荧光原位杂交与免疫组织化学方法对乳腺癌 Her-2 检测的比较

徐国森[1],林海峰[1],佟丹丹[1,2],耿敬姝[1]
(1.哈尔滨医科大学附属第三医院,黑龙江 哈尔滨 150086;
2.哈尔滨医科大学病理教研室,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘　要:[目的]探讨荧光原位杂交(FISH)与免疫组织化学方法(IHC)检测乳腺癌组织中人类表皮生长因子受体 2(Her-2)表达结果的差异。[方法]采用 FISH 和 IHC 法分别检测 508 例乳腺癌标本中 *Her-2* 基因扩增和 Her-2 蛋白表达状况。[结果]在 IHC 法检测 Her-2 蛋白表达 0/+的 104 例(20.47%)标本中,FISH 检出 13 例(2.56%)*Her-2* 基因扩增,89 例(17.52%)为非扩增,2 例(0.39%)为可疑;Her-2 蛋白表达++的 245 例(48.23%)标本中,FISH 检出 121 例(23.82%)*Her-2* 基因扩增,120 例(23.62%)为非扩增,4 例(0.79%)为可疑;IHC 在 Her-2 蛋白表达+++的 159 例(31.30%)标本中,FISH 检出 137 例(26.97%)*Her-2* 基因扩增,22 例(4.33%)为非扩增。[结论]对于 IHC 法初筛 Her-2 蛋白为++~+++的患者必须进行 FISH 检测,以明确 *Her-2* 基因的状态,从而指导临床医师诊断治疗。
主题词:乳腺肿瘤;荧光原位杂交;人类表皮生长因子受体;免疫组织化学;多倍体
中图分类号:R737.9　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-170X(2012)12-0939-05

Comparison of Her-2 Detections by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) and by Immunohistochemistry (IHC) in Breast Cancer

XU Guo-sen[1], LIN Hai-feng[1], TONG Dan-dan[1,2], et al.
(1. *The Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin* 150086, *China*; 2. *Department of Pathology, Harbin Medical University, Harbin* 150086, *China*)

Abstract: [Purpose] To investigate the difference of Her-2 expression detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and by immunohistochemistry (IHC) in breast cancer. [Methods] Both IHC and FISH techniques were performed to detect *Her-2* gene amplification and Her-2 protein expression respectively in 508 samples with breast cancer. [Results] Among 104 cases (20.47%) with 0/+ Her-2 protein expression detected by IHC, 13 cases(2.56%) were *Her-2* gene amplification detected by FISH; 89 cases (17.52%), non-amplification; 2 cases (0.39%), suspicious. Among 245 cases (48.23%) with ++ Her-2 protein expression, 121 cases (23.82%) were *Her-2* gene amplification; 120 cases(23.62%), non-amplification; 4 cases(0.79%), suspicious. Among 159 cases (31.30%) with +++ Her-2 protein expression, 137 cases (2.97%) were *Her-2* gene amplification; 22 cases(4.33%), non-amplification. [Conclusion] Detecting the amplification of *Her-2* gene with FISH may be helpful to know *Her-2* gene status for treatment decision in breast cancer patients with positive Her-2 expression ++~+++ by IHC.
Subject words: breast neoplasms; fluorescent *in situ* hybridization; human epithelium growth factor receptor; immunohistochemistry; polyploidy

近些年来,由于受到饮食、环境等诸多因素的影响,女性乳腺癌的发病率逐年增高[1~3],且在我国患者年龄年轻化趋势明显,是女性最常见的恶性肿瘤之一[4,5]。人类表皮生长因子受体 2(*Her-2*)是原癌基因,也称 *c-erbB-2* 基因,是编码一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白,在 20%~30%的乳腺浸润性导

基金项目:黑龙江省自然基金(D200921);哈尔滨医科大学附属第三医院院内基金。
通讯作者:耿敬姝,主任医师,博士生导师,博士;哈尔滨医科大学附属第三医院病理科,黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号(150086);E-mail: jeangeng2004@yahoo.com.cn。
收稿日期:2012-10-03;**修回日期**:2012-11-24

