



卢瑗瑗, 空军军医大学西京医院消化内科副主任、博导, 消化系肿瘤整合防治全国重点实验室PI, 国家优青, 曾在美国 Vanderbilt 大学做博士后研究。任中国抗癌协会青年理事会副理事长, 中华医学会消化病学分会消化道肿瘤协作组委员, 中国临床肿瘤学会结肠癌专委会委员等学术职务。长期从事胃肠道肿瘤的基础和临床转化研究, 在化疗、靶向治疗和免疫治疗方面积累了较多经验。以第一/通讯作者身份在 *Nature Medicine*、*Journal of Clinical Investigation*、*Molecular Cancer*、*Science Signaling* 等期刊上发表论著40篇。参编专著14部。国家自然科学基金(5项)负责人, 科技部重点研发项目课题负责人。参编肿瘤学临床指南和共识9部。获军队青年科技英才、空军高层次科技人才, 陕西省三秦学者, 陕西省科技进步一等奖, 中国肿瘤青年科学家奖等荣誉。

消化系肿瘤整合防治全国重点实验室依托空军军医大学与北京大学肿瘤医院联合组建, 2023年4月完成国家重点实验室重组工作, 由原名称“肿瘤生物学国家重点实验室”正式更名为“消化系肿瘤整合防治全国重点实验室”。

实验室秉持整合医学理念, 坚持以“面向人民生命健康”为己任, 致力于为实现消化系肿瘤发病率降低15%、五年生存率提高15%的国家目标贡献力量。实验室聚焦消化系肿瘤本质特征, 开展肿瘤发生与演进过程中的基础理论研究, 创制消化系肿瘤早筛、早诊、早期干预和整合诊疗的新技术、新药物与新方法, 形成了消化道肿瘤整合防治理论与实践相互促进、防-筛-诊-治-康全程管理为一体的整合医学优势和特色。

实验室以第一完成单位获国家科技进步创新团队奖1项, 国家科技进步一等奖1项、二等奖4项。近五年, 承担国家重点研发计划, 国家自然科学基金重大项目、重点项目, 国际合作项目等国家级科研项目171项, 累计获批经费2.26亿元; 获授权PCT国际专利8项、国家发明专利32项, 成果转化7项; 在 *Nature*、*Lancet*、*Nature Medicine*、*Cell*、*Science* 等国际期刊上发表论文320余篇。

表观遗传学标志物在肿瘤液体活检中的研究进展

刘浩¹ 周云^{2,3} 卢瑗瑗^{1*}

¹第四军医大学, 西京消化病医院, 国家消化系统疾病临床医学研究中心和消化系肿瘤整合防治全国重点实验室, 西安 710032; ²空军军医大学唐都医院消化内科, 西安 710038; ³西北大学, 生命科学学院, 西安 710069)

摘要 与传统组织活检相比, 液体活检具有无创、实时动态监测、克服肿瘤异质性等诸多优势, 是极具潜力的肿瘤早筛早诊工具。肿瘤的发生发展伴随着异常的表观遗传学的改变, 如DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA调控等。通过液体活检检测这些表观遗传标志物的变化已被应用于肿瘤的早诊早筛、复发监测、肿瘤亚型鉴定以及对治疗反应和结果预测等方面, 并展现出极

收稿日期: 2023-11-01 接受日期: 2023-12-04

国家自然科学基金(批准号: 82303489、82273142)和国家重点研发计划(批准号: 2022YFC2505104)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13891956860, E-mail: luyuandreamer@aliyun.com

Received: November 1, 2023 Accepted: December 4, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82303489, 82273142), and the National Key R&D Program of China (Grant No.2022YFC2505104)

*Corresponding author. Tel: +86-13891956860, E-mail: luyuandreamer@aliyun.com

大的应用前景。该文就目前表观遗传学标志物检测在肿瘤液体活检中的研究进展进行综述。

关键词 肿瘤; 液体活检; 表观遗传学; 生物标志物

Research Progress of Epigenetic Markers in Tumor Liquid Biopsy

LIU Hao¹, ZHOU Yun^{2,3}, LU Yuanyuan^{1*}

(*State Key Laboratory of Holistic Integrative Management of Gastrointestinal Cancers and National Clinical Research Center for Digestive Diseases Xijing Hospital of Digestive Diseases, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;*

²Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China;

³College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Compared with traditional tissue biopsy, liquid biopsy has many advantages, such as non-invasive, real-time dynamic monitoring, overcoming tumor heterogeneity, and so on. It is regarded as a promising tool for early screening and diagnosis of cancer. Tumor development and progression are accompanied by abnormal epigenetic changes, such as DNA methylation, histone modification, and non-coding RNA regulation. The detection of these epigenetic markers by liquid biopsy has been applied in early diagnosis and screening of tumors, recurrence monitoring, identification of tumor subtypes, and prediction of treatment response and outcomes. And it has shown great application prospects. This review summarizes the progress of epigenetic marker detection in tumor liquid biopsy.

Keywords tumor; liquid biopsy; epigenetics; biomarkers

肿瘤是危害人类健康的重大疾病。由于早期症状隐匿,大部分的肿瘤在确诊时已进展到晚期。尽管近些年来,以分子靶向治疗、免疫治疗等为代表的新型治疗方式在肿瘤治疗中取得了进步,但是对于晚期肿瘤,依然没有很好的治疗手段,患者的死亡率仍旧较高^[1]。而大多数早期癌通过手术或者药物治疗可以根除,并长期存活,因此早期筛查和早诊早治是降低癌症整体发病率、死亡率的有效手段^[2]。

近些年,全球范围内早癌筛查意识的普及推动了肿瘤早筛液体活检领域迎来了新的机遇。肿瘤液体活检技术是指通过检测血液、尿液、唾液、脑脊液等含有肿瘤相关生物标志物的体液来获取患者肿瘤病变信息,用以帮助肿瘤诊断、治疗和监测的技术。相较于传统的影像学检查、组织活检等肿瘤检测技术,液体活检技术具有明显优势^[3]。首先是其无创性高,可接受度好;其次,液体活检的重复性高,便于多次取样,有利于保证肿瘤监测的全面连续;最后,研究表明早期肿瘤患者的血液中就已经有循环肿瘤细胞和循环肿瘤DNA等液体活检标志物的存在,并且早于影像学改变,更有利于肿瘤的早期发现^[4]。

表观遗传学(epigenetics)是指在基因的DNA序

列没有发生改变的情况下,基因功能发生了可遗传的变化,并最终导致了表型的变化。除了基因改变外,癌细胞还具有多种表观遗传的异常,异常的表观遗传改变被认为是肿瘤发生发展的关键事件之一^[5]。研究发现,这些异常的表观遗传改变可以作为肿瘤诊断、预后判断和预测药物反应的生物标志物^[6]。通过液体活检检测这些表观遗传标志物的变化已被证明可应用于肿瘤的早诊早筛、复发监测、肿瘤亚型鉴定以及对治疗反应和结果的预测等方面,并展现出极大的应用前景。

