

基于前列腺健康指数和 ctDNA 甲基化的临床显著性 前列腺癌无创诊断模型

徐锦焰¹, 岳道远², 王 雄², 舒 博¹, 杨春光³

(1.华中科技大学附属武汉市中心医院泌尿外科, 武汉 430014; 2.华中科技大学附属武汉同济医院检验科, 武汉 430030;

3.华中科技大学附属武汉同济医院泌尿外科, 武汉 430030)

【摘要】目的:探究血清脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)甲基化水平及健康指数(Prostate Health Index, phi)等在前列腺癌无创诊断的价值及其在免穿刺根治术患者筛选中的应用。**方法:**本研究以 2023 年 3 月至 2024 年 4 月武汉同济医院住院患者为研究对象, 回顾性纳入 121 例患者, 记录患者年龄、体质指数(body mass index, BMI)、总前列腺特异性抗原(total prostate-specific antigen, tPSA)、术前谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (glutathione S-transferase pi 1, GSTP1) 等血清循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 甲基化水平及病理学检测结果等信息, 由受试者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)、曲线下面积(area under the curve, AUC)等比较各参数及多元逻辑回归模型的前列腺癌预测能力, 计算模型在阳性预测值 95% 基础上的免穿刺率及误诊率。**结果:**phi、GSTP1 病例组及环指蛋白 219 (ring finger protein 219, RNF219) 甲基化表达水平明显高于对照组, 其 AUC 值明显高于其他参数 ($P < 0.05$), 结合患者病史, 建立基于 phi 及血清 ctDNA 甲基化表达水平的多元逻辑回归模型, 临床显著性前列腺癌 (clinically significant prostate cancer, csPCa) 诊断 AUC 值为 0.94, 明显高于 tPSA (AUC = 0.61) 及 phi (AUC = 0.80) 诊断效能 ($P < 0.05$), 模型整体疾病诊断能力良好, csPCa 患者中约 46% (24/52) 可选择免穿刺根治手术, 且误诊率仅 1%, 优于 tPSA 及 phi。**结论:**研究发现 phi、血清甲基化 GSTP1 及 RNF219 基因的疾病诊断能力明显优于传统血清 PSA, 基于 3 项指标建立的诊断模型可进一步区分良性前列腺疾病及前列腺癌患者, 有望提高前列腺疾病的临床无创诊断率。

【关键词】甲基化; 前列腺健康指数; 液体活检; 临床显著性前列腺癌; 免穿刺

【中图分类号】R737.25

【文献标志码】A

A noninvasive diagnostic model for clinically significant prostate cancer based on prostate health index and circulating tumor DNA methylation

Xu Jinyan¹, Yue Daoyuan², Wang Xiong², Shu Bo¹, Yang Chunguang³

(1. Department of Urology, Wuhan Central Hospital, Huazhong University of Science and Technology;

2. Department of Laboratory Medicine, Wuhan Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology;

3. Department of Urology, Wuhan Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology)

【Abstract】Objective: To investigate the value of serum DNA methylation level and prostate health index (PHI) in the noninvasive diagnosis of prostate cancer, as well as their application in identifying the patients eligible for biopsy-free radical surgery. **Methods:** A retrospective analysis was performed for 121 patients who were hospitalized in Wuhan Tongji Hospital from March 2023 to April 2024, and related information was recorded, including age, body mass index, total prostate-specific antigen (tPSA), the methylation level of serum circulating tumor DNAs (ctDNAs) such as glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1) before surgery, and pathological results. The receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the ROC curve (AUC) were used to compare the ability of each parameter and the multivariate logistic regression model in predicting prostate cancer, and the biopsy-free rate and misdiagnosis rate of

the model were calculated based on a positive predictive value of 95%. **Results:** Compared with the control group, the case group had a significantly higher level of PHI and significantly higher methylation levels of GSTP1 and ring finger protein 219 (RNF219), and the AUC values of these indicators were significantly higher than those of other parameters ($P < 0.05$). With reference to the medical history of patients, a multivariate logistic regression model was established

作者介绍: 徐锦焰, Email: 2351154069@qq.com,

研究方向: 前列腺癌。

通信作者: 杨春光, Email: cgyang-hust@hotmail.com。

基金项目: 湖北省战略科技人才支持专项资助项目 (编号: 2023DJC160);

同济医院医学人工智能基金资助项目 (编号: AI2024B05)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20260313.1045.002>

(2026-03-14)

based on PHI and the methylation level of serum ctDNAs. This model had an AUC of 0.94 and a significantly better diagnostic efficacy than tPSA (AUC=0.61) and PHI (AUC=0.80) ($P<0.05$). The model had a good ability for the diagnosis of the disease. About 46% (24/52) of the patients with clinically significant prostate cancer could select biopsy-free radical surgery, with a misdiagnosis rate of 1%, which was better than that of tPSA and PHI. **Conclusion:** This study shows that PHI and serum methylated GSTP1 and RNF219 genes have a significantly better ability for disease diagnosis than traditional serum PSA. The diagnostic model established based on these three indicators can further distinguish patients with benign prostatic diseases from those with prostate cancer, and it is expected to significantly increase the noninvasive diagnosis rate of prostate diseases in clinical practice.

[Key words] methylation; prostate health index; liquid biopsy; clinically significant prostate cancer; biopsy-free

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是中老年男性最常见泌尿生殖系统恶性肿瘤, 有研究表明从 2020 年到 2040 年预计患病人数增长 1 倍^[1-2]。前列腺癌中最常见是前列腺腺泡腺癌, 格林森评分 (Gleason score, GS) 6 分定义为临床非显著性前列腺癌 (clinically insignificant PCa, cisPCa), GS $\geq$ 7 分者定义为临床显著性前列腺癌 (clinically significant PCa, csPCa), 非显著性前列腺癌与临床显著性前列腺癌在治疗方案及预后等方面存在显著差异。因此识别前列腺癌, 尤其是 GS 7 分以上恶性肿瘤的无创诊断方式值得深入探索。临床常见前列腺癌筛查及诊断方式有前列腺特异性抗原、直肠指诊及影像学检查, 但对临床显著性前列腺癌的诊断效能仍存在不足, 如何降低误诊、漏诊率及有创诊断比例, 并提高临床早筛早诊效率是临床上亟需解决的问题。

