

## • 论 著 •

FISH 和 IHC 检测乳腺癌患者 HER2/neu 基因影响因素的研究<sup>\*</sup>黄俊<sup>1</sup>, 邓明凤<sup>1</sup>, 郭华雄<sup>2</sup>, 王昌富<sup>1△</sup>, 陈登峰<sup>3</sup>, 李滔<sup>1</sup>, 陈永玲<sup>1</sup>

(华中科技大学同济医学院附属荆州医院:1. 医学检验部;2. 病理科;3. 乳腺科, 湖北荆州 434020)

**摘要:**目的 观察乳腺癌石蜡包埋组织荧光原位杂交(FISH)和免疫组化(IHC)检测乳腺癌患者 HER2/neu 基因状态, 比较不同切片方法及不同结果判读人员的经验区别。方法 55 例乳腺癌石蜡包埋组织分组切片和观察判读, 观察 1 组: 由技术人员选定区域切片, 平行检测 HER2/neu 基因状态; 观察 2 组: 先切片做 HE 染色, 由初级病理医师根据病理图像选定区域后切片, 平行检测 HER2/neu 基因状态, 并由初级病理医师分析结果; 观察 3 组, 由中、高级病理医师根据病理图像选定区域后重新切片检测, 判读分析。结果 观察 1 组和观察 2 组, IHC(—) 和 IHC(1+) 与 FISH 检测一致性较好, IHC(2+) 和 IHC(3+) 与 FISH 检测的相符率分别为 33.33%/33.33%, 50.00%/100.00%; 2 组的一致性分别为中等和较好 (K1=0.478, K2=0.659); 共有 10 例患者入选观察 3 组, 重新切片后, 6 例患者结果不同, 其中 3 例为取材误差, 3 例为判读误差, 3 例取材误差均出现在观察 1 组。结论 FISH 和 IHC 检测乳腺癌患者 HER2/neu 基因状态受到制片、结果判读等多种因素影响, 实验室应制定标准化的操作程序, 严密的质量控制和质量保证措施, 才可得到准确而可靠的结果。

**关键词:**原位杂交, 荧光; 免疫组织化学; 乳腺肿瘤; 表皮生长因子; 标准化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0268-03

## Research on effecting factor of the detection of HER2/neu gene expression in patients with breast cancer

by fluorescence in-situ hybridization and by immunohistochemistry<sup>\*</sup>Huang Jun<sup>1</sup>, Deng Mingfeng<sup>1</sup>, Guo Huaxiong<sup>2</sup>, Wang Changfu<sup>1</sup>, Cheng Dengfeng<sup>3</sup>, Li Tao<sup>1</sup>, Chen Yongling<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of pathology; 3. Mammary Glands Section,

Affiliated Jingzhou Hospital, Tongji Medicine College, Huazhong Science and

Technology University, Jingzhou Hubei 434020, China)

**Abstract: Objective** To compare the influence of different sampling methods and observers on the detection of HER2/neu gene expression in paraffin-embedded tissue of breast cancer by fluorescence in-situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC). **Methods** 55 cases of paraffin-embedded tissues of breast cancer were grouped according to section and observation. In Observed Group 1, target section regions were selected and parallel observed by technical staff. In Observed-Group 2, the tissue were first sliced and dyed with HE, the regions for section were selected by ordinary pathologists according to the pathological images, the HER2/neu gene was detected meanwhile and then the results were judged by the same ordinary pathologists. In Observed-Group 3, the regions for section were selected according to the pathological images and the tissues were sliced again and judged by professional pathologists. **Results** In Observed Group 1 and Observed-Group 2, there was fine consistency between IHC(—), IHC(+) and FISH, and the coincidence was 33.33%/33.33% and 50.00%/100.00% between IHC(2+), IHC(3+) and FISH. The consistency of Observed Group 1 and 2 were moderate and preferable (K1=0.478, K2=0.659). 10 cases were grouped into the Observed-Group 3, among which, after section again, 6 cases were obtained with different results, including 3 cases of sampling error from Observed Group 1, and 3 cases of error judgment. **Conclusion** Detection of HER2/neu gene in breast cancer by FISH and IHC was influenced by many factors, such as slice preparation and result interpretation. Standardized operating procedures and measures for quality control and assurance should be developed to obtain accurate and reliable results.

