

应用 2013 年 ASCO/CAP 指南对 Her-2IHC2+ 乳腺癌患者进行 Her-2FISH 分类

刘思诗,陈可心,耿敬姝

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院,黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:[目的] 探讨 2013 年 ASCO/CAP 指南对 IHC2+乳腺癌患者 Her-2FISH 分类的影响。[方法] 采用荧光原位杂交法检测 173 例 Her-2 免疫组化 2+的乳腺癌患者的 Her-2 基因的状态并应用 2013 年 ASCO/CAP 指南的标准对检测结果进行分析。[结果] 与 2007 年检测指南相比,使用 2013 年检测指南使 36 例患者发生了变化,取得了较高的阳性率 (28.3% vs. 23.1%) 和不确定率 (16.2% vs. 4.0%),阴性比例下降 (55.5% vs. 72.8%)。[结论] 2013 年指南的使用提高了阳性率和不确定患者的比例,从而提高了 Her-2 靶向治疗的病例数。FISH 对于 IHC2+的患者能够起到最后分类的作用,而 17 号染色体多体在 FISH 不确定的患者中占很大的比例。

关键词:Her-2;FISH;IHC2+;ASCO/CAP 指南

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1671-170X(2018)03-0203-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2018.03.B005

Her-2 FISH Classification of Equivocal Her-2 IHC Breast Cancer with 2013 ASCO/CAP Guideline

LIU Si-shi, CHEN Ke-xin, GENG Jing-shu

(The Affiliated Cancer Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: [Objective] To explore the ASCO/CAP guidelines for 2013 IHC2+ Her-2 FISH breast cancer classification. [Methods] Using fluorescence in situ-hybridization method to detect 173 cases of Her-2 immunohistochemical 2+ breast cancer patients in the state of the Her-2 gene ASCO/CAP guidelines of 2013 standard and applied to analyze test results. [Results] Compared with the testing guidelines in 2007, and 2013 were used to detect guidelines also resulted in the changes of 36 patients, the higher positive rate (28.3% vs. 23.1%) and the uncertain rate (16.2% vs. 4.0%), negative percentage (55.5% vs. 72.8%). [Conclusion] 2013 guidelines can improve the positive rate and the proportion of patients with uncertain, thus raise the number of cases of Her-2 targeted therapy, FISH for IHC2+ patients can have the effect of the final classification, and polysomy 17 in FISH make up a large proportion of patients with uncertainty.

Subject words: Her-2; FISH; IHC2+; 2013 ASCO/CAP guideline

人类表皮生长因子受体 2 基因(Her-2),是定位于人类 17 号染色体(Chr17)长臂(17q12)上的原癌基因,该基因在 15%~20%乳腺癌患者中有扩增或过表达^[1]。经研究证实^[1-6],Her-2 阳性的乳腺癌浸润性强、无病生存期短、预后差,其基因扩增与乳腺癌患者的复发、转移有关,且化疗效果欠佳,Her-2 状态的检测对于个体化癌症治疗和新靶向治疗临床试验是必不可少的^[7-9]。由于使用不同类型的技术和不

同类型的诊断试剂盒,乳腺癌 Her-2 状态的诊断是复杂的。有两种不同类型的技术检测已经被用来确定 Her-2 状态,免疫组织化学方法(IHC)用来评估 Her-2 蛋白表达水平,荧光原位杂交(FISH)用来检测 Her-2 基因的扩增,虽然 FISH 方法比免疫组化方法更加昂贵和耗时,但是许多研究表明这种成本的花费能够更加精确地指导 Her-2 靶向治疗^[10-14]。有相关统计数据表明^[15]当 IHC3+和 0、1+的时候,FISH 阳性率分别为 91.7%和 4.1%;而当 IHC2+时,一致性为 23%~25%,而免疫组化 2+的乳腺癌患者数量已经达到乳腺癌患者的四分之一^[16-20],所以临床有必要对

通讯作者:耿敬姝,病理科主任,主任医师,博士;哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科,黑龙江哈尔滨市南岗区哈平路 150 号(150081);
E-mail:jingshugeng@sina.com

收稿日期:2017-04-23;修回日期:2017-06-29

其进行进一步的检测。本研究对 173 例乳腺癌患者的 Her-2 状态进行回顾性分析, 分别根据 2007 年与 2013 年指南的 Her-2 判读标准分析其 Her-2 基因扩增状态, 旨在探讨 2013 年 ASCO/CAP 指南的更新对 Her-2 基因扩增状态的影响。

