

双色银染原位杂交技术检测胃癌 HER2 基因扩增及临床意义

范大明 冉雯雯 孙玲玲 张龙宵 李玉军

作者单位: 266003 青岛市, 青岛大学医学院附属医院病理科

通讯作者: 李玉军, E-mail: liyujun.66@163.com

【摘要】 目的 探讨双色银染原位杂交技术 (dual-color silver-enhanced in-situ hybridization, DSISH) 检测胃癌人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 基因扩增的可行性及其与临床病理学特征的关系。**方法** 应用 DSISH 技术检测 230 例患者胃癌切除组织中 HER2 基因扩增状态, 并进行相关统计学分析。**结果** DSISH 检测 230 份胃癌标本中 43 例存在 HER2 基因扩增, HER2 基因扩增率为 18.7%。HER2 基因扩增与胃癌的分化程度、淋巴结转移有关 (P 均 < 0.05), 与患者年龄、性别、肿瘤发生部位、浸润深度、神经以及脉管侵犯无关 (P 均 > 0.05)。**结论** DSISH 技术检测胃癌 HER2 基因扩增状态具有可行性; HER2 基因扩增可以反应胃癌生物学行为。

【关键词】 胃癌; HER2 基因; 双色银染原位杂交技术; 基因扩增

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.03.008

Dual-color silver-enhanced in-situ hybridization for determination of HER2 gene amplification in gastric carcinoma and clinical significance

FAN Da-ming, RAN Wen-wen, SUN Ling-ling, et al. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003, China

【Abstract】 Objective To evaluate the application of dual-color silver-enhanced in-situ hybridization (DSISH) in analysis of human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) gene status and investigate the correlation between HER2 gene status and the clinical pathological parameters in gastric cancer. **Methods** HER2 gene status was detected in 230 cases of gastric cancer tissue by using automated DSISH and the results were analyzed statistically. **Results** Among 230 cases of gastric cancer tested by DSISH, 43 cases were positive, and all gene amplification rate was 18.7%. HER2 gene amplification were significantly correlated with degree of differentiation of gastric cancer and lymph node metastasis (P all < 0.05), but not correlated with patient's age, gender, site of gastric cancer, the depth of tumor invasion and nerve, vascular invasion (P all > 0.05). **Conclusion** Automated DSISH can be used to detect the HER2 gene status. HER2 gene amplification may reflect biological behavior of gastric cancer.

【Key words】 Gastric cancer; HER2 gene; DSISH; Gene amplification

人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 基因定位于人类染色体 17q21 上, 是表皮生长因子家族的第 2 个成员, 其表达的蛋白产物为 HER2, 该蛋白的高表达可以活化细胞信号转导系统, 导致细胞转化、增殖^[1]。HER2 过表达常见于乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌等, HER2 基因扩增与肿瘤的分化、转移、化疗耐药及预后不良有明显的相关性^[2], 因此, 准确检测和评估 HER2 基因状态对患者靶向治疗的筛选和肿瘤生物学行为的判断起重要作用。本文采用双色银染原位杂交技术 (dual-color silver-enhanced in-situ hy-

bridization, DSISH) 检测胃癌组织中 HER2 基因扩增状态, 探讨 HER2 基因扩增与胃癌临床病理学特征的关系及意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集我院 2011 年 12 月-2012 年 10 月普外科 230 例手术切除胃癌组织的患者的标本, 术前均未行放疗或分子靶向治疗。其中男性 170 例, 女性 60 例; 年龄 38-83 岁, 中位年龄 61 岁; 肿瘤最大直径 1.5~10.5 cm; 肿瘤位于胃食管结合部 22 例, 胃体 40 例, 胃窦 165 例, 残胃 3 例; 组织学分级: 高分化 8 例, 中分化 35 例, 低分化 187 例; 有淋

巴结转移 168 例, 侵犯神经 122 例, 脉管癌栓阳性 104 例。手术切除胃癌标本均于离体后 30 min 内经 10% 的中性福尔马林固定。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 INFORM HER2 及 CEP17 探针、DNP 抗体、原位杂交银染色液和 AP 染色液均购于罗氏诊断产品(上海)有限公司。

1.2.2 DSISH 检测 所有胃癌组织标本均经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 3 μm 厚度切片, 采用 DSISH 技术在罗氏 BenchMark GT 全自动免疫组化染色机上进行 HER2 基因扩增检测。操作步骤均严格按照罗氏诊断优化程序执行, 常规封片, 光镜观察。用已知阳性和阴性胃癌病例标本为外对照, 同一切片中正常黏膜上皮为内对照。

