

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00099

乳腺癌 *HER2* 基因扩增检测方法——显色原位杂交法的应用及优化

倪灿荣*, 白辰光

第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的:**应用显色原位杂交技术(chromogenic *in situ* hybridization, CISH)检测乳腺癌组织人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, *HER2*)基因扩增情况,并对操作方法进行优化。**方法:**选择免疫组织化学(IHC)En-Vision法检测结果2+及以上的60例乳腺癌组织作为研究对象,应用CISH技术检测其*HER2*基因扩增情况,分析二者结果的相关性;总结CISH操作经验,优化操作方法。**结果:**44例标本IHC检测*HER2*蛋白表达为3+,其中40例CISH检测呈现*HER2*基因高倍扩增,4例无扩增;基因扩增与蛋白表达的符合率为91%。16例IHC检测*HER2*表达为2+标本基因扩增与蛋白表达的符合率为50%。IHC与CISH符合率为80%(48/60),二者明显相关($P<0.01$)。操作过程中应严格控制切片厚度,一般要求4~5 μm ;杂交变性一定要彻底,杂交后的洗涤温度和时间也很重要,最好控制在70~75 $^{\circ}\text{C}$;要严格控制苏木精衬染时间;每次实验最好有阳性对照片,可以有效进行质量控制。**结论:**CISH检测乳腺癌*HER2*基因扩增的结果与IHC检测的蛋白表达结果符合率较高,可作为乳腺癌*HER2*基因检测的一项新技术;但在具体操作时,应注意严格控制切片厚度、消化及杂交后洗涤温度与时间以及苏木精衬染时间等因素。

[关键词] 显色原位杂交技术;乳腺肿瘤;人表皮生长因子受体2;c-erbB-2基因

[中图分类号] R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0099-04

A method for detection of *HER2* gene amplification in breast cancer tissues: chromogenic *in situ* hybridization method and its modification

NI Can-rong*, BAI Chen-guang

Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To apply chromogenic *in situ* hybridization (CISH) for detection of *HER2* gene amplification in breast cancer tissues and to discuss some modifications of the CISH method. **Methods:** *HER2* gene amplification was detected by CISH in 60 breast cancer specimens with an immunohistochemical score over 2+. The correlation between the results of IHC and CISH was analyzed. Our experience in CISH manipulation was summarized and optimization to CISH was discussed. **Results:** CISH identified gene amplification in 91%(40/44) specimens with an IHC score of 3+ and in 50%(8/16) specimens with an IHC score of 2+. The total concordance rate between IHC and CISH was 80%(48/60, $P<0.01$). The thickness of sections should be controlled within 4-5 μm ; the denaturation should be complete; and the post-hybridization washing temperature and time were also very important and the temperature should be controlled at 70-75 $^{\circ}\text{C}$. The dyeing time of hematoxylin should also be restrictedly controlled. Positive control should be set up in the experiment for high quality of the experiment. **Conclusion:** CISH has high concordance rate with IHC in examining *HER2* amplification and it may be a new method for detection of *HER2* gene. The thickness of the sections, the post-hybridization washing temperature and time, and the time of hematoxylin dyeing should be strictly controlled.

[KEY WORDS] chromogenic *in situ* hybridization; breast neoplasms; human epidermal growth factor receptor 2; c-erbB-2 gene

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 99-102]

原癌基因人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, *HER2*)基因,即 *c-erbB-2* 基因,定位于染色体17q12-21.32上,编码相对分子质量为185 000的跨膜受体样蛋白,具有酪氨酸激酶活性^[1]。Vocaturro等^[2]

研究发现20%~30%乳腺癌患者肿瘤组织存在*HER2*基因异常扩增或蛋白过表达,对此类患者进一步应用*HER2*蛋白人源性单克隆抗体teastuzumab(herceptin)进行靶向治疗,可以取得较好疗效。因此,直接评估乳腺癌患者*HER2*基因

[收稿日期] 2007-08-20 **[接受日期]** 2007-11-30

[作者简介] 倪灿荣,高级实验师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25074605, E-mail: nicanrong@126.com