1 资料与方法

1.1 标本

收集哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科 2015 年浸润性乳腺癌标本 173 例, 患者手术前未接受任何治疗, 患者年龄 36~79 岁, 平均年龄 51 岁, 组织学分级: 浸润性乳头状癌 2 例, 乳腺黏液癌 2 例, 浸润性小叶癌 1 例, 浸润性导管癌 168 例。分期: II A 期 65 例, II B 期 73 例, III A 期 35 例。全部标本都经过福尔马林固定, 石蜡包埋, 4 μ m 连续切片, 56 $^{\circ}$ 烤箱过夜, 免疫组化 Her-2 检测为 2+ 的患者。

1.2 试剂

使用北京金菩嘉医疗科技有限公司生产的双探针试剂盒: 同时含有 Her-2 基因(标记为红色荧光)和该基因所在的 17 号染色体着丝粒(CEP17, 标记为绿色荧光)。

1.3 检测方法

采用荧光原位杂交(FISH)法。每例标本的切片都先由病理学家对浸润性乳腺癌区域做出标记, 选择细胞核大小一致、核边界完整、二脒基苯基吡啶(DAPI)染色均一、细胞核无重叠、信号清晰的细胞。随机计数至少 30 个浸润癌细胞核中的双色信号。在观察信号时, 应根据情况随时调节显微镜的焦距, 准确观察位于细胞核不同平面上的信号以免遗漏。当两位技术员结果不一致的情况下, 则由第三位最有经验的技术员重新进行计数细胞。所有标本都要根据 2007 年和 2013 年 ASCO/CAP 指南分别记录其结果。

1.4 结果判读

2007 年 ASCO/CAP Her-2 免疫组化和 FISH 的检测标准^[21]: (1) 对于 Her-2FISH 值, Her-2/CEP17 信号比值大于 2.2 时为 FISH 阳性, 比值小于 1.8 的时候为 FISH 阴性, 在 1.8~2.2 间为 FISH 不确定, Her-2 平均拷贝数 ≥ 6 时为 FISH 阳性, < 6 时为 FISH 阴性, 在 4~6 间为 FISH 不确定。2013 年 ASCO/CAP 指

南已经在 Her-2 分类上做出了重大改变, 包括以下内容: (1) 对于双探针原位杂交 Her-2/CEP17 阳性比值从 ≥ 2.2 降到 ≥ 2.0 。(2) 当 Her-2/CEP17 比值 < 2 时, 最后决定分类的是 Her-2 单拷贝数, Her-2 平均拷贝数 ≥ 6 时为 FISH 阳性, < 6 时为 FISH 阴性, 在 4~6 之间为 FISH 不确定。(3) FISH 不确定的患者需要重新计数其他细胞或者重复 FISH 检测。

1.5 统计学处理

采用 SPSS22.0 版本的统计软件进行数据分析, 组间比较采用经 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2007 年和 2013 年指南对 IHC2+ 的患者分类比较

根据 2013 年 ASCO/CAP 指南和 2007 年指南对 173 例免疫组化 Her-2 2+ 的患者分别进行分类并且进行比较, 根据 2013 年 ASCO/CAO 指南, 173 例患者中 49 例(28.3%)阳性, 96 例(55.5%)阴性, 28 例(16.2%)不确定, 而 2007 年指南分类 173 例患者中 40 例(23.1%)阳性, 125 例(72.8%)阴性, 7 例(4.0%)不确定, 因此 2013 年指南的使用使阳性率提高了 5.2%, 阴性率降低了 17.3%, 不确定提高了 12.2% (Table 1)。

2.2 比较 2007 年指南和 2013 年指南 Her-2FISH 分类变化

2013 年与 2007 年指南相比, 36 例患者发生了改变。2013 指南使 26 例患者从阴性提高到不确定, 有 5 例患者从阴性到阳性, 有 4 例患者从不确定到阳性。数据分析表明 2013 年指南与 2007 年指南相比 Her-2FISH 分类有了很大改变, 阳性和不确定的患者提高, 阴性患者下降 ($P < 0.001$)。

