DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20210302

DNA甲基化生物标记物在恶性肿瘤中的转化应用

刘杰[1]，唐富天[1,2]，李玉民[1,2]*

（1. 兰州大学第二临床医学院，甘肃 兰州 730000；
2. 兰州大学第二医院普外科，甘肃省消化系肿瘤重点实验室，甘肃 兰州 730030）

【摘要】肿瘤的发生发展存在广泛的遗传变化和相关的基因功能及活动失调。其中表观遗传学中DNA甲基化是表征最好的表观遗传修饰之一，它影响基因表达和基因组稳定性，对肿瘤的发生发展具有重要影响。这些表观遗传变化大部分发生在肿瘤的早期，且在整个肿瘤类型中普遍存在，DNA甲基化标记物是肿瘤早期诊断、预后和治疗检测的重要方法。通过血液、粪便、尿液和其他生物样本中可以检测癌症相关的DNA甲基化变化，它是一种无创、快速和可重复的组织活检的替代方法。DNA甲基化是可适用于人群筛查的简单、经济和高度特异性的癌症检测的重要手段，虽然面临许多挑战，但是DNA甲基化生物标记物以独特的优势，具有临床转化应用的前景和价值。本文综述了DNA甲基化特征、作用机制，及在膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌等肿瘤中的早期诊断、临床治疗效果及预后判定的最新研究进展，并讨论了临床转化存在的问题和展望。

【关键词】DNA甲基化；生物标记物；恶性肿瘤；转化应用

中图分类号：R730　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2021）03-0006-08

Translational application of DNA methylation biomarkers in malignant tumors

Liu Jie[1], Tang Futian[1,2], Li Yuming[1,2]*

(1. Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, Gansu, China;
2. Key Laboratory of Digestive Tumor of Gansu Province, Department of General Surgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu, China)

【**Abstract**】Extensive genetic changes as well as related gene function and activity disorders occur in the development of malignant tumors. DNA methylation in epigenetics is one of the best-characterized epigenetic modifications. It affects gene expression and genome stability, having an important impact on the development of malignant tumors. Most of these epigenetic changes occur in the early stages of malignant tumors and are widespread in the entire malignant tumor. DNA methylation biomarkers are important methods for early tumor diagnosis, prognosis and treatment detection. Cancer-related DNA methylation changes can be detected in blood, feces, urine and other biological samples. It is a non-invasive, rapid and reproducible alternative to tissue biopsy. DNA methylation is a simple, economical and highly specific malignant tumor detection method that can be applied to population screening. Although it faces many challenges, DNA methylation biomarkers have unique advantages, having the prospect of clinical translational application and value. This article reviews the characteristics of DNA methylation, the mechanism of action as well as the latest research progress in early diagnosis, clinical treatment effects, and prognosis determination in bladder cancer, breast cancer, colorectal cancer and other malignant tumors, dis-

基金项目：国家自然科学基金项目（31770537）；甘肃省国际科技合作项目（18YF1WA113）；甘肃省科技重大专项（20ZD7FA003）

通讯作者：李玉民（1962-），男，甘肃民勤人，博士生导师，主要从事肝胆胰外科、微创外科和消化系肿瘤外科方面的研究。
E-mail：liym@lzu.edu.cn

cussing the problems and prospects of clinical translation.

【Keywords】DNA methylation; Biomarker; Malignant tumor; Translational application

肿瘤的发生发展过程中存在广泛的遗传变化和相关的基因功能及活动失调[1]。自40多年前科学家们首次在癌症[2]中发现异常的DNA甲基化以来，已证实DNA甲基化影响基因表达和基因组稳定性，对肿瘤发生发展具有重要影响。DNA甲基化分析具有灵敏度高、稳定性好和成本低的特性，可用于各种癌症早期诊断的生物标记物，样本易于从血液、尿液、粪便、唾液或痰液中获得[3]。1999年，Esteller等通过测定血浆中DNA甲基化水平，初步诊断出了非小细胞肺癌，开启了基于癌症表观遗传学诊断的新时代[4]。迄今为止已发表的数千项研究将DNA甲基化与临床参数联系起来，使DNA甲基化的生物标记物在癌症诊断中具有重要意义。本文阐述了DNA甲基化的作用机制、特征及DNA甲基化标记物在恶性肿瘤中的临床应用进展、目前存在的问题、挑战及展望。

