

胃癌组织 HER-2 基因扩增和蛋白表达检测及临床意义

潘丹玲 陈小岩 林洁 李峰 陈新

作者单位:350001 福州市,福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院病理科

【摘要】 目的 探讨免疫组化(immunohistochemistry, IHC)法检测胃癌 HER-2 蛋白表达和荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)法检测 HER-2 基因扩增的临床意义。方法 收集 256 例胃癌患者手术切除及胃镜活检的胃癌组织标本,分别采用 IHC 法及 FISH 法检测胃癌组织 HER-2 蛋白表达及基因扩增状态,并对结果进行统计学分析。结果 256 例胃癌组织标本中,有 26 例 HER-2 蛋白表达阳性,阳性率为 10.16%;46 例 HER-2 基因有扩增,阳性率 17.97%。26 例 HER-2 蛋白表达(3+)的标本中,24 例有 HER-2 基因扩增,2 例无扩增;95 例 HER-2 蛋白表达(2+)的标本中,20 例有基因扩增,75 例无扩增;90 例 HER-2 蛋白表达(1+)的标本中,2 例有基因扩增,88 例无扩增;45 例 HER-2 蛋白表达(0)的标本中,HER-2 基因均无扩增。IHC 法和 FISH 法检测 HER-2 表达阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 IHC 法检测胃癌 HER-2 蛋白表达可作为临床治疗的初筛,HER-2 蛋白表达(2+)的患者应常规行 FISH 法,以确定 HER-2 基因扩增状态。FISH 法检测结果具有较高的稳定性和可靠性,联合 IHC 法可更准确和客观评价胃癌预后,并指导临床选用靶向药物治疗。

【关键词】 胃癌;HER-2 基因;免疫组织化学;荧光原位杂交

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2014.01.003

The clinical significance of detecting HER-2 protein expression and HER-2 gene amplification in gastric carcinoma

PAN Dan-ling, CHEN Xiao-yan, LIN Jie, et al. Department of Pathology, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

【Abstract】 Objective To detect the expression of HER-2 protein by immunohistochemistry (IHC) method and HER-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization (FISH) method in gastric cancer, and to evaluate the clinical significance. **Methods** 256 cases gastric cancer tissue samples by surgical excision and gastroscopic biopsies were collected. HER-2 gene amplification and HER-2 protein expression were examined by FISH method and IHC method respectively. All data were analyzed statistically. **Results** In 256 samples from gastric carcinoma patients, there were 26 cases had HER-2 protein positive expression, and 46 cases had HER-2 gene amplification. The positive rates were 10.16% and 17.97% respectively. There were 24 cases showed positive HER-2 gene amplification in 26 patients with HER-2 protein expression (3+), 20 cases showed positive HER-2 gene amplification in 95 patients with HER-2 protein expression (2+), and 2 cases showed positive HER-2 gene amplification in 90 patients with HER-2 protein expression (1+). There was no positive HER-2 gene amplification in 45 patients with HER-2 protein expression (0). The difference of these two methods in HER-2 protein expressive detection had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** The IHC method detection of gastric cancer HER-2 protein expression can be used as a initial clinical screening. In cases of HER-2 protein expression (2+), HER-2 gene amplification shall be detected by FISH method. FISH method has a higher stability and reliability than IHC method. The combination of FISH and IHC methods used to detect the expression of HER-2 in gastric carcinoma is the best way which guide the selection of targeted drug therapy and the evaluation of prognosis.

【Key words】 Gastric carcinoma; HER-2; Immunohistochemistry; Fluorescence in situ hybridization

胃癌是消化系统恶性肿瘤,是世界第二致死癌症,中国为高发区。该病预后差,早期诊断较困难,绝大多数患者直到晚期才出现相应症状。进展期胃癌

患者约 20%表现人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2) 蛋白过表达或基因扩增,HER-2 蛋白过表达能预测多种化疗药

