

HER2 基因扩增和蛋白表达与胃癌临床病理特征和预后的关系

卞学艺^{1*} 叶青青^{2*} 王 瑶² 沈艳莹³ 沈丹平¹ 倪醒之^{1#}

上海交通大学医学院附属仁济医院普外科¹(200127) 病理科³ 阿斯利康中国创新中心²

背景:曲妥珠单抗在人表皮生长因子受体 2(HER2)阳性胃癌分子靶向治疗中的作用已得到确认,研究 HER2 评分与患者临床结局的关系可确定哪些患者可能从曲妥珠单抗治疗中获益。**目的:**探讨 HER2 基因扩增和蛋白表达与胃癌临床病理特征和预后的关系。**方法:**应用美国食品药品监督管理局(FDA)认证的检测试剂盒和 Hofmann 等报道的共识小组推荐胃癌 HER2 评分系统,采用荧光原位杂交(FISH)和免疫组化方法(IHC)检测 177 例胃癌组织的 HER2 基因扩增和蛋白表达。比较不同临床病理特征胃癌亚组间 HER2 阳性率的差异,以 Kaplan-Meier 生存曲线分析 HER2 与预后的关系。**结果:**177 例胃癌组织中 31 例(17.5%) HER2 阳性,肠型胃癌阳性率显著高于弥漫型/混合型胃癌(28.1%对 12.5%, $P=0.0109$),分化较好的胃癌阳性率显著高于分化较差的胃癌(37.0%对 10.7%, $P<0.0001$)。HER2 与性别、年龄、肿瘤部位和 TNM 分期无关。HER2 阳性与阴性者总体生存率无明显差异,但在分化较好的胃癌中,HER2 阳性者预后差于 HER2 阴性者($P=0.0084$)。**结论:**肠型胃癌和分化较好的胃癌是曲妥珠单抗治疗的主要候选人群。HER2 尚不能作为独立指标判断胃癌预后。

关键词 胃肿瘤; 人表皮生长因子受体 2; 预后; 原位杂交,荧光; 免疫组织化学

Correlation of HER2 Gene Amplification and Protein Expression with Clinicopathological Characteristics and Prognosis of Gastric Cancer BIAN Xueyi, YE Qingqing, WANG Yao, SHEN Yanying, SHEN Danping, NI Xingzhi. Department of General Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai (200127)

Correspondence to: NI Xingzhi, Email: niyin@yahoo.com

Background: The efficacy of trastuzumab for treating human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive gastric cancer (GC) has been confirmed by phase III clinical trial. Investigation on correlation of HER2 score with clinical outcome will be helpful for determining which patient might be benefit from trastuzumab therapy. **Aims:** To study the correlation of HER2 gene amplification and protein expression with clinicopathological characteristics and prognosis of GC. **Methods:** One hundred and seventy-seven GC specimens were collected. HER2 gene amplification and protein expression were determined by using the Food and Drug Administration (FDA)-approved kits for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC), and were scored according to the consensus panel recommendations on HER2 scoring for GC. The difference in HER2 positivity rate among GC with different clinicopathological characteristics was analyzed, and the correlation between HER2 and prognosis was estimated by Kaplan-Meier survival curve. **Results:** Thirty-one cases of GC (17.5%) were positive for HER2. The positivity rates in intestinal type GC and well-differentiated GC were higher than those in diffuse/mixed type GC and poorly-differentiated GC, respectively (28.1% vs. 12.5%, $P=0.0109$; 37.0% vs. 10.7%, $P<0.0001$), but were not correlated with gender, age, tumor location and TNM stage. The overall survival was not significantly different between HER2-positive and HER2-negative GC, but in well-differentiated cases, the survival of HER2-positive GC was worse than that of HER2-negative GC ($P=0.0084$). **Conclusions:** Patients with intestinal type GC and well-differentiated GC may be the potential responders to trastuzumab therapy. HER2 can not yet be served as an independent predictor for prognosis of GC.

