



癌症液体活检新思路：数字PCR检测 DNA甲基化*

曹雷^{1,2)} 郭利娟^{1,2)} 郭晓锦^{2,3)} 巩燕⁴⁾ 李菲^{1,2)**}

¹⁾ 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物信息工程教育部重点实验室, 西安 710049;

²⁾ 西安交通大学仿生工程与生物力学中心, 西安 710049;

³⁾ 西安交通大学理学院化学系, 西安 710049; ⁴⁾ 苏州缔因安生物科技有限公司, 苏州 215000)

摘要 癌症的早期诊断可提高患者生存率. 微创采集人体体液的液体活检方法可避免传统肿瘤组织活检方法侵入性和异质性的问题, 逐渐成为癌症诊断的新方式. 另外, DNA甲基化作为预测癌症发生发展的标志物, 引起了越来越多研究者的关注. 但传统DNA甲基化的检测方法灵敏度不高, 且容易出现假阳性. 近年来, 数字PCR技术因其超高的检测灵敏度和精确度、无需标准曲线即可进行核酸绝对定量检测的优势, 被用于DNA甲基化的定量检测中. 本文首先介绍了DNA甲基化与癌症发生发展的关系, 总结了传统DNA甲基化检测方法及其在癌症临床诊断中的应用, 阐述了基于不同核酸样本分散方法的数字PCR技术及其在微量DNA甲基化检测中的优势, 总结了采用数字PCR技术检测癌症患者体液中DNA甲基化的具体步骤, 列举了数字PCR技术在癌症DNA甲基化检测中的研究成果及应用进展, 最后提出了数字PCR技术检测癌症DNA甲基化未来可能面临的挑战, 并对数字PCR技术在癌症液体活检方面的应用前景进行了展望.

关键词 DNA甲基化, 数字PCR, 液体活检, 癌症早期诊断

中图分类号 Q523, Q786

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0190

癌症是威胁人类健康的主要杀手之一. 肿瘤组织活检是目前癌症临床诊断的金标准, 但组织样本获取存在侵入性、样本污染、异质性问题, 阻碍了肿瘤组织活检在癌症诊断中的应用. 因此, 需要一种既能检测出微量癌症风险标志物, 又能应对肿瘤异质性的微创技术. 液体活检是一种非侵入式的微创体液检测技术, 通过采集外周血或收集外分泌液、唾液、尿液等方式监测原位肿瘤或转移灶释放到体液中的循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 及外泌体DNA (exosome DNA), 可避免肿瘤组织活检中可能发生的感染, 同时能够减轻患者疼痛和消除手术并发症带来的风险, 并可根据体液检测结果重复连续地监测肿瘤标志物的变化, 综合评判患者的整体状况. 得益于此, 液体活检作为一种针对癌症早期诊断、辅助预后及疗效监测的突破性医学检验技术, 逐渐成为癌症早期诊断的新方式^[1-2].

液体活检在早期确定癌症风险需要依赖相关的疾病标志物, 包括疾病蛋白质标志物和DNA表观遗传标志物等. DNA甲基化是一种基因的表观遗传学修饰方式, 是在DNA的胞嘧啶5'端碳原子上加入一个甲基集团, 使之成为5'甲基胞嘧啶的反应. 研究发现, 不同阶段的癌症患者和健康个体相比, DNA甲基化模式和甲基化水平均存在显著差异. 并且在癌症发生早期, 体液中的DNA甲基化水平会出现微量变化^[3-5]. 因此, 准确且定量地检测DNA甲基化标志物对于癌症的早期诊断和长时间监测具有十分重要的意义, 吸引了越来越多研究者的关

* 国家自然科学基金(21775117, 11120101002), 中国博士后科学基金(2016M592773), 高层次留学回国人员资助项目([2018]642)和中央高校基本科研业务费(xjh012019044)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 029-82667486, E-mail: feili@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-08-15, 接受日期: 2019-10-08

注. Web of Science 数据库的统计数据显示 (图 1), 近 20 年有关 DNA 甲基化和癌症的文献发表数量逐

年递增, 2018 年全年的相关文献发表数量超过 3 000 篇.

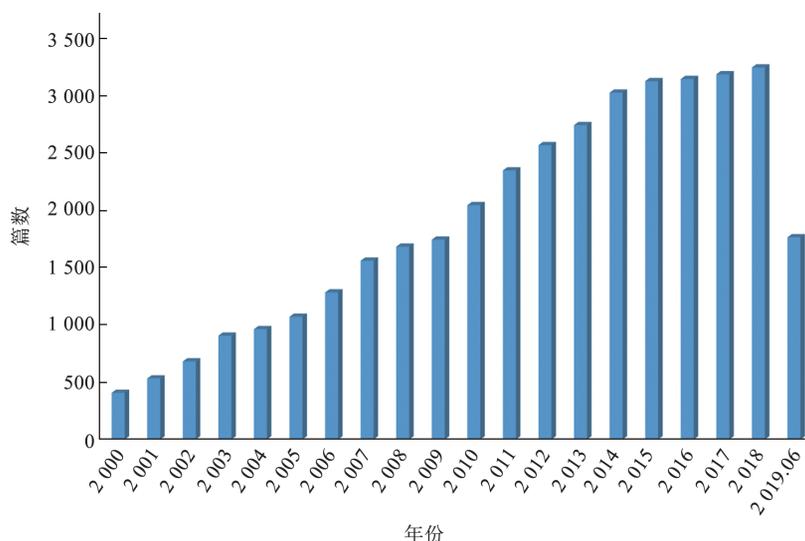


Fig. 1 A statistical chart of the publication number related to “DNA methylation” and “cancer”

图 1 “DNA 甲基化”和“癌症”主题相关文献发表数量统计图

搜索关键词: “DNA methylation” & “cancer”; 时间范围: 1999 年~2019 年 6 月

目前已有不少方法被用于 DNA 甲基化的检测中. 传统 DNA 甲基化的检测方法基于重亚硫酸盐转化进行 DNA 的预处理, 采用甲基化敏感的限制性核酸内切酶和 PCR 技术进行检测. 此外, 甲基化特异性聚合酶链式反应 (methylation specific PCR, MSP) 和甲基化荧光定量法 (MethyLight) 也是检测 DNA 甲基化较为常用的方法. 但这些传统方法都存在一些局限性, 如基于普通 PCR 及电泳分析技术的 MSP 主要用于定性检测, 基于实时荧光定量 PCR 技术的 MethyLight 方法虽可实现定量, 但需要荧光标准曲线做参考, 检测精确度较低、重复性较差. 另外, 体液中超低浓度的 DNA 片段 (健康个体血浆中 DNA 浓度大约为 0~25 $\mu\text{g/L}$, 恶性肿瘤患者浓度大约为 349~475 $\mu\text{g/L}$ [6-7]) 给 DNA 甲基化的检测带来了技术挑战. 近些年, 具有超高检测灵敏度和准确度的数字 PCR (digital PCR, dPCR) 技术由于超强的鲁棒性和无需标准曲线即可对目标核酸进行绝对定量检测的优点, 在 DNA 甲基化检测中展示出巨大潜力. 例如, 一种结合了油包水液滴结构和磁珠的数字 PCR 技术 (也称为 BEAMing (beads, emulsion, amplication and magnetics)) 被成功用于结直肠癌患者血浆中 DNA

甲基化标志物的检测. 该研究实现了在 5 000 个非甲基化 DNA 片段中单个 DNA 甲基化的检测, 相比于焦磷酸盐测序法和 MSP 法具有更高的灵敏度和特异性. 之后发展出的基于荧光定量法的液滴式数字 PCR 技术 (droplet digital PCR, ddPCR) 也被用于 DNA 甲基化的检测中. 如研究人员用 ddPCR 检测出结直肠癌患者体内 *EVL* 和 *NTRK3* 基因的最低甲基化浓度分别为 19 拷贝/ μl 和 38 拷贝/ μl . 相比实时荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 方法, ddPCR 方法对 DNA 甲基化的检测灵敏度提高了约 10 倍 [8-9]. 数字 PCR 的以上优点证明采用数字 PCR 技术分析患者体液中的 DNA 甲基化水平对于拓展液体活检的临床应用具有一定潜力.

综上, 由于液体活检的非侵入性及数字 PCR 技术的高灵敏度和特异性, 结合数字 PCR 和液体活检的 DNA 甲基化检测技术成为最具前景的癌症早期诊断和监测手段. 以往有关 DNA 甲基化的综述主要介绍 DNA 甲基化对疾病调控作用的机制机理及 DNA 甲基化的不同检测方法 [10-11], 还未见基于现阶段最新数字 PCR 技术和液体活检技术进行 DNA 甲基化检测的综述文章. 基于此, 本文关注基于数字 PCR 技术的 DNA 甲基化检测及其在癌症液

体活检中的应用进展, 首先介绍DNA甲基化与癌症发生发展的关系, 并总结传统DNA甲基化的检测方法及其在癌症临床诊断中的应用. 其次, 阐述基于不同核酸样本分散方法的数字PCR技术及其在微量DNA甲基化检测中的优势, 总结采用数字PCR技术检测癌症患者体液中DNA甲基化的具体步骤. 最后, 综述数字PCR技术在癌症DNA甲基化检测中的研究成果及应用进展, 提出数字PCR技术检测癌症DNA甲基化未来可能面临的挑战, 并对其应用前景进行了展望. 希望本文有助于相关研究人员和临床医生进行癌症相关DNA甲基化标志物的检测时, 能对患者的不同体液样本进行合理选择, 并将基于数字PCR技术的DNA甲基化标志物检测方法深入应用到癌症的临床诊断及预后监测中.

