

人类表皮生长因子受体 2 在乳腺癌表达与临床的相关病理特征分析*

刘延梅, 马少君, 张月浪, 康晓丽, 梁晓燕, 周理乾, 李文生

(陕西省人民医院西院二病区, 西安 710068)

摘要:目的 评估人类表皮生长因子受体 2(HER2)预测价值,并分析其与常见的组织病理学参数的相关性。方法 收集陕西省人民医院 2011 年~2014 年之间 160 例接受手术治疗的乳腺癌患者组织标本,通过免疫组织化学方法(IHC)和荧光原位杂交(FISH)检测 HER2 水平,通过 χ^2 检验用来评估 HER2 基因扩增状况及不同临床病理特性的相关性,临床参数包括:肿瘤大小、组织学分级、雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)表达,年龄、绝经情况和 Ki-67 指数。结果 HER-2 表达与组织学分级、淋巴结转移、ER 水平、PR、Ki-67 指数差异存在统计学意义(均 $P < 0.05$)。相对于 HER-2⁺ 组患者,HER-2⁻ 病变多表现为雌激素 ER 阴性、孕激素阴性、ER 阴性、淋巴结阴性、ki-67 $\geq 20\%$ 。结论 HER-2 表达与多种临床病理因素存在相关性。

关键词:乳腺癌;表皮生长因子受体 2;临床病理特征

中图分类号:R373.9;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)05-091-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.024

Expression of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Correlation with Clinical Pathological Features in Breast Cancer

LIU Yan-mei, MA Shao-jun, ZHANG Yue-lang,

KANG Xiao-li, LIANG Xiao-yan, ZHOU Li-qian, LI Wen-sheng

(the Second Department of Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To evaluate of value of HER2 as a prognostic marker, and to analysis associations with common histopathological parameters in BC cases. **Methods** In this study, formalin-fixed, paraffin-embedded samples of tumors from 160 breast cancer patients who underwent curative surgery procedures between 2011 and 2014 were tested by immunohistochemistry (IHC) as a primary estimate of HER2 status, followed by fluorescence in situ hybridization (FISH). Concordance rate between IHC and FISH was evaluated. The χ^2 test was used to evaluate the correlation between HER2 gene amplification status and different clinical pathological features including: (estrogen receptor) ER and (progesterone receptor) PR expression, age, menopausal status and tumor size. **Results** There was a significant inverse association between expression of hormone receptors (ER and PR) and HER2 amplification (all $P < 0.05$) among the patients studied. However, no relationship was observed between HER2 amplification and age, menopausal status and tumor size ($P > 0.05$). HER2-negative lesions were of higher grade and more likely to be ER-negative, PR-negative, p53-positive, lymph node metastasis, and also Ki-67 $\geq 20\%$ as compared to the HER2-positive group and HER2 overexpression was associated with the levels of ER and PR. **Conclusion** There is correlation of many clinical factors with HER2 expression.

Keywords: breast cancer, human epidermal growth factor receptor 2, clinical pathological features

乳腺癌是一组异质性极高的肿瘤,目前大多数乳腺癌的预后及预测因子诸如人表皮生长因子受体 2(HER2),雌激素受体(ER),孕激素受体(PR)的表达水平都是病理诊断的重要组成部分,这些指标对预测肿瘤的生物学行为非常重要^[1]。大多数 ER 阴性肿瘤患者不受益于抗激素疗法^[2],人类表皮生长因子受体 2(HER2)作是一个重要的分子标记物,HER2 是一个跨膜的酪氨酸激酶受体,在 20%~30%的乳腺癌中呈阳性表达,过表达 HER2 是靶向治疗的一个重要的治疗靶点,精确评估

HER2 状态对治疗乳腺癌非常关键,对靶向治疗和化疗敏感性较高^[3],掌握乳腺癌 HER-2 表达与其他常见临床病理参数及生物学因子诸如组织学分级、淋巴结转移、肿瘤大小、ER 水平、PR、Ki-67 指数相关联系,能够为临床医生提供更多的信息,有助于制定乳腺癌的治疗计划和评估患者预后。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2010 年 1 月~2016 年 6 月在我院行手术切除的 ER-女性乳腺癌患者 160 例,其中 HER2 过表达(HER-2⁺)乳腺癌患者 71 例,年龄