**Key words:** in-situ hybridization, fluorescence; immunohistochemistry; breast neoplasms; epidermal growth factor; standardization

HER2/NEU 是人类表皮生长因子受体 2, 其编码基因位于 17q21, 编码相对分子质量为  $185 \times 10^3$  跨膜蛋白, 具有细胞内酪氨酸激酶活性, 调节细胞的生长发育及分化。目前已证实 25%~30% 的晚期乳腺癌患者肿瘤有 HER2 基因的扩增或过度表达, 对一般化疗方案无效, 肿瘤易早期复发且患者生存期缩短, 靶向治疗药物 Herceptin 自问世并成功用于临床, 已使很多 HER2 高表达的患者受益, 这提示准确测定 HER2 基因状态至关重要<sup>[1]</sup>。目前美国 FDA 批准临幊上进行检测的方法有 2 种: 一为免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 检测

蛋白表达, 二为荧光原位杂交 (fluorescent in-situ hybridization, FISH) 检测基因扩增, 但二者各有特点, 规范操作程序十分必要。笔者采用前瞻性分析, 观察了本院 55 例女性乳腺癌石蜡包埋组织 FISH 和 ICH 检测 HER2/neu 的基因状态和蛋白表达, 比较不同取材方法以及结果判读人员对检测的影响, 旨在发现影响检测重复性和准确性的因素, 为临幊进一步应用该技术提供依据。

## 1 资料与方法

## 1.1 一般资料 选取华中科技大学同济医学院附属荆州医院

\* 基金项目: 卫生部科研基金课题(WKJ2007-3-001)。

2008 年 3~12 月确诊的 55 例乳腺癌患者。(1)入选标准:① ECOG 体力评分≤1;②可获得足够病理标本的 I~IV 期乳癌患者;③如行乳癌根治术、改良根治术或保乳手术,腋窝淋巴结清扫数目应超过 10 个;(2)排除标准:①已行新辅助化疗、放疗及或内分泌治疗;②腋窝淋巴结清扫数目不足 10 个;③ECOG 体力评分>1 分。

**1.2 标本的获取** 对于可手术患者,通过手术获得标本,包括原发病灶的标本和淋巴结的标本。不能手术患者通过粗针穿刺的方法获得标本。所选标本采用中性福尔马林固定,石蜡包埋切片后行 FISH 检测。所采用的试剂盒为购自北京金普嘉公司的 PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, 内含 Her-2/neu DNA 探针及 CEP17 探针。

**1.3 切片方法** 55 例患者随机分为 2 组,未观察组 20 例,患者石蜡组织由技术人员选定区域后切片 3 张,切片厚度为 4  $\mu\text{m}$ ,1 张用于 HE 染色,2 张用于 FISH 和 IHC 检测;观察 1 组 35 例,患者石蜡组织先切片做 HE 染色,由一般病理医师根据病理图像选定区域后切片 2 张,用于 FISH 和 IHC 检测。观察 2 组:上述 2 组患者出现 IHC(−/1+),FISH(+) 或 IHC(2+/3+),FISH(−) 时,由专科病理医师根据病理图像选定区域后重新切片 2 张检测。

**1.4 FISH 和 IHC 检测** 采用独立盲法检测分析。

**1.4.1 操作流程** IHC 操作流程:S-P 免疫组化法。组织脱蜡,水化,抗原修复,过氧化物酶阻断,滴加非免疫性动物血清,第一抗体,第二抗体,链霉菌抗生素-过氧化物酶溶液,DAB 显色,苏木素,氨水返蓝,脱水,透明,封片后观察。FISH 操作流程:参照文献[2]。

**1.4.2 结果判断**

**1.4.2.1 判断标准** IHC:参照《乳腺癌 HER2 检测指南》<sup>[3]</sup>: (−):无染色或少于 10% 细胞膜染色;(1+):≥10% 细胞有不完整胞膜染色;(2+):≥10% 细胞有较弱但完整的胞膜染色;(3+):≥10% 细胞有较强的完整胞膜染色。(−) 和 (1+) 为无或低表达,(2+) 和 (3+) 为过表达。

FISH:在 10/40 倍物镜下观察信号,选择细胞核大小一致、核边界完整、DAPI 染色均一、细胞核孤立无重叠、绿色着丝粒信号清晰的区域,在 100 倍物镜下,通过特异的单通道滤光片随机计数 30 个细胞内信号。正常细胞:单个间期细胞核中红色及绿色信号各 2 个。HER2 基因扩增异常细胞:单个间期细胞核中红色信号大于 2 个。Ratio 值计算:Ratio 值 = 30

个细胞核中核中红色信号总数/30 个细胞核中绿色信号总数,Ratio<1.8 提示该样本无 HER2 基因扩增;Ratio>2.2 提示样本中 HER2 基因扩增;若 Ratio>20 或众多信号连接成簇时,可不用计算,即视为基因扩增;Ratio 在 1.8~2.2 时,可以选择增加计数细胞至 100 个,或者重新本次实验来判断最终结果。若遇到 HER2 基因扩增在不同癌细胞中存在异质性时,要于另一癌区域再计算 30 个癌细胞核中的红绿信号值,报告其最大值,并加以注释。

