

• 综 述 •

游离 DNA 甲基化在非肿瘤性疾病中的应用研究进展*

魏丽荣 综述, 杜玉珍[△] 审校

上海交通大学医学院附属第六人民医院检验科, 上海 201306

摘 要: 游离 DNA 已成为新兴的、非侵入性的重要临床样本类型, 游离 DNA 甲基化具有组织特异性, 可以反映来源细胞的 DNA 甲基化状态, 在临床疾病诊疗中可能成为重要的潜在标志物。该文旨在综述近年常用的游离 DNA 甲基化检测技术, 以及游离 DNA 甲基化在神经退行性疾病、精神性疾病、心血管疾病、糖尿病和出生缺陷等非肿瘤性疾病中的应用研究进展。

关键词: 游离 DNA; 甲基化; 液态活检; 非肿瘤性疾病

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.05.025

中图法分类号: R734.2

文章编号: 1673-4130(2024)05-0635-06

文献标志码: A

**Research progress in cell free DNA methylation detection technology
and its application in non-neoplastic diseases***

WEI Lirong, DU Yuzhen[△]

Department of Clinical Laboratory, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201306, China

Abstract: Cell-free DNA has emerged as a novel and non-invasive clinical sample type. The methylation patterns of cell-free DNA are tissue-specific and can reflect the DNA methylation status of the source cells. Therefore, they have the potential to serve as important biomarkers in clinical disease diagnosis and treatment. The article aims to review the recent developments in commonly used cell-free DNA methylation detection techniques, as well as the research progress of cell-free DNA methylation in non-neoplastic diseases such as neurodegenerative diseases, psychiatric disorders, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, and birth defects.

Key words: cell-free DNA; methylation; liquid biopsy; non-neoplastic diseases

游离 DNA 是细胞凋亡、坏死和自噬等过程中释放到血液、腹水、脑脊液、唾液、胸腔积液和尿液等体液中的 DNA 片段, 长度为 150~200 bp^[1]。游离 DNA 的产生和清除是一个动态过程, 半衰期为 5~150 min, 因此游离 DNA 可以对全身死亡细胞进行“快照”, 这一特点使其成为许多疾病的检测目标^[2]。健康人的血浆中含有 0~100 ng/mL 的游离 DNA, 而在以细胞死亡和损伤为特征性疾病(包括癌症、创伤、败血症和糖尿病等)患者的血浆中游离 DNA 水平可高达 1 000 ng/mL^[3], 但这种游离 DNA 水平的显著升高是非特异性的, 无法明确游离 DNA 的组织细胞来源^[4]。对游离 DNA 甲基化模式进行分析, 则可以溯源到相应的组织或细胞, 从而帮助判断特定疾病的发生和进展。

DNA 甲基化是最广泛存在并深入研究的表观遗传修饰类型, 参与调控基因转录、基因组印记、维持 X

染色体失活、染色体维持和基因组稳定性等重要过程, 同时在个体发育、癌症、自身免疫性疾病、代谢紊乱、神经系统疾病和衰老等生理病理过程中发挥重要作用^[5-9]。游离 DNA 甲基化模式具有组织特异性, 与基因碱基突变信息相比, 与来源细胞具有更好的一致性, 因此, 液体活检样本游离 DNA 甲基化的研究为特定疾病的微创检测和监测潜在病变提供了可能。游离 DNA 甲基化已应用于多种异常疾病的诊断^[10-12], 特别在肿瘤早筛、微小病灶残留和复发预测中的运用是目前研究的热门领域^[13]。除肿瘤之外, 游离 DNA 甲基化还与其他疾病的诊疗密切相关, 包括神经退行性疾病、精神性疾病、心血管疾病、糖尿病及出生缺陷等。本文将重点阐述游离 DNA 甲基化检测技术及其在上述非肿瘤性疾病中的应用研究进展。

1 游离 DNA 甲基化检测技术

DNA 甲基化是指胞嘧啶或腺嘌呤在甲基化结合

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81974315); 浦东新区科技发展基金事业单位民生科研专项(医疗卫生)项目(PKJ2019-Y05)。

