

精准狙击——肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003079

cg08721802 位点异常甲基化对良恶性肺结节
鉴别诊断的价值探讨

马苏红, 李培龙, 谢 艳, 杜鲁涛, 王传新

(山东大学第二医院检验医学中心、山东省肿瘤标志物检测工程实验室, 济南 250033)

【摘要】目的:探讨基于外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的DNA差异甲基化修饰位点在肺良恶性结节临床鉴别诊断中的价值。**方法:**采用850k甲基化芯片检测20例良性肺结节和34例恶性肺结节患者PBMCs的全基因组甲基化状态,初步构建PBMCs来源的良恶性肺结节特异性甲基化图谱并获得差异甲基化位点(differentially methylated positions, DMPs),对DMPs所在的基因进行基因本体(gene ontology, GO)分析及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析。利用LASSO回归分析方法对DMPs进行统计筛选。将36例良性肺结节患者和84例恶性肺结节患者随机分成2组队列(测试队列和验证队列),通过焦磷酸测序方法对所选的位点进行分析验证,并采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线进行分析,计算ROC曲线下面积(area under the curve, AUC),评估其对肺良恶性结节的预测效能。**结果:**发现队列的良恶性肺结节患者PBMCs差异甲基化图谱具有明显差异。以 $\Delta\beta>0.06$, adjust $P<0.01$ 作为预筛选条件共得到421个DMPs。使用LASSO回归分析进一步筛选得到6个CpG位点。根据Pearson相关分析,以及进一步去除具有引物错配风险及引物合成困难的位点,得到cg05460181(AUC=0.793, $P<0.0001$)和cg08721802(AUC=0.893, $P<0.0001$)2个位点。测试阶段,通过焦磷酸测序测试2个位点在16例良性肺结节患者及34例恶性肺结节患者中的甲基化水平,发现cg08721802位点对肺良恶性结节具有较高的诊断价值(AUC=0.778, 敏感度=85.29%, 特异度=56.25%, $P<0.01$)。验证阶段,在另一个包含20例良性肺结节患者及50例恶性肺结节患者的独立样本集中对cg08721802的甲基化水平进行检测,发现其对区分良恶性肺结节仍具有临床价值(AUC=0.768, 敏感度=84%, 特异度=50%, $P<0.01$),cg08721802位点诊断效能明显高于传统肿瘤标志物,cg08721802位点与CEA结合明显提高了对大小为6~20 mm的结节诊断价值。**结论:**cg08721802甲基化水平在良恶性结节患者中具有明显差异,可以作为良恶性肺结节鉴别诊断的新型分子标志物。

【关键词】良恶性肺结节;DNA甲基化;外周血单个核细胞;鉴别诊断标志物**【中图分类号】**R734**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-06-12Value of abnormal methylation of cg08721802 locus in differential diagnosis
of benign and malignant pulmonary nodules

Ma Suhong, Li Peilong, Xie Yan, Du Lutao, Wang Chuanxin

(Department of Clinical Laboratory, The Second Hospital of Shandong University/Tumor Marker Detection
Engineering Laboratory of Shandong Province)

【Abstract】Objective: To investigate the value of DNA differential methylation modification sites based on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in the differential diagnosis of benign and malignant pulmonary nodules. **Methods:** The genome-wide methylation status of 20 cases of benign pulmonary nodules and 34 cases of malignant pulmonary nodules were detected by 850k methylation bead chip. The specific methylation maps of benign and malignant pulmonary nodules derived from PBMCs were preliminarily constructed to obtain differentially methylated positions (DMPs). Gene ontology (GO) analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis were performed to analyze the genes where DMPs were located. LASSO regression analysis was used to screen DMPs. The 36 patients with benign pulmonary nodules and 84 patients with malignant lung nodules were randomly divided into two groups of cohorts (test group and validation group). The selected sites were analyzed and validated through the pyrophosphate sequencing method, the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was adopted, and the area under the ROC curve (AUC) was calculated to evaluate its prediction effectiveness of benign and malignant lung nodules. **Results:** The PBMCs differential methylation

作者介绍:马苏红, Email: 921153009@qq.com,

研究方向:肺良恶性结节的鉴别诊断。

通信作者:王传新, Email: cxwang@sdu.edu.cn。**基金项目:**肿瘤大数据与精准医疗技术创新研究资助项目(编号: YDZX2021014);济南市高校创新团队资助项目(编号: 2019GXRC004、2021GXRC020)。**优先出版:** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.0935.018.html>
(2022-08-31)

tion profiles of patients with benign and malignant pulmonary nodules were significantly different in the cohort. A total of 421 DPMs were obtained with $\Delta\beta > 0.06$ and adjust $P < 0.01$ as pre-screening condition. Six CpG loci were further screened by LASSO regression model. Two loci, cg05460181 ($AUC = 0.793$, $P < 0.0001$) and cg08721802 ($AUC = 0.893$, $P < 0.0001$), were obtained based on Pearson correlation analysis and further removal of loci with primer mismatch risk and primer synthesis difficulty. In the test phase, the methylation levels of the two sites in 16 benign pulmonary nodules and 34 malignant pulmonary nodules were tested by pyrosequencing, and it was found that cg08721802 had high diagnostic value for benign and malignant pulmonary nodules ($AUC = 0.778$, sensitivity=85.29%, specificity=56.25%, $P < 0.01$). In the validation phase, the methylation level of cg08721802 was detected in an independent sample set of 22 patients with benign pulmonary nodules and 51 patients with malignant pulmonary nodules. It was found that cg08721802 still had diagnostic value in differentiating benign and malignant pulmonary nodules ($AUC = 0.768$, sensitivity=84%, specificity=50%, $P < 0.01$). The diagnostic efficiency of cg08721802 locus was significantly higher than that of traditional tumor markers, and the combination of cg08721802 locus with CEA could significantly improve the diagnostic value of nodules with a size of 6–20 mm. **Conclusion:** The methylation level of cg08721802 is significantly different in patients with benign and malignant pulmonary nodules, which can be used as a new molecular marker for the differential diagnosis of benign and malignant pulmonary nodules.

