DOI:10.12113/202008006

基于 DNA 甲基化模式筛选评估结肠腺癌预后的标记物

刘　阳,王丽茹,张　岩*
(哈尔滨工业大学 生命科学与技术学院计算生物学研究中心, 哈尔滨 150001)

摘　要:为了通过分析 DNA 甲基化谱识别出与预后相关的结肠腺癌亚型。从 TCGA 数据库获取了结肠腺癌患者的甲基化数据,通过差异甲基化分析和构建 COX 比例风险回归模型筛得与预后显著相关的 CpG 位点,并通过一致性聚类识别出 7 个亚型。生存分析和临床特征检验显示 7 个亚型间预后差异显著且亚型特征可由多种临床特征反映。此外,用 7 个亚型间识别出的差异甲基化位点构建的基于 SMO(序列最小最优化)的预测模型在各亚型上都有较高的 AUC 值,并用检验集进行了验证。综上,本研究利用生物信息学算法识别了 7 个预后差异的结肠腺癌亚型并挖掘了它们的特异性甲基化标记。该研究结果或可使得结肠腺癌预后被更精准地评估,为早期诊断及治疗方案提供新思路。

关键词:结肠腺癌;DNA 甲基化;一致性聚类
中图分类号:Q523　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1672-5565(2021)04-240-09

Marker evaluation for the prognosis of colon adenocarcinoma based on DNA methylation patterns

LIU Yang, WANG Liru, ZHANG Yan*
(*School of Life Science and Technology*, *Computational Biology Research Center*, *Harbin Institute of Technology*, *Harbin* 150001, *China*)

Abstract: To identify the subtypes of colon adenocarcinoma for prognosis by analyzing the DNA methylation patterns, methylation data of colon adenocarcinoma patients was obtained from the TCGA database, and CpG sites that significantly related to prognosis were screened by differential methylation analysis and constructing a COX proportional hazard regression model. Seven subtypes were identified through consensus clustering. Survival analysis and clinical feature tests showed that the prognosis was significantly different among the seven subtypes and the subtype features could be reflected by multiple clinical features. In addition, the sequence minimal optimization (SMO)-based prediction model was constructed based on the differential methylation data and showed high AUC values for each subtype. Finally, the SMO model was evaluated on the test set. To sum up, this study used bioinformatics algorithms to identify seven subtypes of colon adenocarcinoma with different prognosis and their specific methylation markers. The results of this study enable the prognosis of colon adenocarcinoma to be more accurately evaluated, providing new ideas for early diagnosis and treatment.

Keywords: Colon adenocarcinoma; DNA methylation; Consensus clustering

结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)是一种发生率极高的恶性肿瘤[1]。结肠腺癌(Colon adenocarcinoma, COAD)是结直肠癌最常见的病理类型之一(约占 95%)[2]。然而目前现有的结肠腺癌的治疗手段(包括手术和化疗等综合治疗)仍然不能达到令人满意的效果,结肠腺癌的五年生存率依然不容乐观[3]。大部分患者发现和初诊为结肠腺癌时已处于癌症晚期,因此,现阶段的医疗诊治过程中晚就诊、缺乏可靠的生物标志物和不精准的治疗靶点已成为治疗结肠腺癌的主要障碍[4],而早期诊断和治疗对于改善患者的预后和生活质量至关重要。最新的研究表明,除了遗传变异以外,扰乱的、

收稿日期:2020-08-12;**修回日期:**2020-09-29.
基金项目:国家自然科学基金项目(No.61972116);黑龙江省应用技术研究与开发计划项目(No.GA20C018).
作者简介:刘阳,女,本科生,研究方向:生物工程. E-mail: 1162800106@stu.hit.edu.cn.
*通信作者:张岩,女,教授,研究方向:生物信息学,计算表观遗传学. E-mail: zhangtyo@hit.edu.cn.

不平衡的表观遗传基因组也是癌症发生发展的重要原因[5]。DNA 甲基化是一种重要的调控基因表达的表观遗传修饰,与癌症的发生和发展紧密相关[6]。异常的 DNA 甲基化通过激活癌基因和/或使肿瘤抑制基因失活诱导癌症的发生发展[7]。通过因此本课题旨在通过结肠腺癌 DNA 甲基化谱,分析患者的 DNA 甲基化模式并识别出与预后相关的结肠腺癌亚型。

1　材料与方法

1.1　DNA 甲基化数据的获取和预处理

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA, https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga)数据库中下载了结肠腺癌样本 DNA 甲基化数据和这些样本对应病人的临床信息,甲基化数据全部由 Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip 芯片平台产生。选取 324 个记录了患者生存状态的结肠腺肿瘤样本数据进行接下来的分析。研究表明,发生在 DNA 启动子区的异常甲基化对癌症的发生发展起着重要调控作用。在本研究中启动子区域定义为转录起始位点上游 2 kb 至下游 0.5 kb。首先选取癌症样本数据中属于启动子区的位点,去除其中的 SNP 位点、对应于性染色体上的位点和一个位点对应多个基因的位点。接下来去除 70%以上的样本中有缺失的位点,最后使用 k 近邻算法(knn)补全其余的缺失值,该算法使用“impute” R 包中的 impute.knn()函数实现,其中参数 k 取 10、$maxp$ 取3 000。

1.2　提取分类特征

为寻找在癌症和癌旁样本中甲基化水平有差异且差异具有显著性的 CpG 位点,计算每个位点在癌症和癌旁样本中的甲基化水平平均值,求出均值差并用 t 检验方法计算该差异的显著性。本研究将均值差绝对差异>0.1 且经 Benjamini-Hochberg 多重检验校正方法校正后 $p < 0.05$ 的 CpG 位点视作差异甲基化位点。将 324 个样本按7∶3的比例划分为训练集与测试集,分组原则为随机分组且死亡率相似。最后分为 226 个样本的训练集和 98 个样本的测试集。

