



分子诊断技术在乳腺癌检测中的最新进展*

邢德纯^{1,2)} 王霞²⁾ 孙锁柱³⁾ 董莲华^{2)**} 杨靖亚^{1)**}⁽¹⁾ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ⁽²⁾ 中国计量科学研究院前沿计量科学中心, 北京 100029;⁽³⁾ 火箭军特色医学中心, 北京 100088)

摘要 乳腺癌是一种严重危害女性健康的恶性肿瘤, 对其致病基因的检测有助于肿瘤早期诊断、精准治疗及预后评估。本文总结了近年来乳腺癌相关的热点基因, 并对相关基因的分子诊断技术、检测方法及应用进行了综述。首次评述了数字PCR方法用于乳腺癌分子检测的进展。全面对比不同分子诊断技术的差别与优缺点, 为乳腺癌关键基因的检测提供指导建议与理论支持, 并对未来发展趋势做出展望。

关键词 乳腺癌基因, 生物芯片, 核酸分子杂交, 数字PCR, 高通量测序

中图分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0253

1 引言

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤, 严重危害女性群体的健康, 主要发生于绝经前后的女性^[1]。中国乳腺癌发病率居女性恶性肿瘤首位, 占全身性恶性肿瘤的7%~10%, 且发病率逐年上升, 呈现年轻化的趋势^[2]。采用准确有效的检测方法, 对乳腺癌的原癌基因和抑癌基因进行检测, 可以实现对乳腺癌的早期诊断、精准治疗, 并对跟踪肿瘤的复发和转移及预后评估提供重要的评价指标^[3-7]。

随着分子生物学技术的发展, 临床分子诊断取得了飞跃式的发展, 它已成为肿瘤诊断中最具有发展潜力的领域。目前常用的分子诊断技术包括生物芯片、聚合酶链反应、高通量测序等。相比于传统乳腺CT检测等方法, 分子诊断技术具有特异性更强、检测更灵敏、准确性更好、操作更简便等优势。采用分子生物学技术对乳腺癌致病基因进行检测、分型、功能分析, 将有助于尽早发现肿瘤的发生与转移, 提高靶向药物的治疗, 并对肿瘤预后评估提供客观依据。然而每种检测方法在检测的灵敏度和准确性方面不尽相同, 目前鲜有针对其不同检测方法进行全面对比的评述, 因此本综述整理不同原理的分子诊断技术在乳腺癌原癌基因及抑癌基因检测中的研究现状及进展, 并对其发展趋势进行展望。

2 乳腺癌相关基因

2.1 原癌基因

在现有乳腺癌相关基因中, 被研究最为广泛的原癌基因主要为MYC、RAS以及HER2等(表1)。MYC基因在细胞增殖、细胞转化和凋亡中起着重要作用。当正常基因扩增、重排或过度表达后, MYC基因被激活, 在RAS癌基因协同作用下, 细胞无限增殖形成恶性肿瘤。RAS基因家族有3个成员, 分别为HRAS、KRAS和NRAS。HRAS基因mRNA水平和蛋白质水平的过度表达与乳腺癌密切相关^[8], 其常发生于乳腺癌的早期阶段。

HER2即人类表皮生长因子受体2, 列属于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族, 是一种具有跨膜酪氨酸激酶活性的生长因子受体, 定位于染色体17q12。美国临床肿瘤学会根据临床检验结果、国际研讨以及美国食品和药物管理局的调查结果将IHC检测结果为3+、FISH结果中HER2基因拷贝数大于6个基因拷贝、

* 国家重点基础研究发展计划资助项目(2017YFF0204605)。

** 通讯联系人。

董莲华. Tel: 18510031111, E-mail: donglh@nim.ac.cn

杨靖亚. Tel: 15692165856, E-mail: jy yang@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-10-22, 接受日期: 2019-12-30

或者 *HER2/CEP17* 比值为 >2.2 , 定义为 *HER2* 阳性肿瘤^[9]. 有研究发现抗 *HER2* 靶向治疗也可使 *HER2* 基因突变患者从中受益^[10-11].

2.2 抑癌基因

抑癌基因与原癌基因相互制约, 其在体内可抑制细胞的无限增殖, 以达到防止细胞癌变的目的, 然而当抑癌基因缺失或突变后, 细胞增殖不受到调控, 将形成肿瘤. 乳腺癌相关的抑癌基因主要有 *TP53*、*CDKN1A*、*CDKN2A*、*CDKN1B*、*NME1* 以及 *BRCA1* 基因等 (表1).

