

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.10.1169

· 短篇论著 ·

PRDM12、FOXE1、B3GAT2、VIM、SFRP2 基因在结直肠癌组织中的甲基化水平

徐 正^{1,2}, 颜宏利^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院生殖医学中心, 上海 200433
2. 上海中医药大学附属第七人民医院检验科, 上海 200137

[摘要] **目的** 检测结直肠癌组织中 PR 结构域蛋白 12 (PRDM12)、叉头框 E1 (FOXE1)、 β -1,3-葡萄糖醛转移酶 2 (B3GAT2)、波形蛋白 (VIM)、分泌型卷曲相关蛋白 2 (SFRP2) 基因的甲基化水平, 初步评估上述基因作为结直肠癌早期筛查标志物的潜力。**方法** 选取海军军医大学(第二军医大学)长海医院 31 例接受手术切除治疗的结直肠癌患者的石蜡切片标本, 使用焦磷酸测序法检测癌组织和相应癌旁正常组织中 PRDM12、FOXE1、B3GAT2、VIM、SFRP2-1、SFRP2-2 基因启动子的甲基化水平。**结果** 31 例结直肠癌患者癌组织中 PRDM12、FOXE1、B3GAT2、VIM、SFRP2-1、SFRP2-2 基因启动子甲基化指数均高于相应癌旁正常组织, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。在 31 例结直肠癌患者中, PRDM12、FOXE1、B3GAT2、VIM、SFRP2-1、SFRP2-2 基因启动子高度甲基化率分别为 87.1% (27/31)、90.3% (28/31)、80.6% (25/31)、77.4% (24/31)、74.2% (23/31)、64.5% (20/31); 在 18 例早期 (TNM I ~ II 期) 结直肠癌患者中, PRDM12、FOXE1、B3GAT2、VIM、SFRP2-1、SFRP2-2 基因启动子高度甲基化率分别为 88.9% (16/18)、94.4% (17/18)、83.3% (15/18)、77.8% (14/18)、83.3% (15/18)、61.1% (11/18)。**结论** PRDM12 和 FOXE1 基因在结直肠癌组织中出现异常甲基化, 初步判断两者有潜力成为结直肠癌早期筛查的分子标志物。

[关键词] 焦磷酸测序; PR 结构域蛋白 12; 叉头框 E1; DNA 甲基化; 结直肠肿瘤

[中图分类号] R 735.34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)10-1169-06

Methylation status of PRDM12, FOXE1, B3GAT2, VIM and SFRP2 genes in colorectal cancer

XU Zheng^{1,2}, YAN Hong-li^{1*}

1. Department of Reproductive Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
2. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China

[Abstract] **Objective** To detect the methylation levels of PR domain-containing protein 12 (PRDM12), forkhead box E1 (FOXE1), beta-1,3-glucuronyltransferase 2 (B3GAT2), vimentin (VIM) and secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) genes in colorectal cancer tissues, so as to evaluate their potentials as early screening markers for colorectal cancer. **Methods** The paraffin specimen samples were collected from 31 colorectal cancer patients receiving surgical resection in Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University). The methylation levels of PRDM12, FOXE1, B3GAT2, VIM, SFRP2-1 and SFRP2-2 gene promoters in cancer tissues and corresponding paracancerous normal tissues were detected using pyrosequencing method. **Results** The promoter methylation indexes of PRDM12, FOXE1, B3GAT2, VIM, SFRP2-1 and SFRP2-2 genes were significantly higher in the cancer tissues of the 31 patients than those in the paracancerous tissues (all $P < 0.01$). The positive methylation rates of PRDM12, FOXE1, B3GAT2, VIM, SFRP2-1 and SFRP2-2 gene promoters were 87.1% (27/31), 90.3% (28/31), 80.6% (25/31), 77.4% (24/31), 74.2% (23/31) and 64.5% (20/31), respectively. In the 18 cases of early stage (TNM I - II) colorectal cancer, the positive methylation rates of PRDM12, FOXE1, B3GAT2, VIM, SFRP2-1

[收稿日期] 2020-05-13 **[接受日期]** 2020-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金(81672350),上海市浦东新区卫生和计划生育委员会重要薄弱学科建设项目(PWZbr2017-01). Supported by National Natural Science Foundation of China (81672350) and Key Weak Discipline Construction Project of Health and Family Planning Commission of Shanghai Pudong New District (PWZbr2017-01).

