

血浆SHOX2/RASSF1A/PTGER4 基因甲基化检测对肺结节的 诊断价值

段维婷^{1*}, 张平^{2#}, 严桥路³

¹大理大学临床医学院, 云南 大理

²大理大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 云南 大理

³大理白族自治州人民医院呼吸与危重症医学科, 云南 大理

收稿日期: 2024年3月11日; 录用日期: 2024年4月4日; 发布日期: 2024年4月12日

摘要

【目的】探究血浆SHOX2/RASSF1A/PTGER4基因甲基化检测对肺结节性质判定及诊断的价值。**【方法】**抽取静脉血8~10 ml进行血浆分离, 分离后的血浆进行DNA的提取与制备, 其中包括裂解、结合、洗涤、亚硫酸盐转化、脱洗等步骤。进行PCR检测, 分别设置SHOX2、RASSF1A、PTGER4甲基化的阈值, 检测游离DNA中基因甲基化状态。采用首创的P值(阳性指数, Positive Index)计算公式法分析样本检测数据, 依据阳性判断值判定样本阳阴性。**【结果】**84例胸部CT提示肺结节的患者, 进行血浆游离DNA甲基化检测, 其中阳性和阴性分别有18例和66例, 阳性与阴性结果与患者的性别、吸烟、结节大小、多发与否无关; 与年龄、结节的密度及病理类型有关, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。通过金标准病理诊断肺癌有8例, 其中6例甲基化检测为阳性, 阳性率为75%; 恶性结节与良性结节的甲基化阳性指数数值分别为 2.00 ± 1.38 和 1.10 ± 0.92 , 差异有统计学意义($P < 0.05$)。SHOX2/RASSF1A/PTGER4基因甲基化诊断肺癌的曲线下面积(AUC)、灵敏度和特异度分别为0.754、75%和84.2%。SHOX2/RASSF1A/PTGER4甲基化与病理诊断评定结果存在一致性, $Kappa = 0.842$ 。**【结论】**SHOX2/RASSF1A/PTGER4基因甲基化检测可以成为肺结节性质早期判断的一种可靠且灵敏的新型生物学标志物, 为肺癌的早期诊治提供依据。

关键词

肺结节, SHOX2/RASSF1A/PTGER4, 甲基化, 血浆, 肺癌

*第一作者。

#通讯作者。

The Diagnosis Value of Plasma SHOX2/RASSF1A/PTGER4 Gene Methylation Detection in the Pulmonary Nodules

Weiting Duan^{1*}, Ping Zhang^{2#}, Qiaolu Yan³

¹Clinical Medical College of Dali University, Dali Yunnan

²Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Dali University, Dali Yunnan

³Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Dali Bai Autonomous Prefecture People's Hospital, Dali Yunnan

Received: Mar. 11th, 2024; accepted: Apr. 4th, 2024; published: Apr. 12th, 2024

Abstract

[Objective] To investigate the value of plasma SHOX2/RASSF1A/PTGER4 gene methylation detection in the identification and diagnosis of pulmonary nodules. [Method] Venous blood 8 - 10 ml was collected for plasma separation, and the separated plasma was used for DNA extraction and preparation, which included the steps of lysis, binding, washing, sulfite conversion, desorption and other steps. DNA methylation levels of SHOX2, RASSF1A and PTGER4 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. According to the set threshold, the analysis was performed using dedicated interpretation software. The original P value (Positive Index) calculation formula method was used to analyze the sample test data, and the positive and negative samples were determined according to the positive judgment value. [Result] In 84 patients with pulmonary nodules indicated by chest CT, plasma free DNA methylation of SHOX2/RASSF1A/PTGER4 gene was detected. A total of 84 patients with pulmonary nodules indicated by chest CT were selected for plasma SHOX2/RASSF1A/PTGER4 gene methylation detection, including 18 cases of positive result and 66 cases of negative result. The positive and negative results were not related to gender, smoking, nodule size, or multiple nodules. It was related to age, density of nodules and pathological type. There were 8 patients who were pathologically diagnosed as lung cancer, of which 6 were positive by SHOX2/RASSF1A/PTGER methylation test, and the positive rate was 75%. The methylation values of malignant and benign nodules were 2.00 ± 1.38 and 1.10 ± 0.92 , respectively. The area under the curve (AUC), sensitivity and specificity of plasma SHOX2/RASSF1A/PTGER4 gene methylation in diagnosis of lung cancer were 0.754, 75% and 84.2%, respectively. SHOX2/RASSF1A/PTGER methylation was consistent with pathological diagnosis, Kappa = 0.842. [Conclusion] Detection of SHOX2/RASSF1A/PTGER4 gene methylation in plasma may be the reliable and sensitive new biomarkers for preliminary determination of lung nodule properties, and provide a basis for the early diagnosis and treatment of lung cancer.

