

IHC 和 FISH 检测乳腺癌组织 HER-2 基因扩增及蛋白表达*

周海丰¹, 范玉宏¹, 武雪亮², 孙喜斌³, 王立坤⁴, 梁晚平^{1△}, 刘运江⁵

(1. 河北北方学院附属第一医院乳腺外科, 河北张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院血管腺体外科, 河北张家口 075000; 3. 河北北方学院附属第一医院检验科, 河北张家口 075000; 4. 河北北方学院附属第一医院超声医学科, 河北张家口 075000; 5. 河北省肿瘤医院乳腺中心, 河北石家庄 050000)

摘要:目的 分析比较荧光原位杂交(FISH)与免疫组织化学(IHC)检测乳腺癌组织 HER-2 基因扩增或蛋白表达情况。方法 选择 2008 年 1 月至 2012 年 5 月行改良根治术的乳腺癌患者 110 例, 对手术切除的乳腺癌组织均予以 FISH 与 IHC 检测, 对检测结果进行比较分析。结果 110 例乳腺癌组织中 HER-2 蛋白表达为(+++)者 25 例(22.73%);(++)者 44 例(40.00%);(+)者 26 例(23.64%);(-)者 15 例(13.64%)。110 例乳腺癌组织中 HER-2 基因扩增 28 例(25.45%), 无扩增 82 例(74.55%)。IHC 检测阳性(+++)与 FISH 的阳性符合率一致, IHC 检测阴性(+/-)与 FISH 的阴性符合率一致, IHC 检测可疑阳性(++)与 FISH 结果比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。但 IHC 检测结果与 FISH 检测结果的总符合率为 89.29% (25/28), 两种检测方法呈正相关($\chi^2 = 84.89, P < 0.01$)。结论 IHC 阳性及阴性表达, 与 FISH 检测结果具有较好一致性。IHC 可疑阳性表达, 与 FISH 检测结果的一致性较差, 提示 IHC 检测可疑阳性标本需再以 FISH 检测。

关键词: 基因, erbB-2; 原位杂交, 荧光; 免疫组织化学

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)11-1299-03

Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for detecting HER-2 gene amplification and protein expression in breast cancer tissue*

Zhou Hai Feng¹, Fan Yuhong¹, Wu Xueliang², Sun Xibin³, Wang Likun⁴, Liang Wanping^{1△}, Liu Yunjiang⁵

(1. Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000 China; 2. Department of Vascular Gland Surgery, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000 China; 3. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000 China; 4. Department of Ultrasound, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000 China; 5. Department of Breast Surgery, Hebei Provincial Tumor Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000 China)

Abstract: Objective To analyze and compare the fluorescence in situ hybridization(FISH) and immunohistochemical(IHC) for detecting HER-2 gene amplification and protein expression in breast cancer tissues. **Methods** 110 cases of breast cancer from January 2008 to May 2012 receiving the modified radical mastectomy were selected. The resected breast cancer tissue was detected by FISH and IHC and the detected results were performed the comparative analysis. **Results** Among 110 cases of breast cancer tissue, 25 cases(22.73%) were the HER-2 protein expression(+++), 44 cases(40.00%) were(++), 26 cases(23.64%) were(+) and 15 cases(13.64%) were(-). Among 110 cases, the gene amplification was in 28 cases(25.45%) and no gene amplification was in 82 cases(74.55%). The positive(+++) of the IHC detection was coincident with that of FISH, and the negative(+/-) of the IHC detection was also coincident with that of FISH, there was statistical difference between the suspicious positive of the IHC detection and the results of FISH($P < 0.05$). But the total coincidence of the IHC detection results and FISH test results was 89.29% (25/28), and the two detection methods had the positive correlation($\chi^2 = 84.89, P < 0.01$). **Conclusion** The positive and negative expression of the IHC detection has better consistency with that of the FISH detection. However, the coincidence of the IHC suspicious positive expression and the FISH results is poor, indicating that the suspicious positive sample of the IHC detection needs to be detected by the FISH detection.

Key words: genes, erbB-2; in situ hybridization, fluorescence; immunohistochemistry

乳腺癌作为女性常见的恶性肿瘤之一, 严重地威胁到妇女的生命健康。临床上对于乳腺癌的治疗遵循着早发现, 早诊断的原则^[1]。然而, 预后却始终受到多方面因素的影响。HER-2 作为乳腺癌治疗的重要因子, 其过度表达或基因扩增直接关系到患者的激素、化学治疗效果以及预后, 对临床治疗有重要的意义^[2-3]。本文通过对 110 例行改良根治术的乳腺癌患者资

