

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00453

运用实时荧光定量 RT-PCR 法检测乳腺癌组织中 $ER\alpha$ 、PR 和 $Her2$ mRNA 表达

陆慧琦¹, 何金², 陈佳¹, 徐毅², 祝丽双¹, 韩焕兴^{1*}

1. 第二军医大学长征医院转化医学中心, 上海 200003

2. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

[摘要] **目的** 评价实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)在测定乳腺癌组织中雌激素受体 α ($ER\alpha$)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体 2($Her2$)基因表达的临床价值。**方法** 选择 2010 年 3 月至 10 月在我院接受手术治疗的乳腺癌患者 48 例和乳腺良性病变患者 28 例,用免疫组化染色(IHC)法检测乳腺癌组织中 $ER\alpha$ 、PR、 $Her2$ 蛋白的表达,用实时 qRT-PCR 法检测乳腺癌组织及良性乳腺肿瘤组织中 $ER\alpha$ 、PR、 $Her2$ mRNA 的表达,并评价这两种检测方法在乳腺癌诊断中的价值。**结果** 用实时 qRT-PCR 测得的 $ER\alpha$ 、 $Her2$ mRNA 在乳腺癌组织中的表达均高于对照组织($P<0.05$, $P<0.01$),而 PR mRNA 的表达在乳腺癌组织与对照组织之间差异无统计学意义。乳腺癌组织中 $ER\alpha$ 、PR、 $Her2$ 的蛋白表达与临床 TNM 分期有关, $ER\alpha$ 和 PR 的阳性表达率随临床 TNM 分期的升高而下降($P<0.05$), $Her2$ 的阳性表达率随临床 TNM 分期的升高而升高($P<0.05$)。乳腺癌淋巴结转移组乳腺组织中 $ER\alpha$ 、 $Her2$ mRNA 表达均高于无淋巴结转移组($P<0.05$),而 PR mRNA 表达与无淋巴结转移组比较差异无统计学意义。实时 qRT-PCR 检测 $ER\alpha$ 、PR、 $Her2$ mRNA 在评价乳腺癌对内分泌治疗的敏感性、特异性以及病理学诊断的符合率均与 IHC 相符。**结论** $ER\alpha$ 、PR 和 $Her2$ 是预测乳腺癌内分泌治疗或靶向治疗的重要基因,本研究建立的实时 qRT-PCR 检测方法可用于 $ER\alpha$ 、PR 和 $Her2$ mRNA 表达的临床检测和研发。

[关键词] 乳腺肿瘤;雌激素受体 α ;孕激素受体;人表皮生长因子受体 2;实时荧光定量 RT-PCR;预后

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)04-0453-05

Real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction in detecting expression of $ER\alpha$, PR and $Her2$ mRNA in breast cancer tissues

LU Hui-qi¹, HE Jin², CHEN Jia¹, XU Yi², ZHU Li-shuang¹, HAN Huan-xing^{1*}

1. Center for Translational Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the clinical value of real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) in detecting expression of estrogen receptor alpha ($ER\alpha$), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 ($Her2$) genes in breast cancer tissues. **Methods** Totally 48 breast cancer tissues and 28 benign breast tumor tissues (control) were obtained from patients undergoing surgery in our hospital during Mar. 2010 and Oct. 2010. The expression of $ER\alpha$, PR and $Her2$ protein was examined by immunohistochemistry (IHC) in breast cancer tissues and the expression levels of $ER\alpha$, PR and $Her2$ mRNA were detected by real-time qRT-PCR in breast cancer tissues and benign breast tumor tissues. The values of these two methods in diagnosis of breast cancer were evaluated. **Results** The expressions of $ER\alpha$ and $Her2$ mRNA were significantly higher in the breast cancer tissues than in the controls ($P<0.05$, $P<0.01$), while the expression of PR mRNA had no significant difference between controls and breast cancer tissues. $ER\alpha$, PR and $Her2$ protein expressions were associated with the TNM stage of breast cancer, with the former two being negatively associated with TNM stages ($P<0.05$) and $Her2$ being positively associated with TNM stages ($P<0.05$). The expressions of $ER\alpha$ and $Her2$ mRNA were significantly higher in breast cancer tissues of patients with lymph node metastasis than in those

[收稿日期] 2012-11-18

[接受日期] 2013-01-11

[基金项目] 上海市科委基金(08411962100). Supported by Fund from Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (08411962100).