* 基金项目:陕西社发科技攻关项目(编号:2016SF-168),陕西科学技术研究发展计划项目(编号:2013K-12-03-19)。

作者简介:刘延梅(1976-),女,副主任医师,从事呼吸、老年病治疗工作。

通讯作者:马少君(1975-),男,副主任医师,从事乳腺疾病、骨关节及消化道疾病影像诊断。

25~87岁,中位年龄52岁;HER2无过表达(HER-2⁻)型乳腺癌患者89例,年龄27~83岁,中位年龄55岁;术前无远处转移,分析了年龄、性别、组织学分级、肿瘤大小、血管侵犯、淋巴结转移、激素受体状态、Ki-67指数,并所有患者均有完整病历资料。

1.2 试剂和主要仪器

1.2.1 免疫组织化学染色检测:Ki-67用抗生物素-蛋白生物素-过氧化物酶复合物化酶复合法进行(vector laboratories,旧金山,美国),切片对比染色用MaYer苏木精。Ki-67检测,切片单克隆小鼠抗人Ki-67抗原孵育(1:100;DAKO)。

1.2.3 荧光原位杂交(FISH)检测:HER-2⁻/neu试剂盒购自北京金菩嘉公司DNA FISH探针,内含GLP HER-2⁻/CSP17(CSP17为对照探针)探针,缓冲液及DAP I染料。

1.2.4 主要设备:荧光显微镜,漩涡混合器,电热恒温培养箱,烤片机,恒温水浴箱。

1.3 方法 病理标本为组织切除后1 h内用10 ml/dl中性缓冲福尔马林液固定,固定时间为6~48 h,石蜡包埋,并于6周内切片,连续切4 μm切片2张,分别置于经多聚赖氨酸处理过的载玻片上。1张用IHC检测,另一张未染色的切片用于FISH检测。

1.3.1 荧光原位杂交(FISH)检测 HER-2⁻/neu:标本处理程序严格按照说明书进行。杂交信号计数选择细胞核大小一致,核的边界完整、二脒基苯基吡啶(DAP I)染色均一,细胞核孤立无重叠,绿色着丝粒信号清晰的细胞,随机计数20~30个癌细胞核中的双色信号。判读标准:①红色信号的总数与绿色信号的总数比值 ≥ 2 时,即为HER-2基因扩增,否则为无扩增;②若红绿两信号的比值 > 20 或众多信号连接成簇时可不计算,即视为基因扩增;③若比值介于1.8~2.2之间,则需要再计数20个细胞核中的信号或由另外一个分析者重新计数;④若HER-2基因扩增在不同癌细胞中存在异质性时,在另一癌区域再计算30个癌细胞核中的红、绿信号值,计算其最大值,并加以注释。

1.3.2 免疫组织化学分析方法检测ER, PGR和Ki-67所有标本经10 ml/dl中性甲醛固定、常规脱水、二甲苯透明、石蜡包埋切片。免疫组织化学采用S-P法,肿瘤组织切片进行微波抗原修复,一抗为ER, PR, HER-2单克隆抗体,用磷酸盐缓冲液代替一抗进行阴性对照。ER, PR结果判定: $\geq 10\%$ 的癌细胞核呈棕黄色染色判定为ER, PR阳性表达;HER-2结果判定:细胞膜无染色或 $< 10\%$ 的细胞膜较弱染色为(-), $> 10\%$ 的细胞膜部分较

弱染色为(+), 10% 的细胞膜完全较弱至中等棕黄染色为(++), $> 10\%$ 的细胞膜完全强棕黄染色为(+++),其中(+++)及(+++)判定为HER-2过表达或阳性表达。(++)用荧光原位杂交(FISH)进行验证,FISH结果阳性判定为阳性,相反则判定为阴性。Ki-67指数分为分数($< 20\%$, $\geq 20\%$)。

1.4 统计学分析 用SPSS16.0统计软件对数字进行统计学分析,两组数据间比较采用 χ^2 检验及Fisher精确概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 160例乳腺癌患者HER2与临床病理特征的相关性评价中,经免疫组织化学(IHC)检测及荧光原位杂交(FISH)进行验证(图1,2),HER2过表达(HER-2⁺)乳腺癌患者71例,HER2无过表达(HER-2⁻)型乳腺癌患者89例。

