

# 基于qPCR的结直肠癌HER2扩增检测方法的构建及应用

汪月霞<sup>1\*</sup>, 刘杰<sup>2\*</sup>, 叶晓艳<sup>3</sup>, 叶平<sup>4</sup>, 宋鹏霞<sup>2</sup>, 郑坤华<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>开化县人民医院全科医学科, 浙江 衢州

<sup>2</sup>衢州职业技术学院医学院, 浙江 衢州

<sup>3</sup>开化县人民医院病理科, 浙江 衢州

<sup>4</sup>开化县人民医院消化内科, 浙江 衢州

收稿日期: 2026年2月11日; 录用日期: 2026年3月4日; 发布日期: 2026年3月12日

## 摘要

目的: 构建基于实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)的结直肠癌HER2扩增检测作为荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)的补充。方法: 首先构建基于qPCR平台检测HER2和RPPH1基因拷贝数的流程, 然后根据 $3\sigma$ 原则并基于30例正常对照样本的检测结果制定临床结直肠癌样本HER2扩增阳性的判定标准, 并在临床样本中进行验证。结果: 根据30例正常对照样本的检测结果制定了临床样本HER2扩增阳性的判定标准, 即RPPH1和HER2的Ct差值大于1.6。27例结直肠癌样本的检测及判定结果显示, qPCR与FISH的检测结果具有良好一致性(Kappa值为0.509), qPCR检测FISH阳性样本的灵敏度60%, 特异性90.9%。此外, qPCR检测FISH阳性或FISH阴性结直肠癌患者的HER2扩增水平均显著高于正常对照人群。结论: 通过qPCR技术检测结直肠癌HER2扩增具有可行性, 但仍需进一步优化检测流程并在更多临床样本中加以验证。

## 关键词

结直肠癌, HER2扩增, 实时荧光定量聚合酶链反应, 荧光原位杂交

# Construction and Application of Detection Method of HER2 Amplification Based on qPCR for Colorectal Cancer

Yuexia Wang<sup>1\*</sup>, Jie Liu<sup>2\*</sup>, Xiaoyan Ye<sup>3</sup>, Ping Ye<sup>4</sup>, Pengxia Song<sup>2</sup>, Kunhua Zheng<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Department of General Practice, People's Hospital of Kaihua, Quzhou Zhejiang

<sup>2</sup>Medical School, Quzhou College of Technology, Quzhou Zhejiang

\*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 汪月霞, 刘杰, 叶晓艳, 叶平, 宋鹏霞, 郑坤华. 基于 qPCR 的结直肠癌 HER2 扩增检测方法的构建及应用 [J]. 临床医学进展, 2026, 16(3): 2042-2051. DOI: 10.12677/acm.2026.163993

<sup>3</sup>Department of Pathology, People's Hospital of Kaihua, Quzhou Zhejiang

<sup>4</sup>Department of Gastroenterology, People's Hospital of Kaihua, Quzhou Zhejiang

Received: February 11, 2026; accepted: March 4, 2026; published: March 12, 2026

## Abstract

**Objective:** To construct a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) based HER2 amplification detection method for colorectal cancer as a supplement to fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Methods:** Firstly, the process of detecting the copy number of HER2 and RPPH1 genes based on qPCR platform was constructed, and then the criterion for judging the amplification of HER2 in clinical samples was established according to the  $3\sigma$  principle and based on the detection results of 30 normal control samples. Finally, it is verified in colorectal cancer samples. **Results:** The judgement criteria for HER2 amplification in clinical samples was established, that is, the difference of threshold cycle(Ct) between RPPH1 and HER2 was greater than 1.6. The results of 27 colorectal cancer samples showed that the detection results of qPCR and FISH were in good agreement (Kappa value was 0.509), and the sensitivity of qPCR in detecting FISH positive samples were 60% with specificity of 90.9%. In addition, the amplification level of HER2 in FISH-positive or FISH-negative colorectal cancer patients detected by qPCR was significantly higher than that in normal control population. **Conclusion:** It is feasible to detect HER2 amplification of colorectal cancer by qPCR technology, but it is still necessary to further optimize the detection process and verify it in more clinical samples.

