

双色 FISH 分析浸润性乳腺癌 HER-2 基因扩增模式

HER-2 Amplification Pattern in Invasive Breast Cancer by Dual Color FISH
ZHANG Gui-rong, MA Yan, JIANG Hui, et al.

张桂荣, 马艳, 江慧, 王兴玲, 王燕, 祝贺, 李奕, 宋纯
(辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042)

摘要: [目的] 应用荧光原位杂交技术(FISH)分析乳腺癌 HER-2 基因状态。[方法] 采用双色 FISH 技术检测 100 例浸润性乳腺癌 HER-2 基因, 分析 FISH 和免疫组织化学(IHC)检测结果, 分析 17 号染色体多倍体比率及其与 HER-2 基因扩增的关系。[结果] 100 例浸润性乳腺癌标本中, HER-2 蛋白 IHC 3+ 21 例者中 FISH 检测均为阳性; IHC 2+ 69 例者中 FISH 检测为阳性的占 72%, IHC 1+ 10 例者 FISH 检测为阳性的占 20%。17 号染色体多倍体的比率为 51%。17 号染色体二倍体与多倍体标本中, HER-2 基因扩增的比率分别是 76% 和 69%, 差异无统计学意义($P=0.330$)。[结论] 乳腺癌 IHC 检测 HER-2 为 1+ ~ 2+ 者需进一步行 FISH 检测确定 HER-2 基因状态; 应用双色 FISH 方法能准确、全面评估 HER-2 基因状态。

关键词: 荧光原位杂交(FISH); HER-2 基因; 乳腺癌; 染色体

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)03-0225-05

20%~25% 乳腺癌中人表皮生长因子受体 2 (HER-2) 蛋白高表达, 是由于染色体 17q12~21 基因拷贝数增加所导致。HER-2 高表达促进细胞增殖, 且与预后密切相关^[1]。曲妥珠单抗(赫赛汀)是一种人源化单克隆免疫球蛋白 G 抗体, 专门针对 HER-2 蛋白胞外区域而研发, 能使 HER-2 阳性乳腺癌患者获得显著生存益处^[2]。然而, 曲妥珠单抗不仅价格昂贵, 而且具有一定的毒副作用, 因此, 在治疗之前确定患者是否会受益显得尤为重要。目前认为, 曲妥珠单抗只对 HER-2 阳性的浸润性乳腺癌有效。因此受益人群的选择是基于对 HER-2 状态的准确评估。

现已形成标准化 HER-2 检测流程和判读标准来指导临床治疗^[3]。尽管如此, HER-2 靶向治疗受益与否的选择有时仍然会引起争议。本文从方法学角度对乳腺癌 HER-2 基因状态进行评估, 期望能够进一步指导临床治疗。

1 材料与方法

1.1 研究对象

100 例浸润性乳腺癌标本来源于本院 2010 年 5 月至 2011 年 8 月临床送检的手术切除和穿刺标本, 其免疫组化(immunohistochemistry, IHC)评分在 1+ 以上。

1.2 研究方法

采用 IHC 和荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 两种方法检测 HER-2 基因状态。

1.2.1 免疫组织化学(IHC)方法

采用 Dako 公司 HercepTest 试剂盒, 依据检测说明, 4~5 μ m 厚的石蜡组织切片, 常规脱蜡、脱苯后入纯水, 置入抗原修复液(10mM 的柠檬酸缓冲液, pH=6.0)中高压 2.5min, 缓慢冷却至室温, 3% H₂O₂ 处理 5min, 封闭内源性过氧化物酶, PBS 冲洗后特异性一抗室温(25℃左右)孵育 60min, PBS 冲洗后 EnVision 二抗室温孵育 15min, PBS 冲洗后 DAB 显

收稿日期: 2011-11-02

通讯作者: 宋纯, E-mail: csong882002@yahoo.com.cn

色 10s。最后,自来水终止反应,充分水洗后苏木精对比染色,常规脱水、透明、封片,同时设置阳性、阴性对照。

根据 Dako 公司的说明,以膜的染色强度进行评分,即 0:无着色或<10%浸润性肿瘤细胞染色;1+:>10%浸润性肿瘤细胞呈微弱、不完整的膜染色;2+:>10%浸润性肿瘤细胞呈弱到中度的完整膜染色;3+:>10%的浸润性肿瘤细胞呈强的完整膜染色。对于异质性明显的肿瘤,如同一切片中同时存在 1+、2+、3+的情况,以高级别评分。IHC 评分 0 和 1+ 的被界定为阴性,而 2+ 和 3+ 被界定为 HER-2 基因的过度表达阳性反应。

