

Progress of DNA Methylation Biomarkers in Fecal Samples for Colorectal Cancer Screening

Jiajie Wei^{1,2} Huiqing Zhang²

1. Chengde Medical College, Chengde, Hebei, 067000, China
2. Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei, 071000, China

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-related deaths, claiming millions of lives each year and imposing a heavy burden on public health systems. Although existing screening methods such as fecal immunochemical test (FIT) and colonoscopy have reduced CRC mortality to some extent, their limitations have prompted researchers to explore more effective screening approaches. In recent years, detection technologies based on fecal DNA methylation biomarkers have attracted considerable attention due to their non-invasiveness, high sensitivity, and specificity. This article reviews the research progress of DNA methylation biomarkers in CRC screening, compares their advantages and disadvantages with traditional screening methods, and discusses future development directions.

Keywords

colorectal cancer; DNA methylation; stool detection; Early diagnosis; Epigenetics

粪便样本中 DNA 甲基化生物标志物在结直肠癌筛查中的进展

魏家杰^{1,2} 张惠卿^{2*}

1. 承德医学院, 中国·河北承德 067000
2. 保定市第一中心医院, 中国·河北保定 071000

摘要

结直肠癌 (Colorectal Cancer, CRC) 是癌症相关死亡的主要原因之一, 每年导致数百万患者丧生, 给公共卫生系统带来沉重负担。尽管现有的筛查方法如粪便潜血试验 (FIT)、结肠镜检查等在一定程度上降低了CRC的死亡率, 但其局限性促使研究者探索更有效的筛查手段。近年来, 基于粪便DNA甲基化生物标志物的检测技术因其非侵入性、高敏感性和特异性而备受关注。本文综述了DNA甲基化生物标志物在CRC筛查中的研究进展, 比较了其与传统筛查方法的优劣, 并探讨了未来发展方向。

关键词

结直肠癌; DNA甲基化; 粪便检测; 早期诊断; 表观遗传学

1 引言

结直肠癌 (Colorectal Cancer, CRC) 是全球第三大常见癌症, 也是癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。根据GLOBOCAN 2020年的数据, 全球每年新增CRC病例超过190万例, 死亡病例约93.5万例^[2]。尽管筛查技术的进步显著降低了CRC的死亡率, 但仍有约三分之一的50-75岁成年人未接受推荐的筛查^[3]。传统的CRC筛查方法包括粪

便潜血试验 (FIT)、结肠镜检查等, 但这些方法存在假阳性/假阴性率高、侵入性强或患者依从性低等问题^[4]。因此, 开发更高效、非侵入性的筛查方法成为研究热点。DNA甲基化作为表观遗传修饰的重要形式, 在CRC的发生发展中起关键作用。异常的DNA甲基化模式可导致抑癌基因沉默或原癌基因激活, 进而促进肿瘤发生^[5]。粪便DNA甲基化检测通过分析肿瘤脱落细胞中的甲基化标志物, 为CRC的早期诊断提供了新思路。本文旨在综述DNA甲基化生物标志物在CRC筛查中的应用现状及未来前景。

2 传统结直肠癌筛查方法的局限性

结直肠癌 (CRC) 是唯一一种已被证明通过筛查可以降低平均风险女性和男性癌症死亡率的癌症。目前有多种筛

【作者简介】魏家杰 (1998-), 男, 中国天津人, 在读硕士, 医师, 从事普通外科疾病研究。

【通讯作者】张惠卿 (1972-), 男, 中国河北保定人, 博士, 主任医师, 从事普通外科疾病方便研究。

查测试可供选择, 每种测试都有其自身的优势和局限性^[6]。CRC 筛查指南因国家而异, 包括开始年龄和筛查策略^[7]。其筛查方法主要分为粪便检测和内镜检查两大类。粪便免疫化学检测 (FIT) 凭借特异性检测人珠蛋白的优势, 展现出 79% 的灵敏度和 94% 的特异性, 且不受饮食药物干扰, 较传统愈创木脂法 (gFOBT) 更具可靠性, 后者易受红肉、蔬菜等饮食因素影响产生假阳性或假阴性结果。内镜检查中, 结肠镜检查作为金标准虽具有较高准确性, 但存在 0.04% 穿孔率和 0.8% 出血风险, 且右半结肠腺瘤漏诊率达 26%; 乙状结肠镜虽操作简便但仅能检查远端结肠, 对近端病变检出能力有限。新兴筛查技术如 CT 结肠成像 (CTC) 虽为非侵入性检查, 但仍需肠道准备且存在辐射暴露问题; 最新一代结肠胶囊内镜对 $\geq 6\text{mm}$ 腺瘤的检出率达 88%, 但对无蒂锯齿状息肉的识别仍存在 26% 的假阴性率。

