

SHOX2 基因甲基化辅助诊断肺癌的临床转化现状

Current situation of clinical translation about lung cancer auxiliary diagnosis with *SHOX2* gene methylation assay

宋乐乐^{1,2}, 李月敏¹ (1. 中国人民解放军 309 医院 放射治疗科, 北京 100091; 2. 博尔诚(北京)科技有限公司, 北京 100176)

[摘要] 肺癌是中国发病率首位的癌症,虽然组织学活检和细胞学检测可以确诊肺癌,但其检出时病情多已处于较晚期,且检出率并不理想。*SHOX2* 基因甲基化检测为解决这个问题提供了一个较为有效的选项,多项临床试验证明其与组织学或细胞学检测联合使用提高了确诊率,是辅助确诊肺癌的有效工具。本文回顾了此检测在辅助确诊肺癌方面所进行的临床试验的结果,并对未来的使用方法和研究方向提出建议。

[关键词] 肺癌;小细胞肺癌;非小细胞肺癌;甲基化;*SHOX*; *SHOX2*

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)04-0550-05

肺癌是中国发病率和病死率均居首位的癌症。由于缺乏早期有效的筛查及诊断方法,大多数肺癌患者首诊时已经处于晚期,导致患者五年生存率很低。目前美国国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)和美国肺协会(American Lung Association, ALA)均推荐低剂量螺旋CT(low-dose spiral computed tomography, LDCT)作为筛查手段。然而LDCT筛查费用较高,且发现的肺部肿块未必是肺癌,仍需要其他侵入性诊断方法确定肿块性质。所以目前亟需更有效的肺癌诊断方法以减少甚至避免重复筛查和侵入性检测。近年来,新出现的矮身高同源框2(short stature homeobox 2, *SHOX2*)基因甲基化检测有望成为辅助肺癌确诊的体外诊断方法。本文将首先对此检测的机制做简要介绍,重点回顾应用此检测进行的临床研究的数据,并比较其他检测方法,最后对其未来应用和研究方向进行展望。

1 *SHOX2* 基因的功能和相关疾病

SHOX 基因位于 X 染色体短臂 22.33 (Xp22.33)和 Y 染色体短臂 11.3 位置(Yp11.3),因最初发现其与一系列生长发育迟缓和身材矮小的疾病有关而得名,其作用主要是编码蛋白转录因子。*SHOX* 基因主要调控胚胎早期身体结构发育,对骨骼尤其是四肢骨骼的发育和成熟十分重要^[1-5]。近年研究^[6-8]还发现,*SHOX* 基因直接影响心脏自主节律系统发育。此外,有证据表明 *SHOX* 基因还与神经系统和腭发育有关^[9-12]。

SHOX 基因异常与人类疾病相关。首先,*SHOX*

基因的删除或突变可导致特发性生长迟缓(idiopathic growth retardation)^[13-14],主要表现为身材矮小,伴骨骼的微小异常。其次,*SHOX* 基因的缺失或突变可导致 Langer 肢中骨发育不良(Langer mesomelic dysplasia)^[5,15-17],表现为身材非常矮小,在胳膊和腿的长骨端缩短,以及异常的手腕和前臂的骨发育。第三,*SHOX* 基因的删除或突变可引起 Léri-Weill 软骨骨生成障碍综合征(Léri-Weill dyschondrosteosis)^[14,18-19],类似 Langer 肢中骨发育不良,但其异常不如后者严重。最后,当女性的两个 X 染色体中的一个受到影响时,可引起 Turner 综合征(Turner syndrome)^[14,16,20-21]。

SHOX2 基因又称为 *OG12*、*SHOT* 或 *OG12X* 基因,属于 *SHOX* 基因家族,位于 3q25-q26.1。由于 *SHOX2* 基因与 *SHOX* 基因在蛋白产物水平有 83% 的同源性^[22-23],所以目前认为 *SHOX2* 基因与 *SHOX* 基因的功能有部分重叠^[2]。*SHOX2* 基因主要在人类胚胎的肢芽、鳃弓、鼻突、心脏、中枢神经系统和生殖结节表达^[24]。在四肢发育方面,*SHOX2* 的表达更