1 DNA甲基化作用机制

表观遗传信息在细胞分裂过程中遗传，能够控制发育、组织分化和细胞反应。其中DNA甲基化是表观遗传信息最清晰的例子，是人类疾病研究最有用的表观遗传标记。DNA甲基化通常由甲基（$-CH_3$）共价结合到胞嘧啶残基（5-甲基胞嘧啶，5mC）嘧啶环的第五个碳原子组成。人体正常细胞的DNA甲基化在发育、分化和组织稳态过程中起着至关重要的作用。肿瘤的发生发展存在广泛的遗传变化和相关的基因功能及活动失调。其中表观遗传学中DNA甲基化是表征最好的表观遗传修饰之一，它影响基因表达和基因组稳定性，对肿瘤的发生发展具有重要影响。这些表观遗传变化大部分发生在肿瘤的早期，且在整个肿瘤类型中普遍存在。肿瘤发生过程伴随着广泛的DNA甲基化变化，其特征是具有许多5′-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3′（CpG）岛的局灶性高甲基化[5]。在肿瘤形成过程中，甲基化的一些功能包括基因组印迹[6]、X染色体失活（X Chromosome Inactivation，XCI）[7]、种系特异性基因沉默和重复基因组区域的失活。

DNA甲基化在肿瘤发生发展中的作用机制主要有以下几种：（1）癌细胞增殖中的DNA甲基化畸变：在一系列增殖信号，如丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase，MAPK）和细胞周期蛋白依赖性激酶（Cyclin Dependent Kinase，CDK）等的介导下引起DNA甲基化，导致恶性增殖，例如黑色素瘤[8]的发病；（2）抑制细胞凋亡中的DNA甲基化失调：如内在途径P53和外在途径肿瘤坏死因子（Tumor Necrosis Factor，TNF）的激活能够抑制细胞凋亡的能力；（3）DNA甲基化在转移诱导中的作用：如由上皮间充质（Epithelial-to-Mesenchymal Transition，EMT）启动的DNA甲基化使肿瘤从其原发部位转移并侵入其他组织[9]；（4）促进基因组的不稳定性：如以共济失调毛细血管扩张突变（Ataxia-Telangiectasia Mutation，ATM）启动子和O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶（O6-Methylguanine DNA Methyltransferase，MGMT）为主介导的CpG启动子高甲基化将恶性细胞转向更高可变性的基因组受损；（5）改变整体的基因表达模式：最近发现新兴领域“表观转录组学”在肿瘤发生过程中调节异常，例如神经胶质瘤[10]和结直肠癌[11]。

2 DNA甲基化检测方法

目前测定样本中DNA甲基化的方法较多，但是如何选择最合适的方法来解决生物学问题仍具有挑战性。检测DNA甲基化的方法主要集中在识别被检测基因的甲基化状态和确定5-甲基胞嘧啶的总量。检测DNA甲基化异常是早期癌症诊断中最重要的检测之一。阵列和测序技术的快速发展显著改善了DNA甲基化谱，为DNA甲基化景观提供了前所未有的全面视图。

2.1 亚硫酸氢盐处理技术

亚硫酸氢盐处理是一种分类5-甲基胞嘧啶和非甲基化碱基的有效方法之一。主要包括基于序列、熔化温度和交互的分析。基于序列的分析方法中，甲基化特异性PCR（Methylation-Specific PCR，MS-PCR）避免了复杂的测序过程，但是该技术只能用于定性测定[12]。为克服MS-PCR的局限性，开发了甲基化敏感单核苷酸引物延伸（Methylation-senstive Single Nucleotide Extention，Ms-SnuPE）的技术[13]。之后开发的简并代表性亚硫酸氢盐测序技术（Reduced Representation Bisulfite Sequencing，

RRBS）能够使用MspI限制性内切酶消化基因组以富集CpG位点[14]。亚硫酸氢盐测序为基因组的广泛定位提供了支持，但是多重操作和结果误差是显著的缺点[15]。自1999年开发的甲基化特异性变性梯度凝胶电泳（Methylation-Specific Denaturing Gradient Gel Electrophoresis，MS-DGGE）[16]，到2001年开发的甲基化特异性熔化曲线分析（Methylation-Specific Melting Curve Analysis，MS-MCA）[17]和2010年开发的高分辨率熔化（High-Resolution Melting，HRM）方法无需测序和分析就能测定5-甲基胞嘧啶[18]。此外，基于交互作用的双硫酸限制分析（Combined Bisulfite Restrictionanalysis，COBRA）和甲基光也可确定5-甲基胞嘧啶[19]。

