

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.27.050

结直肠癌无创筛查技术研究进展*

曹祖聪¹ 刘云龙² 邹秉杰² 王韵淞¹ 周国华^{1,2Δ}

(1 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009; 2 南京军区南京总医院药理科 江苏 南京 210002)

摘要:结直肠癌和高危腺瘤的早期诊断及治疗,能够大大降低其死亡率。因而,在临床普及结直肠癌筛查有助于遏制该疾病的危害。目前,结肠镜检查是结直肠癌诊断的金标准,但该方法需要肠道准备,且具有侵入性,易造成肠道穿孔等缺点,导致患者依从性差,不利于其作为大规模筛查技术推广实施。近年来非侵入性的结直肠癌诊断方法发展迅速,这类方法主要通过检测粪便或血液样本中与结直肠癌发生相关的生物标志物,为结直肠癌的无创筛查提供了可能。但由于粪便、血液样本的成分复杂,对其中生物标志物的检测技术仍然在不断研究和完善中。本文分别从基于粪便样本和血液样本的检测技术两方面入手,探讨了近年来结直肠癌无创筛查技术的研究进展。

关键词:结直肠癌;早期筛查;非侵入性;粪便;血液

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)27-5396-05

The Progress of Non-invasive Screening Methods for Colorectal Cancer*

CAO Zu-cong¹, LIU Yun-long², ZOU Bing-jie², WANG Yun-song¹, ZHOU Guo-hua^{1,2Δ}

(1 School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China;

2 Department of pharmacology, Jinling Hospital, Nanjing, Jiangsu, 210002, China)

ABSTRACT: Early detection and treatment of high-risk adenomas and colorectal cancer (CRC) can reduce mortality of this disease. CRC screening is aimed at minimizing its harm and colonoscopy is presently the gold standard for it. However, colonoscopy needs bowel preparation and is invasive with high risk of intestinal perforation, causing a bad compliance, which is unfavorable to its popularization and application. Recently, non-invasive detection methods for CRC have gone through a rapid development. Tests based on CRC-related biomarkers in fecal and blood samples provide new options for non-invasive CRC screening. However, detection methods for these biomarkers still need further research and improvement because of the complex composition of feces and blood. In the two aspects of fecal tests and blood tests, the progress of recent studies on non-invasive screening methods for CRC was reviewed in this article.

Key words: CRC; Early screening; Non-invasive; Feces; Blood

Chinese Library Classification(CLC): R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)27-5396-05

前言

作为全球范围内第四大致命癌症,结直肠癌(colorectal cancer, CRC)每年造成近70万人丧生(2012)^[1]。其发生率具有区域差异,在西方发达国家尤其常见。随着国内经济的快速发展,我国结直肠癌的发生率也呈现出上升趋势^[2]。

结直肠癌筛查是遏制结直肠癌发生发展的有效途径,大部分结直肠癌造成的死亡可以通过筛查而避免^[3]。美国癌症协会建议50-75岁的一般风险人群要定期进行结直肠癌筛查。

一个好的结直肠癌筛查方法应当具有以下特征:(1)风险小,既包括直接风险(检测方法本身可能造成的身体伤害),也包括间接风险(如果需要进一步检测,则可能产生下游风险);(2)特异性高,高特异性和低假阳性率有助于减少非必需的检测和过度诊断,同时降低筛查费用;(3)灵敏度高,检测方法应当足够灵敏,并在结直肠癌无法治疗之前检测到病变发生;(4)

用于筛查的检测方法还应当具备便于获取,价格合理,检测方式易于接受等特征。

早期的结直肠癌筛查方法有粪便潜血试验(fecal occult blood test, FOBT),乙状结肠镜检查及结肠镜检查。1988年以来,不同的研究机构和专家指出,相较于其他两种筛查方法,结肠镜检查具有最高的灵敏度和特异性,而结肠镜检查逐渐成为目前最普遍的筛查方法和金标准。然而,结肠镜检查是一种侵入性检查,具有出血风险,且需要肠道准备,导致患者依从性差,不利于其推广。非侵入性筛查技术,可以为病人提供符合其个人偏好和满足其个性化要求的检测方式,从而增加患者的依从性,更利于结直肠癌筛查的推广和实施。

近年来非侵入性的大肠癌筛查技术不断发展,一些较成熟的检测方法已商业化并得到了临床应用,成为遏制结直肠癌的有力武器。然而,多数非侵入性筛查手段仍处于研究初期阶段,未得到大规模研究的验证,而一些较成熟方法成本过高或灵敏