[Key words] benign and malignant pulmonary nodule; DNA methylation; peripheral blood mononuclear cell; differential diagnostic marker

孤立性肺结节(solitary pulmonary nodule, SPN)是指肺实质内直径 ≤ 30 mm的单个、类圆形密度增高影,同时无肺不张、肺门淋巴结肿大及胸腔积液等影像表现^[1]。根据病理组织学分为良性肺结节和恶性肺结节,良性结节包括肺错构瘤、肉芽肿、炎性假瘤等,恶性主要有肺腺癌、细支气管肺泡癌、肺鳞状细胞癌等^[2]。治疗方面,良性肺结节主要以观察随访为主,恶性肺结节需要及时手术,若对恶性结节评估不足会增加癌症转移风险。如果对良性结节误诊会导致过度医疗引起医疗资源浪费,并给患者带来痛苦。因此,对于良恶性肺结节的准确鉴别至关重要,也是一个重要的临床难题。病理组织学检查是鉴别诊断良恶性肺结节的金标准,但是需要手术或介入等侵入性方法,而且对孤立性肺结节良恶性鉴别诊断效能如何鲜见报道。目前胸部低剂量CT(low-dose computed tomography, LDCT)是临床诊断该疾病的常见无创检查方式。美国国家肺部筛查试验(National Lung Screening Trial, NLST)表明,采用低剂量CT对高危人群肺癌的筛查可降低死亡率^[3]。然而,低剂量CT缺乏区分良恶性肺结节的准确性,导致假阳性率居高不下。此外,肿瘤标志物(NSE、CEA、CY-FRA21-1)也广泛应用于临床,但是缺乏令人满意的敏感度和特异度。

DNA甲基化是公认的对疾病发生进展具有重要影响的表观遗传修饰之一,其由DNA甲基转移酶和DNA去甲基化酶平衡,在异染色质结构维持和基因表达调控中发挥关键作用^[4]。大量研究表明,异常的DNA甲基化会导致肿瘤发生,主要通过整体低

甲基化、多个基因组区域(主要是CpG岛)的局灶性高甲基化及甲基化胞嘧啶的直接突变发挥作用^[5-9]。此外,有研究发现,在肺腺癌的发展过程中,甚至在非典型腺瘤样增生(atypical adenomatous hyperplasia, AAH)形成之前就会发生DNA甲基化改变^[10]。外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)主要包括外周血中的淋巴细胞、单核细胞等具有单个核的细胞。研究发现PBMCs来源的异常DNA甲基化可作为癌症诊断和治疗的潜在标志物^[11-12],且PBMCs的分离成本低、操作简便无创。

本研究通过探究良恶性肺结节患者PBMCs中的全基因组DNA甲基化状态,选择异常甲基化的位点作为研究对象,旨在为良恶性肺结节的无创性鉴别诊断提供新的标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 样本收集 纳入2019年6月至2022年2月山东大学第二医院就诊的56例良性和118例恶性肺结节患者。经CT/LDCT筛查肺结节阳性的患者,在手术切除前收集其EDTA抗凝全血。本研究已获得山东大学第二医院伦理审批委员会同意,批准号:KYLL-2020(KJ)P-0137。所有样本在收集之前均已告知患者并且获得患者同意。

1.1.2 纳排标准 病例纳入标准:病理组织学诊断为良性肺结节及早期恶性肿瘤且在收集样本时未接受任何治疗。病例排除标准:免疫系统疾病、血液系统疾病、炎症性疾病、其他癌症或转移癌以及有肺癌家族史。

1.1.3 样本处理 符合预选标准的患者术前抽取2~3 mL血

液, 48 h 内在无明显溶血情况下使用人外周血淋巴细胞分离液 (Histopaque®-1077, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司) 分离出 PBMCs, 保存于 -80°C 。通过 DNA 提取试剂盒 (血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 DP304, 购自北京天根生化科技有限公司) 对 PBMCs 进行 DNA 提取, 使用 Nanodrop2000C 检测 DNA 浓度和纯度。提取出的 DNA 通过亚硫酸盐转化试剂盒 (EZ DNA Methylation Gold Kit, D5006, 购自美国 AYO RESEARCH 公司) 进行亚硫酸盐转化并纯化后置于 -20°C 下保存, 避免反复冻融。

1.2 研究方法

1.2.1 850k 甲基化芯片检测 对 20 例良性肺结节 (包括错构瘤、肉芽肿、炎性假瘤、慢性炎症、纤维瘤、支气管腺瘤等) 和 34 例恶性结节 (原位癌、I 期恶性肿瘤) 采用 Illumina Infinium® Human Methylation 850 BeadChip 进行全基因组 (覆盖不同基因区域, 包括 TSS1500、TSS200、5'UTR、3'UTR、1stExon 和 Body 大约 850 000 个 CpG 位点) 进行甲基化测序, 确定高甲基化和低甲基化位点, 以 $\Delta\beta > 0.06$ 且 $\text{adjust } P < 0.01$ ($\Delta\beta = \text{恶性肺结节平均甲基化水平} - \text{良性肺结节平均甲基化水平}$; P 值已经过 Benjamini-Hochberg 方法校正) 作为预筛选条件筛选出差异位点。