1.2.2 荧光原位杂交(FISH)方法

1.2.2.1 双色 FISH 探针

HER-2 DNA 探针试剂盒(Path Vysion HER-2 DNA Probe Kit)购自美国 Abbott/Vysis 公司,经美国 FDA 批准可用于临床 HER-2 的定量扩增检测,由定位于染色体 17q11.2~q12 的 HER-2 基因(红色荧光标记)和定位于 17p11.1~q11.1 的 17 号染色体着丝粒计数探针 CEP17(绿色荧光标记)组成。

1.2.2.2 杂交过程

依据 Vysis 公司 HER-2 的检测方法,4~5 μ m 厚的石蜡组织切片经二甲苯脱蜡 3 次(10min/次),无水乙醇脱苯 2 次(5min/次),自然干燥。干燥后,将玻片置于预处理液 II(80 $^{\circ}$ C)中 10min,取出擦干置于蛋白酶中 37 $^{\circ}$ C 消化 10~60min,入纯水 5min 之后甩干或擦干,置于甲醛固定液中 10min,纯水洗涤 2 次(5min/次),洗涤后甩干或擦干,依次置于 70%乙醇,85%乙醇,100%乙醇中各 2min,再置于 70%甲酰胺(72 \pm 1 $^{\circ}$ C)中变性 5min,再依次置于 70%乙醇,85%乙醇,100%乙醇中各 2min,避光滴加 10 μ l 探针于标本中央,压盖片,避免气泡,封胶后 37 $^{\circ}$ C 放置 16~18h。次日晨,避光将玻片取出后迅速扯去封片胶,置于 0.3%NP-40(常温)中,晃去盖片后再置于 72 \pm 1 $^{\circ}$ C 预热的 0.3%NP-40 中 2min(中间晃动几次)。将玻片取出后避光、自然干燥。最后,将 10 μ l DAPI 滴于标本中央,盖玻片封片,-20 $^{\circ}$ C 避光孵育 20min。荧光显微镜下观察、分析结果。

1.2.2.3 HER-2 扩增定量标准

依据 ASCO/CAP 判读标准,每例乳腺癌样本在浸润性癌区域随机计数 20 个癌细胞核中的双色信号,以 HER-2/CEP17 比值作为 HER-2 的扩增的定

量标准,HER-2/CEP17 比值越大,提示扩增程度越强。HER-2/CEP17 >2.2 提示扩增阳性,HER-2/CEP17 <1.8 提示扩增阴性,二者比值介于 1.8~2.2 之间为可疑结果,此时再计数 20 个细胞核中的信号或由另外一个分析者重新计数,若仍为临界值,则在 FISH 检测报告中注明,或重复进行 FISH 或 IHC 检测。

1.2.2.4 多倍体判读标准

以 CEP17 信号的平均计数进行判断,若 CEP17 >2.25 个/细胞则判别为多倍体。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,用四格表卡方检验分析二倍体与多倍体扩增比率之间差异是否具有统计学意义, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FISH 和 IHC 检测结果

应用 IHC 的方法检测 HER-2 蛋白的过度表达,90%(90/100)样本呈阳性,其中 69 例 IHC 评分 2+, 21 例 IHC 评分 3+;另 10 例 IHC 评分 1+。

应用双色 FISH 的方法检测 HER-2 基因扩增,72%(72/100)的样本扩增。21 例 IHC 评分 3+ 样本中 21 例扩增(100%),69 例 IHC 评分 2+ 样本中 49 例(71%)扩增,10 例 IHC 评分 1+ 样本中 2 例(20%)扩增,见表 1。