[△] 通信作者, E-mail: yzdu@sjtu.edu.cn。

蛋白(MBDs)和 DNA 甲基转移酶的作用下,从 S-腺苷甲硫氨酸中获得甲基基团的化学修饰。人体基因组中含量最高的甲基化修饰是 5-甲基胞嘧啶(5mC),以及 5mC 经 TET 蛋白催化形成的 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)修饰^[14]。5mC 和 5hmC 修饰具有组织特异性,也是目前游离 DNA 甲基化检测技术的主要分析目标。

游离 DNA 甲基化检测技术一般需要 5 个步骤,包括体液样本采集、游离 DNA 提取、游离 DNA 预处理、甲基化位点的检测和数据分析。由于游离 DNA 甲基化并没有产生碱基序列的差异,5mC 和 5hmC 的甲基基团位于 DNA 双螺旋的沟槽中,因此直接采用传统 PCR、杂交或测序的方法检测,无法判别胞嘧啶是否发生了甲基化修饰。早期的游离 DNA 甲基化分析方法都需要先对 DNA 序列进行预处理,然后再通过 PCR 扩增、测序或杂交等方法进行后续的分析。目前主要有 4 种预处理方法:重亚硫酸盐转化法、限制性内切酶法、亲和富集法和 TET 酶转化法^[15-16]。4 种预处理方法的原理和基于该预处理方法的游离 DNA 甲基化检测技术如下:(1)重亚硫酸盐转化法原理是亚硫酸氢盐处理后,5mC 不变,非甲基化的胞嘧啶(C)变为尿嘧啶(U),再通过 PCR 反应转换为胸腺嘌呤(T),从而将甲基化修饰的差异转化为序列的差异,最后通过识别 C 或 T 来鉴定胞嘧啶是否被甲基化修饰;基于该预处理法的技术有全基因组甲基化测序、亚硫酸盐后接头标记测序、甲基化 CpG 串联扩增和测序、靶基因重压硫酸盐测序、甲基化芯片、氧化亚硫酸氢盐测序和 TET 辅助的重亚硫酸盐测序等。(2)限制性内切酶法原理是基于特定的限制性内切酶特异性剪切甲基化或非甲基化序列,经大小选择后,对未甲基化的 CpG 岛区域进行检测;基于该预处理法的技术有简化基因组甲基化测序、单细胞简化代表性重亚硫酸盐测序、甲基化特异性 PCR、甲基化特异性数字 PCR 等。(3)亲和富集法原理是利用抗体或 MBDs 的特异性来富集甲基化的基因组区域,用于后续分析;基于该预处理法的技术有甲基化 cfDNA 免疫沉淀测序、甲基-CpG 结合域测序、甲基化芯片和 5hmC 选择性化学标记方法等。(4)TET 酶转化法原理是利用 TET 蛋白将 5mC 先转化为 5hmC,进而转化为 5-羧基胞嘧啶(5caC),随后 5caC 经吡啶硼烷处理和 PCR 扩增等过程转化为 T,再进行下一步分析;基于该预处理法的技术有 TET 辅助吡啶硼烷测序和酶法甲基化测序等。上述基于 4 种预处理方法的甲基化检测技术中,重亚硫酸盐转化法是最常用和高效的方法;限制性内切酶法简单、省时且特异度强,但游离 DNA 的高度碎片化特征导致的基因组覆盖率低和限制位点丢失,会对结果造成一定的干扰;亲和富集