* 基金项目:国家自然科学基金项目(21275161);江苏省临床医学技术专项(BL2012061)

作者简介:曹祖聪(1990-),硕士研究生,研究方向:分子遗传学,电话:15537101421, E-mail: 920878710@qq.com

Δ 通讯作者:周国华(1964-),博士生导师,研究方向:分子遗传学, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

(收稿日期:2016-11-22 接受日期:2016-12-12)

度不高,成为制约其发展的障碍。本文从粪便检测和血液检测两大类入手,展示了非侵入性结直肠癌筛查方法的研究成果与不足,并对其发展方向进行了展望,以期更多专家学者对结直肠癌非侵入性筛查的重视与研究。

1 基于粪便检测的结直肠癌筛查技术

结直肠癌的粪便检测是最常见的非侵入性检测方法。根据靶标不同,粪便检测可分为基于生化指标、基于 RNA 标志物和基于 DNA 标志物的检测。

1.1 粪便生化指标检测

粪便潜血试验(FOBT)已有超过 40 年的应用历史。其主要原理是,利用愈创木脂(guaiac)能够检测血红蛋白中血红素的特性,判断粪便中是否存在潜血,而粪便中出现潜血是结直肠癌可能显现的征兆之一。早期的 FOBT 检测灵敏度较差且波动大(15 %-30 %) [4],而随着技术的不断改进,最新的高灵敏 FOBT 商业化产品(如 Hemocult SENSE)灵敏度可达 79.4 % [5]。多个随机对照研究表明,FOBT 筛查可以降低 15 %-33 % 的结直肠癌死亡率 [6]。

FOBT 是一种简单、方便、低成本的非侵入性结直肠癌筛查方法 [7]。其缺陷在于,仅有在肠道出血异常增多时,FOBT 才能检测到病变的发生,而不少结直肠癌或恶化前的息肉并不出血,或只间歇性出血。这导致 FOBT 灵敏度降低,也使得部分情况下需要进行多次取样。

粪便免疫化学测试(fecal immunochemical test, FIT) [8,9] 是粪便潜血试验的一种变型。与检测血红素的 gFOBT (guaiac-based FOBT) 不同, FIT 通过特异性抗体直接检测未被消化的血红蛋白。由于球蛋白极易在胃和小肠中被消化,因此 FIT 能够更具选择性地检测出结直肠来源的出血,特异性也更高。

除了血红蛋白,几种白细胞和血浆来源的蛋白也被用于结直肠癌筛查。例如,基于粪便中钙网蛋白(特异存在于嗜中性粒细胞中)的检测,对于结直肠癌和腺瘤息肉的灵敏度分别达约 80 % 和 70 % [10]。其他几种白细胞来源的蛋白(乳铁蛋白、溶菌酶)和血浆蛋白(α -抗胰蛋白酶、白蛋白和转铁蛋白)也被证明有相似的灵敏度。然而这些蛋白检测与 FOBT 相比,对一般风险人群的特异性过低(FOBT 特异性 90 %),不符合大规模筛查项目的要求。

1.2 粪便 RNA 检测

结直肠患者体内多个基因呈现过表达情况,这些基因的 mRNA 是潜在的癌症特异性标志物 [11,12]。从起初的单个 mRNA 表达分析,到后来的 mRNA 表达谱(转录组)分析,粪便 mRNA 检测研究获得了较高的灵敏度和特异性。但 mRNA 极易在粪便环境中被降解的性质,是其作为标志物严重缺陷 [13]。在过去的几年当中,研究热点转向了在粪便中更加稳定的 microRNA (miRNA)。

miRNA 在癌症形成的多步过程中起着致癌基因或抑癌基因的作用,被认为与细胞类型和疾病具有特殊关联 [14]。miRNA 失调与诸多通路密切相关(如 WNT 通路激活, EGFR 信号激活, TGF β 激活及 APC、TP53、KRAS 和 BRAF 基因激活突变)。这些通路的异常是癌症发展的早期特征,因此基于 miRNA 的筛查技术相对 FOBT 或 FIT 等其他粪便筛查技术在早期诊断

