

· 论著 ·

微滴式数字PCR与IHC联合FISH对乳腺癌新辅助化疗前后HER-2检测的分析

王金海*

南阳市第二人民医院病理科 (河南 南阳 473000)

【摘要】目的 分析乳腺癌患者在新辅助化疗前后, 采用微滴式数字PCR、IHC联合FISH检测人表皮生长因子受体2(epithelial growth factor receptor-2, HER-2)变化的价值。**方法** 筛选96例乳腺癌患者均自2020年1月~2022年1月入院实施新辅助化疗, 在化疗前后采用微滴式数字PCR(设为观察组)、IHC联合FISH法(设为对照组)检测HER-2变化, 分析两种方案检测结果、与金标准符合率。**结果** 化疗前, 观察组检测显示阳性为46(47.92%)例, 阴性为50(52.08%)例; 对照组检测显示阳性为42(43.75%)例, 阴性为54(56.25%)例, 两组检测结果显示对比无明显差异($P>0.05$), 符合率为96.88%、98.96%; 化疗后, 观察组检测显示阳性为44(45.83%)例, 阴性为52(54.17%)例; 对照组检测显示阳性为40(41.67%)例, 阴性为56(58.33%)例, 两组检测结果显示对比无明显差异($P>0.05$), 符合率为98.96%、98.96%。**结论** 将微滴式数字PCR与IHC联合FISH法应用在乳腺癌新辅助化疗前后HER-2检测过程中, 两种方案与金标准符合率较高, 可有效弥补常规检测不足之处, 并为临床疾病的诊断提供丰富参考, 值得借鉴。

【关键词】 微滴式数字PCR; IHC; FISH; 乳腺癌; 新辅助化疗; HER-2

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.03.016

Analysis of PCR and IHC Combined with FISH in the Detection of HER-2 before and After Chemotherapy in Breast Cancer

WANG Jin-hai*

Department of Pathology, Nanyang Second People's Hospital, Nanyang 473000, Henan Province, China

Abstract: Objective: The value of microdroplet digital PCR, IHC (epithelial growth factor receptor-2 and HER-2) in breast cancer patients before and after neoadjuvant chemotherapy was analyzed. Methods: Ninety-six breast cancer patients were screened from January 2020 to January 2022 and were admitted to the hospital for neoadjuvant chemotherapy. Before and after chemotherapy, droplet digital PCR (set as the observation group), IHC combined with FISH (set as the control group) were used.) to detect the changes of HER-2, and analyze the detection results of the two schemes and the coincidence rate with the gold standard. Results: Before the chemotherapy, The observation group showed positive 46 (47.92%), Negative value was 50 (52.08%) cases; The control group showed positive for 42 (43.75%) cases, The negative score was 54 (56.25%) of the cases, The test results of the two groups showed no significant difference ($P>0.05$), The coincidence rate was 96.88% and 98.96%; After the chemotherapy, The observation group tested positive for 44 (45.83%) cases, Negative value was 52 (54.17%) cases; The control group showed a positive test of 40 (41.67%) cases, The negative score was 56 (58.33%) of the cases, The test results of the two groups showed no significant difference ($P>0.05$), The compliance rate was 98.96% and 98.96%. Conclusion: The application of droplet digital PCR and IHC combined with FISH in the detection of HER-2 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer, the two protocols have a high compliance rate with the gold standard, which can effectively make up for the insufficiency of conventional detection, and provide a good basis for the detection of HER-2. The diagnosis of clinical diseases provides a wealth of references and is worth learning from.

Keywords: Droplet Digital PCR; IHC; FISH; Breast Cancer; Neoadjuvant Chemotherapy; HER-2

乳腺癌为女性高发的生殖系统恶性肿瘤之一, 近年受多种因素影响该病发生率持续增加, 目前已位居女性恶性肿瘤发病率第一位, 对患者生活质量、身心健康状态均有明显影响^[1]。研究发现^[2], 乳腺的发病、转归、预后等与生物标志物密切相关, 雌激素受体、孕激素受体广泛存在与乳腺上皮细胞内, 研究发现上述受体在加速乳腺细胞增殖及分化中有一定促进作用, 其中人表皮生长因子受体2(epithelial growth factor receptor-2, HER-2)阳性的病灶侵袭性较强, 且极易在早期发生转移, 因此临床多将HER-2变化作为判定患者预后效果的重要指标^[3]。因乳腺癌患者早期无典型临床症状, 随着病情加重入院就诊时已错失最佳治疗方案, 加之大部分患者不愿意失去第一性征, 因此新辅助化疗成为控制乳腺癌病情的主要方案, 其通过合理治疗不仅可降低临床分期, 促使不可能手术患者病情缓解从而实施手术, 亦可改善整体预后效果, 但患者在新辅助化疗前后存在HER-2表达不一致等情况, 因此临床建议及早对机体内HER-2变化进行评估, 从而选择合理的化疗方案。本文遴选96例乳腺癌患者(2020年1月~2022年1月)实施研究, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择的96例乳腺癌患者均自2020年1月~2022年1月入院, 年龄40~75岁(均值 56.14 ± 6.82 岁), 50例绝经者、46例未绝经者, 按管理分型: 40例II B型、31例III A型、14例III B型、11例III C型。

