[13] Moore R G,Brown AK,Miller MC,et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol,2008,108(2):402-408.

[14] Havrilesky LJ,Whitehead CM,Rubatt JM,et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence[J]. Gynecol Oncol,2008,110(3):374-382.

[15] 卢仁泉,郭林,沈烨红. HE4 在卵巢癌诊治中的临床应用评价[J]. 中国癌症杂志,2010,20(9):680-685.

[16] Macuks R,Baidekalna I,Donina S. An ovarian cancer malignancy risk index composed of HE4,CA125,ultrasonographic score,and menopausal status:use in differentiation of ovarian cancers and benign lesions[J]. Tumor Biol,2012,33(5):1811-1817.

[17] 唐志坚,叶雪,昌晓红,等. 血清人附睾蛋白 4 在卵巢癌临床转归中的关系[J]. 中国妇产科临床杂志,2011,12(5):364-368.

[18] Anastasi E,Marchei G G,Viggiani V,et al. HE4:a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer[J]. Tumor Biol,2010,31(2):113-119.

[19] Plotti F,Capriglione S,Terranova C,et al. Does HE4 have a role as biomarker in the recurrence of ovarian cancer? [J]. Tumor Biol,2012,33(6):2117-2123.

[20] 程洪艳,刘亚南,叶雪,等. 血清人附睾蛋白 4(HE4)和 CA125 在卵巢癌患者手术及化疗前后的变化[J]. 中国妇产科临床杂志,2011,12(5):212-215.

[21] Iwahori K,Suzuki H,Kishi Y,et al. Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer[J]. Tumor Biol,2012,33(4):1141-1149.

(收稿日期:2013-01-30)

·综　　述·

肿瘤基因 EGFR 检测方法的研究进展*

周　泉 综述,李　艳△,童永清 审校

(武汉大学人民医院检验科,湖北武汉 430060)

关键词:EGFR;　突变;　检测方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.027　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1673-4130(2013)11-1407-03

表皮生长因子受体(EGFR)是一种受体酪氨酸激酶,其基因位于 7p12～14 区,含 28 个外显子,相对分子质量为 170×10^3,是一种跨膜糖蛋白,由 1 186 个氨基酸残基组成,广泛存在于人体中。在结构上分为 3 个区:细胞外配体结合区、跨膜区和细胞内酪氨酸激酶活性区。其中酪氨酸激酶活性区由 18～24 外显子编码,有 542 个氨基酸,并且有典型的 ATP 结合位点与酪氨酸激酶区,对细胞的增殖和分化有重要调节作用。EGFR 在与胞外配体特异性结合后改变其构象形成二聚体,激活酪氨酸激酶区。EGFR 活化后激活多条下游的信号转导通路介导细胞正常或异常生长。EGFR 诱导癌变至少通过 3 种机制:EGFR 基因突变活化、EGFR 基因扩增及 EGFR 蛋白过表达。其中 EGFR 基因突变活化是导致肿瘤细胞异常生物学行为最主要的因素。目前研究表明,在体外实验中,EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(TKI)对一系列肿瘤细胞株,如口腔癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、子宫癌、卵巢癌、非小细胞肺癌和结直肠癌的癌细胞系显示出明显的抑制作用,EGFR 突变是肿瘤患者是否对 EGFR-TKI 敏感的强预测因子。因此,检测 EGFR 基因突变对临床医生选择肿瘤药物具有重要的参考价值,现就 EGFR 检测方法的研究进展综述如下。

1　EGFR 蛋白免疫组化法检测

免疫组化技术从上世纪 40 年代出现,直至 90 年代才逐渐运用到分子生物学领域,近几年各种免疫组化技术更加成熟,成为当今生物医学研究的一项有力工具。EGFR 基因突变会导致 EGFR 蛋白高表达,诸如放射标记免疫法,竞争性免疫检测法,Western 印迹和免疫组化等方法均可检测 EGFR 蛋白的表达水平。大部分实验室采用间接免疫荧光法,通过细胞着色的强度和染色的细胞数量定量判断免疫组化结果,但是目前对于 EGFR 蛋白的表达水平能否预测 EGFR-TKI 的生存获益仍有争议[1]。

由于免疫组化方法因抗体类型与来源不同,以及所使用的评分系统的差异而导致结果差异,不同抗体可使结果范围从 12%变至 14%[2],故免疫组化法对于评价患者是否使用 EGFR-TKI 治疗并非最佳的手段[3]。

2　EGFR 基因突变检测

随着对肿瘤发生发展的深入探讨,医学研究已精确到分子水平,单一病理切片的形态学检查已经无法满足临床医生对不同患者确定相应诊疗方案和用药指导的需求,直接对 EGFR 基因进行检测成为确定肿瘤治疗药物的重要依据,如非小细胞型肺癌和膀胱癌等。对于 EGFR 基因突变的检测手段各种各样,介绍如下。