液体活检通过血液、尿液、前列腺液等体液来检测前列腺癌相关生物标志物, 例如前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA) 及相关衍生物、肿瘤基因、表观遗传改变、外泌体脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 等。Crowley E 等^[3]认为循环体液中肿瘤基因及表观遗传改变在肿瘤的诊断、预后评估等方面已取得重大进展, 液体活检有望替代传统诊断方式, 例如通过检测血液或尿液中细胞外囊泡的基因表达反映患者的肿瘤特征及治疗变化^[4]; 基于基因表达量建立的前列腺评分模型, 诊断效能显著优于总 PSA ($P<0.05$), 仅以 3% 漏诊率为代价减少了 26% 的非必要活检率, 也说明液体活检在中国人群中的适用性^[5]。

在众多液体活检方式中, 通过检测血液中循环肿瘤 DNA 甲基化对肿瘤进行定性诊断的方式具有高效、低成本且特异性强的特征。DNA 甲基化作为一种表观遗传学改变, 通过修饰基因启动子参与调

控基因表达和细胞功能^[6-7], 例如当抑癌基因发生超甲基化时可导致抑癌基因沉默, 进而促进恶性肿瘤的发生和进展, 例如谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因甲基化改变目前已在多种恶性肿瘤中发现, 例如乳腺癌、肺癌、前列腺癌等^[8]。且 1 项病例对照研究表明外周血 DNA 中 CpG 岛高甲基化与前列腺癌发生及侵袭性风险高度相关^[9]。Xu RH 等^[10]大型临床队列研究表明了血浆中循环肿瘤 DNA 甲基化模型在肝细胞癌诊断、监测及预后等工作中的价值。Chen X 等^[11]也在 1 项前瞻性队列研究中证实尿肿瘤 DNA 甲基化在膀胱癌诊断及术后监测的价值, 可减轻膀胱镜及二次手术的负担。因此本课题组也可开发出新的关于前列腺癌诊断相关的 DNA 甲基化生物标志物及建立有效的诊断模型, 探索其在前列腺恶性肿瘤诊断和治疗的价值, 从而为临床诊断和疾病监测提供新方式。

此次研究收集患者术前循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 甲基化水平, 并参考多篇有关前列腺癌患者的 DNA 甲基化特征, 建立基于前列腺健康指数 (prostate health index, phi) 值和血液中 ctDNA 甲基化水平的 csPCa 预测模型, 并与总 PSA (total prostate specific antigen, tPSA) 和 phi 进行比较, 探索循环肿瘤 DNA 甲基化水平及预测模型在临床显著性前列腺癌预测效能及在避免非必要穿刺中的应用价值。

1 资料及方法

1.1 研究人群

本研究以甲基化指标在中国前列腺癌患者术前诊断中的应用价值为目标, 回顾性纳入武汉同济医院汉口院区的住院患者, 血清总 PSA “灰区” (4~10 ng/mL) 的患者虽是前列腺癌无创诊断的主要研究对象, 但临床工作中总 PSA 在 10~

30 ng/mL 的患者中仍有半数 of 良性前列腺疾病患者,存在过度诊疗风险,因此考虑将 4~30 ng/mL 的患者纳入该研究。该研究已通过武汉同济医院伦理委员会批准(批号:TJ-IRB20230330)。

纳入标准:①tPSA 在 4~30 ng/mL;②完成了穿刺术前血液甲基化和 phi 检测;③患者符合 2022 年前列腺穿刺专家共识穿刺指征且完成前列腺穿刺手术,有明确前列腺穿刺病理学检查结果。排除标准:①缺失年龄、体质指数(body mass index, BMI)、PSA 等患者信息及检查检验结果;②既往有前列腺电切病史;③其他恶性肿瘤病史;患者筛选流程如图 1 所示。

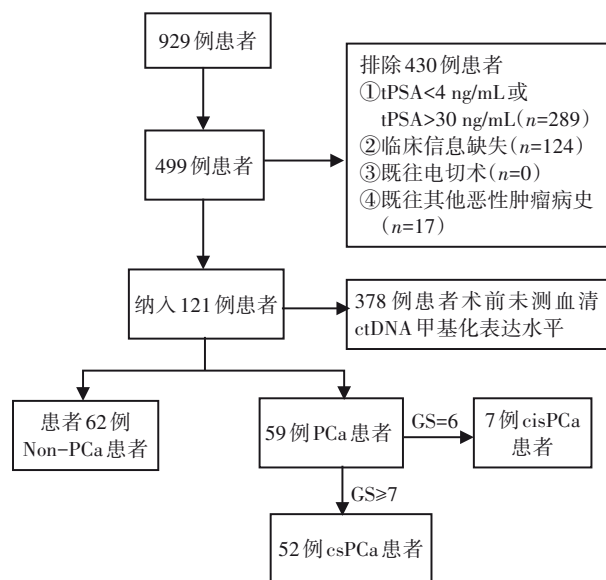


图 1 数据筛选流程图

1.2 血清甲基化肿瘤 DNA 指标

本课题组基于相关文献中的数据分析及课题组前列腺癌特异性基因甲基化检测结果,优选了 4 个血清 DNA 甲基化位点纳入本研究^[12]。

谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (glutathione S-transferase pi 1, GSTP1) 基因启动子序列在前列腺腺癌中表现为高甲基化程度,有研究表明前列腺癌患者血浆中 GSTP1 基因甲基化修饰谱与良性患者间存在不同,可作为临床预后监测及临床决策的新型标志物^[13],并提示 GSTP1 及环指蛋白 219 (ring finger protein 219, RNF219) 基因甲基化程度可以绝对敏感度和特异度区分良性前列腺增生和前列腺癌患者^[14-15]。另有荟萃研究表明 GSTP1 在血浆、血清及尿液中的检测结果的特异性优于 PSA,可作为前列腺癌筛查的补充方法^[16]。Ras 关联结构域家族蛋白 1A (Ras association domain family member 1A, RASSF1A) 基因在多种恶性肿瘤中表现为高甲基化,例如前列腺癌、乳腺癌、肺癌及结肠癌^[6,17],Woodson K 等^[18]通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术测定 90 例前列腺癌患者病理组织 DNA 甲基化状态,证实 RASSF1A 及 GSTP1 基因甲基化在前列腺癌中高度普遍,且