[作者简介] 陆慧琦,博士,助理研究员. E-mail: huiqilu2012@sohu.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871907, E-mail: hanhuanxing@sohu.com

without lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of *PR* mRNA was not significantly different in breast cancer tissues between patients with and without lymph node metastasis ($P > 0.05$). Real-time qRT-PCR in detecting *ER α* , *PR* and *Her2* mRNA expression had similar capability with IHC method in evaluating the sensitivity, specificity of endocrine therapy; moreover, the two methods also had a consistent pathological diagnosis rates ($P > 0.05$). **Conclusion** *ER α* , *PR* and *Her2* genes are important predictive markers for endocrine therapy or targeted therapy of breast cancer. Real-time qRT-PCR method can be used for clinical detection and research of *ER α* , *PR* and *Her2* mRNA.

[**Key words**] breast neoplasms; estrogen receptor alpha; progesterone receptor; human epidermal growth factor receptor 2; real-time fluorescent quantitative RT-PCR; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(4): 453-457]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,发病率逐年提高,并有年轻化趋势^[1]。迄今为止,有关乳腺癌的生物学特性仍未完全清楚,临床上对乳腺癌患者进行内分泌治疗和靶向治疗时,其乳腺癌组织中雌激素受体 α (*ER α*)、孕激素受体(*PR*)和人表皮生长因子受体2(*Her2*)基因的表达状态是其治疗的主要依据。免疫组织化学(IHC)是目前应用最广泛的检测方法,但其方法间接且检测过程受诸多因素干扰。本研究在前期建立的实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)检测 *ER α* 、*PR*、*Her2* mRNA 的技术平台^[2-3]基础上,应用实时 qRT-PCR 检测乳腺癌组织中 *ER α* 、*PR* 和 *Her2* 的表达,并对基因扩增技术与免疫组化技术的检测结果进行比较,评价实时 qRT-PCR 方法在乳腺癌诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 标本来源及临床资料 选择我院 2010 年 3 月至 10 月间接受手术治疗的乳腺癌及乳腺良性病变患者共 76 例,均经病理学确诊。其中乳腺癌患者 48 例,年龄 21~70 岁,平均(48.17±9.78)岁;临床 TNM 分期 I 期 9 例,II 期 19 例,III 期 13 例,IV 期 7 例;无淋巴结转移 34 例,有淋巴结转移 14 例;术前均未接受任何放射和化学治疗。乳腺良性病变患者 28 例,年龄 17~75 岁,平均(44.73±10.63)岁,作为对照组。手术后在原发灶取病理切片的同时,留取病灶组织(避开坏死、炎症部位)置-70℃备用。

1.2 主要试剂及仪器 细胞总 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司),SuperScript™ Platinum[®] 两步法定量 RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司),兔抗人 *ER α* 多克隆抗体、兔抗人 *PR* 多克隆抗体、兔抗人 *Her2* 多克隆抗体(丹麦 DAKO 公司),生物素-链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶试剂盒、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(北京达科为生物技术有限公司)。DU640 型紫外分光光度仪(美国