2.2 基于生物鉴定的技术

亚硫酸氢盐处理存在不完全转化、假阳性结果、使用困难和耗时等问题[19]。相比之下，生物鉴定方法，如酶消化或生物反应可以在温和的反应条件[20]下快速检测出高特异性的甲基化。基于酶促消化的方法主要有限制性标记基因组扫描（Restriction Landmark Genomic Scanning，RLGS）、甲基化敏感限制性内切酶-PCR/southern（Methylation-Sensitive Restriction Endonuclease-PCR/Southern，MSRE-PCR/Southern）和在线监控的技术。基于生物依赖反应的方法主要是BMD，其原理是MBD蛋白有特异性结合甲基化DNA序列的能力。

2.3 无亚硫酸氢盐和无酶的技术

虽然亚硫酸氢盐和生物学方法对DNA甲基化的位置具有特异性，但在5-甲基胞嘧啶的分析中仍存在反应效率、分析成本和操作复杂性等问题。一种无酶和亚硫酸氢盐的DNA甲基化方法能够克服这些限制，并具有快速、方便、低成本等许多优点。其中主要有基于直接氧化反应分析的MW-CNTs/Ch/GCE[21]和基于氧化反应化学分解方法的NalO4/LiBr[22]。

3 DNA甲基化液体活检技术

目前DNA甲基化肿瘤学早期诊断领域的市场产品部分是基于在新鲜肿瘤活检或固定组织块检测的。近年来，DNA甲基化分析几乎可以扩展到任何体液，通常称为“液体活检”。各种体液含有大量与肿瘤发生、生长、免疫/癌症相互作用和细胞死亡、循环肿瘤细胞（Circulating Tumor Cell，CTC）和微泡（如外泌体）相关的信息分子[23]。这些分子很容易使用非侵入性或微创技术进行分析。其中循环肿瘤DNA（Circulating tumor DNA，ctDNA）是游离细胞DNA（cell free DNA，cfDNA）的癌症起源成分，可以提供肿瘤突变和表观遗传特征的信息，与传统的组织活检方法相比具有一系列优势[24]。简单组织活检仅对所有细胞类型的一个亚群进行采样，最近的研究表明，ctDNA可以通过对更广泛比例的肿瘤细胞进行采样来更好地发现变异[25]。目前，DNA甲基化癌症液体活检测试与传统筛查和医学成像相结合，可应用于六个广泛的诊断领域，主要有：初步诊断，分类，治疗选择，治疗反应，残留病灶监测和复发。目前，主要的组织和分析物包括血液、尿、粪便、呼吸道。其中血液有丰富的肿瘤生物学信息来源，是ctDNA研究的首选组织。与血液cfDNA检测相比，尿液cfDNA的获取更容易、更经济[26]。其次，尿液cfDNA在早期检测或监测泌尿生殖道癌症复发方面更为敏感。粪便分析可应用于一系列肠道疾病，如结直肠癌（Colorectal Cancer，CRC）[27]。呼吸道的生物样本主要是痰[28]、支气管肺泡灌洗液、鼻腔冲洗/刷洗和呼出气冷凝物（Exhaled Breath Condensate，EBC），其中与肺癌[29]相关研究较多。总体而言，从疗效和转化的角度来看，液体活检是一种极具吸引力的策略，能够在不久的将来极大地改变疾病的诊断和管理。

4 DNA甲基化生物标记物在肿瘤诊断中的应用

4.1 膀胱癌

血尿可能是膀胱癌（Bladder Cancer，BC）早期症状的表现，其中3%～28%的血尿患者被诊断为BC。膀胱镜检查的诊断成本高，患者负担重，急需开发诊断性尿液检测方法。AssureMDx™（MDxHealth）是一种尿液检测试剂盒，它根据阴性结果排除BC诊断，导致诊断性膀胱镜检查减少77%，从而降低诊断成本并减轻患者负担[30]。UroMark测试结果显示原发性BC较非BC尿液相比，其UroMark诊断灵敏度为98%，特异性为97%，阴性预测值（Negative Predictive Value，NPV）为97%。这是一种用于检测尿液中BC特异性表观遗传改变的新型高通量、基于下一代测序的生物标记物测定，将有可能彻底改变BC患者的诊治[31]。最近Chen等[32]开发了一种utMeMA方法，用于检测MassARRAY在多个基因组区域的尿液肿瘤DNA

甲基化，较尿细胞学和荧光原位杂交（Fluorescence in Situ Hybridization，FISH）更能有效的区分BC患者，特别是对检测早期癌，微小癌和复发肿瘤等。另外，Ruan等[33]报道基于尿液DNA甲基化检测是BC早期检测和风险分层的一种高度敏感和特异的方法。

