

乳腺癌相关分子诊断技术的新研究进展^①

韦宝斌¹, 梁丽娜², 罗志斋², 陈善萍¹, 徐冲¹, 王俊利², 韦贵将^{2②}

(1. 右江民族医学院医学检验学院 2013 级 1 班, 广西 百色 533000

E-mail: 769245239@qq.com;

2. 右江民族医学院附属医院检验科, 广西 百色 533000)

摘要: 乳腺癌是一种好发于乳腺上皮组织的恶性肿瘤, 威胁女性的身心健康甚至性命。早期诊断是提高乳腺癌治愈率和生存率的关键。随着临床研究的不断发展, 乳腺癌相关诊断技术也不断涌现。作为一种新的医疗诊断技术, 分子诊断技术为乳腺癌的早期诊断、预后判断、化疗、内分泌治疗方案的选择等提供了重要帮助。本文将就乳腺癌相关分子诊断技术的新进展作一综述。

关键词: 乳腺癌; 分子诊断; 基因芯片; PCR; 高通量测序

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)04-0319-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.04.023

近年来乳腺癌的发病率呈逐年上升的趋势, 是我国女性发病率最高的癌症, 每年我国乳腺癌新发病例和死亡病例分别占全世界的 12.2% 和 9.6%^[1-3]。一般来说, 乳腺癌早期无任何临床症状, 早期发现及治疗对降低乳腺癌病死率、改善预后起到很大作用^[4]。据相关文献报道, 乳腺癌的 5 年生存率在原位癌为 100%, I 期为 84%~100%, II 期为 76%~87%, III 期为 38%~77%^[5-6]。目前, 乳腺癌相关分子诊断技术有多种, 如基因芯片技术、实时荧光定量 PCR 技术、高通量测序技术等。相对于传统的乳腺癌诊断技术, 如乳腺红外线扫描检查、乳腺 CT 检查等, 乳腺癌分子诊断技术具有灵敏度更高、特异性更强、准确性更好, 且操作更为简便快捷等优势。然而目前却鲜有乳腺癌相关分子诊断技术的综合对比, 故本文就乳腺癌相关分子诊断技术的最新进展做简要综述。

1 基因芯片技术

1.1 基因芯片技术简介 基因芯片是指按照预定位置固定在很小面积内的千万个核酸分子密集排列固定在固相载体形成的微型检测器件。其主要原理是通过各种可行的技术手段将核苷酸固定到固定的支持物上, 利用碱基互补配对的原理, 将处理好的样品与其进行杂交, 从而完成样品基因的检测。基因芯片的概念由 Stephen Fodor 博士^[7]于 1991 年首次提出, 并借助半导体技术进行芯片研制。而世界上第一张基因芯片则是由美国 Affymetrix 生物公司于 1991 年制造出。由于基因芯片技术具有快速、敏感、高通量等优点, 因而在基因组研究、基因诊断、DNA 序列测定, 以及工农业等领域得到广泛应用。

1.2 基因芯片技术在乳腺癌诊断中的应用 自基因芯片技术问世以来, 因其可高通量平行检测一个组织细胞中的多个基因表达水平, 因此学者们运用该技术比较乳腺正常组织与乳腺癌组织基因之间的表达差异, 进而发现某些与乳腺癌发生具有密切关联的基因, 为乳腺癌的一级预防提供相关依据。付伟杰等^[8]采用基因芯片技术对乳腺癌 MCF-7 细胞系他莫昔芬耐受的差异表达基因进行检测, 探讨 S100p 对 MCF-7 和耐药型 MCF-7 细胞系他莫昔芬耐受和细胞迁移能力的影响, 发现与 MCF-7 相比, MCF-7R 细胞系中 S100p mRNA 和蛋白表达显著上调, 干扰其蛋白表达后, MCF-7R 他莫昔芬耐受性明显降低, 细胞迁移能力显著减弱, 表明了 S100p 能够促进乳腺癌细胞他莫昔芬耐受和增强细胞迁移能力。厉周等^[9]利用 Agilent 人全基因组 Oligo 芯片对实验组和对照组的组织样本基因表达进行分析, 并采用 real-time PCR 技术进行验证, 实验结果证明了不同预后的早期乳腺癌样本的基因表达存在明显差异, 早期乳腺癌的预后与 CD44、MKI67、NTRK2 等基因的表达有关。潘峰等^[10]应用基因芯片分析技术, 筛选乳腺癌耐药相关基因, 探讨乳腺癌化疗耐药机制, 最终在不同的细胞系中筛选出差异有显著性意义的基因 1520 个, 结果证实基因芯片技术可为乳腺癌耐药相关基因的筛查提供全面的技术分析。沈丽霞等^[11]采用乳腺癌和雌激素受体信号通路 DNA oligo microarray 功能基因芯片技术, 对金雀异黄酮对雌激素依赖性乳腺癌细胞 T47D 基因表达及雌激素受体依赖性信号转导通路的影响进行观察, 从而发现了金雀异黄酮激活人乳腺癌 T47D 细胞雌激素受