方面表现更优。其主要缺陷在于,miRNA 检测依赖于高质量的 RNA 提取产物,片段化的 RNA 则会因扩增效率降低而定量失准。

临床上,使用定量实时 PCR,借助参比基因或非编码 RNA 转录子可以确定 miRNA 的相对表达量。现已有相当数量针对单个 miRNA 或多 miRNA 组合的研究被发表,如 Ahmed [15] 等利用 20 种 miRNA 表达量变化,不仅能高灵敏和高特异性地检测出结直肠癌的发生,还能区分其不同 TNM 分期。然而,该领域研究仍处于初期阶段,多个假说性研究之间表现出较大的分歧,需要进一步独立验证以及大规模基于人群的评估 [16]。

1.3 粪便 DNA 检测

粪便 DNA 作为肿瘤标志物具有以下优势:(1)与间歇性出血不同,DNA 是持续性释放到粪便当中的,灵敏度因此更高,不需要多次取样。(2)DNA 直接来源于肿瘤本身,所以特异性更高,且肿瘤来源的肠道脱落细胞远多于正常健康粘膜细胞,肿瘤来源的 DNA 完整性也高于正常细胞来源 DNA。(3)DNA 检测无需饮食等限制,在粪便运输和储存中也相对稳定。(4)原癌基因和抑癌基因上的 DNA 点突变是肿瘤细胞特异的标志物。

目前已被用于结直肠癌筛查的 DNA 标志物主要分为以下几种:DNA 点突变、微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)、DNA 异常甲基化及长片段 DNA。

1.3.1 DNA 点突变 用于结直肠癌 DNA 突变检测的常见基因有 APC、Kras、DCC 和 TP53 等等。1992 年, Sidransky 首次发表了通过测定粪便中 Kras 突变检测结直肠癌的研究结果 [17],其灵敏度小于 35 %。其后发表的其他检测单个基因突变的研究对结直肠癌的灵敏度通常都小于 40 %,未能达到符合大规模筛查要求的灵敏度和特异性。

1.3.2 微卫星不稳定性 编码区域包含微卫星的基因易受到 MSI 的影响,如果受影响的基因是原癌基因或抑癌基因,则有可能导致结直肠癌的发生。例如微卫星 BAT-26 突变,是用于结直肠癌筛查的有效标志物(主要用于遗传性非息肉结直肠癌)。

1.3.3 DNA 异常甲基化 启动子区域的 DNA 甲基化比例增高是肿瘤发生过程中常见的表观遗传学变化,通常与某些癌症相关基因转录沉默现象相关,因此异常甲基化的 DNA 可以作为肿瘤标志物。例如,一项针对 SFRP2 基因甲基化的小样本研究中,对结直肠癌的检测灵敏度达 77 %-90 %,特异性 77 % [18]。

1.3.4 长片段 DNA 正常情况下,肠道内 DNA 会在细胞凋亡时被内切酶降解为小片段(<200 碱基对),结直肠癌病人肠道内不断脱落的非凋亡肿瘤细胞导致病人粪便中长片段 DNA (>200 碱基对)大量增多,因此对长片段 DNA 具有选择性的检测方法可被用于结直肠癌检测 [19]。

1.3.5 联合多个标志物的粪便 DNA 检测 由于结直肠癌遗传学异质性的存在,尚未发现任何一种在结直肠癌病人当中普遍表达的突变,而单一标志物的检测试验很有可能产生过多假阴性结果,因此,为了获得最佳的灵敏度,需要同时以多个基因变异为靶点进行检测。

2000 年, Exact Sciences 公司设计发表的多靶点检测 panel (PreGen Plus),成为之后多标志物联合检测结直肠癌研究的基础。早期多靶点 panel 的靶点包括 Kras、APC 和 TP53 三个基因的 21 个点突变, BAT-26 微卫星不稳定性,以及长片段 DNA (DNA 完整性试验)。一项基于 2507 位受试者的大规模研究表

明^[20],该 panel 的结直肠癌和腺瘤的检出灵敏度分别为 52 % 和 15.5 %,特异性 94 %。然而,另一项包含 4482 位一般风险成年受试者的研究^[21]中,该 panel 灵敏度仅为 25 % (特异性 96 %)。在该研究的后期工作中,研究者将 Kras 和 APC 的突变与 Vimentin 基因甲基化检测结合,使结直肠癌检出率提高至 58 %, >1 cm 腺瘤检出率提高至 46 %,但特异性降低为 84 %。尽管第一代粪便 DNA 检测方法受到一些指导机构的推荐,但由于检测费用高昂,难以在临床推广应用。

