

文章编号 1006-8147(2022)02-0218-04

综述

外周血 SEPT9 基因甲基化检测在胃癌诊断中的研究进展

赵路瑶¹ 综述,李慕然²,刘艳迪² 审校

(1.南开大学医学院,天津 300071;2.天津市人民医院消化科,天津 300121)

摘要 胃癌发病率、死亡率位居前列,原因在于缺乏敏感高效的检查手段。SEPT9 基因是 Septin 基因家族中的一员,经历了最多的选择性剪接,参与胞质分裂、极化、囊泡运输、膜重建、脱氧核糖核酸修复、细胞迁移和凋亡等多种生物过程。研究表明,相较于对照组,胃癌外周血 SEPT9 甲基化水平明显升高,与长期生存率相关,且胃癌外周血 SEPT9 甲基化检测的敏感性及其特异性优于传统肿瘤标志物,可以作为胃癌无创早期筛查、诊断和预后的生物标志物。

关键词 胃癌;SEPT9;DNA 甲基化;诊断

中图分类号 R735.2

文献标志码 A

胃癌是常见的恶性肿瘤之一。流行病学研究数据显示,胃癌的发病率在所有恶性肿瘤中排名第5位,但其死亡率却相对更高,位列第3位^[1]。目前胃癌的诊断金标准为内镜下活检的病理结果,但这种方法技术复杂,受检者依从性差,特别是对无症状的个体很难开展。临床上,用于胃癌预后指标的肿瘤标志物主要有癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 CA19-9 和 CA72-4,单独诊断胃癌的敏感性为 20.1%~27.6%,联合检测敏感性为 48.2%^[2]。这些检测手段或是技术复杂,或是敏感性和特异性低,迫切需要寻找简便易行、敏感高效的检测手段。Septins 是一种 GTP 结合蛋白,Septin 9 基因是 Septin 基因家族中的一员,在结直肠癌中,SEPT9 可以作为肿瘤生物标志物来诊断疾病,同时可预测预后、复发以及转移风险,其价值已在临床中得到证实^[3]。由于结直肠癌和胃癌都是胃肠道肿瘤,它们都有一些分子特征,包括微卫星不稳定、高甲基化和基因突变,SEPT9 甲基化检测对于在胃癌中的筛查价值也逐渐引起关注^[4-5]。本文对 SEPT9 基因的结构特征、生物学功能、致癌机制,以及检测胃癌外周血 SEPT9 基因甲基化的研究进展做一综述。

1 Septins 家族概述

Septins 在进化和结构上都与 RAS 癌基因相关,广泛分布于除植物外的所有真核生物中。结构特征(图1)为一个 G 结构域(G1 是以 P-环的存在为特征,能够与核苷酸磷酸基团相互作用,G3 和 G4 与 GTP 结合相关),以及 N 端多碱性氨基酸结构域(polybasic domain)和 C 端卷曲螺旋结构域(coiled-

coil domain)^[6]。哺乳动物基因组编码 13 种不同的 Septins(Septin1~12,14)。根据序列同源性和螺旋结构域的数量,可分为 4 组:SEPT2(Septin 1,2,4,5)、SEPT3(Septin 3,9,12),SEPT6(Septin 6,8,10,11,14)、SEPT7^[7]。不同组成员间有很高的亲和力,它们通过两个相互作用界面:G 界面和 NC 界面,在折叠时相互靠近,聚合形成非极性三、六、八聚体^[8]。其中由两个 Septin 2/6/7/9 复合物组成的回文八聚体是大多数哺乳动物 Septin 蛋白的基本单位,可进一步聚合成更高阶的结构,如细丝、环,以及通过端端和横向连接形成网状结构等^[9]。



注:GTP-binding domain:GTP 结合结构域;PBR:磷酸肌醇结合多元酸区;SUD:septin 独特结构域;coiled-coil:卷曲螺旋结构域

图1 Septins 基本结构

Septin 蛋白家族是继微管、微丝及中间纤维蛋白后发现的第4种细胞骨架成分^[10],在细胞分裂、胞内物质转运、扩散屏障、细胞周期调控与细胞凋亡、细菌-细胞间相互作用、细胞突起、溶酶体稳态、囊泡转运、T 细胞发育等生理过程中发挥着重要作用^[11-15]。多项研究表明,Septin 表达异常与多种疾病相关,包括神经退行性疾病、神经肌肉疾病、阿尔茨海默病、生育障碍、恶性肿瘤等。在恶性肿瘤中,Septin 与癌症发生的多种机制有关,如细胞持续增殖、抗细胞凋亡、血管生成、细胞迁移和侵袭、染色体不稳定、抗癌药物耐药以及癌症相关微环境改变等^[10,16-17]。

