DOI:10.16016/j.1000-5404.202104084

46 例前列腺癌患者的组织 DNA 及血液 ctDNA 测序分析

唐 堂,唐 朋,谭信韬,冉 强,彭 松,刘秋礼,徐 静,江 军 400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院泌尿外科

[摘要] **目的** 探讨前列腺癌患者组织 DNA 与血液 ctDNA 检出的突变情况,分析基因突变与临床特点和治疗的相关性。**方法** 采用探针杂交捕获和 Illumina 高通量测序为基础的靶向二代测序技术检测本院泌尿外科 46 例病理诊断明确的前列腺癌患者的前列腺组织标本($n=31$)以及外周血液标本($n=32$)循环肿瘤细胞 DNA(circulating tumor DNA,ctDNA)的突变情况,检测范围包括 1 021 个基因的全外显子区域及部分内含子区域中的 4 种突变类型(点突变、小片段的插入缺失、拷贝数变异和目前已知的融合基因)。**结果** 在 31 例患者的前列腺组织标本中最常被检出的突变基因为 TP53(29%,9/31),其次为 CDK12(22.6%,7/31)、FOXA1(22.6%,7/31)与 JAK1(16.1%,5/31)。在 32 例外周血 ctDNA 标本中检测出的常见突变基因为 AR(34.3%,11/32)、APC(25%,8/32)、CDK12(18.8%,6/32)、DNMT3a(18.8%,6/32)与 TP53(18.8%,6/32)。TMPRSS2-ERG 融合基因在所有检测患者中检出率为 13%(6/46)。其中 1 例患者同时存在 TMPRSS2-ERG、VEGFA-TMPRSS2 及 ERG-VEGFA 融合突变。46 例患者中同源重组相关基因的体细胞突变检出率为 21.7%,携带有胚系同源重组基因突变患者占 8.7%。且携带(无论胚系或体细胞)同源重组基因突变患者的发病年龄更低、Gleason 评分更高、转移灶数量更多,特别是携带胚系突变的患者更显著。**结论** 血液 ctDNA 和传统的组织 DNA 样本均可检出基因突变;血液 ctDNA 检测可动态监控前列腺癌基因频谱在治疗过程中的变化,有助于及时调整治疗方案。

[关键词] 前列腺癌;二代测序;全外显子测序;基因突变;同源重组基因
[中图法分类号] R394.3; R730.43; R737.25 [文献标志码] A

Sequencing analysis on tissue DNA and blood ctDNA from 46 patients with prostate cancer

TANG Tang, TANG Peng, TAN Xintao, RAN Qiang, PENG Song, LIU Qiuli, XU Jing, JIANG Jun Department of Urology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mutations in the tissue DNA and plasma circulating tumor DNA (ctDNA) from patients with prostate cancer, and analyze their association with clinical characteristics and treatment. **Methods** Based on probe hybridization capture and Illumina high-throughput sequencing, a targeted second-generation sequencing was used to analyze the mutations in 31 tumor tissues and 32 peripheral blood specimens from 46 patients with pathologically diagnosed prostate cancer. The tumor tissues and peripheral blood specimens were sequenced in the whole exons area and part of the introns area of 1 021 genes for 4 types of mutations (point mutation, loss/insert of small fragments, copy number variation and currently known fusion genes). **Results** The most frequently mutated gene was TP53 (29.0%, 9/31), followed by CDK12 (22.6%, 7/31), FOXA1 (22.6%, 7/31) and JAK1 (16.1%, 5/31) in 31 tissue samples. The most common mutant genes in the 32 blood samples were AR (34.3%, 11/32), APC (25.0%, 8/32), CDK12 (18.8%, 6/32), DNMT3a (18.8%, 6/32) and TP53 (18.8%, 6/32). TMPRSS2-ERG fusion

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81802558);陆军军医大学科研项目(2017XYY07)
[通信作者] 江 军,E-mail:jiangjun_64@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

gene was detected in 13.0% (6/46) of the 46 patients. One patient had TMPRSS2-ERG, VEGFA-TMPRSS2, and ERG-VEGFA fusion mutations simultaneously. The somatic mutation of homologous recombination (HR) associated genes were found in 21.7% (10/46) of all the patients, and those with germline mutations in the HR gene accounted for 8.7% (4/46) of all the patients. Moreover, the patients with HR gene mutations (either germline or somatic), especially those with germline mutations, had younger onset-age, higher Gleason score, and more metastases. **Conclusion** Gene mutation can be detected from both blood ctDNA and traditional tissue DNA. Dynamic blood ctDNA testing can monitor the changes in gene spectrum of prostate cancer, and is helpful to adjust treatment scheme in time.

[**Key words**] prostate cancer; second generation sequencing; whole exon sequencing; gene mutations; homologous recombinant genes

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81802558) and the Scientific Research Project of Army Medical University (2017XYY07). Corresponding author: JIANG Jun, E-mail: jiangjun_64@163.com

前列腺癌在欧美国家中是老年男性发病率最高的肿瘤,也是导致癌症相关死亡的第二大原因[1]。近年来中国老年男性的前列腺癌发病率也在不断攀升,2015年前列腺癌已成为中国男性中发病率第6位的癌症[2-3]。随着相关研究进展以及基因检测技术的不断发展,大量研究表明,基因突变是肿瘤发生和进展过程中的关键分子事件[4-5];有研究表明很多基因突变与前列腺癌的发生、发展密切相关,包括TP53、PTEN、RB1、TMPRSS2-ERG融合等[6-8]。其中融合基因(包括TMPRSS2与ERG或ETV1)在前列腺癌中非常常见,在57%~80%的前列腺癌组织中检测出TMPRSS2基因与ERG基因或ETV1基因在非翻译区发生基因融合[9]。最新研究发现,约有19%的局限性前列腺癌患者携带同源重组相关基因的突变,这一比例在转移性去势抵抗性前列腺癌(metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC)患者中高达23%左右[10-11]。同源重组修复基因的突变与前列腺癌的发生风险、恶性程度及预后紧密相关,并且对患者的治疗选择有重要的指导作用[12]。既往研究发现携带BRCA胚系突变患者发生前列腺癌时年龄更轻,前列腺癌Gleason评分更高,更容易发生淋巴结侵犯及远处转移,且该类患者的预后很差[13]。而最新研究发现,该类患者对于PARP抑制剂和铂类为基础的化疗敏感[14-15]。因此,美国国立综合癌症网络(The National Comprehensive Cancer Network,NCCN)前列腺癌指南建议对有阳性或可疑家族史、危险分级在高危或极高危组或确诊转移性前列腺癌以及病理类型为导管内癌的前列腺癌患者进行基因检测[16]。但是在国内,由于基因检测技术开展时间短、患者经济条件差等原因,前列腺癌基因检测未得到广泛普及,因而缺乏国人特有前列腺癌突变频谱数据。