随后的研究工作,从优化粪便处理方法(使用粪便稳定缓冲液,改进 DNA 的探针捕获方法等),选择更优的标志物和开发更灵敏的 DNA 分析检测技术(例如 BEAMing^[22]和 QuARTS^[23]技术)等方面对多靶点的粪便 DNA 检测技术进行了改进。

在 2012 年 Ahlquist 等发表的研究^[23,24]中,研究人员利用 QuARTS 技术测定了 Kras 突变和 4 个基因(NDRG4, BMP3, VIM 和 TFPI2)甲基化水平,结合血红蛋白的免疫分析试验,对结直肠癌和 >1 cm 腺瘤的检测灵敏度分别达到了 90 % 和 89 %,特异性分别为 85 % 和 54 %。在这次研究结果的基础上,研究者针对其基因 panel 进行了改进和更大规模研究^[25],约 10000 名 50-84 岁无症状受试者通过多靶点检测 panel (包括 NDRG4, BMP3 的异常甲基化, Kras 突变和参比基因 β -actin 的分子检测,以及血红蛋白的免疫化学分析)进行了结直肠癌检测。每个标志物的定量分析结果都被放入一个经过验证的逻辑回归方程中进行计算,所得值大于 / 等于阈值则为结直肠癌阳性。作为对照,每个受试者同时接受了商品化的 FIT 检测。结果, FIT 对结直肠癌和癌前息肉的检测灵敏度 73.8 % 和 23.8 %,而该基因 panel 灵敏度达到了 92.3 % 和 42.4 %,并能检测出更多的癌前病变,但特异性(86.6 %)略低于 FIT(94.9 %)。2014 年 8 月,美国 FDA 正式通过了该粪便检测 panel(Cologuard, Exact Sciences Corporation),作为间隔为三年的结直肠癌筛查项目,并享受医疗保险和医疗补助服务中心的医疗补偿。虽然 Cologuard 并不能够完全替代结肠镜检查,其检测结果为阳性的受试者仍需要结肠镜检查的进一步确认,但相对 FIT 检测, Cologuard 的表现更优。

2 基于血液检测的结直肠癌筛查技术

虽然粪便检测具有其独特优势,但大部分人排斥粪便样本收集过程,而基于血液的结直肠癌筛查技术则能弥补这一缺陷。此外,相较于粪便样本,血液样本更易操作和储存,也没有影响靶标分子检测的微生物群落背景。目前血液中用于结直肠癌筛查的靶标同样包括生化指标、RNA 标志物和 DNA 标志物三类。

2.1 血液生化指标检测

血液中的生化指标标志物一方面来源于从癌细胞分泌或脱落的蛋白,另一方面来源于结直肠癌病人免疫应答产生的自身抗体。

常见的结直肠癌单一蛋白标志物有:糖类抗原家族(carbohydrate antigens, CAs),主要有 CA 19-9, CA 50, CA 72-4 等,癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA), p53, sFasL 和 VEGF 等^[26]。CEA 和 CAs 是最早也是被研究最多的结直肠癌血浆蛋白标志物。虽然其相关性已被多数研究验证,但由于 CEA、CAs

对结直肠癌的灵敏度低(18 %-69 %),可靠性差,不适合作为结直肠癌早期筛查的标志物^[27]。大多数其他单一蛋白标志物仅停留在首次研究,一部分标志物的高灵敏表现需要进一步大规模研究验证。

除了用常见的免疫分析方法对单一蛋白进行检测,利用 MALDI-TOF 和 SELDI-TOF 等质谱方法对血浆进行蛋白组学分析也成为当前研究的热门。蛋白组学技术不但可以分析多肽和蛋白总体表达谱,还可以检测出翻译后修饰。新的蛋白标志物正依靠蛋白组学技术不断发现,例如,一项研究将筛选出的 6 个自身抗体与 CEA 结合进行检测,对结直肠癌的灵敏度和特异性分别为 92 % 和 96 %^[28]。