1.3 HER2 基因扩增结果判定 参照 2007 年美国临床肿瘤协会/美国病理家协会(ASCO/CAP)制定的标准^[3], 即计数 20 个连续或相邻肿瘤细胞核中的红色 HER2 基因信号和绿色 CEP17 信号, 若红色信号总数与绿色信号总数的比值 < 1.8 , 代表基因无扩增; 若该比值 > 2.2 , 代表基因有扩增; 若该比值介于 1.8~2.2 之间, 则再计数 20 个细胞的信号或由另一位医师计数, 最后该比值 ≥ 2.0 代表基因有扩增。DSISH 的 HER2 基因为黑色信号, CEP17 为红色信号。每个肿瘤细胞中 CEP17 信号数平均值 ≥ 3 , 定义为 17 号染色体多体。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 HER2 基因扩增状态 230 例胃癌患者组织中 43 例存在 HER2 基因的扩增, 无扩增 187 例, HER2 基因扩增率为 18.7% (43/230); 17 号染色体多体 23 例。见图 1。

2.2 HER2 基因扩增与胃癌临床病理学特征的关系 高、中分化及有淋巴结转移的胃癌组织中 HER2 基因扩增率明显高于低分化和无淋巴结转移者, HER2 基因扩增与胃癌分化程度和淋巴结转移有关 ($\chi_1^2 = 9.12, \chi_2^2 = 4.54; P$ 均 < 0.05), 而与胃癌患者年龄、性别、肿瘤发生部位、神经侵犯、脉管癌栓及肿瘤浸润深度无关 ($\chi^2 = 0.04 \sim 1.54; P$ 均 > 0.05)。见表 1。

3 讨论

目前荧光原位杂交 (fluorescence in-situ hybridization, FISH) 被认为是 HER2 基因检测的金标准, 该方法具有受实验操作程序影响小, 可消除多倍

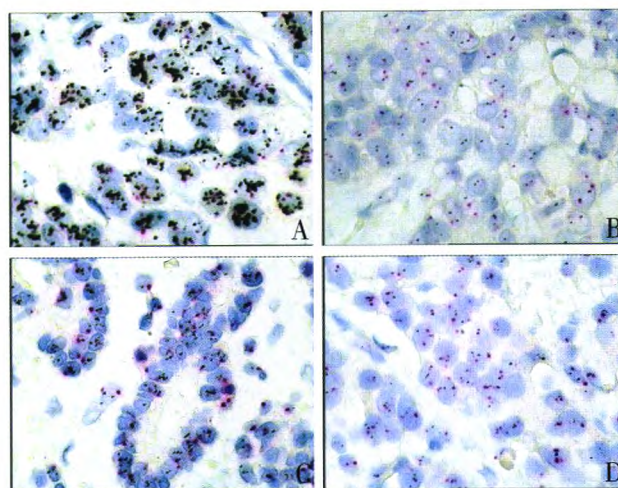


图 1 胃癌 HER2 基因状态

注: A 为 HER2 基因簇状扩增; B 为 HER2 基因无扩增, HER2/CEP17 < 1.8 ; C 为 HER2 基因扩增, HER2/CEP17 > 2.2 ; D 为 HER2 无扩增, HER2/CEP17 < 1.8 , CEP17 信号呈多倍体

体的干扰, 结果定量判读, 避免主观因素的影响等优点, 但同时也存在实验过程较繁琐, 相对耗时, 需要荧光显微镜暗视野观察, 不能很好的观察组织形态和切片不能长期保存等缺点^[4]。DSISH 作为一种新兴的亮视野原位杂交技术, 可以全自动检测 HER2 基因拷贝数和 CEP17 数目, 操作时间短, 只是 FISH 检测所需时间的一半, 并且利用银沉淀方法能够得到精确、可长期保存的色素信号, 可以利用光镜在同一张切片上观察 HER2 基因信号和肿瘤组织形态, 易于肿瘤成分的确认。Bartlett 等^[5]研究表明 DSISH 在不同判读者间符合率达到 92.8%~95.2%, 而且对结果不确定的标本, 病理医师可在多头显微镜下同时观察, 从而达成共识。所以, DSISH 被认为更具有实际应用价值^[6,7]。