2.2 HER-2 基因扩增与 17 号染色体着丝粒状态的关系

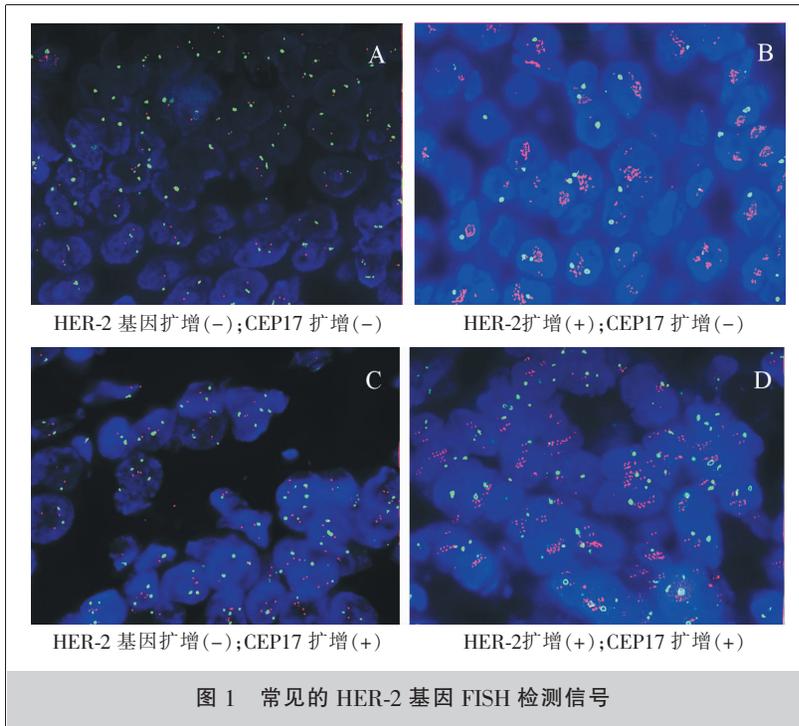
应用 FISH 方法检测 17 号染色体着丝粒状态,51%(51/100)的样本呈多倍体,其中 35 例(69%)

表 1 乳腺癌 HER-2 基因扩增与蛋白表达检测结果比较

FISH	IHC			总数
	1+	2+	3+	
正常	8	20	0	28
扩增	2	49	21	72
总数	10	69	21	100

表 2 不同 HER-2 基因扩增患者中 CEP17 多倍体检测结果

HER-2	例数	CEP17	
		二倍体	多倍体
正常	28	12	16
扩增	72	37	35
总数	100	49	51



HER-2/CEP17>2.2;49%(49/100) 的样本呈二倍体,其中 37 例(76%)HER-2/CEP17>2.2。二倍体与多倍体标本中 HER-2 基因扩增比率无统计学意义差异($P=0.330$)。见表 2。

2.3 HER-2 基因 FISH 检测信号

在我们的研究中,28%(28/100) 样本 HER-2 基因正常(图 1A、C),72%(28/100)样本 HER-2 基因扩增(图 1B、D),其中,1 例(1%)HER-2/CEP17 共扩增尚未检测到 CEP17 缺失信号。

3 讨论

曲妥珠单抗的治疗方案(赫赛汀)能够明显改善伴有 HER-2 扩增的乳腺癌患者的预后^[9]。因此,选择适当的方法进行 HER-2 状态的有效评估,从而确定受益人群显得尤为重要。目前,最常用的两种评估 HER-2 状态的方法是应用 IHC 方法来检测 HER-2 蛋白的表达及应用 FISH 方法来检测 HER-2 基因的扩增。

研究表明,IHC 检测的结果显示 HER-2 蛋白表达呈阴性(IHC 评分 0/1+)或者强阳性(IHC 评分 3+)均具有较高的准确性^[5-7],但 IHC 检测的结果显示 HER-2 蛋白表达呈弱阳性(IHC 评分 2+)则具有相

对较高的假阳性率,这一结果归因于多种因素,包括抗体的选择、固定的方法以及评分系统的标准化等^[8,9]。

一种替代的检测 HER-2 基因的方法是 FISH。由于 FISH 可以生成数值结果并且可以评估每个细胞的信号分布,因此具有客观性的优点。但是,FISH 方法不但价格昂贵,而且操作繁琐并需要专门的仪器设备,因此常规应用 FISH 的方法检测 HER-2 基因是不切实际的。目前的建议仍然是使用 IHC 的方法进行 HER-2 基因扩增的初步筛选,对 IHC 评分 2+的结果进一步行 FISH 检测来准确评估。IHC 和 FISH 之间具有很高的相关性,但并不完全一致,不同实验室结果之间的一致性也不同。Kostopoulou 等^[10]汇总了 10 余家 IHC 2+病例 FISH 检测的阳性率,其结果