为获得与预后相关的结肠腺癌分子亚型,将使用显著影响生存的 CpG 位点作为分类特征。首先,使用每个样本所对应患者的生存状态和生存时间为每个差异甲基化 CpG 位点和患者的性别、年龄、临床分期构建单变量 COX 比例风险回归模型,分析每个 CpG 位点的甲基化水平、年龄、阶段与预后的关系。再将单变量中显著影响预后的临床因素作为协变量引入多变量模型筛选得到独立影响预后的 CpG 位点。对于每个 CpG 位点 i,单变量和多变量 COX 比例风险回归模型的公式定义如下:

$$h(t,x)_i = h0(t)exp\ (\beta_{methy}\ methy_i) \quad (1)$$

$$h(t,x)_i = h0(t)exp\ (\beta_{methy}\ methy_i + \beta_{stage}stage) \quad (2)$$

式中 $h0(t)$ 是基准风险方程,可以是任意一个针对时间 t 的非负方程,$methy_i$ 是代表 CpG_i 甲基化水平的矢量,stage 是代表患者临床分期的矢量,β_{methy} 和 β_{stage} 代表回归系数。该模型使用 Benjamini-Hochberg 多重检验校正方法对 P 值进行校正。

1.3　识别预后相关的 DNA 甲基化亚组

在指定聚类算法和度量距离时,使用 ConcensusClusterPlus 包内嵌的多种聚类算法和距离进行尝试,以探寻最优的聚类结果。根据输出的结果文件,使用欧几里得距离为度量的 K 均值聚类算法被纳入考虑范围。

分组数 k 的确定是本研究要解决的一个重要问题,对从 $k=2$ 到 $k=10$ 的不同分组数,应用上一步的聚类方法,除了固有的输出结果外,对不同分组数下类别的平均一致性和一致性变异系数进行了计算。最终用于确定聚类方法和聚类数的标准是:在某一聚类数 k 下,组间的一致性数值相对较高、变异系数相对较低,并且 CDF 曲线下面积在相邻的两个类别数量间的改变趋势较缓。变异系数根据下式计算:

$$CV = \left(\frac{SD}{MN}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中 SD 是同一分类数下不同分组间一致性的标准差,MN 是同一分类数下不同分组间的平均一致性。根据上述标准,最终选择使用 K 均值算法,以欧几里得距离作为相似度指标的聚类方法,确定聚类数目 k 为 7。

1.4　不同甲基化亚组间的预后分析

通过与预后相关的 CpG 位点区分出了七个亚组,自然应该考察这七个 DNA 甲基化亚组间的预后情况。对得到的甲基化亚组进行 Kaplan-Meier 生存分析。这一分析通过“survival” R 包中的函数 survfit()和 survdiff()完成。并使用对数秩检验(log-rank test)分析生存差异的统计学显著性。

1.5　各甲基化亚组间的特征描述

目前结肠腺癌还没有通过临床病理特征定义的细分亚型,在分析并确定了不同 DNA 甲基化亚型间的预后差异之后,进一步分析各个甲基化亚型与临床特征的相关性,所有检验方法若无特殊说明均采取双侧检验。

根据临床数据的情况,使用费希尔精确检验(Fisher's exact test)分析各临床特征在不同甲基化亚型间的分布是否有显著差异。

在每个甲基化亚型内,对每个临床特征和总体之间进行超几何检验,以分析各临床特征在各甲基化亚型内的富集是否具有显著性。

1.6 筛选甲基化亚型的特异性标记

使用一种基于香农熵模型可从全基因组甲基化谱中鉴定差异甲基化区域(DMR)的软件 QDMR[12](Quantitative Differentially Methylated Regions),从用于识别七个甲基化亚组的 137 个 CpG 位点中筛选每个亚组的特异性甲基化标记。由于在前述亚组确定的过程中采用了一致性聚类的方法,这意味着各个亚组内的样本有着相似的甲基化模式。因此,本研究计算用于一致性聚类的 137 个特征位点在七个亚组中的甲基化均值,以该均值来表征各位点在不同亚组中的甲基化状态,将得到 285×6 维矩阵作为 QDMR 的输入。在衡量特异性的过程中,参数 SD 被设置为 0.07。

1.7 构建和评估甲基化亚型预测模型

本研究的 DNA 甲基化亚型由前述无监督的一致性聚类方法得到,为了验证 DNA 甲基化分型结果并建立更为便捷精确的结肠腺癌甲基化分型方法,使用有着 7 个甲基化亚型标签的训练集构建有监督的 SMO 分类模型。在 98 个样本的测试集中使用 1.2中得到的预测模型,根据样本的甲基化数据将患者划分到 7 个 DNA 甲基化亚型中,也就是使用 SMO 分类模型将训练集得到的 7 个甲基化亚型标签分配给测试集中的样本。然后对测试集中 7 个甲基化亚型进行生存分析,验证模型的稳定性和准确性。

2 结果和分析

2.1 结肠腺癌 DNA 甲基化特征的筛选

本研究将均值差绝对差异> 0.1 且 $p < 0.05$ 的 CpG 位点视作样本对之间显著差异的 CpG 位点。最终得到 26 158 个差异甲基化位点,这一结果可视化使用 R 包 ggplot(见图 1)。