根据 2013 年 ASCO/CAP 指南, Her-2 靶向治疗可以应用于 49 例阳性患者和 28 例不确定患者, 对于同样的病例使用 2007 年指南将会有 40 例阳性病例和 7 例 (Her-2/CEP17 比值在 1.8~2.2 之间) 不确定患者中有 4 例可以应用 Her-2 (Her-2/CEP ≥ 2) 靶向治疗的。由于 2013 年 ASCO/CAP 指南在 Her-2 免疫组化 2+ 的患者中的应用, 提高了 19.1% 的患者可以应用 Her-2 靶向治疗 (Table 2)。

Table 1 Summary of reflex Her-2 FISH results in 172 Her-2 IHC 2+ equivocal cases with use of the 2013 versus the 2007 guideline

Result	Of cases classified with 2007 guideline	Of cases reported with 2013 guideline	Difference (%)
FISH positive	40(23.1%)	49(28.3%)	+5.2
FISH negative	126(72.8%)	96(55.5%)	-17.3
FISH equivocal	7(4.0%)	28(16.2%)	+12.2

2.3 当阳性和不确定患者结合时 2007 年和 2013 年指南 Her-2FISH 分类变化

当阳性和不确定患者结合统计,2013 年和 2007 年 ASCO/CAP 指南 Her-2FISH 分类发生了显著性变化 ($P < 0.001$)。根据 2013 年指南分类阳性和不确定患者有了很大的提高 (17.3%) (Table 3)。

2.4 2013 年指南 Her-2FISH 阳性和不确定的患者 Her-2/CEP 比值、Her-2 拷贝数、CEP17 拷贝数的分类

根据 2013 年指南对阳性和不确定的患者的 Her-2/CEP17 比值, Her-2 基因和 CEP17 拷贝数进行统计, 与阳性患者相比较, 不确定患者组表现出高比例的 CEP17 拷贝数 ≥ 3 (75% vs. 34.7%, $P = 0.001$) (Table 4)。

Table 2 Her-2 FISH classification changes by use 2013 guideline versus 2007 guideline

Her-2 FISH using 2007 guideline	Her-2 FISH using 2013 guideline						Total		P
	Positive		Negative		Equivocal		N	%	
	N	%	N	%	N	%			
Positive	40	23.1	-	-	-	-	40	23.1	<0.001
Negative	5	2.9	95	54.9	26	15.0	126	72.8	
Equivocal	4	2.3	1	0.6	2	1.2	7	4.1	
Total	49	28.3	96	55.5	28	16.2	173	100	

Table 3 Her-2 FISH classification changes by 2013 guideline versus 2007 guideline when the positive and equivocal categories are combined

Her-2 FISH using 2007 guideline	Her-2 FISH using 2013 guideline				Total		P
	Positive and equivocal		Negative		N	%	
	N	%	N	%			
Positive	46	26.6	1	0.6	47	27.2	<0.001
Negative	31	17.9	95	54.9	126	72.8	
Total	77	44.5	96	55.5	173	100.0	

Table 4 Summary of the Her-2/CEP17 ratio, Her-2 copy number, and CEP17 copy number in Her-2 FISH-positive and equivocal cases classified by 2013 guideline

Her-2 classification	N	Her-2/CEP ratio number/cell (Mean)	Her-2 copy (Mean)	CEP17 copy number/cell (Mean)	CEP17 copy number/cell ≥ 3 N (%)
Positive	49	4.46(2.72)	11.85(5.95)	2.99(1.60)	17(34.7%)
Equivocal	28	1.45(0.23)	4.64(0.45)	3.28(0.57)	21(75.0%)
P		<0.001	<0.001	0.262	0.001

3 讨论

2013 年 ASCO/CAP 检测指南的更新, 从仅评估 Her-2/CEP17 比值到同时或更加关注 Her-2 基因拷贝数。FISH 双探针检测中加入 CEP17 探针的目的是为了在检测 Her-2 基因的同时, 获得第 17 号染色体的数目, 从而将第 17 号染色体的非整倍体和单纯的 Her-2 基因扩增, 尤其是低水平扩增区分开。

