

·综述·

循环肿瘤 DNA 甲基化状态在胃癌筛查和诊治中的研究进展

曹钦兴 严力 侯能易 陈锦锋 余松 陆河江 旦真甲 庞明辉

四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学附属医院)老年综合外科,成都 610072

通信作者:庞明辉,Email:mhpang@uestc.edu.cn

【摘要】 循环肿瘤 DNA 是由肿瘤或循环肿瘤细胞释放的游离 DNA,含有大量的肿瘤特征信息,这些特征可作为癌症早筛、监测、预后及预测治疗反应的生物标记物。目前还没有优质的筛查、监测及预测方法的胃癌领域极具吸引力。胃癌具有极大的肿瘤异质性,不同的胃癌亚组遗传特征和表现遗传特征差异性大,甲基化循环肿瘤 DNA 的敏感性和特异性高,有助于明确肿瘤基因分型,便于制定精确的诊治策略。此外,大量研究也证实了甲基化 DNA 在预测治疗反应、辅助治疗及耐药性评估上具有独特优势,在未来可以用于增强化疗方案的疗效和改善患者的化疗反应,甚至治疗多药耐药等。但甲基化循环肿瘤 DNA 也面临着诸多问题,如在单靶点的敏感性和特异性不高,部分胃癌亚型与循环肿瘤 DNA 关联有限、有脱靶风险、大样本及高质量临床研究证据缺乏等不足。本综述主要总结了目前对胃癌循环肿瘤 DNA 甲基化状态的研究,并将这些发现与胃癌早筛、复发监测和潜在的治疗机会联系起来,随着技术的进步和医工交叉研究的深入,循环肿瘤 DNA 检测将揭示更多疾病信息,成为胃癌领域和精准医学治疗的重要基础。

【关键词】 胃肿瘤; DNA 甲基化; 循环肿瘤 DNA; 生物标志物; 早期筛查

基金项目:四川省科技厅重点研发项目(2022YFS0220);电子科技大学医工交叉联合基金(ZYGX2021YGLH212)

Progress of circulating tumor DNA methylation for gastric cancer screening and management

Cao Qinxing, Yan Li, Hou Nengyi, Chen Jinfeng, Yu Song, Lu Hejiang, Dan Zhenjia, Pang Minghui

Department of Geriatric General Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072, China

Corresponding author: Pang Minghui, Email: mhpang@uestc.edu.cn

【Abstract】 Circulating tumor DNA (ctDNA) is cell-free DNA released by tumors or circulating tumor cells, containing abundant tumor-specific information that can serve as biomarkers for cancer early screening, monitoring, prognosis, and prediction of treatment response. This is particularly attractive in the field of gastric cancer, where high-quality screening, monitoring, and prediction methods are currently lacking. Gastric cancer exhibits significant tumor heterogeneity, with large differences in genetic and epigenetic characteristics among different subgroups. Methylated ctDNA has high sensitivity and specificity, which can help clarify tumor genotyping and facilitate the formulation of precise diagnostic and therapeutic strategies. Furthermore, numerous studies have confirmed the unique advantages of methylated DNA in predicting treatment response, adjuvant therapy, and drug resistance assessment, which may be used in the future to enhance the efficacy of chemotherapy regimens and improve patient

DOI: 10.3760/cma.j.cn441530-20230710-00001

收稿日期 2023-07-10 本文编辑 朱雯洁

引用本文:曹钦兴,严力,侯能易,等.循环肿瘤 DNA 甲基化状态在胃癌筛查和诊治中的研究进展[J].中华胃肠外科杂志,2024,27(5):535-544. DOI: 10.3760/cma.j.cn441530-20230710-00001.



chemotherapeutic response, and even treat multidrug resistance. However, there are several challenges associated with methylated ctDNA, such as low sensitivity and specificity at single-target sites, limited association between some gastric cancer subtypes and ctDNA, off-target risks, and the lack of large-scale and high-quality clinical research evidence. This review mainly summarizes current research on the methylation status of ctDNA in gastric cancer and connects these findings to early screening, recurrence monitoring, and potential treatment opportunities for gastric cancer. With advances in technology and the deepening of interdisciplinary research, ctDNA detection will reveal more disease information and become an essential foundation for gastric cancer research and precision medicine treatment.

【Key words】 Stomach neoplasms; DNA methylation; Circulating tumor DNA; Biomarkers; Early detection

Fund programs: Key R&D project of Science and Technology Department of Sichuan Province (2022YFS0220); Medical Engineering Cross Project of UESTC (ZYGX2021YGLH212)

胃癌的发生发展,涉及多种遗传机制和表观遗传的改变。在表观遗传改变中,异常的甲基化状态在胃癌发生中起着重要作用,表现为部分基因区域的高度甲基化或全基因组整体去甲基化^[1-8]。在细胞凋亡或坏死过程中,会释放部分核酸片段进入血液中,即循环游离 DNA (circulating free DNA, cfDNA),其中一部分来自肿瘤的含有肿瘤特异性分子特征的 cfDNA,称为循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)^[9]。ctDNA 的许多固有特征可被开发为早期癌症筛查、监测复发及预测治疗反应的生物标志物,如 DNA 甲基化状态和组蛋白甲基化模式等^[10]。目前研究显示,DNA 的甲基化状态在处于癌前病变时就已经改变,可用于胃癌的非侵入性早期筛查和诊断,而且其甲基化状态的改变在监测患者术后复发及预测患者的预后等方面具有显著优势^[11-14]。此外,很多研究也发现,异常的基因甲基化修饰与复发转移和治疗反应相关^[15-17]。因此,ctDNA 的甲基化状态可用于肿瘤的早期诊断,监测治疗过程中肿瘤的进展及复发情况,也可以帮助指导肿瘤的特异性治疗。

对于需要辅助治疗的患者来说,耐药性是不可避免的沉重话题。研究发现 DNA 甲基化与胃癌化疗耐药性相关,但令人备受鼓舞的是,DNA 的甲基化是一个可逆的过程^[18]。因此,恢复异常的表观遗传变化可能是克服化学耐药性的一个有前途的策略。

早期胃癌的临床症状隐匿,影像学检查对早期胃癌的诊断敏感性较差,给早期诊断带来了一定困难。得益于表观遗传机制研究上的进展,目前国内外针对 ctDNA 甲基化状态的研究发展迅速,大量的研究证实,异常的 DNA 甲基化状态在胃癌发生中扮演着重要作用,及其在早期筛查、复发转移监测、评估治疗反应和治疗耐药患者方面的高潜力。本综述的目的是总结目前 ctDNA 甲基化状态作为胃癌生物标志物的研究进展,并评估其在胃癌早期诊断、复发监测和预测治疗反应的临床潜力。

一、影响胃癌中 ctDNA 甲基化状态的因素

1. 外部影响因素:胃癌关键驱动基因的 DNA 甲基化情况可能与组织学分类、病理分化、肿瘤转移、肿瘤位置和预

后有关^[19-22]。例如,*CDH1* 启动子高甲基化在低分化胃癌中出现更为频繁^[19];而 *RUNX3* 则多与肠型胃癌及不良预后相关^[23]。此外,环境因素如感染性病原体、慢性炎症反应、饮食、体育活动、年龄和吸烟等都与胃癌相关基因的甲基化状态变化有关^[24-26]。另外,胃癌的特异性甲基化状态呈现出显著与年龄相关联的甲基化模式^[21];这可能与老年人的癌症易感性有关^[27-29]。

