

• 临床研究 •

微阵列技术用于检测乳腺癌人表皮生长因子受体 2 基因状态

蒋会勇 马永权 张雪峰

【摘要】 目的 探讨细胞核微阵列技术及组织微阵列技术用于检测乳腺癌组织中 HER-2 基因扩增和蛋白表达状态。**方法** 将 248 例乳腺癌普通组织蜡块制成组织微阵列组,应用免疫组织化学法(IHC)和荧光原位杂交法(FISH)分别检测 HER-2 基因和蛋白表达。两种检测方法的一致性采用检验,并以 FISH 检测结果为金标准,绘制 IHC 检测乳腺癌 HER-2 表达的 ROC 曲线图。**结果** 248 例乳腺癌 FISH 与 IHC 检测结果一致性分析显示: $Kappa=0.711, P=0.000$,两种检测方法的一致性尚可。IHC 检测乳腺癌 HER-2 ROC 曲线下面积为 0.888, $P=0.000$,约登指数为 0.700,准确率为 87.9%。IHC(++)中 4 例为 17 号染色体单体型,占 FISH 阳性病例总数的 5.26% (4/76)。IHC(+++)中 5 例为 17 号染色体多倍体型,FISH 检测均为阴性,占 FISH 阴性总例数的 2.9% (5/172)。IHC 的检测可以较好地反映出 FISH 的结果。**结论** 细胞核微阵列及组织微阵列技术用于检测乳腺癌 HER-2 基因状态有着节约实验成本、同一性好、结果可靠的优点。

【关键词】 组织微阵列;免疫组织化学法;荧光原位杂交;HER-2;乳腺肿瘤

【中图法分类号】 R655.8

【文献标识码】 A

Nuclei and tissue microarrays technique in detecting HER-2 gene expression in breast carcinoma JIANG Hui-yong, MA Yong-quan, ZHANG Xue-feng. Department of General Surgery, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China

Corresponding author: ZHANG Xue-feng, E-mail: huiyongj@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the usage of nuclei and tissue microarrays technique in detecting HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma. **Methods** Two hundred and forty-eight breast carcinoma paraffin embedded tissue blocks were used to construct tissue microarray groups. Fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC) were used to detect the expressions of HER-2 gene and protein. The detection results of the two methods were analyzed using Kappa test. Taking the results obtained from FISH analysis as the gold standard, the ROC curve of IHC detecting HER-2 expression was drawn. **Results** The Kappa test of the two methods showed an acceptable consistency ($Kappa=0.711, P=0.000$). The area under the ROC curve of IHC

detecting HER-2 expression was 0.888 ($P=0.000$), the Youden's index was 0.700 and an accuracy was 87.9%. Four of the IHC(++) cases had haplotype of chromosome 17, with a positive rate of 5.26% (4/76) of the FISH positive cases. Five of the IHC(+++) cases had polyploid of chromosome 17, with a negative rate of 2.9% (5/172) of the FISH negative cases, indicating IHC results could better reflect FISH results. **Conclusions** Nuclei and tissue microarrays technique can be used in detecting HER-2 gene amplification and protein expression, and has the advantages of low cost and relatively reliable results.

【Key words】 tissue microarray; immunohistochemistry; fluorescence in situ hybridization; HER-2; breast carcinoma

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,近年来乳腺癌发病率不断上升,而且有年轻化趋势,严重威胁女性健康^[1-2]。HER-2 基因过度表达已被证实与乳腺癌患者的预后及化疗、激素治疗的效果密切相关^[3]。

检测 HER-2 基因状态的方法很多,包括蛋白水平和基因水平^[4]。检测 HER-2 状态最客观的方法是荧光原位杂交法 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 检测基因扩增和免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 检测蛋白的表达情况^[5]。笔者在相关检测过程中发明了细胞核阵列方法 (发明专利号: ZL 2005 1 0100216.6)^[6] 进行 FISH,同时采用组织微阵列组^[7]的方法进行 IHC 检测,使所有检测在同一条件下进行,更具可比性,同时节约了实验成本,实验结果更可靠。