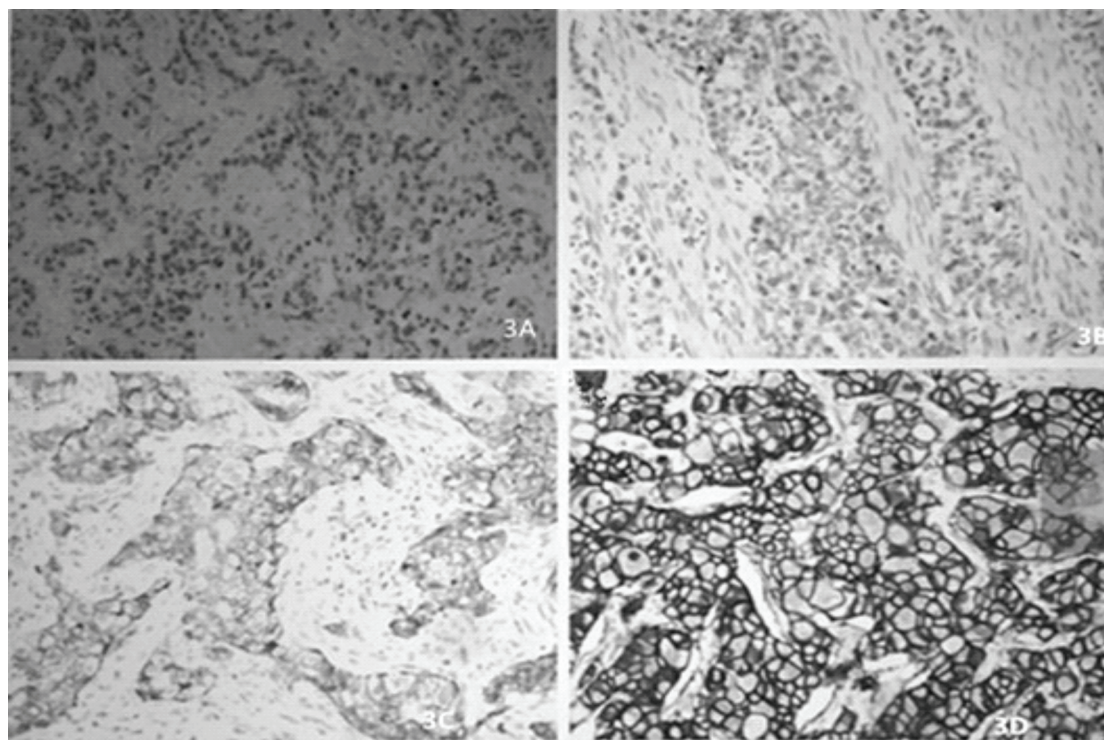
表1 HER-2表达与临床病例特征关系[n(%)]

变 量*	HER-2 ⁺ (n=71)	HER-2 ⁻ (n=89)	χ^2	P
年龄			1.101	0.294
>50	23(32.4)	36(40.4)		
<50岁	48(67.6)	53(59.6)		
组织学分级			16.451	0.000
I级	11(15.5)	21(23.6)		
II级	54(76.1)	41(46.1)		
III级	6(8.4)	27(30.3)		
月经状况			0.459	0.498
绝经前	46(64.8)	53(59.6)		
绝经后	25(35.2)	36(40.4)		
腋窝淋巴结			5.874	0.015
阳性	53(74.6)	50(56.2)		
阴性	18(25.4)	39(43.8)		
肿瘤大小			3.64	0.056
≥ 2 cm	65(91.5)	72(80.9)		
< 2 cm	6(8.5)	17(19.1)		
血管浸润			1.302	0.254
阳性	50(70.4)	55(61.8)		
阴性	21(29.6)	34(38.2)		
ER			5.133	0.023
阳性	50(70.4)	47(52.8)		
阴性	21(29.6)	42(47.2)		
PR			14.450	0.000
阳性	24(33.8)	57(64.0)		
阴性	47(66.2)	32(36.0)		
Ki-67			4.342	0.037
$< 20\%$	46(64.8)	43(48.3)		
$\geq 20\%$	25(35.2)	46(51.7)		