扩增和蛋白表达程度显得尤为重要。

显色原位杂交(chromogenic *in situ* hybridization, CISH)技术是近年来发展的一种新的组织化学方法,可以较好地评估 *HER2* 基因的扩增水平^[3]。因此,本研究选择免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC) EnVision 法检测结果 2+ 及以上的 60 例乳腺癌组织作为研究对象,应用 CISH 技术检测其中 *HER2* 基因扩增情况,分析二者结果的相关性,进一步评价 CISH 技术在乳腺癌组织 *HER2* 基因扩增检测中的应用价值;同时总结操作经验,分析其操作过程中的注意事项,优化操作方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 *HER2* 原位杂交试剂盒(Cat# 84-0146; Lot# 60882736 Spot-Light[®] *HER2* CISH[™] Kit)购自美国 Zymed 公司,包括 1 L 加热预处理液(室温, pH 7.0), 5 ml 预处理酶试剂(用前复温至室温), 0.4 ml 地高辛标记 Spot-Light[®] *HER2* 探针(-20℃ 保存), 500 ml SSC 缓冲液(室温), 3 ml CAS-阻断试剂(室温), 3 ml 小鼠抗地高辛抗体试剂(4℃), 3 ml 抗小鼠多聚物连接试剂(4℃), 1 ml 浓缩液 DAB(20×), 1 ml 浓缩底物缓冲液(20×), 1 ml 浓缩 0.65% 过氧化氢(20×)。兔抗 c-erbB-2 多克隆抗体和 EnVision 试剂购自丹麦 DAKO 公司;杂交用盖玻片购自美国 Sigma 公司。

1.2 标本来源及入选标准 选择 2006 年 10 月至 2007 年 10 月我院普通外科手术切除的乳腺癌组织标本 60 例,其中浸润性导管癌 50 例、浸润性小叶癌 5 例、浸润性导管癌与浸润性小叶癌混合型 3 例和浸润性小管癌 2 例。所有标本经 10% 中性甲醛溶液固定备用。所有标本经免疫组织化学 EnVision 法^[4] 检测, *HER2* 蛋白表达为 2+ 及以上。IHC 染色结果判断标准:超过 10% 的肿瘤细胞有强、完整的胞膜棕褐色着色为强阳性(3+);超过 10% 的肿瘤细胞有轻到中等程度的胞膜着色为阳性(2+);超过 10% 的肿瘤细胞有微弱、不完整胞膜着色为弱阳性(1+)。

1.3 CISH 法检测 *HER2* 基因扩增 CISH 法参照原位杂交试剂盒说明书进行,略加改进。

1.3.1 切片预处理 4~5 μm 石蜡切片 58℃ 烤片 4~18 h,常规脱蜡至水,加热预处理(CISH[™] 中最严格的步骤:切片放入预处理液 98℃ 加热 15 min,转移至室温蒸馏水中洗 3×2 min),滴加已复温的酶预处理液(视组织固定时间、固定液种类和组织类型调整酶消化时间)室温孵育 5~10 min,蒸馏水洗 3×2 min,梯度乙醇脱水(75%、85%、95%、100% I、100% II 各 2 min),自然干燥或电吹风吹 30 s。

1.3.2 变性与杂交 每片滴加地高辛标记的 *HER2* 探针 10~15 μl,用专用杂交盖片覆盖 95℃ 变性 6~10 min,冰上速冷 5~8 min;37℃, 50% 甲酰胺-PBS 湿盒中杂交过夜(超过 10 h);洗涤:准备 2 只直式染色缸,并装满 SSC 缓冲液洗涤液,1 只室温,另 1 只放入预热到 70~75℃ 的水浴锅中(超过 2 张切片时,每多 1 张切片,温度提高 1℃,但不超过 80℃),在室温 SSC 中洗涤切片 2~5 min,后移入热 SSC 中洗 5~8 min,转入室温蒸馏水洗 3×2 min。

1.3.3 免疫组织化学染色 该步骤全部在室温中进行。切片放入 3% H₂O₂-甲醇溶液中 10 min,用 TPBS(0.01% Tween-20 + 0.01 mol/L pH 7.5 PBS)洗涤 3×2 min;加 CAS 阻断试剂 10 min;倾去阻断试剂 10 min,不必洗涤;加入小鼠抗地高辛抗体 30~40 min;用 TPBS 洗涤 3×2 min;加入抗小鼠多聚物连接试剂,30~50 min;用 TPBS 洗涤,在洗涤过程中准备 DAB/H₂O₂(1 ml 蒸馏水中加入浓缩 DAB 底物缓冲液、浓缩 0.65% H₂O₂ 和浓缩 DAB 各 1 滴);切片上滴加 DAB 液,室温下避光显色 30 min,流水洗 2 min。

