

项目名称： 基于血清甲基化谱建立的结直肠癌肝转移
预测模型及预后价值的评价

知情同意书

版本号：

版本日期： 2016 年 7 月 4 日

项目来源： 国家自然科学基金青年项目 项目负责人
： 张朋军

所在单位科室： 介入治疗科

项目执行时间： 2016 年 1 月 至 2018 年 12 月

一、研究背景（简述国内外研究现状，突出临床问题与科学问题，并附主要参考文献目录）

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一，已成为我国第五大癌症杀手，其发病率和死亡率呈逐年上升趋势。肝脏是结直肠癌转移的最主要的部位，且临床上大约 40% 的结直肠癌患者死于肝脏的转移。大约 15%-25% 的结直肠癌患者在确诊时即有肝转移，如不采取有效治疗，中位生存时间仅为 5-10 个月。因此，结直肠癌肝转移的早期预测在临床上尤为重要(1)。目前，临床上常用的结直肠癌肝转移的诊断指标包括癌胚抗原、B 超检查、CT、MRI 和 PET-CT 等。然而，其临床诊断价值有限，例如，癌胚抗原只有当侵犯到血管或淋巴管时，其水平才升高；B 超检查对于小于 1 cm 的病灶，其诊断价值较差，且易受操作人员经验影响；同样，CT 和 MRI 对于小于 1 cm 的病灶，其准确度也较差；PET-CT 价格昂贵，且不易重复检测(2)。因此，微创、准确和可重复的检测指标迫切需要，血清或血浆作为临床样品为结直肠癌肝转移的早期预测提供了可能。游离循环 DNA 是指存在于细胞外，呈游离状态的 DNA。研究发现正常人血浆或者血清中存在着微量的游离 DNA，而肿瘤患者血清或者血浆中循环 DNA 的浓度大于正常人。肿瘤患者循环 DNA 不仅来源于肿瘤细胞的凋亡及坏死，而且来源于免疫系统的释放。大量的研究发现肿瘤患者血清或血浆中相关基因的改变可以为肿瘤发生发展、疗效及预后的监测提供了可能(3)。国内外研究发现血清或血浆 DNA 拷贝数的变化与结直肠癌肝转移密切相关。截止 2015 年 2 月 15 日 Pubmed 检索：以 colorectal cancer and liver metastases AND biomarker AND serum 为关键词，共 263 篇文献。以 colorectal cancer and liver metastases AND biomarker AND plasma 为关键词，共 37 篇文献。锌指蛋白 217(ZEN217)是驱动 20 号染色体扩增的靶分子，在结直肠癌肝转移中扩增的频率明显高于原发灶，其扩增的增加显著增加了结直肠癌肝转移的风险。细胞凋亡易感蛋白(CSE1L)属于介导核定位信号通路中输入蛋白的回收，检测其在结直肠癌细胞系的表达，提示其参与了结直肠癌细胞的肝转移过程。结直肠癌缺失蛋白(DCC)是一种在大部分正常组织及黏膜上表达的穿膜蛋白，参与细胞的发生发展及转移过程，研究表明其可以作为结直肠癌肝转移的预测指标。转录因子 E2F-1(E2F-1)是一种参与活化 S 期相关蛋白，其在肝肺转移灶中含量显著升高。基质金属蛋白酶 7(MMP7)是一种负责细胞外基质重塑和