2 Septin 9 概述

2.1 Septin 9 结构特征 Septin9 基因位于人类染色

作者简介 赵路瑶(1996-),女,硕士在读,研究方向:胃癌早期诊断;
通信作者:刘艳迪,E-mail:liuyandi66@163.com。

体 17q25.3, 包含 17 个外显子, 其长度约 24×10^3 bp^[18]。与家族其他成员相比, Septin9 N 端含有长的脯氨酸区域, C 端缺少卷曲结构域。Septin9 是 Septin 家族中唯一直接促进肌动蛋白聚合、交联的成员^[19]。在哺乳动物中, SEPT9 经历了最多的选择性剪接, 5' 端产生 6 个不同的 mRNA 变异剪接体 (SEPT9 v1、2、3、4、4*、5), 3' 端的外显子内部不对称的变异剪接亦可产生 3 种不同 mRNA (SV1、2 和 3), 因此, SEPT9 可有 18 种转录产物, 编码包括长型 (SEPT9_v1、SEPT9_v2、SEPT9_v3)、中等型 (SEPT9_v4、SEPT9_v4*) 和短型 (SEPT9_v5) 等 15 种多肽^[20], 造就复杂的生物学功能。

2.2 Septin9 的生物学功能 Septin9 是一种细胞周期相关蛋白。电镜观察表明 Septin9 与 F-肌动蛋白直接结合, 维持肌动蛋白生长和收缩的完整性, 使肌动蛋白细丝交联, 弯曲成功能结构 (如细胞运动收缩环、肌动蛋白应力纤维、细胞突起), 促进局部黏附和上皮细胞运动^[19, 21]。此外, Septin9 结合并捆绑微管, 通过介导胞外囊泡复合体到中体的定位, 在胞质分裂中发挥重要作用^[22]。因此, Septin9 沉默后将导致细胞分裂异常, 最终产生多核细胞。研究发现 Septin9 阻止接头蛋白 CIN85 (SH3KBP1) 与泛素连接酶 Cb1 的结合, 负向调节泛素依赖的表皮生长因子受体 (EGFR) 降解, 从而将 Septin9 的分子活性与细胞增殖联系起来^[23]。

3 Septin9 与癌症

3.1 Septin9 与多种恶性肿瘤 Septin9 参与许多生物过程, 如胞质分裂、极化、囊泡运输、膜重建、脱氧核糖核酸修复、细胞迁移和凋亡, 在多种恶性肿瘤的发展中发挥重要作用。Septin9 表达的改变可导致癌症, 如结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、血液系统肿瘤、头颈部鳞癌、胃癌、肺癌、前列腺癌等。Septin9 基因的组织特异性及转录产物可变剪接, 在不同肿瘤中转录表达模式不同, 可以是表达减少、过度表达, 也可以是产生融合基因, 最终导致 Septin9 各亚型表达失衡。如在结肠癌中, 主要为 SEPT9 v2 高度甲基化^[24]; 在卵巢癌上皮中 SEPT9 v1 和 v4* 高表达^[25]; 在乳腺癌中 SEPT9 v1 高表达, v2 低表达^[26]。随着对 Septin9 功能的了解不断深入, 人们逐渐认识到 Septin 不同于癌基因、抑癌基因, 而是属于更广泛的癌症基因类别。Septin9 基因常在多种肿瘤细胞中异常表达, 因此 Septin9 蛋白可作为某些恶性肿瘤的早期筛查、诊断和预后的标志, 并有可能成为抗癌治疗的新靶点。

3.2 Septin9 致癌机制 关于 SEPT9 促进肿瘤发

生、发展的机制, 目前研究主要有 HIF-1 信号通路、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路、Rho 信号通路、细胞分裂异常、DNA 甲基化等机制。研究表明 SEPT9_i1 的前 25 个氨基酸 (N25) 与 Septin 家族的其他成员相比是独一无二的, 该 N25 结构域是 SEPT9_i1 激活缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 的关键区域, SEPT9_i1 蛋白与 HIF-1 α 结合可增强其转录活性, 同时防止其由 RACK1 介导的降解来上调 HIF-1 水平, 增加下游基因如血管内皮生长因子的表达, 促进血管生成和肿瘤的发生^[27]。在整个细胞周期, 特别是在 G1 期, SEPT9_v1 上调激活 JNK 信号通路, 提高 cyclin D1 蛋白表达水平, 抑制细胞凋亡和促进细胞增殖导致细胞周期以更快的速度进行^[28]。SEPT9 还可以通过 Rho 信号通路影响细胞骨架的形成, 介导细胞间或与细胞基质间的黏附, 进而影响肿瘤细胞的侵袭及转移^[29]。在细胞分裂中, 胞质分裂是有丝分裂的最后一步, 涉及膜断裂的 ESCRT (endocytic sorting complex required for transport) 机制, Septins 在细胞中间体形成膜结合双环, 双环提供 ESCRT-III 膜组装位点, SEPT9 是 ESCRT-III 环形成和扩张所必需的, SEPT9 通过与 TSG101 相互作用, 招募并组装 ESCRT-II/-III 亚基^[31]。因此, SEPT9 表达异常致使有丝分裂纺锤体缺陷和无法完成细胞分裂, 进而导致多倍体和非整倍体。