3 DNA 甲基化生物标志物在早期结直肠癌检测中的潜力

目前对结直肠癌疾病进展的探究已经有了显著的发展, 强调了遗传和表观遗传改变在驱动疾病过程中的作用。在这些改变中, 异常 DNA 甲基化, 特别是基因启动子内 CpG 位点的甲基化, 已被认为是癌症发展的标志, 包括 CRC^[8]。在 CRC 中, 遗传突变和表观遗传变化的积累, 如 DNA 甲基化, 导致参与细胞生长、分化和凋亡的关键细胞通路的失调。基因组中特定 CpG 位点的异常甲基化可以沉默肿瘤抑制基因或激活癌基因, CRC 检测的一个值得注意的方面是基于粪便的 DNA 检测的潜在效用^[9]。结直肠癌患者的粪便标本通常含有脱落的肿瘤细胞, 提供了一种非侵入性的肿瘤源 DNA 来源。通过检测粪便样本中特定基因的甲基化 DNA, 可以识别结直肠癌或癌前病变的个体, 为早期发现和干预提供了一个有前途的途径。目前, 三种非侵入性甲基化生物标志物 -N-Myc 下游调节基因 4 (NDRG 4), 骨形态发生蛋白 3 (BMP 3), 和 Septin 9 (SEPT 9) - 在美国已获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 的 CRC 筛查批准, 另一个测试标志物, Vim 甲基化, 目前已上市, 但正在等待 FDA 的批准^[10]。粪便样本显示 CRC 的阳性检出率明显较高 (93.4%) 和腺瘤 (81.3%), 特异性为 94.3%。此外, I 至 III 期 CRC 患者粪便样品中的 TFPI 2 甲基化已显示出作为早期 CRC 检测的生物标志物的前景, 灵敏度范围为 76% 至 89%, 特异性范围为 79% 至 93%^[11-13]。将 TFPI 2 甲基化标记到粪便 DNA 中可以增强非侵入性 CRC 筛查策略。

通常, 实体瘤中异常甲基化基因是早期癌症检测的合适生物标志物, 并且可以在粪便样本中容易地检测到。例如, 在先前的研究中, 甲基化 SDC 2 对于 CRC 的总体灵敏度为 90.0%, 对于晚期腺瘤为 33.3%, 在粪便样本中通过线性靶向富集 - 定量甲基化特异性 PCR 的特异性为 90.9%^[14]。

4 粪便 DNA 甲基化检测优于传统方法

基于粪便的 CRC 筛查由于其非侵入性和易于样本收集而具有前景。它依赖于从脱落到粪便中的肿瘤细胞中检测生物标志物, 提供了一种简单的方法来识别 CRC 或癌前病变。这种方法更容易被患者接受, 并可能增加筛查参与率。CRC 从良性息肉到恶性肿瘤的进展涉及遗传和表观遗传结肠上皮细胞的变化^[15]。基于粪便的筛查方法可以潜在地检测这些变化, 例如异常的 DNA 甲基化模式或基因突变, 为早期检测和干预提供有价值的信息^[16]。一项研究比较了一种非侵入性的, 多靶点粪便 DNA 检测与粪便免疫化学检测 (FIT) 在结直肠癌平均风险个体中的比较^[17]。这项研究把 9, 989 名参与者被纳入研究, 其中 65 名患有结直肠癌, 757 名在结肠镜检查中表现为晚期癌前病变。多靶点粪便 DNA 检测发现 65 名受试者中的 60 名, 其敏感为 92.3%。灵敏度根据癌症分期或肿瘤在结肠内的位置没有显著变化。在 757 名患有晚期癌前病变的受试者中, DNA 检测检测到 321 例, 其中包括 39 例高度不典型增生中的 27 例 (69.2%) 和 99 例 1cm 或更大的无柄锯齿状息肉中的 42 例 (42.4%)。DNA 检测对远端晚期癌前病变的敏感性高于近端病变, 测试灵敏度随着病灶大小的增加而增加。癌症或晚期癌前病变的检测灵敏度因年龄或实验室检测部位而异 (数据未显示)。在结直肠癌或晚期癌前病变 (例如, 非晚期腺瘤或阴性结果) 以外的 9167 名参与者中, DNA 检测的特异性 (真阴性率) 为 86.6%。在结肠镜检查结果完全阴性的 4457 名受试者中, 特异性为 89.8%; 在该亚组中, 65 岁以下受试者的特异度为 94.0%, 65 岁或以上受试者的特异度为 87.1% ($P < 0.001$)。FIT 检测到 65 例癌症中的 48 例, 757 例晚期癌前病变中的 180 例, 结果显著低于 DNA 检测)。DNA 检测检测到 FIT 未检测到的 757 个晚期癌前病变中的 170 个, 而 FIT 检测到 29 个 DNA 检测未检测到的此类病灶。在 757 名患有晚期癌前病变的受试者中, FIT 检测检测到 180 例, 其中包括 18 例 (46.2%) 高度不典型增生和 5 例 (5.1%) 1cm 或更大的无柄锯齿状息肉。在结直肠癌或晚期癌前病变以外的 9167 名受试者中, FIT 的特异性为 94.9%。在结肠镜检查结果为阴性的 4457 名受试者中, 特异性为 96.4%。在这两个亚组中, 特异性值优于 DNA 测试。FIT 的特异性因年龄而异。