**1.4.2.2 判断方法** 所有样本均由一般病理医师读片,IHC(2+和/3+),FISH(−) 或 FISH(+),ICH(−~1+) 患者,重新切片检测后,由 2 位专科病理医师,共同判读分析,并复核前次结果,分别记为结果 1 和结果 2,2 次结果有差异时,以结果 2 为准。

**1.5 配对 Kappa 分析** IHC(−/1+) 为阴性组,(2+/3+) 为阳性组,以 FISH 结果为标准,应用 SPSS13.0 统计软件进行配对 Kappa 分析,比较 2 种切片方法对 HER2/neu 检测一致性的影响(K1,K2)。K 值范围为 −1~1。K 值为 0 表示判读的一致性由机遇造成;负值表示判读的一致性低于机遇造成的一致性;大于 0 的 K 值对应的判读重复性如下:0.00~0.20 一致性低,0.21~0.40 一致性中下,0.41~0.60 一致性中等,0.61~0.80 一致性较好,0.81~1.00 一致性极好。

## 2 结 果

**2.1** 55 例患者 HER2 检测 IHC(−)26 例,(1+)8 例,(2+)9 例,(3+)12 例,FISH 检测 13 例(+),阳性率 23.64%(13/55),除观察 1 组 1 例患者 IHC(−)/FISH(+) 外,其余 IHC(−) 和 (1+) 患者与 FISH 结果一致性好,IHC(2+) 和 IHC(3+) 未观察组与 FISH 检测的相符率分别为 33.33% 和 50.00%;观察 1 组分别为 33.33% 和 100.00%;应用 SPSS 13.0 统计软件进行配对 Kappa 分析,观察 1 组(K1=0.478) 优于未观察组(K2=0.659)。

表 1 未观察组和观察 1 组乳腺癌患者 FISH 和 IHC 检测结果及配对 Kappa 分析

分组	FISH	IHC	IHC	IHC	IHC	配对 Kappa 分析
		(−)	(1+)	(2+)	(3+)	
未观察组	FISH(−)	8	4	2	3	K1=0.478
	FISH(+) 0	0	0	1	3	P1=0.01
观察 1 组	FISH(−)	17	4	4	0	K2=0.659
	FISH(+) 1	0	2	6	P2=8.72×10 <sup>−5</sup>	

表 2 10 例患者不同取材方法及判读人员 FISH 和 IHC 检查结果比较

组别	病例号	一般病理医生判读结果	专科病理医师判读结果	
			结果一	结果二
未观察组	5	IHC(3+)FISH(−)	IHC(3+)FISH(−)	IHC(3+)FISH(−)
	8	IHC(3+)FISH(−)	IHC(3+)FISH(−)	IHC(3+)FISH(+) 1
	11	IHC(2+)FISH(−)	IHC(2+)FISH(−)	IHC(2+)FISH(+) 1
	16	IHC(3+)FISH(−)	IHC(3+)FISH(−)	IHC(3+)FISH(+) 1
	20	IHC(2+)FISH(−)	IHC(2+)FISH(−)	IHC(2+)FISH(−)
观察 1 组	5	IHC(−)FISH(+) 1	IHC(+)FISH(+) 1	IHC(2+)FISH(+) 1
	10	IHC(2+)FISH(−)	IHC(1+)FISH(−)	IHC(1+)FISH(−)
	12	IHC(2+)FISH(−)	IHC(2+)FISH(−)	IHC(2+)FISH(−)
	32	IHC(2+)FISH(−)	IHC(2+)FISH(−)	IHC(2+)FISH(−)
	34	IHC(2+)FISH(−)	IHC(1+)FISH(−)	IHC(1+)FISH(−)

**2.2** 共有 10 例 IHC(−/1+)，FISH(+) 或 IHC(2+/3+)，FISH(−)，重新切片检测后，6 例结果不同(见表 2)，其中 3 例为取材误差，3 例为判读误差，3 例取材误差均出现在技术人员取材组。

### 3 讨 论

FISH 技术是 20 世纪 80 年代末期发展起来的一种非放射性原位杂交技术，具有高稳定性、高准确性和高灵敏性的特点。近年来，FISH 技术越来越多的应用于肿瘤基因的检测<sup>[4-5]</sup>，特别是在乳癌患者 HER2/neu 基因检测方面，目前被认为是检测 HER2 的金标准，但其试剂价格昂贵，技术要求高，目前大多数学者认为 IHC 是筛查 HER2 基因状态的首选方法，而 FISH 用于结果的确认，二者的准确性和一致性一直是人们关注的焦点。