目前在抑癌基因的研究中, 对 *TP53* 基因的研究较为深入. 该基因位于 17p13, 编码 53-ku 核磷酸化蛋白质, 在正常细胞中通过细胞周期阻滞、DNA 修复和凋亡来维持基因组的完整性, 阻止细胞病变^[12]. 当 *TP53* 基因突变后, 可引起细胞的癌变和转化, 现已发现位于 *TP53* 基因第 4 外显子的 72 密码子 (codon 72) 多态性与多种肿瘤的易感性相关, 对乳腺癌患者术后接受放化疗的疗效及术后生存期有直接关联^[13].

CDKN1A (别名 *P21*) 基因定位于染色体 6p21.2, 通过与 *TP53* 蛋白结合, 激活 *CDKN1A* 转录. *CDKN1A* 蛋白可抑制细胞周期依赖性激酶和增殖细胞核抗原产生, 其异常表达会对细胞的增殖与分化产生影响^[14], 从而导致肿瘤的发生. 此外 *CDKN1A* 可用来作为乳腺癌患者的预后判断^[3], 评估乳腺癌细胞的转移潜能及分化情况. 但 *CDKN1A* 的表达在不同组织差异较大, 这可能是由于 *CDKN1A* 除了受 *TP53* 刺激诱导外, 也可能受其他途径影响而被抑制或激活.

CDKN2A (别名 *P16*) 基因位于 9p21.3, 由 2 个内含子及 3 个外显子组成. *CDKN2A* 基因的表达产物直接参与细胞增殖的负调节, 其编码的产物为 *P16* 蛋白, 该蛋白质是作用于细胞分裂周期关键酶之一的 *CDK4* 抑制因子, 阻止细胞进入 S 期. 一旦 *CDKN2A* 基因缺失或者突变, 则不能抑制 *CDK4* 活性, 导致细胞进入恶性增殖^[15].

CDKN1B (别名 *P27*) 基因位于染色体 12p13.1, 由 1 个无功能外显子和 2 个外显子及 1 个内含子组成. 在乳腺癌中, 其抑制细胞周期并使细胞周期停滞在 G1 期. 有研究^[5] 表明, *CDKN1B* 基因对肿瘤的增殖分化有着调控作用, *CDKN1B* 蛋白表达降低也与乳腺癌临床预后不良紧密相关.

NME1 (别名 *NM23*) 基因是一种肿瘤转移抑制基因, 其主要功能是抑制肿瘤细胞的转移, 在人基因组中存在着两个 *NME1* 基因, 即 *NM23-H1* 和 *NM23-H2*, 它们都定位于 17q21.33. *NME1* 基因的低表达与黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌和肝癌等多种上皮癌晚期转移及临床预后不良有关^[6]. 在乳腺癌中, *NME1* 蛋白表达水平与腋淋巴结转移情况呈负相关.

BRCA1 基因位于人染色体 17q21.31, 与遗传性乳腺癌直接相关, 是一种具有抑制恶性肿瘤发生的基因, *BRCA1* 基因突变者, 乳腺癌发病率为 50%~85%. 有研究者对 *BRCA1* 预后影响因素进行多变量分析后发现, *BRCA1* 在肿瘤细胞核以及细胞质中的表达存在缺失或减少, *BRCA1* 失调可能在早期分化良好的肿瘤以及分化不良的激素受体阴性肿瘤中发挥作用^[7], 这可以作为肿瘤早期诊断的依据.

Table 1 Breast cancer related gene
表1 乳腺癌相关基因

乳腺癌 相关基因	名称	别名	染色体位置
原癌基因	MYC	c-Myc、bHLHe39、MYCC	8p24.21
	H-RAS	HRAS1	11p15.5
	HER2	ERBB2、NEU、CD340、HER-2	17q12
抑癌基因	TP53	p53、LFS1	17p13.1
	CDKN1A	P21、CIP1、WAF1、SDI1、CAP20、p21CIP1、p21Cip1/Waf1、p21	6p21.2
	CDKN2A	P16、CDK4I、Ink4a、MTS 1、CMM 2、ARF、P19、p14、INK 4、p16INK4a、p19Arf、p14ARF	9p21.3
	CDKN1B	P27、KIP1、P27KIP1	12p13.1
	NME1	NM23、NM23-H1、NDPKA	17q21.33
	BRCA1	RNF53、BRCC1、PPP1R53、FANCS	17q21.31

3 分子诊断技术

3.1 基于原位杂交的诊断技术

在乳腺癌检测中,以原位杂交为主要代表的核酸分子杂交技术最为常用,其根据核酸分子具有变性和复性的特点,使来源不同的DNA(或RNA)片段,按碱基互补配对形成杂交双链分子,通过已知序列探针对特异性的靶序列进行检测.基于原位杂交法的检测技术除生物芯片外还包括荧光原位杂交法(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)和亮视野原位杂交,通常被使用的亮视野原位杂交包括显色原位杂交(chromogenic *in situ* hybridization, CISH)和银增强原位杂交(silver-enhanced *in situ* hybridization, SISH)(表2).