在这些外部影响因素中,由幽门螺杆菌引起的慢性炎症反应可能是导致胃癌甲基化状态改变的主要因素^[30-32]。见图 1A。根除幽门螺杆菌后,癌症相关基因 *CDH1*、*MGMT* 的甲基化状态完全或部分逆转,但其 DNA 甲基化水平不会恢复到未感染状态,可能会导致永久的基因印迹^[33-36]。与幽门螺杆菌导致慢性炎症反应而逐步发生 DNA 甲基化不同,EB 病毒 (*Epstein-Barr virus*, EBV) 似乎没有通过炎症反应这一中间环节,其 DNA 高甲基化状态被认为是由病原体直接感染引起,这可能与病毒对宿主 *DNMT1* 和 *TET2* 表达的调控有关^[37-39]。见图 1B。此外研究发现,EBV 与胃癌的发病机制和肿瘤维持密切相关,EBV 阳性胃癌病例的抑癌基因的甲基化水平更高^[40-41]。值得关注的是,在 EBV 和 MSI 阴性的胃癌中,出现了 CpG 岛甲基化 (CpG island methylator phenotype, CIMP)^[42-43]。但在胃癌中 CIMP 发生的确切机制尚不清楚,在一些研究中 CIMP 阳性的胃癌患者能获得更久的生存期,值得进一步研究其机制^[44]。

2. 内在影响因素:细胞的表观遗传机制经常涉及数百种具有活性的蛋白质,体细胞突变和表观遗传基因组调控因子的表达改变,将引起表观遗传机制的改变,促进胃癌发生发展^[45-49]。但是,目前对体细胞突变和表观基因组调控因子影响表观遗传机制的研究还不够深入,相关机制尚不清晰。*ARID1A* 是胃癌驱动基因中最常见的突变之一,通常在 EBV 和 MSI 亚型中富集,但其对胃癌整体的 DNA 甲基化状态或染色质的影响尚未明确。在胃癌中也有关于表观遗传酶转录变化的报道,主要是 *EZH2*、*DNMT1*、组蛋白甲基转移酶 *SETDB2* 和 DNA 去甲基化酶 *TET1* 的表达缺失,但目前对表观遗传酶的研究还较为局限,需要进一步深入研究^[50-53]。

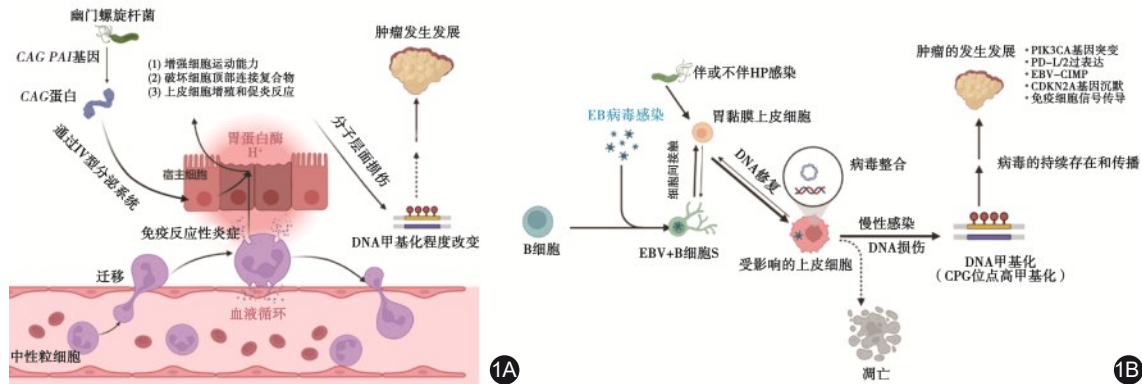


图1 胃癌DNA甲基化的发生影响因素示意图(曹钦兴总结绘制) 1A.幽门螺杆菌相关胃癌发生相关的多种因素;1B.EB病毒相关胃癌的发生机制

二、ctDNA在早期诊断、预后监测及治疗反应中的研究进展

(一)ctDNA甲基化与胃癌早期诊断的关系

早诊早治是提升胃癌患者的生存率及提高患者的生活质量的重要举措^[54-56]。理想的早期检测,是在疾病的最早期就能识别随后可能发生的癌前病变或癌症,以期在此时间点进行干预,从而提高存活率或降低发病率^[10]。DNA甲基化是在肿瘤形成早期发生的,并且可以在胃癌的早期诊断和治疗方面提供前瞻性的信息,因此DNA甲基化在胃癌早期诊断中扮演着重要的角色。胃癌在多种基因中表现出甲基化差异,目前研究发现,DNA甲基化状态的异常不仅是晚期恶性肿瘤的特征,而且是胃癌发病机制中的早期事件和驱动力之一^[57-59]。除胃肿瘤本身外,研究还发现癌前病变组织、肠化生组织及癌旁组织的胃黏膜中的癌相关基因出现了DNA甲基化状态的变化^[60-62]。此外,有学者发现,在动物模型中抑制DNA甲基化的发生可以降低胃癌的发生率^[30]。而在幽门螺杆菌阳性的胃癌中,慢性炎症反应引起的表观遗传变化被认为是随着时间的推移而累积的,这种逐步累积的方式,增加了癌症发生的风险^[63]。根据甲基化可在早期胃癌中稳定出现,并随病情发展逐步累积,我们可将特定的DNA甲基化位点作为有价值的风险预测因子,应用于胃癌的早期诊断。

在早期病变中,DNA甲基化改变比基因突变要频繁得多,因而它们作为诊断癌症的生物标记物具有更大的潜力^[64]。有学者研究发现,在晚期息肉和早期胃癌患者中,循环肿瘤细胞来源的DNA突变在其中的丰度都较低,这可能提示,在血浆中这些基因突变的频率非常低,或者释放入血突变DNA的数量低于检测下限^[64-65]。而有其他学者研究发现,息肉和早期胃癌的ctDNA甲基化状态的改变相较于DNA突变更常见,这可能是由于息肉和早期胃癌进行表观遗传畸变的频率较高和(或)释放入血的甲基化DNA较多。因此,尽管目前在开发的各种检测工具和富集技术多专注于突破DNA突变的检测下限,但我们认为,甲基化的DNA检测可能在进行胃癌的早期筛查中更具优势^[65-69]。

(二)ctDNA甲基化在胃癌筛查中的应用

目前诊断胃癌的金标准是组织活检的病理结果,但通过内镜活检面临诸多挑战,难以对大规模的无症状者进行内镜检查。此外,常规的血清学标志物(如CA72-4、CA19-9和CEA)和粪便潜血检测也面临着敏感性和特异性不足、受大量体内外因素的影响等问题^[70-71]。这些标志物与肿瘤分期和患者生存率显著相关,但对早期癌症的筛查作用有限,即使有研究使用多种血清学标志物联合检测,其敏感性也差强人意。因此,迫切需要寻找简便易行、敏感高效的检测手段。

用液体活检进行癌症早期筛查极具吸引力,最初的方法是检测血浆cfDNA中的驱动基因突变,但这种方法可能会受到未患癌症个体中意义不明的克隆性造血(clonal haematopoiesis of indeterminate potential, CHIP)相关突变的影响。而随着技术的发展,分析健康个体和胃癌患者cfDNA之间甲基化基因模式的差异,开发出可应用于临床的产品成为现实。*SEPT9*是首个被批准用于诊断结肠癌的肿瘤生物标志物,在临床上使用已超过10年^[72]。研究发现,在胃癌患者血液*SEPT9*基因甲基化程度显著升高,提示可通过检测血清中*SEPT9*的甲基化位点,对胃癌进行早期筛查^[73]。2012年,Cheung等^[74]的研究发现,*RNF180*在胃癌中表现出高度甲基化,*RNF180*是一种肿瘤抑制因子,在原发性胃癌中显著下调,其基因表达缺失与启动子区域甲基化有关,具有用于胃癌筛查的潜力。2013年,Lee等^[75]首次对153例胃癌患者的血液样本进行前瞻性验证研究,发现*SEPT9*甲基化检测的敏感性为17.7%,特异性为90.6%,肯定了通过检测血液*SEPT9*的甲基化位点进行胃癌早筛的价值,但其敏感性尚不足以用于临床。2017年,Song等^[75]使用Epi proColon 2.0商用甲基化试剂盒检测胃癌患者的外周血标本,其敏感性较上一代显著提升,但较常规方法优势不明显。近期的一项研究将甲基化标志物*SEPT9*与蛋白质标志物组合进行胃癌筛查发现,单独使用*SEPT9*时敏感性为42.6%,联合使用蛋白质标志物CEA时为可达86.4%,诊断性能显著提高^[76]。Xu等^[77]将甲基化标志物*SEPT9*和