既往的有关研究中，人们注意到，IHC 检测时有关固定，抗体(包括抗原修复)，技术(如 IHC、FISH 和 CISH)，染色方法以及操作者经验等的差异是很普遍的<sup>[6]</sup>，而 FISH 检测也受到多种因素的影响，在不同实验室间存在差异<sup>[7]</sup>。这些研究多为回顾性分析，本文采用前瞻性分析，观察了 55 例未经治疗的女性乳癌石蜡组织 HER2 基因状态，比较了不同取材方法和结果判读人员对 FISH 和 IHC 检测的影响。

本组结果显示，未观察 HE 染色取材时，IHC 与 FISH 检测结果一致性低于观察组，且这种误差容易出现在 HER2/neu 表达阳性的患者中。Moeder 等<sup>[8]</sup>发现肿瘤组织存在异质性，而这种异质性将导致检测结果发生差异。为了避免这些误差，《乳癌 HER2 检测指南》<sup>[3]</sup>指出，应该选择与 HE 染色相同的区域观察 IHC 和 FISH 结果，本文结果显示在取材检测 HER2/neu 基因之前，观察 HE 染色，准确地了解肿瘤组织的状态，可以减少由于取材误差造成的差异。

IHC 和 FISH 的结果判读一直是人们关注的重点，认为是影响结果准确性和一致性的重要因素，IHC 的结果判定属于经验性诊断，即使采用 HercepTest<sup>[9]</sup>，其重复性为中等或以下；FISH 虽然有一定的量化标准，但对于比值为 1.8~2.2 之间的病例依然存在误差。美国 ASCO/CAP 乳癌 HER2 检测专家组对这种人为因素干扰也很关注，提出 IHC 和 FISH 的结果判读应由有经验的工作者完成，以保证结果的准确性和一致性<sup>[10]</sup>。本组观察 1 组 5 号、10 号和 34 号病例，一般病理医师与专科病理医师判读结果有差异，表明结果判读在不同经验的医师间是不同的，这一结论也与 Wolff 等<sup>[11]</sup>一致。

HER2 基因的表达状态直接影响患者的预后判断，指导临床用药，因此国际社会对 HER2 检测标准化非常重视。2006 年我国发布了《乳癌 HER2 检测指南》<sup>[3]</sup>，之后美国、英国、加拿大等<sup>[10-13]</sup>相继推出了本国的指南性文件，在文件中对于检测流程每个环节和实验室要求等方面都制定了详细的标准方案和判读标准。在本文的研究中，笔者发现即使排除了药物和样本保存等方面的影响，FISH 和 IHC 检测乳癌患者 HER2 基因依然受到制片、结果断读等多种因素影响。实验室应制定标准化的操作程序，严格按照程序进行操作，才可得到准确而可靠的结果。

### 参考文献

[1] Ross JS, Gray GS. Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu

- and Herceptin story[J]. Clin Leadersh Manag Rev, 2003, 17(6): 333-340.
- [2] 黄俊, 邓明凤, 等. 荧光原位杂交(FISH)技术与免疫组织化学(IHC)技术应用于乳癌患者 Her2 基因检测的评价[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 24(3): 92-94.
- [3] 《乳癌 HER2 检测指南》编写组. 乳癌 HER2 检测指南[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(10): 631-633.
- [4] 刘静芸, 林婴, 杨季云. 荧光原位杂交技术对多发性骨髓瘤染色体异常的检测及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 349-352.
- [5] 向阳, 府伟灵. 荧光原位杂交检测细胞中 hTERC 基因扩增在宫颈癌早期诊断中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(8): 733-736.
- [6] Powell WC, Hicks DG, Prescott N, et al. A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the HER2 status in breast cancer: comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory reproducibility[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(1): 94-102.
- [7] Roche PC, Suman VJ, Jebkins RB, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9381[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(11): 855-857.
- [8] Moeder CB, Giltman JM, Harigopal M, et al. Quantitative justification of the change from 10% to 30% for human epidermal growth factor receptor 2 scoring in the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines: tumor heterogeneity in breast cancer and its implications for tissue microarray based assessment of outcome[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(34): 5418-5425.
- [9] Hsu CY, Ho DM, Yang CF, et al. Interobserver reproducibility of HER-2/neu protein overexpression in invasive breast carcinoma using the DAKO HercepTest[J]. Am J Clin Pathol, 2002, 118(5): 693-698.
- [10] Santinelli A, Baccarini M, Colanzi P, et al. Immunohistochemical evaluation of HER2/neu expression in infiltrating breast carcinoma: a study of reproducibility[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2002, 24(1): 54-62.
- [11] 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.
- [12] Dowsett M, Hanby AM, Laing R, et al. HER2 testing in the UK: consensus from a national consultation[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(6): 685-689.
- [13] Hanna W, O'malley FP, Barnes P, et al. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer[J]. Curr Oncol, 2007, 14(4): 149-153.

(收稿日期:2011-10-09)