

• 论 著 •

乳腺癌中不同克隆号 HER-2 抗体 IHC 与 FISH 检测结果比较*

房爱菊¹, 张晓莹¹, 程凤凤¹, 戴宗燕², 于静²

(1. 山东省交通医院病理科, 济南 250031; 2 济南齐鲁医学检验所, 济南 250031)

摘要:目的 3 种不同克隆号人表皮生长因子受体 2(HER-2) 抗体的免疫组织化学(IHC)检测结果与荧光原位杂交(FISH)检测结果进行比较, 为实验室选择合适的 HER-2 抗体提供依据。方法 选择 3 种不同克隆号的 HER-2 抗体, 对 268 例浸润性乳腺癌标本进行检测, 并与 HER-2 基因的荧光原位杂交检测进行比较。结果 HER-2 的 3 种抗体的结果分别为克隆号 SP3 IHC 结果 3+ 66 例; 克隆号 EP3 IHC 结果 3+ 53 例; Polyclonal Her-2 抗体 IHC 结果 3+ 80 例, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 FISH 结果的一致性 $Kappa$ 值分别为 0.76、0.67、0.56。结论 HER-2 的 IHC 检测以选择单克隆抗体优先, 建议优先选择克隆号 SP3 抗体。

关键词:乳腺癌; HER-2 抗体; 克隆号; 荧光原位杂交

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)17-2357-03

Compare the results of HER-2 immunostaining among different clone numbers
and with the results of FISH detection in breast cancer*

FANG Aiju¹, ZHANG Xiaoying¹, CHENG Fengfeng¹, DAI Zongyan², YU Jing²

(1. Department of Pathology, Shandong Jiaotong Hospital, Ji'nan, Shandong 250031, China;

2. Qilu Medical Laboratory of Shandong, Ji'nan, Shandong 250031, China)

Abstract: Objective To compare the immunostaining of human epidermal growth factor receptor-2(HER-2) among three different clones, and to compare with the results of fluorescence in situ hybridization(FISH) detection, to provide evidences for pathological department to select appropriate antibodies. **Methods** 268 cases of invasive breast cancer were examined by immunohistochemistry using antibodies for HER-2 of 3 different clones. The results were compared with those done by FISH. **Results** Immunostaining using antibody clone SP3 showed 3+ reactions in 66 cases; Immunostaining using antibody clone EP3 showed 3+ reactions in 53 cases, while using polyclonal HER-2 antibody, 80 cases showed 3+ reactions. There was statistical significance between those groups using different clones($P < 0.05$). Consistent with the FISH results, the $Kappa$ values are 0.76, 0.67, and 0.56, respectively. **Conclusion** It suggests detection of HER-2 using immunohistochemistry should prioritize selecting monoclonal antibodies, especially clone SP3.

Key words: breast cancer; HER-2 antibody; clone; fluorescence in situ hybridization

人表皮生长因子受体 2(HER-2)基因扩增不仅是乳腺癌预后不良的指标也是疗效预测的指标,明确 HER-2 基因状态对于判断预后和指导治疗具有重要的意义。目前检测 HER-2 基因状态推荐免疫组织化学(IHC)和荧光原位杂交(FISH)两种方法分别从蛋白和基因水平检测 HER-2 基因的状态^[1-2]。IHC 方法有多种克隆号 HER-2 抗体可以选择,采用 IHC 技术使用 3 种不同克隆号 HER-2 蛋白抗体检测乳腺癌组织中 HER-2 基因的表达状态,并与 FISH 检测 HER-2 基因状态进行对比,通过分析不同克隆号抗体表达与 FISH 结果检测 HER-2 状态的一致性,选择出适宜临床应用的 HER-2 IHC 抗体克隆号。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2015 年 1 月至 2016 年 12 月诊断的浸润性乳腺癌(包括浸润性导管癌 232 例,浸润性小叶癌 32 例,微乳头型浸润性乳腺癌 1 例,黏液腺癌 3 例)组织标本 268 例,其中 1 例为男性标本,其他均为女性标本;患者年龄 35~80 岁,中位年龄为 47.3 岁。

