·论著·

*ATR/CHEK1*基因突变与胃癌高TMB/MSI-H状态的关系及其对免疫治疗效果的预测作用

雒雯宇[1,2],任静怡[1],艾力菲娅·依力夏提[1],申情[1],宋娜[1]
(1.中国医科大学附属第一医院肿瘤内科,沈阳 110001;2.中国人民解放军总医院第一医学中心生物治疗科,北京 100853)

摘要 目的 探讨胃癌(GC)患者共济失调毛细血管扩张突变基因Rad3相关激酶(*ATR*)和检查点激酶1(*CHEK1*)基因突变与肿瘤突变负荷(TMB)、微卫星状态(MSS)及程序性死亡配体1(PD-L1)表达的相关性,评估其作为预测免疫治疗效果生物标志物的潜力。**方法** 回顾性分析594例GC患者的福尔马林固定石蜡包埋组织样本,利用下一代测序技术检测*ATR/CHEK1*基因突变、TMB和MSS,并通过免疫组织化学检测PD-L1表达。采用Fisher确切概率法、χ^2检验、Wilcoxon秩和检验和Spearman相关分析评估变量间的关联性。**结果** 在594例患者中,检出*ATR*突变22例(3.7%),其中3例同时携带*CHEK1*突变(0.5%)。*ATR*突变患者中,高肿瘤突变负荷(TMB-H)比例(63.6%)和高度微卫星不稳定(MSI-H)比例(57.1%)显著增高。3例*ATR/CHEK1*双突变患者均为TMB-H和MSI-H,且双突变组的TMB值显著高于*ATR*单突变组($P<0.05$)。突变位点分析显示,*ATR*基因I774Yfs*5移码突变在TMB-H(35.7%)和MSI-H(41.7%)患者中高频出现。*ATR*突变组中有27.3%的患者PD-L1联合阳性评分(CPS)≥1。**结论** *ATR/CHEK1*基因突变,特别是双基因突变和I774Yfs*5热点突变,与GC的TMB-H和MSI-H状态相关,其可能通过破坏DNA损伤修复通路增强肿瘤免疫原性。*ATR/CHEK1*突变状态有望成为预测GC免疫治疗敏感性的新型生物标志物。

关键词 胃癌;共济失调毛细血管扩张突变基因Rad3相关激酶;检查点激酶1;肿瘤突变负荷;微卫星状态;程序性死亡配体1
中图分类号 R735.2 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2026)09-0802-05
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20260921.1355.012
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2026.09.006

Relationship between *ATR/CHEK1* gene mutations and high TMB/MSI-H status in gastric cancer and their predictive role on immunotherapy efficacy

LUO Wenyu[1,2], REN Jingyi[1], YILIXIATI Ailifeiya[1], SHEN Qing[1], SONG Na[1]
(1. Department of Medical Oncology, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Biotherapeutics, The First Medical Center, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract Objective To explore the correlations between mutations in ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase (*ATR*) and checkpoint kinase 1 (*CHEK1*) genes and tumor mutational burden (TMB), microsatellite status (MSS), and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in patients with gastric cancer (GC) and to evaluate their potential as biomarkers for predicting the efficacy of immunotherapy. **Methods** A total of 594 formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples from patients with GC were retrospectively analyzed. Next-generation sequencing (NGS) was used to assess *ATR/CHEK1* gene mutations, TMB, and MSS, and immunohistochemistry was performed to analyze PD-L1 expression. Fisher's exact test, chi-square test, Wilcoxon rank-sum test, and Spearman correlation analysis were used to assess the associations among variables. **Results** Among the 594 enrolled patients, *ATR* mutations were identified in 22 patients (3.7%), including three concurrently harboring *CHEK1* mutations (0.5%). Patients with *ATR* mutations had significantly higher proportions of high tumor mutational burden (TMB-H, 63.6%) and microsatellite instability-high (MSI-H, 57.1%). All three patients with concurrent *ATR* and *CHEK1* double mutations presented TMB-H and MSI-H status, and the TMB level in the double mutation group was markedly higher than that in the *ATR* single mutation group ($P<0.05$). Mutation site analysis revealed that the frameshift mutation I774Yfs*5 of the *ATR* gene occurred at a high frequency in patients with TMB-H (35.7%) and MSI-H (41.7%). In the *ATR* mutation group, 27.3% of patients had a combined positive score (CPS) of PD-L1≥1. **Conclusion** This study confirmed that *ATR/CHEK1* gene mutations, especially double mutations and the hotspot mutation I774Yfs*5, correlate with TMB-H and MSI-H status in GC, indicating that these mutations may enhance tumor immunogenicity by disrupting the DNA damage repair pathway. Collectively, *ATR/CHEK1* mutation status can serve as a novel biomarker for predicting the sensitivity to immunotherapy in GC.

