doi:10.11659/jjssx.03E021117

·临床研究·

基于微滴式数字 PCR 技术的 HER2 基因扩增用于乳腺癌 TNM 分期的研究

黄 波,张艺超,林建山 (深圳市宝安人民医院普外二区,广东 深圳 518101)

[摘 要] **目的** 分析微滴式数字 PCR(ddPCR)技术用于人类表皮生长因子受体 2(HER2)基因扩增的价值及在评估乳腺癌 TNM 分期中的应用。**方法** 选取临床资料及随访资料完整的 100 例乳腺癌患者,其组织标本作为观察组,其中 TNM Ⅰ ~ Ⅱ期71 例,Ⅲ ~ Ⅳ期 29 例;另选择 80 例乳腺增生患者的组织标本作为对照组。构建 HER2 基因扩增 ddPCR 方法,分析 2 组 HER2 基因相对扩增倍数;采用 *Spearman* 相关性分析 HER2 基因相对扩增倍数与 TNM 分期的相关性;绘制受试者工作特征(*ROC*)曲线,分析 ddPCR 技术用于 HER2 基因扩增在评估乳腺癌 TNM 分期的价值。**结果** 观察组 HER2 基因相对扩增倍数显著高于对照组($P<0.05$);且观察组 TNM Ⅲ ~ Ⅳ期乳腺癌患者 HER2 基因相对扩增倍数高于 TNM Ⅰ ~ Ⅱ期乳腺癌患者($P<0.05$)。*Spearman* 相关性分析结果显示,HER2 基因相对扩增倍数与 TNM 分期呈正相关($r=0.632$,$P<0.05$);使用 ddPCR 技术检测乳腺癌患者 HER2 基因分析 TNM 分期的敏感度和特异度均大于 90%,曲线下面积(*AUC*)>0.95。**结论** ddPCR 技术检测的 HER2 基因相对扩增倍数与乳腺癌 TNM 分期呈正相关,该方法敏感度和特异度均较高,可用于预测 TNM 的分期。

[关键词] 微滴式数字 PCR 技术;人类表皮生长因子受体 2;乳腺癌;TNM 分期;基因扩增

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-03-26

HER2 gene amplification based on droplet digital PCR technology for TNM staging of breast cancer

HUANG Bo,ZHANG Yi-chao,LIN Jian-shan (Second Ward of General Surgery,People's Hospital of Baoan District in Shenzhen,Shenzhen Guangdong 518101,China)

Abstract: Objective To analyze the value of droplet digital PCR (ddPCR) technology for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) gene amplification and its application in the assessment of TNM staging for breast cancer. **Methods** A total of 100 breast cancer patients with complete clinical data and follow-up data were enrolled and their tissue samples were included into the observation group,with 71 cases of TNM staging from Ⅰ to Ⅱ and 29 cases of TNM staging from Ⅲ to Ⅳ,and the tissue samples of 80 breast hyperplasia patients were taken into the control group. The ddPCR method for HER2 gene amplification was established to analyze the relative gene amplification number of HER2 in the two groups. *Spearman* correlation analysis was used to explore the correlation between the relative gene amplification number of HER2 and TNM staging. The *receiver operating characteristic* (*ROC*) curve was drawn to analyze the value of ddPCR technology for HER2 gene amplification in the assessment of TNM staging for breast cancer. **Results** The relative gene amplification number of HER2 in the observation group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$),and the relative gene amplification number of HER2 for breast cancer patients with TNM staging from Ⅲ to Ⅳ was significantly higher than that of breast cancer patients with TNM staging from Ⅰ to Ⅱ in the observation group ($P<0.05$). A positive correlation was obtained between the relative amplification munber of HER2 gene and TNM staging in *Spearman* correlation analysis ($r=0.632$,$P<0.05$);both the sensitivity and specificity of ddPCR technology for HER2 gene amplification in the assessment of TNM staging for breast cancer were more than 90%,with *area under curve* (*AUC*) > 0.95. **Conclusion** There is a significant positive correlation between the relative gene amplification number of HER2 detected by ddPCR technology and TNM staging of breast cancer. This method has high sensitivity and specificity,which can be used to predict TNM staging.