1.2.2 焦磷酸测序 经亚硫酸盐处理后的 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增后的产物带有生物素标记与亲和素标记的微珠相混合, 最终在焦磷酸测序仪上进行测序。

1.2.3 GO 和 KEGG 富集分析 使用 R 包 “cluster Profiler” 的基因本体 (gene ontology, GO) 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 进行细胞功能、生物学过程、分子功能及信号通路进行预测。

1.3 统计学处理

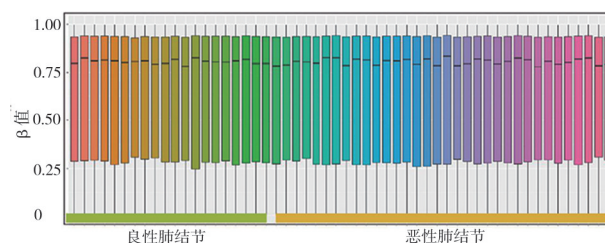
使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 采用 Shapiro-Wilk (S-W) 方法检验数据的正态分布特征。符合正态分布的数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两之间多重比较采用 LSD- t 检验。通过 R 语言实现热图、火山图、箱式图、GO、KEGG 图等。采用 Graph-Pad Prism 8.0 (San Diego, CA, USA) 软件绘制散点图, 使用 Med-Calculator 15.2.2 (Med-Calculator, Mariakerke, Belgium) 绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 计算曲线下面积 (area under the curve, AUC)。采用 Pearson 相关分析研究位点相关程度。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

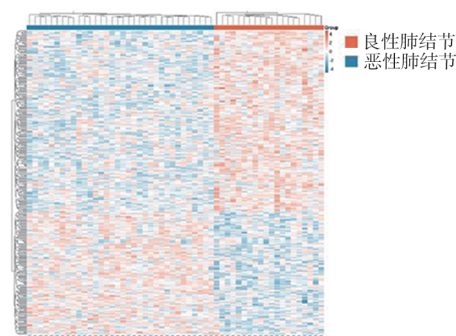
2.1 基于 PBMCs 的良恶性肺结节全基因组甲基化图谱的构建

利用 850k 芯片检测 20 例良性肺结节和 34 例恶性结节全基因组甲基化状态, 构建良恶性肺结节特异性甲基化图谱 (图 1)。箱式图表征良恶性结节每个样本的平均甲基化水平 (图 1A), 根据转录起始位点甲基化分析和无监督层次聚

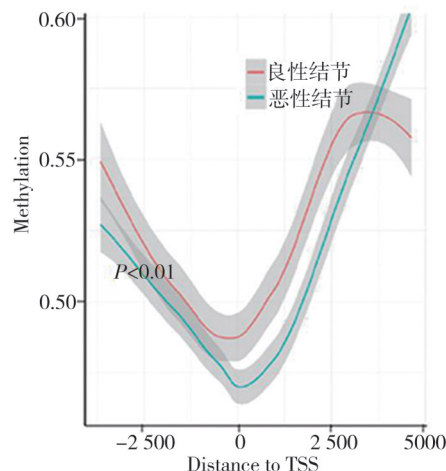
类分析显示良恶性肺结节甲基化状态存在明显差异 (图 1B、C)。总体来说, 恶性结节相较于良性结节甲基化水平降低, 与前人研究一致。以 $\Delta\beta > 0.06$ 且 $\text{adjust } P < 0.01$ 为条件筛选出来的 169 个高甲基化位点和 252 个低甲基化位点 (图 1D)。



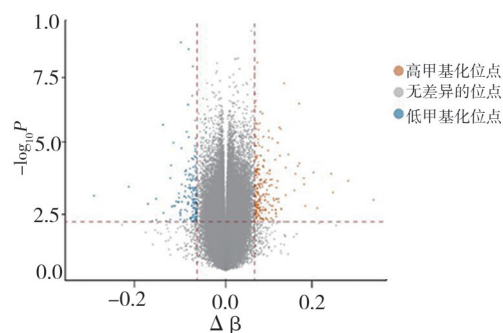
A. 表征单个样本的平均甲基化水平的箱式图



B. DMPs 聚类热图



C. TSS 图



D. DMPs 火山图

图 1 PBMCs 来源的良恶性肺结节特异性全基因组甲基化图谱

2.2 DMPs 在基因结构及 CpG 岛相关区域的分布以及基因的功能预测和通路分析

图 2A 提示, DMPs 大多数位点分布在 Inland 区, 其次在 N_Shore 区和 N_Shelf 区。进一步分析 DMPs 在 CpG 岛相关区域的分布, 发现 DMPs 均大多分布在 Body 区, 约 30% 分布在启动子区 (包括 TSS1500、TSS200、5' UTR 和 1stExon) (图 2B)。GO 分析结果显示, 差异甲基化位点功能主要富集在钙离子结合、细胞间黏附、质膜黏附分子等 (图 2C)。KEGG 分析显示, 基因主要参与细胞黏附、免疫细胞 Th17 细胞分化等通路 (图 2D)。这一结果表明, 负责免疫激活调控、细胞分化、黏附的特异性表观遗传信号可能对良性肺结节向早期肺癌的发展至关重要。