料, 分析比较荧光原位杂交(FISH)与免疫组织化学(IHC)检测乳腺癌组织 HER-2 基因扩增或蛋白表达情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择河北北方学院附属第一医院乳腺外科 2008 年 1 月至 2012 年 5 月行改良根治术的乳腺癌患者 110 例, 均为女性, 年龄 32~69 岁。采用恶性肿瘤诊疗规范乳腺癌

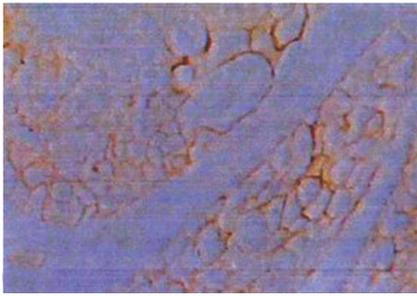


图 1 IHC 检测 HER-2 蛋白(+++)

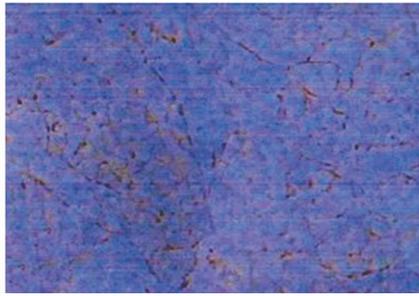


图 2 IHC 检测 HER-2 蛋白(+++)

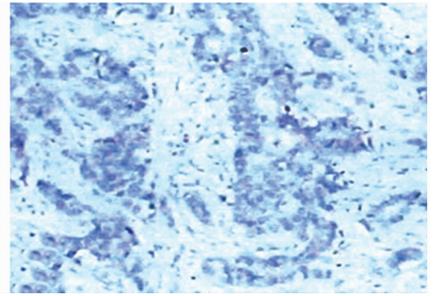


图 3 IHC 检测 HER-2 蛋白(+)

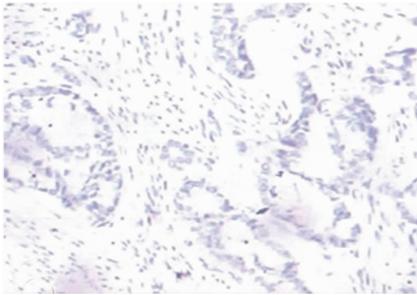


图 4 IHC 检测 HER-2 蛋白(-)

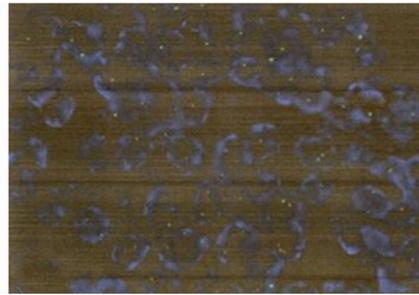


图 5 FISH 检测 HER-2 基因扩增阳性

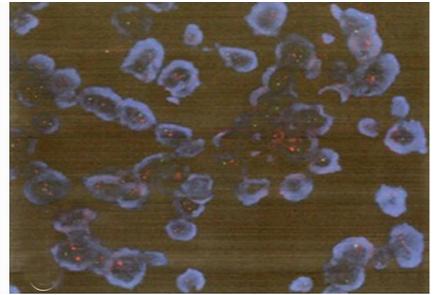


图 6 FISH 检测 HER-2 基因扩增阴性

病理分类:其中浸润性导管癌 33 例,浸润性小叶癌 14 例,髓样癌 21 例,小管癌 10,导管内癌 18 例,原位癌 14 例。其中有淋巴结转移者 48 例,无淋巴结转移者 62 例。肿瘤直径小于 2 cm 者 39 例,2~5 cm 者 63 例,大于 5 cm 者 8 例。所有标本采用 10% 甲醛进行固定,石蜡包埋,标本组织切片厚度以 4~5 μm 为准。110 例患者在术前均未接受任何治疗。

1.2 方法

1.2.1 IHC 检测 本次实验采用 IHC,其中兔抗人 HER-2 多克隆抗体购自武汉博士德公司。一抗工作浓度为 1:100,二抗为 1:200。标本统一行 IHC 链霉菌抗生物蛋白-过氧化物酶连结法(SP)实验,SP 与 3,3'-二氧基联苯胺(DAB)试剂盒均购自北京中山金桥公司,按照试剂盒操作说明进行。

1.2.2 FISH 检测 FISH 是用于 17 号染色体着丝粒和 HER-2 基因扩增情况下乳腺癌诊断的一类新技术,与 IHC 相比更为准确,被认为是 HER-2 基因监测的金标准。实验步骤如下:(1)提取细胞核,从石蜡包埋组织中提取细胞核,对包埋组织进行 HE 染色;显微镜下确定肿瘤细胞的密集部位,石蜡切片,厚度以 20 μm 为准。(2)细胞核阵列制作,利用细胞阵列技术将 ICH 检测中 HER-2 阴性标本的血细胞排列在同一张切片上。(3)FISH,细胞阵列载玻片浸入固定液体中固定 1 h,取出在 25 $^{\circ}\text{C}$ 中干燥;置入 pH=6.0 的柠檬酸盐缓冲液中微波加热 10 min;置入 2 \times SSC 溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$,15 min;0.4%胃蛋白酶中适当消化;分别用 70%、85%、100%乙醇脱水处理 2 min;置入 45~50 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中蒸发乙醇;加入 10 μL HER-2/neuDNA 探针;封口胶封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 6~15 h;清洗探针,行 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色。