1 材料与方法

1.1 临床标本

收集沈阳军区总医院 2008 年 5 月 ~ 2010 年 5 月病理诊断明确的乳腺癌标本 248 例,患者均为女性,平均年龄 48.3 岁 (31 ~ 84 岁),所有病例均经手术治疗。

1.2 主要仪器及试剂

荧光显微镜: 奥林巴斯 BX61 型 (日本 Olympus 公司); 组织微阵列仪: MTA1-Manual Tissue Arrayer (德国 Beecher Instruments 公司); FISH 图像采集系统: CX13 (黑白) (CCD 瑞士 Baumer 公司); 显微切割仪: AG 22331 Micro Dissector (德国 Eppendorf 公司); 探针: HER-2/neu DNA 探针及 CEP17 探针和杂交缓冲液购于美国 Vysis 公司。免疫组织化学 SP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; HER-2 单克隆抗体购于福州 Maxim 公司。

1.3 细胞核阵列 FISH 检测 HER-2 基因扩增

1.3.1 从石蜡包埋组织中提取细胞核:先对石蜡包埋组织进行 HE 染色,在显微镜下确定肿瘤细胞密集的部位,切 20 μm 厚石蜡切片,对照 HE 染色片,利用显微切割仪切除非肿瘤组织及坏死组织,按照文献[5]所述的方法进行细胞核提取。

1.3.2 细胞核阵列的制作:为了使所有待测样品在同一条件下检测及节约探针,笔者发明了利用细胞制作阵列的技术,一次将 100 例样品的细胞排列在同一切片上进行实验^[6]。

1.3.3 荧光原位杂交:将预制的细胞阵列玻片浸入固定液中固定 1 h。将玻片取出,空气中干燥后置 pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液中,微波加热 10 min,取出置 2 \times SSC 溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 置 15 min,0.4% 胃蛋白酶中适当消化,梯度乙醇(70%,85%,100%)脱水,各 2 min。移出玻片于 100% 乙醇中,以纸巾吸干乙醇,置 45 $^{\circ}\text{C}$ ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中蒸发乙醇。加 10 μl HER-2/neu DNA 探针及 CEP17 探针,按探针说明书混合,快速加一盖玻片,以封口胶封闭切片,以防蒸发,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 6 ~ 16 h,去除盖片,按照供应商建议的强度和清洗条件洗涤探针,略干后 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride,4',6-二氨基-2-苯基吡啶)复染,置荧光显微镜下观察杂交结果。

1.4 组织微阵列 IHC 法检测乳癌 HER-2 蛋白的表达

首先制作全部标本的组织微阵列蜡块,然后采用常规 SP 法进行免疫组织化学染色,检测 HER-2 蛋白的表达。为保证 IHC 和 FISH 检测的一致性,在进行 FISH 和 IHC 时选取的是同一蜡块标本。

1.5 结果判断

免疫组织化学染色结果参照美国食品和药品管理局(FDA)标准^[8]:光镜下观察以细胞膜棕黄染色为阳性,分为 0 ~ 3 级:0 级为无细胞染色或 <10 % 的肿瘤细胞胞膜较弱染色;1 级为 $\geq 10\%$ 的肿瘤细胞胞膜部分较弱染色;2 级为大于 10 % 的肿瘤细胞胞膜完全较弱到中等染色;3 级为大于 10 % 的肿瘤细胞胞膜完全、均一强染色。所有结果均经两次重复观察,计分不一致者经再次观察确认。美国的一项调查显示,IHC 检测假阳性率平均为 18%,FISH 为 13%^[9],因此 2007 年美国 FDA 重新制定了乳腺癌 IHC 及 FISH 的标准,这一标准将乳癌 IHC(+++)定义为大于 30% 的肿瘤细胞呈现强的、完整的细胞膜着色,显然这一标准是为了减少假阳性率而制定的。本研究目的是了解采用新的组织微阵列技术及细胞核阵列技术 IHC 与 FISH 的一致性,为了便于同