Bladder EpiCheck®（Nucleix）是一种基于15种专有甲基化标记物的非肌层浸润性膀胱癌（Non-Muscular Invasive Bladder Cancer，NMIBC）尿液检测方法，目前在欧盟可用作CE-IVD[34]。Bladder CARETM[35]是一种基于专有三基因组（可能是SOX1、IRAK3和甲基化LINE1）的高甲基化的NMIBC复发尿液检测，该LDT目前用于BC复发的诊断。最近一项研究表明基于DNA甲基化的风险评分（RS）可以作为预测肌层浸润性膀胱癌（Muscle Invasive Bladder Cancer，MIBC）患者术前和/或膀胱切除术后总生存期（Overall Survival，OS）模型准确性的有用工具[36]。

4.2 乳腺癌

乳房X光检查和超声检查广泛用于乳腺癌（Breast Cancer，BRCA）早期检测，但假阳性率高，导致不必要的活检，尤其是BI-RADS 4类患者。近期一项研究进行了首次基于血液的全基因组DNA甲基化检测，发现液体活检与传统诊断成像相结合可以通过降低假阳性率和避免有创检查从而改善当前的临床应用[37]。白细胞中DNA甲基化标记可能为潜在的BRCA生物标志物，然而这些研究受到低统计功效和潜在偏差的限制。近期一项研究使用遗传数据和DNA甲基化数据建立统计模型的新方法可识别BRCA风险的新型DNA甲基化生物标记物[38]。

目前在BRCA中基于DNA甲基化的检测和液体活检产品仅限于由Qiagen/Therawis开发的therascreen® PITX2 RQG测试，欧盟用作预后/预测CE-IVD。可确定肿瘤组织切片中甲基化与非甲基化DNA含量的比率，其中甲基化百分比（Percentage of methylation ratio, PMR）指示蒽环类药物与标准疗法联合使用时的总体存活率和患者预后[39]。但是，therascreen®测试仅限于雌激素受体阳性、淋巴结阴性的肿瘤。最近一项研究发现，神经丝介质（Nerve Filament Medium，NEFM）低表达/DNA甲基化与不良预后相关。Zhang等[40]报道7个差异甲基化位点（Differentially Methylated Sites，DMSs）组合甲基化谱优于目前公布的甲基化标记物，它可以用作BRCA早期诊断和预后的潜在的生物标记物。目前仍无预测BRCA对贝伐单抗反应的生物标记物。有研究发现基因甲基化与非进展生存（Progression-Free Survival，PFS）和治疗反应显著相关，可以区分患者对贝伐单抗治疗的反应，帮助识别从贝伐单抗获得更大益处的患者[41]。

4.3 宫颈癌

人乳头瘤病毒（Human Papilloma Virus，HPV）疫苗对宫颈癌产生了巨大影响。在具有有效疫苗接种计划的国家中，年轻女性的HPV发病率趋于零[42]。子宫颈癌的早期诊断和预防势在必行。目前市场上有QIAsure（Qiagen）[43]、GynTect®（Oncgnostics GmbH）[44]和CONFIDENCE [45]检测，这三个测试都使用来自宫颈刮片/涂片的液体样本。宫颈癌患者血清甲基化模式的研究已发现MYOD1启动子高甲基化的血清学检测可能具有潜在的用途，可作为区分淋巴结转移或复发风险高的宫颈癌患者的预后标志物[46]。

4.4 结直肠癌

对于结直肠癌（Colorectal Cancer，CRC）的初步诊断，基于血液的Epi proColon®和基于粪便的Cologuard®已取得FDA PMA的批准。Cologuard®对晚期癌前病变和早期癌症的敏感性高[47]。Epi proColon®检测血浆中甲基化SEPT9的存在，比Cologuard®具有更高的特异性。最新研究Bach等[48]通过SEPT9甲基化分析，为尿液中的CRC的检测提供了证据，该分析与SDC2结合，是CRC患者和对照组之间的最佳区分。Bagheri等[49]报道外周血单核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cell，PBMC）中TFPI2和NDRG4基因的启动子甲基化在评估CRC的无创性早期诊断有很高的灵敏度和特异性，是一种新型非侵入性CRC筛查方法。基于甲基化双基因（IKZF1和BCAT1）的COLVERA™液体活检测试[50]自2016年起在美国作为LDT提供，用于检测手术切除后的残留病灶和监测初级治疗后复发的CRC，其敏感性是CEA的两倍。