1 DNA甲基化与癌症

1.1 DNA甲基化与癌症的发生

传统理论认为癌症的发生是由致癌基因、抑癌基因及染色体突变引起的^[12-14]. 近期研究发现基因

表观遗传学的变化在癌症发生中发挥着重要作用. 例如, 基因损伤之后的修复过程会触发其表观遗传学的改变, 进而影响基因表达, 最终引起癌变^[15]. 相关研究表明作为一种表观遗传学基因修饰方式, DNA甲基化异常和癌症的发生发展密不可分^[4-5]. 癌症基因甲基化有全基因组范围内低甲基化和启动子区域CpG岛高甲基化两种模式, 并且均与癌症发生相关^[16-17]. 低甲基化通常发生在重复的DNA序列(如长散布的核元件), 即人类基因组中的移动基因或DNA序列转座子(图2). 这些移动基因的去甲基化导致原癌基因激活, 影响相邻基因表达的同时会增加染色体的不稳定性, 进而导致癌症的发生^[16]. 高甲基化发生在基因启动子区域的CpG岛, 包括细胞周期调节相关基因(如*p16INK4a*、*p15INK4a*、*Rb*、*p14ARF*)、DNA修复相关基因(如*BRCA1*、*MGMT*)、细胞凋亡相关基因(如*DAPK*、*TMS1*)和耐药性、解毒、分化、血管生成及转移相关的基因等^[17]. 这些基因的高甲基化导致基因修复缺陷、重新进入细胞周期、凋亡丧失、细胞黏附功能丧失以及血管生成, 进而引

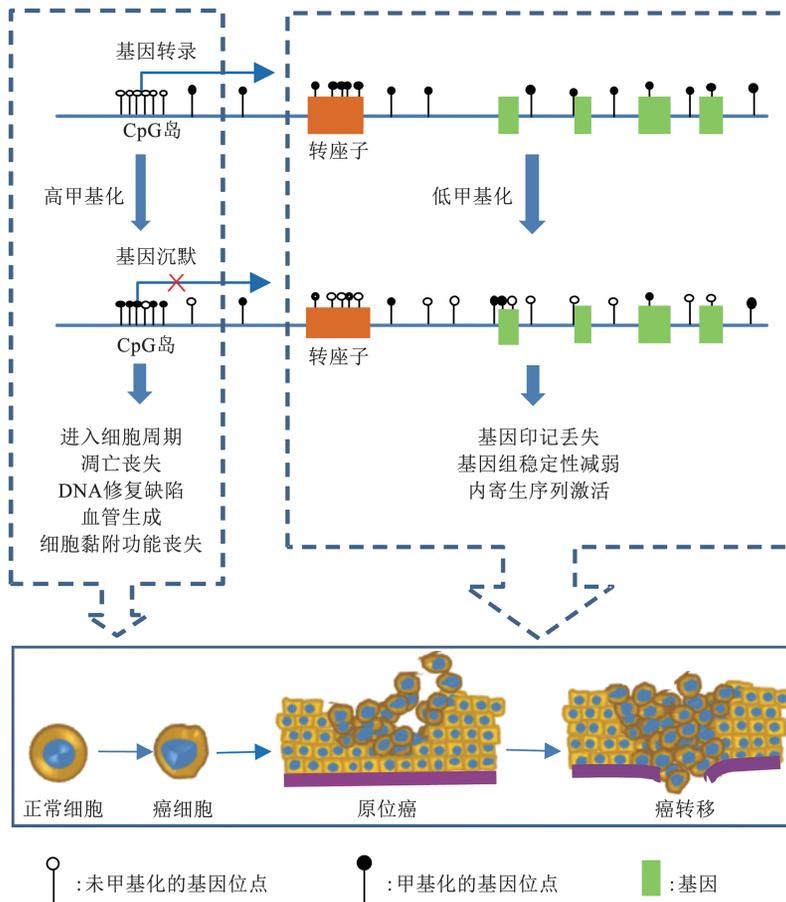


Fig. 2 The relationship between DNA methylation and cancer

图2 DNA甲基化与癌症发生的关系

发癌变。

1.2 DNA甲基化标志物的癌症临床应用现状

目前, 关于癌症DNA甲基化标志物的研究主要包括癌症的早期诊断、预后及疗效评估(表1)。由于肿瘤抑制基因CpG岛高甲基化对于特定癌症具有特异性, 因此肿瘤高甲基化基因可作为标记物从生物样本中鉴别癌细胞。其中, DNA甲基化标志物已实现在多种体液中的癌症检测, 如血清、血浆、粪便、尿液及乳头吸出物等。Chen等^[18]在结直肠癌患者的粪便样本中检测到波形蛋白基因的异常甲基化, 检测灵敏度为46%, 特异性为90%, 表明波形蛋白基因异常甲基化可作为新型分子标志物, 对结肠癌的发生进行早期诊断。Wong等^[19]在肝细胞癌患者体液中研究了肿瘤相关p16基因的甲基化状态, 他们提取肝细胞癌患者外周血的血清及血浆进行了DNA甲基化特异性的PCR分析, 结果发现22例肝细胞癌患者中有16例出现p16基因异常甲基化, 检测灵敏度为73%。其次, 异常的启动子甲基化也可提供癌症预后相关信息。在早期肺癌切除组织中, 促凋亡基因DAPK的甲基化与无疾病进展生存期和总体生存期显著相关, 1.69的死亡风险比率预示着较高的死亡风险^[20]。同样, 在乳腺癌和前列腺癌组织研究中发现, 甲基化

标志基因的数量与病人生存率及复发风险之间存在类似关系。多种DNA甲基化标记物的组合可提供更大预后潜力。例如, Brock等^[21]研究了包括p16INK4A、CDH13、APC和RASSF1A在内的四基因标记组与早期肺癌切除后复发风险的相关性, 发现复发风险比率比为15.5。此外, 关于基因甲基化状态的研究还可用于预测药物的疗效。由于癌症中参与DNA损伤修复的基因通常是未高甲基化的, 故对这些基因位点的研究有助于实现个性化用药、改善病人预后。如MGMT是一种DNA损伤修复酶, 可保护DNA不受烷化剂损伤, 对烷化剂类肿瘤治疗药物具有耐药性。Esteller等^[22]研究了胶质瘤中O₆-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)基因启动子的甲基化与烷化剂治疗之间的相关性, 他们的研究显示MGMT甲基化状态可预测胶质瘤患者对烷化剂类药物的治疗效果。更多有关卵巢癌、胃癌、结直肠癌等的研究证实了特异性DNA甲基化与药物疗效相关性, 显示出DNA甲基化状态在肿瘤化疗及预后中的重要意义。另外, 基因甲基化检测在癌症管理中的应用避免了因药物毒性引发的正常组织死亡, 达到了改善治疗方案和节省治疗成本的目的。

Table 1 Clinical applications of detection of DNA methylation in cancer

表1 DNA甲基化检测的相关癌症临床应用研究

癌症类型	标记基因	组织类型	灵敏度	特异性	参考文献	
癌症早期诊断	结直肠癌	<i>vim exon1</i>	粪便	46%	90%	[18]
	前列腺癌	<i>GSTP1, RASSF1a, RARβ2, APC</i>	尿液	86%	89%	[23]
	胃癌	<i>CA125, TP53, SEPT9</i>	胃清洗液	90%	96%	[24]
	肝癌	<i>p16</i>	血液	73%	81%	[19]
癌症类型	标记基因	相关预后风险		参考文献		
癌症预后	肺癌	<i>DAPK</i>	死亡风险比率 (M vs U) 1.69		[20]	
	肺癌	<i>p16^{INK4A}, CDH13, APC, RASSF1A</i>	死亡风险比率 (M vs U) 15.5		[21]	
	乳腺癌	<i>PITX2</i>	复发风险比率 (M vs U) 2.35		[25]	
	前列腺癌	<i>ASC, CDH13</i>	复发风险比率 (M vs U) 5.64		[26]	
癌症类型	标记基因	治疗方法	疗效	参考文献		
疗效评估	胶质瘤	<i>MGMT</i>	卡莫司汀	63%的MGMT甲基化患者对卡莫司汀治疗有反应, 未甲基化患者只有3.6%	[22]	
	卵巢癌	<i>FANCF</i>	顺铂	卵巢癌细胞对顺铂治疗具有高敏感性, FANCF基因去甲基化后顺铂治疗表现抗性	[27]	
	胃癌	<i>CHFR</i>	紫杉烷	CHFR甲基化程度与紫杉烷治疗效果正相关	[28]	
	上皮性卵巢癌	<i>BRCA1</i>	铂类药物	20个化疗敏感病人中有12个BRCA1基因启动子区域甲基化	[29]	

作为强有力的生物学标志物, DNA异常甲基化的监测在癌症患者的疾病管理中逐渐显示出其重要性, 为癌症的诊断、预后和治疗开辟了新途径. 有关DNA异常甲基化的临床研究大量涌现, 但同时存在一些问题, 限制了其在临床上的进一步广泛应用. 首先, 许多甲基化候选基因频率低, 难以达到临床试验所需的灵敏度; 其次, 传统侵入性的组织切片作为甲基化的分析来源, 增加了患者痛苦. 为实现DNA甲基化检测在癌症临床上的广泛应用, 需要大量临床实验数据来明确DNA甲基化在癌症管理中的生物学作用, 以及增强从样本中获取微量DNA甲基化信息的能力. 因此, 研究人员还需对DNA甲基化检测方法进行更加深入的研究.

