HER-2 基因及蛋白的检测在乳腺癌临床诊断中的价值

余 琦,杨江辉,李 宁,鄂 盈,郝 翊,宋业盈 (解放军第 309 医院病理科,北京 100091)

[摘 要] **目的** 探讨用免疫组化(immunohistochemistry,IHC)和显色原位杂交技术(chromogenic in situ hybridization,CISH)检测乳腺癌 HER-2 蛋白表达和基因扩增在临床病理诊断及分子靶向治疗中的应用及意义。**方法** 用免疫组化(IHC)和显色原位杂交技术(CISH)检测 60 例乳腺癌石蜡包埋组织标本中 HER-2 蛋白的表达及基因扩增情况,比较两种方法的结果以及与临床病理的关系。**结果** HER-2 蛋白过表达与 HER-2 基因扩增之间密切相关。**结论** 两者综合结果的判定对乳腺癌患者的临床治疗有明确的指导意义,可用于临床赫塞汀(Herceptin)分子靶向治疗病例的筛选。

[关键词] HER-2;免疫组化;显色原位杂交技术;乳腺癌;基因表达

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)04-0367-03

Clinical value of HER-2 gene and protein detection in diagnosis of breast cancer

YU Qi, YANG Jiang-hui, LI Ning, E Ying, HAO Yi, SONG Ye-ying (Department of Pathology, 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, china)

Abstract: Objective To explore the clinical value of applying immunohistochemistry (IHC) and chromogenic in situ hybridization (CISH) to detect HER-2 protein expression and gene amplification in clinical pathological diagnosis of breast caner and molecular targeting therapy. **Methods** The HER-2 protein expression and gene amplification in 60 cases of formalin fixed and paraffin embedded breast carcinoma samples were detected by method of IHC and CISH. The results of the two methods were compared and the clinical pathological relations were analyzed. **Results** The results showed that the over-expression of HER-2 protein was closely related with HER-2 gene amplification. **Conclusion** Both of IHC and CISH are of clinically value for breast cancer treatment and both can be used to screening cases in molecular targeting therapy of Herceptin.

Keywords: HER-2; immunohistochemistry; chromogenic in situ hybridization; breast cancer; gene expression

原癌基因 HER-2/c-erbB-2/nue 与 v-erbB 原癌基因有高度同源性,定位于 17q12-21,其具有酪氨酸激酶活性,现已证实在 20% ~30% 的乳腺癌病人中 HER-2 基因扩增或蛋白过表达,而大量研究表明 HER-2 的过表达与乳腺癌病程的进展及不良预后有关[1-2],随着现代分子生物学及其相关学科的发展,目前对 HER-2 基因的研究已越来越受到国内外学者的重视,同时乳腺癌的治疗策略也发生了极大的变化,通过抑制细胞活化信号的传递来治疗有 HER-2 基因扩增的乳腺癌的药物赫塞汀(Herceptin)已通过美国 FDA 认证,并已成功应用于临床治疗,疗效显著[3-4]。以往多采用免疫组化(IHC)方法检测 HER-2 蛋白的表达,显色原位杂交(CISH)技术是近年来对 HER-2 基因检测的一种新方法,我们运用这两种检测技术对 60 例乳腺癌标本的 HER-2 蛋白和基因进行检测,通过两者综合结果的判定,为临床筛选赫塞汀用药病例及选择治疗方案提供了可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集我院 2010 年下半年手术切除乳腺癌石蜡标本 60 例,其中浸润性导管癌 48 例,导管内癌 12 例,患者均为女性,年龄 35 ~70 岁,平均 43 岁,有 46 例浸润性导管癌病例发生局部或腋窝淋巴结转移,标本均经 10% 中性甲醛固定处理。

1.1.2 试剂 IHC 检测试剂采用小鼠抗人 HER-2 单克隆抗体工作液,即用型非生物素免疫组化 EnVision 检测试剂盒(KIT-9902),均购自福州迈新生物技术有限公司。CISH 检测试剂采用 Zyme SPoT-Light HER2 CISH 即用型试剂标准试剂盒,为美国 Zymed 公司产品,购自北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法(IHC) 常规切片脱蜡后入 PBS 液,组织片入 EDTA pH 8.0 枸橼酸缓冲液中行高压修复,切片浸入 3% H_2O_2 10 min。PBS 液充分洗涤后滴加一抗于切片上,37 ℃烤箱孵育 90 min,PBS 液洗 5 min×3 次,二抗室温孵育 30 min;PBS 充分洗涤后 DAB 显微镜下观察显色,达到信号强度后终