为获得与预后相关的结肠腺癌分子亚型,使用显著影响存活的 CpG 位点作为分类特征。首先将所有结肠腺癌样本按照 7∶3 的比例划分为训练集和测试集,分别包含 226 个样本和 98 个样本。接着,为训练集中的样本基于生存时间和存活情况构建 COX 比例风险回归模型。单变量 COX 模型获得的 2 838 个与预后显著相关位点被用于多变量 COX 模型构建,3 个显著的临床因素"分期"(gender: p = 0.017, age: 0.004, stage: 0.016)被作为协变量也引入其中,最终多变量的回归模型获得 137 个依旧显著的位点,部分位点所对应的基因(见表 1)。

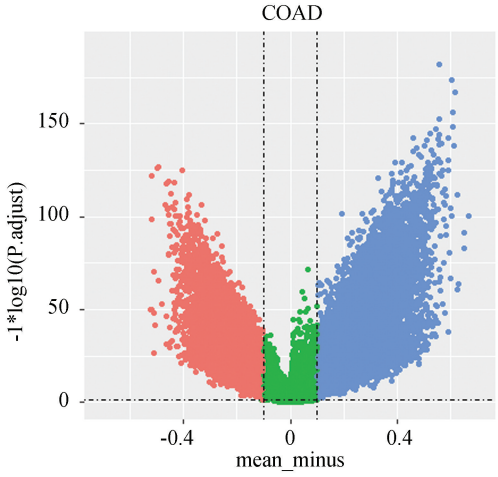


图 1 结肠腺癌差异甲基化位点火山图

Fig.1 Volcano plot of differential methylation sites of colon adenocarcinoma

注:横坐标是癌症癌旁样本间不同 CpG 位点的均值差,纵坐标是经过多重检验校正后的 p 值负对数。在均值差阈值和 P 值分别设置为 0.1 和 0.05 的情况下,红色区域为差异且显著的低甲基化位点,蓝色区域是差异且显著的高甲基化位点。

表 1 特异性位点基因对应表

Table 1 Characteristic sites and corresponding gene symbols

Characteritsics	Gene Symbol
cg00328935	FLJ43860
cg00345862	LECT1
cg00547077	ZNF132
cg00689580	TFAP2A
cg01196531	ONECUT1
cg01227558	ODZ2

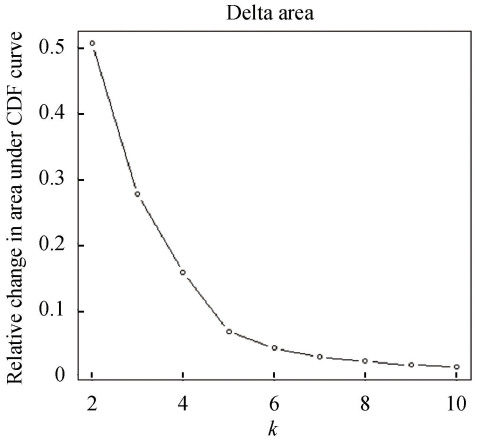
P 值使用 Benjamini-Hochberg 方法进行了多重检验校正,Hazard.Ratio 代表着 COX 模型的风险比,风险比是相对而言的,风险比大于 1 的位点被认为与不良预后相关,小于 1 的位点被认为与良好预后相关。137 个 CpG 位点将被用作分组特征。

2.2 基于一致性聚类的结肠腺癌亚组识别

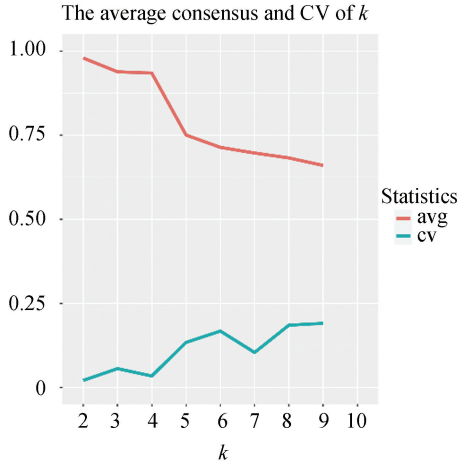
进一步对所获得的 137 个 CpG 位点进行一致性聚类以获得与预后相关的结肠腺癌 DNA 甲基化亚型。本研究计算每个类别的平均聚类一致性和聚类之间的变异系数,结合 ConcensusClusterPlus 包的输出结果(见图 2),根据 1.3 中描述的方法来确定选择最优的聚类算法和类别数 k。

对于 K 均值算法,CDF 曲线下面积改变趋势从聚类数目 k=6 开始明显趋缓且分类数为 7 时,其平均聚类一致性曲线和变异系数曲线有一个明显的拐点,拥有相对高的一致性系数和相对低的变异系数。

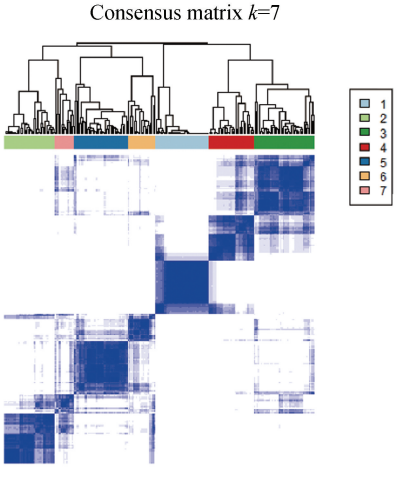
因此,对于 K 均值算法,认为它在聚类数为 7 时具有较高的聚类稳定性,$k=7$ 是最适聚类数。最终确定使用聚类数 $k=7$ 时 K 均值算法的聚类结果用于下一步的分析。



