



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.023
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.023
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(12):1756-1760.

· 简要论著 ·

外周血 Septin9 基因甲基化检测在结直肠癌筛查中的应用

李士杰¹, 刘艳刚², 王警¹, 曹长琦¹, 闫炎¹, 袁鹏¹, 吴齐¹

(1. 北京大学肿瘤医院 / 北京市肿瘤防治研究所 / 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室 内镜中心, 北京 100142; 2. 山东省临朐县人民医院 内镜诊疗科, 山东 临朐 262600)

摘要

目的: 评价外周血 Septin9 基因甲基化状态在中国结直肠癌筛查中的作用。

方法: 选取 2014 年 9 月—2015 年 3 月于北京大学肿瘤医院内镜中心接受结肠镜检查的 170 例患者, 分析其外周血 Septin9 基因甲基化状态与临床病理资料的关系。

结果: 外周血 Septin9 基因甲基化检测结直肠癌的灵敏度及特异度分别为 72.5% (95% CI: 62.2%~81.4%) 及 91.1% (95% CI: 82.6%~96.4%)。其阳性率与患者年龄、性别及病变部位无关 ($P>0.05$)。低分化癌患者 Septin9 基因甲基化阳性率高于高分化者 ($P=0.028$), 进展期患者的 Septin9 基因甲基化阳性率高于早期患者 ($P=0.002$)。无论早期或进展期结直肠癌, 外周血 Septin9 基因甲基化检测的灵敏度均高于癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 及糖链抗原 199 (carbohydrate antigen 199, CA199) ($P<0.05$)。Septin9 基因甲基化在结肠腺瘤中的阳性率较低 (4.3%)。

结论: 外周血 Septin9 基因甲基化检测 CRC 具有较高的灵敏度及特异度, 患者依从性好, 有可能提高 CRC 的早期诊断率。

关键词

结直肠肿瘤; Septin9 基因; 甲基化

中图分类号: R735.3

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是我国常见的恶性肿瘤, 发病率占恶性肿瘤第 5 位, 患者 5 年生存率约为 47.2%^[1]。CRC 预后与早期诊断密切相关, 大多数早期 CRC 可以治愈, 5 年生存率可达 90%, 而晚期则不足 10%^[2]。内镜是早期诊断的主要手段, 然而在中国, 人群对于结肠镜检查的依从性较低, 如何筛选出高危人群进行结肠镜检查是提高 CRC 早期诊断率的重点。Lofton-Day 等^[3]发现 CRC 患者外周血 Septin9 基因甲基化有较高的检出率, Tanzer 等^[4]发现在 CRC 前病变患者外周血中亦可检出 Septin9 基因甲基化发生, 但其发生率低于正常对照人群。本研究分析国人外周血 Septin9 基因甲基化检测在 CRC 筛查中的作用, 现报告结果如下。

1 资料与方法

1.1 患者一般特征

选取 2014 年 9 月—2015 年 3 月于北京大学肿瘤医院内镜中心接受结肠镜检查的患者 170 例。其中男 99 例, 女 71 例; 平均年龄 (56.4 ± 12.9) 岁。共有 123 例患者同时进行了 Septin9 基因甲基化、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 及糖链抗原 199 (carbohydrate antigen 199, CA199) 检测。

1.2 方法

1.2.1 研究设计 本研究通过单盲法临床验证 Septin9 基因甲基化在 CRC 筛查中的作用。本研究通过北京大学肿瘤医院伦理委员批准。

1.2.2 入选及排除标准 入选标准: (1) 接受结肠镜检查的患者。(2) 年龄 >18 岁。排除标准: (1) 既往恶性肿瘤病史。(2) 曾接受放射治疗或化疗。(3) 既往腹部外科手术史。(4) 妇女处于妊娠期。(5) 未能完成全结肠镜检查者。

