

# HER2/neu之原位雜交檢驗

廖儷容<sup>1</sup>、許志怡<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>台北榮民總醫院病理檢驗部，台北，台灣

<sup>2</sup>陽明大學醫學院病理學科，台北，台灣

## 摘要

HER2/neu已是明確的致癌基因，過多的HER2/neu蛋白會讓癌細胞快速生長，使得患者預後變差。目前，檢驗HER2/neu的蛋白質表現及基因放大（amplification），已成為評估治療方式的依據，且兩者有95%以上的一致性。臨床上，以免疫組織化學染色法（Immunohistochemistry; IHC）及螢光原位雜交法（Fluorescence *in situ* hybridization; FISH）為主要的檢驗方式。IHC在病理檢驗已被廣泛使用，主要應用於定性的診斷輔助工具，應用於定量的檢驗上有其限制，因IHC的結果易受到檢體固定處理、染色試劑及染色步驟等的影響。所以IHC不確定或是蛋白質保存較差的檢體，需進一步使用FISH來做確認。FISH是一種量化的檢驗方法，可以直接看到HER2/neu基因的數目，且有CEP17做比較。但由於FISH的結果需使用螢光顯微鏡來觀察，病理醫師在暗視野的環境下，很難同時觀察到細胞的形態，對於常有HER2/neu基因放大分布不均的胃癌，容易因觀察時選取細胞的不同而導致誤判。針對FISH的缺點，在市面上已有新的染色套組上市，其使用不同的呈色劑來取代螢光，結果可透過一般的光學顯微鏡來觀察，並可以藉由自動染色機來操作。自動化的檢驗套組，使得染色流程更容易達到標準作業程序，同時也提高了HER2/neu檢驗的準確性。（生醫2011;4(3):148-153）

關鍵字：HER2/neu、乳癌、胃癌、ISH

## 前言

根據衛生署發布的國人去年十大死因統計中，惡性腫瘤已連續二十九年蟬聯十大死因之首，而乳癌則是女性十大癌症排行榜的第一位。在乳癌患者中，有20-30%被發現其癌細胞有第二型人類

表皮生長因子受體（human epidermal growth factor receptor 2; HER2）的過度表現，此蛋白的過度表現（overexpression）會使細胞的分裂及增殖加快，造成腫瘤的侵襲性變大，導致患者對於化學治療和荷爾蒙療法的敏感度不佳，並與預後較差有極為明顯的相關性<sup>1</sup>。

通訊作者：許志怡 醫師

電話：886-2-2875-7449

傳真：886-2-2875-7056

地址：112 台北市石牌路2段201號

電子郵件：cyhsu@vghtpe.gov.tw

今年四月國民健康局發表的民國九十七年癌症登記報告顯示，胃癌發生的人口數已超過3500人。胃癌因早期症狀不明顯，約4成5患者發現時多已轉移<sup>2</sup>，且研究數據指出，約2成轉移性胃癌病患有HER2/neu陽性基因，可能使疾病惡化更加迅速，復發風險增加。根據2010年發表的胃癌第三期全球臨床研究（ToGA study）結果證實，廣泛應用於乳癌的標靶製劑賀癌平（Herceptin），同樣可以應用於胃癌的治療。結果也顯示HER2/neu過度表現的轉移性胃癌患者，在接受標靶治療後，會比未接受標靶治療的患者延長2.7個月存活期，死亡風險下降26%<sup>3</sup>。

有鑑於此，HER2/neu的狀態，為臨床決定是否使用Trastuzumab（Herceptin<sup>®</sup>，賀癌平<sup>®</sup>）標靶治療的關鍵之一。賀癌平為基因重組的單株抗體，可以和腫瘤細胞膜上的HER2/neu蛋白結合，以阻止腫瘤細胞內蛋白質訊號的傳遞，來抑制腫瘤細胞生長。該藥已於1988年經美國食品藥物管理局（US Food and Drug Administration; FDA）核准上市，正式應用於乳癌的治療<sup>4</sup>。國內健保於2002年開放賀癌平為轉移性乳癌用藥，2010年10月起，也給付給具HER2過度表現（亦即免疫組織化學染色法〔Immunohistochemistry; IHC〕3+）或FISH+有腋下淋巴結轉移之早期乳癌患者，作為輔助性治療用藥。2010年美國FDA及我國衛生署也核准賀癌平用於HER2陽性轉移性胃癌的治療。但並非所有的乳癌患者均適用於此治療方式，賀癌平理論上只對細胞膜上有過多HER2/neu蛋白質表現的細胞才有作用，所以必需篩選HER2/neu陽性的患者來接受治療才會成功，因此HER2/neu蛋白表現的檢驗就更加的重要。