1.2.3 阳性结果的判定标准 以细胞膜呈现清晰棕褐色或棕黄色为阳性。HER-2 定位于细胞膜或细胞质,按照阳性细胞百分比定性。3 位研究人员对结果进行判读,每张切片至少观察 10 个高倍视野(400 倍)中大于或等于 500 个细胞。采用 DAKO HerceptTest 评分系统:(-)表示无细胞染色或少于 10% 细胞膜较弱染色;(+)表示 10% 肿瘤细胞膜部分较弱染

色;(++)表示 10% 肿瘤细胞膜完全较弱或中等染色;(+++)为大于 10% 的肿瘤细胞膜完全强染色。按照阳性细胞占所观察细胞的比例行半定量分级:阳性反应小于 10% 为(-),10%~30% 为(+),>30%~50% 为(++),>50% 为(+++)。以(-)、(+)及(++)计入阴性表达,(+++)记为阳性表达^[4]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,HER-2 与临床病理指标关系的比较,采用行 X 列表进行 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IHC 检测结果 110 例乳腺癌组织中 HER-2 蛋白表达为(+++)者 25 例(22.73%),(++)者 44 例(40.00%),(+)者 26 例(23.64%),(-)者 15 例(13.64%),见图 1~4。

2.2 FISH 检测结果 110 例乳腺癌组织中 HER-2 基因扩增 28 例(25.45%),无扩增 82 例(74.55%),见图 5~6。

2.3 两者结果比较 本组实验中 IHC 检测(+++)后行 FISH 检测的符合率为 96.00%(24/25),IHC 检测(++)后行 FISH 检测的符合率为 4.55%(2/44),IHC 检测(+)后行 FISH 检测的符合率为 96.15%(25/26),IHC 检测(-)后行 FISH 检测的符合率为 93.33%(14/15)。即 IHC 检测阳性(+++)与 FISH 的阳性符合率一致,IHC 检测阴性(+/-)与 FISH 的阴性符合率一致,IHC 检测可疑阳性(++)与 FISH 结果的一致性较差。但 IHC 与 FISH 检测结果的总符合率为 89.29%(25/28),两种检测方法呈正相关($\chi^2=84.89$, $P<0.01$),见表 1。

表 1 110 例乳腺癌样本 IHC 与 FISH 结果比较(n)

IHC 检测结果	FISH 检测结果		合计
	阳性	阴性	
+++	24	1	25
++	2	42	44
+	1	25	26

续表 1 110 例乳腺癌样本 IHC 与 FISH 结果比较 (n)

IHC 检测结果	FISH 检测结果		合计
	阳性	阴性	
—	1	14	15
合计	28	82	110

3 讨 论

国内外在研究 HER-2 基因表达方面的实验或临床的文献都普遍存在样本容量较小的问题^[5],部分还出现了结论不一致甚至相悖的现象,对于 HER-2 检测主要靠显微镜等设备来观察,很大程度上局限于观察者个人的经验和状态,同时检测结果也并没有标准、客观的依据,对于 HER-2 基因检测方法的选择依旧存在较大的争议,尽管 IHC 检测应用范围较广,但却存在明显的不足,而 FISH 的应用却因价格问题迟迟得不到定论^[6]。而针对 IHC 和 FISH 法在 HER-2 基因检测中的优劣势比较,可分析此两种检测方法的差异所在,完善 HER-2 实验室检测的标准,提高检测结果的准确率,力求为临床提供一种简便、便宜、准确、迅速的检测方式^[7-8]。