肿瘤生长过程中伴随着凋亡和坏死等,会释放DNA片段进入血液循环系统中,也就是循环肿瘤DNA(ciculating tumor DNA, ctDNA)。ctDNA作为液态活检重要手段之一,目前在肿瘤研究领域及临床诊治过程中具有潜在应用价值。而前列腺癌在经过内分泌治疗后,原发灶多发生萎缩,疾病进展时多以骨转移灶进展为主,而骨穿刺阳性率及患者接受度均较低[17-18],在疾病进展至去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)时很难再次获取组织行基因检测。而进行ctDNA检测仅需患者血液标本,相对创伤小,患者接受度更高,因此在前列腺癌疾病进展时具有较好的应用前景。本研究对本院46例前列腺癌患者的组织标本和/或血液ctDNA进行靶向二代测序,对与肿瘤发生、发展相关的1 021个基因的全外显子区和部分内含子区域进行突变检测,分析前列腺癌治疗前后基因突变频谱及特定突变与患者临床表型相关性。

1 资料与方法

1.1 患者选择

收集2015年9月至2019年12月就诊于本院的前列腺癌患者共46例。纳入标准:①前列腺穿刺或手术标本病理确诊为前列腺癌;②具有明确前列腺癌家族史的患者,或其他肿瘤(如乳腺癌、卵巢癌、结肠癌等)家族史的患者;③前列腺组织病理类型为前列腺导管内癌(intraductal carcinoma of the prostate,IDC-P)或前列腺导管腺癌(ductal adenocarcinoma of the prostate,DAP)的患者;④确诊时发现局部进展(N1)及转移性(M1)前列腺癌的患者。排除标准:①无法获得组织及血液标本;②患者未签署知情同意参加本研究;③随访信息缺失过多;④送检样本未能达到质控要求。本研究得到陆军军医大学大坪医院伦理委员会审批(医研伦审2018第28号)。

采集全部入组患者的确诊年龄、确诊时前列腺特异

性抗原(prostate-specific antigen, PSA);穿刺 Gleason 评分,穿刺及手术标本病理类型;转移情况;肿瘤临床分期、内分泌治疗情况及相应基因检测结果;开始内分泌治疗后睾酮及 PSA 变化水平。随访中确诊去势抵抗性前列腺癌诊断标准按照美国 AUA 指南(2018 版),即:①血清睾酮<50 ng/dL 或<1.7 nmol/L;②PSA 升高:间隔至少 3 周,PSA 较最低值升高>2 ng/mL,或第 2 次测定值较最低值升高>25%,或骨扫描发现 2 个及以上的新病灶或用 RECIST 评估软组织病灶为疾病进展。

1.2 标本获取

共送检样本 63 份,其中前列腺组织样本 31 例,外周血样本 32 例。组织样本通过前列腺穿刺或前列腺癌根治手术获得,进行石蜡包埋后切片送检;血液样本采集自患者肘部静脉并存放于 EDTA 抗凝管低温保存送检。全部送检样本均达到基因测序质控要求。

1.3 基因测序

基因二代测序由北京吉因加医学检验实验室有限公司完成。具体步骤如下:新鲜组织样本及石蜡包埋组织使用 QIAamp DNA 微型试剂盒(Qiagen)、ReliaPrep-FFPE-gDNA 微型制备系统(Promega)和配套试剂 Maxwell 16 FFPE Plus Lev DNA Purification Kit(货号:AS1135)进行提取,并严格按照说明书步骤进行。再使用 Covaris S2 超声仪(Covaris)破碎 DNA 产生 300 bp 峰值的片段,使用 NEB Next Ultra DNA(Illumina)进行文库构建,生成测序文库。然后,使用定制的探针组(integrated DNA technologies,IDT)富集目标区域的文库 DNA,在 Illumina Hiseq 3000 测序仪(Illumina,San Diego,CA,USA)上对富集的文库进行测序。

外周血采用 EDTA 真空管(BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ)收集,2 500×*g* 离心 10 min,取上清液转移至微离心管,上清液 16 000×*g* 离心 10 min,去除残留细胞碎片。采用 QIAamp DNA 微型试剂盒从 0.6~1.8 mL 血浆中分离游离 DNA(circulating free DNA,cfDNA)检测 ctDNA。使用量子位荧光计(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)和双链 DNA 荧光定量检测试剂盒(Invitrogen)测定 DNA 浓度。ctDNA 的大小分布采用安捷伦 2100 生物分析仪和 DNA HS 试剂盒(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA)进行评估。DNA 提取严格按照说明书步骤进行。

使用 KAPA DNA 文库制备试剂盒(KAPA Biosystems,Wilmington, MA, USA)构建 DNA 测序文库。捕获探针涵盖范围来自实体肿瘤中常见的 1 021 个基因(包含下文中除 GEN1 以外的 17 个同源重组相关基因)的编码序列或外显子,采用 HiSeq3000 测序系统进行 DNA 测序。质控标准:组织样本经 HE 染色后镜下评估的肿瘤细胞含量≥10%,平均测序深度≥500X;血液样本提取的 DNA 总量≥15 ng,平均测序深度≥4000X。

1.4 同源重组基因的筛选

全部同源重组基因列表参考文献[19],具体包括 ATM、ATR、BRCA1、BRCA2、BRIP1、CHEK2、FAM175A、FANCA、GEN1、MLH1、MRE11、MSH2、MSH6、NBN、PALB2、PMS2、RAD51C、RAD51D 共 18 个相关基因。

1.5 突变基因分析

胚系突变、组织突变和 ctDNA 突变的区分方法:组织 DNA 和外周血中游离 DNA 作为实验组(case),外周血白细胞 DNA 作为对照组(normal),配对的肿瘤样本和正常样本进行 NGS 检测,即 matched tumor-normal NGS。NGS 测序之后将所测得序列跟人类基因组序列(Human Genome Build 37)比较,如果在实验组和对照组中都发生了突变,为胚系变异;如果实验组有突变,对照组无突变,为体细胞变异。

胚系变异的分析遵循美国医学遗传学和基因组学学会(ACMG)指南,只报告致病突变、疑似致病突变及意义未明变异,未报告可能不会增加患癌风险的疑似良性变异和良性变异。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析,以家族史、确诊时是否有转移灶、Gleason 评分、PSA 水平是否高于 20 μg/mL 为分类变量,对连续变量采用 *t* 检验,对分类变量采用卡方检验或 Fisher 确切检验,采用双侧检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床信息