[基金项目] 中国博士后科学基金特别资助项目(No. 201003778),北京市科委科技资助项目(No. Z151100003915092)。Project supported by the Postdoctoral Science Foundation of China (No. 201003778), and the Beijing Municipal Science and Technology Project sponsored by the Beijing Municipal Science and Technology Commission (No. Z151100003915092)

[作者简介] 宋乐乐(1979-),男,北京市人,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事肿瘤发病机制、肿瘤诊断与治疗以及钙离子通道结构、功能和相关疾病的研究, E-mail: songlele@sina.com

[通信作者] 李月敏(LI Yuemin, corresponding author), E-mail: liyuemin224@sina.com

靠近近端和中段, 主要在结缔组织和肌肉中, 而 *SHOX* 基因的表达更靠近远端^[2-3]。虽然目前还未发现 *SHOX2* 基因与人类的任何综合征有关, 但在敲除 *SHOX2* 基因的小鼠早期发育中发现心脏结构异常, 包括发育不全的窦房结和静脉窦、有缺陷的心房心肌壁, 以及发育晚期表现的显著增大的右心房。因此, *SHOX2* 基因异常可能导致心脏自主节律失常及心动过缓^[6, 25-26]。

2 *SHOX2* 基因甲基化与肺癌发病的关系

DNA 甲基化是表观遗传学水平基因表达、细胞发育和细胞分化等过程调控的重要方式。异常的 DNA 甲基化在癌症发生过程中有重要作用。DNA 甲基化主要发生在 -C-磷酸-G- (CpG) 位点。CpG 位点中, 胞嘧啶与鸟嘌呤毗邻并以线性方式连接。哺乳动物 60% ~ 90% 的 CpG 处于甲基化状态^[27-28]。未甲基化的 CpG 通常成簇分布并形成 CpG 岛。CpG 岛经常存在于许多基因的 5' 调控区, 特别是启动子区。目前发现癌细胞基因启动子区域高含量的 5-甲基胞嘧啶可造成基因转录沉默^[29-30], 基因转录沉默抑制下游基因产物表达, 往往导致细胞功能异常, 从而使细胞癌变风险增加。

SHOX2 基因有两个较大的 CpG 岛, 一个在基因的 5' 端覆盖约 1 kb 的区域, 一个在 3' 端覆盖约 0.5 kb 的区域^[31]。以肺癌组织或细胞为对象的甲基化研究^[31-36]均发现, *SHOX2* 基因 CpG 岛的甲基化水平比正常组织或细胞明显升高, 即超甲基化现象。目前还不能确定这种超甲基化现象是否为肺癌发生的原因, 但文献报道中两者的相关性十分明显。由于 *SHOX2* 基因编码蛋白转录因子, 其基因的超甲基化对下游基因产物表达有很大影响, 所以 *SHOX2* 基因超甲基化有可能影响多个蛋白的表达, 从而促使细胞癌变。研究^[32-33, 37]还发现, *SHOX2* 基因的超甲基化与其基因扩增及拷贝数量增加相伴发生, 但此种扩增并不导致基因表达的明显升高。这说明在肺癌发生过程中, 发生了多重基因异常, 这些异常发生的先后顺序和因果关系目前暂不清楚。另外, 有报道^[32-34]显示, 肺鳞癌和小细胞肺癌的组织或细胞的超甲基化水平明显高于肺腺癌, 说明甲基化水平在肺癌不同病理类型中具有一定的组织特异性。

