

学校编码: 10384

分类号__密级__

学号: 30520101152489

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

新型环状引物实时荧光定量 PCR 检测乳腺癌 HER2
基因 mRNA 表达水平方法的建立

Establishment of ring primers real-time PCR for
quantification of the mRNA expression levels of HER2 gene

李 怡

指导教师姓名: 郑立谋 教授 曾骥孟 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2013 年 月 日

论文答辩时间: 2013 年 月 日

学位授予日期: 2013 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 前言.....	5
第一节 乳腺癌与人表皮生长因子受体 2 基因的概述.....	5
1.1 乳腺癌的研究背景.....	5
1.2 乳腺癌 HER2 基因检测的临床意义.....	5
第二节 乳腺癌 HER2 基因检测的方法.....	8
2.1 目前临床用于检测 HER2 基因的方法.....	8
2.2 新型 HER2 基因检测方法.....	9
第三节 实时荧光定量 PCR 技术和新型环状引物技术.....	11
3.1 实时荧光定量 PCR 技术.....	11
3.2 新型环形引物技术.....	11
第四节 本论文研究内容.....	13
第二章 乳腺癌六种候选内参基因的稳定性研究.....	14
第一节 引言.....	14
第二节 材料与方法.....	16
2.1 主要仪器、试剂盒及主要试剂的配制.....	16
2.2 乳腺癌组织样本.....	17
2.3 样本 RNA 提取和 cDNA 模板第一链的合成.....	17
2.4 候选内参基因实时荧光定量 PCR 特异性引物的设计.....	18
2.5 候选内参基因引物特异性检测.....	19
2.6 数据分析.....	21
第三节 结果与分析.....	22
3.1 乳腺癌组织样本总 RNA 提取.....	22
3.2 候选内参基因引物特异性检测.....	22
3.3 候选内参基因表达稳定性评价.....	23
第四节 讨论.....	25

第三章 新型环状引物实时荧光定量 PCR 检测 HER2 基因 mRNA 表达水平方法的建立	26
第一节 引言	26
第二节 材料与方法	27
2.1 主要仪器、试剂盒及主要试剂的配制.....	27
2.2 乳腺癌组织样本.....	28
2.3 细胞株.....	28
2.4 RNA 提取和 cDNA 模板第一链的合成.....	28
2.5 HER2 基因和 RPL37A 基因的克隆.....	30
2.6 质粒提取.....	35
2.7 HER2 基因和 RPL37A 基因特异性环状的设计.....	36
2.8 HER2 基因和 RPL37A 基因环状引物特异性检测.....	37
2.9 实时荧光定量 PCR 反应体系的优化.....	39
2.10 实时荧光定量 PCR 法标准曲线的绘制和灵敏度分析.....	40
2.11 实时荧光定量 PCR 法稳定性分析.....	40
2.12 荧光定量 PCR 法模拟实验.....	41
2.13 临床样本的检测.....	41
2.14 数据分析.....	41
第三节 结果与分析	42
3.1 细胞株总 RNA 提取.....	42
3.2 HER2 基因和 RPL37A 基因的克隆.....	42
3.3 HER2 基因和 RPL37A 基因环状引物特异性检测.....	43
3.4 实时荧光定量 PCR 反应体系的优化.....	44
3.5 实时荧光定量 PCR 法标准曲线的绘制和灵敏度分析.....	45
3.6 实时荧光定量 PCR 法稳定性分析.....	46
3.7 实时荧光定量 PCR 法模拟实验.....	46
3.8 临床样本的检测.....	46
第四节 讨论	48
参考文献	50

硕士期间发表的交流文章.....	56
致谢.....	57
附录.....	58

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	3
Chapter I Introduction	5
Section I Background of breast cancer & HER2 gene	5
1.1 Background of breast cancer.....	5
1.2 Clinical significance of HER2 gene in breast cancer.....	5
Section II Methods of HER2 gene detection	8
2.1 Current assays of HER2 gene detection in clinical.....	8
2.2 Assays of HER2 gene detection.....	9
Section III Real-time PCR & ring primers technology	11
3.1 Real-time PCR technology.....	11
3.2 Ring primers technology.....	11
Section IV Research contents of this dissertation	13
Chapter II Studies on the stability of six candidate reference genes	14
Section I Introduction	14
Section II Materials and Methods	16
2.1 Reagents preparation.....	16
2.2 Breast cancer tissue samples.....	17
2.3 RNA extraction and cDNA synthesis.....	17
2.4 Primers design of candidate reference genes.....	18
2.5 Specificity evaluation of primers of candidate reference genes.....	19
2.6 Data analysis.....	21
Section III Results and discussion	22
3.1 RNA extraction of breast cancer tissue samples.....	22
3.2 Specificity evaluation of primers of candidate reference genes.....	22
3.3 Stability of six candidate reference genes.....	23