3.1.1 生物芯片

生物芯片包含基因芯片及蛋白质芯片等,基因芯片在乳腺癌的基因检测中较为常见,该技术根据分子杂交的原理,将大量探针密集固定在硅片、玻璃、尼龙膜等载体上制作成微小的检测芯片,再与带有荧光标记的DNA或其他分子样品进行杂交,通过检测其信号强度来获得目标基因序列及数量信息.美国Affymetrix公司于1991年制作出了第一张基因芯片,Vranic等^[16]利用Affymetrix基因芯片研究了*HER2*、*CEP17*基因与17号染色体上其他位点的关系.研究表明,*CEP17*信号数量的增加可能代表17号染色体的中心体区域的局部增益,而不是FISH分析中所意味的多聚体17. Leivonen等^[17]使用miRIDIAN microRNA mimic文库v.10.1(共810个miRNA模拟物)以20 nmol/L浓度在384孔板上用SilentFect转染细胞,将孵化处理后的细胞裂解并打印在硝酸纤维素包覆的微阵列快速载玻片上,使用Array-Pro分析仪微阵列分析软件来对miRNA裂解物进行分析.结果显示,miR-342-5p和miR-744在*HER2*阳性乳腺癌中显著下调,miR-342-5p在体外对*HER2*阴性对照细胞的生长无影响,从而证明其特异性地抑制了*HER2*阳性细胞的生长.Tennis等^[18]对使用Affymetrix *P53*基因芯片在420个样本中成功扩增出的392例肿瘤进行分析,其中138例(35%)乳腺肿瘤有*TP53*突变,88%位于外显子5~8上,11例在第9外显子,3例在第4外显子,2例在第10外显子,1例在第3外显子.同时对139例肿瘤(增加了一种新的扩增产物,

以避免样品处理过程中导致基因芯片检测到突变的伪迹)的*TP53*基因外显子5~9进行了人工测序,验证了Affymetrix基因芯片的实用性,并为乳腺癌的突变图谱提供了新的数据.

3.1.2 荧光原位杂交(FISH)

FISH技术是在同位素标记探针的基础演变而来,其原理是使用荧光素来标记核酸探针,然后将探针与靶DNA杂交.由于同源互补,核酸探针将与靶DNA形成杂交体,经过洗涤便可在荧光显微镜下进行观察.在乳腺癌中,多用FISH技术对*HER2*基因的扩增情况进行检测.赵坡等^[19]使用FISH技术对1699例乳腺癌*HER2*基因扩增情况及17号染色体多体状态进行检测,发现在乳腺癌中*HER2*基因扩增的阳性表达率为52.6%,17号染色体多体的阳性表达率为12.7%,二者之间呈现正相关.在使用赫赛汀处理后,检测到*HER2*基因与17号染色体多体预后结果明显优于未用药组,该研究证明了FISH检测在临床应用中可以明显改善预后结果.

3.1.3 显色原位杂交(CISH)

CISH原理与FISH技术相同,不同之处在于将标记探针的基团用地高辛和生物素代替了荧光.Gupta等^[20]对CISH和FISH技术进行了对比,使用这两种方法对31例浸润性乳腺癌进行了分析,其中26例检测结果相同,根据判读结果认为CISH相比FISH更准确实用.国内也有学者^[21]通过对比CISH与IHC对检测乳腺癌*HER2/neu*基因状况和蛋白质表达的结果,发现CISH与IHC和FISH结果高度一致.但张伟等^[22]在研究FISH与CISH对检测乳腺癌*HER2*基因扩增的敏感性、准确性实验中发现,两种检测方法的符合率为87.5%,FISH法敏感性和准确性较高.

3.1.4 银增强原位杂交(SISH)

银增强原位杂交基于银沉淀技术,将金属银固定在靶位点,使用二硝基苯标记检测*HER2*的探针,银染原位杂交二硝基苯染色液显色,同时用地高辛标记检测参考基因的探针,使用地高辛红染色液显色^[23],其结果在普通的光学显微镜下便可进行观察.Bartlett等^[24]分析了来自8个不同实验室对45例乳腺癌样本检测的结果,其中有6个实验室采用SISH成功分析了94.8%的病例,SISH与FISH诊断*HER2*扩增的符合率达到了96.0%.