Backman 公司),ABI7500 荧光定量分析仪(美国 ABI 公司)。

1.3 IHC 法测定乳腺癌组织中 *ER α* 、*PR*、*Her2* 蛋白的表达 采用 EnVision 法,按照试剂盒说明书进行操作。*ER α* 、*PR* 和 *Her2* 抗体稀释浓度均为 1:2 000,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 IHC 评分标准 *ER α* 、*PR* 阳性细胞为核着色。0 级:无细胞核棕黄色染色或<5%的肿瘤细胞核呈较弱棕黄色染色;1 级:5%~30%的肿瘤细胞核呈弱棕黄色染色;2 级:31%~60%的肿瘤细胞核呈弱至中等棕黄色染色;3 级:>60%的肿瘤细胞核呈中至强棕黄色染色。*Her2* 阳性物质定位于细胞膜。0 级:无肿瘤细胞膜棕黄色染色或≤10%的肿瘤细胞膜呈较弱棕黄色染色;1 级:>10%的肿瘤细胞膜呈较弱棕黄色染色;2 级:>10%的肿瘤细胞膜呈完整的较弱至中等强度棕黄色染色;3 级:>10%的肿瘤细胞膜全层呈高强度棕黄色染色。

1.5 乳腺癌组织和对照乳腺组织中 *ER α* 、*PR* 和 *Her2* mRNA 的测定 将 48 例乳腺癌组织及 28 例良性病变组织的 cDNA 与不同稀释度的 *ER α* 、*PR*、*Her2* 和 β actin 定值品按文献^[2-3]中的反应体系和反应条件进行扩增。根据扩增曲线和标准曲线,计算出各标本的 *ER α* 、*PR* 和 *Her2* 基因表达的拷贝数,除以该标本总 RNA 量,即为单位质量的基因拷贝数(copy/ μ g RNA)。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。乳腺癌组织中 *ER α* 、*PR*、*Her2* mRNA 的表达与患者临床病理特征之间的关系分析采用 χ^2 检验,组间比较分析采用 Mann-Whitney *U* 非参数检验,相关性分析采用 Spearman 相关分析方法。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 IHC 测定乳腺癌组织中 *ER α* 、*PR*、*Her2* 蛋白

的表达 ER α 、PR 阳性表达为细胞核染色, Her2 阳性表达为细胞膜染色, 检测结果见表 1。48 例乳腺癌组织中 ER α 、PR、Her2 蛋白的阳性率分别为 58.3% (28/48)、60.4% (29/48)、41.7% (20/48)。ER α 的阳性表达随临床 TNM 分期的升高而下降 ($P < 0.05$), 且与淋巴结转移呈负相关 ($r = -0.524$,

$P = 0.027$)。PR 的阳性表达与 ER α 的阳性表达呈正相关 ($r = 0.776$, $P < 0.01$)。Her2 的阳性表达随临床 TNM 分期的升高而升高 ($P < 0.05$), 且与淋巴结转移呈正相关 ($r = 0.629$, $P = 0.031$), 与 ER α 、PR 的阳性表达呈负相关 (r 值分别为 -0.546 和 -0.438 , P 值分别为 0.031 和 0.044)。

表 1 乳腺癌组织中 ER α 、PR 和 Her2 蛋白表达Tab 1 Expression of ER α , PR and Her2 protein in breast cancer tissues

Group	N	ER α (+)	PR (+)	Her2 (+)	n(%)
TNM stage					
I	9	7(77.8)	6(66.7)	2(22.2)	
II + III	32	19(59.4) * Δ	20(62.5) Δ	13(40.6) * Δ	
IV	7	2(28.6) *	3(42.9) *	5(71.4) *	
Lymph node metastasis					
Yes	14	6(42.9) \blacktriangle	7(50.0)	9(64.3) \blacktriangle	
No	34	22(64.7)	22(64.7)	11(32.4)	

ER α : Estrogen receptor alpha; PR: Progesterone receptor; Her2: Human epidermal growth factor receptor 2. * $P < 0.05$ vs TNM stage I; $\Delta P < 0.05$ vs TNM stage IV; $\blacktriangle P < 0.05$ vs non-lymph nodes metastasis

2.2 乳腺癌组织和对照乳腺组织中 ER α 、PR 和 Her2 mRNA 的表达 ER α mRNA 和 Her2 mRNA 在乳腺癌组织中的表达均高于对照乳腺组织 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 有淋巴结转移者的表达高于

无淋巴结转移者 ($P < 0.05$)。PR mRNA 在乳腺癌组织中的表达与对照乳腺组织比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 且与是否有淋巴结转移无关 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 乳腺癌组织和对照乳腺组织中 ER α 、PR、Her2 mRNA 定量测定结果Tab 2 Quantitative results of ER α , PR and Her2 mRNA expression in breast cancer tissues and control tissues