Keywords

Pulmonary Nodules, SHOX2/RASSF1A/PTGER4, Methylation, Blood Plasma, Lung Cancer

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺结节是影像学特征为直径 $\leq 3\text{cm}$ 的局灶性、类圆形、密度增高的实性或亚实性肺部阴影,可为孤立性或多发性,不伴肺不张、肺门淋巴结肿大和胸腔积液[1]。随着公众对健康的关注和医疗设备与技术的进步,胸部CT的广泛应用能够很灵敏地识别出肺结节。根据肺结节密度的不同被分两大类:即实性肺结节和亚实性肺结节(sub-solid nodule, SSN),其中,亚实性肺结节又可分为部分实性结节(part-solid nodule, PSN)和纯磨玻璃结节(pure ground-glass nodule, PGGN) [2] [3]。有研究指出,评估肺结节的良恶性首先需要结合患者的症状、体征、年龄、吸烟史、暴露史、家族史、相关肺部疾病和既往临床史[4],其次是进行影像学的检查和有效的随访,结节的大小、生长和倍增时间都是评估肺结节恶性程度的重要参考依据[5]。在我国,肺癌的发病率及死亡率居高不下,超过40%的患者在初诊时多被诊断为晚期恶性肿瘤[6]。同时晚期肺癌的治疗手段有限且疗效较差,从而导致其死亡率居高不下。早期的肺癌常表现为肺结节,现目前,组织病理学的诊断仍然是金标准[7]。这意味着必须通过侵入性检查或手术取活组织才可确诊,对于那些病理结果提示良性的患者,这往往会过度医疗,给患者带来一定的心理、身体乃至经济负担。因此,寻求一种无创、安全、方便、灵敏的方法尽早的评估肺结节的风险有着重大的意义。

近年来,随着DNA甲基化分析技术的发展,DNA甲基化检测可以作为肿瘤诊断生物标志物和早期肿瘤筛查的新技术[8] [9] [10]。启动子区甲基化是一种重要的转录调控因子,与肿瘤的发生发展有着密切的关系[11]。同源盒基因家族的成员矮小同源盒2基因(short stature homeobox 2, SHOX2),它是一种包含着60个氨基酸残基基序的蛋白质[12]。同源框蛋白被认为具有复杂的生物功能[13]。RASSF1A是一种新型肿瘤抑制基因,参与细胞周期调节、细胞生长和诱导细胞凋亡,从而抑制肿瘤的发生发展。当它启动子区域异常的高甲基化时,抑制肿瘤的功能就会失活,进而促进肺癌的发生[14] [15] [16]。前列腺素E受体4基因(prostaglandin E receptor 4 gene, PTGER4)为原癌基因。相关研究表明血浆中PTGER4甲基化与其他生物标志物一起联合使用,有助于判定肺结节的性质[17]。就肺癌而言,目前在肺癌患者的血浆中都能检测到上述三种基因甲基化,本研究将检测影像学提示有肺结节患者的血浆中游离的肿瘤SHOX2/RASSF1A/PTGER4甲基化的情况,明确该检测是否能辅助对肺结节性质的判断,以寻求一种无创的方法,为临床诊断以及后续的临床决策提供思路,最大程度的减少甚至避免重复筛查、侵入性检测、手术和过度治疗。

2. 材料与方法

2.1. 研究对象

选择2022年2月~2023年12月在大理大学第一附属医院诊治通过肺CT检测发现肺结节并行甲基化检测的患者。经过筛选,最终84例纳入研究。所有甲基化阳性的患者根据组织学和(或)病理结果进行最终的诊断。