[作者简介] 徐 正, 主管技师. E-mail: xuzheng2007@sina.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31166666, E-mail: hongliyan@smmu.edu.cn

and *SFRP2-2* gene promoters were 88.9% (16/18), 94.4% (17/18), 83.3% (15/18), 77.8% (14/18), 83.3% (15/18) and 61.1% (11/18), respectively. **Conclusion** *PRDM12* and *FOXE1* genes show abnormal methylation in colorectal cancer tissues, suggesting that they may serve as potential molecular markers for the early diagnosis of colorectal cancer.

[Key words] pyrosequencing; PR domain-containing protein 12; forkhead box E1; DNA methylation; colorectal neoplasms
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(10): 1169-1174]

结直肠癌是我国常见的消化道肿瘤,由于饮食和生活方式的改变,近年来我国结直肠癌发病率呈上升趋势,男性、女性结直肠癌发病率分别位于恶性肿瘤的第5位和第4位^[1]。目前在结直肠癌早期筛查工作中,常用的方法包括粪便隐血试验、粪便免疫化学检测及金标准肠镜筛查,但前两者的灵敏度和特异度不高,尤其对早期结直肠癌患者易造成误诊、漏诊,而肠镜则因为肠道准备和检查时间长、易引起疼痛等导致患者依从性不高^[2]。因此,探讨简便易行且兼具高灵敏度和高特异度的结直肠癌筛查方法十分必要。

近年来随着基因甲基化检测技术的创新和发展,以甲基化基因作为分子标志物筛查肿瘤的方法越来越受到重视^[3-6],如 *Septin9* 基因甲基化已被用于结直肠癌临床检测^[7],但目前能够应用到临床的甲基化基因仍较少。本研究收集了海军军医大学(第二军医大学)长海医院31例结直肠癌标本及其相应癌旁正常结直肠组织标本,根据前期研究结果^[8]选取PR结构域蛋白12(PR domain-containing protein 12, *PRDM12*)、叉头框E1(forkhead box E1, *FOXE1*)、 β -1,3-葡糖醛转移酶2(beta-1,3-glucuronyltransferase 2, *B3GAT2*)、波形蛋白(vimentin, *VIM*)、分泌型卷曲相关蛋白2(secreted frizzled-related protein 2, *SFRP2*)基因进行甲基化水平检测,初步评估其作为结直肠癌早期筛查标志物的潜力。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集海军军医大学(第二军医大学)长海医院2018年3月至2018年7月收治的31例结直肠癌患者经手术切除的癌组织及癌旁正常组织标本并制成石蜡切片,其中癌旁正常组织距癌组织边缘5 cm以上,并经过组织病理学确认无相关癌细胞浸润。纳入标准:(1)经手术及组织病理学证实为结直肠癌;(2)患者知晓本次研究内容,并签署知情同意书。排除标准:(1)标本失活;(2)标本来源信息不全。本研究方案通过海军军医大学(第二军医大学)长海医院医学伦

理委员会审批。

1.2 主要试剂及仪器 组织全基因组DNA提取试剂盒(德国Qiagen公司);DNA甲基化试剂盒(美国ZYMO公司);*Taq*酶PCR预混液试剂盒(德国Qiagen公司);LC480 II PCR扩增仪(瑞士Roche公司);NanoDrop ND-2000微量紫外分光光度计(美国ThermoFisher Scientific公司);焦磷酸测序检测相关试剂(瑞典Biotage公司);PSQ96焦磷酸测序仪(德国Qiagen公司)。