SectionIV Discussion	25
ChapterIII Establishment of ring primers qPCR assay	26
Section I Introduction	26
Section II Materials and Methods	27
2.1 Reagents preparation.....	27
2.2 Breast cancer tissue samples.....	28
2.3 Cell lines.....	28
2.4 RNA extraction and cDNA synthesis.....	28
2.5 Molecular clone of HER2 and RPL37A gene.....	30
2.6 Plasmid extraction.....	35
2.7 Ring primers design of HER2 and RPL37A gene.....	36
2.8 Specificity evaluation of ring primers.....	37
2.9 Optimization of qPCR system.....	39
2.10 Standard curve and sensitivity analysis.....	40
2.11 Reproducibility analysis.....	40
2.12 Simulation experiments.....	41
2.13 Detection of clinical samples.....	41
2.14 Data analysis.....	41
SectionIII Results and discussion	42
3.1 RNA extraction of cell lines.....	42
3.2 Molecular clone of HER2 and RPL37A gene.....	42
3.3 Ring primers specificity evaluation.....	43
3.4 Optimization of qPCR system.....	44
3.5 Standard curve and sensitivity analysis.....	45
3.6 Stability analysis.....	46
3.7 Simulation experiments.....	46
3.8 Detection of clinical samples.....	46
SectionIV Discussion	48
References	50

Published articles	56
Acknowledgement	57
Appendix	58

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

本论文基于实时荧光定量 PCR 技术和环状引物技术，建立了一种乳腺癌 HER2 基因 mRNA 表达水平的环状引物 Eva Green 染料实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法。目前临床上用于检测 HER2 基因表达水平的方法都存在一些不足，且耗时（至少需要 1~3 天的时间），不利于临床诊断和治疗。因此，临床上迫切需要一种能够快速准确、简捷价廉且易于标准化的检测乳腺癌 HER2 基因表达水平的方法。

第一章，综述乳腺癌研究的发展过程与人表皮生长因子受体2 (Human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 基因的相关背景知识；介绍现有检测方法各自优缺点；介绍实时荧光定量PCR 技术的发展过程、原理和环状引物的技术要点。最后，我们提出探索一种新型HER2基因mRNA表达水平检测方法，即环状引物Eva Green染料实时荧光定量PCR (qPCR) 法的思路。

第二章，通过文献筛查和资料检索，选择了6个可能在乳腺癌组织中稳定表达的基因 β 肌动蛋白 (ACTB)、重组人钙调素-2 (CALM2)、 β -葡萄糖醛酸酶 (GUSB)、核糖体蛋白L37a (RPL37A)、转运铁蛋白受体 (TFRC)、TATA盒结合蛋白 (TBP) 作为候选内参基因，综合了geNorm、NormFinder和BestKeeper三种内参基因稳定性评估软件的分析结果，选择出最适合用于乳腺癌HER2基因 mRNA表达水平定量的内参基因。

第三章，基于实时荧光定量PCR技术和新型环状引物技术，建立了一种检测乳腺癌HER2基因mRNA表达水平的新型环状引物Eva Green染料实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法。首先，设计HER2基因和内参基因特异性环状引物，用以提高引物的特异性；其次是应用实验室已成熟的实时荧光定量PCR检测体系，通过对多个反应条件进行考察、优化，最终建立标准的qPCR检测体系；再次，对自建qPCR方法的灵敏度、特异性、稳定性进行评价；最后，用自建qPCR方法与免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC) 法平行检测2008至2012年厦门大学附属中山医院普外科收集的55份乳腺癌组织和其中32份同一患者匹配的正常组织（距癌组织 $\geq 5\text{cm}$ ）中HER2基因mRNA的表达水平，并评价自建qPCR方法对乳腺癌HER2基因mRNA表达水平的检测效能。