1 肿瘤液体活检的生物标志物

目前,肿瘤液体活检的生物标志物主要包括循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤RNA(circulating tumor RNA, ctRNA)、细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)等^[7]。这些生物标志物分子携带有肿瘤信息,通过各种技术检测这些分子,有助于实现肿瘤的精准治疗。

早在1869年,病理学家Thomas ASHWORTH^[8]就报道了在乳腺癌患者的血液中发现了肿瘤细胞,

并将其命名为CTC。CTC被认为是指从肿瘤病灶(原发灶或转移灶)脱落入血的肿瘤细胞,可以单个形式存在或者形成微栓。极少数在血液中存活的CTC可以作为肿瘤转移的“种子”,播散到其他地方形成转移灶。研究表明,CTC含有其来源肿瘤的完整遗传学信息,包含基因组、蛋白组等,因此CTC可反映原发肿瘤组织的特征,在肿瘤的早诊、疗效观察、药物筛选、复发转移监测等方面发挥重要作用^[9]。

循环游离DNA(cell free DNA, cfDNA)是一种通过细胞凋亡、坏死和主动分泌释放到血液中的核酸混合物^[10]。cfDNA通常是长度为150~200个碱基对的双链片段,与核小体的单位大小相对应。肿瘤来源的cfDNA叫作ctDNA,与CTC相比,ctDNA丰度要明显高很多,其提取和检测方法也更加简单。ctDNA的半衰期较短,从16分钟到2.5小时不等,并且其丰度与肿瘤突变负荷呈正相关,可实时反映肿瘤进展^[11]。ctDNA携带有来源肿瘤的基因突变、甲基化修饰、拷贝数变异等遗传信息,是目前临床上应用最广泛的液体活检形式^[12]。

ctRNA是指体液中存在的来源于肿瘤的RNA,主要包括mRNA、microRNA、lncRNA、circRNA等^[13]。已有研究发现,血液循环中的游离核酸在不同的患者中存在肿瘤特异或相关改变。检测和分析ctRNA中的驱动突变例如*ALK*、*RET*、*ROS1*和*NTRK*基因融合,可以指导癌症患者的临床治疗决策^[14]。

细胞外囊泡是细胞通过不同机制释放的含有膜结构的物质,根据囊泡粒径的大小可分为外泌体(直径范围在30~100 nm)、微囊泡(直径范围在50~2 000 nm)和凋亡小体(直径范围在500~4 000 nm)^[15]。细胞外囊泡在癌症中发挥重要作用,能够介导肿瘤细胞之间和肿瘤细胞与基质细胞之间的相互作用,并参与转移前生态位的建立。肿瘤细胞分泌的细胞外囊泡中含有肿瘤来源的蛋白质、RNA、DNA等,可反映肿瘤特征。在体液中,外泌体含量丰富,并且具有较好的稳定性,同时携带有大量的肿瘤信息,因此被认为是种新型的肿瘤标记物^[16]。

2 表观遗传学与肿瘤

人类基因组计划的完成揭示了基因组DNA在对生物过程调节中的作用并没有最初预计的多,而表观遗传因素决定了基因在何时何地表达,从而调

控从发育过程到细胞死亡通路的基本细胞程序^[17]。异常的表观遗传学变化,同基因改变一样,在肿瘤的发生发展中起着关键作用。对表观遗传学调控的研究,可以揭示肿瘤的发生机制,并为肿瘤的预测和治疗提供指导。表观遗传学修饰主要通过DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、非编码RNA调控等方式对基因的表达和功能进行调控,进而影响肿瘤的进展^[18]。

DNA甲基化与人类发育和肿瘤等疾病密切相关,也是目前研究的最多和最深入的表观遗传学修饰。DNA甲基化是指在甲基转移酶的作用下,将由*S*-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosylmethionine, SAM)提供的甲基基团连接于胞嘧啶5位的碳原子,形成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytidine, m⁵C)的过程,这一过程主要受到DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的调控^[19]。人类基因组含有大约1%的甲基化胞嘧啶,甲基化胞嘧啶也是最丰富、最广泛的DNA修饰^[20]。在肿瘤中,DNA整体呈现低甲基化水平,低水平的DNA甲基化不但能够导致基因组稳定性的降低和突变率的增加,还可以通过异常激活多种原癌基因的表达从而导致恶性肿瘤的发生。但是启动子区CpG岛(富含CG的碱基片段)存在着高甲基化,高水平的DNA甲基化能够通过降低肿瘤抑制基因的转录活性使其表达水平降低或表达沉默,从而间接地诱导恶性肿瘤的发生^[21]。

组蛋白是与DNA共同组成核小体的物质,每个核小体由2个相同的亚基组成,每个亚基含有4个组蛋白:H2A、H2B、H3和H4。组蛋白的氨基酸存在翻译后修饰,常见的修饰方式包括乙酰化、甲基化、磷酸化和泛素化等^[22]。研究表明,组蛋白修饰影响了基因的表达,例如某些组蛋白修饰(如H3上K9和K27的乙酰化,K4上的单甲基化和三甲基化),破坏了组蛋白-DNA间的相互作用,导致核小体解旋,DNA可以与转录复合物结合,随后激活基因表达。相反,一些组蛋白修饰(如H3上K9和K27的三甲基化)加强了组蛋白-DNA间的相互作用,产生了一种排列紧密的染色质结构,转录复合物无法接近DNA,导致基因表达受到抑制。同其他蛋白翻译后修饰类似,组蛋白修饰也受到一系列酶,如组蛋白K乙酰化酶5(K-acetyltransferase 5, KAT5)、组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)、组蛋白-赖氨酸*N*-甲基转移酶2(histone-lysine *N*-methyltransferase

enzyme 2, EZH2)等的调节, 研究证实这些关键修饰酶的表达和功能与肿瘤的发生发展密切相关^[23]。

随着测序技术的发展和人类基因组计划的实施, 人们发现非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA) 占到了人类所有基因转录本的90%以上, 根据片段大小又分为小非编码RNA(18~200 nt, 如miRNA、tsRNA、rRNA、piRNA、snoRNA等)和长非编码RNA(大于200 nt, 如lncRNA、circRNA等)^[24]。在所有小非编码RNA中, miRNA是研究的最多和最深入的ncRNA。miRNA是长度为18~25 nt的单链分子, 能够与靶mRNA的特定区域结合, 通过阻断转录或触发mRNA降解介导转录后基因沉默。因此, 单个miRNA可以影响数百个基因的表达, 从而调控肿瘤发生和进展的关键环节^[25]。lncRNA是ncRNA中含量最丰富的一种。lncRNA不具有编码蛋白质的潜力, 但它们可以表现出一些类似mRNA的特性, 如多外显子基因结构、聚腺苷化、5'帽的存在以及RNA聚合酶II的转录。lncRNA具有基因调控的作用, 例如lncRNA可以与特定蛋白质直接相互作用影响转录因子结合或表观遗传标记。lncRNA与mRNA的相互作用可能影响mRNA的稳定性或翻译速率。同样, lncRNA与蛋白质的相互作用也可能影响蛋白质的稳定性、活性或定位^[26]。此外, circRNA具有与lncRNA相似的长度范围, 二者均可以作为miRNA海绵发挥表观遗传学调控作用^[27]。

