

DOI: 10.12280/gjfcx.20240167

·综述·

甲基化检测用于卵巢癌筛查和诊断的研究进展

苏海琦, 李雷[△]

【摘要】 卵巢癌是妇科恶性肿瘤中死亡率最高、预后最差的癌症, 目前缺少有效的早诊早筛工具。甲基化在卵巢癌发生发展中有关键作用, 目前已经开展了多项研究, 分析基于液体活检方案的细胞游离 DNA 甲基化检测诊断卵巢癌的效能, 总体准确度达到 85% 的中位水平, 优于糖类抗原 125(CA125)等传统蛋白分子标志物。卵巢癌组织甲基化检测结果与患者生存结局及药物敏感性也密切相关。卵巢癌甲基化检测方式方法的改进发展有望为卵巢癌诊疗分子方案研究提供新的路径和机遇。

【关键词】 卵巢肿瘤; 甲基化; 表观基因组学; 早期诊断; 生物标记, 肿瘤

Advances in Methylation Detection for Ovarian Cancer Screening and Diagnosis SU Hai-qi, LI Lei. Department of Obstetrics and Gynecology, Peking Union Medical College Hospital, National Clinical Research Center for Obstetric & Gynecologic Diseases, State Key Laboratory for Complex, Severe and Rare Diseases, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

Corresponding author: LI Lei, E-mail: lileigh@163.com

【Abstract】 Ovarian cancer has the highest mortality rate and poorest prognosis in gynecologic cancers. Presently, there is a lack of effective tools for early diagnosis and early screening for ovarian cancer. Methylation plays a key role in the origin and progression of ovarian cancer. Based on liquid biopsy technique, several studies had been conducted to analyze the efficacy of cell-free DNA methylation detection in diagnosing ovarian cancer. The overall median accuracy of cell-free DNA methylation reached 85%, which is superior to traditional protein molecular markers such as CA125. The findings from methylation detection in ovarian cancer tissue were also closely related to patients' survival outcomes and drug sensitivity. The advances and improvement of methylation assays for ovarian cancer hold promise for providing novel direction and opportunities in exploring molecular strategies for diagnosing and treating.

【Keywords】 Ovarian neoplasms; Methylation; Epigenomics; Early diagnosis; Biomarkers, tumor

(J Int Obstet Gynecol, 2024, 51:366-369)

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中死亡率最高的癌症。上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)是最主要的卵巢癌组织类型。卵巢癌早期症状不典型, 缺乏有效的早期诊断方法, 85% 的患者在首次诊断时已处于晚期, 5 年生存率仅 30%~44%; 若能在肿瘤局限于卵巢(早期病变)获得诊断, 患者的 5 年生存率则可提高至 93%^[1]。血清糖类抗原 125(carbohydrate antigen 125, CA125)是检测 EOC 应用最多的分子标志物, 检测卵巢癌的特异度为 78%^[2], 但对早期卵巢癌的敏感度较差, 在超过 50% 的 I 期患者中并

不会升高^[3]。CA125 联合血清人附睾蛋白 4(human epididymis protein 4, HE4)检测的卵巢癌风险预测模型(risk of ovarian malignancy algorithm, ROMA)指数目前应用也较广泛, 但对卵巢癌的随访和治疗效应价值不高^[4]。目前研究表明表观遗传学与卵巢癌发生发展密切相关, 现对目前甲基化检测在卵巢癌诊疗领域的研究进展进行综述, 以期阐明未来研发方向。

1 甲基化在卵巢癌中的作用

作为肿瘤发生过程中的早期事件之一, DNA 甲基化是目前研究最多的表观遗传修饰内容。表观遗传是指在基因 DNA 序列没有发生改变的情况下, 基因功能发生可遗传的改变, 并最终引起基因表型的变化。甲基化修饰调节基因表达的过程主要通过 DNA 甲基化和组蛋白修饰来实现。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶的作用下, 在基因组 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5 号碳位共价结合一个甲基基团。

基金项目: 中国医学科学院临床与转化医学研究专项项目(2022-I2M-C&T-B-033)

作者单位: 100730 中国医学科学院北京协和医院妇产科, 国家妇产疾病临床医学研究中心, 中国医学科学院北京协和医院疑难重症及罕见病全国重点实验室

通信作者: 李雷, E-mail: lileigh@163.com

[△]审校者

在基因组中, CpG 序列密集的部分称为 CpG 岛。CpG 岛常见于功能基因的启动子和增强子, 对于基因表达或沉默具有调控作用, 这就是甲基化修饰能够控制基因表达的基本原理。