2.2. 研究方法

2.2.1. 血浆分离与提取

离心装有8~10 ml全血的游离DNA采血管12 min,离心力1500 rcf,将得到的血浆转移至新的离心管中,吸取2 ml分离好的血浆12 min,离心力1500 rcf转移至提前做好标记的圆锥底的2.0 ml低吸附离心管(ependorf DNA LoBind Tube 2.0 ml)中。血浆样本可以在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 存放不超过3~5天,在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存不超过30天。

2.2.2. DNA 提取与制备

在分离好的血浆样本中加入 3 ml 裂解液 DL, 盖紧离心管盖, 用轮状混匀器上室温 15 rpm 旋转 20 分钟混匀, 加入 100 μ l 混匀后的磁珠进行充分的混匀。充分混匀后将 15 ml 离心管进行吸附 1 分钟, 丢弃上清液, 加入洗涤液 1 ml, 对磁珠进行反复的吹打, 后将磁珠转移至 1.5 ml 离心管中, 涡旋震荡 30 秒, 再次进行 30 秒的吸附, 小心吸弃所有液体, 短暂离心后重新吸附 30 秒, 在用 200 μ l 移液器尽量除去残余液体, 室温晾干 10 分钟。在晾干的磁珠中加入亚硫酸盐溶液 180 μ l、保护液 20 μ l, 将磁珠混匀。将离心管放置到浮漂上, 放入水浴锅中, 85 $^{\circ}$ C 恒温孵育 45 分钟。向转化后的磁珠反应液中加入 600 μ l 裂解液和 300 μ l 无水乙醇。将离心管置于轮状旋转混匀器中, 转速为 15 rpm 混匀 15 分钟。混匀结束后进行短暂的离心, 再次吸弃所有液体。在 1.5 ml 离心管中加入 1000 μ l 洗液 A, 涡旋混匀重悬磁珠 15~30 秒, 进行短暂离心后吸弃所有液体。加入 1000 μ l 洗液 B, 混匀后离心。将含有磁珠的洗液转移到新的离心管中, 将离心管置于磁力架 30 s, 小心吸弃所有液体。向离心管中加入洗液 B 1000 μ l, 进行混匀后短暂离心并小心吸弃所有液体。再次进行短暂离心, 用 10~200 μ l 移液器除去尽可能多的残余液体。揭开离心管管盖, 等待乙醇挥发, 期间不要震荡。将洗脱液 40~50 μ l 加入 1.5 ml 离心管后涡旋重悬磁珠。室温的条件下, 1000 \pm 10 rpm, 于恒温振荡器中震荡 10 分钟。震荡结束后, 用 10~100 μ l 移液器将洗脱液转移新的离心管中, 短暂离心。

2.2.3. PCR 检测

每个样本需要做 3 个 PCR 反应, 根据反应量按比例将相应体积的 PCR 反应液和引物混合液加入到离心管中制成 PCR 预反应液, PCR 预反应液混匀后短暂离心, 将管壁液滴离下来。在 8 联排 PCR 管的管孔中加入 PCR 预反应液 15 μ l。在 PCR 管对应的孔中加入 10 μ l 的 BisDNA。用管盖密封, 振荡混匀后 1000 \pm 100 rcf 离心 1 分钟, 使混合液全部流入管底并且无气泡出现。Applied Biosystems 7500 PCR 仪上机, 设置基线的起点为第 10 个循环, 终点为第 18 个循环, 分析运行结果。设置 SHOX2、阈值 15,000, PTGER4 阈值为 5000, RASSF1A 阈值 4000, ACTB 阈值 7000 (可视具体状况进行微调)。荧光定量 PCR 测试临床样本的 SHOX2、RASSF1A、PTGER4 基因甲基化, 使用数学统计方法分析荧光 PCR 数据, 再结合 ROC 曲线法及约登指数, 获得符合率最高的计算公式和阳性判断值。我们采用首创的 P 值(阳性指数(Positive Index)计算公式法分析样本检测数据, 依据阳性判断值判定样本阴阳性。此检测委托于昆明金域医学检验所有限公司, 该公司严格按照说明书操作。

2.3. 统计学方法

采用 SPSS23.0 进行数据分析。正态分布的连续性变量表示为平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$), 分类变量用频数表示, 前者组间差异使用 Student *t* 检验, 后者采用 χ^2 或 Fisher 精确检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 构建受试者工作特征曲线(ROC), 计算截断值以及 ROC 曲线下面积、灵敏度和特异度; 采用 Kappa 检验分析血浆甲基化检验与病理诊断的一致性。