染色质重塑指染色质结构在紧密的超螺旋状态和转录可及状态之间发生的动态变化过程。染色质重塑和DNA甲基化以及蛋白质修饰一样可以影

响染色质结构进而调控基因的表达。染色质重塑主要有两种方式: 一是染色质结构可通过染色质成分的共价修饰(如组蛋白和DNA的甲基化、乙酰化等)发生改变, 二是染色质经由ATP依赖的染色质重塑因子[如SWI/SNF(switch/sucrose non-fermentable)、INO80(inositol auxotroph 80)、ISWI(imitation switch)和CHD(chromodomain, helicase, DNA binding)复合物]的非共价修饰改变染色质的位置和结构^[28]。

3 肿瘤液体活检中的表观遗传学标志物及其检测

与基因突变的高度个体化和异质性不同, 表观遗传修饰谱在癌症中具有更好的一致性, 通过液体活检的方法检测肿瘤表观遗传学标志物的变化是目前液体活检领域的热点方向。常见的肿瘤液体活检表观遗传学标志物主要包括: DNA甲基化、组蛋白修饰以及非编码RNA等(图1)。

3.1 DNA甲基化标志物

相较于其他的生物标志物, DNA甲基化标志物有诸多优势: 首先, 甲基化变化发生在癌变的早期, 并且具有组织和癌种特异性; 其次, 癌症中的DNA甲基化在大量基因组区域中具有更好的一致性, 因此可以使用多个CpG二核苷酸进行检测; 最后, 甲基化模式通常与特定癌症的起源有关, 可用于揭示未知原发肿瘤的起源组织^[12]。因此, DNA甲基化是液体活检中研究的最多的表观遗传学标志物。泛癌早筛龙头美国Grail公司近期公布的其循环细胞游离基因组图谱(circulating cell-free genome atlas, CCGA)

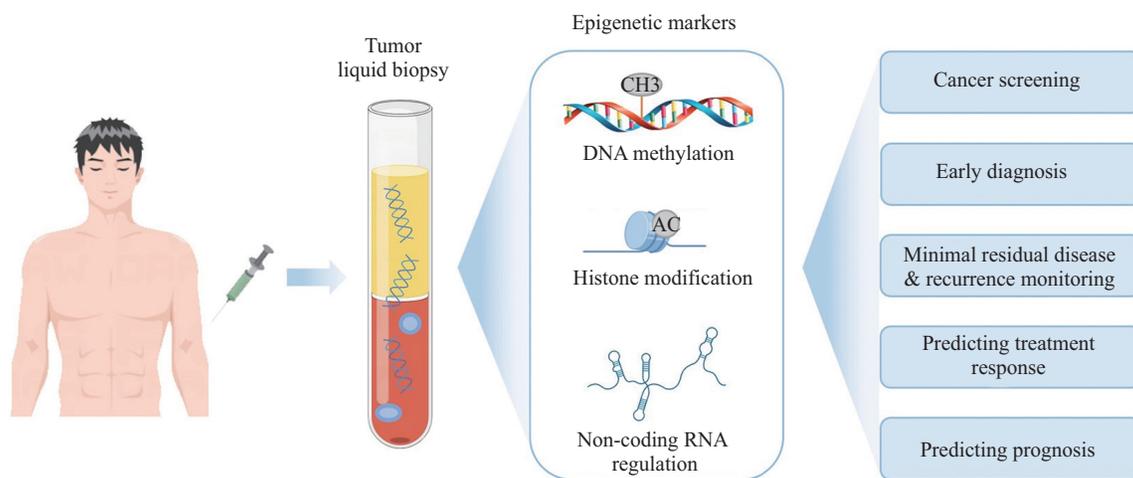


图1 肿瘤液体活检中主要的表观遗传学标志物及其临床应用

Fig.1 The main epigenetics markers in tumor liquid biopsy and their clinical application

研究的一项子研究(CCGA discovery)的结果表明,与其他方法相比,cfDNA甲基化是最有希望用于癌症检测和预测癌症信号来源的基因组特征。该研究首次严格、系统地比较了用于多癌早检的cfDNA的各种基因组特征,也是目前最大规模的cfDNA方法全基因组综合比较^[29]。现阶段cfDNA甲基化检测主要用于肿瘤早诊早筛、最小残留病、复发监测、预测治疗反应和预后判断以及追踪ctDNA的组织起源等方面。

肿瘤早筛和早诊是DNA甲基化在液体活检中应用的最多的领域。目前已有多种基于cfDNA甲基化生物标志物的检测试剂盒应用于临床。在结肠癌中,血浆SEPT9(SEPTIN9)甲基化是研究最多的表观遗传生物标志物之一。Epi proColon是第一个可用于检测血浆SEPT9甲基化的商业试剂盒,也是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的第一个用于筛查结直肠癌的血清学检测方法^[30]。在FDA批准Epi proColon后,中国国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)随后批准了博尔诚(北京)科技有限公司(引进Epigenomics专利)、为真生物医药科技有限公司、透景生命科技有限公司的SEPT9甲基化检测试剂盒,但均为辅助诊断用途。韩国 Genomictree公司适用于结直肠癌,检测SDC2(syndecan-2)甲基化的产品EarlyTect于2014年获KFDA批准后,国内广州康立明生物科技股份有限公司、厦门艾德生物医药科技股份有限公司的SDC2甲基化检测也随后获NMPA批准,同样为辅助诊断用途。最近的一项共纳入1 493名受试者的前瞻性研究报道了cfDNA甲基化标志物用于高危人群的结直肠癌(colorectal cancer, CRC)筛查^[31]。该研究使用MYO1G作为单一标志物,在29名受试者中经MYO1G甲基化检测出26名CRC患者,敏感性为89.7%,特异性为86.8%,曲线下面积(area under curve, AUC)为0.90^[31]。国内团队此前也报道,使用6种ctDNA甲基化生物标志物组合检测结直肠癌(I~IV期)的灵敏度为86%(149/173),特异性为92%(125/136),显示出良好的应用前景^[32]。目前,单靶点的甲基化检测产品较难获批早筛用途,而仅作为金标准检查的辅助诊断手段,将甲基化检测与其他的肿瘤特征联合进行多组学的检测是提高检测效能的可行方式和发展趋势。2014年,美国FDA批准

了全球第一个通过粪便隐血和基因多靶点(fecal immunochemical tests-DNA, FIT-DNA)联合检测用于结直肠癌筛查的产品Cologuard,其使用了3种类型的生物标志物:NDRG4和BMP3基因的甲基化,KRAS基因的点突变,以及大便隐血中的血红蛋白。Cologuard表现出对结直肠癌92.3%的灵敏度,对进展期腺瘤42.4%的灵敏度,特异性为87%^[33]。该产品已被美国疾病预防工作组等多个权威组织推荐用于适龄的无症状人群结直肠肿瘤早期筛查。