1.3 检测方法 通过前期研究分析结果^[8],结合相关文献报道,确定并选择基因CpG岛位置。使用Pyro Mark Assay Design 2.0软件设计特异性扩增引物及测序引物。引物和探针(表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用组织全基因组DNA提取试剂盒从石蜡组织切片中提取基因组DNA,使用NanoDrop ND-2000微量紫外分光光度计测定DNA含量,按照DNA甲基化试剂盒说明书对基因组DNA进行亚硫酸盐处理后,-70℃保存备用。PCR反应体系为50 μ L。基因组长片段扩增反应条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 40 s,72℃ 30 s,35个循环;72℃ 5 min。焦磷酸测序模板扩增反应条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s,54℃ 40 s,72℃ 30 s,40个循环;72℃ 3 min。将标有生物素的PCR产物与载有链霉亲和素的微珠混匀,变性后单链化处理测序模板,放入焦磷酸测序仪中检测各基因启动子CpG位点甲基化水平。

1.4 焦磷酸测序数据分析 使用焦磷酸测序检测结直肠癌组织和相应癌旁正常组织标本各基因检测位点出现甲基化的频率,利用焦磷酸测序仪的等位基因频率分析软件对测序结果进行统计。甲基化程度用甲基化指数(methylation index, M_{ti})衡量, $M_{ti} = \text{基因甲基化位点峰值高度} / (\text{甲基化位点峰值高度} + \text{非甲基化位点峰值高度})$ 。 $M_{ti} < 5\%$ 为检测背景值, $\geq 5\%$ 表示该位点出现甲基化。当癌组织基因检测位点的M_{ti}大于癌旁正常组织M_{ti}的95%时,定义该基因高度甲基化。

表1 各基因引物和探针序列

基因	引物序列 (5' -3')
<i>PRDM12</i>	F1: GAAATTTTTTTTTYGGGGAGATGTGAGTATAGGGTTTTG F2: GGGYGGGGTTTAGGTGGGTTTTGT R1: aacctcaacacccaacctataCAAACCCRAAAAACAATACTAAAAACC Seq: GTTAGATTAGAAGTATAAAAATGTGA
<i>FOXE1</i>	F1: GGTTAATTTTTATTTTTTTTAGGATAAAAAAGTG F2: TTTTAGGATAAAAAAGTGAGATGAGTT R1: aacctcaacacccaacctataACTAAAACCCRAAAAATTCAAAAACC Seq: GTTTTTGGTAGAGGTTTGAAAAGT
<i>B3GAT2</i>	F1: GTTTTTTAAGTTTTTTTGTGGGAAGATAGTAG F2: GTTGTTATTGGTGGAGAGGGGTTG R1: aacctcaacacccaacctataATCACCCCCTCCAAAAATCRTACAACCCC Seq: GGAGGGATTTTTTGGTTTTT
<i>VIM</i>	F1: GTTATTTTTYGTAGTTATGTTTATTAGGTT F2: GAGTTTTAGTYGGAGTTAYGTGATTA R1: aacctcaacacccaacctataAAAAATCCACCRAATCCTACAAAAACC Seq: TTATTYGTATTTATAGTTTGGGTAG
<i>SFRP2-1</i>	F1: TTATTATAGGGTATAYGYGGTTATTAGGGA F2: GGTAATTTAGTAGAAATTTTGGATTGGGG R1: aacctcaacacccaacctataCCCTAAAATTTCTTTAAACAACAAAC Seq: ATTTYGGATTGGGGTAAAATAAGTT
<i>SFRP2-2</i>	F1: GGGTYGGGTAAATAAGTTGGTTAGAGG F2: GGTAATAAGTTGGTTAGAGGTGGATATTG R1: aacctcaacacccaacctataCAAAACCCCTATTAATAAATTCAAAAACCC Seq: GAGGGTTTTTAAAATAATGTAG
通用引物	R2: aacctcaacacccaacctata

PRDM12:PR结构域蛋白12;FOXE1;叉头框E1;B3GAT2:β-1,3-葡萄糖醛转移酶2;VIM:波形蛋白;SFRP2:分泌型卷曲相关蛋白2. F1、R1分别为基因组长片段扩增反应上、下游引物;F2、R2分别为焦磷酸测序模板扩增反应上、下游引物;Seq为焦磷酸测序引物