(a)一致聚类的Delta面积曲线



(b) 每个分类数k下的类别之间的平均类一致性和变异系数



*(c)*结肠腺癌样本的一致性聚类分析

图 2　基于 K 均值算法的结肠腺癌亚型分类标准

Fig.2　Classification standards for colon adenocarcinoma subtypes based on *k*-means algorithm

注:(a)表示每个类别号 k 与 $k-1$ 相比的累积分布函数(CDF)曲线下面积的相对变化。横轴表示类别编号 k,纵轴表示 CDF 曲线下面积的相对变化。(b)中红线代表平均类一致性,蓝线代表类间的变异系数。

2.3　七个 DNA 甲基化亚组的预后分析

因为使用的是与预后相关的 CpG 位点区分的亚组,进一步本研究对 7 个亚组进行 Kaplan-Meier 生存分析,并使用对数秩检验(log-rank test)研究生存差异的统计学显著性(见图 3)。与其他癌症类型相比较而言,结肠腺癌属于恶性程度高、预后状况差的一类肿瘤,目前还没有应用于临床的可以区分肿瘤预后的分型方法。在本文的 DNA 甲基化亚组中,生存分析显示这 7 个 DNA 甲基化亚组主要分为两大组,之间的预后差异存在显著性。三年(1 095 d)存活率分析结果表明,cluster1、cluster3、cluster4、cluster6 生存时间明显优于其他亚型。

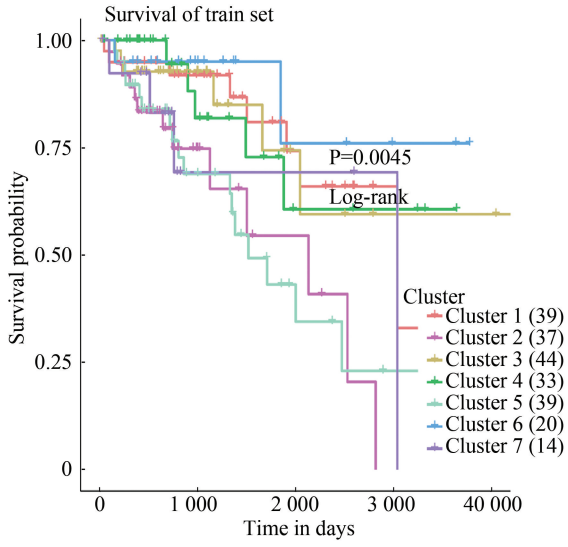


图 3　训练集中甲基化亚组的生存曲线

Fig.3　Survival of methylation subgroups in training set

注:横坐标是存活时间(d),纵坐标是存活概率.

2.4　不同甲基化亚型的临床特征描述

对各个亚型中样本的临床特征进行分析,临床特征年龄、肿瘤分期、T 分期、N 分期、M 分期、组织学类型等较为经典的 6 个指标,同时,历年来有多篇 NCS 文章表明微卫星不稳定性与结肠腺癌的发生发展密切相关,故也将其选出作为结肠腺癌的重要临床特征。其中 T 分期是对原发肿瘤的评估,随着肿瘤体积的增加和邻近 组织受累范围的增加,依次用 T1~T4 来表示;N 分期是对区域淋巴结的评估,本研究中患者该项指标被纳入分析的分期有 N0 和 N1,分别表示着没有区域淋巴结转移和 1~3 枚区域淋巴结转移;M 分期是对肿瘤是否有远端转移的评估;肿瘤解剖学细分评估了肿瘤位置,不同位置的结肠腺癌肿瘤侵犯范围、术式选择等方面存在差异。

本研究在 7 个 DNA 甲基化亚型之间,使用 Fisher's exact test 分析各临床特征在不同亚型之间的分布差异是否具有显著性(见表 2)。结果显示:

年龄($p=0.017$)、组织学类型(($p=0.039$)、微卫星不稳定性($p=0.003$)、N 分期(($p=0.038$)在不同亚型样本中的分布差异是显著的。这说明基于 DNA 甲基化谱分出的结肠腺癌亚型间的预后差异,一定程度上可由患者的年龄、发生部位、淋巴结受累情况、微卫星不稳定性去解释。而临床分期、肿瘤的大小和肿瘤转移情况,对于甲基化亚型的区分没有显著的指导意义。

在确定了不同亚型间的临床特征有着差异性后,进一步分析临床特征在各亚型内的富集情况是否具有显著性。对每个临床特征在各亚型内的分布情况和在总体中的分布进行超几何检验,检验结果(见表 3)。

表 2 甲基化亚型间Fisher's exact test 结果

Table 2 Fisher's exact test results among methylation subtypes

Clinical attributes	Subclasses	*P*-value
Stage	StageI	0.206 4
	StageII	
	StageIII	
	StageIV	
Anatomic subdivision	Colon Adenocarcinoma	0.039 5
	Colon Mucinous Adenocarcinoma	
T stage	T1	0.785 1
	T2	
	T3	
	T4	
Age	<70	0.017 0
	>=70	
M stage	M0	0.524 7
	M1	
N stage	N0	0.038 3
	N1	
Microsatellite instability	High	0.002 9
	Low	

表 3 超几何检验各特征在亚型内富集的显著性

Table 3 Hypergeometric test for significance of feature enrichment in subtypes

Feature	Class	*P*-value
Colon Adenocarcinoma	1	0.036 3
>=70	2	0.036 6
High microsatellite instability	2	0.000 1
<70	4	0.022 0
T2	6	0.039 5
>=70	6	0.046 9
N0	6	0.002 7

