

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.022

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.022>

乳腺癌组织HER2基因扩增的检测方法

王晓舟¹, 翟云良², 杨振², 倪晓龙², 孙尧², 李世宝³

(1. 徐州医科大学基础医学院, 江苏 徐州 221000; 2. 苏州天隆生物科技有限公司, 江苏 苏州 215123;
3. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏 徐州 221000)

[摘要] 目的: 评价高分辨率熔体聚合酶链反应(high-resolution melt polymerase chain reaction, HRM-PCR)检测HER2基因扩增的有效性及其与荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)检测法的一致性。方法: 采用HRM-PCR法检测HER2阴性及阳性细胞株, 评估检测方法的有效性; 检测98例已行FISH和/或IHC的临床样本, 并与FISH和IHC结果进行比较。结果: HRM-PCR检测可以有效区分HER2阴性及阳性细胞株($P < 0.05$), 具有较好的可重复性; 检测98例临床样本显示, 阴性和阳性样本检测结果差异有统计学意义(0.18 ± 0.14 vs 1.42 ± 0.88 , $P < 0.01$), 与IHC的一致性为80.33% ($\kappa = 0.6$, $P < 0.01$), 与FISH的一致性为87.88% ($\kappa = 0.7$, $P < 0.01$), 结论: HRM-PCR是一种可靠有效的检测HER2基因扩增的方法, 与FISH和IHC均有较好的一致性。

[关键词] HER2基因; HRM-PCR; 乳腺癌; 荧光原位杂交; 免疫组织化学

Detecting methods for HER2 gene amplification in breast cancer tissue

WANG Xiaozhou¹, ZHAI Yunliang², YANG Zhen², NI Xiaolong², SUN Yao², LI Shibao³

(1. School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221000;

2. Suzhou Tianlong Biological Technology Co, Ltd, Suzhou Jiangsu 215123;

3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221000, China)

Abstract **Objective:** To evaluate the detection of HER2 gene amplification effectiveness by high-resolution melt polymerase chain reaction (HRM-PCR) and compare with fluorescence in situ hybridization (FISH) and/or immunohistochemistry (IHC). **Methods:** HRM-PCR was used to test 98 clinical samples which has detected by FISH and/or IHC, and the results of FISH and IHC were compared. **Results:** HER2 negative and positive cell lines can be distinguished by HRM-PCR ($P < 0.05$) with well repeatability. The difference between negative and positive samples results was significant (0.18 ± 0.14 vs 1.42 ± 0.88 , $P < 0.01$), and 80.33% consistency with IHC ($\kappa = 0.6$, $P < 0.01$), 87.88% with FISH ($\kappa = 0.7$, $P < 0.01$).

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-19

通信作者 (Corresponding author): 李世宝, Email: sdjshlb@126.com

基金项目 (Foundation item): 江苏省青年医学人才 (QNRC2016781)。This work was supported by the Jiangsu Provincial Medical Youth Talent of China (QNRC2016781).

Conclusion: HRM-PCR is a reliable and effective method to detect *HER2* gene amplification which has a high consistency with FISH/IHC.

Keywords *HER2* gene; HRM-PCR; breast cancer; fluorescence in situ hybridization; immunohistochemistry

