

• 综 述 •

DNA 及 RNA 甲基化检测在肿瘤诊断中的研究进展*

赵琦¹, 相绿竹¹, 彭瑞¹, 王晔²综述, 牟晓峰^{2△}审校

(1. 青岛大学医学部, 山东青岛 266021; 2. 青岛市中心医院检验科, 山东青岛 266042)

摘 要:在恶性肿瘤的发生及发展过程中, 遗传异常以及基因表观遗传学的改变起到了重要的作用。同遗传学异常一样, 表观遗传的改变也是一种可反映肿瘤发生早期的分子机制。DNA 甲基化作为表观遗传学的一种重要方式, 在控制基因的表达、维持基因组稳定性、细胞分化和胚胎发育中起着重要的作用; RNA 甲基化则主要包括后转录过程对真核基因表达的调控。因此, 检测肿瘤细胞中这 2 种甲基化的异常成为早期诊断肿瘤的重要手段。本文就 DNA 及 RNA 甲基化与肿瘤的关系以及这 2 种甲基化检测方法做一综述。

关键词: DNA 甲基化; RNA 甲基化; 肿瘤; 诊断; 检测方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.018

中图法分类号: R730.4

文章编号: 1673-4130(2019)11-1356-05

文献标识码: A

Advances in DNA and RNA methylation detection in tumor diagnosis*

ZHAO Qi¹, XIANG Lyuzhu¹, PENG Rui¹, WANG Ye², MU Xiaofeng^{2△}

(1. Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Qingdao Central Hospital, Qingdao, Shandong 266042, China)

Abstract: Genetic abnormality and changes in gene epigenetics play an important role in the occurrence and development of malignant tumors. Like genetic abnormalities, epigenetic changes are also a molecular mechanism reflecting the early stage of tumorigenesis. As an important way of epigenetics, DNA methylation plays an important role in controlling gene expression, maintaining genomic stability, cell differentiation and embryonic development. RNA methylation mainly includes the regulation of eukaryotic gene expression by post transcriptional process. Therefore, detection of these two abnormal methylation in tumor cells becomes an important means for early diagnosis of tumor. This paper reviews the relationship between DNA and RNA methylation and tumor and the two methods of methylation detection.

Key words: DNA methylation; RNA methylation; cancer; diagnosis; detection

基因甲基化是表观遗传学中的一个重要组成部分, 是在不改变基因组核苷酸序列的情况下, 将有活性的甲基化合物在相关转移酶的催化下结合到其他化合物上的过程。目前已发现的基因甲基化形式主要有 DNA 甲基化、RNA 甲基化以及组蛋白甲基化, 在多种生物学过程中发挥着重要的作用, 包括基因的表达、干细胞的自我更新和分化、组织发育、RNA 的稳定性等等。本文将从基因甲基化的概念、在肿瘤中的作用机制、检测方法等方面做一综述, 为后续研究提供理论基础。

1 甲基化的概念

1.1 DNA 甲基化 DNA 甲基化是 DNA 甲基转移酶(DNMT)介导的一种化学修饰过程, 在 DNMT 催化下, 通过 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)提供甲基, 将甲基转移到相应碱基上。在哺乳动物中, DNA 甲基化主

要发生在 CpG 岛 5' 端胞嘧啶上, 生成 5' 甲基胞嘧啶^[1]。CpG 岛为富含 G、C 碱基的 DNA 区域, 主要位于基因的启动子。人类的 CpG 以 2 种形式存在, 一种分散于 DNA 中, 另一种是 CpG 结构高度聚集的 CpG 岛。在正常组织中, 前者多被甲基化修饰, 而后者常以非甲基化状态存在于启动子区^[2], 大约有 60% 的人类基因存在于启动子区的 CpG 岛。在高等真核生物中已发现的 DNMTs 有: DNMT1、DNMT2、DNMT3a、DNMT3b、DNMT3L^[3]。DNMT1 是一种维持甲基化的甲基化转移酶, 它能识别 DNA 复制时生成的“半甲基化 DNA”, 即其亲代链已经甲基化, 进一步促进子链形成新的甲基化 CpG 二核苷酸; DNMT3a 和 DNMT3b 则主要在胚胎形成时期促进新的甲基化形成^[4]。