46 例前列腺癌患者经前列腺穿刺活检确诊为前列腺腺癌,其中 1 例术后病理诊断前列腺癌合并导管内癌。5 例患者的一级亲属有肿瘤病史,2 例患者非一级亲属有肿瘤病史,其余 39 例患者无相关肿瘤家族史。患者确诊平均年龄 67 岁(中位数 65 岁),确诊时中位 PSA 值为 103 ng/mL(最小值 0.48 ng/mL,最大值 2 092 ng/mL)。确诊时肿瘤分期 T2 期患者 16 例,T3 期患者 17 例,T4 期患者 12 例(1 例无随访信息)。其中出现骨转移患者 21 例,淋巴结转移 18 例,肺转移 3 例,同时伴有骨和肺部转移患者 1 例。行前列腺电切术(transurethral resection of the prostate, TURP)发现偶发癌患者 8 例,接受前列腺癌根治术患者 10 例,接

受局部放疗患者 6 例;45 例患者接受雄激素剥夺治疗(androgen deprivation therapy, ADT),根治术后接受内分泌治疗结合局部放疗患者 3 例,截至随访时间 2020 年 8 月 1 日,已进展为 CRPC 患者 20 例,因前列腺癌去世 5 例(表 1)。

表 1 46 例患者基本信息

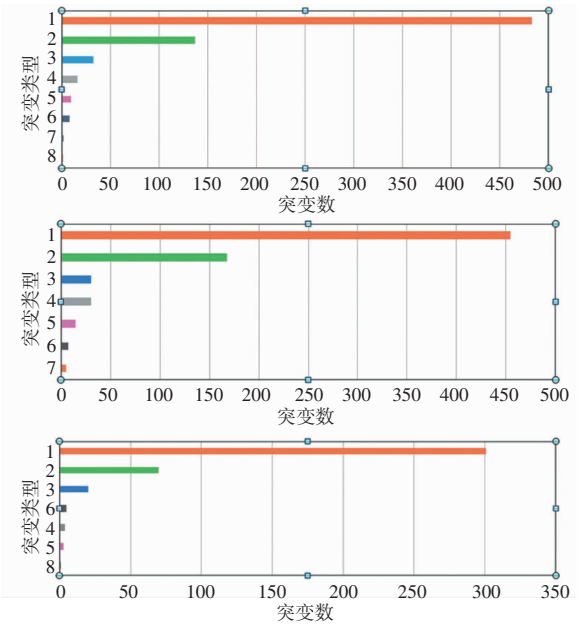
分类	HR 基因突变携带者	HR 基因突变非携带者	合计
病例数	14	32	46
诊断中位年龄/岁	63(47~76)	71(57~84)	65
合并其他肿瘤	1	2	3
肿瘤家族史			
直系亲属	4	1	5
非直系亲属	1	1	2
确诊时 Gleason 评分			
≤7	0	6	6
≥8	13	26	39
缺失	1	0	1
其他病理类型			
导管内癌	1	0	1
神经内分泌型癌	1	0	1
诊断时肿瘤分期			
T1/T2	4	12	16
T3/T4	9	20	29
缺失	1	0	1
淋巴结转移	5	13	18
骨转移灶数量			
≤2	4	9	13
≥3	4	4	8
肺转移	2	1	3
肺转移合并骨转移	1	0	1
诊断时远处转移(骨转移、肺转移等)	11	14	25
诊断时中位 PSA 值/ng·mL^{-1}	143	235	
服用阿比特龙	9	8	17

2.2 基因突变分析

在 46 例患者的样本检测中共检测出胚系突变 5 例,均为杂合突变,MEN1 和 SDHA 同时突变 1 例,4 例为同源重组基因胚系突变,分别为 BRCA2 突变 2 例,BRCA1 突变 1 例,BRCA2 和 PALB2 同时突变 1 例。对胚系突变的致病性分析参照 ACMG 指南(2015 版),HR 功能相关的 BRCA2 和 PALB2 基因的胚系突变是致病/疑似致病的,而 MEN1、SDHA 和 BRCA1 基因的胚系突变则尚无明确有害证据,为意义未明突变。其余疑似良性变异和良性变异,因现有证据表明这些变异很可能不会增加患癌风险,所以未进行报告。

在全部送检的 63 份样本中(组织 DNA 样本 31 例和血液 ctDNA 样本 32 例)共检测出 362 种基因的 703 个单核苷酸突变(SNV),涉及 30 个基因的 34 个拷贝数变化(CNV),以及 4 个基因的 8 种结构域变化(SV),见图 1A。在组织 DNA 样本和血液 ctDNA 样本中最常见检出的突变类型为错义突变,其次为框移突变和无义突变,错义突变在组织 DNA 和血液 ctDNA 中的检出比率分别占 64.1%(182/284)和 74.5%(301/404),见图 1B、C。涉及基因结构改变的插入、缺失和框移突变分别占组织 DNA 和血液 ctDNA 全部检出突变的 28.5%(81/284)和 18.6%(75/404)。其余包括启动子突变及剪切突变等分别占组织 DNA 和血液 ctDNA 全部检出突变的 7.4%(21/284)和 6.9%(28/404)。

在 31 例患者组织 DNA 中检出突变率超过 10%的基因为 TP53(29%,9/31)、CDK12(22.6%,7/31)、FOXA1(22.6%,7/31)、JAK1(16.1%,5/31)、MLL(12.9%,4/31)、TERT(12.9%,4/31),见图 2。在 32 例患者血液 ctDNA 中检出突变率超过 10%的基因分别为 AR(34.3%,11/32)、APC(25%,8/32)、CDK12(18.8%,6/32)、DNMT3a(18.8%,6/32)、TP53(18.8%,6/32)和 MLL3(15.6%,5/32),见图 3。