Key words Stomach Neoplasms; Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; Prognosis; In Situ Hybridization, Fluorescence; Immunohistochemistry

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2011.05.003

*本文共同第一作者,卞学艺:现工作单位 上海交通大学医学院苏州九龙医院普外科(215021),Email: bxymxf@163.com;

叶青青:Email: qingqing.ye@astrazeneca.com

#本文通信作者,Email: niyin@yahoo.com

已知人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)基因扩增及其蛋白过表达参与了多种实体瘤的发生机制,据报道 6%~35%的胃和胃食管连接部肿瘤存在 HER2 过表达,重组抗 HER2 人源化单克隆抗体曲妥珠单抗在 HER2 阳性胃癌分子靶向治疗中的作用已得到确认^[1]。HER2 检测是筛选适用曲妥珠单抗治疗的胃癌患者的关键步骤,研究 HER2 评分与患者临床结局的关系可确定哪些患者可能从曲妥珠单抗治疗中获益。2008 年 Hofmann 等^[2]首次提出了在目前用于乳腺癌 HER2 检测的 HercepTest™ 评分系统基础上进行修正并经国际肿瘤学和病理学专家小组论证通过的针对胃癌的 HER2 评分系统,并建议曲妥珠单抗治疗临床试验在纳入胃癌患者时,同时使用荧光原位杂交(FISH)和免疫组化方法(IHC)检测 HER2。本研究使用经美国食品药品监督管理局(FDA)认证的检测试剂盒,采用该评分系统检测了 177 例胃癌组织,旨在探讨 HER2 基因扩增和蛋白表达与胃癌临床病理特征和预后的关系。

材料与方法

一、标本来源

2007 年 7 月~2010 年 1 月于上海交通大学医学院附属仁济医院普外科接受手术治疗、肉眼辨认肿瘤病灶直径大于 1 cm 的 177 例胃癌患者的肿瘤组织和相应正常胃组织甲醛固定石蜡包埋标本纳入研究。患者术前均未接受过放化疗或分子靶向治疗。正常胃组织标本取自距肿瘤边缘 5 cm 以上处。胃癌组织和正常胃组织的诊断均经病理检查证实。

177 例胃癌患者中男 119 例,女 58 例,男女比例为 2.05:1,年龄 22~85 岁,中位年龄 62 岁。贲门癌 28 例,胃体癌 37 例,胃窦癌 110 例,残胃癌 2 例;Lauren 分型肠型 57 例,弥漫型 81 例,混合型 39 例;根据世界卫生组织(WHO)消化系统肿瘤病理学分类,按肿瘤所形成的腺样结构百分率对肿瘤分化程度进行分级,1 级 2 例,2 级 44 例,3 级 87 例,4 级 44 例,1、2 级归为分化较好,3、4 级归为分化较差;根据第 5 版国际抗癌联盟(UICC)胃癌 TNM 分期标准,Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 43 例,Ⅲ期 88 例,Ⅳ期 34 例。随访时间由术后起计,至 2010 年 4 月截止。

二、HER2 检测

1. FISH 检测 HER2 基因扩增:将石蜡包埋组织块制成组织芯片,切取 4 μm 厚白片数张,二甲苯脱蜡 10 min×3 次,梯度乙醇水化。按 SPoT-Light Tissue Pretreatment Kit(Invitrogen™ by Life Technologies)操作说明将切片置入预处理液中煮沸 18 min,酶消化液温浴 16 min。滴加 HER2/CEP17 双色 FISH 探针(PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, Abbott Laboratories.), FISH 杂交仪(ThermoBrite System, Abbott Laboratories.) 75 ℃变性 4 min, 37 ℃杂交过夜。73 ℃ 1×SSC/0.3% NP-40 洗涤 3 min, 2×SSC/0.3% NP-40 洗涤 2 min, 室温 2×SSC 洗涤 2 min×2 次,脱水,以含 DAPI 的防荧光淬灭封片剂(VECTA-SHIELD Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories)衬染细胞核、封片。于 Olympus BX61 荧光显微镜下观察, CytoVision® platform(Genetix Ltd.) 拍摄典型图像, 计算 HER2 荧光信号与 CEP17 荧光信号的比值。