2.1　DNA 直接测序法　70 年代末 Frederick Sanger 发明双脱氧终止法手动测序之后,80 年代中期出现应用双脱氧终止法原理、使用荧光代替同位素及计算机图像识别的自动测序仪。2006 年,《Science》杂志发表题为“人类乳腺癌和结直肠癌共有编码序列”的论文[4],该文不仅对癌基因组图解计划得出有利的结论,也提供了宝贵的技术经验。它所发现的候选癌基因也为肿瘤的研究提供重要的线索,对于突变的检测起到重要的指导作用;此后,DNA 直接测序成为比显微镜下组织学检查更重要的项目[5]。

目前,DNA 直接测序法仍然是检测 EGFR 基因突变使用最多的方法,但需要获取肿瘤组织、分离肿瘤细胞、提取核酸并进行测序,所需的时间长,费用高,对于取材与技术的要求都很

*　基金项目:武汉大学人民医院国家临床重点专科建设项目(财社[2010]305 号)。　作者简介:周泉,女,在读硕士研究生,主要从事个体化医疗的分子诊断研究。　△　通讯作者,E-mail:yanlitf1120@163.com。

严格[6]，更为重要的是测序方法灵敏度不高，只能对含量大于10%的突变基因进行检测[7]。因此，DNA 直接测序法在临床应用中存在一定的限制，不适用于大量的临床样品分析。

2.2　聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)　PCR-SSCP 是一种检测基因突变的经典方法。单链构象多态性(SSCP)是指单链 DNA 由于链内碱基配对而具有一定空间构象，当碱基发生改变时，单链 DNA 会形成不同的构象。单链 DNA 分子的迁移率除与 DNA 长度有关外，更主要取决于 DNA 单链所形成的空间构象，相同长度的单链 DNA 因其顺序不同或单个碱基差异，导致形成的构象不同，在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中，不同构象的 DNA 分子具有不同的泳动速度。PCR 产物经变性后进行单链 DNA 凝胶电泳，有碱基插入、缺失或替代突变的单链就会出现不同的电泳条带。

有报道指出[8]，聚合酶链式反应-单链构象多态性分析能够检测出比 DNA 直接测序法更多的突变数，具有更高的灵敏度且成本更低。但其也有局限性：电泳时间较长，操作步骤比较繁琐，不能进行定量分析，受实验条件的影响较大，容易出现假阴性；检测小于 200 bp 的 PCR 产物时，突变检出率可达70%～95%，片段大于 400 bp 时，检出率仅为 50%左右。

2.3　实时荧光定量 PCR　实时荧光定量 PCR(RT-PCR)是近几年迅速发展的一种新技术，它完全脱离凝胶电泳技术，避免有毒操作且更加简便。该技术借助荧光信号来检测 PCR 产物，通过荧光染料或荧光标记的特异探针，对 PCR 产物进行标记跟踪，在扩增过程中，每经过一次循环，荧光定量 PCR 仪就会收集一次荧光信号，实时检测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板浓度进行定量分析。用荧光定量法检测目的基因并不需要检测突变基因组 DNA 具体含量，仅需检测样本是否具有扩增信号即可；并且 PCR 反应具有核酸扩增的高效性，可检测出微小突变。在实时荧光定量 PCR 中常用的探针有 Taqman 探针，PNA 探针，SYBR Green Ⅰ等。

目前，在实时荧光定量 PCR 的基础上，又出现一种新型方法——楔形探针扩增阻滞突变系统(Scorpions ARMS)，它是将 ARMS 与 Scorpions 实时 PCR 技术相结合的技术。其中探针扩增阻滞突变系统(ARMS)又名等位基因特异性 PCR(AS-PCR)，利用 Taq DNA 聚合酶缺少 3′→5′ 外切酶活性，PCR 引物的 3′端末位碱基必须与其模板 DNA 互补才能有效扩增的原理，针对不同的已知突变，设计适当的引物以检测出突变基因。该法在设计引物时，在引物 3′端设计一错配碱基，一个与野生 DNA 互补，1 个与突变 DNA 互补，使之仅能与突变型或野生型互补而只扩增突变型或野生型基因。而在楔形探针扩增阻滞突变系统里面所用探针为 Scorpions 探针，由一条发夹结构的探针和一条引物构成，由于该探针中序列特异性引物和探针在同一分子上，荧光信号产生相当快。有研究发现分别检测相同位点的突变情况楔形探针扩增阻滞突变系统检出率48%明显高于 DNA 直接测序法 38%[9-10]。

2.4　悬浮点阵技术　近年来在核酸和蛋白质研究领域出现一种全新的检测技术——悬浮点阵技术，又名液态生物芯片技术。它是以荧光编码的微球为核心，通过一束激光识别微球产生的特异性荧光，另一束激光识别微球表面发生的生物学反应后产生的荧光信号，荧光编码不同的微球实现检测指标的分类，通过生物学反应产生的荧光信号进行分析，检测特异度较高。

