

两种不同方法在检测 IHC2+ 的乳腺癌中 HER-2/neu 基因表达差异的比较研究

郑炜华 卢洪胜 陈敏芬

摘 要 **目的** 探讨免疫组化(immunohistochemistry, IHC)与荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)两种技术在检测乳腺浸润性导管癌 HER-2/neu 为 2+ 时的一致性。**方法** 收集乳腺浸润性导管癌并经 IHC 证实为 2+ 的标本 66 例,同时进行 FISH 检测,比较两者结果的相关性。**结果** FISH 检测发现在 66 例 IHC 为 2+ 的病例中,HER-2/neu 基因的阳性率为 28.8% (19/66);ER-PR-乳腺癌 HER-2/neu 基因的阳性率(47.4%)明显高于 ER+PR+乳腺癌 HER-2/neu 基因的阳性率(17.5%),两者具有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** IHC 证实 HER-2/neu 为 2+ 时必须进行 FISH 检测。

关键词 乳腺肿瘤 荧光原位杂交 HER-2/neu 免疫组化

Comparison of Two Different Methods in Evaluating the Status of HER-2/neu in Breast Carcinomas Scored IHC2+. Zheng Weihua, Lu Hongsheng, Chen Minfen. Department of General Practice, Linhai Municipal First People's Hospital, Zhejiang 317002, China

Abstract Objective To investigate the concordance between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) when applied for testing the HER-2/neu status in breast infiltrating ductal carcinomas scored IHC(2+). **Methods** Totally 66 cases of breast infiltrating ductal carcinoma scored IHC(2+) were collected. For all the cases, the amplification of HER-2/neu was also detected by FISH. The results from the two methods were analyzed. **Results** Of the 66 cases, the positive rate of HER-2/neu gene amplification was 28.8% (19/66). The positive rate of HER-2/neu gene amplification in ER-PR- cases (47.4%) was significantly higher than that in ER+PR+ cases (17.5%) ($P < 0.05$). **Conclusion** It is definitely necessary to do the FISH test of HER-2/neu in breast carcinomas which are scored 2+ by IHC.

Key words Breast cancer; FISH; HER-2/neu; IHC

HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor-2) 为原癌基因,定位于人类染色体 17q12 ~ 21.3,编码一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜生长因子受体。该受体蛋白与 HER 家族成员及其配体之间相互作用,通过细胞间的信号转导,调节细胞生长、分化和增殖^[1]。在约 30% 的浸润性乳腺癌,70% 的导管原位癌中可发现 HER-2/neu 的过度表达^[2]。HER-2/neu 基因状态对乳腺癌的预后、生物靶向治疗等方面有决定性的影响。2002 年美国 FDA 批准的全新药物 Herceptin 能改善 HER-2/neu 阳性患者的生存,而对于 HER-2/neu 基因低表达或者不表达的乳腺癌患者疗效不确切^[3]。因此在用药之前,对 HER-2/neu 基因的状态进行正确的评估是必不可少的。

目前 HER-2/neu 基因检测的常用方法是免疫

组化(IHC)和荧光原位杂交(FISH),前者检测蛋白表达,后者检测基因扩增。报道显示当 HER-2/neu 免疫组化的结果为 1+ 或者 3+ 时,两种方法具有较高的一致性^[4,5]。然而对于那些 HER-2/neu 为 2+ 的病例,很多经 FISH 检测证实是阴性的,不存在 HER-2/neu 的扩增^[6]。本研究主要探讨 IHC2+ 的病例中,IHC 和 FISH 两种方法对于检测 HER-2/neu 基因的一致性。

材料与方法

1. 一般资料:选取浙江省临海市第一人民医院 2007 年 1 月 ~ 2012 年 10 月手术切除的乳腺浸润性导管癌并经免疫组化证实为 2+ 的标本 66 例,均为女性,术前均未接受任何放化疗。

2. 主要试剂:抗体 HER-2/neu、ER 和 PR 均为 DAKO 公司产品,FISH 检测探针(HER2 基因检测试剂盒)购自北京金菩嘉生物技术公司。

3. 方法:(1)免疫组化法(IHC):标本经 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,采用 Envision 二步法染色。(2)荧光原位杂交(FISH):组织切片,65 $^{\circ}$ C 过夜烘烤,二甲苯室温脱蜡 2 次,每次 10min,梯度乙醇脱水,50 $^{\circ}$ C 下 30% 酸性

作者单位:317002 浙江省临海市第一人民医院妇产科(郑炜华);浙江省台州医院病理科(卢洪胜),耳鼻喉科(陈敏芬)

