

FISH 检测乳腺癌组织 HER-2 原癌基因 50 例分析*

第四军医大学唐都医院(西安 710038)

吴涛 何显力 李怡 巩丽 包国强 李金茂 鲁建国[△]

摘要 目的:探讨荧光免疫原位杂交法(FISH)检查乳腺癌 HER-2 基因扩增在临床中的应用价值。方法:选取 50 例乳腺癌手术患者,免疫组化染色方法检查乳腺癌组织中 HER-2 蛋白表达,FISH 检查 HER-2 基因扩增情况,比较二者之间差异。结果:50 例乳腺癌中免疫组化方法检测 HER-2 蛋白表达,+++者 7 例,++者 21 例,+者 17 例;FISH 检查 50 例中有 8 例出现 HER-2 基因扩增,42 例无扩增。两种检测方法检测阳性结果有显著性差异($P < 0.01$)。结论:免疫组化检测可做为 HER-2 表达状态的初筛,对于初筛阳性患者有必要进行 FISH 检测,有助于指导临床应用赫赛汀(Herceptin)的治疗及对患者预后的判断。

主题词 乳腺肿瘤 原位杂交,荧光 @HER-2 基因

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-7377(2011)04-0423-03

Detection of HER-2/neu Oncogene by fluorescence in situ hybridization in 50 patients of breast cancer

Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University
(Xi'an 710038) Wu Tao He Xianli Li Yi et al

ABSTRACT Objective: To detect the HER-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization (FISH) in breast cancer and evaluate their clinical significance. Methods: 50 patients which in-patient from August 2007 to July 2008 were detected the expression of HER-2 protein by immunohistochemical staining and the HER-2 gene amplification by FISH after surgery. Compared the difference between the two methods. Results: Of 50 patients, 7 cases (14%) expression of HER-2 protein were strongly positive (+++), 21 cases (42%) were positive (++), and 17 cases (34%) were weak positive (+), and the HER-2 gene amplification were 8 cases (16%), 42 cases were no amplification. There were significant difference about positive between two methods ($P < 0.01$). Conclusion: The immunohistochemistry can be used in initial screening of HER-2 protein expression. It is necessary to detect the HER-2 gene amplification by FISH in positive patients, which help to guide the treatment of Herceptin and prognosis of patients.

KEY WORDS Breast neoplasms In situ hybridization, fluorescence @HER-2 gene

近年来,女性乳腺癌的发病率逐年增高,已成为女性最常见的恶性肿瘤之一。目前治疗多采用手术、化疗、放疗、内分泌治疗及分子靶向药物治疗等为主的综合治疗。HER-2/neu 基因的过表达与乳腺癌的发生、发展及预后密切相关,赫赛汀已开始应用于临床治疗 HER-2 过表达的分子靶向药物。而 HER-2 基因扩增表达状态的检测对于临床选择应用赫赛汀至关重要,明确 HER-2 表达状态可为乳腺癌的临床治疗和判断

预后提供更准确的参考。本实验选取我院 50 例乳腺癌患者,进行免疫组化及 FISH 检查,比较二者对 HER-2 过表达的诊断价值。

资料及方法

1 一般资料 我院 2007 年 8 月至 2008 年 7 月乳腺癌住院手术患者 50 例,年龄 38~62 岁,平均 48.5 岁,所有患者经病理检查诊断为乳腺浸润性导管癌。术前未接受其他治疗。c-erbB2 鼠抗人单克隆抗体、免疫组化 S-P 试剂盒购自鼎国生物技术有限公司。HER-2 FISHTM检测试剂盒购自北京金菩嘉生物技术有限公司。

* 卫生部科研基金项目(WKJ2007-3-001)

[△]通讯作者

2 标本取材 手术切除标本后,10%中性福尔马林固定,4~36h 石蜡包埋,制作病理切片,HE 染色明确诊断,免疫组化染色检测 HER-2 蛋白表达。所有标本同时进行荧光免疫原位杂交(Fluorescence in situ hybridization,FISH)检测 HER-2 基因表达。

3 免疫组化检测 切片经免疫组化 S-P 法检测 HER-2 蛋白表达,光镜观察阳性信号,阳性反应物为棕黄色颗粒,定位于细胞膜。高倍显微镜下观察 10 个视野,没有染色或<30%瘤细胞染色为阴性(-),>30%的肿瘤细胞有不完整细胞膜着色为弱阳性(+),>30%的肿瘤细胞有较弱但完整的细胞膜着色为阳性(++),>30%的肿瘤细胞较强完整细胞膜着色为强阳性(+++)。