## Keywords

Colorectal Cancer, HER2 Amplification, Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, Fluorescence *in Situ* Hybridization

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

结直肠癌是常见消化道肿瘤之一。据 2020 中国癌症统计报告显示,我国结直肠癌发病率和死亡率在全部恶性肿瘤中分别位居第 2 和第 5 位,其中新发病例 55.5 万例,死亡病例 28.6 万例[1] [2]。结直肠癌的早期症状并不明显,早癌筛查和精准治疗是降低我国结直肠癌患者死亡率的两个重要途径。在结直肠癌治疗中,尤其针对中晚期患者,靶向治疗发挥着越来越重要的作用,人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2)是其中一个重要的治疗靶点[3] [4]。

HER2 作为表皮生长因子受体家族的重要成员之一,具备内在酪氨酸激酶活性。当 HER2 发生受体聚合后,会导致自身酪氨酸残基的磷酸化,进而启动下游多条信号通路,最终导致细胞的异常增殖及肿瘤的发生发展。目前已有很多靶向 HER2 的药物用于治疗 HER2 扩增/过表达的肿瘤患者。多中心临床试验结果显示,帕妥珠单抗联合曲妥珠单抗可用于 HER2 扩增的转移性结直肠癌的治疗[5];此外,以抗体药物偶联物(antibody-drug conjugates, ADC)为作用机制的 DS-8201 对 HER2 表达的转移性结直肠癌患者也具有一定疗效[6]。关于 HER2 表达水平在肿瘤术后辅助治疗效果的预测价值,目前主要在乳腺癌中开展了相关研究,而探索 HER2 用于预测结直肠癌辅助疗效的研究较为匮乏[7]。随着美国食

品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准全球首款靶向 HER2 结直肠癌的重磅新药图卡替尼联合曲妥珠单抗的组合疗法上市, HER2 扩增/表达水平对结直肠癌辅助治疗效果的预测意义有待探索和明确。

荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)和免疫组化(immunohistochemical, IHC)是目前检测 HER2 扩增/过表达的主要方法, FISH+或 IHC 3+是常用的 HER2 阳性判定标准。临床研究显示, HER2 靶向药物新型 ADC DS-8201 对 HER2 低表达(IHC 2+/ISH-或 IHC 1+)的乳腺癌患者同样有效, 该研究结果扩大 HER2 阳性判定范围的同时也提出了新的问题, 即如何更准确地识别 HER2 靶向药物的适用人群。虽然 IHC 和 FISH 是临床 HER2 检测的常规方法, 但二者存在各自局限性, 因此基于定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR) [8] [9]、液滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) [10] [11]的 HER2 基因扩增检测以及基于实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)的 HER2 基因表达检测[12]相关研究越来越多。对于临床 FISH 与 IHC 检测结果不一致以及临床样本质量不符合 FISH 或 IHC 质控标准的情况, 基于 PCR 的检测方法可以作为 HER2 的辅助诊断方法, 但这些方法的 HER2 阳性判定标准及其与 FISH、IHC 检测结果的一致性都需要进一步验证。

为明确不同的 HER2 扩增/表达检测方法的结果一致性, 并探究 HER2 扩增/表达对结直肠癌术后辅助治疗疗效的预测价值, 本研究开展回顾性研究, 拟纳入至少 40 例接受手术切除治疗的结直肠癌患者并收集福尔马林固定、石蜡包埋的组织样本(Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE), 分别使用 IHC、FISH、qPCR 技术检测结直肠癌组织中 HER2 表达与扩增情况, 进而系统分析不同方法检测 HER2 结果的一致性。该研究有望为临床 HER2 检测提供一种新的辅助方法, 同时也为结直肠癌术后辅助治疗效果的预测提供一种新的潜在标志物。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 患者与样本来源

本研究收集近 5 年于开化县人民医院接受结直肠癌手术且留存有 IHC 检测报告的结直肠癌患者手术组织石蜡标本。所有标本均遵循标准化流程进行福尔马林固定、石蜡包埋和常规处理, 并根据世界卫生组织(WHO)组织学诊断标准完成病理诊断。该研究方案已通过开化县人民医院伦理委员会的批准(伦理批件号: 2023-伦审研第(03))。所有实验均严格遵照《赫尔辛基宣言》及临床研究相关指南和规定执行。研究中所有标本均来自病理组织库, 仅用于本研究的回顾性分析。所有标本的获取均符合伦理要求, 不会对患者造成潜在伤害。为保障患者隐私与信息机密性, 所有样本均按实验室登录号进行编码, 且不可识别患者的身份信息。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. FISH 检测