基底膜及基质的破坏。研究表明，其在转移灶中的含量显著高于原发灶(4)。蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA3 成员 3 (PTP4A3) 是一种位于细胞膜表面的酪氨酸磷酸酶，其在结直肠癌的大部分转移灶中高表达，而在原发灶中基本不表达(5)。国内 Wang 等用 PCR 方法检测血清中 miRNA-29a 的相对表达量，发现其区分结直肠癌肝转移和未转移的灵敏度为 75%(6)。除此之外，研究发现表观遗传学的改变也参与到结直肠癌的肝转移过程中。截止 2015 年 2 月 15 日 Pubmed 检索：以 colorectal cancer AND liver metastases AND biomarker AND methylation 为关键词，共 10 篇文章。国内 Ju 等采用焦磷酸测序法发现超过 80% 肝转移患者携带 MGMT 甲基化，且部分肝转移患者携带 TIMP3 甲基化。同时，研究发现 NEK2(7)、RUNX3(8)、CDH13、FLBN3(9) 和 c-Met(10) 基因的甲基化也参与到结直肠癌肝转移过程中，证实甲基化位点的改变可以作为结直肠癌肝转移的预测标志物。然而，血清中用于结直肠癌肝转移预测的甲基化位点研究甚少。目前研究 DNA 甲基化水平的方法较多。依据不同的检测原理，可以分为单个特异甲基化位点的检测、凝胶分析法、芯片检测法和基因测序法。使用甲基化芯片的方法包括 Illumina 公司 HumanMethylation 27 DNA analysis BeadChip、Agilent 公司 Human CpG Island Microarray Kit、Affymetrix 公司 seven-arrayGeneChip® Human Tiling 2.0R Array Set 和 Roche 公司 NimbleGen Human DNAMeth 2.1M Deluxe Promoter Array 等。Agilent 公司和 NimbleGen 公司的甲基化芯片检测通量约为 27000 个甲基化位点，难以高通量的要求。Infinium Human DNAMethylation 450K 芯片为全基因组甲基化芯片，覆盖了大约 450,000 个甲基化位点，其检测位点包括 96% 的 CpG 岛，而且包括 CpG 岛以外的甲基化位点、多种肿瘤组织的差异甲基化位点、干细胞非 CpG 甲基化位点、miRNA 启动子区域和其他疾病的相关位点。且最为重要的是，与其他芯片相比，其检测通量远远于其他芯片，约为 45 万个甲基化位点，且其对起始 DNA 的含量仅需 500 ng(11)。DNA 二代测序技术作为一种覆盖度非常广的甲基化检测技术，有非常重要的应用。然而，其价格较为昂贵，且需要的起始 DNA 含量约为 3-5 μg ，极大的限制了其发展和应用。DNA methylation 450K 较好的解决了芯片和二代测序需起始 DNA 含量较高(一般为 3-5 μg)，而血清 DNA 含量较低的矛盾(一般小于 1 μg)。同时其具有全基因组甲基化位点通量(45 万个甲基化位点)。在前期研究工作中，

我们使用 DNA methylation 450K 筛选血清中与早期原发性肝细胞癌相关的甲基化位点, 证明其可以作为一种有效的血清甲基化谱筛选工具。且目前为止, 尚未见国内外有关 DNA methylation 450K 芯片用于结直肠癌肝转移甲基化相关位点筛选的报道。

参考文献

- (1). Macedo FI, Makarawo T. Colorectal hepatic metastasis: Evolving therapies. *World J Hepatol*, 2014, 6(7):453-463.
- (2). Evrard S. Colorectal liver metastases: history, sciences and clinical practices. *Bull Cancer*, 2014, 101(4):373-379.
- (3). Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov*, 2014, 4(6):650-661.
- (4). Zeng ZS, Shu WP, Cohen AM, Guillem JG. Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(1):144-148.
- (5). Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*, 2001, 294(5545):1343-1346.
- (6). Tang W, Zhu Y, Gao J, Fu J, Liu C, Liu Y, Song C, Zhu S, Leng Y, Wang G, Chen W, Du P, Huang S, Zhou X, Kang J, Cui L. MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4. *Br J Cancer*, 2014, 110(2):450-458.
- (7). Takahashi Y, Iwaya T, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, Takano Y, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Mimori K. Up-regulation of NEK2 by microRNA-128 methylation is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(1):205-212.
- (8). Hyun Joo Song, Ki-Nam Shim, corresponding author Yang-Hee Joo, Seong-Eun Kim, Sung-Ae Jung, and Kwon Yoo. Methylation of the Tumor Suppressor Gene RUNX3 in Human Gastric Carcinoma. *Gut Liver*, 2008, 2(2): 119-125.
- (9). Wang Z, Yuan X, Jiao N, Zhu H, Zhang Y, Tong J. CDH13 and FLBN3 gene

methylation are associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(2):263-270.

(10). Siemens H, Neumann J, Jackstadt R, Mansmann U, Horst D, Kirchner T, Hermeking H. Detection of miR-34a promoter methylation in combination with elevated expression of c-Met and β -catenin predicts distant metastasis of colon cancer. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(3):710-720.

(11). Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*, 2012, 4(3):325-341.