5 粪便 DNA 甲基化检测的当前应用

随着表观遗传学方法在结直肠癌筛查中的出现, 对临床应用的价值越来越大。这些方法依赖于确定粪便 DNA 中特定的表观遗传学改变。目前已注册的使用粪便样本进行 CRC 筛查的 DNA 甲基化检测包括: Cologuard (Exact Science Co.)、ColoClear (New Horizon Health Technology Company, Ltd.)、Earlytect Colon (Genomictree, Inc.)、Colosafe (Creative Biosciences Guangzhou Company)、

Colowell (Shanghai Realbio Technology Company) 和 iColocomf (Wuhan Ammunition Life-tech Co)。Cologuard 和 ColoClear 分析 NDRG 4 和 BMP 3 的甲基化, 基于 KRAS 突变, 而其他测试依赖于 SDC2 甲基化状态。2014 年, Cologuard 获得了 FDA 的全面批准, 可用于 50 岁以上具有 CRC 平均风险的成年人。2019 年, 该适用范围扩大到 45 岁及以上。将人类血红蛋白的免疫化学测定与分子遗传学和表观遗传学分析相结合, 与传统的粪便免疫化学试验 (FIT) 相比, Cologuard 在检测 CRC 方面显示出显著更高的灵敏度 (92.3% [95% 置信区间 (CI), 83.0%-97.5%] vs. 73.8% [95% CI, 61.5%-84.0%]; $p = 0.002$)。然而, 根据试验 (ClinicalTrials.gov 标识符 NCT 01397747), FIT 在具有非晚期或阴性结果的参与者中表现出更高的特异性 (86.6% [95% CI, 85.9%-87.2%] 对比 94.9% [95% CI, 94.4%-95.3%]; $p < .001$)。NCCN CRC 筛查指南 (第 2 版 2022 年)、ACS CRC 筛查指南 (2018 年) 和 USPSTF CRC 筛查建议 (2021 年) 均建议使用 Cologuard 作为 CRC 筛查策略。经韩国监管机构批准的 EarlyTect-Colon Cancer (Genomictree, South Korea) 与经中国国家药品监督管理局批准的 Colosafe (Creative Biosciences China) 是两种基于粪便的 DNA 检测 (sDNAs) [18, 19]。这两种市售试剂盒专门设计用于检测甲基化 Syndecan2 (SDC2) 基因。此外, iColocomf 设计用于检测粪便中甲基化 SDC2 DNA 沿着 TFPI2, 从而扩大了结肠直肠癌筛查的选择 [20]。

6 讨论

根据 2020 年全球癌症数据 [1], 结肠直肠癌是全球第二大常见肿瘤, 死亡人数众多。在理论上, 定期的无创监测可以发现大多数早期或初期的 CRC, 最大限度地降低进展的风险。粪便 DNA 甲基化检测用于结肠直肠癌筛查提供了一种有前途的方法, 由于其非侵入性的性质, 易于管理, 并具有早期检测的潜力。虽然它们有几个优点, 但仍存在假阳性和假阴性等挑战。临床对结肠直肠癌 (CRC) 筛查的表观遗传解决方案的兴趣已经增长, 重点是粪便 DNA 中的特定表观遗传改变。ColoClear, Earlytect Colon, Colosafe 和 Colowell 利用 DNA 甲基化进行 CRC 筛查。需要进一步研究以优化其有效性并将其整合到临床实践中。最终目标是开发一种简单, 具有成本效益, 用于对中等风险人群进行分层并识别需要进一步治疗结肠直肠癌或腺瘤的个体的准确方法。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer J Clinicians* (2021) 71:209–49. doi:10.3322/caac.21660

[2] Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, et al. Global Burden of Colorectal Cancer in 2020

and 2040: Incidence and Mortality Estimates from GLOBOCAN. *Gut* (2023) 72:338–44. doi:10.1136/gutjnl-2022-327736

[3] Lotfollahzadeh S, Recio-Boiles A, Cagir B. *Colon Cancer*. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing (2024).

