

本文引文格式:苏群英,陆飞燕,陆相磊,等.外周血 Septin9 基因甲基化检测在胃癌的
临床应用价值探讨[J].右江民族医学院学报,2023,45(5):800-803.

【论著与临床报道】

外周血 Septin9 基因甲基化检测在胃癌的临床应用价值探讨

苏群英^{1,2},陆飞燕^{1,2},陆相磊¹,王兴枝子^{1,2},朱晓莹^{1,2}

[1. 右江民族医学院附属医院病理科,广西 百色 533000;

2. 广西分子病理学(肝胆疾病)重点实验室,广西 百色 533000]

摘要:目的 研究胃癌患者外周血中 Septin9 基因甲基化(mSEPT9)异常表达情况,探讨其对胃癌诊断的临床应用意义。**方法** 收集2019年11月至2022年2月在右江民族医学院附属医院行外周血 mSEPT9 检测患者,经筛选纳入胃癌组136例,胃炎组30例,无疾病证据组60例。分析各组外周血 mSeptin9 表达情况,探讨外周血 mSEPT9 检测对临床诊断胃癌的可行性;并比较分析 mSEPT9 检测与消化道肿瘤血清学指标 CEA、CA199、AFP 的诊断效能。**结果** 胃癌组外周血 mSEPT9 阳性率高于胃炎组和无疾病证据组(50.74% vs 26.67% vs 3.33%),差异具有统计学意义($P < 0.05$),特异度和灵敏度分别为 88.89% 和 50.74%,ROC 曲线下面积为 0.716。胃癌患者外周血 mSeptin9 检测诊断效能高于消化道肿瘤血清学指标 CEA、CA199、AFP,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。mSEPT9 表达差异与胃癌临床分期有关,与其他病理参数无关。mSEPT9 与胃癌不良预后有关。**结论** 外周血 mSEPT9 检测对胃癌的诊断和判断预后具有一定的临床价值。

关键词:Septin9 基因;甲基化;胃肿瘤

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)05-0800-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.05.019

Clinical application value of peripheral blood Septin9 gene methylation detection in gastric cancer

Su Qunying^{1,2}, Lu Feiyang^{1,2}, Lu Xianglei¹, Wang Xinzhi^{1,2}, Zhu Xiaoying^{1,2}

[1. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. The Key Laboratory of Molecular Pathology (Hepatobiliary Diseases) of Guangxi, Baise 533000, Guangxi, China]

Abstract: **Objective** To investigate the abnormal expression of the Septin9 gene methylation (mSEPT9) in the peripheral blood of patients with gastric cancer (GC), and to explore its clinical significance in GC diagnosis. **Methods** Patients who underwent peripheral blood mSEPT9 tests at the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities from November 2019 to February 2022 were collected. A total of 136 patients with GC, 30 patients with gastritis, and 60 patients with no evidence of disease were included after screening. The expression of mSEPT9 in the peripheral blood of each group was analyzed to explore the feasibility of mSEPT9 detection in the clinical diagnosis of GC. The diagnostic efficacy of mSEPT9 detection was compared with the serological indicators of gastrointestinal tumors, including CEA, CA199, AFP. **Results** The positive rate of mSEPT9 in the peripheral blood of the GC group was higher than in the gastritis and no disease evidence groups (50.74% vs. 26.67% vs. 3.33%), and the difference was statistically significant (P

基金项目:百色市科学研究与技术开发计划项目(百科学[2019]31-28,百科学[2021]32-13);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2020KY13022)

第一作者简介:苏群英(1986—),女,硕士,副主任医师,研究方向:消化道肿瘤的临床与基础研究,E-mail:suqunying201809@163.com

通讯作者简介:朱晓莹(1981—),女,在读博士研究生,教授,硕士研究生导师,研究方向:分子病理诊断与研究, E-mail:00422@ymen.edu.cn

<0.05). The specificity and sensitivity were 88.89% and 50.74%, respectively, with an area under the ROC curve of 0.716. The diagnostic efficacy of mSEPT9 detection in the peripheral blood of GC patients was higher than that of serological indicators (CEA, CA199, AFP), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Differential mSEPT9 expression was related to the clinical stage of GC but not to other pathological parameters. mSEPT9 was associated with a poor prognosis in GC. **Conclusion** Peripheral blood mSEPT9 detection has certain clinical value in the diagnosis and prognosis assessment of GC.