① 基金项目: 百色市科学研究与技术开发计划(百科计 20140617)

② 通信作者, E-mail: cpuwgj@163.com

体表达,通过周期蛋白过表达从而调节细胞周期蛋白依赖性激酶的活性,加速S期进程,促进细胞的增殖。

基因芯片技术充分利用了生物学、信息学等当今前沿科技成果,因其具有快速、高通量、灵敏度高、特异性强等优点而在乳腺癌早期诊断中得到大量应用。然而这项技术目前还存在DNA芯片上原位合成探针可能会掺入错误的核酸或者杂质等缺陷,这将使得杂交背景增高,特异性也将降低,另外基因芯片还有价格昂贵、实验成本高等不足。随着分子生物学的迅猛发展和人们对越来越多肿瘤的基因表达差异进行研究,基因芯片技术也在实践中不断完善、成熟。因为有基因芯片技术,乳腺癌的研究已由原来的细胞水平迈进了现代分子生物学的范畴,未来逐步完善的基因芯片技术将为乳腺癌早期诊断提供更加强有力的支持。

2 实时荧光定量PCR技术

2.1 实时荧光定量PCR简介 实时荧光定量PCR技术是指在PCR反应体系中加入荧光基团,通过荧光信号积累对整个PCR进程实时监测。荧光染料能特异性渗入DNA双链,发出荧光信号,从而保证荧光信号与PCR产物同步增加。其定量的原理在于靶基因初始拷贝数越多,所产生的循环阈值越小。

2.2 实时荧光定量PCR在乳腺癌诊断中的应用 实时荧光定量PCR的应用范围很广泛,其中包括mRNA表达情况的研究、单核苷酸多态性的检测以及DNA拷贝数的测定等。邓艳华等^[12]应用双标准曲线的实时荧光PCR法检测原癌基因人类表皮生长因子受体2基因扩增在临床乳腺癌诊治中的可行性,并以荧光原位杂交方法作为对照方法,通过计算目的基因浓度和内标基因浓度的比值来判断HER2基因的扩增情况,得到双标准曲线的实时荧光PCR法用于检测HER2基因扩增相对准确可靠的结论。陆慧琦等^[13]运用实时荧光定量RT-PCR测定乳腺癌组织中雌激素受体 α 、孕激素受体和人表皮生长因子受体2基因的表达,用免疫组化染色法作为对照,结果发现实时荧光定量RT-PCR检测方法可用于雌激素受体 α 、人表皮生长因子受体2和孕激素受体mRNA表达的临床检测和研究。弓自玉等^[14]应用实时荧光定量PCR检测乳腺癌患者外周血中表皮生长因子受体及细胞角蛋白20并分析其临床病理联系,发现此两项指标联合检测可作为乳腺癌诊断、治疗及预后的参考指标。王卉等^[15]应用实时荧光定量PCR探讨微小RNA-21在乳腺癌细胞和患者血清中的表达及其与乳腺癌侵袭转移的关系,使得血清中微小RNA-21的表达成为乳腺癌辅助诊断及预后判断的新的分子标志。

