

# 乳腺癌 HER2 免疫组化检测步骤

上海市长征医院病理科 何金

编者按：标准化操作是精准医疗的需要，也是病理科得以发展的必由之路，建立各种程序化 SOP 文件是其中的关键步骤。上海长征医院在这些方面成绩卓著，尤其是应用我公司的 HER2 (EP3) 免单抗试剂，不仅顺利地通过了 PQCC 考核，而且在日常的工作中也取得了满意的结果。在此分享何金老师 SOP 文件中关于 HER2 染色的标准实验步骤，供大家参考。

## 1. 切片

将切片机的切片厚度调为 4 μm，常规核对染色标签、免疫组化申请单及蜡块号，按要求捞贴组织切片，保证切片完整、平整、无气泡、无皱褶、无空洞。切片 55°C 烤片过夜或 60°C 烤片 2h。

## 2. 染色

2.1 将组织切片浸于二甲苯中室温脱蜡 2 次，每次 20min，随后浸入 100% 乙醇中 3 次，每次 3min，将玻片依次室温置于 85% 乙醇和 70% 乙醇中各 2 分钟复水。

### 2.2 抗原修复 (pH9.0 EDTA)

取 20ml pH9.0 EDTA 抗原修复液放入量筒中，加蒸馏水至 1000ml 中，配制成 50 倍稀释的 pH9.0 的抗原修复工作液，然后倒入不锈钢锅中，把锅放置于电磁炉上，用大功率加热至沸腾。然后将功率调至中度，将切片置于耐高压塑料染色架上，放入沸腾的修复液中，继续加热 20 分钟。加热结束后迅速将锅移入水槽内冷却降温，冷却至室温后取出切片，流水冲洗干净。除去切片上的水分，在离组织 3mm 处用免疫组化油笔划线（注意不要太贴近组织），有利于集中试剂，防止干片提高染色效果。

2.3 PBS 冲洗 2 × 3min，去除多余水分后滴加 3% 过氧化氢 2 滴 (100ul)，室温孵育 10min，PBS 冲洗 2 × 3min。

2.4 去除多余水分后滴加即用型兔抗人单克隆抗体 HER2 (EP3) 2 滴 (100ul)，室温孵育 60min，PBS 冲洗 2 × 3min。

2.5 去除多余水分后滴加即用型 EnVision™ FLEX/HRP (SM802) 2 滴 (100ul)，室温孵育 20min，PBS 冲洗 2 × 3min。

2.6 配制 DAB 显色液，取 EnVision™ FLEX SUBSTRATE BUFFER (SM803) 1ml，加 EnVision™ FLEX DAB+ (DM827) 1 滴，混匀后滴加在切片上显色 8min。

2.7 蒸馏水洗终止显色，苏木素复染 1 分钟，流水冲洗；1% 盐酸酒精分化 2 秒钟，流水冲洗，温水返蓝。

2.8 梯度酒精脱水、二甲苯透明，中性树脂封片。

## 3. 质量控制

3.1 阳、阴性对照：用已知的乳腺癌 HER2 检测结果 1+、2+ 及 3+ 各一例，阴性对照为正常乳腺组织，用直径 3mm 组织芯片取样笔分别在 4 块组织上取样，然后制备成包含 4 个位点的组织芯片。每张切片必须同时捞贴 HER2 检测结果 0、1+、2+ 及 3+ 的组织芯片作为对照；

