

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01141

· 短篇论著 ·

## 采用色素原位杂交法检测 HER2 蛋白弱阳性表达乳腺癌患者的基因扩增状态

Chromogenic *in situ* hybridization in examination of HER2 amplification status in breast cancer specimens with weak HER2 expression

白辰光,倪灿荣,陶立阳,郑唯强,马大烈\*

第二军医大学长海医院病理科,上海 200433

**[摘要]** **目的** 应用色素原位杂交法(chromogenic *in situ* hybridization, CISH)检测 HER2 蛋白弱阳性表达乳腺癌患者的 HER2 基因扩增状态,为乳腺癌的临床诊治提供依据。**方法** 收集 HER2 蛋白弱阳性(++)表达乳腺癌患者石蜡切片标本 187 例,采用 Invitrogen 公司的 HER2 CISH™ 检测试剂盒,根据美国临床肿瘤学会/美国病理医师学会推荐标准,分析标本 HER2 基因状态及其与雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)表达的相关性。**结果** 乳腺癌 HER2 蛋白弱阳性表达标本 HER2 基因扩增阳性率为 53.48%(100/187),基因扩增阳性者 ER、PR 阳性表达率分别为 44.00%、46.00%;HER2 基因扩增阴性率为 46.52%(87/187),基因扩增阴性者 ER、PR 阳性表达率分别为 70.73%、78.05%。HER2 基因扩增结果与性激素受体(ER、PR)表达明显负相关( $P < 0.01$ )。**结论** HER2 蛋白弱阳性表达乳腺癌患者有必要进一步明确其基因扩增状态,CISH 可有效检测此类患者的 HER2 基因扩增状态。

**[关键词]** 乳腺肿瘤;HER2 基因;色素原位杂交;免疫组织化学

**[中图分类号]** R 737.9 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1141-03

乳腺癌是我国女性最常见的恶性肿瘤,发病率逐年上升,上海地区的发病率约 60/10 万<sup>[1]</sup>。HER2 表达是一项独立的预后预测因素,20%~30%的乳腺癌(特别是浸润性导管癌)患者存在 HER2 基因扩增和(或)蛋白过表达,此类患者生存期短,易复发和转移,常规化疗不敏感<sup>[2-3]</sup>。人源化抗 HER2 单克隆抗体曲妥珠单抗(trastuzumab, Herceptin)等靶向药物的发明和应用为此类患者带来了福音,但是治疗效果与 HER2 表达状态明确相关。因此,HER2 基因表达状态的准确检测和评估十分重要,是治疗方案选择和预判化疗效果的重要指标。本研究采用色素原位杂交法(chromogenic *in situ* hybridization, CISH)检测 HER2 蛋白弱阳性表达乳腺癌患者 HER2 基因扩增状态,为乳腺癌的临床靶向治疗的指导提供依据。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源及一般资料 2007 年 1 月至 2009 年 5 月经

免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法检测 HER2 蛋白表达弱阳性(++)的我院病理科活检的女性乳腺浸润性导管癌石蜡包埋组织标本,共计 187 例。患者年龄 20~81 岁,中位年龄为 47 岁。

1.2 免疫组织化学检测 石蜡切片 IHC 染色操作采用 En-Vision 二步法,EnVision 试剂盒及一抗 HER2(A0485)、ER(1D5)、PR(PgR636)均购自丹麦 Dako 公司。HER2 蛋白表达结果判断采用美国临床肿瘤学会/美国病理医师学会(ASCO/CAP)工作组推荐方案<sup>[4]</sup>,ER、PR 结果判定为两个等级:阴性(0~20%)、阳性(20%~)。

1.3 CISH 法检测 HER2 基因扩增状态 地高辛标记的 HER-2 原癌基因原位杂交探针和检测试剂盒(Spot-Light HER2 CISH™)为美国 Invitrogen 公司产品,购自上海太阳生物技术有限公司。操作参照试剂盒说明书进行,结果判断采用 ASCO/CAP 工作组推荐方案(表 1)<sup>[4]</sup>。

1.4 统计学处理 计数资料采用  $\chi^2$  检验,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

表 1 ASCO/CAP 工作组推荐的显色原位杂交法 HER2 检测结果判断标准<sup>[4]</sup>

HER2 基因状态	CISH 检测结果
阴性(无扩增)	在所选计数区中 50%以上的癌细胞核有 4 个以下信号点
交界性	在所选计数区中 50%以上的癌细胞核有 4~6 个信号点
阳性(扩增)	在所选计数区中 50%以上的癌细胞核有 6 个以上信号点或簇状信号点