Keywords: droplet digital PCR;human epidermal growth factor receptor 2;breast cancer;TNM staging;gene amplification

乳腺癌是威胁女性健康的恶性肿瘤之一,每年乳腺癌新发 100 多万例,死亡 40 多万例[1]。乳腺癌类型较多,因而明确乳腺癌类型,制定合适的治疗方案,准确评估预后,才能取得最佳的治疗效果[2]。有研究显示,人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2,HER2)作为多变量分析中的一个独立预后指标,可判断乳腺癌的恶性程度[3]。HER2 的标准化检测、乳腺癌患者 HER2 基因表达的规律及 TNM 分期等在临床实践中对于预测患者的预后、提高乳腺

[基金项目] 深圳宝安区医疗卫生基础研究项目(2020JD395);深圳市宝安人民医院(集团)青年科研基金(2018C009)

[通信作者] 黄 波,E-mail:hhech126@126.com

癌诊治水平有着积极的意义[4]。目前,可通过免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)检测 HER2 蛋白的表达,通过荧光原位杂交方法(fluorescence in situ hybridization,FISH)检测 HER2 基因扩增的水平[5]。然而现有的 HER2 检测方法,结果判读具有主观性,也易受到取样及处理方法的影响,且 HER2 存在基因融合、断裂等现象,FISH 检测结果存在假阴性的可能[6]。微滴式数字 PCR(droplet digital PCR,ddPCR)技术是一种新型的绝对定量 PCR 方法,与实时荧光定量 PCR 技术相比,其具有灵敏度高、定量准确、检测的线性范围宽、特异度高、成本低等优点,极具发展潜力[7],但其结果的可靠性有待进一步证实。因此,本研究选择我院收治的乳腺癌患者的标本进行研究,分析 ddPCR 技术用于 HER2 基因扩增的价值及在评估乳腺癌 TNM 分期中的应用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

从我科乳腺癌标本库中选择 2015~2017 年行手术治疗的 100 例乳腺癌患者的标本作为观察组,其中 TNM Ⅰ~Ⅱ期 71 例,Ⅲ~Ⅳ期 29 例。纳入标准:经病理学检查确诊为乳腺癌;IHC 3+或 FISH 法检测 HER2 阳性;年龄≥18 岁。排除标准:肝肾功能不全;合并其他肿瘤;严重精神病史;存在其他重大器官疾病;临床资料缺失。同期选择 80 例乳腺增生患者的组织标本作为对照组。2 组患者的年龄、绝经比例比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。本研究经我院医学伦理委员会批准。

表 1 患者临床资料比较

组别	n	年龄/岁	绝经/例(%)
观察组	100	48.59±5.97	32(32.00)
对照组	80	49.01±6.49	26(32.50)
t/χ^2		0.451	0.005
P		0.652	0.943

1.2 方法

构建 HER2 基因扩增 ddPCR 方法:采用 QX200 ddPCR 系统检测 HER2 基因扩增,将 MixDNA 样品按 16:4的比例混合,制备反应混合物。取 20 μL 反应体系置于微滴发生器的样品孔中,每孔加入 70 μL 微滴生成油,合上微滴生成仪,覆盖垫圈墨盒,启动生成仪,形成 20 000 个纳米级的油包水微滴。每孔取 40 μL 油包水微滴加入 96 孔板。铝箔热封膜密封,置于 Bio-Rad C1000热封膜仪上,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s 进行 40 个常规的 PCR 扩增反应循环。将 96 孔板放入 QX200 微滴检测仪中,利用检测仪自带的控制分析软件设置样本孔条件,启动检测仪,根据泊松分布原理获得标本起始分子的绝对拷贝数,将结果导出并保存。检测 HER2 基因相对扩增倍数,相对扩增倍数(n)=目标基因拷贝数/内参基因拷贝数,当 $n\leqslant1.2$ 时为阴性,当 $n>1.2$ 时为阳性。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验;计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,行 *LSD-t* 检验;采用 *Spearman* 相关性分析 HER2 基因相对扩增倍数与 TNM 分期的相关性;以常规病理检测结果作为金标准,绘制受试者工作特征(*receiver operating characteristic*, *ROC*)曲线,分析 ddPCR 技术用于 HER2 基因扩增在乳腺癌 TNM 分期的价值。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HER2 基因相对扩增倍数检测