4 FISH 检测 切片常规二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,酸性亚硫酸钠处理,蛋白酶消化,Hcl 浸泡,梯度乙醇脱水,丙酮固定,56℃烤片 5min,加 10 探针工作液于组织切片上,73℃变性 5min 后于原位杂交仪中杂交,42℃湿盒杂交过夜 16 h,50%甲酰胺、柠檬酸缓冲液、0.1%NP-40 和 70%乙醇漂洗,暗处自然干燥玻片,DAPI 复染,封片。暗处放置 20min 后在荧光显微镜下观察。结果判定标准:计数 30 个细胞,统计 Ratio 值(Ratio 值=30 个细胞核中红信号总数/30 个细胞核中绿信号总数)。Ratio<1.8 为阴性结果,提示该样本无 HER-2 基因扩增;Ratio>2.2 为阳性结果,提示样本中 HER-2 基因发生扩增;Ratio 在 1.8~2.2 之间时,选择增加计数细胞至 100 个,或重做 FISH 试验来判断最终结果。

5 统计学处理 数据分析采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,免疫组化和原位杂交结果采用 χ^2 检验和 kappa 检验进行统计分析。

结 果

1 免疫组化结果 HER-2 蛋白表达定位于细胞膜,呈棕黄色颗粒;50 例乳腺癌组织中 HER-2 蛋白表达为(+++)者 7 例(14%),表达为(++)者 21 例(42%),表达为(+)者 17 例(34%)。

2 FISH 检测结果 HER-2 基因扩增信号表现为单个细胞核中红色信号大于 2,且绿色信号不少于 2,红绿信号之比>2.2。50 例乳腺癌中有 8 例(16%)出现 HER-2 基因扩增。42 例(84%)无扩增。

3 两者比较结果 见附表。两种方法相比,免疫组化方法检测 HER-2 蛋白表达阳性率为 90%(45/50);FISH 检测阳性率仅为 16%(8/50),两者阳性率有显著性差异($P<0.01$);而免疫组化检测阳性病例中,HER-2 蛋白(+++)与 FISH 检测 HER-2 基因扩增结果基本一致,无统计学差别($P>0.05$),且两种检测方

法的吻合度较高。

附表 乳腺癌中 HER-2 蛋白表达及
HER-2 基因扩增结果

HER-2 蛋白	n	HER-2 基因	
		扩增	无扩增
+++	7	7	0
++	21	1	20
+	17	0	17
-	5	0	5
合计	50	8	42

讨 论

HER-2 属于酪氨酸激酶受体家族成员,通过细胞信号传导通路调控细胞增殖及血管生成等,HER-2 基因(又称 HER-2/neu 或 c-erbB-2 基因),是人类原癌基因,其过表达与肿瘤的发生发展密切相关^[1]。研究表明,在乳癌患者中,大约有 25%~30%的患者会有 HER-2 蛋白的高表达,而这其中 90%~95%的蛋白高表达是由于 HER-2 基因的扩增引起的^[2,3]。近年来,HER-2 基因靶向治疗已成为乳腺癌的有效治疗手段之一,并取得了令人瞩目的进展。赫赛汀(Herceptin)是一种人源化的针对 HER-2 受体的单克隆抗体^[4]。其可杀伤 HER-2 高表达的肿瘤细胞。多项关于该药物研究结果表明,无论是与常规化疗联用,还是单药用于晚期乳癌患者,赫赛汀能改善 HER-2 过表达患者的生活质量,延长生存期,使乳癌患者在常规治疗的基础上进一步获益^[5]。然而,由于该药比较昂贵,如何才能准确把握用药指征,避免遗漏或者不必要的过度治疗,无论是临床医生还是患者对于该药物的选择都表现的很慎重。因此在选择该药进行治疗时,对 HER-2 基因扩增的检测显得至关重要。

目前检测乳腺癌中 HER-2 蛋白表达的方法是免疫组化法,该方法简便、费用低廉、可重复性好、对标本的要求也不高,因此在临床上被广泛应用。但由于在标本固定和处理过程中蛋白容易发生破坏,即使进行抗原修复有时也存在一定的局限性,所以对结果的影响比较大,存在假阳性假阴性现象^[6]。与蛋白质相比,DNA 的稳定性则好得多,实验操作过程中受到的影响较小。FISH 做为一种成熟的原位杂交技术,被逐渐应用于乳癌患者的 HER-2 基因的检测,它的优点在于:敏感性高,稳定性和重复性好;荧光显微镜油镜 100 倍即可清晰地显示 HER-2 基因扩增信号,并有标准化阳性判断标准,可进行定量分析,目前被认为是检测 HER-2 基因是否扩增的金标准^[7,8]。