2 传统的DNA甲基化检测方法及其在癌症诊断中的应用

2.1 基于传统PCR的DNA甲基化检测方法

DNA甲基化的检测可分为针对基因组整体甲基化水平和特定位点甲基化的检测. 整体甲基化水平主要通过测定基因组中5-mC (5'端甲基化胞嘧啶) 的含量进行评定, 典型的检测方法包括高效液相色谱法、毛细管电泳法和基于生物亲和吸附分析的方法等^[30]. 关于癌症DNA甲基化的检测主要针对甲基化特定位点进行检测, 包括DNA预处理和甲基化检测两个步骤. 传统分子生物学技术 (如细胞克隆和PCR技术) 是通过杂交的方法揭示DNA

序列信息, 而5-mC的甲基基团位于DNA的沟槽中而不是氢键处, 基于普通杂交的方法会使DNA甲基化标记丢失, 从而无法区分甲基化5-mC和未甲基化的胞嘧啶. 一些研究者提出, 若在PCR反应中存在合适的DNA甲基转移酶, 便可在PCR后保持原有的甲基化模式, 该设计需要具有很高热稳定性和效率的DNA甲基转移酶来维持保真度, 但该想法迄今尚未实现^[31]. 因此, 几乎所有特异性的DNA甲基化序列分析技术都依赖于扩增或杂交前DNA的甲基化预处理, 以揭示在胞嘧啶残基处甲基的存在与否. DNA甲基化预处理的方法主要有重亚硫酸氢盐转换法^[32]、甲基化特异性限制性内切酶法^[33]和生物亲合法^[34]. 重亚硫酸盐转化法是DNA经重亚硫酸氢盐处理后, 甲基化的胞嘧啶不发生变化, 非甲基化的胞嘧啶变为尿嘧啶, 通过特定位点的碱基差异来检测甲基化的方法, 该方法可针对任何的甲基化位点进行转换和检测. 生物亲和法主要包括基于甲基化亲和蛋白的荧光检测法和基于酶联免疫反应的甲基化检测法^[35], 该类方法容易出现假阳性, 并且灵敏度较低. 因此, 现阶段最常见的检测方法主要还是基于重亚硫酸盐转换的方法和基于甲基化特异性限制性内切酶的方法, 如甲基化特异性PCR、荧光定量法、限制酶切法、重亚硫酸盐直接测序法等. 以上几种方法主要参数比较见表2.

Table 2 Comparison of main parameters of different DNA methylation detection methods

表2 不同DNA甲基化检测方法的主要参数比较

DNA甲基化检测方法	主要参数				
	检测时间	准确度	仪器需求	优点	缺点
甲基化特异性PCR (MSP)	4~6 h	较低	普通PCR仪 电泳仪	成本低, 可检测低浓度 DNA甲基化状态	易出现假阳性
荧光定量法 (MethyLight)	4~6 h	较高	实时荧光定量 PCR仪	闭管操作, 操作简单	需用荧光探针, 需对照试验
限制性酶切法 (RE-PCR)	17~19 h	较低	普通PCR仪 电泳仪	成本低	缺乏识别特定序列的酶, 需高浓度DNA
重亚硫酸盐直接测序法 (Bisulfite sequencing)	2~3 d	较高	普通PCR仪 电泳仪	可定量, 全基因组范围 检测	操作复杂, 需克隆, 成本高
甲基化敏感性高分辨率熔解法 (MS-HRM)	4~6 h	较低	实时荧光定量 PCR仪	闭管操作, 重复性好, 成本低	只能反应整体甲基化状态

2.1.1 限制性酶切PCR法

限制酶PCR法 (restriction endonucleases-PCR, RE-PCR) 是第一代DNA甲基化的检测技术^[36]. 它的基本原理是: 首先用甲基化敏感性限制性内切酶处理待测DNA, 然后用选取甲基化位点两侧 DNA 序列设计引物进行PCR扩增. 若存在DNA甲基化, 经过甲基化敏感性限制性内切酶处理后的DNA仍能扩增出含有甲基化位点的DNA片段, 否则扩增不出含有甲基化位点的DNA片段. 此法相对简单, 费用低廉且操作简单, 但存在诸多缺点, 因此限制了其应用. 首先, 该方法所需样本量大, 不能检测微量样本的DNA甲基化; 其次, 该方法仅能反映限制性内切酶识别位点处CpG岛的甲基化状态, 并且可利用的限制性内切酶数量较少, 只能反应部分位点的甲基化状态; 另外, 该方法容易出现酶切不完全而导致假阳性, 影响结果的准确度.

2.1.2 重亚硫酸盐直接测序法

基于重亚硫酸盐转化后测序 (bisulfite sequencing) 的方法在1992年由Frommer等^[37]首次提出. 该方法首先使双链DNA在碱性条件下变性为单链DNA, 经重亚硫酸氢钠改性将单链DNA中未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶, 然后由PCR扩增改性后的DNA经纯化、克隆、测序等步骤建立基因组DNA分子单个DNA链的精确甲基化图谱, 其中每个5'甲基胞嘧啶的位置通过测序凝胶上的清晰阳性条带给出. 该方法关键在于聚丙烯酰胺凝胶电泳能分辨单个碱基, 精确度较高, 能明确目的片段中的每一个CpG位点的甲基化状态, 是甲基化检测的金标准, 文献中有关DNA甲基化的研究大部分也是基于此方法. 但若想保持检测的精确度需要克隆测序, 整个过程耗时较长且操作繁琐, 成本也较高.

2.1.3 甲基化特异性PCR法

甲基化特异性PCR (methylation specific PCR, MSP) 于1996年由Herman提出^[38], 是甲基化检测最经典的方法, 也是目前使用最广的方法. 其原理是样本DNA在经重亚硫酸盐变性处理后, 甲基化的DNA序列不会发生改变, 而非甲基化的DNA序列中的胞嘧啶变成尿嘧啶, 然后根据亚硫酸氢盐转化后甲基化位点和非甲基化位点碱基的差异而设计两对不同的引物进行PCR扩增, 最后通过凝胶电泳检测扩增片段来判断基因是否发生甲基化. 该方法操作简单、费用较低并且特异性较高, 但只能针对已知序列, 并且不能定量分析甲基化水平. 后

来有研究者对MSP进行了改进, 设计出了半巢式PCR^[39]和巢式PCR^[40], 明显提高了甲基化的检测率.

2.1.4 荧光定量法

荧光定量法 (MethyLight) 是一种基于实时荧光定量PCR的甲基化检测技术. 该方法首先采用重亚硫酸盐转化法对DNA进行处理, 然后通过设计特异性的引物和TaqMan荧光探针进行扩增, 最后根据荧光信号强度进行核酸定量分析^[41]. 在引物和探针的设计过程中主要包括两种方式: 第一种是引物的互补配对序列不包含甲基化的CpG位点而探针序列中包括, 该方式是甲基化检测中最常见的一种方式^[42]; 另一种是引物的互补配对序列包含CpG位点, 而探针序列中不包括, 该方法可测定每个CpG区域的甲基化状态^[43]. MethyLight甲基化检测方法的优点在于不需要进行额外的电泳分离, 操作步骤简单、检测时间短、检测误差较小, 另外特异性较高. 但缺点在于成本较高, 定量检测时需要制备荧光标准曲线, PCR扩增过程可能存在如假阳性等多种因素的影响等^[44].

2.1.5 甲基化敏感性高分辨率熔解曲线法

甲基化敏感性高分辨率熔解曲线法 (methylation sensitive-high resolution melting, MS-HRM)^[45]是一种不依赖于PCR技术的DNA甲基化检测新方法. 它的原理在于将DNA用重亚硫酸盐处理后, 设计一对不针对CpG岛位点的引物进行扩增, 由于PCR扩增产物中胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G) 的含量不同导致熔解曲线 T_m (melting temperature) 值变化, 根据 T_m 值的变化可检测出样本的甲基化情况. 该方法优点在于闭管操作避免样品污染, 且反应时间短、灵敏度高、成本低, 但只能检测基因组整体的甲基化水平, 不能检测特定位点的DNA甲基化情况^[46].

2.2 基于不同癌症患者体液的DNA甲基化检测

体液中癌症标志物的检测是现阶段研究最多的癌症早期检测手段, 包括对体液中游离DNA (cfDNA)、循环肿瘤细胞 (CTCs) 和外泌体 (exosome) 的检测等^[1, 47]. 其中, 对外泌体的检测主要针对其中大量富集的microRNA, 如检测microRNA-375可特异性地诊断前列腺癌^[48]. 但循环肿瘤细胞较短的半衰期、外泌体提取困难等问题限制了它们在液体活检中的应用. 目前, 液体活检中对cfDNA的检测得到了广泛关注, 成为通过体液早期检测癌症的重要方式. 另外, 癌症患者与正

常人体液中 cfDNA 甲基化模式不同且甲基化性质稳定, 不易受到其他生理指标的影响, 分析体液中 cfDNA 甲基化具有很多竞争性优势, 已被广泛用于检测结直肠癌、乳腺癌和胃癌等疾病 (表3)。

2.2.1 血液中DNA甲基化标志物的检测

肿瘤细胞中的DNA分子随着细胞凋亡或坏死释放到血液中, 血液中癌症标志物的检测能够直观反映体内肿瘤细胞的发生及演变. 研究证实癌症患者血液中DNA甲基化水平异于正常个体, 因此血液游离肿瘤DNA (ctDNA) 的甲基化检测可作为癌症检测的一种初筛手段. 例如, 血清中ctDNA甲基化已被用于结直肠癌的检测. 研究者基于MSP和MethyLight方法对血清中SEPT9基因的甲基化状态进行了检测^[49-50], 检测结果具有很高的灵敏度和特异性. 血浆中甲基化标志基因通常被用于乳腺癌的早期检测, 相关研究发现乳腺癌患者中RASSF1A^[51]、SOX17^[52]、p16^[53]、CDH1^[54]、

Cyclin D2^[55]和RARβ2^[55]基因启动子区域都存在高甲基化状态. Park等^[56]同时对6个基因(UCHL1、NPTX2、SARP2、ppENK、p16、RASSF1A)进行了甲基化检测, 发现p16基因的启动子区域的甲基化在胰腺癌患者和慢性胰腺炎患者中存在很大的差异, 可作为胰腺癌早期检测的潜在标志物. 另外, 上皮性卵巢癌早期症状模糊, 检测困难, 癌症晚期患者死亡率高. Liggett等^[57]采用微阵列分析方法对多个病人血浆样本cfDNA进行了多基因甲基化检测, 区分出健康个体和良性、恶性卵巢肿瘤患者, 而且均具有很高的灵敏度和特异性, 证明异常甲基化的cfDNA有潜力作为一种甲基化标志物进行早期卵巢癌的检测. 因此, 针对血液中甲基化异常的cfDNA/ctDNA, 开发具有较高的特异性和灵敏度的新式检测方法, 对于癌症的早期筛查和预后具有重大意义.