1.2.3 血样采集与制备 EDTA 抗凝真空采血管收集外周静脉血 10 mL, 于无刹车功能离心机内

收稿日期: 2015-09-29; 修订日期: 2015-11-12。

作者简介: 李士杰, 北京大学肿瘤医院 / 北京市肿瘤防治研究所 / 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室主治医师, 主要从事消化道肿瘤内镜诊断及微创治疗方面的研究。

通信作者: 吴齐, Email: wuqi1973@163.com

($1\ 350 \pm 150$) r/min 离心 12 min, 吸取 3.5 mL 血浆冻存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱, 4 周内完成检测。单盲检测由博尔诚(北京)科技有限公司检测完成。Septin9 基因甲基化检测: 检测过程按照大肠癌甲基化基因检测试剂盒(PCR 荧光探针法)说明书, 由博尔诚(北京)科技有限公司单盲检测并提供结果。血 CEA、CA199 检测: 采用电化学发光法检测血清肿瘤标志物, 结果由北京大学肿瘤医院检验科提供。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 组间均数比较采用 t 检验, 组间率的比较采用 χ^2 检验, 总样本不同诊断方法符合率的比较采用 ROC 曲线分析法, 肿瘤检测灵敏度的比较采用 McNemar χ^2 检验。采用 SAS 9.3 软件基于精确的二项式分布计算检测灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值的 95% 置信区间。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 Septin9 基因甲基化在 170 例患者中的检测情况。

共 170 例患者接受结肠镜检查, 确诊 CRC 患者 91 例 (CRC 组), 其中男 58 例, 女 33 例, 平均年龄 (60.1 ± 13.0) 岁; 非 CRC 患者 79 例, 其中男 41 例, 女 38 例, 平均年龄 (52.1 ± 11.3) 岁。CRC 组患者平均年龄大于非 CRC 患者, 差异具有统计学意义 ($P = 0.000$), 而两组间性别比例差异无统计学意义 ($P = 0.119$)。

CRC 组 Septin9 基因甲基化阳性率为 72.5% ($66/91$)。非结肠癌病例包括 23 例结直肠腺瘤患者 (adenoma, ADE 组)、47 例结肠镜未见异常者 (normal, NOR 组) 及 9 例胃癌 (gastric cancer, GC 组) 患者, 各组 Septin9 基因甲基化阳性率为 4.3% ($1/23$)、8.5% ($4/47$) 及 22.2% ($2/9$)。其中 ADE 组包括 10 例高风险腺瘤 (1 次结肠镜检查发现 3 个及以上腺瘤, 或其中 1 个腺瘤直径 $> 10\ \text{mm}$, 或有 1/3 绒毛结构以上, 或高级别上皮内瘤变) 及 13 例低风险腺瘤, Septin9 基因甲基化阳性者位于低风险腺瘤组。Septin9 基因甲基化检测 CRC 灵敏度及特异度分别为 72.5% (95% CI: 62.2%~81.4%) 及 91.1% (95% CI: 82.6%~96.4%); 阳性预测值及阴性预测值分别为 90.4% (95% CI: 81.2%~96.1%) 及 74.2%

(95% CI: 64.3%~82.6%)。

在 CRC 组中, 不同性别 ($P = 0.313$) 及年龄 ($P = 0.735$) 患者 Septin9 基因甲基化阳性率的差异不具有统计学意义。各部位 Septin9 基因甲基化阳性率分别为: 盲肠 33.3% ($1/3$)、升结肠 87.5% ($7/8$)、横结肠 33.3% ($1/3$)、降结肠 100% ($3/3$)、乙状结肠 76.0% ($19/25$)、直肠 71.4% ($35/49$)。病变位于结肠癌及直肠癌的 Septin9 基因甲基化阳性率分别为 73.8% ($31/42$) 及 71.4% ($35/49$), 差异不具有统计学意义 ($P = 0.800$)。右半结肠癌 (脾曲近端的结肠) 的 Septin9 基因甲基化阳性率为 78.6% ($22/28$), 高于左半结肠癌 (脾曲远端的结肠) 的 64.3% ($9/14$), 差异不具有统计学意义 ($P = 0.535$)。不同分化程度 CRC 的 Septin9 基因甲基化阳性率依次为: 高分化癌 45.5% ($5/11$)、中分化癌 72.6% ($45/62$)、低分化癌 88.9% ($16/18$), 低分化癌患者 Septin9 基因甲基化阳性率高于高分化者 ($P = 0.028$), 但与中分化者的差异不具有统计学意义 ($P = 0.264$) (表 1)。