[作者简介] 余 琦(1973 -),女,北京市人,实验师,主要从事肿瘤临床病理方面的研究。电话:(010)66775047,E-mail:davidlee65@ sina.com

[通讯作者] 李 宁(1956 -),男,主任医师、教授,硕士生导师,主要从事肿瘤病理学诊断和研究。E-mail:davidlee65@ sina. com. cn

[收稿日期] 2011-04-25 [修回日期] 2011-05-10

止显色,苏木素衬染,脱水,透明,封片。

1.2.2 显色原位杂交法(CISH) 常规石蜡切片 4 μm,自然干燥后 60 ℃烤片 4 h,脱蜡至纯水,入预处理液中加热,98 ℃以上煮沸 20 min 后,立即入室温下纯水洗 2 min × 3 次;胃酶消化 8 min 后梯度酒精脱水,自然干燥晾干,每张切片滴加 HER-2 探针 15 μl,盖玻片封闭以免加热时蒸发,95 ℃变性 5 min,37 ℃ PCR 杂交仪过夜,常温 SSC 液洗涤后入 70 ℃ SSC 液 5 min,纯水洗 2 min × 3 次,3% H_2O_2 甲醇溶液 10 min,PBS 洗 2 min × 3 次,滴加阻断剂室温 10 min,不必洗涤,甩去后直接滴加鼠抗 DIG 抗体,室温 30 min,PBS 洗,滴加 HRP-抗鼠抗体,室温 30 min,PBS 洗,DAB 显色室温 30 min,水洗后,苏木素复染,梯度酒精脱水,透明,封片。每次实验均设立阴、阳性对照。

1.3 结果判定标准

1.3.1 IHC 检测结果判定 按照迈新公司提供的分级标准,参考 Herceptest 标准[5]进行评定。全部瘤细胞中细胞膜无染色或少于 10% 的肿瘤细胞膜染色为(-);大于 10% 的瘤细胞呈现微弱、不完整的细胞膜着色(+);瘤细胞细胞膜呈现大于 10% 轻度至中度完整染色结果为(++);瘤细胞细胞膜大于 10% 完全强染色结果为(+++)。

1.3.2 CISH 基因检测结果的判定 大部分(大于 50%)肿瘤细胞核内有 1 ~ 5 个 HER-2 基因信号颗粒视为无扩增,大部分(大于 50%)肿瘤细胞核内有 4 ~ 6 个基因信号颗粒视为低拷贝扩增,大部分肿瘤细胞(大于 50%)每个核内有 5 个或以上的信号点,或超过 50% 的肿瘤细胞中出现大簇团的信号为高拷贝扩增。对于难以判定的标本,采用选定区域计数细胞 30 ~ 60 个的信号颗粒来进行判读。

1.4 统计学处理

采用非参数检验法判断 HER-2 蛋白表达和基因扩增及二者与淋巴结转移间的相互关系,$P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 HER-2 蛋白的表达和 HER-2 基因扩增的关系

60 例乳腺癌标本组织经 IHC 检测 HER-2 蛋白表达病例中,16 例强阳性(+++),其 HER-2 基因扩增阳性率为 94%(15/16),高拷贝扩增为 12 例,低拷贝扩增 3 例,无扩增 1 例;19 例阳性(++)病例中,HER-2 基因扩增阳性率为 63%(12/19),低拷贝扩增 12 例,无扩增 7 例;10 例弱阳性病例中,HER-2 基因扩增阳性率 10%(1/10),低拷贝扩增 1 例,9 例无扩增;12 例阴性病例中,基因扩增率为 0(0/15)。本研究结果显示,HER-2 基因扩增与 HER-2 蛋白表达各组分布中,阳性率差别明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 HER-2 蛋白的阳性表达和 HER-2 基因扩增成正相关。