RNF180 进行组合研究,发现其可检测到 60.3% 的胃癌,且与蛋白标志物 CA72-4 联合检测,可进一步提高其诊断性能。由此可见,联合多种多类标志物进行多靶点检测可能是胃癌早期筛查的有力策略之一。

(三) 脱落细胞 DNA 甲基化在胃癌筛查中的作用

粪便是胃肠道筛查测试中最常见的分析物之一。自从 Sidransky 等^[78]在结直肠癌患者的粪便标本中发现 *KRAS* 突变以来,期望用粪便检测实现早癌筛查的研究开展得如火如荼。然而,通过脱落细胞 DNA 早期检测胃癌仍有许多挑战需要克服,胃属于上消化道器官,大量胃酸以及冗长的胃肠道会对胃的脱落细胞 DNA 产生损伤,有研究表示使用粪便中的 DNA 检测胃癌可能是无效的^[79]。

近期有研究发现,可以从粪便中检测到胃癌患者的脱落细胞 DNA 的甲基化状态,根据 4 个靶点的甲基化状态开发了一款名为“Colocaller”的诊断工具,有作为胃癌的辅助诊断工具的潜力^[80]。此外有学者观察到胃癌患者粪便中 *TERT*^[81]、*RASSF2* 和 *SFRP2*^[82] 的启动子区域呈现高甲基化特征。这也给我们为探索脱落细胞 DNA 诊断胃癌提供了一个参考方法,即是否存在一种或几种“泛癌”标志物能同时对胃癌及结直肠癌均有较高的筛查作用。在未来,如果基于粪便的甲基化检测具备高敏感性和特异性,并且保留了类似粪便隐血试验的简单无创特点,它将有助于推广和改善胃癌筛查,进一步提高早期胃癌的检出率。

(四) ctDNA 甲基化在胃癌复发监测转移评估及治疗中的应用

1. ctDNA 甲基化在胃癌复发转移评估上的应用:对于淋巴结阳性的胃癌患者,即使接受根治手术+术后标准化疗方案辅助治疗,其复发率仍可高达 88%,5 年总生存率仅为 20% 左右^[83-84]。目前用于胃癌复发监测的手段缺乏,常用的 CEA 和 CA19-9 等只能监测到约 40% 的肿瘤复发^[85-86]。对胃癌的关键研究表明,ctDNA 检测可以在术后识别出微小残余病灶(minimal residual disease, MRD)患者,评估患者术后复发风险^[87-88]。ctDNA 的半衰期较短,若术后可持续在血液中检测到 ctDNA,则提示血液循环中可能存在肿瘤细胞或微转移灶^[89]。因此,术后 ctDNA 的存在,理论上表明可能存在 MRD。有研究发现,术后 ctDNA 的甲基化状态是 MRD 的独立预测因子,甲基化阳性的患者提示存在 MRD 和复发风险增加^[88]。另一项研究发现,*CHFR*、*RUNX3*、*MGMT* 和 *hMLH1* 在原发性胃癌中高频率甲基化,且这些甲基化基因可辅助预测在区域淋巴结中的隐匿性肿瘤细胞^[90]。机器学习也在利用多靶点甲基化分析预测胃癌淋巴结转移风险上有较高的准确性^[91]。2012 年 Chen 等^[22]检测了 *ALX2*、*TMEFF10*、*CHCHD3*、*IGFBP1* 和 *NPR0* 的甲基化状态发现,CpG 岛甲基化程度越高的胃癌,往往表现为分站更远的淋巴结转移,分化更差的病理分类,更高的病理分期,是胃癌独立的预后因素。这给我们在未来进行早期淋巴结转移预测提供了新的方法和途径,但是目前尚缺乏更多甲基化基因与早期区域淋巴结转移关系的高质量研究。有趣的是,

Wu 等^[91]发现,肿瘤组织中 *MINT2* 甲基化水平与术前腹膜灌洗液(preoperative peritoneal lavage fluid, PPLF)和血液标本中的甲基化水平非常接近,提示 PPLF/血液中异常的 *MINT2* 甲基化可能预示胃癌患者腹膜微转移的存在。可以想象,若术前 *MINT2* 甲基化阳性,将可能指导我们采取如 HIPEC 治疗在内多种治疗方式,以减少术后复发转移可能^[92]。

但日本学者在 2020 年进行的研究发现,术后 *LINE-1* 的甲基化程度可能并不反映 MRD,而术后高浓度的长片段 *LINE-1* 可能提示 MRD 和高复发风险^[14]。考虑到这项研究发现由于大量 cfDNA 来自正常细胞,因此, *LINE-1* cfDNA 的低甲基化水平表明可能存在大量循环的高甲基化癌细胞,这些癌细胞可能具有很高的生长或转移潜能,且纳入的胃癌患者较少,能否反映甲基化程度与 MRD 的关系尚存疑。

总的来说,虽然现有的少量研究中,关于胃癌 ctDNA 甲基化状态与 MRD 的关系尚存在争议。但现有的研究已经提示,ctDNA 甲基化状态是 MRD 的一个有效的预测因子,能在术后提示是否存在影像学检查无效的微小残余病灶,预测可能的早期淋巴结转移、腹膜微转移,评估患者的复发风险,指导后续的辅助治疗等。若在辅助治疗前通过检测 ctDNA 甲基化状态识别出 MRD 患者,可以指导我们更好地识别高危患者进行强化治疗,而在常规辅助治疗后识别出 MRD 患者,则提示我们可能需要进一步进行个体化治疗,如加用免疫治疗、靶向治疗和个体化抗原疫苗等,甚至最终以 ctDNA 甲基化状态清除作为治疗终点^[93]。见图 2。

2. ctDNA 在预测治疗反应、辅助治疗方案及耐药性评估上的应用:对于根治性切除术后肿瘤患者,目前仍无满意的预测手段来评估患者是否能够从后续的辅助化疗中获益。目前使用的化疗药物对晚期胃癌的疗效有限,且不能明确患者对辅助治疗的反应。目前公认胃癌分子标记,如 *HER2*、*MMR/MSI*、*TMB-H*、*Claudin18.2*^[94] 和 *FGFR2b*^[95] 等,在指导患者的辅助治疗上有一定临床价值,但对预测治疗性生物标记物的需求尚未满足。

此外,化疗耐药性主要也与 DNA 甲基化有关,纠正异常甲基化模式可以改善化疗反应^[18]。胃癌细胞 DNA 甲基化与化疗敏感性及 5-FU、顺铂等抗癌药物耐药密切相关,高甲基化的 *TFAP2E*、*TMS1*、*PYCARD* 和 *DAPK* 可能与 5-FU 的耐药相关联,而高甲基化的 *CDKN2A* 和 *DCTPP1* 则可能提示对 5-FU 敏感,另外高甲基化的 *BMP4* 和 *GSTP1* 可能与铂类敏感有关,而低甲基化的 *ADGRL2* 和 *GTSE1* 可能与胃癌对顺铂类药物不敏感有关^[15, 96-99]。此外也有研究发现, *CDO1* 启动子区域高甲基化的患者,术后化疗患者的生存期明显优于术后不化疗患者,提示其可能是预测化疗反应的潜在标志物^[100]。而有学者发现,虽然 *MAGE-A1* 基因的甲基化改变可能与化疗反应之间没有相关性,但其表达可预测晚期和复发性胃癌对多西他赛和紫杉醇的耐药性,另一项类似研究发现, *MAGE-A3* 也有具有预测多西他赛和紫杉