表1显示:年龄因素与HER2表达差异无统

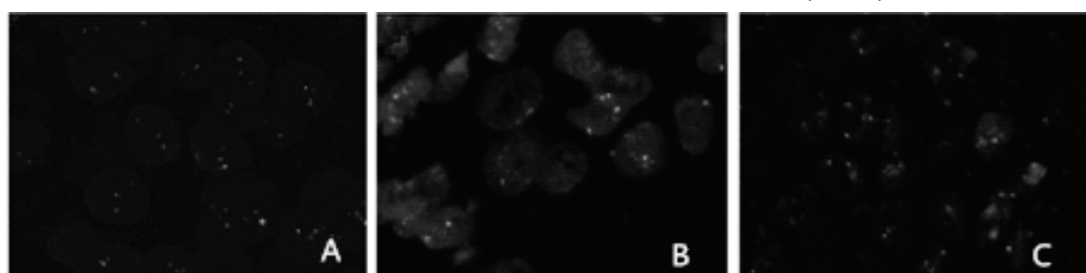
计学意义($P=0.294$);组织学分级年龄因素与 HER2 表达差异有统计学意义($P=0.000$);月经状况、肿瘤大小、血管浸润与 HER2 表达差异无统计学意义($P=0.496, 0.056, 0.254$);腋窝淋巴结与 HER2 表达差异有统计学意义($P=0.015$), HER-2⁻组较 HER-2⁺组更易表现为淋巴结阴性;

ER, Ki-67 表达与 HER2 表达差异有统计学意义($P=0.023, 0.037$);PR 表达与 HER2 表达差异有统计学意义($P=0.000$)。HER2 无过表达(HER-2⁻)较 HER2 过表达(HER-2⁺)乳腺癌较多表现为高组织分级、腋窝淋巴结阴性、ER 阴性、PR 阳性及 Ki-67 $\geq 20\%$ 。



A:IHC 0;B:IHC 1+;C:IHC 2+;D:IHC 3+。

图1 HER2 蛋白表达在乳腺癌组织的免疫组织化学染色($\times 100$)



红色信号代表 HER2 基因探针,绿点表示 CEP17 参考探测器。A:正常的 HER2 基因表达;B:HER2 基因扩增;C:明显扩增 HER2 信号的簇状放大。

图2 FISH 检测 HER2 基因结果($\times 1000$)

3 讨论 乳腺癌是一组异质性极高的肿瘤^[1],目前大多数乳腺癌的预后/预测因子,如患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、淋巴/血管侵犯、转移肿瘤大小,以及雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、HER2 的表达水平,都是病理诊断的重要组成部分^[4]。这些病理指标对目前预测乳腺癌生物学行为非常重要,病理诊断直接影响到患者治疗方案的确定。

研究显示,患者年龄是一个很重要的预后/预测因子,乳腺癌的发病年龄直接与预后呈反比,发病年龄越轻,预后越差^[5],本研究表明,患者年龄与 HER2 的表达水平无相关性,结论不一致可能是由

于样本量较小所致。Figueroa-Magalhaes 等^[6]报道,HER-2 表达随着年龄的增长而减弱,这与我们的结论符合。Nishimura 等^[7]报道,ER 表达水平,PR 表达水平,Ki-67 指数和 HER2 过度表达显著相关,更高的 HER2 表达关联更高的 Ki-67 指数,Ki-67 高表达者的生存率明显差于低表达者,这一点和我们的结果不相符。此外,在年轻乳腺癌患者 Ki-67 的超表达 HER2 的过表达显示了乳腺肿瘤较其他肿瘤更加具有侵袭性^[8],在本研究结果中,尽管 HER2 在年龄分组中无显著关联,但 HER-2⁺ 仍较多存在于年轻患者中。本研究结论 HER-2 表达与组织学分级、淋巴结转移、肿 (下转 96 页)