Pehlivanoglu 等^[25]使用 60 例样本对 FISH 和 SISH 法进行对比分析, 通过 FISH 法检测到其中 *HER2* 扩增的样本有 7 例 (13.7%), 通过 SISH 法检测到

的 *HER2* 扩增样本有 8 例 (15.7%), 两种方法表现出良好的一致性, 验证了 SISH 法在乳腺癌基因检测方面的可行性.

Table 2 Molecular diagnostic method
表2 分子诊断方法

分子诊断技术		操作 耗时	成本	材料	操作 难度	优点	缺点
原位杂交	生物芯片	短	高	相关监测芯片、分析平台等	难	敏感、高通量、特异性强	可能有错误核酸或杂质掺入
	荧光原位杂交 (FISH)	长	高	相关探针及染料、光学显微镜、FISH 图像分析软件等	难	准确、稳定	结果缺少组织形态学上的参考、切片难以长期保存、标本需求量大
	显色原位杂交 (CISH)	长	低	相关探针及染料、放大系统检测试剂、光学显微镜等	难	信号稳定、切片储存方便、可做组织学评价	对中低丰度突变样本的检测灵敏性低、结果易受主观因素影响
	银增强原位杂交 (SISH)	短	低	SISH 相关试剂盒、染色机、组织芯片仪等	难	误差小、快速准确、可直接观察组织形态	
实时荧光定量 PCR (qPCR)		短	高	引物探针、荧光定量分析仪等	易	敏感、重复性好、特异性好、通量高、污染可能性低	需外标、对 Ct 值难确定的样本分析结果较差
数字 PCR (dPCR)		短	高	引物探针、PCR 仪、微滴式数字 PCR 系统等	易	绝对定量、重复性好、精密度及灵敏性高、判读结果准确、可进行无创检测	成本高
高通量测序		长	高	相关反应芯片、测序仪、基因组分析平台等	难	通量高、耗时短、精准定量、污染可能性极低	操作复杂、数据分析难度大、分析平台要求高
等温核酸扩增技术		短	低	恒温仪器等	低	应用范围宽、设备要求低	相关技术的细节要求高、成熟度低
生物传感器		短	低	相关仪器等	低	灵敏度高、特异性高、非入侵性	寿命短、需联动其他诊断技术才能发挥最大价值

3.2 实时荧光定量PCR (qPCR)

qPCR 是在 PCR 反应过程中加入荧光基团, 在扩增过程中荧光信号不断积累, 从而实时监测 PCR 过程, 再通过标准曲线对结果进行定量分析 (表 2). Jacquemier 等^[26]尝试通过 SISH、CISH 以及 qPCR 代替 FISH 检测, 研究包括 10 对引物: *HER2* 的外显子 8 和 26、染色体 17 多聚体 *TAOK1*、*UTP6*、*MRMI*、*MKSI*、*SSTR2* 和二倍体对照 *TSN*、*LAP3* 和 *ADAMTS16*. 基于 *HER2/CEP17* 比值或 *HER2* 拷贝数所得结果, 通过将 3 种替代技术与 FISH 进行对比, 发现一致性极高, SISH 的符合率分别为 97% 和 98%, 灵敏度为 99% 到 95%; CISH 的符合率分别为 98% 和 75%, 灵敏度为 89% 到 80%; qPCR 的符合率为 95% 和 93%, 灵敏度为 89% 到 90%. qPCR 相比于普通的定性 PCR 具有检测时间短、操作简

单等优势, 其可在 45~70 min 内得到检测结果, 并且在前处理后, 将样本插入到仪器中, 不需要其他的转移操作, 便可以得到结果. 终点定量 PCR 仅可在循环终点进行荧光检测, 而 qPCR 在扩增的过程中便可根据样品荧光值的变化进行实时检测, 大大提升了结果的精确度.

3.3 数字PCR (dPCR)

dPCR 是一种基于单分子扩增技术可实现对核酸分子绝对定量的技术, 主要采用微流控或者微滴化的方式, 将核酸溶液稀释后分散至芯片的微反应器或微滴中, 形成独立的反应室; 通过调整加入的核酸分子个数, 使每个反应室的核酸模板数符合泊松分布; 经过 PCR 循环扩增后, 含有核酸模板的反应室就会显示出荧光信号; 通过阳性反应室比例和反应室的体积, 便可计算出起始核酸样本中目标