3. 结果

3.1. SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化与临床特征的关系

SHOX2/RASSF1A/PTGER4 基因甲基化结果与患者的性别、吸烟、结节大小、多发与否无关($P > 0.05$)。与年龄有关, 年龄 ≥ 50 和 < 50 岁间差异有统计学意义($P < 0.05$)。 ≥ 50 岁阳性率为 32.7% (17/52)、 < 50 岁 3.1% (1/32)。不同密度结节间差异有统计学意义($P < 0.05$), 实性结节阳性率为 15% (9/60)、亚实行结节 37.5% (9/24)。与病理诊断有关, 不同病理类型的结节间差异有统计学意义($P < 0.05$), 恶性结节阳性率为 75% (6/8)、良性结节 15.8% (12/76)。见表 1。

Table 1. Relationship between SHOX2/RASSF1A/PTGER4 methylation and clinical features in 84 patients [n(%)]
表 1. 84 例患者 SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化与临床特征的关系(例(%))

项目	SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化		χ^2	P
	阳性	阴性		
性别			0.147	0.701
男	7 (9.3)	29 (34.5)		
女	11 (13.1)	37 (44.0)		
年龄			10.287	0.001
≥50	17 (20.2)	35 (41.7)		
<50	1 (1.2)	31 (36.9)		
吸烟			0.147	0.701
是	7 (9.3)	29 (34.5)		
否	11 (13.1)	37 (44.0)		
结节大小			4.655	0.098
≤4 mm	6 (4.6)	41 (31.5)		
4~8 mm	9 (6.9)	19 (14.6)		
≥8 mm	9 (6.9)	46 (35.3)		
密度			5.155	0.023
实性结节	9 (10.7)	51 (60.7)		
亚实行结节	9 (10.7)	15 (17.9)		
是否多发			0.21	0.647
是	9 (10.7)	37 (44.0)		
否	9 (10.7)	29 (46.4)		
病理诊断			11.76	0.001
恶性结节	6 (7.1)	2 (2.4)		
良性结节	12 (14.3)	64 (76.2)		

3.2. 良恶性结节中甲基化阳性指数数值、年龄指标比较

在良性结节与恶性结节中患者的年龄差异有统计学意义($P < 0.005$)。恶性结节中患者的年龄为 61.29 ± 4.86 ，良性结节中患者的年龄为 54.86 ± 12.75 ，说明在恶性结节患者的年龄大于良性结节患者。恶性结节阳性指数数值为 2.00 ± 1.38 ，良性结节阳性指数数值为 1.10 ± 0.92 ，恶性结节甲基化阳性指数数值大于良性结节甲基化阳性指数数值，两组甲基化阳性指数数值差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

Table 2. Comparison of methylation values between malignant and benign nodules [n, $\bar{X} \pm S$]

表 2. 恶性结节与良性结节甲基化数值比较[n, $\bar{X} \pm S$]

	恶性结节(n = 7)	良性结节(n = 77)	t/z	P
年龄	61.29 ± 4.86	54.86 ± 12.75	2.746	0.015
阳性指数数值	2.00 ± 1.38	1.10 ± 0.92	2.376	0.02

