荧光原位杂交与免疫组化法检测乳腺癌 HER-2 表达的临床意义

Fluorescence *in situ* Hybridization and Immunohistochemistry in Detection of HER-2 for Breast Cancer // *YAO Guo-dong, HOU Ming-xing, YUAN Hong-wei, et al.*

姚国栋[1],侯明星[1],袁宏伟[1],张永胜[2],王志强[3],罗　力[1],董培德[1],乌新林[1],苏秀兰[1],孟兴凯[1]

(1.内蒙古医学院附属医院,内蒙古 呼和浩特 010020;2.内蒙古公安边防武警医院,内蒙古 呼和浩特 010010; 3.内蒙古医学院解剖教研室,内蒙古 呼和浩特 010110)

摘　要:[目的] 探讨乳腺癌中荧光原位杂交(FISH)检测 HER-2 基因的扩增和免疫组织化学(IHC)检测 HER-2 蛋白表达在临床诊断及分子靶向治疗中的应用。[方法] 采用 FISH 与 IHC 检测 50 例乳腺癌组织中 HER-2 基因的扩增与 HER-2 蛋白表达。[结果] 50 例浸润性乳腺癌中,FISH 检测 HER-2 基因扩增阳性 15 例 (30%),IHC 检测 HER-2 蛋白表达(−~+)40 例, HER-2 蛋白表达(++)的 2 例, HER-2 蛋白表达(+++)的 8 例。[结论] FISH 检测 HER-2 基因的扩增与 IHC 检测 HER-2 蛋白表达 (++~+++) 有较高的一致性。对于 IHC 检测 HER-2(−~++)表达时,必须进一步 FISH 检测。

主题词:荧光原位杂交;免疫组织化学;HER-2;乳腺肿瘤
中图分类号:R737.9　　**文献标识码**:B
文章编号:1671-170X(2012)04-0306-03

乳腺癌是目前威胁妇女健康和生命的重要恶性肿瘤之一。随着分子生物学技术及相关学科的发展,人类表皮生长因子Ⅱ(HER-2)已成为乳腺癌治疗及预后的研究热点。HRE-2 是定位于人类染色体 17q12-21.3 的原癌基因,编码一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜生长因子受体。研究发现约有 30% 的浸润性乳腺癌和 70%的导管原位癌中可发现 HER-2 的过表达[1,2]。乳腺癌患者 HER-2 高水平表达不仅提示预后,同时也对临床治疗方案的选择有指导作用,尤其是针对 HER-2 过度表达的免疫治疗 Herceptin 的临床应用[3-5],目前临床上常用免疫组化法(immunohistochemistry,IHC)检测 HER-2 受体蛋白的表达,其费用低、简便、对材料和设备要求不高,因此被广泛应用,但也有其局限性。荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization,FISH)被认为是检测 HER-2 基因的金标准,但其价格贵,对设备要求高。因为只有 HER-2 过度表达的乳腺癌患者用 Hercetin 单抗治疗才有效, 且该药物比较昂贵,故对 HER-2 表达情况的检测至关重要。本实验探讨 FISH 和 IHC 联合检测乳腺癌患者 HER-2 的表达,为选择靶向治疗药物方案及预后的判断提供可靠的依据。

基金项目:卫生部科研基金资助项目(WKJ2007-3-001)
通讯作者:侯明星,医务部长,主任医师,硕士;内蒙古医学院附属医院外科,内蒙古自治区呼和浩特市回民区通道北街 1 号(010020);E-mail:hmx6412@163.com。
收稿日期:2011-09-23;**修回日期**:2012-01-20

1　材料与方法

1.1　一般资料

收集 2007 年 5 月至 2008 年 3 月内蒙古医学院附属医院普外科手术切除的女性浸润性乳腺癌标本 50 例,年龄 24~69 岁,平均年龄 47.5 岁。术前均未接受放化疗。标本离体后立即取材,并用 10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋,4~6μm 切片。

1.2　实验试剂

HER-2 兔抗人多克隆抗体(货号 ab62496)、免疫组织化学 SP 染色试剂盒(货号 KIT-9710)购自福建迈新生物工程有限公司。FISH 检测用 HER-2 探针购自北京金菩嘉医疗科技公司,内含 GLPHER-2/CSP 17(CSP 17 为对照探针)探针、缓冲液及 DAPI 复染剂。荧光显微镜为日本奥林帕斯公司产品(BX51)。