2.2 HER-2 蛋白表达、基因扩增与淋巴结转移

本研究 60 例乳腺癌标本中,45 例(75%)HER-2 蛋白表达阳性,均为为浸润性导管癌,为浸润性导管癌病例的 94%(45/48);HER-2 蛋白表达病例中伴淋巴结转移癌组的分布为 80%(37/46);而未伴淋巴结转移癌组的分布为 21%(3/14)。12 例导管内癌 HER-2 蛋白表达均为阴性(0/12)。本研究 60 例乳腺癌中伴淋巴结转移组 HER-2 蛋白表达阳性率(80%)与未伴淋巴结转移组阳性率(21%)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1;本组 60 例乳腺癌中,28 例(47%)HER-2 基因扩增阳性,其中 12 例 HER-2 基因高拷贝扩增均为浸润性导管癌,为浸润性导管癌的 25%(12/48);HER-2 基因扩增病例在伴淋巴结转移癌组的分布为 54%(25/46);而在未伴淋巴结转移癌组的分布为 21%(3/14)。12 例导管内癌 HER-2 基因扩增均为阴性(0/12)。本研究 60 例乳腺癌中伴淋巴结转移癌组 HER-2 基因扩增阳性率(54%)与未伴淋巴结转移癌组(21%)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 HER-2 蛋白表达、基因扩增与乳腺癌转移的关系

项目	例数(n)	HER-2 (n,%)		HER-2 基因扩增(n,%)	
		阳性	阴性	阳性	阴性
伴淋巴结转移	46	37(80)*	9(20)	25(54)*	21(46)
未伴淋巴结转移	14	3(21)	11(79)	3(21)	11(79)

*:与未伴淋巴结转移组比较,$P < 0.05$

3 讨论

HER-2 基因表达增高与原发性肿瘤的组织学或细胞核分级差,阳性淋巴结水平、肿瘤体积大、肿瘤细胞增殖活性高和 DNA 多倍体相关,与肿瘤雌激素受体及孕激素受体表达呈负相关[6]。临床上,HER-2 过表达的乳腺癌患者往往生存率低、病情进展迅速、易复发及转移、对化疗耐药、化疗缓解期缩短[7],同时其能作为独立的乳腺癌预后因素,HER-2 过表达的患者无病生存(DFS)和总生存(OS)较短[8]。2002 年美国 FDA 批准了一种全新药物 Herceptin 的使用,这种是一种人源化的针对 HER-2 受体的单克隆抗体,它能通过抑制肿瘤细胞生长信号的传导进而抑制肿瘤生长、减少 S 期肿瘤细胞数目,下调肿瘤细胞表面的 HER-2 蛋白及减少血管内皮生长因子产生等途径发挥作用,临床应用显示 Herceptin 能有效治疗 HER-2/nue 高表达的乳腺癌[9-12],提高患者生活质量。Herceptin 也被用于其他系统肿瘤,如头颈肿瘤,还有希望用于进展期或转移性胰腺癌的治疗[13-15]。

免疫组化是一项较为成熟的技术,已在临床病理上普遍应用。IHC 能检测组织中蛋白的表达强度及蛋白定位,还具有较好的组织形态学的信息,但作为一项半定量技术并易受诸多因素的影响。本研究中 IHC 检测 HER-2 蛋白阳性率为(+ ~ +++)75%,能较好地显示其细胞膜定位。而 Herceptin 发挥作用需要肿瘤细胞表面的 HER-2 蛋白,但由于 IHC 可能存在假阳性,其灵敏度及阳性预测值有多高尚不确定,因此并非所有细胞膜表达 HER-2 蛋白的患者都需要接受 Her-

ceptin 的治疗。弱阳性病例则需从基因水平检测 HER-2 以确定细胞膜 HER-2 蛋白阳性的细胞其细胞核中基因的情况。

CISH 是将癌基因探针用地高辛或生物素标记,利用过氧化物酶或碱性磷酸酶的反应使在光学显微镜下检测石蜡组织 mRNA 的表达水平。本研究结果示,在乳腺癌中 CISH 检测 HER-2 基因扩增阳性率为 47%,与 IHC 阳性率相比较低,这提示我们 IHC 可能存在扩大 HER-2 蛋白表达阳性率的可能,我们进一步分析比较了两种方法结果的差异,随着 HER-2 蛋白表达的增加,HER-2 基因扩增增加,具有统计学意义,表明 HER-2 蛋白高表达主要由其基因扩增引起。数据显示 IHC 强阳性组(+++),CISH 阳性率为 94%,IHC 弱阳性组(+ ~ ++),CISH 阳性率为 45%,IHC 阴性组(-),CISH 阳性率为 0。数据表明强阳性及阴性表达与 HER-2 基因扩增与否有良好的一致性;HER-2 弱阳性表达一致度只有 45%,所以并不能反应 HER-2 蛋白表达的真实情况,应进一步从基因水平检测 HER-2 情况,以正确指导临床用药。

本研究应用 IHC 和 CISH 联合检测乳腺癌中 HER-2 蛋白及基因的表达,得出 HER-2 蛋白高表达由基因的扩增引起,IHC 检测 HER-2 蛋白强阳性或阴性可直接指导临床对 Herceptin 的应用,弱阳性病例则需行基因检测才可指导临床赫塞汀(Herceptin)分子靶向治疗病例的筛选。

[参考文献]

[1] AkiyamaT, Sudo C, Ogawara H, et al. The product of cerbB-2 genea 185-kilodalton glycoprotein with tyrosinekinase activity[J]. Science, 1986, 232(4758):1644 - 1646.

