此,通过深入研究这些标记物在不同分型中的表现,可以进一步优化粪便DNA检测的应用策略,提高其在不同患者群体中的适用性和准确性。

4 小结与展望

现在亚洲许多国家,早癌筛查已被证明能有效降低CRC的发病率和病死率^[67]。美国近年来癌症的发病率和死亡率均呈下降趋势,最主要的原因就是预防、早期发现和积极的治疗,以及广泛和公平地实施有效干预措施^[68]。最近的一项多中心大样本前瞻性研究结果令人振奋,该研究结合亚太结肠直肠癌筛查评分联合多靶点粪便DNA检测(SDC2和SFRP2)对受试者进行结肠直肠癌筛查,研究结果显示结肠癌的检出率高达95.2%,结肠进展期腺瘤的检出率高达73.5%,由于检测的准确性,研究中还降低了一半以上的结肠镜检查量,大大节约了医疗资源^[69]。粪便DNA甲基化检测作为一种非侵入性、简便快捷的CRC早期诊断方法,具有巨大的潜力。然而,目前仍存在一些问题需要解决,包括缺乏理想的DNA甲基化基因、样本易受污染和灵敏度有待提升改进等问题。未来的研究应更加关注多基因联合检测和提高检测方法的敏感度和特异度,关注如何结合CRC不同发生途径和分子分型的甲基化检测,以实现CRC早期诊断的准确性和可行性。

[基金项目]

湖北省重点研发计划项目(社会发展领域)(No.2022BCA018)及工业微生物省部共建协同创新中心开放课题(2022KF16)。

[参考文献]

- [1]SUNG H,FERLAY J,SIEGEL RL,etal.Global Cancer Statistics 2020:GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J].CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249.
- [2]LOEHRERSR P. Colon Cancer Survival Rates With the New American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging[J]. Yearbook of Oncology, 2006,2006:280-281.
- [3]KNUDSEN, AMY B, NABER, et al. Estimation of Benefits, Burden, and Harms of Colorectal Cancer Screening Strategies Modeling Study for the US Preventive Services Task Force[J]. JAMA: the Journal of the American Medical Association, 2016; 315(23):2595-2609.
- [4]Hospital Authority of National Health Commission of the People's Republic of China, Chinese Society of Oncology Chinese Medical Association.中国结肠直肠癌诊疗规范(2023版)[J].消化肿瘤杂志(电子版),2023,15(03):177-206.
- [5]中华医学会检验医学分会分子诊断学组.早期结肠癌和癌前病变实验诊断技术中国专家共识[J].中华检验医学杂志,2021,44(5):372-380.