Table 3 Detection of DNA methylation based on different body fluids of cancer patients

表3 基于癌症患者不同体液的DNA甲基化检测

类型	检测方法	癌症类型	基因标志物	参考文献
尿液	微阵列芯片和焦磷酸测序	膀胱癌、前列腺癌	CDH1、FHIT、LAMC2、RASSF1A、TIMP3、SFRP1、SOX9、PMF1 RUNX3	[58-59]
唾液	甲基化特异性PCR	头颈部肿瘤、口腔癌	TIMP3	[60]
痰液	定量甲基化特异性PCR	肺癌	RASSF1A、3OST2、PRDM14	[61]
脑脊液	免疫捕获结合PCR	恶性胶质瘤	MGMT、p16 ^{INK4a} 、TIMP-3、THBS1	[62]
血液	甲基化荧光法、甲基化特异性PCR	结直肠癌	SEPT9、RASSF1A、APC、E-cadherin、THBD	[49-50]
	甲基化特异性PCR	胃癌	APC、RASSF1A、RNF180、DAPK1、SFRP2	[63]
	甲基化特异性PCR	鼻咽癌	CDH1、DAPK1、p15、p16、RASSF1A、MLH1	[64]
	甲基化荧光法、甲基化特异性PCR	乳腺癌	RASSF1A、SOX17、p16、CDH1、CyclinD2、RARβ2	[65-67]
	甲基化特异性PCR	胰腺癌	PENK、CDKN2A	[68]
	微阵列芯片cfDNA甲基化分析	卵巢癌	RASSF1A、Cacla、EP300	[57]
	甲基化特异性PCR	肺癌	APC、RASSF1A、RARβ、CDH13	[69-70]

2.2.2 尿液中DNA甲基化标志物的检测

尿液样本具有蛋白质水平低、干扰少及无创采集、患者依从性高等优点, 因此对尿液样本中DNA甲基化标志物的检测成为非侵入性检测膀胱癌、前列腺癌等癌症的强有力工具. Zhao等^[71]预先收集了153例接受主动监测病人的尿液样本, 他们的直肠指诊后格利森评级均为6级, 然后采用多重MethyLight对尿沉渣中的8种DNA甲基化生物

学标志物进行检测, 通过分析基因甲基化和临床病理变量的相关性, 从而验证使用该方法预测患者风险再分类的能力. Zhao等^[71]采用逆向logistic回归方法, 鉴定了4基因甲基化分类板(APC、CRIP3、GSTP1和HOXD8). 结果显示, 与目前的前列腺癌临床预测因子, 如前列腺特异性抗原的诊断或肿瘤活检阳性核心的百分比相比, 实验获得的4基因甲基化分类板是一个相对独立并且可靠的预测因子.

Renard 等^[72]利用膀胱癌患者尿液中 *TWIST1* 和 *NID2* 基因的甲基化状态进行原发性膀胱癌的无创检测, 通过 MSP 方法对 496 个有效尿液样本进行 *TWIST1* 和 *NID2* 基因分析, 并与细胞学检测方法进行了比对. 结果显示有 466 个 (94%) 样本的 *TWIST1* 和 *NID2* 基因普遍存在甲基化, 灵敏度显著高于细胞学分析方法 (分别为 90% 和 48%), 特异性与细胞学分析方法相当 (分别为 93% 和 96%). 治疗后发生复发的前列腺癌患者有较高的远处转移和患癌死亡的风险. 尿液中异常 DNA 甲基化的评估可作为早期预测前列腺根治性切除术后生化复发的无创工具. 例如, Daniunaite 等^[73]采用甲基化敏感聚合酶链反应的方法, 对 149 例前列腺癌组织、37 例非前列腺癌组织和 17 例前列腺增生良性组织中 7 个基因的启动子甲基化进行了研究. 同时借助定量聚合酶链反应 (quantitative PCR) 对 253 例前列腺癌患者和 32 例前列腺增生症患者的尿液进行 DNA 甲基化分析. 在前列腺癌组织中, 最常见的甲基化基因为 *RASSF1*、*GSTP1* 和 *RAR β* , 三者结合阳性检出率达 85%, 这些基因在 60% 的前列腺癌患者的尿液中也被甲基化, *RASSF1* 在 45% 的前列腺癌患者尿液样本中存在甲基化, 其甲基化强度在前列腺癌中明显高于良性前列腺增生病例. 在单变量模型中, *RASSF1* 甲基化和前列腺癌组织中甲基化基因总数可预测生化复发的时间. 在多因素分析中, 通过检测组织和尿液样本, *RASSF1* 甲基化结合病理分期可以作为最显著的预测因子, 来预测格里森分级 6 级的患者肿瘤组织和尿液中的生化复发^[73]. 以上研究表明, 尿液中的 DNA 甲基化水平可反映泌尿系统肿瘤演化过程, 具有很高的临床诊断价值.

2.2.3 唾液中 DNA 甲基化标志物的检测

唾液中含有来自口腔黏膜和咽部的细胞, 近年来有关唾液中 DNA 甲基化的检测与疾病诊断的研究日趋增多. 目前的研究主要集中在头颈部鳞状细胞癌和口腔癌中. 例如, Gaykalova 等^[74]筛选出锌指蛋白 14、锌指蛋白 160 和锌指蛋白 420 的 DNA 甲基化作为最优的 DNA 甲基化标志物, 建立了一种检测原发性组织和唾液样本中头颈部鳞状细胞癌的方法, 与正常对照样本相比, 特异性达到了 100%. Rettori 等^[75]采用定量 MSP-PCR 法对头颈部鳞状细胞癌患者的唾液进行了评估, 在最后一次治疗后 6 个月收集的头颈部鳞状细胞癌样本中, *TIMP3* 启动子甲基化与局部无复发生存率之间存在

显著的相关性. 启动子高甲基化被认为是包括口腔在内的多种恶性肿瘤的标志物. Arantes 等^[76]采用 Q-MSP 对 40 例口腔鳞癌和 40 例健康人唾液标本中 8 个基因的甲基化模式进行了分析. 研究表明 *CCNA1*、*DAPK*、*DCC* 和 *TIMP3* 甲基化在口腔鳞癌样品中具有高度特异性. 与单个标记物相比, 这些基因的组合使用优化了检测效果, 检测敏感性和特异性达到 92.5% (使用组合 *CCNA1*、*DCC* 和 *TIMP3* 时). 此外, 近 90% 的临床 T1 和 T2 患者的 *DAPK*、*DCC* 和 *TIMP3* 基因均存在高甲基化. 这些研究工作证明了唾液 DNA 甲基化可作为头颈部鳞状细胞癌和口腔肿瘤早期诊断的标志物.

2.2.4 痰液中 DNA 甲基化标志物的检测

肺癌在所有癌症中死亡率最高, 早期检测可提高肺癌患者的生存率. 痰液中含有肺组织和下呼吸道脱落的细胞, 具有较高的肺组织特异性, 肺癌细胞会随着肺癌患者痰液咳出, 因此可通过痰液的无创方法获取肺癌细胞, 而肺癌患者痰液可作为 DNA 甲基化标志物检测的可靠样本. 例如, Hubers 等^[77]采用定量甲基化特异性 PCR 方法分别分析了健康对照组和肺癌患者的痰液样本中的 *APC*、*cytoglobin*、*3OST2*、*RASSF1A*、*PRDM14*、*FAM19A4* 和 *PHACTR3* 的甲基化状态. 在对 *RASSF1A* 基因的检测中发现, 肺癌患者痰液中 *RASSF1A* 基因呈现高甲基化状态而健康对照组中该基因呈现非甲基化状态, 从而将肺癌患者从健康对照组中区分出来, 检测灵敏度为 42.5%, 特异性为 96.5%. 在对 *RASSF1A*、*3OST2* 和 *PRDM14* 基因组合的高甲基化分析中, 检测灵敏度为 82.2%, 特异性为 66.3%; 在对 *RASSF1A*、*3OST2* 和 *PHACTR3* 基因组合的高甲基化分析中, 检测灵敏度为 67.1%, 特异性为 89.5%. 该研究验证了 DNA 甲基化标志物在肺癌早期诊断中的作用, 证实 *RASSF1A* 高甲基化是 7 个标记基因中最有效的肺癌标志物.

2.2.5 脑脊液中 DNA 甲基化标志物的检测

研究发现, 脑部肿瘤患者的脑脊液中可检测到游离的 ctDNA, 因此脑部肿瘤患者的脑脊液可作为 DNA 甲基化检测样本. 有研究表明, 在神经胶质瘤恶性转化期间几种已知或推定的肿瘤抑制基因的启动子区域出现 DNA 甲基化现象. 例如, Liu 等^[62]采用免疫捕获结合 PCR 技术的方法通过对恶性胶质瘤患者的组织、对应血清和脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 进行了甲基化检测. 实

验结果表明, 组织、血清和脑脊液中 *MGMT*、*p16^{INK4a}*、*TIMP-3* 和 *THBS1* 基因都呈现高甲基化状态, 并且对于无进展生存期, 脑脊液中 *MGMT* 和 *THBS1* 的高甲基化是独立的预后因素. 因此, 多基因启动子高甲基化分析有望作为胶质瘤中的预后因子和作为血清或 CSF 中的微创检测肿瘤标志物.

