



· 论 著 ·

血浆Septin9基因甲基化状态和水平在胃癌患者诊断和预后评估中的应用价值

陈馨宁¹, 姜惠琴¹, 杨轶慧¹, 虞倩¹, 张春燕^{1, 2}, 王蓓丽^{1, 2}, 潘柏申¹, 郭玮^{1, 2}

1. 复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200032;
2. 复旦大学附属中山医院厦门医院检验科, 福建 厦门 361015

[摘要] 背景与目的: 胃癌是中国常见的恶性肿瘤之一, 胃癌诊疗过程中仍缺乏高特异性、高灵敏度的生物标志物。甲基化的Septin9基因 (methylated Septin9 gene, mSEPT9) 在胃癌患者癌组织中特征性增高。本文旨在探讨胃癌患者血浆mSEPT9的表达及临床意义。方法: 纳入2020年4月—11月在复旦大学附属中山医院检验科检测血浆mSEPT9 (PCR荧光探针法) 的221例诊断为胃癌的患者以及34例无疾病证据受检者, 并应用 $\Delta\Delta Ct$ 法对mSEPT9水平进行相对定量。收集相关临床资料, 包括临床病理学资料 (患者基本信息和病理学检查结果) 和血清蛋白标志物 [癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原 (carbohydrate antigen, CA) 12-5、CA19-9和CA72-4] 并采用配对 t 检验、 χ^2 检验和受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线进行分析。结果: mSEPT9在胃癌未治疗人群中的阳性率为35% (28/80), 曲线下面积 (area under curve, AUC) 为0.815 3, 灵敏度为35%, 特异度为100%。脉管内见癌栓、侵及浆膜层或周围组织和存在淋巴结转移的胃癌患者术前mSEPT9阳性率较高 (46.87% vs 12.50%, 45.16% vs 14.29%, 75.00% vs 40.00%), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗后疾病进展 (progressive disease, PD) 患者mSEPT9阳性率高于治疗后部分缓解 (partial response, PR) 和稳定 (stable disease, SD) 患者 (68.75% vs 17.74%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。患者疾病进展前和疾病进展时mSEPT9 $\Delta\Delta Ct$ 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 血浆mSEPT9基因检测在胃癌诊断中的灵敏度和特异性较传统血清蛋白标志物 (CEA、CA12-5、CA19-9和CA72-4) 更优。该标志物能提供严重程度相关信息, 且在PD患者中阳性率较高。SEPT9状态和相对定量结果在预测术后病理学分期和治疗反应中具有潜在临床意义。

[关键词] Septin9 基因; 甲基化; 胃癌; 血浆; 循环肿瘤DNA

中图分类号: R735.2 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.02.009

Expression of plasma methylated Septin9 gene and its clinical significance in patients with gastric cancer CHEN

Xinning¹, JIANG Huiqin¹, YANG Yihui¹, YU Qian¹, ZHANG Chunyan^{1, 2}, WANG Beili¹, PAN Baishen¹, GUO Wei^{1, 2}

[1. Department of Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital (Xiamen Branch), Fudan University, Xiamen 361015,

Fujian Province, China]

Correspondence to: ZHANG Chunyan, E-mail: zhang.chunyan@zs-hospital.sh.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Gastric cancer is one of the most common malignant tumors in our country. The diagnosis and treatment process of gastric cancer lacks of sensitive and specific biomarker. This study aimed to explore the expression of plasma methylated Septin9 gene (mSEPT9) and its clinical significance in patients with gastric cancer. **Methods:** From April 2020 to November 2020, 221 patients with gastric cancer and 34 patients with no evidence of disease who visited Zhongshan Hospital Fudan University were enrolled. The status of mSEPT9 was detected by polymerase chain reaction (PCR) fluorescence probe method, and relative mSEPT9 value was determined by the $\Delta\Delta Ct$ method. Detailed clinical data including pathological characteristics (patients