基因拷贝数,而不需要采用外标(表2)^[27]. Whale等^[28]采用MCF-7、SK-BR-3、T-47D三株不同HER2基因扩增水平的乳腺癌细胞系基因组DNA, RNase P作为参考基因,来对比dPCR与qPCR拷贝数检测的精准度.在对正常女性基因组检测时,二者拷贝数比值分别为1.03和1.00,没有显著差别;两种方法在测定MCF-7与T-47D基因组中,其结果也没有显著差别($P=0.71$, $P=0.52$);但在具有较高的HER2基因扩增的SK-BR-3基因组中,dPCR检测的HER2:RNase P比值为7.15,明显低于qPCR检测的HER2:RNase P比值9.43($P=0.00005$).此外作者基于泊松分布和二项分布建立了一个模型,以确定dPCR的内在变异,并使用该模型证明了在低浓度DNA模板中,dPCR对CNV的测量灵敏度要优于qPCR. Heredia^[29]等通过dPCR对采用福尔马林固定石蜡包埋的临床乳腺肿瘤样本进行检测,成功将HER2+与HER2-分离,认为液滴数字PCR技术可用于乳腺癌基因HER2的定量检测,而且这种方法的准确性不依赖于实验人员的判断和实验条件.

3.4 高通量测序

高通量测序技术(high-throughput sequencing)相比于第一代测序技术Sanger测序,可以一次并行对几十万到几百万条DNA分子同时进行序列测定(表2).由于其大幅缩短了测序时长,在保持较高准确性的同时降低了成本,能够对一个物种的基因组和转录组进行全面细致的分析,具有划时代的意义,故也称下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)或深度测序(deep sequencing). Hortobagyi等^[30]通过NGS技术分析182个癌症相关基因的外显子序列和基因拷贝数变异,发现依维莫司联合依西美坦在维持绝经后激素受体阳性(HR+)、HER2阴性(HER2-)的晚期乳腺癌患者生活质量的同时,将无进展生存率(PFS)提高了一倍以上,该研究证实了大规模应用NGS和随后的相关分析对此类试验的可行性. Sarah-jane等^[31]使用NGS技术对30例患者中11例共44份血浆样本进行循环肿瘤DNA(ctDNA)检测,以追踪其体细胞突变和结构变异,其中有33例样本被检测出(80%),同时使用dPCR对其余的19例患者的97份血浆样本进行检测,结果中有80份样本被检测出(82%).从整体结果来看,30例样本中29例(97%)得到检测,并且141份血浆样本中115份(82%)检测到了ctDNA,这两种技术

的检测结果显示出了良好的一致性.

Roy-chowdhuri等^[32]通过NGS技术分析来自354名患者的415个乳腺癌样本,这些样本包含乳腺癌的46个常见致癌基因.该研究在62.1%的患者中共检测到281个体细胞非同义突变,其中TP53基因突变最为常见,突变频率高达38.8%,表明乳腺癌可能具有针对靶向治疗的潜在可行突变.基于NGS技术的突变分析可以为靶向癌症治疗提供有用的信息. Uji等^[4]采用NGS技术对115例乳腺癌患者的TP53基因进行突变分析,并采用DNA微阵列技术检测TP53突变相关基因表达特征.发现TP53突变与体积大、组织学分级高、孕酮受体呈阴性、HER2阳性表达的肿瘤相关性更显著,并证实NGS对TP53突变的检测比Sanger测序更为敏感,且TP54基因突变与预后不良显著相关.

3.5 等温核酸扩增技术

除分子诊断技术外,近年来等温核酸扩增技术也被用于乳腺癌诊断中,其只需恒温装置便能进行快速且高效的扩增反应(表2).该技术包含环介导等温扩增(LAMP)、依赖核酸序列型扩增(NASBA)、滚环扩增(RCA)、单引物等温扩增(SPIA)、链置换扩增(SDA)、交叉引物等温扩增(CPA)、新型等温多自配引发扩增(IMS)等,其中依赖核酸序列型扩增作为一种发明较早的等温核酸扩增技术被人们所熟知. Lamy等^[33]通过NASBA方法与qPCR、ELISA两种方法对比检测HER2 mRNA后,发现结果具有高度的一致性(AUC ROC 0.92, 敏感性90%, 特异性89.7%; AUC ROC为0.98, 敏感性为100%, 特异性为91.5%),这表明NASBA适合于评估乳腺肿瘤样本中HER2的扩增情况,该方法具有快速、高灵敏度和标准化的特点,可作为小肿瘤检测技术的补充.近年来,在众多等温检测技术中,环介导等温扩增技术具有广泛的应用范围, Hao等^[34]建立了一种RT-LAMP检测乳腺癌患者前哨淋巴结转移的方法,并将该方法与美国食品药品监督管理局批准的乳腺淋巴结(BLN)检测及常规病理检查结果进行对比,结果的一致性为95.4%(166/174).统计分析表明,两种方法结果一致($\kappa=0.890$, $P<0.001$).与病理检查相比,该方法的检测结果(敏感性=81.3%, 特异度=89.7%, $\kappa=0.691$, $P<0.001$)与BLN法相似(敏感性=87.5%, 特异度=84.9%, $\kappa=0.668$, $P<0.001$).此外,该方法可在术中完成,对手术策略的选择具有重要意义,其