3 数字PCR用于DNA甲基化检测

3.1 基于数字PCR技术的甲基化检测方法

数字PCR技术是近些年来蓬勃发展的新技术, 其工作原理是: 将核酸样本稀释到一定浓度, 通过一定技术手段将其分配到若干个微反应单元中, 使绝大多数反应体系中至多包含一个拷贝的DNA模板. 其中模板数量分布遵循泊松分布的规律, 然后将所有的微反应单元同时进行PCR扩增反应, 最后获取荧光信号进行统计学分析. 数字PCR技术不需要标准荧光曲线作对照, 不受扩增效率的影响, 可实现目标分子的绝对定量^[78-79].

样品分散是数字PCR技术的核心步骤, 其分散方法主要分为4种: 基于微孔芯片的方法、基于油包水微液滴的方法、基于微流控室分割的方法和基于打印液滴的方法. 微孔芯片的方法通过物理或化学修饰使硅基板上的微孔阵列产生数万个纳升级别的微反应体系, 通过每个微孔中单一分子的独立扩增进行初始模板的定量检测, 具有重复性和灵敏度较高的特点. 现阶段基于微孔芯片技术已被 Thermo Fisher Scientific[®] 公司发展为商业化仪器, 实现了实际样本的检测^[80-82]. 油包水的实验过程主要包括液滴生成、PCR扩增和荧光读取3步. 具体步骤将PCR反应液生成大小均匀的微小液滴并被油相包裹起来, 然后生成的油包水液滴进入PCR管中在PCR仪器中进行扩增, 最后每个液滴通过液滴荧光读取器进行荧光信号的读取. 现阶段基于油包水液滴技术(如Bio-Rad[®]公司推出了QX100[™]和QX200[™]数字PCR系统)已被用于诸多与基因检测相关的应用中^[83-84]. 微流控数字PCR是通过“微流体阀”快速准确地将样品分散到若干个独立的单元, 实现独立的PCR扩增. 微流体数字PCR芯片由两层PDMS通道层构成: PCR反应层(DNA溶液, 包含PCR mix)和压力微阀控制层(气体、油相). 现阶段基于微流控技术发展成商业化的数字

PCR仪器主要有Fluidigm[®]公司的微流控芯片平台(BioMark[™] HD system)基因分析系统. 基于生物打印的数字PCR系统是通过生物打印技术打印若干体积均一的微液滴, 微液滴形成的油滴阵列进行PCR反应和荧光图像的读取. 其优势在于高通量检测和成本低, 但现阶段还未有商业化的仪器产品.

PCR扩增后荧光图像的获取和处理主要有基于光电倍增管(PMT)和电荷耦合器(CCD)的检测. 基于微孔芯片和微流控技术的加样方法一般采用CCD测量荧光信号, 基于油包水加样的方法一般采用PMT检测荧光信号, 基于生物打印技术的数字PCR加样方法一般采用扫描的方法进行荧光信号的检测. 在识别荧光信号的有无之后需要进行统计和计算. 通常使用ImageJ、Matlab和Mathematica等^[85]软件进行统计学分析(如贝叶斯分析法等), 并给出相应的数学分析结果. 由于数字PCR通常不受PCR效率差异的影响, 可提供DNA模板的绝对定量, 与实时荧光定量PCR相比, 它提供了更高的灵敏度和特异性. 相较于传统试管中的PCR, 数字PCR可在每个微孔中检测单个的核酸分子, 可检测到0.1%的突变基因^[86]. 随着商业数字PCR的不断推广, 很多研究表明数字PCR检测平台比qPCR更具优势, 虽然数字PCR的线性检测范围没有荧光定量PCR宽, 但其优势主要在于不需要外界参考实现绝对定量检测, 且PCR扩增效率高、抗干扰能力强、灵敏度更高. 因此, 采用数字PCR技术检测体液中微量的DNA甲基化异常具有巨大潜力, 目前采用数字PCR技术在DNA甲基化检测中也取得了一定进展.

数字PCR检测DNA甲基化主要包括样品预处理、数字化PCR扩增及荧光图像获取及分析三步^[87](图3). 样品预处理是检测第一步: 将从癌症病人获取的样本经分离、纯化等步骤提取DNA, 然后将提取的DNA经重亚硫酸氢盐处理, 使DNA中未发生甲基化的胞嘧啶经脱氨基转变成尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶不发生转变. 第二步是数字化PCR扩增过程, 将经重亚硫酸氢盐转化后的DNA样本进行分散或分割, 形成成千上万个“单分子”扩增体系, 随后进行数字化PCR扩增, 然后将获取的荧光信号进行分析得到定量的检测结果.

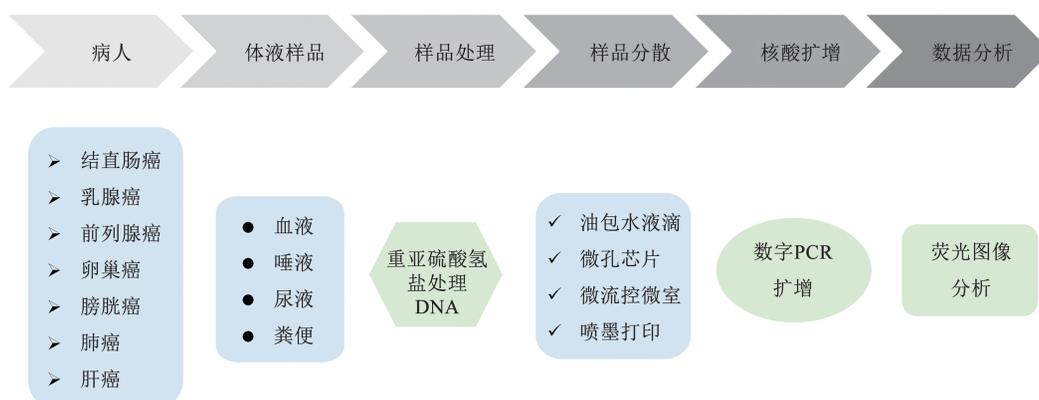


Fig. 3 Procedures for detecting DNA methylation in body fluids of cancer patients using digital PCR

图3 采用数字PCR检测癌症患者体液中DNA甲基化的步骤

3.2 数字PCR技术在癌症DNA甲基化检测中的应用

由于数字PCR技术在检测灵敏度的绝对优势,因此可用于血浆中游离cfDNA甲基化及循环肿瘤细胞CTC的检测.现阶段越来越多的研究者将数字PCR技术用到DNA甲基化的检测中,其中使用最多的是Bio-Rad®公司的QX100™、QX200™数字PCR系统.例如,Wiencke等^[88]采用Bio-Rad®公司的QX100™数字PCR系统定量检测了CD3Z基因去甲基化CpG启动子位点的拷贝数,用于估计人血液和组织中T细胞的数量和比例.通过采用亚硫酸氢盐转化法对原发性胶质瘤患者和健康对照组的157个血液标本中的DNA进行了预处理,分别使用qPCR和ddPCR进行了甲基化检测.相同血液样本的重复测量显示ddPCR比qPCR变化不大.统计学结果表明,ddPCR的线性一致性比qPCR强,ddPCR的绝对值更接近FACS (fluorescence activated cell sorting)的结果.因此,鉴于ddPCR的精度更高、准确度更高、技术简单,该方法成为优于常规qPCR的DNA甲基化检测方法,可用于评估T细胞进而对多种癌症进行预后评估.例如,Yu等^[8]采用该数字PCR系统准确对临床组织样本中的甲基化NTRK3和EVL进行了定量化检测,实验结果证明数字PCR在检测甲基化的最低定量限比qPCR提高了25倍,最低检测浓度提高了20倍.同时他们发现数字PCR可更加准确地检测结肠直肠癌组织和正常的结肠黏膜生物样本中EVL基因的甲基化情况,因此数字PCR检测基因甲基化异常在结肠直肠癌的早期诊断中具有应用潜力.Hayashi

等^[89]采用该数字PCR系统检测了头颈部鳞状细胞癌中PAX5基因的甲基化情况,他们对82个手术边缘样本进行检测,结果表明PAX5甲基化是头颈部鳞癌深部手术边缘分析的优良肿瘤特异性标记.此外,相比传统的MSP检测方法,基于数字PCR的MSP方法显示出更高的甲基化标记物检测灵敏度.

另外,基于油包水微液滴结构和磁珠的数字PCR技术,即BEAMing技术也被应用到基因甲基化的检测中(图4c).Barault等^[90]采用超高灵敏度的两步数字PCR流式DNA甲基化检测技术(Methyl-BEAMing),检测石蜡包埋肿瘤组织和循环游离DNA中甲基化转移酶MGMT基因的甲基化状态,在成胶质瘤组织和结肠直肠癌组织样本中检测到MGMT基因的甲基化异常,并且在结肠直肠癌患者的血浆和对应组织中表现出很好的一致性.实验结果表明Methyl-BEAMing的检测方法具有高度可重复性、特异性和灵敏性、可用于对任何来源DNA甲基化的检测.Sartore-Bianchi等^[91]选取了转移性结肠直肠癌病人的石蜡包埋肿瘤组织样本,它们的甲基化转移酶MSP均呈现阳性,研究者分别采用免疫组化和methyl-BEAMing的方法对甲基化转移酶的表达及MGMT基因的启动子甲基化百分比进行了研究.通过对接受治疗患者甲基化转移酶MSP阳性的结肠直肠癌样本的回顾性分析,表明联合蛋白质和基因的MGMT检测方法具有一定的癌症风险预测能力.比如,采用免疫组化检测蛋白质表达的同时,使用Methyl-BEAMing对相关基因启动子的甲基化进行量化.