1.5 统计学处理 使用SPSS 20.0软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;呈偏态分布的计量资料以中位数(下四分位数,上四分位数)表示,采用Wilcoxon符号秩检验比较癌组织与癌旁正常组织各基因CpG位点甲基化水平的差异。计数资料以例数和百分数表示。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 结直肠癌组织和癌旁正常组织中各基因启动子甲基化水平 31例患者中,男23例、女8例,年龄为38~65岁,平均年龄为(45.29±4.36)岁,结直肠癌TNM分期I期7例、II期11例、III期8例、IV期5例。结直肠癌组织和癌旁正常组织中PRDM12基因的Mtl分别为42.49%(24.59%,52.52%)和18.44%(16.87%,21.06%),癌组织PRDM12基因Mtl高于癌旁正常组织($Z=5.357$, $P<0.01$);在所测序的PRDM12基因7个CpG位点中,癌组织Mtl均高于癌旁正常组织(P 均 <0.01 ,

图1A)。结直肠癌组织和癌旁正常组织中FOXE1基因的Mtl分别为36.22%(17.60%,42.53%)和6.90%(5.69%,9.64%),癌组织FOXE1基因Mtl高于癌旁正常组织($Z=-4.68$, $P<0.01$);在所测序的FOXE1基因6个CpG位点中,癌组织Mtl均高于癌旁正常组织(P 均 <0.01 ,图1B)。结直肠癌组织和癌旁正常组织中B3GAT2基因的Mtl分别为22.78%(8.21%,34.33%)和7.97%(5.14%,10.26%),癌组织B3GAT2基因Mtl高于癌旁正常组织($Z=4.23$, $P<0.01$);在所测序的B3GAT2基因6个CpG位点中,癌组织Mtl均高于癌旁正常组织(P 均 <0.01 ,图1C)。结直肠癌组织和癌旁正常组织中VIM基因的Mtl分别为33.25%(8.83%,70.36%)和6.99%(4.62%,11.82%),癌组织VIM基因Mtl高于癌旁正常组织($Z=3.51$, $P<0.01$);在所测序的VIM基因7个CpG位点中,癌组织Mtl均高于癌旁正常组织(P 均 <0.01 ,图1D)。结直肠癌组织和癌旁正常组织中SFRP2-1基因的Mtl分别为

28.25% (15.61%, 48.61%) 和 11.80% (5.92%, 16.65%), 癌组织 *SFRP2-1* 基因 Mtl 高于癌旁正常组织 ($Z=4.02, P<0.01$); 在所测序的 *SFRP2-1* 基因 7 个 CpG 位点中, 癌组织 Mtl 均高于癌旁正常组织 (P 均 <0.01 , 图 1E)。结直肠癌组织和癌旁正常组织中 *SFRP2-2* 基因的 Mtl 分别为 8.85%

(5.51%, 27.24%) 和 5.26% (4.09%, 7.35%), 癌组织 *SFRP2-2* 基因 Mtl 高于癌旁正常组织 ($Z=3.43, P<0.01$); 在所测序 *SFRP2-2* 基因的 7 个 CpG 位点中, 癌组织 Mtl 均高于癌旁正常组织 (P 均 <0.01 , 图 1F)。