使用德诺杰亿(北京)生物科技有限公司的 HER2 基因扩增检测试剂盒(荧光原位杂交法)进行 FISH 分析。检测流程如下: 首先制备厚度为 3 微米的 FFPE 组织切片, 以 CSP17 对照探针为参考, 用于评估 HER2 基因拷贝数; 然后使用 OLYMPUS (奥林巴斯) BX53 型号显微镜观察切片中荧光信号; 使用 CCD 相机获取图像, 并使用 Imstar 全自动荧光原位杂交扫描分析系统进行分析。信号计数环节严格遵循以下标准: 在切片上选取 2 个及以上具有代表性的区域, 每个区域至少计算 30 个细胞核, 该计数结果由计数人员在不考虑其他测试结果的情况下进行。HER2 基因扩增的阳性判定标准为: 在大于 50%的肿瘤细胞中, HER2/CSP17 比值  $\geq 2.0$ 。

### 2.2.2. DNA 提取

在肿瘤 FFPE 样本中提取 DNA 时, 通过 HE 染色来评估和筛选出肿瘤细胞含量足够的样本, 从而间接确保后续 DNA 提取和基因检测的有效性。使用新型无苯石蜡包埋组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克: DP7121)从 FFPE 样品中分离 DNA。具体步骤包括: 使用独特的裂解/结合液迅速裂解细胞和灭活细胞内核酸酶, 然后基因组 DNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗-离心步骤将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后使用低盐的洗脱缓冲液将纯净基因组 DNA 从硅基质膜上洗脱。

### 2.2.3. qPCR 检测

使用罗氏 Lightcycler 96 对 HER2 和 RPPH1 基因进行 qPCR 检测。用于 qPCR 的寡核苷酸引物和探针的序列均来自于擎科生物(北京市北京经济技术开发区经海三路 105 号院 3 号楼西半单元), 具体引物和探针序列如下: RPPH1-F: AGCTTGGAACAGACTCACGG; RPPH1-R: AATGGGCGGAGAGAGTAGT; RPPH1 探针: CCTGCGGGGTACCTCACCTCAGCCA; HER2-F: CCATGCGGGGTAGAACCTTT; HER2-R: CGCAGTTAGCGCCTACCATA; HER2 探针: CCTGTTCACCACTCTACCTCCAGCACA。qPCR 反应条件如下: PCR 反应在 96 孔板上进行, 反应体系构建需同时包含 HER2 靶基因反应混合物与内参基因反应体系, 总反应体积设定为 20  $\mu$ L 体积, 包含 2  $\mu$ L 基因组 DNA 模板、0.6  $\mu$ L 正向引物和 0.6  $\mu$ L 反向引物、0.4  $\mu$ L 杂交探针和 10  $\mu$ L 通用混合试剂(TAKARA 探针法多重 qPCR 试剂 RR393A), 剩余用无菌水补齐。qPCR 反应程序设置如下: 首先是在 95 $^{\circ}$ C 下持续预变性 30 s, 然后进入循环扩增阶段, 共进行 40 个循环, 每个循环包含两步反应: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s 和 58 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s。

## 2.3. 统计分析

使用 GraphPad Prism5.0 软件完成统计分析。采用费舍尔精确检验分析分类变量之间相关性, 采用 Mann-Whitney/Kruskal-Wallis 检验分析连续变量与分类变量之间的相关性以及不同组间数据的差异显著性, 采用 Kappa 分析评估不同 HER2 检测方法之间的结果一致性。

## 3. 结果

### 3.1. 患者临床特征

共 40 例结直肠癌患者, 年龄分布在 45~89 岁, 男女比例为 5:3, 结肠癌和直肠癌的占比为 11:9。在 40 例结直肠癌中, 绝大多数是隆起型浸润性中分化腺癌(35%)和溃疡型浸润性中分化腺癌(50%)。大部分患者术后未接受任何治疗, 其余患者主要接受辅助化疗(奥沙利铂 + 卡培他滨)。术前血清肿瘤标志物检测结果显示, 仅癌胚抗原存在部分异常(表 1)。Fisher's 精确检验结果显示, 性别、肿瘤位置、肿瘤类型与 HER2 IHC 检测结果无显著关联。Mann-Whitney/Kruskal-Wallis 检验结果显示, 年龄与 HER2 IHC 检测结果无显著关联。