Weisenberger等^[92]在一种数字化微阵列芯片

的基础上开发了一种数字化MethyLight (digital MethyLight) 方法^[41], 利用多重数字MethyLight在乳腺癌患者的血清样品中检测到了*RUNX3*、*CLDN5*和*FOXE1*基因CpG岛的高甲基化, 其中*CLDN5*和*FOXE1*基因CpG岛的高甲基化属于首次报道, 而且该研究只用了100 μl的血清样本中提取的少量DNA. Digital MethyLight相比传统的MethyLight方法更敏感, 可在大量非甲基化DNA的背景下检测少量甲基化基因, 其检测原理如图4a所示. 数字MethyLight通过在多个PCR孔中将样本DNA隔开进行独立扩增, 降低了信噪比及PCR试剂的抑制作用, 增加了DNA甲基化检测灵敏度. 该方法使我们能够对乳腺癌患者血浆样本中单个甲基化DNA分子进行检测和定量, 是迄今为止检测生物体液中DNA高甲基化最灵敏的方法. 多重数字MethyLight测定法是对数字MethyLight方法的

优化, 进一步提高了血浆样品中DNA甲基化位点的检测灵敏度. 虽然使用多重数字MethyLight几乎只能在IV期乳腺癌患者的血浆中检测到DNA高甲基化, 但事实上, 在一例II期乳腺癌患者中也检测出了DNA高甲基化, 这表明了进一步提高DNA甲基化检测灵敏度的必要性, 将有助于实现乳腺癌的早期诊断. 目前, 为了获得更加可信的早期诊断结果, 可通过在多重数字MethyLight中对多个标记基因进行分析来实现更准确的判断. Digital MethyLight具有十分广阔的癌症临床诊断方面的应用前景, 然而实验室中仅可获取少量癌症患者的相关样本, 这限制了其在研究中的广泛使用, 但是较大的样本量便可提高数字MethyLight测定中检测单个甲基化DNA分子的灵敏度. 因此, 使用数字MethyLight检测体液中的DNA甲基化在癌症早期诊断和长期病情监测中具有潜在的应用前景.

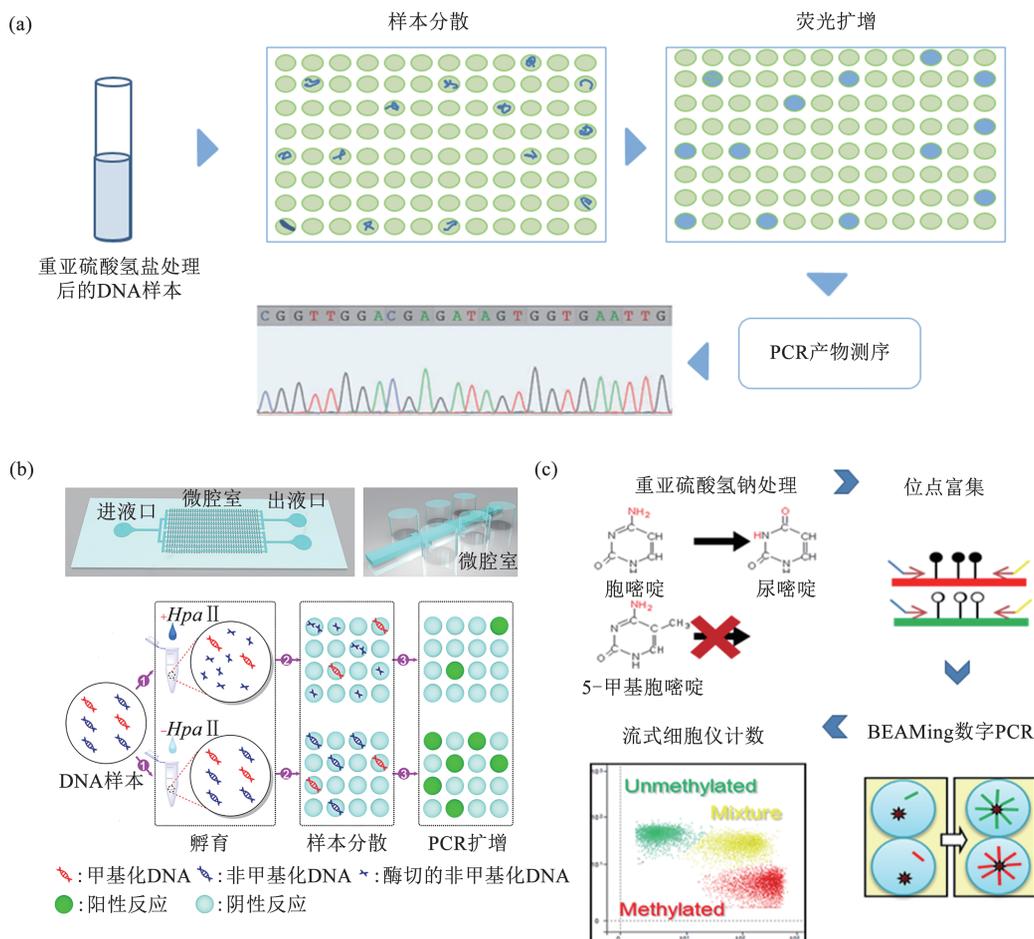


Fig. 4 Typical applications of digital PCR for DNA methylation detection

图4 数字PCR技术检测DNA甲基化的几种典型应用

(a) Digital MethyLight检测DNA甲基化示意图; (b) 微流控芯片检测DNA甲基化示意图; (c) Methyl-BEAMing检测DNA甲基化流程图.

近年来随着微流控芯片 (microfluidic chip) 技术的不断发展, 基于微流控芯片的DNA甲基化检测方法也初步发展起来. Wu等^[93]开发了一种基于微流控芯片的数字PCR技术整合检测甲基化的新方法, 该微流控芯片可避免使用数字PCR仪器, 降低反应成本并且可简化操作程序. 该芯片的整体结构及检测原理如图4b所示, 该方法依赖于甲基化敏感的限制酶 *Hpa* II, 可切割未甲基化的DNA链, 同时保持甲基化的DNA完整. 在 *Hpa* II 处理后, 通过基于微流控芯片的数字PCR定量测定DNA甲基化水平. 实验结果表明, 该微流控芯片的检测下限为0.52%. 为验证此方法的适用性, 在10例早期肺腺癌及其相邻非肿瘤组织样本中检测了两种肿瘤抑制基因 (*PCDHGB6*和*HOXA9*)的启动子甲基化. 实验结果和常规的亚硫酸氢盐焦磷酸测序的结果表现出良好的一致性. 该微流控芯片具有较高的灵敏度和较低的成本, 因此基于微流控芯片的数字PCR方法有望提供更加便捷、合适的检测方案, 用于DNA甲基化甚至表观遗传学相关疾病的早期诊断中.

4 结论与展望

在过去几十年中, 人们对癌症表观遗传学改变的认识有了很大提升, 其中DNA甲基化分析有了革命性发展. 在对各类癌症DNA甲基化异常研究中发现了数十种甲基化标记基因, 涌现了大量基于重亚硫酸盐转化和PCR技术进行DNA甲基化检测的研究. 然而, 大多数甲基化标记基因甲基化程度的高低对癌症的诊断和分期具有至关重要的作用, 基于传统PCR的甲基化检测方法难以实现甲基化程度的准确定量, 新兴的数字PCR技术拥有超高核酸定量的灵敏度和特异性. 将基于数字PCR的DNA甲基化检测技术的高灵敏度和液体活检技术的非侵入性相结合, 有望成为现阶段乃至未来癌症诊断及监测中最具有前景的方法. 本综述比较了不同的基于PCR技术的DNA甲基化检测方法的优缺点, 总结了针对癌症病人不同体液样本进行DNA甲基化检测的研究, 介绍了基于数字PCR技术进行基因甲基化定量检测的原理及其在癌症诊断中的应用进展, 讨论并展望了基于数字PCR技术的甲基化定量检测用于癌症早期诊断和监测的发展方向.

近年来已发表了一些应用数字PCR技术对甲基化基因进行定量检测的研究, 但它们大部分集中

于实验室的基础研究, 临床上使用甲基化检测用于癌症的早期诊断仍需进一步探索. 希望本综述有助于相关研究人员和临床医生对癌症基因甲基化检测时的体液样本进行选择, 推动基于数字PCR的体液活检技术的发展, 将更加便捷、准确的甲基化定量检测方法深入应用到癌症临床诊断和监测中. 另外, 利用数字PCR进行甲基化的定量检测虽具有超高灵敏度的优势, 但其仪器价格昂贵、体积较大、集成度低、需要专业人员操作, 且很难实现多目标物的同时检测, 这些因素阻碍了其在临床上的进一步广泛应用. 微流控技术凭借其操作简单、高通量、价格低廉的特性在即时诊断中得到了广泛应用. 由于DNA甲基化的异常逐渐成为癌症的生物学标志物, 在微流控芯片上实现从体液到DNA甲基化检测具有重要的意义. 虽然单一的核酸提取、甲基化特异性数字PCR芯片均有开发, 但一体化的芯片检测还未被研发出来. 因此, 通过整合核酸提取、重亚硫酸盐处理和甲基化特异性数字PCR扩增的微流控芯片, 实现甲基化的样本至结果快速检测, 并将其应用到基于体液活检的癌症早期诊断当中具有重大意义. 另一方面, 进行癌症诊断所需要的标记物往往需要具有很强的特异性, 否则会受到假阳性结果的影响, 降低诊断的准确性. 虽然目前的研究已发现了几十种癌症相关的甲基化标记基因, 但它们往往不具有针对某种癌症的专一特异性, 所以亟需相关研究人员发现更具特异性的癌症甲基化标记物. 未来, 人类甲基化图谱将建立, 在选择癌症诊断的生物标志物前, 通过从不同个体获得的参考数据集的系统筛选, 能够识别甲基化不稳定CpG位点和区域, 排除不合适的CpG位点, 极大地促进甲基化生物学标记物的选择. 期待在不久的将来, 通过以数字PCR微流控芯片为核心技术的无创检测方法检测患者的相关基因位点甲基化异常, 有望成为癌症早期诊断、长期监测、预后以及个性化用药的重要手段.