1.2 方法

1.2.1 IHC 检测 HER-2 蛋白表达 手术切除标本于离体 30 min 内用 4%中性甲醛固定,固定时间为 24~48 h,石蜡包埋。3 μ m 厚的石蜡切片 60 $^{\circ}$ C 烤片过夜,二甲苯脱蜡后高压修复(修复液选择 Tris-EDTA, pH 值 9.0)行抗原修复。一抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 一抗均为兔抗人抗体,克隆号分别为 SP3、EP3、Polyclonal,分别购自广州安必平科技有限公司、北京中杉科技有限公司、基因科技(上海)有限公司,二抗(LBP-Vbrighy1,购自广州安必平科技有限公司)37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,二氨基联苯胺(DAB)显色 5 min,苏木素复染。IHC 结果判读标准: $>10\%$ 肿瘤细胞出现完整的细胞膜外围强染色为 3+; $>10\%$ 肿瘤细胞出现不完整和(或)中度细胞膜外围染色或 $\leq 10\%$ 肿瘤细胞出现完整的细胞膜外围强染色为 2+; $>10\%$ 肿瘤细胞出现不完整、微弱或难以察觉的细胞膜染色为 1+;未观察至染色或 $\leq 10\%$ 肿瘤细胞出现不完整、微弱或难以察觉的细胞染色为 0^[1-2]。

1.2.2 FISH 检测 HER-2 基因 HER-2 荧光原位杂交探针

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划(2015WS0264)。

作者简介:房爱菊,女,主管技师,主要从事分子病理技术和诊断研究。

购自广州安必平有限公司, 3 μm 厚的石蜡切片 60 °C 烤片过夜后二甲苯脱蜡 30 min(分 3 缸), 梯度酒精去二甲苯并复水(100%、100%、90%、70%酒精各 3 min, 蒸馏水 3 min), 100 °C 水浴 25 min 破坏细胞膜, 胃蛋白酶消化 6.5~7 min, 2×柠檬酸缓冲液(SSC)冲洗 5 min 两次; 70%酒精清除 SSC, 干燥后加探针 10 μL, 85 °C 变性 5 min, 37 °C 杂交过夜(使用 ThermoBrite 原位杂交仪); 2×SSC 预热至 37 °C, 冲洗 10 min; 预热至 37 °C, 冲洗 5 min; 梯度酒精去水(70%、90%、100%酒精各 2 min); 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)复染, 荧光显微镜观察结果。

1.3 FISH 结果判定标准 阳性:(1)HER-2/CEP17 比值 ≥ 2.0 时;(2)HER-2/CEP17 比值 < 2.0, 但每个肿瘤细胞平均 HER-2 拷贝数 ≥ 6.0。阴性:HER-2/CEP17 比值 < 2.0 且每个肿瘤细胞平均 HER-2 拷贝数 < 4.0 时为 HER-2 阴性。不确定:(1)HER-2/CEP17 比值 < 2.0, 但每个肿瘤细胞平均 HER-2 拷贝数 ≥ 4.0 且 < 6.0^[1-2]。

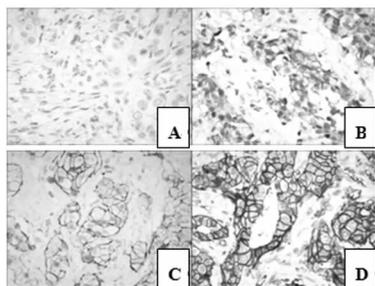
1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件, IHC 结果比及对与 FISH 结果比对均采用配对计数资料 χ² 检验进行统计分析, IHC 与 FISH 检测 HER-2 基因状态一致性的比较采用一致性检验(计算 Kappa 值), P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乳腺癌 HER-2 表达情况 克隆号 SP3 Her-2 抗体 IHC 结果 3+ 66 例(24.62%); 克隆号 EP3 Her-2 抗体 IHC 结果 3+ 53 例(19.77%); Polyclonal Her-2 抗体 IHC 结果 3+ 80 例(29.85%), 差异有统计学意义(P < 0.05), 见表 1。HER-2 蛋白 IHC 结果判读由 2 名高年资诊断医师共同完成, 见图 1; 同一乳腺癌组织不同克隆抗体表达情况见图 2。

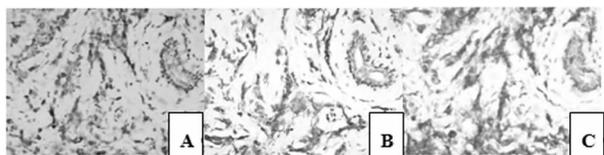
表 1 3 种 HER-2 IHC 结果比较(n)

项目	EP3	SP3	Polyclonal
3+	53	66	80
2+	28	26	57
0/1+	187	176	131



注: A 结果为 0; B 结果为 1+; C 结果为 2+; D 结果为 3+。

图 1 乳腺癌中 HER-2 基因表达 IHC 结果 (SP3, 10×40 倍)



注: A 为 EP3; B 为 SP3; C 为 Polyclonal。

图 2 1 例乳腺癌组织 3 种不同克隆号 HER-2 抗体 IHC 表达(10×40 倍)