纳入标准: 结合影像学检查、病理检查确诊为乳腺癌^[4]; 均实施新辅助化疗; 无药物治疗禁忌症者; 化疗前均经临床检查排除远处转移者^[5]; 纳入研究96例患者均选择同一化疗方案。排除标准: 临床检查资料、治疗资料不全者; 治疗后肿瘤呈现进展者^[6]; 合并其他系统或组织恶性病变者; 无法耐受本次化疗方案及药物者; 自愿退出本次研究者; 肿瘤发生远处转移者^[7]。

1.2 方法 纳入研究96例患者均选择CAF方案化疗, CTX 500 mg/m²+ THP 40 mg/m²+ 5-Fu 500 mg/m², 持续治疗3周为1个周期, 持续化疗4个周期^[8]。

96例患者在新辅助化疗前后实施微滴式数字PCR、IHC联合FISH检测HER-2变化, 在乳腺标本离体后, 即刻采用中性福尔马林(浓度为10%)固定6-24小时, 并按照病理科相关要求、操作流程进行脱水、石蜡包埋, 结束后连续切4μm厚的切片4-10张。

【第一作者】 王金海, 男, 病理主管技师, 主要研究方向: 病理常规技术/FISH荧光原位杂交/PCR。E-mail: qiufengwang1010@163.com

【通讯作者】 王金海

选择全自动免疫组化仪(赛诺特CNT-330)对化疗前后HER-2的变化进行检测,其中针对HER-2为2+的不明确标本根据试剂盒相关说明书进行FISH检测。

根据试剂盒说明书进行操作,首先提取样本DNA,将含有样本的20ul DNA反应液放置在微滴发生器样品孔中,同时添加微滴生成油70ul,使其呈现油包水液滴,随后取40ul转入96孔板中用铝箔热封膜密封,并放置在热封膜仪(Bio-Rad C1000)上进行40个常规的PCR扩增反应循环,并进行荧光检测与数据分析。

1.3 观察指标 分析不同方案阳性、阴性检出率,与手术病理结果符合率。结果判定标准:(1)IHC根据染色结果判定,其中“0”为肿瘤细胞不着色,“1+”表示有>10%的癌细胞细胞膜出现微弱的染色情况,“2+”表示有>10%的癌细胞细胞膜出现中等强度的染色情况,“3+”表示有>10%的癌细胞细胞膜出现完整的染色情况,若结果显示为“0~1+”为阴性,“2+”为疑似病变,“3+”阳性^[9]。(2)FISH根据HER-2拷贝数/细胞判定,若HER-2拷贝数/细胞<4.0则显示为“阴性”,HER-2拷贝数/细胞≥6.0则为“阳性”^[10]。(3)微滴式数字PCR则根据CNV(HER-2拷贝数/细胞的比值)判定,若CNV≥3.2则为“阳性”,CNV<3.2为“阴性”^[11]。

1.4 统计学方法 SPSS 23.0软件分析数据,计量资料采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用百分比或率(n,%)表示, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

表1、表2、表3结果可见,以手术结果为金标准,化疗前,观察组检测显示阳性为46(47.92%)例,阴性为50(52.08%)例;对照组检测显示阳性为42(43.75%)例,阴性为54(56.25%)例,两组检测结果对比无明显差异($P > 0.05$),符合率为96.88%、98.96%;化疗后,观察组检测显示阳性为44(45.83%)例,阴性为52(54.17%)例;对照组检测显示阳性为40(41.67%)例,阴性为56(58.33%)例,两组检测结果对比无明显差异($P > 0.05$),符合率为98.96%、98.96%。

表1 微滴式数字PCR检测结果分析[n(%)]

组别	阳性	阴性	符合率
“金标准”	43(44.79)	53(55.21)	/
观察组(n=96) 辅助化疗前	46(47.92)*	50(52.08)*	96.88%
辅助化疗后	44(45.83)*	52(54.17)*	98.96%

表2 IHC联合FISH检测结果分析[n(%)]