醇的耐药性作用^[101-102]。有趣的是,有一项研究发现,未甲基化的 *SOX17* 和 *RASSF1A* 基因启动子与化疗反应良好相关,而甲基化后则与化疗反应不良相关^[103]。这提示我们,或许可以通过改变 DNA 的甲基化状态来抑制胃癌的发生。

动物研究表明,抑制 DNA 的异常甲基化可以抑制胃癌的发生^[104]。因此,有关 DNA 甲基转移酶抑制剂(DNA methyltransferase inhibitors, DNMTi)的药物研究正在积极开展。越来越多的证据表明, DNMTi 和传统化疗联合使用可以恢复异常的表现遗传变化,从而实现化学增敏和改善耐药性。例如,地西他滨和 5-FU 联合用药使 *TFAP2E* 在胃癌患者中通过去甲基化,实现增敏反应性表达^[105]。此外,美国的研究人员研究了阿扎胞苷作为去甲基化试剂用于晚期胃癌的预处理的一项 I 期临床试验。他们在胃癌患者使用 EOX 方案(表柔比星、奥沙利铂、卡培他滨)新辅助化疗前使用 5-阿扎胞苷,结果显示,肿瘤相关基因位点如 *HPP1*、*TIMP3*、*CDKN2A*、*ESR1* 和 *MGMT* 出现低甲基化,而且初步证据表明新辅助 VEOX 方案耐受性良好,化疗前用 5-阿扎胞苷可能会增强化疗疗效^[106]。当然还需要更多的高质量随机研究和联合更多新辅助方案,来进一步确定这种联合化疗的疗效是否优于单独化疗。

到目前为止,关于胃癌的辅助放疗还存在诸多争议,尚不明确哪些患者可以从辅助放疗中受益。有研究表明,某些癌症相关基因的高甲基化和失活可能导致胃癌细胞的放疗抵抗,因此有可能通过特定基因的 DNA 甲基化状态来预测辅助放疗的效果。2020 年,中国研究团队提出了 DNA 修复基因的启动子甲基化负担模型(RPMB 模型)来预测辅助放疗效果,高 RPMB 组无病生存期表现出更好临床结局,尤其是因>T2 肿瘤和阳性淋巴结而接受辅助放疗的高 RPMB 患者^[107]。此外,有研究发现,部分 DNMTi 能增强胃癌细胞的放射敏感性,可用作治疗某些类型胃癌的辐射敏化剂^[108]。DNMTis 与化疗药物及放射治疗具有协同作用,可用作化疗、放疗增敏剂。因此,以 DNA 甲基化为靶点的 DNMTis 在未来或许可用于治疗胃癌多药耐药和改善。胃癌中甲基化状态对放化疗影响的研究汇总见表 1。

药物表观遗传学是一个专注于关键表观遗传靶点的新

治疗领域,期望早期阻断或逆转异常的表现遗传修饰,从而治疗疾病^[112]。以 DNMTi 为靶点的相关药物越来越多,如新型 DNMT 抑制剂 Zebularine,但目前正在临床和临床前试验中积极探索^[113]。与 DNMTi 相比,组蛋白甲基化药物也是一个可能的靶向治疗方向,但目前尚处于非常早期的状态。此外,有研究表明 CRISPR-Cas9 系统是一种很有前景的 DNA 甲基化靶向治疗策略^[114-115]。因此,定向甲基化编辑可能比 DNMTis 更具潜力,更加符合精准医疗的理念。

以免疫检查点阻断(PD-1/L1)为代表的免疫疗法,在少数胃癌患者中显示出惊人的临床疗效。令人沮丧的是,大多数患者的临床获益很少,而有些具有疗效的患者最终也会获得耐药性。大量研究表明,肿瘤微环境在肿瘤进展中也起着至关重要的作用,癌细胞通过与其他肿瘤微环境成分直接或间接地相互作用,引起多种生物学行为改变,某些基因的甲基化状态在肿瘤微环境中起到重要作用。例如,通过改变 *GABRA3* 的甲基化状态有望调节胃癌的 PD-L1 表达和肿瘤免疫原性^[116]。此外,有研究发现,PD-L2 甲基化与肿瘤微环境密切相关,能预测抗 PD-1 免疫治疗的反应^[117]。另外也有研究发现,某些 DNA 甲基化相关的调节因子的表达与胃癌肿瘤免疫微环境表型密切相关,其通过构建 DNA 甲基化评分(DNA methylation score, DMS)评估胃癌患者的甲基化修饰情况,发现高 DMS 与增强免疫治疗的疗效有关^[118]。因此,通过综合分析肿瘤微环境的异质性和复杂性,有可能识别出不同的肿瘤免疫表型,提高对免疫治疗反应的指导和预测能力、评估患者对治疗耐药可能性和开发新的治疗靶点。见表 2 和图 2。

三、胃癌患者 ctDNA 生物标志物面临的挑战与展望

表观遗传调控已被证实发生在胃癌的发生发展中起到重要作用,其中 DNA 甲基化修饰作为一个重要亚群,已被证实发生在癌症的发生发展中起到关键作用。此外甲基化酶作为胃癌的潜在靶点也已经引起了广泛的关注。目前甲基化标志物研究面临的重大挑战可能是发现和验证早期癌症标志物。例如,在早期病变和局部复发时,释放入血的 ctDNA 的量通常都极小,甚至会低于现有技术的检测下限,同时还受

表 1 胃癌中甲基化状态对放化疗的影响总结

治疗方式	临床问题	甲基化基因	基因状态	参考文献
化学治疗	氟尿嘧啶耐药	<i>TFAP2E</i> 、 <i>TMS1</i> 、 <i>PYCARD</i> 、 <i>DAPK</i> 、 <i>CPT1C</i> 、 <i>NOTCH3</i> 、 <i>FSCN1</i>	高甲基化	[15]、[96]、[97]、[98]、[99]、[105]、[109]
	氟尿嘧啶敏感	<i>ADGRL2</i> 和 <i>GTSE1</i>	高甲基化	[96]、[110]
	铂类敏感	<i>BMP4</i> 、 <i>GSTP1</i>	高甲基化	[96]、[98]
	铂类耐药	<i>CDKN2A</i> 和 <i>DCTPP1</i>	去甲基化	[98]、[106]
	紫杉醇类药物耐药性	<i>MAGE-A1</i> 、 <i>MAGE-A3</i> 、 <i>CHFR</i>	去甲基化	[101]、[102]、[111]
	改善耐药,化学增敏	<i>HPPI</i> 、 <i>TIMP3</i> 、 <i>CDKN2A</i> 、 <i>ESR1</i> 、 <i>MGMT</i> 、 <i>TFAP2E</i>	去甲基化	[105]
	预测化疗反应	<i>CDO1</i>	高甲基化	[100]
	预测化疗反应	<i>SOX17</i> 和 <i>RASSF1A</i>	去甲基化	[103]
放射治疗	预测放射治疗	<i>p53</i> 、 <i>RASSF1</i> 、 <i>DAPK</i> 及甲基化负担模型	未定	[101]、[108]

