

FISH 技术检测乳腺浸润性癌 HER-2 基因状态的操作要点及结果分析

李桂凤

桂林市中医医院 广西 桂林 541000

【摘要】目的：归纳 FISH 技术检测乳腺浸润性癌 HER-2 基因状态的操作要点，分析其检测价值。方法：选取 2025 年 1 月—12 月我院病理科存档的 253 例乳腺浸润性癌石蜡包埋标本为研究对象，均完成 IHC 与 FISH 检测。记录 FISH 检测阳性率，对比 IHC 与 FISH 结果的一致性，总结操作异常问题与优化要点。结果：253 例标本均成功完成 FISH 检测，HER-2 基因扩增阳性 34 例，阳性率为 13.44%。IHC0/1+组、2+组、3+组与 FISH 结果的符合率分别为 96.20%、82.81%、80.43%，总体一致性 Kappa 值为 0.675，差异有统计学意义（ $P<0.001$ ），呈中等一致性。首次检测异常发生率为 11.07%，经针对性优化后均获得合格结果。结论：FISH 是评估 HER-2 基因扩增状态的金标准方法，规范操作流程、精准把控关键节点是保障检测质量的核心。

【关键词】：荧光原位杂交；乳腺浸润性癌；HER-2 基因；操作要点；结果判读

DOI:10.12417/2811-051X.26.12.026

引言

乳腺癌位居全球女性恶性肿瘤发病首位，近年来我国浸润性乳腺癌新发病例持续攀升，且患者年龄日趋年轻化，已然构成影响女性健康的重大公共卫生挑战^[1]。人表皮生长因子受体 2（Human epidermal growth factor receptor-2；HER-2）作为关键预后标志物及靶向干预靶标，在乳腺癌诊疗中地位突出^[2]。当前临床实践中，HER-2 状态判定主要依赖免疫组织化学法（Immunohistochemical method；IHC）和荧光原位杂交法（Fluorescence in situ hybridization；FISH）^[3]。基于此，本研究依托本院 253 例浸润性乳腺癌组织样本的 FISH 实操经验，系统归纳各阶段关键技术节点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2025 年 1 月—12 月我院病理科存档的 253 例乳腺浸润性癌石蜡包埋标本为研究对象。所有患者均为女性，年龄 28~78 岁，平均年龄（ 52.47 ± 9.83 ）岁；病理类型分布：扩增阳性 34 例：32 例非特殊型浸润性癌，1 例浸润性大汗腺癌，1 例浸润性微乳头状癌；扩增阴性 219 例：196 例非特殊性浸润性癌，9 例浸润性小叶癌，3 例粘液癌，1 例浸润性大汗腺癌，1 例浸润性微乳头状癌，10 例混合性癌。根据 IHC 初筛结果分组：IHC0/1+组 79 例，IHC2+组 128 例，IHC3+组 46 例。

纳入标准：①经组织病理学确诊为原发性乳腺浸润性癌^[4]；②石蜡标本保存完好，有足够的肿瘤组织用于检测；③临床病理资料完整；④标本固定规范，均为 10%中性福尔马林固定；⑤标本类型包含手术切除标本、微创及穿刺活检标本。

排除标准：①标本固定不规范、自溶严重或蜡块保存不当；②肿瘤组织过少，无法满足检测计数要求；③复发转移或术前接受过新辅助治疗的标本；④临床资料不全。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂

采用广州安必平医药科技股份有限公司的 HER-2/CEP17 FISH 探针试剂盒，配套原位杂交仪、尼康（Nikon）荧光显微镜、恒温水浴锅、梯度乙醇、二甲苯、胃蛋白酶工作液、2×SSC 洗涤液、0.1%NP-40/2×SSC 洗涤液、DAPI 复染剂等。所有试剂均在有效期内，严格按照说明书配制与使用。

1.2.2 操作流程与核心要点

切片与烤片：将石蜡标本连续切片，厚度控制在 3-5μm，贴于防脱载玻片上。将切片置于 65±5℃恒温箱中烘烤 12-16 小时，取出后自然冷却。

脱蜡与水化：将切片依次放入室温两缸二甲苯中浸泡 2 次，每次 10min；随后依次放入室温无水乙醇、90%乙醇、70%乙醇各 3min，最后放入室温纯化水中浸泡 3min，用无绒纸巾吸取多余水分。

预处理与蛋白酶消化：将玻片放入 100±5℃纯化水中煮片 25min，取出后室温晾干；随后滴加胃蛋白酶工作液，37℃恒温消化 3-15min，消化完成后放入室温 2×SSC 洗涤液中洗涤 3min。