法适合 CpG 密度较高的序列;TET 酶转化法较为温和,并且可以降低成本^[16-24]。

随着第三代测序技术的兴起,目前还出现了无须预处理,直接检测游离 DNA 甲基化的技术,即 PacBio 单分子实时测序(SMRT)法和 Nanopore 测序法^[25-26]。PacBio SMRT 法测序原理是通过荧光信号时间延迟效应检测 DNA 甲基化修饰,在测序过程中,聚合酶遇到碱基上带有甲基化修饰的碱基时,合成速度变慢导致光谱发生改变,从而检出碱基甲基化修饰;而 Nanopore 测序法原理是 4 种碱基(A、T、C、G)及带有甲基化修饰的碱基通过单纳米孔时,孔两侧产生电信号差异不同,从而实现甲基化修饰的检测。这两种方法均可实现单碱基分辨率,避免游离 DNA 预处理过程对游离 DNA 的损耗;同时二者无需 PCR 扩增过程,极大减少了因扩增导致的误差。另外,Nanopore 测序法对于长碱基测序具有独特优势,因此也受到了越来越多的关注。以上的游离 DNA 甲基化检测技术各有优缺点,由于血浆或其他体液中游离 DNA 水平极低,应根据游离 DNA 样本起始量及实际的分析目的,选择合适的方法进行检测^[21-27]。

2 游离 DNA 甲基化在非肿瘤疾病中的研究现状

游离 DNA 的甲基化可以进行器官和组织溯源,发生病变的器官会增大释放到血液中的游离 DNA 的量,同时一些慢性病还有特殊的甲基化信号。这些信息为 DNA 甲基化进行器官和组织的衰老和疾病评估提供了基础。通过比较非肿瘤疾病患者与健康者的游离 DNA 甲基化模式,可以鉴别出疾病相关的特征,从而实现疾病的早期诊断。非肿瘤疾病进展和治疗过程中,相关细胞的死亡和损伤程度的变化也会反映在游离 DNA 甲基化模式的改变上,因此游离 DNA 甲基化还可用于评估疾病进展或治疗效果。目前,对于游离 DNA 甲基化在一些非肿瘤性疾病诊疗中的运用已经取得了一些进展。

- 2.1 游离 DNA 甲基化与神经退行性疾病
- 2.1.1 阿尔茨海默病(AD) AD 的早诊对于治疗有很高的价值,CHEN 等^[28]对于在阿尔兹海默症不同阶段的双胞胎的血液游离 DNA 的甲基化进行检测,发现 11 个基因位点的甲基化水平有差异。BAHA-DO-SINGH 等^[29]通过对 26 名 AD 患者和 26 名健康对照组的血液游离 DNA 的全基因组 DNA 甲基化分析,筛选获得 3 684 个有显著差异的 CpG 甲基化位点,然后使用 6 种人工智能算法构建了 AD 的诊断模型,曲线下面积(AUC)可达 0.949~0.998,提示游离 DNA 甲基化可用于 AD 的诊断。
- 2.1.2 早发性帕金森病(EOPD) EOPD 是一种罕见的帕金森病亚型,有研究者通过分析 EOPD 患者和对照人群的脑脊液中游离 DNA 的全甲基化谱,在

EOPD 中鉴定出 2 220 个差异甲基化基因,结果显示 EOPD 患者中高甲基化的基因数量远远超过了低甲基化,这些基因与神经元功能和免疫反应相关,提示脑脊液游离 DNA 甲基化有作为 EOPD 诊断标志物的潜力^[30]。

2.1.3 癫痫 颞叶内侧面癫痫伴海马硬化(MTLE-HS)是常见的癫痫综合征,MTLE-HS 患者的脑组织中存在显著的 DNA 甲基化差异^[31],在此基础上,研究人员分析了内侧面癫痫患者的血清游离 DNA 样本的 DNA 甲基化谱,并将其与从健康对照中获得的样本进行了比较,结果显示 MTLE-HS 患者的游离 DNA 甲基化组分析可以作为癫痫患者神经元细胞死亡的预测、诊断或预后工具^[32]。

2.1.4 肌萎缩侧索硬化(ALS) ALS 是一种进行性的神经退行性疾病,可导致肌肉无力、语言和吞咽障碍,最终导致呼吸衰竭和死亡的瘫痪。对 20 名诊断患有 ALS 的患者的血浆游离 DNA 分析结果显示,与健康者相比,ALS 患者 RHBDF2 基因的启动子增强子区有 2 个 CpG 的甲基化状态升高^[33]。另外有研究分析了 96 名 ALS 患者的血液游离 DNA 甲基化水平的分析,结果也显示了血液游离 DNA 甲基化模式对 ALS 患者的诊断潜力^[34-35]。

