



· 专家述评与论著 ·



杨文涛，复旦大学附属肿瘤医院病理科副主任，主任医师，博士研究生导师。现为中华医学会病理学分会乳腺学组组长，中国医促会病理学分会副主任委员，中国抗癌协会乳腺癌专业委员会常委，中国临床肿瘤学会肿瘤病理专家委员会常委，中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会委员，上海市抗癌协会乳腺癌专业委员会常委。现兼任《诊断病理学杂志》副主编，《中华病理学杂志》《临床与实验病理学杂志》编委。

免疫组织化学在乳腺癌分子分型中的作用及目前存在的问题

孙向洁，杨文涛

复旦大学附属肿瘤医院病理科，复旦大学上海医学院肿瘤学系，上海 200032

[摘要] 目前，被公认的乳腺癌分子分型主要包括4型：腔面A型、腔面B型、人类表皮生长因子受体2（human epidermal growth factor receptor 2, HER2）过表达型和基底样型。由于基因表达谱检测常规应用受到限制，在日常的病理学诊断中，免疫组织化学替代分型在全世界范围内被广泛认可和应用。对当前免疫组织化学在乳腺癌分子分型中的作用及存在的问题进行了讨论，旨在进一步规范及促进免疫组织化学的应用。

[关键词] 乳腺癌；分子分型；免疫组织化学

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.03.001

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)03-0161-05

Issues on immunohistochemistry for molecular classification of breast cancer SUN Xiangjie, YANG Wentao (Department of Pathology, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: YANG Wentao E-mail: yangwt2000@163.com

[Abstract] Currently, there are 4 intrinsic subtypes of breast cancer identified by gene expression profiling: luminal A, luminal B, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-enriched and basal-like subtypes. As the application of gene expression profiling in daily practice is not practical, using immunohistochemistry as a surrogate for intrinsic subtypes are used worldwide. This review aimed to standardize and promote the immunohistochemistry for molecular classification of breast cancer.

[Key words] Breast cancer; Molecular classification; Immunohistochemistry

作为危害女性健康最常见的恶性肿瘤，乳腺癌的发病率近年来呈不断上升趋势。统计显示，2018年美国女性乳腺癌新发病例超过26.6万，占女性所有恶性肿瘤的30%，远超第2位的肺癌

（13%）及第3位的结直肠癌（7%）^[1]。在2015年中国恶性肿瘤统计数据中，乳腺癌居女性新发恶性肿瘤的第1位（15%），并已成为45岁以下女性恶性肿瘤死亡原因的首位^[2]。乳腺癌是一

种在分子水平上具有高度异质性的肿瘤, 不同的病例即使在肿瘤分期与组织学形态上十分相似, 其生物学行为及对治疗的反应也可能大相径庭。因此, 分子分型对乳腺癌的治疗、预后及疗效预测均有重要意义。

1 乳腺癌分子分型

2000年Perou等^[3]根据基因表达谱, 将乳腺癌分成5种分子分型: 腔面A型、腔面B型、人类表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 过表达型、基底样型和正常乳腺样型, 并证明不同分子分型的乳腺癌预后差异有统计学意义。此后, 不断更新的文献报道使人们对乳腺癌分子分型的认识逐渐明朗。目前, 被公认的乳腺癌分子分型主要包括4型: 腔面A型、腔面B型、HER2过表达型和基底样型。

2 临床病理替代分型

对乳腺癌进行基因表达谱分析是鉴定乳腺癌分子分型最有效的工具, 但由于基因表达谱检测价格昂贵, 常规应用受到限制。在日常的病理诊断中, 免疫组织化学方法因其成本低、检测时间较短及易操作等特点, 在全世界范围内被广泛认可和應用。

St. Gallen乳腺癌国际共识会议(以下简称为St. Gallen共识)对乳腺癌临床病理替代分型进行了具体定义(表1)^[4], 强调了免疫组织化学方法并不是真正的分子分型, 只是一种替代分型。涉及乳腺癌临床病理替代分型的标志物主要包括雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、HER2、Ki-67、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、CK5/6及CK14等。

表1 乳腺癌临床病理替代分型

Tab. 1 Surrogate definitions of intrinsic subtypes of breast cancer

Subtypes	Notes
Luminal	ER and/or PR positive $\geq 1\%$
A spectrum of hormone receptor-positive and HER2-negative	
■ High receptor, low proliferation, low tumor burden (luminal A-like)	Multiparameter molecular marker 'favorable prognosis' if available. High ER/PR and clearly low Ki-67. Low or absent nodal involvement (N ₀₋₃), smaller T size (T _{1,2})
■ Intermediate	Multiparameter molecular marker 'intermediate' if available. Uncertainty persists about degree of risk and responsiveness to endocrine and cytotoxic therapies
■ Low receptor, high proliferation, high tumor burden (luminal B-like)	Multiparameter molecular marker 'unfavorable prognosis' if available. Lower ER/PR with clearly high Ki-67. More extensive nodal involvement, histological grade 3, extensive lymphovascular invasion, larger T size (T ₃)
Luminal B-like (HER2-positive)	Hormone receptor-positive and HER2-positive
HER2-positive (non-luminal)	Hormone receptor-negative and HER2-positive
Triple negative	Negative ER, PR and HER2