虽然 FISH 法的优点为大家所认可,但由于该操作技术复杂、耗时长、费用昂贵,需特殊荧光显微镜观察、标本的取材要求严格等原因的限制,临床还不能常规开展。研究表明^[9],对于免疫组化法检测 HER-2 蛋白(+++),FISH 阳性率为 91.7%,而(+~++)的患者 FISH 阳性率仅为 7.4%和 23.3%,免疫组化法(-)患者 FISH 阳性率低于 5%。与本实验结果基本相符,本实验中免疫组化法(+++)FISH 均为(+),而免疫组化法(++)仅有 1 例 FISH 检测为(+)。目前多数的观点认为,对于免疫组化法检测结果为(+++)的患者,免疫组化法和 FISH 法的一致性较高,可以直接作为诊断的依据;对于结果为(+)和(-)的患者,其 FISH 检测结果基本为阴性,可以选择性的进行 FISH 检测;而对于 2+ 的患者,因免疫组化法与 FISH 法的一致性较差,在免疫组化基础上应对这部分患者重点进行 FISH 的检测^[10]。

通过我们研究认为,两种方法相结合,能更准确更客观的反应 HER-2 表达状态,为临床医生用药提供参考。免疫组化法可做为临床 HER-2 检测的初筛,对于免疫组化法(++)有必要进行 FISH 检测来明确 HER-2 基因的扩增状态,而对于(+、+++)的病人仍建议进行 FISH 检测,以指导临床上赫赛汀的应用,避免漏诊误诊,但应根据患者意愿进行,避免盲目扩大 FISH 检测范围。在以后的实验中我们将进一步探讨建立标准化的 HER-2 测定和分析方法,这是乳腺癌特异性靶向治疗的关键。

参考文献

- [1] Engel RH, Kaklamani VG. HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies[J]. *Drugs*, 2007, 67(9):1329-134.

(上接第 389 页)

- [8] 朴日龙,许青松. 知母乙醇提取物对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆能力的影响. *陕西医学杂志*, 2010, 39(8):941-943.
- [9] Mc-Daid DG, Kim EM, Reid RE, *et al.* Parenteral antioxidant treatment preserves temporal discrimination following intrahippocampal aggregated A[β](1-42) injections[J]. *Behavioural Pharmacology*, 2005, 16(4): 237.
- [10] Cao X, Wei Z, Gabriel GG, *et al.* Calcium-sensitive regulation of monoamine oxidase-A contributes to the production of peroxyradicals in hippocampal cultures:

- [2] 鲍 炜,张立红,付海京,等. 靶向于 HER2 的 siRNA 表达载体在人乳腺癌细胞 SKBr-3 中的表达[J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(15):1355-1358.
- [3] Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z. Immunohistochemical anti-bodies in breast cancer HER2 diagnostics. A comparative immuno-histochemical and fluorescence in situ hybridization study[J]. *Tumour Biol*, 2008, 29(1): 18-27.
- [4] 王晓兰,姚 凡,刘 楠,等. FISH 在乳腺癌组织 HER2/neu 原癌基因检测上的应用及其临床意义的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2008, 37(5):664-666.
- [5] 吕亚莉,钟 梅,赵 坡. 应用荧光原位杂交法检测乳腺癌石蜡样本中 HER-2 基因的扩增[J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(5):345-347.
- [6] 陈 红,许建平,马小干,等. 乳腺癌 HER2 基因表达阳性者 17 号染色体倍体性与 HER2 蛋白表达及临床预后因素的相关性分析[J]. *重庆医学*, 2009, 38(7):803-814.
- [7] Ito Y, Tokudome N, Sugihara T, *et al.* Does lapatinib, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor, constitute a breakthrough in the treatment of breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2007, 14(2):156-162.
- [8] 吴 芳,胡春宏,蒋少艾,等. 赫赛汀联合辅助化疗对人类表皮生长因子受体 2 阳性早期乳腺癌患者预后影响的 Meta 分析[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2007, 32(4):684-689.
- [9] Egervafi K, Szollesi Z, Nemes Z. Immunohistochemical anti-bodies in breast cancer HER2 diagnostics. A comparative and fluorescence in situ hybridization study [J]. *Tumour Biol*, 2008, 29(1):18-27.
- [10] 董海新,张仁亚,刘启龙,等. 荧光原位杂交与免疫组化对乳腺癌 HER-2 检测的对比研究[J]. *济宁医学院学报*, 2009, 32(4):246-249.

(收稿:2010-11-17)

implications for Alzheimer disease-related pathology. *BMC Neurosci*, 2007, 8:73.

- [11] Esposito G, De-Filippis D, Maiuri MC, *et al.* Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett*, 2006, 399(1-2):91.
- [12] 张维娟,刘 彬,安玉会. 灵草液对阿尔茨海默病模型大鼠脑组织氧化还原力的影响. *陕西医学杂志*, 2004, 33(7):591-594.

(收稿:2010-07-20)