表 1 91 例结直肠癌患者 Septin9 基因甲基化检测情况 (n)

项目	Septin9 阳性 ($n=66$)	Septin9 阴性 ($n=25$)	χ^2	P
性别				
男	40	18	1.018	0.313
女	26	7		
年龄 (岁)				
≤ 60	29	10	0.115	0.735
> 60	37	15		
病变位置			0.064	0.800 ¹⁾
盲肠	1	2	0.385	0.535 ²⁾
升结肠	7	1		
横结肠	1	2		
降结肠	3	0		
乙状结肠	19	6		
直肠	35	14		
分化程度				
高分化	5	6	1.247	0.264 ⁴⁾
中分化	45	17		
低分化	16	2		

注: 1) 结肠癌与直肠癌病例 Septin9 基因甲基化阳性率比较; 2) 右半结肠癌与左半结肠癌病例 Septin9 基因甲基化阳性率比较; 3) 低分化癌与高分化癌病例 Septin9 基因甲基化阳性率比较, 采用 Fisher's 确切概率法检验; 4) 低分化癌与中分化癌病例 Septin9 基因甲基化阳性率比较

根据美国癌症联合委员会 (AJCC) / 国际抗癌联盟 (UICC) CRC 的 TNM 分期 (第 7 版)^[5], CRC 组共有 75 例患者通过手术或肝脏穿刺 (肝转移患

者)获得病理分期,其中0期6例,I期5例,II期29例,III期17例,IV期18例。其余16例CRC患者中无法获得本院病理分期,其中4例患者接受术前化疗后拒绝进一步手术治疗,12例患者于外院接受进一步治疗。各期患者Septin9基因甲基化阳性率依次为:0期16.7%(1/6),I期40%(2/5),II期65.5%(19/29),III期88.2%(15/17),IV期88.9%(16/18)。进展期CRC(II期、III期及IV期)的Septin9基因甲基化阳性率为78.1%,高于早期CRC(0期及I期)的27.3%,差异具有统计学意义($P=0.002$)。

非CRC组包含了9例结肠镜检查未见异常的胃癌患者,其中4例为早期胃癌,5例为进展期胃癌,进展期胃癌患者中2例为Septin9基因甲基化

阳性者。本组胃癌患者Septin9基因甲基化阳性率(22.2%)低于CRC患者(72.5%),差异有统计学意义($P=0.004$)。

2.2 外周血 Septin9 基因甲基化及 CEA、CA199 在 123 例患者中的检测情况

共有123例患者同时进行了Septin9基因甲基化、CEA及CA199检测,包括CRC组83例(0期6例、I期5例、II期29例、III期17例、IV期18例、分期不明8例)、ADE组10例、NOR组21例、GC组9例。Septin9基因甲基化检测CRC的灵敏度及特异度为71.1%(95% CI: 60.1%~80.5%)及87.5%(95% CI: 73.2%~95.8%),优于CEA及CA199(表2)(图1)。

表2 123例患者 Septin9 基因甲基化、CEA 及 CA199 的检测情况

项目	a ¹⁾	b ²⁾	c ³⁾	d ⁴⁾	灵敏度 ⁵⁾ (95% CI)	特异度 ⁵⁾ (95% CI)	曲线下面积 (95% CI)	P
Septin9	59	5	24	35	71.1 (60.1~80.5)	87.5 (73.2~95.8)	0.793 (0.709~0.877)	0.000
CEA	35	10	48	30	42.2 (31.4~53.5)	75.0 (58.8~87.3)	0.586 (0.480~0.691)	0.124
CA199	17	4	66	36	20.5 (12.4~30.8)	90.0 (76.3~97.2)	0.552 (0.446~0.685)	0.348