3 临床病理替代分型中各指标的检测规范

3.1 ER/PR

乳腺癌中ER/PR的表达提示肿瘤细胞保留激素依赖性生长的特征, 对乳腺癌的预后判断和治疗方案决策, 尤其是内分泌治疗的选择具有指导意义。在全球范围内, 多达20%的ER/PR免疫组织化学检测并不准确。2010年, 美国临床肿瘤学会/美国病理学家协会(American Society of Clinical Oncology/College of American

Pathologists, ASCO/CAP)发布了ER/PR免疫组织化学检测指南, 明确地提出所有新诊断的乳腺癌患者均需要检测ER/PR的表达水平, 并强调了ER/PR检测的基本操作程序、质量控制和结果判读标准。ASCO/CAP指南将1%作为免疫组织化学ER/PR表达阳性的临界值, 并推荐在报告中注明阳性细胞所占的百分比和阳性染色的强度^[5]。由于ER/PR的表达在乳腺癌原发灶和转移灶中的不一致率较高, ASCO/CAP指南推荐对复发的乳

腺癌患者再次检测ER/PR。

在ASCO/CAP的ER/PR免疫组织化学检测指南发布后,也有些不同的意见提出。Deyarmin等^[6]研究显示,ER低表达(1%~9%)的乳腺癌在分子水平上更接近于ER阴性的病例。Yi等^[7]研究了9 639例乳腺癌,指出ER表达介于1%~9%的乳腺癌患者,其无复发生存期显著短于ER > 10%的患者,与ER阴性的乳腺癌更为相似,且难以从内分泌治疗中获益。在2015年St. Gallen共识中,专家组提出ER表达介于1%~9%的乳腺癌为激素受体不确定状态,是否使用内分泌治疗不能仅依赖于ER/PR的免疫组织化学分析结果,而需综合考虑^[4]。

在已有的文献报道中,ER阴性且PR阳性[以下简称为ER(-)/PR(+)]的乳腺癌较为少见,占总体的0%~4%,与ER(-)/PR(-)的乳腺癌相比,两者的总生存期差异无统计学意义^[8]。在乳腺癌中,ER(-)/PR(+)的结果可重复性差,至少94%的ER(-)/PR(+)乳腺癌在接受第2种检测方法后,其结果发生改变^[9]。因此,ASCO/CAP指南推荐,对ER(-)/PR(+)的乳腺癌需进行重复检测,以排除ER假阴性或PR假阳性的可能。

PR位于ER通路的下游,其表达显示了ER功能的完整性,可预测患者对内分泌治疗的疗效。与ER(+)/PR(+)的乳腺癌相比,ER(+)/PR(-)的乳腺癌患者生存期较短,且对内分泌治疗反应较差^[10]。2013年St. Gallen共识^[11]提出,鉴于化疗在腔面型乳腺癌之间的差异,区分腔面A型与腔面B型乳腺癌相当必要。Prat等^[12]报道,PR高表达(>20%)患者的无病生存期显著长于PR低表达(≤20%)的患者,建议将20%作为腔面A型与腔面B型的PR临界值。本中心的一项研究也显示,PR低表达(1%~19%)与PR(-)的腔面型乳腺癌在临床病理学特征上的差异无统计学意义,为PR > 20%作为腔面A型与腔面B型的临界值提供了新的研究证据^[13]。

3.2 HER2

15%~20%的原发性乳腺癌中存在HER2基因扩增或HER2蛋白过表达^[14]。HER2的表达状态

对判断乳腺癌患者预后、化疗效果预测、内分泌治疗及靶向治疗的选择均十分关键,因此,准确地检测和评估乳腺癌的HER2蛋白表达和基因扩增状态至关重要。

2018年,ASCO/CAP发布了乳腺癌HER2检测指南的更新版本,与2013版相比,免疫组织化学检测判读的主要改变为:将HER2(2+)的标准从“>10%的浸润癌细胞呈现不完整和(或)弱至中等强度的细胞膜染色”更改为“>10%的浸润癌细胞呈现弱-中等强度、完整的细胞膜染色”^[15]。对于免疫组织化学检测判读为HER2(2+)的病例,应使用原位杂交(*in situ hybridization*, ISH)法做进一步检测,也可选取不同的组织块重新检测或送往条件更好的中心实验室进行检测。

