

ctDNA 启动子区甲基化在食管鳞癌诊断中的应用价值

杨志珍¹, 谈艳芳²

(1. 成都中医药大学医学技术学院, 四川 成都 610000;

2. 德阳市人民医院检验科, 四川 德阳 618000)

摘要:目的 探讨 ctDNA 启动子区(Promoter)甲基化在食管鳞状细胞癌患者血浆中的表达情况, 筛选可作为诊断食管鳞状细胞癌潜在的生物标志物。方法 收集 2022 年 8 月-2023 年 1 月于德阳市人民医院初诊为食管鳞状细胞癌患者与健康体检者血浆标本分别作为食管鳞癌组与健康对照组。采用全基因组酶促甲基化测序(EM-Seq)检测两组间的 ctDNA 甲基化差异表达水平, 结合 GO、KEGG、Reactome 富集筛选出食管鳞癌组甲基化水平高于健康对照组的前 4 位基因作为食管鳞状细胞癌相关的诊断生物标志物。结果 EM-Seq 测序得到两组差异甲基化区基因共 9354 个, 其中食管鳞癌组高于健康对照组的有 553 个基因位于 Promoter 上。相关通路富集显示, 食管鳞癌组甲基化水平高于健康对照组的前 4 位基因为 AXIN1、EPS15、CACTIN、E2F1, 分别位于 16 号染色体、1 号染色体、19 号染色体和 20 号染色体上, 涉及 DNA 损伤修复、Wnt 信号通路、EGFR 信号通路及 NF- κ B 信号通路等肿瘤中常见信号通路。结论 AXIN1、EPS15、CACTIN 和 E2F1 基因或可作为诊断食管鳞状细胞癌的潜在生物标志物。

关键词: DNA 甲基化; 食管鳞状细胞癌; 生物标志物

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2024.06.015

文章编号: 1006-1959(2024)06-0091-06

Application Value of ctDNA Promoter Methylation in the Diagnosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

YANG Zhi-zhen¹, TAN Yan-fang²

(1. College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610000, Sichuan, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Deyang People's Hospital, Deyang 618000, Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of ctDNA promoter methylation in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma, and to screen potential biomarkers for the diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. **Methods** The plasma samples of patients with esophageal squamous cell carcinoma and healthy subjects who were newly diagnosed in Deyang People's Hospital from August 2022 to January 2023 were collected as esophageal squamous cell carcinoma group and healthy control group respectively. The differential expression levels of ctDNA methylation between the two groups were detected by whole-genome enzymatic methylation sequencing (EM-Seq). Combined with GO, KEGG, and Reactome enrichment, the first four genes with higher methylation levels in the esophageal squamous cell carcinoma group than in the healthy control group were selected as diagnostic biomarkers related to esophageal squamous cell carcinoma. **Results** A total of 9354 differentially methylated genes were obtained by EM-Seq sequencing. Among them, 553 genes in the esophageal squamous cell carcinoma group were higher than those in the healthy control group. The enrichment of related pathways showed that the top four genes with higher methylation level in esophageal squamous cell carcinoma group than in healthy control group were AXIN1, EPS15, CACTIN and E2F1, which were located on chromosome 16, chromosome 1, chromosome 19 and chromosome 20, respectively, involving DNA damage repair, Wnt signaling pathway, EGFR signaling pathway, NF- κ B signaling pathway and other common signaling pathways in tumors. **Conclusion** AXIN1, EPS15, CACTIN and E2F1 genes may be potential biomarkers for the diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: DNA methylation; Esophageal squamous cell carcinoma; Biomarkers

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是食管癌的一个主要亚型, 约占食管癌的 90%, 在全球癌症相关死亡原因中排名第 6^[1-3]。ESCC 是由鳞状上皮细胞分化的高度恶性上

皮肿瘤, 极具侵袭性, 5 年存活率仅约 30%^[3]。液体活检最初主要指循环肿瘤细胞的分析, 现在扩展到分析肿瘤在体液(主要是血液)中释放的肿瘤成分, 其中就包括肿瘤循环 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)^[4,5]。游离 DNA(cell free DNA, cfDNA)是存在于体液中的细胞外 DNA, 来源于正常细胞和凋亡、坏死的肿瘤细胞; 而 ctDNA 是其中的一部分, 约占所有 cfDNA 的 0.01%~1%, 其含量与肿瘤的类型、肿瘤负荷、疾病进展程度相关^[6], 既携带肿瘤细胞的基本遗传信息, 又携带基因突变后的信息, 包含点突变、