1:错义突变;2:框移突变;3:无义突变;4:编码区碱基缺失;5:启动子区突变;6:剪接突变;7:编码区碱基插入;8:编码区碱基插入/缺失

A:全部 63 例样本检测出的突变分类;B:31 例组织标本中检出的突变分类;C:32 例血液 ctDNA 中检测出的突变分类

图 1 不同样本检出的突变类型

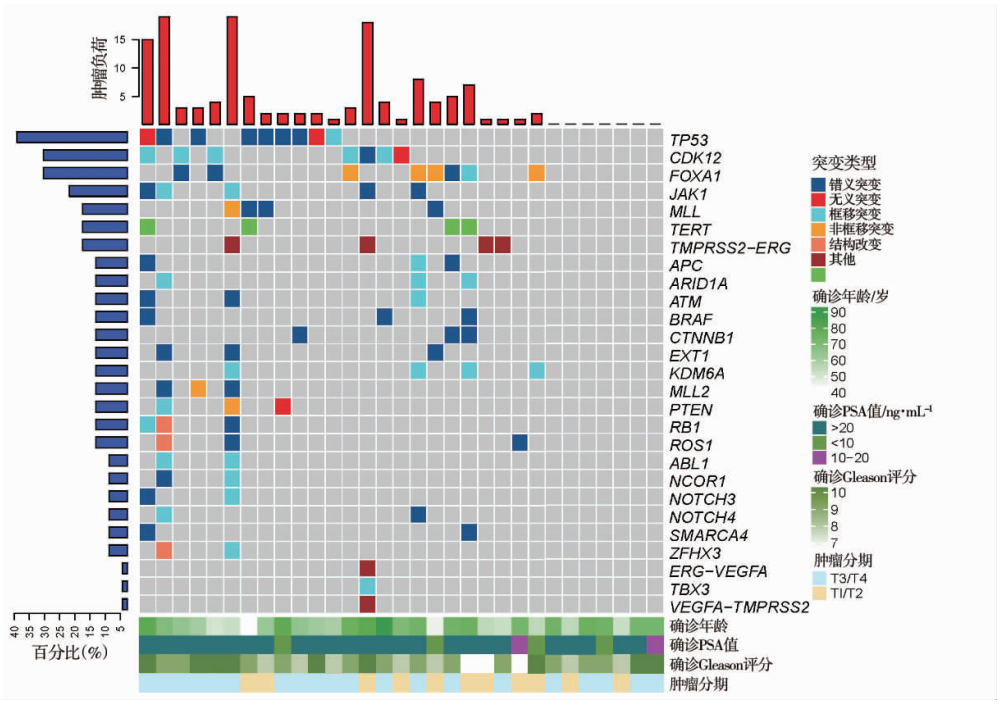


图 2　送检患者前列腺组织中检出前 27 位突变基因

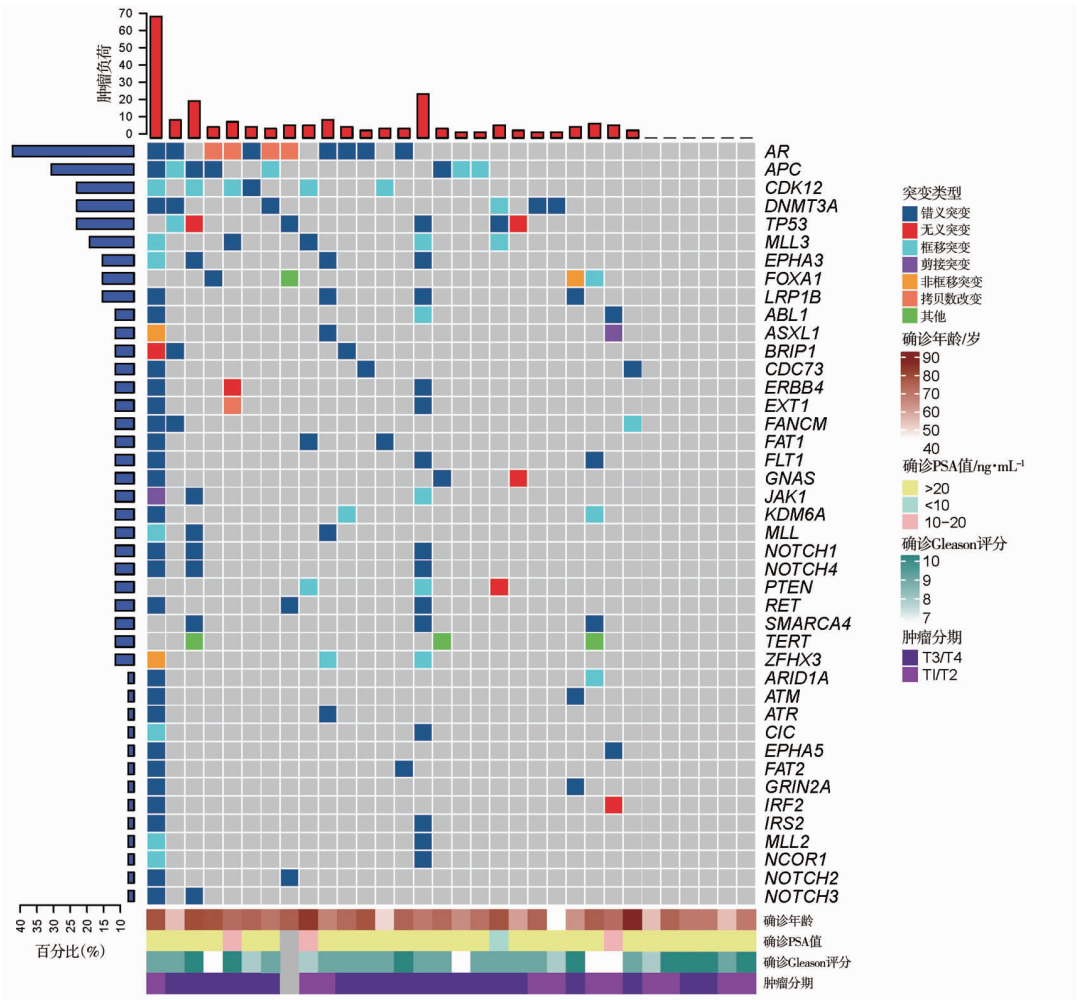


图 3　送检患者血液 ctDNA 中检出前 42 位突变基因

46 例患者中有 17 例同时进行了组织标本 DNA 检测和血液 ctDNA 检测,两类样本中检出相同基因突变占总检出突变的 27.9%(84/301)。其中,有 9 例患者是在同一时间点收取的前列腺组织标本与血液 ctDNA 标本;而其余 8 例患者的 ctDNA 样本是在获取前列腺组织标本诊断前列腺癌后,经过至少 3 个月治疗抽血获取。同一时间点收取的 9 例患者组织 DNA 和血液 ctDNA 检测体细胞突变结果发现,有 7 例患者在组织 DNA 和血液 ctDNA 中检测出相同基因突变,各例患者相同基因突变占检测出总突变率平均值为 28%(14%~60%)。8 例非同时送检的患者中 1 例患者未接受 ADT 治疗,7 例患者均接受 ADT 治疗(1 例治疗 3 个月,6 例治疗 1 年以上)。7 例 ADT 治疗后送检的 ctDNA 样本与治疗前组织 DNA 样本检测突变的一致率较低,总体一致率为 5.6%(共检出突变基因 54 个,其中共同突变基因 3 个,各患者突变检出一致率为 0%~33%),提示治疗后患者的基因突变存在明显改变。其中 AR(5/54)是治疗后出现的最主要的突变,提示 AR 突变可能与 ADT 治疗抵抗(即 CRPC 发生)有关。