**Table 1.** Clinical characteristics of patients

**表 1.** 患者临床特征

临床特征	患者数量(比例)
年龄	
<60	9 (22.5%)
60~69	9 (22.5%)
70~79	17 (42.5%)

续表

	≥80	5 (12.5%)
性别	男性	25 (62.5%)
	女性	15 (37.5%)
肿瘤位置	结肠	22 (55.0%)
	直肠	18 (45.0%)
肿瘤类型	隆起型浸润性中分化腺癌	14 (35.0%)
	溃疡型浸润性中分化腺癌	20 (50.0%)
	其他	6 (15.0%)
术后方案	化疗(奥沙利铂 + 卡培他滨)	12 (30.0%)
	化疗(奥沙利铂 + 氟尿嘧啶类)	2 (5.0%)
	化疗 + 靶向治疗(卡培他滨 + 贝伐珠单抗)	1 (2.5%)
	靶向治疗(仑伐替尼)	1 (2.5%)
	无	24 (60.0%)
HER2 IHC	0	6 (15.0%)
	1+	22 (57.5%)
	2+	9 (20.0%)
	3+	3 (7.5%)
术前 CEA	正常(0.0~5.0 不吸烟 0.0~10.0 吸烟)	32 (80.0%)
	异常	7 (17.5%)
	未检测	1 (2.5%)
术前 CA125	正常(0.0~30.2)	38 (95.0%)
	异常	1 (2.5%)
	未检测	1 (2.5%)
术前 CA199	正常(0.0~37.0)	38 (95.0%)
	异常	1 (2.5%)
	未检测	1 (2.5%)

注: HER2: 人表皮生长因子受体 2; IHC: 免疫组织化学; CEA: 癌胚抗原; CA125: 糖类抗原 125; CA199: 糖类抗原 199。

### 3.2. IHC 和 FISH 检测一致性分析

本研究对 40 例结肠癌患者的手术组织石蜡样本分别开展 IHC 和 FISH 检测, 其中 IHC 检测 HER2 表达, FISH 检测 HER2 基因扩增, 具体检测结果见表 2。IHC 检测结果显示, 在 40 例样本中, HER2 蛋白表达以低水平为主, 其中 0/1+ 的比例高达 70%, 3+ 的比例仅为 7.5%。FISH 检测结果显示, 在 40 例样本中 HER2 基因扩增阴性占比达 85%, 仅少数样本表现为 FISH 阳性。比较 IHC 和 FISH 两种检测方法的结果发现, IHC 0 和 3+ 分别对应 FISH 阴性和阳性, 而 IHC 1+ 几乎全部都是 FISH 阴性, IHC 2+ 中有 22.2% 为 FISH 阳性, 提示 IHC 2+ 尚不能直接判定为阴性, 还需要通过 FISH 进一步验证。

**Table 2.** Consistency analysis of results between IHC and FISH  
**表 2.** IHC 和 FISH 检测结果的一致性分析

IHC 检测	FISH 检测, 数量(%)	
	FISH 阳性	FISH 阴性
0	0 (0)	6 (100)
1+	1 (4.5)	21 (95.5)
2+	2 (22.2)	7 (77.8)
3+	3 (100)	0 (0)

注: IHC: 免疫组织化学; FISH: 荧光原位杂交。

### 3.3. qPCR 检测阳性判定标准的制定

qPCR 检测中 HER2 扩增阳性的判定标准制定流程如下: 首先选取 30 例正常对照人群石蜡组织样本, 提取其基因组 DNA, 使用探针法检测样本中 HER2 和 RPPH1 基因的循环阈值(Ct 值), 然后计算每例样本的 HER2 和 RPPH1 基因的 Ct 差值( $\Delta Ct = Ct_{RPPH1} - Ct_{HER2}$ )及  $\Delta Ct$  的平均值(Mean)和标准差(SD), 最后将临床样本 HER2 基因扩增的阳性判定标准设为  $\Delta Ct > (\text{Mean} + 3 * SD)$ 。30 例正常对照样本的检测结果显示, 内参基因 RPPH1 的 Ct 值范围为 25.0~31.1, 靶基因 HER2 的 Ct 值范围为 24.3~31.9,  $\Delta Ct$  值范围为 -1.6~0.7 (符合正态分布), 进一步计算 Mean 为 -0.5, SD 为 0.7, 带入以上公式, 最终确定阳性判定标准为  $\Delta Ct > 1.6$ 。