2013年版HER2检测指南在双探针ISH的判断标准中强调了平均HER2拷贝数/细胞的重要性。双探针ISH法中的第17号染色体着丝粒(CEP17)探针用以区分第17号染色体的非整倍体和单纯的HER2基因扩增,但研究显示整条第17号染色体的多体现象罕见,部分乳腺癌中CEP17与HER2基因共同扩增,CEP17多体并不能代表整条第17号染色体多体^[16]。因此,ISH检测结果除需要报告HER2/CEP17的比值外,还应分别报告HER2拷贝数和CEP17的数值。

在2018年版HER2检测指南中,双探针ISH法检测的判读标准进行了更新,对于HER2/CEP17比值及平均HER2拷贝数/细胞的不同情况均进行了详细说明。新指南中取消了“ISH不确定”这一判读结果,提出需结合患者免疫组织化学检测进行判断。中国乳腺癌HER2检测指南(2019版)即将发布,届时将结合更多循证医学证据,对日常工作中的HER2检测及结果判读进行有力的指导。无论对于何种检测结果,在出现免疫组织化学与ISH检测结果不一致的情况时,都建议进行多学科讨论分析原因并制定相应的治疗策略,必要时还需与患者进行充分沟通。

存在HER2异质性的乳腺癌比例为5%~40%,反映了乳腺癌肿瘤细胞的亚克隆生长特征^[17]。HER2异质性常会导致免疫组织化学与ISH、原发

灶与转移灶、穿刺标本与手术切除标本的检测结果不一致, 从而影响抗HER2靶向治疗的选择。因此, ASCO/CAP指南指出, 对相关病例需采取ISH检测的方法进行整体评估并在报告中详细说明。

3.3 Ki-67

单克隆抗体Ki-67所识别的抗原是一种定位于增殖细胞细胞核的非组蛋白核蛋白, 其功能与有丝分裂相关。在乳腺癌中, Ki-67增殖指数与肿瘤恶性程度、患者预后及治疗反应均有相关性。

Ki-67免疫组织化学检测在全球各实验室间的差异较大, 有关Ki-67与乳腺癌预后的Meta分析显示, 各项研究定义Ki-67免疫染色阳性率的临界值从3.5%到34.0%不等^[18]。2011年, 乳腺癌国际工作组发表Ki-67评估推荐指南, 指出由于缺乏标准化的方法学, 目前仍没有统一的Ki-67增殖指数评估的“金标准”, Ki-67评估结果的一致性和可重复性均较低^[19]。2013年St. Gallen共识^[11]提出, 标准化的Ki-67临界值尚未建立, 各实验室可以采用其特异的临界值, 但多数专家同意将Ki-67 \geq 20%视为高水平(在2011年这一标准为14%^[20])。在2015年St. Gallen共识^[4]中, 多数专家接受将20%~29%这一区间作为临界值来区分腔面B型乳腺癌, 但仍有20%的专家认为Ki-67不能用来区分腔面A型及腔面B型乳腺癌。

对于特殊类型的乳腺癌, Ki-67临界值的选择也有所不同。Carbognin等^[21]对1 097例浸润性乳腺癌进行研究指出, 使用4%作为Ki-67的临界值, 可以作为浸润性小叶癌患者预后的独立预测因素。

近年来, 自动化数字图像分析系统的发展使得对Ki-67增殖指数的评估有了更多选择。Zhong等^[22]的研究结果显示, Ki-67肉眼评估与数字图像分析的一致性整体较好, 但在临床较为重视的11%~30%区间一致性稍差, 与数字图像分析相比, 肉眼评估Ki-67增殖指数偏低。尽管数字图像分析可以避免观察者间的评估差异, 但在其还

未被广泛采用的情况下, 提高肉眼评估的准确性仍十分重要。

4 争议与挑战

在2015年St. Gallen共识^[4]中, 专家组认为激素受体阳性且HER2阴性的乳腺癌是一组谱系, 在腔面A型与腔面B型乳腺癌之间存在一个中间型, 其疾病风险、对内分泌治疗和化疗的反应尚难以评估, 2017年St. Gallen共识沿用了这一分型^[23]。

目前, 多基因分子检测技术层出不穷, 较为成熟的检测平台包括Oncotype DX、MammaPrint、21基因复发评分、70基因印迹、PAM50 ROR评分、EpClin评分及乳腺癌指数等。2015年St. Gallen共识专家组对于常用的多基因分子检测技术在1~5年内的预后价值均给予了肯定, 而在5年以上的预后预测方面, 只有PAM50 ROR评分获得了大多数专家的认可^[4]。由于多基因分子检测成本较高, 且在国内尚未广泛开展, 限制了多基因分子检测技术的大规模应用, 目前国内实验室已有自主开发的类似检测项目, 但仍需加强质控。St. Gallen共识专家推荐费用更低且已被广泛应用的免疫组织化学检测作为乳腺癌的临床病理替代分型。实验室应当建立严格的免疫组织化学验证方法, 保证免疫组织化学检测的准确性、特异性及可重复性, 并且考虑到潜在的不确定性对于其预后及预测作用的影响, 最大程度地提高免疫组织化学检测的可靠性。