Keywords gastric cancer; ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase; checkpoint kinase 1; tumor mutational burden; microsatellite status; programmed death-ligand 1

基金项目: 辽宁省科学技术计划(2021-MS-184)
作者简介: 雒雯宇(2000-),男,硕士研究生.
通信作者: 宋娜,E-mail:songna_cmu@hotmail.com
收稿日期: 2025-10-16
网络出版时间: 2026-09-21 18:02:38

2022年全球胃癌（gastric cancer，GC）发病率和死亡率均居恶性肿瘤第5位，中国患者约占全球总病例数的40%[1-2]。多数GC患者确诊时已为中晚期，传统化疗效果有限，5年生存率不足5%[3]。近年来，免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhibitor，ICI）显著改善了晚期GC患者生存率，但疗效存在个体差异。作为GC生物标志物，现有的程序性死亡配体1（programmed death-ligand 1，PD-L1）、肿瘤突变负荷（tumor mutational burden，TMB）、微卫星不稳定（microsatellite instability，MSI）等均有一定局限性，需探索更精准的新型标志物[4-5]。DNA损伤修复（DNA damage repair，DDR）通路缺陷与肿瘤免疫原性相关，其中共济失调毛细血管扩张突变基因Rad3相关激酶（ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase，*ATR*）/检查点激酶1（checkpoint kinase 1，*CHEK1*）信号通路是DDR核心调控通路，其与GC发生、发展及治疗抵抗密切相关，但*ATR/CHEK1*突变状态与TMB、MSI及PD-L1表达的关联性尚不清楚[6]。本研究通过对594例晚期GC样本进行多组学分析，明确了*ATR/CHEK1*突变分布特征及相关性，并探讨其作为免疫治疗预测标志物的潜力，为优化GC个体化治疗策略提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　研究对象

回顾性纳入2018年1月至2023年6月期间中国医科大学附属第一医院收治的经组织病理学确诊的原发性GC病例594例。所有福尔马林固定石蜡包埋（formalin fixed paraffin embedded，FFPE）样本来源于医院病理科。纳入标准：初次治疗，未接受新辅助治疗；肿瘤细胞占比 ≥ 20%（HE染色切片由2名独立病理专家确认）；临床病理资料完整。排除标准：样本DNA浓度< 5 ng/μL（Qubit 4.0定量检测）；DNA降解指数> 7（Agilent 4200 TapeStation评估）。本研究获得中国医科大学附属第一医院医学伦理委员会批准（AF-SOP-07-1.2-01），豁免知情同意（符合回顾性研究规范）。

1.2　方法

1.2.1　DNA/RNA提取与质控：通过手工刮取FFPE组织切片上富集肿瘤细胞的区域，使用AllPrep DNA/RNA FFPE试剂盒（德国QIAGEN公司）同步提取核酸。DNA纯度通过NanoDrop检测（A_{260}/A_{280}比值1.8~2.0），浓度≥50 ng/μL，且片段长度>150 bp视为合格[7]。