3 *SHOX2* 基因甲基化检测可用于肺癌辅助诊断

3.1 *SHOX2* 基因甲基化检测的样本类型

目前, *SHOX2* 基因甲基化检测已经用于临床辅助诊断肺癌。目前在 5 种样品中可以进行 *SHOX2*

基因甲基化检测, 分别是肺癌组织^[35]、肺癌周围淋巴结^[36]、胸腔积液^[38-39]、支气管灌洗液^[31-32, 40]及血浆^[33]。由于在首次气管镜检查中即便采集了组织学和细胞学的样品, 在怀疑肺癌的患者中也有约 50% 无法确诊^[41-42], 这些患者往往需要侵入性的检测手段确诊肿瘤的存在和性质。上述 5 种样品中前 4 种样品的取得属于侵入性检测, 取得的样品均可进行组织学或细胞学的检测, 用于对肺癌的诊断。应用这些样品同时可进行 *SHOX2* 检测, 用于辅助诊断。其中前 3 种样品往往在影像学检测、支气管镜检查后怀疑肺癌时, 或手术取样后进行, 因此确诊的时间会有延迟, 而支气管灌洗液的取得可以和首次气管镜检查同时进行, 以其为样本的 *SHOX2* 基因甲基化检测作为对细胞学检测的辅助诊断方法。另外, 血浆样品 *SHOX2* 基因甲基化检测可以用于肺癌早期检测和筛查, 具有广阔的应用前景。但由于其检测指标还不理想, 所以只有研究性的试剂盒推出, 还未应用于临床。目前, *SHOX2* 基因甲基化的临床应用主要针对以支气管灌洗液为样品的检测, 市场上已经有成熟的经认证的商业化产品, 应用在其他类型样品的检测均属于研究性检测。

3.2 *SHOX2* 基因甲基化检测的效能

SHOX2 甲基化检测在不同类型的样品中表现出不同的灵敏度和特异性。目前发现, 不论采取何种样品, *SHOX2* 基因甲基化检测的特异性均在 90% 以上, 即肺癌阴性患者的假阳性检出率较低, 保证了较低的误诊率。而检测灵敏度的差异较大, 肺癌组织和淋巴结样品的灵敏度 > 94%^[34, 36], 支气管灌洗液样品的灵敏度在 64% ~ 78%^[31-32, 40], 血浆样品灵敏度在 60% 左右^[34], 而胸腔积液样品则不足 40%^[38-39]。灵敏度呈现肺癌组织样品 ≈ 淋巴结样品 > 支气管灌洗液样品 > 血浆样品 > 胸腔积液样品的趋势。造成这种现象的原因可能是由于各种样品中细胞和 DNA 含量的不一致, 甲基化 *SHOX2* DNA 的含量差别也很大。如果样品中 DNA 含量较高, 如组织学样品, 其探测的灵敏度往往较高, 而在 DNA 含量较少的样品, 如胸腔积液样品中, DNA 含量较低, 所以检测的灵敏度较低。另外, 各研究使用的检测方法是较为统一的, 在 8 项独立研究中, 有 6 个采用了 Epi proLung BL Reflex Assay (Epigenomics AG, Berlin, Germany) 检测试剂盒^[32-34, 36, 39-40], 另两个采用了 Qiagen 试剂盒^[31, 38]。Epi proLung BL 是一个 CE 认证的商业化试剂盒, 虽然其标定用途仅限于支气管灌洗液样品, 但研究显示其在组织样品、淋巴结样品、血浆样品中, 均具有较高的灵敏度, 在胸腔积液

样品中也可使用,说明该检测可用于不同类型样本的辅助确诊。值得一提的是,该试剂盒在以血浆样品的检测中的灵敏度为60%,特异性为90%^[33],有潜力成为肺癌早期检测和筛查的工具。