1.3　实验方法

1.3.1　IHC 检测

采用 SP 免疫组织化学方法检测。石蜡包埋组织切片(4μm)经常规脱蜡至水,按试剂盒操作说明进行,微波抗原修复,HER-2 抗体、(2.5μg/ml 稀释),PBS 代替一抗作阴性对照,DAB 显色,苏木精复染,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.3.2　FISH 检测

标本预处理程序严格按照说明书进行。将标本固定于 10%中性甲醛 24~48h,石蜡包埋后标出杂交区域。切片厚 4~6μm,65~75℃烤片。二甲苯脱蜡至水化,室温下依次以 100%、85%和 70%乙醇各 2min 脱水,去离子水中浸 3min。50℃下浸入 30%酸性亚硫酸钠 30min,2×SSC 缓冲液洗片 2 次后放入 37℃蛋白酶 K 溶液 4~10min。再次洗片后置入 0.1mol/L HCl,室温下浸泡 5min。洗片后玻片依次置于-20℃70%、85%和 100%乙醇中脱水各 2min。室温下浸入丙酮 2min,空气中自然干片。置 46℃烤片机上预热 2~5min 后与探针杂交。若探针混合物尚未完成变性, 玻片可置于 46℃烤片机上较长时间预热。探针混合准备及变性:室温下将 7μl 杂交缓冲液、1μl 去

离子水、2μl 探针加入到微量离心管中。离心 3s。涡旋混匀后再次短暂离心。将离心管置于 73℃±1℃水浴中变性 5min。探针与样本杂交:将 10μl 变性后的探针混合物滴于杂交区域,立即加盖盖玻片,用橡皮胶封边,置于预热的湿盒中,42℃保温过夜杂交。玻片洗涤:移去盖玻片,分别用 46℃的 50%甲酰胺/2×SSC 溶液洗涤 3 遍,各 10min,用 46℃的 2×SSC 溶液洗涤 1 遍 10min,用 46℃的 2×SSC/0.1%NP-40 溶液洗涤 1 遍 5min。将玻片室温浸泡在 70%乙醇中 3min 取出。暗处自然干燥玻片。将 15μl DAPI 复染剂滴加于杂交区位置,立即盖上盖玻片,暗处放置 10min 后,使用 OLYMPUS 荧光显微镜观察,用冷光源的 CCD 成像系统,用不同的滤片分别在同一视野拍摄出红色、绿色、蓝色的荧光信号,Photoshop 软件融合各自得到的图像。乳腺癌组织杂交的细胞中有 75%的细胞核显示出双色信号时,为试验成功。

1.4 结果判断标准

IHC:按照福建迈新生物工程有限公司提供的分级标准进行结果判读。全部癌细胞中细胞膜均无染色或<30%癌细胞膜染色者结果为"-";>30%癌细胞膜不完整染色者结果为"+";>30%癌细胞膜轻度至中度完整染色者结果为"++";>30%癌细胞膜完整强染色者结果为"+++",并按照 2006 年《乳腺癌 HER-2 检测指南》标准将-、+归为阴性,其余为阳性。

FISH:计数 30 个细胞核大小一致、核的边界完整、DAPI 染色均一、细胞核孤立无重叠、绿色着丝粒信号清晰的双色信号癌细胞。统计 Ratio 值(Ratio 值=30 个细胞核中红信号总数/30 个细胞核中绿信号总数)。Ratio<1.8 为阴性结果,提示该样本无 HER-2 基因扩增;Ratio > 2.2 为阳性结果,提示样本中 HER-2 基因发生扩增;Ratio 在 1.8~2.2 之间时,可以选择增加计数细胞至 100 个或重做 FISH 实验来判断最终结果。若众多信号连接成簇时可不计算,即视为基因扩增;若 HER-2 基因扩增在不同癌细胞中存在异质性时,在另一癌区域再计算 20~30 个癌细胞核中的红、绿信号比值,计算其最大值,并加以注释[3]。在观测信号时,应根据情况随时调整显微镜的焦距,准确观测位于细胞核不同平面上的信号以免遗漏,并注意 G_2 期细胞内的基因拷贝数目特征[6]。

1.5 统计学处理

实验数据采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,IHC 与 FISH 采用 *Kappa* 一致性检验分析,$P<0.05$ 认为两种方法检验具有一致性。