物及内分泌治疗的敏感性,并指导靶向治疗药物(曲妥珠单抗)的选择。一项包括中国在内的 24 个国家参与的全球多中心随机对照 III 期临床研究(ToGA 试验)^[1]的结果显示,化疗联合曲妥珠单抗可显著延长进展期胃癌患者的生存期。所以,正确检测和评定 HER-2 蛋白表达和基因扩增对胃癌临床治疗和预后判断有重要价值。2010 年欧洲药品管理局及美国食品药品监督管理局先后批准化疗联合使用曲妥珠单抗治疗 HER-2 阳性胃癌患者。参照 2009 年《乳腺癌 HER-2 检测指南》,我国于 2011 年发布《胃癌 HER-2 检测指南》^[2],本文研究按照该指南,应用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)法检测胃癌 HER-2 蛋白表达和荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)法检测 HER-2 基因扩增水平,为正确评估胃癌患者预后及临床选择治疗方案提供可靠依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择我院 2012 年 1 月至 2013 年 6 月手术切除及内镜活检的胃癌标本 256 例,术前或活检前均未接受放、化疗及免疫治疗,均经病理学明确诊断为胃癌。其中男性 120 例,女性 136 例,平均年龄(40.5±10.0)岁。肿物直径最小 0.5 cm,最大 13.5 cm。具体临床病理资料见表 1。

表 1 256 例胃癌患者的临床病理参数

临床病理分型	例数	
早期	45	
大体分型	蕈伞型	69
	进展期 溃疡型	102
	浸润型	40
组织学类型	管状腺癌	90
	乳头状腺癌	80
	黏液腺癌	40
	印戒细胞癌	40
	未分化癌	6
分化程度	低分化	112
	中分化	132
	高分化	12
TNM 分期	I 期	54
	II 期	75
	III 期	79
	IV 期	48

1.2 方法 送检组织在离体后 20-30 min 内进行标记、切开,采用新鲜配制的 4%中性缓冲甲醛液固定,固定时间为 8-24 h;石蜡包埋、切片脱蜡、HE 染色,IHC 采用 Elivision 二步法,以已知 HER-2 IHC

(3+)的胃癌组织作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作空白对照。HER-2 抗体克隆号为 SP3,为福州迈新生物技术开发有限公司产品。Path Vysion HER-2 DNA 探针试剂盒购自美国 Vysis 公司。

1.2.1 IHC 法检测 HER-2 蛋白表达 根据《胃癌 HER-2 检测指南》^[2]评判标准,对于手术标本,光镜下观察结果,≥ 10%肿瘤细胞基底侧膜、侧膜或完全性膜强染色,判为 HER-2(3+);≥ 10%的肿瘤细胞有弱至中度的基底侧膜、侧膜或完全性膜染色,判为 HER-2(2+);≥ 10%肿瘤细胞微弱或隐约可见膜着色,仅有部分细胞膜染色,判为 HER-2(1+);无反应或< 10%肿瘤细胞膜染色,判为 HER-2(0)。对于活检标本,光镜下观察结果,肿瘤细胞的基底侧膜、侧膜或完全性膜强染色(不管着色的肿瘤细胞占整个组织的百分比,但至少要有 5 个成簇的肿瘤细胞着色),判为 HER-2(3+);肿瘤细胞团有弱到中度的基底侧膜、侧膜或完全性膜强染色(不管着色的肿瘤细胞占整个组织的百分比,但至少要有 5 个成簇的肿瘤细胞着色),判为 HER-2(2+);肿瘤细胞团微弱或隐约可见膜染色(不管着色的肿瘤细胞占整个组织的百分比),判为 HER-2(1+);任何肿瘤细胞无膜染色,判为 HER-2(0)。HER-2 蛋白表达(3+)判定为阳性表达(过表达),其余均为阴性表达。

1.2.2 FISH 法检测 HER-2 基因扩增水平 胃癌 HER-2 原位杂交判读方法参照 ToGA 研究经验^[3],荧光显微镜下观察结果,选择扩增程度最高的区域,计数至少 20 个肿瘤细胞核中的双色信号,统计 Ratio 值(Ratio= 20 个细胞核中红色信号总数/20 个细胞核中绿色信号总数,即 HER-2 与 CEP17 的比值)。Ratio ≥ 2.2 为阳性,提示 HER-2 基因扩增;Ratio < 1.8 为阴性,提示 HER-2 基因无扩增;Ratio 在 1.8~2.2 为不确定,需要再计算 20 个细胞核中的信号或由另一位医师重新计数,若 Ratio ≥ 2.0 判为阳性,Ratio < 2.0 判为阴性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析,计数资料以百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IHC 法检测 HER-2 蛋白表达结果 256 例胃癌患者的组织标本中,有 26 例 HER-2 蛋白表达为(3+),阳性率为 10.16%,95 例 HER-2 蛋白表达为(2+),阳性率为 37.11%,90 例 HER-2 蛋白表达为(1+),阳性率为 35.16%,45 例无 HER-2 蛋白表达。HER-2 蛋白表达结果见图 1~图 4。