### 3.4. qPCR 与其他检测方法的一致性分析

**Table 3.** Consistency analysis of results between qPCR and FISH  
**表 3.** qPCR 和 FISH 检测结果的一致性分析

FISH 检测	qPCR 检测, 数量(%)	
	qPCR 阳性	qPCR 阴性
阳性	3 (60)	2 (40)
阴性	2 (9.1)	20 (90.9)

注: FISH: 荧光原位杂交; qPCR: 实时荧光定量聚合酶链反应。

**Table 4.** Consistency analysis of results between qPCR and IHC  
**表 4.** qPCR 和 IHC 检测结果的一致性分析

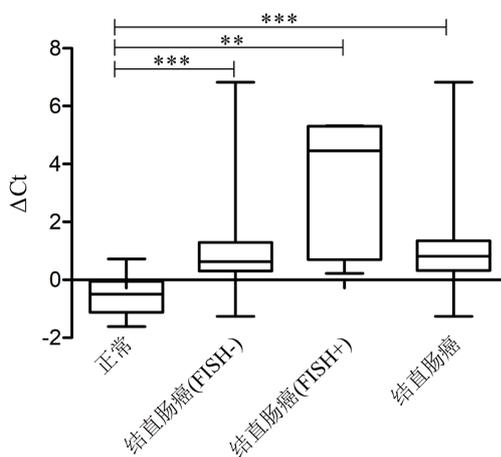
IHC 检测	qPCR 检测, 数量(%)	
	qPCR 阳性	qPCR 阴性
0	0 (0)	4 (100)
1+	0 (0)	14 (100)
2+	3 (50)	3 (50)
3+	2 (66.7)	1 (33.3)

注: IHC: 免疫组织化学; qPCR: 实时荧光定量聚合酶链反应。

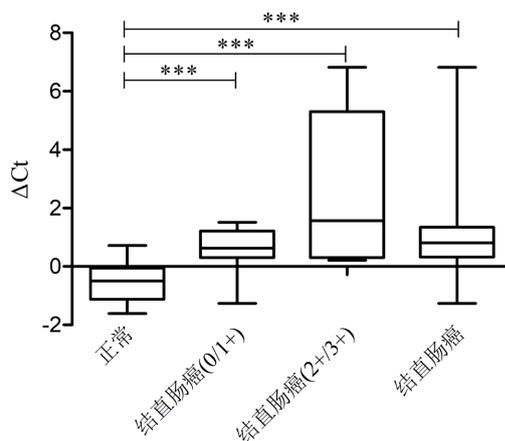
在本研究中, 13 例结直肠癌石蜡样本由于提取的 DNA 质量未达到要求, 未进行后续 qPCR 检测,

最终共 27 例结直肠癌石蜡样本完成了 qPCR 检测。对比 qPCR 和 FISH 检测结果显示, Kappa 值为 0.509, 表示两种检测结果具有中度一致性(表 3)。比较正常对照、FISH 阴性结直肠癌、FISH 阳性结直肠癌之间的 qPCR 检测结果显示, 整体结直肠癌(无论 FISH 检测结果如何)的  $\Delta Ct$  值, 以及 FISH 阳性、FISH 阴性结直肠癌患者的  $\Delta Ct$  均显著高于正常对照人群, 但 FISH 阳性与 FISH 阴性结直肠癌患者之间的  $\Delta Ct$  没有显著差异(P 值 = 0.0981, 图 1(A))。对比 qPCR 和 IHC 检测结果显示出同样的趋势, Kappa 值为 0.419(表 4), 整体结直肠癌患者的  $\Delta Ct$  值, 以及 HER2 低表达(0/1+)、HER2 高表达(2+/3+)结直肠癌患者的  $\Delta Ct$  均显著高于正常对照人群, 但 HER2 低表达(0/1+)与 HER2 高表达(2+/3+)结直肠癌患者之间没有显著差异(P 值 = 0.0896, 图 1(B))。

