

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.08.010

免疫组织化学法检测三阴乳腺癌 Ki-67 抗原的改良方法研究*

张 琰, 吴云凤, 兰 希, 王 静, 周义文, 宋春丽[△]

(南方医科大学深圳医院临床检验医学中心, 广东深圳 518100)

摘要:目的 优化免疫组织化学法检测三阴乳腺癌(TNBC)组织中 Ki-67 抗原实验条件, 实现检测技术标准化。方法 20 例诊断为 TNBC 的组织标本, 使用标准免疫组织化学检测 Ki-67 抗原。针对不理想的结果对实验条件进行调整, 直至获得最佳结果。使用图像分析软件对阳性染色细胞计数分析。结果 通过对脱蜡、孵一抗、分化时间控制等因素的优化, 得到更为理想的免疫组织化学结果。阳性细胞数和总细胞数通过软件灰度值分析来获得。最终 20 例标本均为 Ki-67 阳性高表达。结论 改良的免疫组织化学染色法对 TNBC 组织中 Ki-67 抗原检测结果较传统法更加精准、结果更为可靠。

关键词:三阴乳腺癌; 免疫组织化学; Ki-67**中图分类号:**R446.19**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)08-1040-04**Study of improved immunohistochemistry in Ki-67 antigen detection in triple negative breast cancer***ZHANG Yan, WU Yunfeng, LAN Xi, WANG Jing, ZHOU Yiwen, SONG Chunli[△]

(Center for Clinical Laboratory Medicine, Affiliated Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518100, China)

Abstract: Objective To optimize the experimental conditions of Ki-67 antigen in triple-negative breast cancer tissues by immunohistochemistry. To achieve the standardization and improve the accuracy of testing technology. **Methods** Tissues from 20 triple-negative breast cancer patients have been detected Ki-67 antigen by immunohistochemistry. The experimental conditions of non-idea results were adjusted to obtain ideal results. Image analysis software was used to count and analyze the positive staining cells. **Results** More ideal results of immunohistochemistry results were obtained through optimization of dewaxing, first antibody incubation and differentiation time control. Numbers of positive cells and the total cells were calculated by gray value analysis. All the 20 samples were Ki-67 positive with high expression. **Conclusion** The improved immunohistochemistry method is more accurate and reliable than the traditional method in Ki-67 antigen detection in triple-negative breast cancer tissues.

Key words: triple-negative breast cancer; immunohistochemistry; Ki-67

乳腺癌(BC)是女性最常见的恶性肿瘤,其发病率在世界各地均呈上升趋势,并趋于年轻化。《临床医师癌症杂志》2015 年公布的全球癌症统计数据:2012 年全球女性 BC 新发病例数超过 167.7 万,占女性新发癌症的 25.2%,病死率约为 69.5%^[1-2]。三阴性乳腺癌(TNBC)作为 BC 的一种特殊亚型,具有局部复发早、全身转移快、整体预后差等特点,且由于缺乏雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及人表皮生长因子受体(HER)而对内分泌治疗及靶向治疗无效。因此,准确的早期诊断对 TNBC 的治疗和预后判断具有极其重要的意义^[3]。

Ki-67 是判断细胞增殖状态的核抗原,近年研究表明其与 BC 的预后密切相关,因而学者们一致建议将 Ki-67 作为 ER、PR、HER-2 以外的第 4 个用于 BC 分型、指导治疗及评估预后的生物标记^[4]。进一步对

照研究指出, TNBC 中 Ki-67 的表达显著高于非三阴乳腺癌(NTNBC), Ki-67 也被作为 TNBC 病理诊断的重要指标之一,用于指导治疗、判断预后^[5-6]。因此, Ki-67 免疫组织化学检测定性的准确性在临床诊疗指导中具有极为重要的意义^[7]。然而,与另外 3 种受体的标志物不同, BC 组织中 Ki-67 尚欠缺统一的免疫组织化学检测指南。鉴于其检测过程中干预因素较多、各种条件需要加以控制,本研究旨在探讨检测条件,排除影响因素,得到标准化的检测流程和理想的检测结果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2015 年 12 月至 2016 年 6 月术后病理结果 ER、PR、HER-2 均为阴性的 BC 标本 20 例, 癌灶直径 ≥ 2 cm。20 例标本患者年龄 32~65 岁, 中位年龄 53.6 岁; 组织学类型: 浸润性癌 12