注: 1) 真阳性; 2) 假阳性; 3) 假阴性; 4) 真阴性; 5) 灵敏度 = $a/(a+c)$; 特异度 = $d/(b+d)$

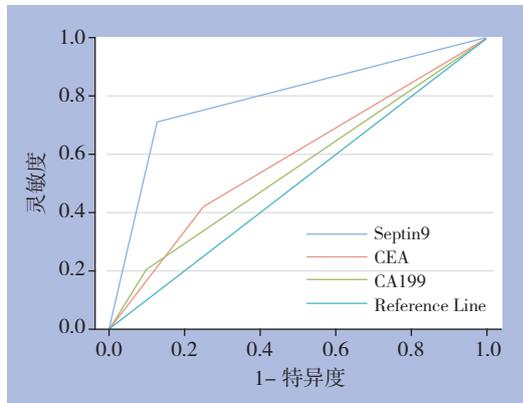


图1 123例患者外周血 Septin9 基因甲基化及血清 CEA、CA199 的检测情况 (Septin9 基因甲基化检测 CRC 的灵敏度及特异度优于 CEA 及 CA199)

在40例早期阶段(0期、I期及II期)CRC中,Septin9基因甲基化检测灵敏度为55.0%(22/40),高于CEA(22.5%)及CA199(2.5%),差异具有统计学意义($P=0.007$ 及 $P=0.000$)。在35例晚期阶段(III期及IV期)CRC中,Septin9基因甲基化检测灵敏度为88.6%(31/35),高于CEA(62.9%)及CA199(42.9%),差异具有统计学意义($P=0.035$ 及 $P=0.000$)。

3 讨论

结肠镜检查是实现CRC早期诊断的主要手段,作为侵入性检查,在中国通常情况下患者接受度较差,在临床工作中无法作为首选筛查方式。粪便潜血检测有助于筛选出高危人群进行结肠镜检查,但容易因干扰而出现假阳性或假阴性,且样本需要反复送检,导致该检测本身患者依从性也不高^[6]。Septin9基因位于常染色体17q25.3,作为高度保守的GTP结合蛋白广泛存在于人类细胞,研究显示Septin9基因甲基化在CRC及部分癌前病变患者外周血中有较高的检出率^[3-4,7],由于仅需要抽取外周静脉血,故其患者依从性较高。

来自欧洲及美国的多项研究^[3-4,8-10]显示,Septin9基因甲基化检测CRC的灵敏度为67%~95.6%,特异度为86%~99%。在本研究中,Septin9基因甲基化检测CRC灵敏度及特异度分别为72.5%及91.1%,与上述结果类似。但Lee等^[11]针对韩国人群样本的研究却显示出较低的灵敏度(36.6%),造成这一差异的原因究竟是不同试剂盒造成的还是种族差异引起,目前尚不得而知。

Septin9基因甲基化可出现在各期CRC中,

阳性率不受患者性别、年龄、病变部位的影响,并随分期增高而呈升高趋势。其在I期、II期、III期及IV期CRC的阳性率依次为30%~84%、56%~100%、45%~100%及68%~100%^[3,8-10]。本组I~IV期CRC患者Septin9基因甲基化阳性率分别为40.0%、65.5%、88.2%及88.9%,与上述结果近似,其阳性率与患者性别、年龄、发生部位无关。本研究中进展期(II~IV期)与早期(0~I期)CRC病例Septin9基因甲基化阳性率的差异具有统计学意义(78.1%vs.27.3%, $P=0.002$)。在Lee等^[11]的研究中,IV期CRC患者Septin9基因甲基化阳性率高于I~III期,与本研究结果有类似之处。而在Tóth等^[8]及Warren等^[9]的研究中,不同病理分期CRC间Septin9基因甲基化阳性率的差异无统计学意义。此外, Lee等^[11]的研究中Septin9基因甲基化阳性率与肿瘤分化程度无关,而本组其在低分化结直肠癌中阳性率明显高于高分化者。尽管如此,笔者依然认为Septin9基因甲基化有可能成为CRC诊断特别是早期发现CRC的可靠检测指标。