根据上一步对亚型间进行 Fisher's exact test 的结果,将 7 个甲基化亚型和基于这两个临床特征下的样本分组进行比较(见图 4)。

2.5 不同甲基化亚型特异性标记的确定

提取训练集样本中通过 QDMR 得到的 79 个特征 CpG 位点的甲基化数据,部分位点对应的基因(见表 4)。生成特征位点甲基化矩阵。使用 R 包 pheatmap 为该矩阵绘制热图,并为它从 0-1 的甲基化值关联上蓝色到红色。每个类别中特性低甲基化位点在热图中显示出蓝色,特异高甲基化位点显示出红色(见图 5)。这 79 个特征位点可以作为结肠腺癌中不同 DNA 甲基化亚型的特异性 DNA 甲基化标记,代表着每个亚型独特的 DNA 甲基化模式(见图 5)。class1 具有最大数量的特异性低甲基化位点,class2 具有最大数量的特异性高甲基化 CpG 位点。

表 4 特异性位点基因对应表

Table 4 Characteristic sites and corresponding gene symbols

Characteritsics	Gene Symbol
cg21039708	OTX2OS1
cg11784071	AS3MT
cg22831607	SFRP5
cg06480736	SLCO4C1
cg02539855	LY6H
cg10784386	THBS4

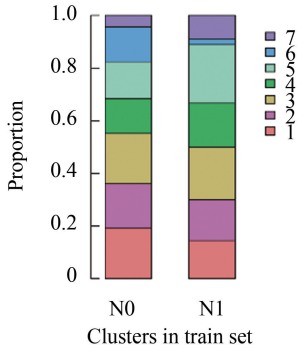
2.6 构建 DNA 甲基化预测模型

为了验证本研究获得的甲基化亚型及更为准确高效地对样本进行分类,使用训练集样本构建基于决策树学习有监督的 SMO 分类模型(见表 5),所得到的模型有着 87.61%的分类准确性,每一行代表模型预测的样本类别,每列代表样本真实的类别。C1-C7 对应着 class1-class7,表中对角线上的数字表示每个 class 中预测类别与实际类别相符的样本数量。

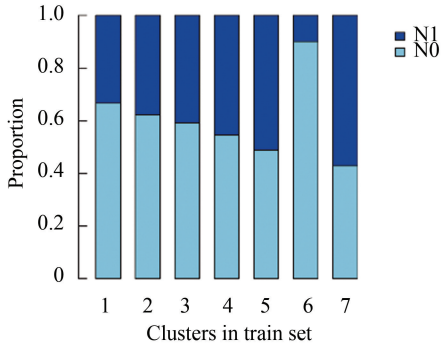
表 5 SMO 分类器的混淆矩阵

Table 5 Confusion matrix of SMO classifier

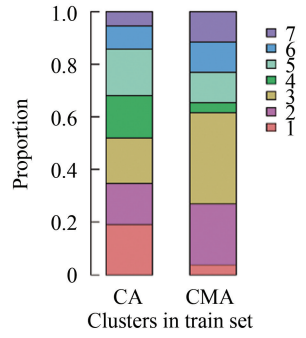
模型	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
C1	**38**	0	0	1	0	0	0
C2	0	**37**	0	0	0	0	0
C3	0	0	**40**	1	1	1	1
C4	5	0	3	**25**	0	0	0
C5	0	0	1	0	**38**	0	0
C6	0	4	2	0	4	**10**	0
C7	0	0	1	0	1	2	**10**



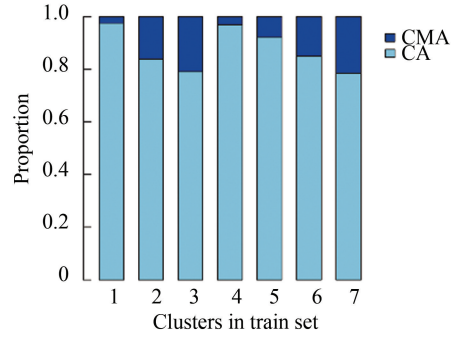
(a) N Stage to DNA methylation clusters



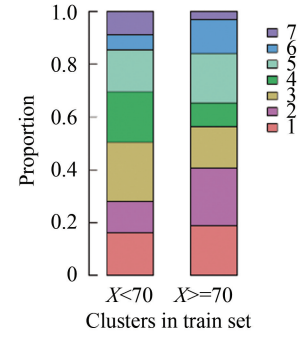
(b) DNA methylation clusters to N Stage



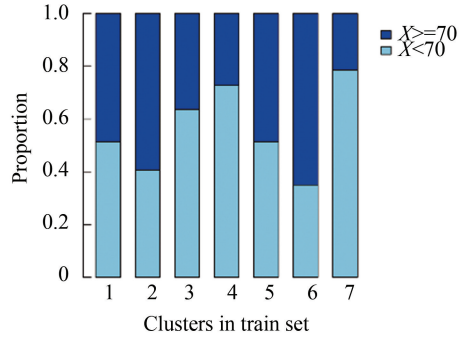
(c) Histology type to DNA methylation clusters



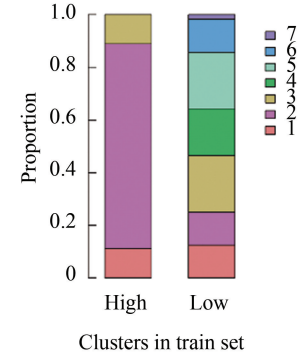
(d) DNA methylation clusters to Histology type