乳腺癌已成为全球女性发病率最高的恶性肿瘤。研究^[1]表明: 15%~20%的乳腺癌患者*HER2*表达阳性, 对这部分病人使用抗*HER2*单抗药物可以获得较大的收益, 而*HER2*阴性病人则无法获益, 因此对于*HER2*基因扩增表达的检测显得尤为重要。目前, 临床常用的检测方法主要有荧光原位杂交(*fluorescence in situ hybridization*, FISH)和免疫组织化学(*immunohistochemistry*, IHC)。然而, 这两种方法存在着一定的局限性。IHC检测*HER2*蛋白表达目前最常用, 它采用带显色剂标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的呈色反应, 对相应抗原进行定性、定位、定量检测, 其主要优点在于操作简便、价格低廉、判读方便、便于保存等, 但是检测的过程缺乏标准化, 结果易受组织处理、不同抗体的敏感性影响。而FISH则通过荧光标记的DNA探针与细胞核内的DNA靶序列杂交, 利用荧光检测体系对待测DNA进行定性、定量及相对定位分析, 其主要优点在于检测冷冻组织或甲醛固定、石蜡包埋组织的*HER2*基因扩增的稳定性较好, 不受组织处理等影响。但是检测费用昂贵, 荧光淬灭而致结果无法长期保存, 操作难度大、时间长。因此, 寻找一种新的更加可靠、便捷的检测方法成为了目前研究的热点。高分辨率溶解曲线法聚合酶链反应(*high-resolution melt polymerase chain reaction*, HRM-PCR)是一种新近发明的PCR方法^[2]。通过在双重PCR中, 两对引物在指数期扩增时可以很好地反映底物模板之间拷贝数的相对关系, 而通过对dNTP浓度、循环数等因素的限制, 使两者在竞争性扩增中维持在可以反映底物模板拷贝数相对关系的阶段而达到平台期, 此时, 通过对产物的高分辨溶解曲线分析产生的溶解峰可以很好地反映底物模板中两种基因拷贝数的关系, 从而进一步通过归一化分析处理软件对内参溶解峰进行归一化处理, 直观地分析不同模板中基因扩增变异的情况。本研究基于HRM-PCR法, 通过对乳腺癌组织样本的回顾性研究, 评价HRM-PCR法检测*HER2*基因扩增的可靠性和与FISH及IHC的一致性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

收集98例于2013年1月至2015年12月在徐州医科大学附属医院甲乳外科进行就诊的浸润性乳腺癌患者的病例标本, 所有样本已行有关*HER2*的IHC和/或FISH检测。按石蜡包埋组织提取试剂盒[DP331, 天根生化科技(北京)有限公司]说明提取样本DNA, 采用紫外分光光度计检测DNA浓度与纯度, -80℃保存备用。本研究经徐州医科大学附属医院伦理委员会批准。所选用样本均为经病理诊断由病理科留存的肿瘤蜡块, FISH及IHC诊断结果以经病理医师签发的病理诊断结果为准。

1.1.2 标准样本

采用正常人群外周血DNA作为标准样本。

1.1.3 乳腺癌细胞系

乳腺癌*HER2*阳性细胞系SK-BR-3 DNA和*HER2*阴性细胞系ZR-75-1 DNA均购自于中国科学院细胞所。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

选择*HER2*和内参*RPPH*基因核酸序列的高保守区设计*HER2*和内参基因的靶多核苷酸引物, 保证两者扩增效率一致, 内参表达稳定。引物及内参序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primers sequencing

基因	引物序列(5'→3')
<i>HER2-F</i>	CACCCTAGAGTAACITGATGCCT
<i>HER2-R</i>	AAGGAATGAACITGCTGTG
<i>RPPH-F</i>	GCAGGAGATGCCGTGGAC
<i>RPPH-R</i>	GGGTACCTCACCTCAGCCAT

1.2.2 HRM-PCR 检测

目的基因和内参基因在同一管内完成, 每例样本设3个平行管, 每例样本重复检测3次,

每次检测设一组空白管和一组标准样本管。采用 LightCycler 96 实时荧光 PCR 仪进行扩增, PCR 在 10 μ L 反应体系中进行: 10 \times buffer(含 25 mmol/L MgCl₂, 500 mmol/L Tris-HCl(pH=8.3), 1 mg/mL BSA 1 μ L, 62.5 μ mol/L 1 μ L, 10 pmol/L 正、反向引物各 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 样本模板 1 μ L, 加超纯水至 10 μ L, PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 66 $^{\circ}$ C, 30 s, 35 个循环; 循环后设置 65~97 $^{\circ}$ C, 每 0.07 $^{\circ}$ C 读取荧光值生成高分辨溶解曲线。