(A)



(B)



注:\*\*\*对应 P 值小于 0.0001; \*\*对应的 P 值等于 0.0011。  
 $\Delta Ct$  是 RPPH1 与 HER2 的 Ct 差值。

**Figure 1.** Difference of qPCR detection results between different groups. (A) Grouping based on FISH results; (B) Grouping based on IHC results

**图 1.** 不同分组之间的 qPCR 检测结果的差异。(A) 基于 FISH 检测结果分组; (B) 基于 IHC 检测结果分组

## 4. 讨论

近年来,HER2 靶向药在恶性肿瘤治疗中的应用得到了广泛关注,FDA 已正式批准图卡替尼(tucatinib)联合曲妥珠单抗用于治疗接受氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康为基础的化疗后病情进展的 RAS 野生型、HER2 阳性的不可切除或转移性结直肠癌成人患者。CSCO 结直肠癌诊疗指南也明确推荐,对于接受标准治疗失败后的患者,可接受抗 HER2 治疗。目前,结直肠癌中 HER2 的检测方法和判断标准主要参考各临床研究数据确定。例如,在 HERACLES 研究中,将 HER2 阳性定义为“50%以上的肿瘤细胞呈现 3+”,如果染色强度为 2+,或者仅有 10%~50%的细胞呈现 3+染色,则需进一步使用 FISH 方法进行验证。FISH 方法将 HER2 阳性定义为“50%的肿瘤细胞中 HER2/CEP17 比值  $\geq 2$ ” [13]。研究数据显示,IHC 2+的病例中,绝大多数(80%~85%)实际上并没有基因扩增,称为“IHC 2+/FISH 阴性” [14],这些患者不能从 HER2 靶向治疗中获益;小部分患者(15%~20%)存在基因扩增,称为“IHC 2+/FISH 阳性”,这些患者有资格接受 HER2 靶向治疗。导致 IHC 与 FISH 检测结果不一致的原因较多,除肿瘤异质性、样本质量参差不齐以外,核心机制在于 HER2 蛋白表达水平受多重调控:其不仅受基因拷贝数影响,还受转录、翻译和蛋白降解等转录后调控机制的影响,因此导致蛋白表达与基因扩增状态不完全一致。

IHC 具有技术操作简单、成本较低、技术成熟的特点,已广泛应用于各级医疗机构;FISH 检测则受限于技术操作复杂、成本较高、判读复杂等缺点,目前难以在县域医院普及。基于这一临床需求,本研究研发了一种基于 qPCR 平台的 HER2 扩增检测方法作为 FISH 的补充。qPCR 的核心优势在于其具有高通量、自动化、快速、成本相对较低且能提供精确的定量数据的特点[15]。虽然 FISH 和 qPCR 两种检测方法均是从 DNA 水平进行检测,但技术路径存在一定的差异:FISH 通过荧光探针杂交,直接计算肿瘤细胞中 HER2 基因信号与第 17 号染色体着丝粒(CEP17)信号的比值(HER2/CEP17 ratio)及平均每个细胞的 HER2 基因拷贝数进行相关判断,而 qPCR 则是通过选取 HER2 基因和对照基因 RPPH1 的某个片段设计特异性引物和探针,并根据 Ct 值差异判断是否存在 HER2 扩增[16]-[18]。为了确定 qPCR 检测 HER2 基因扩增阳性的判定标准,我们采用“ $3\sigma$  准则”(正态分布数据的统计规律):对于服从正态分布的数据,约 99.73%的数值会落在均值( $\mu$ )  $\pm 3$  倍标准差( $\sigma$ )的区间内,超出此范围的数据概率不足 0.3%,可判定为异常值。基于此,最终将阳性判定标准设定为:Ct 差值(CtRPPH1-CtHER2) > 均值( $\mu$ ) + 3 倍标准差( $\sigma$ )。