(12). PJ Zhang, XY Wen, F Gu, XX Deng, YL Liu, J Li, XW Jia, ZN Dong, and YP Tian. Methylation profiling of serum DNA from hepatocellular carcinoma patients using an Infinium Human Methylation 450 BeadChip. *Hepatol Int*, 2013, 7(3):893-900.

(13). PJ Zhang, W Run, L P, CB Wang, XX Deng, B Wang, B Chen, J Jiao, HY Liu, ZN Dong, XJ Zhang, and YP Tian. Peripheral blood mRNA expression patterns to differentiate hepatocellular carcinoma from other hepatic diseases. *Front Biosci(Elite)*, 2012, 4(1): 620-630.

(14). PJ Zhang, M Zou, XY Wen, F Gu, J Li, GX Liu, JX Dong, XX Deng, J Gao, XL Li, XW Jia, ZN Dong, LN Chen, Y Wang, and YP Tian. Development of Serum Parameters Panels for the Early Detection of Pancreatic Cancer. *Int J Cancer*, 2014, 134(11):2646-2655.

(15). PJ Zhang, XY Wen, F Gu, XX Deng, YL Liu, J Li, XW Jia, ZN Dong, and YP Tian. Multiplexed cytokine profiling of serum for detection of colorectal cancer. *Future Oncol*, 2013, 9(7): 1017-1027.

二、研究目的与意义

本课题基于前期我们已完成的 DNA methylation 450K 甲基化芯片筛选血清中原发性肝细胞癌相关甲基化位点 (*Hepatology International*, 2013) (12) 及多种多参数联合分析方法, 例如, K 近邻法完成原发性肝细胞癌外周血诊断模型 (*Frontiers in Bioscience*, 2012) (13), 蒙特卡洛算法完成胰腺癌的血清诊断

模型(International Journal of Cancer, 2014) (14)及二元 Logistic 回归模型完成结直肠癌的血清诊断模型(Future Oncology, 2013) (15)。拟通过甲基化芯片筛选、生物信息学分析、重亚硫酸盐测序、多参数联合分析以及患者的预后评价等多个方面研究血清甲基化谱用于结直肠癌肝转移的预测。从临床需求出发,经芯片筛选、生物信息学分析和多参数模型等研究,最后回归到临床需求。完成临床-科研-临床的转化医学模式,有望为结直肠癌肝转移的预测及预后评价提供一种新的模型和评价指标,为结直肠癌肝转移的防治提供新的思路。

三、实施方案

(包括研究设计、研究步骤、评价指标、技术路线图等,并明确入/排标准、退出/终止标准、招募程序及预期招募人数、标本收集等相关信息)

研究方案

(1). DNA methylation 450K 甲基化芯片筛选血清中可用于结直肠癌肝转移预测的甲基化位点

1). 收集 10 例同时性结直肠癌肝转移患者和 10 例结直肠癌未肝转移患者的血清标本。

2). 提取血清 DNA 后,重亚硫酸盐转换后,采用 DNA methylation 450K 甲基化芯片检测,甲基化水平使用 β 值来表示,其取值范围在 0 到 1 之间,0 代表完全没有甲基化,1 代表完全甲基化。基于两组甲基化位点比较的 P 值(Bioconductor 安装包中的芯片数据线性模型分析)和差异倍数(大于 2),筛选出血清中结直肠癌肝转移相关差异甲基化位点。

3). 染色体分布、基因功能分布和基因位置分析。选取位于启动子区域的甲基化位点,经基因本体论“Gene Ontology Enrichment Analysis”(http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/)进行基因功能分析后,使用基因间相互关系分析工具“Graphlet”(http://sonorus.princeton.edu/graphlet/)软件进行分析,基于相互关系系数大于 0.689 作为筛选标准,得到一些在结直肠癌肝转移过程中起关键调控机制的甲基化位点。

4). 基于这些位点,本课题使用重亚硫酸盐测序法验证这些位点。

(2). 建立基于 Bruker Sequenom Massarray 血清差异甲基化谱和多参数联合分析方法的结直肠癌肝转移预测模型

1). 收集 200 例同时性结直肠癌肝转移患者和 200 例结直肠癌未肝转移患者血清标本。

2). 提取血清 DNA 后, 使用 Bruker Sequenom Massarray 甲基化谱检测技术, 同时检测甲基化芯片筛选后的差异超甲基化(差异前 15 个甲基化位点)和差异超低甲基化位点(差异前 15 个甲基化位点)。