荧光定量PCR诊断乳腺癌应用封闭的检测,扩增后无需电泳的检测,然而却无法检测扩增产物的大小,

而且荧光定量PCR的复合式检测也会受限于荧光素种类和检测光源,实验成本比较高。但是随着PCR技术的不断推广,利用实时荧光PCR诊断乳腺癌的优势也越来越明显。其操作简便、高通量,而且具有很高的敏感性、重复性和特异性,可多重扩增,污染可能性小,有利于乳腺癌的大规模筛查。随着实时荧光定量PCR技术的逐步完善,其在临床诊治乳腺癌将有良好的应用前景。

3 高通量测序技术

3.1 高通量测序技术简介 相对于以Sanger测序法为代表的第一代测序技术,高通量测序技术又称新一代测序技术。高通量测序技术的突出特征是能对几十万到几百万条DNA分子同时进行测序,产出序列数据量大^[16]。与Sanger测序技术相比,高通量测序技术在测序原理上有本质的飞跃,是基于边合成边测序的原理。高通量测序技术的核心原理在于通过对单条DNA分子进行相互隔离的PCR以放大后续测序信号,再利用酶联化学发光反应对单条DNA分子的多个拷贝进行大规模平行测序。

3.2 高通量测序技术在乳腺癌诊断中的应用 近年来以下一代测序技术为代表的大规模、高通量基因组技术的迅速发展,为癌症病因、诊断、预防和制定新的治疗策略提供了新的机遇^[17]。Rothé F等^[18]选取17例转移性乳腺癌患者的61个原发/转移灶和29个血浆样本,应用新一代测序技术进行血浆ctDNA检测,评估其是否能够代替转移性组织的活检,对癌转移组织和血浆样本进行综合分析后得到在分子筛选中,血浆ctDNA检测在一定程度上可以代替转移性组织的检测的结论。Roy-Chowdhuri等^[19]应用下一代测序技术分析来自354位患者的415份乳腺癌样本中TP53、ATM等一些众所周知的致癌基因,检测发现62.1%的患者中共有281个体细胞非同义突变,其中TP53突变频率高达38.8%,表明了乳腺癌可能含有可针对治疗的潜在可行的突变,新一代测序技术基于突变图谱可以为乳腺癌靶向治疗提供有用信息。Ellis等^[20]利用全基因组测序分析新辅助化疗乳腺癌患者基因突变与芳香化酶抑制剂反应性的关系,发现GATA3突变会增加患者对芳香化酶抑制剂的敏感性,TP53突变与芳香化酶抑制剂抵抗相关。

高通量测序技术诊断乳腺癌,除了可以快速实现肿瘤基因组测序外,还可以全面快速地数字化分析肿瘤转录组、DNA-蛋白质以及表观遗传交互作用,其具有高通量、耗时短等优势。但是,高通量测序技术诊断乳腺癌也具有一定的不足。例如:目前需要专门的公司来为用户对初始图像进行分类和存档,研究者想对海量小片段数据进行组装和拼接从而得到原始的测序

结果,还得具备一个足够强大的计算机平台等条件。随着科技的进步,高通量测序技术也将不断发展,变得更加成熟,为乳腺癌的诊断提供强有力的技术支持。

4 讨论

综上所述,基因芯片技术虽然具有快速、高通量、灵敏度高、特异性强等优点,但是也有易受掺入的错误核酸及混入杂质的影响、实验成本高等不足。实时荧光定量 PCR 技术具有很高的敏感性、重复性和特异性,可多重扩增,污染可能性小等优势,但同时也有不能检测扩增产物大小,会因为荧光素种类以及检测光源而受限等缺点。而高通量测序技术则具有高通量、耗时短等优势,但仍存在需要专门的公司来对初始图像进行分类、存档和进行处理等不足。每种乳腺癌诊断相关技术都有其各自的优势与不足。但是,随着科技的发展,乳腺癌分子诊断技术也将更加成熟全面。临床医生必须要全方位地了解各种诊断技术的特点,从而根据患者的临床情况,有效地选择一种或数种方法联合进行诊断,发挥各项诊断技术的优势,又避免各项诊断技术的不足,从而得出较为准确的诊断结论。相信随着分子诊断技术的不断发展与完善,乳腺癌的早期诊断率必将得到进一步的提高,从而使更多的乳腺癌患者受益。