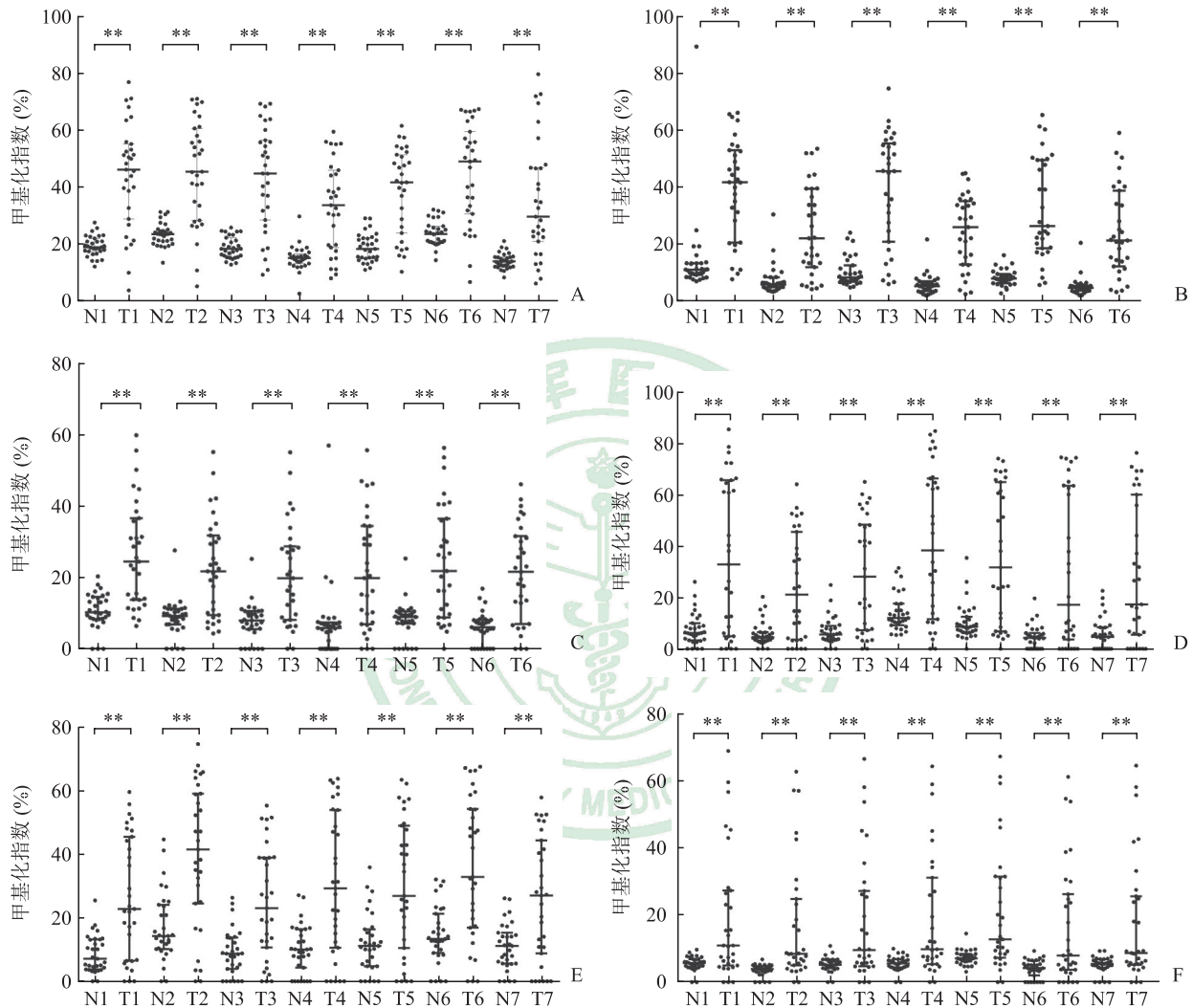


图 1 结直肠癌和癌旁正常组织中 *PRDM12*、*FOXE1*、*B3GAT2*、*VIM*、*SFRP2* 基因不同 CpG 位点甲基化水平差异 A:*PRDM12*; B:*FOXE1*; C:*B3GAT2*; D:*VIM*; E:*SFRP2-1*; F:*SFRP2-2*. *PRDM12*:PR 结构域蛋白 12; *FOXE1*:叉头框 E1; *B3GAT2*: β -1,3- 葡糖醛转移酶 2; *VIM*:波形蛋白; *SFRP2*:分泌型卷曲相关蛋白 2; N:癌旁正常组织; T:癌组织. 1~7 分别表示不同 CpG 位点. ** $P<0.01$. $n=31$

2.2 不同 TNM 分期结直肠癌组织中各基因启动子高度甲基化状态分析 在 31 例结直肠癌组织中, *PRDM12*、*FOXE1*、*B3GAT2*、*VIM*、*SFRP2-1*、*SFRP2-2* 基因启动子高度甲基化率分别为 87.1% (27/31)、90.3% (28/31)、80.6% (25/31)、77.4% (24/31)、74.2% (23/31)、64.5% (20/31), 可见 *PRDM12* 和 *FOXE1* 基因启动子高度甲基化率较高, 而 *B3GAT2*、*VIM*、*SFRP2-1*、*SFRP2-2* 基因