1.2.2　下一代测序（next-generation sequencing，NGS）与生物标志物分析：基于杂交捕获法构建NGS文库（KAPA HyperPrep Kit，美国Roche公司），目标区域覆盖*ATR*和*CHEK1*基因全编码外显子[7-8]。在Illumina NovaSeq 6000平台（https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html）进行双端测序（2 × 150 bp），平均深度> 500次。原始数据经FastQC质控后，使用BWA-MEM比对至GRCh38参考基因组，体细胞突变调用采用GATK 4.2与VarScan 2联合流程。通过相关突变的总数除以测试的编码区靶区域计算TMB，并表征为过滤除去已知的体细胞和有害突变后每兆碱基（megabase，Mb）的体细胞碱基置换或indel改变的数量[9]。高TMB（high TMB，TMB-H）定义为每个DNA兆碱基突变（mut/Mb）>520，低TMB（low TMB，TMB-L）则为mut/Mb<520[9]。通过评估114个基因座的变化测量MSI，计算每个样品跨越该基因座的每次读取的重复长度。记录读数重复长度的平均值和方差，形成每个样品228个数据点。使用主成分分析将228个维度的数据投影到1个维度上，最大化数据分离产生基于NGS的“MSI得分”。MSI得分超过阈值定义为高度MSI（MSI-high，MSI-H），否则为微卫星稳定（microsatellite stability，MSS）。

1.2.3　PD-L1免疫组织化学检测：采用抗PD-L1单克隆抗体（克隆22C3，丹麦Dako公司）进行4 μm厚度FFPE连续切片染色。使用Dako Autostainer Link 48平台及EnVision FLEX+显色系统[10]。由2名资深病理专家采用联合阳性分数（combined positive score，CPS）双盲评估。CPS =（PD-L1阳性细胞数/存活肿瘤细胞总数）× 100，CPS ≥ 1定义为阳性。其中，PD-L1阳性细胞包括肿瘤细胞、淋巴细胞、巨噬细胞。

1.3　统计学分析

采用R软件（4.3.1）进行统计分析。分类变量采用Fisher确切概率法或χ^2检验比较。非正态分布的连续变量采用Wilcoxon秩和检验进行组间比较；采用Spearman秩相关分析*ATR/CHEK1*突变与生物标志物的相关性。显著性水准设为双侧$P < 0.05$。