1.2 RNA 甲基化 RNA 甲基化一般是指 m6A 基

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81670822, 81370990); 青岛市医疗卫生重点学科建设项目(青卫科教学[2017]9 号)。

△ 通信作者, E-mail: muxiaofeng2005@126.com。

本文引用格式: 赵琦, 相绿竹, 彭瑞, 等. DNA 及 RNA 甲基化检测在肿瘤诊断中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(11): 1356-

因的甲基化。即碱基 A 第 6 位 N 原子上增加一个甲基。m6A 主要存在于 mRNA 的 CDS 区(蛋白质编码区)和 3'UTR 区,影响信使 RNA(mRNA)的稳定性、翻译效率、可变剪接和定位等,在后转录层面参与真核基因的表达调控^[2]。

RNA 甲基化在体内受到 3 种效应蛋白的调控,“书写器”、“消除器”和“阅读器”^[2]。“书写器”是指 m6A 甲基化转移酶,介导 RNA 的甲基化修饰过程,主要指 METTL3-METTL14 复合物^[5-6],两者可在体外和体内催化 mRNA(和其他细胞核 RNA)的 m6A 甲基化;另一种常见转移酶是肾母细胞瘤 1 结合蛋白(WTAP)^[7];“消除器”是指去甲基化酶,介导 RNA 的去甲基化修饰过程,主要包括 FTO^[8]和 ALKBH5^[9]。“阅读器”主要包括 YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3^[10],可识别 RNA 甲基化修饰的信息,并参与下游 RNA 的翻译、降解等过程。比如, YTHDC1 可与 mRNA 上的 m6A 结合,将 mRNA 转运出核。YTHDF1/YTHDF3 识别 m6A 后可促进 mRNA 的翻译,而 YTHDF2 与 m6A 的结合则会促进 mRNA 的降解。

2 甲基化与肿瘤

2.1 异常 DNA 甲基化与肿瘤发生的关系 在肿瘤细胞中,常常有正常 DNA 甲基化模式异常改变,常表现为全基因组广泛低甲基化及抑癌基因 CpG 岛区域高甲基化;除此之外,基因错配修复系统的失活、微小 RNA(miRNA)表达缺失等均和 DNA 甲基化有着千丝万缕的联系。

2.1.1 抑癌基因 CpG 岛区域高甲基化 正常情况下,抑癌基因的 CpG 岛为非甲基化状态;而在某些肿瘤中抑癌基因启动子区 CpG 岛区域发生高甲基化,抑制了其转录和表达,使抑癌基因失活,导致肿瘤的产生。吴亮等^[11]发现抑癌基因 DACH1 启动子甲基化程度与食管鳞癌分化程度成反比,提示 DACH1 启动子甲基化有很大可能促进食管癌的发生、发展。

2.1.2 癌基因组的广泛低甲基化 肿瘤细胞中常见全基因组的低甲基化会导致基因的突变率增加,特异基因尤其是启动子区域的低甲基化则会激活癌基因,促进肿瘤生长及转移^[12]。

2.1.3 基因错配修复与 DNA 甲基化 DNA 错配修复系统(MMR)能够修复几乎所有碱基的错配,最大程度避免基因突变。而有研究发现,当 MMR 缺陷时,CpG 岛会出现较强的甲基化^[13],碱基错配将不能被修复,因此造成的基因突变也是肿瘤发生的机制之一。

2.1.4 CpG 甲基化促进肿瘤相关基因突变 研究证明,甲基化的 CpG 岛基因突变的频率远高于正常水平。比如在结肠癌患者的 p53 基因中,55%左右的突变发生在 CpG 位点上,其中 94%是 C→T 的突变,甲基化的 CpG 突变为 TpG,经过 DNA 复制,最终从 C:G 转换为 T:A,导致遗传信息的改变,最终可导