通讯作者:郑炜华,电子信箱:wzwhwq@gmail.com

亚硫酸钠处理 20 ~ 30min, 2 × SSC 漂洗 2 次, 每次 5min, 37℃ 下于蛋白酶 K (DAKO 公司) 工作液中孵育 10min, 2 × SSC 漂洗 2 次, 每次 5min, 经 -20℃ 预冷的 70%、85% 和 100% 乙醇各 2min 脱水, 丙酮浸泡 2min, 干燥, 56℃ 烤片机上烤片 3min, 将玻片在变性液中浸泡 5min, 预冷的 70%、85% 和 100% 乙醇各 2min 脱水, 预热后与探针在 42℃ 杂交仪中杂交过夜; 玻片经 46℃ 预热的甲酰胺洗涤之后, 经 DAPI 复染, 于荧光显微镜下选择合适的滤光片观察。

4. 结果判读: (1) 根据乳腺癌 HER2 检测指南 (2009 版)^[7], 全部瘤细胞中细胞膜均无染色或 < 10% 瘤细胞膜染色者免疫组化结果为 0; 瘤细胞 > 10% 细胞膜不完整弱染色者结果为 (1+); 瘤细胞 > 10% 细胞膜轻度至中度完整染色者结果为 (2+); 瘤细胞 > 30% 细胞膜完整强染色者结果为 (3+)。(2) 荧光原位杂交 (FISH) 计数 30 个细胞, 统计 Ratio 值 [Ratio 值 = 30 个细胞核中红信号 (HER-2/neu) 总数 / 30 个细胞核中绿信号 (17 号染色体) 总数]。Ratio 值 < 1.8 为阴性结果, 提示该样本无 HER-2/neu 基因扩增 (图 1); Ratio 值 > 2.2 为阳性结果, 提示样本中 HER-2/neu 基因发生扩增 (图 2); Ratio 值 1.8 ~ 2.2 时为可疑 (图 3), 可以选择增加计数细胞至 100 个或重做 FISH 实验来判断最终结果。(3) 17 号染色体倍体的判断标准参考文献^[8]: 单倍体: 平均每个细胞 17 号染色体复制数 < 1.5; 二倍体: 平均每个细胞 17 号染色体复制数介于 1.5 ~ 2.25; 多倍体: 平均每个细胞 17 号染色体复制数 > 2.25。

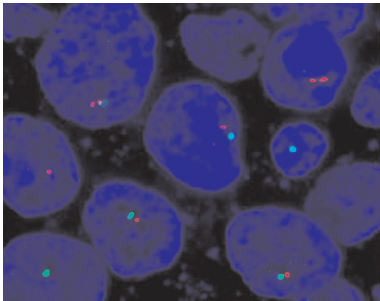


图 1 FISH 结果为阴性

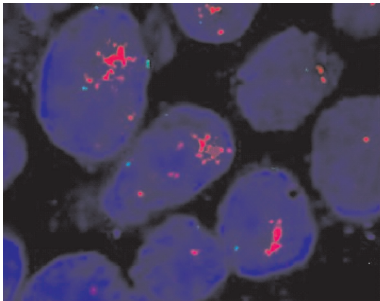


图 2 FISH 结果为阳性

5. 统计学方法: 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。两组间比较采用 χ^2 或 Fisher's 精确检验, 多组因素间比较采用 Kruskal-Wallis 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

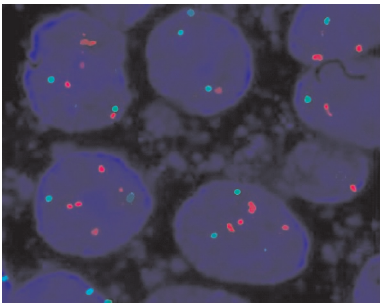


图 3 FISH 结果为可疑

结 果

本研究中患者的年龄 29 ~ 74 岁, 中位年龄 48.5 岁, 其中有 57.6% 的患者 < 50 岁。在所有病例中, 肿瘤分级为 2 级的有 60.6%, 肿瘤 > 2cm 的病例占到了 75.8%; 肿瘤分期 I 期、II A 期、II B 期、III 期和 IV 期的比例分别为 22.7%、30.3%、31.8%、13.6% 和 1.5%; 肿瘤伴有淋巴结转移的为 54.5%。ER 和 PR 同时阳性的比例是 60.6%。经 FISH 检测, 19 例证实为 HER-2/neu 基因存在扩增, 43 例无 HER-2/neu 基因扩增, 余 4 例无法判断 HER-2/neu 基因的扩增 (表 1)。

表 1 乳腺癌患者的临床病理特征 (n = 66)