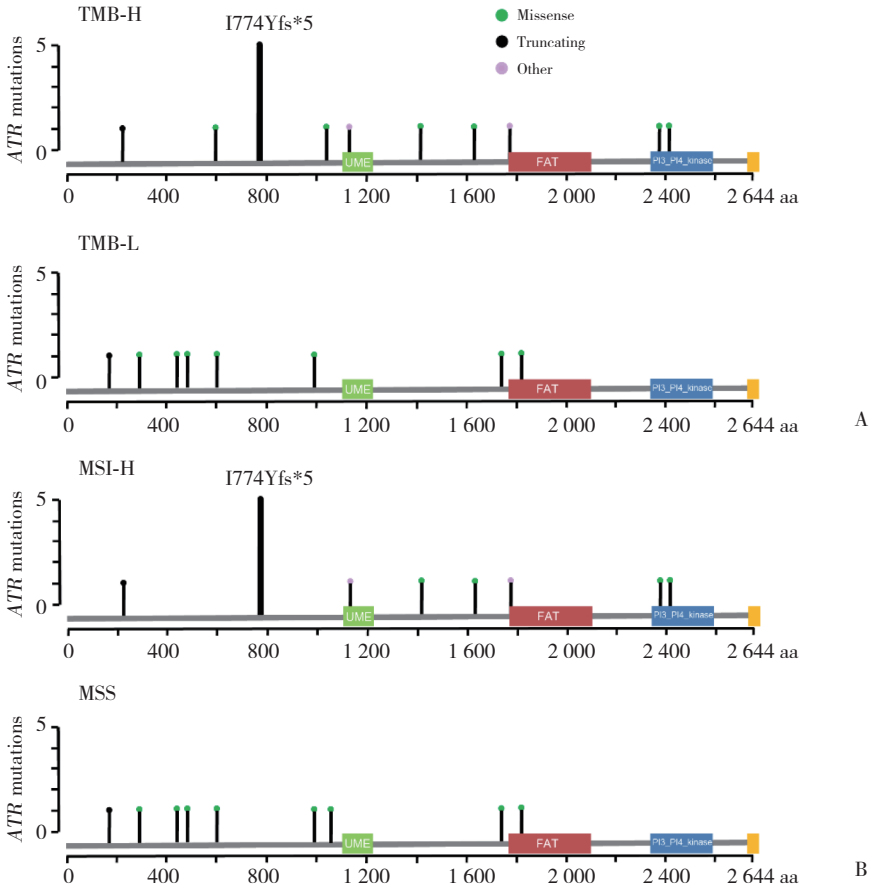
2　结果

2.1　GC患者的TMB、MSI及PD-L1分析

纳入的患者中，有1例患者因同时送检的2个原发灶检出的MSI/TMB状态相悖，故计为2例。594例GC患者中，*ATR*突变22例（3.7%），*CHEK1*突变3例（0.5%，均有*ATR*突变）；TMB-H患者121例（20.4%），TMB-L患者473例（79.6%）。剔除无有效MSI结果的34例后进行MSI分析，MSI-H患者27例（5.1%），MSS患者533例（94.9%）。在*ATR*突变患者中，TMB-H 14例（63.7%），TMB-L 8例（36.3%）。剔除了MSI结果缺失的1例后进行MSI分析，MSI-H 12例（57.1%），MSS 9例（42.9%）。值得注意的是，3例*CHEK1*突变患者均为TMB-H及MSI-H。*ATR*/*CHEK1*突变组和非突变组TMB、MSI分布比较有统计学差异。*ATR*/*CHEK1*突变与TMB明确相关，突变组TMB更高。此外，594例患者中有125例（21.0%）PD-L1 CPS≥1，73例（12.3%）CPS<1。在*ATR*突变组中，6例（27.3%）PD-L1 CPS≥1，2例（9.0%）CPS<1；*CHEK1*突变组中，1例（33.3%）PD-L1 CPS ≥1。

2.2　GC患者的突变位点分布

TMB-H的*ATR*突变患者共检出位点突变14次，其中I774Yfs*5检出5次（35.7%）；TMB-L的*ATR*突变患者共检出位点突变8次（图1A、表1）。MSI-H的*ATR*突变患者共检出位点突变12次，其中I774Yfs*5检出5次（41.7%）；MSS的*ATR*突变患者共检出位点突变10次（图1B、表2）。在*ATR*/*CHEK1*共突变患者中，检出了*ATR*位点N1135*fs*1，G606D，I774Yfs*5，A470V和*CHEK1*位点R372Q，Y81H，T226Hfs*14（表3）。



A，according to TMB classification；B，according to MSI classification. Green，missense mutation；black，truncated mutation；pink，other mutation.

图1　*ATR*突变患者的突变位点分布

Fig.1　Distribution of mutation sites in *ATR* mutation patients

3　讨论

GC作为一种全球范围内高发病率和高死亡率的恶性肿瘤，其治疗面临巨大挑战。尽管手术、化疗和靶向治疗等手段不断进步，但晚期或耐药性患者的预后仍不理想。GC的高度异质性使得现有治疗方法效果有限，需要探索新的分子标志物以指导个体化免疫治疗。

表1　根据TMB划分的*ATR*突变患者突变位点分布

Tab.1　Distribution of mutation sites in *ATR* mutation patients divided by TMB

TMB	Mutation site	Detection count	Detection rate (%)	TMB	Mutation site	Detection count	Detection rate (%)
TMB-H					R1631H	1	5.56
	A1417V	1	5.56		R2356H	1	5.56
	A470V	1	5.56		Y1773*fs*1	1	5.56
	A979V	1	5.56	TMB-L			
	F222Lfs*11	1	5.56		K1813T	1	12.50
	G606D	1	5.56		R177*	1	12.50
	I774Nfs*3	1	5.56		L1746F	1	12.50
	I774Yfs*5	5	27.78		S601F	1	12.50
	L596R	1	5.56		F990L	1	12.50
	N1135*fs*1	1	5.56		E293V	1	12.50
	N2381D	1	5.56		L477F	1	12.50
	R1051C	1	5.56		L434R	1	12.50

表2　根据MSI划分的*ATR*突变患者突变位点分布

Tab.2　Distribution of mutation sites in *ATR* mutation patients divided by MSI

MSI	Mutation site	Detection count	Detection rate (%)	MSI	Mutation site	Detection count	Detection rate (%)
MSI-H				MSS			
	Y1773*fs*1	1	8.33		K1813T	1	10.00
	R2356H	1	8.33		R177*	1	10.00
	R1631H	1	8.33		L1746F	1	10.00
	N2381D	1	8.33		R1051C	1	10.00
	N1135*fs*1	1	8.33		S601F	1	10.00
	I774Yfs*5	5	41.67		L596R	1	10.00
	F222Lfs*11	1	8.33		F990L	1	10.00
	A1417V	1	8.33		E293V	1	10.00
					L477F	1	10.00
					L434R	1	10.00