SHOX2 基因甲基化检测的阳性检出率与病理分型有一定的关系。在3个涉及分型的研究中, Schmidt等^[31]和 Dietrich等^[32]的研究以支气管灌洗液样品为对象,而 Kneip等^[33]的研究以血浆为对象,数据显示不论样本来源如何,小细胞肺癌的阳性检出率均为最高,达到80%~97%,其次是肺鳞癌,达到63%~91%,而腺癌的阳性率检出最低,只有39%~77%。这说明 *SHOX2* 基因甲基化检测对小细胞肺癌和肺鳞癌具有较高的灵敏度,而对于肺腺癌灵敏度较差。造成这种现象的原因可能是小细胞肺癌和肺鳞癌细胞中 *SHOX2* 基因甲基化的水平较高,因此阳性检出率较高。*SHOX2* 基因甲基化水平在不同分型肺癌中具有差异性,这种差异是否提示恶性程度的不同及预后的不同,目前还未见报道,因此是有意义的研究方向。此外,不同期的肺癌的阳性检出率呈现随恶性程度增加而增高的趋势,在两个涉及分期的报道中,不论是以支气管灌洗液样品为对象^[32],或是以血浆为对象^[33], I期的检出率均较低,分别只有54%^[32]和27%^[34],而II、III、IV期的检出率较高,分别达到72%, 55%~73%和68%~83%。这一现象说明 *SHOX2* 基因甲基化检测的阳性检出率与肺癌恶性程度呈正相关。其原因可能有两方面的因素,一是随肺癌恶性程度的增高,基因甲基化水平增高,因而甲基化更容易被检测到;二是随恶性程度增高,细胞坏死和更新更加活跃,因而收集到的样品中的DNA含量增高,甲基化基因拷贝数增加,甲基化更容易被检测到。当然,两方面因素有可能同时存在。

3.3 包括 *SHOX2* 基因甲基化检测的多指标肺癌联合检测

由于单独使用组织学、细胞学以及 *SHOX2* 基因甲基化检测的灵敏度或检出率不理想,所以研究人员尝试联合使用组织学 + *SHOX2* 检测或细胞学 + *SHOX2* 检测,以提高确诊率。Darwiche等^[37]使用组织学与 *SHOX2* 检测联合应用,使检测灵敏度提到99%,同时特异性也达到99%,达到了金标准的指标要求。而 Dietrich等^[38]和 ILSE等^[39]以胸腔积液样品为对象,应用细胞学 + *SHOX2* 进行检测,指标比单独使用有所提高,但最终联合检测的灵敏度仍然不理想,分别为36%和58%;其中 Dietrich等还加入了大肠癌早期检测的指标 *SEPT9* 基因甲基化进

行联合检测,但对灵敏度的提升作用有限。然而, ILSE等^[40]以支气管灌洗液样品为对象,利用细胞学 + *SHOX2* 进行检测,使检测的灵敏度和特异性达到69%和98%。由此可见,联合多指标检测可以在一定程度上提高检测的灵敏度和特异性,对肺癌确诊有积极意义。由于肺癌组织学、淋巴结和胸腔积液检测均为进展期癌症的诊断方法,而支气管灌洗和 *SHOX2* 检测是相对较早的检测,所以在目前缺乏早期检测肺癌有效手段的情况下,笔者推荐支气管灌洗 + *SHOX2* 检测作为肺癌早期检测和确诊的手段。当然,细胞学和 *SHOX2* 检测并非100%准确,还应参考患者症状体征以及影像学诊断等证据,对疑似患者进行综合的检查以确诊。

3.4 *SHOX2* 基因甲基化检测预测肺癌预后

除了可以联合或单独应用于肺癌诊断外,目前发现 *SHOX2* 基因甲基化检测对肺癌的预后也有一定的提示作用。有报道^[35]指出,在非小细胞肺癌组织学样品检测中, *SHOX2* 基因低甲基化水平的患者比高甲基化水平的患者表现出疾病进展方面的更高风险。这个发现与目前对甲基化与肿瘤关系的理解有矛盾,因为目前认为甲基化水平的高低与肿瘤恶性程度呈正相关。然而,作者认为肺癌组织中 *SHOX2* 基因的超甲基化可能只是3号染色体局部扩增的一个表象,而3号染色体扩增可能与较好的预后相关。还有研究^[38]发现,与胸腔积液 *SHOX2* 基因甲基化检测阴性的癌症(不限于肺癌,也包括其他癌)患者相比,阳性的癌症患者的生存时间明显缩短,说明 *SHOX2* 基因甲基化可作为预测多种癌症预后的指标。同时,也说明 *SHOX2* 基因甲基化异常并非肺癌所特有,在其他癌症也存在。因此, *SHOX2* 基因甲基化在多种癌症发生中的角色及特异性也是未来的研究方向。