管癌中有过度表达[4-9],过度表达的患者容易复发、转移,预后较差。大量研究已证实,*Her-2* 基因扩增既与乳腺癌的发生、发展及预后密切相关,对临床药物治疗的选择也非常重要。免疫组织化学方法(IHC)检测 Her-2 蛋白和荧光原位杂交(FISH)检测 *Her-2* 基因是目前临床诊断最常用的两种方法。IHC 由于操作简单且价廉,应用广泛,而 FISH 检测 Her-2 的灵敏度高、特异性强。本研究拟比较两种检测方法的差异,为乳腺癌的临床治疗和预后判断提供准确的依据。

1 资料与方法

1.1 标本资料

选取 2009 年 7 月至 2012 年 7 月期间经哈尔滨医科大学附属第三医院病理科确诊的手术切除浸润性乳腺癌患者的肿瘤标本,共 508 例。标本于 4%甲醛(pH=7.4)中固定 24h。所有标本均经病理学诊断为浸润性癌。

1.2 Her-2 蛋白的 IHC 检测及结果判读

将每个标本对应的蜡块制成 3~4μm 的组织切片,使用 Roche Bench Mark 全自动免疫组织仪和抗 Her-2 蛋白的单克隆抗体。Her-2 阳性判断标准根据美国临床肿瘤学会(American Society of Clinical Oncology,ASCO)和美国病理学家学会(College of American Pathologists,CAP)推荐的乳腺癌中 Her-2 表达检测指南[10~14]。IHC 标记的操作顺序依次为脱蜡、水化,于修复液中 90℃~95℃抗原修复 20min,缓冲液中漂洗,过氧化物酶阻滞液中孵育 5min,随后加入 Her-2 一抗,孵育 30min,DAB 显色剂中反应 30min,最后漂洗封片。免疫组化的结果由有 10 年以上经验的病理医师判读。IHC 结果 0 为完全阴性,无表达,IHC+为微弱的胞膜表达,IHC++为轻至中等强度的不连续的胞膜表达,IHC+++为完整的勾勒出胞膜的强表达,且这种表达的细胞占肿瘤细胞的 30%以上[4,14]。

1.3 *Her-2* 基因的 FISH 检测及结果判读

Her-2 基因扩增的 FISH 检测由哈尔滨医科大学附属第三医院病理科和北京金菩嘉生物技术有限公司合作完成。双色探针(北京金菩嘉生物技术有限公司产品)包括 17q11.2~q12(编码整个 *Her-2* 基因片段)和 17p11.1~q11.1(着丝粒)作为对照,前者用红色荧光素标记,后者用绿色荧光素标记。4μm 厚石蜡切片 65℃烤箱中过夜,二甲苯中脱蜡 2 次,每次 10min,依次梯度脱水 3min(乙醇浓度分别为 100%、85%、70%),之后于 90℃纯水中加热 15min。依据组织的具体情况,在 37℃蛋白酶中消化 7~15min。于室温下,在缓冲液(2×柠檬酸钠生理盐水,2×SSC,pH=7.2)中漂洗 5min,依次梯度水化 3min(乙醇浓度分别为 70%、85%、100%),自然晾干。为使 DNA 变性,将玻片置于 78.5℃的 70%甲醛/2×SSC 混合液中 10min,之后于 75%乙醇中水化 3min。在室温中自然晾干后加入探针 10μl,树脂封片,42℃下于杂交仪中过夜。杂交 14~16h 后 2×SSC 中漂洗 3 次,每次 3min;用 70%乙醇漂洗 5min,自然晾干后加入 DAPI 染色 15min,盖玻片封片后于荧光显微镜下观察染色计数。加入探针后均暗室避光操作以防荧光淬灭。FISH 结果由一名经培训的细胞技术员和两名病理科医师共同判读。随机计数浸润性乳腺癌细胞 30 个,将 *Her-2* 与 CEP17(17 号染色体着丝粒位点)的比值记为 R,当 R>2.2 为阳性,*Her-2* 基因发生扩增;当 R<1.8,则 FISH 为阴性,*Her-2* 基因无扩增;当 R 值介于 1.8 与 2.2 之间时为可疑[4,14]。为真实反应 IHC 和 FISH 结果的一致性,IHC 和 FISH 结果的判读由不同的病理科医师依据 ASCO 和 CAP 的推荐指南在双盲的情况下判定。