46 例患者中共检测出 6 例存在融合基因相关的突变,4 例单独在组织中检测出,1 例单独在血液 ctDNA 样本中检测出,还有 1 例同时在组织 DNA 和血液 ctDNA 中检测出。这 6 例患者平均年龄 62.2 岁,确诊 PSA 中位数 103 μg/mL,其中 1 例患者 Gleason 评分 4+3 分,1 例 Gleason 评分 4+4 分,1 例 Gleason 评分 4+5 分,2 例 Gleason 评分 5+4 分。有 1 例分别在血液和组织中检出 3 种融合基因突变,分别为 TMPRSS2-ERG、VEGFA-TMPRSS2、ERG-VEGFA,其确诊时 PSA 为 127.01 μg/mL,Gleason 评分 5+5 分,临床分期 T2cN0M1b(3 处骨转移灶)。

1 例患者前列腺组织病理诊断为导管型和腺癌混合型前列腺癌,在前列腺肿瘤组织中检测出 ATR、FBXW7、MLL2、MLL3、NTRK3、PIK3C2B、PTEN、TIPARP 的突变,此患者在行前列腺电切术时诊断,并行前列腺癌根治术,1 年后于膀胱颈部发生前列腺癌局部复发,之后发现全身多处骨转移。

2.3 同源重组基因突变与前列腺癌临床特点

在 46 例患者中有 14 例检测出含有 HR 相关基因的突变,除 4 例胚系突变外,其余 10 例存在 HR 相关基因的体细胞突变,包括 ATR、BRIP1、ATM、CHEK2、MLH1、MSH2、RAD51C、MRE11A、MSH6。通过将携带 HR 基因突变(无论胚系或体细胞突变)的患者与无突变的患者比较,结果表明携带 HR 基因突变的 14 例患者在诊断时的 Gleason 评分整体水平更高,并且确诊时往往有更多的转移灶。HR 突变携带者 Gleason 评分≥8 分的比例占 100%(13/13 例,1 例患者无穿刺信息),高于非携带者的 59.4%(19/32 例),差异有统计学意义($P<0.01$);HR 基因突变携带者确诊时发现转移灶的患者比例为 78.5%(11/14 例),高于非携带者的 43.8%(14/32 例),差异有统计学意义($P=0.018$),且 HR 基因突变携带者中骨转移灶数量大于 3 处的患者所占比例也更高;在确诊时的肿瘤分期对比中,携带 HR 基因突变(无论胚系或体细胞突变)患者在确诊时的肿瘤分期为 T3/T4 期所占比例为 69.2%(9/13 例,1 例患者无分期信息),高于非携带者的 59.3%(19/32 例),差异有统计学意义($P=0.031$)。

此外,相比非胚系 HR 突变的患者,带有胚系 HR 突变的患者确诊年龄往往更低。4 名胚系 HR 基因突变患者平均确诊年龄为 51.5 岁,显著小于无胚系 HR 突变患者的 70.1 岁($P<0.01$)。这提示带有胚系同源重组基因突变的前列腺癌患者往往具有更早的发病年龄。4 名胚系同源重组基因突变的患者确诊 Gleason 评分均≥8 分(100%),高于非胚系 HR 突变患者 Gleason 评分均≥8 分的比例(85.3%,35/41 例,1 例患者无穿刺信息),差异有统计学意义($P<0.01$)。胚系突变和体细胞突变组在确诊时 PSA≥20 μg/mL 的比例分别为 50%(2/4 例)和 77.7%(7/9 例,1 例无确诊时 PSA 值),差异无统计学意义。这可能与少数特殊病例(2 例胚系突变患者确诊时 PSA 值<10 μg/mL)确诊时极低的检测值和总体样本数量较少有一定关系。

3 讨论

基因突变是肿瘤发生和进展过程中的关键分子事件,在嗜铬细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌的相关研究中已经有大量报道[20-23],也有研究表明很多基因的突变与前列腺癌发生发展密切相关,例如 ATM、ATR、BRCA1、BRCA2、BRIP1、CDK12、CHEK2 等[24-25]。通过基因检测发现,PTEN 和 P53 在原发前列腺癌患者中突变频率达 17%和 8%[26],在转移性激素抵抗性前列腺癌中有报道高达 50%和 40%以上[26-27];通过基因编辑小鼠,在前列腺上皮细胞中特异性敲除 PTEN 和 P53 可导致前列腺癌的发生[28]。此外,2015 年 *Cell* 杂志发表的文章对 150 例转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC)的肿瘤组织进行测序发现,mCRPC 患者主要基因突变富集于 AR 相关通路、PI3K 通路、RAF 通路、

WNT 通路以及 DNA 修复通路[26]。随后,PRITCHARD 等[29]对 692 例转移性前列腺癌进行 DNA 修复通路基因胚系检测,发现 11.8%的患者存在 DNA 修复通路基因突变,BRCA2 突变占 5.3%,ATM 突变占 1.6%,CHEK2 突变占 1.9%,BRCA1 突变占 0.9%。叶定伟教授团队研究结果显示,9.8%的患者存在 DNA 修复通路胚系突变,其中 BRCA2 突变率最高(6.3%),其次为 BRCA1(0.63%)和 ATM(0.63%)[19, 30]。可见欧美人种与东亚人种之间前列腺癌的基因突变频谱确有一定差异。但国内尚无前列腺癌体细胞突变频谱相关报道,本研究结果显示,前列腺组织标本中最常被检出的突变基因为 TP53,其次为 CDK12、FOXA1 与 JAK1;血 ctDNA 标本中检测出的常见突变基因为 AR、APC、CDK12、DNMT3a 与 TP53,融合基因占总体患者的 13%(6/46)。其中携带 HR 缺陷相关基因体系突变患者比例为 22.7%,胚系 HR 相关突变比例为 8.8%。与文献[26,29]结果基本一致。