4 结 语

本文回顾了 *SHOX2* 基因甲基化检测肺癌的临床转化研究现状,目前研究共涉及五个来源的样品,其中对组织学和细胞学来源样品的 *SHOX2* 基因甲基化检测均属于辅助病理或细胞学的诊断。临床已经应用的 *SHOX2* 基因甲基化检测仅有以支气管灌洗液样品为对象的检测,此检测目前仅用于对细胞学检测不确定样品的辅助诊断。目前临床上仍然缺乏肺癌早期检测的方法,以支气管灌洗液样品为对象的细胞学和 *SHOX2* 基因甲基化联合检测有希望对肺癌进行早期诊断,同样,血浆检测也有潜力用于肺癌早期诊断。虽然目前 *SHOX2* 基因超甲基化与

肺癌的相关性比较确定,但其基因学和蛋白学机制仍然不清楚,对基因扩增和拷贝数增加与甲基化的关系也不了解,所以未来的机制研究可以着眼于这些方面。此外,由于 *SHOX2* 基因甲基化水平在不同病理类型间有一定的差异,所以病理类型与甲基化的关系及其中的机制和对预后的提示也值得研究。而 *SHOX2* 是否可以作为可靠的预后及生存率判断的指标,是否可成为疾病复发和治疗效果监测的指标,也是有意义的研究方向。由于在多种癌症中都发现 *SHOX2* 基因超甲基化,所以此检测对肺癌的特异性有待考察,如果未来此检测用于临床对肺癌的辅助确诊,则需要了解它在其他癌症的阳性检出率。

[参考文献]

