

胶质瘤表皮生长因子受体基因突变检测方法的对比研究

王 敏, 李兴涛(山东省莱芜市人民医院检验科 271100)

【摘要】 目的 分析普通聚合酶链式反应(PCR)联合直接测序法与实时聚合酶链式反应-高分辨率融解(qPCR-HRM)曲线分析技术对胶质瘤表皮生长因子受体(EGFR)基因突变的检测效果。**方法** 用普通 PCR 联合直接测序法与 qPCR-HRM 曲线分析技术检测胶质瘤患者 EGFR 基因突变类型,检测结果比较采用 χ^2 检验。**结果** 普通 PCR 联合直接测序法与 qPCR-HRM 曲线分析技术对胶质瘤患者肿瘤组织 EGFR 突变的检测结果一致性较高,达 90.91%,两者间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** qPCR-HRM 曲线分析技术操作较普通 PCR 联合直接测序法简便,实验时间较短,降低了交叉污染的风险,通过 HRM 曲线分析检测结果可以实现对样品基因型的判定。

【关键词】 普通聚合酶链式反应联合直接测序法; 实时聚合酶链式反应-高分辨率融解曲线分析技术; 胶质瘤; 表皮生长因子受体; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.15.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)15-1930-02

Comparative study of mutation detection method in glioma epidermal growth factor receptor gene WANG Min, LI Xing-tao (Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Laiwu City, Laiwu, Shandong 271100, China)

【Abstract】 Objective To analyse mutation detection effect of the ordinary PCR method with direct sequencing method and qPCR-HRM curve analysis technology on the detection of glioma epidermal growth factor receptor(EGFR) gene. **Methods** Ordinary PCR with sequencing method and qPCR-HRM curve analysis technical were used to detect EGFR gene mutation type in patients with glioma, the chi test was used for results comparison. **Results** The consistency of detection results was up to 90.91% between ordinary PCR with direct sequencing method and qPCR-HRM curve analysis technology on tumor tissue in patients with glioma EGFR mutation, the difference was statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** Compare to ordinary PCR with direct sequencing method, the operation of qPCR-HRM curve analysis technical might more simple, the experimental time might shorter, the risk of cross contamination might less, and its test results could identify the samples of genotype.

【Key words】 ordinary polymerase chain reaction and direct sequencing method; real-time polymerase chain reaction-high resolution melting curve analysis techniques; glioma; epidermal growth factor receptor; mutation

表皮生长因子受体(EGFR)在肿瘤细胞内的过度表达往往与肿瘤患者预后差、转移速度快、生存期短密切相关^[1-3]。目前,临床上研发出多种抑制 EGFR 的靶分子药物,通过阻断 EGFR 信号转导通路来抑制肿瘤细胞的生长^[4]。在对肿瘤患者进行靶向药物治疗方案实施前必须明确肿瘤组织内 EGFR 的基因型以优化肿瘤患者的个体治疗方案,同时避免不必要的化疗对患者造成的不良反应^[5]。对 EGFR 基因突变进行直接测序是临床常用的经典检测方法,但存在耗时、成本高等缺点。本文采用普通聚合酶链式反应(PCR)联合直接测序法与实时聚合酶链式反应-高分辨率融解(qPCR-HRM)曲线分析技术分别对 45 例胶质瘤患者的肿瘤组织样本进行 EGFR 基因突变检测,对比分析其检测准确性,评价其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院神经外科 2010 年 1 月至 2012 年 6 月收治的 45 例胶质瘤患者的肿瘤组织样本,其中男 25 例,女 20 例;年龄 14~79 岁,平均年龄为 49.3 岁。患者病程为 1 周至 9 年,平均病程为 38.5 周。所有患者均符合胶质瘤的临床诊断标准;根据世界卫生组织神经系统肿瘤分类及分级标准对胶质瘤患者进行分级,Ⅱ级淋巴瘤患者 13 例(28.89%)、Ⅲ级淋巴瘤患者 18 例(40.0%)、Ⅳ级淋巴瘤患者 14 例(31.11%)。45 例胶质瘤患者均为首诊病例,在手术前均未实施放疗与化疗等治疗措施。