参 考 文 献

- [1] Gorgannezhad L, Umer M, Islam M N, *et al.* Circulating tumor DNA and liquid biopsy: opportunities, challenges, and recent advances in detection technologies. *Lab on a Chip*, 2018, **18**(8): 1174-1196
- [2] Williams P M, Conley B A. Clinical application of liquid biopsies. *JAMA Oncology*, 2016, **2**(8): 1003-1005
- [3] Hashimoto Y, Zumwalt T J, Goel A. DNA methylation patterns as noninvasive biomarkers and targets of epigenetic therapies in

- colorectal cancer. *Epigenomics*, 2016, **8**(5): 685-703
- [4] Hao X, Luo H, Krawczyk M, *et al.* DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(28): 7414-7419
- [5] Tang Q, Cheng J, Cao X, *et al.* Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review. *Clinical Epigenetics*, 2016, **8**: 115
- [6] Qin Z, Ljubimov V A, Zhou C, *et al.* Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*, 2016, **35**: 36
- [7] Wan J C, Massie C, Garcia-corbacho J, *et al.* Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*, 2017, **17**(4): 223-228
- [8] Yu M, Carter K T, Makar K W, *et al.* Methylight droplet digital PCR for detection and absolute quantification of infrequently methylated alleles. *Epigenetics*, 2015, **10**(9): 803-809
- [9] Cui X, Cao L, Huang Y, *et al.* *In vitro* diagnosis of DNA methylation biomarkers with digital PCR in breast tumors. *The Analyst*, 2018, **143**(13): 3011-3020
- [10] Crider K S, Yang T P, Berry R J, *et al.* Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Advances in Nutrition*, 2012, **3**(1): 21-38
- [11] Schubeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 2015, **517**(7534): 321-326
- [12] Ciriello G, Miller M L, Aksoy B A, *et al.* Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature Genetics*, 2013, **45**(10): 1127-1133
- [13] Hong B, Van den heuvel A P, Prabhu V, *et al.* Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities. *Current Drug Targets*, 2014, **15**(1): 80-89
- [14] Heng H H, Bremer S W, Stevens J B, *et al.* Chromosomal instability (cin): what it is and why it is crucial to cancer evolution. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2013, **32**(3-4): 325-340
- [15] Kelly A D, Issa J P J. Epigenetics and cancer. *Genes & Development*, 2016, **18**(19): 2315-2335
- [16] Tongelen A V, Loriot A, Smet C D. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Letters*, 2017, **396**: 130-137
- [17] Ng J, Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(2): 2472-2496
- [18] Chen W-D, Han Z J, Skoletsky J, *et al.* Detection in fecal DNA of colon cancer - specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2005, **97**(15): 1124-1132
- [19] Wong I H N, Dennis Lo Y M, Zhang J, *et al.* Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Research*, 1999, **59**(1): 71-73
- [20] Lu C, Soria J-C, Tang X, *et al.* Prognostic factors in resected stage I non - small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, **22**(22): 4575-4583
- [21] Brock M V, Hooker C M, Ota-machida E, *et al.* DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 2008, **358**(11): 1118-1128
- [22] Esteller M, Garcia-foncillas J, Andion E, *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene mgmt and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *New England Journal of Medicine*, 2000, **343**(19): 1350-1354
- [23] Roupr T M, Hupertan V, Yates D R, *et al.* Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage. *Clinical Cancer Research*, 2007, **13**(6): 1720-1725
- [24] Watanabe Y, Kim H S, Castoro R J, *et al.* Sensitive and specific detection of early gastric cancer with DNA methylation analysis of gastric washes. *Gastroenterology*, 2009, **136**(7): 2149-2158
- [25] Harbeck N, Nimmrich I, Hartmann A, *et al.* Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing pitx2 DNA methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, **26**(31): 5036-5042
- [26] Alumkal J J, Zhang Z, Humphreys E B, *et al.* Effect of DNA methylation on identification of aggressive prostate cancer. *Urology*, 2008, **72**(6): 1234-1239
- [27] Taniguchi T, Tisvhkowitz M, Ameziane N, *et al.* Disruption of the fanconi anemia - brca pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nature Medicine*, 2003, **9**(5): 568-574
- [28] Satoh A, Toyota M, Itoh F, *et al.* Epigenetic Inactivation of chfr and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer. *Cancer Research*, 2003, **63**(24): 8606-8613
- [29] Chaudhry P, Srinivasan R, Patel F D. Utility of gene promoter methylation in prediction of response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer (eoc). *Cancer Investigation*, 2009, **27**(8): 877-884
- [30] Kurdyukov S, Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology*, 2016, **5**(1). Pii:E3
- [31] Edwards J R, Yarychkivska O, Boulard M, *et al.* DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin*, 2017, **10**: 23
- [32] Stark A, Dong J S, Pisanic T, *et al.* A parallelized microfluidic DNA bisulfite conversion module for streamlined methylation analysis. *Biomedical Microdevices*, 2016, **18**(1): 5
- [33] Shi W, Jia L, Zhang L, *et al.* Methyrad: a simple and scalable method for genome-wide DNA methylation profiling using methylation-dependent restriction enzymes. *Open Biology*, 2015, **5**(11). pii: 150130
- [34] Zhang L, Xu Y Z, Xiao X F, *et al.* Development of techniques for DNA-methylation analysis. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2015, **72**: 114-122
- [35] Xu Z, Yin H, Huo L, *et al.* Electrochemical immunosensor for DNA methyltransferase activity assay based on methyl cpg-binding protein and dual gold nanoparticle conjugate-based signal amplification. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2014, **192**(192): 143-149
- [36] Hua D, Hu Y, Wu Y Y, *et al.* Quantitative methylation analysis of multiple genes using methylation-sensitive restriction enzyme-

- based quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma. *Experimental & Molecular Pathology*, 2011, **91**(1): 455-460
- [37] Frommer M, Mcdonald L E, Millar D S, *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(5): 1827-1831
- [38] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of cpg islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(18): 9821-9826
- [39] Alkhalaf M A, Guiver M, Cooper R J. Prevalence and quantitation of adenovirus DNA from human tonsil and adenoid tissues. *Journal of Medical Virology*, 2013, **85**(11): 1947-1954
- [40] Scher M B, Elbaum M B, Migilevkin Y, *et al.* Detecting DNA methylation of the *bcl2*, *cdkn2a* and *mid2* genes in urine using a nested methylation specific polymerase chain reaction assay to predict bladder cancer. *J Urol*, 2012, **188**(6): 2101-2107
- [41] Campan M, Weisenberger D J, Trinh B, *et al.* Methylight and digital methylight. *Methods Mol Biol*, 2018, **1708**: 497-513
- [42] Zhou J, Cao J, Lu Z, *et al.* A 115-bp methylight assay for detection of p16 (*cdkn2aA*) methylation as a diagnostic biomarker in human tissues. *BMC Medical Genetics*, 2011, **12**: 67
- [43] Um T-H, Kim H, Oh B-K, *et al.* Aberrant cpg island hypermethylation in dysplastic nodules and early hcc of hepatitis b virus-related human multistep hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*, 2011, **54**(5): 939-947
- [44] Olkhov-mitsel E, Zdravic D, Kron K, *et al.* Novel multiplex methylight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids. *Scientific Reports*, 2014, **4**: 4432
- [45] Hussmann D, Hansen L L. Methylation-sensitive high resolution melting (ms-hrm). *Methods Mol Biol*, 2018, **1708**: 551-571
- [46] Xiao Z, Li B, Wang G, *et al.* Validation of methylation-sensitive high-resolution melting (ms-hrm) for the detection of stool DNA methylation in colorectal neoplasms. *Clinica Chimica Acta*, 2014, **431**: 154-163
- [47] Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, *et al.* Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Molecular Cancer*, 2017, **16**(1): 80
- [48] Kachakova D, Mitkova A, Popov E, *et al.* Combinations of serum prostate-specific antigen and plasma expression levels of *let-7c*, *mir-30c*, *mir-141*, and *mir-375* as potential better diagnostic biomarkers for prostate cancer. *DNA and Cell Biology*, 2014, **34**(3): 189-200
- [49] Warren J D, Xiong W, Bunker A M, *et al.* Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Medicine*, 2011, **9**: 133
- [50] Church T R, Wandell M, Lofton-day C, *et al.* Prospective evaluation of methylated sept9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*, 2014, **63**(2): 317-325
- [51] Spitzwieser M, Holzweber E, Pfeiler G, *et al.* Applicability of *hin-1*, *mgmt* and *rassf1a* promoter methylation as biomarkers for detecting field cancerization in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2015, **17**: 125
- [52] Chimonidou M, Strati A, Malamos N, *et al.* Sox17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer. *Clinical Chemistry*, 2013, **59**(1): 270-279
- [53] Klajic J, Busato F, Edvardsen H, *et al.* DNA methylation status of key cell-cycle regulators such as *cdkn2a/p16* and *ccna1* correlates with treatment response to doxorubicin and 5-fluorouracil in locally advanced breast tumors. *Clinical Cancer Research*, 2014, **20**(24): 6357-6366
- [54] Elshimali Y I, Khaddour H, Sarkissyan M, *et al.* The clinical utilization of circulating cell free dan (ccfDNA) in blood of cancer patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**(9): 18925-18958
- [55] Xiang T X, Yuan Y, Li L L, *et al.* Aberrant promoter cpg methylation and its translational applications in breast cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 2013, **32**(1): 12-20
- [56] Park J W, Baek I H, Kim Y T. Preliminary study analyzing the methylated genes in the plasma of patients with pancreatic cancer. *Scand J Surg*, 2012, **101**(1): 38-44
- [57] Liggett T E, Melnikov A, YI Q, *et al.* Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecologic Oncology*, 2011, **120**(1): 113-120
- [58] Yu J, Zhu T, Wang Z, *et al.* A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 2007, **13**(24): 7296-7304
- [59] Kandimalla R, Van Tilborg A A, Zwarthoff E C. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, 2013, **10**(6): 327-335
- [60] Rettori M M, De Carvalho A C, Bomfim Longo A L, *et al.* Prognostic significance of *timp3* hypermethylation in post-treatment salivary rinse from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Carcinogenesis*, 2013, **34**(1): 20-27
- [61] Hubers A J, Heideman D A M, Burgers S A, *et al.* DNA hypermethylation analysis in sputum for the diagnosis of lung cancer: training validation set approach. *British Journal of Cancer*, 2015, **112**(6): 1105-1113
- [62] Liu B L, Cheng J X, Zhang W, *et al.* Quantitative detection of multiple gene promoter hypermethylation in tumor tissue, serum, and cerebrospinal fluid predicts prognosis of malignant gliomas. *Neuro-oncology*, 2010, **12**(6): 540-548
- [63] Balgkouranidou I, Matthaïos D, Karayiannakis A, *et al.* Prognostic role of *apc* and *rassf1a* promoter methylation status in cell free circulating DNA of operable gastric cancer patients. *Mutat Res*, 2015, **778**: 46-51
- [64] Wong T S, Kwong D L W, Sham J S T, *et al.* Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2004, **10**(7): 2401-2406
- [65] Chimonidou M, Strati A, Malamos N, *et al.* Sox17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer. *Clinical*