- [6]国家消化系统疾病临床医学研究中心(上海),国家消化道早癌防治中心联盟,中华医学会消化内镜学分会,等.中国早期结肠癌筛查流程专家共识意见(2019,上海)[J].中华消化内镜杂志,2019,36(10):709-719.
- [7]CIARDIELLO F, CIARDIELLO D, MARTINI G, et al. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2022, 72: 372-401.
- [8]OSBORN NK, AHLQUIST DA. Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches[J]. *Gastroenterology*, 2005; 128(1): 1286-1293.
- [9]TZKOWITZ S, BRAND R, JANDORF L, et al. A simplified, noninvasive stool DNA test for colorectal cancer detection[J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2008, 103(11): 2862-2870.
- [10]AHLQUIST DA, TAYLOR WR, MAHONEY DW, et al. The Stool DNA Test is More Accurate than the Plasma Septin 9 Test in Detecting Colorectal Neoplasia[J]. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 2012, 10(3): 272-277.
- [11]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.
- [12]JUSPSTF, KIRSTEN BD, GROSSMAN DC, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement[J]. *JAMA*. 2016; 315(23): 2564-2575.
- [13]REX DK, BOLAND CR, DOMINITZ JA, et al. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer [J]. *Gastroenterology*. 2017; 153(1): 307-323.
- [14]PROVENZALE D, GUPTA S, AHNEN DJ, et al. NCCN Guidelines Insights: Colorectal Cancer Screening, Version 1.2018 [J]. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*. 2018; 16(8): 939-949.
- [15]WOLF AMD, FONTHAM ETH, CHURCH TR, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society [J]. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(4): 250-281.
- [16]SAU YK, MIZUHO N, ATSUYA M, et al. Genetic and nongenetic mechanisms for colorectal cancer evolution [J]. *Cancer Science*. 2023; 114: 3478-3486.
- [17]ZHONG J, ZHAO M, MA Y, et al. UCHL1 acts as a colorectal cancer oncogene via activation of the β -catenin/TCF pathway through its deubiquitinating activity [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2012, 30(2): 430-436.
- [18]LI J, MA X, CHAKRAVARTI D, et al. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer [J]. *Genes & Development*, 2021, 35(11-12): 787-820.
- [19]BARDHAN K, LIU K. Epigenetics and Colorectal Cancer Pathogenesis [J]. *Cancers*, 2013, 5(2): 676-713.
- [20]GOEL A, BOLAND CR, et al. Epigenetics of Colorectal Cancer [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(6): 1442-1460.
- [21]SUZUKI H, WATKINS DN, JAIR KW, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer [J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(4): 417-422.
- [22]ZHANG H, ZHU YQ, WU YQ, et al. Detection of promoter hypermethylation of Wnt antagonist genes in fecal samples for diagnosis of early colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(20): 6329-6335.
- [23]徐正, 颜宏利. 粪便基因甲基化检测在结肠癌早期诊断中的研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(11): 2177-2187
- [24]LENHARD K, BOMMER GT, ASUTAY S, et al. Analysis of promoter methylation in stool: A novel method for the detection of colorectal cancer [J]. *Clinical Gastroenterology & Hepatology*, 2005, 3(2): 142-149.
- [25]SATELLI A, LI S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(18): 3033-3046.
- [26]CHEN WD, HAN ZJ, SKOLETSKY J, et al. Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, 97(15): 1124-1132.
- [27]NED RM, MELILLO S, MARRONE M. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: the ColoSure™ test [J]. *PLoS Currents*, 2011, 3: RRR1220.
- [28]SIERKO E, WOJTUKIEWICZ MZ, KISIEL W. The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology [J]. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2007, 33(7): 653-659.
- [29]GLOCKNER SC, DHIR M, Yi JM, et al. Methylation of TFPI2 in Stool DNA: A Potential Novel Biomarker for the Detection of Colorectal Cancer [J]. *Cancer Research*, 2009, 69(11): 4691-4699.
- [30]MYTILINAIIOU M, NIKITOVIC D, BERDIKI A, et al. Emerging roles of syndecan 2 in epithelial and mesenchymal cancer progression [J]. *IUBMB Life*, 2017, 69(11): 824-833.
- [31]JOH T, KIM N, MOON Y, et al. Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer [J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2013, 15(4): 498-507.
- [32]YOON DH, TAE JO, TAE-HA C, et al. Early detection of colorectal cancer based on presence of methylated syndecan-2 (SDC2) in stool DNA [J]. *Clinical epigenetics*, 2019, 11(1): 51.
- [33]肖著军, 王新颖, 李丙生, 等. 联合检测 vimentin 和 SFRP2 甲基化在大肠癌筛查中的应用评价 [J]. *现代消化的介入诊*

疗,2014,19(1):13-20.

[34]KANGY,CAOF, CHANG W, et al. Gene methylation in stool for the screening of colorectal cancer and pre-malignant lesions[J]. Chinese journal of gastrointestinal surgery, 2011, 14(1):52-56.

[35]黄子懿,贺延新,陈存海.粪便多基因甲基化联合检测在CRC及癌前病变诊断中的价值[J].肿瘤研究与临床,2022,34(4):7.