1.4 统计学处理

测得的数据应用 SPSS16.0 软件行统计分析,采用 Kappa 一致性检验分析 FISH 与 IHC 两种检测方法,$P<0.05$ 认为两种方法检验具有一致性。符合率采用 Fisher 确切概率法检验分析。

2 结 果

2.1 IHC 检测结果

508 例浸润性乳腺癌标本中 5 例(0.98%)IHC 检测结果为阴性,99 例(19.49%)为+,245 例(48.23%)为++,159 例(31.30%)为+++(图 1~3)。

2.2 FISH 检测结果

508 例浸润性乳腺癌标本中 271 例(53.35%)FISH 检测结果为阳性,*Her-2* 基因发生扩增,231 例(45.47%)为阴性,*Her-2* 基因无扩增,6 例(1.18%)为

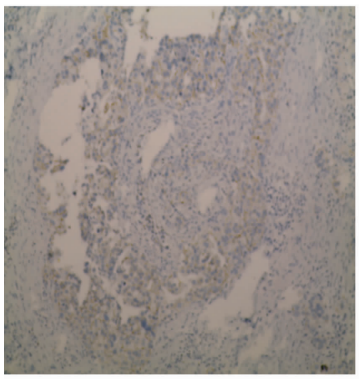

图 1　乳腺癌 IHC 检测+ (×100)

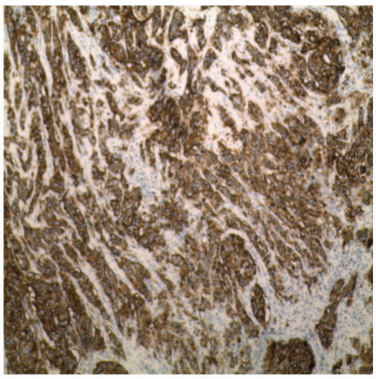

图 2　乳腺癌 IHC 检测++ (×100)

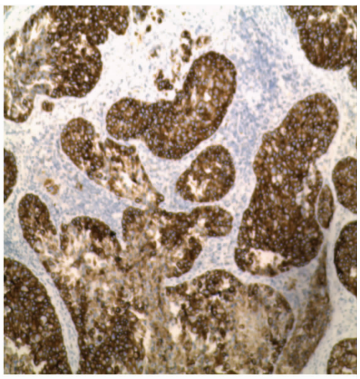

图 3　乳腺癌 IHC 检测+++ (×100)

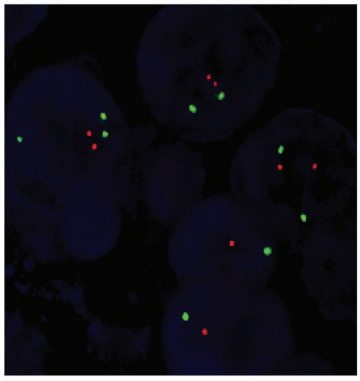

图 4　乳腺癌 *Her-2* 基因扩增阳性，成簇(×1000)

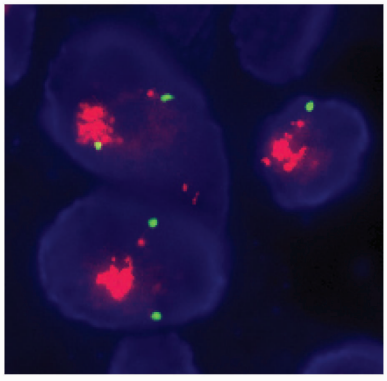

图 5　乳腺癌 *Her-2* 基因扩增阴性 (×1000)