2007 年美国临床肿瘤学会/美国病理家协会对乳腺 HER2 检测提出了标准^[8], 新技术的检测结果与 FISH 的符合率应达 95% 以上。根据目前国内外文献^[9-13]报道 DSISH 与 FISH 检测 HER2 基因扩增结果的总体符合率为 95.25%~99.5% ($k = 0.852 \sim 0.975$)。说明了 DSISH 在检测 HER2 基因扩增方面具有稳定性与可重复性。本文研究采用 DSISH 方法检测 230 例胃癌组织 HER2 状态, 发现 HER2 基因扩增率为 18.7% (43/230), 与龙晓雨等^[9]报道一致 (18.8%)。

2009 年 ToGA 试验报道 HER2 表达阳性的进展期胃癌患者, 化疗联合赫赛汀的有效率达 47.3%, 中位生存期达到 13.8 个月。HER2 基因作为胃癌的重要靶基因已经成为共识。自 1986 年 Sakai 等^[14]第一

表 1 230 例胃癌组织中 HER2 基因扩增与临床病理指标的关系

临床病理指标		例数	HER2 基因		χ^2 值	P 值
			扩增	无扩增		
年龄(岁)	< 60	100	22	78	1.27	0.260
	≥ 60	130	21	109		
性别	男性	170	35	135	1.54	0.220
	女性	60	8	52		
肿瘤部位*	胃食管结合部	22	6	16	1.40	0.500
	胃体区	40	6	34		
分化程度	胃窦区	165	31	134	9.12	0.003
	高、中分化	43	15	28		
浸润深度	低分化	187	28	159	1.21	0.270
	黏膜及肌层	46	6	40		
神经侵犯	浆膜及浆膜外	184	37	147	0.08	0.780
	阳性	122	22	100		
脉管癌栓	阴性	108	21	87	0.04	0.850
	阳性	104	20	84		
淋巴结转移	阴性	126	23	103	4.54	0.030
	阳性	168	37	131		
	阴性	62	6	56		

注: *肿瘤部位统计中 3 例残胃癌未列入统计计数

次报道 HER2 在胃癌中过表达以来, 国内外对胃癌与 HER2 基因的关系、致病机制、预后等方面开展了一系列的研究,但报道结果不尽一致。国外文献^[15,16]报道肠型胃癌的 HER2 蛋白表达高于弥漫性胃癌; 有淋巴结转移的胃癌 HER2 的表达高于无淋巴结转移者, 提示 HER2 基因可能参与了胃癌的淋巴结转移过程。国内奚文崎等^[17]检测 198 例胃癌患者手术标本中 HER2 蛋白表达, 发现 HER2 表达与肿瘤大小、组织类型、肿瘤侵袭深度和 TNM 分期有关, 与患者的性别、年龄、肿瘤部位及预后无关, 且肠型胃癌的表达率(36.7%)明显高于弥漫型胃癌(10.4%)。陈娟等^[18]研究结果显示 HER2 阳性与胃癌患者性别、年龄、肿瘤部位、浸润深度及淋巴结转移无相关性, 而与组织类型、分化程度、TNM 分期及远处转移相关。本文研究通过 DSISH 方法检测 230 例胃癌患者中 HER2 基因扩增状态, 发现 HER2 基因扩增与胃癌的分化程度、淋巴结转移有关, 与患者年龄、性别、肿瘤发生部位、浸润深度、神经以及脉管侵犯无关。虽然与各文献报道结果不完全一致, 但仍可说明 HER2 基因检测可以作为评估胃癌恶性生物学行为及预后的指标, 并为靶向治疗提供了理论依据。

4 参考文献

1 Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, et al. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1766: 120-139.

2 Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4429-4434.

3 Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*, 2010, 134: e48-e72.

4 应建明, 郭蕾, 刘秀云, 等. 全自动银增强原位杂交检测乳腺癌患者人表皮生长因子受体 2 基因状态. *中华医学杂志*, 2010, 90: 1674-1677.

5 Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M, et al. Chromogenic in situ hybridization: a multicenter study comparing silver in situ hybridization with FISH. *Am J Clin Pathol*, 2009, 132: 514-520.

6 Langer R, Rauser S, Feith M, et al. Assessment of ErbB2 (Her2) in oesophageal adenocarcinomas: summary of a revised immunohistochemical evaluation system, bright field double in situ hybridisation and fluorescence in situ hybridisation. *Mod Pathol*, 2011, 24: 908-916.