组别	阳性	阴性	符合率
“金标准”	43(44.79)	53(55.21)	/
对照组(n=96) 辅助化疗前	42(43.75)*	54(56.25)*	98.96%
辅助化疗后	40(41.67)*	56(58.33)*	98.96%

表3 不同方案检测结果对比[n(%)]

组别	阳性	阴性
辅助化疗前		
观察组	46(47.92)	50(52.08)
对照组	42(43.75)	54(56.25)
χ^2	0.335	
P	0.562	
辅助化疗后		
观察组	44(45.83)	52(54.17)
对照组	40(41.67)	56(58.33)
χ^2	0.338	
P	0.561	

注:以“*”表示与金标准相比无统计学差异。

3 讨论

乳腺癌的出现,不仅可严重威胁当代女性健康,同时可对其生命安全造成影响,统计显示,全球发生乳腺癌的女性在120万左右,因乳腺癌死亡的女性在50万左右,可见该病死亡率在40%左右。近年随着临床对乳腺癌研究的深入,加之分子生物技术、相关学科的发展,HER-2逐渐成为研究乳腺癌治疗、预后效果的热点问题^[12]。HER-2具有酪氨酸激酶活性,其通过同源二聚或异源二聚的方式发生偶联,促使受体胞内部分的酪氨酸激酶激活,并导致下游的蛋白发生磷酸化,从而发挥调控细胞增殖、血管生成的作用,与此同时HER-2可增加肿瘤细胞的侵袭能力并对机体的组织抗侵袭屏障进行破坏^[13]。

研究发现^[14],临床约20%-30%的乳腺癌患者,在疾病进展过程中HER-2出现过度表达情况(即在机体内含量呈现异常状态),从而影响化疗、内分泌治疗效果,导致整体治疗效果不理想继而影响其生存周期,鉴于此临床需在实施新辅助化疗前对乳腺癌患者HER-2进行检测,旨在明确机体对新辅助化疗敏感性。

FISH因具有敏感度、特异性高的特点,且具有极高的可重复性,因此在乳腺癌患者HER-2检测过程中占据重要地位,但实际应用过程中FISH具有成本高、操作复杂、无法分辨最基础的组织形态结构、无法长期保存等缺陷,因此在HER-2检测过程中应用受限。

IHC具有抗体成本低、操作简单、标本可长期保留等特点,同时在检测过程中仅使用普通光学显微镜观察便可明确形态学结构特征变化,因此获得临床研究者青睐,此外IHC在检测过程中以应用免疫学为操作原理,通过化学反应,根据标记抗体的显色情况来明确,待检测组织内的抗原存在情况,同时对待检组织进行定位、定性、定量分析,通过检测可直接明确蛋白表达水平,且该方案对病理切片组织的分析非常有效,但实际应用过程中IHC因操作问题、选择的抗体不同、抗原修复方式也存在明显差异,导致检测准确性、特异性相较于FISH降低,同时在检测过程中样本经过处理、固定、染色后,待检组织细胞表面的抗原水平也会受到一定程度影响,从而出现假阳性情况,因此本文将两种方案联合进行检测,既可弥补IHC假阳性、假阴性等问题,同时避免FISH操作成本高增加患者经济压力及负担。此外在检测过程中需注意,IHC虽然理论、试验均不复杂,但在实际操作过程中染色质量会受多种因素影响,例如没有使用中性缓冲福尔马林对组织进行固定、固定时间不足或超长等均会影响结果准确性,因此医务人员各项操作的展开均需严格按照试剂盒说明书进行,尽可能确保检测结果准确性。

微滴式数字PCR是一种检测核酸分子的绝对定量技术,通过检测可获得机体内目标基因的拷贝数,从而为判定HER-2提供参考,在检测过程中将含有核酸分子的反应体系处理为钠升级的微滴,确保每个微滴含或不待检的靶分子,将扩增处理后以终点信号有或无作为判定标准,为医师明确HER-2扩增情况提供参考,为明确该方案具体应用价值,本文遴选96例实施新辅助化疗的乳腺癌患者作为研究对象,结果显示化疗前,观察组检测显示阳性为46(47.92%)例,阴性为50(52.08%)例;对照组检测显示阳性为42(43.75%)例,阴性为54(56.25%)例,两组检测结果对比无明显差异($P > 0.05$),符合率为96.88%、98.96%;化疗后,观察组检测显示阳性为44(45.83%)例,阴性为52(54.17%)例;对照组检测显示阳性为40(41.67%)例,阴性为56(58.33%)例,两组检测结果对比无明显差异($P > 0.05$),符合率为98.96%、98.96%,由此证实微滴式数字PCR在HER-2检测过程中可获得与IHC联合FISH极高的相似性,同时二者符合率较高,因此可将其应用在HER-2检测中。