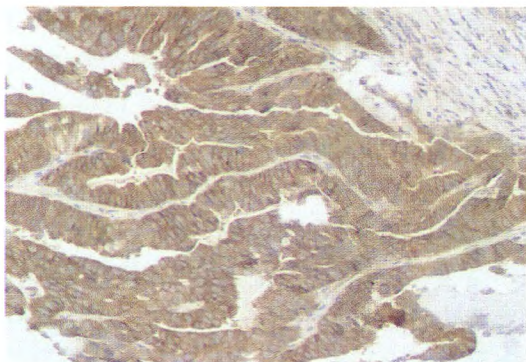


图 1 胃癌 HER-2 蛋白表达为(3+)

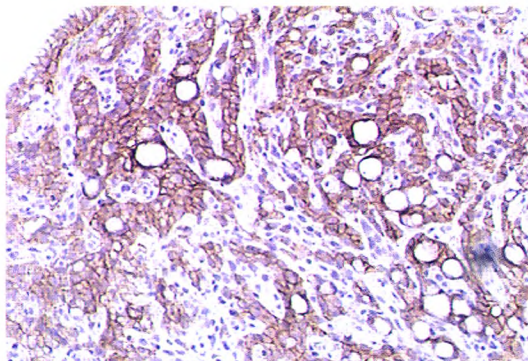


图 2 胃癌 HER-2 蛋白表达为(2+)

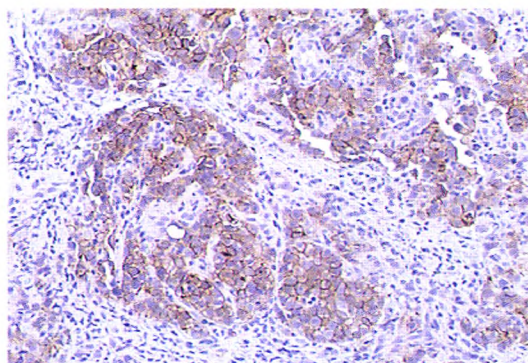


图 3 胃癌 HER-2 蛋白表达为(1+)

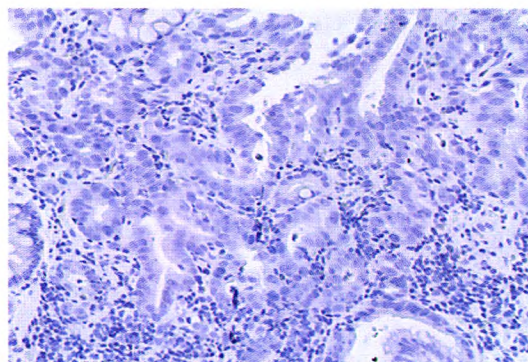


图 4 胃癌 HER-2 蛋白表达为(0)