表 2 胃癌的靶向及免疫治疗表观遗传学总结

治疗靶点	药物名称	作用原理	研究阶段	参考文献
DNA 甲基转移酶抑制剂 (DNMTi)	Zebularine	DNA 甲基转移酶和胞苷脱氨酶的抑制	临床前阶段	[113]
DNA 甲基转移酶抑制剂 (DNMTi)	Vidaza	形成与酶不可逆的共价键	一、二期临床研究	[106]、[119]
DNA 甲基转移酶抑制剂 (DNMTi)	Decitabine	抑制 DNA 甲基转移酶	临床前阶段	[120]
组蛋白甲基化药物	EZH2	SAH 水解酶抑制剂甲基转移酶, 下调胃癌细胞系中 VEGF-A 的表达	临床前阶段	[121]、[122]
CRISPR-Cas9	未定	定向甲基化诱导	临床前阶段	[114]、[115]
GABRA3	未定	PD-L1 表达和肿瘤免疫原性	临床前阶段	[116]
PD-L2 甲基化	未定	调节免疫微环境, 预测抗 PD-1 免疫治疗的反应	临床前阶段	[117]
甲基化相关的调节因子	未定	调节肿瘤免疫微环境表征, 强免疫治疗的疗效。	临床前阶段	[118]

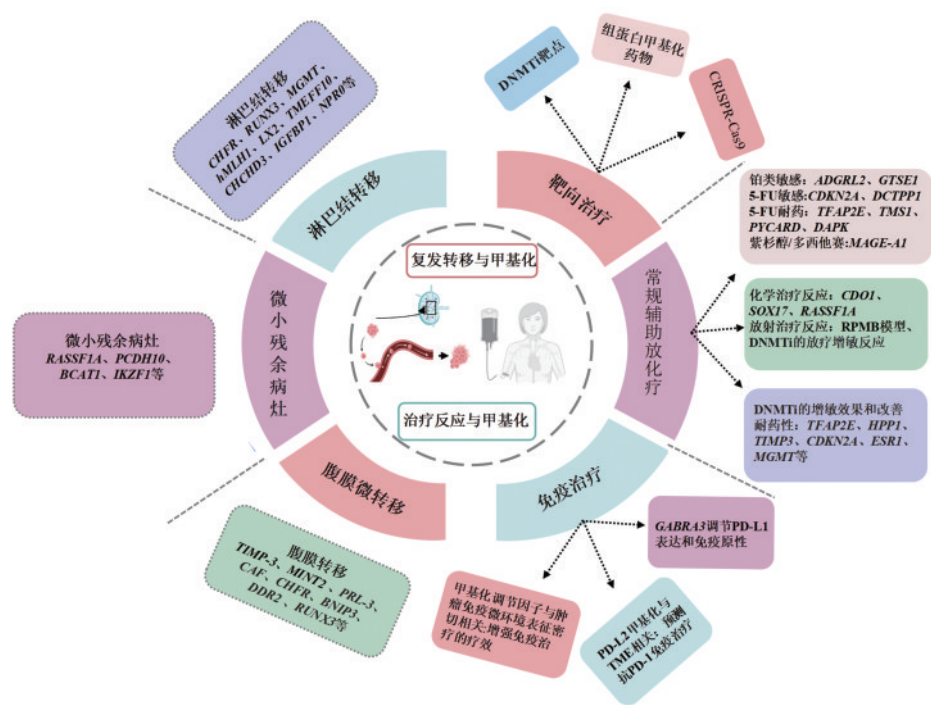


图 2 DNA 甲基化在胃癌复发转移评估、治疗反应上的简图(曹钦兴总结绘制)

到庞大的人体背景噪音的影响,这对于检测技术和研究方法都提出极高的要求。而对于粪便检测来说,面临着胃酸和冗长的消化系统对脱落细胞 DNA 的损伤,甚至对能不能成为合格的标本来源还存在争议。另外不同亚型的肿瘤可能会有多种基因上的变化,目前已经发现非常多的标志物,但是如何去验证这些已发现生物标志物的在临床中的实际作用仍是难点。受限于目前对早期疾病和复发恶性肿瘤的生物学行为的理解,对于如何确定疾病是属于原发性病变、继发性病变、侵袭性病变抑或是无意义的病变还需进一步探索。此外不同的人群患病风险不同,目前胃癌的甲基化标志物研究模型似乎未将患者的家族史、人口学特征及环境暴露因素等纳入研究模型,这可能会导致现有的研究模型在临床应用时出现偏差。从已有的研究看来,以小样本及回顾性研究居多,前瞻性或进入临床试验的研究凤毛麟角,存在不可避免的选择偏倚,亟待大样本、高质量的深入研究。

胃癌的早期发现能显著提高生存率及提高患者的生活质量,而在中晚期胃癌则需要考虑患者能从哪种治疗方式中获益更多。DNMTis 在预测治疗反应、辅助治疗方案及耐药性具有独特优势,在未来可以用于增强标准化疗方案疗效和改善患者化疗反应,甚至治疗多药耐药等。此外,还发现 DNA 甲基化可能和肿瘤微环境相关,可能可以预测胃癌免疫治疗的反应,甚至辅助免疫治疗等。但不可否认的是,这些甲基化药物和调节因子仍存在脱靶毒性风险,许多染色质修饰酶的功能更为多样,不一定会向我们期望的方向发展。因此,了解潜在的 DNA 甲基化机制,发现新的靶点和药物将是未来表观遗传治疗成功的关键。

目前跨学科合作对早期疾病筛查、复发监测和预测治疗反应的作用至关重要,如在建立筛查模型时引入人工智能(artificial intelligence, AI)辅助进行标志物的发现和验证,或许会加快标志的发现及验证过程,甚至提高预测模型的准确性,但目前罕有基于 DNA 甲基化的生物标志物 AI 模型

报道。此外单一的生物标志物的准确性和特异性可能有限,在未来多模态,多种样本的组合标志物或许会实现更高敏感性和特异性。表观遗传学无疑是胃癌研究的一个新前沿,随着功能更强大、成本更低的技术出现和高质量临床研究的开展,胃癌的表观遗传标志物可能变得更加整合和无偏倚。当然表观遗传标志物要常规用于早期检测、复发监测和预测治疗效果还需要更多的数据来确定。在有明确的临床循证医学证据之前,应该仅限于在临床试验中对其进行必要的评估。