有学者在对乳腺良性疾病的研究中发现^[15],HER-2增殖的良性乳腺疾病患者发生恶变的几率明显增加,其中HER-2增殖病例中乳腺癌发生率为未增殖患者的7倍,且经检验发现大部分乳腺良性疾病中HER-2无过度表达情况,但在良性向恶性转化过程中HER-2呈现过度表达情况,因此可证实HER-2参与乳腺癌的发生,且在疾病进展过程中占据重要作用。HER-2在机体内的过度

表达与DNA非整倍体、高表达、激素受体阴性等因素密切相关，而上述因素为乳腺癌进展的关键，同时有研究证实HER-2与乳腺癌的复发、转移、预后密切相关，因此临床可根据HER-2变化对乳腺恶性肿瘤患者病情进行评估，从而判定其预后效果，以便根据患者实际病情调整治疗方案。随着临床对HER-2的深入研究，发现HER-2扩增对治疗具有一定指导意义，可根据HER-2变化合理选择化疗药物，大部分研究认为HER-2扩张患者对他莫昔芬的耐受性不佳，且若机体内HER-2呈现扩增情况提示对内分泌治疗效果不敏感，此时需加强全身化疗，达到控制乳腺癌病情的目的，可见在新辅助化疗前后通过检测乳腺组织中HER-2状态可对患者预后效果进行评估，同时可为治疗方案的选择提供指导，其中FISH因稳定性、准确性、敏感性高等广泛应用在HER-2检测过程中，与IHC联合可有效弥补检测过程中不足之处，从而为临床提供丰富参考，但本研究结果显示微滴式数字PCR在HER-2检测过程中，可获得与IHC联合FISH接近的价值，既可避免进行二次检测，同时可节约医疗资源。

综上所述，微滴式数字PCR与IHC联合FISH，均可应用在乳腺癌患者新辅助化疗前后HER-2检测过程中，且两种方案与手术结果符合率较高，因此可作为诊断、评估乳腺癌患者预后效果的方案，可参考。但本研究设计方案相对简单、研究选择时间段较窄，在研究中选择样本数量较少，因此获得的临床价值有限，后期在研究中可深入分析多项指标在评估乳腺癌患者预后效果中的价值，从而为临床疾病的治疗提供丰富参考。

参考文献

[1] 夏玉光. SMI技术联合ABVS、CDFI对乳腺癌早期的诊断价值[J]. 罕少疾病杂志, 2022, 29(6): 49-51.

[2] 刘颖, 董苑. US联合MRI对乳腺癌新辅助化疗后腋窝淋巴结状态的评估[J]. 罕少疾病杂志, 2021, 28(5): 45-47.
 [3] 李彬彬, 王新桐, 王新立. 乳腺癌新辅助化疗前后相关生物因子的变化及MP分级相关预测因子分析[J]. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报, 2021, 42(12): 899-902.
 [4] 杨丽, 何建信, 张春霞, 等. HER-2阳性浸润性乳腺癌新辅助化疗后肿瘤退缩模式及影响因素[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(2): 226-229.
 [5] 党少华, 徐敏, 胡金月, 等. HER-2阳性乳腺癌患者新辅助化疗联合曲妥珠单抗治疗的影响因素及预后分析[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(15): 2620-2624.
 [6] 张启航. 三阴性乳腺癌中HER-2蛋白表达强度对新辅助化疗疗效及预后的影响[D]. 郑州大学, 2021.
 [7] 余花艳, 史中州, 仓顺东. TCH方案新辅助化疗在HER-2阳性早期乳腺癌治疗中的效果及对患者脂质运载蛋白-2表达的影响[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(3): 483-485, 493.
 [8] 彭燕, 郑细闰, 刘红英, 等. 微滴式数字PCR与IHC联合FISH对乳腺癌新辅助化疗前后HER-2检测的分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(1): 81-83.
 [9] 肖志, 罗沙阳, 毛杰, 等. 剂量密集型蒽环序贯紫杉醇脂质体与蒽环序贯多西紫杉醇在局部晚期HER-2阴性乳腺癌新辅助化疗中的疗效及安全性比较[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(12): 1487-1493.
 [10] 何洋, 赵伟鹏, 佟仲生. 新辅助化疗对乳腺癌ER PR HER-2及Ki-67表达影响的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2020, 47(22): 1185-1188.
 [11] 李荣军, 崔艳芬. 新辅助化疗对乳腺癌手术患者ER、PR、HER-2及Ki67的影响[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(17): 3186-3189.
 [12] 张晓宇, 张辉, 杨云云, 等. 曲妥珠单抗联合紫杉醇、卡铂新辅助化疗治疗HER-2阳性乳腺癌的效果观察及对心功能、近期预后的影响[J]. 临床误诊误治, 2019, 32(10): 51-56.
 [13] 王西礼. 新辅助化疗对乳腺癌组织中HER-2、Ki-67表达的影响及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(08): 1345-1347.
 [14] 刘燕, 刘淑真, 马昊, 等. Her-2及Topo-II α 与乳腺癌患者临床病理参数的关系及其在新辅助化疗效果评估中的意义[J]. 中国医药导报, 2018, 15(23): 17-21.
 [15] 吴晓霞, 李振军. 不同新辅助化疗方案对乳腺癌患者雌激素受体(ER)、Her-2表达及生活质量的影响[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(2): 201-203.