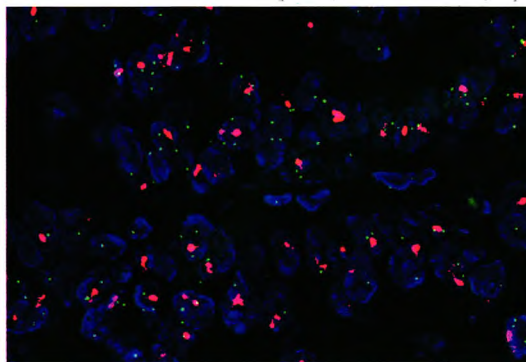


图 5 FISH 法检测胃癌组织 HER-2 基因有扩增

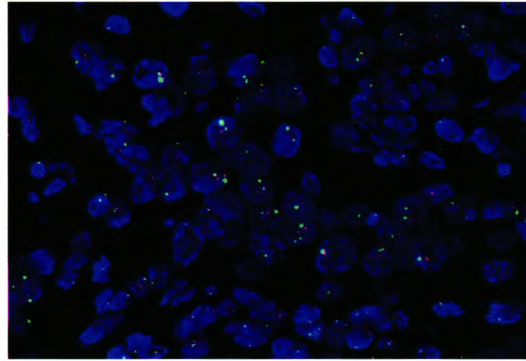


图 6 FISH 法检测胃癌组织 HER-2 基因无扩增

2.2 FISH 法检测 HER-2 基因扩增结果 256 例胃癌患者的组织标本中,46 例有扩增,210 例无扩增,扩增率为 17.97%。HER-2 基因的扩增结果见图 5、图 6。

2.3 两种检测方法的比较 在 26 例 HER-2 蛋白表达(3+)的胃癌组织标本中,有 24 例出现 HER-2 基因扩增,2 例无扩增;95 例 HER-2 蛋白表达(2+)的胃癌组织标本中,20 例有基因扩增,75 例无扩增;90 例 HER-2 蛋白表达(1+)的胃癌组织标本中,2 例有基因扩增,88 例无基因扩增;45 例 HER-2 蛋白表达为(0)的胃癌组织标本中,均无基因扩增。IHC 法检测 HER-2 蛋白表达阳性率(10.16%)和 FISH 法检测 HER-2 基因扩增阳性率(17.97%)比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.782, P>0.05$),见表 2。

表 2 胃癌患者 HER-2 基因扩增及蛋白表达结果[n(%)]

HER-2 蛋白表达	例数	HER-2 基因	
		扩增	未扩增
3+	26	24(92.31)	2(7.69)
2+	95	20(21.05)	75(78.95)
1+	90	2(2.22)	88(97.78)
0	45	0(0.00)	45(100.00)
合计	256	46(17.97)	210(82.03)

3 讨论

HER-2 是原癌基因,定位于染色体 17q21,是相对分子质量为 185×10^3 的跨膜糖蛋白,简称为 HER-2 蛋白或受体。HER-2 是一种跨膜酪氨酸激酶受体,通过与相应配体结合,调节细胞生长、生存、

分化和凋亡。研究^[4]表明,HER-2 过表达的恶性肿瘤具有更强的侵袭、转移能力,患者预后较差。准确检测 HER-2 状态十分必要,可预测胃癌预后,并指导分子靶向药物曲妥珠单抗的治疗。曲妥珠单抗可特异性地识别癌细胞 HER-2 胞外域的抗原决定簇,抑制 HER-2 对肿瘤细胞向恶性表型的转导^[3]。临床上,曲妥珠单抗对 HER-2 阳性胃癌患者具有一定的治疗效果,不但降低胃癌复发转移率,而且能肯定改善 HER-2 基因过表达患者的生存,使得胃癌患者在常规治疗进行的基础上进一步获益。

准确检测胃癌 HER-2 表达和基因扩增情况是进展期胃癌 HER-2 靶向治疗患者筛选和治疗疗效预测的前提。目前,常用的 HER-2 蛋白与基因的检测方法为 IHC 法和 FISH 法。HER-2 蛋白检测要求实验室必须有规范化流程和质量控制体系,只有严格遵循标准化流程的实验过程才能提供可信赖的实验结果^[5]。

在我国各大医院病理科实验室,IHC 法仍是 HER-2 蛋白检测的主要手段。IHC 法具有成本低廉、方法简单、生物学关联密切、可重复性好等优点,而且 IHC 切片可同时观察组织学形态,其切片可长期保存且反复评估。但是 IHC 法染色存在定量性不强、抗体差异、抗原修复方法不同及组织固定和制片等因素的影响,以及结果的主观判读等,使检测结果受影响,导致不同医院病理实验室之间结果有较大的差异性。IHC 法的这些缺陷将会影响检测结果对临床治疗的指导。