2.2 游离 DNA 甲基化与精神性疾病

2.2.1 精神分裂症 精神分裂症目前还没有可以帮助其诊断和病程预测的生物标记物。LUBOTZKY 等^[36]开发了一种大脑特异性 DNA 甲基化标记物检测方法,用于评估首次精神病发作患者血浆中是否存在脑源性游离 DNA,结果显示该方法对首次精神分裂症发作的患者诊断的 AUC 为 0.770,对精神病发作患者的灵敏度为 65%,特异度为 90%。表明脑特异性游离 DNA 甲基化标记物可能有助于精神分裂症的早期检测和监测,从而实现早期干预和充分治疗。

2.2.2 双相情感障碍(BD) 快速循环型 BD 患者是指 1 年内有 4 次以上的躁狂和抑郁发作,此类患者有更严重的自残和自杀倾向。目前的研究发现游离 DNA 甲基化对于快速循环型 BD 患者的鉴别诊断也具有重要价值,HO 等^[37]的一项研究分析了 46 名快速循环型 BD 患者和 47 名非快速循环型 BD 患者的血浆游离 DNA,并使用 850K Infinium MethylationEPIC 芯片检测游离 DNA 甲基化水平,从中筛选获得了 4 个对快速循环型 BD 患者有诊断价值的 CpG 甲基化位点,表明游离 DNA 甲基化具有作为快速循环型 BD 患者生物标志物的潜力。

2.3 游离 DNA 甲基化与心血管疾病

2.3.1 胸主动脉夹层(TAD) TAD 是致命的主动脉疾病之一,目前对其发病机制的了解有限。有研究使用全基因组亚硫酸氢盐分析了 TAD 患者中游离

DNA 中甲基化谱的变化,结果显示 TAD 患者游离 DNA 中存在许多差异甲基化区域,相关基因在脉管系统和心脏发育功能富集,基于此构建的预测模型可以实现 TAD 患者的分类诊断^[38]。

2.3.2 心肌梗死和体外循环(CPB)损伤 心肌梗死过程中,大量的心肌细胞死亡并释放游离 DNA 到血浆中。ZEMMOUR 等^[39]发现心脏特异性的血浆游离 DNA 非甲基化 FAM101A,在 ST 段抬高性心肌梗死患者中高于健康对照者,可用于诊断心梗。LIU 等^[40]通过甲基化 CpG 短串联扩增与测序技术(MC-TA-Seq)鉴定了 6 个心脏特异性高甲基化模式的 CGCGCGG 位点,并开发了一种检测 CORO6 甲基化位点的 ddPCR 检测方法,用于心肌梗死的诊断,诊断灵敏度为 46%,特异度为 80%。

CPB 是将患者的血液从心肺流转到体外构建新循环的治疗手段,CPB 被认为会导致延迟性的心脏损伤。有研究分析 42 名接受开胸手术的婴儿血浆中的心脏游离 DNA 甲基化标志物,结果显示游离 DNA 甲基化可以提示与 CPB 相关的心脏损伤,监测心脏细胞死亡,从而达到预测手术的临床结果和评估心脏保护性干预措施的效果^[41]。

2.3.3 妊娠期高血压(HDP) 妊娠期高血压(HDP)对围生期发病率和病死率有很大影响。SPINELLI 等^[42]通过分析妊娠 11~14 周的 HDP 患者的游离 DNA 甲基化谱,发现差异甲基化区域和注释基因的评估可以预测妊娠早期先兆子痫和心血管疾病易感性。

2.4 游离 DNA 甲基化与糖尿病 甲基化修饰在糖尿病进展中起着重要的作用,高甲基化和低甲基化都会影响身体代谢^[43]。研究发现差异甲基化的前胰岛素原基因的游离 DNA 在检测 β 细胞死亡方面具有良好的灵敏度和特异度^[44-45]。此外,检测血清中 β 细胞来源的差异甲基化胰岛素 DNA 可用于预测高危人群患 1 型糖尿病的可能性,以及评估 2 型糖尿病、妊娠糖尿病、胰岛移植和胰岛特异性免疫治疗中的 β 细胞死亡,表明游离 DNA 甲基化对于糖尿病的诊断和治疗检测具有潜在的运用价值^[10,46-49]。