- Chemistry, 2013, **59**(1):270-279
- [66] Elshimali Y, Khaddour H, Sarkissyan M, *et al.* The clinical utilization of circulating cell free DNA (ccfDNA) in blood of cancer patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**(9): 18925-18958
- [67] Hoque M O, Feng Q, Toure P, *et al.* Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2006, **24**(26): 4262-4269
- [68] Li J, Zhu J, Hassan M M, *et al.* K-ras mutation and p16 and preproenkephalin promoter hypermethylation in plasma DNA of pancreatic cancer patients: in relation to cigarette smoking. *Pancreas*, 2007, **34**(1): 55-62
- [69] Ponomaryova A A, Rykova E Y, Cherdynseva N V, *et al.* Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2013, **81**(3): 397-403
- [70] Zhang Q, Hu G, Yang Q, *et al.* A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA. *Gynecologic Oncology*, 2013, **130**(1): 132-139
- [71] Zhao F, Olkhov-Mitsel E, Van Der Kwast T, *et al.* Urinary DNA methylation biomarkers for noninvasive prediction of aggressive disease in patients with prostate cancer on active surveillance. *J Urol*, 2017, **197**(2): 335-341
- [72] Renard I, Joniau S, Van Cleynenbreugel B, *et al.* Identification and validation of the methylated *twist1* and *nid2* genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *European Urology*, 2010, **58**(1): 96-104
- [73] Daniunaite K, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, *et al.* Prognostic value of *rassf1* promoter methylation in prostate cancer. *J Urol*, 2014, **192**(6): 1849-1855
- [74] Gaykalova D A, Vatapalli R, Wei Y, *et al.* Outlier analysis defines zinc finger gene family DNA methylation in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Plos One*, 2015, **10**(11): e0142148
- [75] Rettori M M, De Carvalho A C, Bomfim Longo A L, *et al.* Prognostic significance of *timp3* hypermethylation in post-treatment salivary rinse from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Carcinogenesis*, 2012, **34**(1): 20-27
- [76] Arantes L M, De Carvalho A C, Melendez M E, *et al.* Validation of methylation markers for diagnosis of oral cavity cancer. *European Journal of Cancer*, 2015, **51**(5): 632-641
- [77] Hubers A, Heideman D, Burgers S, *et al.* DNA hypermethylation analysis in sputum for the diagnosis of lung cancer: training validation set approach. *British Journal of Cancer*, 2015, **112**(6): 1105-1113
- [78] Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 2012, **9**(6): 541-544
- [79] Hindson C M, Chevillet J R, Briggs H A, *et al.* Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*, 2013, **10**(10): 1003-1005
- [80] Morishita S, Takahashi K, Araki M, *et al.* Melting curve analysis after t allele enrichment (melcatle) as a highly sensitive and reliable method for detecting the *Jak2v617f* mutation. *Plos One*, 2015, **10**(3): e0122003
- [81] Stabley D L, Harris A W, Holbrook J, *et al.* *Snn1* and *snn2* copy numbers in cell lines derived from patients with spinal muscular atrophy as measured by array digital PCR. *Mol Genet Genomic Med*, 2015, **3**(4): 248-257
- [82] Sefrioui D, Sarafan-Vasseur N, Beaussire L, *et al.* Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. *Dig Liver Dis*, 2015, **47**(10): 884-890
- [83] Lemos D R, Babaeijandaghi F, Low M, *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting tnf-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nature Medicine*, 2015, **21**(7): 786-794
- [84] Jahn M, Vorpahl C, Turkowsky D, *et al.* Accurate determination of plasmid copy number of flow-sorted cells using droplet digital PCR. *Analytical Chemistry*, 2014, **86**(12): 5969-5976
- [85] Strain M C, Lada S M, Luong T, *et al.* Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *Plos One*, 2013, **8**(4): e55943
- [86] Taly V, Pekin D, El Abed A, *et al.* Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends in Molecular Medicine*, 2012, **18**(7): 405-416
- [87] Cao L, Cui X, Hu J, *et al.* Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **90**: 459-474
- [88] Wiencke J K, Bracci P M, Hsuang G, *et al.* A comparison of DNA methylation specific droplet digital PCR (ddPCR) and real time qPCR with flow cytometry in characterizing human t cells in peripheral blood. *Epigenetics*, 2014, **9**(10): 1360-1365
- [89] Hayashi M, Guerrero-Preston R, Sidransky D, *et al.* Paired box 5 methylation detection by droplet digital PCR for ultra-sensitive deep surgical margins analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Prevention Research*, 2015, **8**(11): 1017-1026
- [90] Barault L, Amatu A, Bleeker F E, *et al.* Digital PCR quantification of *mgmt* methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 2015, **26**(9): 1994-1999
- [91] Sartore-Bianchi A, Pietrantonio F, Amatu A, *et al.* Digital PCR assessment of *mgmt* promoter methylation coupled with reduced protein expression optimises prediction of response to alkylating agents in metastatic colorectal cancer patients. *European Journal of Cancer*, 2017, **71**: 43-50
- [92] Weisenberger D J, Trinh B N, Campan M, *et al.* DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital methylight. *Nucleic Acids Research*, 2008, **36**(14): 4689-4698
- [93] Wu Z, Bai Y, Cheng Z, *et al.* Absolute quantification of DNA methylation using microfluidic chip-based digital PCR. *Biosens Bioelectron*, 2017, **96**: 339-344

New Path of Cancer Liquid Biopsy: DNA Methylation Detection by Digital PCR*

CAO Lei^{1,2)}, GUO Li-Juan^{1,2)}, GUO Xiao-Jin^{2,3)}, GONG Yan⁴⁾, LI Fei^{1,2)**}

¹⁾The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education,
Xi'an Jiaotong University School of Life Science and Technology, Xi'an 710049, China;

²⁾Bioinspired Engineering and Biomechanics Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

³⁾Department of Chemistry, School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

⁴⁾Suzhou DiYinAn Biotechnology Co., Ltd., Suzhou 215000, China)

Abstract Early diagnosis of cancer can increase the survival rate of patients. Minimally invasive liquid biopsy can avoid the problems of invasion and heterogeneity of traditional tumor biopsy methods, also is becoming a new approach for cancer diagnosis. In addition, DNA methylation as a marker to predict the occurrence and development of cancer has aroused more and more researchers' interest. But the traditional DNA methylation detection methods usually possess poor sensitivity and false positive. In recent years, digital PCR technology has been used for quantitative detection of DNA methylation because of its super sensitivity, better accuracy and the advantage of absolute quantification of nucleic acids without standard curve. Firstly, this review introduced the relationship between DNA methylation and carcinogenesis, then summarized the traditional detection methods of DNA methylation and their applications in clinical cancer early diagnosis. Secondly, the digital PCR based on different methods of nucleic acid sample dispersion and its advantages in the detection of DNA methylation are elaborated. Also, this review summarized the specific steps of using digital PCR to detect DNA methylation in body fluids for cancer diagnosis. Finally, we reviewed the research results and application progress of digital PCR in cancer DNA methylation detection. The possible challenges in the future of digital PCR in cancer DNA methylation detection are put forward and the opportunity of digital PCR in cancer liquid biopsy are prospected.

Key words DNA methylation, digital PCR, liquid biopsy, cancer early diagnosis

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0190

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21775117, 11120101002), The China Postdoctoral Science Foundation (2016M592773), the High Level Returned Overseas Students Foundation ([2018]642) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (xjh012019044).

** Corresponding author.

Tel: 86-29-82667486, E-mail: feili@mail.xjtu.edu.cn

Received: August 15, 2019 Accepted: October 8, 2019