随着前列腺癌国际泌尿病理学会 (International Society of Urological Pathology, ISUP) 分级升高, RASSF1A 基因甲基化程度也随之增加,正常前列腺组织与 ISUP3 级之后患者间 RASSF1A 基因甲基化程度存在显著差异^[19],国内 1 项研究结果也表明 RASSF1A 及 GSTP1 基因甲基化表达水平检测可明显提高前列腺癌诊断的敏感度及特异度^[20],另有研究表明 RASSF1A 甲基化位点可能用于晚期前列腺癌的靶向治疗^[21],且 RASSF1A 甲基化检测可提高前列腺癌转移及治疗效果的早期检测能力^[22]。POU 结构域 4 类转录因子 (POU class 4 homeobox gene, POU4F) 基因也称 Brn3b,首先在视网膜神经节细胞中发现,后发现在睾丸、乳腺上皮细胞及子宫等多种组织中有所表达,并参与调控细胞的增殖与分化,是直肠癌、乳腺癌、尿路上皮癌及卵巢癌等多种恶性肿瘤发生发展的调节基因,具有泛肿瘤表达特征^[23-26]。

该研究参考以上文献,认为 GSTP1、RNF219、RASSF1A、POU4F 甲基化表达水平在前列腺癌液体无创诊断中具有研究价值,甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因用来进行对照分析,将 5 种 ctDNA 甲基化启动子循环阈值作为纳入分析。

1.3 样本收集及处理

本研究中,在患者行穿刺手术前收集患者血浆,低温无菌保护下送至低温高速离心机离心血浆后取上清液 (4 °C, 14 000 r/min, 5 min),在 -80 °C 条件下保存留待检测,通过提取试剂盒 Blood Genomic DNA Midi Kit (1~5 mL) (CW BIO, CW0541S) 提取血浆总 DNA,通过转化试剂盒 EZ DNA Methylation-Lightning Kits (ZYMO RESEARCH, D5049) 对基因进行重亚硫酸盐处理及甲基化位点标记。

1.4 定量逆转录聚合酶链式反应 (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)

经过样本提纯及重亚硫酸盐处理后,在进一步的 GSTP1、RNF219 等基因启动子序列的 PCR 试验中,制备包括 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ plus) (TAKARA, 9151A)、Hieff UNICON® HotStart Taq DNA Polymerase (YEASEN, 10729ES72)、Uracil DNA Glycosylase (UNG) (TAKARA, 2820) 和 dU plus dNTP Mixture (TAKARA, 4035) 的 PCR 反应体系,并加入各目标基因启动子对应引物,在 PCR 仪 (宏石 SLAN-96S) 中进行聚合酶链反应,程序设置为 37 °C 下 10 min,然后 95 °C 下 5 min,最后在 95 °C 下 15 s 及 60 °C 下 35 s,循环 45 次。在 PCR 仪中分析各基因启动子循环阈值 (cycle threshold value, Ct value),以 ACTB 序列为内参基因,计算目的基因 ΔCt 值 (目标基因 Ct 值 - ACTB 基因 Ct 值),反映各基因启动子甲基化程度,并在后续分析中用基因名称表达 ΔCt (目标基因)。

1.5 统计学方法

本研究采用 RStudio 软件 (版本 4.3.1) 进行统计学分析。首先通过相关性热图及相关性系数评估不同指标间的共线性关系,经 LASSO 分析再次筛选模型参数;符合正态分布的连续变量数值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 student's

t -test 分析组间差异有无统计学意义;非正态分布的连续变量数值以中位数及四分位数 $[M_d(P_{25}, P_{75})]$ 表示,用 Wilcoxon rank sum test 分析组间差异有无统计学意义。在 RStudio 软件中通过 rms 工具包拟合广义线性模型,并用 plogis 函数($P = \text{plogis}(y) = 1/[1 + e^{(-y)}]$)计算模型预测 csPCa 概率值 P ,用 qlogis 函数计算 P 值对应参数数值。绘制不同参数及模型的受试者操作特征(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线,并计算对应曲线下面积(area under the curve, AUC)值比较其诊断效能,用 Delong 检验分析不同指标及预测模型 ROC 间差异有无统计学意义;最后用决策曲线分析(decision curve analysis, DCA)及校准曲线评估模型临床应用价值及可靠性。计算各模型在 95% 阳性预测值(positive predictive value, PPV)条件下的免穿率及误诊率,以及 95% 敏感度基础上的特异度、PPV、阴性预测值(negative predictive value, NPV)。该研究过程中,统计学检验水准 $\alpha = 0.05$,为双侧检验。

2 结果

2.1 患者特征

本研究回顾性收集武汉同济医院汉口院区的 929 例住院患者信息,808 例患者不符合纳入标准而排除,最终纳入 121 例患者,前列腺癌患者 59 例,临床显著性前列腺癌患者 52 例,所有纳入研究患者的信息如表 1 所示,患者中位年龄为 65 岁,平均 BMI 为 23.68 kg/m²,中位 tPSA 为 9.91 ng/mL,符

合正态分布的连续性变量以均值 $\pm$ 标准差表示,符合偏态分布的连续性变量以中位数及四分位数表示。

2.2 参数单因素及相关性分析

在建立诊断模型前,研究通过单因素分析对比不同参数在疾病诊断的诊断能力比重,如表 1 及图 2 所示,tPSA、f/tPSA、p2PSA、phi、尿道炎症、穿刺史、GSTP1 基因、RNF219 基因及 POU4F 基因甲基化表达水平在 csPCa 诊断中表现优于其他参数,相关性分析发现 tPSA 与 tPSA 及 p2PSA、p2PSA 与 phi 间相关性系数大于 0.6,相关性较强,见图 3。