基金项目: 四川省卫健委科研基金资助项目(编号: 20PJ241)

作者简介: 杨志珍(1991. 12-), 女, 湖南龙山县人, 硕士研究生, 主要从事食管癌的诊治研究

通讯作者: 谈艳芳(1978. 10-), 女, 四川乐山人, 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事肿瘤和免疫性疾病的诊治研究

重排、扩增甚至基因拷贝数变异^[7]。ctDNA 可来源于坏死的肿瘤细胞、凋亡的肿瘤细胞、肿瘤细胞分泌的外泌体^[8]。表观遗传学异常是 ESCC 形成的重要原因,特别是 DNA 甲基化异常与食管鳞癌的发生发展有着密切的关系。DNA 甲基化异常会导致基因的异常表达,使其成为食管鳞癌进展的重要调控因子。有研究报道^[9],相对血清,血浆中 ctDNA 甲基化水平能更准确地反映机体 ctDNA 甲基化的真实水平。多项研究表明^[10-12],ctDNA 甲基化是当前非侵入性诊断和监测肿瘤动力学的理想生物标志物。然而,ctDNA 甲基化在食管鳞癌发生发展中的研究报道较少。为了获得关于 ctDNA 甲基化的定量和定性信息,已经开发了广泛的方法。高通量测序(或下一代测序)技术通过一次对数百万个 DNA 片段进行大规模的平行反应而显著提高了测序能力^[13]。酶促甲基化测序(EM-Seq)作为针对 5-甲基胞嘧啶(5-mC)的抗体富集甲基化 DNA 序列的大规模纯化技术,已经成为比以往更快地鉴定甲基化 CpG 富集序列的有利工具^[14]。有研究表明^[15,16],启动子区基因甲基化水平随着肿瘤进展呈现逐渐升高的状态。本研究利用 EM-Seq 技术探讨食管鳞癌中 ctDNA 启动子区高甲基化水平状态,结合相关富集通路,筛选出前 4 位高甲基化水平基因,或可作为食管鳞癌诊断生物标志物,将为临床上 ESCC 的诊断带来 DNA 甲基化的新思路。

1 材料与方法

1.1 样本收集 收集 2022 年 8 月-2023 年 1 月于德阳市人民医院初诊食管鳞癌患者和健康体检者的外周血样本各 4 份,入选人员年龄 48~70 岁,平均年龄(55.50±7.10)岁。所有入选患者确诊依据《食管癌诊疗指南(2022 年版)》^[17]、《食管癌 TNM 分期(第 8 版)》^[18]和病理诊断。将初次诊断为食管鳞癌且未接受任何治疗及发生淋巴及远处转移患者作为食管鳞癌诊断组(2 男 2 女,代号 S1、S2、S3、S4),将体检各项指标正常且无任何器质性病变的体检者作为健康对照组(2 男 2 女,代号 J1、J2、J3、J4)。立即对收集到外周血样本进行血浆分离,2000 g 离心 10 min,分离得到血浆 5 ml,转移到冻存管,-80 ℃储存,用于后续 ctDNA 分离。本研究已获得德阳市人民医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的检测与测序

采用 High Pure Viral 核

酸试剂盒从存储的血浆中抽提 ctDNA。用琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 降解程度以及是否有 RNA 污染。用 Nanodrop 检测 DNA 的纯度(OD260/280 比值),用 Qubit 对 DNA 浓度进行精确定量,将大于 3 ng 且没有过度基因组 DNA 污染的 ctDNA 用于文库构建。使用 methylation-insensitive restriction enzyme, MspI 对 DNA 样品进行酶切处理,然后进行末端修复、加 A 尾,并连接上所有胞嘧啶均经过甲基化修饰的测序接头,切胶选择插入片段长度在 150~300 bp 范围的 DNA 片段。随后进行 Bisulfite 处理(采用 EZ DNA Methylation Gold Kit, Zymo Research)。经过处理后,未发生甲基化的 C 变成 U(PCR 扩增后变为 T),而甲基化的 C 保持不变,最后进行 PCR 扩增,得到最终的 DNA 文库。使用 Qubit3.0 进行初步定量,稀释文库至 1 ng/μl,进行 EM-Seq 测序。文库构建流程图见图 1。