Group	n	ER α mRNA	PR mRNA	Her2 mRNA	copies $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ RNA, median (95% CI)
Carcinoma tissue	48	6.76×10^5 * (4.17×10^5 , 9.34×10^5)	1.02×10^6 (6.81×10^5 , 1.36×10^6)	2.92×10^6 * * (9.15×10^5 , 4.91×10^6)	
Lymph node metastasis	14	1.12×10^6 Δ (2.63×10^5 , 1.98×10^6)	1.68×10^6 (4.33×10^5 , 2.93×10^6)	6.83×10^6 Δ (-2.81×10^5 , 1.65×10^7)	
Non-lymph node metastasis	34	7.1×10^5 (2.31×10^5 , 1.12×10^6)	7.95×10^5 (1.32×10^5 , 1.46×10^6)	1.93×10^6 (-4.43×10^5 , 4.31×10^6)	
Control	28	1.54×10^5 (1.02×10^5 , 2.06×10^5)	4.93×10^5 (3.21×10^5 , 6.65×10^5)	3.76×10^5 (2.10×10^5 , 5.42×10^5)	

ER α : Estrogen receptor alpha; PR: Progesterone receptor; Her2: Human epidermal growth factor receptor 2; * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs non-lymph nodes metastasis

2.3 IHC 与实时 qRT-PCR 检测 ER α 、PR 和 Her2 表达对乳腺癌诊断的性能评价 应用实时 qRT-PCR 法于 ROC 曲线上确定 ER α 、PR 和 Her2 mRNA 在乳腺癌组织的临界值分别为 2.74×10^5 、 5.54×10^5 和 3.1×10^5 copies/ μg RNA, 曲线下面积

(AUC) 分别为 0.685、0.569 和 0.765 (图 1)。乳腺癌组织中 ER α 、PR 和 Her2 mRNA 水平的敏感性、特异性及病理学诊断的符合率均与 IHC 检测结果相符, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 3)。

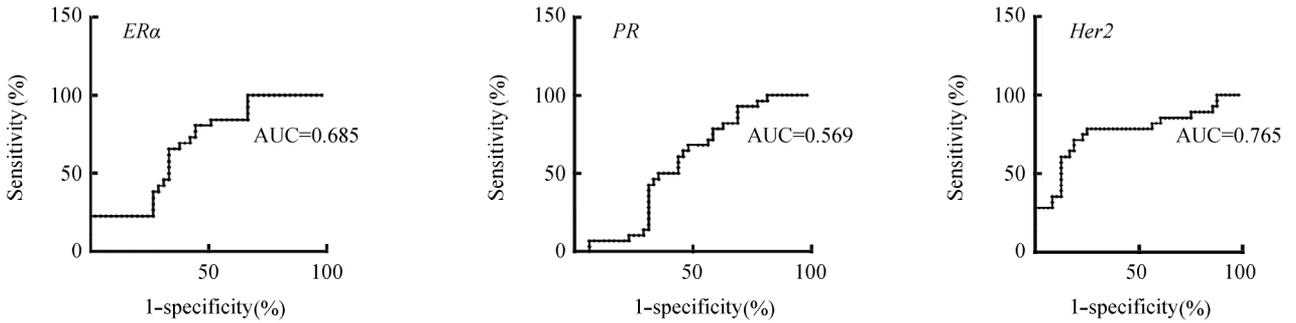


图 1 乳腺癌组织中 ER α 、PR 和 Her2 mRNA 的 ROC 曲线

Fig 1 ROC curves for the ER α , PR and Her2 mRNA in breast cancer tissues

ER α : Estrogen receptor alpha; PR: Progesterone receptor; Her2: Human epidermal growth factor receptor 2; ROC: Receiver operating characteristic