FISH 法是一种分子细胞遗传学技术,在组织切片上显示细胞内特异性 DNA 片段。通过荧光标记的 DNA 探针与细胞核内的 DNA 靶序列杂交,在荧光显微镜下,分析细胞核内杂交的 DNA 靶序列的多种彩色探针信号,以获得细胞内多条染色体(或染色体片段)或多种基因状态的信息。应用该技术检测 HER-2 基因具有较高的稳定性和重复性,因此测定结果具有高度的准确性、灵敏度和特异性,其结果在不同实验室间一致性很高。但 FISH 法检测费用较高,信号强度随时间衰减,不能同时观察细胞形态且较难鉴定胃癌微小浸润灶。胃癌 HER-2 检测异质性较常见,在胃癌中,有 5%~30% 的病例出现肿瘤异质性。Rüschoff 等^[6]研究者认为,因为胃癌的异质性,IHC 法的预测价值比 FISH 法高。在 IHC 法的染色切片上,胃癌异质性区域可结合全片分析,而 FISH 法在暗视野 100 倍物镜下观察,难以在同等时间内全面把握切片信息,因此 FISH 法不能作为首次或

唯一决定是否适合靶向治疗的检测,而 IHC 法可用于胃癌患者 HER-2 靶向治疗的初步筛选。

HER-2 状态的准确检测和判读需要标准化方法的支持,也需要结合足够的临床资料来判断,使患者得到更有效的治疗,真正成为个体化治疗的受益者。本文研究对 256 例胃癌患者采用 IHC 法和 FISH 法检测 HER-2 状态,结果表明,IHC 法和 FISH 法检测 HER-2 结果差异无统计学意义。目前,国内外不同研究^[7-9]报道的 HER-2 蛋白过表达率为 6.8%~34.0%。本文研究中,IHC 法检测蛋白表达(3+)为 26 例,阳性率为 10.16%,与以上报道一致。本文研究结果显示,IHC 法检测 HER-2 无表达时,FISH 法检测 HER-2 均无基因扩增。IHC 法检测为(2+)时,FISH 法检测阳性率为 21.05%,故 IHC 法检测为(2+)的患者需要进一步行 FISH 法检测来确定是否存在基因扩增。IHC 法检测(3+)患者中,FISH 法检测有 2 例为阴性,17 号染色体多体可能是导致 IHC 法检测强阳性而 FISH 法检测为阴性的主要原因,胃癌 17 号染色体多体可引起 HER-2 蛋白表达的增强,因此,必要时这类患者应进一步行 FISH 法检测。90 例 IHC 法检测结果为(1+)的患者中,有 2 例(2.22%)出现 HER-2 基因扩增,认为 17 号染色体单体可能是 IHC 法检测(1+)而 FISH 法检测有基因扩增的原因。还有胃活检小标本,因不能代表肿瘤的整体,故进一步的 HER-2 基因扩增检测对 IHC 法检测(0)或(1+)的病例仍有一定意义。

综上所述,IHC 法可以用作临床靶向药物治疗的初筛,对于 IHC 法检测(0)或(1+)及(3+)的患者可选择性行 FISH 法检测,而对于 IHC 法检测(2+)的患者应行 FISH 法检测,以确定 HER-2 基因状态来指导临床的诊疗,临床工作中对这部分患者进行 FISH 检测的意义最大^[10]。HER-2 基因检测的准确性是患者得到正确治疗的基础。IHC 法和 FISH 法联合检测,可准确评估 HER-2 状态,并准确和客观评价胃癌患者预后,指导临床选用靶向药物治疗。

4 参考文献

- 1 Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 2010, 376: 687-697.
- 2 《胃癌 HER-2 检测指南》编写组. 胃癌 HER-2 检测指南. 中华病理学杂志, 2011, 40: 553-557.
- 3 Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin)

(下接第 26 页)

一种引起医院感染的常见条件致病菌，他可以天然水解碳青霉烯类抗生素，导致对亚胺培南天然耐药^[15]。嗜麦芽窄食单胞菌对大多数抗菌药物高度耐药(耐药率大于 60%)，但对复方新诺明、左氧氟沙星、环丙沙星、哌拉西林/他唑巴坦、多粘菌素 B、头孢哌酮/舒巴坦、米诺环素(耐药率小于 20%)显示相对较好的敏感性，因此临床对此细菌感染的治疗中，首先应避免使用头孢类和碳青霉烯类抗生素，及时进行细菌学检查和药敏试验，根据药敏试验结果选择合理的抗菌药物进行治疗。