(收稿日期: 2022-07-14)
(校对编辑: 朱丹丹)



(上接第 21 页)

参考文献

[1] 胡航, 赵涌琪. 强制性运动疗法在脑卒中偏瘫康复治疗中的应用效果[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(19): 111-113.
 [2] 孙法强. 强制性运动疗法应用于脑卒中偏瘫康复治疗的效果分析[J]. 临床研究, 2019, 27(9): 124-125.
 [3] 练俏俏. 强制性运动疗法结合电刺激对偏瘫患者上肢功能的作用[J]. 中国现代医药杂志, 2021, 23(5): 72-74.
 [4] 陈董东, 汤国敏, 温速女, 等. 功能性电刺激联合改良强制性运动疗法对脑卒中偏瘫患者下肢功能恢复的影响[J]. 包头医学院学报, 2020, 36(5): 22-23, 36.
 [5] 张秀芳, 周敬杰, 张玉明, 等. 基于虚拟反馈技术的改良强制性运动疗法在脑卒中恢复期患者上肢功能恢复中的临床应用[J]. 中国康复, 2021, 36(4): 195-199.
 [6] 苏小霞, 杨晓毅, 黄天海, 等. 强制性运动疗法辅助rTMS对脑卒中后偏瘫患者上肢运动功能恢复的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2021, 31(11): 48-49.
 [7] 曾华武. 神经肌肉电刺激治疗仪联合早期康复训练对脑卒中偏瘫效果分析[J]. 中外医学研究, 2021, 19(33): 158-161.
 [8] 姜静静, 高炳, 赵淑娟, 等. 强制性运动疗法在脑卒中偏瘫康复治疗中的效果以及对生活自理能力、运动功能、NOSIE评分的影响分析[J]. 黑龙江医学, 2022, 46(13): 1605-1607.
 [9] 丁彦青. 强制性运动疗法在急性脑卒中后偏瘫患者中的应用[J]. 当代护士(中旬刊), 2020, 27(4): 88-91.
 [10] 张锦. 神经肌肉电刺激联合核心稳定性训练对脑卒中偏瘫患者平衡能力与步行能力的影响[J]. 反射疗法与康复医学, 2022, 3(8): 63-65.

[11] 盛碧婵, 吕晓丹, 黄建亮. 神经肌肉电刺激联合强制性运动疗法对脑卒中偏瘫的康复效果[J]. 现代实用医学, 2021, 33(7): 917-919.
 [12] 刘艳华. 强制性运动疗法在脑卒中偏瘫康复治疗中的应用价值[J]. 当代医学, 2020, 26(8): 144-146.
 [13] Wei Y Y, Koh C L, Hsu M J, et al. Effects of Transcranial Direct Current Stimulation Combined With Neuromuscular Electrical Stimulation on Upper Extremity Motor Function in Patients With Stroke[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2022, 101(2): 145-151.
 [14] Alisar D C, Ozen S, Sozay S. Effects of Bihemispheric Transcranial Direct Current Stimulation on Upper Extremity Function in Stroke Patients: A randomized Double-Blind Sham-Controlled Study[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020, 29(1): 104454.
 [15] 沈惠, 王光旭, 王兴. 改良强制性运动疗法对脑卒中偏瘫患者上肢运动功能影响的meta分析[J]. 中国康复医学杂志, 2019, 34(10): 1216-1223.
 [16] 张淑娟, 郑雅丹, 李鑫, 等. 智能运动反馈训练在脑卒中恢复期偏瘫患者手及上肢功能康复中的应用[J]. 中国康复医学杂志, 2019, 34(10): 1183-1187.

(收稿日期: 2022-09-14)
(校对编辑: 谢诗婷)