2.3 差异甲基化修饰 CpG 位点的筛选

发现队列中芯片检测的全基因组甲基化位点以 $\Delta\beta > 0.06$ 及 $\text{adjust } P < 0.01$ 作为筛选条件共得到 421 个 DMPs。使用 LASSO 回归分析进一步筛选得到 6 个 CpG 位点。根据 Pearson 相关分析 cg08721802 和 cg12755745 高度相关 ($r = 0.95, P < 0.01$) (图 3A), 进一步去除具有引物错配风险以及引物合成困难的位点, 最终 cg05460181、cg08721802 两个位点纳入下一步研究, 2 个位点甲基化修饰水平在良恶性肺结节之间比较均具有统计学意义 (图 3B)。ROC 分析显示,

cg05460181 区分良恶性结节的 AUC 达 0.793、cg08721802 的 AUC 达 0.893 (图 3C、D)。

2.4 差异甲基化修饰 CpG 位点的验证

将 36 例良性肺结节和 84 例恶性肺结节随机分为测试队列和验证队列, 在测试队列 (16 例良性肺结节和 34 例恶性肺结节患者) 对 2 个 DMPs 进行焦磷酸测序分析。结果显示, cg05460181 甲基化修饰水平在良恶性肺结节间不存在统计学差异, cg08721802 位点在恶性肺结节的甲基化水平低于良性肺结节组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 与位点在芯片检测中的甲基化水平趋势相符。ROC 分析显示, AUC 为 0.778 (95%CI=0.638~0.883, 敏感度=85.29%, 特异度=56.25%; 图 4A、B)。进一步在包含 20 例良性肺结节和 50 例恶性肺结节的验证队列样本集中进行验证 cg08721802 的甲基化水平, 结果显示 cg08721802 在验证组中仍具有统计学意义 ($P < 0.01$)。ROC 分析显示, AUC 为 0.768 (95%CI=0.652~0.860, 敏感度=84%, 特异度=50%; 图 4C、D)。在独立验证队列中, 选取肿瘤标志物 CEA 信息完整的样本 (9 例和恶性结节 31 例) 与 cg08721802 进行诊断效能比较, ROC 分析显示, cg08721802 的 AUC 为 0.787 (95%CI=0.624~0.903, 敏感度=89.66%, 特异度=44.44%), 诊断效能明显高于 CEA (AUC=0.511, 95%CI=0.344~0.677, 敏感度=55.17%, 特异度=55.56%; 图 5)。