3). 然后将患者临床一般信息、血液指标检测等临床资料及血清超甲基化位点和超低甲基化位点相结合, 通过多参数联合分析, 例如, 二元 Logistic 回归分析、判别分析、分类树、支持向量机、蒙特卡洛算法和多参数模型整合算法等, 建立结直肠癌肝转移预测模型。根据 ROC 曲线下面积、诊断灵敏性、特异性、阳性预测值及阴性预测值评价多参数联合模型和单独指标的诊断价值, 利用 z score 检验找出最佳的诊断模型。

4). 收集 100 例同时性结直肠癌肝转移患者和 100 例结直肠癌未肝转移患者对建立的模型进行验证, 评价本项目建立的结直肠癌肝转移预测模型。然后收集 100 例异时性结直肠癌肝转移患者和 100 例结直肠癌肝转移术后血清标本, 评价建立的模型对异时性结直肠癌肝转移患者和结直肠癌肝转移术后患者的价值。

(3). 评价结直肠癌肝转移预测模型中血清甲基化谱和患者临床资料的结直肠癌肝转移预后价值

1). 收集用于建立结直肠癌肝转移预测模型和验证模型时的总共 300 例同时性结直肠癌肝转移患者和 300 例结直肠癌未肝转移患者的临床资料, 例如, 患者的一般临床资料(如年龄、性别、组织学分级、肿瘤大小、浆膜侵犯、淋巴结转移、静脉入侵、淋巴管浸润、肝转移、腹膜转移和远处转移等), 血液检查指标(如 CEA、CA199、AFP、ALT、AST 等), 治疗方案(如手术切除后、经静脉全身化疗和经肝动脉灌注化疗后)。

2). 收集用于建立结直肠癌肝转移预测模型和验证模型时的总共 300 例同时性结直肠癌肝转移患者和 300 例结直肠癌未肝转移患者血清中相关血清甲基化位

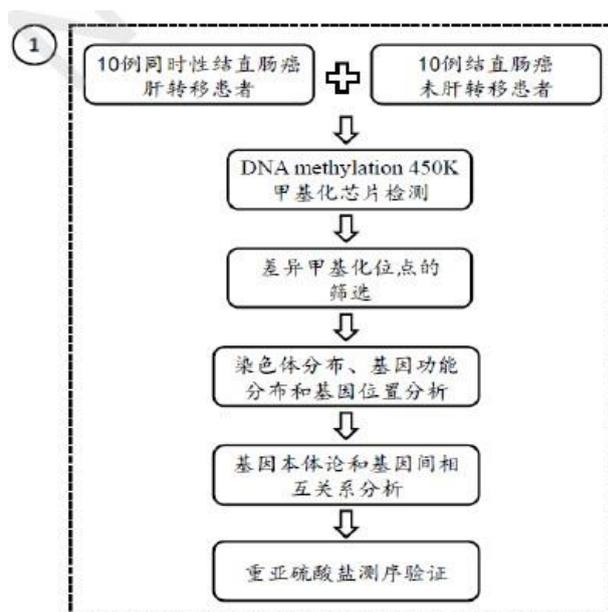
点的表达水平(基于 Bruker Sequenom Massarray 技术同时检测多个甲基化位点)。

3). Logistic 回归分析用于评价用于患者的临床资料,例如,患者的一般临床资料(如年龄、性别、组织学分级、肿瘤大小、浆膜侵犯、淋巴结转移、静脉入侵、淋巴管浸润、肝转移、腹膜转移和远处转移等),血液检查指标(如 CEA、CA199、AFP、ALT、AST 等),治疗方案(如手术切除、经静脉全身化疗和经肝动脉灌注化疗后)以及结直肠癌肝转移预测模型中的血清差异甲基化位点的单因素分析。总体生存时间和中位生存期用 Kaplan-Meier 法进行比较。P<0.05 代表差异具有统计学意义。