在细胞分化过程中, 通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 的改变等表观遗传事件使得某些基因的表达发生变化。与经典的遗传改变不同, 表观遗传不涉及 DNA 序列的变化, 是潜在的可逆和可遗传的。其中 DNA 甲基化是 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶残基在 5'-碳位置甲基化, 产生 5-甲基胞嘧啶。在正常细胞中, 大多数 CpG 二核苷酸散在分布整个基因组中, 通常是甲基化的; 而一些 CpG 二核苷酸聚集组成的 CpG 岛, 极少甲基化。但在肿瘤细胞中, 以整个基因组的低甲基化和启动子 CpG 岛高甲基化为特点。机制在于这些 CpG 岛一旦发生甲基化, 可抑制基因表达: 一方面, DNA 甲基化改变其构象, 使其不利于结合转录因子, 抑制基因表达; 另一方面, 甲基化的 DNA 分子招募并结合甲基化 CpG 结合蛋白, 这些甲基化 CpG 结合蛋白继续与其他蛋白 (如组蛋白脱乙酰酶) 结合, 最终形成致密的、不活跃的异常染色质, 从而抑制基因的表达^[6]。SEPT9 基因异常甲基化导致基因表达异常, 引起机体生理功能异常, 最终诱发肿瘤。

3.3 外周血 SEPT9 基因甲基化在胃癌中的临床检测 一项在体细胞癌变目录 (COSMIC) 数据库中搜

查 SEPT9 突变情况的研究表明:SEPT9 在胃癌中的突变明显多于所有其他的 SEPT9 (~14%);在前十位最常见的 SEPT9 突变中,SEPT14 和 SEPT9 在皮肤癌和胃癌中的频率分别为 2.56%和 1.86%,位居榜首^[30]。因此我们可以认为 SEPT9 与胃癌关系密切。Septin 突变发生的频率较低,甲基化频率高。启示检测几个频繁异常甲基化区域的甲基化可能比检测单个或少数突变标志物具有更高的灵敏度。

研究表明胃癌组织中 Septin9 基因甲基化显著高于相应的癌旁组织^[31]。考虑到样本获取的便利性,检测外周血 DNA 甲基化水平无疑为无创胃癌检测提供了一个新的途径。目前对于外周血甲基化检测的研究(表 1)有:2013 年 Lee 等^[32]对 153 例胃癌患者的外周血样本进行研究,发现外周血 SEPT9 甲基化检测的灵敏度为 17.7%,特异度为 90.6%;且外周血甲基化 SEPT9 阳性患者有远处转移倾向,无病生存率低;另外,该研究发现混合型(40.0%,2/5)、肠型(23.5%,12/51)患者的外周血 SEPT9 基因甲基化与弥漫型(7.3%,6/82)相比有更高的阳性率。研究肯定了血浆 mSEPT9 检测在胃癌中的价值,特别是在肠道、混合型、IV 期胃癌患者中。2017 年 Song 等^[3]使用

Epi proColon 2.0 血液检测试剂检测胃癌患者外周血,发现 49.4%(44/89)胃癌阳性。同样地,2018 年 Fu 等^[33]研究血浆 mSEPT9 对结直肠癌诊断价值时同样发现 70%(7/10)胃癌患者血浆 mSEPT9 阳性。