肿瘤患者在手术或治疗后复发的一个主要原因是微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)的存在。MRD的早期检测可以明确哪些患者更可能从强化治疗中获益,避免不加区分的治疗对部分低风险患者可能造成的伤害^[34]。已有研究表明,cfDNA的甲基化可作为MRD的标志物,用于区分高复发风险的患者并指导临床治疗。近期的一项前瞻性研究发现,WIFI和NPY ctDNA甲基化标志物可以预测手术后患者MRD及生存情况^[35]。另外一项前瞻性纵向队列研究收集了299例I~III期结直肠癌患者术前和术后以及化疗中和化疗后的血液样本,通过ColonAiQ方法检测BCAN、BCAT1、IKZF1、Septin9_1、Septin9_2和VAV3等6个基因的ctDNA甲基化水平,发现手术及化疗后ctDNA阳性组的无复发生存期要显著短于ctDNA阴性组[HR(hazard ratio)=13.8; 95%置信区间(confidence interval, CI), 5.9~32.1; $P < 0.001$],说明ctDNA甲基化分析可用于预测术后以及化疗后MRD的存在^[36]。

预测治疗反应和预后判断是DNA甲基化检测的另一项重要应用。在结直肠癌中,研究最多的预后生物标志物是血液中p16启动子的高甲基化,其与较差的总生存率相关^[37]。血液中HPP1和B4GALT1基因的高甲基化也被证实与结直肠癌病人较差的预后呈正相关^[38-39]。可用于预测肺癌患者预后的血液DNA甲基化标志物包括DCLK1^[40]、BRMS1^[41]、KMT2C^[42]等。研究表明ctDNA的血液动力学与治疗反应相关,可反映肿瘤细胞的状态,用于监测治疗效果^[43]。EYA4、GRIA4、ITGA4、MAP3K14-AS1和MSC等5种基因的cfDNA甲基化水平能反映转移性结直肠癌患者对不同治疗的效果^[43]。cfDNA甲基化标记物的分析在评估治疗和手术反应方面也显示出与影像学检查结果的一致性^[44]。

血浆cfDNA是各种DNA的混合物,因此确定

cfDNA的组织起源具有潜在的诊断意义。DNA甲基化具有组织特异性差异,所以可以用作各种组织的标记。SUN等^[45]报道了一种被称为“血浆DNA组织定位”的全基因组方法,该方法利用各种组织中的甲基化特征来追踪cfDNA的组织起源。通过将使用全基因组亚硫酸盐测序得到的血浆cfDNA甲基组与由多个组织组成的参考甲基组进行比较,可以计算出每种组织对血浆cfDNA库的贡献百分比,从而判断cfDNA的组织来源。在另一项研究中,研究者通过鉴定肝脏和结肠中与其他组织相比存在差异的甲基化区域鉴定出了2个标记物,并开发了相应的微滴数字PCR检测方法。结果表明,肝脏特异性标记物在反映血浆中肝脏源性DNA浓度方面具有良好的准确性[检测肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的特异性为93%,敏感性为60%]^[46]。

3.2 DNA甲基化液体活检技术

目前已有多种检测ctDNA甲基化的方法,主要可分为两类:基于亚硫酸氢盐转化的方法和非亚硫酸氢盐转化的方法,其中基于亚硫酸氢盐转化的方法是公认的金标准。

亚硫酸氢盐转化法的主要原理是亚硫酸氢盐能将未甲基化的胞嘧啶残基脱胺为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶在转化过程中保持不变。经过两组链特异性引物PCR扩增后,转化后的DNA的甲基化状态可通过后续测序得以确定^[47]。对于特定基因位点,液体活检中常用的基于亚硫酸盐的方法包括甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)、定量甲基化特异性PCR(quantitative methylation specific PCR, qMSP)、甲基化光检测、甲基化敏感高分辨率熔解(methylation sensitive high resolution melt, MS-HRM),以及最近基于数字PCR(digital PCR, dPCR)的方法。其中dPCR具有高敏感性,允许分析非常少量的DNA,目前几种基于dPCR的方法,包括甲基-BEAMing和液滴数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)已被用于临床cfDNA的甲基化分析^[44]。对于全基因组,常见的基于亚硫酸氢盐转化的测序方法有全基因组亚硫酸氢盐测序(whole-genome bisulfite sequencing, WGBS)、还原亚硫酸氢盐测序(reduced-representation bisulfite sequencing, RRBS)、甲基化CpG串联扩增和测序(methylated CpG tandem amplification and sequencing, MCTA-seq)和甲基化阵列。WGBS是最全面和信息最丰富的DNA

甲基化分析技术,该方法在亚硫酸盐转化后直接建立一个文库并进行测序,能检测所有胞嘧啶的甲基化状态,包括低CpG密度区域和非CpG位点(CpA、CpT和CpC)^[48]。

非亚硫酸盐转化的方法主要包括抗体富集法和甲基敏感限制性内切酶法^[49]。抗体富集法是利用抗甲基胞嘧啶抗体或甲基CpG结合蛋白的特异性来富集甲基化的基因组区域并进行后续分析。无细胞甲基化DNA免疫沉淀测序(cell-free methylated DNA immunoprecipitation and high-throughput sequencing, cfMeDIP-seq)是最近开发的一种利用抗体富集的方法,该方法利用m⁵C抗体特异性富集甲基化cfDNA片段,然后进行高通量测序^[50]。甲基化限制性内切酶(methylated restriction endonucleases, MREs)是一种广泛使用的基因座特异性DNA甲基化分析工具。MREs对甲基化的ctDNA表现出不同的敏感性。酶切后,其可通过随后的实时或定量PCR和测序对甲基化进行定性分析。cfDNA是非随机片段化的,包含大量可用于癌症检测的分子信息,是近些年兴起的另一种液体活检的生物标志物^[51]。最近的一项研究表明,使用cfDNA片段化模式可以推断cfDNA分子甲基化模式,从而摆脱了亚硫酸氢盐测序的限制^[52]。在这项研究中,研究人员利用靠近CpG位点的碎片模式来推断其甲基化状态。片段化模式由cfDNA片段末端在特定长度(nt)范围内相对于感兴趣的CpG的每个位置的频率来描述,被称为切割谱。这种切割谱根据CpG位点的甲基化状态而有所不同,为使用片段组学特征进行甲基化分析提供了基础。