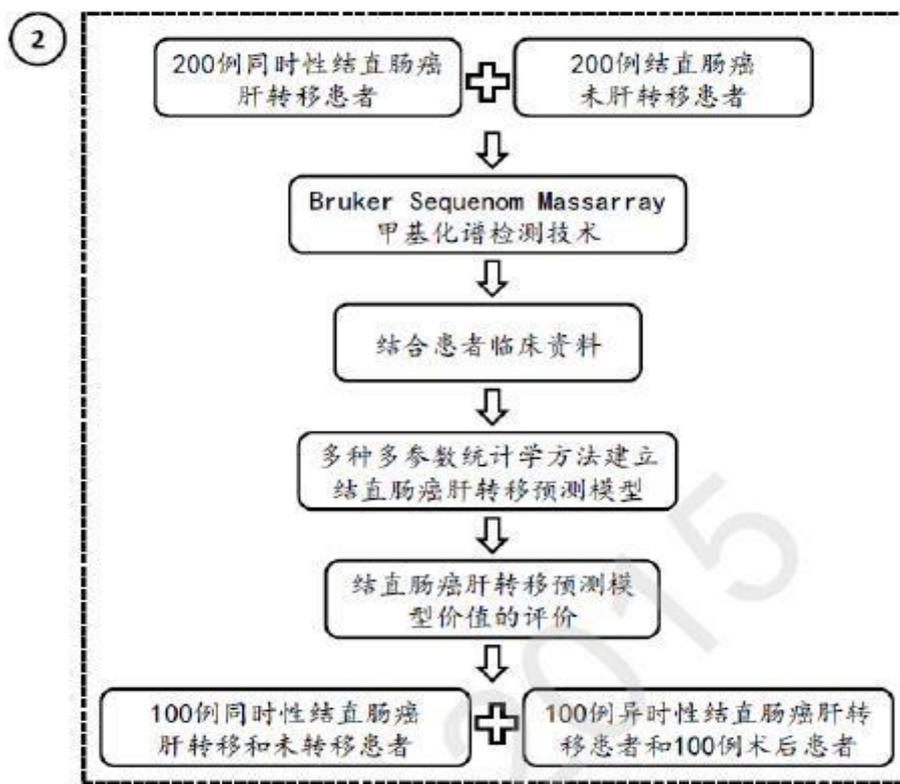
4). Cox 比例风险回归分析用于评价用于患者的临床资料,例如,患者的一般临床资料(如年龄、性别、组织学分级、肿瘤大小、浆膜侵犯、淋巴结转移、静脉入侵、淋巴管浸润、肝转移、腹膜转移和远处转移等),血液检查指标(如 CEA、CA199、AFP、ALT、AST 等),治疗方案(如手术切除、经静脉全身化疗和经肝动脉灌注化疗后)以及结直肠癌肝转移预测模型中的血清甲基化位点的单因素和多因素风险比 EXP(B)评价指标是保护因素还是危险因素。P<0.05 代表差异具有统计学意义。

2. 技术路线

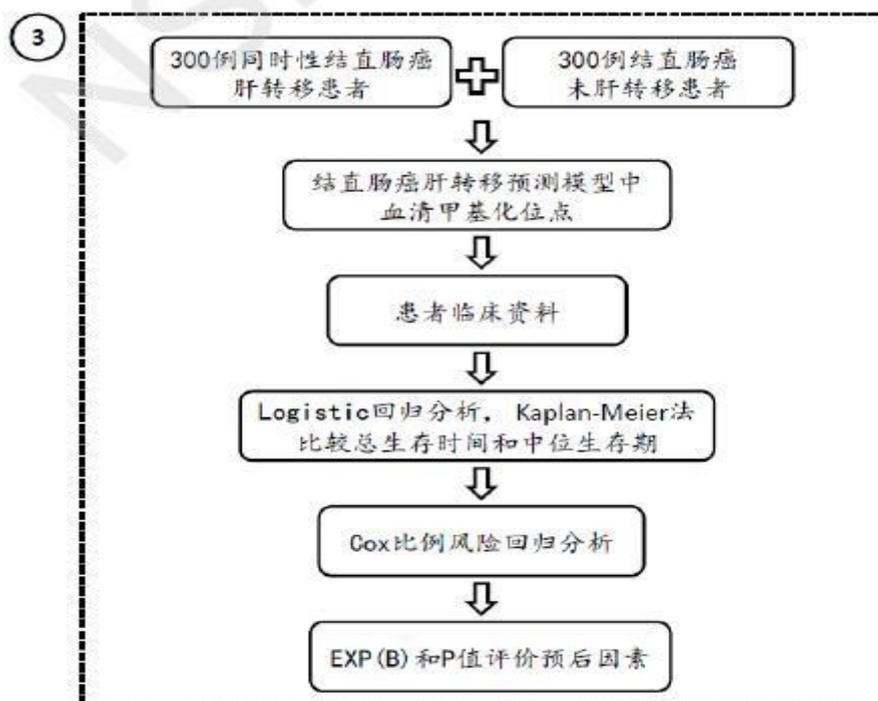
1). 筛选血清中基于 DNA methylation 450K 甲基化芯片可用于结直肠癌肝转移预测的甲基化位点