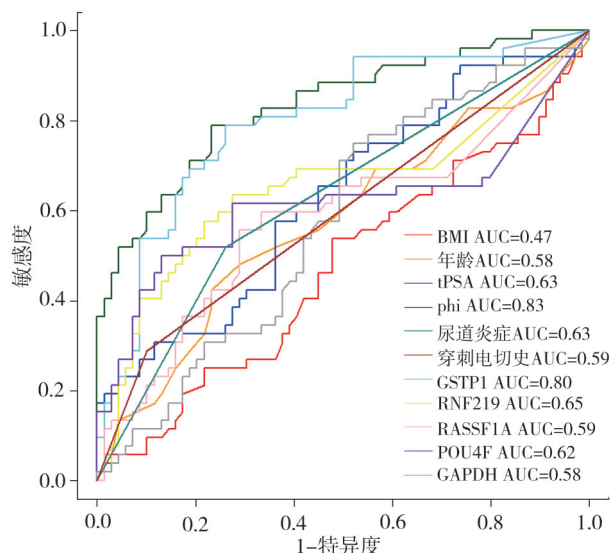


图2 单因素 ROC 分析

表 1 临床显著性前列腺癌基线分析 $[M_d(P_{25}, P_{75}); \bar{x} \pm s; n, \%]$

参数	Non-csPCa (69)	csPCa (52)	$w/t/\chi^2$	P 值	AUC	Delong 检验
年龄(岁)	65(60,68)	67(60,72)	1 523	0.156 ^a	0.58(0.47~0.68)	—
BMI(kg/m ²)	23.50 $\pm$ 2.93	23.92 $\pm$ 3.28	-0.721	0.473 ^b	0.47(0.36~0.58)	0.14
tPSA(ng/mL)	9.08(5.79, 15.41)	11.26(7.91, 19.69)	1 338	0.017 ^a	0.63(0.53~0.73)	0.51
fPSA(ng/mL)	1.47(1.01, 2.13)	1.49(1.00, 2.52)	1 745.5	0.802 ^a	0.51(0.41~0.62)	0.38
f/tPSA(%)	15.27(11.75, 20.40)	13.24(9.95, 17.51)	2 189.5	0.038 ^a	0.61(0.51~0.71)	0.69
p2PSA(ng/mL)	16.72(11.38, 29.27)	28.83(18.11, 58.11)	1 002	0.000 ^a	0.72(0.63~0.81)	0.03
phi	37.10(26.60, 45.10)	68.80(48.50, 113.05)	597.5	<0.001 ^a	0.83(0.76~0.91)	<0.01
尿道炎症			7.40	0.007 ^c	0.63(0.54~0.72)	0.47
否	18(14.9)	27(22.3)				
是	51(42.1)	25(20.7)				
穿刺史			5.77	0.016 ^c	0.59(0.52~0.67)	0.80
否	62(51.2)	37(30.6)				
是	7(5.8)	15(12.4)				
GSTP1	38.94(36.82, 41.98)	34.20(30.25, 36.82)	2 860	<0.001 ^a	0.80(0.72~0.88)	<0.01
RNF219	41.57(38.82, 45.00)	37.05(33.82, 45.00)	2 338.5	0.004 ^a	0.65(0.55~0.77)	0.35
RASSF1A	40.56(37.59, 45.00)	37.83(35.36, 45.00)	2 099	0.106 ^a	0.59(0.48~0.69)	0.89
POU4F	39.87(37.62, 42.68)	36.95(33.87, 45.00)	2 207.5	0.029 ^a	0.62(0.50~0.73)	0.62
GAPDH	31.52(28.79, 33.70)	30.07(28.26, 31.82)	2 071.5	0.147 ^a	0.58(0.48~0.68)	0.98

注:GSTP1, 谷胱甘肽 S-转移酶 Pi 1; Glutathione S-Transferase Pi 1; RNF219, 环指蛋白 219, Ring Finger Protein 219; RASSF1A, Ras 关联结构域家族成员 1A, Ras Association Domain Family Member 1A; POU4F, POU 域 4 类同源框转录因子, POU Class 4 Homeobox; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; a, 秩和检验(w 值); b, t 检验(t 值); c, 卡方检验(χ^2 值)

2.3 前列腺癌及显著性前列腺癌诊断预测模型

在研究中,并将患者以 7:3 比例随机分组为训练集与验证集,训练集与验证集患者间参数差异无统计学意义,见表 2。

在调整了混杂因素后,临床显著性前列腺癌诊断模型参数纳入 tPSA、phi、穿刺史(Biopsy)、GSTP1、RNF219,见表 3。

训练集中以二分类逻辑回归方式建模可得患者罹患疾病的概率,结果转化为公式如下:

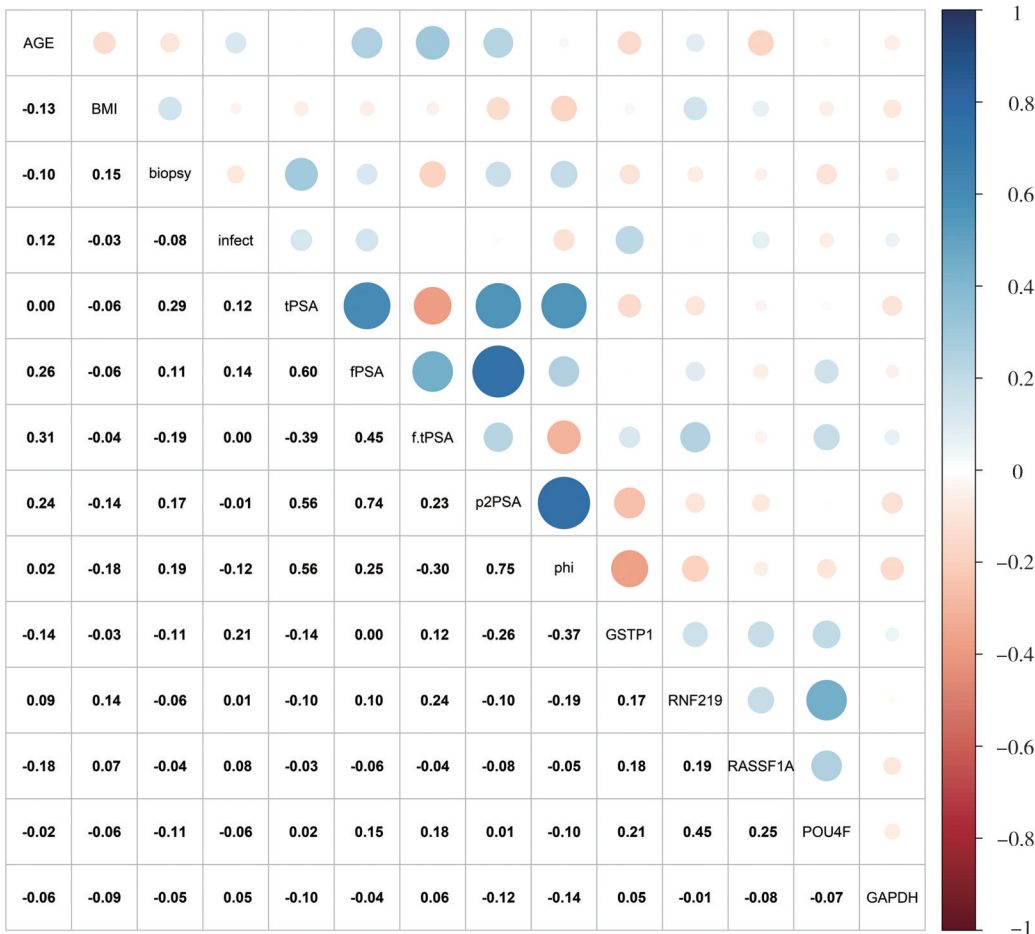


图3 参数相关性分析热图

表2 训练集与验证集基线对比分析[$M_d(P_{25}, P_{75}); \bar{x} \pm s; n, \%$]