4 肿瘤液体活检中的组蛋白修饰

核小体在蛋白质-蛋白质和蛋白质-DNA的相互作用下保持稳定,但这不是恒定的。表观遗传修饰改变核小体的构象和相互作用,不同的组蛋白变体引起相应功能的结构变异^[53-54]。组蛋白半衰期约为220天。不同细胞、组织、染色质区域的组蛋白半衰期不同,大脑中组蛋白半衰期约为72天,肝细胞中组蛋白半衰期为18~61小时。科研人员在健康和疾病个体中都能检测到主要来源于凋亡和坏死的循环组蛋白^[55]。组蛋白被活化的细胞分泌到细胞外,充当损伤相关分子模式,进而影响炎症。中性粒细胞通过释放核心组蛋白、基因组DNA和抗菌分子来

抵抗入侵的病原体,进而发挥特异性免疫防御机制,这一过程被称为“中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)”^[55]。NETs可引起不同类型的细胞死亡,引起组蛋白的进一步释放。因此,检测细胞外空间的组蛋白释放对肿瘤液体活检不可或缺^[4,56]。在肝癌组织样本中,发现H3K27me₃,而富含H3K27me₃的区域包括一组编码对正常肝脏稳态至关重要的转录因子的基因,包括*NR1H4*、*HNF1A*、*HNF4A*和*KLF9*^[57]。在结直肠癌样本中,H3K27Ac明显上调。H3K9me₃在侵袭性CRC组织中特异性增加,与结直肠癌患者淋巴结转移的存在呈正相关^[58]。在肺癌中,联合检测组蛋白修饰(H3K4me₂、H3K9ac和H2AK5ac)可预测生存率,H4K20me₃下调与I期肺癌患者的预后不良有关^[59]。胰腺导管腺癌(ductal adenocarcinoma of the pancreas, PDAC)是侵袭性很强的实体瘤,其进展与表观遗传学变化有关^[60-61]。腺泡细胞命运基因H3K27me₃的获得和H3K4me₃的缺失促进了腺泡到导管的化生,促进了PDAC的进展^[62]。循环核小体的组蛋白修饰可作为胰腺癌的表观遗传标志物,区分肿瘤患者和对照病例,灵敏度和特异性高^[63]。胰腺癌患者H2AK119Ub/核小体和H3K4me₂/核小体的值均升高。此外,H3K27me₃在接受根治性放化疗的食管癌患者中表达水平越高,肿瘤分期和大小越大。H3K18ac和H3K27me₃低表达与食管鳞状细胞癌的预后较好相关。赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1的高表达和一些低水平的组蛋白修饰(H3K9ac、H3K18ac、H4K12ac、H3K4me₂、H4K20me₂和H4K3me₂)参与乳腺癌预后^[64]。循环组蛋白和肿瘤相关的表观遗传学修饰具备作为肿瘤液体活检标志物的巨大潜力,但是,目前尚未明确其与癌症早期检测的相关性,这还需要更进一步的研究。

循环组蛋白的检测方法主要有酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、蛋白质组学和ImageStream多光谱成像细胞术^[65]。ELISA技术具有检测成本低、操作难度小、检测标准化等优点,通常用于定量检测循环组蛋白/核小体或液体样品中组蛋白的特异性修饰,例如H3K4me₃和H3K27me₃^[66]。通过ELISA检测循环核小体相关标志物(H2AK119Ub、H3K9Ac、H3K27Ac和核小体总水平)以评估I和II期结直肠癌情况^[67]。将ELISA检测循环核小体的PTM和血清学分析碳水化合物抗

原19-9(carbohydrate antigen19-9, CA 19-9)结合,大幅度提高胰腺癌的检测灵敏度和特异性^[63]。

蛋白质组学主要利于质谱(mass spectrum-MS)、抗体/抗原阵列技术、基于适配体的检测、邻近延伸分析(proximity extension assay, PEA)、反相蛋白质阵列(revers phase protein microArray, RPPA)等技术,提供蛋白质定性、定量和无偏移的PTM分析^[68]。一项研究开发了通过抗体介导的蛋白质A-抗坏血酸过氧化物酶2(protein A-ascorbate peroxidase 2, pA-APEX2)标记 AMAPEX串联质谱检测组蛋白修饰的近端蛋白(包括H3K27me₃、H3K9me₃、H3K4me₃、H4K5ac和H4K12ac)^[69]。抗体/抗原阵列技术通过共价结合、亲和结合或物理包埋将特异性抗体/抗原固定到修饰的平面底物上,使用荧光、化学发光或寡核耦合标签标记样品,以实现不同的信号放大和检测,进而捕获和抗体/抗原结合的样品中的靶蛋白,这项技术可以表征一千多种蛋白质或修饰形式的蛋白质^[70-71]。目前,人类蛋白质组阵列最多可以检测21 000种蛋白质形式,达到约81%的蛋白质组覆盖率,给液体活检提供了可靠的工具^[72]。基于核酸适配体的蛋白质组学技术利用短的单链DNA、RNA或肽,折叠成特定的三级结构后,与天然状态的同源蛋白靶标高亲和力和特异性结合,再通过表征和定量结合蛋白,来分析样品中靶蛋白的丰度^[73-74]。一项基于纳米核酸适配体蛋白质组学研究建立了包含约20万个组学信息的卵巢癌血清蛋白组学数据库,针对从数据库中筛选出的关键蛋白标志物构建核酸适配体,设计了基于核酸适配体的多靶标、多参数的卵巢癌早期诊断技术^[75]。

ImageStream多光谱成像细胞术结合了流式细胞仪和荧光显微镜的优势,不仅可以计算常规流式细胞术中使用的基于标准强度的参数和统计数据,还可以定量许多其他形态特征(例如细胞面积、周长、纵横比、纹理、斑点计数、细胞质心、梯度强度和空间频率)^[76]。ImageStream多光谱成像细胞术可检测淋巴细胞和骨髓细胞群中的H4组蛋白乙酰化,在临床试验中监测药物疗效。

5 肿瘤液体活检中的非编码RNA

循环ncRNA得益于其稳定性和高丰度,能提供有关肿瘤生物学和治疗效果的大量信息,已成为恶性肿瘤早期诊断、治疗监测和预后评估的候选生物

标志物^[77-78]。

miRNA是研究最为广泛的ncRNA, 得益于其在血浆中的稳定性, 广泛用于肿瘤液体活检。血浆miR-155的表达受启动子甲基化调节, 高表达的miR-155水平是预测慢性淋巴细胞白血病患者化疗反应性和总生存期的预后标志^[79-80]。一组血浆外泌体miR-17-5p和miR-185-5p被成功地用于预测晚期CRC患者的FOLFOX4/FOLFIRI反应^[81]。在一项针对高风险患者队列的研究中, 作为筛查计划的一部分, miRNA-BART2-5p的表达能够在临床体征出现之前判断鼻咽癌, 这表明它可以用作临床前标志物, AUC为0.858, 95% CI为0.765~0.951^[82]。此外, 由于miRNA在体液中的稳定性高的优势, 部分miRNA已被用于开发癌症的辅助诊断。例如, 血清miR-25和粪便miR-92a检测试剂盒已被NMPA批准分别用于胰腺癌和肠癌的临床诊断。在肝癌领域, 多组合miRNA试剂盒(血浆miR-21、miR-26a、miR-27a、miR-122、miR-192、miR-223和miR-801检测试剂盒)相比单一的检测试剂盒, 具有检测灵敏度和特异性高的优势。在前列腺癌领域, 尿液PCA3 lncRNA和PSA mRNA的联合诊断已被美国FDA批准用于液体活检, 辅助临床决策。在ER-/PR-/HER2-乳腺癌患者中, miR-200b-3p和miR-190a水平升高以及miR-512-5p水平降低, 可预测新辅助化疗反应的效果。胶质母细胞瘤患者通过检测脑脊液中microRNA(miR-30e、miR-140、let-7b、miR-10a、miR-21-3p、miR-10b和miR-196b)谱用于预测癌症预后^[6]。