快速的检测优势可能被引入到POCT方法中。

3.6 生物传感器

随着医疗研究对临床检测要求的提升, 生物传感器进入到研究者的视野中, 并得到飞速的发展, 该方法基本原理是将被分析物浓度转化为电信号, 根据信号强度反应被分析物状态. 其操作性简单快捷、成本低廉、具有非入侵性、高灵敏度及高特异性的优势(表2). 根据生物传感器所采用的敏感材料特性不同, 大体可以分为光学生物传感器、电化学生物传感器及质量型生物传感器^[35]. 以电化学生物传感器为例, Pacheco等^[36]研制了一种用于HER2-ECD定量的电化学分子印迹聚合物传感器, 该传感器的浓度范围为10~70 ng/L, 检测限为1.6 ng/L. 通过对比不同蛋白质生物学标志物的分析结果, 确定了其具有高度的特异性. 同时, 通过对人血清中生物学标志物的分析结果, 证明了其在早期临床监测以及病情跟踪方面具有很大的使用价值.

4 分子诊断技术对比

基因芯片技术在高通量检测方面具有极大优势, 可以在有限的实验次数中检测众多基因在特定实验体系中的变化规律, 其缺点在于其不能对待检测基因在多细胞类型组织中的精确定位进行判断, 而原位杂交技术可以克服此缺点. 在中国2019年出版的《乳腺癌Her2检测指南》^[37]中, 将IHC检测后浸润癌细胞的状态分为了4类, 其中对呈现IHC2+状态的结果建议更换样本或者使用原位杂交进一步检测. 该指南同时将双探针FISH检测的结果根据HER2/CEP17比值是否<2.0进行区分, 并提出相应建议. 但无论哪种检测结果, 当出现IHC与原位杂交结果不一致时, 需进行发生原因的合理分析, 选用其他的检测方法进行多方面验证.

FISH可以分析HER2的扩增状态, 具有良好的敏感性和特异性, 通常与染色体17着丝粒结合, 识别HER2基因的拷贝数, 被认为是金标准, 然而该技术的操作性十分复杂^[38], 对环境及设备要求较高, 而且费用昂贵. CISH和SISH技术^[39]是近年来引入的用于检测HER2基因状态的新技术, CISH检测技术具有敏感稳定的特点, 其显色剂可清晰显示目标基因, 并且组织杂交片可长期保存, 试剂价格也相对便宜, 操作技术重复性较好^[40], 但检测结果可能与FISH存在差异. SISH检测应用全自动仪器操作, 虽然其成本与FISH相当^[23], 但大大减

少了人为误差, 具有操作快速便捷、结果准确的优势.

qPCR是一种快速、灵敏、精确度高的定量技术, 可满足大多数的研究需求, 其通过标准曲线对未知模板进行定量分析, 在指数期测量可实现更加准确的定量, 但对于拷贝数变异、突变检测、基因相对表达这些通过Ct值很难准确判断的分析中, 其检测效果逊色于dPCR. dPCR是一种可实现对目标基因绝对定量的技术, 相较于qPCR, dPCR无需依赖于外标, 可直接读出DNA分子的个数, 是对起始样品的绝对定量. 其次, qPCR在实验室之间和实验室内部的检测技术差异性可能很高^[41], 而dPCR由于其测定结果的精密度与扩增的变化无关^[28], 所以在试验结果上的差异要明显较小^[42-43], 提高了试验结果的重复性与准确性, 更方便于实验室之间方法的标准化. 虽然目前仅有少量文献报道应用dPCR检测乳腺癌HER2基因的拷贝数变异^[29], 但笔者认为该方法与临床指南中推荐的FISH方法相比, 操作更简单、灵敏度更高, 可以显著缩小FISH等方法无法判断的灰区. 更重要的是dPCR方法可以准确、客观的判断HER2基因拷贝数变异, 无需依赖个人经验的判断, 还可以实现无创检测. 这些优势势必会快速推动dPCR方法在乳腺癌诊断中的应用, 使得乳腺癌分子诊断结果更准确和更客观.

等温扩增技术和生物传感器检测技术由于其具备耗时短、方便携带等优势, 逐渐发展为即时检验POCT (point-of-care testing) 的理想候选技术. 虽然已有技术发展成商业产品, 但其具体细节仍缺少标准化的规范, 且市场的成熟度较低. 此外, 随着测序技术的高速发展, 高通量测序技术在乳腺癌基因检测方面得到广泛应用, 虽然其具有高通量、耗时短等优点, 但这种检测方法实验操作较为复杂, 对数据分析难度大、对分析平台要求极高、往往需要专门的生物公司对初始结果进行分类处理、其检测的周期也比较长、成本较高, 相比适用于早期诊断的数字PCR, NGS技术更适用于未知序列或突变、高通量多位点的检测方面.