DNA 损伤修复过程复杂,涉及多个修复机制维持 DNA 稳定,包括 DNA 单链断裂的碱基切除修复、错配修复、同源重组修复及非同源末端连接等。其中,同源重组修复是 DNA 双链断裂修复最高效/保真的关键途径。BRCA1/2 是同源重组修复的关键基因,BRCA1/2 的突变与多种肿瘤的发生密切相关,特别是女性乳腺癌、卵巢癌及男性前列腺癌。在前列腺癌中,BRCA1 和 BRCA2 胚系突变频率分别为 0.9%和 2.2%,携带 BRCA1 突变的个体发生前列腺癌的概率是非携带者的 3.8 倍;携带 BRCA2 突变的个体发生前列腺癌的概率是非携带者的 5~7 倍[31]。NYBERG 等[32]研究表明,携带有 BRCA2 胚系突变的患者在 75 岁之前,前列腺癌的标准化发病率(SIR)为 4.45(95% *CI* 2.99~6.61);而携带 BRCA1 胚系突变的患者前列腺癌总体 SIR 为 2.35(95% *CI* 1.43~3.88)。且携带 BRCA1/2 的前列腺癌患者有更高的风险死于肿瘤本身。此外,携带 BRCA2 胚系突变患者发病年龄更早,小于 65 岁的前列腺癌患者中有 1.2%携带有 BRCA2 胚系突变[33]。这与本研究发现的胚系突变携带者发病年龄较低的结果一致。提示携带 BRCA1/2 突变的患者其前列腺癌恶性程度更高、有更高的 Gleason 评分、更有可能发生淋巴结侵犯、远处转移。本研究发现携带 HR 基因突变的患者,无论胚系或体细胞突变,其 Gleason 评分及临床分期均更高。

既往研究发现胚系 HR 突变携带者更易因疾病进展而死亡[34-35],但本研究提示精准的治疗选择可明显改善患者生存。本研究 4 例 HR 胚系突变携带者在随访截止日期有 1 位进展为 CRPC,从确诊到进展为 CRPC 的时间为 12 个月;其余 3 名携带者在接受 ADT+放疗或化疗的联合疗法目前未进展为 CRPC。2016 年发表在 *European Urology* 杂志的文章表明:BRCA2 双等位基因突变的 mCRPC 对铂类敏感[36]。本组 1 例 BRCA2 和 PALB2 胚系突变肺转移前列腺癌患者在接受 ADT+铂类和多西他赛化疗后,目前肺部病灶已基本消失,PSA 也在控制中,与文献[37]结论一致。另外,1 例 BRCA2 胚系突变患者在接受 ADT+前列腺及盆腔放疗后,疾病得到很好地控制,目前随访 9 年,现已停止内分泌治疗,TPSA 一直维持在 0.00 左右,睾酮水平已恢复正常,该患者在随访过程中同时罹患食管鳞癌[38]。此外,美国 FDA 的一项Ⅱ期临床研究 TOPARP-A 显示 49 例 mCRPC 患者在进行 DNA 修复基因检测时,有 16 例(33%)患者存在相应突变,其中 14 例对奥拉帕尼治疗有效[39]。随后,TOPARP-B 的研究结果进一步显示 DNA 修复缺陷患者对奥拉帕尼复合反应率为 46.7%,其中 BRCA1/2 的复合反应率高达 83.3%[40]。综上,携带 DNA 修复基因突变的患者虽然疾病恶性程度高,但是对相应的治疗,包括 PARP 抑制剂和铂类化疗具有更高的敏感性。

ctDNA 作为近年来迅速发展的一种新检测手段,具有无创、无损,可以多次获取并实时检测疾病进展的优点,能提供比组织样品检测更多的信息。相对常规检测手段,可以在早期无创地检测出癌前病变[41]。在部分肺癌和结直肠癌中 ctDNA 检测已经应用于抗 EGFR 治疗以及确定免疫检查点抑制剂疗效的预测生物标志物,例如 ctDNA 检测出错配修复基因突变,或微卫星不稳定性高以及肿瘤突变负荷高的患者对免疫检查点抑制剂更敏感[42-43]。在前列腺癌中,ctDNA 检测可以发现驱动性的 DNA 突变并预测患者生存期[44],或指导临床治疗用药(如 PARP 抑制剂)的选择以及预测耐药[45]。本研究有 9 例患者的肿瘤组织 DNA 标本和血液 ctDNA 标本是同时送检的,两种检测方法突变检出一致率约为 27%;提示 ctDNA 检测可以部分替代传统组织检测。同时,另外 7 例患者的血液 ctDNA 标本是在接受 ADT 治疗后(1 例治疗 3 个月,6 例治疗 1 年以上)送样的,其与之前组织样本比较突变检出一致率只有 7.7%,提示疾病在治疗前后其突变频谱并不完全一致,不能用手术获得的组织标本测序结果代替疾病治疗后阶段的分子特点[46-47]。ADT 治疗后的突变主要包括 AR、CDK12、APC,57%的患者

在接受 ADT 治疗后出现 AR 基因的变异(4/7 例),提示 ADT 治疗可能导致 AR 的突变,从而引起对 ADT 治疗抵抗发生,与 2015 年发表在 *Cell* 杂志上对 mCRPC 患者测序结果一致[27]。最后,ctDNA 检测在前列腺癌疾病进展中的实时应用有重要意义。前列腺癌在经过内分泌治疗后,原发灶多发生萎缩,疾病进展时又多以骨转移为主,而骨穿刺阳性率及患者接受度均较低,因此在疾病进展时,如 CRPC 时很难再次进行穿刺获取组织行基因检测[17-18]。而外周血 ctDNA 检测作为一种无创、可重复进行的检测方式,特别适宜监测激素抵抗性前列腺癌的基因突变情况,并以此预测疾病的进展和指导选择治疗方案。

本研究对 46 例前列腺癌患者进行了靶向二代测序,结果表明 HR 基因突变患者,无论胚系或者体系,均较非携带者具有更早的发病年龄和更多的远处转移,且此类患者对以破坏肿瘤细胞 DNA 为靶点的治疗方案(如放疗和化疗)具有更佳的反应性。此外,同一时间点的 ctDNA 检测与肿瘤组织检测具有一定的一致性;治疗后的 ctDNA 检测与治疗前的组织 DNA 检测结果存在明显差异,提示需要在疾病进展阶段对患者进行动态 ctDNA 检测评估肿瘤分子状态;前列腺癌经过 ADT 治疗后可导致 AR 突变增加,进而引起 CRPC 的发生。基于以上结果,实时动态的基因检测对于前列腺癌的临床诊疗具有重要的指导意义。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, *et al*. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018[J]. Eur J Cancer, 2018, 103: 356-387. DOI:10.1016/j.ejca.2018.07.005.

[2] TEOH J Y C, HIRAI H W, HO J M W, *et al*. Global incidence of prostate cancer in developing and developed countries with changing age structures[J]. PLoS ONE, 2019, 14(10): e0221775. DOI: 10.1371/journal.pone.0221775.

[3] PANG C, GUAN Y Y, LI H B, *et al*. Urologic cancer in China[J]. Jpn J Clin Oncol, 2016, 46(6): 497-501. DOI:10.1093/jjco/hyw034.

[4] STRATTON M R, CAMPBELL P J, FUTREAL P A. The cancer genome[J]. Nature, 2009, 458(7239): 719-724. DOI:10.1038/nature07943.