[4] Leach KM, Granzow ME, Popalis ML, Stoltzfus KC, Moss JL. Promoting Colorectal Cancer Screening: A Scoping Review of Screening Interventions and Resources. *Prev Med* (2021) 147:106517. doi:10.1016/j.ypmed.2021.106517

[5] Shen Y, Wang D, Yuan T, Fang H, Zhu C, Qin J, et al. Novel DNA Methylation Biomarkers in Stool and Blood for Early Detection of Colorectal Cancer and Precancerous Lesions. *Clin Epigenetics* (2023) 15:26. doi:10.1186/s13148-023-01443-7

[6] Ladabaum U, Dominitz JA, Kahi C, Schoen RE. Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology* (2020) 158:418–32. doi:10.1053/j.gastro.2019.06.043

[7] Song D, Wang F, Ju Y, He Q, Sun T, Deng W, et al. Application and Development of Noninvasive Biomarkers for Colorectal Cancer Screening: A Systematic Review. *Int J Surg* (2023) 109:925–35. doi:10.1097/JS9.0000000000000260

[8] Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res: GCR* (2012) 5:19–27.

[9] Zhang H, Qi J, Wu Y-Q, Zhang P, Jiang J, Wang Q-X, et al. Accuracy of Early Detection of Colorectal Tumours by Stool Methylation Markers: A Meta-Analysis. *World J Gastroenterol* (2014) 20:14040–50. doi:10.3748/wjg.v20.i38.14040

[10] Ye J, Zhang J, Ding W. DNA Methylation Modulates Epigenetic Regulation in Colorectal Cancer Diagnosis, Prognosis and Precision Medicine. *Exploration Targeted Anti-tumor Ther* (2024) 5:34–53. doi:10.37349/etat.2024.00203

[11] Hibi K, Goto T, Kitamura Y-H, Yokomizo K, Sakuraba K, Shirahata A, et al. Methylation of TFPI2 Gene Is Frequently Detected in Advanced Well Differentiated Colorectal Cancer. *Anticancer Res* (2010) 30:1205–7.

[12] Kang B, Lee HS, Jeon SW, Park SY, Choi GS, Lee WK, et al. Progressive Alteration of DNA Methylation of Alu, MGMT, MINT2, and TFPI2 Genes in Colonic Mucosa during Colorectal Cancer Development. *Cancer Biomarkers* (2021) 32:231–6. doi:10.3233/CCM-203259

[13] Glöckner SC, Dhir M, Yi JM, McGarvey KE, Van Neste L, Louwagie J, et al. Methylation of TFPI2 in Stool DNA: A Potential Novel Biomarker for the Detection of Colorectal Cancer. *Cancer Res* (2009) 69:4691–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0142.

[14] Oh TJ, Oh HI, Seo YY, Jeong D, Kim C, Kang HW, et al. Feasibility of Quantifying SDC2 Methylation in Stool DNA for Early Detection of Colorectal Cancer. *Clin Epigenetics* (2017) 9:126. doi:10.1186/s13148-017-0426-3

- [15] Liu R, Su X, Long Y, Zhou D, Zhang X, Ye Z, et al. A Systematic Review and Quantitative Assessment of Methylation Biomarkers in Fecal DNA and Colorectal Cancer and its Precursor, Colorectal Adenoma. *Mutat Research/Reviews Mutat Res* (2019) 779:45–57. doi:10.1016/j.mrrev.2019.01.003
- [16] Carmona FJ, Azuara D, Berenguer-Llargo A, Fernández AF, Biondo S, de Oca J, et al. DNA Methylation Biomarkers for Noninvasive Diagnosis of Colorectal Cancer. *Cancer Prev Res* (2013) 6:656–65. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-12-0501
- [17] Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *N Engl J Med* (2014) 370:1287–97. doi:10.1056/NEJMoa1311194
- [18] Ferrari A, Neefs I, Hoeck S, Peeters M, Van Hal G. Towards Novel NonInvasive Colorectal Cancer Screening **Methods: A Comprehensive Review.** *Cancers* (2021) 13:1820. doi:10.3390/cancers13081820
- [19] Wang Z, Shang J, Zhang G, Kong L, Zhang F, Guo Y, et al. Evaluating the Clinical Performance of a Dual-Target Stool DNA Test for Colorectal Cancer Detection. *J Mol Diagn* (2022) 24:131–43. doi:10.1016/j.jmoldx.2021.10.012
- [20] Ahlquist D, Zou H, Domanico M, Mahoney DW, Yab TC, Taylor WR, et al. Next-Generation Stool DNA Test Accurately Detects Colorectal Cancer and Large Adenomas. *Gastroenterology* (2012) 142:248–56. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.031