1.2 方法 标本处理:手术后 30 min 内将切除的肿瘤组织冻存于液氮中,置于-80℃深低温冰箱保存。采用德国 QIAGEN 公司的基因组 DNA 抽提试剂盒对肿瘤组织标本中的基因组 DNA 进行抽提,操作步骤严格按照产品操作说明书进行。提取的基因组 DNA 在 SmartSpec 3000 分光光度计上对 DNA 纯度与浓度进行测定,将 DNA 浓度调整至 30 mg/L 后置于-80℃深低温冰箱保存备用。试剂与仪器:血液、组织样本基因组 DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司)、脱氧核糖核苷三磷酸 10 mmol/L(大连 TaKaRa 公司)、Hot Star 耐热 DNA 聚合酶(大连 TaKaRa 公司)、西班牙琼脂糖、异丙醇、无水乙醇(广州化学试剂厂)、SmartSpec 3000 分光光度计(美国 Bio-Rad 公司)、PTC-200 PCR 基因扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)、低温高速离心机(德国 SORVALL 公司)、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)、7000 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2.1 普通 PCR 联合直接测序法 引物设计:应用 Primer 5 软件对 EGFR 基因 19 号外显子区进行 PCR 引物设计,并由上海英骏公司合成。上游引物序列为:5'-TCC ATA GCC GGG AAC GTC GA-3';下游引物序列为:5'-ACA AGC TGT GCC AGA CGT TG-3'。普通 PCR 扩增:采用 50 μ L PCR 反应体系,具体配置比例为 5 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ L、脱氧核糖核苷三磷酸(10 mmol/L)1 μ L、Taq 酶 1 μ L、上游引物 1 μ L、下游引物 1

μL 、双蒸水(ddH_2O) $3\ \mu\text{L}$ 、模板 DNA $5\ \mu\text{L}$,共 $50\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $93\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $5\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$, $55\ ^\circ\text{C}$ 退火 $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $90\ \text{s}$, 共进行 35 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $10\ \text{min}$ 后 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。分析 PCR 反应扩增曲线图, 并将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。基因测序: 对所有 DNA 标本 EGFR 基因扩增产物进行直接基因测序, 确定 EGFR 基因类型, 由上海英骏公司完成。

1.2.2 qPCR-HRM 曲线分析技术 基因突变模型构建: 将上海英骏公司合成的已知突变类型的胶质瘤标本进行实时荧光定量 PCR 扩增, 采用 $20\ \mu\text{L}$ PCR 反应体系, 具体配置比例为 $2\times\text{EGFR}$ 反应混和液 $10\ \mu\text{L}$ 、阳性 DNA 或阴性对照 DNA ($30\ \text{mg/L}$) $1\ \mu\text{L}$ 、Hot-Star 耐热 DNA 聚合酶 $0.2\ \mu\text{L}$ 、 ddH_2O $8.8\ \mu\text{L}$ 。qPCR-HRM 反应条件为: $95\ ^\circ\text{C}$ 酶激活 $5\ \text{min}$; $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $10\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火 $15\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $25\ \text{s}$, 共进行 50 个循环 PCR 扩增; $95\ ^\circ\text{C}$ $1\ \text{min}$ 、 $40\ ^\circ\text{C}$ $1\ \text{min}$ 、 $65\ ^\circ\text{C}$ $1\ \text{s}$ 、 $95\ ^\circ\text{C}$ 进行熔解; 最后再 $40\ ^\circ\text{C}$ 进行冷却。分析数据: 分析 qPCR 运行的熔解曲线是否为单峰, 扩增单峰则满足扩增要求, 同时运用配置的分析软件对结果进行分析, 对比阴性对照, 确定 DNA 标本中是否存在 EGFR 基因位点突变。标本 DNA 突变类型分析: 所有标本 DNA 均按上述反应体系进行, 并应用分析软件对 EGFR 基因突变类型进行分析。

1.3 统计学处理 运用 SPSS13.0 统计软件对数据进行处理, 计量资料采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 普通 PCR 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳结果 见图 1。

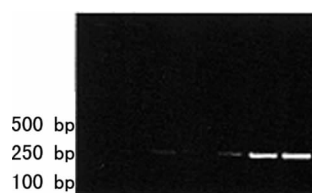


图 1 2% 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 分析普通 PCR 联合直接测序法对 EGFR 突变的检测情况, 45 例胶质瘤患者肿瘤组织 DNA 标本中共检出 EGFR 突变 10 例, 突变率为 22.22%, 其中 II 级肿瘤患者中, EGFR 突变 2 例 (15.38%); III 级患者 EGFR 突变 5 例 (27.78%); IV 级患者 EGFR 突变 3 例 (21.43%)。