从 8%~44.4%不等。

在我们的研究中,应用 IHC HercepTest 试剂盒检测乳腺癌 HER-2 蛋白的过度表达,90%(90/100)的样本呈阳性,其中 69 例(77%)IHC 评分 2+,21 例(23%)IHC 评分 3+。这种较高的 HER-2 基因过度表达率是由于样本选择并不是采取随机原则所造成的。应用 FISH 的方法检测 HER-2 基因扩增,70%(70/100)的样本 HER-2 扩增,69 例 IHC 评分 2+样本中有 49 例(71%)扩增,21 例 IHC 评分 3+样本中有 21 例扩增(100%)。在 10 例 IHC 评分 1+样本中有 2 例扩增(20%),这一阳性率显著高于国外相关报道。有报道显示,3%~10%病例 IHC 检测 HER-2 蛋白表达阳性而 FISH 检测 HER-2 基因未扩增^[6,11]。

FISH 方法检测 HER-2 基因包括两种方法:一是采用单色探针标记 HER-2 基因,通过计数癌细胞核中荧光信号数来评价 HER-2 基因是否扩增;二是采用双色探针分别标记 HER-2 基因和 17 号染色体着丝粒(CEP17),通过计算两种信号总数比值(HER-2/CEP17)来判断 HER-2 基因是否扩增。多数文献认为采用双色探针标记更能真实地反映 HER-2 基因的扩增状态。通过 HER-2/CEP17 比例可以区分 HER-2 基因拷贝数增加是由于 HER-2 基因扩增所致,或是由于 17 号染色体多倍体所致。尽管文献

上常见 17 号染色体多倍体的报道,我们的研究中也沿用了多倍体的概念,然而 17 号染色体着丝粒的扩增并不等同于 17 号染色体的扩增^[12,13]。因此,不同 FISH 判读标准难免会产生差异性结果,比如 HER-2 基因轻度扩增而 CEP17 拷贝数明显增加的样本(2%~9%),其应用双色探针的标准判读是阴性结果而单色探针的标准判读则是阳性结果^[14,15]。在我们的研究中,应用 FISH 的方法检测 CEP17 状态,51%(51/100)的样本呈多倍体,其中 35 例(69%)HER-2/CEP17>2.2;49%(49/100)的样本呈二倍体,其中 37 例(76%)HER-2/CEP17>2.2;二倍体与多倍体标本中 HER-2 基因扩增比率分别是 76%和 69%,两者差异无统计学意义($P=0.330$)。值得说明的是:第一,我们没有临界值的结果,也未见 CEP17<1 的样本;第二,4 例(4%)HER-2/CEP17<1.8 而 HER-2>6,此 4 例样本 IHC 评分均为 2+。对于这样的病例,我们又该如何选择判读的标准,值得进一步探讨。尽管如此,CEP17 拷贝数的增加仍然具有重要的临床意义,比如预测蒽环类药物对乳腺癌患者的化疗疗效等^[16,17]。

不仅如此,双色 FISH 标记还可以区分 HER-2 基因扩增的信号模式,如 CEP17 缺失、HER-2/CEP17 共扩增。文献报道,共扩增是一种罕见的情况,其比率是 1%或者更低^[18]。我们的研究中,检测到 1 例(1%)共扩增样本,这与文献报道一致。通常情况下,CEP17 与 HER-2 位点有足够远的距离,因此,多数样本 HER-2 扩增而 CEP17 并不扩增。然而,有时伴随着 HER-2 扩增,CEP17 部分区域也存在扩增,从而可见成簇的 HER-2 和 CEP17 信号出现。研究显示,这似乎是邻近 CEP17 和 HER-2 基因位点的一个复杂易位,同时伴随着二者信号的共同放大^[19]。此时,HER-2 和 CEP17 的信号相当,这种情况等同于 HER-2 的真正扩增,可以由 HER-2 持续过表达来进一步证实。因其特征性的信号模式,共扩增可以很容易与多倍体相区分。由于处在同一条染色体上,共扩增时可见成簇覆盖的 HER-2 以及 CEP17 信号。与此相反,多倍体时可在肿瘤细胞细胞核中见到 HER-2 和 CEP17 信号随机分布。本研究中尚未检测到 CEP17 缺失的样本,而文献报道 CEP17 缺失的比例是 2%~5%^[20]。