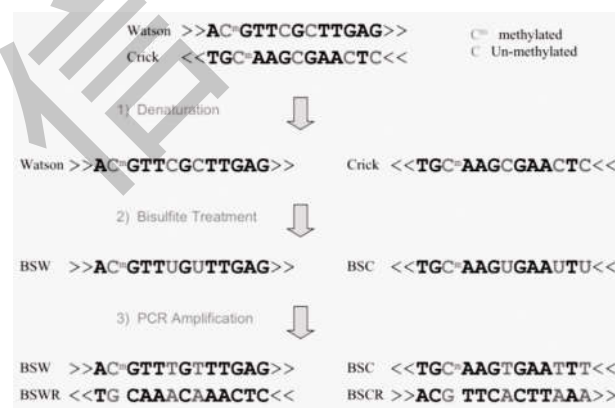


图 1 文库构建流程图

1.2.2 测序结果评估及数据处理 使用 Illumina HiSeq 2500 测序仪构建 Cluster 生成和第一向测序引物杂交。将带着 Cluster 的 flow cell 上机测序,选择 Paired-end 程序,进行双端高通量测序,使用 Illumina 公司提供的数据收集软件进行测序过程的控制并实时数据分析。使用 FastQC 对测序序列质量进行评估,评估原理:应用测序质量 Q 值进行评估,Q 值与测序错误 E 值之间关系为: $Q = -10 \log_{10} E$ 。评价标准是各样本获得约 20 G 的测序数据,测序读长 150 bp,单碱基质量>20 的比例≥90%。为了保证数据质量,首先,对下机的 raw reads 利用 fastqc 进行质控,随后 cutadapt 过滤低质量数据,得到 clean reads。对 raw reads 截去低质量 reads,得到的高质量 Reads 或碱基,称为 clean data。

1.2.3 基因比对及甲基化水平获取分析 使用 bwameth.py^[19](bwa-mem2 version 0.2.5)将样本 clean data 和参考基因组 hg38(人)进行比对。随后采用 MethylDackel 软件进行 CpG 甲基化位点检测。计算其甲基化水平, 公式为: $ML = mC / (mC + umC)$ 。其中 ML 为甲基化水平, mC 和 umC 分别代表甲基化 C 和未甲基化 C 的个数。使用 20 Kbp/bin 分序列环境计算各个 bin 内甲基化水平。通过 MethylDackel 工具提取每个样本甲基化情况, 利用 DSS R 包筛选阈值为 Cutoff 10% 和 $P < 0.05$ 进行组间差异甲基化区域分析。使用 ChIPseeker 软件对其进行功能区域注释, 当差异甲基化区域(differentially methylated region, DMR)与特定基因功能元件有重叠时, 将相应的基因挑选出来, 称为 DMR 相关基因。对 Promoter 上基因集行 GO、KEGG、Reactome 富集分析。甲基化分析流程图见图 2。

2 结果

2.1 甲基化水平分析图表

2.1.1 各位点甲基化水平 对于鉴定出的甲基化位点, 计算其甲基化水平, 统计各个序列环境(CG、CHG、CHH, H 代表 A 或者 T)下 C 位点的甲基化水平, 见表 1。

2.1.2 各样本甲基化水平的关系 对各样本间使用 20 Kbp/bin 分序列环境计算各个 bin 内甲基化水平后做 Pearson 相关性分析, 显示相关系数约在 1 左右, 表明样本之间甲基化模式的相似度较高, 见图 3。

2.1.3 甲基化主成分分析 对各样本间进行甲基化主成分分析(PCA), 横坐标表示第一主成分的分量, 纵坐标表示第二主成分的分量。图中椭圆表示样本聚集中心, 图中点与点之间的距离反应样本间相似性或者差异性。图中可见健康对照组与食管鳞癌诊断组数据拟合性较高, 同时相同分组间样本差异较小体现了数据的稳定性, 见图 4。

2.2 差异甲基化基因筛选及富集通路分析 通过两组间差异甲基化水平比较分析, 最终得到差异甲基化区基因共 9354 个, 其中有 1136 个位于 Promoter 上。Promoter 区诊断组甲基化水平高于健康对照组甲基化水平的基因有 553 个。结合 GO、KEGG、Reactome 功能富集与食管鳞癌相关的排名前 4 位基因分别为 AXIN1、EPS15、CACTIN、E2F1, 基因所在染色体位置见表 2, 基因相关富集通路见表 3。