lncRNA作为癌基因或肿瘤抑制因子在癌症的发生和发展中发挥复杂而精确的调节作用^[83]。血清lncRNA-AC007271.3的表达结合血清鳞状细胞癌抗原的分析, 可用于区分口腔鳞状细胞癌患者与正常对照组, AUC为0.902(0.849~0.955), 敏感性为82.5%, 特异性为91.4%。此外, AC007271.3表达与病理分化程度($P=0.022$)、临床分期($P=0.005$)和淋巴转移($P=0.011$)有关, 但与年龄、性别或酒精史无关, 这表明血清lncRNA-AC007271.3能作为口腔鳞状细胞癌患者液体活检标志物^[84-85]。另一项研究, 通过多组学筛查对新辅助化疗有效的晚期胃癌患者外泌体富集部分的mRNA、miRNA和lncRNA谱, 筛选到6个有效的外泌体RNA(let-7i-5p、miR-1307-3p、LZIC、SRSF6、lncFTH1-211和lncPTMA-209), 建立了外泌

体RNA生物标志物模型, 该模型有助于区分出对新辅助化疗有效的晚期胃癌患者, 并对其提供针对性治疗, 提高疗效^[86]。

circRNA已被报道有作为癌症预后、诊断、预测性生物标志物的巨大潜力。非小细胞肺癌患者中circFGFR1的表达水平和预后负相关^[87]。和正常组织比较, 自噬相关的circCDYL和circSEPT9在乳腺癌组织中表达上调, 与肿瘤负荷增加正相关, 可作为乳腺癌患者疾病进展和治疗反应的重要预后和预测因素^[88-89]。

piRNA可通过多种机制, 例如DNA甲基化、组蛋白标记沉积、mRNA衰变和降解、蛋白质修饰等, 调控靶基因的表达, 进而促进肿瘤发生^[90]。piRNA失调促进癌细胞恶性表型, 在癌症诊断和预后中发挥重要的临床价值。在胃癌诊断中, piR-651、piR-823的AUCs以及两者的组合分别为0.841、0.822、0.860, 这提示其可作为液体活检的候选标志物^[91]。

目前, 循环RNA检测主要有以聚合酶链式反应(RCR)为基础的扩增反应和以下一代测序(next-generation sequencing, NGS)为基础的高通量RNA测序技术, 例如small RNA-seq、HEBER-seq(high efficiency barcoded extracellular RNA sequencing)等^[92]。PCR检测技术灵敏度高、准确性高, 但是获得信息局限, 适合微量核酸检测; NGS检测技术速度快、覆盖范围广, 可以完成全基因组或转录组高通量的检测, 广泛用于肿瘤液体活检。small RNA-seq主要用于检测生物体液和组织样本中miRNA。为了克服small RNA-seq靶miRNA读取数低、随机错误序列读取等局限, 研究者开发了将重悬的细胞分散到纳米孔芯片中, 通过显微镜选择单个活细胞, 制备小RNA文库, 进行测序和数据分析的平行单细胞小RNA测序技术(parallel single-cell small RNA sequencing, PSCSR-seq)。PSCSR-seq具有高精度和重复性好的优点, 成功解析肺癌中的细胞群, 并鉴定具有诊断或治疗价值的肿瘤特异性miRNA^[93]。HEBER-seq通过裂解血浆、尿液、脑脊液等其他体液样本中的外泌体, 释放RNA分子, 每个样本加入独立的Barcode Beads, 通过磁珠回收、合并样本、多样本混合建库和测序分析, 能同时获得mRNA和lncRNA的数据, 应用于液体活检生物标志物开发、用药指导及病程检测标志物开发、病毒RNA检测等领域。