## HER2/neu檢驗方法

實驗室檢驗HER2/neu蛋白表現及HER2/neu基因

放大（amplification）的方法有許多種，包括免疫組織化學染色法、螢光原位雜交法（Fluorescence *in situ* hybridization; FISH）、南方墨點法（Southern blot）、西方墨點法（Western blot）和北方墨點法（Northern blot）。其中，IHC及螢光原位雜交法是目目前臨床實驗室測定HER2/neu表現最常使用的方法。

IHC是所有病理實驗室的基本技術，原理是藉由抗原抗體反應來偵測細胞膜表面HER2/neu蛋白的表現，其可做為定性的輔助診斷。因為使用福馬林固定及固定時間的不同，都會影響到腫瘤組織HER2/neu蛋白質的表現，並且不同實驗室的操作方式及不同人員的判讀，都使得結果難以達到一致性<sup>5</sup>。

反觀FISH的檢驗，FISH是用來偵測腫瘤細胞的DNA，所以組織固定的過程較不會影響其分析的結果，且分析的再現性也較好<sup>6</sup>。由於IHC比較便宜又省時，因此較適合優先當作篩選的工具。IHC的判讀，依照染色程度分成四級：0、1+、2+、3+，我們一般以HER2/neu 3+最具有臨床意義，可以作為使用賀癌平的依據；HER2/neu 2+則需進一步做FISH來確認基因有無放大；而HER2/neu 0或HER2/neu 1+，則表示沒有HER2/neu蛋白的過度表現，不必再作FISH，也不適合使用賀癌平來治療。FISH檢驗通常被認為是較準確的測試方法，本文將進一步介紹，利用分子檢驗技術在HER2/neu檢驗的應用。

## ISH原理及種類

核酸雜交技術（nucleic acid hybridization），在臨床檢驗上已被大量使用，特別是應用在產前基因異常、腫瘤診斷、以及感染性疾病的偵測上。核酸雜交技術的原理十分簡單，是以核苷酸分子間的特異配對

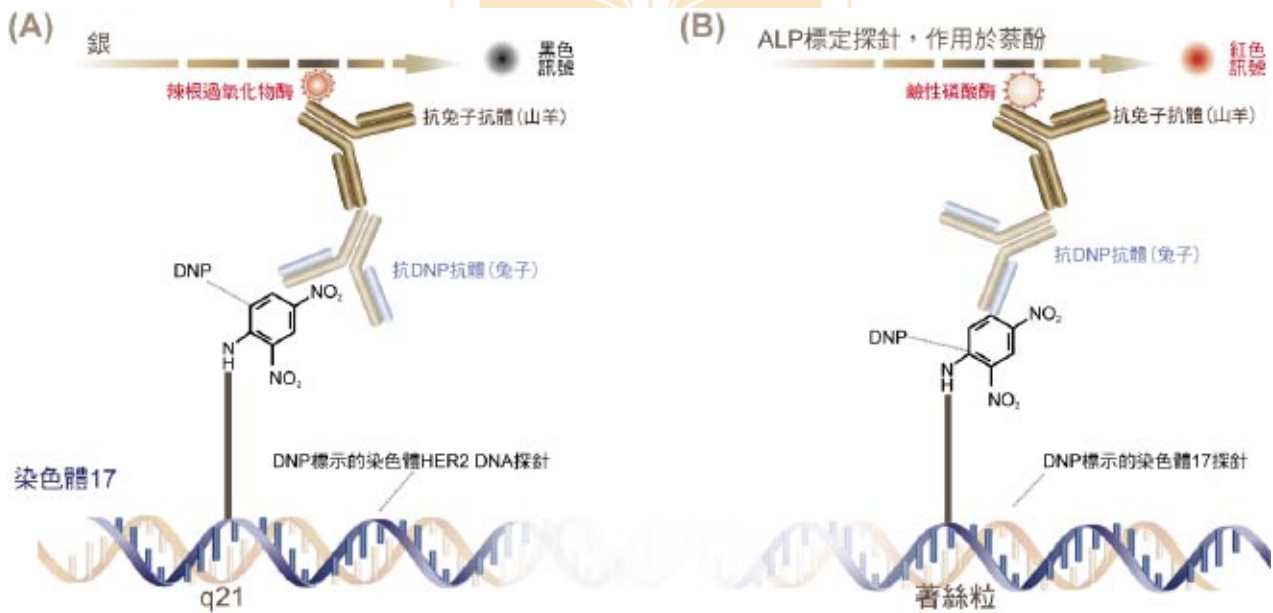
產生氫鍵而結合（也就是A::T與G::C）的方式，來偵測核酸的表現。使用具有專一性之核酸序列，以體外合成的方式，合成一段核酸探針（probe），在特定的反應條件下，進行雜交（hybridization），反應結果可以經由測定該核酸探針所攜帶的標記物而測得。