Key words: Septin9 gene; methylation; gastric tumor

胃癌是我国常见的消化道恶性肿瘤,每年我国胃癌的新发病例数和死亡病例数分别为全球的 44.10% 和 49.90%^[1]。目前,胃癌诊断手段主要有胃镜和血清学筛查。但胃镜检查相对有创,患者依从性、可行性较差,血清学指标存在特异性和敏感性不足^[2],亟待寻找胃癌诊断的便捷、有效方法。SEPTIN9 基因甲基化(methylated Septin9, mSEPT9)检测,是近年临床用于结直肠癌检查的早期筛查和辅助诊断方法^[3-4]。Septin9 基因是一种抑癌基因,当它发生甲基化后,基因表达受抑制,会引起细胞分裂异常甚至癌变。研究证实^[5-6] mSeptin9 与人类结直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。研究发现 Septin9 基因在胃癌组织中表达异常,而胃癌患者外周血 mSEPT9 的情况尚未明确。本研究通过比较本院胃癌、胃炎患者和健康体检人群的 mSEPT9 甲基化的情况,进一步分析 mSEPT9 与胃癌患者的临床病理参数,以期为 mSEPT9 的潜在致病机制和进一步临床应用提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 回顾性收集 2019 年 11 月至 2022 年 2 月在右江民族医学院附属医院行外周血 mSEPT9 检测的所有病例,经筛选纳入胃癌患者 136 例,其中男性 102 例,女性 34 例。胃癌组:①经组织病理确诊为胃癌且符合诊断标准^[7]《中国临床肿瘤学会(CSCO)原发性胃癌诊疗指南》(2017. V1);②患者在入组前均未接受放疗、化疗等治疗;③排除患有其他肿瘤、胃肠疾病、怀孕及免疫缺陷等患者;纳入胃炎病例 30 例,其中男性 19 例,女性 11 例,经过组织病理确诊为萎缩性胃炎或非萎缩性胃炎且符合诊断标准^[8]《中国慢性胃炎共识意见》(2017 年,上海);另有 60 例无疾病证据受检者作为对照,其中男性 24 例,女性 36 例,同时收集所有纳入病例的相关临床资料。对所有胃癌患者进行电话临床随访,记录患者的生存时间、生存状态,死亡原因等信息,总生存期定义为从确诊之日起到死亡之日或末次随访之日。本研究主要观察终点为肿瘤相关的生存,随访截止时间 2022 年 5 月 12 日。

1.2 检测仪器及试剂 mSEPT9 检测试剂盒(PCR 荧光定量法,北京博尔诚科技公司),紫外分光光度计

(Thermo Fisher NanoDrop One 美国),实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7500 Fast 美国)。

1.3 标本采集 无疾病证据受检者标本为体检人群体检时采集,胃炎组和胃癌组于患者住院第 1 天采集。采集受试者晨起空腹(禁食 8~12 h)静脉血 10 mL,EDTA-K2 抗凝,(1350±150)×g 离心 12 min,重复 1 次,获取 3.5 mL 血浆置于-20℃备用,统一检测。

1.4 外周血 mSEPT9 检测 所有检测均在右江民族医学院附属医院分子病理实验室完成。参照试剂盒说明书。依次裂解、磁珠富集 DNA、洗涤、洗脱,亚硫酸盐转化;将转化后的 DNA 加入 PCR 预反应液中,按照 94℃活化 20 min;62℃ 5 s,55.5℃ 35 s,93℃ 30 s,行 45 次循环。结果判断:在确保质控对照样品有效的前提下,内参基因(β -肌动蛋白)CT 值 ≤ 32 ,待检样本 Ct 值 ≤ 41.0 时判为阳性;Ct 值 > 41.0 或无时结果判为阴性。每次实验均设阳性和阴性对照,阳/阴性对照品处理方法及流程与待检样本相同。