(2). 建立基于Bruker Sequenom Massarray 血清差异甲基化谱和多参数联合分析方法
的结直肠癌肝转移预测模型



(3). 评价结直肠癌肝转移预测模型中血清甲基化谱和患者临床资料的结直肠癌肝转移预后价值



四、风险/获益评估1. 获益（个人和社会获益）

无 2. 风险（说明可能的风险机率、保证风险在可能范围内最小化的措施）

本课题主要收集自患者临床血液检查完毕后 3-5 小时内血液标本，根据相关的法律和/或法规，有关受试者身份的所有记录均予以保密，这些资料将不对外公开，避免患者资料外泄的风险。

3. 特殊人群保护（妇女、儿童、老人等、其他特殊人群如在押人员等的风险及 保护）

无 五、数据管理与统计分析计划

二元Logistic 回归分析用于评价患者的临床资料，例如，患者的一般临床资料、血液检查指标、治疗方案以及结直肠癌肝转移预测模型中的血清差异甲基化位点的单因素分析。总体生存时间和中位生存期用Kaplan-Meier 法进行比较。 $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。3). Cox 比例风险回归分析用于评价患者的临床资料，例如，患者的一般临床资料、血液检查指标、治疗方案以及结直肠癌肝转移预测模型中的血清差异甲基化位点的单因素和多因素风险比。EXP(B)评价指标是保护因素还是危险因素。 $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。 六、资料保密

根据相关的法律和/或法规，有关受试者身份的所有记录均予以保密，这些资料将不对外公开。

受试者将得到书面通知，说明申办者、IEC/IRB 或法规部门的代表可能会审查他们的病历以核对收集的信息，审查时涉及的所有个人信息都将严格保密并遵从当地的资料保护法律。

如果研究的结果予以发表，受试者的身份仍将保密。

研究者将保留一份名单以便分辨受试者的记录。

七、其他需要说明的问题

1、课题的合作

无

2、其他需要说明的问题

无

八、研究者信息表1、主要研究

者

姓名	电话	电子邮箱
张朋军		zhangpj301@126.com

2. 项目组人员

姓名	单位	学位/职称	GCP 培训时间	项目任务分工
朱林忠	北大肿瘤医院	博士/副主任医师		甲基化位点检测
郭建海	北大肿瘤医院	博士/主治医师		数据采集
寇福新	北大肿瘤医院	博士/住院医师		标本收集
刘少兴	北大肿瘤医院	博士/住院医师		标本收集

知情同意签字-同意签字页

如果您完全理解了这一研究项目的内容，并同意参加此项研究，您将签署此 知情同意书，一式两份，由研究者和患者本人或委托人各保留一份。由受试者本人或其合法代表签署同意声明。

- 1、 我确认已阅读并理解了此项研究的知情同意书，在研究过程中可能出现的问题及解决方法已经向我解释，并且我有机会提出自己的疑问。
- 2、 我已明确参加研究属于自愿行为，拒绝参加研究不会损害我应有的任何利益。
- 3、 我已得知参与本研究的医师、北京肿瘤医院主管此项工作的负责人 以及北京肿瘤医院的医学伦理委员会均有权审阅研究记录和病例资料，我同意上述方面的人员直接得到我的研究记录，并了解上述信息将得到保密处理。
- 4、 我同意参加本项研究。

患者姓名全称： 年 月 日

法定代理人姓名全称： 年 月 日

以下由执行知情同意过程的医师完成 研究者申明：我确认已就本研究的性质、目的、要求和可能的风险向患者进行了解释和讨论，并同时探讨了其他可选择的治疗方案，并确保本受试者信息的 复印件已交给患者保存。

研究者姓名全称： 年 月 日