表 3 IHC 和实时 qRT-PCR 测定 ER α 、PR、Her2 对乳腺癌治疗的评价性能

Tab 3 Efficiencies of IHC and real-time qRT-PCR in detecting ER α , PR and Her2 expression for evaluating breast cancer therapy

Item	IHC			Real-time qRT-PCR			%
	ER α protein	PR protein	Her2 protein	ER α mRNA	PR mRNA	Her2 mRNA	
Sensitivity	80.3	68.6	68.7	80.8	72.9	72.7	
Specificity	55.6	52.1	79.2	70.0	70.0	83.5	
Conformity	81.3	75.0	86.3	86.7	83.3	91.2	

IHC: Immunohistochemistry; qRT-PCR: Fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; ER α : Estrogen receptor alpha; PR: Progesterone receptor; Her2: Human epidermal growth factor receptor 2

3 讨论

乳腺癌是一种高发的恶性肿瘤,乳腺上皮癌变后,细胞可以部分或全部保留表达性激素受体的能力,肿瘤细胞的生长仍然依赖于原有的激素环境调节,因此乳腺癌是一种激素依赖性肿瘤^[4]。Arpino 等^[5]报道约 60%~70%的乳腺癌患者的癌细胞中有雌激素受体的高表达,而约 30%~40%乳腺癌患者的肿瘤细胞则丧失了性激素受体的表达,后者的生长、增殖与机体内性激素水平无明显关系,临床上对内分泌治疗不敏感,这类肿瘤则称为非激素依赖性肿瘤^[4]。因此,对于仍然受激素调节的肿瘤来讲,肿瘤细胞内激素受体的含量就被视为预测内内分泌治疗效果及判断预后的指征。随着对激素受体结构功能的深入研究及检测方法的不断完善,目前激素受体检测的临床价值越来越受到重视。

在本研究中,研究对象的 ER α 阳性率为 58.3% (28/48),其表达随乳腺癌的临床 TNM 分期的升高而下降 ($P < 0.05$),与淋巴结转移呈负相关

($r = -0.524, P = 0.027$),与 PR 的阳性表达呈正相关($r = 0.776, P < 0.01$),与文献^[5]报道一致。PR 和 Her2 的阳性率分别为 60.4% (29/48) 和 41.7% (20/48),与文献^[6-7]报道相符。Her2 的阳性表达随临床 TNM 分期的升高而升高 ($P < 0.05$),与淋巴结转移呈正相关($r = 0.629, P = 0.031$)。ER α mRNA ($P < 0.05$) 和 Her2 mRNA ($P < 0.01$) 在乳腺癌组织中的表达高于对照组织;PR mRNA 在癌组织中的表达与对照组织比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。使用实时 qRT-PCR 法于 ROC 曲线上确定 ER α 、PR 和 Her2 mRNA 水平的检测临界值,得到曲线下面积(AUC)分别为 0.685、0.569 和 0.765, AUC 在 0.5~0.7 时有较低准确性, AUC 在 0.7~0.9 时则有一定准确性。今后我们将优化检测方法,扩大样本的检测量,以获得更为准确的检测临界值。

IHC 是目前使用最广泛的检测肿瘤标记物的方法,但方法间接且检测过程受许多因素干扰,缺乏统一的检测程序和验证手段。我们意识到 IHC 结果

不可避免地存在室内和室间的差异,对有效的外部质量保证体系的需求必然会对传统的 IHC 方法产生冲击,严格的质量控制不仅应该用于研究中,同样也应运用于实验室检测中。因此,我们建立了定量测定 *ER α* 、*PR* 和 *Her2* mRNA 的实时 qRT-PCR 法,并分析了其与 IHC 检测结果的相关性。实验结果显示二者在检测敏感性、特异性及病理学诊断的符合率方面均相符,差异无统计学意义($P>0.05$)。实时 qRT-PCR 作为基因表达的常规检测手段,操作相对简单,克服了 IHC 人为因素较多的缺陷,其突出优势是测定的结果可量化,具有一定的应用价值。