表3　3例*ATR/CHEK1*共突变患者的突变位点分布

Tab.3　Distribution of mutation sites in 3 patients with co-mutation of *ATR/CHEK1*

Patient No.	*ATR* mutation site	*CHEK1* mutation site
1	N1135*fs*1	R372Q
	G606D	Y81H
2	I774Yfs*5	Y81H
	A470V	T226Hfs*14
3	I774Yfs*5	T226Hfs*14

本研究阐述了*ATR/CHEK1*双基因突变协同增强基因组不稳定性的独特效应，以及I774Yfs*5热点突变在TMB-H/MSI-H亚群中的高频富集特征。本研究首次在GC队列中系统证实了*ATR/CHEK1*双基因突变协同增强基因组不稳定性，表现为双基因突变患者TMB高于单基因突变患者，且*ATR*-I774Yfs*5移码突变在TMB-H/MSI-H亚群高频富集（35.7%~41.7%）。这一发现与DDR通路的核心生物学功能一致：*ATR/CHEK1*信号通路作为应激响应枢纽，其功能缺失可导致DNA错误累积，进而驱动高突变表型[11-13]。肝细胞癌中*ATR/CHEK1*信号通路被证实是PLK-4下游的关键致癌驱动因子。PLK-4通过直接结合并激活*ATR*，进而磷酸化*CHEK1*，促进细胞周期进程和侵袭，抑制该通路可显著抑制肿瘤生长并诱导凋亡[14]。然而，GC的独特性在于*CHEK1*突变与MSI-H的强关联，这可能与GC特有的表观遗传调控相关。从转化视角看，*ATR/CHEK1*突变可作为GC基因组不稳定的新型预测标志物。本研究中，63.7%的*ATR*突变患者为TMB-H，57.1%为MSI-H，显著高于非突变患者（$P<$

0.001）。与此前的1项关于DDR1-HIF1α轴的研究[15]形成互补，即DDR1通过稳定HIF1α促进血管生成，而*ATR/CHEK1*缺陷则可能直接放大突变负荷，二者共同塑造高免疫原性肿瘤微环境。

*ATR/CHEK1*突变与PD-L1表达的部分关联（本研究中75%突变患者CPS≥1）提示，DDR缺陷可能通过多种途径激活免疫应答。DDR缺陷积累的细胞质DNA通过cGAS-STING信号通路诱导Ⅰ型干扰素释放，促进PD-L1上调[16]。这一发现为DDR靶向药物与免疫治疗的联合策略提供了理论支撑。研究显示，ATR抑制剂VE-821使GC细胞对顺铂敏感性提升3.1倍，且下调PD-L1表达。而本研究中双突变患者的超高TMB特征（中位数18.5 mut/Mb）提示其对PARP抑制剂可能敏感。因此，三药联合模式（DDR抑制剂解除免疫抑制+检查点抑制剂激活T细胞+化疗诱导免疫原性死亡）可能为这些双突变患者提供更大的治疗获益。

本研究存在以下局限性：*CHEK1*突变样本量过少，可能影响统计效力并导致潜在偏倚；缺乏功能性实验验证I774Yfs*5等突变位点对DNA修复通路的具体影响，难以建立明确的因果关系；FFPE样本的DNA降解可能导致NGS数据偏差；PD-L1表达分析仅基于CPS评分，且样本不均衡，其与突变关联的生物学意义仍需更大队列验证；未整合患者生存数据或治疗响应信息，无法评估这些分子标志物的临床预后价值。值得注意的是，MSI检测中发现1例（占0.17%）多原发灶状态相悖病例，提示肿瘤时空异质性可能影响分子分型准确性。未来研究可基于现有GC分子分型，前瞻性探索*ATR/CHEK1*突变状态作为筛选免疫治疗超进展高危人群的新型标志物的潜力，从而为精准治疗分层提供直接依据。

综上所述，本研究揭示了*ATR/CHEK1*突变通过破坏DDR通路驱动GC基因组不稳定性，可能成为预测GC免疫治疗敏感性的潜在生物标志物。临床上*ATR/CHEK1*可纳入GC分子分型的基础检测，对于双突变患者优先推荐ICI联合治疗。未来需继续收集更多样本验证其与免疫治疗疗效的相关性，最终实现分子分型指导下的精准免疫治疗。

参考文献：

[1] SUNDAR R，NAKAYAMA I，MARKAR SR，et al. Gastric cancer [J]. Lancet，2025，405（10494）：2087-2102. DOI：10.1016/S0140-6736（25）00052-2.