2. IHC 检测 HER2 蛋白表达: 使用 HercepTest™ Kits(DAKO)。石蜡包埋组织块 4 μm 厚切片, 37 ℃干燥过夜, 56 ℃烘烤 30 min, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化。99 ℃抗原修复液修复 40 min, 室温冷却 20 min, 过氧化物酶阻断剂作用 5 min。每张切片滴加一抗 100 μl, 室温孵育 30 min, TBST 洗涤 5 min×2 次, 室温与二抗反应 30 min, TBST 洗涤 5 min×2 次, DAB 染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯清洗, DPX 封片。于 Leica DM2500 显微镜下观察, Adobe Photoshop CS3 软件获取图像。

3. 结果判断: 采用 Hofmann 等^[2]报道的共识小组推荐胃癌 HER2 评分系统。FISH: 每例至少观察 50 个肿瘤细胞, HER2:CEP17 ≥ 2 为 FISH 阳性。IHC: 观察整张切片, 0, 无染色或 < 10% 的肿瘤细胞膜染色; 1+, > 10% 的肿瘤细胞膜染色较浅或仅有部分细胞膜染色; 2+, > 10% 的肿瘤细胞膜或外膜低至中度染色; 3+, > 10% 的肿瘤细胞膜或外膜中至高度染色。0 和 1+ 为阴性, 2+ 为可疑阳性, 3+ 为阳性。IHC 3+ 和(或)FISH 阳性判定为 HER2 阳性。

三、统计学分析

应用 SAS 8.0 统计软件, 不同临床病理特征胃癌亚组间 HER2 阳性率的比较采用 χ^2 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, 生存曲线的比较采用 log rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、HER2 检测结果

FISH 检测显示,177 例胃癌组织中 27 例 HER2 基因扩增阳性,150 例阴性,阳性率为 15.3% (见图 1)。IHC 检测显示,177 例胃癌组织中 65 例表现出不同程度的 HER2 染色,其中 IHC3+ 16 例, IHC2+ 22 例, IHC1+ 27 例, IHC0 112 例, 阳性率为 9.0%(见图 2)。FISH 与 IHC 检测结果的关系见表 1, 两者一致率为 89.3%(158/177)。根据评分标准,共 31 例胃癌组织 HER2 阳性,阳性率为 17.5%。相应正常胃组织 HER2 基因扩增和蛋白表达均为阴性。

表 1 177 例胃癌组织 FISH 和 IHC 检测结果 (n)

FISH	IHC				合计
	3+	2+	1+	0	
阳性	12	9	6	0	27
阴性	4	13	21	112	150
合计	16	22	27	112	177

二、HER2 与胃癌临床病理特征的关系

肠型胃癌的 HER2 阳性率明显高于弥漫型/混合型胃癌,分化较好的胃癌 HER2 阳性率明显高于分化较差的胃癌,组间差异均有统计学意义;不同性别、年龄、肿瘤部位和 TNM 分期胃癌亚组间 HER2 阳性率差异无统计学意义(见表 2)。

三、HER2 与胃癌预后的关系

177 例胃癌患者中 154 例获随访,23 例失访,随访率为 87.0%,获随访者中位生存期为 18.5 个

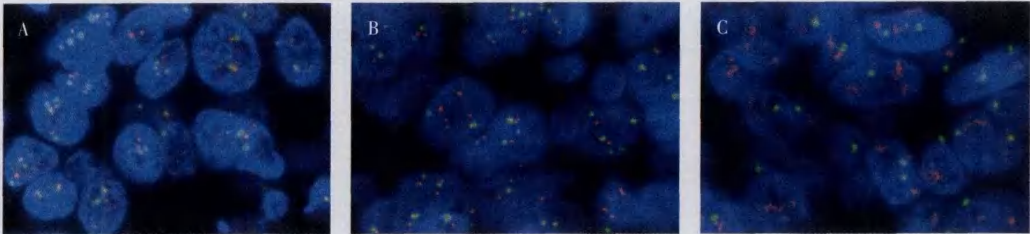
表 2 HER2 与胃癌临床病理特征的关系 n(%)