致肿瘤的发生^[14]。

2.1.5 DNMT 与肿瘤 作为 DNA 甲基化的催化酶,DNMT 基因在异常甲基化中起着不可替代的作用。肿瘤细胞中某些部位基因的高甲基化往往预示着 DNMT 表达的增加,相反,DNMT 表达的异常增加也可能导致部分基因尤其是抑癌基因的异常高甲基化,进一步促进肿瘤的产生。RAJNEESH 等^[15]发现,与乳腺干细胞相比,DNMT1 在肿瘤干细胞中表达增加,而 DNMT1 基因的功能缺失则通过阻断肿瘤干细胞的形成来保护小鼠免受乳腺肿瘤的影响。方钦亮等^[16]采用免疫组织学技术检测了 89 例手术切除肝癌组织与癌旁组织中 DNMT1 和 DNMT3b 的表达情况,发现肝癌组织中 DNMT1 和 DNMT3b 普遍存在过表达,且显著高于癌旁组织,提示了这 2 种甲基化转移酶与肝癌的发生和进展可能存在密切的关系。KIM 等^[17]对 102 例非小细胞肺癌进行研究,结果发现 DNMT1 和 DNMT3b mRNA 表达提高,同时检出相关抑癌基因高甲基化。

2.1.6 微小 RNA(miRNA)编码 DNA 甲基化与肿瘤 miRNA 通过降解目标 mRNA 或抑制其翻译从而实现对细胞生物学功能的调节。某些 miRNA 在癌旁组织和肿瘤组织中出现表达差异^[18],表现为表达增加或表达下降,罗顺容等^[19]采用实时荧光定量 PCR 法对 27 份非小细胞肺癌(NSCLC)组织及其癌旁正常组织标本的 miRNA-205 进行相对定量分析,发现肺鳞癌的 miRNA-205 表达水平升高,这可能与其编码基因启动子低甲基化有关;某些具有抑癌基因功能的 miRNA 的编码基因启动子区在癌症中呈现出高甲基化状态,而使其表达受到抑制^[20]。

2.2 RNA 甲基化与肿瘤 近年来很多研究表明 RNA 甲基化与肿瘤的发生、发展密不可分,包括“书写器”、“消除器”及“阅读器”的异常都可导致肿瘤的产生与进展。有研究表明,包括 METTL-3 和 METTL14 复合体、RNA 结合蛋白 15 等甲基化转移酶复合物在髓系白血病中高度表达,它们的改变往往预示着预后不良,如 m6A 水平的升高可能预示着髓系白血病的发生^[21]。除此之外,METTL-3 和 METTL14 复合体还可影响某些信号因子活性来发挥其对肿瘤细胞的作用。研究表明 mRNA 甲基化可以通过调节蛋白激酶 B(AKT)的活性促进子宫内膜癌细胞的增殖和致癌性,其机制之一就是 METTL14 热点 R298P 的突变和 METTL-3 表达减少,导致 AKT 负调节器 PHLPP2 表达降低以及正向调节器 mTORC2 表达增高,导致 AKT 表达增加,而 AKT 又可促进细胞的存活和生长,进一步证实 mRNA 甲基化的降低可以增加子宫内膜癌细胞的增殖和致癌性^[22]。

去甲基化酶的表达也与肿瘤关系密切,例如:低氧促进乳腺癌的表达,部分是通过增加去甲基化酶 ALKBH5 的表达,进而减少 m6A 表达水平来实现的^[23];有研究者也发现,在某些急性粒细胞白血病亚

型中出现 FTO 的高表达,具体机制为:FTO 基因促进细胞增殖或转化和体外抑制细胞凋亡,而某些白血病相关致癌基因会使 FTO 的表达水平上调;使用 MeRIP-seq 测序法证实 FTO 过表达和敲除会分别降低和提升靶基因 ASB2 和 RARA 的 m6A 水平,进一步证实 FTO 可促进 AML 的发展,在 AML 中发挥着“原癌基因”的作用^[24]。除此之外,免疫组化分析表明阅读器 YTHDF1 表达与多种恶性肿瘤的行为有关,如肿瘤侵犯深度、淋巴结转移、恶性肿瘤的分期,NISHIZAWA 等^[25]对结直肠癌患者生存期的研究表明,高 YTHDF1 表达的患者有显著较差的总生存期,YTHDF1 表达是影响患者预后的独立危险因素,体外研究表明,敲除 YTHDF1 基因后,使用抗癌药物氟尿嘧啶和奥沙利铂等可抑制肿瘤的生长。