[36]LIB,LIUS,GAOY,et.al.Combined detection of SDC2/ADHFE1/PPP2R5C methylation in stool DNA for colorectal cancer screening[J].Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2023, 149(12):10241-10253

[37]柏愚,刘晶,康倩.联合检测SDC2和SFRP2甲基化在结直肠癌筛查中的价值[J].中华消化内镜杂志,2019,36(6):427-432.

[38]ZHANGL,DONGL,LuC,etal.MethylationofSDC2/TFPI2andItsDiagnosticValueinColorectalTumorousLesions[J].Frontiers in MolecularBiosciences,2021,8.

[39]韩冰,申玉翠,王慧,等.粪便Vimentin和SFRP2甲基化在结直肠癌筛查中的作用[J].胃肠病学和肝病杂志,2020,29(5):561-566.

[40]LINDGE,AHLQUIST T, KOLBERG M, et al. Hypermethylated MAL gene—a silent marker of early colon tumorigenesis[J]. Journal of Translational Medicine,6,1(2008-03-17), 2008, 6(1): 13-24.

[41]SHEN L, KONDO Y, HAMILTON SR, et al. p14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53[J].Gastroenterology, 2003, 124(3):626-633.

[42]KAZUYA M,KAZUYUKI K,YOSHINORI I,etal. Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival[J]. Oncology Reports, 2003, 10(4): 935-938.

[43]ESTELLER M, HAMILTON SR, BURGER PC, et al. Inactivation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia[J]. Cancer Research, 1999, 59(4):793-797.

[44]FAN J, LI J, GUO S, et al. Genome-wide DNA methylation profiles of low- and high-grade adenoma reveals potential biomarkers for early detection of colorectal carcinoma[J]. Clinical Epigenetics,2020,12(1): 56

[45]SHEN Y, WANG D, YUAN T, et al. Novel DNA methylation biomarkers in stool and blood for early detection of colorectal cancer and precancerous lesions[J]. Clinical Epigenetics, 2023,15(1).

[46]国家食品药品监督管理总局医疗器械技术评审中心.体外诊断试剂产品注册技术评审报告:人类SDC2基因甲基化检测试剂盒(荧光PCR法)(CSZ1800035)[R/OL].[2018-11-13].https://www.cmde.org.cn/CL0116/8094.html.

[47]MAL,QING,GAI,etal.A novel method for early detection of colorectal cancer based on detection of methylation of two fragments of syndecan-2 (SDC2) in stool DNA[J]. BMC Gastroenterology,2022,22(1):1-10.

[48]SHI ZY, CHEN LP, LI BX, et al. Comparative analysis of different fecal DNA extraction methods[J]. Chinese Journal of Biotechnology,2022,38(9):3542-3550.

[49]WANG J, LIU S, WANG H, et al. Robust performance of a novel stool DNA test of methylated SDC2 for colorectal cancer detection: a multicenter clinical study[J]. Clinical Epigenetics,2020,12(1):162-174.

[50]WANG DY, HE KX, HUANG Y, et al. A New Method for the Detection of Colorectal Cancer and the Precancerous Lesions: Occult Blood Testing Combination with Promoter Methylation in the Fecal Sample[J].Journal of Cancer,2021,12(2): 335-342.

[51]IMPERIALE TF, RANSOHOFF DF, ITZKOWITZ SH, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening [J].The New England journal of medicine,2014,370(14):1287-1297.

[52]马志刚,朱晓麟,马丽红.基于多靶点粪便FIT-DNA联合检测技术的结直肠癌早期筛查结果分析[J].中华结直肠疾病电子杂志,2019,8(06):616-621.

[53]KATSMANE, ORLANSKI S, MARTIGNANO F, et al. Detecting cell-of-origin and cancer-specific methylation features of cell-free DNA from Nanopore sequencing[J]. Genome Biology, 2022,23(1):1-25.

[54]LEE I, RAZAGHI R, GILPATRICK T, et al. Simultaneous profiling of chromatin accessibility and methylation on human cell lines with nanopore sequencing[J]. Nature Methods, 2020,17,1191-1199.