利益冲突 所有作者均声明本文不存在利益冲突

参 考 文 献

- Grady WM, Yu M, Markowitz SD. Epigenetic alterations in the gastrointestinal tract: current and emerging use for biomarkers of cancer[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(3): 690-709. DOI:10.1053/j.gastro.2020.09.058.
- Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, et al. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(2): 277-285. DOI:10.1007/s13277-011-0308-9.
- Fattahi S, Kosari-Monfared M, Ghadami E, et al. Infection-associated epigenetic alterations in gastric cancer: New insight in cancer therapy[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(12): 9261-9270. DOI:10.1002/jcp.27030.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Usui G, Matsusaka K, Mano Y, et al. DNA methylation and genetic aberrations in gastric cancer[J]. *Digestion*, 2021, 102(1):25-32. DOI:10.1159/000511243.
- Ebrahimi V, Soleimani A, Ebrahimi T, et al. Epigenetic modifications in gastric cancer: focus on DNA methylation [J]. *Gene*, 2020, 742: 144577. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144577.
- Andersen GB, Tost J. A summary of the biological processes, disease-associated changes, and clinical applications of DNA methylation[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1708:3-30. DOI: 10.1007/978-1-4939-7481-8_1.
- Yang YC, Wang D, Jin L, et al. Circulating tumor DNA detectable in early- and late-stage colorectal cancer patients[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20180322. DOI: 10.1042/BSR20180322.
- Qu Y, Dang S, Hou P. Gene methylation in gastric cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424:53-65. DOI: 10.1016/j.cca.2013.05.002.
- Crosby D, Bhatia S, Brindle KM, et al. Early detection of cancer[J]. *Science*, 2022, 375(6586): eaay9040. DOI: 10.1126/science.aay9040.
- Zhang J, Guo S, Piao HY, et al. ALKBH5 promotes invasion and metastasis of gastric cancer by decreasing methylation of the lncRNA NEAT1[J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(3):379-389. DOI: 10.1007/s13105-019-00690-8.
- Chamberlain JA, Dugué PA, Bassett JK, et al. DNA methylation in peripheral blood and risk of gastric cancer: a prospective nested case-control study[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2021, 14(2):233-240. DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-20-0003.
- Park SY, Yoo EJ, Cho NY, et al. Comparison of CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in premalignant stages of gastric cancer, stratified for *Helicobacter pylori* infection[J]. *J Pathol*, 2009, 219(4): 410-416. DOI: 10.1002/path.2596.
- Ko K, Kananazawa Y, Yamada T, et al. Methylation status and long-fragment cell-free DNA are prognostic biomarkers for gastric cancer[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(6):2003-2012. DOI: 10.1002/cam4.3755.
- Choi SJ, Jung SW, Huh S, et al. Alteration of DNA methylation in gastric cancer with chemotherapy[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(8): 1367-1378. DOI: 10.4014/jmb.1704.04035.
- Kim J, Bae DH, Kim JH, et al. HOXC10 overexpression promotes cell proliferation and migration in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(1):202-212. DOI: 10.3892/or.2019.7164.
- Wang F, Zhang J, Tang H, et al. Nup54-induced CARM1 nuclear importation promotes gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis through transcriptional activation and methylation of Notch2[J]. *Oncogene*, 2022, 41(2):246-259. DOI: 10.1038/s41388-021-02078-9.
- Housman G, Byler S, Heerboth S, et al. Drug resistance in cancer: an overview[J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(3): 1769-1792. DOI: 10.3390/cancers6031769.
- Oue N, Oshimo Y, Nakayama H, et al. DNA methylation of multiple genes in gastric carcinoma: association with histological type and CpG island methylator phenotype[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(10): 901-905. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01373.x.
- Oue N, Mitani Y, Motoshita J, et al. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer[J]. *Cancer*, 2006, 106(6):1250-1259. DOI: 10.1002/cncr.21754.
- Kupcinskaite-Noreikiene R, Ugenskiene R, Noreika A, et al. Gene methylation profile of gastric cancerous tissue according to tumor site in the stomach[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16:40. DOI: 10.1186/s12885-016-2077-8.
- Chen HY, Zhu BH, Zhang CH, et al. High CpG island methylator phenotype is associated with lymph node metastasis and prognosis in gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(1):73-79. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02129.x.
- Fan XY, Hu XL, Han TM, et al. Association between RUNX3 promoter methylation and gastric cancer: a meta-analysis [J]. *BMC Gastroenterol*, 2011, 11:92. DOI: 10.1186/1471-230X-11-92.
- Morales-Sanchez A, Fuentes-Panana EM. Epstein-Barr virus-associated gastric cancer and potential mechanisms of oncogenesis[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2017, 17(6): 534-554. DOI: 10.2174/1568009616666160926124923.
- Shimazu T, Asada K, Charvat H, et al. Association of gastric cancer risk factors with DNA methylation levels in gastric mucosa of healthy Japanese: a cross-sectional study[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(11):1291-1298. DOI: 10.1093/carcin/bgv125.
- Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(8):e1000602. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000602.
- So K, Tamura G, Honda T, et al. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(11):1155-1158. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00302.x.
- Kim TY, Jong HS, Jung Y, et al. DNA hypermethylation in gastric cancer[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 20 Suppl 1:S131-S142. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.01984.x.
- Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(4):1551-1556. DOI: 10.1016/

- S0002-9440(10)63511-0.
- [30] Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4):1430-1440. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2755.
 - [31] Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(3 Pt 1):989-995. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2096.
 - [32] Nardone G, Compare D, De Colibus P, et al. *Helicobacter pylori* and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis[J]. *Dig Dis*, 2007, 25(3):225-229. DOI: 10.1159/000103890.
 - [33] Chan AO, Peng JZ, Lam SK, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses E-cadherin promoter hypermethylation[J]. *Gut*, 2006, 55(4):463-468. DOI: 10.1136/gut.2005.077776.
 - [34] Sepulveda AR, Yao Y, Yan W, et al. CpG methylation and reduced expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase is associated with *Helicobacter pylori* infection [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(5):1836-1844. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.042.
 - [35] Perri F, Cotugno R, Piepoli A, et al. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of H. Pylori infected patients and effect of eradication[J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102(7):1361-1371. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01284.x.
 - [36] Leung WK, Man EP, Yu J, et al. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of E-cadherin gene in noncancerous stomach[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(10): 3216-3221. DOI: 10.1158/1078-0432. CCR-05-2442.
 - [37] Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, et al. Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(23): 7187-7197. DOI: 10.1158/0008-5472. CAN-11-1349.
 - [38] Namba-Fukuyo H, Funata S, Matsusaka K, et al. TET2 functions as a resistance factor against DNA methylation acquisition during Epstein-Barr virus infection[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81512-81526. DOI: 10.18632/oncotarget.13130.
 - [39] Hino R, Uozaki H, Murakami N, et al. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7):2766-2774. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3070.
 - [40] Gulley ML. Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma[J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(1): e134. DOI: 10.1038/emmm.2014.93.
 - [41] Gedder H, zur Hausen A, Gabbert HE, et al. EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011, 34(3): 209-214. DOI: 10.1007/s13402-011-0028-6.
 - [42] Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2014, 513(7517):202-209. DOI: 10.1038/nature13480.
 - [43] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(15): 8681-8686. DOI: 10.1073/pnas.96.15.8681.
 - [44] Kusano M, Toyota M, Suzuki H, et al. Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus[J]. *Cancer*, 2006, 106(7): 1467-1479. DOI: 10.1002/cncr.21789.
 - [45] Locke WJ, Guanzone D, Ma C, et al. DNA methylation cancer biomarkers: translation to the clinic[J]. *Front Genet*, 2019, 10:1150. DOI: 10.3389/fgene.2019.01150.
 - [46] Zhou Z, Lin Z, Pang X, et al. Epigenetic regulation of long non-coding RNAs in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(27):19443-19458. DOI: 10.18632/oncotarget.23821.
 - [47] Padmanabhan N, Ushijima T, Tan P. How to stomach an epigenetic insult: the gastric cancer epigenome[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(8):467-478. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.53.
 - [48] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2): 143-153. DOI: 10.1038/nrc1279.
 - [49] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes[J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1546-1558. DOI: 10.1126/science.1235122.
 - [50] Li H, Li W, Liu S, et al. DNMT1, DNMT3A and DNMT3B polymorphisms associated with gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis[J]. *EBioMedicine*, 2016, 13:125-131. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.10.028.
 - [51] Pan YM, Wang CG, Zhu M, et al. STAT3 signaling drives EZH2 transcriptional activation and mediates poor prognosis in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1):79. DOI: 10.1186/s12943-016-0561-z.
 - [52] Nishikawaji T, Akiyama Y, Shimada S, et al. Oncogenic roles of the SETDB2 histone methyltransferase in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(41):67251-67265. DOI: 10.18632/oncotarget.11625.
 - [53] Deng M, Zhang R, He Z, et al. TET-mediated sequestration of miR-26 drives EZH2 expression and gastric carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(22): 6069-6082. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2964.
 - [54] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7):783-791. DOI:10.1097/CM9.0000000000001474.
 - [55] Zheng R, Zhang S, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2022, 2(1): 1-9. DOI:10.1016/j.jncc.2022.02.002.
 - [56] UK Office for National Statistics. Cancer survival by stage at diagnosis for England (experimental statistics): Adults diagnosed 2012, 2013 and 2014 and followed up to 2015 [EB/OL]. (2016-07-10) [2023-06-09]. <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/bulletins/cancersurvivalbysstageatdiagnosisforenglandexperimentalstatistics/adults-diagnosed20122013and2014andfollowedupto2015>.
 - [57] Park JH, Park J, Choi JK, et al. Identification of DNA methylation changes associated with human gastric cancer[J]. *BMC Med Genomics*, 2011, 4:82. DOI: 10.1186/1755-8794-4-82.
 - [58] Chiurillo MA. Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review[J]. *World J Exp Med*, 2015, 5(2):84-102. DOI: 10.5493/wjem.v5.i2.84.
 - [59] Choi IS, Wu TT. Epigenetic alterations in gastric carcinogenesis[J]. *Cell Res*, 2005, 15(4):247-254. DOI: 10.1038/sj.cr.7290293.
 - [60] Lee JH, Park SJ, Abraham SC, et al. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas[J]. *Oncogene*, 2004, 23(26): 4646-4654. DOI: 10.1038/sj.onc.1207588.
 - [61] To KF, Leung WK, Lee TL, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer[J]. *Int J*