以往发表的文献进行对比,因此仍采用传统旧的标准。

荧光原位杂交结果判断^[9]:HER-2 基因检测的探针同时含有 HER-2 基因(标记为橘红色荧光)和该基因所在的 17 号染色体着丝粒(标记绿色荧光)序列的混合探针。杂交的组织、细胞中有 75% 的细胞核显示出双色信号时,视为试验成功。且红、绿信号互为对照,癌与非癌细胞互为对照。具体操作:(1)红色信号的总数与绿色信号的总数比值 ≥ 2 时,为 HER-2 基因扩增,否则为无扩增;(2)若红、绿两信号的比值 >20 或众多信号连接成簇时可不计算,即视为基因扩增;(3)若比值介于 1.8~2.2 之间,则需要再计算 20 个细胞核中的信号或由另外一个分析者重新计数。如仍为临界值,则在检测报告中注明;(4)若 HER-2 基因扩增在不同癌细胞中存在异质性时,应在另一乳腺癌组织区域再计算 20~30 个癌细胞核中的红、绿信号值,报告其最大值,并加以注释;(5)在肿瘤细胞核中仅有一个绿色信号的病例诊断为 17 号染色体单倍体;(6)红色荧光信号的总数与绿色荧光信号的总数比值 <2 且绿色荧光信号 ≥ 3 为 17 号染色体多倍体型。

1.6 统计学处理

统计学处理采用 SPSS 11.5 软件,两种方法检测结果的比较采用一致性 Kappa 检验。以 FISH 检测结果为金标准,绘制 IHC 检测乳腺癌 HER-2 ROC 曲线; $P<0.050$ 有统计学意义。