在肿瘤组织中, 常见的甲基化模式是 CpG 岛区域呈现出高甲基化状态, 而总体基因组(包括着丝粒和异染色质等区域)则表现为低甲基化水平。甲基化通过癌基因的转录激活、潜在转座子的激活或染色体不稳定性促进肿瘤发生。研究已发现大量基因的甲基化改变与卵巢癌分子、临床和病理特征有关, 参与了卵巢癌的发生发展。如 *ICAM-1*、*CCBE1*、*LDOC1* 和 *FILIP1L* 等基因的表达下调均受甲基化调控, 与卵巢癌侵袭性相关; *DOK1* 在浆液性 EOC 中强过表达, 提示其可能在 EOC 中发挥抑癌作用; 钙黏着蛋白基因甲基化也与卵巢癌发生有关。卵巢癌不同组织类型间的甲基化水平也有显著差异, 如乳腺癌相关基因 1 (breast cancer-related gene, *BRCA1*)、*CDKN2A* 和 *SFN* 等基因异常甲基化在卵巢浆液性癌中较为常见, 而 *SFN*、*TMS1* 和肾母细胞瘤基因 1 (Wilms tumor gene 1, *WT1*) 等基因异常甲基化则在卵巢透明细胞癌中更常见。

总之, DNA 甲基化参与卵巢癌的发病机制, 与癌症发展密切相关, 这种改变通常发生在患者出现临床表现和(或)影像学证据之前, 为早期癌症筛查和诊断提供了一种新的分子途径。

2 细胞游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 甲基化检测用于卵巢癌筛查和诊断

液体活检技术最常应用的方案是外周血的片段 DNA 及其他遗传分子物质。卵巢癌患者的外周血中富含 cfDNA 和循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)。应用 cfDNA 的甲基化检测是卵巢癌早期筛查和诊断极具希望的方案, 总体准确度达到 85% 的中位水平(范围 40%~91%)^[5]。cfDNA 甲基化用于鉴别卵巢癌的价值也得到荟萃分析的证实^[6]。因此, 检测 cfDNA 甲基化改变用于卵巢癌筛查和诊断是目前最可靠、最常用的技术方案。

目前利用 cfDNA 单基因甲基化检测和多基因联合检测、多个分化表达的甲基化域(differentially methylated region, DMR) 联合检测以及多个 CpG 甲基化印迹分析已见于近百项研究、几十种候选基因和(或)位点, 其中关于 *BRCA1*、*RASSF1A*、*HOXA9* 和 *CDO1* 等候选基因的研究相对较多。其他可诊断卵巢癌的甲基化分子标志物还包括长链非编码

RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 和微小 RNA (microRNA, miRNA) 等。大部分研究发现候选基因甲基化检测对于卵巢癌诊断具有较好的准确性, 但也有研究提出争议, 发现某些候选基因的诊断效能并不高。这种矛盾提示 cfDNA 甲基化检测诊断卵巢癌尚处于初步阶段。

检索注册研究数据库 (<https://clinicaltrials.gov/>) 发现, 目前已开展的卵巢癌甲基化筛查工作中中美两国均已密集进行。来自中国的研究包括 NCT03155451 (cfDNA 甲基化检测用于 EOC 的单中心研究, 上海交通大学医学院附属仁济医院)、NCT04651946 (游离 DNA 甲基化用于卵巢癌诊断和监测的单中心研究的试验集和验证集, 北京协和医院) 和 NCT04903665 (甲基化检测联合其他分子标志物用于卵巢癌在内的女性多癌种早期诊断, 复旦大学)。来自美国的研究包括 NCT03622385 (cfDNA 甲基化检测用于诊断高级别浆液性癌, 美国贝勒研究院) 和 NCT04794322 (cfDNA 甲基化检测用于诊断卵巢癌的多中心研究, 美国麻省总医院)。申报 cfDNA 甲基化检测体外诊断试剂盒用于卵巢癌诊断的临床研究也在进行中 (NCT05801276, 来自北京协和医院)。这些研究均为两基因或多基因的联合甲基化检测, 并尝试与其他无创诊断方案进行比较。初步研究发现, cfDNA 甲基化检测优于 CA125 等蛋白标志物^[7-8]。目前研究总体上队列规模较小, 未能对早期病变进行充分的分层分析, 限制了研究结论的推广。由北京协和医院主导的一项中国多中心前瞻性研究正在实施中 (NCT05801263), 该项目对考虑附件区占位或盆腔包块的女性在术前进行 cfDNA 甲基化检测、CA125 和 ROMA 指数分析, 并纳入影像学方案, 入组患者数量在 3 000 例以上, 有望弥补规模不大、早期病变不足的缺点。