参数	训练集(85)	验证集(36)	$w/t/\chi^2$	P 值
年龄(岁)	65(60,71)	66(60,71)	1 493	0.836 ^a
BMI(kg/m ²)	23.56 ± 3.09	23.96 ± 3.07	-0.665	0.509 ^b
tPSA(ng/ml)	9.91(6.47,16.31)	10.17(6.72,16.60)	1 559	0.872 ^a
f/tPSA(%)	13.91(10.83,19.17)	15.23(11.92,19.48)	1 380.5	0.398 ^a
phi	43.10(31.60,68.20)	48.85(33.40,68.55)	1 395.5	0.447 ^a
尿道炎症			0.755	0.385 ^c
否	29(24.0)	16(13.2)		
是	56(46.3)	20(16.5)		
穿刺史			0.001	0.981 ^c
否	69(57.0)	30(24.8)		
是	16(13.2)	6(5.0)		
GSTP1	37.30(33.93,41.08)	37.16(33.75,40.63)	1 515.5	0.937 ^a
RNF219	40.23(35.70,45.00)	39.85(35.95,45.00)	1 515	0.933 ^a
POU4F	39.03(36.72,43.21)	39.45(33.88,45.00)	1 600	0.691 ^a

注:a,秩和检验,b,t 检验,c,卡方检验

$P(\text{csPCa}) = \text{plogis}(-\text{tPSA} * 0.2488 + \text{phi} * 0.0806 + \text{biopsy} * 2.1140 - \text{GSTP1} * 0.2934 - \text{RNF219} * 0.0672 + 11.0358)$ 。

进一步分析模型诊断效能,并将模型与 tPSA 及 phi 对比分析,分析结果如表 4 及图 4 所见。模型对前列腺癌及临床显著性前列腺癌的诊断效能明显优于 tPSA 及 phi。通过校准曲线对模型评估,模型轻度高估罹患疾病概率。临床决策曲线分析见模型临床净获益高于常规检查,综合上述结果,以前列腺癌及临床显著性前列腺癌为终点的诊断模型整体效能优于常规检查,可有效辨别患者,提高临床疾病筛查能力,但需结合实际避免过度诊断。

力,但需结合实际避免过度诊断。

如表 5 所示,当 PPV=95% 时,模型预测截断值为 0.9,模型预测值大于截断值者为临床显著性前列腺癌患者,可考虑免穿刺根治手术,免穿刺率为 21%,csPCa 患者中约 46% (24/52) 可考虑行免穿刺根治手术,但仍需考虑 1% 误诊率,临床需进一步结合患者影像学等检验检查结果进行临床决策。当敏感度为 95% 时,模型 PPV 及 NPV 均明显高于 tPSA 及 phi,误诊率更低,综上,基于 phi 及 ctDNA 甲基化水平的诊断模型的 csPCa 无创诊断率高于 tPSA 及 phi,且漏诊率及误诊率更低。

表 3 临床显著性前列腺癌(csPCa)多元逻辑回归分析

项目	年龄	tPSA	f/tPSA	phi	尿道炎症	穿刺史	GSTP1	RNF219	POU4F
OR	1.13	0.78	0.94	1.10	0.35	16.4	0.82	0.86	1.06
95%CI	1.02~1.26	0.65~0.91	0.87~1.01	1.05~1.15	0.10~1.17	2.82~128	0.71~0.94	0.74~1.00	0.91~1.25
P	0.03	<0.01	0.14	<0.01	0.09	<0.01	<0.01	0.06	0.47

表 4 模型诊断能力对比分析

结局变量	评估	模型训练集	模型验证集	训练集 tPSA	训练集 phi
csPCa	AUC(95%CI)	0.94(0.89~0.99)	0.87(0.75~0.99)	0.61(0.49~0.74)	0.80(0.70~0.91)
	P 值	—	0.28	<0.01	<0.01
	最佳截断值	0.39	0.39	9.73	59.17
	敏感度	0.88	0.74	0.58	0.64
	特异度	0.90	0.76	0.54	0.90
	阳性预测值	0.85	0.78	0.44	0.81
	阴性预测值	0.92	0.72	0.67	0.80
	粗一致率	0.89	0.75	0.55	0.80
	F1 分数	0.87	0.76	0.50	0.71