基金项目: 国家自然科学基金 (81972000, 82172348); 复旦大学附属中山医院临床研究专项基金 (2018ZSLC05); 国家自然科学基金青年项目 (81902139); 复旦大学附属中山医院临床研究专项基金 (2020ZSLC54); 上海市临床重点专科建设项目 (shslczdk03302); 上海市医学重点专科项目 (ZK2019B28); 厦门市医疗卫生重点项目 (YDZX20193502000002); 复旦大学附属中山医院青年基金 (2021ZSQN38)。

第一作者: 陈馨宁 (ORCID: 0000-0002-2614-6003), 本科, 技师, E-mail: chen.xinning@zs-hospital.sh.cn。

通信作者: 张春燕 (ORCID: 0000-0002-0345-6236), 硕士, 副主任技师, 主任, E-mail: zhang.chunyan@zs-hospital.sh.cn。

characteristics and pathology characteristics) and serum biomarkers [carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen (CA)12-5, CA19-9 and CA72-4] were collected and analyzed. Paired *t* test, χ^2 test and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis were performed for statistical analysis. **Results:** The positive rate, sensitivity and specificity of plasma mSEPT9 were 35%, 35% and 100%, respectively in untreated patients with gastric cancer. The positive rate of mSEPT9 was higher in patients with blood vessel invasion, serosa invasion and lymphatic metastasis, which was 46.87% vs 12.50%, 45.16% vs 14.29%, 75.00% vs 40.00%, respectively ($P < 0.05$). The positive rate of mSEPT9 was higher in progressive disease (PD) patients than in partial response (PR) and stable disease (SD) patients, which were 68.75% and 17.74%, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). mSEPT9 level before PD and at the time of PD showed statistically significance. **Conclusion:** Plasma mSEPT9 detection demonstrates a more satisfactory diagnostic performance in gastric cancer than traditional serum biomarkers. The biomarker can provide information regarding severity with high positive rate among PD patients. The status and level of mSEPT9 were of clinical significance in evaluating tumor burden and predicting treatment response.

[**Key words**] *Septin9* gene; Methylated; Gastric cancer; Plasma; Circulating tumor DNA

胃癌是全球第5大常见癌症，也是第4大癌症死因^[1]，中国胃癌病例数量约占东亚地区总数量的一半^[2]。当前胃癌诊疗过程中仍缺乏高特异性、高灵敏度的生物标志物。

基因甲基化被认为与肿瘤的发生、发展和细胞癌变存在密切的联系，几乎所有肿瘤都已发现特异性的基因甲基化标志物^[3]。先前研究表明，在胃癌患者癌组织中甲基化*Septin9*基因 (methylated *Septin9* gene, mSEPT9) 特征性增高^[4]。由肿瘤细胞坏死、凋亡所释放到外周血的循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 携带与原发肿瘤组织一致的分子改变^[5]。ctDNA甲基化分析被认为是肿瘤领域极具潜力的技术手段^[6]。

本研究通过检测胃癌患者血浆mSEPT9，分析其甲基化状态和相对定量结果，探讨其在胃癌诊断、术后病理学分期严重程度评估、治疗反应预测中的价值和临床意义。

1 资料和方法

1.1 一般资料

回顾性分析2020年4月—11月在复旦大学附属中山医院检验科检测血浆mSEPT9的所有病例。经筛选纳入221例诊断为胃癌的患者以及34例无疾病证据受检者作为对照。同时收集所有入组者的相关临床资料，包括临床病理学资料 (患者基本信息和病理学检查结果) 和血清蛋白标志物 [癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen,

CEA)、糖类抗原 (carbohydrate antigen, CA) 12-5、CA19-9和CA72-4]。本研究经复旦大学附属中山医院医学伦理学委员会批准，患者均知情同意。

1.2 纳入标准

所有胃癌患者的诊断均经病理学检查确诊，符合相应的诊断标准且均为原发性肿瘤。未经治疗组即胃癌患者未行放化疗、手术治疗或全身治疗。

肿瘤治疗反应根据实体瘤疗效评价标准 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST) 1.1版分为完全缓解 (complete response, CR)、部分缓解 (partial response, PR)、稳定 (stable disease, SD) 和疾病进展 (progressive disease, PD)。