参数	n	%
年龄 (岁)		
≤ 50	38	57.6
> 50	28	42.4
肿瘤分级		
I	2	3.0
2	40	60.6
3	24	36.4
肿瘤大小 (cm)		
≤ 2	16	24.2
> 2	50	75.8
肿瘤分期		
I	15	22.7
II A	20	30.3
II B	21	31.8
III	9	13.6
IV	1	1.5
淋巴结转移		
阴性	30	45.5
阳性	36	54.5
ER 和 PR 的表达		
ER + PR +	40	60.6
ER - PR -	19	28.8
ER + PR -	5	7.6
ER - PR +	2	3.0
FISH 结果		
扩增	19	28.8
无扩增	43	65.2
可疑	4	6.1

HER-2/neu 基因的扩增与患者的年龄、肿瘤的分级、肿瘤的大小、肿瘤的分期以及淋巴结是否转移均无相关性($P>0.05$)。HER-2/neu 基因在 ER-PR-乳腺癌中的阳性率为 47.4% (9/19),而在 ER+PR+乳腺癌中的阳性率为 17.5% (7/40) ($P=0.009$) (表 2)。HER-2/neu 基因的表达与 17 号染色体的相关性见表 3。17 号染色体呈多倍体的乳腺癌中 HER-2/neu 基因的阳性率为 30.0% (12/40),17 号染色体呈二倍体的乳腺癌中 HER-2/neu 基因的阳性率为 27.3% (6/22),17 号染色体呈单倍体的乳腺癌中 HER-2/neu 基因的阳性率为 25.0% (1/4)。

表 2 HER-2/neu 的表达与临床病理特征的关系

参数	HER-2/neu(n)			P
	无扩增	扩增	可疑	
年龄(岁)				
≤50	25	11	2	0.986
>50	18	8	2	
肿瘤分级				
1	1	1	0	0.669
2	26	12	2	
3	16	6	2	
肿瘤大小(cm)				
≤2	11	4	1	0.701
>2	32	15	3	
肿瘤分期				
I	10	4	1	0.636
II A	15	4	1	
II B	12	8	1	
III	5	3	1	
IV	1	0	0	
淋巴结转移				
阴性	20	7	3	0.099
阳性	23	12	1	
ER 和 PR 的表达				
ER+PR+	31	7	2	0.009*
ER-PR-	8	9	2	
ER+PR-	3	2	0	
ER-PR+	1	1	0	

可疑病例不进行分析, * ER+PR+组与 ER-PR-组比较

表 3 HER-2/neu 的表达与 17 号染色体异常的关系(n)

17 号染色体	HER-2/neu		
	无扩增	扩增	可疑
多倍体	25	12	3
二倍体	15	6	1
单倍体	3	1	0

讨 论

IHC 和 FISH 是目前用于乳腺癌 HER-2/neu 基

因检测最常用的两种方法,它们各自都有优缺点。IHC 成本低,耗时短,易于操作,但是它的结果受到很多因素的影响,如固定、一抗的选择。FISH 是一种半定量的方法,减少了主观因素的干扰,缺点是成本较高。基于 FISH 方法的敏感度和特异性,FISH 被认为是检测 HER-2/neu 基因的金标准。实验发现两种方法用于判断 IHC 为 3+ 或者 1+/0 的乳腺癌 HER-2/neu 基因时,它们的一致性是非常高的^[4,5]。但是对于 IHC 为 2+ 的乳腺癌,不同的文献报道的结果分歧较大。最近的数据显示 6%~25% 的 IHC 为 2+ 的乳腺癌经 FISH 检测证明 HER-2/neu 基因是存在扩增的,而 ASCO/CAP 指南里提供的阳性率为 23.9%^[9-12]。本组实验中,66 例 IHC2+ 的乳腺癌有 19 例 HER-2/neu 基因是扩增的,阳性率为 28.8%,与文献报道基本一致。

HER-2/neu 基因是一个非常重要的预后因子,伴有 HER-2/neu 基因扩增的肿瘤往往表现的更有侵袭性,更容易转移,肿瘤的分级和分期也高^[13]。Sudha 等研究了肿瘤分级分期、肿瘤大小、淋巴结转移及激素表达与 HER-2/neu 基因的相关性,也得到了同样的结论。另有研究者证实激素表达与 HER-2/neu 基因具有统计学上的负相关性。本数据显示 HER-2/neu 基因的扩增与病人的年龄、肿瘤的分级、肿瘤的大小、肿瘤的分期以及淋巴结是否转移均无相关性,但是 ER-PR-乳腺癌 HER-2/neu 基因的阳性率(47.4%)明显高于 ER+PR+乳腺癌 HER-2/neu 基因的阳性率(17.5%),两者具有显著性差异($P<0.05$)。其机制可能是由于 HER-2/neu 基因高扩增的癌细胞酪氨酸蛋白激酶系统持续高活性,从而可能不需要内分泌调节,而致雌孕激素受体表达阴性。同时 HER-2/neu 基因高扩增的癌细胞内癌基因数量、性质可能发生改变,导致受体结构可能出现某些功能缺陷,从而对内分泌治疗失去反应。