5 总结与展望

近年来, 对乳腺癌原癌基因以及抑癌基因的研究越来越广泛, 所取得的成果也对乳腺癌的临床监测与预后诊断提供了很大的帮助. 但由于各种检测方法的不确定性, 以及目前还缺少对相关检测的统

therapies in human breast cancer. Clin Cancer Res, 2016, **22**(19): 4859-4869

[12] Lane D P. p53, guardian of the genome. *Nature*(Lond.), 1992(385): 15-16

- [13] 铁剑,解云涛,徐晔,等.p53基因codon 72多态性与乳腺癌术后放化疗疗效相关性分析.中国肿瘤临床,2015(3):152-156

Tie J, Xie Y T, Xu Y, *et al.* Chinese Journal of Clinical Oncology, 2015(3): 152-156

[14] Lin J, Reichner C, Wu X, *et al.* Analysis of wild-type and mutant p21^{WAF-1} gene activities. *Mol Cell Biol*. 1996; **16**(4): 1786-1793

[15] Alcorta D A, Xiong Y, Phelps D, *et al.* Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(24): 13742-13747

[16] Vranic S, Teruya B, Repertinger S, *et al.* Assessment of HER2 gene status in breast carcinomas with polysomy of chromosome 17. *Cancer*. 2011. **117**(1): 48-53

[17] Leivonen S K, Sahlberg K K, Mäkelä R, *et al.* High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. *Mol Oncol*, 2014, **8**(1): 93-104

[18] Tennis M, Krishnan S, Bonner M, *et al.* p53 Mutation analysis in breast tumors by a DNA microarray method. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2006, **15**(1): 80-85

[19] 赵坡,姜学革,李晓瑛,等. FISH检测乳腺癌HER-2基因扩增及17号染色体多体状况及其临床病理学意义的分析. 中华肿瘤防治杂志, 2011(09):680-683

Zhao P, Jiang X G, Li X Y, *et al.* Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2011(09): 680-683

[20] Gupta D, Middleton L P, Whitaker M J, *et al.* Comparison of fluorescence and chromogenic *in situ* hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. Am J Clin Pathol, 2003, **119**(3): 381-387

[21] 张瑰红,施达仁,梁晓曼,等.显色原位杂交和免疫组织化学检测乳腺癌HER2/neu基因状况和蛋白表达的对照性研究.中华病理学杂志,2006(10):580-583

Zhang G H, Shi D R, Liang X M, *et al.* Chinese Journal of Pathology, 2006(10): 580-583

[22] 张伟,彭大云,陈晓东,等.乳腺癌HER2基因荧光原位杂交与显色原位杂交检测对比研究.华南国防医学杂志,2011(01): 13-15

Zhang W, Peng D Y, Chen X D, *et al.* Military Medical Journal of South China. 2011(01): 13-15

[23] 李佳嘉.FISH和SISH技术在乳腺癌HER2基因检测中对比性研究[D].芜湖:皖南医学院.2018

Li JJ. FISH and SISH in Detection of HER2 Gene in Breast Cancer Comparative Study[D]. Wuhu: Wannan Medical College. 2018

[24] Bartlett J M, Campbell F M, Ibrahim M, *et al.* Chromogenic *in situ* hybridization: a multicenter study comparing silver *in situ* hybridization with FISH. *Am J Clin Pathol*. 2009; **132**(4): 514-520.

[25] Pehlivanoglu B, Serin G, Yeniay L, *et al.* Comparison of HER2 status determination methods in HER2 (2+) patients: manual fluorescent *in situ* hybridization (FISH) vs. dual silver enhanced in