[5] MA X, LIU Y, LIU Y, *et al*. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1, 699 paediatric leukaemias and solid tumours[J]. Nature, 2018, 555(7696): 371-376. DOI:10.1038/nature25795.

[6] MARSHALL C H, FU W, WANG H, *et al*. Prevalence of DNA repair gene mutations in localized prostate cancer according to clinical and pathologic features: association of Gleason score and tumor stage[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2019, 22(1): 59-65. DOI: 10.1038/s41391-018-0086-1.

[7] LIU J N, NEAR A, CHIARAPPA J A, *et al*. Clinical outcomes associated with pathogenic genomic instability mutations in prostate cancer: a retrospective analysis of US pharmacy and medical claims data[J]. J Med Econ, 2019, 22(10): 1080-1087. DOI: 10.1080/13696998.2019.1649267.

[8] HAMID A A, GRAY K P, SHAW G, *et al*. Compound genomic alterations of TP53, PTEN, and RB1 tumor suppressors in localized and metastatic prostate cancer[J]. Eur Urol, 2019, 76(1): 89-97. DOI:10.1016/j.eururo.2018.11.045.

[9] TOMLINS S A, RHODES D R, PERNER S, *et al*. Recurrent fusion of $TMPRSS_2$ and ETS transcription factor genes in prostate cancer[J]. Science, 2005, 310(5748): 644-648. DOI:10.1126/science.1117679.

[10] DALL'ERA M A, MCPHERSON J D, GAO A C, *et al*. Germline and somatic DNA repair gene alterations in prostate cancer[J]. Cancer, 2020, 126(13): 2980-2985. DOI: 10.1002/cncr.32908.

[11] RANTAPERO T, WAHLFORS T, KÄHLER A, *et al*. Inherited DNA repair gene mutations in men with lethal prostate cancer[J]. Genes (Basel), 2020, 11(3): E314. DOI:10.3390/genes11030314.

[12] MARSHALL C H, ANTONARAKIS E S. Therapeutic targeting of the DNA damage response in prostate cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2020, 32(3): 216-222. DOI:10.1097/cco.0000000000000617.

[13] CASTRO E, GOH C, OLMOS D, *et al*. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(14): 1748-1757. DOI:10.1200/JCO.2012.43.1882.

[14] RIMAR K J, TRAN P T, MATULEWICZ R S, *et al*. The emerging role of homologous recombination repair and PARP inhibitors in genitourinary malignancies[J]. Cancer, 2017, 123(11): 1912-1924. DOI:10.1002/cncr.30631.

[15] ZHAO E Y, SHEN Y Q, PLEASANCE E, *et al*. Homologous recombination deficiency and platinum-based therapy outcomes in advanced breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(24): 7521-7530. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-17-1941.

[16] MOHLER J L, ANTONARAKIS E S, ARMSTRONG A J, *et al*. Prostate Cancer, Version 2. 2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(5): 479-505. DOI: 10.6004/jnccn.2019.0023.

[17] LORENTE D, OMLIN A, ZAFEIRIOU Z, *et al*. Castration-resistant prostate cancer tissue acquisition from bone metastases for molecular analyses [J]. Clin Genitourin Cancer, 2016, 14(6): 485-493. DOI:10.1016/j.clgc.2016.04.016.

[18] SAILER V, SCHIFFMAN M H, KOSSAI M, *et al*. Bone biopsy protocol for advanced prostate cancer in the era of precision medicine[J]. Cancer, 2018, 124(5): 1008-1015. DOI:10.1002/cncr.31173.

[19] WEI Y, WU J L, GU W J, *et al*. Germline DNA repair gene mutation landscape in Chinese prostate cancer patients [J]. Eur Urol, 2019, 76(3): 280-283. DOI:10.1016/j.eururo.2019.06.004.

[20] LITTON J K, RUGO H S, ETTL J, *et al*. Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation[J]. N Engl J Med, 2018, 379(8): 753-763. DOI:10.1056/nejmoa1802905.

[21] GOLAN T, HAMMEL P, RENI M, *et al*. Maintenance olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer[J]. N Engl J Med, 2019, 381(4): 317-327. DOI:10.1056/NEJMoa1903387.

[22] LEDERMANN J A, DREW Y, KRISTELEIT R S. Homologous recombination deficiency and ovarian cancer [J]. Eur J Cancer, 2016, 60: 49-58. DOI:10.1016/j.ejca.2016.03.005.

[23] WONG-BROWN M W, MELDRUM C J, CARPENTER J E, *et al*. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients with triple-negative breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2015, 150(1): 71-80. DOI:10.1007/s10549-015-3293-7.

[24] ATTARD G, PARKER C, EELES R A, *et al*. Prostate cancer[J]. Lancet, 2016, 387(10013): 70-82. DOI:10.1016/S0140-6736(14)61947-4.

[25] CHENG H H, SOKOLOVA A O, SCHAEFFER E M, *et al*. Germline and somatic mutations in prostate cancer for the clinician[J]. J Natl Compr Cancer Netw, 2019, 17(5): 515-521. DOI:10.6004/jnccn.2019.7307.

[26] CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. The molecular taxonomy of primary prostate cancer [J]. Cell, 2015, 163(4): 1011-1025. DOI:10.1016/j.cell.2015.10.025.

[27] ROBINSON D, VAN ALLEN E M, WU Y M, *et al*. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer [J]. Cell, 2015, 161(5): 1215-1228. DOI:10.1016/j.cell.2015.05.001.

[28] KU S Y, ROSARIO S, WANG Y Q, *et al*. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance[J]. Science, 2017, 355(6320): 78-83. DOI:10.1126/science.aah4199.

[29] PRITCHARD C C, MATEO J, WALSH M F, *et al*. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2016, 375(5): 443-453. DOI:10.1056/nejmoa1603144.

[30] WU J L, WEI Y, PAN J, *et al*. Prevalence of comprehensive DNA damage repair gene germline mutations in Chinese prostate cancer patients[J]. Int J Cancer, 2021, 148(3): 673-681. DOI:10.1002/ijc.33324.

[31] OH M, ALKHUSHAYM N, FALLATAH S, *et al*. The association of BRCA1 and BRCA2 mutations with prostate cancer risk, frequency, and mortality: a meta-analysis[J]. Prostate, 2019, 79(8): 880-895. DOI:10.1002/pros.23795.

[32] NYBERG T, FROST D, BARROWDALE D, *et al*. Prostate cancer risks for male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a prospective cohort study[J]. Eur Urol, 2020, 77(1): 24-35. DOI:10.1016/j.eururo.2019.08.025.