1.2.3 溶解曲线归一化处理

采用天隆归一化处理软件对数据进行, 通过软件分别获得待测样本和标准样本的目的基因与内参基因溶解峰高比, 按下列公式计算每例样本的峰高比值差(以下简称比值差):

$$\text{样本峰高比值差} = \frac{\sum_{i=1}^n (\text{样本峰高比} - \text{标准品峰高比})_i}{n}$$

1.3 统计学处理

所有数据结果采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 比值差采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 正态分布采用 Shapiro-Wilk 检验, 计量资料使用方差分析, 计数资料采用 kappa 一致性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本信息

共 98 例样本纳入统计, 全部行 IHC 检测, 1+ 为 34 例, 2+ 为 37 例, 3+ 为 27 例; 66 例行 FISH 检测, 阴性 45 例, 阳性 21 例。

2.2 检测方法评估

采用 HER2 阳性细胞株 SK-BR-3 细胞 DNA, 10 ng 遗传背景 5% SK-BR-3 细胞 DNA 和 HER2 阴性细胞株 ZR-75-1 细胞 DNA 对检测方法进行评估, 阳性细胞株组, 5% 阳性细胞株组和阴性细胞株组的比值差分别为 1.22 ± 0.045 , 0.18 ± 0.017 , -0.03 ± 0.015 , 阳性细胞株组、5% 阳性细胞株组与阴性细胞株组差异存在统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 HRM-PCR 法检测结果

结果显示: FISH 检测为阴性的 45 例样本, 比值差在 $-0.26\sim 0.39$, 样本数据呈正态分布 ($Z=0.804$, $P=0.54$; 图 1), 比值差均值为

0.18 ± 0.13 , 根据 C28-A2, 可以 $\bar{x}\pm 2SD$ 确定为临床参考值, 确定比值差 > 0.45 时判定为阳性。结果显示: 98 例临床样本的比值差在 $-0.27\sim 4.66$, 其中 64 例判定为阴性, 比值差为 0.17 ± 0.14 , 34 例判定为阳性, 比值差为 1.42 ± 0.88 , 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.4 HRM-PCR 与 IHC 比较

34 例 PCR 判定 HER2 扩增为阳性的样本中 IHC(1+) 8 例、IHC(2+) 3 例、IHC(3+) 23 例, 64 例 PCR 判定 HER2 扩增为阴性的样本中 IHC(1+) 26 例、IHC(2+) 34 例、IHC(3+) 4 例, 比较 IHC 检测为 1+ 和 3+ 样本与 PCR 的一致性, 结果显示两者一致性一般 ($\text{kappa}=0.6$, $P < 0.01$, 表 2)。