在本研究中,基于 qPCR 平台的 HER2 扩增检测与 FISH 检测结果具有中度一致性(Kappa 值 = 0.509);进一步评估 qPCR 的诊断效能发现,其检测 FISH 阳性样本的灵敏度为 60%,特异性为 90.9%。不同人群的 qPCR 比较结果显示,结直肠癌患者(无论是 FISH 阳性还是 FISH 阴性)的 HER2 扩增水平显著高于正常对照人群,但目前 qPCR 检测方法仍不够灵敏,其区分 FISH 阳性和 FISH 阴性的准确率仍需要进一步提高。导致 qPCR 和 FISH 结果不一致的原因包括以下两个方面:1. FISH 检测需要避开纤维间质、炎症细胞和正常上皮细胞,精准选择浸润性癌的区域进行计数,而 qPCR 则是提取整个组织块的混合 DNA,若样本中肿瘤细胞比例低,HER2 扩增的信号会被大量非扩增的正常细胞 DNA“稀释”,导致假阴性结果[19]。2. 针对 17 号染色体拷贝数增加而非特异 HER2 基因扩增的情况,FISH 检测会因 HER2/CEP17 比值未达到阳性标准而阴性;qPCR 检测的 HER2 和 RPPH1 基因分别位于 17 号染色体和 14 号染色体,17 号染色体多倍体会导致 HER2 基因拷贝数相对升高,因此 qPCR 结果会显示阳性[20]。另外,本研究中临床样本数量较少,尤其是 HER2 扩增阳性样本,这可能导致两种检测方法的一致性结果不够精确,后续研究还需扩大样本量,进一步验证 qPCR 检测方法的准确性。

## 5. 结论

综上所述,本研究初步研发了一款基于 qPCR 平台的 HER2 扩增检测方法,该方法检测结果与 FISH

检测结果具有较好的一致性, 可作为 FISH 检测的潜在补充手段, 为 HER2 扩增检测提供更多选择。未来我们将进一步对其进行优化, 并探索其检测结果对结直肠癌患者术后辅助治疗及预后的预测价值。