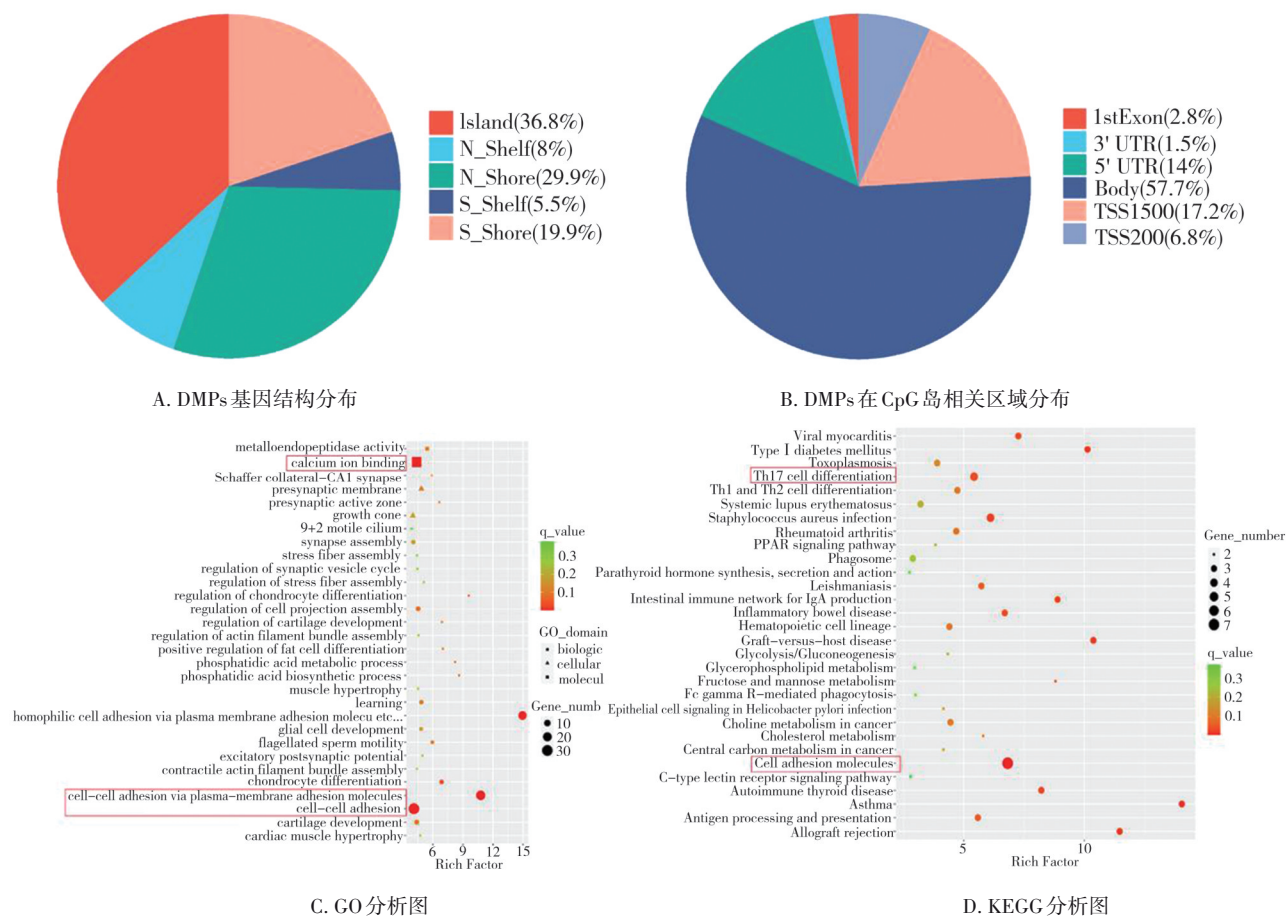


图 2 DMPs 基因分布图及 GO 和 KEGG 分析图

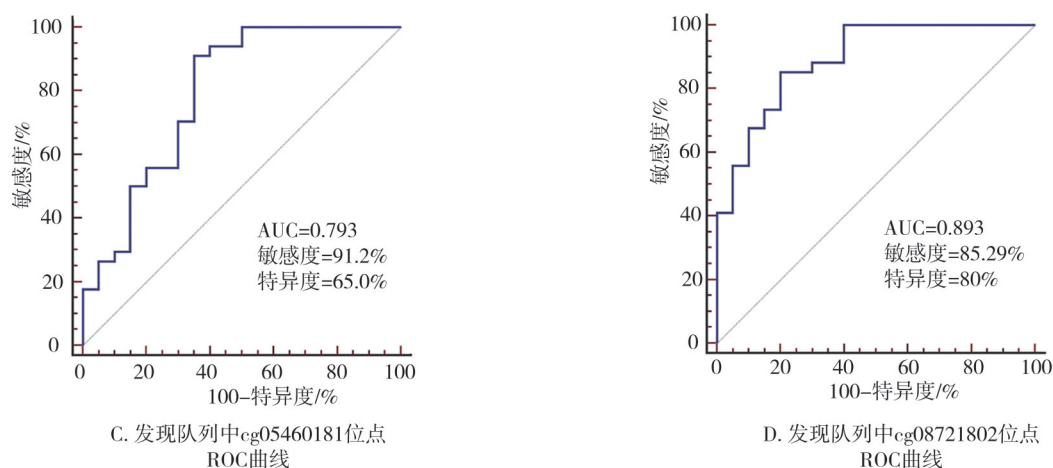
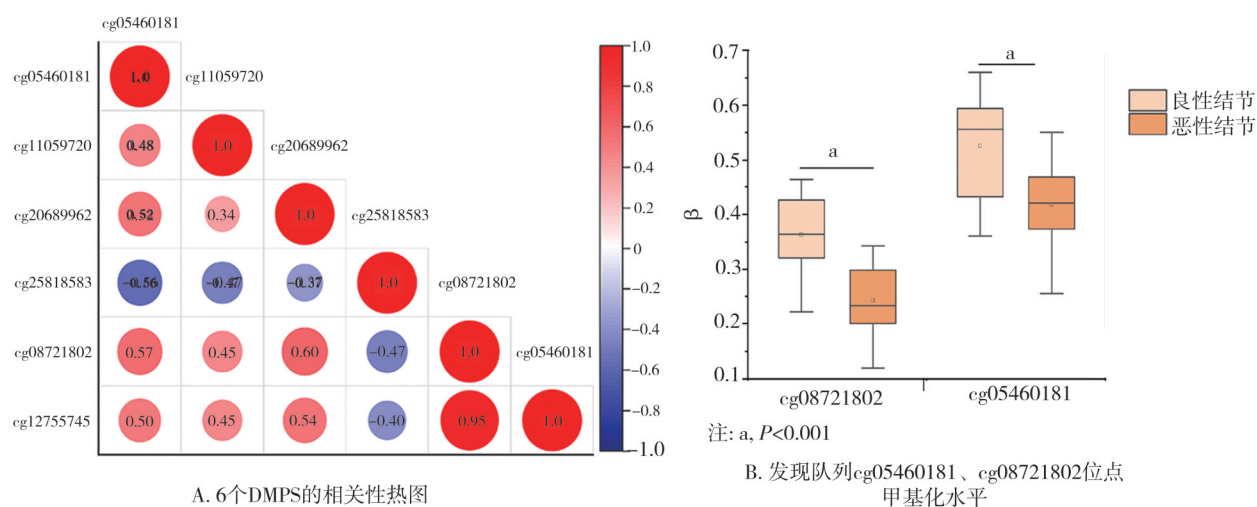