6 总结和展望

表观遗传生物标志物的检测是肿瘤液体活检的一个新兴领域,在肿瘤的早诊早筛、复发监测、肿瘤亚型鉴定以及对治疗反应和结果的预测等方面均发挥着重要的作用。在这篇综述中,我们介绍了目前肿瘤液体活检中主要的表观遗传学标志物和检测方法及其在临床中的应用。表观遗传的改变与肿瘤的发生发展十分密切,通过液体活检的方式检测表观遗传的变化相较传统的肿瘤检测方法具有巨大的优势,但是目前在临床应用上还存在着一些问题需要解决。首先是检测方法的敏感性和特异性的双重挑战,例如以ctDNA为检测对象的方法会面对从患者生物体液中获取的DNA数量低、易降解等困难,尤其是在肿瘤的早期。其次是缺乏统一的样本采集、处理、存储以及分析的标准,导致不同的检测方案之间缺乏可比性。最后是目前检测技术需要设备先进的实验室,价格也比较高昂,在基层的医院较难开展。尽管如此,相信随着技术的进步以及更多的临床实验的开展,肿瘤液体活检表观遗传标志物检测将在肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] CROSBY D, BHATIA S, BRINDLE K M, et al. Early detection of cancer [J]. *Science*, 2022, 375(6586): eaay9040.
- [3] 王传新. 肿瘤液体活检[J]. *山东大学学报(医学版)*(WANG C X. Liquid biopsy of tumor [J]. *Journal of Shandong University, Health Science*), 2021, 59(9): 64-71.
- [4] NIKANJAM M, KATO S, KURZROCK R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 131.
- [5] NEBBIOSO A, TAMBARO F P, DELL'AVERSANA C, et al. Cancer epigenetics: moving forward [J]. *PLoS Gene*, 2018, 14(6): e1007362.
- [6] PALANCA-BALLESTER C, RODRIGUEZ-CASANOVA A, TORRES S, et al. Cancer epigenetic biomarkers in liquid biopsy for high incidence malignancies [J]. *Cancers*, 2021, 13(12): 3016.
- [7] 刘洋, 尹纯, 贾永峰, 等. 肿瘤液体活检的临床应用与挑战[J]. *临床检验杂志*(LIU Y, YIN C, JIA Y F, et al. Clinical application and challenge of liquid tumor biopsy. *Chin J Clin Lab Sci*), 2019, 37(8): 561-3,73.
- [8] IGNATIADIS M, SLEDGE G W, JEFFREY S S. Liquid biopsy enters the clinic: implementation issues and future challenges [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 297-312.
- [9] LI P, LIU S, DU L, et al. Liquid biopsies based on DNA methylation as biomarkers for the detection and prognosis of lung cancer [J]. *Clin Epigenetics*, 2022, 14(1): 118.
- [10] THIERRY A R, EL MESSAOUDI S, GAHAN P B, et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology [J]. *Cancer Metast Rev*, 2016, 35(3): 347-76.
- [11] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985-90.
- [12] LUO H, WEI W, YE Z, et al. Liquid biopsy of methylation biomarkers in cell-free DNA [J]. *Trends Mol Med*, 2021, 27(5): 482-500.
- [13] SORBER L, ZWAENEPOEL K, JACOBS J, et al. Circulating cell-free DNA and RNA analysis as liquid biopsy: optimal centrifugation protocol [J]. *Cancers*, 2019, 11(4): 458.
- [14] KAN C M, PEI X M, YEUNG M H Y, et al. Exploring the role of circulating cell-free RNA in the development of colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 11026.
- [15] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [16] YU W, HURLEY J, ROBERTS D, et al. Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges [J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(4): 466-77.
- [17] HOGG S J, BEAVIS P A, DAWSON M A, et al. Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity [J]. *Nat Rev Drug Dis*, 2020, 19(11): 776-800.
- [18] BATES S E. Epigenetic therapies for cancer [J]. *New Eng J Med*, 2020, 383(7): 650-63.
- [19] MATTEI A L, BAILLY N, MEISSNER A. DNA methylation: a historical perspective [J]. *Trends Genet*, 2022, 38(7): 676-707.
- [20] MOORE L D, LE T, FAN G. DNA methylation and its basic function [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1): 23-38.
- [21] NISHIYAMA A, NAKANISHI M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer [J]. *Trends Genet*, 2021, 37(11): 1012-27.
- [22] ZHANG Y, SUN Z, JIA J, et al. Overview of histone modification [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1283: 1-16.
- [23] AUDIA J E, CAMPBELL R M. Histone modifications and cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(4): a019521.
- [24] ANASTASIADOU E, JACOB L S, SLACK F J. Non-coding RNA networks in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(1): 5-18.
- [25] HILL M, TRAN N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(4): dmm047662.
- [26] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-81.
- [27] CHEN L, SHAN G. CircRNA in cancer: fundamental mechanism and clinical potential [J]. *Cancer Lett*, 2021, 505: 49-57.
- [28] CENTORE R C, SANDOVAL G J, SOARES L M M, et al. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes: emerging mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Trends Genet*, 2020, 36(12): 936-50.
- [29] JAMSHIDI A, LIU M C, KLEIN E A, et al. Evaluation of cell-free DNA approaches for multi-cancer early detection [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(12): 1537-49, e12.
- [30] NIAN J, SUN X, MING S, et al. Diagnostic accuracy of methylated SEPT9 for blood-based colorectal cancer detection: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2017, 8(1): e216.

- [31] LUO H, ZHAO Q, WEI W, et al. Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(524): eaax7533.
- [32] CAI G, CAI M, FENG Z, et al. A multilocus blood-based assay targeting circulating tumor DNA methylation enables early detection and early relapse prediction of colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(6): 2053-6.e2.
- [33] A stool DNA test (Cologuard) for colorectal cancer screening [J]. *JAMA*, 2014, 312(23): 2566.
- [34] WAN J C M, MASSIE C, GARCIA-CORBACHO J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4): 223-38.
- [35] TAIEB J, TALY V, HENRIQUES J, et al. Prognostic value and relation with adjuvant treatment duration of ctDNA in stage III colon cancer: a post hoc analysis of the PRODIGE-GERCOR IDEA-France trial [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(20): 5638-46.
- [36] MO S, YE L, WANG D, et al. Early detection of molecular residual disease and risk stratification for stage I to III colorectal cancer via circulating tumor DNA methylation [J]. *JAMA Oncol*, 2023, 9(6): 770-8.
- [37] JIANG W, WANG P G, ZHAN Y, et al. Prognostic value of p16 promoter hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis [J]. *Cancer Invest*, 2014, 32(2): 43-52.
- [38] LIU Y, CHEW M H, THAM C K, et al. Methylation of serum SST gene is an independent prognostic marker in colorectal cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(9): 2098-108.
- [39] PICARDO F, ROMANELLI A, MUINELO-ROMAY L, et al. Diagnostic and prognostic value of B4GALT1 hypermethylation and its clinical significance as a novel circulating cell-free DNA biomarker in colorectal cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1598.
- [40] POWRÓZEK T, KRAWCZYK P, NICOŚ M, et al. Methylation of the DCLK1 promoter region in circulating free DNA and its prognostic value in lung cancer patients [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(4): 398-404.
- [41] BALGKOURANIDOU I, CHIMONIDOU M, MILAKI G, et al. Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(8): 2054-62.
- [42] MASTORAKI S, BALGKOURANIDOU I, TSAROUCHEA E, et al. KMT2C promoter methylation in plasma-circulating tumor DNA is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(9): 2412-22.
- [43] BARAULT L, AMATU A, SIRAVEGNA G, et al. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer [J]. *Gut*, 2018, 67(11): 1995-2005.
- [44] BOECKX N, OP DE BEECK K, BEYENS M, et al. Mutation and methylation analysis of circulating tumor DNA can be used for follow-up of metastatic colorectal cancer patients [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2018, 17(2): e369-e79.
- [45] SUN K, JIANG P, CHAN K C, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(40): E5503-12.
- [46] GAI W, JI L, LAM W K J, et al. Liver- and colon-specific DNA methylation markers in plasma for investigation of colorectal cancers with or without liver metastases [J]. *Clin Chem*, 2018, 64(8): 1239-49.
- [47] FROMMER M, MCDONALD L E, MILLAR D S, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(5): 1827-31.
- [48] BECK S, RAKYAN V K. The methylome: approaches for global DNA methylation profiling [J]. *Trends Genet*, 2008, 24(5): 231-7.
- [49] HUANG J, WANG L. Cell-free DNA methylation profiling analysis-technologies and bioinformatics [J]. *Cancers*, 2019, 11(11): 1741.
- [50] WEBER M, DAVIES J J, WITTIG D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells [J]. *Nat Gene*, 2005, 37(8): 853-62.
- [51] LO Y M D, HAN D S C, JIANG P, et al. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies [J]. *Science*, 2021, 372(6538): eaaw3616.
- [52] ZHOU Q, KANG G, JIANG P, et al. Epigenetic analysis of cell-free DNA by fragmentomic profiling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(44): e2209852119.
- [53] JOSEPH F M, YOUNG N L. Histone variant-specific post-translational modifications [J]. *Sem Cell Dev Biol*, 2023, 135: 73-84.
- [54] SHIRVALILOO M. The landscape of histone modifications in epigenomics since 2020 [J]. *Epigenomics*, 2022, 14(23): 1465-77.
- [55] PATEL B V, LEE T M L, O'DEA K. CLUSTERING Circulating Histones in Sepsis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, 208(2): 125-7.
- [56] TSONEVA D K, IVANOV M N, CONEV N V, et al. Circulating histones to detect and monitor the progression of cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 942.
- [57] ARECHEDERRA M, RECALDE M, GÁRATE-RASCÓN M, et al. Epigenetic biomarkers for the diagnosis and treatment of liver disease [J]. *Cancers*, 2021, 13(6): 1265.
- [58] EL BAIRI K, TARIQ K, HIMRI I, et al. Decoding colorectal cancer epigenomics [J]. *Cancer Gene*, 2018, 220: 49-76.
- [59] TENG P C, LIANG Y, YARMISHYN A A, et al. RNA modifications and epigenetics in modulation of lung cancer and pulmonary diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 205.
- [60] KAPSZEWICZ M, MAŁECKA-WOJCIESKO E. Simple serum pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) protein biomarkers-is there anything in sight [J]? *J Clin Med*, 2021, 10(22): 5463.
- [61] PIFFOUX M, ERIAU E, CASSIER P A. Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(2): 333-44.
- [62] ELRAKAYBI A, RUESS D A, LÜBBERT M, et al. Epigenetics in pancreatic ductal adenocarcinoma: impact on biology and utilization in diagnostics and treatment [J]. *Cancers*, 2022, 14(23): 101.
- [63] BAUDEN M, PAMART D, ANSARI D, et al. Circulating nucleosomes as epigenetic biomarkers in pancreatic cancer [J]. *Clin Epigenetics*, 2015, 7: 106.
- [64] THOMAS M L, MARCATO P. Epigenetic modifications as biomarkers of tumor development, therapy response, and recurrence across the cancer care continuum [J]. *Cancers*, 2018, 10(4): 101.