3.2 切片要求：切片厚 4 μm，55°C 烤片过夜或 60°C 烤 2h，烤箱内同时放一支温度计监测温度；

3.3 检测过程严格时间控制，观察染色过程中有无出现异常情况；

3.4 经过测试的实验条件，未经科室许可，不得随便更改实验条件；

3.5 异常情况的处理：出现下列情况，必须重新检测：

3.5.1 阳性对照组织脱片或无染色；

3.5.2 浸润癌的成份有皱褶或脱片；

3.5.3 阴性对照组织出现中等强度的染色；

3.6 定期（每年 2-3 次）参加室间质量评价活动。

## FDA 获批靶向药物及靶点

药物名称	分子靶点	预测突变率	肿瘤类型
Crizotinib	ALK 重排	4%	非小细胞肺癌
	ROS1 转位	5%	
Dabrafenib	BRAF V600E 或 V600K 突变	7%	黑色素瘤
Trametinib			
Trametinib	BRAF 融合 / 非 V600E / V600K 突变	2.8%	黑色素瘤
Afatinib	EGFR 活化突变	1-4%	非小细胞肺癌（一线治疗药物）
	HER2 活化突变	2-5%	非小细胞肺癌
Ado-trastuzumab emtansine	HER2 扩增	5%	HER2+ 转移性乳腺癌（经过 Trastuzumab 治疗或辅助治疗后复发）
Sunitinib	c-Kit 突变	4%	胃肠道间质瘤、胰腺癌、肾细胞癌



内部资料

## 常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识

《常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识》专家组

编者按：发表在《中华病理学杂志》2015年7月的《常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识》，明确了初筛 ALK 的适宜范围，组织标本的处理，ALK 常规 IHC 检测，判断标准等重要内容。由于篇幅有限，将免疫组化相关部分摘要刊登，供病理工作者参考。

### 一、初筛 ALK 阳性 NSCLC 的适宜范围

所有晚期 NSCLC 腺癌或者含腺癌成分的肺癌，应在组织病理诊断的同时进行常规 ALK 检测；对于所有 NSCLC 的小活检标本建议进行 ALK 初筛。对于不能开展 Ventana IHC 诊断检测 ALK 的实验室，建议采用常规 IHC 进行 ALK 的初筛。

### 二、组织标本的前期处理

1. 标本类型：包括手术切除标本、活检组织标本和细胞蜡块标本。建议活检标本尽量多取，以获得足够的癌组织，保证足够组织病理诊断和分子分型。

2. 标本固定：离体后应尽快固定（30 min 内），手术切除大标本肿物应每隔 5 ~ 10 mm 切开固定。采用新鲜配制的 4% 中性缓冲甲醛固定液；固定液量与所浸泡组织的比例应足够；标本的固定时间为 6 ~ 48 h 为宜。常规组织脱水和包埋。

3. 制片：（1）切片厚度以 3 ~ 5 μm 为宜；（2）切片应尽快进行 ALK 检测，未染色的切片置于室温不宜超过 6 周，以防抗原丢失。

### 三、ALK 常规 IHC 检测

1. 常规 IHC 方法：检测方法根据实验室条件可以选择手工染色或使用免疫组织化学机染色。

2. 建议可采用的人工染色方法：（1）抗原修复：目前手工 IHC 常用的抗原修复方法主要有高温高压修复和微波修复方法两种，使用的修复液以弱酸性和碱性修复液为主。专家组对国内外研究文献和国内常用修复方法进行讨 论，建议使用煮沸热修复方法，具体可以采用如下方法之一对抗原进行修复：① 0.01 mol/L

柠檬酸缓冲液（pH6.0），修复 10 min；② EDTA 缓冲液（pH8.0）修复 5 min；③ EDTA 缓冲液（pH9.0）修复 3 min，修复维持时间和冷却方式各实验室可根据各自成熟的方法酌情使用。（2）过氧化物酶灭活：建议使用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶。（3）抗体：共有三种抗体被报道过用于 ALK IHC，它们分别是 ALK1（Dako 公司），D5F3（Cell Signaling 公司）和 5A4（Abcam 公司）。研究结果显示，在 NSCLC 中 D5F3 抗体和 5A4 抗体检测 ALK 融合蛋白的敏感性和特异性较高，ALK1 抗体的敏感性较低。结合研究报道和专家组成员的使用经验，建议使用 D5F3 抗体（Cat#3633）和 5A4 抗体（Cat#abl17127）用于 ALK 的初筛，建议使用的抗体稀释度为：D5F3 抗体，1:（100 ~ 250）稀释；5A4 抗体，1:（50 ~ 100）稀释（具体的抗体稀释度，可以根据各批次抗体的预实验结果确定）。抗体孵育常温 1h，或者 4℃ 过夜。抗体孵育后使用 pH7.4 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min 以确保充分洗涤，始终保持切片潮湿。小样本实验显示新抗体 1A4（OriGene, Cat# TA 801287）的检测特异性敏感性均高于其他抗体，但目前该抗体的研究文献还很少。（4）二抗和后续染色过程：建议根据各实验室常规使用的二抗的稀释比率 and 孵育时间进行操作。使用非生物素化试剂盒和高质量的二氨基联苯胺（DAB）显色液染色。