总而言之,正确评价乳腺癌中 HER-2/neu 基因的扩增状态对于后续治疗是至关重要的。本研究表明,对于 IHC2+ 的乳腺癌进行 FISH 检测是必要的。

参考文献

1 Van de Vijver MJ. Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) [J]. Euro J Cancer, 2001, 37(Supply1): S11-S17

2 Hynes NE,Stem DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer[J]. Biochem Biophys Acta, 1994, 1198(2-3): 165-184

3 Susanne H, Heidrun G, Sylvia R, et al. Expression of heregulin,

- phosphorylated HER - 2, HER - 3 and HER - 4 in HER - 2 negative breast cancers[J]. Institute of Pathology, 2009,21(2): 299 - 304
- 4 Mrozowskiak A, Olszewski WP, Piascik A, *et al.* HER2 status in breast cancer determined by IHC and FISH: comparison of the results [J]. Pol J Pathol, 2004, 55(4): 165 - 171
 - 5 Kuo SJ, Wang BB, Chang CS, *et al.* Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment for HER - 2/neu status in Taiwanese breast cancer patients[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2007, 46(2): 146 - 151
 - 6 Adv Y, Camila A, JairB, *et al.* Breast cancer HER2 equivocal cases: is there an alternative to FISH testing? A pilot study using two different antibodies sequentially[J]. Israel Med Assoc J, 2010, 12(6): 353 - 356
 - 7 《乳腺癌 HER2 检测指南(2009 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2009 版)[J]. 中华病理学杂志, 2009, 38(12): 836 - 840
 - 8 Lissandra DL, Virginie D, Christine D, *et al.* Correction for chromosome - 17 is critical for the determination of true Her - 2/neu gene amplification status in breast cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(10): 2572 - 2579
 - 9 Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, *et al.* HER - 2 testing in breast cancer using parallel tissue - based methods[J]. J Am Med Assoc, 2004, 291(16): 1972 - 1977
 - 10 Hammock L, Lewis M, Phillips C, *et al.* Strong HER - 2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization [J]. Hum Pathol, 2003, 34(10): 1043 - 1047
 - 11 Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, *et al.* HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(19): 3032 - 3038
 - 12 Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, *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(1): 118 - 145
 - 13 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER - 2/neu oncogene[J]. Science, 1987, 235(4785): 177 - 182

(收稿日期:2013-04-28)

(修回日期:2013-05-18)

超声结合温浴试验评价 2 型糖尿病患者足趾末端血液微循环反应性的初步研究

张其敏 邹春鹏 郑 超 赵雅萍

摘 要 **目的** 探讨超声结合温浴试验评价 2 型糖尿病患者足趾末端血液微循环反应性的可行性及临床价值。**方法** 随机选取 2 型糖尿病患者 40 例作为病例组, 42 例年龄和性别与病例组相匹配的同期健康志愿者作为对照组。两组全部应用彩色多普勒超声检测右侧足背动脉、第 1 足趾腓侧趾底动脉收缩期峰值速度(PSV)、舒张末期速度(EDV)以及阻力指数(RI)等血流动力学参数, 然后将右足全部浸入 40℃ 的温水中 5 分钟后重复以上操作。对组间及组内参数进行统计学分析。**结果** 组间比较: 病例组温浴试验前和试验后的足背动脉和第 1 足趾腓侧趾底动脉的 PSV、EDV 均低于对照组, RI 高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 病例组足背动脉 PSV、EDV 及 RI 温浴试验前后变化率与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$); 病例组第 1 足趾腓侧趾底动脉 PSV、EDV 及 RI 温浴试验前后变化率低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。组内比较: 温浴试验后病例组与对照组的足背动脉及第 1 足趾腓侧趾底动脉 PSV、EDV 均高于温浴试验前, RI 均低于温浴试验前, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 超声结合温浴试验可以检测 2 型糖尿病患者足趾末端血流参数变化程度从而评价其血液微循环的反应性, 该方法具有一定的临床实用价值。

关键词 温浴试验 彩色多普勒超声 2 型糖尿病 足趾末端 血液微循环

Preliminary Study on Reactivity of Toe Microcirculation in Patients With Type 2 Diabetes by Ultrasound Combined with Warm Bath Test.

Zhang Qimin, Zou Chunpeng, Zheng Chao, Zhao Yaping. Department of Ultrasound, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To explore the feasibility and clinical value of ultrasound combined with warm bath test in assessing reactivity of toe microcirculation in patients with type 2 diabetes mellitus. **Methods** Forty type 2 diabetic patients were involved as case group,

作者单位: 325027 温州医学院附属第二医院超声科(张其敏、邹春鹏、赵雅萍), 内分泌科(郑超)

通讯作者: 赵雅萍, 主任医师, 电子信箱: 939655548@qq.com