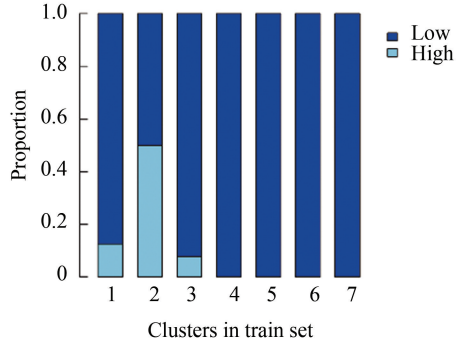
(e) Age to DNA methylation clusters



(f) DNA methylation clusters to Age



(g) Microsatellite instability to DNA methylation clusters



(h) DNA Methylation clusters to Microsatellite instabillity

图 4　DNA 甲基化亚型和 N 分期类型、组织学类型、年龄、微卫星不稳定性相互富集

Fig.4　Enrichment of DNA methylation clusters, N stage, histology type, age, and microsatellite instability

注:A. N 分期类型对应于 DNA 甲基化亚型。B. DNA 甲基化亚型对应 N 分期。C. 组织学类型对应于 DNA 甲基化亚型。D. DNA 甲基化亚型对应组织学类型。E.年龄对应于 DNA 甲基化亚型。F. DNA 甲基化亚型对应年龄。G. DNA 甲基化亚型对应微卫星不稳定性。H. 微卫星不稳定性对应于 DNA 甲基化亚型。

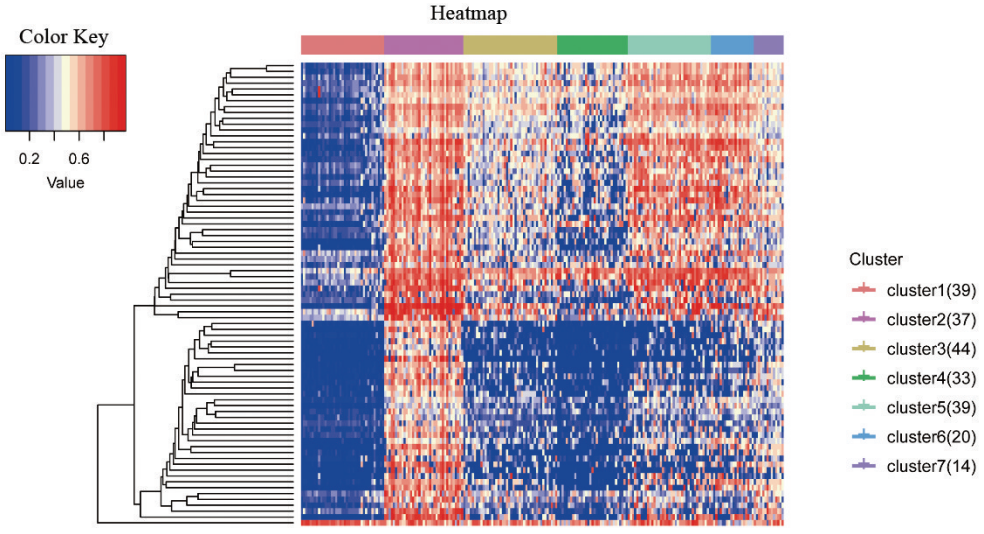
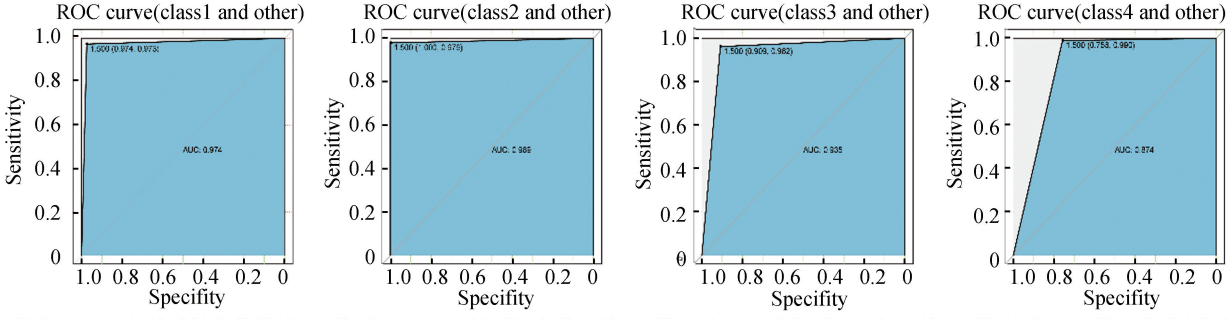


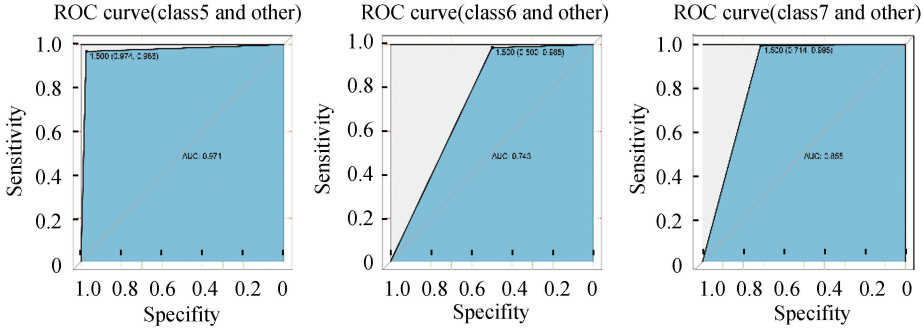
图 5 七个甲基化亚型中特征 CpG 位点甲基化水平

Fig.5 CpG site methylation level among seven subtypes

本研究的分类数量为 7,而 ROC 曲线通常针对二分类的研究,故将 7 个亚型的真实值和模型的预测值转化为 7 个二分类对象以适应 ROC 曲线特征(见图 6),使用训练集样本训练出的该模型对 6 个亚型的分类都具有较高的 AUC 值(ROC 曲线下面积),而模型对 class6 的特异性和敏感性则相对较低。