4.5 肝癌

AFP是肝癌（Hepatocellular Carcinoma，HCC）应用最广泛的血清生物标记物，但其早期临床诊断的敏感性较低，且常导致误诊。Epigenomics开发的肝癌血细胞检测是一种诊断性血液测试，用于检测肝硬化患者的HCC，高甲基化表明HCC发生，且识别循环细胞游离DNA（cfDNA）中5mC水平持

续变化的区域可以作为早期HCC诊断和监测微创筛查的标记物[51]。Zhang等发现外周血单个核细胞和T细胞的DNA甲基化可区分出HCC早期和慢性HBV、HCV和健康对照组，并随着HCC的进展而增强[52]。

4.6 肺癌

Epi proLung® 是由Epigenomics开发的用于检测肺癌的CE-IVD DNA甲基化测试，已在来自美国和欧洲的360份临床样本的验证研究中进行了测试[53]。低剂量CT筛查可以降低肺癌相关死亡率。然而，CT筛查的错误发现率（False Discovery Rates，FDR）接近96%。最近有研究发现，血浆和尿液中都检测到6个基因中每一个的甲基化检测与非小细胞肺癌的诊断显著相关，表明血浆和尿液中基于DNA甲基化的生物标记物可作为CT筛查的辅助手段，以指导进一步有创手术的决策[54]。最新研究报道，血浆DNA中甲基化PTGER4的检测可作为一种生物标记物，支持肺部病变患者在高危人群肺癌筛查中的临床决策[55]。

4.7 前列腺癌

在高危人群中筛查血液前列腺特异性抗原（Prostate-Specific Antigen，PSA）水平一直被用于早期检测和治疗前列腺癌（Prostate Cancer，PCa）。但是PSA对PCa初步诊断的敏感性仅为21%。数据显示，在2%到67%的病例中，PCa治疗可能是不必要的，因为PSA检测到大量不太可能对患者造成太大影响的肿瘤。迫切需要在PCa领域找到更好的生物标记物。ConfirmMDx测试针对与基因GSTP1、RASSF1和APC相关的DNA区域，在高加索人和非裔美国人队列中对高级别癌症的NPV大于90%[56]。Han等[57]使用Illumina450k甲基化阵列对患者的白细胞DNA进行了全基因组DNA甲基化分析，在白细胞DNA中发现了一个CpG甲基化特征与PCa的侵袭性临床特征相关。也有最新研究表明一种新的DNA甲基化特征与骨转移性PCa的雄激素受体活性和患者预后相关[58]。

4.8 卵巢癌

上皮性卵巢癌（Epithelial Ovarian Cancer，EOC）是最致命的妇科恶性肿瘤，很少有可靠的非侵入性检测的早期检测或诊断。基因组技术的最新进展支持了外周血游离DNA（cfDNA）评估作为一种可行的癌症生物标记物。数据表明，这些cfDNA甲基化测试的性能良好，在血清或血浆中检测EOC的准确率高达91%[59]。一项对近63 000名欧洲后裔女性的遗传学数据的整合分析表明12个CpG的甲基化可能通过调节5个基因的表达，即MAPT、HOXH3、ABHD8、ARHGAP27和SKAP1来影响EOC风险。该研究鉴定了与EOC风险相关的新的DNA甲基化标记物，并提出多个CpG的甲基化可能通过调控基因表达来影响EOC风险[60]。

4.9 胰腺癌

胰腺癌作为最恶性的癌症之一，由于缺乏有效的早期诊断，治疗难度大。因此，迫切需要寻找胰腺癌早期检测的可靠诊断和预测标记物。最新研究通过甲基化DNA免疫沉淀结合高通量测序（Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing，MeDIP-seq），对胰腺导管腺癌（Pancreatic Ductal Adenocarcinoma，PDAC）患者进行了全基因组cfDNA甲基化分析研究，共发现8个标记物可以区分PDAC患者和健康个体，包括TRIM73、FAM150A、EPB41L3、SIX3、MIR663、MAPT、LOC100128977和LOC100130148，它们可应用于胰腺癌的非有创诊断[61]。另一项研究在胰腺癌患者的外周无细胞肿瘤DNA中验证了该生物标记物测试，结果表明，cfDNA中ADAMTS1和BNC1的甲基化状态可预测可行治愈性切除肿瘤的早期阶段胰腺癌，可用在选定的高危人群子集中进行诊断和筛查[62]。