3 分子甲基化的检测

3.1 DNA 甲基化的检测 检测基因组 DNA 甲基化水平的方法有很多,总体分为 2 大类:一类是检测基因组总体甲基化水平,包括变性高效液相色谱法、基于抗 5mC 的免疫化学法、SssI 甲基转移酶法等,另一类方法则可检测到具体的甲基化位点,例如甲基化敏感限制性内切酶-Southern 印记杂交技术、重亚硫酸氢钠修饰后测序法、甲基化特异性 PCR、亚硫酸氢钠联合限制性内切酶分析法等。

3.1.1 变性高液相色谱法(DHPLC) DHPLC 技术可对 DNA 甲基化进行定量检测,由于异源双链 DNA 和同源双链 DNA 被色谱柱保留的时间不同,导致了 DNA 片段的洗脱特性差异。DNA 片段的保留时间由 DNA 序列的 G/C 含量和存在的 DNA 失配来确定。序列中 CpG 位点的甲基化导致 PCR 产物的 G/C 含量比未甲基化基因组的含量增加,导致更高的熔融温度,进一步增加了保留时间。在部分变性条件下,通过监测由硫酸氢盐处理的 DNA 扩增子保留时间,可以揭示 DNA 甲基化的差异^[26]。

3.1.2 基于抗 5mC 抗体免疫化学法 利用 5mC 抗体能够与 5mC 发生特异性反应:应用荧光素标记该抗体使之与预先已固定在 DEAE 膜上的样品 DNA 特异性结合,对 DEAE 膜上的荧光素进行测量即可得到 5mC 的水平,荧光素强度与 5mC 水平成正比。抗体的设计决定了该方法的灵敏度和特异性。

3.1.3 CpG 甲基转移酶(M. SssI)法 CpG 甲基转移酶(M. SssI)能识别双链 DNA 上的 CpG 二核苷酸序列,并甲基化其中的胞嘧啶残基。由 3H-S-腺苷甲硫氨酸(3H-SAM)提供甲基,在 M. SssI 甲基转移酶催化下转移到基因组 DNA 的 CpG 胞嘧啶使其发生甲基化^[27]。剩余腺苷甲硫氨酸(SAM)放射性强度与所测 DNA 甲基化水平成反比。但因 M. SssI 甲基转移酶不稳定,导致结果不够精确,可以用设置 M. SssI 甲基转移酶自身对照组这一办法解决。

3.1.4 甲基化敏感的限制性内切酶-Southern 印记杂交技术 甲基化敏感限制性内切酶只切割非甲基

化 DNA 片段;而甲基化不敏感的限制性内切酶无论 DNA 片段是否甲基化都会切割。根据这一特性,将 DNA 分别用两种内切酶切割,用放射性标记 ³²P 的探针对目的片段作 Southern 杂交。比较两组条带的差异即可得到目的位点的甲基化状态。该法简便、快捷,可定位具体甲基化位点。

3.1.5 重亚硫酸氢钠修饰后测序法^[28] 待测 DNA 片段中非甲基化的胞嘧啶经重亚硫酸盐修饰后,转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶不变,进一步通过高通量测序比较就可间接判断样品中的胞嘧啶甲基化与否。该方法分辨率高,可检测出 DNA 序列上的全部甲基化信息,但费用较高。