[55]贾哲,吴晓滨.肠道微生物群在肿瘤中的作用和机制研究进展[J].消化肿瘤杂志:电子版,2023,15(2):160-165.

[56]陈星,姜泊,迪吉.肠道菌群对早期结直肠癌筛查的研究进展[J].消化肿瘤杂志:电子版,2022,14(3):262-267.

[57]EVELIEND, TANIS PJ, VLEUGELS JLA, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet (London, England), 2020, 2019年394卷10207期:1467-1480.

[58]WILLETT CG, CHANG DT, CZITO BG, et al. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer[J].Nature2012.(5):487: 330-37.

[59]FENNELL LJ, JAMIESON S, MCKEONE D, et al. MLH1-93G/a polymorphism is associated with MLH1 promoter methylation and protein loss in dysplastic sessile serrated adenomas with BRAF V600E mutation[J]. BMC Cancer,2018,18(1):35.

[60]FARZANEHFAR M, VOSSOUGHINIA H, JABINI R, et al. Evalu

ation of methylation of MGMT (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) gene promoter in sporadic colorectal cancer[J]. *Dna & Cell Biology*,2013,32(7):371-377.

[61]LEGGETT B, WHITEHALL V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis[J].*Gastroenterology*, 2010, 138(6):2088-2100.

[62]潘程宇,曹俊,季兴,等.实时荧光定量PCR和甲基化特异性PCR检测结直肠癌APC、MLH1基因甲基化状态[J].*胃肠病学*,2011,16(002):77-81.

[63]蔡克银,徐梅华,王晓.检测粪便DNA中hMLH1基因甲基化对老年性结直肠癌早期诊断的意义[J].*联勤军事医学*,2017,31(12):814-817.

[64]高文仓,张月蒙.胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白1基因甲基化检测联合粪便潜血定量试验在结直肠癌中的诊断价值[J].*中国医药*,2021,16(6):886-889.

[65]GUINNEY J, DIENSTMANN R, WANG X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer[J]. *Nature medicine*, 2015,21(11):1350-1356.

[66]LEE MS, MENTER DG, KOPETZ S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes[J].*Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2017,15(3):411-419.

[67]SANO Y, BYEON JS, LI XB, et al. Colorectal cancer screening of the general population in East Asia[J]. *Dig Endosc*, 2016, 28(3):243-249.

[68]ISLAMI F, WARD EM, SUNG H, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: national cancer statistics[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2021, 113(12),

1648-1669.

[69]XU JF, RONG L, GU F, et al. Asia-Pacific Colorectal Screening Score Combined with Stool DNA Test Improves the Detection Rate for Colorectal Advanced Neoplasms[J]. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 2023,21(6):1627-1636.

[70]RUBIN J S, BARSHIISHAT-KUPPER M, FERZE-MERZOUQ F, et al. Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2006,11(11):2093-2105.

[71]LEE JL, LIN CT, CHUEH LL, et al. Autocrine/paracrine SFRP2 induces cellular resistance to apoptosis: A possible mechanism of mammary tumorigenesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*,2004,279(15):14602-14609.

[72]BOVOLENTA P, ESTEVE P, RUIZ JM, et al. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease[J].*J Cell Sci*,2008,121(Pt6):737-746.

作者简介:

肖白丁(1974--),男,汉族,湖北省十堰市竹溪县人,硕士,执业药师,研究方向:生物医学。

胡康洪(1964--),男,汉族,湖北省武汉市人,博士,二级教授,研究方向:生物医学。

尧晨光(1989--),男,汉族,湖北省咸宁市人,博士,副教授,研究方向:肿瘤能量代谢;多肽鉴定和功能研究;抗病毒和抗肿瘤药物和分子机制研究。

李涵冻(1986--),男,汉族,湖北省武汉市人,博士,副教授,研究方向:干细胞与再生医学。