2 结果

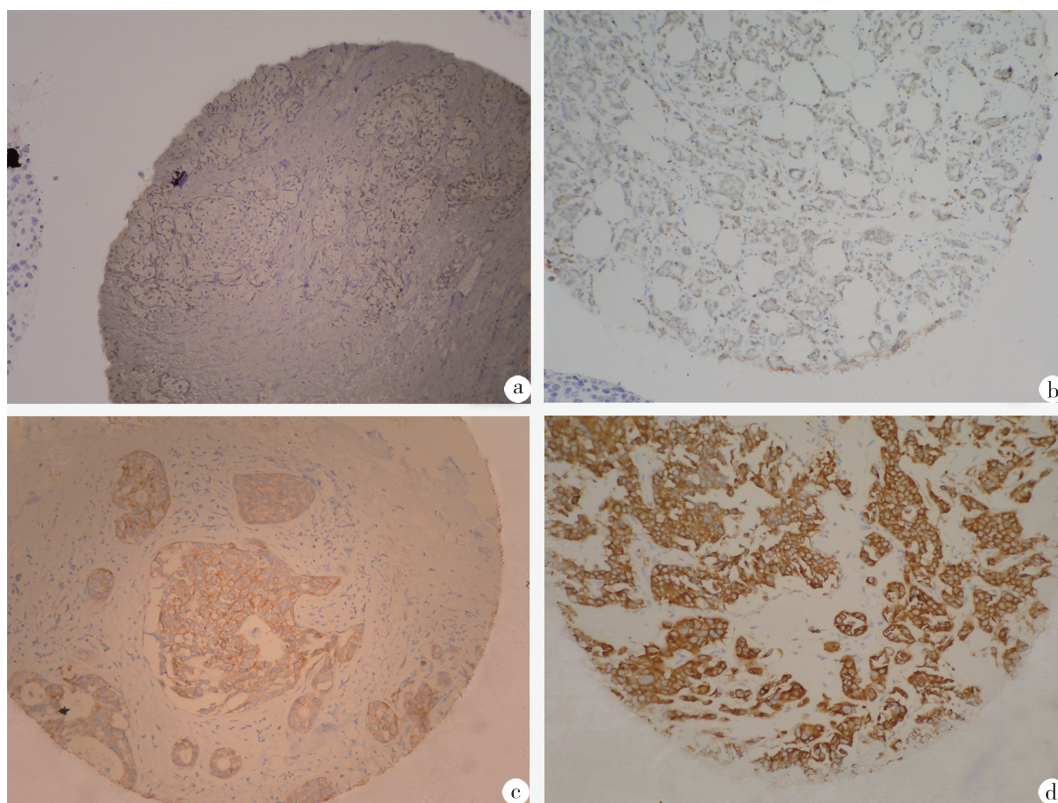
2.1 IHC 检测结果

248 例乳腺癌标本中,IHC(-) 为 90 例,IHC(+) 为 49 例,IHC(++) 为 37 例,IHC(+++) 为 72 例。根据 IHC 结果判断标准,阴性 176 例,阳性 72 例,阳性率为 29.0 % (表 1,图 1)。

表 1 248 例乳腺癌 HER-2 的 FISH 与 IHC 检测结果

IHC	FISH		总数
	-	+	
-	85	5	90
+	46	3	49
++	28	9	37
+++	13	59	72
总数	172	76	248

IHC:免疫组织化学检验;FISH:荧光原位杂交检验

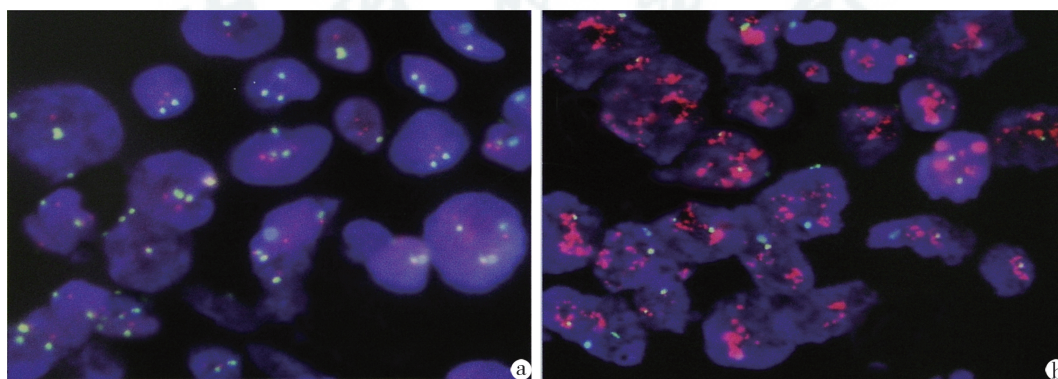


a:HER-2 (-); b: HER-2(+); c: HER-2(++); d:HER-2(+++)

图 1 乳腺癌组织 HER2 的免疫组织化学检测结果(SP 法 $\times 100$)

2.2 FISH 检测结果

248 例乳腺癌病理标本中,FISH 阴性 172 例(图 2a), FISH 阳性 76 例(图 2b)(表 1),FISH 阳性率为 30.6 %。



a:三色 FISH 观察到 HER-2 基因,无扩增(HE 染色 $\times 1000$);

b:三色 FISH 观察到 HER-2 基因扩增(HE 染色 $\times 1000$)