环状引物 Eva Green 染料实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法，具有高灵

敏度、高特异性的特点，且操作简单、成本低廉，是一种易于在临床诊断推广和应用的 HER2 基因 mRNA 表达水平检测方法。

关键词：乳腺癌；人表皮生长因子受体 2；环状引物；聚合酶链反应

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Current clinical assays for detection of mRNA expression levels of HER2 gene require at least 1 to 3 days to be completed due to methodological reasons which are not conducive to clinical diagnosis and treatment. Therefore, there is an urgent need in the clinical diagnosis to establish a simple, accurate, cost-effective and easily standardized quantitative assay for quantification of HER2 mRNA. This paper developed a method for quantification of the mRNA expression levels of HER2 gene based on the real-time PCR and ring primers technology.

In chapter 1, the discovery and the development of related research of breast cancer and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) gene were reviewed. We also have summarized relevant background of current clinical assays for detection of mRNA expression levels of HER2 gene include their advantages and disadvantages, real-time PCR and ring primers technology; Finally, we proposed a novel HER2 gene mRNA expression levels detection technology (ring primers real-time PCR).

In chapter 2, six candidate reference genes through literatures were selected include beta-actin (ACTB), recombinant human calmodulin-2 (CALM2), beta-glucuronidase (GUSB), ribosomal protein L37a (RPL37A), transferrin receptor (TFRC) and TATA-box binding protein (TBP) and combined the results of three reference gene stability assessment softwares (geNorm, NormFinder and BestKeeper) to select out the optimal reference gene for HER2 gene mRNA expression quantitative in breast cancer.

In chapter 3, based on real-time PCR and ring primers technology, we developed a novel detection assay. Firstly we designed gene-specific ring primers to improve the specificity of the primers and optimized several reaction conditions for achieving optimal detection system. Then the sensitivity, specificity and reproducibility of the method were evaluated. Finally 87 specimens including 55 breast cancer tissues and 32 normal tissues were detected by real-time PCR (qPCR) and immunohistochemistry (IHC) to evaluate the performance of qPCR method for the detection of HER2 gene mRNA expression in breast cancer.

The assay we developed can quantify the mRNA expression levels of HER2 gene rapidly and cost-effective with high sensitivity and specificity, it can be applied to clinical molecular diagnosis with attractive prospect.

Key words: Breast cancer; Human epidermal growth factor receptor-2; Ring primers; Polymerase chain reaction

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

第一节 乳腺癌与人表皮生长因子受体 2 基因的概述

1.1 乳腺癌的研究背景

乳腺癌是女性最常见的肿瘤，是导致患癌妇女死亡的首要原因，其发病率占全部女性恶性肿瘤的 16%。它的发病常与遗传有关，据流行病学调查发现，5%~10%的乳腺癌具有家族性遗传的特性。近年来乳腺癌的发病率在全世界范围内均有上升的趋势，据资料统计，仅 2008 年全球新增乳腺癌患者 1,380,000 人次，占女性恶性肿瘤患者的 23%，因乳腺癌死亡人数就高达 458,400 人次，占女性恶性肿瘤死亡人数的 14%，其中约有 1/2 新增病例和 60%死亡病例来自于发展中国家^[1]。我国女性乳腺癌的发病率正在以每年 3%~4%的增长率急剧上升，即平均每年约有 200,000 人次新增乳腺癌患者。Yang 等^[2]根据全国肿瘤死亡率监测资料预测，我国女性乳腺癌的发病率将从 2000 年的 19.9/100,000 上升到 2005 年的 24.8/100,000。近年来的研究也发现，我国女性乳腺癌的发病年龄正逐渐趋于年轻化，约 40%的患者在 40~49 岁之间被诊断为乳腺癌，因此这部分患者可能在治疗过程中经历绝经过程，这一特点与欧美国家 2/3 以上患者发病时已绝经形成了鲜明对比，2011 年由中国癌症基金会发起的中国首个大规模乳腺癌流行病学调研项目——“中国乳腺癌流行病学调研项目”发布的整体调研结果显示，我国女性乳腺癌病人发病的中位年龄为 48 岁，比西方提早了 10 年。因此，对于乳腺癌的早期诊断、预防、复发监测、预后判断等研究对于我国乃至全球女性的生命健康均具有非常重要的意义^[3]。

