

论著·基础研究

Septin9 基因甲基化检测方法的建立及在结直肠癌 血浆标本检测中的应用探讨*

束新华¹, 潘志文¹, 包叶江¹, 金元¹, 叶柳青¹, 李德川², 谢玲女², 徐笑红^{1△}
(浙江省肿瘤医院: 1. 检验科; 2. 大肠外科, 杭州 310022)

摘要:目的 以荧光聚合酶链反应(PCR)技术为基础, 构建早期筛查结直肠癌的血液 Septin9 甲基化检测体系。方法 在美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库查找 Septin9 甲基化的 CpG 岛位点, 设计相应的 PCR 引物。提取结直肠癌组织和癌旁组织的 DNA, PCR 扩增并测序确认 Septin9 基因启动子区高甲基化位点。针对高甲基化位点, 设计荧光 PCR 和 Taqman 探针检测技术构建血浆标本甲基化检测体系, 并对该检测体系的准确度、特异度、重复性及最低检出量进行评估分析。在 57 例结直肠癌患者和 30 例健康人血浆标本中进行 Septin9 甲基化检测, 验证该检测体系的可靠性。结果 组织标本中经测序确认 Septin9 基因高甲基化位点。以该位点为靶点设计荧光 PCR 检测体系, 经评估, 该检测体系的准确度为 100%, 特异度和重复性均为 100%, 最低检出量可达 0.1 ng/ μ L。在 57 例结直肠癌患者血浆标本中, Septin9 甲基化位点检测的阳性率为 71.92% (41/57), 结直肠癌患者病理分期 I 和 II 期阳性率达 64.2%; 而健康人群血浆中 Septin9 基因均无甲基化。结论 以 Septin9 基因甲基化位点为靶标的水浆荧光 PCR 检测体系具有灵敏度、特异度及准确度高特点, 是结直肠癌早期筛查的可靠检测技术, 具有良好的临床应用前景。

关键词: Septin9 甲基化; 结直肠癌; 血浆; 早期诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.005

中图法分类号: R735.3

文章编号: 1673-4130(2018)01-0017-05

文献标识码: A

Establishment of methylation detection method for Septin9 gene and its application in plasma specimen detection in colorectal cancer*

SHU Xinhua¹, PAN Zhiwen¹, BAO Yejiang¹, JIN Yuan¹,
YE Liuqing¹, LI Dechuan², XIE Lingnv², XU Xiaohong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Colorectal Surgery, Zhejiang
Provincial Tumor Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310022, China)

Abstract: **Objective** To establish the blood Septin9 methylation detection system for early screening of colorectal cancer based on fluorescence PCR technology. **Methods** The PCR primer of Septin9 was designed by searching the CpG island site of Septin9 methylation in the NCBI database. The high methylation site of Septin9 gene promoter region was confirmed by PCR amplification and sequencing after extracting DNA from colorectal cancer and para-carcinoma tissues. The fluorescence PCR and TaqMan probe detection technique was designed by aiming at high methylation site for constructing the plasma sample methylation detection system. Then its accuracy, specificity, repeatability and minimum detectable amount were performed the assessment and analysis. The SETP9 methylation detection was performed in plasma samples from 57 cases of colorectal cancer and 30 healthy persons. **Results** The high methylation site of Septin9 gene in tissue samples was confirmed by sequencing. This site served as the target for designing fluorescence PCR detection system. After assessment, the accuracy, specificity and repeatability of this detection system were 100%, the lowest detection amount reached 0.1 ng/ μ L. Among the plasma samples in 57 cases of colorectal cancer, the positive rate of Septin9 methylation site detection was 71.92% (41/57) and the positive rate of in the patients with pathological stage I and II of colorectal cancer reached 64.2%. But Septin9 gene had no methylation in plasma of healthy population. **Conclusion** The plasma fluorescence PCR detection system with Septin9 gene methylation as the target has the characteristics of high sensitivity, high specificity and high accuracy, which is the reliable

* 基金项目: 浙江省公益技术应用研究计划资助项目(2015C33187)。

作者简介: 束新华, 男, 主管技师, 主要从事分子检测研究。 △ 通信作者, E-mail: zjhxxxh@163.com。

本文引用格式: 束新华, 潘志文, 包叶江, 等. Septin9 基因甲基化检测方法的建立及在结直肠癌血浆标本检测中的应用探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 17-20.

detection technique for the early screening of colorectal cancer and has good clinical application prospect.