- [1] COBB J, DIERICH A, HUSS-GARCIA Y, et al. A mouse model for human short-stature syndromes identifies Shox2 as an upstream regulator of Runx2 during long-bone development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(12):4511-4515. DOI: 10.1073/pnas.0510544103.
- [2] YU L, LIU H, YAN M, et al. Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton [J]. *Dev Biol*, 2007, 306(2):549-559. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.03.518.
- [3] OLIVEIRA C S, ALVES C. The role of the SHOX gene in the pathophysiology of Turner syndrome [J]. *Endocrinol Nutr*, 2011, 58(8):433-442. DOI: 10.1016/j.endonu.2011.06.005.
- [4] BOBICK B E, COBB J. Shox2 regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 24):6071-6083. DOI: 10.1242/jcs.111997.
- [5] AZA-CARMONA M, BARCA-TIERNO V, HISADO-OLIVA A, et al. NPPB and ACAN, two novel SHOX2 transcription targets implicated in skeletal development [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e83104 [2015-10-02]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0083104>. DOI: 10.1371/journal.pone.0083104.
- [6] ESPINOZA-LEWIS R A, YU L, HE F, et al. Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5 [J]. *Dev Biol*, 2009, 327(2):376-385. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.12.028.
- [7] LIU H, ESPINOZA-LEWIS R A, CHEN C, et al. The role of Shox2 in SAN development and function [J]. *Pediatr Cardiol*, 2012, 33(6):882-889. DOI: 10.1007/s00246-012-0179-x.
- [8] SUN C, YU D, YE W, et al. The short stature homeobox 2 (Shox2)-bone morphogenetic protein (BMP) pathway regulates dorsal mesenchymal protrusion development and its temporary function as a pacemaker during cardiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2014, 290(4):2007-2023. DOI: 10.1074/jbc.M114.619007.
- [9] YU L, GU S, ALAPPAT S, et al. Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate [J]. *Development*, 2005, 132(19):4397-4406. DOI: 10.1242/dev.02013.
- [10] SCOTT A, HASEGAWA H, SAKURAI K, et al. Transcription factor short stature homeobox 2 is required for proper development of tropomyosin-related kinase B-expressing mechanosensory neurons [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(18):6741-6749. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5883-10.2011.
- [11] SUN C, ZHANG T, LIU C, et al. Generation of Shox2-Cre allele for tissue specific manipulation of genes in the developing heart, palate, and limb [J]. *Genesis*, 2013, 51(7): 515-522. DOI: 10.1002/dvg.22397.
- [12] SMITH T M, LOZANOFF S, IYYANAR P P, et al. Molecular signaling along the anterior-posterior axis of early palate development [J/OL]. *Front Physiol*, 2013, 3: 488 [2015-10-02]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2012.00488/full>. DOI: 10.3389/fphys.2012.00488.
- [13] CALIEBE J, BROEKMAN S, BOOGAARD M, et al. IGF1, IGF1R and SHOX mutation analysis in short children born small for gestational age and short children with normal birth size (idiopathic short stature) [J]. *Horm Res Paediatr*, 2012, 77(4):250-260. DOI: 10.1159/000338341.
- [14] SAWADA R, KAMEI H, HAKUNO F, et al. In vivo loss of function study reveals the short stature homeobox-containing (shox) gene plays indispensable roles in early embryonic growth and bone formation in zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 2015, 244(2):146-156. DOI: 10.1002/dvdy.24239.
- [15] BUNYAN D J, TAYLOR E J, MALONEY V K, et al. Homozygosity for a novel deletion downstream of the SHOX gene provides evidence for an additional long range regulatory region with a mild phenotypic effect [J]. *Am J Med Genet A*, 2014, 164A(11): 2764-2768. DOI: 10.1002/ajmg.a.36724.
- [16] BEISER K U, GLASER A, KLEINSCHMIDT K, et al. Identification of novel SHOX target genes in the developing limb using a transgenic mouse model [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98543 [2015-10-02]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0098543>. DOI: 10.1371/journal.pone.0098543.
- [17] TSUCHIYA T, SHIBATA M, NUMABE H, et al. Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestations of langer mesomelic dysplasia [J]. *Am J Med Genet A*, 2014, 164A(2):505-510. DOI: 10.1002/ajmg.a.36284.
- [18] RODRÍGUEZ F A, UNANUE N, HERNANDEZ M I, et al. Clinical and molecular characterization of Chilean patients with Léri-Weill dyschondrosteosis [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2013, 26(7/8): 729-734. DOI: 10.1515/jpem-2013-0023.
- [19] SEKI A, JINNO T, SUZUKI E, et al. Skeletal deformity associated with SHOX deficiency [J]. *Clin Pediatr Endocrinol*, 2014, 23(3):65-72. DOI: 10.1297/cpe.23.65.
- [20] IBARRA-RAMÍREZ M, ZAMUDIO-OSUNA M J, CAMPOS-ACEVEDO L D, et al. Detection of Turner Syndrome by quantitative