1.3 方法

1.3.1 主要仪器及试剂

*Septin9*基因甲基化检测试剂盒 (PCR荧光探针法) 购自博尔诚 (北京) 科技有限公司，ABI 7500实时荧光定量PCR仪购自美国ThermoFisher Scientific公司，Roche Cobas e801全自动电化学发光分析仪及配套的CEA、CA12-5、CA19-9和CA72-4检测试剂盒购自瑞士Roche公司。

1.3.2 血浆mSEPT9基因检测

所有检测均在复旦大学附属中山医院检验科完成。按照*Septin9*基因甲基化检测试剂盒 (PCR荧光探针法) 说明书对受检者血浆中DNA进行提取、亚硫酸盐转化处理、多重PCR扩增并进行

结果判断。质控合格条件下, ACTB Ct \leq 32.1, mSEPT9 Ct \leq 41.0时判定为阳性。

应用 $\Delta\Delta$ Ct法对mSEPT9甲基化水平进行相对定量, 公式如下^[7-8]:

$\Delta\Delta$ Ct检测样本 = Δ Ct检测样本 - Δ Ct校准样本

Δ Ct检测样本 = Ct检测样本(ACTB) - Ct检测样本(mSEPT9)

Δ Ct校准样本 = Ct校准样本(ACTB) - Ct校准样本(mSEPT9)

此处校准样本即每批次阳性质控品。

1.3.3 CEA、CA12-5、CA19-9和CA72-4检测

采用电化学发光法, 受检者血清标本按照Roche Cobas e801全自动电化学发光仪及配套试剂盒说明书操作。CEA参考范围为0~5 ng/mL; CA12-5参考范围为0~25 IU/mL; CA19-9参考范围为0~34 U/mL; CA72-4参考范围为0~10 U/mL。

1.4 统计学处理

采用SPSS Statistics 26.0和Prism v9.0.0进行统计学分析, 两组数据间的比较采用配对*t*检验, 分类数据的组间比较采用 χ^2 检验, 不同诊断方法的比较采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析判断其诊断效能, 选取最佳截断值, 得到相应的敏感度和特异度。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本信息

本研究共纳入221例胃癌患者, mSEPT9阳性率为27.60% (61/221)。其中有80例患者未经治疗, mSEPT9阳性率为35% (28/80)。胃癌患者基本临床信息见表1, 其中男性138例 (62%), 女性83例 (38%), 患者年龄30~84岁, 中位年龄62岁。

34例无疾病证据受检者, mSEPT9阳性率为0% (0/33), 其中男性18例, 女性16例, 年龄34~83岁, 中位年龄63岁。

2.2 血浆mSEPT9、CEA、CA19-9、CA72-4和CA12-5胃癌诊断ROC曲线分析

以80例未经治疗胃癌患者为疾病组, 34例无疾病证据受检者作为对照组, 采用单一标志物检测胃癌并绘制ROC曲线进行分析。mSEPT9阳性率为35% (28/80), 曲线下面积 (area under curve, AUC) 为0.815 3, 灵敏度为35%, 特异度为100%。其阳性率、AUC、灵敏度和特异性均为5项指标中最优 (表2、图1)。5项指标联合检测诊断胃癌的效能略有改善, 在敏感性上有明显提升。

2.3 血浆mSEPT9与术后病理学分期相关

脉管内见癌栓、侵及浆膜层或周围组织和存在淋巴结转移的胃癌患者术前mSEPT9阳性率较高, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05 , 表3)。是否存在神经侵犯与胃癌患者术前mSEPT9阳性率无显著相关性。

表1 患者基本信息

Tab. 1 Patient characteristics

Characteristic	N	Percentage/%
Median age (range)/year	62 (30-84)	
Gender	221	
Male	138	62
Female	83	38
Differentiation status	177	
Well	2	1
Moderately	42	24
Poorly	133	75
Lauren classification	186	
Intestinal type	61	33
Diffuse type	60	32
Mixed type	65	35
HER2	180	
Negative	165	92
Positive	15	8

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2.