- [J]. Contemporary Medicine, 2011, 17(17): 116-117.
- [2] Rackow BW, Taylor HS. Submucosal uterine leiomyomas have a global effect on molecular determinants of endometrial receptivity[J]. Fertil Steril, 2010, 93(6): 2027-2034.
- [3] Li H, Zhu H, Xu CJ, et al. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis[J]. Cell, 1998, 94(4): 491-501.
- [4] 王海燕, 王来栓, 归绥琪. 细胞凋亡通路研究进展[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2003, 23(5): 490-492.
- Wang HY, Wang LS, Gui SQ. The research advancement of apoptotic pathway[J]. Foreign Medical Sciences, Section of Pathophysiology and Clinical Medicine, 2003, 23(5): 490-492.
- [5] Rao RV, Hetmel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(36): 33869-33874.
- [6] Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, et al. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95 and TRAIL-receptor-mediated apoptosis[J]. Oncogene, 2000, 19(48): 5477-5486.
- [7] Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL induced apoptosis by Bcl-2 overexpression[J]. Oncogene, 2002, 21(15): 2283-2294.
- [8] Ng CP, Bonavida B. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation; sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI (Smac/DIABLO)[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(12): 1051-1058.
- [9] 冯静, 崔恒, 魏丽惠, 等. TFAR19蛋白在卵巢上皮性癌中的表达[J]. 中国妇产科临床杂志, 2002, 3(3): 164-167.
- Feng J, Cui H, Wei LH, et al. Expression of TFAR19 protein in epithelial ovarian cancer[J]. Chin J Clin Obstet Gynecol, 2002, 3(3): 164-167.

收稿日期: 2015-11-19

修回日期: 2016-05-30

(上接 93 页) 瘤大小、ER 水平、PR、Ki-67 指数存在显著相关性。HER2 无过表达 (HER-2⁻) 较 HER2 过表达 (HER-2⁺) 乳腺癌较多表现为高组织分级、腋窝淋巴结阴性、ER 阴性、PR 阳性及 Ki-67 ≥ 20%, 与以前的研究存在部分差异, 有待继续研究。

HER2 阳性肿瘤的分化较差, 对靶向治疗反应好。2007 年和 2010 年美国临床肿瘤学会/美国病理医师学院 (ASCO/CAP) 分别发布了乳腺癌 HER2 检测指南以及 ER/PR 检测指南^[9,10]。国内专家组也于 2009 年发布了中国乳腺癌 HER2 检测指南^[11], 上述指南就三种肿瘤标志物的标准化检测和报告进行了详尽阐述, 可供广大医师参考。ER、PR 和 HER2 能够同时判定乳腺癌的预后和预测治疗反应, 其检测结果直接影响患者的治疗方案, 因此检测的准确性和标准化对研究 HER2 与 ER、PR 关系也至关重要。

总之, 乳腺癌的临床病理特征与激素受体和 HER2 密切相关, 了解乳腺癌 HER2 表达状况及与其他预测因子的关系及生物学特征, 可以为临床医师在乳腺疾病的诊疗中提供重要参考。

参考文献:

- [1] 唐平, 魏兵, 杨雯娟, 等. 乳腺癌预后/预测因子[J]. 中华病理学杂志, 2011, 40(2): 73-76.
- Tang P, Wei B, Yang WJ, et al. Prognostic factors of breast cancer[J]. Chinese Journal of Pathology, 2011, 40(2): 73-76.
- [2] Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, et al. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(4): 980-991.
- [3] Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009[J]. Ann Oncol, 2009, 20(8): 1319-1329.
- [4] Carey LA. Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000 ~ 2010[J]. Clin Breast Cancer, 2010, 10(3): 188-195.
- [5] Jatoi I, Anderson WF, Rosenberg PS. Qualitative age-interactions in breast cancer: a tale of two diseases? [J]. Am J Clin Oncol, 2008, 31(5): 504-506.
- [6] Figueroa-Magalhaes MC, Jelovac D, Connolly RM, et al. Treatment of HER2-positive breast cancer[J]. Current Treatment Options in Oncology, 2014, 23(2): 128-136.
- [7] Nishimura R, Osako T, Okumura Y, et al. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer[J]. Exp Ther Med, 2010, 1(5): 747-754.
- [8] Patnayak R, Jena A, Rukmangadha N, et al. Hormone receptor status (estrogen receptor, progesterone receptor), human epidermal growth factor-2 and p53 in South Indian breast cancer patients: A tertiary care center experience[J]. Indian J Med Paediatr Oncol, 2015, 36(2): 117-122.
- [9] 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]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 1(1): 1843.
- [10] 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[J]. Arch Pathol Lab Med, 2010, 134(6): 907-922.
- [11] 《乳腺癌 HER2 检测指南 (2009 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南 (2009 版)[J]. 中华病理学杂志, 2009, 38(12): 836-840.

收稿日期: 2016-06-20

修回日期: 2016-08-25