脱水与变性杂交：将玻片依次放入室温 70%乙醇、90%乙醇、无水乙醇各 2min，取出玻片，室温晾干后滴加 10μLHER-2 探针，加盖盖玻片，轻压使杂交液均匀分布，避免产生气泡，橡皮胶泥封边，完全覆盖盖玻片和载玻片接触的部位。将玻片放入原位杂交仪中，湿润原位杂交仪适度条，插入湿条，盖上杂交仪上盖，设置“Denat&Hyb”程序，85℃变性 5min，随后 37℃恒温杂交 10-18h。

杂交后洗涤：洗涤前 30 分钟将 2×SSC,0.1%NP-40/2×SSC，放入 37±1℃的恒温水浴锅中，测量以确保温度合适。关闭杂交

仪电源，将玻片取出，轻轻撕去橡皮胶，移去盖玻片，放入 $37\pm1^{\circ}\text{C} \times \text{SSC}$ 中 10min，再放入 $37\pm1^{\circ}\text{C} 0.1\% \text{NP-40}/2 \times \text{SSC}$ 洗涤液中 5min，取出玻片，室温 70%乙醇中 3min，暗处自然干燥玻片。

复染与封片：室温，滴加 10ulDAPI 复染剂到盖玻片，载玻片目标区域朝下，轻放于盖玻片上，轻压，避免产生气泡。在暗处存放，后置于荧光显微镜下观察。

1.2.3 结果判读

在清晰的肿瘤区域，找到至少 2 个浸润癌区域，随机计数至少 20 个浸润癌细胞。当计数 HER2 基因状态出现如下情况时：a) HER2/CSP17 比值 <2.0 且平均 HER2 拷贝数/细胞 <4.0 时，为 HER2 基因无扩增；b) HER2/CSP17 比值 <2.0 且平均 HER2 拷贝数/细胞 <6.0 ，但 ≥ 4.0 时为 HER2FISH 结果不确定；c) HER2/CSP17 比值 <2.0 ，但平均 HER2 拷贝数/细胞 ≥ 6.0 时，为 HER2 基因扩增；d) HER2/CSP17 比值 ≥ 2.0 时，为 HER2 基因扩增；e) 若众多 HER2 信号连接成簇时可不计数，即为 HER2 基因扩增^[5]。

1.3 观察指标

- (1) 统计 FISH 检测的 HER-2 基因扩增阳性率。
- (2) 以 FISH 结果为金标准，对比 IHC 不同分级与 FISH 结果的符合率，分析两种方法的一致性。
- (3) 记录操作过程中出现的异常结果类型、发生原因，总结对应操作优化要点。

1.4 统计学分析

采用 SPSS22.0 统计学软件处理数据。计数资料以例数、百分比(%)表示，两种检测方法的一致性采用 Kappa 检验，Kappa 值 ≥ 0.75 为一致性较好，0.40~0.74 为一致性中等， <0.40 为一致性较差。P <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FISH 检测 HER-2 基因扩增结果

253 例乳腺浸润性癌标本均完成 FISH 检测，最终获得有效结果 253 例，检测成功率 100%。见表 1。

表 1 287 例乳腺浸润性癌 HER-2 基因 FISH 检测结果

检测结果	例数	占比(%)
扩增阳性	34	13.44
扩增阴性	219	86.56
合计	253	100.00

2.2 FISH 与 IHC 检测结果的一致性对比

经 Kappa 检验，两种方法总体一致性 Kappa 值为 0.675 (P <0.001)，呈中等一致性。见表 2。

表 2 FISH 与 IHC 检测结果对比 (例)

IHC 结果	例数	FISH 阳性	FISH 阴性	符合率(%)
0/1+	79	3	76	96.20
2+	128	22	106	82.81
3+	46	9	37	80.43
合计	253	34	219	86.56

2.3 FISH 操作常见问题与原因分析

所有异常标本经针对性优化操作流程后重新检测，均获得清晰合格的结果。见表 3。

表 3 FISH 检测常见异常问题分布与原因

异常类型	例数	占比(%)	主要原因
肿瘤细胞出现空洞、信号点丢失	23	9.09	消化过度
肿瘤细胞重叠	5	1.98	消化不足
结果合格	225	88.93	-
合计	253	100.00	-