表2 血浆mSEPT9、CEA、CA19-9、CA72-4和CA12-5单独及联合辅助胃癌诊断效能

Tab. 2 Detection performance of mSEPT9 status, CEA, CA19-9, CA72-4 and CA12-5 single and joint in gastric cancer

Item	Cut-off value	AUC	Sensitivity/%	Specificity/%	SE	95% CI	P value
CEA	5	0.573 9	25.32	100.00	0.0527 6	0.470 5-0.677 3	0.214 0
CA19-9	34	0.600 1	17.95	97.06	0.0593 4	0.483 8-0.716 3	0.092 9
CA72-4	10	0.562 9	22.78	94.12	0.0559 1	0.453 3-0.672 5	0.290 1
CA12-5	25	0.711 6	16.25	100.00	0.0473 0	0.618 9-0.804 3	0.000 4
mSEPT9	-0.152 1	0.815 3	35.00	100.00	0.0414 1	0.734 2-0.896 5	<0.000 1
Joint	2.852	0.822 2	66.25	96.77	0.382 1	0.747 3-0.897 1	<0.000 1

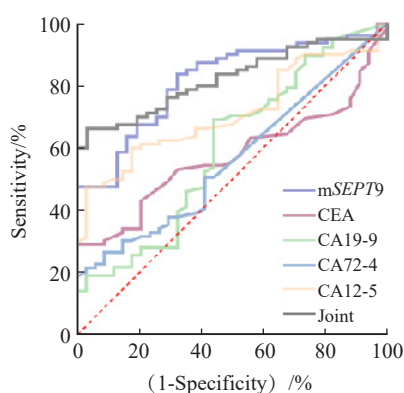


图1 血浆mSEPT9、CEA、CA19-9、CA72-4和CA12-5单独及联合辅助胃癌诊断的ROC曲线

Fig. 1 ROC curve for mSEPT9 status, CEA, CA19-9, CA72-4 and CA12-5 single and joint in gastric cancer

2.4 血浆mSEPT9与肿瘤治疗反应相关

与治疗后出现PD的患者相比，治疗后出现PR和SD的患者mSEPT9阳性率明显更低 ($P=0.000 2$, 表4)。未经治疗患者组和经治疗患者组间mSEPT9阳性率差异无统计学意义。

在14例连续监测患者中，患者PD前和PD时mSEPT9 $\Delta \Delta Ct$ 差异有统计学意义 ($P=0.028 4$, 图2)。未经治疗患者组和经治疗患者组间mSEPT9 $\Delta \Delta Ct$ 差异无统计学意义。6例治疗前后接受mSEPT9检测的患者也未见SEPT9 $\Delta \Delta Ct$ 有统计学意义。

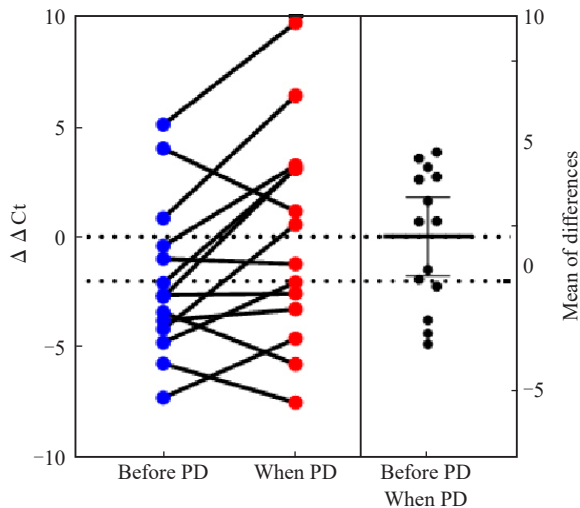
表3 术前血浆mSEPT9与临床病理学特征的相关性分析

Tab. 3 Correlation between mSEPT9 status and clinical pathological characteristics