参考文献:

- [1] Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China[J]. *Lancet Oncology*, 2014, 15(7): e279-e289.
- [2] Coughlin SS, Smith SA. The Impact of the Natural, Social, Built, and Policy Environments on Breast Cancer [J]. *J Environ Health Sci*, 2015, 1(3). doi: 10.15436/2378-6841.15.020
- [3] 林疆,刘毅,梁峰,等. 乳腺癌前哨淋巴结分子病理检测技术的验证: RT-LAMP 与 GeneSearch 技术的对比研究 [J]. *军事医学*, 2015, (5): 373-376.
- [4] Dimitrakopoulos FI, Kottorou A, Antonacopoulou AG, et al. Early-Stage Breast Cancer in the Elderly: Confronting an Old Clinical Problem [J]. *J Breast Cancer*, 2015, 18(3): 207-217.
- [5] Bonneau C, Gurard-Levin ZA, Andre F, et al. Predictive and Prognostic Value of the Tau Protein in Breast Cancer [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(10): 5179-5184.
- [6] 聂德红,李洪义,李凯. 乳腺癌的影像学检查现状与新进展 [J]. *中国当代医药*, 2015, 22(15): 20-24.
- [7] Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, et al. Light-directed,

spatially addressable parallel chemical synthesis [J]. *Science*, 1991, 251(4995): 767-773.

- [8] 付伟杰,杨光伦,涂刚,等. S100p 促进乳腺癌 MCF-7 细胞他莫西芬耐受和细胞迁移 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(17): 1795-1799.
- [9] 厉周,彭亮,韩帅,等. 利用 Agilent 定制基因芯片筛选相同病理类型、不同预后的早期乳腺癌的分子标记物 [J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(10): 1483-1488.
- [10] 潘峰,洪理泉,於王骐,等. 应用基因芯片技术筛选乳腺癌多药耐药相关基因的初步研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(11): 2477-2480.
- [11] 沈丽霞,牛建昭,王继峰. 应用基因芯片技术检测金雀异黄素对乳腺癌 T47D 细胞雌激素受体相关信号通路基因表达的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(2): 100-103.
- [12] 邓艳华,吴荃,陈华云,等. 实时荧光 PCR 法检测 HER2 基因扩增方法的建立 [J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(3): 295-298.
- [13] 陆慧琦,何金,陈佳,等. 运用实时荧光定量 RT-PCR 法检测乳腺癌组织中 ER α 、PR 和 Her2m-RNA 表达 [J]. *第二军医大学学报*, 2013, 34(4): 453-457.
- [14] 弓自玉,熊兵红,马利. 荧光定量 PCR 技术检测乳腺癌患者外周血 EGFR mRNA 及 CK20 mRNA 表达的意义 [J]. *按摩与康复医学*, 2012, 3(2): 22-23.
- [15] 王卉,刘水逸,吴唐维,等. miR-21 在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌侵袭转移的影响 [J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(3): 186-190.
- [16] 张和平,郑艺. 高通量测序技术在乳制品研究中的应用 [J]. *中国食品学报*, 2015, 15(3): 1-7.
- [17] Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(10): 726-734.
- [18] Rothé F, Laes JF, Lambrechts D, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analyses in breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(10): 1959-1965.
- [19] Roy-Chowdhuri S, de Melo Gagliato D, Routbort MJ, et al. Multigene clinical mutational profiling of breast carcinoma using next-generation sequencing [J]. *Am J Clin Pathol*, 2015, 144(5): 713-721.
- [20] Ellis MJ, Ding L, Shen D, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition [J]. *Nature*, 2012, 486(7403): 353-360.

收稿日期: 2016-08-15; 修回日期: 2016-11-14