省略

5. 结果判读和评分：（1）观察程序：先在低倍镜下观察整张切片，判断染色是否满意。然后在较高倍数下观察着色

### 导读

- 常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识
- 非小细胞肺癌靶点检测工具—高特异性、高亲和性 ROS1 抗体
- 错配修复基因表达缺陷能够预测进展期肿瘤患者对 PD-1 抑制剂的疗效
- 结直肠癌微卫星不稳定性（MSI）检测及其临床意义
- 乳腺癌 HER2 免疫组化检测步骤
- FDA 获批靶向药物及靶点

部位。观察胞质着色癌细胞的比例和着色强度。研究表明，在大多数 ALK 阳性病例中，阳性信号都是均匀分布，在整个肿瘤中有着一致的强度。在少数病例中，信号在染色强度上存在较大的异质性。（2）结果判读标准：综合国内外的研究结果和专家组的经验，考虑到本共识主要用于 ALK 的初筛，专家组建议采用已有文献研究结果、且在国内多家机构使用、检测结果确诊比较高的判读标准，具体如下：IHC 3+：>5% 的肿瘤细胞呈现细胞质强着色；IHC 2+：>5% 的肿瘤细胞呈现中度细胞质着色；IHC 1+：>5% 的肿瘤细胞呈现微弱或模糊的细胞质着色或 ≤ 5% 的肿瘤细胞有任何程度的着色；IHC 0：肿瘤细胞无明显着色。（3）注意事项：IHC 判读和评分时需要注意，在正常黏膜上皮、肺泡巨噬细胞、肿瘤坏死组织、分泌黏液、淋巴细胞和神经组织中也会观察到一些强的背景染色，这种染色在 ALK 判读时应当排除。

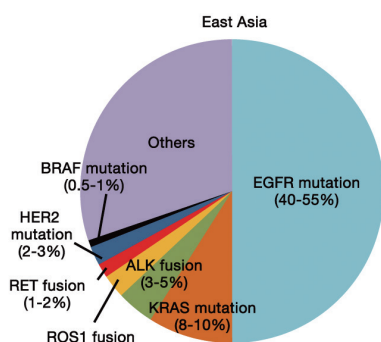
通信作者：周晓军，210002 南京军区南京总医院病理科

E-mail: zhouxj3456@163.com

## 非小细胞肺癌靶点检测工具—高特异性、高亲和力 ROS1 抗体

无锡傲锐东源生物科技有限公司研发部 陈才伟

肺癌是世界范围内发病率及死亡率均居于首位的恶性肿瘤，其中非小细胞肺癌（NSCLC）约占 85% 左右。癌基因活化是 NSCLC 发生发展的关键步骤，特别是肺腺癌，这些活化基因被称作癌驱动基因。代表性的驱动基因包括 EGFR、KRAS、BRAF、HER2 和 ALK，前四种通过错义 / 插入 / 缺失等突变被活化，而 ALK 则通过与其它基因融合而被活化。人们推测阻断这些活化基因的产物可以抑制相应癌驱动基因所造成的肺腺癌细胞的生长。的确，酪氨酸激酶抑制剂 TKIs 已经成为 EGFR 突变和 ALK 融合分子亚型的晚期肺腺癌的标准治疗方案。2012 年，另外两种原癌基因 ROS1 和 RET 也被列入癌驱动基因，发生 ROS1 融合基因的患者多为年龄偏小、不吸烟、病理类型为腺癌的肺癌，在 NSCLC 突变基因中占 2.4%。它的发现使其成为 NSCLC 患者有效的治疗靶点，其抑制剂克唑替尼（Crizotinib）抗肿瘤临床活性的证实，进一步推动了晚期 NSCLC 个体化治疗的发展。