Key words: Septin9 methylation; colorectal carcinoma; plasma; early screening

结直肠癌是常见消化道恶性肿瘤,发生率仅次于胃癌和食道癌。在我国常见恶性肿瘤的病死率中,结直肠癌患者在男性中占第 5 位,女性中占第 6 位。近 20 年来结直肠癌的发病率在逐渐增加。在我国超过 80% 患者确诊时已发展到中晚期,早期诊断率仅 10%~15%;国内调查显示,早期大肠癌术后存活率达 90%~95%,而晚期则只有 5%。手术治疗可使早期结直肠癌得到根治,而晚期结直肠癌经化学放疗联合分子靶向治疗后平均生存时间仍不足 30 个月。因此,结直肠癌的早期诊断显得非常重要和迫切。近年来研究表明 DNA 甲基化状态改变与结直肠癌的发生发展关系密切,并且贯穿整个肿瘤发生发展过程,也已发现多个基因的异常高甲基化在结直肠癌中频繁发生^[1-4]。因此,DNA 甲基化的异常有望作为结直肠癌早期诊断的分子标志物。Septin 广泛分布于除植物外所有真核生物中,具有 GTPase 活性的保守骨架蛋白基因家族,与细胞分裂有关^[5]。在人类中,其由 14 个家族成员组成,分别命名为 SEPT1~14,其中 Septin9 定位于 17q25.3。研究发现 Septin9 与肿瘤的发生直接相关且在不同的肿瘤中,其表达及功能不尽相同^[6]。在结直肠癌中,Septin9-v2 启动子区的 CPG 岛高度甲基化^[7]。LOFTONDAY 等^[8]和 WARREN 等^[9]发现 Septin9-v2 启动子区甲基化水平在结直肠癌组织中最高,而在健康人群和其他疾病中其甲基化水平明显降低,检测灵敏度为 70% (60%~77%),特异度为 86% (80%~91%)。因此 GLORIA 等^[10]和 SHAHIN 等^[11]认为 Septin9 启动子区异常甲基化可作为结直肠癌潜在的诊断标志物。目前,国内有关 Septin9 血浆检测的研究报道不多。本文采用聚合酶链反应(PCR)和测序的方法确认组织中 Septin9 基因的甲基化热点位点,改进后用于血浆中 Septin9 基因甲基化检测,探讨血浆 Septin9 基因甲基化检测在结直肠癌筛查中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院生物样本库中大肠癌外科 2011 年 5 月至 2014 年 9 月手术切除的结直肠癌组织标本 30 例,结直肠癌标本病理分期 I~IV 期分别为 1、4、9 和 16 例,所有结直肠癌标本均经病理证实。同时收集了 30 例肠炎组织样本,结直肠癌与肠炎患者间性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。后期收集了本院 57 例结直肠癌患者血浆样本和 30 例健康人血浆样本进行血浆实验,结直肠癌标本病理分期 I~IV 期分别为 1、6、20 和 30 例,两组性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者在术前均未接受过化疗或放疗,所有研究对象均对本研究知情同意并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 组织 DNA 提取试剂盒(天根生化

科技有限公司,货号:DP304);血浆 DNA 提取试剂盒(苏州为真生物医药技术股份有限公司);DNA 硫化试剂盒 EZ DNA Methylation-Gold Kito(Zymo Research,货号:D5006);PCR 扩增仪为 Roche LightCycler® 480 PCR 仪(罗氏公司)。