1.5 消化道肿瘤标记物检测 血清学肿瘤标记物 CEA、CA199 和 AFP 均由右江民族医学院附属医院检验科采用电化学发光法进行检测(罗氏电化学发光仪)。判读标准:CEA 参考范围为 0~6.5 ng/mL,AFP 参考范围为 0~9 ng/mL,CA199 参考范围为 0~34 U/mL。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 24.0、GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析。计数资料以例数(n)和百分数(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法;通过计算 ROC 曲线下面积(AUC),预测外周血 mSEPT9 检测的诊断价值;配对资料一致性检验,采用 Kappa 检验,Kappa ≥ 0.75 ,说明两种方法诊断一致性较好,Kappa < 0.4 一致性较差;生存分析采用 Kaplan-Meier 法,风险比采用 Cox 回归模型(log-rank 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 mSEPT9 检测在各组中阳性率的比较 在所有未经治疗的受检者中,无疾病证据组、胃炎组、胃癌组外周血 mSEPT9 阳性率分别为 3.33%(2/60)、26.67%(8/30)、50.74%(69/136)。胃癌组外周血 mSEPT9 阳性率高于胃炎组和无疾病证据组,差异

有统计学意义(分别为 $\chi^2 = 40.492, P < 0.001; \chi^2 = 5.725, P = 0.017$)。226 例检查者中外周血 mSEPT9 检测为胃癌的灵敏度为 50.74%(69/136), 特异度为 88.89%(80/90)。绘制 ROC 曲线, ROC 曲线下面积 AUC 为 0.716, 95% 置信区间(0.649~0.783), $P < 0.001$ 。见图 1。

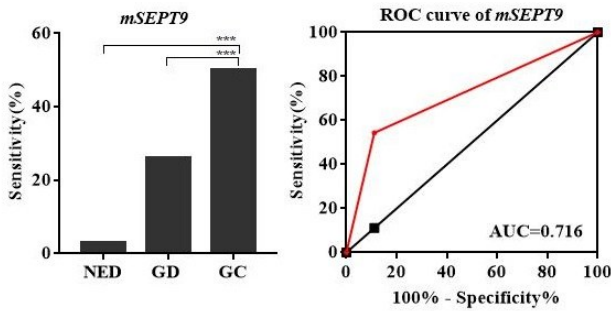


图 1 血浆 mSEPT9 基因检测在各组的阳性率和 ROC 曲线

2.2 胃癌患者外周血 mSEPT9 基因甲基化检测结果及其临床病理参数关系 分析经病理确诊胃癌患者外周血 mSEPT9 基因检测结果与临床病理参数的关系, 结果见表 1。不同 TNM 分期患者的 mSEPT9 基因差异有统计学意义($P < 0.05$), 但性别、淋巴结转移、病理分型、分化程度、浸润深度等 mSEPT9 基因差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 胃癌患者外周血 mSEPT9 与临床病理参数关系

临床病理特征	n	mSEPT9 阳性	χ^2	P
年龄/岁			0.123	0.726
<55	65	34(52.31)		
≥ 55	71	35(49.29)		
性别			0.090	0.764
男	102	57(55.88)		
女	34	20(58.82)		
临床分期			8.879	0.031
I 期	30	11(36.67)		
II 期	29	12(41.38)		
III 期	48	25(52.08)		
IV 期	29	21(72.41)		
淋巴结转移			0.242	0.623
是	100	52(52.00)		
否	36	17(47.22)		
浸润深度			1.943	0.584
T1	27	12(44.44)		
T2	24	10(41.67)		
T3	53	29(54.72)		
T4	32	18(56.25)		
Lauren 分型			3.492	0.174
肠型	56	30(53.57)		
弥漫型	68	36(52.94)		
混合型	12	3(25.00)		

表 1(续) 胃癌患者外周血 mSEPT9 与临床病理参数关系

临床病理特征	n	mSEPT9 阳性	χ^2	P
分化程度			0.347	0.841
高分化	12	7(58.33)		
中分化	31	16(51.61)		
低分化	93	46(49.46)		