2019 年曹长琦等^[34]通过对 74 例早期胃癌(EGC)患者血浆进行 Septin 9、RNF180 甲基化检测发现:SEPT9 甲基化对 EGC 的灵敏度为 28.3%,特异度为 94.2%;在此基础上比较了与传统肿瘤标志物检测的差别,并得出结论:联合检测 SEPT9 与 RNF180 阳性率最高,其次依次为 RNF180、SEPT9、CA724、CA125、CEA、CA199。另外,RNF180/Septin9 基因甲基化检测试剂盒(PCR 荧光探针法)的临床试验证实,该试剂盒检测胃癌的灵敏度为 61.76%(420/680),特异性为 85.07%(456/536)。分期灵敏度为 I 期 50.00%,II 期 62.32%,III 期 67.68%,IV 期 82.00%,分期不明为 55.88%。2020 年 Song 等^[35]分析 239 例胃癌患者血浆 Septin9 基因甲基化水平时,发现其对胃癌的灵敏度为 47.7%,特异度为 92.5%,而当 mSEPT9 与 CA724 结合时,灵敏度提高到 63.6%,特异度为 91.1%,研究还证实治疗前 mSEPT9 水平是长期生存率的良好预测因子。

表 1 胃癌患者外周血 SEPT9 基因甲基化检测实验研究

临床研究		样本量	研究结果		
			敏感度(%)	特异度(%)	其他
SEPT9	2013 年 Lee 等 ^[32]	153	17.7	90.6	混合型>肠型>弥漫型
	2017 年 Song 等 ^[3]	89	49.4		
	2018 年 Fu 等 ^[33]	10	70.0		
	2019 年曹长琦等 ^[34]	74*	28.3	94.2	SEPT9>CA724>CA125>CEA>CA199
	2020 年 Song 等 ^[35]	239	47.7	92.5	(结直肠癌、肝癌)>(胃癌、食管癌)

注:*早期胃癌

综上所述,SEPT9 基因通过甲基化改变表达水平,在胃癌发生、发展中扮演复杂角色。通过对外周血 SEPT9 基因甲基化检测可发现胃癌。与传统肿瘤标志物相比,SEPT9 基因甲基化检测有更高的灵敏度。通过将 mSEPT9 测定其他标志物结合,检测的敏感性显著增强,更有助于临床实践。

Septin9 甲基化检测在胃癌早期诊断中的价值已凸显,但是具体作用的信号通路及机制需要深入研究。由于 Septin9 复杂的异构体的存在,目前仍然无法清楚地阐明 mSEPT9 和 Septin9 表达之间的关系,对于 SEPT9 基因是否是癌基因的问题仍存在争议,因此未来应细化 Septin9 各亚型,研究其在癌症中的作用。此外,SEPT9_v2 启动子高甲基化是结直肠癌形成过程的特有表现,其成功用于外周血检测

筛查结直肠癌,提示我们未来胃癌甲基化生物标志物研究应考虑到特异性剪接变异体的作用。再者,可通过优化外周血 SEPT9 基因甲基化检测技术,提高检测准确性,开展大样本随机对照实验,进一步研究定量 DNA 甲基化与胃癌病程进展的关系,在早期筛查、诊断、靶向治疗、疗效评价、预后和复发监测中发挥新的作用。

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] LIANG Y, WANG W, FANG C, et al. Clinical significance and diagnostic value of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(31):49565-49573.