1.3 方法

1.3.1 Septin9 甲基化位点的选择 选择 Septin9-v2 基因的启动子区域的第 3 个 CPG 岛作为本检测方法的检测对象。具体基因片段如下列序列中方框所示:CG³³C G³⁴CG³⁵ acc CG³⁶c tgc cca cca gcc atc atg t CG³⁷ gac ccC G³⁸CG³⁹ gtc aaC G⁴⁰CG⁴¹ cag ctg gat ggg atc att tCG⁴² gac ttC G⁴³aa ggt ggg tgc tgg gct ggc tgc tgC G⁴⁴gc CG⁴⁵C G⁴⁶ga CG⁴⁷t gct gga gag gac c。

1.3.2 组织 DNA 的提取及硫化纯化 使用组织细胞 DNA 提取试剂分别提取结直肠癌组织标本和肠炎组织标本各 30 例,具体操作步骤按照说明书进行。血浆 DNA 提取按该试剂盒使用说明进行提取。根据说明书使用 DNA 硫化试剂盒对提取后的组织和血浆 DNA 进行硫化纯化。

1.3.3 测序引物和探针的设计合成 使用 Primer Premier 5 软件设计 Septin9 测序引物,引物分别是:上游 5'-CCT TCC TCC CCC ATT CAT TCA GCT G-3';下游 5'-CAG CAG CCA GCC CAG CAC CCA CC-3'。PCR 反应每孔加入 5.5 μLPCR Mix,1 μL SYBR-Green 染料,0.2 μL 的 DNA 聚合酶,13.3 μL 的组织 DNA 模板,总体积为 20 ng/μL。反应的程序为 95℃,5 min;50 个循环,每个循环中首先升温至 95℃,反应 10 s,其次降温至 56℃,20 s,最后升温至 72℃,30 s;50 个循环后体系升温至 95℃,5 s,降温至 65℃,1 min;继续降温至 40℃,30 s。使用 Septin9 甲基化测序引物对组织样本 DNA 硫化纯化产物进行扩增、测序,确定启动子区高甲基化位点。

1.3.4 血浆检测体系建立及 PCR 引物、探针、Blocker 序列设计 使用 Primer Premier 5 软件针对 Septin9 高甲基化位点进行血浆样本检测体系的引物和探针的设计,同时设计内参基因 ACTB 的引物和探针序列见表 1、2。

表 1 Septin9 基因及探针引物	
Septin9 项目	引物序列(5'→3')
上游引物	TTC GTT GTT TAT TAG TTA TTA TGT C
下游引物	TCG AAA TCC GAA ATA ATC CCA TCC A
探针引物	AAT CCC ATC CAA CTA CGC GTT AAC C
阻断引物	ATT AGT TAT TAT GTT GGA TTT TGT GGT
	TAA TGT GTA G

表 2 ACTB 基因及探针引物	
ACTB 基因项目	引物序列(5'→3')
上游引物	GTG ATG GAG GAG GTT TAG TAA GTT
下游引物	CCA ATA AAA CCT ACT CCT CCC TTA A
探针引物	ACC ACC ACC CAA CAC ACA ATA ACA AAC
	ACA

1.3.5 血浆检测体系 PCR 反应 PCR 反应体系的总体积为 30 μL。PCR 反应的程序为 95 ℃, 20 min; 50 个 PCR 循环, 每个循环中, 先升温至 62 ℃, 5 s, 再降温至 56 ℃, 反应 35 s, 最后升温至 94 ℃, 反应 20 s; 50 个循环反应后降温至 40 ℃, 反应 30 s, PCR 反应结束。每个 PCR 反应体系 30 μL, 最终反应体系浓度达到: 氯化镁(MgCl₂) 2.5 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, Septin9 引物(上下游) 350 nmol/L, 阻断剂引物 100 nmol/L, Septin9 探针 70 nmol/L, ACTB 基因引物(上下游) 170 nmol/L, ACTB 基因探针 70 nmol/L, DNA 聚合酶 1.5 U, DNA 模板 2~20 ng/μL, 补充 10×PCR 缓存液 buffer 到总体积 30 μL。