[33] KOTE-JARAI Z, LEONGAMORNLERT D, SAUNDERS E, *et al*. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients[J]. Br J Cancer, 2011, 105(8): 1230-1234. DOI:10.1038/bjc.2011.383.

[34] YADAV S, HART S N, HU C L, *et al*. Contribution of inherited DNA-repair gene mutations to hormone-sensitive and castrate-resistant metastatic prostate cancer and implications for clinical outcome [J]. JCO Precis Oncol, 2019, 3: PO.19.00067. DOI:10.1200/PO.19.00067.

[35] CARLSON A S, ACEVEDO R I, LIM D M, *et al*. Impact of mutations in homologous recombination repair genes on treatment outcomes for metastatic castration resistant prostate cancer[J]. PLoS ONE, 2020, 15(9): e0239686. DOI:10.1371/journal.pone.0239686.

[36] CHENG H H, PRITCHARD C C, BOYD T, *et al*. Biallelic inactivation of BRCA2 in platinum-sensitive metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. Eur Urol, 2016, 69(6): 992-995. DOI:10.1016/j.eururo.2015.11.022.

[37] TANG T, WANG L N, WANG P, *et al*. Case report: co-existence of BRCA2 and PALB2 germline mutations in familial prostate cancer with solitary lung metastasis [J]. Front Oncol, 2020, 10: 564694. DOI: 10.3389/fonc.2020.564694.

(下转封3)

338. DOI:10.1136/jramc-2016-000733.

[7] MIYAWAKI H, SAITOH D, HAGISAWA K, *et al*. Noradrenalin effectively rescues mice from blast lung injury caused by laser-induced shock waves[J]. Intens Care Med Exp, 2015, 3(1): 32. DOI:10.1186/s40635-015-0069-7.

[8] HUANG J Z, YANG Z, WANG Z, *et al*. Study on characteristics of blast-fragment combined injury in dogs[J]. J Trauma, 1996, 40(3 Suppl): S63-S67. DOI:10.1097/00005373-199603001-00014.

[9] 杨策, 蒋建新, 王正国, 等. 肺冲击伤转化研究: 历史、现状与挑战[J]. 实用医药杂志, 2019, 36(1): 1-5,8.
YANG C, JIANG J X, WANG Z G, *et al*. Transformation research of pulmonary blast injury: history, current situation and challenges[J]. Pract J Med Pharm, 2019, 36(1): 1-5,8.

[10] 邵飞, 杨志鹏. 单发子弹致多处肢体创伤1例[J]. 创伤外科杂志, 2018, 20(4): 316-317.
SHAO F, YANG Z P. Treatment of multiple limb trauma and fracture caused by single bullet in 1 case[J]. J Trauma Surg, 2018, 20(4): 316-317.

[11] 陈秀, 邵伟庆, 赵红, 等. 火器致胸部穿透伤1例救治分析[J]. 创伤外科杂志, 2013, 15(1): 96.
CHEN X, SHAO W Q, ZHAO H, *et al*. Treatment of transmediastinal gunshot wound in 1 case[J]. J Trauma Surg, 2013, 15(1): 96.

[12] 张珺, 李海波, 梁宇, 等. 火器伤急诊腹腔镜探查1例并文献复习[J]. 中国微创外科杂志, 2017, 17(4): 379-380.
ZHANG J, LI H B, LIANG Y, *et al*. Emergency laparoscopic exploration for firearm injury: case report and review of literature[J]. Chin J Minim Invas Surg, 2017, 17(4): 379-380.

[13] IGOR KHOMENKO, IEVGEN TSEMA, PAVLO SHKLYAREVYCH. Pulmonary artery embolism by a metal fragment after a booby trap explosion in a combat patient injured in the armed conflict in East Ukraine: a case report and review of the literature[J]. J Med Case Rep, 2018, 12(1): 330.

[14] FACKLER M L, BRETEAU J P, COURBIL L J, *et al*. Open wound drainage versus wound excision in treating the modern assault rifle wound[J]. Surgery, 1989, 105(5): 576-584.

[15] 许川, 李兵仓. 爆炸破片伤的机制、特点及早期外科处理[J]. 创伤外科杂志, 2011, 13(1): 86-89.
XU C, LI B C. The mechanism, characteristics and primary surgery treatment for explosive injuries[J]. J Trauma Surg, 2011, 13(1): 86-89.

(**收稿**:2021-03-23;**修回**:2021-04-29)

(编辑 邓强庭)

(上接1666页)

[38] KO J M, NING L, ZHAO X K, *et al*. BRCA2 loss-of-function germline mutations are associated with esophageal squamous cell carcinoma risk in Chinese[J]. Int J Cancer, 2020, 146(4): 1042-1051. DOI:10.1002/ijc.32619.

[39] MATEO J, CARREIRA S, SANDHU S, *et al*. DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2015, 373(18): 1697-1708. DOI:10.1056/NEJMoa1506859.

[40] MATEO J, PORTA N, BIANCHINI D, *et al*. Olaparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair gene aberrations (TOPARP-B): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(1): 162-174. DOI:10.1016/S1470-2045(19)30684-9.

[41] CAMPOS-CARRILLO A, WEITZEL J N, 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.

[42] OELLERICH M, SCHÜTZ E, BECK J, *et al*. Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2017, 54(3): 205-218. DOI:10.1080/10408363.2017.1299683.

[43] NAKAMURA Y, YOSHINO T. Clinical utility of analyzing circulating tumor DNA in patients with metastatic colorectal cancer[J]. Oncologist, 2018, 23(11): 1310-1318. DOI:10.1634/theoncologist.2017-0621.

[44] WYATT A W, ANNALA M, AGGARWAL R, *et al*. Concordance of circulating tumor DNA and matched metastatic tissue biopsy in prostate cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2017, 109(12): djx118. DOI:10.1093/jnci/djx118.

[45] GOODALL J, MATEO J, YUAN W, *et al*. Circulating cell-free DNA to guide prostate cancer treatment with PARP inhibition[J]. Cancer Discov, 2017, 7(9): 1006-1017. DOI:10.1158/2159-8290.CD-17-0261.

[46] VOLANTE M, TOTA D, GIORCELLI J, *et al*. Androgen deprivation modulates gene expression profile along prostate cancer progression[J]. Hum Pathol, 2016, 56: 81-88. DOI:10.1016/j.humpath.2016.06.004.

[47] HORNING A M, WANG Y, LIN C K, *et al*. Single-cell RNA-seq reveals a subpopulation of prostate cancer cells with enhanced cell-cycle-related transcription and attenuated androgen response[J]. Cancer Res, 2018, 78(4): 853-864. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-1924.

(**收稿**:2021-04-14;**修回**:2021-06-08)

(编辑 汪勤俭)