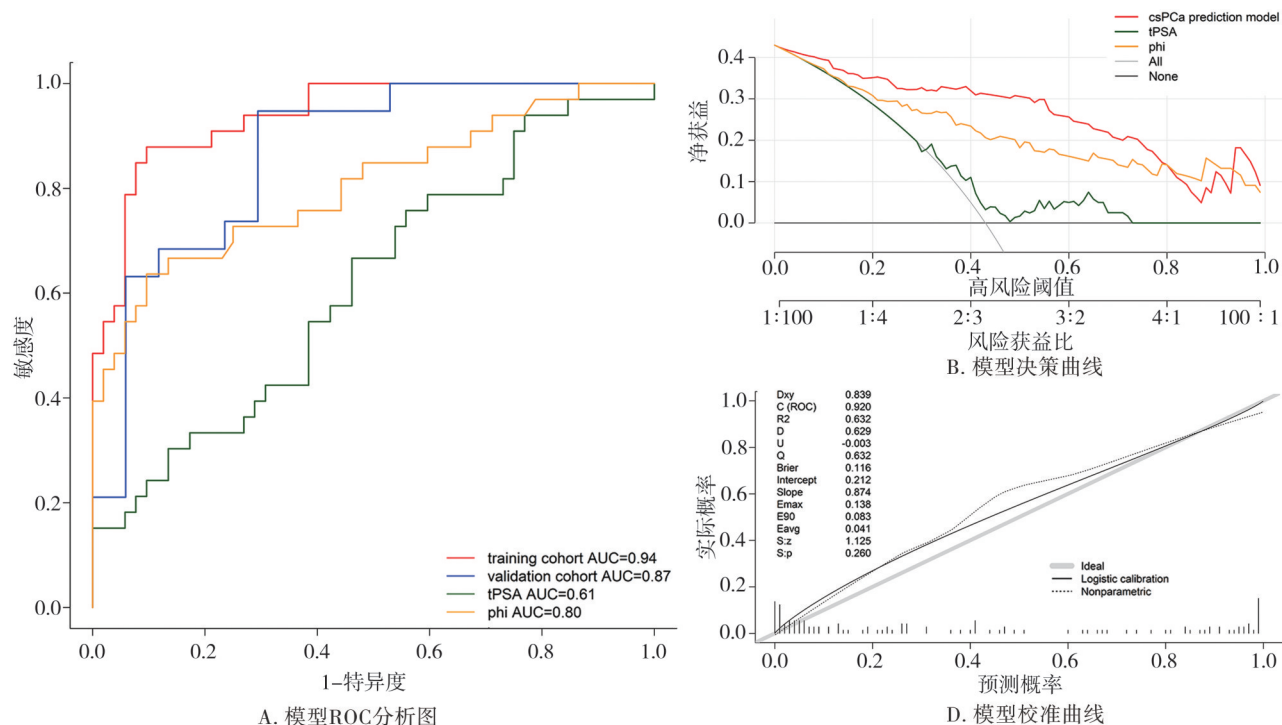


图 4 模型性能评估示意图

表 5 模型免穿刺分析

项目	PPV=95%					敏感度=95%				
	截断值	敏感度	特异度	免穿率	误诊率	截断值	PPV	NPV	漏诊率	误诊率
模型	0.9	46%	99%	21%	1%	0.15	62%	93%	6%	43%
tPSA	24.12	17%	100%	7%	0%	5.01	45%	73%	6%	88%
phi	82.38	40%	99%	18%	1%	31.14	52%	88%	6%	67%

3 讨 论

前列腺癌作为男性生殖系统常见恶性肿瘤,在早期筛查及诊断工作中仍存在诸多问题,临床医生在如何制定治疗方案时缺乏更有力的指导方案,目前临床常用的前列腺癌诊断方式主要为 PSA 和影像学分析,诊断金标准为活检病理结果。根据诊疗指南,对于 PSA“灰区”(4~10 ng/mL)的患者,如 f/tPSA、PSAD 及影像学检查均无异常则推荐严密随访,但仍存在部分临床显著性前列腺癌漏诊问题,而对于 PSA 在 10~30 ng/mL 区间的患者,则推荐进一步行磁共振、正电子发射计算机断层扫描(positron emission tomography-computed tomography, PET-CT)等影像学检查或行病理活检,降低了疾病漏诊率,但也因此存在部分过度诊疗问题,且对于部分存在穿刺活检禁忌症患者也难以确定治疗方案,因此如何提高 4~30 ng/mL 区间患者术前临床显著性前列腺癌的诊断能力迫在眉睫。根据临床工作及大量文献分析,基于[-2]前体前列腺特异性抗原([-2]proPSA, p2PSA)的前列腺健康指数(phi)明显提升了疾病的检出率。另外, DNA 甲基化经多项研究表明与多种肿瘤发生与进展密切相关,通过影响抑癌基因或促癌基因启动子功能进而影响细胞功能,基于基因甲基化的无创液体诊断有望成为前列腺癌分子诊断的新趋势^[27-28],因此可以考虑将 DNA 启动子甲基化作为新的生物标志物纳入研究,并结合 phi 建立诊断模型。

本研究中以临床检验结果及血浆肿瘤 DNA 甲基化表达水平及前列腺健康指数(Prostate Health Index, phi)为研究对象,甲基化表达水平通过 PCR 试验检测循环甲基化肿瘤 DNA 启动子 Ct 值,从而反映该 DNA 启动子甲基化表达水平。以预测前列腺癌及临床显著性前列腺癌为试验终点,通过单因素分析及多元逻辑回归评估临床检验结果及 DNA 甲基化水平在疾病诊断的能力,在 ROC 及 DCA 分析中可得血清肿瘤 DNA 甲基化表达水平及 phi 指标的诊断效能及临床获益均显著优于传统检验指标

PSA,此外甲基化生物标志物联合 phi 建模诊断效能及患者净获益相较于单一参数显著提升,校准曲线评估模型良好,但仍存在轻度诊断过度风险,考虑样本量不足导致,有进一步研究价值。经研究可知, DNA 甲基化与肿瘤发生与进展相关,因其诊断敏感度及特异度可作为疾病液体活检的新型生物标记物,且临床采样处理及试验均便捷易行,有利于在前列腺癌早筛早诊工作中推广试验,且基于血清肿瘤 DNA 甲基化水平及 phi 的疾病预测模型可提高临床疾病无创液体诊断能力,其预测准确性、稳定性均优于传统检测方式,指导疾病诊疗方案的选择。

目前,国内外已有诸多 DNA 甲基化在前列腺疾病的研究,包括开发新型生物标志物、致病机制、监测疾病预后及治疗靶点等。大量研究通过基因组学及大数据分析发现肿瘤 DNA 甲基化在前列腺癌、肝癌、结直肠癌及宫颈癌等多种恶性疾病中表达水平相较于无疾病对照组发生变化^[29-30], Van Tongelen A 等^[31]认为前列腺癌患者在全基因组内表现为低甲基化,在启动子 CpG 岛则表现为高甲基化,且均与前列腺癌的发生发展密切相关。The Cancer Genome Atlas Research Network 基于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据研究,揭示了前列腺癌的分子分型及其与 DNA 甲基化的关系,相较于正常前列腺组织,初级前列腺癌显示出多种甲基化变化;相较于正常前列腺组织,雄激素反应基因例如雄激素受体(androgen receptor, AR)、激肽释放酶 3(kallikrein-related peptidase 3, KLK3)、叶酸水解酶 1(folate hydrolase 1, FOLH1)等基因在前列腺癌中表现为低甲基化状态,在转移性去势抵抗型前列腺癌中肿瘤抑制因子视网膜母细胞瘤蛋白 1(retinoblastoma protein 1, RB1)和肿瘤蛋白 P53(tumor protein P53, TP53)的启动子未表现出高甲基化状态,且 GSTP1 在转移性去势抵抗性前列腺癌(metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC)和良性前列腺组织中表现出甲基化差异^[32-34]。Li J 等^[35]则通过中国前列腺癌基因组及表观基因组图谱(Chinese Prostate Cancer Genome and