观察组患者 HER2 基因相对扩增倍数高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组中 TNM Ⅲ~Ⅳ期乳腺癌患者 HER2 基因相对扩增倍数高于 TNM Ⅰ~Ⅱ期乳腺癌患者,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。*Spearman* 相关性分析结果显示,HER2 基因相对扩增倍数与 TNM 分期呈正相关($r=0.632$,$P<0.05$)。

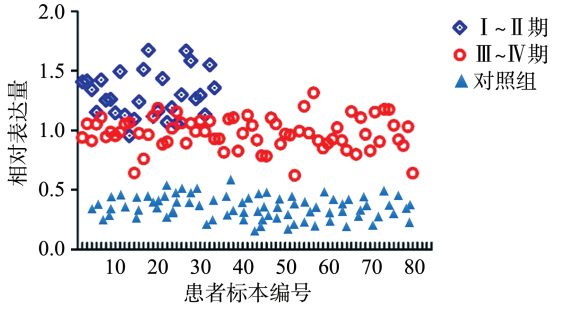


图 1 HER2 基因相对扩增倍数检测结果

2.2 ddPCR 检测分析乳腺癌患者 TNM 分期的价值

使用 ddPCR 技术检测乳腺癌患者 HER2 基因分析 TNM 分期的敏感度和特异度均大于 90%,且曲线下面积(*area under curve*,*AUC*)>0.95(图 2),相关性分析有统计学意义,说明基于 ddPCR 技术的 HER2 基因相对扩增倍数可作为评估乳腺癌患者 TNM 分期的参考依据。

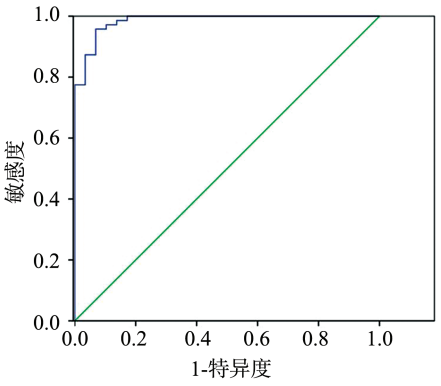


图 2 *ROC* 曲线图

3 讨论

2018 年 2 月,国家癌症中心发布了最新的全国癌症统计数据,乳腺癌发病率居女性恶性肿瘤的首位,约占 16.51%,乳腺癌的防控形势非常严峻[8]。根据基因不同,可将乳腺癌分为 Luminal A 型、Luminal B 型(其中 Luminal B 型又细分为 Luminal B HER2 阴性型和 Luminal B HER2 阳性型)、HER2 过表达型、三阴型[9]。不同类型乳腺癌治疗方法也不同,Luminal A 型乳腺癌以内分泌治疗为主;Luminal B 型乳腺癌要考虑多种辅助治疗相结合;三阴型乳腺癌尚无针对性治疗方法,以化疗为主;20% ~ 30% 的乳腺癌患者为 Luminal B HER2 阳性型,是各种分型中较为凶险的一个亚型,相比其他类型乳腺癌其恶性程度更高,疾病进展更快,更容易复发和转移,严重威胁患者的生命[10]。

HER2/neu 基因是乳腺癌细胞中重要的表皮生长因子受体家族成员,也是目前乳腺癌治疗的药物靶点之一。有研究显示,若乳腺癌患者 HER2 过表达,则其生存期极易缩短,导致不良结局[11]。现阶段临床应用过程中参考《乳腺癌 HER2 检测指南》,而该指南中推荐使用 IHC 与 FISH 和/或显色原位杂交结合方案检测 HER2 的表达,但均存在分析结果主观性、检测耗时长、操作繁琐等缺点,导致其临床应用存在一定的局限性[12-13]。