总之,现有的血浆蛋白标志物就筛查目的而言检测灵敏度不足,蛋白组学领域的研究显示出巨大潜力并发掘了新的标志物,需要大规模研究验证。

2.2 血液 RNA 检测

由于 RNA(尤其 mRNA)易被血浆中的 RNA 酶降解,因此 RNA 作为生物标志物的研究具有一定难度。血浆中的 mRNA 主要有两个来源:游离于细胞外的循环 mRNA 和外周血细胞中的 mRNA。目前已有多个研究团队致力于寻找循环 mRNA 作为潜在的结直肠癌检测标志物。常见的 mRNA 标志物基因包括 CEA, CK19, CK20, TERT 和 EGFR 等^[29-32]。不同的研究中,基于这些基因编码的 mRNA 的检测灵敏度波动较大,但表现出了作为肿瘤诊断标志物的潜力。存在的问题是,一方面炎症肠病及非结直肠癌类癌症检出的假阳性结果过多,另一方面,这些研究仍需要大规模随机试验评价其用于结直肠癌筛查的价值。

循环 miRNA 在血液当中相对稳定,不易受 RNA 酶降解和高温、极端 pH 的影响,因此作为具有潜力的血液标志物受到了越来越多的关注。当前研究最受关注的 miRNA 包括 miR601, miR760, miR21, miR29a 和 miR92a 等。例如,一项基于 100 名结直肠癌病人、37 名晚期腺瘤病人和 59 名对照的研究中,结合血浆中 miR29a 和 miR92a 表达变化,对结直肠癌和晚期腺瘤的检测灵敏度达到了 83 % 和 73 % (特异性 80 %-85 %)^[33]。同样的,限于这些研究的样本规模过小,其作为结直肠癌筛查试验的价值需要更多研究的评估。

2.3 血液 DNA 检测

在粪便 DNA 突变检测的报道之后,出现了最早的通过血浆 DNA 突变检测结直肠癌的小规模研究,研究主要集中于 Kras 基因点突变检测,但结直肠癌的实际检出灵敏度只有 43 % 以下(特异性 >93 %)。与粪便检测不同的是,随后的研究尝试将多个 DNA 突变标志物或 DNA 突变与甲基化标志物结合,但检测灵敏度均未得到提升。2005 年, Diehl 等利用 BEAMing 技术对血浆 APC 突变进行检测,对早期结直肠癌的灵敏度达 63 %^[34]。随后,该研究团队对同一批病人分别进行了基于粪便样本和血液样本的突变检测,结果粪便样本的检测灵敏度为 92 %,而血液样本的检测灵敏度仅有 50 %^[22]。

大量针对血浆 DNA 异常甲基化检测的研究中, septin 9 (SEPT9)基因甲基化检测研究最引人注目。SEPT9 基因编码一种与细胞分裂和细胞周期控制相关的 GTP 结合蛋白。2008 年发表的一篇初期研究表明,通过测定病人血浆当中 SEPT9 甲

基化水平,对结直肠癌的检测灵敏度和特异性分别为 72 % 和 90 %^[35]。随后的进一步验证中,该甲基化标志物的灵敏度和特异性达到了 90 % 和 88 %^[36]。目前,已有三种基于检测血浆中甲基化 SEPT9 基因的结直肠癌筛查试剂盒面市:Epi proColon (Epigenomics), ColoVantage™ (Quest Diagnostic) 和 RealTime ms9 (Abbott)。2014 年发表的一项基于 7941 名无症状、一般风险受试者的研究表明,Epi proColon 对结直肠癌的检测灵敏度为 48.2 %,特异性 91.5 %,但对晚期腺瘤的检出率仅为 11.2 %^[37]。同年发表的另一项基于 8000 人的研究表明,Epi proColon 对结直肠癌的检出率为 68 %,但假阳性率高达 20 %^[38]。考虑到成本效益问题,这样的结果使得 Epi proColon 相对其他检测方法并无优势可言。但 Epigenomics 公司声称其产品面向的是尚未接受结直肠癌筛查的人群,他们相信结直肠癌 "一滴血" 式的检测能够减少筛查阻力。2014 年 6 月,美国 FDA 拒绝通过 Epi proColon,并要求公司提供 Epi proColon 能够提高受试者依从性的证据。半年后,Epigenomics 即开展了一项研究,研究者将选择曾经受邀进行结直肠癌筛查但最终未参加的人,随机提供给他们家用 FIT 检测或 Epi proColon 血液检测,并记录受试者的选择情况,公司希望通过这项研究回答 FDA 提出的问题。目前,CFDA 已批准 Epi proColon 在国内的上市销售。