1.3.6 血浆检测体系准确度、特异度、重复性和最低检出量的评估分析 参照国食药监《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》的标准^[12], 分别检测甲基化阳性(甲基化率 10%)和非甲基化阴性参考品(无甲基化)以评估检测准确度; 检测 10 份非甲基化阴性参考品以评估特异度; 对同一样品重复检测 10 次以评估检测体系的重复性; 对含不同甲基化率的 DNA 进行检测, 同时对低甲基化率 DNA 的最低检出量进行分析评估。采用这些分析手段是评估血浆检测体系稳定性和可靠性的必要方法, 并为相关检测试剂盒的研发提供实验依据。

2 结 果

2.1 Septin9 甲基化位点的确定 对结直肠癌组织和肠炎组织的 PCR 扩增产物测序, 共有 60 例测序图, 选取结直肠癌组织和肠炎组织样本各 2 例进行说明: Septin9 基因甲基化阳性和阴性测序图见图 1~4。测序结果验证, 第 37~39 号位子的 CG 点为 Septin9

主要甲基化位点。

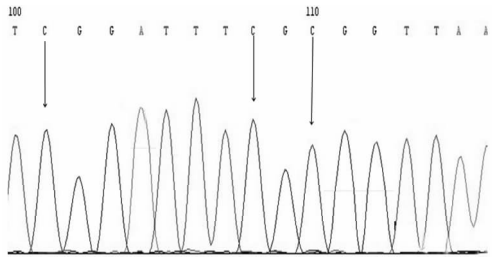


图 1 阳性结直肠癌组织样本 1 测序

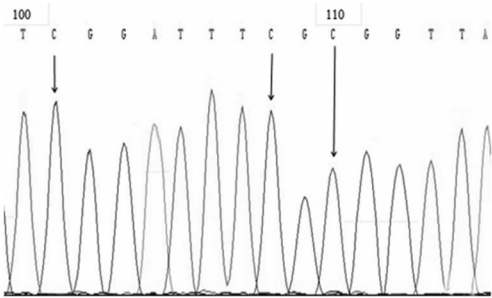


图 2 阳性结直肠癌组织样本 2 测序

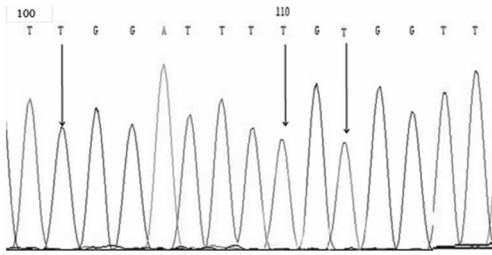


图 3 阴性肠炎组织样本 1 测序

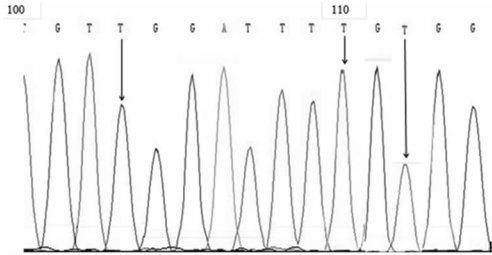


图 4 阴性肠炎组织样本 2 测序

表 3 结直肠癌和肠炎组织中 Septin9 基因甲基化样本数比较(n)											
样本	CG33	CG34	CG35	CG36	CG37	CG38	CG39	CG40	CG41	CG42	CG43
结直肠癌组织	28	29	30	30	29	30	30	30	27	29	26
肠炎组织	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

30 例结直肠癌组织样本中, Septin9 基因区域甲基化的样本数较多, 特定位点的甲基化概率达到 90%。肠炎组织样本中该位点几乎均为未甲基化状态, 故确定用该区位点在结直肠癌血浆样本进行甲基化检测研究, 见表 3。

2.2 肠癌血浆标本 Septin9 甲基化位点的验证 57 例结直肠癌患者血浆游离 DNA 中 Septin9 甲基化位

点的检测, 阳性率可达 71.92%(41/57), 结直肠癌患者病理分期 I~II 期阳性率达 64.20%, 30 例健康人中未检测到 Septin9 基因甲基化。

2.3 检测体系的方法学评估结果 对该检测体系进行准确度、特异度、重复性和最低检出限的评估和分析。分别对甲基化阳性参考品和非甲基化阴性参考品检测以评估准确度, 合格率应为 100%, 实际结果为