启动子高度甲基化率相对较低。

不同 TNM 分期的结直肠癌组织中各基因的高度甲基化情况见表 2, 在 18 例早期 (TNM I~II 期) 结直肠癌患者癌组织中, *PRDM12*、*FOXE1*、*B3GAT2*、*VIM*、*SFRP2-1*、*SFRP2-2* 基因启动子高度甲基化率分别为 88.9% (16/18)、94.4% (17/18)、83.3% (15/18)、77.8% (14/18)、83.3% (15/18)、61.1% (11/18); 而在 13 例晚期 (TNM III~IV

期)结直肠癌患者癌组织中, *PRDM12*、*FOXE1*、*B3GAT2*、*VIM*、*SFRP2-1*、*SFRP2-2*基因启动子高度甲基化率分别为84.6%(11/13)、84.6%(11/13)、76.9%(10/13)、76.9%(10/13)、61.5%(8/13)、69.2%(9/13)。由以上结果可见*PRDM12*和*FOXE1*基因启动子在早期结直肠癌组织中的高度甲基化率较高,而*B3GAT2*、*VIM*、*SFRP2-1*、*SFRP2-2*基因启动子高度甲基化率相对较低。

表2 不同TNM分期结直肠癌组织中各基因启动子高度甲基化状态

基因	高度甲基化状态	TNM分期			
		I	II	III	IV
<i>PRDM12</i>	阳性	7	9	7	4
	阴性	0	2	1	1
<i>FOXE1</i>	阳性	7	10	7	4
	阴性	0	1	1	1
<i>B3GAT2</i>	阳性	7	8	6	4
	阴性	0	3	2	1
<i>VIM</i>	阳性	6	8	6	4
	阴性	1	3	2	1
<i>SFRP2-1</i>	阳性	6	9	5	3
	阴性	1	2	3	2
<i>SFRP2-2</i>	阳性	5	6	7	2
	阴性	2	5	1	3

PRDM12:PR结构域蛋白12;*FOXE1*:叉头框E1;*B3GAT2*: β -1,3-葡萄糖醛转移酶2;*VIM*:波形蛋白;*SFRP2*:分泌型卷曲相关蛋白2

3 讨论

结直肠癌为临床常见消化道恶性肿瘤,诊疗核心是早发现、早治疗,因此早期的筛查尤为重要^[9-10]。近年来基因甲基化检测技术日益成熟,已被用于各类肿瘤疾病的早期筛查。目前在结直肠癌早期筛查中已应用到临床的甲基化检测基因有*Septin9*、*N-myc*下游调节基因4(*N-myc* downstream-regulated gene 4, *NDRG4*)等^[5,11]。Su等^[12]检测了172例结直肠癌组织中*Septin9*基因甲基化情况,其中152例为阳性,灵敏度为88.4%。Xiao等^[13]发现结直肠癌组织中*NDRG4*基因的甲基化阳性检出率为81%,而在癌旁正常组织中仅为8.3%。本研究发现*PRDM12*和*FOXE1*基因在结直肠癌组织中的甲基化率分别为87.1%(27/31)和90.3%(28/31),高于上述报道的*Septin9*、*NDRG4*基因甲基化率,提示*PRDM12*和*FOXE1*基因甲基化有潜力成为辅助诊断候选标志物。

*PRDM12*基因位于人第9号染色体9q34.12上,属于含有PR/SET蛋白结构域的转录调控因子家族成员。*PRDM12*是重要的转录调节因子,能够调控神经分化和形成,与实体肿瘤和血液恶性肿瘤发生相关^[14-15]。*FOXE1*基因位于人第9号染色体9q22.33上,是叉头转录因子家族成员,既往研究表明*FOXE1*是重要转录因子,与甲状腺癌、胰腺癌、皮肤鳞状细胞癌的发生直接相关^[16]。Dai等^[17]研究表明结直肠癌中*FOXE1*基因低表达,且导致结直肠癌预后不良,这可能与*FOXE1*基因高甲基化使基因功能受到抑制有关。