### ROS1 基因的结构及融合方式

ROS1 是最先在 UR2 鸟肉瘤病毒中发现的具有独特致癌作用的病毒原癌基因，人类 ROS1 基因编码的是胰岛素受体家族的一种跨膜酪氨酸激酶，定位于第 6 号染色体 q21 区，分子量为 259kDa。ROS1 基因含有 44 个外显子，编码 2347aa，由胞内酪氨酸激酶活性区（C 末端 464 aa）、跨膜区（1862-1882 aa）及胞外区（N 端 1-1861aa，含多个糖基化位点）三部分组成。

ROS1 基因重排位点主要在 32-36 外显子，发生重排时保留胞内酪氨酸激酶区和跨膜区，丢失 N 末端糖基化胞外

区。迄今为止，共发现 9 种不同的 ROS1 融合基因型，不同的 ROS1 融合基因变体具有不同的恶性转化和致瘤能力。

### ROS1 融合基因抑制剂的临床应用前景

有研究表明 ROS1 基因和 ALK 基因在酪氨酸激酶酶区域的同源性可达 49%，而在激酶催化区的 ATP 结合位点更有着高达 77% 的同源性，这可能是 ALK 抑制剂克唑替尼在治疗 ROS1 基因融合变异的 NSCLC 中取得明显疗效的共同基础。研究表明，用于治疗局部晚期或转移性非小细胞肺癌的克唑替尼通过抑制 ROS1 酪氨酸激酶区域的活性，阻断其下游异常信号传导，从而抑制肿瘤细胞的生长，临床效果显著。

lafrate 等人在 2014 年 11 月的《新英格兰医学杂志》上发表了有关克唑替尼在 ROS1 重排的 NSCLC 病人中有效性和安全性的 I 期临床试验结果。入组的 50 例 ROS1 重排（经 FISH、二代测序及 RT-PCR 验证）的进展期 NSCLC 患者总体客观缓解率为 72%，其中 3 例完全缓解，33 例部分缓解。中位缓解持续时间为 17.6 个月。中位无疾病进展生存时间为 19.2 个月，其中 25 例（50%）目前仍然接受着随访。克唑替尼在 ROS1 阳性病人中的治疗效果优于 ALK 重排病人，但其安全性与 ALK 基因重排的 NSCLC 是相似的。另有其它大量的 I 期和 II 期临床实验都表明克唑替尼对于 ROS1 重排的进展期 NSCLC 有着显著的抗肿瘤作用。ROS1 重排为克唑替尼提供了第二个有效治疗的患者亚群。

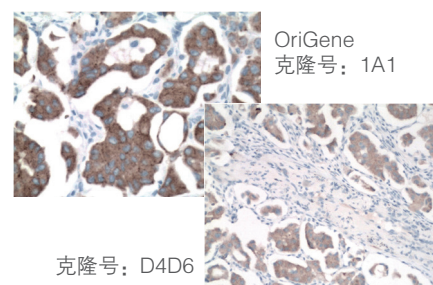
因此，在治疗前检测 ROS1 基因突变状态不仅是指导靶向药物克唑替尼的关键，而且对提高非小细胞肺癌患者的生存率、延长生存期、避免无效化疗、节约医疗成本、提高患者生存质量都有重要意义。

### ROS1 融合基因检测方式

目前针对 ROS1 融合基因检测常用方法主要有 RT-PCR、FISH、IHC 以及第二代全基因组测序技术。免疫组织化学染色在临床病理实验室的应用极为普遍，具有低成本、简便快速且不失准确性，对包括 ALK、ROS1 基因重排的患者亚