尽管Septin9基因甲基化在CRC中具有很高检出率,但其在结肠腺瘤中的检出率却较低。Warren等^[9]及Church等^[10]报道其在腺瘤中的检出率为11.2%及12%,与正常对照组无显著性差异。本组中,Septin9基因甲基化在ADE组的阳性率更低,仅为4.3%,低于正常对照组(8.5%)。腺瘤作为CRC最常见的癌前病变,单独采用Septin9基因甲基化对其进行检测诊断意义有限。

CEA及CA199作为常用的肿瘤标志物,围手术期CEA的变化是判断患者预后的重要指标^[8,12]。虽然目前被广泛的用于CRC筛查之中,但其对CRC的诊断价值有限,在Lee等^[11]研究中CEA的阳性率仅为20.8%。根据Tóth等^[8]报道,Septin9基因甲基化检测CRC的灵敏度及特异度分别为79.3%及98.9%,优于CEA(51.8%及81.2%)。本研究亦显示,Septin9基因甲基化检测CRC的灵敏度(71.1%)及特异度(71.1%)均优于CEA及CA199。CEA常作为晚期结直肠癌的诊断指标^[13],而在本研究中,无论在CRC早期阶段或是晚期阶段,Septin9基因甲基化检测的灵敏度均高于CEA及CA199。均提示,相比于CEA及CA199而言,Septin9基因甲基化检测CRC的诊断价值更高。

尽管Septin9基因甲基化可见于多种肿瘤,但其在CRC中的检出率远高于其他肿瘤(11.5%)

及正常人(13.0%)^[14-15]。本研究结果与之类似,正常对照人群(8.5%)及胃癌患者(22.2%)的Septin9基因甲基化阳性率低于CRC患者。

作为一种无创诊断方法,外周血Septin9基因甲基化检测CRC具有较高的灵敏度及特异度,患者依从性好,有可能筛选出高危人群进一步接受结肠镜检查,从而提高CRC的早期诊断率。

参考文献

- [1] Zeng H, Zheng R, Guo Y, et al. Cancer survival in China, 2003-2005: a population-based study[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(8):1921-1930.
- [2] 中华医学会消化内镜学分会消化系早癌内镜诊断与治疗协,中华医学会消化病学分会消化道肿瘤协作组,中华医学会消化内镜学分会肠道学组,等.中国早期结直肠癌及癌前病变筛查与诊治共识意见(2014年11月·重庆)[J]. *中华内科杂志*, 2015, 54(4):375-389.
- [3] Lofton-Day C, Model F, Devos T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(2):414-423.
- [4] Tanzer M, Balluff B, Distler J, et al. Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9061. doi: 10.1371/journal.pone.0009061.
- [5] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*[M]. 7th ed. New York: Springer-Verlag, 2010:117-164.
- [6] He J, Efron JE. Screening for colorectal cancer[J]. *Adv Surg*, 2011, 45:31-44.
- [7] Coppède F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation[J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(2):238-247.
- [8] Tóth K, Sipos F, Kalmár A, et al. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e46000. doi: 10.1371/journal.pone.0046000.
- [9] Warren JD, Xiong W, Bunker AM, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer[J]. *BMC Med*, 2011, 9:133. doi: 10.1186/1741-7015-9-133.
- [10] Church TR, 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.
- [11] Lee HS, Hwang SM, Kim TS, et al. Circulating methylated septin 9 nucleic Acid in the plasma of patients with gastrointestinal cancer in the stomach and colon[J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(3):290-296.
- [12] Park YA, Lee KY, Kim NK, et al. Prognostic effect of perioperative change of serum carcinoembryonic antigen level: a useful tool for detection of systemic recurrence in



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.024
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.024
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(12):1760-1763.