## 2 结果

2.1 HER2 基因扩增状态检测结果 CISH 检测结果(图 1)

表明:HER2 蛋白表达弱阳性(++)的 187 例标本中 100 例存在 HER2 基因扩增,5 例交界性,82 例无扩增,IHC 和 CISH 两种方法的符合率为 53.48%。

**[收稿日期]** 2010-01-05 **[接受日期]** 2010-07-19

**[作者简介]** 白辰光,讲师、主治医师. E-mail: bcg709@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873690, E-mail: madalie@126.com

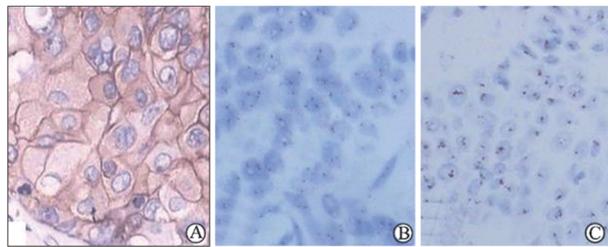


图1 乳腺癌组织 HER2 基因 IHC 和 CISH 检测结果

A: HER2 蛋白表达弱阳性(IHC 法); B: HER2 基因无扩增,细胞核内有 1~2 个扩增信号(CISH 法); C: HER2 基因扩增,细胞核内有簇状扩增信号(CISH 法). Original magnification: ×400

2.2 HER2 基因扩增状态与性激素受体表达的相关性

HER2 基因扩增的 100 例标本中,ER 和 PR 阳性者分别为 44 例(44.00%)和 46 例(46.00%)。而在 HER2 基因无扩增的 82 例标本中,ER 和 PR 阳性率分别为 70.73%(58/82)和 78.05%(64/82)。HER2 基因无扩增组和扩增组的性激素受体(ER、PR)表达水平差异有统计学意义( $\chi^2_{ER}=17.43, P_{ER}<0.01; \chi^2_{PR}=19.35, P_{PR}<0.01$ ;表 2)。同时,在 HER2 基因无扩增的 82 例标本中,55 例(67.07%)为 ER 和 PR 双阳性,15 例(18.29%)为 ER 和 PR 双阴性;而在 HER2 基因扩增的标本中,ER 和 PR 双阳性者仅占 36.00%(36/100),ER 和 PR 双阴性者占 46.00%(46/100),两者差异具有统计学意义( $\chi^2=18.89, P<0.01$ ,表 3)。

表 2 乳腺癌 HER2 蛋白弱阳性表达病例 HER2 基因扩增状态与性激素受体表达相关性

HER2 基因状态	N	ER		PR	
		阳性	阴性	阳性	阴性
扩 增	100	44	56	46	54
无扩增	82	58	24	64	18
合 计	182	102	80	110	72

(n)

$\chi^2=17.43, P<0.01$        $\chi^2=19.35, P<0.01$

表 3 乳腺癌 HER2 蛋白弱阳性表达病例 HER2 基因扩增状态与性激素受体共表达相关性

HER2 基因状态	N	性激素受体表达状态			
		** ER+ PR+	ER+ PR-	ER- PR+	** ER- PR-
无扩增	82	55	3	9	15
扩 增	100	36	8	10	46
合 计	182	91	11	19	61

(n)

$\chi^2=18.89, P<0.01$

组织化学(IHC)方法是目前临床上首选的评估 HER2 基因过表达的方法,具有操作简便、成本低等特点,但是只有 HER2 蛋白表达强阳性(++)者才能应用 Herceptin 进行治疗。而对于临床上大量的 HER2 蛋白表达为弱阳性(+)的病例,Herceptin 的使用则有待进一步明确 HER2 基因扩增状态,因为 HER2 基因扩增与患者生存率和 Herceptin 疗效的相关性更好。

目前检测 HER2 基因扩增的方法主要有荧光原位杂交(FISH)和色素原位杂交(CISH)。FISH 结果可靠,被誉为“金标准”,但需要昂贵的试剂和专门设备,操作方法复杂且标本不能长期保存<sup>[5-6]</sup>。CISH 技术是一种检测基因扩增状态的新方法<sup>[7]</sup>,综合利用了 FISH 的原位杂交技术和 IHC 的酶显色技术,可以准确检测乳腺癌标本中 HER2 基因扩增状态,具有操作简单、不需要昂贵的仪器设备、普通光学显微镜下能观察判断、有组织结构、可长期保存结果等特点,且其结果与 FISH 有较高的符合性<sup>[8-10]</sup>,已于 2008 年 7 月通过美国食品药品监督管理局(FDA)认证。