3 讨论

本组首次检测异常发生率为 11.07% (28/253)，经针对性优化后都得到合格结果。这组数据能说明 FISH 检测的操作要求很高，近 90%标本可一次成功，仍有超过 1/10 的标本需要二次处理。异常类型的分布有明确的规律性，每种异常都指向特定的操作环节，想要建立标准化质控体系，可从这些特定环节入手调整。以下结合本组数据分析异常包括：

- (1) 肿瘤细胞出现空洞，信号点丢失 (9 例，占 3.56%)。这种情况是消化过度的典型表现。蛋白酶消化的本质，是利用胃蛋白酶水解细胞核周围的蛋白质，提升核膜通透性，方便探针进入^[6]。但消化时间过长或是酶浓度过高时，蛋白酶水解核膜蛋白之外，还会进一步破坏核内的染色质结构，导致 DNA 从核骨架脱离，杂交信号也跟着丢失，显微镜下能看到细胞核

内出现空洞,信号点稀疏甚至消失^[7]。这说明,消化时间不能设定为固定值,要根据标本的固定时间,组织硬度随时调整^[8]。

(2) 肿瘤细胞重叠(5例,占1.98%)。肿瘤细胞重叠,本质是消化不足导致细胞核没能充分分散,多个细胞核在显微镜下堆叠在一起,没法分辨单个细胞的信号归属和信号弱不一样,信号弱是看不到信号,细胞重叠是看到了信号,但分不清属于哪个细胞^[9]。

本组数据显示,按照常规流程操作依旧有11.07%的标本达不到要求,需要重新调整消化条件才能符合标准。这个比例在可接受范围内,但提醒实验室要把首次成功率当成长期优化的质控指标,积累本实验室的标本特征数据,比如固定时间分布,

还有标本类型构成,慢慢缩小消化条件的经验范围,把首次成功率提升到95%以上。以IHC2+组举例,这一组的符合率为82.81%,也就是说约有17%的IHC2+患者要经FISH检测才能最终确认阴性或阳性。FISH检测的质量控制是实验室内部的工作,也直接关系到患者治疗决策与临床安全。建议在检测报告里增加“质控备注”字段,标注本批次实验的信号质量等级,是否存在异常和对应的处理方式,给临床医师解读结果提供额外的质量参考信息。

综上所述,FISH方法被公认为评估乳腺浸润性癌HER-2基因扩增状态的权威检测手段,检测结果有很高的准确性与特异性,免疫组化结果模糊时,会用其来做最终确认,能帮医生确定靶向治疗方案,可推广应用。

参考文献:

- [1] 邓杰,杨育新,吕东津,等. CDK4/6i 治疗 HR+/HER2-乳腺癌致血液学毒性的发生率及影响因素分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2025, 25(12): 1522-1526+1531.
- [2] 姜建平, 罗香蓉, 颜学波, 等. HER-2 低表达乳腺癌临床病理学特征及预后研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2025, 30(12): 1172-1178.
- [3] 罗师萍, 宋传贵, 吡咯替尼联合曲妥珠单抗双靶向治疗 HER-2 阳性转移性乳腺癌患者的效果[J]. 天津药学, 2025, 37(12): 1434-1437+1458.
- [4] 黄超, 朱小朝, 管小青, 等. 曲妥珠单抗联合吡咯替尼对 HER2 阳性乳腺癌患者疗效及血清 UBE2C 水平的影响[J]. 肿瘤药学, 2025, 15(6): 780-786.
- [5] 李鸿恩, 陈江玲, 唐大为, 等. ER 与 HER2 状态联合 MRI 评估乳腺癌新辅助化疗病理完全缓解[J]. 影像诊断与介入放射学, 2025, 34(6): 404-412.
- [6] 方威, 王笛, 陈龙. 老年乳腺非特殊型浸润性癌 ER、PR、HER-2 和 Ki67 表达与临床病理意义[J]. 中国老年学杂志, 2025, 45(20): 4915-4918.
- [7] 彭志强, 温美如, 卓健, 等. 基于多模态 MRI 和小波变换的影像组学术前预测乳腺浸润性导管癌 HER2 基因表达[J]. 临床医药实践, 2025, 34(4): 280-284.
- [8] 巩海燕, 查海玲, 栗翠英, 等. 常规超声检查及超声造影在 HER-2 阴性与 HER-2 过表达型乳腺浸润性癌中的应用[J]. 医学影像学杂志, 2022, 32(10): 1731-1734.
- [9] 周朋, 栾中华, 吴忻晶, 等. FISH 法与 IHC 法检测乳腺导管浸润癌 HER2 表达的一致性分析[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2022, 19(1): 231-234.