Item	Group	mSEPT9 positive	mSEPT9 negative	P value
Blood vessel invasion	Yes	15	17	0.025 8
	No	2	14	
Perineural invasion	Yes	13	17	0.362 7
	No	5	13	
Depth of invasion	Serosa negative	4	24	0.012 3
	Serosa positive	14	17	
Lymphatic metastasis	Yes	15	18	0.014 8
	No	5	27	

表4 血浆mSEPT9与治疗反应相关

Item	treatment		P value
	PR+SD	PD	
mSEPT9 positive	11	11	0.000 2
mSEPT9 negative	51	5	

图2 PD前和PD时患者血浆mSEPT9 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 的改变Fig.2 Change in the $\Delta\Delta\text{Ct}$ of mSEPT9 between the plasma sample collected before and at PD

3 讨 论

mSEPT9基因与肿瘤的发生、发展密切相关^[9],大量临床研究已经验证了mSEPT9在结直肠癌筛查和早期诊断中的性能。目前,该检测已经获得美国食品药品监督管理局、中国国家食品药品监督管理总局和欧盟CE认证审批,但mSEPT9检测在其他消化道癌症全程管理中的价值尚未得到充分论证,胃癌中的相关数据也鲜有报道。

本回顾性研究表明,mSEPT9在胃癌未治疗人群中的诊断灵敏度为35%,特异度为100%,其诊断效能比起传统血清蛋白标志物具有一定优势,这与王炳龙等^[10](灵敏度为43.71%,特异度为95.12%)以及贺娜等^[11](灵敏度为46.9%,特异度为95.7%)的研究结果一致。本研究结果特异度理想,但灵敏度较低,这可能是受制于标本量和患者纳入标准不同。本研究进一

步分析了5项指标联合检测效能,仅在敏感性上有明显改善。因此,临床实际开展5项指标诊断胃癌,仍待卫生经济学评估。本文相较于其他研究所比较的血清蛋白标志物更加全面,但由于胃良性疾病例数太少,未纳入本次分析。本研究结果表明,在机会性筛查中,mSEPT9检测仍可以成为侵入性胃镜的一种耐受性良好的补充检查手段。

此外,本研究还分析了胃癌患者血浆mSEPT9与临床病理学特征的相关性,结果显示有脉管癌栓、侵及浆膜层或周围组织和有淋巴结转移的患者血浆mSEPT9阳性率较高,表明血浆mSEPT9与术后病理学分期存在密切联系($P < 0.05$)。这符合目前对癌症特异性ctDNA甲基化的认识,即能提供一定的相关信息^[12]。

本研究进一步探究了mSEPT9与患者预后的相关性,发现在PD患者中mSEPT9阳性率较高($P < 0.05$)。存在大量关于ctDNA甲基化水平评估预后和动态监测的研究结果及临床试验的报道。例如,在结直肠癌中mSEPT9水平变化对疾病状态预测的准确率为69.2%^[13];晚期肺癌患者中PR患者mSHOX2 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 变化程度显著大于SD患者^[14];KLK10甲基化与乳腺癌复发和辅助治疗后无瘤生存期缩短显著相关^[15]等。本研究未能发现mSEPT9在治疗前后的差异具有统计学意义,可能是由于本研究为回顾性研究,故患者采血点并非严格控制,可能使结果出现偏差。

鉴于目前商品化试剂盒仅能提供定性结果,我们引入 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法对甲基化程度进行相对定量,结果发现患者PD前mSEPT9 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 较PD时更低,平均变化幅度为2.028,差异有统计学意义。本研究提示同一患者血浆mSEPT9的相对定量结果可以在分子水平提示胃癌疾病发展,是预后预测和动态监测的潜在生物标志物。未来甲基化检测的发展方向应着重于定量甲基化水平以辅助纵向监测。