群筛选是一个理想的工具，但其检测的准确性依赖于融合蛋白的表达量及相应抗体的特异性和敏感性。

OriGene 公司新研发的 ROS1 鼠单抗 1A1（中杉编号：ZM-0362）以原核表达 ROS1 的 C 端胞内酪氨酸激酶活性区（2126-2347aa）蛋白免疫小鼠，利用 ROS1 基因重排 NSCLC 细胞系 HCC78 和 ROS1 阴性细胞系 HeLa，建立 ICC 的细胞学筛选方法，从 132 株 ROS1 阳性杂交瘤中获得一株高亲和力的特异性 ROS1 鼠单抗 1A1。这株抗体能通过蛋白印记 WB、细胞组化 ICC 以及免疫组化 IHC 等方法检测到非小细胞肺癌细胞系 HCC78 中 SCL32A2-ROS1 融合蛋白的表达，通过接种裸鼠获得 HCC78 和 HeLa 的 Xenograft，利用这两种细胞的 Xenograft 制备 FFPE 肿瘤蜡块，进行 IHC 条件优化。利用该抗体通过 IHC 从 92 例肺癌临床样本中检测到 2 例 ROS1 高表达的肺癌组织；而在另外 78 份正常组织（包含 26 种正常组织样本各 3 例）中无非特异性识别。与目前市售的 D4D6 兔单抗相比，在背景和染色强度等方面取得了良好的结果，如图：



### 【参考文献】

- [1]. Sher T, et al. Mayo Clin Proc, 2008, 83(3): 355-367.
- [2]. Zhu Q, et al. Transl Lung Cancer Res 2015; 4(3): 300-309.
- [3]. Takashi Kohno, et al. Transl Lung Cancer Res 2015; 4(2): 156-164.
- [4]. Justin F. et al. The Oncologist. 2013; 18: 865-875.
- [5]. Shaw AT, et al. N Engl J Med 2014; 371: 1963-71.

Ros 1（目录编号：ZM-0362）  
OriGene 公司自主研发生产  
欢迎选购！



## 错配修复基因表达缺陷能够预测进展期肿瘤患者对 PD-1 抑制剂的疗效

南京大学医学院附属鼓楼医院病理科李琳整理，樊祥山审校

PD-1 和 PD-L1 是目前肿瘤免疫治疗中的热点。PD-1 与 PD-L1 结合导致 T 细胞对于肿瘤细胞的免疫效应减弱。基于这一原理，通过单克隆抗体拮抗 PD-1 与 PD-L1 之间的结合，唤醒免疫细胞，通过患者自身的免疫系统攻克癌细胞。目前已证明这种治疗对诸多晚期肿瘤有效。针对如何筛选 PD-1 抑制剂的适用人群，近日 NEJM 杂志上的一篇题为“PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency”的 II 期临床试验指出 DNA 错配修复 (MMR) 基因的缺失或可帮助准确预测病人对 PD-1 抑制剂的反应。该项研究来自约翰·霍普金斯基墨尔癌症中心 (Johns Hopkins Kimmel Cancer Center)，研究结果一经刊出，引起强烈反响。

该研究评估了 PD-1 抑制剂 Pembrolizumab 对 41 名晚期肿瘤患者的临床作用效果，其中包括 MMR- 缺失结肠癌 (CRCs) (N=11)、MMR- 正常 CRCs (N=21) 和非 CRCs 的 MMR- 缺失晚期肿瘤 (N=9)。入组患者均接

受抗 PD-1 单抗 Pembrolizumab (10mg/kg, Q2W) 治疗。3 组共同的主要终点是免疫相关的客观缓解率 (irORR) 和 20 周时免疫相关的无进展生存期 (irPFS)。结果显示 MMR- 缺失 CRCs 的 20 周时的 irORR 和 irPFS 分别是 40% 和 78%，非 CRCs 的 MMR- 缺失组分别为 71% 和 67%。MMR- 正常 CRC 组，20 周时的 irORR 和 irPFS 分别为 0% 和 11%。根据 RECIST 标准和疾病控制率 (CR+PR+SD) 三组分别为：MMR- 缺失 CRCs 组：40% 和 90%，MMR- 正常 CRCs 组：0% 和 11%，非 CRCs 的 MMR- 缺失组 71% 和 71%。该研究提示存在 MMR 缺失的进展期肿瘤患者或从 PD-1 抑制剂的治疗中获益。