ddPCR 技术是近年来临床逐渐推广应用的新型检测技术,可有效分析 HER2 基因拷贝数,定量分析 HER2 的 DNA 以及 RNA 水平[14]。ddPCR 技术在使用过程中通过将反应体系均分到大量反应单元中,独立进行 PCR 扩增,检测每个反应单元的荧光信号(荧光信号产生过程参考 qPCR),根据泊松分布和阳性比例计算核酸数量[15]。本研究采用 ddPCR 技术检测乳腺癌患者的标本,结果显示,TNM Ⅲ ~ Ⅳ期的患者 HER2 基因相对扩增倍数高于 TNM Ⅰ ~ Ⅱ期的患者;相关性分析结果显示,ddPCR 技术检测的 HER2 基因相对扩增倍数与 TNM 分期呈正相关;进一步分析发现,ddPCR 技术检测乳腺癌患者 HER2 基因分析 TNM 分期的敏感度和特异度均大于 90%,且 $AUC > 0.95$,具有较高的应用价值。ddPCR 技术可对基因序列进行高灵敏度的检测,在检测过程中无需采用标准品即可实现 DNA 的绝对定量;此外,ddPCR 技术检测 HER2 基因时,不依赖扩增效率和 Ct 值,可有效避免 PCR 抑制剂的影响,对样本容忍度较高。结合本研究进一步分析认为,ddPCR 技术可有效分析 HER2 表达水平和拷贝数,通过精准定量分析为乳腺癌分子分型提供数据支持,ddPCR 计数可有效筛选出低丰度的基因表达并开展鉴定分析,对于乳腺癌患者病情的评估具有重要作用。

综上所述,使用 ddPCR 技术检测乳腺癌患者 HER2 基因相对扩增倍数与乳腺癌 TNM 分期呈正相关,该方法预测 TNM 分期的敏感度和特异度均较高。但本研究并未详细分析 ddPCR 技术检测 HER2 基因相对扩增倍数与乳腺癌患者预后质量的关系,有待后续进一步研究。

[参考文献]

[1] Koh J, Kim MJ. Introduction of a new staging system of breast cancer for radiologists: an emphasis on the prognostic stage[J]. Korean J Radiol, 2019, 20(1): 69 - 82. doi: 10.3348/kjr.2018.0231.

[2] Breaux A, Turner B, Wu X, et al. Impact of the 21-gene expression assay on staging estrogen receptor positive HER2 negative breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2019, 19(1): e261 - e269. doi: 10.1016/j.clbc.2018.10.005.

[3] 王丰莲,程旭锋,赵慧朵,等. T1 期 HER2 阳性乳腺癌患者临床特征及抗 HER2 靶向治疗对预后的影响分析[J]. 癌症进展, 2018, 16(2): 217 - 221. doi: 10.11877/j.issn.1672 - 1535.2018.16.02.24.

[4] Ahn SG, Cha YJ, Bae SJ, et al. Comparisons of tumor-infiltrating lymphocyte levels and the 21-gene recurrence score in ER-positive/HER2-negative breast cancer[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 320. doi: 10.1186/s12885 - 018 - 4228 - 6.

[5] Liu P, Tang H, Wu J, et al. Linc01638 promotes tumorigenesis in HER2 + breast cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2019, 19(1): 74 - 80. doi: 10.2174/1568009618666180709163718.

[6] 徐伟铭,张玲娜,金海丽,等. 运用《乳腺癌 HER2 检测指南(2019 版)》对免疫组织化学检测 HER2 不确定表达状态的再评估[J]. 中华病理学杂志, 2020, 49(11): 1152 - 1157. doi: 10.3760/cma.j.cn112151 - 20200214 - 00098.

[7] Richard B, Belinda Y, Brentnall AR, et al. Novel 18-gene signature for predicting relapse in ER-positive, HER2-negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2018, 20(1): 103. doi: 10.1186/s13058 - 018 - 1040 - 9.

doi:10.11659/jjssx.03E021007

·临床研究·

腹腔镜下 C1 型子宫切除术治疗宫颈癌的临床价值

吴学明,陈燕娥,陈 绵 (海口市妇幼保健院妇科,海南 海口 570203)