综上所述, 作为乳腺癌分子分型的临床病理替代方法, 免疫组织化学在乳腺癌的治疗、预后及疗效预测方面均有十分重要的地位。尽管在检测及判读方面有不足之处, 但仍是一种适于广泛应用的检测方式。病理科医师需要不断了解相关领域的研究进展, 完善检测的各个环节, 才能发挥免疫组织化学在替代分子分型方面的作用, 为乳腺癌诊治提供准确、有效的信息。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

- [3] PEROU C M, SORLIE T, EISEN M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours [J] . Nature, 2000, 406(6797): 747–752.
- [4] COATES A S, WINER E P, GOLDHIRSCH A, et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 [J] . Ann Oncol, 2015, 26(8): 1533–1546.
- [5] HAMMOND M E, HAYES D F, DOWSETT M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer [J] . J Clin Oncol, 2010, 28(16): 2784–2795.
- [6] DEYARMIN B, KANE J L, VALENTE A L, et al. Effect of ASCO/CAP guidelines for determining ER status on molecular subtype [J] . Ann Surg Oncol, 2013, 20(1): 87–93.
- [7] YI M, HUO L, KOENIG K B, et al. Which threshold for ER positivity? A retrospective study based on 9 639 patients [J] . Ann Oncol, 2014, 25(5): 1004–1011.
- [8] RAKHA E A, EL-SAYED M E, GREEN A R, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype [J] . J Clin Oncol, 2007, 25(30): 4772–4778.
- [9] HEFTI M M, HU R, KNOBLAUCH N W, et al. Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype [J] . Breast Cancer Res, 2013, 15(4): R68.
- [10] THAKKAR J P, MEHTA D G. A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative [J] . Oncologist, 2011, 16(3): 276–285.
- [11] GOLDHIRSCH A, WINER E P, COATES A S, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 [J] . Ann Oncol, 2013, 24(9): 2206–2223.
- [12] PRAT A, CHEANG M C, MARTIN M, et al. Prognostic significance of progesterone receptor–positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer [J] . J Clin Oncol, 2013, 31(2): 203–209.
- [13] LI A Q, ZHOU S L, LI M, et al. Clinicopathologic characteristics of estrogen receptor–positive/progesterone receptor–negative/HER2–negative breast cancer according to a novel definition of negative progesterone receptor status: a large population–based study from China [J] . PLoS One, 2015, 10(5): e125067.
- [14] WOLFF A C, HAMMOND M E, HICKS D G, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update [J] . J Clin Oncol, 2013, 31(31): 3997–4013.
- [15] WOLFF A C, HAMMOND M, ALLISON K H, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update [J] . J Clin Oncol, 2018, 36(20): 2105–2122.
- [16] TSE C H, HWANG H C, GOLDSTEIN L C, et al. Determining true *HER2* gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy [J] . J Clin Oncol, 2011, 29(31): 4168–4174.
- [17] HANNA W M, RUSCHOFF J, BILOUS M, et al. HER2 *in situ* hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity [J] . Mod Pathol, 2014, 27(1): 4–18.
- [18] DE AZAMBUJA E, CARDOSO F, DE CASTRO G J, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients [J] . Br J Cancer, 2007, 96(10): 1504–1513.
- [19] DOWSETT M, NIELSEN T O, A’HERN R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group [J] . J Natl Cancer Inst, 2011, 103(22): 1656–1664.
- [20] GOLDHIRSCH A, WOOD W C, COATES A S, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 [J] . Ann Oncol, 2011, 22(8): 1736–1747.
- [21] CARBOGNIN L, SPERDUTI I, FABI A, et al. Prognostic impact of proliferation for resected early stage ‘pure’ invasive lobular breast cancer: cut-off analysis of Ki-67 according to histology and clinical validation [J] . Breast, 2017, 35: 21–26.
- [22] ZHONG F, BI R, YU B, et al. A comparison of visual assessment and automated digital image analysis of Ki-67 labeling index in breast cancer [J] . PLoS One, 2016, 11(2): e150505.
- [23] CURIGLIANO G, BURSTEIN H J, WINER E P, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017 [J] . Ann Oncol, 2018, 29(10): 2153.

(收稿日期: 2018-09-27 修回日期: 2019-01-07)