(a)模型对class1的敏感性和特异性 (b)模型对class2的敏感性和特异性 (c)模型对class3的敏感性和特异性 (d)模型对class4的敏感性和特异性



(e)模型对class5的敏感性和特异性 (f)模型对class6的敏感性和特异性 (g)模型对class7的敏感性和特异性

图 6 预测模型的敏感性和特异性

Fig.6 Sensitivity and specifity of prediction model

将训练集中得到的模型应用到预留的检验集中,对检验集中未知类别标签的患者进行 DNA 甲基化亚型的分类。检验集中 98 个样本根据特征 CpG 位点的甲基化模式被分配到了 7 个不同的组内。对不同分组的 3 年(109 5 d)存活率进行分析,并使用对数秩检验(Log-rank test)分析发现生存差异具有较高的显著性($p=0.052$)。生存曲线(见图 7)。

3 讨 论

诱发癌症的因素复杂而多样,众所周知,目前的主流观点认为癌症由于基因突变引起[10],是一个累

积渐进的过程,遗传改变的积累导致了恶性肿瘤的发生和发展。但是最新的研究表明,除了遗传变异以外,异常的 DNA 甲基化也在癌症的发生和发展中起到重要作用[11]。目前,异常的 DNA 甲基化在胃癌中是被广泛研究的一种失调的表观遗传机制。例如,有研究证明胃癌中一些肿瘤抑制基因或者肿瘤相关基因(如 p16、RUNX3、MLH1 和 CDH1 等)会被启动子的甲基化沉默[12]。这些研究都验证了 DNA 甲基化作为肿瘤标志物的重要价值。在确定了 DNA 甲基化与癌症的发生和进展相关联后,甲基化模式的动态性可能有助于癌症的早期诊断和评估:异常甲基化位点增加或减少的时间趋势可以帮助预测恶性肿瘤转化的速率和概率。因此,异常 DNA 甲基化被认为是可用来评估癌症前期进展的潜在早期诊断生物标志物[13],是临床实践中癌症诊断的理想靶标。此外,识别癌症特异或亚型特异的生物标志物也具有预测价值。

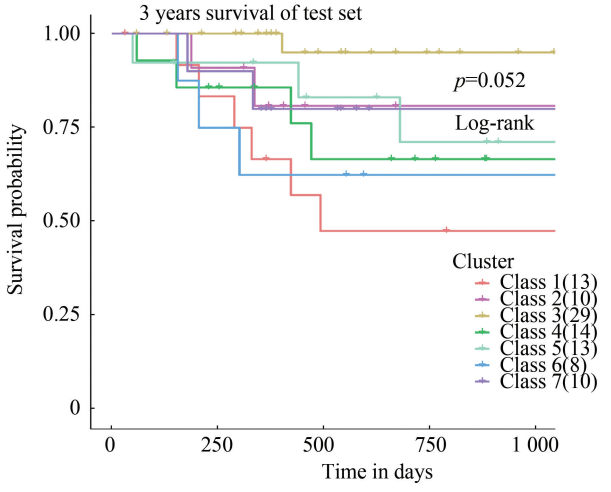


图 7　检验集生存分析结果

Fig.7　Survival analysis results of test set

本研究中包含了大量的结肠腺癌样本的 Infinium HumanMethylation450 BeadChip 阵列数据集从 TCGA 数据库下载,这些 数据可以用于本文的结肠腺癌异质性分析。庞大的样本量使得本研究能够更全面地探索结肠腺癌的分子亚型和分子异质性。

许多研究表明,表观遗传修饰(DNA 甲基化)在结肠腺 癌中的早期检测,以及改善分子分类,预后和辅助治疗中发挥关键作用,体现了 基因组范围的分子水平分析在精准医学时代具有重要的生物学和临床意义[14]。利用基因启动子区域内筛选的预后相关的 CpG 位点进行无监督的聚类分析,通过一致性聚类获得七个预后不同的分子亚型,深入分析发现不同亚型之间有着分子或临床特征上的差异,这证实了结肠腺肿瘤的异质性及对结肠腺癌详细分类的必要性。

一致性聚类与其他无监督聚类方法(如层次聚类)相比,提供了聚类的类别 数量的选取参考依据[15]。本研究首次提出建议根据 DNA 甲基化水平将结肠腺肿分为七个预后分子亚型。这种详细程度带来了较高的类内一致性,可更好地指导个性化医疗。在本研究中,SMO 模型的甲基化亚型分类能力有着较高的稳定性。但是,第六亚型的 AUC 曲线太直,分析可能是由于样本量过少,过拟合导致。同时,在模型运用到检验集时,在训练集和检验集中,class6, class5, class3, class2 的生存曲线差异较大,其可能是由于分类器对 class6 的灵敏性和特异性相对较低,导致预测类别有误所致。观察混淆矩阵可注意到实际类别为 class6 的不少样本被错误划分为 class3,class5 和 class2,从而可以解释检验集中 class3,class5 和 class2 生存率提升的现象,这说明在一定程度上本研究建立的分类模型对于结肠腺癌 DNA 甲基化亚型的预测与预后情况相关联。值得注意的是,本研究建立的模型为各个甲基化亚型分配的样本数量占总样本数的相对数目多少在训练集和检验集中是相似的,例如:分配到 class3 的样本数目在训练集和检验集样本数均是最多。这也从一定程度上说明本研究建立的模型对甲基化亚型分类能力的稳定性。