本研究通过焦磷酸测序检测31例结直肠癌组织中多个基因的甲基化状态,结果发现*PRDM12*、*FOXE1*、*B3GAT2*、*VIM*、*SFRP2-1*、*SFRP2-2*基因启动子甲基化水平在结直肠癌组织与癌旁正常组织中均存在差异(P 均 <0.01),且*PRDM12*、*FOXE1*基因启动子高度甲基化率高于既往文献报道较多的*VIM*、*SFRP2*、*Septin9*、*NDRG4*等基因的甲基化率^[4,18-20]。在18例早期(TNM I~II期)结直肠癌中,*PRDM12*、*FOXE1*基因启动子高度甲基化率分别为88.9%(16/18)、94.4%(17/18),提示*PRDM12*、*FOXE1*基因甲基化在早期结直肠癌患者诊断中可能具有一定价值。*B3GAT2*基因编码葡萄糖醛酸转移酶家族的跨膜蛋白,参与人自然杀伤蛋白1碳水化合物表位的合成,与神经系统的细胞迁移和黏附有关,有研究发现*B3GAT2*蛋白表达下降与其基因启动子甲基化有关^[21]。*VIM*通常在正常的间充质细胞中表达,并且其高甲基化与癌转移相关^[22]。*SFRP2*蛋白主要参与Wnt信号通路相关蛋白的表达,有研究发现有该蛋白参与骨肉瘤和结直肠癌的癌细胞迁移^[23-24]。但本研究结果显示,与*PRDM12*和*FOXE1*相比,*VIM*、*SFRP2-1*、*SFRP2-2*基因在结直肠癌组织中的甲基化水平相对较低,但由于这些基因均是在癌细胞扩散阶段发挥功能,可能不适合作为早期结直肠癌筛查的标志物。