100%。同时对 10 个非甲基化阴性参考品进行检测,以评估检测特异性,阴性参考品符合率应为 100%。实际结果为 100%。对同一份甲基化阳性参考品重复检测 10 次,评估检测重复性,结果应一致,实际结果均为一致。最低检出量的检测包括以下 2 个检测指标:在 1 ng 野生型基因组 DNA 的背景下,对甲基化 DNA 为 5% 的检出限参考品能够准确检出。在甲基化 DNA 率为 10% 的背景下, DNA 浓度的最低检测限为 0.1 ng/ μ L。

3 讨 论

结直肠癌早期诊断金标准的纤维结肠镜为侵入性检查,要求完全彻底的肠道准备,隐私的暴露和镇静等不便之处,难以被人们广泛接受,内窥镜检测可准确判断病变的部位、范围、程度及数量,但有一定的失败率、误诊率,且可发生并发症,梗阻性的病变不适合侵入性操作;大便潜血试验是目前临床推荐的结直肠癌早期筛查的标准非侵入手段,然而其灵敏度较差(15%~80%),大多文献报道灵敏度不足 30%,特异度也较低,不能满足结直肠癌的早期诊断^[2-3]。目前早期诊断方法还有肛门指检、钡灌肠 X 线检查、计算机断层扫描(CT)等。肛诊有促进癌细胞从静脉扩散的可能,未能触到的肿物不能轻易排除癌肿。钡灌肠 X 线检查有辐射,并且可能发生肠管破裂和钡剂泄漏至腹腔内等严重的并发症。CT 在 1 次屏气下完成腹部和盆腔的联合扫描,并可以进行三维重建,从而更准确地进行术前分期,但由于结肠不停蠕动,其厚度和形态经常发生变化,再加上粪便的干扰,容易导致误诊和漏诊。

Septin9 基因 5'端调控区域含有 CpG 岛,在结直肠癌发生发展过程中常常被甲基化,高甲基化发生率高达 90%以上,而相对癌旁组织和结肠组织的高甲基化发生率均约 10%。因此,Septin9 基因甲基化被认为是结直肠癌的重要生物学特征。ALEXANDER 等^[13]认为 SEPT9 的甲基化状态可用于结直肠腺癌的诊断。有研究显示 Septin9 的 sDNA(stoll DNA)甲基化在 I~III 期结直肠癌中灵敏度约为 91%、特异度 90%、假阳性率 7%^[14]。BEHROUZ 等^[15]发现 Septin9 可作为结直肠癌早期诊断的生物学标志。近期研究表明血浆 Septin9 甲基化可用于结直肠癌筛查^[16]。

目前甲基化检测技术包括甲基化特异性 PCR、亚硫酸氢盐处理后测序、联合亚硫酸氢钠的限制性内切酶分析法(COBRA)、甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析、焦磷酸测序、荧光 PCR 等。荧光 PCR 因其高通量和高灵敏度等优点,且无需在 PCR 后电泳、杂交等操作,减少了污染和操作误差,是甲基化检测中应用前景较为广阔的检测技术。

本研究在结直肠癌和肠炎组织 DNA 对比研究中发现,结直肠癌组织中 Septin9-v2 基因启动子区域第 3 个 CPG 岛有明显的甲基化,而肠炎组织中该位点基本无甲基化。因此选择 Septin9-v2 基因的启动子区