IHC 因有组织标本所需量小、操作简便、要求不高、价格低廉、实验过程短、染色片易于保存、阅片快等优势,使得其仍为评价 HER-2 状态的首选检测方法^[9-10]。虽然 IHC 具有上述优势,但因标本处理中使得蛋白容易破坏等因素使得 IHC 的准确性易受到影响。FISH 有别于 IHC 的主要特点为结果的定量判读,其避免了主观上的误差,且有高度的可靠性与重复性^[11]。聂克克等^[12]研究表明,FISH 检测 HER-2 蛋白有很高的假阳性及假阴性,FISH 有效性及准确性显著高于 IHC,可在临床广泛推广应用。HER-2 基因扩增与腋窝淋巴结阳性相关。韩晓红等^[13]研究表明,FISH 和 IHC 两种方法检测 HER-2 表达状态具有较高的一致性,结合实际情况包括费用仪器等限制,在 IHC 作为初筛的基础上,仍然推荐 FISH 作为检测 HER-2 基因扩增的标准方法。FISH 技术检测乳腺癌患者 HER-2 基因表达状态可为临床指导用药和预后评价提供更可靠的依据。张宏等^[14]研究表明,IHC 可作为筛查乳腺癌患者 HER-2 的首选方法,当 HER-2 蛋白表达为(-)或(++)时,IHC 和 FISH 检测的一致性较高;而对于 IHC 为(+)或(+++)的患者应再进行 FISH 检测,以确定 HER-2 基因表达。宋宝等^[15]研究表明,FISH 较 IHC 检测 HER-2 表达准确性更高,尤适用于对 IHC(+++)的患者判断 HER-2 的表达。乳腺癌原发灶与转移灶之间 HER-2 的表达存在一定的不一致性,本文研究结果表明,IHC 检测阳性(+++)与 FISH 的阳性符合率一致,IHC 检测阴性(+/-)与 FISH 的阴性符合率一致,IHC 检测可疑阳性(+++)与 FISH 结果的一致性较差。但 IHC 与 FISH 检测结果的总符合率为 89.29%(25/28),两种检测方法呈正相关($\chi^2=84.89, P<0.01$)。

综合上述,IHC 阳性及阴性表达,与 FISH 检测结果具有较好一致性。IHC 可疑阳性表达,与 FISH 检测结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 IHC 检测可疑阳性标本需再以 FISH 检测,而阳性与阴性标本可无须再检。

参考文献:

[1] 谢静,郭滢,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.

- [2] 万美珍,凌扬,徐志毅,等. 荧光原位杂交与免疫组化检测乳腺癌组织 HER-2 基因扩增或蛋白表达情况的比较分析[J]. 肿瘤基础与临床, 2010,23(1):16-18.
- [3] 方宇,曾思恩,肖胜军. 荧光原位杂交对乳腺癌 HER2 基因的检测及临床应用[J]. 重庆医学, 2011,40(5):460-463.
- [4] 罗建湘,刘载道,冯雪萍,等. 荧光原位杂交与免疫组织化学对乳腺癌 HER-2 基因检测的研究[C]//2011 年全国西安病理技术学术会议暨全军第七届病理技术学术会议论文集,西安,2011. 北京:解放军出版社,2011:98-101.
- [5] 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.
- [6] 王玉环,孙振柱,张恒明,等. 荧光原位杂交与免疫组化检测结肠癌组织 HER-2 基因扩增或蛋白表达情况的研究[J]. 农垦医学, 2011,33(2):97-101.
- [7] 潘小英,郜红艺,张佳立,等. 荧光原位杂交和免疫组织化学技术检测乳腺癌 HER-2 基因扩增和蛋白表达状态对照研究[J]. 南方医科大学学报, 2009,29(11):2225-2227.
- [8] Gokhale S, Gatalica Z, Mohammad A, et al. FISH for HER-2/neu in breast cancer; Standardization makes the difference! [J]. Indian J Cancer, 2004,41(4):152-158.
- [9] Ray A, Sharma BK, Kaur S, et al. Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein and associated pathobiological factors in invasive primary breast cancer[J]. Indian J Exp Biol, 2004,42(3):253-258.
- [10] 甄乐锋,叶长生,刘民锋,等. 青年乳腺癌中 ER、PR、HER-2 及 VEGF 表达及其临床病理学意义[J]. 广东医学, 2010,31(4):490-492.
- [11] 李霄阳,徐雪琴,罗定存,等. HER-2 蛋白表达和基因扩增与乳腺癌预后的关系[J]. 浙江医学, 2010,32(2):166-172.
- [12] 聂克克,马学真,何信佳,等. 乳腺癌 HER-2 基因荧光原位杂交检测的临床应用[J]. 实用临床医药杂志, 2010,14(3):4-7.
- [13] 韩晓红,石远凯,马丽,等. 应用 FISH 和 IHC 技术检测中国乳腺癌患者 HER-2 基因状态及蛋白表达的前瞻性多中心研究[J]. 中华检验医学杂志, 2010,33(7):655-662.
- [14] 张宏,李峰,范银银,等. 检测乳腺癌 HER-2 基因扩增与 HER-2 蛋白表达的相关性[J]. 江苏医药, 2011,37(6):703-705.
- [15] 宋宝,郑刚,谢丽,等. 乳腺癌组织与转移淋巴结 HER-2 基因表达及检测方法的比较[J]. 肿瘤防治研究, 2011,38(1):70-72.

(收稿日期:2013-09-10 修回日期:2013-12-17)