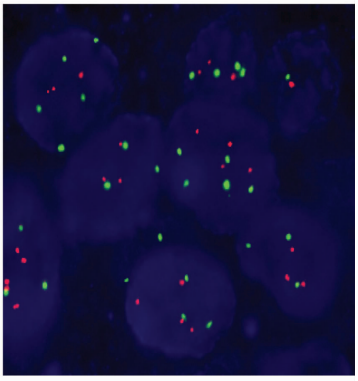

图 6　乳腺癌多倍体(×1000)

可疑(图 4、5)。

2.3　FISH 与 IHC 检测结果的比较

在 IHC 法检测 Her-2 蛋白表达 0/+的 104 例(20.47%)标本中，FISH 检出 13 例(2.56%)*Her-2* 基因扩增，89 例(17.52%)为非扩增，2 例(0.39%)为可疑；Her-2 蛋白表达++的 245 例(48.23%)标本中，FISH 检出 121 例 (23.82%)*Her-2* 基因扩增，120 例(23.62%) 为非扩增，4 例 (0.79%) 为可疑；IHC 在 Her-2 蛋白表达+++的 159 例(31.30%)标本中，FISH 检出 137 例(26.97%)*Her-2* 基因扩增，22 例(4.33%)为非扩增。*Her-2* 基因的 FISH 检测结果的阳性率为 53.35%(271/508)。IHC 检测结果中以++~+++为阳性结果的阳性率 79.53%(404/508)。如以 *Her-2* 基因的 FISH 检测结果为标准，IHC 与 FISH 检测结果一致的阳性标本 258 例，阴性标本 91 例，两种方法检测结果的总符合率为 68.70%(349/508)。此结果表明 IHC 检测 Her-2 蛋白和 FISH 检测 *Her-2* 基因扩增有一致性(κ=0.2547，*P*=0.000)。详见表 1。

表 1　FISH 与 IHC 结果的对比

FISH*	IHC			合计
	0/+	++	+++	
R<1.8	89	120	22	231
1.8≤R≤2.2	2	4	0	6
R>2.2	13	121	137	271
合计	104	245	159	508

*:R 值为 *Her-2* 与 CEP17(17 号染色体着丝粒位点)的比值。

2.4　17 号染色体多倍体的表达关系

本实验收集的 508 例患者中，FISH 检测中多倍体(图 6)为 257 例，占总标本的 50.59%(257/508)，其中 IHC 结果 0/+者 25 例占 Her-2 蛋白表达 0/+总数的 24.04%(25/104)，++者 144 例占 Her-2 蛋白表达++总数的 58.78%(144/245)，+++者 88 例，占 Her-2 蛋白表达+++总数的 55.35%(88/159)。而多倍体伴 Her-2 扩增为 154 例，多倍体伴非 Her-2 扩增中 100 例为非扩增，3 例为可疑。两组比较差异显著 (*P*=0.0000)。见表 2。

表 2　多倍体在 IHC 及 FISH 检测结果的表达情况

	多倍体伴 *Her-2* 扩增	多倍体伴非 *Her-2* 扩增
IHC		
0/+	1	24
++	74	70
+++	79	9
FISH		
R<1.8	0	100
1.8≤R≤2.2	0	3
R>2.2	154	0

3　讨　论

人类表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是一族具有酪氨酸激酶活性的高同源性蛋白质。包括 Her-1、Her-2、Her-3 和 Her-4。*Her-2* 原癌基因位于 17 号染色体 q21 上，编码 p185 跨膜糖蛋白。它参与抑制细胞凋亡,维持或促进肿瘤细胞生长;上调血管内皮生长因子(VEGF)/血管通透性因子(VPF),促进肿瘤新生血管生成;增加肿瘤细胞的侵袭力,破坏机体组织抗侵袭屏障等。Her-2 过表达型乳腺癌有其特殊的生物学特性，肿瘤细胞侵袭力强,容易发生转移,恶性度高。