综上所述，革兰阴性肠杆菌的铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、阴沟肠杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌和革兰阳性的凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌是我院感染的主要病原菌。万古霉素、替考拉宁仍然是革兰阳性球菌感染的首选抗生素；亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦是革兰阴性肠杆菌感染的首选抗生素。多粘菌素 B、头孢哌酮/舒巴坦、米诺环素是非发酵的铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌感染的首选抗生素，复方新诺明、左氧氟沙星、环丙沙星、哌拉西林/他唑巴坦、多粘素 B、头孢哌酮/舒巴坦、米诺环素是非发酵嗜麦芽窄食单胞菌的首选抗生素；广谱抗菌药物的广泛应用使细菌感染不容忽视，医院应加强生物安全管理加强消毒隔离措施，阻断交叉感染，应接合实验室药敏结果，尽量合理使用窄谱、针对性强的抗菌药物，保护体内正常菌群，避免二次感染，并且实验室要定时检测细菌的耐药性，准确掌握细菌对抗菌药物的耐药动向和耐药性变迁，向临床定期发布最新药敏统计报告，为临床合理用药提供实验室诊断依据。

4 参考文献

1 程颖,金正江,雷新云,等.2009-2011 年儿科住院患者感染病原菌

的菌种及耐药性分析.山东医药,2013,53:70-73.

2 李三中,王刚.葡萄球菌属感染分布与耐药性分析.中华医院感染学杂志,2010,20:3045-3046.

3 吴香兰,陈朝民,李月凤.6395 例住院新生儿感染情况调查.中华临床感染病杂志,2008,1:271-273.

4 杨祖耀,詹思廷,王波,等.中国血行感染住院病死率的系统评价和 meta 分析.北京大学学报(医学版),2010,42:304-307.

5 苏丹虹,李敏亮,金光耀,等.肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌产 KPC 酶的监测研究.中国抗生素杂志,2009,34:684-687.

6 Bratu S, Labdab D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med*, 2005, 162: 1430-1435.

刘媛,孙明月,王本祥,等.临床非发酵革兰阴性杆菌感染的分布及耐药性分析.中华临床感染病杂志,2012,5:114-116.

何贤礼.非发酵革兰阴性杆菌医院感染、耐药趋势与抗菌治疗.中国抗生素杂志,2004,29:65-67.

9 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床经验操作规程.第 3 版.南京:东南大学出版社,2006,738-753.

10 张茜茜,黄志宏,余广超,等.医院住院患者下呼吸道感染的病原菌分布及耐药性分析.临床荟萃,2010,25:1851-854.

11 裴丽淑,于树云,葛庚芝.下呼吸道感染分离革兰阴性杆菌的耐药性分析.临床荟萃,2011,26:1016-1018.

12 迎春妹,应骏,罗柳林,等.耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性机制研究.中国医院感染与化疗杂志,2008,8:300-302.

13 陈彦香,陈少峰,吴璞,等.2007-2010 年 NICU 中细菌分布及耐药变迁的分布.中国抗生素杂志,2013,38:227-229.

14 罗润齐,潘建刚,叶晓光,等.胆道感染革兰阴性杆菌的构成及耐药性分析.广东医药,2013,34:1207-1209.

15 Waterer CW, Wunderink RG. Increasing threat of Gram-negative bacteria. *Crit Care Med*, 2001, 29: N75-N81.

(收稿日期:2014-01-25)

(本文编辑:李霁)

(上接第 13 页)

anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER-2 overexpression metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol*, 1999, 26: 71-77.

4 Meert AP, Martin B, Paesmans M, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer*, 2003, 89: 959-965.

5 Arena V, Pennacchia I, Monego G, et al. Fluorescent in situ hybridization as a primary test for HER-2 status in breast cancer: controversies. *J Clin Oncol*, 2010, 28: e83-e84.

6 Rüschoff J, Diemel M, Baretton G, et al. HER2 diagnostics in gastric

cancer -guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch*, 2010, 457: 299-307.

7 Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*, 2008, 52: 797-805.

8 武鸿美,刘艳辉,林锋,等.中国胃癌患者 HER2 蛋白表达与临床病理学参数及预后的关系.中华病理学杂志,2011,40:296-299.

9 Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, et al. HER-2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol*, 2012, 25: 637-650.

(收稿日期:2013-11-29)

(本文编辑:杨军)