[2] 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.

[3] Vogel CL, Reddy JC, Reyno LM. Efficacy of trastuzumab[J]. Cancer Res, 2005, 65(5):2004.

[4] Slamon DJ, Romond EH, Perez EA. Advances in adjuvant the rapy for breast cancer[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2006, 4(3):4 - 9.

[5] Hammock I, Lewis M, Phillips C, et al. strong HER-2/neu protein over-expression by immuno-histochemistry often does not prediet oncogene amplification by fluores-cence in situ by bridization [J]. Hum pathol 2003, 34:1043 - 1047.

[6] 郑 莉,任加强. HER-2/neu 过表达通过 P13k-AKT 通路对乳腺癌细胞 MCF7 中 P53 基因表达及细胞生长和放疗敏感性的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(10):594 - 597.

[7] Kunitomo K, Inoue S, Ichihara F, et al. A case of metastatic breast caner with outgrowth of HER-2 negetive cells after eradication of HER-2 positive cells by humanized anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumad) combined with docetaxe[J]. Hum Pathol, 2004, 35(3):379 - 381.

[8] Ardavanis A, Hung M. Dysregulation of cellular signaling by HER-2/nue in breast cancer[J]. Semin Oncol, 2003, 30:38 - 48.

[9] Ardavanis A, Kountourakis P, Kyriakou F, et al. Trastuzumabplus paclitaxel or docetaxel in HER-2-negative/HER-2 ECD-positive anthracycline-and taxane-refractory advanced breast cancer[J]. Oncologist, 2008, 13(4):361 - 369.

[10] Ardavanis A, Kountourakis P, Kyriakou F, et al. Trastuzumabplus paclitaxel or docetaxel in HER-2-negative/HER-2 ECD-positive anthracycline-and taxane-refractory advanced breast cancer[J]. Oncologist, 2008, 13(4):361 - 369.

[11] Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients wish HER-2/neu-positive metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(11):1789 - 1796.

[12] Khosravi-Shahi P, Izarzugaza-Peron Y, Encinas-Garcia S, et al. Tratamiento adyuvante en el cancer de mama operable. [Adjuvant treatment of operable breast cancer][J]. An-Med-Interna, 2008, 25(1):36 - 40.

[13] Kondo N, Ishiguro Y, Kimura M, et al. Antitumor effect of gefitinib on head and neck squamous cell cercinoma enhanced by trastuzumab[J]. Oncol Rep, 2008, 20(2):373 - 378.

[14] Mihaljievic A, Buchler P, Harder J, et al. A prospective, non-randomized phase Ⅱ trial of Trastuzumab and Capecitabine in patients with HER-2 expressing metasized pancreatic cancer[J]. BMC Surg, 2009, 9:1.

[15] Stathopoulos GP, Androulakis N, Souglakos J, et al. Present treatment and future expectations in advanced pancretic cancer[J]. Anticancer Res, 2008, 28(2B):1303 - 1308.

(编辑:周小林)

欢迎使用《局解手术学杂志》稿件远程处理系统

为提高编辑、出版工作效率,缩短论文发表周期,加强作者、读者、编者及审稿专家的联系,《局解手术学杂志》开通了互联网在线投稿、审稿、查询系统,本系统包括作者在线投稿查稿、专家在线审稿、编辑在线办公 3 部分。即日起作者可通过网站投稿并查询稿件处理情况,审稿专家可实现网上审稿。网址为 http://www.jraos.com.cn。本刊编辑部欢迎广大作者、读者访问本刊网站并使用该系统。

如果您在投稿中遇到什么问题,或者对本系统及网站有好的意见和建议,请及时联系我们,谢谢您的大力支持!

电话:(023)68752649,68752251,E-mail:jjssxzz@yahoo.com.cn

《局解手术学杂志》编辑部