将该技术应用于 EGFR 突变检测中，通过待测突变片段与特异性探针(含有 TAG 标签序列)连接后与微球杂交液进行混合，微球杂交液中含有多种荧光编码微球，每种微球表面都有共价交联寡核苷酸探针，杂交过程中寡核苷酸探针特异性识别并结合连接产物上的 TAG 序列，形成微球-探针-连接产物-荧光素复合物。在连接片段与探针的时候，采用高特异性的多重连接酶检测反应(LDR)[11]，可一次同时准确检测 100 种不同的生物学指标，具有高通量和并行检测的特点。该技术应用于临床检测，还面临很多问题；在引物与 LDR 连接探针的设计上，难度比较大；该检测中分子杂交在悬浮溶液中进行，需考虑杂交反应条件对检测结果的影响。由于悬浮点阵技术具有高通量特点，适合用于临床实验室大规模样本的筛查。

2.5　基因扫描法　基因扫描法利用荧光标记引物的方式区分 PCR 产物的大小，只需要做一次常规 PCR 后进行毛细管电泳，使用基因扫描软件检测荧光信号即可得到结果，耗时短，步骤简单。在 2005 年，有国外研究机构应用基因扫描方法检测样本[12]。最近国内研究表明，基因扫描法可检出 1%的突变体，而 DNA 直接测序法仅为 10%。实验表明扫描法比测序法多检测约 5%的缺失突变，但是将发生缺失的样本稀释之后再检测，扫描法灵敏度低于直接测序法[13]。基因扫描法只能大致判断 EGFR 某个外显子缺失多少个碱基，不能准确判定缺失类型尤其是缺失和插入同时存在的类型；但作为一种初级筛查仍是快速有效的工具。

2.6　变性高效液相色谱技术(DHPLC)　DHPLC 技术最早建立于 1995 年，近年来发展迅速，由单链构象多态性 (SSCP)和变性梯度凝胶电泳 (DGGE)基础上发展起来的新杂合双链突变检测技术，可自动检测单碱基替代及小片段核苷酸的插入或缺失。该技术是根据受检 DNA 片段序列，经由特定软件分析选择维持一定的柱温，使受检 DNA 片段的双链达到部分变性，可被较低浓度的乙腈洗脱下来。由于错配的异源双链 DNA 与同源双链 DNA 的解链特征不同，在相同的部分变性条件下，异源双链 DNA 因有错配区的存在而更易变性，被色谱柱保留时间短于同源双链，从而在色谱图中表现为双峰或多峰的洗脱曲线；依据洗脱曲线可以直观分析判断结果[14]。与 DNA 直接测序法相比，该方法简单快速，3 min 即可完成一个样本的检测，但无法检测出同源突变和突变类型；且由于需要温度控制，对温度的要求很高，当有多个片段需要检测时，则需设置多个解链温度，增加工作量。

3　小　　结

目前，DNA 直接测序法仍然是进行基因突变检测的最直观和最准确的方法之一。它不仅能检测突变，而且能确定突变的位置，被认为是突变检测的金标准，但是 DNA 直接测序法操作过程复杂、所需时间长、费用高。其他方法尽管灵敏度和特异度有所提高，但只能针对 EGFR 基因的一些已知常见突变进行检测而无法检测未知突变。PCR-SSCP，基因扫描法和 DHPLC 虽然操作简单，但是只能提供样本有无突变的信息而无法得出具体的突变类型。

以上所有方法对组织的取材要求较高，需要较多的肿瘤组织细胞；特殊的检测方法如 DHPLC、RT-PCR 对于仪器设备的要求也不尽相同；在临床上推广十分困难。PCR-SSCP 尽管只能做定性分析，但是通过条件优化后，同基因扫描法与悬浮点阵技术一样，均可以作为突变初筛方法获得推广。

综上所述，根据目前国内外研究现状，迫切需要建立一种快速、可靠的检测 EGFR 基因突变的新方法，提高 EGFR 基因

突变的检测灵敏度,从而为临床合理使用 EGFR-TKI 提供依据,指导临床个性化用药。笔者比较以上所有方法的优缺点后,认为实时荧光定量 PCR 的方法检测 EGFR 突变比较适合临床应用。随着新技术的不断出现与成熟,实时荧光定量 PCR 在临床基因诊断中将会显示出无可比拟的优越性。

参考文献

[1] Hirsch FR,Varella-Garcia M,Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer[J]. Oncogene,2009,28(suppl 1):32-37.

[2] Buckley AF,Kakar S. Comparison of the Dako EGFR pharmDx kit and Zymed EGFR antibody for assessment of EGFR status in colorectal adenocarcinoma[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol,2007,15(3):305-309.