IHC 和 FISH 结果的偏差定义为,不符合性包括以下两种情况：①IHC 结果为++、+++但 FISH 结果为阴性;②IHC 结果为阴性或+,但 FISH 结果为阳性[5]。本实验将 IHC 不符合率定义为,FISH 结果为阳性但 IHC 为阴性（即 FISH 阳性但 IHC 结果为阴性或+)例数与 IHC 检测结果为阴性或+的总例数的比值,本文为 12.5%(13/104)。同样的,FISH 结果为阴性,但 IHC 结果为阳性(即 FISH 结果为阴性,但 IHC 结果为++、+++）的例数与 IHC 结果为++~+++的总例数的比值,为 36.14%(146/404)。总的不符合率为 31.30%(159/508)。本研究中,FISH 与 IHC 检测 Her-2 状态的符合率达 68.70%,与国外的研究报道基本一致[14-18]。在 IHC 检测 Her-2 结果为++~+++的病例中,258 例 FISH 为阳性，占总数的 50.79%(258/508)，这一部分患者进行 FISH 检测的临床意义最大,与国内、外研究结果一致。本研究还表明,有 13.13%(13/99)IHC 结果显示为+的乳腺癌,其 FISH 结果为阳性。本研究中有了 5 例对 IHC 结果显示为阴性的乳腺癌患者进行 FISH 检测，其结果均为 FISH 阴性,*Her-2* 基因无扩增,符合 ASCO 对 IHC 结果阴性的乳腺癌不必进行 FISH 检测的推荐。而在本研究中还显示有 13.84%(22/159) 的 IHC 标记 Her-2 结果为+++的病例,其 FISH 结果为阴性,FISH 检测结果中有 6 例判读为可疑，其中 IHC 结果 0/+占 2 例,IHC 结果++占 4 例。通过本研究对两种检测方法的比较，可以确定 FISH 检测是较 IHC 检测 *Her-2* 基因的更好的方法。

多倍体(polyploid)是指在体细胞中含有三个以上染色体组的个体。多倍体也叫多体,多体在生物界广泛存在，是在癌细胞中普遍存在的遗传学特征之一[19-21]。研究表明 17 号染色体多倍体是影响 *Her-2* 基因 FISH 检测结果的重要因素之一。在本研究 FISH 检测结果中多倍体占 50.59%(257/508),与 Watters 等[19] 的研究认为,大约 50%左右的浸润性乳腺癌患者癌细胞的 17 号染色体为非整倍体的研究结果一致,而为了避免由于 17 号染色体多倍体引起 FISH 的误差，本研究经扩大计数范围判定染色体多倍体的 R 值,其中多倍体在 IHC 结果 0/+者 25 例占(24.04%),++者 144 例(58.78%),+++者 88 例(55.35%),而多倍体伴 Her-2 扩增为 154 例,多倍体伴非 Her-2 扩增中 100 例为阴性,3 例为可疑。在乳腺癌中 17 号染色体多体和 *Her-2* 基因扩增应该是两个不同意义的临床病理参数,而单纯 17 号染色体多体应该判定为 *Her-2* 基因为阴性[19,21]。还有文献报道:17 号染色体多倍体导致 Her-2 拷贝数增多,引起蛋白过表达,而无 *Her-2* 基因扩增。表明 FISH 检测 17 号染色体多倍体与 *Her-2* 基因的扩增不相关，所以通过 FISH 检测方法对乳腺癌进行多倍体检测筛查,可避免假阳性结果的发生。

综上所述，临床应用 IHC 法检测乳腺癌 Her-2 蛋白表达具有一定的准确度,但由于 IHC 的检测对象为 Her-2 蛋白，在标本固定和处理中可能会使蛋白质变性破坏而影响检测结果,17 号染色体的非整倍体现象会出现假阳性结果,主观判断的误差等,可直接影响结果的可靠性，所以 FISH 检测乃是指导临床治疗的较好方法。当 IHC 法检测为 Her-2 蛋白表达++~+++时,应进一步做 FISH 检测确诊,以明确 *Her-2* 基因是否扩增;而 IHC 结果为+时,有少部分患者的 FISH 检测为 *Her-2* 基因扩增,这部分病患采用曲妥珠单抗治疗也有一定的临床意义。所以本研究认为对 IHC 法检测 Her-2 蛋白表达++~+++时的