Epigenome Atlas, CPGEA)研究表明前列腺癌患者与正常患者间 DNA 甲基化也存在一定差异,同时也发现同一疾病在中国人群和西方人群中的基因突变及表观遗传景观存在明显差异。在临床应用上,一些临床研究也发现及验证了一些 DNA 甲基化生物标志物及模型的临床诊断价值,在 1 项纳入 41 例确诊前列腺癌土耳其人的回顾性研究中,细胞因子信号抑制因子 3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)基因甲基化在局限性前列腺癌和局部进展型前列腺癌中具有显著性差异($P=0.03$),可提高局部进展型前列腺癌的诊断能力,不过尚缺乏外部验证及模型评估^[36]。Van Neste L 等^[37]在 1 项前瞻性研究中建立基于临床风险因素和 GSTP1、RASSF1A 等多基因甲基化的前列腺癌风险评分系统,高 GS 前列腺癌预测 AUC 达 0.82,但也面临样本量不足的问题。还有研究以非洲及美国男性为研究对象,通过建立基于不同基因甲基化程度的逻辑回归模型,判断不同基因甲基化程度与患前列腺癌风险间的关系,但仍有待完善模型对前列腺癌及显著性前列腺癌诊断效能的评估及进一步分析^[38]。Cucchiara V 等^[39]研究表明利用机器学习方法可以筛选 DNA 甲基化标志物,并构建了前列腺癌诊断预测模型,进而改善了前列腺癌的检测及预后等工作,但仍需要大规模和多中心的研究来验证研究结果。此外一些基于基因甲基化的诊断模型也可以提高前列腺癌的诊出率,李丹等^[40]建立了基于血浆中同源盒基因 A6(homeobox A6, HOXA6)及脆性组氨酸三联体基因(fragile histidine triad, FHIT)的甲基化水平的多因素逻辑回归模型,研究发现 2 种基因在前列腺癌患者中甲基化表达水平均有所提高,随临床分期进展而升高,两者联合诊断前列腺癌的敏感度为 95%。

因此综合以上文献,本课题组发现不同地区及人种前列腺癌的甲基化特征筛选存在巨大差异,因此综合多个地区的文献报道,探索中国患者的甲基化特征或通用型 DNA 甲基化位点,有助于 DNA 甲基化在前列腺癌诊疗的应用,但基于 DNA 甲基化指标的诊断模型研究工作仍存在不足。

本研究中仍存在局限性,纳入试验样本量较少,且为单中心研究,缺乏外部验证,存在一定偏倚,目前仅纳入了 GSTP1、RASSF1A 等 4 种基因作为研究对象,关于血液中其他 DNA 甲基化位点在前列腺疾病诊断的价值仍有待进一步研究;研究中基于 phi 及肿瘤 DNA 甲基化表达水平的模型虽然敏感度

及特异度均高于常规检验方式,但存在过度诊断可能,考虑样本量较少所致,因此需结合实际情况应用于临床工作。

总体而言,phi、GSTP1 及 RNF219 甲基化表达水平均可作为前列腺癌及显著性前列腺癌液体活检方式应用于 tPSA 在 4~30 ng/mL 区间患者,基于 3 项参数建立的诊断模型进一步提高了疾病的无创诊断能力及免穿刺比例。对于血清 ctDNA 甲基化表达水平在前列腺癌的致病机制、诊断、治疗及预后监测研究,还有待进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 徐锦焰:研究方案设计、实施研究、收集及分析数据、论文撰写;岳道远:数据收集、试验技术指导;王雄:研究方案设计、实验技术指导;舒博:研究方案设计、实验技术指导;杨春光:研究方案设计、实施研究、论文修改

参 考 文 献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3):229–263.
- [2] James ND, Tannock I, N'Dow J, et al. The Lancet Commission on prostate cancer: planning for the surge in cases[J]. Lancet, 2024, 403(10437):1683–1722.
- [3] Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2013, 10(8):472–484.
- [4] Casanova-Salas I, Aguilar D, Cordoba-Terreros S, et al. Circulating tumor extracellular vesicles to monitor metastatic prostate cancer genomics and transcriptomic evolution[J]. Cancer Cell, 2024, 42(7):1301–1312.
- [5] Jiang SQ, Lu FT, Chen JD, et al. UPCARE: urinary extracellular vesicles-derived prostate cancer assessment for risk evaluation[J]. J Extracell Vesicles, 2024, 13(8):e12491.
- [6] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6):415–428.
- [7] Geybels MS, Zhao SS, Wong CJ, et al. Epigenomic profiling of DNA methylation in paired prostate cancer versus adjacent benign tissue[J]. Prostate, 2015, 75(16):1941–1950.
- [8] Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction?[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(2):107–116.
- [9] FitzGerald LM, Naeem H, Makalic E, et al. Genome-wide measures of peripheral blood DNA methylation and prostate cancer risk in a prospective nested case-control study[J]. Prostate, 2017, 77(5):471–478.
- [10] Xu RH, Wei W, Krawczyk M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Nat Mater, 2017, 16(11):1155–1161.
- [11] Chen X, Zhang JT, Ruan WM, et al. Urine DNA methylation assay enables early detection and recurrence monitoring for bladder cancer[J]. J Clin Invest, 2020, 130(12):6278–6289.