本研究采用 IHC 试剂盒 A0485 检测女性乳腺浸润性导管癌患者石蜡包埋组织切片的 HER2 蛋白表达情况,2 年多共筛选出 187 例弱阳性表达病例。为了明确 HER2 基因扩增状态,本研究进一步进行 CISH 检测。结果显示,在 HER2 蛋白表达弱阳性的 187 例标本中,100 例存在 HER2 基因扩增,5 例交界性,82 例无扩增,总体符合率为 53.48%,与国内外 CISH 检测结果<sup>[5,11]</sup>相似,但高于文献报道的 FISH 18%~44%的符合率<sup>[12]</sup>。本研究结果提示,HER2 蛋白表达弱阳性(IHC++)的患者应进一步做 CISH 或 FISH 检测以明确 HER2 基因扩增状态。不可否认,CISH 有缺少内对照(无 Cep17 等对照)和低水平扩增时难以判断(存在主观平面和显色落差等原因)的缺点<sup>[5-6]</sup>,为此,ASCO/CAP 联合工作组推荐的原位杂交结果判定标准将此类难以判读的病例判断为交界性。我们在实际应用中发现,该方案在不影响总体判断准确性的同时,降低了结果判读的难度,提高了 CISH 技术的临床适用性和可重复性。本组病例中仅 5 例结果判定为交界性,有进一步行 FISH 检测的必要,但此类病例仅占 2.67%,不影响 CISH 的临床实用和推广。

为了探讨 HER2 蛋白弱阳性(IHC++)患者的 HER2 基因扩增状态与性激素受体(ER、PR)表达水平的相关性,本研究进一步对相关因素进行了统计学分析。统计结果提示乳腺癌浸润性导管癌标本 HER2 基因扩增状态与性激素受体(ER、PR)表达明显负相关,与文献<sup>[5,13]</sup>结果相似。

综上所述,HER2 蛋白弱阳性表达(IHC++)的乳腺癌病例有必要进一步明确肿瘤中 HER2 基因扩增状态,以实现临床针对性的靶向治疗,而 CISH 是检测乳腺癌 HER2 基因扩增状态的一项可靠技术。

3 讨 论

HER2(cerbB2)是一种具有酪氨酸激酶样活性的跨膜糖蛋白(p185),属表皮生长因子受体(EGFR)家族,参与酪氨酸激酶信号转导,调控细胞增殖。HER2 基因状态不仅是预测乳腺癌患者预后的独立因素,同时还是 Herceptin 治疗和辅助化疗的重要参考指标<sup>[1]</sup>,所以准确检测非常重要。免疫组

[参考文献]

[1] 付 强,于世英,许三鹏.乳腺癌 HER2 过度表达预后相关因素研究[J].肿瘤防治研究,2008,35(增刊):9-11.  
 [2] Mass R D, Press M F, Anderson S, Cobleigh M A, Vogel C L, Dybdal N, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women

- with metastatic breast cancer treated with trastuzumab[J]. Clin Breast Cancer, 2005, 6: 240-246.
- [3] Konecny G E, Thomssen C, Lück H J, Untch M, Wang H J, Kuhn W, et al. Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96: 1141-1151.
- [4] Wolff A C, Hammond M E, Schwartz J N, Hagerty K L, Allred D C, Cote R J, 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: 118-145.
- [5] 张瑰红, 施达仁, 梁晓曼, 侯景辉, 康苏娅, 朱卫东, 等. 显色原位杂交和免疫组织化学检测乳腺癌 HER2/neu 基因状况和蛋白表达的对照性研究[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35: 580-583.
- [6] 刘彤华. 表皮生长因子受体家族与靶向性抗癌治疗[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35: 577-579.
- [7] Madrid M A, Lo R W. Chromogenic *in situ* hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status[J]. Breast Cancer Res, 2004, 6: R593-R600.
- [8] Gupta D, Middleton L P, Whitaker M J, Abrams J. Comparison of fluorescence and chromogenic *in situ* hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 119: 381-387.
- [9] Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic *in situ* hybridization (CISH) in archival breast carcinoma[J]. Mod Pathol, 2002, 15: 657-665.
- [10] Leong A S, Formby M, Haffajee Z, Clarke M, Morey A. Refinement of immunohistologic parameters for Her2/neu scoring validation by FISH and CISH[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2006, 14: 384-389.
- [11] 陈舒婕, 王莉萍, 沈坤炜, 陆洪芬. 色素原位杂交法和免疫组织化学法检测乳腺癌 HER2 基因扩增及蛋白表达[J]. 肿瘤, 2008, 28: 705-708.
- [12] Dolan M, Snover D. Comparison of immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization assessment of HER-2 status in routine practice[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 123: 766-770.
- [13] Francis G D, Dimech M, Giles L, Hopkins A. Frequency and reliability of oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2 in breast carcinoma determined by immunohistochemistry in Australasia: results of the RCPA Quality Assurance Program [J]. J Clin Pathol, 2007, 60: 1277-1283.

[本文编辑] 贾泽军