- [3] SONG L, LI Y. Progress on the clinical application of the SEPT9 gene methylation assay in the past 5 years[J]. *Biomark Med*, 2017, 11(6):415–418.
- [4] DANAHER P, WARREN S, ONG S F, et al. A gene expression assay for simultaneous measurement of microsatellite instability and anti-tumor immune activity[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1):15.
- [5] RATTI M, Lampis A, HAHANE J C, et al. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(22):4151–4162.
- [6] SUN J, ZHENG M Y, LI Y W, et al. Structure and function of Septin 9 and its role in human malignant tumors[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2020, 12(6):619–631.
- [7] NEUBAUER K, ZIEGER B. The mammalian Septin interactome[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5(2):00003.
- [8] VISSA A, GIULIANI M, FROESE C D, et al. Single-molecule localization microscopy of septin bundles in mammalian cells[J]. *Cytoskeleton*, 2019, 76(1):63–72.
- [9] SELLIN M E, SANDBLAD L, STENMARK S, et al. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(17):3152–3164.
- [10] FARRUGIA A J, RODRIGUEZ J, ORGAZ J L, et al. CDC42EP5/BORG3 modulates SEPT9 to promote actomyosin function, migration, and invasion[J]. *J Cell Biol*, 2020, 219(9):e201912159.
- [11] KARASMANIS E P, HWANG D, NAKOS K, et al. A septin double ring controls the spatiotemporal organization of the ESCRT machinery in cytokinetic abscission[J]. *Curr Biol*, 2017, 176(5):139–148.
- [12] ROBERTIN S, MOSTOWY S. The history of septin biology and bacterial infection[J]. *Cell Microbiol*, 2020, 22(4):e13173.
- [13] DOLAT L, SPILIOTIS E T. Septins promote macropinosome maturation and traffic to the lysosome by facilitating membrane fusion[J]. *J Cell Biol*, 2016, 214(5):517–527.
- [14] HECHT M, ROSLER R, WIESE S, et al. An interaction network of the human SEPT9 established by quantitative mass spectrometry[J]. *G3 (Bethesda)*, 2019, 9(6):1869–1880.
- [15] LASSEN L B, FUCHTBAUER A, SCHMITZ A, et al. Septin9 is involved in T-cell development and CD8⁺ T-cell homeostasis [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 352(3):695–705.
- [16] TARGA B, KLIPFEL L, CANTALOUBE I, et al. Septin filament coalignment with microtubules depends on SEPT9_i1 and tubulin polyglutamylation, and is an early feature of acquired cell resistance to paclitaxel[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2):54.
- [17] CALVO F, RANFTL R, HOOPER S, et al. Cdc42EP3/BORG2 and Septin network enables mechano-transduction and the emergence of cancer-associated fibroblasts[J]. *Cell Rep*, 2015, 13(12):2699–2714.
- [18] MCILHATTON M A, BURROWS J F, DONAGHY P G, et al. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3[J]. *Oncogene*, 2001, 20(41):5930–5939.
- [19] SMITH C, DOLAT L, ANGELIS D, et al. Septin 9 exhibits polymorphic binding to F-actin and inhibits myosin and cofilin activity[J]. *J Mol Biol*, 2015, 427(20):3273–3284.
- [20] HALL P A, RUSSELL S H. Mammalian septins: dynamic heteromers with roles in cellular morphogenesis and compartmentalization[J]. *J Pathol*, 2012, 226(2):287–299.
- [21] ØSTEVOLD K, MELENDEZ A V, LEHMANN F, et al. Septin remodeling is essential for the formation of cell membrane protrusions (microtentacles) in detached tumor cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44):76686–76698.
- [22] SPILIOTIS E T. Spatial effects—site-specific regulation of actin and microtubule organization by septin GTPases[J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(1):jcs207555.
- [23] DIESENBERG K, BEERBAUM M, FINK U, et al. SEPT9 negatively regulates ubiquitin-dependent downregulation of EGFR[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(2):397–407.
- [24] WASSERKORT R, KALMAR A, VALCZ G, et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:398.
- [25] SCOTT M, MCCLUGGAGE W G, HILLAN K J, et al. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(5):1325–1329.
- [26] MARCUS J, BEJERANO E, SAGIE M, PATTERSON N, et al. Septin 9 isoforms promote tumorigenesis in mammary epithelial cells by increasing migration and ECM degradation through metalloproteinase secretion at focal adhesions[J]. *Oncogene*, 2020, 38(30):5839–5859.
- [27] TAZAT K, SCHINDLER S, DEPPING R, et al. Septin 9 isoform 1 (SEPT9_i1) specifically interacts with importin- α 7 to drive hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α nuclear translocation [J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2019, 76(1):123–130.
- [28] GONZALEZ M E, MAKAROVA O, PETERSON E A, et al. Up-regulation of SEPT9_v1 stabilizes c-Jun-N-Terminal Kinase and contributes to its pro-proliferative activity in mammary epithelial cells [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(4):477–487.
- [29] YEH Y T, HUR S S, CHANG J, et al. Matrix stiffness regulates endothelial cell proliferation through Septin 9[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e46889.
- [30] ANGELIS D, SPILIOTIS E T. Septin mutations in human cancers[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4:122.
- [31] 张意琴, 胡笑蓉, 毛雄英, 等. 胃癌组织 septin 9 基因甲基化及其临床意义研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(14):1987–1990.
- [32] LEE H S, HWANG S M, KIM T S, et al. Circulating methylated Septin 9 nucleic acid in the plasma of patients with gastrointestinal cancer in the stomach and colon[J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(3):290–296.
- [33] FU B, YAN P, ZHANG S, et al. Cell-free circulating methylated SEPT9 for noninvasive diagnosis and monitoring of colorectal cancer [J]. *Dis Markers*, 2018, 2018(4):6437104.
- [34] 曹长琦, 常琳, 吴齐. SEPT9 与 RNF180 基因甲基化检测在早期胃癌筛查中的诊断价值[J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(24):1251–1255.
- [35] SONG L, CHEN Y, GONG Y, et al. Opportunistic screening and survival prediction of digestive cancers by the combination of blood mSEPT9 with protein markers[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12:1758835920962966.

(2021-08-12 收稿)