在使用 QDMR 的分析中,发现了 79 个在亚型中特异性高/低甲基化的 CpG 位点,对应于 76 个基因,它们定义了结肠腺癌的特定 DNA 甲基化亚组。这些位点可以被视为诊断结肠腺癌的精准医疗的靶标和生物标志物。在这些特异性的 CpG 位点对应的基因中,需多先前已报道与结肠腺癌有关。其中,Sfrp5 基因的甲基化被认为与结肠腺癌中致癌物诱导过程 WNT 基因的响应有关[16],Thbs4 基因是大肠癌中一个与年龄相关的甲基化肿瘤抑制基因[17],GDF10 基因与结肠癌发生密切相关[18]。

总之,使用 TCGA 数据库中的结肠腺肿瘤数据识别出七种不同的 DNA 甲基化预后分子亚型,这些亚型在分子水平或临床特征上也存在着显著差异。这可以对单一肿瘤内部的异质性更详细地解释。同时,该研究方法也可以推广到其他肿瘤的分型中。

4　结　论

使用 TCGA 中结肠腺癌的 DNA 甲基化数据,筛

选到 137 个与预后相关的 CpG 位点。基于一致性聚类方法识别出 7 个与预后相关的亚型,这些亚型的预后差异显著且亚型特征可由年龄、N 分期、微卫星不稳定性、解剖学发生部位反映。在不同的结肠腺癌亚型中筛选出 79 个特异性高/低甲基化位点,这些位点代表着每个亚型独特的甲基化模式。利用结肠腺癌亚型特异性 DNA 甲基化特征构建了基于序列最小最优化的分类模型,该模型对结肠腺癌亚型的分类准确性达到 87.61%,提供了用于结肠腺癌分型的精确的 DNA 甲基化标记。

参考文献(References)

[1] JATHAR S, KUMAR V, SRIVASTAVA J, et al. Technological Developments in lncRNA Biology[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2017, 1008: 283-323. DOI: 10.1007/978-981-10-5203-3_10.

[2] LIU H, ZHE Z, NAN W, et al. Integrative analysis of dysregulated lncRNA-associated ceRNA network reveals functional lncRNAs in gastric cancer[J]. Genes, 2018, 9(6): 303.DOI: 10.3390/genes9060303.

[3] YANG Yong, LI Xiaojia, LI Peng, et al. MicroRNA-145 regulates the proliferation, migration and invasion of human primary colon adenocarcinoma cells by targeting MAPK1 [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42 (6): 3171-3180. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3904.

[4] TSUKUDA K, TANINO M, SOGA H, et al. A novel activating mutation of the k-RAS gene in human primary colon adenocarcinoma [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2000, 278(3): 658. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3839.

[5] LONGO D L, FEINBERG A P. The key role of epigenetics in human disease prevention and mitigation [J]. New England Journal of Medicine, 2018, 378(14): 1323-1334. DOI: 10.1056/NEJMra1402513.

[6] VANAJA K G, TIMP W, FEINBERG A P, et al. A loss of epigenetic control can promote cell death through reversing the balance of pathways in a signaling network[J]. Molecular Cell, 2018, 72(1): 60-70. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.08.025.

[7] KLUTSTEIN M, NEJMAN D, GREENFIELD R, et al. DNA methylation in cancer and aging[J]. Cancer Research, 2016, 76(12): 3446-3450. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3278.

[8] KOBOLDT D C, FULTON R S, MCLELLAN M D, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours [J]. Nature, 2012, 490(7418): 61-70. DOI: 10.1038/nature11412.

[9] STRANSKY N, EGLOFF A M, TWARD A D, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Science, 2011, 333(6046): 1157-1160. DOI: DOI: 10.1126/science.1208130.

[10] GAN K A, SEBASTIAN C P, SEWELL J A, et al. Identification of single nucleotide non-coding driver mutations in cancer[J/OL]. Frontiers in Genetics, 2018. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00016, 2018-02-02. DOI: 10.1126/science.1208130.

[11] FEINBERG A P, KOLDOBSKIY M A, GÖNDÖR A, et al. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(5): 284-299. DOI: 10.1038/nrg.2016.13.

[12] LEE J H, PARK S J, ABRAHAM S C, et al. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas[J]. Oncogene, 2004, 23(26): 4646-4654. DOI: 10.1038/sj.onc.1207588.

[13] MENDIZABAL I, YI S V. Whole-genome bisulfite sequencing maps from multiple human tissues reveal novel CpG islands associated with tissue-specific regulation[J]. Human Molecular Genetics, 2016, 25(1): 69-82. DOI: 10.1093/hmg/ddv449.

[14] PASCULLI B, BARBANO R, PARRELLA P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine [J]. Seminars in Cancer Biology, 2018, 51: 22-35. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.01.007.

[15] LANCICHINETTI A, FORTUNATO S. Consensus clustering in complex networks[J]. Scientific Reports, 2012, 336(2): 1-7. DOI: 10.1038/srep00336.

[16] ZHANG Y, LI Q, CHEN H. DNA methylation and histone modifications of Wnt genes by genistein during colon cancer development[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(8): 1756-1763. DOI: 10.1093/carcin/bgt129.

[17] GRECO S A, CHIA J, INGLIS K J, et al. Thrombospondin-4 is a putative tumour-suppressor gene in colorectal cancer that exhibits age-related methylation[J]. BMC Cancer, 2010, 494, 1-10. DOI: 10.1186/1471-2407-10-494.

[18] SLATTERY M L, LUNDGREEN A, HERRICK J S, et al. Genetic variation in bone morphogenetic protein and colon and rectal cancer [J]. International Journal of Cancer, 2012, 130(3): 653-664. DOI: 10.1002/ijc.26047.