· 简要论著 ·

李金斯坦腹股沟疝无张力修补术最佳网片面积的初步研究

陈佳慧¹, 肖江卫^{2,3}, 任明扬¹, 薛松林^{2,3}, 蒲敏¹, 邓思寒¹, 黄斌¹, 王崇树^{2,3}, 王鹏礼¹

(1. 四川省南充市中心医院/川北医学院第二临床学院 普外二科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属医院 普外一科, 四川南充 637000; 3. 川北医学院肝胆胰肠研究所 四川南充 637000)

摘要

目的: 了解成人腹股沟区的面积, 并以此推算在不影响疗效的前提下用材最少的腹股沟疝修补网片。
方法: 在彩超引导下测量 65 例腹股沟疝患者腹股沟区的三条边长, 运用海伦公式计算腹股沟区面积, 再据此推算在不影响疗效的前提下用材最少的最佳网片面积。
结果: 患者患侧腹股沟区平均面积为 $(23.65 \pm 4.85) \text{ cm}^2$ (95% CI=22.57~24.74)。最佳网片面积为 $(39.42 \pm 8.08) \text{ cm}^2$ (95% CI=37.61~41.23), 明显小于李金斯坦协会推荐的网片面积 ($7 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$) ($t=-72.16, P=0.000, 95\% \text{ CI}=-67.39 \sim -63.77$)。
结论: 42 cm^2 与腹股沟区形状相似的类三角形网片即可满足绝大多数患者的需求, 有效节省网片资源。

关键词

疝; 腹股沟; 疝修补术; 成年人
中图分类号: R656.21

腹股沟疝修补术是普外科最常见的手术之一。腹股沟疝无张力修补术已逐渐替代传统的张力手术, 其中李金斯坦网片疝修补术因其操作简单、疗效可靠、并发症少、复发率低等优势得到了广泛认可和采用, 并被评成人腹股沟疝修补术的金标准^[1-10]。对于腹股沟疝修补网片的大小和形状, 目前无统一标准, 不同厂家推出不同规格

的网片。李金斯坦协会推荐使用 $7 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ 网片, 术中外科医生可根据需要从网片侧边剪掉 $3 \sim 4 \text{ cm}$ ^[2]。这样虽便于操作, 但会造成不必要的网片资源浪费和医疗费用的增加。对于经济欠发达、医疗资源相对缺乏的地区, 医院购入不同规格的网片或面积较大的昂贵网片不太现实, 而使用面积较小的网片可能会因不能覆盖整个腹股沟区而增加复发率。Phillips等^[11]的多中心研究结果显示, 网片过小是腹股沟疝术后复发最主要的原因。因此, 既能节约资源又能满足绝大多数患者的网片显得尤为重要。本研究在彩超引导下测量成人腹股沟疝患者的腹股沟区面积, 并以此推算

收稿日期: 2014-12-19; 修订日期: 2015-08-21。

作者简介: 陈佳慧, 四川省南充市中心医院/川北医学院第二临床学院住院医师, 主要从事普外胃肠疾病的基础与临床方面的研究。

通信作者: 王崇树, Email: chongs-wang@163.com

rectal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2006, 13(5):645-650.

[13] Locker G Y, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(33):5313-5327.

[14] Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay[J]. PLoS One, 2008, 3(11):e3759. doi: 10.1371/journal.pone.0003759.

[15] Paska AV, Hudler P. Aberrant methylation patterns in cancer: a

clinical view[J]. Biochem Med(Zagreb), 2015, 25(2):161-176.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 李士杰, 刘艳刚, 王警, 等. 外周血Septin9基因甲基化检测在结肠癌筛查中的应用[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(12):1756-1760. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.023

Cite this article as: LI SJ, LIU YG, WANG J, et al. Application of determination of methylation gene Septin9 in peripheral blood in the screening of colorectal carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(12):1756-1760. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.023