临床病理特征	例数	HER2		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
性别				3.0693	0.0798
男性	119	25 (21.0)	94 (79.0)		
女性	58	6 (10.3)	52 (89.7)		
年龄				3.7013	0.0544
≤60 岁	79	9 (11.4)	70 (88.6)		
>60 岁	98	22 (22.4)	76 (77.6)		
肿瘤部位 *				0.0519	0.9744
贲门癌	28	5 (17.9)	23 (82.1)		
胃体癌	37	7 (18.9)	30 (81.1)		
胃窦癌	110	19 (17.3)	91 (82.7)		
Lauren 分型				6.4849	0.0109
肠型	57	16 (28.1)	41 (71.9)		
弥漫型/混合型	120	15 (12.5)	105 (87.5)		
分化程度				16.2627	<0.0001
分化较好	46	17 (37.0)	29 (63.0)		
分化较差	131	14 (10.7)	117 (89.3)		
TNM 分期				1.3560	0.7159
I 期	12	2 (16.7)	10 (83.3)		
II 期	43	7 (16.3)	36 (83.7)		
III 期	88	18 (20.5)	70 (79.5)		
IV 期	34	4 (11.8)	30 (88.2)		

*2 例残胃癌未纳入统计分析

月(0~33 个月),102 例存活,52 例死亡。死亡者中 1 例死于围手术期感染,2 例死于其他疾病,其余均死于胃癌复发晚期多脏器功能衰竭。

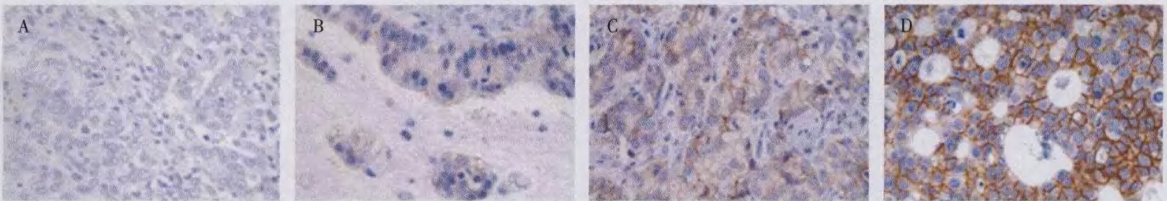
154 例获随访者中,HER2 阳性 25 例(16.2%),中位生存期 17 个月,1 年生存率 77.1%,2 年生存率 50.9%;HER2 阴性 129 例(83.8%),中位生存期 19 个月,1 年生存率 80.3%,2 年生存率 65.2%。HER2 阳性与阴性组间总体生存率差异无统计学意义($\chi^2=0.9602$, $P=0.3271$)。



红色为 HER2 信号,绿色为 CEP17 信号(对照),蓝色为细胞核衬染

A:HER2 正常表达;B:HER2 阳性表达,HER2:CEP17>2;C:HER2 阳性表达,HER2 信号成簇分布,HER2:CEP17 远大于 2

图 1 胃癌组织 HER2 基因扩增 FISH 检测(×600)



A:IHC0;B:IHC1+;C:IHC2+;D:IHC3+

图 2 胃癌组织 HER2 蛋白表达 IHC 检测(×200)

在分化较好的胃癌患者中,HER2 阳性者中位生存期 17 个月,1 年生存率 83.1%,2 年生存率 46.2%;HER2 阴性者中位生存期 27.5 个月,1 年生存率 95.8%,2 年生存率 86.3%。HER2 阳性与阴性组间生存率差异有统计学意义(见图 3),表明在分化较好的胃癌中,HER2 阳性者预后差于 HER2 阴性者。其他根据不同临床病理特征分组的各胃癌亚组中,HER2 阳性与阴性组间生存率差异均无统计学意义(见表 3)。