图3 差异位点筛选

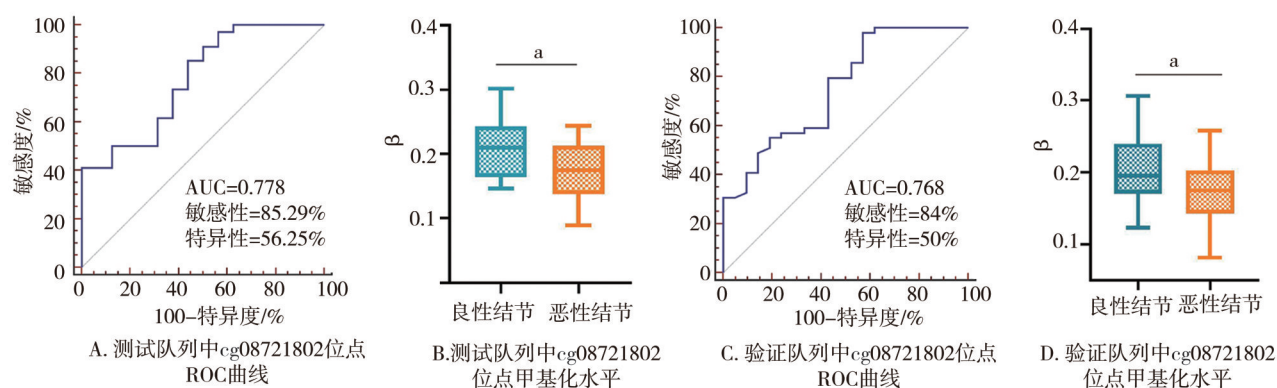
注: a, $P < 0.01$

图4 差异位点的测试及验证

2.5 cg08721802 甲基化水平对 6~20 mm 结节的诊断效能

在独立验证队列中,选取 CT 影像学报告中 6~20 mm 大小的结节 (17 例和恶性结节 46 例) 进行位点诊断效能分析, ROC 分析显示, AUC 为 0.782 (95%CI=0.661~0.876, 敏感度=85.11%, 特异度=52.94%; 图 6A)。选取大小 6~20 mm 结节的

肿瘤标志物 CEA 信息完整的样本 (7 例和恶性结节 30 例) 与 cg08721802 以及 cg08721802 与 CEA 结合诊断进行诊断效能比较, ROC 分析显示, cg08721802 + CEA (AUC=0.829, 95%CI=0.669~0.932, 敏感度=86.67%, 特异度=57.14%) 诊断效能高于 cg08721802 (AUC=0.805, 95%CI=0.641~0.916, 敏

感度=83.33%, 特异度=57.14%), 明显高于 CEA (AUC=0.536, 95%CI=0.365~0.701, 敏感度=66.67%, 特异度=42.86%; 图 6B)。

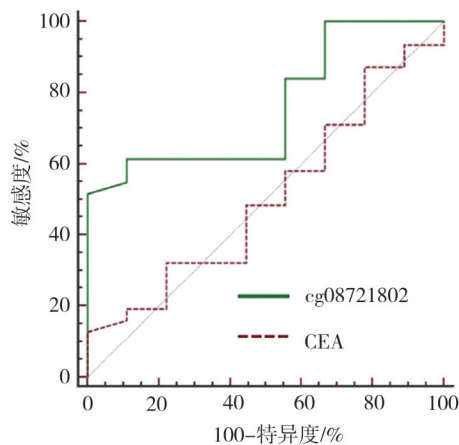
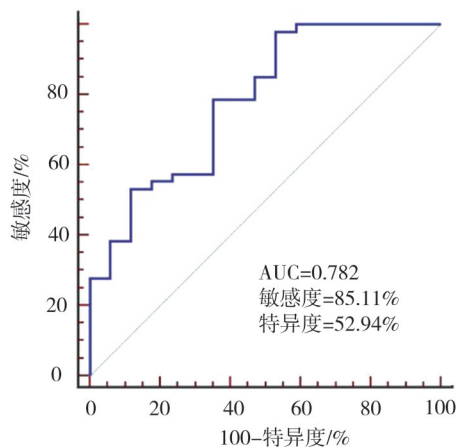
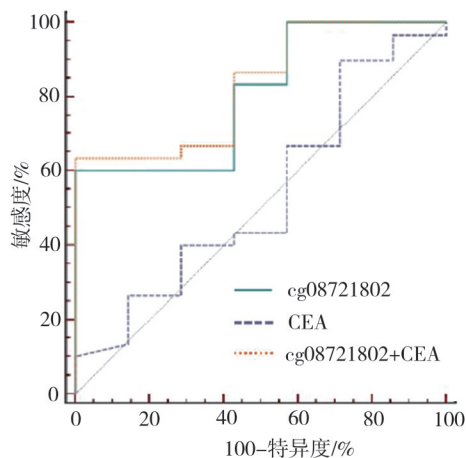


图5 cg08721802位点与CEA在验证队列中ROC曲线对比图



A. cg08721802位点在验证队列大小6~20 mm 结节中ROC曲线图



B. cg08721802位点与CEA以及cg08721802与CEA结合在验证队列大小为6~20mm 结节中ROC曲线对比图

图6 cg08721802位点在大小6~20 mm 结节中诊断效能图

2.6 cg08721802 甲基化水平与临床病理特征的关系

分析该位点甲基化水平与患者的临床病理参数发现, cg08721802 位点甲基化水平与患者年龄、性别、吸烟史、结节大小等无相关性, 与良性结节患者的病理类型, 恶性结节的分期均无相关性(表1、表2)。