5 存在的问题和挑战

5.1 DNA甲基化分析方法方面存在的问题

目前，DNA甲基化分析虽取得了较大进展，但存在以下问题：（1）PCR扩增、DNA提取和亚硫酸氢盐转化过程中出现明显错误，导致错误结果。（2）PCR和亚硫酸氢盐试验方法都很耗时。（3）高通量技术在标准实验室中运行成本昂贵且非常复杂。DNA甲基化分析方法取决于研究目标，没有任何DNA甲基化分析方法将适用于所有的应用。通过了解每种方法中呈现的信息类型，可根据研究需求选择最合适的方法。

5.2 转化应用方面面临的挑战

尽管在DNA甲基化转化研究方面取得了较大的进展，但仍然存在许多挑战。（1）单细胞分析技术的最新发展极大地扩展了对肿瘤进化的理解，但它在DNA甲基化分析中与批量分析观察到的稳定性相比，CpG覆盖率、等位基因特异性甲基化的困难很难解决[63]；（2）破译DNA甲基化衍生物也面临

挑战，最新研究开始全面了解去甲基化过程以及这些甲基化中间体对肿瘤发展、诊断和治疗的影响[64, 65]。其中牛津纳米孔（Oxford Nanopore Technologies，ONT）技术潜力巨大，能提供潜在新型生物标记物[66]，这是开创性的技术进展，但同时也会带来数据存储的问题[67]；（3）目前甲基化生物标记物转化为临床实践的进展较为困难。主要是因为大多数研究的设计、调查和数据不足以满足监管部门批准和应用于临床；（4）甲基化生物标记物诊断生产部门如何将研究结果转化为大量的临床实践，也是推广应用中存在的问题。此外，从临床应用的角度来看，甲基化标记物市场非常具有挑战性。

6 展望

目前，DNA甲基化正发展成为肿瘤转化医学的突出领域。DNA甲基化有助于肿瘤早期诊断、肿瘤状态、治疗效果、临床结果及预后，以提高肿瘤生存率。DNA甲基化以其稳定性成为肿瘤的无创诊断、治疗及预后预测的重要标记物。目前重要的创新主要有多癌症检测和确定起源组织[68]，多分析物测试的发展，新的基于酶的DNA转化方法等。尽管生物标记物已取得一定进展，但仍需要继续深入的研究，如当前生物标记物必须在传统位点进行测试，新型的生物标记物需在无创所得样本中得到进展，以弥补罕见肿瘤生物标记物的缺乏，未来可纳入多组学分析和综合计算来解决。单细胞技术的发展会带来克服药物反应中的细胞异质性问题[69]或下一代3D癌细胞模型的出现。表观转录组学[70]和对逆转录病毒DNA甲基化异常的深入研究将会使我们对肿瘤治疗新的领域有全新的认识。虽然面临许多挑战，但DNA甲基化生物标记物具有独特的优势，在临床转化应用方面有着广阔前景和价值。

参考文献

[1] NAKAGAWA H, FUJITA M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine[J]. Cancer Sci, 2018, 109(3): 513-522.

[2] FEINBERG A P, VOGELSTEIN B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts[J]. Nature, 1983, 301(5895): 89-92.

[3] NEUMANN M H D, BENDER S, KRAHN T, et al. ctDNA and CTCs in liquid biopsy−current status and where we need to progress[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2018, 16: 190-195.

[4] ESTELLER M, SANCHEZ-CESPEDES M, ROSELL R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non−small cell lung cancer patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(1): 67-70.

[5] ESTELLER M. Epigenetics in cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11): 1148-1159.

[6] FERGUSON-SMITH A C. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(2): 565-575.

[7] LYON M F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.)[J]. Nature, 1961, 190: 372-373.

[8] DAVIES H, BIGNELL G R, COX C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer[J]. Nature, 2002, 417 (6892): 949-954.

[9] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J] . Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69-84.

[10] JANIN M, ORTIZ-BARAHONA V, DE MOURA M C, et al. Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program[J]. Acta Neuropathol, 2019, 138(6): 1053-1074.

[11] ROSSELLÓ-TORTELLA M, LLINÀS-ARIAS P, SAKAGUCHI Y, et al. Epigenetic loss of the transfer RNA-modifying enzyme TYW2 induces ribosome frameshifts in colon cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117 (34): 20785-20793.

[12] CANDILORO I L, MIKESKA T, DOBROVIC A. Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation[J]. Epigenetics, 2011, 6 (4): 500-507.

[13] GONZALGO M L, LIANG G. Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) for quantitative measurement of DNA methylation[J]. Nat Protoc, 2007, 2(8):1931-1936.

[14] MEISSNER A, GNIRKE A, BELL G W, et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(18): 5868-5877.