[摘 要] **目的** 探讨腹腔镜下保留盆腔自主神经(PAN)的子宫切除术治疗宫颈癌的临床应用效果。**方法** 纳入我院收治的 106 例宫颈癌患者进行前瞻性研究,采用随机数字表法将患者分为对照组和观察组,每组 53 例。观察组患者行腹腔镜下 C1 型子宫切除术(保留 PAN),对照组行腹腔镜下 C2 型子宫切除术(不保留 PAN)。记录并比较 2 组患者围术期相关指标、术后性功能、膀胱功能及生存情况。**结果** 2 组患者术中出血量及淋巴结切除数目比较,差异无统计学意义($P>0.05$);观察组患者手术时间长于对照组($P<0.05$),但尿管留置时间、术后排气时间、术后排便时间及术后住院时间短于对照组($P<0.05$)。观察组患者术后3 个月女性性功能指数(FSFI)各项评分均高于对照组($P<0.05$),术后膀胱功能障碍总发生率较对照组低($P<0.05$)。随访期间,*Kaplan-Meier* 分析显示,2 组患者累积总生存率、累积无病生存率比较,差异无统计学意义(*Log-rank* $\chi^2=0.062$、0.306,$P=0.803$、0.580)。**结论** 腹腔镜下 C1 型子宫切除术不仅可以促进宫颈癌患者术后康复,而且对患者直肠、膀胱及性功能具有较好的保护作用。

[关键词] 腹腔镜;保留盆腔自主神经;C1 型子宫切除术;宫颈癌;下腹下神经丛;盆腔内脏神经;腹下神经

[中图分类号] R737.33 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-03-02

Clinical value of laparoscopic type C1 hysterectomy in treatment of cervical cancer

WU Xue-ming, CHEN Yan-e, CHEN Mian (Department of Gynecology, Haikou Hospital of the Maternal and Child Health, Haikou Hainan 570203, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical effect of pelvic autonomic nerve-sparing laparoscopic hysterectomy in the treatment of cervical cancer. **Methods** A total of 106 patients with cervical cancer admitted to our hospital were prospectively selected, and the patients were divided into the control group and the observation group by random number table method, with 53 cases in each group. Laparoscopic type C1 hysterectomy (PAN sparing) was performed in the observation group, and laparoscopic type C2 hysterectomy (without PAN sparing) was performed in the control group. Perioperative related indexes, postoperative sexual function, bladder function and survival of patients in the two groups were recorded and compared. **Results** There was no significant difference in intraoperative blood loss or the number of lymph node resection between the two groups ($P>0.05$), the operation time of the observation group was longer than that of the control

[基金项目] 海南省重点研发计划项目(ZDYF2019102)

[通信作者] 吴学明,E-mail:hvd75899622@163.com

[8] 宋亚波.2018 年全国癌症统计数据公布[J].中华医学信息导报,2018,33(7):6.

[9] Yamashita H, Ishida N, Hatanaka Y, et al. HER2 gene amplification in ER-positive HER2 Immunohistochemistry 0 or 1 + breast cancer with early recurrence[J]. Anticancer Res, 2020, 40(2): 645 - 652. doi: 10.21873/anticanres.13994.

[10] Steenhoven JECV, Dalen TV. ASO author reflections: the changing role of gene expression profiling in ER +/HER2 breast cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2019, 26(S3): 800 - 801. doi: 10.1245/s10434 - 019 - 07955 - y.

[11] Yeong KY, Jeong OS, Soon CY, et al. Gene expression assay and Watson for oncology for optimization of treatment in ER-positive, HER2-negative breast cancer[J]. PLoS One, 2018, 13(7): 100. doi: 10.1371/journal.pone.0200100.

[12] Ran R, Huang W, Lin S, et al. Prognostic role of plasma HER2 gene copy number in patients with HER2 positive metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(15): e13018. doi: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e13018.

[13] 徐巧萍,朱洁瑾,刘 坚,等. HER-2 阳性乳腺癌患者 2 种新辅助化疗方案的药物经济学评价[J].中国现代应用药学,2019,36(8):89 - 96. doi:10.13748/j.cnki.issn1007 - 7693.2019.08.018.

[14] Menon M, Orem J, Adams S, et al. ER, PR, and HER2 expression in Ugandan breast cancer patients: an evaluation of in-country RT-PCR compared to IHC[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(15): e19009. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e19009.

[15] Wu VT, Kiriazov B, Koch KE, et al. A TFAP2C gene signature is predictive of outcome in HER2-positive breast cancer[J]. Mol Cancer Res, 2019, 18(1): 359. doi: 10.1158/1541 - 7786.MCR - 19 - 0359.

(编辑:龙小芬)