1.2 乳腺癌 HER2 基因检测的临床意义

HER2 是原癌基因人类表皮生长因子受体 2 (Human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 基因，也叫 c-erbB-2 基因，定位于染色体 17q12-17q21 上，编码相对分子质量为 185kDa 的跨膜受体样蛋白，具有跨膜酪氨酸激酶活性的生长因子受体，由胞外区 (Extracellular domain, ECD)、跨膜区 (Transmembrane domain, TM) 和胞内区 (Intracellular domain, ID) 三部分构成，胞外区主要由 2 个配体结合域 (Ligand binding domain, RLD) 与 2 个富含半胱氨酸区构成^[4]。对 HER2 基因及其蛋白产物的病理学研究表明，在多种肿瘤中均存在 HER2 的扩增或过表达，且多见于乳腺癌。1987 年，Slamon 等^[5]在对 189 名乳腺癌患者的

研究中，首次报道了 HER2 基因在乳腺癌细胞中的表达，指出 HER2 基因在乳腺癌的生物学行为和发病机制中有重要作用，并认为 HER2 基因的扩增水平是比雌激素受体（Estrogen receptor, ER）、肿瘤大小等更有价值的预后指标；此后，Ross 等^[6]对涉及 15,248 例病人的 47 组试验进行了回顾性研究，结果显示，对 60% 的试验组和 67% 的病人来说，HER2 基因的扩增水平可作为判断乳腺癌预后的独立指标；Schmidt 等^[7]通过对未经任何治疗的淋巴结阴性乳腺癌患者 HER2 状态的研究，发现 HER2 基因扩增比 HER2 蛋白表达对于预后的意义更加明确，因此，他们认为 HER2 基因扩增可作为一个独立的预后因子；Mrhalova 等^[8]通过对 39 例浸润性导管癌（Infiltrating ductal carcinoma, IDC）进行研究，发现 HER2 基因 mRNA 的表达水平（实时荧光定量 PCR 法，qPCR）与 HER2 蛋白表达水平（免疫组织化学法，Immunohistochemistry）及 HER2 基因拷贝数水平（荧光原位杂交法，Fluorescence in situ hybridization）存在较好的一致性，且在可疑病例的判断中有较出色的表现；Celine Bossard 等^[9]也通过 44 例浸润性乳腺癌的研究证实了 Mrhalova 等的研究。

2007 年美国临床肿瘤学会（American Society of Clinical Oncology, ASCO）发布了 HER2 基因作为乳腺癌治疗指标的更新建议，其中指出，对每 1 例原发浸润性乳腺癌的诊断，以及复发病人选赫赛汀（曲妥珠单抗）治疗前都应进行 HER2 基因表达水平的评估检测^[10]。乳腺肿瘤患者 HER2 阳性意味着乳腺肿瘤细胞表面的 HER2 蛋白数量增多，过度传递信号，刺激癌细胞疯狂增殖，HER2 阳性的患者同其他乳腺癌病人相比，肿瘤恶性程度更高，进展更快，更容易复发和远处转移，且此类病人通常对内分泌治疗——他莫昔芬（Tamoxifen）不敏感，预后较差^[11]。1998 年被美国 FDA 批准上市，2002 年在中国上市的生物靶向治疗药物曲妥珠单抗（Trastuzumab）商品名赫赛汀（Herceptin），是人类历史上第一个生物基因靶向治疗药物，作为癌症治疗史上的重要突破，赫赛汀的出现将乳腺癌的治疗引入了生物靶向治疗的新时代。赫赛汀（曲妥珠单抗）是一种重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体，选择性地作用于 HER2 的细胞外部位，该药能够靶向作用于 HER2 受体，主要用于 HER2 过表达的乳腺癌患者，研究报道指出，HER2 阳性的乳癌患者在化疗时加用赫赛汀（曲妥珠单抗），可降低乳腺癌患者的复发风险和病死率，延长患者的生存期^[12]。目前医学界已经达成共识，赫赛汀（曲妥

珠单抗)是 HER2 阳性乳腺癌的一种有效治疗手段^[13]。由于赫赛汀(曲妥珠单抗)的价格较贵,在英国患者使用该药每年的费用尤为 20,000~30,000 英镑^[14],同时也有研究表明患者服用赫赛汀(曲妥珠单抗)会增加心脏毒性的风险^[15-17]。因此,准确的 HER2 基因检测对于乳腺癌靶向治疗患者的筛选起决定性作用。

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