[3] Ciardiello F,Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment [J]. N Engl J Med,2008,358(11):1160-1174.

[4] Sjöblom T,Jones S,Wood LD,et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers[J]. Science,2006,314(5797):268-274.

[5] 田泽君,郭宁. 人类肿瘤基因组系统性突变分析带来的机遇[J]. 生物化学与生物物理进展,2007,34(3):236-239.

[6] 高云,陈嘉昌,朱振宇,等. EGFR 基因突变及其检测方法的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2011,3(1):51-57.

[7] Fan X,Furnari FB,Cavenee WK,et al. Non-isotopic sliver-stained SSCP is more sensitive than automated direct sequencing for the detection of PTEN mutations in a mixture of DNA extracted from normal and tumor cells[J]. Int J Oncol,2001,18(5):1023-1026.

[8] Marchetti A,Martella C,Felicioni L,et al. EGFR Mutations in non -small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment[J]. J Clin Oncol,2005,23(4): 857-865.

[9] Kimura H,Suminoe M,Kasahara K,et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to ge? tinib (IRESSA) [J]. Br J Cancer,2007,97(6): 778-784.

[10] Kimura H,Kasahara K,Kawaishi M,et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to ge? tinib in patients with non-small-cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res,2006,12(13): 3915-3921.

[11] 娄加陶,吴传勇,薛剑,等. 基于悬浮点阵技术的新型 EGFR 基因突变检测方法的建立和应用[J]. 上海交通大学学报(医学版),2011,31(3):284-289.

[12] Johnson BE,Jänne PA. Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res,2005,65(17):7525-7529.

[13] 黄迎,苏健,陈世良,等. 应用基因扫描方法快速检测 EGFR 基因 19 外显子缺失突变[J]. 实用医学杂志,2010,26(19):3471-3473.

[14] 蔡丹,叶韵斌,陈强,等. 变性高效液相色谱技术检测非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变的研究[J]. 肿瘤研究与临床,2010,22(9):595-597.

(收稿日期:2012-12-08)

· 综　　述 ·

MicroRNA 在肿瘤中的研究进展

苗晋华,杜叶平 综述,武春梅,尹莉莉 审校
(中国人民解放军二六四医院检验科,山西太原 030001)

关键词:miRNA;　肿瘤;　综述
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.028　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1673-4130(2013)11-1409-03

MicroRNA(miRNA)是一类长度大约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 小分子,调节基因表达和转录。从 1993 年发现首个 miRNA 起,它的功能特征和作用模式引起了几乎所有生物和生化领域学者的关注。miRNA 参与细胞增殖、分化、转移、凋亡等多种不同的进程。

miRNA 通过缺失、增殖、基因沉默、突变、作用于不同的转录因子等多种复杂机制在肿瘤的发生发展中扮演着至关重要的角色。研究表明,通过基因芯片和一些其他的方法,miRNA 可以将正常组织和癌组织区分开,而一些特异的 miRNA 已被发现与肿瘤的诊断和预后密切相关,在为肿瘤患者制订治疗方案过程中存在很大的潜能[1]。

1　miRNA 的结构特征

miRNA 的成熟过程可分为 3 个阶段,即 pri-miRNA 的转录、细胞核中生成 pre-miRNA、细胞质中形成成熟 miRNA,成熟的 miRNA 5′端有一磷酸基团,3′端为羟基,这一特点使它与大多数寡核苷酸和功能 RNA 的降解片段区别开来。它是含有茎环结构的 miRNA 前体,经过 Dicer 加工之后的一类非编码的小 RNA 分子。在细胞核内,编码 miRNA 的 DNA 转录成含约 1 000 个碱基的发夹样结构的 pri-miRNA。Pri-miRNA 在细胞核内经 RNaseⅢDrosha 加工释放发夹中间体——前体 miRNA(pre-miRNA)。Pre-miRNA 经过 Ran-GTP 依赖的转运蛋白 exportin 5 的作用,从细胞核转运至细胞质中,pre-miRNA 通过胞浆 RNaseⅢDicer 进行第二次加工,pre-miRNA 被剪切成 19～25 个核苷酸序列的双链 miRNA[2-3]。

2　miRNA 的功能

miRNA 在细胞的生长和发育的调节过程中起着多种作用,miRNA 在细胞周期循环、细胞分化及凋亡的基因调控中起到重要的作用。有研究表明,在人类基因组中超过 1000 多个 miRNA 调节着大约 60%的基因编码蛋白[4-5]。miRNA 在发挥作用之前,需要同细胞内一些协同因子结合形成蛋白质-RNA 复合物(miRNP),在 miRNP 的作用下指导其识别同源 mRNA。成熟的 miRNA 主要通过两种途径调节靶 mRNA 的

作者简介:苗晋华,女,主治医师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。