2.2 乳腺癌 HER-2 基因 FISH 结果及与 IHC 结果比较 268 例浸润性乳腺癌 HER-2 基因经 FISH 检测, 扩增阳性为 68 例(25.37%), 结果不确定者 9 例(3.35%), 无扩增者 191 例(71.26%)。HER-2 基因 FISH 结果与不同克隆号抗体 IHC 结果比较见表 2。HER-2 基因 FISH 检测结果判读由 2 名高年资主管医师共同完成。

表 2 IHC 与 FISH 结果比较

项目	IHC	FISH(n)			Kappa 值	特异度 (%)	灵敏度 (%)
		阴性	不确定	阳性			
EP3	0/1+	181	3	3	0.67	94.76	67.64
	2+	7	2	19			
	3+	3	4	46			
SP3	0/1+	171	3	2	0.76	89.52	89.71
	2+	17	4	5			
	3+	3	2	61			
Polyclonal	0/1+	130	1	0	0.56	68.06	98.52
	2+	51	5	1			
	3+	10	3	67			

3 讨 论

HER-2 是表皮生长因子受体家族的一个成员, 可编码相对分子质量为 185 000 的跨膜蛋白, 具有酪氨酸激酶活性, 通过与配体相互作用, 参与细胞信号通路调节细胞生长、分化和增殖, 大量研究证实乳腺癌组织中 HER-2 基因的扩增在浸润性乳腺癌占 20%~30%, 其过度表达和基因扩增的患者总生存时间(OS)和无病生存时间(DFS)缩短; 同时, 对于肿瘤直径超过 1 cm 的浸润性乳腺癌 HER-2 基因过表达的患者术后推荐化疗加抗 HER-2 治疗, HER-2 成为乳腺癌靶向治疗的理想靶点^[3-4]。

目前, 常用 HER-2 蛋白与基因的检测方法是 IHC 和 FISH。通常认为 IHC 检测结果为 3+ 及 FISH 结果为扩增的浸润性乳腺癌可被确定为 HER-2 检测结果为阳性, 用于指导是否选择赫赛汀单抗进行治疗。而 HER-2 蛋白为 2+ 者, 多数患者 FISH 检测 HER-2 基因扩增为阴性, 因此美国 FDA 及中国 CFDA 均要求必须行 FISH 检测 HER-2 基因扩增状态才能进行赫赛汀的治疗^[1-2]。国外一些实验室发现, 如果以 FISH 法作为检测 HER-2 基因的金标准, IHC 检测结果为 3+ 时, FISH 法检测的阳性率为 91.7%~94.1%, 2+ 时 FISH 阳性率为 13.2%~23.3%, 1+ / 0 时 FISH 的阳性率为 4.1%~11.1%, 而研究者选择的 3 种抗体中 Polyclonal 抗体 3+ 时阳性率仅为 83.75%, 2+ 时仅为 1.75%, 明显低于文献^[5-8]报道; EP3 抗体 3+ 时阳性率达到 86.79%, 2+ 时阳性率高达 67.85%, 灵敏度较高, 但其特异度明显低于其他两种抗体; SP3 抗体 3+ 时阳性率为 92.42%, 2+ 时阳性率为 19.23%, 与文献^[5-8]报道相符。本研究 FISH 检测 HER-2 扩增阳性率为 25.17%, 与文献^[3, 5, 8]报道一致, 说明实验室人员技术及操作规程规范, 可以准确检测患者 HER-2 基因状态。

检测 HER-2 基因 IHC 方法以组织为基础, 直接利用抗 HER-2 抗体来检测 HER-2 蛋白, 具有操作简便、价格低廉、判读方便、便于保存等特点, 目前国内对乳腺癌 HER-2 基因检测

现状首选 IHC 方法,只有在 IHC 结果为 2+ 时才进一步行 FISH 检测,因此选择合适的抗 HER-2 抗体至关重要。本研究以 FISH 检测结果为金标准,3 种抗体与 FISH 结果的一致性以克隆号 SP3 抗体为最高, $Kappa$ 值达到 0.76。国外的一些实验也证实克隆号 SP3 HER-2 抗体在乳腺癌中比其他抗体灵敏度高^[9-10],在胃-食管交界腺癌及结肠癌中也得到证实且与 FISH 有很好的一致性^[11-12],因此建议选择灵敏度及特异度都较高的 SP3 单克隆抗体进行 HER-2 蛋白的检测,既保证患者能够节省不必要的检测费用,也避免漏诊而耽误患者治疗。

目前,尚无确定患者 HER-2 基因状态绝对的金标准,研究者也只做了 3 种抗体与 FISH 结果进行比较,因此还需要在以后的工作中继续总结经验,在选择新的抗体时进行比对,规范操作规程,加强室内质控,提高实验室检测结果可比性。