在目前条件下尚无法甄别将会发生转移的疾病个体,只能通过转移风险(即辅助治疗的必要性评估)的评估界定需要进行系统治疗的人群。因此,风险评估在原发性乳腺癌的系统性辅助治疗决策中起着决定性作用。在 2005 年的第九届国际乳腺癌会议上,专家指出肿瘤病灶的病理检查结果、组织病理分级、脉管癌栓、*Her2* 表达是衡量复发风险的基本要素^[8]。与评估风险同样重要的是与选择治疗手段密切相关的疾病分类。激素受体已经不再作为风险评估指标,而作为辅助性内分泌治疗指标,激素受体阴性或阳性的检查结果也已经不能满足选择治疗方法的需要^[9]。由于现有的复发风险评估标准导致近 50% 的过度治疗,风险评估标准已经成为乳腺癌个体化治疗研究的重要内容之一。因此,*Her2* 基因扩增情况不但用于评估风险,同时还作为选择曲妥单抗(赫赛汀)进行靶向治疗的标准^[10-11]。虽然应用 IHC 方法检查 *ER α* 、*PR* 和 *Her2* 蛋白的过表达情况也可用于治疗对象的选择,但目前荧光原位杂交(FISH)仍然是标准方法。为解决 FISH 方法检测成本高的问题,我们建立了实时 qRT-PCR 法定量测定 *ER α* 、*PR* 和 *Her2* mRNA,该方法灵敏度、稳定性、重现性好^[2-3],用 ROC 曲线确定 *ER α* 、*PR* 和 *Her2* mRNA 在乳腺癌组织中的临界值分别为 2.74×10^5 、 5.54×10^5 、 3.1×10^5 copies/ μg RNA,在此临界值下,三者的敏感性、特异性及与激素或靶向治疗疗效的临床符合率均较好,与 IHC 方法相比差异无统计学意义($P>0.05$)。因此采用实时 qRT-PCR 方法联合检测 *ER α* 、*PR* 和 *Her2* 等指标,可为临床对乳腺癌患者术后选择合理治疗方案、制定治疗措施提供依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Sunpaweravong S, Sunpaweravong P. Recent developments in critical genes in the molecular biology of breast cancer[J]. *Asian J Surg*, 2005, 28: 71-75.
- [2] 陆慧琦, 耿红莲, 孙静, 徐毅, 韩焕兴. *Her2/neu* 基因定量检测方法的建立[J]. *现代检验医学杂志*, 2008, 23: 11-14.
- [3] 叶伟民, 何金, 何铭珺, 杨洁, 徐毅, 陆慧琦. 乳腺癌组织中 *ER α* mRNA 和 *PR* mRNA 检测方法的建立和应用[J]. *现代免疫学*, 2012, 32: 412-416.
- [4] Payne S J, Bowen R L, Jones J L, Wells C A. Predictive markers in breast cancer: the present[J]. *Histopathology*, 2008, 52: 82-90.
- [5] Arpino G, Weiss H, Lee A V, Schiff R, De Placido S, Osborne C K, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97: 1254-1261.
- [6] 任秋华, 肖明明, 侯慧, 郑静. *ER*、*PR*、*CerbB-2*、*p53* 和 *Ki67* 蛋白在乳腺癌中的表达及其意义[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2010, 17: 13-18.
- [7] 孙荔, 徐迎春, 张凤春. 乳腺癌组织雌激素和孕激素受体及 *c-erbB-2* 的表达[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2007, 27: 713-715.
- [8] Proceedings of the 9th International Conference on Primary Therapy of Early Breast Cancer. January 26-29, 2005[J]. *Breast*, 2005, 14: 427-642.
- [9] Goldhirsch A, Glick J H, Gelber R D, Coates A S, Thürlimann B, Senn H J, et al. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005[J]. *Ann Oncol*, 2005, 16: 1569-1583.
- [10] Goel S, Chirgwin J, Francis P, Stuart-Harris R, Dewar J, Mileskin L, et al. Rational use of trastuzumab in metastatic and locally advanced breast cancer: implications of recent research[J]. *Breast*, 2011, 20: 101-110.
- [11] Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C, et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 1059-1065.