- situ hybridization (SISH). *Ann Diagn Pathol*, 2017, **12**(31): 36-40
- [26] Jacquemier J, Spyrtos F, Esterni B, *et al.* SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases. *BMC Cancer*, 2013, **13**(1): 351-351
- [27] 李亮, 隋志伟, 王晶, 等. 基于数字PCR的单分子DNA定量技术研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2012, **39**(10): 1017-1023
- Li L, Sui Z, Wang J, *et al.* Progress in Biochemistry and Biophysics, 2012, **39**(10): 1017-1023
- [28] Whale A S, Huggett J F, Cowen S, *et al.* Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(11): e82
- [29] Heredia N J, Belgrader P, Wang S, *et al.* Droplet Digital™ PCR quantitation of HER2 expression in FFPE breast cancer samples. *Methods*, 2013, **59**(1): S20-S23
- [30] Hortobagyi G N, Piccart-gebhart M J, Rugo H S, *et al.* Correlation of molecular alterations with efficacy of everolimus in hormone receptor - positive, HER2-negative advanced breast cancer: results from BOLERO-2[Z]. American Society of Clinical Oncology, 2013
- [31] Sarah-jane D, Tsui D Y, Murtaza M, *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2013(13): 1199-1209
- [32] Roy-chowdhuri S, De melo gagliato D, Routbort M J, *et al.* Multigene clinical mutational profiling of breast carcinoma using next-generation sequencing. *Am J Clin Pathol*, 2015, **144**(5): 713-721
- [33] Lamy P J, Verjat T, Paye M, *et al.* NASBA: a novel approach to assess hormonal receptors and ERBB2 status in breast cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2006, **44**(1): 3-12
- [34] Hao X, Liu Y, Li X, *et al.* An intra-operative RT-LAMP method allows rapid and reliable detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Virchows Arch*, 2015, **466**(2): 169-176
- [35] 张国魁, 王安平. 生物传感器在乳腺癌诊疗中的应用研究进展. *国际检验医学杂志*, 2015(04): 532-534
- Zhang G, Wang A P. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2015(04): 532-534
- [36] Rebelo, patricia, Pacheco, joao g., Delerue-matos, cristina, *et al.* Breast cancer biomarker (HER2-ECD) detection using a molecularly imprinted electrochemical sensor. *Sens Actuators B Chem*, 2018(273): 1008-1014
- [37] 杨文涛, 步宏, 白雪峰, 等. 乳腺癌HER2检测指南(2019版). *中华病理学杂志*, 2019, **48**(3): 169-175
- Yang W T, Bu H, Bai X F, *et al.* *Chinese Journal of Pathology*, 2019, **48**(3): 169-175
- [38] Elkin E B, Weinstein M C, Winer E P, *et al.* HER-2 testing and trastuzumab therapy for metastatic breast cancer: a cost-effectiveness analysis. *J Clin Oncol*, 2004, **22**(5): 854-863
- [39] Laurent A, Pascal R, Gaëtan M, *et al.* Accuracy of HER2 status determination on breast core-needle biopsies (immunohistochemistry, FISH, CISH and SISH vs FISH). *Modern Pathology*, 2012(5): 675-682
- [40] 虞有智, 姜宝玉, 陈定宝, 等. 显色原位杂交技术在乳腺癌HER-2/neu原癌基因检测上的应用及意义. *中华病理学杂志*, 2006(01): 51-52
- Yu Y Z, Jiang B Y, Chen D B, *et al.* *Chinese Journal of Pathology*, 2006(01): 51-52
- [41] Fryer J F, Baylis S A, Gottlieb A L, *et al.* Development of working reference materials for clinical virology. *J Clin Virol*, 2008, **43**(4): 367-371
- [42] Bhat S, Herrmann J, Armishaw P, *et al.* Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Anal Bioanal Chem*, 2009, **394**(2): 457-467
- [43] Rebecca S, Huggett J F, Bushell C A, *et al.* Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem*, 2011(17): 6474-6484

Recent Advances in Molecular Diagnostic Techniques for Breast Cancer Detection*

XING De-Chun^{1,2)}, WANG Xia²⁾, SUN Suo-Zhu³⁾, DONG Lian-Hua^{2)**}, YANG Jing-Ya^{1)**}

¹⁾College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

²⁾National Institute of Metrology, Beijing 100029, China;

³⁾PLA Rocket Force Characteristic Medical Center, Beijing 100088, China)

Abstract Breast cancer is a malignant tumor which can seriously endanger women's health. The detection of its pathogenic genes is helpful for the early detection, accurate treatment and prognosis evaluation of the tumor. This paper summarizes the hot biomarkers related to breast cancer in recent years and reviews the molecular diagnostic techniques, detection methods and applications of related genes. The development of digital PCR in molecular detection of breast cancer was reviewed for the first time. The advantages and disadvantages of different molecular diagnostic techniques were comprehensively compared in this paper. It provides a guidance for the detection of oncogenes in breast cancer, and makes a forecast for future trends.

Key words breast cancer, biological chip, nucleic acid hybridization, digital PCR, NGS

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0253

* This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2017YFF0204605).

** Corresponding author.

DONG Lian-Hua. Tel: 18510031111, E-mail: donglh@nim.ac.cn

YANG Jing-Ya. Tel: 15692165856, E-mail: jyyang@shou.edu.cn

Received: October 22, 2019 Accepted: December 30, 2019