原位雜交技術（*in situ* hybridization; ISH），為直接偵測及定位細胞或染色體內特異核酸之重要工具，依據不同的呈色方式及偵測方法，可分為：

1. 螢光原位雜交法（FISH）：利用螢光標定之核酸探針與染色體上特定DNA片段做結合，結果透過螢光顯微鏡觀察，可計算出細胞內帶有預觀察基因的數目及其所在位置。缺點為操作時間長，結果無法長期保存，病理醫生在暗視野下不易觀察組織細胞形態。

2. 顯色原位雜交法（Chromogenic *in situ* hybridization; CISH）：CISH與FISH的基本原理相似，不同之處在於，它使用辣根過氧化物酶（Horseradish peroxidase; HRP）與二氨基聯苯胺（Diaminobenzidine; DAB）的呈色反應代替螢光來定位探針，其結果可直接在一般光學顯微鏡下觀察，技術上更為簡單、快速，染色片可以長期保存。

3. 銀染原位雜交法（Silver *in situ* hybridization; SISH）：為Ventana醫療集團所研發，原理及作用與CISH相同，同樣使用辣根過氧化物酶來定位探針，利用銀取代DAB做為呈色劑。可直接使用光學顯微鏡觀察，敏感度更高，操作時間是FISH的一半，意即染色當天即可閱片，減少患者的等待時間。



**圖一、Dual ISH的原理**

(A) 利用辣根過氧化物酶 (horseradish peroxidase; HRP) 來定位探針，過氧化酶作用於銀 (silver) 後產生黑色訊號。  
 (B) 使用鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase; ALP) 標定探針，作用於Fast Red/Naphthol (萘酚) 後產生紅色訊號。  
 (彩圖詳見本刊網頁)

4. 雙色原位雜交法 (Dual ISH)：同時利用兩種不同的呈色方式，分別標定兩段特定的核酸探針，一為利用辣根過氧化物酶來定位探針，辣根過氧化物酶會作用於銀後產生黑色訊號；另一呈色方式為，使用鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase; ALP) 標定探針，作用於Fast Red/Naphthol (萘酚) 後產生紅色訊號，優點是可在同一視野下觀察到兩段核酸表現的情形 (圖一)。

## FISH在HER2/neu的判讀與應用

美國FDA針對賀癌平治療乳癌而推薦的兩種石蠟組織檢驗法，一為免疫組織化學染色法，另一則是螢光原位雜交法。FISH在螢光顯微鏡下可以確認出腫瘤所在的位置，以PathVysion test來說，它會把HER2基因部位呈現橘色螢光亮點，它也會將第17對染色體的著絲粒 (CEP17) 呈現綠色亮點。判讀方法為，計算20個侵襲性腫瘤細胞 (invasive tumor cells)，比對橘色及綠色亮點的數目，計算出HER2/CEP17的比值，若數值在1至1.8則為陰性，1.8至2.2為模稜兩可 (equivocal)，大於2.2則為陽性，即表示HER2/neu基因過度表現<sup>7,8</sup>。

目前健保給付HER2/neu螢光原位雜交的適應症為：(1) 乳癌中之invasive carcinoma (侵襲性癌)。(2) 本法為IHC染色結果之輔助檢查方法，不可單獨使用。(3) 此法僅適用於HER2/neu IHC score為2+之乳癌患者<sup>9</sup>。健保目前未給付胃癌的FISH檢驗。