3.1.6 甲基化特异性 PCR(MSP) 首先将 DNA 经亚硫酸氢钠处理,其次进行 PCR 反应,针对经亚硫酸氢钠处理后的甲基化或非甲基化 DNA 链设计出两种引物对,若用前者能扩增出片段,说明该检测位点发生了甲基化;若用后者能扩增出片段,说明该检测位点没有甲基化。王春华^[29]通过实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR)和测序法检测支气管肺泡灌洗液中 SHOX2 和 RASSF1A 基因甲基化情况,发现 RT-PCR 与测序法检测 SHOX2 和 RASSF1A 甲基化的一致率达到了 99% 和 100%。该法具有较高的特异性、灵敏度,但待测序列需已知,引物设计不足或亚硫酸氢钠对 DNA 处理不完全易致假阳性。

3.1.7 重亚硫酸氢钠联合限制性内切酶分析法(COBRA)^[30] 将亚硫酸氢钠处理后的 DNA 进行 PCR 扩增,用限制性内切酶酶切 PCR 产物,后根据电泳条带的不同位置及亮度即可检测出 DNA 的甲基化状态及甲基化程度。JACOB 等^[31]应用 COBRA 与测序相结合(COBRA-Seq)检测出在卵巢癌中 GBGT1 基因启动子区出现高甲基化。该法简便、可定量,避免了由甲基化敏感性酶产生的假阳性,但检测位点受限,不能除外假阴性检测的可能性。

3.1.8 PCR 荧光法 早在 2000 年,EADS 等^[32]就报道了采用荧光实时 PCR 的定量检测 DNA 甲基化的技术,该方法基于 Taqman[®] 探针实时定量检测。其中探针的设计是关键。首先由重亚硫酸盐联合限制性内切酶分析法检测 DNA 甲基化状态,其次设计与待测甲基化 DNA 位点互补的探针,探针的 5'端连接上一个荧光报告寡核苷酸基团(6FAM),3'端连接荧光淬灭寡核苷酸基团(TAMRA),当探针与待测 DNA 杂交时,在 PCR 引物延伸至探针时,TaqDNA 聚合酶 5'至 3'外切酶活性会将探针 5'端的荧光报告基团切下,3'荧光淬灭基团则不能再将其抑制,荧光报告基团释放荧光即可被检测,荧光强度和甲基化水平成正比。但该方法前提是待测 DNA 序列已知。

3.2 RNA 甲基化检测方法 同 DNA 甲基化检测方法相类似,RNA 甲基化检测同样分为整体水平和精确到特异位点的检测方法。整体甲基化检测方法主要有 LC-MS/MS(液相二级质谱法);而 MeRIP-seq、

miCLIP 以及 SCARLET 等方法则可明确甲基化位点,稍有不同的是 MeRIP-seq 法分辨率较低,为 100 碱基左右,而 miCLIP 和 SCARLET 法可精确到单碱基的程度。

3.2.1 LC-MS/MS 在液相质谱的基础上采用串联质谱,能够获得分子离子峰和碎片离子峰,可对碱基同时进行定性和定量分析。将消化为单碱基的 RNA 样本注入液相色谱仪,根据出峰的保留时间面积可计算各个碱基的含量;而后进入质谱串联分析,将单个核糖核苷酸打断成五碳糖和嘧啶或嘌呤,根据出峰的保留时间计算 m6A 的面积。最后根据 m6A 和总腺嘌呤的比例计算出 m6A 在 mRNA 上整体的甲基化程度。该方法可定量,且简便、成本低,但不能对甲基化位点准确定位。

3.2.2 MeRIP-seq/m6A-seq 该方法结合了免疫共沉淀和高通量测序的方法,用 m6A 特异性抗体筛选带有 m6A 的 mRNA 片段并将其沉淀,构建相应的 cDNA 测序文库,后进行高通量测序,对 m6A 甲基化程度较高的区域进行定位。该法可以以较高的精确度对全基因组进行测序,并得到较为精确的甲基化位点^[33]。由于该方法的分辨率为 100 碱基左右,所以只能对大致的区域进行分析。

3.2.3 miCLIP miCLIP 是一种结合免疫共沉淀、共价交联及高通量测序的技术^[34],它的基本检测原理为:用紫外光诱导 m6A 抗体与含有 m6A 的 RNA 交联,交联后该 RNA 反转录得到的 cDNA 会出现 C-T 突变或者就此截断,因此可以指示 m6A 的存在。