2 结 果

FISH 结果 50 例浸润性乳腺癌中,FISH 检测 HER-2 基因扩增 15 例,占总例数的 30%;IHC 检出 HER-2 蛋白(+)的 22 例,(++)的 2 例,(+++)的 8 例,按乳腺癌 HER-2 检测指南,++~+++为阳性,本组 IHC 检测 HER-2 蛋白阳性率为 20%。见表 1、图 1~6。

HER-2 蛋白表达 18 例(-)中有 1 例基因扩增,22 例(+)中有 6 例基因扩增,2 例(++)均有扩增,8 例(+++)中有 6 例扩增。此结果表明 IHC 检测 HER-2 蛋白和 FISH 检测 HER-2 基因扩增有较高的一致性(κ=0.642,P=0.000)。

表 1 50 例乳腺癌 HER-2 IHC 和 FISH 检测结果比较

IHC	例数	FISH		
		无扩增	扩增	扩增率(%)
(-)	18	17	1	17.5
(+)	22	16	6	27.3
(++)	2	0	2	100.0
(+++)	8	2	6	75.0
合计	50	35	15	30.0

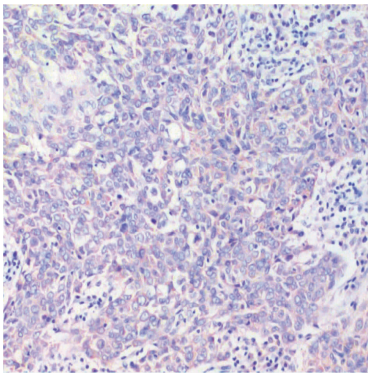

图 1 HER-2 蛋白表达(-)(IHC×400)

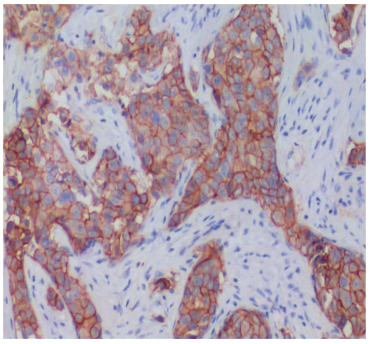

图 2 HER-2 蛋白表达(++)(IHC×400)

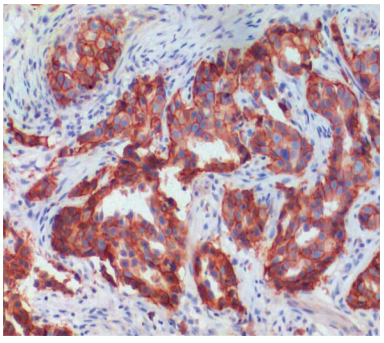

图 3 HER-2 蛋白表达(+++)(IHC×400)

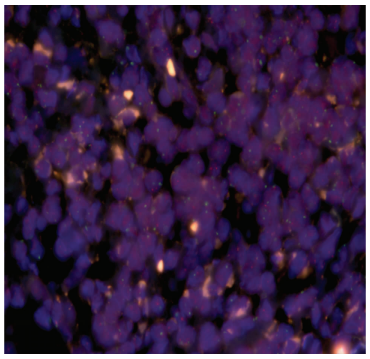

图 4　HER-2 基因未扩增(FISH×1000)

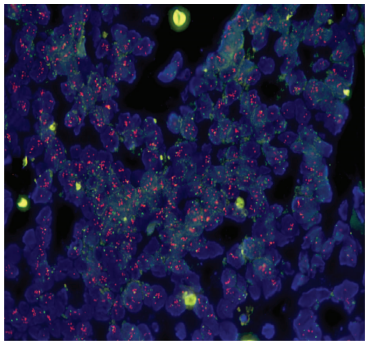

图 5　HER-2 基因扩增(FISH×1000)

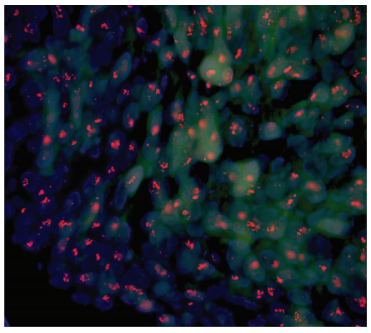

图 6　HER-2 基因扩增(FISH×1000)