- Cancer, 2002, 102(6):623-628. DOI: 10.1002/ijc.10783.
- [62] Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions[J]. Hum Pathol, 2009, 40(11): 1534-1542. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.01.029.
- [63] Ushijima T, Hattori N. Molecular pathways: involvement of Helicobacter pylori-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(4):923-929. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2011.
- [64] Campos-Carrillo A, Weitzel JN, Sahoo P, et al. Circulating tumor DNA as an early cancer detection tool[J]. Pharmacol Ther, 2020, 207:107458. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.107458.
- [65] Nordgård O, Tjensvoll K, Gilje B, et al. Circulating tumour cells and DNA as liquid biopsies in gastrointestinal cancer [J]. Br J Surg, 2018, 105(2): e110-e120. DOI: 10.1002/bjs.10782.
- [66] Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA[J]. Ann Oncol, 2020, 31(6): 745-759. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.02.011.
- [67] Huang ZB, Zhang HT, Yu B, et al. Cell-free DNA as a liquid biopsy for early detection of gastric cancer[J]. Oncol Lett, 2021, 21(1):3. DOI:10.3892/ol.2020.12264.
- [68] Bi F, Wang Q, Dong Q, et al. Circulating tumor DNA in colorectal cancer: opportunities and challenges[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(3):1044-1055.
- [69] Ren J, Lu P, Zhou X, et al. Genome-scale methylation analysis of circulating cell-free DNA in gastric cancer patients[J]. Clin Chem, 2022, 68(2):354-364. DOI:10.1093/clinchem/hvab204.
- [70] Yang AP, Liu J, Lei HY, et al. CA72-4 combined with CEA, CA125 and CA19-9 improves the sensitivity for the early diagnosis of gastric cancer[J]. Clin Chim Acta, 2014, 437: 183-186. DOI: 10.1016/j.cca.2014.07.034.
- [71] de Klerk CM, Vendrig LM, Bossuyt PM, et al. Participant-related risk factors for false-positive and false-negative fecal immunochemical tests in colorectal cancer screening: systematic review and meta-analysis[J]. Am J Gastroenterol, 2018, 113(12): 1778-1787. DOI: 10.1038/s41395-018-0212-7.
- [72] Song L, Li Y. SEPT9: a specific circulating biomarker for colorectal cancer[J]. Adv Clin Chem, 2015, 72: 171-204. DOI: 10.1016/bs.acc.2015.07.004.
- [73] Lee HS, Hwang SM, Kim TS, et al. Circulating methylated septin 9 nucleic Acid in the plasma of patients with gastrointestinal cancer in the stomach and colon[J]. Transl Oncol, 2013, 6(3):290-296. DOI: 10.1593/tlo.13118.
- [74] Cheung KF, Lam CN, Wu K, et al. Characterization of the gene structure, functional significance, and clinical application of RNF180, a novel gene in gastric cancer[J]. Cancer, 2012, 118(4):947-959. DOI: 10.1002/cncr.26189.
- [75] Song L, Li Y. Progress on the clinical application of the SEPT9 gene methylation assay in the past 5 years[J]. Biomark Med, 2017, 11(6): 415-418. DOI: 10.2217/bmm-2017-0091.
- [76] Song L, Chen Y, Gong Y, et al. Opportunistic screening and survival prediction of digestive cancers by the combination of blood mSEPT9 with protein markers[J]. Ther Adv Med Oncol, 2020, 12:1758835920962966. DOI: 10.1177/1758835920962966.
- [77] Xu J, Song J, Wang T, et al. A combination of methylation and protein markers is capable of detecting gastric cancer detection by combined markers[J]. Epigenomics, 2021, 13(19):1557-1570. DOI: 10.2217/epi-2021-0080.
- [78] Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of Ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors[J]. Science, 1992, 256(5053): 102-105. DOI: 10.1126/science.1566048.
- [79] Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, et al. Sensitive and specific detection of early gastric cancer with DNA methylation analysis of gastric washes[J]. Gastroenterology, 2009, 136(7):2149-2158. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.085.
- [80] Ma L, Gong J, Zhao M, et al. A novel stool methylation test for the non-invasive screening of gastric and colorectal cancer[J]. Front Oncol, 2022, 12: 860701. DOI: 10.3389/fonc.2022.860701.
- [81] Liu L, Liu C, Fotouhi O, et al. TERT promoter hypermethylation in gastrointestinal cancer: a potential stool biomarker[J]. Oncologist, 2017, 22(10):1178-1188. DOI:10.1634/theoncologist.2017-0064.
- [82] Nagasaka T, Tanaka N, Cullings HM, et al. Analysis of fecal DNA methylation to detect gastrointestinal neoplasia[J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(18): 1244-1258. DOI: 10.1093/jnci/djp265.
- [83] Jin LX, Moses LE, Squires MH, et al. Factors associated with recurrence and survival in lymph node-negative gastric adenocarcinoma: a 7-institution study of the us gastric cancer collaborative[J]. Ann Surg, 2015, 262(6): 999-1005. DOI: 10.1097/SLA.0000000000001084.
- [84] Youn HG, An JY, Choi MG, et al. Recurrence after curative resection of early gastric cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(2):448-454. DOI: 10.1245/s10434-009-0772-2.
- [85] Baiocchi GL, Marrelli D, Verlato G, et al. Follow-up after gastrectomy for cancer: an appraisal of the Italian research group for gastric cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2014, 21(6): 2005-2011. DOI: 10.1245/s10434-014-3534-8.
- [86] Căinap C, Nagy V, Gherman A, et al. Classic tumor markers in gastric cancer: Current standards and limitations[J]. Clujul Med, 2015, 88(2):111-115. DOI: 10.15386/cjmed-409.
- [87] Kim YW, Kim YH, Song Y, et al. Monitoring circulating tumor DNA by analyzing personalized cancer-specific rearrangements to detect recurrence in gastric cancer[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(8): 1-10. DOI: 10.1038/s12276-019-0292-5.
- [88] Yang J, Gong Y, Lam VK, et al. Deep sequencing of circulating tumor DNA detects molecular residual disease and predicts recurrence in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5):346. DOI: 10.1038/s41419-020-2531-z.
- [89] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6):426-437. DOI: 10.1038/nrc3066.
- [90] Hiraki M, Kitajima Y, Sato S, et al. Aberrant gene methylation in the lymph nodes provides a possible marker for diagnosing micrometastasis in gastric cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(4): 1177-1186. DOI: 10.1245/s10434-009-0815-8.
- [91] Wu J, Xiao Y, Xia C, et al. Identification of biomarkers for predicting lymph node metastasis of stomach cancer using clinical DNA methylation data[J]. Dis Markers, 2017, 2017:5745724. DOI: 10.1155/2017/5745724.
- [92] Zhang JF, Lv L, Zhao S, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) combined with surgery: a 12-year meta-analysis of this promising treatment strategy for advanced gastric cancer at different stages[J]. Ann Surg Oncol, 2022, 29(5): 3170-3186. DOI: 10.1245/s10434-021-11316-z.
- [93] Liu Q, Chu Y, Shao J, et al. Benefits of an immunogenic personalized neoantigen nanovaccine in patients with high-risk gastric/gastroesophageal junction cancer[J].