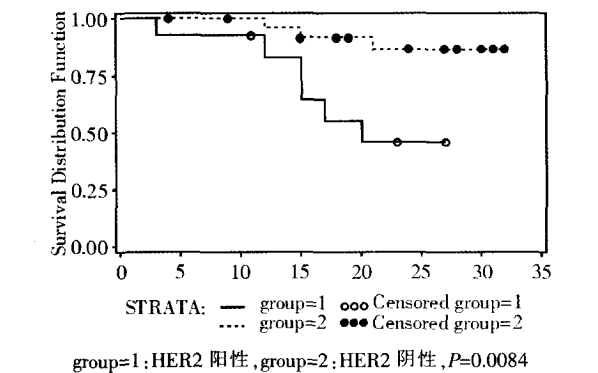


图 3 分化较好的胃癌中 HER2 阳性者与阴性者 Kaplan-Meier 生存曲线比较

讨 论

自 1986 年首次报道胃癌中存在 HER2 基因扩增和蛋白过表达以来^[34],已有大量研究证实了这一发现,然而各研究间检测结果差异较大,FISH 检测

HER2 基因扩增的阳性率为 16.0%~27.1%,IHC 检测 HER2 蛋白过表达的阳性率为 8.2%~53.4%,其原因可能为研究人群的差异,但最主要的原因是未使用标准化的检测方法和统一的结果判断标准^[9]。本研究在检测胃癌 HER2 时,标本的采集、固定以及实验过程中的每一个步骤均遵循美国临床肿瘤学会/美国病理学家协会(ASCO/CAP)乳腺癌 HER2 检测指南的要求^[9],使用经美国 FDA 认证的检测试剂盒,结果判断采用目前胃癌研究中最受认可的 Hofmann 等^[2]报道的共识小组推荐胃癌 HER2 评分系统,保证了检测结果的可靠性,可为临床适用曲妥珠单抗治疗的胃癌患者的筛选提供依据。

既往胃癌研究中 HER2 的检测多参照同期乳腺癌 HER2 检测标准。随着研究的不断深入,2008 年 Hofmann 等^[2]发现由于胃癌组织腺腔形成较乳腺癌多见,癌细胞腔面因保留分泌功能而不能像基底面和侧面一样被染色,因而更常出现 U 型细胞膜不完全染色。因此,在乳腺癌 HER2 评分系统基础上修正的胃癌 HER2 评分系统将 IHC2+ 和 IHC3+ 由原先需完整细胞膜染色改为外膜染色即可。此外,鉴于胃癌与乳腺癌在细胞膜染色和肿瘤异质性方面的差异,新评分系统推荐同时使用 FISH 和 IHC 检测 HER2。采用此新评分系统,本研究 177 例胃癌组织中 15.3% HER2 基因扩增阳性,9.0% HER2 蛋白表达阳性,总体阳性率为 17.5%,与使用相同检测试剂盒和评分系统的 Marx 等^[17]的研

表 3 不同临床病理特征胃癌亚组中 HER2 与预后的关系

临床病理特征	HER2 阳性			HER2 阴性			χ^2 值	P 值
	中位生存期 (月)	1 年生存率 (%)	2 年生存率 (%)	中位生存期 (月)	1 年生存率 (%)	2 年生存率 (%)		
性别								
男性	20	74.1	50.6	21	83.9	71.0	2.2120	0.1369
女性	10	100.0	50.0	16.5	73.7	53.8	0.0119	0.9131
年龄								
≤60 岁	23	100.0	66.7	20	81.7	65.0	0.1637	0.6858
>60 岁	13.5	67.5	45.0	18	79.1	65.7	2.0947	0.1478
肿瘤部位								
贲门癌	23	80.0	60.0	16.5	71.4	55.1	0.0001	0.9916
胃体癌	12	53.3	53.3	13	64.2	43.4	0.0000	0.9968
胃窦癌	17	83.1	46.2	21	87.1	75.3	2.3773	0.1231
Lauren 分型								
肠型	16	83.6	46.4	27	88.6	75.6	2.7843	0.0952
弥漫型/混合型	21	68.2	54.6	17	76.6	60.4	0.0358	0.8499
分化程度								
分化较好	17	83.1	46.2	27.5	95.8	86.3	6.9386	0.0084
分化较差	16.5	68.8	55.0	17	76.2	59.4	0.0021	0.9635
TNM 分期								
I-II 期	23	72.9	72.9	23.5	95.1	88.0	1.5334	0.2156
III-IV 期	15	80.2	38.5	16	72.3	52.9	0.2759	0.5994