2.5 游离 DNA 甲基化与出生缺陷 胎儿和母体基因组的甲基化状态不同,基于此,LUN 等^[50]在妊娠早期、晚期及分娩后收集的母体血液样本,测序分析胎儿、胎盘和母体血浆游离 DNA 甲基化谱,发现 21 三体胎儿的游离 DNA 的 21 号染色体甲基化密度显著降低;YU 等^[51]使用 PacBio SMRT 法分析母体血浆当中的长片段游离 DNA 甲基化,发现该方法可应用于脆性 X 综合征风险的无创产前检测;GORDEVIČIUS 等^[52]通过 uCG 特异性束缚寡核苷酸引物测序和 5hmC 特异性束缚寡核苷酸引物测序

方法检测到胎儿绒毛膜组织样本中 5hmC,在检测胎儿唐氏综合征可以达到 100% 的准确性。说明游离 DNA 甲基化是进行无创产前检测良好的标志物。

2.6 游离 DNA 甲基化与其他疾病除了上述疾病,还有一些研究发现游离 DNA 甲基化在异体移植不良反应、重症急性胰腺炎和新型冠状病毒肺炎组织损伤中也具有较好的诊断和预测价值^[53-56]。对于非肿瘤疾病,游离 DNA 甲基化相关研究还相对较少,并且现有的人类 DNA 甲基化数据库还存在着很大的局限性,缺乏组织常驻免疫细胞、成纤维细胞或内皮细胞等的甲基化图谱,给游离 DNA 甲基化细胞溯源带来了困难,限制了游离 DNA 的临床应用场景。在未来还需要更多的研究,筛选特定疾病相关细胞的特异性游离 DNA 甲基化图谱,为开发覆盖更大甲基化谱系信息和更多疾病的游离 DNA 甲基化检测奠定基础。

3 小结与展望

本综述小结了游离 DNA 甲基化检测技术及其在各类非肿瘤性疾病中的研究进展。总的来说,目前随着游离 DNA 甲基化检测技术的发展,检测的灵敏度和准确度在不断提升,成本也越来越低,为未来的临床运用奠定了良好的基础。对于非肿瘤疾病,目前的游离 DNA 甲基化的相关研究还处于早期阶段,但已经可以看出,基于其特有的组织细胞特异性,游离 DNA 甲基化的检测在神经退行性疾病、心血管疾病、糖尿病和出生缺陷等相关疾病的诊断方面具有独特的优势,在其他疾病中的运用也得到了越来越多的重视。

在实际应用层面,目前有部分肿瘤相关游离 DNA 甲基化检测产品进入商品化和临床使用,如第一个获得美国食品药品监督管理局和我国国家药品监督管理局(NMPA)批准用于结直肠癌的筛查和早期诊断的 mSEPT9 检测试剂盒,以及国内一些已获 NMPA 批准的血浆肿瘤基因甲基化检测试剂盒等^[57]。但已有的这些产品均是针对肿瘤检测,对于非肿瘤性疾病的商品化试剂的开发和临床验证还处在起步阶段,后续还更进一步的研究来拓宽游离 DNA 甲基化的临床运用场景。但可以预计,游离 DNA 甲基化未来可能成为非肿瘤性疾病肿瘤液体活检中一个极具价值的标志物。

参考文献

[1] YAN Y Y, GUO Q R, WANG F H, et al. Cell-free DNA: hope and potential application in cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9(1): 639233.

[2] SONG P, WU L R, YAN Y H, et al. Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics[J]. Nat Biomed Eng, 2022, 6

(3): 232-245.

[3] ELAZEZY M, JOOSSE S A. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2018, 16(1): 370-378.

[4] SCHWARZENBACH H, HOON D S, PANTEL K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6): 426-437.

[5] MENG H, CAO Y, QIN J, et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(5): 604-617.

[6] MATTEI A L, BAILLY N, MEISSNER A. DNA methylation: a historical perspective[J]. Trends Genet, 2022, 38(7): 676-707.