3 甲基化检测用于卵巢癌治疗和预后监测

3.1 甲基化检测与卵巢癌生存结局

目前研究已发现有一百余种候选基因、DMR 及其组合以及十余种 miRNA 的甲基化改变与卵巢癌无进展生存有关^[9]。其中关于 *BRCA1*、*RASSF1A*、*HOXA9/11*、胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (insulin-like growth factor binding protein-3, *IGFBP-3*) 等候选基因的研究相对较多。其他与卵巢癌预后相关的分子检测对象包括 lncRNA 甲基化、16S 和 28S 线粒体 DNA 等。这些研究多局限于肿瘤组织的甲基化检测, 在液体活检中的应用方案还比较罕见, 且缺少充分的验证, 因此在

临床应用还比较局限。

3.2 甲基化检测与卵巢癌药物治疗结局 与卵巢癌治疗效果相关的研究包括铂类敏感性以及新型靶向药物的有效性。以铂类为主的化疗会改变患者外周血中 DNA 甲基化状态^[10],而卵巢癌的铂类敏感性与甲基化水平有关^[11]。在卵巢癌组织和(或)细胞系中,已发现数十种与铂类治疗耐药有关的甲基化靶基因,包括:*AKAP1*、*ATG4A*、*BRCA1*、*CABIN1*、*CAMK2N1*、*CHFR*、*ESR1*、*FAM83A*、*FZD10*、*HERV-K*、*HIST1H2BN*、*LAMA3*、*MCJ*、*MIR130B*、*MIR9-1*、*MKX*、*MSH2*、*MYO18B*、*NCALD*、*NKAPL*、*PTEN*、*RASSF1*、*RUNX3*、*SFRP5*、*TGFB1*、*TMEM88*、*NKDI*血管内皮生长因子 B(vascular endothelial growth factor B, *VEGFB*)/*PRDX2* 组合以及 *VEGF* 家族中的 *VEGFA*/*VEGFB*/*VEGFC* 等。还有基于多基因谱的甲基化指数诊断模型。这些基因或基因谱的甲基化表达对基因功能进行上调或下调,导致铂类耐药。不过,这些研究多局限于肿瘤组织的基因甲基化检测,几乎均为回顾性研究,缺少液体活检的发现。

此外,其他与药物治疗相关的研究包括:*HOXA11* 甲基化的阳性表达与卵巢癌存在肉眼残留病灶呈正相关^[12]; *BRCA1*^[13]、*HOXA9*^[14]、*RAD51C*^[15]等基因甲基化的阳性表达与多腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)抑制剂治疗效果相关,可作为预测 PARP 抑制剂有效性的分子标志物; *KANSL1* 在卵巢癌中的扩增和重排与组蛋白去乙酰化酶抑制效果有关,可作为组蛋白去乙酰化酶抑制剂表观治疗药物的分子标志物^[16]; *ESR1* 甲基化水平与卵巢癌治疗过程中 CA125 水平变化有关,可作为卵巢癌治疗有效性的评估指标^[17]。

4 卵巢癌甲基化检测方式方法的改进和发展

甲基化检测用于卵巢癌诊疗具备良好的应用和转化前景,目前已经在多个领域开展了深入工作,这些内容包括:①临床设计和统计方案的改进,以实现卵巢癌诊断性分子标志物的产品研发上市或重要分子标志物的基础转化研究。临床设计不仅考虑入选患者的匹配,也充分考虑目前卵巢癌治疗中的热点和前沿领域^[14]以及早期肿瘤的诊断^[18]。②基于酶学方案预处理的卵巢癌甲基化试剂盒开发。相比于目前常用的重硫酸盐法,酶学方法对 DNA 的损害更小,获得的基因组信息更多,检测速度更快^[19],对于诊断试剂盒开发具有更好的优势。③人工智能(AI)平台在甲基化分子检测分析和应用中的系统应用。针对