## 基金项目

衢州市指导性科技攻关项目(2023ZD099)。

## 参考文献

- [1] Cao, W., Chen, H., Yu, Y., Li, N. and Chen, W. (2021) Changing Profiles of Cancer Burden Worldwide and in China: A Secondary Analysis of the Global Cancer Statistics 2020. *Chinese Medical Journal*, **134**, 783-791. <https://doi.org/10.1097/cm9.0000000000001474>
- [2] 国家卫生健康委员会医政司, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2023 版) [J]. 协和医学杂志, 2023, 14(4): 706-733.
- [3] Spitzer, E., Cervera, P., André, T. and Cohen, R. (2023) Cibler HER2 dans le cancer colorectal. *Bulletin du Cancer*, **110**, 402-411. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2023.01.013>
- [4] Suwaidan, A.A., Lau, D.K. and Chau, I. (2022) HER2 Targeted Therapy in Colorectal Cancer: New Horizons. *Cancer Treatment Reviews*, **105**, Article ID: 102363. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102363>
- [5] Meric-Bernstam, F., Hurwitz, H., Raghav, K.P.S., McWilliams, R.R., Fakih, M., VanderWalde, A., et al. (2019) Pertuzumab Plus Trastuzumab for HER2-Amplified Metastatic Colorectal Cancer (Mypathway): An Updated Report from a Multicentre, Open-Label, Phase 2a, Multiple Basket Study. *The Lancet Oncology*, **20**, 518-530. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(18\)30904-5](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(18)30904-5)
- [6] Siena, S., Di Bartolomeo, M., Raghav, K., Masuishi, T., Loupakis, F., Kawakami, H., et al. (2021) Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201) in Patients with HER2-Expressing Metastatic Colorectal Cancer (DESTINY-CRC01): A Multicentre, Open-Label, Phase 2 Trial. *The Lancet Oncology*, **22**, 779-789. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(21\)00086-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(21)00086-3)
- [7] Feng, Y., Li, Y., Huang, D., Cai, S. and Peng, J. (2019) HER2 as a Potential Biomarker Guiding Adjuvant Chemotherapy in Stage II Colorectal Cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, **45**, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.10.059>
- [8] Hillig, T., Thode, J., Breinholt, M.F., Franzmann, M., Pedersen, C., Lund, F., et al. (2012) Assessing HER2 Amplification by IHC, FISH, and Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis (Real-Time PCR) Following LCM in Formalin-fixed Paraffin Embedded Tissue from 40 Women with Ovarian Cancer. *APMIS*, **120**, 1000-1007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02929.x>
- [9] Gheni, N. and Westenberg, D. (2020) Quantitative Real-Time PCR Assay with Immunohistochemical Evaluation of HER2/neu Oncogene in Breast Cancer Patients and Its Correlation with Clinicopathological Findings. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, **63**, S123-S128. [https://doi.org/10.4103/ijpm.ijpm\\_136\\_19](https://doi.org/10.4103/ijpm.ijpm_136_19)
- [10] Boldrin, E., Mazza, M., Piano, M.A., Alfieri, R., Montagner, I.M., Magni, G., et al. (2022) Putative Clinical Potential of ERBB2 Amplification Assessment by ddPCR in FFPE-DNA and cfDNA of Gastroesophageal Adenocarcinoma Patients. *Cancers*, **14**, Article 2180. <https://doi.org/10.3390/cancers14092180>
- [11] 卢仁泉, 柳光宇, 杨文涛, 等. 外周血 HER2 基因扩增检测(数字 PCR 法)在抗 HER2 治疗中的应用共识[J]. 中国癌症杂志, 2022, 32(1): 90-96.
- [12] Lu, Y., Jingyan, G., Baorong, S., Peng, J., Xu, Y. and Cai, S. (2012) Expression of EGFR, HER2 Predict Lymph Node Metastasis (LNM)-Associated Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Biomarkers*, **11**, 219-226. <https://doi.org/10.3233/cbm-2012-00282>
- [13] 中华医学会病理学分会, 国家病理质控中心, 中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌专家委员会. 结直肠癌分子病理检测临床实践指南(2025 版) [J]. 中华病理学杂志, 2025, 54(5): 448-462.
- [14] Horimoto, Y., Ishizuka, Y., Ueki, Y., Higuchi, T., Arakawa, A. and Saito, M. (2022) Comparison of Tumors with HER2 Overexpression versus HER2 Amplification in HER2-Positive Breast Cancer Patients. *BMC Cancer*, **22**, Article No. 242. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09351-4>
- [15] Juarez, I., Toro-Fernandez, J.F., Vaquero-Yuste, C., Molina-Alejandre, M., Lasa, I., Gomez, R., et al. (2021) A Reliable and Standardizable Differential PCR and qPCR Methodology Assesses HER2 Gene Amplification in Gastric Cancer. *Biology*, **10**, Article 516. <https://doi.org/10.3390/biology10060516>
- [16] Wang, X., Xing, D., Liu, Z., Zhang, Y., Cheng, B., Sun, S., et al. (2022) Establishment and Evaluation of Digital PCR Methods for HER2 Copy Number Variation in Breast Cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **415**, 725-733. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04466-w>

- 
- [17] Shoda, K., Masuda, K., Ichikawa, D., Arita, T., Miyakami, Y., Watanabe, M., *et al.* (2014) HER2 Amplification Detected in the Circulating DNA of Patients with Gastric Cancer: A Retrospective Pilot Study. *Gastric Cancer*, **18**, 698-710. <https://doi.org/10.1007/s10120-014-0432-5>
- [18] Shoda, K., Ichikawa, D., Fujita, Y., Masuda, K., Hiramoto, H., Hamada, J., *et al.* (2016) Monitoring the HER2 Copy Number Status in Circulating Tumor DNA by Droplet Digital PCR in Patients with Gastric Cancer. *Gastric Cancer*, **20**, 126-135. <https://doi.org/10.1007/s10120-016-0599-z>
- [19] Koudelakova, V., Berkovcova, J., Trojanec, R., Vrbkova, J., Radova, L., Ehrmann, J., *et al.* (2015) Evaluation of HER2 Gene Status in Breast Cancer Samples with Indeterminate Fluorescence *in Situ* Hybridization by Quantitative Real-Time PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **17**, 446-455. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.03.007>
- [20] Hofmann, M., Stoss, O., Gaiser, T., Kneitz, H., Heinmöller, P., Gutjahr, T., *et al.* (2007) Central HER2 IHC and FISH Analysis in a Trastuzumab (Herceptin) Phase II Monotherapy Study: Assessment of Test Sensitivity and Impact of Chromosome 17 Polysomy. *Journal of Clinical Pathology*, **61**, 89-94. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.043562>