- Adv Sci (Weinh), 2022, 10(1): e2203298. DOI: 10.1002/adv.202203298.
- [94] Qi C, Gong J, Li J, et al. Claudin18.2-specific CAR T cells in gastrointestinal cancers: phase 1 trial interim results[J]. Nat Med, 2022, 28(6):1189-1198. DOI: 10.1038/s41591-022-01800-8.
- [95] Wainberg ZA, Enzinger PC, Kang YK, et al. Bemarituzumab in patients with FGFR2b-selected gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FIGHT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study [J]. Lancet Oncol, 2022, 23(11):1430-1440. DOI: 10.1016/S1470-2045(22)00603-9.
- [96] Ivanova T, Zouridis H, Wu Y, et al. Integrated epigenomics identifies BMP4 as a modulator of cisplatin sensitivity in gastric cancer[J]. Gut, 2013, 62(1):22-33. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301113.
- [97] Maeda O, Ando T, Ohmiya N, et al. Alteration of gene expression and DNA methylation in drug-resistant gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 31(4):1883-1890. DOI: 10.3892/or.2014.3014.
- [98] Zhang Y, Qu X, Jing W, et al. GSTP1 determines cis-platinum cytotoxicity in gastric adenocarcinoma MGC803 cells: regulation by promoter methylation and extracellular regulated kinase signaling[J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(3):208-214. DOI: 10.1097/CAD.0b013e328322fbaa.
- [99] Moro H, Hattori N, Nakamura Y, et al. Epigenetic priming sensitizes gastric cancer cells to irinotecan and cisplatin by restoring multiple pathways[J]. Gastric Cancer, 2020, 23(1):105-115. DOI: 10.1007/s10120-019-01010-1.
- [100] Harada H, Soeno T, Yokoi K, et al. Prediction of efficacy of postoperative chemotherapy by DNA methylation of CD01 in gastric cancer[J]. J Surg Res, 2020, 256:404-412. DOI: 10.1016/j.jss.2020.07.001.
- [101] Suzuki T, Yoshida K, Wada Y, et al. Melanoma-associated antigen-A1 expression predicts resistance to docetaxel and paclitaxel in advanced and recurrent gastric cancer [J]. Oncol Rep, 2007, 18(2):329-336.
- [102] Xie C, Subhash VV, Datta A, et al. Melanoma associated antigen (MAGE) -A3 promotes cell proliferation and chemotherapeutic drug resistance in gastric cancer[J]. Cell Oncol (Dordr), 2016, 39(2):175-186. DOI: 10.1007/s13402-015-0261-5.
- [103] Karamitrousis E, Balgkouranidou I, Xenidis N, et al. Association between SOX17, Wif-1 and RASSF1A promoter methylation status and response to chemotherapy in patients with metastatic gastric cancer[J]. Clin Chem Lab Med, 2020, 59(2):e73-e75. DOI: 10.1515/cclm-2020-0662.
- [104] Maeda M, Moro H, Ushijima T. Mechanisms for the induction of gastric cancer by Helicobacter pylori infection: aberrant DNA methylation pathway[J]. Gastric Cancer, 2017, 20 Suppl 1:S8-S15. DOI: 10.1007/s10120-016-0650-0.
- [105] Wu FL, Li RT, Yang M, et al. Gelatinases-stimuli nanoparticles encapsulating 5-fluorouridine and 5-aza-2'-deoxycytidine enhance the sensitivity of gastric cancer cells to chemical therapeutics[J]. Cancer Lett, 2015, 363(1):7-16. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.01.006.
- [106] Schneider BJ, Shah MA, Klute K, et al. Phase I study of epigenetic priming with azacitidine prior to standard neoadjuvant chemotherapy for patients with resectable gastric and esophageal adenocarcinoma: evidence of tumor hypomethylation as an indicator of major histopathologic response[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(11):2673-2680. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1896.
- [107] An N, Yu Z, He XJ, et al. Promoter methylation of DNA repair genes predicts disease-free survival of gastric adenocarcinoma after adjuvant radiotherapy[J]. Mol Ther Oncolytics, 2020, 18:109-117. DOI: 10.1016/j.omto.2020.06.006.
- [108] Qiu H, Yashiro M, Shinto O, et al. DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR enhances the radiosensitivity of gastric cancer cells[J]. Cancer Sci, 2009, 100(1):181-188. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.01004.x.
- [109] Kato K, Iida S, Uetake H, et al. Methylated TMS1 and DAPK genes predict prognosis and response to chemotherapy in gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2008, 122(3):603-608. DOI: 10.1002/ijc.23143.
- [110] Subhash VV, Tan SH, Tan WL, et al. GTSE1 expression represses apoptotic signaling and confers cisplatin resistance in gastric cancer cells[J]. BMC Cancer, 2015, 15:550. DOI: 10.1186/s12885-015-1550-0.
- [111] Li Y, Yang Y, Lu Y, et al. Predictive value of CHFR and MLH1 methylation in human gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2015, 18(2):280-287. DOI: 10.1007/s10120-014-0370-2.
- [112] Ballestar E, Esteller M. SnapShot: the human DNA methylome in health and disease[J]. Cell, 2008, 135(6):1144-1144.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2008.11.040.
- [113] Tan W, Zhou W, Yu HG, et al. The DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces mitochondria-mediated apoptosis in gastric cancer cells in vitro and in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(1):250-255. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.143.
- [114] Huang YH, Su J, Lei Y, et al. DNA epigenome editing using CRISPR-Cas SunTag-directed DNMT3A[J]. Genome Biol, 2017, 18(1):176. DOI: 10.1186/s13059-017-1306-z.
- [115] Vojta A, Dobrinić P, Tadić V, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(12):5615-5628. DOI: 10.1093/nar/gkw159.
- [116] Miliotis C, Slack FJ. miR-105-5p regulates PD-L1 expression and tumor immunogenicity in gastric cancer [J]. Cancer Lett, 2021, 518:115-126. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.05.037.
- [117] Lingohr P, Dohmen J, Semaan A, et al. Clinicopathological, immune and molecular correlates of PD-L2 methylation in gastric adenocarcinomas[J]. Epigenomics, 2019, 11(6):639-653. DOI: 10.2217/epi-2018-0149.
- [118] Meng Q, Lu YX, Ruan DY, et al. DNA methylation regulator-mediated modification patterns and tumor microenvironment characterization in gastric cancer[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 24:695-710. DOI: 10.1016/j.omtn.2021.03.023.
- [119] Moertel CG, Schutt AJ, Reitemeier RJ, et al. Phase II study of 5-azacytidine (NSC-102816) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer[J]. Cancer Chemother Rep, 1972, 56(5):649-652.
- [120] Shin DY, Kim GY, Kim CG, et al. Anti-invasive effects of decitabine, a DNA methyltransferase inhibitor, through tightening of tight junctions and inhibition of matrix metalloproteinase activities in AGS human gastric carcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2012, 28(3):1043-1050. DOI: 10.3892/or.2012.1858.
- [121] Cheng LL, Itahana Y, Lei ZD, et al. TP53 genomic status regulates sensitivity of gastric cancer cells to the histone methylation inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNep) [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(15):4201-4212. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0036.
- [122] Chen YT, Zhu F, Lin WR, et al. The novel EZH2 inhibitor, GSK126, suppresses cell migration and angiogenesis via down-regulating VEGF-A[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 77(4):757-765. DOI: 10.1007/s00280-016-2990-1.