该团队还进行了全基因组测序，结果显示 MMR- 缺失组中每个肿瘤约平均 1782 个体细胞突变，MMR- 正常的肿瘤有 73 个突变 (P=0.0015)。肿瘤中 MMR 缺失带来基因突变的积累，可以增加免疫系统识别并摧毁肿瘤的几率。

MMR 缺失发生于 15%–20% 的偶发

性 (非遗传) CRCs 和几乎所有与 Lynch 综合征相关的 CRCs，也存在于其他肿瘤类型包括胃癌、小肠癌、子宫内膜癌、前列腺癌和卵巢癌等。目前的检测主要 PCR 和 IHC 方法。IHC 检测通常包括 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2。在 MMR 蛋白异源二聚体配对中，PMS2 与 MLH1 形成异源二聚体，MSH6 与 MSH2 形成异源二聚体。在内部阳性对照 (淋巴细胞和间质细胞) 存在的情况下，当肿瘤细胞中的 MMR 蛋白表达缺乏时，归为表达缺失。需要强调的是，在整个肿瘤中，MMR 蛋白的免疫染色可以是异质性的，在特殊的病例，可以有片状、弱的免疫反应，特别是 MLH1 和 MSH6 可能会遇到这样的问题。任何不确定的染色结果都应该使用不同克隆号的抗体重复检测，甚至重做。

综上所述，DNA 错配修复基因缺失的患者对 PD-1 抑制剂产生了明显的反应，从而为进展期癌症的治疗带来光明前景。

## 结直肠癌微卫星不稳定性 (MSI) 检测及其临床意义

医学界肿瘤频道 雪山飞狐

约 80–85% 的结直肠癌 (CRC) 由染色体不稳定性 (CIN) 引起，包括家族性腺瘤性息肉病和散发性 CRC (APC、P53、DCC、KRAS 等基因突变)；而另外 15–20% 的 CRC 则主要是由微卫星不稳定性 (MSI) 引起，包括遗传性非息肉病性结直肠癌 (又称 Lynch 综合征) 和散发性 MSI (+) CRC (错配修复基因 MLH1 基因启动子甲基化)。

### 一、MSI 和错配修复基因

MSI 是指与正常组织相比，在肿瘤中某一微卫星由于重复单位的插入或缺失而造成的微卫星长度的任何改变，出现新的微卫星等位基因现象。错配修复 (Mismatch Repair, MMR) 是指在含有错配碱基的 DNA 分子中，使核苷酸序列恢复正常的修复方式。

CRC 患者常常发生 MMR 基因缺失，主要由基因突变或启动子甲基化引起，

其中 MSH2 和 MLH1 基因突变占有所有基因改变的 90% 以上。

### 二、MSI 的检测方法及判读标准

临床上主要利用免疫组织化学 (IHC) 染色或多聚酶链反应 (PCR) 方法检测 CRC 患者的 MSI 状态。IHC 主要是检测 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2，其结果判读标准见表 1。

### 三、MSI 检测的临床意义

(1) 判断预后：目前大量证据表明，错配修复基因缺失 / 高度微卫星不稳定性 II 期 CRC 患者预后良好的一个标志物。

(2) 指导治疗：一项回顾性研究结果显示，高度微卫星不稳定 (MSI-H) 患者并不能从 5-FU 的辅助化疗中获益。如果考虑氟尿嘧啶类单药治疗，推荐行 MMR 检测。

(3) 帮助筛选 Lynch 综合征  
Lynch 综合征，既往亦称 HNPCC，是一种常染色体显性遗传病，由于 MMR 基因发生胚系突变所致，约占所有 CRC 的 3–5%。

总之，MSI 检测对于 CRC 患者的预后判断和治疗指导具有重要意义。

### MMR 蛋白免疫组化结果判读标准

免疫组化结果	错配修复蛋白	微卫星不稳定性
MLH1 或 MSH2 蛋白缺失	基因缺失	高度不稳定
正常的蛋白表达	基因正常	低度不稳定 / 稳定

MLH1 (目录编号: ZM-0154)  
MSH2 (目录编号: ZA-0622)

MSH6 (目录编号: ZA-0541)  
PMS2 (目录编号: ZA-0542)

欢迎选购!