[7] GREENBERG M V C, BOURC' HIS D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(10): 590-607.

[8] UNNIKRISHNAN A, FREEMAN W M, JACKSON J, et al. The role of DNA methylation in epigenetics of aging[J]. Pharmacol Ther, 2019, 195(1): 172-185.

[9] KOCH A, JOOSTEN S C, FENG Z, et al. Author correction: analysis of DNA methylation in cancer: location revisited[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(7): 467.

[10] MOSS J, MAGENHEIM J, NEIMAN D, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5068.

[11] 储金林, 马睿瑶, 李琳琳. 基于 5hmC-Seal 测序技术检测糖尿病肾病患者血浆游离 DNA 中 5-羟甲基胞嘧啶的变化[J]. 新疆医科大学学报, 2022, 45(11): 1256-1261.

[12] 王锋, 丁艳, 张焕基. 循环游离 DNA 甲基化模式分析在心肌梗死中的研究进展[J]. 新医学, 2021, 52(4): 229-233.

[13] BURNHAM P, DADHANIA D, HEYANG M, et al. Urinary cell-free DNA is a versatile analyte for monitoring infections of the urinary tract[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2412.

[14] ZENG C, STROUP E K, ZHANG Z, et al. Towards precision medicine: advances in 5-hydroxymethylcytosine cancer biomarker discovery in liquid biopsy[J]. Cancer Commun(Lond), 2019, 39(1): 12.

[15] 吴羽灵, 张朋军, 田亚平. 甲基化循环肿瘤 DNA 的检测及应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(1): 152-158.

[16] GALARDI F, LUCA F, ROMAGNOLI D, et al. Cell-free DNA-methylation-based methods and applications in oncology[J]. Biomolecules, 2020, 10(12): 1677.

[17] SONG C X, YIN S, MA L, et al. 5-Hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages[J]. Cell Res, 2017, 27(10): 1231-1242.

[18] BACOLOD M D, MIRZA A H, HUANG J, et al. Application of multiplex bisulfite PCR-ligase detection reaction-real-time quantitative pcr assay in interrogating