3.2.4 SCARLET SCARLET 法是一种结合了特定位点切割、放射性标记、“夹板”辅助提取以及薄层色谱法等多种技术的 RNA 测序法^[35]。首先根据靶 mRNA 序列设计嵌合寡核苷酸,对目标核苷酸进行放射性标记;其次利用“夹板”辅助将嵌合寡核苷酸同待测 RNA“结扎”在一起,后用 RNA 酶消化,待测序列因受“夹板”固定保护免受酶解,从而可被检测。最后利用薄层色谱法分析具体修饰位点。该法分辨率高,但由于有放射性以及成本较高,使其开展受限。

4 展 望

DNA 及 RNA 的甲基化修饰在肿瘤发生、发展中的重要作用已被大量专家学者研究所证实,其中 DNA 甲基化调控肿瘤的机制研究在近十几年已日趋完善,某些研究较为成熟的基因已有商品化试剂盒流通,各种 DNA 甲基化抑制药物推陈出新,为癌症患者带来了福音。相比之下,近几年火热的以 m6A 修饰为主的 mRNA 甲基化对肿瘤的调控机制研究还处于初期阶段,因此各种 mRNA m6A 检测技术成为推动其发展的重要手段,也为癌症患者的早诊、早治提供了新的方法。本文简要介绍了两种表观遗传学修饰与肿瘤的相互作用,以及相关检测方法,希望能对甲基化领域初级研究者提供帮助。同时期待更方便、准确、快速以及经济的检测手段的出现,进一步提高检

测的特异度和灵敏度,从而更好地服务于临床,推动表观遗传学在肿瘤早期诊断以及分期、预后和治疗中的发展,为肿瘤患者带来新的希望。

参考文献

- [1] HOWELL P M, LIU S, REN S, et al. Epigenetics in human melanoma[J]. *Cancer Control*, 2009, 16(3): 200-218.
- [2] FU Y, DOMINISSINI D, RECHAVI G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m(6)A RNA methylation[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(5): 293-306.
- [3] CHEN Z X, RIGGS A D. DNA methylation and demethylation in mammals[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21): 18347-18353.
- [4] MARK A, DAWSON, TONY K. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy[J]. *Cell*, 2012, 150(1): 12-27.
- [5] WANG Y, LI Y, TOTH J I, et al. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(2): 191-198.
- [6] LIU J, YUE Y, HAN D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 93-95.
- [7] PING X L, SUN B F, WANG L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase[J]. *Cell Res*, 2014, 24(2): 177-189.
- [8] JIA G, FU Y, ZHAO X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12): 885-887.
- [9] ZHENG G, DAHL J A, NIU Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18-29.
- [10] LUO S, TONG L. Molecular basis for the recognition of methylated adenines in RNA by the eukaryotic YTH domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(38): 13834-13839.
- [11] 吴亮, 李闻, 郭明洲. 抑癌基因启动子区甲基化在食管鳞状细胞癌诊断、治疗和预后中的应用价值[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2014, 24(4): 361-364.
- [12] AHUJA N, LI Q, MOHAN A L, et al. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5489-5494.
- [13] RAJNEE K, KARISHMA G, SANJAY G. Cancer epigenetics: an introduction[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 123(8): 3-25.
- [14] 朱益民, 来茂德. DNA 甲基化在肿瘤发生中的作用[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2003, 45(2): 79-83.
- [15] RAJNEESH P, SABARISH R, SELVAKUMAR E, et al. DNMT1 is essential for mammary and cancer stem cell maintenance and tumorigenesis[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(2): 6910.
- [16] 方钦亮, 谢程融, 赵文秀, 等. DNA 甲基化转移酶 1/3b 与肝癌临床病理特征和预后相关性研究[J/CD]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2015, 11(4): 261-266.

[17] KIM H, KWON Y M, KIM J S, et al. Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer [J]. *Cancer*, 2006, 107(5):1042-1049.

[18] CALIN G A, CROCE C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11):857-866.