## HER2/neu檢驗指引及評估方法

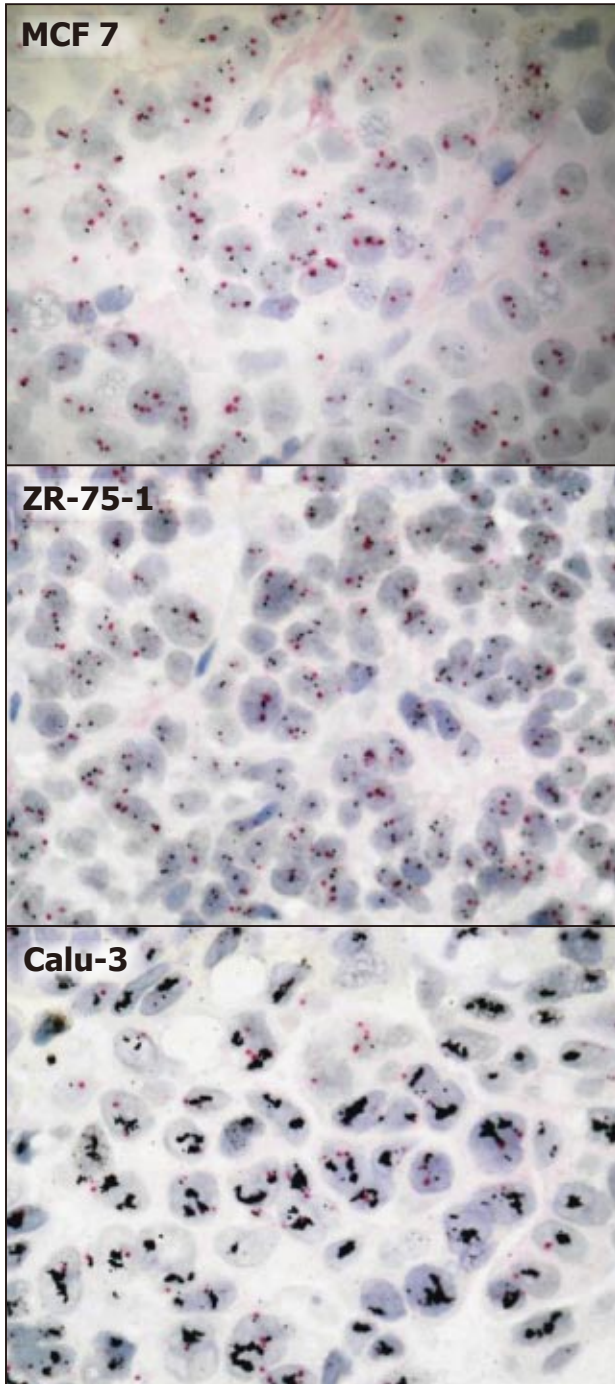
病理醫師的判讀結果決定了臨床上的用藥，以致技術員提供給病理醫師的染色片品質更是相對的重要。染色的品質要如何維持及掌握呢？在2007年美國臨床腫瘤學會 (American Society of Clinical Oncology; ASCO) 與美國病理學會 (College of American Pathologists; CAP) 發表了HER2/neu檢驗指引，其規範了HER2/neu檢驗的標準化作業程序，其中包含了檢體處理、判讀標準及報告的方式<sup>10</sup>。目前，FDA核准通過多種的HER2/neu檢驗方法，如免疫組織化學染色法中的Dako HercepTest™、BioGenex InSite™ HER2/neu Mouse Monoclonal Antibody (Clone CB11) kit，及螢光原位雜交法的PathVysion HER2 DNA probe kit (Vysis PathVysion™)、Dako HER2 FISH pharmDx™等。

對於一個合格的檢驗方法，在提供臨床服務前，應使用25至100個檢體做初始驗證 (initial validation)，其檢驗結果需與另一個已通過認證的檢驗法做交叉比對，結果需達到95%的一致性，才表示此檢驗方法是可信的。另外，每半年都需做一次持續驗證 (ongoing validation)，這部分在參加CAP評鑑的實驗室是可以用每半年一次的能力試驗 (proficiency test; PT) 來進行。若無參加CAP評鑑的實驗室，亦可加入台灣病理學會所舉辦的HER2/neu檢驗的能力試驗。