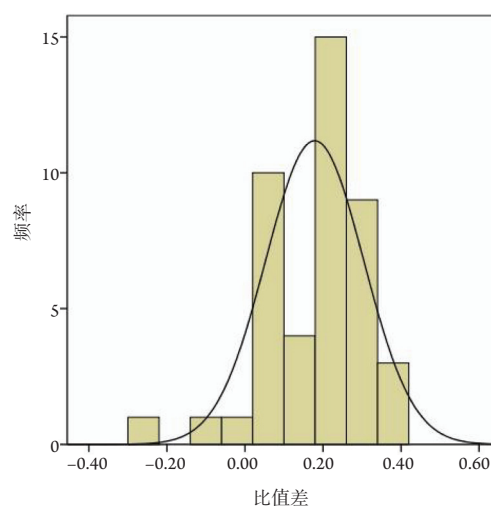


图1 HER2阴性样本比值差分布

Figure 1 Distribution of HER2 negative sample of difference peak height ratio

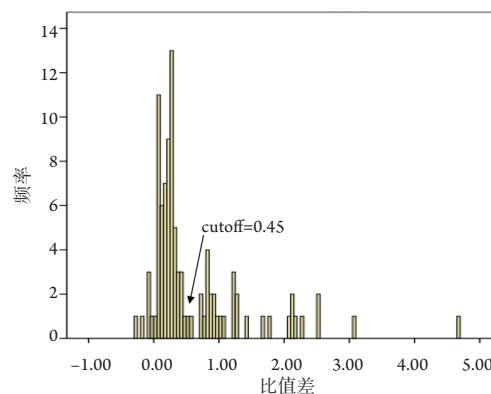


图2 98例乳腺癌临床样本比值差分布

Figure 2 Distribution of 98 breast cancer clinical sample of difference peak height ratio

表2 PCR与IHC检测结果比较

Table 2 Comparison of PCR and IHC test results

PCR	IHC			合计
	1+	2+	3+	
阴性	26	34	4	64
阳性	8	3	23	34
合计	34	37	27	98

2.5 HRM-PCR 与 FISH 比较

66例进行FISH检测的样本, PCR判定 $HER2$ 扩增为阳性的样本中FISH阳性14例, FISH阴性1例, PCR判定 $HER2$ 扩增为阴性的样本中FISH阳性7例, FISH阴性44例, 两者一致性较好($\kappa=0.7$, $P<0.01$; 表3)。

表3 PCR与FISH检测结果比较

Table 3 Comparison of PCR and FISH test results

PCR	FISH		合计
	阴性	阳性	
阴性	44	7	52
阳性	1	14	14
合计	45	21	66

3 讨论

人表皮生长因子受体2($HER2/neu$)基因位于染色体17q21, 编码分子质量为185 kD的跨膜蛋白, 具有跨膜酪氨酸酶活性, 是人表皮生长因子受体家族成员之一。近年来, 研究^[1]发现 $HER2$ 阳性的乳腺癌患者浸润性强, 无病生存期短, 预后差; 临床研究^[3]还发现 $HER2$ 检测结果对是否适合针对 $HER2$ 的靶向治疗、内分泌治疗和化疗方案的选择起指导作用。因此, 选择一种快速、有效的对 $HER2$ 扩增状态检测的方法成为近年来研究的热点。

采用HRM-PCR检测拷贝数变异是一种新近报道^[2]的方法。本研究采用此方法检测 $HER2$ 基因扩增变异, 并与FISH和IHC的检测结果进行对比。首先检测 $HER2$ 阴性细胞ZR-75-1和 $HER2$ 阳性细胞SK-BR-3, 结果显示: 本方法可以有效区分 $HER2$ 阴性与阳性细胞株中 $HER2$ 扩增状态, 进一步考虑到肿瘤的异质性, 本研究使用人基因组DNA对

SK-BR-3细胞DNA进行稀释, 结果发现在5%的细胞浓度下, 本方法依然可以有效地检测出SK-BR-3细胞的扩增。因此, 本法检测 $HER2$ 细胞扩增状态拥有较好的灵敏度。