[19] 罗顺蓉, 姜岚今, 姜雅各, 等. 微小 RNA-205 在非小细胞肺癌中的表达及其启动子甲基化情况[J]. *广西医学*, 2018, 46(3):241-244.

[20] ANDOT, YOSHIDA T, ENOMOTO S, et al. DNA methylation of microRNA genes ingastric mucosae of gastric cancer patients:Its possible involvement in the formation of epigenetic field defect[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(10):2367-2374.

[21] JAFFREY S R, KHARAS M G. Emerging links between m(6)A and misregulated mRNA methylation in cancer [J]. *Genome Med*, 2017, 9(1):2.

[22] JUN L, MARK A E, BRYAN T, et al. m6A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 9(20):1074-1083.

[23] ZHANG C, ZHI W, LU H, et al. Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217- and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40):64527-64542.

[24] LI Z, WENG H, SU R, et al. FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N(6)-Methyladenosine RNA Demethylase[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(1):127-141.

[25] NISHIZAWA Y, KONNO M, ASAI A, et al. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m(6)A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(7):7476-7486.

[26] OMARUDDIN R A, CHAUDHRY M A. Detection of genomic DNA methylation with denaturing high performance liquid chromatography [J]. *Human Cell*, 2010, 23(5):41-49.

[27] KUMAR S, CHENG X, KLIMASAUSKAS S, et al. The DNA (cytosine-5) methyltransferases [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(1):1-10.

[28] CLARK S J, HARRISON J, PAUL C L, et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(15):2990-2997.

[29] 王春华. 支气管肺泡灌洗液 SHOX2, RASSF1A 甲基化检测在肺癌诊断中的研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2016.

[30] WEE E J, RAUF S, SHIDDIKY M J, et al. DNA ligase-based strategy for quantifying heterogeneous DNA methylation without sequencing[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1):163-171.

[31] JACOB F, HITCHINS M P, FEDIER A, et al. Expression of GBGT1 is epigenetically regulated by DNA methylation in ovarian cancer cells[J]. *BMC Mol Biol*, 2014, 15(2):24.

[32] EADS C A, DANENBERG K D, KAWAKAMI K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(8):E32.

[33] DOMINISSINI D, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, SCHWARTZ S, et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq [J]. *Nature*, 2012, 485(7397):201-206.

[34] LINDER B, GROZHIK A V, OLARERIN-GEORGE A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome [J]. *Nat Meth*, 2015, 12(8):767-772.

[35] LIU N, PARISIEN M, DAI Q, et al. Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA[J]. *RNA*, 2013, 19(12):1848-1856.

(收稿日期:2018-10-20 修回日期:2019-02-16)

• 综 述 •

血流感染病原微生物诊断技术的研究与应用^{*}

章 波^{1,2}, 伊贝拜汗·买买提¹综述, 张 新^{1△}审校

(1. 新疆生产建设兵团医院/石河子大学医学院第二附属医院检验科, 新疆乌鲁木齐 830002;
2. 石河子大学医学院, 新疆石河子 832000)

摘 要:血流感染(BSI)是指病原微生物侵入血液循环并在体内繁殖的一种全身感染性疾病。近年来因其高发病率及病死率而受到越来越多的关注,如何实现 BSI 致病菌的快速检测及其药敏结果的准确回报,是长期困扰临床的问题。血培养是诊断 BSI 病原微生物的“金标准”,但其阳性率低且结果报告周期长,因此需探索新的技术以弥补此缺陷。近年来,微生物多种诊断技术,如阳性报警时间、核酸杂交技术、核酸扩增技术、质谱检测技术、基因芯片和测序技术等逐步从研究阶段走向 BSI 病原微生物诊断的临床应用阶段。本文旨在对 BSI

^{*} 基金项目:国家临床重点专科建设项目(兵卫发电[2011]24 号);兵团临床重点专科建设项目(兵卫发[2013]24 号)。

[△] 通信作者, E-mail: xjzhangxin108@126. com.

本文引用格式:章波,伊贝拜汗·买买提,张新. 血流感染病原微生物诊断技术的研究与应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(11):1360-