表1 cg08721802 位点在芯片发现队列中甲基化水平与各组患者临床病理特征关系

项目	β 值	统计量	P 值
性别			
良性结节		-0.575 ^a	0.573
男(n=12)	0.352 4 ± 0.069 5		
女(n=8)	0.370 7 ± 0.069 9		
恶性结节		-0.760 ^a	0.453
男(n=15)	0.249 5 ± 0.058 6		
女(n=19)	0.232 4 ± 0.067 4		
年龄/岁			
良性结节		0.538 ^a	0.598
<59(n=10)	0.372 2 ± 0.059 8		
≥59(n=10)	0.354 5 ± 0.083 3		
恶性结节		1.178 ^a	0.085
<56.5(n=17)	0.261 6 ± 0.061 2		
≥56.5(n=17)	0.223 4 ± 0.064 1		
吸烟史			
良性结节		1.099 ^a	0.286
是(n=15)	0.353 7 ± 0.072 5		
否(n=5)	0.392 4 ± 0.050 1		
恶性结节		0.126 ^a	0.901
是(n=27)	0.247 7 ± 0.070 9		
否(n=7)	0.244 4 ± 0.063 1		
肿瘤大小/mm			
良性结节		0.535 ^a	0.612
<18.0(n=4)	0.371 9 ± 0.103 8		
≥18.0(n=4)	0.341 7 ± 0.044 5		
恶性结节		0.551 ^a	0.588
<8.0(n=9)	0.251 2 ± 0.064 2		
≥8.0(n=10)	0.233 2 ± 0.072 1		
病理诊断			
良性结节		3.752 ^b	0.504
肉芽肿(n=5)	0.340 0 ± 0.040 7		
错构瘤(n=6)	0.320 2 ± 0.075 1		
炎性假瘤(n=4)	0.358 3 ± 0.033 0		
其他(n=5)			
恶性结节		1.860 ^a	0.296
原位癌(n=23)	0.252 8 ± 0.065 9		
I 期肿瘤(n=11)	0.220 9 ± 0.589 6		

注:a, 独立样本 t 检验的 t 值; b: 单因素方差分析统计量 F 值

表2 cg08721802 位点在焦磷酸验证队列甲基化水平与各组患者临床病理特征关系

项目	β 值	统计量	P 值
性别			
良性结节		0.747 ^a	0.465
男(n=10)	0.228 5 ± 0.045 6		
女(n=10)	0.212 6 ± 0.040 3		
恶性结节		-0.158 ^a	0.875
男(n=18)	0.172 9 ± 0.037 7		
女(n=32)	0.171 2 ± 0.037 7		
年龄/岁			
良性结节		-0.455 ^a	0.655
<59(n=10)	0.215 7 ± 0.050 2		
≥59(n=10)	0.224 5 ± 0.045 6		
恶性结节		-1.905 ^a	0.063
<56(n=23)	0.159 8 ± 0.035 5		
≥56(n=27)	0.179 8 ± 0.038 2		
吸烟史			
良性结节		1.510 ^a	0.148
是(n=7)	0.237 2 ± 0.055 3		
否(n=13)	0.202 1 ± 0.036 5		
恶性结节		-0.477 ^a	0.635
是(n=5)	0.163 2 ± 0.026 8		
否(n=45)	0.171 9 ± 0.039 7		
结节大小/mm			
良性结节		0.192 ^a	0.850
<14.0(n=7)	0.226 0 ± 0.063 0		
≥14.0(n=9)	0.220 4 ± 0.052 8		
恶性结节		-0.482 ^a	0.632
<9.0(n=22)	0.171 6 ± 0.038 1		
≥9.0(n=21)	0.177 3 ± 0.039 4		
病理诊断			
良性结节		0.931 ^b	0.496
肉芽肿(n=6)	0.204 5 ± 0.028 8		
错构瘤(n=3)	0.205 6 ± 0.044 1		
炎性假瘤(n=7)	0.242 5 ± 0.056 3		
其他(n=4)			
恶性结节		0.618 ^a	0.435
原位癌(n=31)	0.174 3 ± 0.036 1		
I 期肿瘤(n=19)	0.165 5 ± 0.042 0		

注:a,独立样本 t 检验的 t 值;b:单因素方差分析统计量 F 值

3 讨 论

随着胸部 CT 在临床实践中的日益普及,越来越多的人被诊断为肺结节,这些人通常需接受长期的重复 CT 检查,甚至一些侵入性手术,如支气管镜检、经皮穿刺术或手术以确认病理结果,往往会造

成出血、感染、气胸等并发症,甚至有死亡风险。若对恶性结节评估不足,导致不及时手术,会增加癌症转移风险。现国内外手术及介入处置的时机仍没有很好的评判标准,依靠多学科协作诊疗可能是目前最适宜的方式。

DNA 甲基化是多种生物学过程和疾病中的主要表观遗传修饰之一,特别是在肿瘤的发生过程中^[13],DNA 甲基化的改变通常发生在癌症的早期阶段^[14]。近年来,随着 DNA 甲基化的分析技术和临床转化研究的突破,DNA 甲基化检测可以作为一种早期筛查和诊断肿瘤的新技术。一项基于矮小同源盒(SHOX2)基因、前列腺素 E 受体(PTGER4)基因 DNA 甲基化与传统肿瘤标志物(NSE、CEA、CY-FRA21-1)对良性和恶性肺结节的鉴别诊断研究揭示 SHOX2、PTGER4 和三者总甲基化的 AUC 远高于传统的血清标志物,其诊断性能优于传统的血清参数^[15]。Li M 等^[16]联合 3 个甲基化标记,即 cg08032924(CMTM2)、cg14823851(TBX4)和 cg19161124(DPP6),得出了这 3 种标记物在区分肺腺癌和正常组织方面可以达到较高的敏感性和特异性。在最近一项欧洲和中国肺癌病例对照研究中,结合 6 个甲基化标记物的血液检测(Lung EpiCheck),其能检测到高比例的早期肺癌,并在加入已确定的危险因素(年龄、吸烟、慢性阻塞性肺疾病等)后明显提高预测的准确性^[17]。因此,DNA 甲基化这种非侵袭性的检查方法展现了良好的应用前景。