- [65] LI Y. Modern epigenetics methods in biological research [J]. *Methods*, 2021, 187: 104-13.
- [66] DAI B, RASMUSSEN T P. Global epiproteomic signatures distinguish embryonic stem cells from differentiated cells [J]. *Stem cells*, 2007, 25(10): 2567-74.
- [67] RAHIER J F, DRUEZ A, FAUGERAS L, et al. Circulating nucleosomes as new blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer [J]. *Clin Epigenet*, 2017, 9: 53.
- [68] DING Z, WANG N, JI N, et al. Proteomics technologies for cancer liquid biopsies [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 53.
- [69] LI X, ZHOU J, ZHAO W, et al. Defining proximity proteome of histone modifications by antibody-mediated protein a-APEX2 labeling [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2022, 20(1): 87-100.
- [70] YANG D, SINGH A, WU H, et al. Determination of high-affinity antibody-antigen binding kinetics using four biosensor platforms [J]. *J Vis Exp*, 2017, (122): 5569.
- [71] GASTER R S, HALL D A, WANG S X. Autoassembly protein arrays for analyzing antibody cross-reactivity [J]. *Nano Lett*, 2011, 11(7): 2579-83.
- [72] SYU G D, DUNN J, ZHU H. Developments and applications of functional protein microarrays [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19(6): 916-27.
- [73] RAY J, KRUSE A, OZER A, et al. RNA aptamer capture of macromolecular complexes for mass spectrometry analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(15): e90.
- [74] SINITSYNA V V, VETCHER A A. Nucleic acid aptamers in nanotechnology [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(5): 1079.
- [75] LIU Y, QIAN X, RAN C, et al. Aptamer-based targeted protein degradation [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(7): 6150-64.
- [76] RODRIGUES M A, PROBST C E, ZAYATS A, et al. The *in vitro* micronucleus assay using imaging flow cytometry and deep learning [J]. *NPJ Syst Biol Appl*, 2021, 7(1): 20.
- [77] LUO Z D, WANG Y F, ZHAO Y X, et al. Emerging roles of non-coding RNAs in colorectal cancer oxaliplatin resistance and liquid biopsy potential [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(1): 1-18.
- [78] GARBO E, DEL RIO B, FERRARI G, et al. Exploring the potential of non-coding RNAs as liquid biopsy biomarkers for lung cancer screening: a literature review [J]. *Cancers*, 2023, 15(19): 4774.
- [79] AGUILAR-HERNANDEZ M M, RINCON CAMACHO J C, GALICIA GARCIA G. Extracellular vesicles and their associated miRNAs as potential prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Cur Oncol Rep*, 2021, 23(6): 66.
- [80] MARDANI R, JAFARI NAJAF ABADI M H, MOTIEIAN M, et al. MicroRNA in leukemia: tumor suppressors and oncogenes with prognostic potential [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8465-86.
- [81] SUR D, BALACESCU L, CAINAP S S, et al. Predictive efficacy of miR-125b-5p, miR-17-5p, and miR-185-5p in liver metastasis and chemotherapy response among advanced stage colorectal cancer patients [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 651380.
- [82] DIEZ-FRAILE A, CEULAER J, DERPOORTER C, et al. Circulating non-coding RNAs in head and neck cancer: roles in diagnosis, prognosis, and therapy monitoring [J]. *Cells*, 2020, 10(1): 48.
- [83] TAN Y T, LIN J F, LI T, et al. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer [J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(2): 109-20.
- [84] SHAO T, HUANG J, ZHENG Z, et al. SCCA, TSGF, and the long non-coding RNA AC007271.3 are effective biomarkers for diagnosing oral squamous cell carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(1): 26-38.
- [85] DEY GHOSH R, GUHA MAJUMDER S. Circulating long non-coding RNAs could be the potential prognostic biomarker for liquid biopsy for the clinical management of oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancers*, 2022, 14(22): 5590.
- [86] GUO T, TANG X H, GAO X Y, et al. A liquid biopsy signature of circulating exosome-derived mRNAs, miRNAs and lncRNAs predict therapeutic efficacy to neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 216.
- [87] KRISTENSEN L S, JAKOBSEN T, HAGER H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3): 188-206.
- [88] ZHENG X, HUANG M, XING L, et al. The circRNA circSEPT9 mediated by E2F1 and EIF4A3 facilitates the carcinogenesis and development of triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 73.
- [89] LIANG G, LING Y, MEHRPOUR M, et al. Autophagy-associated circRNA circCDYL augments autophagy and promotes breast cancer progression [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 65.
- [90] SU J F, CONCILLA A, ZHANG D Z, et al. PIWI-interacting RNAs: mitochondria-based biogenesis and functions in cancer [J]. *Genes Dis*, 2021, 8(5): 603-22.
- [91] CHENG J, DENG H, XIAO B, et al. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates *in vitro* and *in vivo* tumor suppressive activity in human gastric cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(1): 12-7.
- [92] BOYLE T A, BOSSLER A D. RNA sequencing steps toward the first line [J]. *Cancer*, 2023, 129(15): 2294-6.
- [93] LI J, ZHANG Z, ZHUANG Y, et al. Small RNA transcriptome analysis using parallel single-cell small RNA sequencing [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 7501.