参考文献

- [1] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer; American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(1):3997-4013.
- [2] 何小艳, 吴宁, 李慧, 等. 培训对乳腺癌 HER-2 基因免疫组化结果判读的影响 [J]. *诊断病理学杂志*, 2014, 20(10):649-650.
- [3] 徐兵河. 针对 HER-2 的乳腺癌分子靶向治疗及研究进展 [J]. *中华内分泌外科杂志*, 2010, 4(5):289-291.
- [4] Awood S, Broglio K, Buzdar AU, et al. Prognosis of women with metastatic breast cancer by Her-2 status and trastuzumab treatment; an institutional-based review [J]. *J Clin Oncology*, 2010, 32(28):92-98.
- [5] 江泽飞, 邵志敏, 徐兵河. 人表皮生长因子受体 2 阳性乳腺癌临床诊疗专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96

(14):1091-1096.

- [6] 韩晓红, 石远凯, 马丽, 等. 应用 FISH 和 IHC 技术检测中国乳腺癌患者 HER-2 基因状态及蛋白表达的前瞻性多中心研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(7):656-662.
- [7] Hasan M, Halit K, Zeki A, et al. Should FISH test be performed to all patients with breast cancer [J]. *Med Science*, 2013, 2(2):539-547.
- [8] 李峰, 董赟, 张宏, 等. 乳腺癌 HER-2 基因扩增和蛋白表达差异及其与激素受体表达的关系 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2013, 29(9):941-945.
- [9] Nunes CB, Rocha RM, Reis-Filho JS, et al. Comparative analysis of six different antibodies against Her2 including the novel rabbit monoclonal antibody (SP3) and chromogenic in situ hybridisation in breast carcinomas [J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61(1):934-938.
- [10] Tim J, Susan T, Gerreit K, et al. Determining sensitivity and specificity of HER2 testing in breast cancer using a tissue micro-array approach [J]. *Bre Cancer Res*, 2012, 14(1):93.
- [11] James E, Harriette M, Natalie M. HER2 status in gastro-oesophageal adenocarcinomas assessed by two rabbit monoclonal antibodies (SP3 and 4B5) and two in situ hybridization methods (FISH and SISH) [J]. *Histopathology*, 2011, 58(1):383-394.
- [12] Zhang S, Yan D, Kangmin Z, et al. Immunohistochemical results of HER2/neu protein expression assessed by rabbit monoclonal antibodies SP3 and 4B5 in colorectal carcinomas [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7):4454-4460.

(收稿日期:2017-02-15 修回日期:2017-04-15)

(上接第 2356 页)

综上所述, ANH 与氨甲环酸联合应用可有效减少全膝关节置换术中失血量和异体血输注量,有效缓解血库备血压力。

参考文献

- [1] 宋昆, 赵宇驰, 刘丹, 等. 急性等容血液稀释在人工关节置换术中的应用 [J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2014, 8(6):726-729.
- [2] Theusinger OM, Stein P, Spahn DR. Applying patient blood management in the trauma center [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2014, 27(2):225-232.
- [3] 李林涛, 吴海山, 吴宇黎, 等. 人工关节置换术围术期的血液管理策略 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(6):772-776.
- [4] 胡春林, 林成新, 罗远国. 连续无创血红蛋白监测在急性等容性血液稀释中的应用 [J]. *临床血液学杂志(输血与检验)*, 2015, 28(2):278-280.
- [5] 陈美珍, 叶晓玲, 林仙菊. 急性等容性血液稀释联合自体血回输在心脏手术中的应用 [J]. *心脑血管病防治*, 2014,

14(4):328-330.

- [6] 涂杰, 张炳东, 吕静, 等. 急性高容量血液稀释对老年患者术后认知功能和脑氧代谢的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 32(10):2265-2268.
- [7] 胡美, 徐三荣. 急性高容血液稀释联合控制性降压对老年肿瘤患者术中血流动力学和肾功能的影响 [J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2010, 20(5):436-439.
- [8] 张江涛, 尚延春, 王站朝. 局部应用氨甲环酸对膝关节置换术后出血量的影响 [J]. *中国现代药物应用*, 2013, 7(14):120-121.
- [9] 赵敏, 王程, 帅培玉, 等. 急性等容血液稀释采自体血回输联合控制性降压对异体输血及凝血功能的影响 [J]. *华西医学*, 2015, 30(4):679-682.
- [10] 李林涛, 吴海山, 符培亮, 等. 全膝关节置换术应用不同剂量氨甲环酸有效性的研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2015, 27(4):32-36.

(收稿日期:2017-02-10 修回日期:2017-04-10)