综上,本研究为日后临床进一步使用血浆mSEPT9检测诊断胃癌提供一定科学依据。mSEPT9的相对定量结果与术后病理学分期和治

疗反应预测有一定的相关性，但仍需要更多的临床研究予以验证。

利益冲突声明：所有作者均声明不存在利益冲突。

【参 考 文 献】

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. 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] GBD STOMACH CANCER COLLABORATORS. The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J] . Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(1): 42-54.
- [3] KLUTSTEIN M, NEJMAN D, GREENFIELD R, et al. DNA methylation in cancer and aging [J] . Cancer Res, 2016, 76(12): 3446-3450.
- [4] 李楠, 王贺玲, 梁晓平, 等. SEPTIN 9在胃癌组织中的表达及临床意义 [J] . 中国微创外科杂志, 2014, 14(12): 1125-1127.
- LI N, WANG H L, LIANG X P, et al. Expression of SEPTIN 9 in gastric cancer tissues and its clinical significance [J] . Chin J Minim Invasive Surg, 2014, 14(12): 1125-1127.
- [5] CESCO D W, BRATMAN S V, CHAN S M, et al. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology [J] . Nat Cancer, 2020, 1(3): 276-290.
- [6] LUO H Y, WEI W, YE Z Y, et al. Liquid biopsy of methylation biomarkers in cell-free DNA [J] . Trends Mol Med, 2021, 27(5): 482-500.
- [7] DIETRICH D, HASINGER O, LIEBENBERG V, et al. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small cell lung cancer patients [J] . Diagn Mol Pathol, 2012, 21(2): 93-104.
- [8] DE VOS L, GEVENSLEBEN H, SCHRÖCK A, et al. Comparison of quantification algorithms for circulating cell-free DNA methylation biomarkers in blood plasma from cancer patients [J] . Clin Epigenetics, 2017, 9: 125.
- [9] 张苗苗, 余辉, 陈庆, 等. SEPT9基因在肿瘤中的研究进展 [J] . 国际检验医学杂志, 2019, 40(4): 453-458.
- ZHANG M M, YU H, CHEN Q, et al. Research progress of SEPT9 gene in tumor [J] . Int J Lab Med, 2019, 40(4): 453-458.
- [10] 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, 39(3): 182-187.
- WANG B L, TANG J F, YU Z Q, et al. Evaluation for clinical application of methylated Septin9 test in plasma of gastrointestinal diseases [J] . Chin J Clin Lab Sci, 2021, 39(3): 182-187.
- [11] 贺娜, 冯巩, 钱美睿, 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, 39(11): 741-745.
- HE N, FENG G, QIAN M R, et al. Expression and clinical significance of plasma methylated Septin9 gene in patients with gastric cancer [J] . Chin J Dig, 2019, 39(11): 741-745.
- [12] 刁艳君, 王娟, 郝晓柯. ctDNA甲基化检测在肿瘤诊疗中的价值 [J] . 中华检验医学杂志, 2019, 42(1): 1-4.
- DIAO Y J, WANG J, HAO X K. The value of methylated circulating tumor DNA as biomarkers in cancer diagnosis and prognosis [J] . Chin J Lab Med, 2019, 42(1): 1-4.
- [13] JIANG H Q, YU Q, CHEN X N, et al. Role of blood mSEPT9 in evaluating tumor burden and disease monitoring in colorectal cancer patients [J] . J Clin Lab Anal, 2021, 35(11): e24030.
- [14] PENG X M, LIU X L, XU L, et al. The mSHOX2 is capable of assessing the therapeutic effect and predicting the prognosis of stage IV lung cancer [J] . J Thorac Dis, 2019, 11(6): 2458-2469.
- [15] PANAGOPOULOU M, KARAGLANI M, BALGKOURANIDOU I, et al. Circulating cell-free DNA in breast cancer: size profiling, levels, and methylation patterns lead to prognostic and predictive classifiers [J] . Oncogene, 2019, 38(18): 3387-3401.

(收稿日期: 2022-06-24 修回日期: 2022-10-13)