3　讨　论

HER-2 自从被发现以来就一直是人们研究关注的热点，随着研究的不断深入以及技术方法的不断改进，HER-2 与乳腺癌的发病、发展、激素和 Herceptin 治疗及预后越来越密切相关，检测 HER-2 基因及其表达产物已成为常规。目前美国食品及药物管理局 (FDA) 批准用于 HER-2 检测的方法有 2 种：即检测 HER-2 蛋白的免疫组化法(IHC)和检测 HER-2 基因的荧光原位杂交法(FISH)，FISH 方法因其高度敏感性和特异性及高度重复性和可靠性在 HER-2 基因检测中被当作金标准用于 HER-2 基因检测[7]，与其他实验技术一样也受到一些因素的影响如标本固定时间长、烤片温度过高、蛋白消化不当、变性温度差异，都会使信号减弱或无信号；而 IHC 技术具有简便、廉价快速等特点，而成为目前病理学实验室检测 HER-2 蛋白表达的首选方法，但由于 IHC 本身的因有特点，在标本的固定和处理中蛋白易受到破坏，抗原修复时提高了灵敏度而降低了特异性，不同批号抗体之间的差异，以及结果平分的主观判断等因素，都将影响 IHC 的准确性。鉴于上述这些影响因素，IHC 和 FISH 检测 HER-2 状态时结果不尽一致。我们采用 IHC 和 FISH 方法检测 HER-2 蛋白和基因状态。检查发现 IHC(−~+)及(+++)与 FISH 检测结果一致性较好；而 IHC(++)与 FISH 检测结果完全一致，与国内外文献[8]报道相差较大。

本实验 FISH 法检测和 HER-2 基因的扩增结果阳性比例为 30%，与国内外实验室 20%~30%的结果一致[8]。有研究表明，对于 FISH 检测阳性患者，IHC 检测阴性患者，其 Herceptin 治疗后的生存是与 FISH 检测阳性、IHC 检测阳性患者的生存期一致，而 FISH 法检测阴性，IHC 检测阳性患者，治疗后的生存与 FISH 法检测阴性、IHC 检测阴性患者的生存期一致。这说明 IHC 检测存在假阳性，目前研究认为主要与 17 号染色体多体有关[9]。

综上所述，IHC 和 FISH 两种方法结果之间有很好的相关性。对于 IHC(−~+)HER-2 表达时，必须进行 FISH 检测；IHC(++)的患者，也应增做 FISH 检查。因此，该实验证实只要严格按照规范法的实验流程及建立科学规范质量控制体系，FISH 技术应用于乳腺癌 HER-2 基因的检测是切实可行的。

参考文献：

[1] Ross JS,Gray GS. Targeted therapy for cancer:the HER2/neu and Herceptin story [J]. Clin Leadersh Manag Rev, 2003,176(6):333-340.

[2] Press MF,Sauter G,Bernstein L,et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target:an assessment of accuracy and repyodcibility of laboratory testing in large, prospective, randmized clinical trials[J]. Clin Cancer Res, 2005,11(18):6598-6607.

[3] 《乳腺癌 HER2 检测指南》编写组.乳腺癌 HER2 检测指南[J].中华病理学杂志,2006,35(10):631-633.

[4] 王涛，江泽飞，宋三秦，等.单药赫塞汀治疗复发转移乳腺癌[J].中华肿瘤杂志，2004，26(6)：430-433.

[5] Romond EH,Perez EA,Bryant J,et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2 positive breast cancer[J]. Engl J Med,2005,353(16):1659-1672.

[6] Hicks DG,Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization a technical review with interpretive guidelines [J]. Hum Pathol, 2005,36:250-261.

[7] Cell Markers and Cytogenetics Committees College of American Pathologists. Clinical laboratory assays for HER2/neu amplification and overexpression: quality assurance, standardization, and proficiency testing [J]. Arch Pathol Lab Med, 2002,126(7):803-808.

[8] 郭华雄，邓明风，陈登峰，等.FISH 和 IHC 检测 HER2 基因及蛋白在乳腺癌诊治中的应用[J].中国组织化学与细胞化学杂志，2010，19(4)：353-356.

[9] 吕亚莉，钟梅，刘琳，等.355 例乳腺癌 HER2 基因扩增及 17 号染色体多体的临床病理学分析 [J]. 诊断病理学杂志，2008，15(6)：169-173.