2013 年 ASCO/CAP 指南对于 IHC2+ 的患者 Her-2FISH 分类的影响是显著的。2013 版指南把阳性标准 Her-2/CEP17 比值从 2.2 降为 2.0, 又结合平均 Her-2 基因拷贝数, 将 Her-2/CEP17 比值 ≥ 2.0 , 或 Her-2/CEP17 比值 < 2.0 , 且平均 Her-2 拷贝数/细胞 ≥ 6.0 的样本判读为阳性。这一更新使得一部分采用 2007 版指南判读 Her-2 基因扩增状态为不确定及阴性的患者获得了潜在的靶向治疗机会。2007 版指南判读的有 5 例阴性和 4 例不确定经 2013 版指南判为阳性, 2013 指南对不确定标准也作了更新: 双探针 Her-2/CEP17 比值 < 2.0 且平均 Her-2 拷贝数/细胞为 < 6.0 但 ≥ 4.0 判读为不确定。2007 版指南判读的 1 例不确定经 2013 版指南判为阴性, 2007 版的 26 例阴性经 2013 版判为不确定。采用 FISH 检测的 173 例样本中, 根据 2007 版指南判定 40 例为阳性, 126 例为阴性, 7 例为不确定; 根据 2013 版新标准重新判定 49 例为阳性, 96 例为阴性, 28 例为不确定。

2013 年 ASCO/CAP 指南推荐如果荧光原位杂交和免疫组化 Her-2 检测结果是阳性的话, 可以使用 Her-2 靶向治疗, 该指南还建议当 FISH 最终检测结果仍为不确定的情况下, 可以考虑使用 Her-2 靶向

治疗,同时我们也注意到大量的 Her-2FISH 不确定的患者有 17 号染色体多体,这表明 17 号染色体对于 Her-2FISH 不确定的乳腺癌患者有一定的影响,在乳腺癌患者中 17 号染色体多体 (CEP17 \geq 3/每个细胞)是一种常见的遗传突变。一些研究表明 17 号染色体多体与一些不良临床病理特征有一定的关系。也有研究表明 17 号染色体扩增的信号可能表明 Her-2 基因和 17 号染色体着丝粒区共同扩增,或是复杂染色体变化而不是简单的 17 号染色体扩增^[22-25]。临床研究显示,具有这类遗传学特征的患者对治疗反应和预后与单纯的基因扩增有明显不同。

有一些实验室已经用 TP53 作为替代 FISH 探针评估那些 Her-2 不确定的患者的 Her-2/CEP17 的比值,由于一些肿瘤细胞缺失 TP53 基因使 Her-2FISH 出现了假阳性结果,最近的研究评估了 RARA、SMS 和 TP53 作为可替代 FISH 探针的使用总结出:这三种基因无论是单独使用还是三种基因联合使用都不能替代 CEP17^[26]。

总之,2013ASCO/CAP 检测指南使 21% 的 IHC2+ 的患者发生了变化,证明了 FISH 对于 IHC2+ 的患者能够有效地分类;也发现 Her-2FISH 不确定的大部分病例都存在 CEP17 \geq 3。那么我们能否找到一种可替代 CEP17 的探针使这些不确定的患者得到确定的分类,让患者能够得到及时的治疗,而且 FISH 不确定的患者对于 Her-2 靶向治疗的反应也需要进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Guo S, Wang Y, Rohr J, et al. Solid papillary carcinoma of the breast: a special entity needs to be distinguished from conventional invasive carcinoma avoiding over-treatment [J]. *Breast*, 2016, 26: 67-72.
- [2] Pestalozzi BC, Tausch C, Dedes KJ, et al. Adjuvant treatment recommendations for patients with ER-positive/HER2-negative early breast cancer by Swiss tumor boards using the 21-gene recurrence score (SAKK 26/10)[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 265.
- [3] Ballinger TJ, Kassem N, Shen F, et al. Discerning the clinical relevance of biomarkers in early stage breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 164(1): 89-97.
- [4] Mirtavoos MH, Khosravi A, Mirtavoos MZ, et al. Overexpression of HER2/neu as a prognostic value in iranian women with early stage breast cancer; a single institute study[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2014, 16(11): e16005.
- [5] Matsumoto A, Jinno H, Ando T, et al. Biological markers of invasive breast cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2016, 46(2): 99-105.
- [6] Vici P, Pizzuti L, Michelotti A, et al. A retrospective multicentric observational study of trastuzumab emtansine in HER2 positive metastatic breast cancer: a real-world experience[J]. *Oncotarget*, 2017, May 25.
- [7] Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine [J]. *Oncologist*, 2009, 14(4): 320-368.
- [8] Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of rastuzumab resistance and novel targeted therapies[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(2): 263-275.
- [9] Cheng YX, He SQ, Dong H, et al. Comparison of different methods for HER2 status detection in non special invasive breast carcinoma [J]. *J Mol Diagn Ther*, 2016, 8(5): 308-315. [成玉霞, 赫淑倩, 董贺, 等. 非特殊型浸润性乳腺癌 HER-2 检测方法的对比研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(5): 308-315.]
- [10] Frithiof H, Aaltonen K, Rydén L. A FISH-based method for assessment of HER-2 amplification status in breast cancer circulating tumor cells following CellSearch isolation[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 7095-7103.
- [11] Echavarria I, López-Tarruella S, Márquez-Rodas I, et al. Neratinib for the treatment of HER2-positive early stage breast cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017, 26: 1-11.
- [12] Mansour M, Teo ZL, Luen SJ, et al. Advancing immunotherapy in metastatic breast cancer[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2017, 18(6): 35.
- [13] Hicks DG, Kulkarni S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2008, 132(6): 1008-1015.
- [14] Beauchemin C, Letarte N, Mathurin K, et al. A global economic model to assess the cost-effectiveness of new treatments for advanced breast cancer in Canada[J]. *J Med Econ*, 2016, 19(6): 619-629.
- [15] 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(3): 250-261.
- [16] Manion E, Hornick JL, Lester SC, et al. A comparison of