图 2 荧光原位杂交(FISH)结果

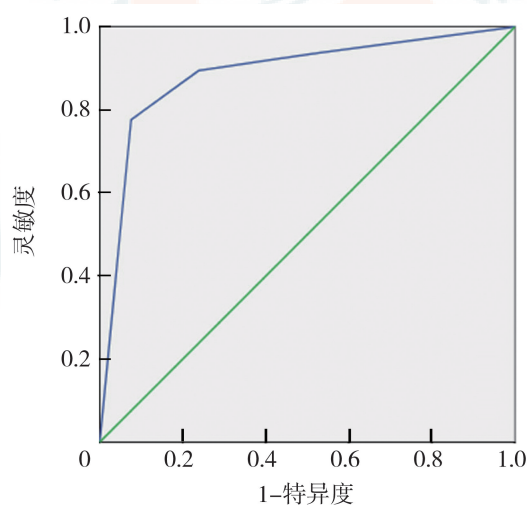
2.3 IHC 与 FISH 的结果比较

248 例乳腺癌 FISH 与 IHC 的检测结果见表 1。将 IHC(-) ~ (++) 合并后行一致性检验, $Kappa=0.711$, $P=0.000$ (表 2), IHC 检测阳性者 FISH 检测结果也趋向阳性。同时以 FISH 检测为金标准, 以 IHC 为变量指标绘制 ROC 曲线图, 测得曲线下面积为 0.888, $P=0.000$, 以 IHC(+++) 为诊断界值, 其准确率为 87.9% (图 3, 表 3)。通过 IHC 的检测可以较好的反映出 FISH 结果。

表 2 两种方法检测乳腺癌 HER-2 状态一致性分析

IHC	FISH		总数	Kappa 值	P 值
	-	+			
-	159	17	176	0.711	0.000
+	13	59	72		
总数	172	76	248		

IHC: 免疫组织化学检验; FISH: 荧光原位杂交检验



$P=0.000$, ROC 曲线下面积=0.888

图 3 免疫组织化学检测乳腺癌组织中 HER-2 的 ROC 曲线

表 3 IHC 检测乳腺癌 HER-2 的 ROC 曲线下面积及其他指标

IHC	FISH		A	灵敏度	特异度	约登指数	准确率	P 值
	+	-						
+	59	17	0.888	0.776	0.924	0.700	87.9%	0.000
-	13	159						

IHC: 免疫组织化学检验; FISH: 荧光原位杂交检验; A: ROC 曲线下面积

2.4 17 号染色体单体型与多倍体型

IHC(++) 中 4 例为 17 号染色体单体型, 其 FISH 检测结果均为阳性(红色

荧光信号的总数与绿色荧光信号的总数比值 ≥ 2 且绿色荧光信号 < 1), 占 FISH 阳性病例总数 5.26% (4/76)。IHC(+++) 中 5 例为 17 号染色体多倍体型, FISH 检测均为阴性(红色荧光信号的总数与绿色荧光信号的总数比值 < 2 且绿色荧光信号 ≥ 3), 占 FISH 阴性总例数 2.9% (5/172)。

3 讨论

笔者自己研究出了细胞阵列技术(发明专利号: ZL 2005 1 0100216.6)并将其用于 FISH 检测^[6], 一次可以完成 100 例样本的检测, 并且所用探针量与传统方法做 1 例检测的量相同, 大大降低了检测成本。利用细胞核阵列进行 FISH 检测, 所有病例均在同一条件下进行, 可比性强, 结果更为可信。通过这种方法同样克服了利用包埋组织进行 FISH 成功率低, 高背景的优点。制作细胞核阵列提取细胞时利用的是整张切片, 因此所分析的细胞应该包含了多个癌浸润部位, 且每个阵列点中细胞数可达 500 个^[6], 可以达到 FISH 检测的要求。

由于在本实验中采用了新的提取细胞核的方法, 并且采用了较厚的组织切片, 这样可以保证完整的细胞核占绝对优势, 因此在检测 HER-2 基因状态时可以避免假阴性的产生。在进行 HER-2 免疫组织化学分子检测时采用组织微阵列组技术, 使所有组织在同一条件下进行实验, 保证了实验结果的准确性^[7]。

本实验对 248 例病理诊断为乳腺癌的组织分别行 IHC 和 FISH 检测, 两种方法检测的结果进行一致性检验得出的结果: $Kappa = 0.711$, $P = 0.000$ 。IHC(+++) 共 72 例, 其中有 59 例 FISH 为阳性, 说明大多数 HER-2 蛋白过度表达的肿瘤, 其 HER-2 基因存在扩增。有 13 例 IHC(+++) 而 FISH 阴性的病例, 文献报道这类患者预后与 IHC 阳性患者相近似, 但没有明确提出是否应用靶向药物治疗^[10]。分析除了基因扩增外, 还可能存在转录和翻译水平的调控, 导致 HER-2 蛋白过度表达, 另外肿瘤对靶向药物的敏感性同时还受到肿机体免疫机能等条件的影响^[11]。