2.3 qPCR-HRM 曲线分析技术检测 EGFR 突变结果显示, 45 例胶质瘤患者肿瘤组织 DNA 标本中共检出 EGFR 突变 11 例, 突变率为 24.44%, 其中 II 级肿瘤患者中, EGFR 突变 2 例 (15.38%); III 级患者 EGFR 突变 6 例 (33.33%); IV 级患者 EGFR 突变 3 例 (21.43%)。普通 PCR 联合直接测序法与 qPCR-HRM 曲线分析技术对胶质瘤患者肿瘤组织 EGFR 基因突变的检测结果一致性较高, 达 90.91%, 两者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

EGFR 在肿瘤细胞中的特殊信号转导能导致肿瘤细胞对放疗出现耐受现象, 而 EGFR 基因失活能使肿瘤细胞对放疗敏感^[6-8]。临床研究结果表明, EGFR19 号外显子发生突变的肿瘤患者对酪氨酸激酶抑制剂具有良好的反应性^[9]。因此, 检测并筛选肿瘤患者 EGFR 基因突变类型对选择分子靶向治疗药物具有重要意义。

检测 EGFR 基因突变的方法有酶切法、测序法、荧光定量 PCR 法、富集 PCR 法和 qPCR-HRM 曲线分析技术等^[10]。本文运用普通 PCR 联合直接测序法与 qPCR-HRM 曲线分析技术对胶质瘤患者 EGFR19 号外显子突变情况进行检测, 比较 2 种方法检测结果的一致性。普通 PCR 联合直接测序法对 EGFR 突变的检测结果显示, 45 例胶质瘤患者肿瘤组织 DNA 标本中共检出 EGFR 突变 10 例, 突变率为 22.22%; 而采用 qPCR-HRM 曲线分析技术对 EGFR 突变进行检测, 45 例胶质瘤患者肿瘤组织 DNA 标本中共检出 EGFR 突变 11 例, 突变率为 24.44%。2 种检测方法对胶质瘤患者肿瘤组织 EGFR 突变的检测结果一致性较高, 达 90.91%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

直接测序法是基因突变检测的金标准, 但需要特殊而昂贵的仪器, 存在检测耗时较长、操作繁琐、结果判定过程复杂、对操作者与环境存在一定危害等缺点。qPCR-HRM 曲线分析技术主要根据 DNA 序列的长度、鸟嘌呤与胞嘧啶含量以及碱基互补差异, 采用 HRM 曲线对 DNA 样品进行分析, 精确分辨单个碱基的差异。

本文研究结果表明, 普通 PCR 联合直接测序法与 qPCR-HRM 曲线分析技术对胶质瘤患者 DNA 标本 EGFR 基因突变的检测结果较为一致。qPCR-HRM 曲线分析技术操作较普通 PCR 联合直接测序法简便, 实验时间较短, 降低了交叉污染的风险, 通过 HRM 曲线分析检测结果可以实现对样品基因型的判定。

参考文献

- [1] 谷化平, 尚培中. 半乳糖凝集素-3 和表皮生长因子受体蛋白表达与老年胃癌转移和预后的关系[J]. 解放军医药杂志, 2012, 24(3): 21-24.
- [2] 廖刚, 王子卫, 张能, 等. 人表皮生长因子受体显性负性突变体对胃癌细胞体外侵袭转移能力的抑制作用[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(7): 574-578.
- [3] 梅琳琳, 岳天孚, 王雅莉, 等. 人表皮生长因子受体 2 在卵巢上皮性癌组织中的过表达及其预后价值[J]. 中国实用医刊, 2010, 37(15): 150-152.
- [4] 冯昌怡, 施纯玫, 陈强. 表皮生长因子受体抑制剂耐药机制的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(11): 1626-1630.
- [5] 车德海, 田强, 曹京燕, 等. DNA 直接测序技术检测 EGFR 基因突变指导厄洛替尼一线治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(10): 2009-2013.
- [6] 何景扬, 林瑞嵩. 恶性胶质瘤手术后放疗的临床疗效及预后影响因素[J]. 中外医学研究, 2012, 10(21): 26-27.
- [7] 陈志朋, 王德林. 肿瘤分子靶向治疗药物的临床应用研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2012, 21(2): 186-188.
- [8] 乐露露, 傅芬. EGFR 介导的信号转导通路相关基因突变与卵巢癌发病的关系及其靶向治疗研究进展[J]. 山东医药, 2011, 51(30): 113-114.
- [9] 魏恩焱, 陈虹. EGFR 抑制剂耐药机制的研究进展及治疗策略[J]. 当代医学, 2012, 18(4): 14-16.
- [10] 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.