通过临床判定为 $HER2$ 阴性的样本探索建立临床参考值, 并与临床常用的检测方法IHC和FISH的检测结果进行比较。众所周知, IHC和FISH目前被广泛使用于 $HER2$ 基因扩增的检测^[1], FISH是一种以组织为基础的细胞遗传学技术。其通过检测基因拷贝数来评价 $HER2$ DNA扩增的水平。IHC是以组织为基础的蛋白检测方法, 可利用抗 $HER2$ 单克隆抗体来检测 $HER2$ 基因扩增相关的 $HER2$ 蛋白水平高表达。然而, 在临床应用中, 这两种检测方法依然存在着许多局限性, IHC检测中大量的模棱两可的结果需要FISH进行确定, 而FISH检测复杂的检测技术和高昂的检测成本限制了这一技术的使用^[4-5]。尽管有研究^[6]显示, FISH和IHC具有较高的一致性; 但也有一项大型前瞻性研究^[7]显示: 由中心实验室FISH确诊的地方实验室IHC诊断结果仅有79%的一致性, 而中心实验室与地方实验室在IHC的诊断一致率为77.5%, FISH一致率为92%。因此, 近年来, 许多研究将眼光投向PCR的方法来寻找一种更为可靠、便捷的检测方法。Egervari等^[8]采用两种定量PCR法检测 $HER2$ 基因扩增情况, 均显示出与FISH有较高的一致性, 因此PCR成为一种可能的新的对 $HER2$ 基因扩增的检测方法。本研究通过归一化后高分辨熔解峰比值与标准品的差值来判断样品中 $HER2$ 的扩增情况, 在纳入研究的98例已行FISH或者IHC的组织样本进行回顾性研究发现, 在61例IHC确定为阴性(1+)和阳性(3+)的样本中, 80.33%的样本PCR检测结果与之一致, 66例已行FISH的样本, 87.88%的样本PCR检测与之一致, 均显示出较高的一致性。然而, 仍有12例和8例样本与IHC和FISH不一致。研究^[9-10]显示: 肿瘤组织在其内部具有一定的异质性, 不同取材部位往往会导致检测结果的不一致, 因此, 是否是这种不一致导致检测结果的不一致, 值得进一步研究。

综上所述, HRM-PCR作为一种新的基因拷贝数扩增的检测方法, 对于 $HER2$ 基因拷贝数扩增具有较高的检测效率和一致性, 是一种可行的检测方法。因此, 需要进一步通过更多的临床前瞻性研究证实这一方法是否可以应用于临床检测 $HER2$ 基因扩增情况等, 以期尽早应用于临床。

参考文献

1. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/college of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(31): 3997-4013.
2. Zhou L, Palais RA, Paxton CN, et al. Copy number assessment by competitive PCR with limiting deoxynucleotide triphosphates and high-resolution melting[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(5): 724-733.
3. 杜长征, 李惠平, 侯宽永, 等. 中国乳腺癌妇女表皮生长因子受体-2表达的Meta 分析[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2006, 38(2), 184-187.
DU Changzheng, LI Huiping, HOU Kuanyong, et al. Expression of epidermal growth factor receptor-2 in Chinese breast cancer patients: a meta-analysis[J]. *Journal of Peking University. Health Science*, 2006, 38(2): 184-187.
4. Moelans CB, de Weger RA, Van der Wall E, et al. Current technologies for HER2 testing in breast cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011, 80(3): 380-392.
5. Furrer D, Sanschagrin F, Jacob S, et al. Advantages and disadvantages of technologies for HER2 testing in breast cancer specimens[J]. *Am J Clin Pathol*, 2015, 144(5): 686-703.
6. Tawfik OW, Kimler BF, Davis M, et al. Comparison of immunohistochemistry by automated cellular imaging system (ACIS) versus fluorescence in-situ hybridization in the evaluation of HER-2/neu expression in primary breast carcinoma[J]. *Histopathology* 2006, 48(3): 258-267.
7. Press MF, Guido S, Leslie B, et al. Diagnostic evaluation of Her-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(18): 6598-6607.
8. Egervari K, Toth J, Nemes Z, et al. An alternative and reliable real-time quantitative PCR method to determine HER2/neu amplification in breast cancer[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2009, 17(3): 247-254.
9. Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133(4): 611-612.
10. Bartlett A, Starczyński J, Robson T, et al. Heterogeneous HER2 gene amplification: impact on patient outcome and a clinically relevant definition[J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136(2): 266-274.

本文引用: 王晓舟, 翟云良, 杨振, 倪晓龙, 孙尧, 李世宝. 乳腺癌组织HER2基因扩增的检测方法[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1899-1903. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.022

Cite this article as: WANG Xiaozhou, ZHAI Yunliang, YANG Zhen, NI Xiaolong, SUN Yao, LI Shibao. Detecting methods for HER2 gene amplification in breast cancer tissue[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1899-1903. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.022