在 FISH 阳性结果病例中 8 例 IHC(- ~ +), 占 FISH 阳性结果总数的 10.5% (8/76), 与文献报道的比率相符^[12]。观察 FISH 染色切片并计数细胞核红色荧光信号, 均在 4 ~ 8 之间。提示这部分患者为基因低水平扩增。以 FISH 检测结果为金标准, IHC 检测的 ROC 分析显示, 曲线下面积为 0.888, $P = 0.000$; 以 IHC(+++) 为诊断界值, 其准确率是 87.9%。这说明通过 IHC 的检测可以较好的反映出 FISH 的结果。

本组 17 号染色体单体型病例 FISH 染色均是阳性,文献报道这类患者与整倍体 FISH 阳性患者的预后明显不同,对靶向药物治疗不敏感^[13]。提示当 IHC(++) 时有必要进行 FISH 检测来评价 HER-2 基因状态。认为 17 号染色体单体型的细胞核内红绿荧光信号比值大于 2,但是每个细胞核内红色信号绝对数小于整倍体,导致 HER-2 基因在转录、翻译水平上低于整倍体 FISH 阳性病例,可能出现乳腺癌细胞膜 HER-2 蛋白表达较低,而致 IHC 染色弱阳性或阴性可能。另外,17 号染色体单体型染色体本身是个畸变染色体,可能是乳腺癌 HER-2 基因一个特殊亚型,因而有不同的预后。

IHC 检测方法与 FISH 检测方法是通过两个不同途径来检测乳腺癌细胞 HER-2 蛋白表达和 HER-2 基因状态,FISH 检测虽精确、稳定,但试剂昂贵、要求条件苛刻,主要反映细胞遗传信息;而 IHC 检测敏感、试剂相对廉价,主要反映细胞功能状态。目前许多学者过于看重 FISH 检测方法。本实验证明 IHC 检测结果能够较好地反映 FISH 检测结果,在检测过程中需排除是否为 17 号染色体单倍体。

参考文献

- [1] Yoshida N, Omoto Y, Inoue A, et al. Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes[J]. Cancer Sci, 2004, 95(6): 496-502.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [3] Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358: 1409-1411.
- [4] Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside[J]. Mod Pathol, 1999, 12(8): 827-834.
- [5] Slodkowska J, Filas V, Buszkiewicz E, et al. Study on breast carcinoma Her2/neu and hormonal receptors status assessed by automated images analysis systems: ACIS III (Dako) and ScanScope (Aperio)[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2010, 48(1): 19-25.
- [6] Jiang HY, Zhang SQ, Zhao T. A new method to make nuclei or cell microarrays[J]. Diagn Mol Pathol, 2006, 15(2): 109-114.
- [7] Jiang HY, Zhang XF, Liu L, et al. A novel tissue array technique for high-throughput tissue microarray analysis: microarray groups[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2007, 43(3/4): 109-112.
- [8] Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. Clin Breast Cancer, 2005, 6(3): 240-246.
- [9] Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines[J]. Hum Pathol, 2005, 36(3): 250-261.
- [10] Dean Colomb W, Esteva FJ. Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(18): 2806-2812.

- [11] Park S, Jiang Z, Mortenson ED, et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity[J]. Cancer Cell, 2010, 18(2): 160-170.
- [12] O'Malley FP, Thomson T, Julian J, et al. HER2 testing in a population-based study of patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab[J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132(1): 61-65.
- [13] Risio M, Casorzo L, Redana S, et al. HER2 gene-amplified breast cancers with monosomy of chromosome 17 are poorly responsive to trastuzumab-based treatment[J]. Oncol Rep, 2005, 13(2): 305-309.

(收稿日期:2011-01-26)

(本文编辑:赵彬)

蒋会勇,马永权,张雪峰.微阵列技术用于检测乳腺癌人表皮生长因子受体 2 基因状态[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2011,5(4):525-533.