肺癌的发生是一个多因素共同调节的过程,免疫细胞的功能状态异常与肿瘤的发生发展密不可分,免疫细胞的 DNA 甲基化可能在肿瘤的极早期就发生异常改变^[18],且 PBMCs 的分离成本低、操作简便无创。本研究将肺结节患者 PBMCs 样本分为 3 个队列,使用 850k 芯片检测对发现队列样本进行全基因组甲基化水平检测,通过筛选方法,筛选出 2 个差异性位点,并在测试队列中使用焦磷酸测序方法对 2 个位点进行验证,发现 cg08721802 甲基化水平在良恶性肺结节仍然具有明显差异,最终选取 cg08721802 位点进行独立验证。ROC 结果显示,AUC 为 0.768。将 cg08721802 位点与 CEA 进行比较,发现位点诊断效能远高于 CEA,表明 cg08721802 可以作为良恶性肺结节鉴别诊断的新型分子标志物。

新的肺成像报告和数据系统(肺-rads)分类和指南将 6 mm 结节的检测设置为阳性阈值。然而,对于中等风险结节的类别(通常大小为 6~20 mm),根据临床评估工具计算,恶性肿瘤的概率达 5%~65%,其鉴别诊断更具临床意义。本研究发现,

cg08721802 位点对大小为 6~20 mm 的肺结节鉴别诊断效能达 0.782, 敏感度为 85.11%, 特异度 52.94%, 相对于其他尺寸类型结节, cg08721802 位点对大小为 6~20 mm 的肺结节具有更佳的诊断效能。进一步统计发现, 在验证队列大小 6~20 mm 的结节中, cg08721802 的诊断效能明显高于 CEA, 而在 cg08721802 中加入 CEA 后发现诊断效能进一步提高。cg08721802 位点的甲基化水平与良恶性肺结节的临床病理特征无明显联系, 表明 cg08721802 的差异甲基化状态普遍存在于不同临床病理类型的肺结节患者。

本研究存在以下不足, cg08721802 位点异常甲基化在良恶性肺结节无创性筛查中具有一定价值, 但其应用推广还需要临床多中心及大数据的支持和验证。此外, 本研究发现, cg08721802 位点的甲基化水平在良恶性肺结节之间具有明显差异, 但其对基因表达的影响机制尚需进一步研究。今后将在大规模临床试验中验证 PBMCs 中 cg08721802 位点的鉴别诊断价值, 并进一步探究其甲基化改变在良性肺结节恶变过程中的机制。

综上所述, 本研究构建了基于 PBMCs 的良恶性肺结节特异性 DNA 甲基化图谱, 发现 cg08721802 位点在良恶性肺结节患者 PBMC 中低甲基化且具有良好的诊断效能, 有望成为良恶性结节鉴别诊断的潜在标志物。

参 考 文 献

- [1] Harzheim D, Eberhardt R, Hoffmann H, et al. The solitary pulmonary nodule[J]. *Respiration*, 2015, 90(2): 160-172.
- [2] 刘晓飞, 李鹏程, 何宝明, 等. ^{18}F -FDG PET/CT 显像联合血清肿瘤标志物组合在孤立性肺结节诊断中的价值[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(8): 1230-1234.
- [3] Liu XF, Li PC, He BM, et al. The diagnostic efficiency for solitary pulmonary nodules combined ^{18}F -FDG PET/CT imaging with serum tumor markers[J]. *J Mod Oncol*, 2017, 25(8): 1230-1234.
- [4] Grogan EL, Weinstein JJ, Deppen SA, et al. Thoracic operations for pulmonary nodules are frequently not futile in patients with benign disease[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(10): 1720-1725.
- [5] Jones PA. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(7): 484-492.
- [6] Hansen KD, Timp W, Bravo HC, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(8): 768-775.
- [7] Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(1): 40-46.
- [8] Bert SA, Robinson MD, Strbenac D, et al. Regional activation of the cancer genome by long-range epigenetic remodeling[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(1): 9-22.
- [9] Pfeifer GP, Tang M, Denissenko MF. Mutation hotspots and DNA methylation[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000, 249: 1-19.
- [10] Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(18): 4855-78.
- [11] Kerr KM, Galler JS, Hagen JA, et al. The role of DNA methylation in the development and progression of lung adenocarcinoma[J]. *Dis Markers*, 2007, 23(1/2): 5-30.
- [12] Zhang YH, Petropoulos S, Liu JH, et al. The signature of liver cancer in immune cells DNA methylation[J]. *Clin Epigenetics*, 2018, 10: 8.
- [13] Klümper N, Ralser DJ, Bawden EG, et al. LAG3 (LAG-3, CD223) DNA methylation correlates with LAG3 expression by tumor and immune cells, immune cell infiltration, and overall survival in clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000552.
- [14] Jones PA. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(7): 484-492.
- [15] Diaz-Lagares A, Mendez-Gonzalez J, Hervas D, et al. A novel epigenetic signature for early diagnosis in lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(13): 3361-3371.
- [16] Huang WH, Huang H, Zhang SS, et al. A novel diagnosis method based on methylation analysis of SHOX2 and serum biomarker for early stage lung cancer[J]. *Cancer Control*, 2020, 27(1): 1073274820969703.
- [17] Li M, Zhang C, Zhou LJ, et al. Identification and validation of novel DNA methylation markers for early diagnosis of lung adenocarcinoma[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(11): 2744-2758.
- [18] Gaga MN, Chorostowska-Wynimko J, Horváth I, et al. Validation of Lung EpiCheck, a novel methylation-based blood assay, for the detection of lung cancer in European and Chinese high-risk individuals[J]. *Eur Respir J*, 2021, 57(1): 2002682.
- [19] Parashar S, Cheishvili D, Mahmood N, et al. DNA methylation signatures of breast cancer in peripheral T-cells[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 574.

(责任编辑: 唐秋姗)