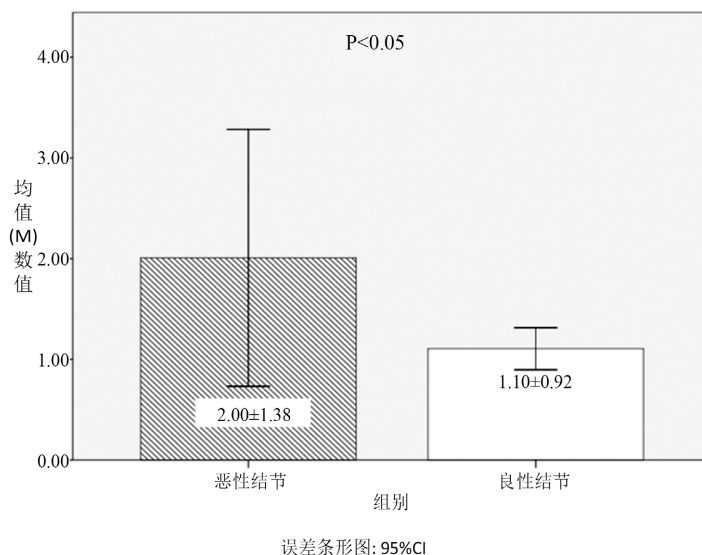


Figure 1. Comparison of methylation values between malignant and benign nodules

图 1. 恶性结节与良性结节甲基化数值比较

3.3. SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化诊断肺癌的 ROC 曲线

以 SHOX2/RASSF1A/PTGER4 基因甲基化阳性指数数值为检验变量, 以是否为肺癌为分类变量绘制 ROC 曲线, 结果显示甲基化阳性指数数值诊断为肺癌曲线下面积(AUC)为 0.754, 最佳截断值为 0.592 时, 灵敏度和特异度分别为 75% 和 84.2% ($Z = -0.994, P < 0.05$)。见图 2。

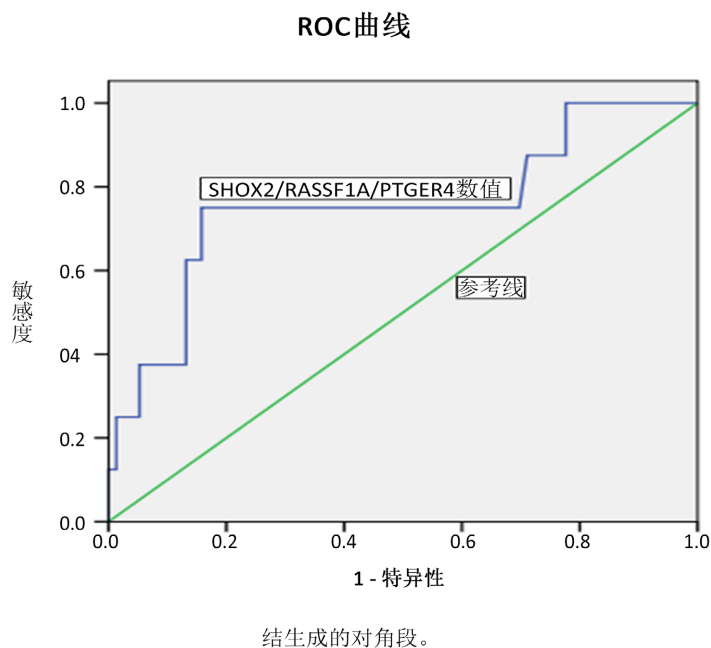


Figure 2. The ability of SHOX2/RASSF1A/PTGER4 methylation levels to predict lung cancer. The area under the curve (AUC) of the receiver operating curve (ROC) was 0.754

图 2. SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化水平预测肺癌的能力。受试者工作曲线(ROC)显示的曲线下面积(AUC) = 0.754

3.4. SHOX2/RASSF1A/PTGER4 基因甲基化与病理诊断的一致性分析

结果显示, $Kappa = 0.842$, $U = 7.236$, $P < 0.001$, 在 0.05 水平差异存在统计学意义, 表明 SHOX2/RASSF1A/PTGER 甲基化与病理诊断评定结果存在一致性。见表 3。

Table 3. Correlation between SHOX2/RASSF1A/PTGER methylation and pathological diagnosis
表 3. SHOX2/RASSF1A/PTGER 甲基化与病理诊断的一致性分析

甲基化	病理诊断		合计	<i>Kappa</i>	<i>U</i>	<i>P</i>
	肺癌	良性结节				
肺癌	6	0	6	0.842	7.236	0.000
良性结节	2	64	66			

4. 讨论

肺结节的发生发展受多种因素的影响, 包括患者的性别、年龄、职业暴露、吸烟、生活环境、慢性炎症等[18], 具有起病隐匿、缺乏症状、进展缓慢、早期影像学检查不突出的特点[19], 因此需要定期的 CT 随访及动态观察, 尽早的区分出惰性增长和快速增长的持续性肺结节。我们的数据显示年龄在 50 岁及以上的阳性率高且确诊为肺癌的患者年龄均值为 61.29 ± 4.86 , 因此根据调查, 建议常规行肺癌筛查的起始年龄为 50 岁[20]。DNA 甲基化被证实广泛的存在于几乎所有的癌症中, 高度的甲基化预示着细胞早期癌变的风险[6]。对与肺癌来说, 在血浆、支气管肺泡灌洗液、肺癌组织、胸腔积液甚至痰液中均能检测得到 DNA 甲基化。然而, 从易获取以及减少有创痛苦的角度来说, 使用简单方便的血浆作为样本对于大部分的患者最有吸引力也更易接受[21]。