[2] 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. DOI：10.3322/caac.21834.

[3] GUAN WL，HE Y，XU RH. Gastric cancer treatment：recent progress and future perspectives [J]. J Hematol Oncol，2023，16（1）：57. DOI：10.1186/s13045-023-01451-3.

[4] SHITARA K，SHAH MA，LORDICK F，et al. Zolbetuximab in gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma [J]. N Engl J Med，2024，391（12）：1159-1162. DOI：10.1056/nejmc2409512.

[5] 杨庆林，郭晓东，张睿，等. 胃癌组织中HER-2和Survivin蛋白的表达及临床意义 [J]. 中国医科大学学报，2016，45（7）：616-619. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2016.07.009.

[6] LI F，KOZONO D，DERASKA P，et al. CHK1 inhibitor blocks phosphorylation of FAM122A and promotes replication stress [J]. Mol Cell，2020，80（3）：410-422.e6. DOI：10.1016/j.molcel.2020.10.008.

[7] 中国抗癌协会肿瘤精准治疗专业委员会. 二代测序技术在消化系统肿瘤临床应用的中国专家共识 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志，2024，10（1）：69-92. DOI：10.1215/JMCM.2024.01-11.

[8] FRAMPTON GM，FICHTENHOLTZ A，OTTO GA，et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing [J]. Nat Biotechnol，2013，31（11）：1023-1031. DOI：10.1038/nbt.2696.

[9] CHALMERS ZR，CONNELLY CF，FABRIZIO D，et al. Analysis of 100，000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden [J]. Genome Med，2017，9（1）：34. DOI：10.1186/s13073-017-0424-2.

[10] ZHANG LY，GUAN B，LI W，et al. The effective molecular characteristics of PD-1 inhibitor combination regimen as the first-line treatment for Chinese patients with HER2-positive gastric cancer：a real-world retrospective analysis study [J]. Transl Gastroenterol Hepatol，2025，10：23. DOI：10.21037/tgh-24-95.

[11] SETHI NS，KIKUCHI O，DURONIO GN，et al. Early TP53 alterations engage environmental exposures to promote gastric premalignancy in an integrative mouse model [J]. Nat Genet，2020，52（2）：219-230. DOI：10.1038/s41588-019-0574-9.

[12] XUE KM，LIU L，LIU YX，et al. Radiomics model based on multi-sequence MR images for predicting preoperative immunoscore in rectal cancer [J]. La Radiol Med，2022，127（7）：702-713. DOI：10.1007/s11547-022-01507-3.

[13] SMITH J，THO LM，XU N，et al. The ATM-Chk2 and *ATR*-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer [M] //Advances in cancer research. Amsterdam：Elsevier，2010：73-112. DOI：10.1016/b978-0-12-380888-2.00003-0.

[14] BAO J，YU Y，CHEN JN，et al. miR-126 negatively regulates PLK-4 to impact the development of hepatocellular carcinoma via *ATR/CHEK1* pathway [J]. Cell Death Dis，2018，9：1045. DOI：10.1038/s41419-018-1020-0.

[15] WEI ZW，LI J，ZHONG L，et al. DDR1 drives malignant progression of gastric cancer by suppressing HIF-1α ubiquitination and degradation [J]. Adv Sci，2024，11（35）：2308395. DOI：10.1002/advs.202308395.

[16] JASIM SA，GUPTA J，UTHIRAPATHY S，et al. A comprehensive review of immunotherapy in gastrointestinal tumors with a focus on the role of combination therapy with PARP inhibitors [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol，2025，398（11）：15095-15111. DOI：10.1007/s00210-025-04336-z.

（编辑　王又冬）