- equivocal immunohistochemical results with anti-HER2/neu antibodies A0485 and SP3 with corresponding FISH results in routine clinical practice[J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 135(6):845-851.
- [17] Lee AH, Key HP, Bell JA, et al. Breast carcinomas with borderline(2+) HER2 immunohistochemistry: percentage of cells with complete membrane staining for HER2 and the frequency of HER2 amplification [J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64(6):490-492.
- [18] Atkinson R, Mollerup J, Laenkholtm AV, et al. Effects of the change in cutoff values for human epidermal growth factor receptor 2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: a study comparing conventional brightfield microscopy, image analysis assisted microscopy, and interobserver variation[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135 (8): 1010-1016.
- [19] Vergara-Lluri ME, Moatamed NA, Hong E, et al. High concordance between Hercep test immunohistochemistry and ERBB2 fluorescence in situ hybridization before and after implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathology 2007 guidelines[J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(10):1326-1332.
- [20] Green IF, Zynger DL. Institutional quality assurance for breast HER2 immunohistochemical testing: identification of outlier results and impact of simultaneous fluorescence in situ hybridization cotesting[J]. *Hum Pathol*, 2015, 46 (12):1842-1849.
- [21] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131(1):18-43.
- [22] Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity[J]. *Mod Pathol*, 2014, 27(1):4-18.
- [23] Orsaria M, Khelifa S, Buza N, et al. Chromosome 17 polysomy: correlation with histological parameters and HER2NEU gene amplification[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66 (12):1070-1075.
- [24] Moelans CB, van Diest PJ. CEP17 copy number increase does not indicate polysomy 17[J]. *J Clin Pathol*, 2014, 67(5):454-455.
- [25] Rondón-Lagos M, Verdun Di Cantogno L, Rangel N, et al. Unraveling the chromosome 17 patterns of FISH in interphase nuclei: an in depth analysis of the HER2 amplicon and chromosome 17 centromere by karyotyping, FISH and M-FISH in breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:922.
- [26] Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, et al. Assessment of HER2 status in invasive breast cancers with increased centromere 17 copy number[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 153(1):67-77.

《肿瘤学杂志》关于“在线优先出版”的通告

为了加快学术论文传播速度,缩短出版周期,使作者研究成果的首发权及时得到确认,《肿瘤学杂志》自2016年实行“在线优先出版”,经同行评议通过采用的稿件,经编辑部加工处理后在中国知网(CNKI)实行电子版在线优先出版。具体如下:

(1)在线投稿接收之后,编辑部核实文稿的题目、作者、单位等版权作息,作者提供相关信息,供在线出版使用。此信息为文稿最终确认的出版信息,此后作者不再予以更改。

(2)在线出版的PDF全文是经作者最终校对的修改定稿。待编辑部完成整个校对流程后替换为正式出版稿,同时给出完整的发表年份、卷、期、起止页码和唯一的文献识别DOI号码。

(3)在线出版的文献是《肿瘤学杂志》印刷版本的在线优先网络版,完全满足国内外学术交流的在线检索和引用。