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

2.3 胃癌外周血 mSEPT9 检测与血清肿瘤标记物 CEA、CA199、AFP 阳性率的比较 在胃癌组中, 外周血 mSEPT9 阳性率高于 CEA、CA199、AFP(Kappa 值 < 0.4), 见表 2。联合外周血 mSEPT9 与 CEA、CA199、AFP 行 ROC 曲线分析(AUC=0.730), 联合指标未能改善胃癌的诊断价值($P > 0.05$)。但联合检测可提高胃癌诊断的灵敏度 66.11%(90/136)。

表 2 胃癌患者外周血 mSEPT9 基因甲基化与 CEA、AFP、CA199 结果一致性的比较

标记物	检测结果(n)		Kappa	95% CI	P ^a
	阳性	阴性			
mSEPT9	69	67			
CEA	29	107	0.262	0.184~0.340	0.002
CA199	22	114	0.113	0.029~0.197	0.189
AFP	17	119	0.150	0.070~0.23	0.081

注:a 与 mSEPT9 阳性率一致性的比较。

2.4 胃癌患者外周血 mSEPT9 与生存期相关性分析 为了探究外周血 mSEPT9 在胃癌患者预测预后的价值, 本研究对胃癌患者生成状态进行随访, 并根据随访数据绘制了 Kaplan-Meier 生存曲线, 见图 2。外周血 mSEPT9 患者的生存率低于阴性患者(HR = 0.471, 95% CI : 0.288~0.772, $P = 0.002$), 提示 mSEPT9 是胃癌患者的潜在危险因素和预后标志。

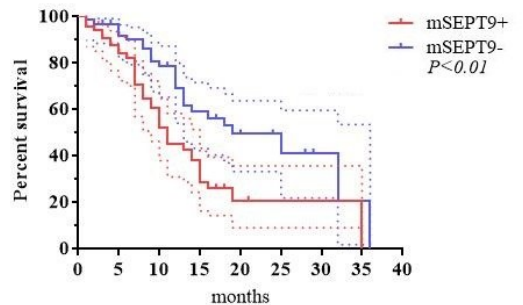


图 2 不同 mSEPT9 表达胃癌患者的生存曲线分析

3 讨论

早期胃癌无特殊体征和症状, 大部分患者就诊时, 疾病已经进展, 患者预后相对较差。因此提高胃癌早期诊断率, 对改善胃癌的预后具有重要的意义^[9]。我国卫生部于 2005 年启动农村恶性肿瘤高发区癌症早诊早治项目, 其中胃癌是重点防治对象。2012 年城市

癌症早诊早治项目也正式纳入国家重大公共卫生服务项目。目前,胃癌诊断手段主要有胃镜和血清学指标(常见肿瘤标志物等)。胃镜是有创检测,患者依从性较差,此外胃镜的可及性在基层仍不能满足需求。消化道常用肿瘤标记物如 CEA、CA199 和 AFP 也是临床辅助诊断胃癌的常用手段,但存在特异性和灵敏性不佳,难以实现胃癌的早期精准的诊断^[10]。液体活检是近年来发展迅速的检测手段。其最大的优势就是微侵入性,通过采集外周血,分离血浆中游离的核酸达到检测目的。