- bioinformatically identified, blood-based methylation markers for colorectal cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(7):885-900.
- [19] ZENG H, HE B, XIA B, et al. Bisulfite-free, nanoscale analysis of 5-hydroxymethylcytosine at single base resolution[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(41):13190-13194.
- [20] HUANG J, WANG L. Cell-free DNA methylation profiling analysis-technologies and bioinformatics[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11):1741.
- [21] SHARMA M, VERMA R K, KUMAR S, et al. Computational challenges in detection of cancer using cell-free DNA methylation[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20(1):26-39.
- [22] SINGH A, GUPTA S, BADARUKHIYA J A, et al. Detection of aberrant methylation of HOXA9 and HIC1 through multiplex methylight assay in serum DNA for the early detection of epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(6):1740-1752.
- [23] DEGER T, BOERS R G, DE WEERD V, et al. High-throughput and affordable genome-wide methylation profiling of circulating cell-free DNA by methylated DNA sequencing(MeD-seq) of LpnPI digested fragments[J]. *Clin Epigenetics*, 2021, 13(1):196.
- [24] 孙祖俊, 李冬. 游离核酸甲基化检测在肿瘤精准诊疗中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(7):707-711.
- [25] CHOY L Y L, PENG W, JIANG P, et al. Single-molecule sequencing enables long cell-free DNA detection and direct methylation analysis for cancer patients [J]. *Clin Chem*, 2022, 68(9):1151-1163.
- [26] KATSMAN E, ORLANSKI S, MARTIGNANO F, et al. Detecting cell-of-origin and cancer-specific methylation features of cell-free DNA from Nanopore sequencing[J]. *Genome Biol*, 2022, 23(1):158.
- [27] LIU Z, WANG Z, JIA E, et al. Analysis of genome-wide in cell free DNA methylation; progress and prospect[J]. *Analyst*, 2019, 144(20):5912-5922.
- [28] CHEN L, SAYKIN A J, YAO B, et al. Multi-task deep autoencoder to predict Alzheimer's disease progression using temporal DNA methylation data in peripheral blood [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20(1):5761-5774.
- [29] BAHADO-SINGH R O, RADHAKRISHNA U, GORDEVIČIUS J, et al. Artificial intelligence and circulating cell-free DNA methylation profiling: mechanism and detection of Alzheimer's disease[J]. *Cells*, 2022, 11(11):1744.
- [30] MENG J, WANG F, JI L, et al. Comprehensive methylation profile of CSF cfDNA revealed pathogenesis and diagnostic markers for early-onset Parkinson's disease[J]. *Epigenomics*, 2021, 13(20):1637-1651.
- [31] MARTINS-FERREIRA R, LEAL B, CHAVES J, et al. Epilepsy progression is associated with cumulative DNA methylation changes in inflammatory genes [J]. *Prog Neurobiol*, 2022, 209(1):102207.
- [32] MARTINS-FERREIRA R, LEAL B, CHAVES J, et al. Circulating cell-free DNA methylation mirrors alterations in cerebral patterns in epilepsy [J]. *Clin Epigenetics*, 2022, 14(1):188.
- [33] MENDIORIZ M, MARTÍNEZ-MERINO L, BLANCO-LUQUIN I, et al. Liquid biopsy: a new source of candidate biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2018, 5(6):763-768.
- [34] TREMOLIZZO L, MESSINA P, CONTI E, et al. Whole-blood global DNA methylation is increased in amyotrophic lateral sclerosis independently of age of onset[J]. *Amyotroph Lateral SclerFrontotemporal Degener*, 2014, 15(1/2):98-105.
- [35] ROBICHAUD P P, ARSENEAULT M, O'CONNELL C, et al. Circulating cell-free DNA as potential diagnostic tools for amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurosci Lett*, 2021, 750(1):135813.
- [36] LUBOTZKY A, PELOV I, TEPLITZ R, et al. Elevated brain-derived cell-free DNA among patients with first psychotic episode-a proof-of-concept study [J]. *Elife*, 2022, 11(1):e76391.
- [37] HO A M, WINHAM S J, MCCAULEY B M, et al. Plasma cell-free dna methylomics of bipolar disorder with and without rapid cycling[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15(1):774037.
- [38] LIU P, ZHANG J, DU D, et al. Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of Hox genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis[J]. *Clin Epigenetics*, 2021, 13(1):124.
- [39] ZEMMOUR H, PLANER D, MAGENHEIM J, et al. Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):1443.
- [40] LIU X, REN J, LUO N, et al. Comprehensive DNA methylation analysis of tissue of origin of plasma cell-free DNA by methylated CpG tandem amplification and sequencing(MCTA-Seq)[J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1):93.
- [41] POLLAK U, ZEMMOUR H, SHAKED E, et al. Novel cfDNA methylation biomarkers reveal delayed cardiac cell death after open-heart surgery[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2023, 16(1):199-208.
- [42] SPINELLI M, ZDANOWICZ J A, KELLER I, et al. Hypertensive disorders of pregnancy share common cfDNA methylation profiles[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):19837.
- [43] MAŁODOBRA-MAZUR M, CIERZNIAK A, KALISZEWSKI K, et al. PPARG hypermethylation as the first epigenetic modification in newly onset insulin resistance in human adipocytes[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(6):889.
- [44] AKIRAV E M, LEBASTCHI J, GALVAN E M, et al.

Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(47):19018-19023.

[45] KURODA A, RAUCH T A, TODOROV I, et al. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation[J]. *PLoS One*, 2009, 4(9):e6953.

[46] HUMARDANI F M, MULYANATA L T, DWI PUTRA S E. Adipose cell-free DNA in diabetes[J]. *Clin Chim Acta*, 2023, 539(1):191-197.

[47] HEROLD K C, USMANI-BROWN S, GHAZI T, et al. β cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(3):1163-1173.

[48] FISHER M M, WATKINS R A, BLUM J, et al. Elevations in circulating methylated and unmethylated preproinsulin DNA in new-onset type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2015, 64(11):3867-3872.