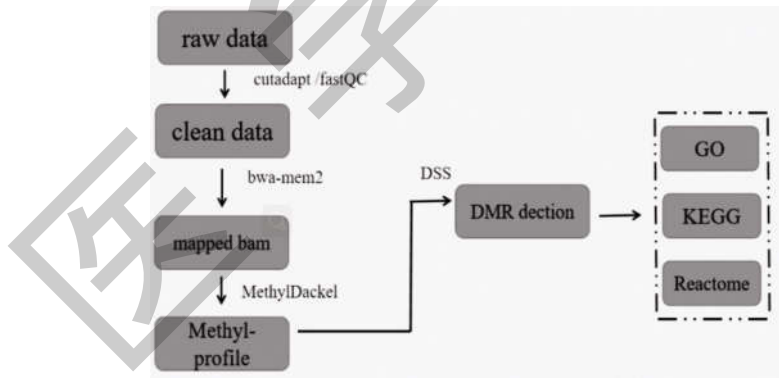


图 2 甲基化分析流程图

表 1 各序列 C 位点的甲基化水平

样本	C	CG	CHG	CHH
J1	0.123 593 559	0.513 543 077	0.074 535 065	0.079 666 583
J2	0.102 385 961	0.502 507 453	0.052 223 758	0.056 298 497
J3	0.062 304 536	0.478 100 898	0.013 842 564	0.012 953 786
J4	0.166 083 316	0.545 075 941	0.116 284 453	0.121 632 405
S1	0.098 074 173	0.503 243 528	0.044 700 115	0.050 055 496
S2	0.112 517 845	0.494 856 77	0.062 745 68	0.067 893 88
S3	0.102 213 94	0.502 724 046	0.050 985 273	0.055 984 185
S4	0.110 481 919	0.510 979 728	0.056 934 37	0.064 131 015

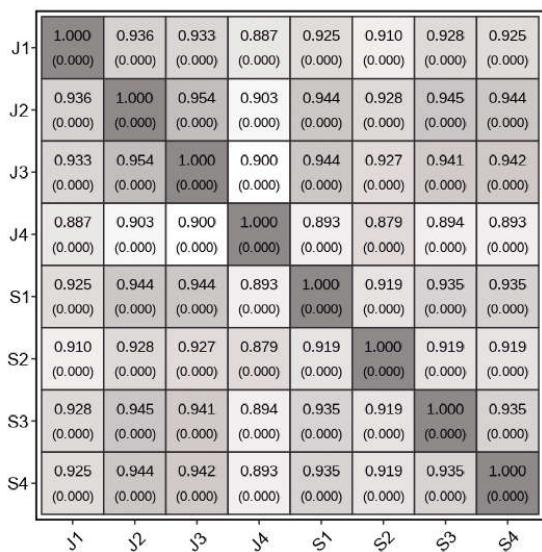


图 3 样本甲基化相关性分析图

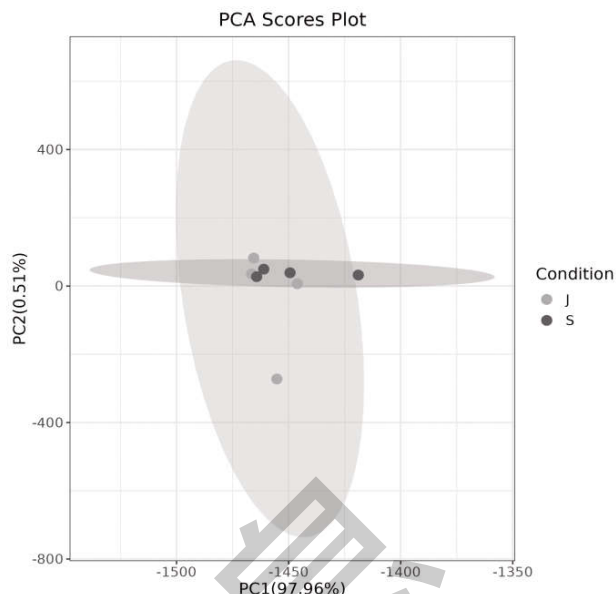


图 4 样本间甲基化情况 PCA 分析结果图

表 2 基因所在染色体位置

染色体	基因名称	基因全称
chr16	AXIN1	axin 1
chr1	EPS15	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
chr19	CACTIN	cactin, spliceosome C complex subunit
chr20	E2F1	E2F transcription factor 1