病患都必须进行 FISH 检测，才能更加准确和客观地为临床医师采用曲妥珠单抗类药物对乳腺癌患者进行靶向治疗提供可靠的依据，而 IHC 法检测 Her-2 蛋白表达+的患者应是根据患者的临床表现和经济条件，酌情推荐做 FISH 检测。

参考文献：

[1] Chu D，Lu J. Novel therapies in breast cancer: what is new from ASCO 2008[J]. J Hematol Oncol，2008，1:16.

[2] Greenlee RT，Hill-Harmon MB，Murray T，et al.Cancer statistics[J].CA Cancer J Clin，2001，51(1):15–36.

[3] 王合兵.Her-2 过表达与乳腺癌治疗的研究进展[J].肿瘤学杂志，2008，14(2):151–153.

[4] 姚国栋，侯明星，袁宏伟，等.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[J].肿瘤学杂志，2012，18(4):306–308.

[5] 郑莹，李德錄，向泳梅，等.上海市区乳腺癌流行现状及趋势分析[J].外科理论与实践，2001，6(4):219–221.

[6] 吴涛，何显力，李怡，等.FISH 检测乳腺癌组织 Her-2 原癌基因 50 例分析[J].陕西医学杂志，2011，40(4):423–425.

[7] 谢静，郭滟，袁菲，等.IHC 和 FISH 联合检测278 例浸润性乳腺癌中 Her-2 状态的研究[J].外科理论与实践，2010，15(5):499–503.

[8] Kurosumi M. Recent trends of Her-2 testing and trastuzumab therapy for breast cancer [J]. Breast Cancer，2009，16(4):284–287.

[9] Dizdar O，Altundag K. Emerging drugs in metastatic breast cancer [J]. Expert Opin Emerg Drugs，2009，14(1):85–98.

[10] Hyams DM. Understanding tumor profiling and assessing treatment[J]. Manag Care，2008，17(7 Suppl 7):4–8.

[11] Tsuda HH.Prognostic and predictive value of c-erbB-2 (Her-2/neu)gene amplification in human breast cancer[J]. Breast Cancer，2001，8(1):38–44.

[12] Keefe DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity [J].Cancer，2002，95(7):1592–1600.

[13] Hayes DF，Picard MH. Heart of darkness: the downside of trastuzumab[J]. J Clin Oncol，2006，24(25):4056–4058.

[14] Wolff AC，Hammond ME，Schwartz JN，et al. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologist's Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer [J].J Clin Oncol ，2007，25(1): 118–145.

[15] 王竹，吕青，王宇，等. 荧光原位杂交技术检测乳腺癌 Her-2/neu 扩增[J].华西医学，2010，25(1):49–52.

[16] 吕亚莉，钟梅，刘琳，等.335 例乳腺癌 Her-2 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(3):169–173.

[17] Dowsett M，Bartlett J，Ellis IO，et al.Correlation between immunohistochemistry (Hercep Test)and fluorescence in situ hybridization (FISH)for Her-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres[J].J Pathol，2003，199(4):418–423.

[18] Wang S，Saboorian MH，Frenkel E，et al.Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens :comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays[J].J Clin Pathol，2000，53 (5):374–381.

[19] 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.

[20] 王富文，应学翔，夏晓天，等.乳腺癌 17 号染色体多体对 Her-2 检测的影响及其临床病理学意义[J].肿瘤，2010，30(1):36–41.

[21] 赵坡，姜学革，李晓瑛，等. FISH 检测乳腺癌 Her-2 基因扩增及 17 号染色体多体状况及其临床病理学意义的分析[J].中华肿瘤防治杂志，2011，18(9):680–683.