- [12] Xu J, Wu Y, Ma W, et al. Establishing Clinically Significant Prostate Cancer Diagnosis Models Based on Serum Methylation Levels of Four Genes[J]. *Annals of surgical oncology*, 2026, 33(1): 730–739.
- [13] Mahon KL, Qu WJ, Lin HM, et al. Serum free methylated glutathione S-transferase 1 DNA levels, survival, and response to docetaxel in metastatic, castration-resistant prostate cancer: post hoc analyses of data from a phase 3 trial[J]. *Eur Urol*, 2019, 76(3): 306–312.
- [14] Bryzgunova O, Bondar A, Ruzankin P, et al. Locus-specific methylation of *GSTP1* *RNF219* and *KIAA1539* genes with single molecule resolution in cell-free DNA from healthy donors and prostate tumor patients: application in diagnostics[J]. *Cancers*, 2021, 13(24): 6234.
- [15] Gupta H, Inoue H, Nakai Y, et al. Progressive spreading of DNA methylation in the *GSTP1* promoter CpG island across transitions from precursors to invasive prostate cancer[J]. *Cancer Prev Res*, 2023, 16(8): 449–460.
- [16] Wu T, Giovannucci E, Welge J, et al. Measurement of *GSTP1* promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(1): 65–73.
- [17] Liu LM, Yoon JH, Dammann R, et al. Frequent hypermethylation of the *RASSF1A* gene in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2002, 21(44): 6835–6840.
- [18] Woodson K, Hanson J, Tangrea J. A survey of gene-specific methylation in human prostate cancer among black and white men[J]. *Cancer Lett*, 2004, 205(2): 181–188.
- [19] Liu LY, Kron KJ, Pethe VV, et al. Association of tissue promoter methylation levels of *APC*, *TGFβ2*, *HOXD3* and *RASSF1A* with prostate cancer progression[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(10): 2454–2462.
- [20] 李爱群, 于静, 李晓鲲. *RASSF1A* 与 *GSTP1* 基因甲基化检测对前列腺癌诊断价值的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(17): 1220–1222.
- Li AQ, Yu J, Li XK. Value of combination of *RASSF1A* and *GSTP1* methylation detection for diagnosis of prostatic cancer[J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2017, 24(17): 1220–1222.
- [21] Agarwal S, Amin KS, Jagadeesh S, et al. Mahanine restores *RASSF1A* expression by down-regulating *DNMT1* and *DNMT3B* in prostate cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 99.
- [22] Friedemann M, Horn F, Gutewort K, et al. Increased sensitivity of detection of *RASSF1A* and *GSTP1* DNA fragments in serum of prostate cancer patients: optimisation of diagnostics using *OBBPA*-ddPCR[J]. *Cancers*, 2021, 13(17): 4459.
- [23] Budhram-Mahadeo VS, Latchman DS. Targeting *Brn-3b* in breast cancer therapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, 10(1): 15–25.
- [24] Guo KB, Wang PP, Zhang LY, et al. Transcription factor *POU4F2* promotes colorectal cancer cell migration and invasion through hedgehog-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(10): 4176–4186.
- [25] Maskell LJ, Mahadeo AV, Budhram-Mahadeo VS. *POU4F2/Brn-3b* transcription factor is associated with survival and drug resistance in human ovarian cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(95): 36770–36779.
- [26] Budhram-Mahadeo V, Moore A, Morris PJ, et al. The closely related *POU* family transcription factors *Brn-3a* and *Brn-3b* are expressed in distinct cell types in the testis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(10): 1027–1039.
- [27] 顾君, 陈振杰, 何泽喜, 等. DNA 异常甲基化在前列腺癌发生发展及诊疗中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(13): 2541–2545.
- Gu J, Chen ZJ, He ZX, et al. Research progress on abnormal DNA methylation in the occurrence, development, diagnosis and treatment of prostate cancer[J]. *J Mod Oncol*, 2023, 31(13): 2541–2545.
- [28] 曹雷, 郭利娟, 郭晓锦, 等. 癌症液体活检新思路: 数字 PCR 检测 DNA 甲基化[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2019, 46(11): 1085–1100.
- Cao L, Guo LJ, Guo XJ, et al. New path of cancer liquid biopsy: DNA methylation detection by digital PCR[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2019, 46(11): 1085–1100.
- [29] 佟延秋. 基于生物信息学的前列腺癌与结直肠癌肿瘤标志物预测研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
- Tong YQ. Prediction study on tumor markers for prostate cancer and colon and rectal cancer based on bioinformatics[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2020.
- [30] 王娟. 循环肿瘤 DNA 甲基化改变在前列腺癌、肝癌发生发展中的应用研究[D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2021.
- Wang J. Application of DNA methylation changes in circulating tumors in the occurrence and development of prostate cancer and liver cancer [D]. Xi'an: Air Force Medical University of PLA, 2021.
- [31] Van Tongelen A, Lorient A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes[J]. *Cancer Lett*, 2017, 396: 130–137.
- [32] Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer[J]. *Cell*, 2015, 163(4): 1011–1025.
- [33] Zhao SG, Chen WS, Li HL, et al. The DNA methylation landscape of advanced prostate cancer[J]. *Nat Genet*, 2020, 52(8): 778–789.
- [34] Massie CE, Mills IG, Lynch AG. The importance of DNA methylation in prostate cancer development[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 166: 1–15.
- [35] Li J, Xu CL, Lee HJ, et al. A genomic and epigenomic atlas of prostate cancer in Asian populations[J]. *Nature*, 2020, 580(7801): 93–99.
- [36] Demircan Tan B, Turan T, Yucel B, et al. Aberrant *SOCS3* promoter methylation as a noninvasive diagnostic biomarker for locally advanced prostate cancer[J]. *Medeni Med J*, 2020, 35(2): 99–105.
- [37] Van Neste L, Groskopf J, Grizzle WE, et al. Epigenetic risk score improves prostate cancer risk assessment[J]. *Prostate*, 2017, 77(12): 1259–1264.
- [38] Moses-Fynn E, Tang W, Beyene D, et al. Correlating blood-based DNA methylation markers and prostate cancer risk in African-American men[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203322.
- [39] Cucchiara V, Cooperberg MR, Dall'Era M, et al. Genomic markers in prostate cancer decision making[J]. *Eur Urol*, 2018, 73(4): 572–582.
- [40] 李丹, 陈学栋, 谭琳. 血浆 cfDNA 中 *HOXA6*、*FHIT* 甲基化水平在前列腺癌诊断中的作用[J]. *医学研究杂志*, 2024, 53(10): 157–160, 177.
- Li D, Chen XD, Tan L. The role of *HOXA6* and *FHIT* methylation levels in plasma cfDNA in the diagnosis of prostate cancer[J]. *J Med Res*, 2024, 53(10): 157–160, 177.
- (收稿: 2025-12-17; 修回: 2026-01-27; 录用: 2026-02-09)
- (责任编辑: 李青颖)
- 本文引用格式:
- 徐锦焰, 岳道远, 王雄, 等. 基于前列腺健康指数和 ctDNA 甲基化的临床显著性前列腺癌无创诊断模型[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(8): 1161–1169.