究结果(基因扩增阳性率 16%,蛋白表达阳性率 13%)基本相符。表明使用经美国 FDA 认证的检测试剂盒和共识小组推荐的胃癌 HER2 评分系统,HER2 检测结果较为稳定。

HER2 与胃癌发生部位的关系目前尚不清楚。Yu 等^[8]的研究发现贲门癌 HER2 蛋白过表达率显著高于其他部位的胃癌,而 Marx 等^[7]的研究和本研究均显示 HER2 与肿瘤部位无关。其原因可能为胃食管连接部腺癌与贲门腺癌在组织学上难以区分,有些研究因纳入了 HER2 阳性率较高的胃食管连接部腺癌而使统计分析结果受到影响^[7,9]。

本研究显示肠型胃癌的 HER2 阳性率显著高于弥漫型/混合型胃癌,分化较好的胃癌 HER2 阳性率显著高于分化较差的胃癌,与其他一些研究结果相符^[7-12],提示肠型胃癌和分化较好的胃癌是曲妥珠单抗治疗的主要候选人群。

一些研究发现 HER2 是胃癌的重要预后因素,但并非所有研究均显示 HER2 过表达与预后不良相关^[11]。本研究未发现 HER2 与胃癌总体预后相关,但在分化较好的胃癌中,HER2 阳性者的生存率显著低于 HER2 阴性者。其原因可能为 HER2 对胃癌预后的影响较微弱,且胃癌本身预后较差,使 HER2 对预后的影响无法表现或表现得不够稳定,导致不同研究得出相互矛盾的结果;而在预后相对较好的胃癌亚组中,HER2 更易表现出对预后的不良影响。既往研究亦发现在预后相对较好的肠型胃癌^[12]、胃窦癌^[13]中,HER2 阳性者预后差于 HER2 阴性者。本研究未能在上述分组中发现 HER2 与预后有关,可能与本研究样本量偏小、随访时间较短有关。

综上所述,准确检测 HER2 对胃癌患者具有重要临床意义,肠型胃癌和分化较好的胃癌 HER2 阳性率较高,是曲妥珠单抗分子靶向治疗的主要候选人群。HER2 尚不能作为独立指标判断胃癌预后,其与胃癌预后的关系有待进一步研究。

参考文献

- 1 Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, et al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). 2009 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). J Clin Oncol, 2009, 27 (18S): LBA4509.

- 2 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 (7): 797-805.
- 3 Fukushima S, Matsubara K, Yoshida M, et al. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. Mol Cell Biol, 1986, 6 (3): 955-958.
- 4 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 (5): 1047-1052.
- 5 Jørgensen JT. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. Oncology, 2010, 78 (1): 26-33.
- 6 Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al; 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. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131 (1): 18-43.
- 7 Marx AH, Tharun L, Muth J, et al. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. Hum Pathol, 2009, 40 (6): 769-777.
- 8 Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135 (10): 1331-1339.
- 9 Bang Y, Chung H, Sawaki A, et al. HER2-positivity rates in advanced gastric cancer (GC): Results from a large international phase III trial. 2008 ASCO Annual Meeting. J Clin Oncol, 2008, 26 (20S): abstr 4526.
- 10 Zhang XL, Yang YS, Xu DP, et al. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. World J Surg, 2009, 33 (10): 2112-2118.
- 11 Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, et al. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. Cell Oncol, 2010, 32 (1-2): 57-65.
- 12 Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II alpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. Ann Oncol, 2005, 16 (2): 273-278.
- 13 Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, et al. c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. Int J Surg Pathol, 2002, 10 (4): 247-256.

(2011-04-10 收稿)