1.3.4 复染及封片 苏木精染色 1 min 左右,复染时间因不同组织而异,染色不宜过深,避免掩盖阳性信号,流水冲洗 2 min;系列乙醇脱水(75%、85%、95%、100% I、100% II 各 2 min)二甲苯洗 2×2 min;树胶封片;用 40×10 倍显微镜观察染色结果。

1.4 CISH 法染色结果判断标准 参照乳腺癌 *HER2* 基因检测指南^[5], CISH 检测结果分为无扩增、低拷贝和高拷贝。

无扩增:单体中大于 50% 肿瘤细胞核每个细胞核内出现 3~5 个信号颗粒,单一信号点呈光滑、卵圆形;二倍体中大于 50% 肿瘤细胞核每个细胞核内出现 1~2 个信号颗粒,单一信号点呈光滑、卵圆形。

低拷贝:大于 50% 的肿瘤细胞核每个细胞核内出现 5~10 个信号颗粒,或小的团块状阳性颗粒,或多点和小的团块状阳性颗粒的混合物。小的团块状阳性颗粒不规则,颗粒直径较点状单一信号颗粒大 3~5 倍。同时观察癌周正常上皮细胞的阳性颗粒,以作参考。

高拷贝:大于 50% 的肿瘤细胞核内出现 10 个及以下的信号颗粒,或大的团块状阳性颗粒,或多点和大的团块状阳性颗粒的混合物。大的团块状阳性颗粒不规则,其颗粒直径较点状单一信号颗粒大 5 倍以上。同时观察癌周正常上皮细胞的阳性颗粒,以作参考。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0 软件,相关性分析采用 Kendall 等级相关分析。

2 结果

2.1 *HER2* 蛋白表达免疫组化结果 IHC 阳性信号定位于细胞膜,偶尔伴有胞质内着色(图 1A、1B、1C)。60 例标本中 44 例为 3+, 16 例为 2+。

2.2 *HER2* 基因扩增结果及其与蛋白表达结果的相关性分析 CISH 染色结果清晰可见,胞核内可见棕色散在细小点状(无或低拷贝扩增)或聚集成团块状的粗大不规则颗粒(高拷贝扩增),除特异性杂交信号外,核内外无非特异性着色,背景干净清晰。

44 例标本 IHC 检测 *HER2* 蛋白表达为 3+, 其中 40 例 CISH 检测呈现 *HER2* 基因高倍扩增(图 1D、图 1E), 4 例无扩增(图 1F);基因扩增与蛋白表达的符合率为 91%。16 例标本 IHC 检测 *HER2* 表达为 2+, 其中 8 例 CISH 检测 *HER2* 基因呈高倍扩增, 8 例无扩增;基因扩增与蛋白表达的符合率为 50%。IHC 与 CISH 总符合率为 80% (48/60), 二者明显相关($P < 0.01$)。