DNA 甲基化是哺乳动物基因组 DNA 后天修饰的主要途径之一,它对维持染色体的结构、X 染色体的失活、基因印记和肿瘤的发生、发展都起重要的作用^[11-12]。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,具有抑癌作用^[13]。Septin9-v2 启动子发生甲基化后,基因转录被抑制,可使正常细胞的形态发生异常改变,极性丧失,进而发展为肿瘤^[14]。研究表明^[15],胃癌组织中 Septin9 甲基化比例异常升高,在肠型胃癌中高达 83.30%。当肿瘤细胞发生凋亡坏死时,被甲基化 Septin9 随即释放入外周血。因此,通过检测外周血 mSEPT9 水平可以推测患胃癌的风险。本研究结果显示,胃癌患者外周血 mSEPT9 阳性率高于胃炎组和无疾病证据组提示外周血 mSEPT9 可作为胃癌临床诊断的有效指标。胃癌患者外周血 mSEPT9 检测的灵敏度较低(50.83%)与胃癌患者 TNM 分期有相关性,可能是因为肿瘤细胞释放的 ctDNA,进入全身血液循环后被稀释,但随着疾病的进展,肿瘤获得优势生长,其释放到外周血的 ctDNA 量增多,mSEPT9 检测的阳性率也得到提高。胃癌患者外周血 mSEPT9 在低龄组(<55 y)和 Lauren 分型肠型组中阳性率较高,但差异无统计学意义,这需要更大的样本数量以便进一步分析。mSEPT9 诊断效能高于消化道血清学标志物 CEA、CA199、AFP,但 mSEPT9 检测联合 CEA、CA199、AFP 三者或与其中任一种指标,均未能有效提高诊断效能,这与文献报道相符^[16-17],但联合检测有利于提高胃癌诊断的灵敏度。在对胃癌患者临床随访中发现,胃癌 mSEPT9 检测阳性组生存期低于阴性组,这提示 mSEPT9 检测对评估胃癌患者预后有良好的指导作用。

综上所述,外周血 mSEPT9 检测可作为胃癌诊断与判断预后的候选标志物之一,但 mSEPT9 在胃癌的复发、转移等机制仍需进一步研究。在高危人群中,外周血 mSEPT9 检查可作为有胃癌诊断与判断预后的补充手段。

参考文献:

- [1] 郑荣涛,孙可欣,张思维,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,2019,41(1):19-28.
- [2] 向楨,安运锋. 非侵入性血清检测在上消化道疾病筛查中的应用现状[J]. 右江医学,2022,50(3):224-228.
- [3] 余结根,李荣,查晓娟,等. 血清胃泌素及胃蛋白酶原在芜湖地区部分健康体检人群中的表达及意义[J]. 右江民族医学院学报,2020,42(3):308-311.
- [4] 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.
- [5] SONG L L,LI Y M. SEPT9:a specific circulating biomarker for colorectal cancer[J]. Adv Clin Chem,2015,72:171-204.
- [6] YE H Y T,HUR S S,CHANG J, et al. Matrix stiffness regulates endothelial cell proliferation through septin 9 [J]. PLoS One,2012,7(10):e46889.
- [7] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)肾癌诊疗指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2020:1-8.
- [8] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(2017年,上海)[J]. 中华消化杂志,2017,37(11):721-738.
- [9] BRAY F,FERLAY J,SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018:GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin,2018,68(6):394-424.
- [10] 苗智峰,徐惠绵. 重视胃癌的预防、筛查与早诊早治[J]. 中华医学信息导报,2021,36(8):8.
- [11] HUANG J Y,SOUPIR A C,SCHLICK B D, et al. Cancer detection and classification by CpG island hypermethylation signatures in plasma cell-free DNA[J]. Cancers (Basel),2021,13(22):5611.
- [12] 吕文豪,李季,向志强,等. Septin9 基因及甲基化检测在消化系肿瘤诊断中的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2020,20(11):48-49.
- [13] HUANG M L,HE J H,LAI W, et al. Methylated septin 9 gene is an important prognostic marker in stage II and stage III colorectal cancer for evaluating local recurrence or distant metastasis after surgery[J]. BMC Gastroenterol,2022,22(1):87.
- [14] DOR Y,CEDAR H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine[J]. Lancet,2018,392(10149):777-786.
- [15] 张意琴,胡笑蓉,毛雄英,等. 胃癌组织 Septin9 基因甲基化及其临床意义研究[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(14):1987-1990.
- [16] 贺娜,冯巩,钱美蓉,等. 血浆甲基化 Septin9 基因在胃癌患者中的表达和临床意义[J]. 中华消化杂志,2019(11):741-745.
- [17] 王炳龙,汤纪丰,俞子晴,等. 血浆 Septin9 基因甲基化检测在胃肠道病变中的临床应用价值评价[J]. 临床检验杂志,2021,3(3):182-187.

收稿日期:2022-10-31;修回日期:2022-11-27