除了參與外部品管測試外，內部品管也是很重要的，內部的品管可使用管制玻片 (Control Slide) 來



進行。目前，HER2/neu免疫染色普遍的參考物質是使用腫瘤細胞株（tumor cell line），利用腫瘤細胞株可不斷增殖培養，並保留原本細胞特質的原理，將腫瘤細胞株大量培養，製成細胞蠟塊，用來做為



圖二、Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides的形態。  
（彩圖詳見本刊網頁）

表一、Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides的特性。

| Cell Line | HER2 Protein expression level | Approximate <i>HER2</i> Gene Copy# by FISH | Average <i>HER2</i> /Chr17 Ratio by FISH | Average <i>HER2</i> /Chr17 Ratio by DISH |
|-----------|-------------------------------|--|--|--|
| Calu-3    | 3+                            | >6 copies/nuclei                           | 5.01                                     | 5.53                                     |
| ZR-75-1   | 1+                            | 3 copies/nuclei                            | 1.36                                     | 1.34                                     |
| MCF 7     | 0                             | 1-2 copies/nuclei                          | 1.0                                      | 0.85                                     |

校正的標準物質。國內以細胞株做為HER2/neu的校正標準物的產品，像是Ventana醫療集團所出的產品 *HER2* Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides及PATHWAY® *HER2* 4 in 1 Control Slides。此外，英國國家外部品質評量（United Kingdom National External Quality Assessment Service; UK NEQAS）所做的HER2/neu檢驗的品質評估，也長期使用腫瘤細胞株來製作，用以測試HER2/neu的免疫染色與FISH的品質。

以*HER2* Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides為例，其分別使用Calu-3、ZR-75-1 and MCF 7細胞株做為HER2/neu蛋白之3+、1+、0的對照，同時也可做為HER2/neu基因放大比率的對照（表一）。利用Dual ISH的方法偵測這三個細胞株，則可清楚的區分不同等級的基因表現（圖二）。

## 結論

確定腫瘤細胞HER2/neu狀態的重要性，在於找出適用標靶藥物治療的病患，接受適當的治療。在證實抗HER2/neu單株抗體賀癌平對於乳癌及胃癌有相當的抗癌療效後，HER2/neu狀態的檢驗變得相對重要。一個合格的臨床實驗室，應遵循HER2/neu的檢驗指引，

建立品管與品保措施，除了內部品管外，亦需定期參與外部能力試驗，來確保檢驗結果的精確性。因此，為避免HER2/neu陽性的乳癌及胃癌病患錯失使用標靶藥物治療的機會，只有針對檢驗方法進行統一的規範，病理醫師才能正確的判讀，為臨床診斷治療提供更可靠的依據。

## 引用文獻

1. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Puzstai L, Bloom KJ. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8:307-325.
2. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 1999;17:1983-1987.
3. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. *Global Cancer Facts & Figures* 2007;9-11.
4. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK; ToGA Trial Investigators. 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.
5. Gancberg D, Järvinen T, di Leo A, Rouas G, Cardoso F, Paesmans M, Verhest A, Piccart MJ, Isola J, Larsimont D. Evaluation of HER-2/NEU protein expression in breast cancer by immunohistochemistry: an interlaboratory study assessing the reproducibility of HER-2/NEU testing. *Breast Cancer Res Treat* 2002;74:113-120.
6. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20:3095-3105.
7. Lal P, Salazar PA, Hudis CA, Ladanyi M, Chen B. HER-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: a single-institution experience of 2,279 cases and comparison of dual-color and single-color scoring. *Am J Clin Pathol* 2004;121:631-636.
8. Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Fiche M, Treilleux I, Mathieu MC, Vincent-Salomon A, Vilain MO, Couturier J. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88:1587-1591.
9. 行政院衛生署：全民健康保險醫療費用支付標準。臺北：衛生署，2010。 [http://www.nhi.gov.tw/resource/bulletin/2433\\_W0970048006-附件1.doc](http://www.nhi.gov.tw/resource/bulletin/2433_W0970048006-附件1.doc)
10. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-145.