3 总结与展望

作为结直肠癌筛查的传统方法,结肠镜检查有着自身不可克服的缺点,即使在应用广泛的美国,由于其侵入性和肠道准备时的不适感,有超过半数人不愿接受肠镜检查。而近年来结直肠癌无创筛查技术取得了令人瞩目的快速发展,多种基于粪便和血液的非侵入性筛查技术表现出了很高的潜力。本文系统地回顾了近年来结直肠癌无创筛查技术的研究进展,并对基于不同标志物的筛查方法进行了总结和对比。

总的来讲,尽管非侵入性筛查技术发展迅速,一些问题仍制约着其推广普及。例如,多数高灵敏度和特异性的筛查方法涵盖的生物标志物数目过多,增加了标志物富集与检测的成本,导致其费用昂贵(例如,Cologuard 标价为 599 美元,其中医保承担 493 美元)。受试者和医疗保障系统为了将筛查费用控制在可承受的范围内,不得不将两次筛查之间的时间间隔延长,不利于对疾病的及时监控。为减少不必要的检测成本,则需要研究人员不断筛选更优的生物标志物,从而减少标志物数目,建立最高效的标志物组合。另一方面,生物标志物(如粪便 DNA、RNA)的富集提取方法不稳定,直接影响着检测方法的灵敏度/特异性。不同课题组为得到高质量的粪便或血液 DNA/RNA,采取了不同的提取策略:基于磁珠或基于电泳的特异性探针捕获是有效的标志物富集手段^[39],但缺乏通用性;基于离心柱纯化膜的商品化提取试剂盒通用性强^[40],但对标志物的选择性差。如何简化标志物提取流程,提高提取特异性和稳定性,是提升结直肠癌无创筛查技术性能所需克服的又一问题。

尽管如此,可以预见的是,随着检测技术不断进步,新的生物标志物不断被发掘,非侵入性检测方法将向着高通量、低成本、自动化的方向发展,粪便检测和血液检测的结合也成为新的可能。届时,非侵入性的检测方法有可能依靠更高的灵敏度/特异性及更易被接受的检测方式,逐步取代结肠镜检查成为结

直肠癌筛查的主流检测方法。

参考文献 (References)

- [1] Arnold M, Sierra M S, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J]. Gut, 2016[Epub ahead of print]
- [2] Rabeneck L, Horton S, Zauber A G, et al. Colorectal Cancer[M]. Cancer: Disease Control Priorities(Third Edition), 2015, 3(6): 101-119
- [3] Kahi C J, Boland C R, Dominitz J A, et al. Colonoscopy Surveillance After Colorectal Cancer Resection: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer [J]. Gastroenterology, 2016, 150(3): 758-768
- [4] Pignone M, Rich M, Teutsch S M, et al. Screening for colorectal cancer in adults at average risk: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force[J]. Annals of internal medicine, 2002, 137(2): 132-141
- [5] Levin B, Lieberman D A, Mcfarland B, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology[J]. Gastroenterology, 2008, 134(5): 1570-1595
- [6] Brenner D E, Rennert G. Fecal DNA biomarkers for the detection of colorectal neoplasia: attractive, but is it feasible? [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2005, 97(15): 1107-1109
- [7] Bandi P, Cokkinides V, Smith R A, et al. Trends in colorectal cancer screening with home-based fecal occult blood tests in adults ages 50 to 64 years, 2000-2008[J]. Cancer, 2012, 118(20): 5092-5099
- [8] Guy G P Jr, Richardson L C, Pignone M P, et al. Costs and benefits of an organized fecal immunochemical test-based colorectal cancer screening program in the United States [J]. Cancer, 2014, 120(15): 2308-2315
- [9] Smith A, Young G P, Cole S R, et al. Comparison of a brush-sampling fecal immunochemical test for hemoglobin with a sensitive guaiac-based fecal occult blood test in detection of colorectal neoplasia[J]. Cancer, 2006, 107(9): 2152-2159
- [10] Kristinsson J, Nygaard K, Aadland E, et al. Screening of first degree relatives of patients operated for colorectal cancer: evaluation of fecal calprotectin vs. hemoccult II[J]. Digestion, 2001, 64(2): 104-110
- [11] Bosch L J, Carvalho B, Fijneman R J, et al. Molecular tests for colorectal cancer screening [J]. Clinical colorectal cancer, 2011, 10(1): 8-23
- [12] Ren A, Dong Y, Tsoi H, et al. Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer[J]. International journal of molecular sciences, 2015, 16(2): 2810-2823
- [13] 乞宗泰, 邓黎莉, 黄欢, 等. 粪便 RNA 的检测在大肠癌早期诊断中的应用[J]. 遗传, 2010, 32(10): 994-1002
Qi Zong-tai, Deng Li-li, Huang Huan, et al. Advances in early diagnosis of colorectal cancer based on detection of RNAs in stool [J]. HEREDITAS (Beijing), 2010, 32(10): 994-1002
- [14] Hrasovec S, Glavac D. MicroRNAs as Novel Biomarkers in Colorectal Cancer[J]. Frontiers in genetics, 2012, 3: 180
- [15] Ahmed F E, Ahmed N C, Vos P W, et al. Diagnostic microRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in stool: I. Proof of principle[J]. Cancer genomics & proteomics, 2013, 10(3): 93-113