乳腺癌是一种具有不同分子亚型的遗传异质性疾病,其基因组具有不稳定性,常见的遗传学改变包

括染色体重排、基因扩增和缺失等^[21-25]。现已证实某些遗传学改变(如低分化导管内癌或小叶癌 16q 缺失^[26,27])与肿瘤不同的病理类型或组织学分级相关,HER-2 基因扩增具有指导用药和预测预后的价值^[28-30]。曲妥珠单抗或酪氨酸激酶抑制剂治疗 HER-2 阳性的乳腺癌,PARP 抑制剂治疗伴随 BRCA1、BRCA2 的基因突变的乳腺癌和卵巢癌。关于 HER-2 基因异常的信号的临床意义将是我们进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene [J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177-182.
- [2] Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(16): 1659-1672.
- [3] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(11): 118-145.
- [4] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Addition of Herceptin™ (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+MBC) markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial[J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16: abstr 377.
- [5] Couturier J, Vincent-Salomon A, Nicolas A, et al. Strong correlation between results of fluorescent in situ hybridisation and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/neu) gene status in breast carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2000, 13(11): 1238-1243.
- [6] Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, et al. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization[J]. *Mod Pathol*, 2000, 13(1): 37-45.
- [7] Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, et al. HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization [J]. *Mayo Clin Proc*, 2002, 77(2): 148-154.
- [8] Starr A, Bloom K, Oleske D, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochem-

- istry (IHC) in determining HER-2/neu status in breast cancer patients [J]. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2000, 19: abstr 2610.
- [9] Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, et al. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(10): 2714–2721.
- [10] Kostopoulou E, Vageli D, Kaisaridou D, et al. Comparative evaluation of non-informative HER-2 immunoreactions (2+) in breast carcinomas with FISH, CISH and QRT-PCR[J]. *The Breast*, 2007, 16(6): 615–624.
- [11] Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Specificity of Hercep Test in determining Her-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17 (7): 1983–1987.
- [12] Vranic S, Teruya B, Repertinger S, et al. Assessment of HER2 gene status in breast carcinomas with polysomy of chromosome 17[J]. *Cancer*, 2011, 117(1):48–53.
- [13] Moelans CB, de Weger RA, van Diest PJ. Absence of chromosome 17 polysomy in breast cancer: analysis by CEP17 chromogenic in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 120(1): 1–7.
- [14] Bartlett J, Going J, Mallon E, et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer[J]. *J Pathol*, 2001, 195(4): 422–428.
- [15] Watters AD, Going JJ, Cooke TG, et al. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 77(2): 109–114.
- [16] Bartlett J, Munro A, Desmedt C, et al. Cancer duplication of chromosome 17 CEP predicts for anthracycline benefit: a meta analysis of 4 trials [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(24): Suppl 3.
- [17] Bartlett J, Munro A, Dunn J, et al. Predictive markers of anthracycline benefit: a prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601)[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(3): 266–274.
- [18] Varga Z, Tubbs RR, Wang Z, et al. Co-amplification of the HER2 gene and chromosome 17 centromere: a potential diagnostic pitfall in HER2 testing in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, Jun 23. [Epub ahead of print].
- [19] Marchio C, Lambros MB, Gugliotta P, et al. Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis[J]. *J Pathol*, 2009, 219(1): 16–24.
- [20] Troxell ML, Bangs CD, Lawce HJ, et al. Evaluation of HER2/neu status in carcinomas with amplified chromosome 17 centromere locus[J]. *Am J Clin Pathol*, 2006, 126 (5): 709–716.
- [21] Chin K, DeVries S, Fridlyand J, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(6): 529–541.
- [22] Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, et al. Molecular evolution of breast cancer[J]. *J Pathol*, 2005, 205(2): 248–254.
- [23] Buerger H, Mommers EC, Littmann R, et al. Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution[J]. *J Pathol*, 2001, 194(2): 165–170.
- [24] Hwang ES, DeVries S, Chew KL, et al. Patterns of chromosomal alterations in breast ductal carcinoma in situ[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5160–5167.
- [25] Jones C, Ford E, Gillett C, et al. Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(18): 5988–5997.
- [26] Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, et al. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2007, 31(3): 417–426.
- [27] Reis-Filho JS, Simpson PT, Gale T, et al. The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization[J]. *Pathol Res Pract*, 2005, 201(11): 713–725.
- [28] Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(16): 1659–1672.
- [29] Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(16): 1673–1684.
- [30] Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354 (8): 809–820.
- [31] Hudis CA. Trastuzumab: mechanism of action and use in clinical practice[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(1): 39–51.