磨玻璃结节或者部分实性结节恶性概率大于实性结节[22]。有共识指出, 大部分纯磨玻璃结节(pGGN)至少随访 7 年; 部分实性结节(PSN)至少随访 3 年[23]。部分患者在长期的随访动态观察的过程中容易产生焦虑恐慌的情绪, 同时也存在过度诊断和过度治疗的情况, 因此寻找一种可靠的肺结节诊断评估方法至关重要。我们的数据显示, 亚实性结节患者 SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化阳性率为 60% (9/15) 远远高于实性结节 15% (9/60)。此类结节需医患共同决策、制订随访时间、增加患者的参与度进行高效的管理, 加以重视、及时处理治疗, 尽早明确结节的良恶性, 对其改善预后和减少疾病负担都有意义。最终通过病理确诊肺癌的患者 SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化阳性率 75% (6/8) 高于良性肺结节 15.8% (12/76), 这表明检测 SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化对鉴别肺结节性质具有一定的提示作用。杨德平[24]等人单独检测了 SHOX2 和 PTGER4 甲基化诊断肺癌的灵敏度分别 74.1% 和 39.6%; 特异度分别为 70.0% 和 94.6%; 联合检验可以提高早期肺癌的检出率, 对肺癌的预后及整体的生存率较好。在我们的数据中也同样显示联合检测血浆 SHOX2/RASSF1A/PTGER 甲基化诊断肺癌的总体灵敏度为 75%, 特异度为 84.2%, 能够帮助临床医生早期明确高危结节的性质, 有望成为一种可靠的生物学指标。因此, 对于早期明确肺结节的性质来说, 联合检测比起单基因检测的诊断特异度有所提高。我们的研究存在局限性, 我们仅仅采集了血浆作为试验的标本, 是否存在其他的标本中也存在这种特异性, 有待我们的进一步的研究。

研究显示 DNA 甲基化检测的阳性率与不同的肺癌亚型和肺癌分期有一定的关系, 一般关系为小细胞肺癌 > 肺鳞癌 > 肺腺癌[25]。HONG CHEN1 [26]等人分析原发性肺癌组织中 RASSF1A 和 RASGRF2 基因甲基化状态与临床病理特征的关系, 得出 RASSF 1A 在 100% 的小细胞肺癌和 70% 的非小细胞肺癌中存在高甲基化。Christoph Kneip 等[27]人以血浆中 SHOX 2 DNA 甲基化检测不同肺癌亚型也同样得出了小细

胞肺癌和鳞状细胞癌检测的灵敏度要高于肺腺癌。然而朱玲[28]等人在对 PTGER4 基因甲基化水平分别诊断肺腺癌及鳞癌时发现, 诊断腺癌的灵敏度和特异度分别为 90.0%和 98.7%大于鳞癌 65.8%和 96.1%, 说明 PTGER4 甲基化水平诊断肺腺癌的效能优于肺鳞癌。然而在我们的试验中联合 SHOX2/RASSF1A/PTGER4 甲基化检测发现在 6 例通过病理诊断确诊为肺癌的患者中, 其中有 4 例为肺腺癌, 2 例为小细胞肺癌, 是否为不同的基因联合提高了腺癌的检出率, 我们将进一步加大标本收集数量对其继续研究。多位学者研究显示 DNA 甲基化随着肺癌的分期的增加, 甲基化阳性率及灵敏度随之也增加[27] [29] [30]。其原因可能与肿瘤的大小、肿瘤的生长方式、浸润程度、分化程度有关, 肿瘤细胞释放更多的基因从而在血浆中更易被检出。

5. 结论

综上, SHOX2/RASSF1A/PTGER4 基因甲基化联合检测具有较好的灵敏度和特异度, 可以作为现有诊断方法的补充, 作为一种可靠且灵敏的新型生物学标志物, 有助于对肺结节性质的早期判断, 可为下一步的临床决策和诊疗提供新思路, 为肺癌的早期诊治提供依据。