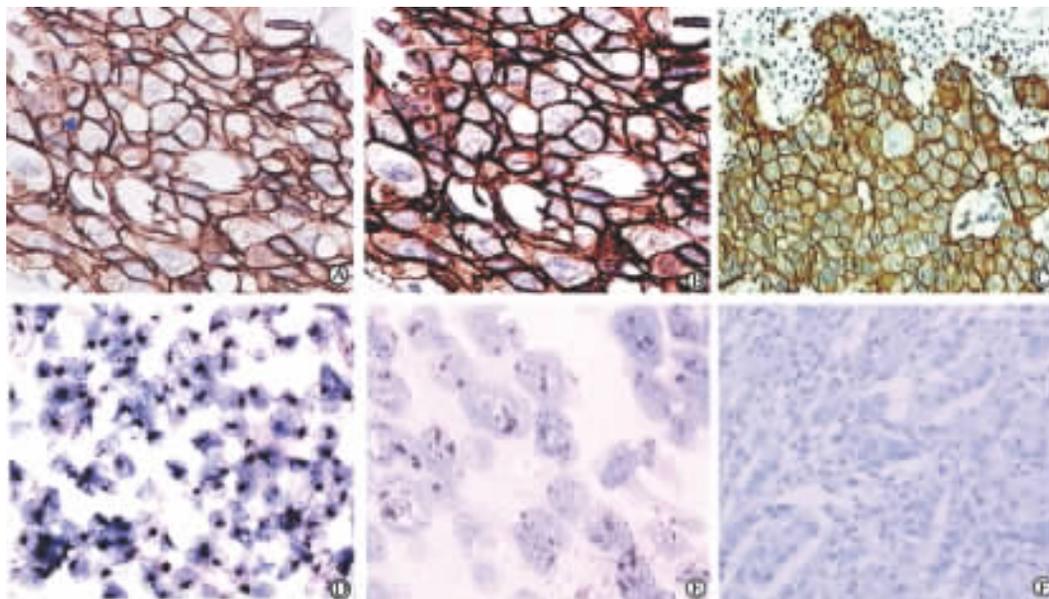


图1 乳腺癌组织 HER2 免疫组化及 CISH 染色结果

Fig 1 Immunohistochemical(A-C) and chromogenic *in situ* hybridization (D-F) staining of HER2 protein in breast cancer tissues

A-C: IHC-HER2 3+; D-E: High amplification; F: No amplification. Original magnification: $\times 400$ (A, B, D); $\times 200$ (C, E, F)

3 讨论

目前,常用免疫组织化学和荧光原位杂交法(fluorescent *in situ* hybridization, FISH)观察乳腺癌组织 HER2 蛋白表达和基因扩增水平,其中 FISH 法是目前检测 HER2 基因扩增的“金标准”,但其荧光衰变速度快,难以长期保存;结合形态学观察比较困难,影响对结果的判断;且需要配备昂贵的荧光显微镜,不利于其推广使用^[6]。免疫组织化学方法虽然简便廉价,但无法准确评估 HER2 基因的扩增状况,不少免疫组织化学阳性患者并不存在 HER2 基因的异常扩增^[7]。CISH 技术是近年来发展的一种新的组织化学方法,是对 FISH 方法的重大改进,可以用 DAB/H₂O₂ 显示,永久保存结果,扩增产物可以进行定位,且费用相对低廉,利于推广,有效克服了 FISH 法的上述缺陷,是目前相关研究的新热点^[1-3]。然而,CISH 技术应用时间不是很长,相关技术还不很成熟,对其应用价值的评价还有一定争议。因此,本研究应用 CISH 技术检测 60 例乳腺癌标本中 HER2 基因扩增水平,并与 HER2 蛋白表达结果进行对比,进一步评价其在乳腺癌组织 HER2 基因扩增检测中的应用价值;同时总结操作经验,分析操作过程中的注意事项,优化操作方法。

Vocaturro 等^[2]研究发现,FISH 和 CISH 技术的阳性符合率较高,证实 CISH 技术检测 HER2 基因的可信度高。国内外其他研究结果^[6-10]也表明 FISH 与 CISH 的检测符合率高。本研究应用 CISH 方法检测 60 例 c-erbB-2 蛋白表达 2+ 及以上的乳腺癌标本中 HER2 基因的扩增率,结果显示,60 例乳腺癌标本中,HER2 基因扩增率为 80% (48/60),其中 c-erbB-2 蛋白水平在 3+ 以上的标本 44 例,其 HER2 基因扩增率为 91% (40/44),略高于上述研究结果。这可能与本研