域的第 3 个 CPG 岛作为本实验的研究和检测对象。由于 Septin9-v2 启动子区的 CpG 岛高度甲基化可在血浆样本中检测到,且与那些传统的诊断方法相比,血浆中基因诊断具有准确度、灵敏度高的特点,检查时间短、无创、无痛苦,标本采集方便、患者依从性高等优点。因此,将组织 DNA 中甲基化检测方法改进后应用于血浆标本。改进后的 Septin9 甲基化位点血浆检测实验体系,主要基于实时荧光 PCR 平台,采用阻断剂阻断技术和 Taqman 探针特异性荧光检测技术,阻断剂阻断技术能特异性识别非甲基化片段而阻滞非甲基化模板扩增,特异偏向扩增甲基化模板,放大甲基化的检测模板;Taqman 探针特异性识别并结合甲基化片段,然后探针被 DNA 聚合酶的外切酶活性水解,释放荧光信号,以鉴别甲基化的存在。这一方法能够特异扩增血浆 DNA 中痕量目的序列,提高检出率,较普通 PCR 能更有效地检出基因的低甲基化状态。对该检测体系进行了方法学评估,评估结果显示该检测方法的准确度、特异度和重复性均为 100%,其最低检出限可达 0.1 ng/ μ L。这表明该检测方法具有准确度、灵敏度和特异度高的特点,是血浆甲基化检测的可靠技术手段。在进行方法学评估分析中,采用了甲基化标准品进行检测分析,这是因为与血浆标本相比,甲基化标准品其甲基化率明确,在定量检测和最低检出限中易于判断和分析,而且标准品制备方便,易于保存和分析。而血浆标本其甲基化含量不易确定,其甲基化率最终还是必须通过标准品来明确,且甲基化率定量的血浆标本不易批量获得。本研究共检测了 57 例结直肠癌患者和 30 例健康人的血浆样本,结果显示结直肠癌中有 41 例出现 Septin9 基因高甲基化,健康人群无一例有甲基化。血浆标本的甲基化检测率为 71.92%,特异度为 100.00%。

本实验结果表明在血浆标本中进行 Septin9 基因甲基化检测是结直肠癌早期诊断的可行方法。研究者设计改进的血浆检测体系准确度、灵敏度和特异度均较好,在结直肠癌的血浆标本甲基化检测中取得了较好的检测结果。下一步将扩大样本量进一步证实该方法的可靠性。

参考文献

- [1] COPPEDE F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation[J]. Cancer Lett, 2014, 342(2):238-247.
- [2] KALIMUTHO M, CECILIA S, VECCHIO G, et al. Epigenetically silenced miR-34b/c as a novel faecal-based screening marker for colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 104(11):1770-1778.
- [3] HIBI K, GOTO T, SHIRAHATA A, et al. Detection of TFPI2 methylation in the serum of colorectal cancer patients[J]. Cancer Lett, 2011, 311(11):96-100.
- [4] MORI Y, OLARU A V, CHENG Y, et al. Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by(下转第 24 页)

- LI A, et al. Altered microRNA expression and immunosuppressive cytokine production by regulatory T cells of ulcerative colitis patients[J]. Immunol Invest, 2016, 45(1): 63-74.
- [5] 李昕, 陈明锴, 金锦莲, 等. 益生菌治疗溃疡性结肠炎的临床疗效及其机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(27): 5361-5363.
- [6] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012 年·广州)[J]. 胃肠病学, 2012, 17(12): 763-781.
- [7] ELSHAL M F, ALDAHLAWI A M, SAADAH O I, et al. Expression of CD200R1 and its ligand CD200 on T-helper lymphocytes of pediatric patients with ulcerative colitis and crohn's disease[J]. Clin Lab, 2016, 62(8): 1521-1529.
- [8] 郭淦华, 沈哲. 调节性 T 细胞分化在炎症性肠病中作用机制的综述[J]. 现代实用医学, 2014, 26(7): 919-920.
- [9] 程正位. 溃疡性结肠炎患者 B10 细胞与 ICOS 阳性调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 临床内科杂志, 2015, 32(10): 705-707.
- [10] MA Y H, ZHANG J, CHEN X, et al. Increased CD4(+) CD45RA(-) FoxP3(low) cells alter the balance between Treg and Th17 cells in colitis mice[J]. World J Gastroen, 2016, 22(42): 9356-9367.
- [11] 卞秀梅, 吴正祥, 陶科明, 等. 血清 IDO 和 KYN 在溃疡性结肠炎中的临床价值研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(12): 1484-1487.
- [12] SKLYAROV A Y, PANASYUK N B, FOMENKO I S. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis[J]. J Physiol Pharmacol, 2011, 62(1): 65-73.
- [13] 刘鹏霞. 炎症性肠病患者血清 2,3-双加氧酶表达水平及其与调节性 T 细胞的相关性[J]. 临床荟萃, 2015, 30(1): 98-99.
- [14] 赖洁莹, 郝丽萍, 宋思宇, 等. 双歧三联活菌胶囊治疗溃疡性结肠炎的疗效及其对 CD4+CD25+调节性 T 细胞和 IL-10 的影响[J]. 海南医学, 2016, 27(1): 40-42.
- [15] 李艳荣, 郭莲怡. 溃疡性结肠炎患者外周血 T 细胞表面 CD4+CD45+ 分子表达的变化及临床意义[J]. 解放军医学院学报, 2015, 36(2): 127-129.
- [16] 马亚会, 张杰, 刘心娟, 等. 溃疡性结肠炎模型小鼠调节性 T 细胞特点的研究[J]. 中国医药, 2016, 11(1): 87-90.
- [17] 吴铁龙, 薛丽莉, 戴圆圆, 等. 活动期溃疡性结肠炎患者外周血 CD4+CD25+ Treg 细胞与肠道炎性反应的相关性研究[J]. 国际消化病杂志, 2015, 35(4): 293-294.
- [18] 廖山婴, 朱小波, 沙卫红, 等. 溃疡性结肠炎患者外周血 CD4+CD25+ 调节性 T 细胞水平及其临床意义[J]. 新医学, 2013, 44(11): 764-766.