表 3 基因相关富集通路

基因名称	基因富集	ID	信号通路	pvalue
AXIN1	Reactome	R-HSA-195721	Wnt 信号通路	5.98E-45
EPS15	Reactome	R-HSA-177929	EGFR 信号通路	0.000 000 353
CACTIN	GObp	GO:0043122	NF-kB 信号通路	3.64E-17
E2F1	GObp	GO:0008630	DNA 损伤修复	0.000 000 111

3 讨论

ctDNA 甲基化检测在 ESCC 检测中前景广阔。本研究使用了高通量 EM-Seq 对 4 对 ESCC 样本和健康样本的全基因组 ctDNA 甲基化水平进行检测。EM-Seq 鉴定出的 DMR 几乎跨越了整个基因组,具有足够的深度和高分辨率,且 DMR 的数量远远大于传统方法检测到的数量,表明该方法代表了用于 ctDNA 甲基化组研究的有效方法^[20]。本研究中,通过 EM-Seq 共鉴定了 9354 个差异表达基因,其中位于启动子区诊断组甲基化水平高于健康对照组甲基化水平的基因有 553 个。通路分析突出了许多与 ESCC 癌变密切相关的通路,如 DNA 损伤修

复、Wnt 信号通路、EGFR 信号通路和 NF-kB 信号通路,为理解 ESCC 发病的分子机制提供了新的线索。

鉴于 ctDNA 甲基化在启动子区的影响,结合富集分析和通路分析,DMR 在与 DNA 损伤修复、Wnt 信号通路、EGFR 信号通路和 NF-kB 信号通路和许多生物学通路相关的基因中被鉴定出来,这些基因与癌变密切相关。因此,本研究选择了诊断组甲基化水平高于健康对照组甲基化水平前 4 位基因进行进一步研究:AXIN1、EPS15、CACTIN、E2F1。AXIN1 是一种多结构域的支架蛋白,与多种疾病的发生和发展有关,如细胞增殖、分化、凋亡和癌变等,AXIN1 通过 Wnt 信号通路促使肿瘤进展在胃癌中尚有报

道^[21]。AXIN1 可能通过 Wnt 信号通路促使了食管鳞癌的发生。EPS15 是表皮生长因子受体(EGFR)的一种蛋白酪氨酸激酶底物,参与 EGFR 的内吞和分泌,通过调节细胞内转运的多功能衔接蛋白下调生长因子信号的传导,对一些肿瘤患者的发生等产生影响^[22]。EPS15 在部分肿瘤细胞及组织中表达异常,与肿瘤的形成与发展可能相关^[23]。CACTIN 是剪接体复合物 C 的组分,参与细胞迁移、调控固有免疫应答反应,有助于调节 NF- κ B 靶基因的转录活化,在胃癌细胞中尚有研究^[24,25]。E2F1 为转录因子家族的重要成员,在细胞周期进展、DNA 复制、DNA 修复、细胞分化、增殖与凋亡等细胞过程中起调控作用,E2F1 可促肿瘤发生或促凋亡,是许多人类癌症中突变的主要肿瘤抑制因子^[26]。本研究中 E2F1 可能通过 DNA 的损伤修复调节食管鳞癌进展。

综上所述,全基因组 ctDNA 启动子区的食管鳞癌基因 AXIN1、EPS15、CACTIN 和 E2F1 高甲基化水平可能参与了食管鳞癌的发病机制,可为筛选 ESCC 诊断生物标志物作参考。虽然本研究探讨了食管鳞癌基因 AXIN1、EPS15、CACTIN 和 E2F1 高甲基化在食管鳞癌的诊断中的应用价值,但还需要扩大样本进行大规模实验来进一步验证其作为诊断标志物的具体应用价值,以及更多的细胞试验进一步探索相关通路在食管鳞癌发生发展中扮演的角色。

参考文献:

- [1]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.
- [2]Chen W,Sun K,Zheng R,et al.Cancer incidence and mortality in China, 2014[J].Chin J Cancer Res,2018,301:1-12.
- [3]Wang S,Pan D,Su M,et al.Moderately high folate level may offset the effects of aberrant DNA methylation of P16 and P53 genes in esophageal squamous cell carcinoma and precancerous lesions[J].Genes Nutr,2020,15(1):18.
- [4]Schwarzenbach H,Hoon DS,Pantel K.Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J].Nat Rev Cancer,2011,11(6): 426-437.
- [5]Li X,Zhou F,Jiang C,et al.Identification of a DNA methylation profile of esophageal squamous cell carcinoma and potential plasma epigenetic biomarkers for early diagnosis [J].PLoS One,2014,9(7):e103162.
- [6]Azad TD,Chaudhuri AA,Fang P,et al.Circulating Tumor DNA Analysis for Detection of Minimal Residual Disease After Chemoradiotherapy for Localized Esophageal Cancer [J].Gastroenterology,2020,158(3):494-505.e6.
- [7]Duffy MJ,McDermott EW,Crown J.Blood-based biomarkers in breast cancer: From proteins to circulating tumor cells to circulating tumor DNA [J].Tumour Biol,2018,40 (5): 1010428318776169.
- [8]Ye Q,Ling S,Zheng S,et al.Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J].Mol Cancer,2019,18(1):114.
- [9]Corcoran RB,Chabner BA.Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment [J].N Engl J Med,2018,379(18): 1754-1765.
- [10]van Ginkel JH,Slieker FJB,de Bree R,et al.Cell-free nucleic acids in body fluids as biomarkers for the prediction and early detection of recurrent head and neck cancer: A systematic review of the literature[J].Oral Oncol,2017,75:8-15.
- [11]Rasmussen L,Christensen IJ,Herzog M,et al.Danish Collaborative Group on Early Detection of Colorectal Cancer. Circulating cell-free nucleosomes as biomarkers for early detection of colorectal cancer[J].Oncotarget,2017,9(12):10247-10258.
- [12]Leng S,Zheng J,Jin Y,et al.Plasma cell-free DNA level and its integrity as biomarkers to distinguish non-small cell lung cancer from tuberculosis[J].Clin Chim Acta,2018,477:160-165.
- [13]Mardis ER.Next-generation DNA sequencing methods [J].Annu Rev Genomics Hum Genet,2008,9:387-402.
- [14]Rubenstein DR,Solomon J.Target-enriched enzymatic methyl sequencing: Flexible, scalable and inexpensive hybridization capture for quantifying DNA methylation [J].PLoS One, 2023,18(3):e0282672.
- [15]Li JS,Ying JM,Wang XW,et al.Promoter methylation of tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma[J].Chin J Cancer,2013,32(1):3-11.
- [16]Saif I,Kasmi Y,Allali K,et al.Prediction of DNA methylation in the promoter of gene suppressor tumor [J].Gene,2018,651: 166-173.
- [17]Health Commission of The People's Republic of China N. National guidelines for diagnosis and treatment of esophageal carcinoma 2022 in China (English version) [J].Chin J Cancer Res,2022,34(4):309-334.

(下转第 134 页)

(上接第 95 页)

- [18]Hsu PK,Chen HS,Liu CC,et al.Application of the Eighth AJCC TNM Staging System in Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J].Ann Thorac Surg,2018,105 (5):1516-1522.
- [19]Grehl C,Wagner M,Lemnian I,et al.Performance of Mapping Approaches for Whole-Genome Bisulfite Sequencing Data in Crop Plants[J].Front Plant Sci,2020,11:176.
- [20]Han Y,Zheleznyakova GY,Marincevic -Zuniga Y,et al.Comparison of EM-seq and PBAT methylome library methods for low-input DNA[J].Epigenetics,2022,17(10):1195-1204.
- [21]Peng Y,Xu Y,Zhang X,et al.A novel protein AXIN1-295aa encoded by circAXIN1 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote gastric cancer progression [J].Mol Cancer, 2021,20(1):158.
- [22]Enshoji M,Miyano Y,Yoshida N,et al.Eps15/Pan1p is a master regulator of the late stages of the endocytic pathway[J].J Cell Biol,2022,221(10):e202112138.
- [23]Wang YH,Chang SC,Ansar M,et al.Eps15 Homology Domain-Containing Protein 3 Hypermethylation as a Prognostic and Predictive Marker for Colorectal Cancer [J].Biomedicines, 2021,9(5):453.
- [24]Miao G,Guo L,Montell DJ.Border cell polarity and collective migration require the spliceosome component Cactin [J].J Cell Biol,2022,221(7):e202202146.
- [25]Lou S,Meng F,Yin X,et al.Comprehensive Characterization of RNA Processing Factors in Gastric Cancer Identifies a Prognostic Signature for Predicting Clinical Outcomes and Therapeutic Responses[J].Front Immunol,2021,12:719628.
- [26]Fang Z,Lin M,Li C,et al.A comprehensive review of the roles of E2F1 in colon cancer [J].Am J Cancer Res,2020,10(3): 757-768.

收稿日期:2023-07-23;修回日期:2023-08-17

编辑/成森