究选用 c-erbB-2 蛋白表达 2+ 及以上的乳腺癌标本,并对检测方法进行优化(如严格控制消化时间,适当延长二抗和多聚物的孵育时间)等因素有关。

国外研究^[8-11]认为,相比较 FISH 方法,CISH 法对组织形态结构要求更严格。这是因为 FISH 方法是采用 2 种荧光探针,为双色,可以很直观地对结果作出判断;而 CISH 方法的结果是单色,要数扩增颗粒,首先要定位准确,才能判断细胞核,这也可能会降低其阳性率。我们总结操作经验,认为可以通过对目前 CISH 方法进行优化改进来提高其阳性检测率和可观性。具体改进包括:(1)石蜡切片厚度要求 4~5 μm ,太薄的切片经热处理和酶消化后会导致细胞核结构消失或模糊,无法准确判断结果。(2)杂交变性一定要彻底,95 $^{\circ}\text{C}$ 5~8 min,迅速移到-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰盒上 5~8 min,否则会出现假阴性。(3)杂交后的洗涤温度和时间也很重要,洗涤温度控制在 70~75 $^{\circ}\text{C}$ 为好,温度应在水浴锅中预热至 75 $^{\circ}\text{C}$,再将切片插入洗 5 min 即可,否则也会使细胞核模糊,影响杂交信号判读,无法数阳性信号颗粒。(4)苏木精衬染要严格控制,试剂盒内说明书要求苏木精衬染细胞核 8~10 s,经观察最佳复染时间为 40~60 s,因不同组织而异,染色不宜过深,避免掩盖阳性信号。(5)在设置阳性切片的情况下,抗地高辛一抗和多聚物酶结合物二抗孵育时间可适当延长 20~50 min,以保证杂交信号更加明显,还可以适当减少每张切片杂交液 5~15 μl ,降低实验成本。每次实验最好有阳性对照片,可以有效进行质量控制。

综上所述,CISH 检测乳腺癌 HER2 基因扩增的结果与 IHC 检测的蛋白表达结果符合率较高,可作为乳腺癌 HER2 基因检测的一项新技术,但在具体操作时,应注意严格控制切片厚度、消化及杂交后洗涤温度与时间以及苏木精衬染时

间等因素。

(志谢 本研究得到第二军医大学长海医院病理科郑唯强、马大烈教授的支持和帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

[1] 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.

[2] Vocaturo A, Novelli F, Benevolo M, Piperno G, Marandino F, Cianciulli A M, et al. Chromogenic *in situ* hybridization to detect HER-2/neu gene amplification in histological and ThinPrep-processed breast cancer fine-needle aspirates: a sensitive and practical method in the trastuzumab era[J]. *Oncologist*, 2006, 11:878-886.

[3] Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart M J, et al. Chromogenic *in situ* hybridization: a practical alternative for fluorescence *in situ* hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples[J]. *Am J Pathol*, 2000, 157:1467-1472.

[4] 倪灿荣, 马大烈, 戴益民. 免疫组织化学实验技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 36-40.

[5] 《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: 631-633.

[6] Todorovic-Rakovic N, Jovanovic D, Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D. Prognostic value of HER2 gene amplification

detected by chromogenic *in situ* hybridization (CISH) in metastatic breast cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2007, 82:262-268.

[7] Hanna W M, Kwok K. Chromogenic *in-situ* hybridization: a viable alternative to fluorescence *in-situ* hybridization in the HER2 testing algorithm[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19:481-487.

[8] Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic *in situ* hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence *in situ* hybridization and assessment of interobserver reproducibility[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18:1015-1021.

[9] Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke T G, Watters A D, Bartlett J M. Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence *in situ* hybridization[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10:4793-4798.

[10] Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic *in situ* hybridization for the detection of HER-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence *in situ* hybridization[J]? *Am J Clin Pathol*, 2005, 123:237-243.

[11] Dietel M, Ellis I O, Hfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, et al. Comparison of automated silver enhanced *in situ* hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists[J]. *Virchows Arch*, 2007, 451:19-25.

[本文编辑] 贾泽军

· 消息 ·

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)可在全文数据库 ScienceDirect 检索浏览

由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)合办的《军医大学学报(英文版)》是国内外公开发行的医药卫生类综合性英文期刊(CN 31-1002/R, ISSN 1000-1948),是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库,已被美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、波兰《哥白尼索引》等检索系统收录。

从2007年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行。目前,期刊全文已进入 ScienceDirect 全文数据库,期刊网址 <http://www.elsevier.com/locate/jmcpla>。ScienceDirect(SD)是全球市场占有率最高的科技与医学期刊全文出版平台之一,其上的论文具有和其他世界主流在线科技与医学期刊的“引用文献”及“被引用文献”的链接功能。本刊进入 SD 全文数据库,不仅可增加刊发论文的可见度和被引频次,帮助作者了解所做工作被国际同行的关注程度,也有助于期刊不断提高学术质量。

编辑部热忱欢迎生物医药领域的专家学者及科研工作人员踊跃投稿!

地址:上海市翔殷路 800 号《军医大学学报》编辑部 邮编:200433

电话:021-25074340-818, E-mail: jydxxb@yahoo.com.cn