- PCR of SHOX and VAMP7 genes [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2015, 19(2):88-92. DOI: 10.1089/gtmb.2014.0236.
- [21] CUESTA HERNÁNDEZ M, RUEDA VALENCIA M E, PÉREZ RODRÍGUEZ O, et al. X isochromosomes: delayed diagnosis of Turner's syndrome [J/OL]. *An Pediatr (Barc)*. 2015, 82(1): e131-e134 [2015-10-02]. <http://www.analesdepediatria.org/es/linkresolver/isocromosomas-x-diagnostico-tardio-sindrome/S1695403314000988/>. DOI: 10.1016/j.angepedi.2014.02.020.
- [22] BLASCHKE R J, MONAGHAN A P, SCHILLER S, et al. SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5):2406-2411.
- [23] SEMINA E V, REITER R S, MURRAY J C. A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(3):415-422.
- [24] CLEMENT-JONES M, SCHILLER S, RAO E, et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome [J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(5):695-702.
- [25] LIU H, CHEN C H, YE W, et al. Phosphorylation of Shox2 is required for its function to control sinoatrial node formation [J/OL]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(3): e000796 [2015-10-02]. <http://jaha.ahajournals.org/content/3/3/e000796.long>. DOI: 10.1161/JAHA.114.000796.
- [26] BLASCHKE R J, HAHURIJ N D, KUIJPER S, et al. Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaker development [J]. *Circulation*, 2007, 115(14): 1830-1838.
- [27] EHRLICH M, GAMA SOSA M A, HUANG L H, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 1982, 10(8): 2709-2721.
- [28] TUCKER K L. Methylated cytosine and the brain: a new base for neuroscience [J]. *Neuron*, 2001, 30(3): 649-652.
- [29] CRAIG J M, WONG N C. *Epigenetics: a reference manual* [M]. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2011.
- [30] DAURA-OLLER E, CABRE M, MONTERO M A, et al. Specific gene hypomethylation and cancer: new insights into coding region feature trends [J]. *Bioinformatics*, 2009, 3(8): 340-343.
- [31] SCHMIDT B, LIEBENBERG V, DIETRICH D, et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates [J/OL]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 600 [2015-10-02]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-600>. DOI: 10.1186/1471-2407-10-600.
- [32] DIETRICH D, KNEIP C, RAJI O, et al. Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(3): 825-832. DOI: 10.3892/ijo.2011.1264.
- [33] KNEIP C, SCHMIDT B, SEEGBARTH A, et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma [J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(10):1632-1638. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318220e9a.
- [34] SCHNEIDER K U, DIETRICH D, FLEISCHHACKER M, et al. Correlation of SHOX2 gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors [J/OL]. *BMC Cancer*, 2011, 11:102 [2015-10-02]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-11-102>. DOI: 10.1186/1471-2407-11-102.
- [35] DIETRICH D, HASINGER O, LIEBENBERG V, et al. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2012, 21(2): 93-104. DOI: 10.1097/PDM.0b013e318240503b.
- [36] DARWICHE K, ZAROGOULIDIS P, BAEHNER K, et al. Assessment of SHOX2 methylation in EBUS-TBNA specimen improves accuracy in lung cancer staging [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(11): 2866-2870. DOI: 10.1093/annonc/mdt365.
- [37] NEWNHAM G M, CONRON M, MCLACHLAN S, et al. Integrated mutation, copy number and expression profiling in resectable non-small cell lung cancer [J/OL]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 93 [2015-10-20]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-11-93>. DOI: 10.1186/1471-2407-11-93.
- [38] DIETRICH D, JUNG M, PUETZER S, et al. Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84225 [2015-10-02]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0084225>. DOI: 10.1371/journal.pone.0084225.
- [39] ILSE P, BIESTERFELD S, POMJANSKI N, et al. SHOX2 DNA methylation is a tumour marker in pleural effusions [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2013, 10(5):217-223.
- [40] ILSE P, BIESTERFELD S, POMJANSKI N, et al. Analysis of SHOX2 methylation as an aid to cytology in lung cancer diagnosis [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2014, 11(5):251-258.
- [41] SCHREIBER G, MCCRORY D C. Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence [J]. *Chest*, 2003, 123(1 Suppl):115S-128S.
- [42] ROTH K, HARDIE J A, ANDREASSEN A H, et al. Predictors of diagnostic yield in bronchoscopy: a retrospective cohort study comparing different combinations of sampling techniques [J/OL]. *BMC Pulm Med*, 2008, 8: 2 [2015-10-02]. <http://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2466-8-2>. DOI: 10.1186/1471-2466-8-2.

[收稿日期] 2015 - 12 - 03

[修回日期] 2016 - 05 - 24

[本文编辑] 黄静怡