基金项目

云南省教育厅科学研究基金(2023Y0999)。

参考文献

- [1] 张晓菊.《肺结节诊治中国专家共识(2018 版)》解读[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(1): 1-3. <https://doi.org/10.13507/J.Issn.1674-3474.2019.01.001>
- [2] 许双燕, 冯涛, 曹宏伟, 等. 三维 CT 定量及定性参数与纯磨玻璃结节样肺腺癌 TOP2A、BASP1、FAM72 蛋白表达的相关性研究[J]. 放射学实践, 2022, 37(5): 543-549. <https://doi.org/10.13609/J.Cnki.1000-0313.2022.05.002>
- [3] Young, H.K., Mog, Y.S., Soo, K.L., et al. (2007) Persistent Pulmonary Nodular Ground-Glass Opacity at Thin-Section CT: Histopathologic Comparisons. *Radiology*, **245**, 267-275. <https://doi.org/10.1148/radiol.2451061682>
- [4] 宋勇, 姚艳雯. 肺部小结节的诊断和治疗近况[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2012, 5(4): 295-299.
- [5] Annemie, S., Pieter, R., Damien, D., et al. (2018) Evaluation of the Solitary Pulmonary Nodule: Size Matters, but Do Not Ignore the Power of Morphology. *Insights into Imaging*, **9**, 73-86. <https://doi.org/10.1007/s13244-017-0581-2>
- [6] Cho, J.H., Oezkan, F., Koenig, M., Otterson, G.A., Herman, J.G. and He, K. (2017) Epigenetic Therapeutics and Their Impact in Immunotherapy of Lung Cancer. *Current Pharmacology Reports*, **3**, 360-373. <https://doi.org/10.1007/s40495-017-0110-5>
- [7] Osarogiagbon, R.U., Veronesi, G., Fang, W., Ekman, S., Suda, K., Aerts, J.G. and Donington, J. (2019) Early-Stage NSCLC: Advances in Thoracic Oncology 2018. *Journal of Thoracic Oncology*, **14**, 968-978. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.02.029>
- [8] 杜孝敬, 马礼兵. 生物标志物用于鉴别诊断肺结节性质的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2022, 27(3): 449-453.
- [9] 任雪珠, 张树森, 蔡志刚, 等. RASSF1A 和 SHOX2 基因甲基化检测联合快速现场细胞学评价对肺癌的诊断价值[J]. 天津医药, 2022, 50(3): 319-323.
- [10] 马晓阳, 张爽, 江泽友. 非小细胞肺癌中 CDO1、RASSF1A 和 SHOX2 基因甲基化的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(10): 1175-1179. <https://doi.org/10.13315/J.Cnki.Cjcep.2020.10.009>
- [11] Walter, R.F.H., Rozynek, P., Casjens, S., Werner, R., Mairinger, F.D., Speel, E.J.M., Zur Hausen, A., Meier, S., Wohlschlaeger, J., Theegarten, D., Behrens, T., Schmid, K.W., Brüning, T. and Johnen, G. (2018) Methylation of L1RE1, RARB, and RASSF1 Function as Possible Biomarkers for the Differential Diagnosis of Lung Cancer. *PLOS ONE*, **13**, e0195716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195716>
- [12] 钟彤, 杨双强. SHOX2 基因甲基化与肺癌[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(7): 1331-1334.
- [13] 刘强, 王帅, 裴国田, 等. 矮小同源盒基因启动子区域甲基化诊断肺癌价值的 Meta 分析[J]. 中国肺癌杂志, 2021, 24(7): 490-496.
- [14] Vo, L.T., Thuan, T.B., Thu, D.M., Uyen, N.Q., Ha, N.T. and To, T.V. (2013) Methylation Profile of BRCA1,