[15] RAULUSEVICIUTE I, DRABLØS F, RYE M B. DNA methylation data by sequencing: experimental approaches and recommendations for tools and pipelines for data analysis[J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(4): 198-210.

[16] YOKOYAMA S, KITAMOTO S, YAMADA N, et al. The application of methylation specific electrophoresis (MSE) to DNA methylation analysis of the 5' CpG island of mucin in cancer cells[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 67.

[17] NAZMUL ISLAM M, YADAV S, HAKIMUL HAQUE M, et al. Optical biosensing strategies for DNA methylation analysis[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 92: 668-678.

[18] RODRÍGUEZ LÓPEZ C M, GUZMÁN ASENJO B, LLOYD A J, et al. Direct detection and quantification of methylation in nucleic acid sequences using high-resolution melting analysis[J]. Anal Chem, 2010, 82(21): 9100-9108.

[19] WEISENBERGER D J, TRINH B N, CAMPAN M, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(14): 4689-4698.

[20] ZHANG S, HUANG J, LU J R, et al. A novel fluorescent biosensor based on dendritic DNA nanostructure in combination with ligase reaction for ultrasensitive detection of DNA methylation[J]. J Nanobiotechnology, 2019,17(62):155-163.

[21] WANG P, MAI Z B, DAI Z, et al. Investigation of DNA methylation by direct electrocatalytic oxidation[J]. Chem Commun (Camb), 2010, 46(41): 7781-7783.

[22] BAREYT S, CARELL T. Selective detection of 5-methylcytosine sites in DNA[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47(1): 181-184.

[23] WANG J Y, CHANG S, LI G C, et al. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges[J]. Front Med, 2017, 11(4): 522-527.

[24] GAI W X, SUN K. Epigenetic biomarkers in cell-free DNA and applications in liquid biopsy[J]. Genes (Basel), 2019, 10(1): 32.

[25] DAGOGO-JACK I, SHAW A T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(2): 81-94.

[26] LAWN S D, KERKHOFF A D, VOGT M, et al. Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study[J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(3): 201-209.

[27] SIDDIQUI I, MAJID H, ABID S. Update on clinical and research application of fecal biomarkers for gastrointestinal diseases[J]. World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2017, 8 (1): 39-46.

[28] HULBERT A, JUSUE-TORRES I, STARK A, et al. Early detection of lung cancer using DNA promoter hypermethylation in plasma and sputum[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(8): 1998-2005.

[29] KONSTANTINIDI E M, LAPPAS A S, TZORTZI A S, et al. Exhaled breath condensate: technical and diagnostic aspects[J]. Scientific World Journal, 2015, 2015: 435160.

[30] VAN KESSEL K E, BEUKERS W, LURKIN I, et al. Validation of a DNA methylation-mutation urine assay to select patients with hematuria for cystoscopy[J]. J Urol, 2017, 197(3): 590-595.

[31] FEBER A, DHAMI P, DONG L, et al. UroMark-a urinary biomarker assay for the detection of bladder cancer[J]. Clin Epigenetics, 2017, 9(1): 8.

[32] CHEN X, ZHANG J T, RUAN W M, et al. Urine DNA methylation assay enables early detection and recurrence monitoring for bladder cancer[J]. J Clin Invest, 2020, 130 (12): 6278-6289.

[33] RUAN W M, CHEN X, HUANG M, et al. A urine-based DNA methylation assay to facilitate early detection and risk stratification of bladder cancer[J]. Clin Epigenetics, 2021, 13(1): 91.

[34] D'ANDREA D, SORIA F, ZEHETMAYER S, et al. Diagnostic accuracy, clinical utility and influence on decision-making of a methylation urine biomarker test in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer [J]. BJU Int, 2019, 123(6): 959-967.

[35] SU S F, DE CASTRO ABREU A L, CHIHARA Y, et al. A panel of three markers hyper-and hypomethylated in urine sediments accurately predicts bladder cancer recurrence[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(7): 1978-1989.

[36] XU Z J, GUJAR H, FU G H, et al. A novel DNA methylation signature as an independent prognostic factor in muscle-invasive bladder cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 614927.

[37] LIU J Q, ZHAO H Q, HUANG Y K, et al. Genome-wide cell-free DNA methylation analyses improve accuracy of non-invasive diagnostic imaging for early-stage breast cancer[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 36.

[38] YANG Y H, WU L, SHU X O, et al. Genetically predicted levels of DNA methylation biomarkers and breast cancer risk: data from 228 951 women of european descent[J]. J Natl Cancer Inst, 2020, 112(3): 295-304.