- [16] Robertson D J, Imperiale T F. Stool Testing for Colorectal Cancer Screening[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1286-1293
- [17] Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now?[J]. *BioMed research international*, 2015, 2015: 149014
- [18] Oberwalder M, Zitt M, Wontner C, et al. SFRP2 methylation in fecal DNA--a marker for colorectal polyps [J]. *International journal of colorectal disease*, 2008, 23(1): 15-19
- [19] Zhang Y, Suehiro Y, Shindo Y, et al. Long-fragment DNA as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer [J]. *Oncology letters*, 2015, 9(1): 454-458
- [20] Imperiale T F, Ransohoff D F, Itzkowitz S H, et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population [J]. *The New England journal of medicine*, 2004, 351(26): 2704-2714
- [21] Ahlquist D A, Sargent D J, Loprinzi C L, et al. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia[J]. *Annals of internal medicine*, 2008, 149(7): 441-450
- [22] Diehl F, Schmidt K, Durkee K H, et al. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(2): 489-498
- [23] Ahlquist D A, Zou H, Domanico M, et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(2): 248-256
- [24] Ahlquist D A, Taylor W R, Mahoney D W, et al. The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 test in detecting colorectal neoplasia [J]. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 2012, 10(3): 272-277
- [25] Souverijn J H. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening [J]. *The New England journal of medicine*, 2014, 371(2): 187
- [26] Yoruker E E, Holdenrieder S, Gezer U. Blood-based biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer [J]. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2016, 455: 26-32
- [27] Hundt S, Haug U, Brenner H. Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review [J]. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2007, 16(10): 1935-1953
- [28] Ran Y, Hu H, Zhou Z, et al. Profiling tumor-associated autoantibodies for the detection of colon cancer [J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2008, 14(9): 2696-2700
- [29] Kamiyama H, Noda H, Konishi F, et al. Molecular biomarkers for the detection of metastatic colorectal cancer cells[J]. *World journal of gastroenterology*, 2014, 20(27): 8928-8938
- [30] Chang Y T, Huang C S, Yao C T, et al. Gene expression profile of peripheral blood in colorectal cancer [J]. *World journal of gastroenterology*, 2014, 20(39): 14463-14471
- [31] Ganepola G A, Nizin J, Rutledge J R, et al. Use of blood-based biomarkers for early diagnosis and surveillance of colorectal cancer [J]. *World journal of gastrointestinal oncology*, 2014, 6(4): 83-97
- [32] Mostert B, Sieuwerts A M, Bolt-De Vries J, et al. mRNA expression profiles in circulating tumor cells of metastatic colorectal cancer patients[J]. *Molecular oncology*, 2015, 9(4): 920-932
- [33] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer [J]. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2010, 127(1): 118-126
- [34] Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(45): 16368-16373
- [35] Grutzmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay [J]. *PloS one*, 2008, 3(11): 3759
- [36] Warren J D, Xiong W, Bunker A M, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer [J]. *BMC medicine*, 2011, 9: 133
- [37] Church T R, Wandell M, Lofton-Day C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer[J]. *Gut*, 2014, 63(2): 317-325
- [38] Potter N T, Hurban P, White M N, et al. Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma [J]. *Clinical chemistry*, 2014, 60 (9): 1183-1191
- [39] Zou H, Allawi H, Cao X, et al. Quantification of methylated markers with a multiplex methylation-specific technology [J]. *Clinical chemistry*, 2012, 58(2): 375-383
- [40] Kalmar A, Peterfia B, Wichmann B, et al. Comparison of Automated and Manual DNA Isolation Methods for DNA Methylation Analysis of Biopsy, Fresh Frozen, and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Colorectal Cancer Samples [J]. *Journal of laboratory automation*, 2015, 20(6): 642-651