[49] GALA-LOPEZ B L, NEIMAN D, KIN T, et al. Beta cell death by cell-free DNA and outcome after clinical islet transplantation[J]. *Transplantation*, 2018, 102(6):978-985.

[50] LUN F M, CHIU R W, SUN K, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(11):1583-1594.

[51] YU S C Y, JIANG P, PENG W, et al. Single-molecule sequencing reveals a large population of long cell-free DNA molecules in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(50):e2114937118.

[52] GORDEVIČIUS J, NARMONTÈ M, GIBAS P, et al. Identification of fetal unmodified and 5-hydroxymethylated CG sites in maternal cell-free DNA for non-invasive prenatal testing[J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1):153.

[53] CHENG A P, CHENG M P, LOY C J, et al. Cell-free DNA profiling informs all major complications of hematopoietic cell transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(4):e2113476118.

[54] COX D R A, LOW N, GOH S K, et al. Low levels of hepatocyte-specific methylation in cell-free DNA are a strong negative predictor for acute T cell-mediated rejection requiring treatment following liver transplantation[J]. *Liver Transpl*, 2022, 28(6):1024-1038.

[55] SUN H W, DAI S J, KONG H R, et al. Accurate prediction of acute pancreatitis severity based on genome-wide cell free DNA methylation profiles[J]. *Clin Epigenetics*, 2021, 13(1):223.

[56] ANDARGIE T E, TSUJI N, SEIFUDDIN F, et al. Cell-free DNA maps COVID-19 tissue injury and risk of death and can cause tissue injury[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(7):e147610.

[57] LIN K W. mSEPT9(Epi proColon) blood test for colorectal cancer screening[J]. *Am Fam Physician*, 2019, 100(1):10-11.

(收稿日期:2023-07-17 修回日期:2023-12-30)

(上接第 634 页)

[8] WANG H, FENG Y, ZHENG X, et al. The diagnostic and therapeutic role of snoRNA and lincRNA in bladder cancer[J]. *Cancers*, 2023, 15(4):1007.

[9] ZHANG J, LV W, LIU Y, et al. LINC_00355 promotes gastric cancer progression by upregulating PHF19 expression through sponging miR-15a-5p[J]. *BMC cancer*, 2021, 21(1):657.

[10] YAN L, WANG P, FANG W, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived exosomes-mediated transfer of LINC00355 regulates bladder cancer cell proliferation and invasion[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(3):257-265.

[11] ZHAO W, JIN Y, WU P, et al. LINC00355 induces gastric cancer proliferation and invasion through promoting ubiquitination of P53[J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6(1):99.

[12] LI W J, LI G, LIU ZW, et al. LncRNA LINC00355 promotes EMT and metastasis of bladder cancer cells through the miR-424-5p/HMGA2 axis[J]. *Neoplasma*, 2021, 68(6):1225-1235.

[13] NI Y, YANG Y, RAN J, et al. miR-15a-5p inhibits metastasis and lipid metabolism by suppressing histone acetylation in lung cancer[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 161:150-162.

[14] HE Y, HUANG H, JIN L, et al. CircZNF609 enhances hepatocellular carcinoma cell proliferation, metastasis, and stemness by activating the Hedgehog pathway through the regulation of miR-15a-5p/15b-5p and GLI2 expressions[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5):358.

[15] CHAVA S, REYNOLDS C P, PATHANIA A S, et al. miR-15a-5p, miR-15b-5p, and miR-16-5p inhibit tumor progression by directly targeting MYCN in neuroblastoma[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(1):180-196.

[16] WU H, TIAN X, ZHU C. Knockdown of lncRNA PVT1 inhibits prostate cancer progression in vitro and in vivo by the suppression of KIF23 through stimulating miR-15a-5p[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:283.

[17] JAIN P, BALLARE C, BLANCO E, et al. PHF19 mediated regulation of proliferation and invasiveness in prostate cancer cells[J]. *Elife*, 2020, 9:e51373.

[18] GHAMLOUCH H, BOYLE E M, BLANEY P, et al. Insights into high-risk multiple myeloma from an analysis of the role of PHF19 in cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):380.

(收稿日期:2023-07-12 修回日期:2023-12-28)