综上所述,*PRDM12*和*FOXE1*基因在结直肠癌组织中出现异常甲基化表达,初步判断两者有潜力成为结直肠癌早期辅助诊断的分子标志物,值得进一步研究。后期我们将在本研究结果的基础上收集肠炎、息肉、腺瘤患者及健康人的组织和粪便样本,比较癌症与炎症、息肉、腺瘤及健康人群中基因甲基化水平的差异,进一步探索*PRDM12*、*FOXE1*基因甲基化应用于结直肠癌早期筛查的可能性。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, ZHANG S, ZENG H, BRAY F, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115-132.
- [2] 林泳, 王红. 结直肠癌的筛查模式与筛查方法[J]. *中华全科医师杂志*, 2017, 16: 342-345.
- [3] ABOUZEID H E, KASSEM A M, ABDEL WAHAB A H, EL-MEZAYEN H A, SHARAD H, ABDEL RAHMAN S. Promoter hypermethylation of *RASSF1A*, *MGMT*, and *HIC-1* genes in benign and malignant colorectal tumors[J]. *Tumour Biol*, 2011, 32: 845-852.
- [4] MELOTTE V, LENTJES M H, VAN DEN BOSCH S M, HELLEBREKERS D M, DE HOON J P, WOUTERS K A, et al. *N-myc* downstream-regulated gene 4 (*NDRG4*): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101: 916-927.
- [5] IMPERIALE T F, RANSOHOFF D F, ITZKOWITZ S H, LEVIN T R, LAVIN P, LIDGARD G P, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370: 1287-1297.
- [6] TIAN X, SUN D, ZHAO S, XIONG H, FANG J. Screening of potential diagnostic markers and therapeutic targets against colorectal cancer[J]. *Oncotargets Ther*, 2015, 8: 1691-1699.
- [7] TÓTH K, SIPOS F, KALMÁR A, PATAI A V, WICHMANN B, STOEHR R, et al. Detection of methylated *SEPT9* in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e46000. doi: 10.1371/journal.pone.0046000.
- [8] YAN H, CHOI A J, LEE B H, TING A H. Identification and functional analysis of epigenetically silenced microRNAs in colorectal cancer cells[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6: e20628. doi: 10.1371/journal.pone.0020628.
- [9] GUPTA N, KUPFER S S, DAVIS A M. Colorectal cancer screening[J]. *JAMA*, 2019, 321: 2022-2023.
- [10] 中华医学会消化内镜学分会消化系早癌内镜诊断与治疗协作组, 中华医学会消化病学分会消化道肿瘤协作组, 中华医学会消化内镜学分会肠道学组, 中华医学会消化病学分会消化病理学组. 中国早期结直肠癌及癌前病变筛查与诊治共识[J]. *中国实用内科杂志*, 2015, 3: 211-227.
- [11] MA Z, WILLIAMS M, CHENG Y Y, LEUNG W K. Roles of methylated DNA biomarkers in patients with colorectal cancer[J/OL]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 2673543. doi: 10.1155/2019/2673543.
- [12] SU X L, WANG Y F, LI S J, ZHANG F, CUI H W. High methylation of the *SEPT9* gene in Chinese colorectal cancer patients[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13: 2513-2520.
- [13] XIAO W, ZHAO H, DONG W, LI Q, ZHU J, LI G, et al. Quantitative detection of methylated *NDRG4* gene as a candidate biomarker for diagnosis of colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9: 1383-1387.
- [14] SORRENTINO A, FEDERICO A, RIENZO M, GAZZERRO P, BIFULCO M, CICCODICOLA A, et al. PR/SET domain family and cancer: novel insights from the cancer genome atlas[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3250. doi: 10.3390/ijms19103250.
- [15] YANG C M, SHINKAI Y. Prdm12 is induced by retinoic acid and exhibits anti-proliferative properties through the cell cycle modulation of P19 embryonic carcinoma cells[J]. *Cell Struct Funct*, 2013, 38: 197-206.
- [16] KATOH M, IGARASHI M, FUKUDA H, NAKAGAMA H, KATOH M. Cancer genetics and genomics of human *FOX* family genes[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328: 198-206.
- [17] DAI W, MENG X, MO S, XIANG W, XU Y, ZHANG L, et al. FOXE1 represses cell proliferation and Warburg effect by inhibiting HK2 in colorectal cancer[J/OL]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18: 7. doi: 10.1186/s12964-019-0502-8.
- [18] AHMED D, DANIELSEN S A, AAGESEN T H, BRETTHAUER M, THIIIS-EVENSEN E, HOFF G, et al. A tissue-based comparative effectiveness analysis of biomarkers for early detection of colorectal tumors[J/OL]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2012, 3: e27. doi: 10.1038/ctg.2012.21.
- [19] WU D, ZHOU G, JIN P, ZHU J, LI S, WU Q, et al. Detection of colorectal cancer using a simplified *SEPT9* gene methylation assay is a reliable method for opportunistic screening [J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18: 535-545.
- [20] TAKEDA M, NAGASAKA T, DONG-SHENG S, NISHIE H, OKA T, YAMADA E, et al. Expansion of CpG methylation in the *SFRP2* promoter region during colorectal tumorigenesis[J]. *Acta Med Okayama*, 2011, 65: 169-177.
- [21] HINOUE T, WEISENBERGER D J, LANGE C P, SHEN H, BYUN H M, VAN DEN BERG D, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer[J]. *Genome Res*, 2012, 22: 271-282.
- [22] LAZAROVA D L, BORDONARO M. Vimentin, colon cancer progression and resistance to butyrate and other HDACis[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20: 989-993.
- [23] LIU X, FU J, BI H, GE A, XIA T, LIU Y, et al. DNA methylation of *SFRP1*, *SFRP2*, and *WIF1* and prognosis of postoperative colorectal cancer patients[J/OL]. *BMC Cancer*, 2019, 19: 1212. doi: 10.1186/s12885-019-6436-0.
- [24] TECHAVICHIT P, GAO Y, KURENBKOVA L, SHUCK R, DONEHOWER L A, YUSTEIN J T. Secreted frizzled-related protein 2 (*sFRP2*) promotes osteosarcoma invasion and metastatic potential[J/OL]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 869. doi: 10.1186/s12885-016-2909-6.