- RASSF1A and ER in Vietnamese Women with Ovarian Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **14**, 7713-7718. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.12.7713>
- [15] Zhao, J., Cui, X., Huang, X., Lu, R., Chen, P. and Zhang, Z. (2019) Methylation of RUNX3 and RASSF1A and the Risk of Malignancy in Small Solitary Pulmonary Nodules. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **15**, 899-903. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_790_18
- [16] Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S. and Pfeifer, G.P. (2000) Epigenetic Inactivation of a RAS Association Domain Family Protein from the Lung Tumour Suppressor Locus 3p21.3. *Nature Genetics*, **25**, 315-319. <https://doi.org/10.1038/77083>
- [17] Schotten, L.M., Darwiche, K., Seweryn, M., Yildiz, V., Kneuert, P.J., Eberhardt, W.E.E., Eisenmann, S., Welter, S., Sisson, B.E., Pietrzak, M., Wiesweg, M., Ploenes, T., Hager, T., He, K., Freitag, L., Aigner, C., Taube, C. and Oezkan, F. (2021) DNA Methylation of PTGER4 in Peripheral Blood Plasma Helps to Distinguish between Lung Cancer, Benign Pulmonary Nodules and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *European Journal of Cancer*, **147**, 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.01.032>
- [18] 郭婧瑶, 骆莹滨, 吴建春, 等. 肺磨玻璃结节患者血清炎症因子及髓源性抑制细胞的表达水平及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2022, 49(13): 693-698.
- [19] 周淼, 闫五玲, 赵栋梁, 等. SHOX2 和 RASSF1A 基因组合甲基化检测参与诊断的肺结节 1 例假阴性分析[J]. 中国当代医药, 2021, 28(2): 201-204.
- [20] 李星月, 殷一行, 袁璐, 等. 肺癌筛查及肺结节随访管理的循证证据总结[J]. 现代预防医学, 2023, 50(20): 3734-3741. <https://doi.org/10.20043/J.Cnki.MPM.202303390>
- [21] Weiss, G., Schlegel, A., Kottwitz, D., et al. (2017) Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA Methylation Marker Panel for Plasma-Based Discrimination between Patients with Malignant and Nonmalignant Lung Disease. *Journal of Thoracic Oncology*, **12**, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.08.123>
- [22] Chung, K., Jacobs, C., Scholten, E.T., et al. (2017) Lung-RADS Category 3/4X: Does It Improve Prediction of Malignancy in Subsolid Nodules. *Radiology*, **284**, 264-271. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017161624>
- [23] 中国医药教育协会肺癌医学教育委员会. 肺结节多学科微创诊疗中国专家共识[J/OL]. <http://gfffb8353bb55a248bbhupkw0qpckv066x5q.fffg.dali.cwkeji.cn/kcms/detail/51.1492.r.20230705.1321.030.html>, 2024-01-03.
- [24] 杨德平, 张萍, 金慧敏, 等. SHOX2、PTGER4 基因甲基化和 SCC 联合检测在肺癌诊断中的应用[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(8): 1101-1104.
- [25] Bernd, S., Volker, L., Dimo, D., et al. (2010) SHOX2 DNA Methylation Is a Biomarker for the Diagnosis of Lung Cancer Based on Bronchial Aspirates. *BMC Cancer*, **10**, Article No. 600. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-600>
- [26] Hong, C., Makoto, S., Yohko, N., et al. (2006) Aberrant Methylation of RASGRF2 and RASSF1A in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology Reports*, **15**, 1281-1285.
- [27] Kneip, C., Schmidt, B., Seegebarth, A., et al. (2011) SHOX2 DNA Methylation Is a Biomarker for the Diagnosis of Lung Cancer in Plasma. *Journal of Thoracic Oncology*, **6**, 1632-1638. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318220ef9a>
- [28] 朱玲, 任德旺, 马润阳, 等. 良恶性肺疾病组织前列腺素 E 受体 4 基因甲基化水平变化及其诊断价值研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2023, 30(5): 748-752+757.
- [29] Xu, Z., Wang, Y., Wang, L., Xiong, J., Wang, H., Cui, F. and Peng, H. (2020) The Performance of the SHOX2/PTGER4 Methylation Assay Is Influenced by Cancer Stage, Age, Type and Differentiation. *Biomarkers in Medicine*, **14**, 341-351. <https://doi.org/10.2217/bmm-2019-0325>
- [30] 初霞, 王保健, 赵伟, 等. 血浆 SHOX2 和 PTGER4 基因甲基化在肺癌筛查中的意义[J]. 中华保健医学杂志, 2021, 23(5): 488-491.