[39] MAIER S, NIMMRICH I, KOENIG T, et al. DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients-Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European

Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group[J]. Eur J Cancer, 2007, 43 (11):1679-1686.

[40] ZHANG M, WANG Y L, WANG Y, et al. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression to determine specific diagnostic biomarkers and prognostic biomarkers of breast cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 529386.

[41] GAMOENRIEDER S P, RINNERTHALER G, HACKL H, et al. DNA methylation signatures predicting bevacizumab efficacy in metastatic breast cancer[J].Theranostics, 2018, 8(8): 2278-2288.

[42] BROTHERTON J M, GERTIG D M, MAY C, et al. HPV vaccine impact in Australian women: ready for an HPV-based screening program[J]. Med J Aust, 2016, 204(5): 184.

[43] DE STROOPER L M A, VERHOEF V M J, BERKHOF J, et al. Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women[J]. Gynecol Oncol, 2016, 141(2): 341-347.

[44] DE STROOPER L M, MEIJER C J, BERKHOF J, et al. Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2014, 7(12):1251-1257.

[45] KONG L H, WANG L H, WANG Z Y, et al. DNA methylation for cervical cancer screening: a training set in China[J]. Clin Epigenetics, 2020, 12(1): 91.

[46] WIDSCHWENDTER A, MÜLLER HANNES M, FIEGL H, et al. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(2): 565-571.

[47] IMPERIALE T F, RANSOHOFF D F, ITZKOWITZ S H, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening[J]. N Engl J Med, 2014, 370(14): 1287-1297.

[48] BACH S, PAULIS I, SLUITER N R, et al. Detection of colorectal cancer in urine using DNA methylation analysis [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 2363.

[49] BAGHERI H, MOSALLAEI M, BAGHERPOUR B, et al. TFPI2 and NDRG4 gene promoter methylation analysis in peripheral blood mononuclear cells are novel epigenetic noninvasive biomarkers for colorectal cancer diagnosis[J]. J Gene Med, 2020, 22(8): e3189.

[50] MITCHELL S M, HO T, BROWN G S, et al. Evaluation of methylation biomarkers for detection of circulating tumor DNA and application to colorectal cancer[J]. Genes (Basel), 2016, 7(12): 125.

[51] OUSSALAH A, RISCHER S, BENSENANE M, et al. Plasma mSEPT9: a novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma[J]. EBioMedicine, 2018, 30: 138-147.

[52] ZHANG Y H, PETROPOULOS S, LIU J H, et al. The signature of liver cancer in immune cells DNA methylation[J]. Clin Epigenetics, 2018, 10(1): 8.

[53] WEISS G, SCHLEGEL A, KOTTWITZ D, et al. Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA methylation marker panel for plasma-based discrimination between patients with malignant and nonmalignant lung disease [J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(1): 77-84.

[54] LIU B, RICARTE F J, MALLISETTY A, et al. Detection of promoter DNA methylation in urine and plasma aids the detection of non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(16): 4339-4348.

[55] SCHOTTEN L M, DARWICHE K, SEWERYN M, et al. DNA methylation of PTGER4 in peripheral blood plasma helps to distinguish between lung cancer, benign pulmonary nodules and chronic obstructive pulmonary disease patients[J]. Eur J Cancer, 2021, 147: 142-150.

[56] WATERHOUSE R L, VAN NESTE L, MOSES K A, et al. Evaluation of an epigenetic assay for predicting repeat prostate biopsy outcome in african american men[J]. Urology, 2019, 128: 62-65.

[57] HAN Y Y, ZHANG M T, XU J F, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of leukocytes identifies CpG methylation signatures of aggressive prostate cancer[J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(3): 968-978.

[58] YLITALO E B, THYSELL E, LANDFORS M, et al. A novel DNA methylation signature is associated with androgen receptor activity and patient prognosis in bone metastatic prostate cancer[J]. Clin Epigenetics, 2021, 13 (1): 133.

[59] GUO X Y M, 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, 2021, 13(4): 838.

[60] YANG Y H, WU L, SHU X, et al. Genetic data from nearly 63,000 women of European descent predicts DNA methylation biomarkers and epithelial ovarian cancer risk [J]. Cancer Res, 2019, 79(3): 505-517.

[61] LI S Y, WANG L, ZHAO Q, et al. Genome-wide analysis of cell-free DNA methylation profiling for the early diagnosis of pancreatic cancer[J]. Front Genet, 2020, 11: 596078.

（下转第28页）