(收稿日期: 2017-06-26 修回日期: 2017-09-26)

(上接第 20 页)

- methylation microarray-based scanning[J]. Endocr Relat Cancer, 2011, 18(4): 465-478.
- [5] KIM M S, FROESE C D, ESTEY M P, et al. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission[J]. Cell Biol, 2011, 195(5): 815-826.
- [6] SCOTT M, HYLAND P L, MCGEGOR G, et al. Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours[J]. Oncogene, 2005, 24(29): 4688-4700.
- [7] GDEVOS T, TETZNER R, MODEL F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer[J]. Clin Chem, 2009, 55(7): 1337-1346.
- [8] LOFTONDAY C, MODEL F, DEVOS T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening[J]. Clin Chem, 2008, 54(2): 414-423.
- [9] WARREN J D, XIONG W, BUNKER A M, et al. Septin9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer[J]. BMC Medicine, 2011, 133(9): 1741-1750.
- [10] GLORIA R, MANUEL M, FRANCESCA M, et al. Simultaneous analysis of SEPT9 promoter methylation status, micronuclei frequency, and folate-related gene polymorphisms: the potential for a novel blood-based colorectal cancer biomarker[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(12): 28486-28497.
- [11] SHAHIN S, SHAHRIAR H, MOUSAVI A, et al. Detection of aberrant methylated SEPT9 and NTRK3 genes in sporadic colorectal cancer patients as a potential diagnostic biomarker[J]. Oncol Lett, 2016, 12(6): 5335-5343.
- [12] 杨勇, 雷孝锋, 李尔华, 等. 《体外诊断试剂注册管理办法》解读[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(4): 286-288.
- [13] ALEXANDER S, ANNE E, SEBASTIAN M, et al. SEPT9 and SHOX2 DNA methylation status and its utility in the diagnosis of colonic adenomas and colorectal adenocarcinomas[J]. Clin Epigenetics, 2016, 8(1): 100-105.
- [14] AHLQUIST D A, TAYLOR W R, MAHONEY D W, et al. The stool DNA test is more accurate than the plasma septin9 test in detecting colorectal neoplasia[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012, 10(3): 272-277.
- [15] BEHROUZ S, HASHEMZADEH S, Mousavi R, et al. Detection of aberrant methylated SEPT9 and NTRK3 genes in sporadic colorectal cancer patients as a potential diagnostic biomarker[J]. Oncol Lett, 2016, 12(6): 5335-5343.
- [16] SONG L, PENG X, LI Y, et al. The SEPT9 gene methylation assay is capable of detecting colorectal adenoma in opportunistic screening[J]. Epigenomics, 2017, 9(5): 599-610.

(收稿日期: 2017-06-20 修回日期: 2017-09-16)