7 Koh YW, Lee HJ, Lee JW, et al. Dual-color silver-enhanced in situ hybridization for assessing HER2 gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol*, 2011, 24: 794-800.

8 Dietel M, Ellis IO, Hofler H, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according

- to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch*, 2007, 451:19-25.
- 9 龙晓雨, 步宏, 魏兵, 等. 双色银染原位杂交与荧光原位杂交检测胃癌患者 HER2 基因状态. *中华病理学杂志*, 2011, 40:300-303.
- 10 Kim MA, Jung JE, Lee HE, et al. In situ analysis of HER2 mRNA in gastric carcinoma: comparison with fluorescence in situ hybridization, dual-color silver in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Hum Pathol*, 2013, 44:487-494.
- 11 Gómez-Martin C, Garralda E, Echarri MJ, et al. HER2/neu testing for anti-HER2-based therapies in patients with unresectable and/or metastatic gastric cancer. *J Clin Pathol*, 2012, 65:751-757.
- 12 García-García E, Gómez-Martín C, Angulo B, et al. Hybridization for human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: a comparison of fluorescence in-situ hybridization with a novel fully automated dual-colour silver in-situ hybridization method. *Histopathology*, 2011, 59:8-17.
- 13 Park YS, Hwang HS, Park HJ, et al. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: which scoring system should we use? *Human Pathology*, 2012, 43:413-422.
- 14 Sakai K, Mori S, Kawamoto T, et al. Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 1986, 77:1047-1052.
- 15 Barros-Silva JD, Leitao D, Afonso L, et al. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer*, 2009, 100:487-493.
- 16 Marx AH, Tharun L, Muth J, et al. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol*, 2009, 40:769-777.
- 17 奚文崎, 张本炎, 金晓龙, 等. 198 例胃癌手术标本 Her-2 蛋白表达与临床病理的相关性和靶向治疗. *中国癌症杂志*, 2010, 20:897-902.
- 18 陈娟, 李东石, 余英豪, 等. Her-2 蛋白在胃癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志*, 2010, 18:1375-1379.

(收稿日期:2013-07-13)

(本文编辑:陈淑莲)

实验室信息系统优化与临床应用研讨会

实验室信息系统已成为现代化临床实验室必不可少的信息基础设施,但在保证检验报告质量、提高工作效率、规范实验室管理、保障人员生物安全、提升服务质量等诸多方面仍然存在巨大的改进空间。借助于 20 余年开发“南方惠侨”LIS 系统及在广东进行 LIS 培训的经验,南方医科大学南方医院拟于 2013 年 10 月 9-12 日举办国家级继续医学教育项目【2013-11-00-126(国)】“实验室信息系统优化与临床应用研讨会”。

1 会议主要内容

1、实验室信息化管理的现状及发展趋势(南方医科大学王前副校长);2、POCT 的临床应用与信息化管理(四川大学华西医院 李贵星教授);3、流水线应用与实验室信息化管理(广东省临床检验中心 邹伟民主任);4、条码识别系统在实验室信息化管理中的运用(南方医科大学生物工程学院于晓宝教授);5、检验标本流程优化与质量控制(南方医科大学珠江医院 陈恩中工程师);6、完善的危急值网络直报与检验过程实时监控(南方医科大学南方医院 曾方银教授);7、临床输血管理系统的建立与应用(南方医科大学南方医院赖福才教授);8、中间件在实验室信息化管理中的运用与思

考(南方医科大学南方医院 裘宇容教授);9、实验室办公自动化管理系统的运用(南方医科大学珠江医院 李雪志教授);10、三甲评审与 ISO15189 认可对实验室信息化管理的要求(南方医科大学南方医院 郑磊教授);11、WHONET 软件与 LIS 的数据交换及微生物分析中的应用(南方医科大学南方医院 芮勇宇教授);12、实验室质量管理体系在 ISO15189 中的应用(人员、文件、设备、方法学评价的信息化管理)(南方医科大学南方医院 孙德华副教授);13、医技人员培训考核体系的规范与信息化建设(南方医科大学南方医院 亓涛讲师);14、试剂全程信息化管理和 LIS 二次开发(南方医科大学南方医院 杨超工程师);15、单人上机实践操作(南方医科大学南方医院 姜太毛工程师)。

2 会议时间及地点

会议时间:2013-10-09 至 2013-10-12

会议地点:南方医院院内南方大酒店

3 联系方式

联系人:柴志欣、杨佳

电 话:020-61642144

E-mail:nfyyjk@sina.com