巨量的、基于全基因组分析得到的甲基化组数据,AI 分析平台构建的风险模型与传统靶基因分析方法相比,对于卵巢癌诊断具备更高的准确性^[20-21]。这种有别于传统分子分析方案的 AI 模式,可能是未来癌症早筛早诊方法的主流^[22]。④甲基化检测用于少见卵巢肿瘤的诊断和鉴别诊断。已知卵巢癌是异质性较强的一大类癌种组合,寻求和开发具备肿瘤特异性的甲基化分子标志物也是未来的研究重点,尤其针对并不多见的非上皮性癌、低度恶性肿瘤和交界性肿瘤。⑤既往 cfDNA 甲基化检测所需外周血量较多,目前已经开发了超敏感和高选择的检测方法用于识别极低浓度甲基化变化^[23],以及更具肿瘤特异性、用量更小的甲基化检测方法^[7]。⑥在检测对象上,宫颈细胞学甲基化检测也可用于卵巢癌检测^[24]。但以宫颈细胞学甲基化进行卵巢癌筛查的效能不高,还需要结合 *BRCA1/2* 等基因突变检测^[25]。⑦甲基化检测连同其他方案的联合检测,以实现最佳的(近乎 100%)特异度和 $\geq 75\%$ 的敏感度^[26]。

甲基化检测用于卵巢癌诊疗尚处于起步阶段,研究总体数量不多、层次不够丰富,还存在一些缺点与不足。未来可在如下几个方面进行深入探索:①在早期肿瘤中以及不同组织类型的肿瘤中获得充分验证,并开展基于社区人群的前瞻性工作;②与现有的其他分子标志物或模型进行全面比较以及联合检测;③在病情监测中进行长期、系统性随访;④对于疾病预后和药物有效性的预测价值开展大样本工作,验证组织学中的发现,并开发新型标志物;⑤进行其他液体活检方案(尿液、宫颈细胞学等)甲基化检测在卵巢癌诊疗中的应用拓展。

5 结语

甲基化是卵巢癌发生过程中的早期事件,甲基化检测用于卵巢癌筛查和诊断尚处于起步阶段。卵巢癌患者中丰富的 cfDNA 为液体活检甲基化检测提供了其他癌种无法比拟的可靠对象,国内外对此均开展了多项临床试验,探讨不同候选基因甲基化检测用于诊断的可靠性;未来尚需开展社区人群、早期患者的进一步探索以验证甲基化方案早筛早诊的价值。目前已经发现,卵巢癌肿瘤组织中多种分子的甲基化表达与疾病生存预后和药物治疗有效性相关;未来尚需开展可转化为临床应用、便捷可靠的分子标志物检测。卵巢癌甲基化检测方式方法的改进发展有望为卵巢癌诊疗分子方案研究提供新的路径和机遇。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(1):12–49. doi: 10.3322/caac.21820.
- [2] You B, Freyer G, Gonzalez–Martin A, et al. The role of the tumor primary chemosensitivity relative to the success of the medical–surgical management in patients with advanced ovarian carcinomas [J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 100:102294. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102294.
- [3] van Nagell JR Jr, Miller RW. Evaluation and Management of Ultrasonographically Detected Ovarian Tumors in Asymptomatic Women [J]. *Obstet Gynecol*, 2016, 127(5):848–858. doi: 10.1097/AOG.0000000000001384.
- [4] González–Martín A, Harter P, Leary A, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow–up [J]. *Ann Oncol*, 2023, 34(10):833–848. doi: 10.1016/j.annonc.2023.07.011.
- [5] Guo XM, Miller H, Matsuo K, et al. Circulating Cell–Free DNA Methylation Profiles in the Early Detection of Ovarian Cancer: A Scoping Review of the Literature [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(4):838. doi: 10.3390/cancers13040838.
- [6] Terp SK, Stoico MP, Dybkær K, et al. Early diagnosis of ovarian cancer based on methylation profiles in peripheral blood cell–free DNA: a systematic review [J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15(1):24. doi: 10.1186/s13148–023–01440–w.
- [7] Widschwendter M, Zikan M, Wahl B, et al. The potential of circulating tumor DNA methylation analysis for the early detection and management of ovarian cancer [J]. *Genome Med*, 2017, 9(1):116. doi: 10.1186/s13073–017–0500–7.
- [8] Miller BF, PisanicIi TR, Margolin G, et al. Leveraging locus–specific epigenetic heterogeneity to improve the performance of blood–based DNA methylation biomarkers [J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1):154. doi: 10.1186/s13148–020–00939–w.
- [9] Lukina SS, Burdenny AM, Filippova EA, et al. Synergy between the Levels of Methylation of microRNA Gene Sets in Primary Tumors and Metastases of Ovarian Cancer Patients [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2022, 173(1):87–91. doi: 10.1007/s10517–022–05499–y.
- [10] Flanagan JM, Wilson A, Koo C, et al. Platinum–Based Chemotherapy Induces Methylation Changes in Blood DNA Associated with Overall Survival in Patients with Ovarian Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9):2213–2222. doi: 10.1158/1078–0432.CCR–16–1754.
- [11] Fang F, Cardenas H, Huang H, et al. Genomic and Epigenomic Signatures in Ovarian Cancer Associated with Resensitization to Platinum Drugs [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(3):631–644. doi: 10.1158/0008–5472.CAN–17–1492.
- [12] Fiegl H, Windbichler G, Mueller–Holzner E, et al. HOXA11 DNA methylation—a novel prognostic biomarker in ovarian cancer [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(3):725–729. doi: 10.1002/ijc.23563.
- [13] Li L, Gu Y, Zhang M, et al. HRD effects on first–line adjuvant chemotherapy and PARPi maintenance therapy in Chinese ovarian cancer patients [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2023, 7(1):51. doi: 10.1038/s41698–023–00402–y.
- [14] Rusan M, Andersen RF, Jakobsen A, et al. Circulating HOXA9–methylated tumour DNA: A novel biomarker of response to poly (ADP–ribose) polymerase inhibition in BRCA–mutated epithelial ovarian cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2020, 125:121–129. doi: 10.1016/j.ejca.2019.11.012.
- [15] Nestic K, Kondrashova O, Hurley RM, et al. Acquired RAD51C Promoter Methylation Loss Causes PARP Inhibitor Resistance in High–Grade Serous Ovarian Carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(18):4709–4722. doi: 10.1158/0008–5472.CAN–21–0774.
- [16] Fejzo MS, Chen HW, Anderson L, et al. Analysis in epithelial ovarian cancer identifies KANSL1 as a biomarker and target gene for immune response and HDAC inhibition [J]. *Gynecol Oncol*, 2021, 160(2):539–546. doi: 10.1016/j.ygyno.2020.11.008.
- [17] Flanagan JM, Wilhelm–Benartzi CS, Metcalf M, et al. Association of somatic DNA methylation variability with progression–free survival and toxicity in ovarian cancer patients [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(11):2813–2818. doi: 10.1093/annonc/mdt370.
- [18] Bast RC Jr, Lu Z, Han CY, et al. Biomarkers and Strategies for Early Detection of Ovarian Cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2020, 29(12):2504–2512. doi: 10.1158/1055–9965.EPI–20–1057.
- [19] Tanaka Y, Mizuguchi R, Koseki N, et al. Quality assessment of enzymatic methyl–seq library constructed using crude cell lysate [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 696:149488. doi: 10.1016/j.bbrc.2024.149488.
- [20] Bahado–Singh RO, Ibrahim A, Al–Wahab Z, et al. Precision gynecologic oncology: circulating cell free DNA epigenomic analysis, artificial intelligence and the accurate detection of ovarian cancer [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):18625. doi: 10.1038/s41598–022–23149–1.
- [21] Hu WL, Zhou XH. Identification of prognostic signature in cancer based on DNA methylation interaction network [J]. *BMC Med Genomics*, 2017, 10(Suppl 4):63. doi: 10.1186/s12920–017–0307–9.
- [22] Papanicolaou–Sengos A, Aldape K. DNA Methylation Profiling: An Emerging Paradigm for Cancer Diagnosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17:295–321. doi: 10.1146/annurev–pathol–042220–022304.
- [23] Lo Riso P, Villa CE, Gasparoni G, et al. A cell–of–origin epigenetic tracer reveals clinically distinct subtypes of high–grade serous ovarian cancer [J]. *Genome Med*, 2020, 12(1):94. doi: 10.1186/s13073–020–00786–7.
- [24] Wu TI, Huang RL, Su PH, et al. Ovarian cancer detection by DNA methylation in cervical scrapings [J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1):166. doi: 10.1186/s13148–019–0773–3.
- [25] Barrett JE, Jones A, Evans I, et al. The DNA methylome of cervical cells can predict the presence of ovarian cancer [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):448. doi: 10.1038/s41467–021–26615–y.
- [26] Srivastava A, Gupta A, Patidar S. Review of biomarker systems as an alternative for early diagnosis of ovarian carcinoma [J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(10):1967–1978. doi: 10.1007/s12094–021–02604–x.

(收稿日期: 2024–02–20)

[本文编辑 秦娟]