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81702088)。

作者简介:张琰,女,硕士研究生,主要从事临床诊断研究工作。

[△] 通信作者, E-mail: songchunlix@163.com。

例,导管内癌 8 例;组织学分级:Ⅰ级 4 例,Ⅱ级 7 例,Ⅲ级 9 例;淋巴结转移 17 例,无转移 3 例。所有病例术前均接受放化疗。标本的使用均得到医院伦理委员会的批准。

1.2 仪器与试剂 Olympus BX53 带照相系统生物显微镜;恒温水浴箱;真空干燥机;电磁炉;不锈钢锅;粉剂型抗原修复液(柠檬酸法);磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4~7.6, 粉剂);即用型快捷免疫组织化学 Max-Vision™ 试剂盒(鼠/兔);DAB 显色试剂盒;苏木素体细胞染色液;Ki-67 抗体试剂(免疫组织化学法)。以上试剂购自福州迈新公司。二甲苯;乙醇(100%、85%、75%);3%过氧化氢;中性树脂。

1.3 方法

1.3.1 标准免疫组织化学法检测 TNBC 组织 (1)脱蜡和水化:二甲苯冲洗 2 次,每次 5 min,100%乙醇 5 min 2 次,95%乙醇 3 min 1 次,85%乙醇 3 min 1 次,80%乙醇 3 min 1 次,75%乙醇 3 min 1 次,用 PBS (pH 7.4)冲洗 3 次,每次 5 min。(2)抗原修复:按照试剂说明书,将抗原修复粉末加入水中,煮沸。将片子放到沸水中 15~20 min,自然冷却 20 min 以上, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。除去 PBS。(3)封闭、灭活内源性过氧化物酶:3% H₂O₂ (新鲜配制),37 °C 孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;除去 PBS。(4)滴加一抗(glypican-3)1 滴,37 °C 1.5 h 孵育, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,除去 PBS。(5)加 maxvision 试剂 1 滴,室温 15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,除去 PBS。(6)加上新鲜配制的 DAB 显色液,室温下显色 5~10 min,显微镜下掌握染色程度。(7)自来水冲洗 10 min。(8)苏木素复染 10 s,自来水冲洗 5 min。0.7%盐酸乙醇分化 5 s,流水冲洗返蓝 10 min;在显微镜下观看细胞着色情况,决定是否需要再次复染与分化。(9)梯度乙醇脱水,75%乙醇 5 min,80%乙醇 5 min,85%乙醇 5 min,95%乙醇 5 min,100%乙醇 5 min。二甲苯冲洗 2 次,每次 5 min。(10)还沾有少量二甲苯时,滴加中性树脂,盖上盖玻片,赶走气泡。

1.3.2 探索针对 TNBC 组织免疫组织化学染色的最佳条件 镜下观察,对欠理想的实验结果(脱片、染色弱、非特异性染色强),分析原因,逐步调整染色条件。(1)对于整体染色差、图像模糊,考虑为常规条件下脱蜡不彻底。对脱蜡步骤调整为第 1 道 10 min,第 2 道 5 min,第 3 道 3 min。(2)对于非特异染色强,经排除可能的影响因素,包括冲洗不充分、更换新鲜封闭液、延长封闭时间,最终确定为一抗孵育条件所引起。尝试在室温、干燥箱、恒温水浴锅 3 种环境下进行一抗孵育。(3)对于背景颜色深、抗原染色不明显,主要考虑为苏木素复染与乙醇分化冲洗时间掌握欠佳,采用镜下控制的办法,根据着色程度调整时间。

1.3.3 图像分析 使用图像分析软件 Olympus cellSens Dimension,打开标本的拍照图片,将图片分成红、绿、蓝 3 个通道。蓝色通道计算阳性细胞个数,设

置阈值为 135,点击“自动计算”后计算出每个阳性细胞的灰度值及阳性细胞个数,导出结果至 Excel 表格。红色通道计算总细胞个数,设置阈值为 180,同法计算图片中细胞总个数,导出结果至 Excel 表格。阳性染色结果定量分别通过阳性细胞百分数与阳性染色强度两种标准。阳性细胞数<14%为低表达,≥14%为高表达;阳性细胞表达率<5%为阴性(-),5%~<25%为弱阳性(+),25%~<50%为阳性(++),≥50%(+++为强阳性。

2 结果

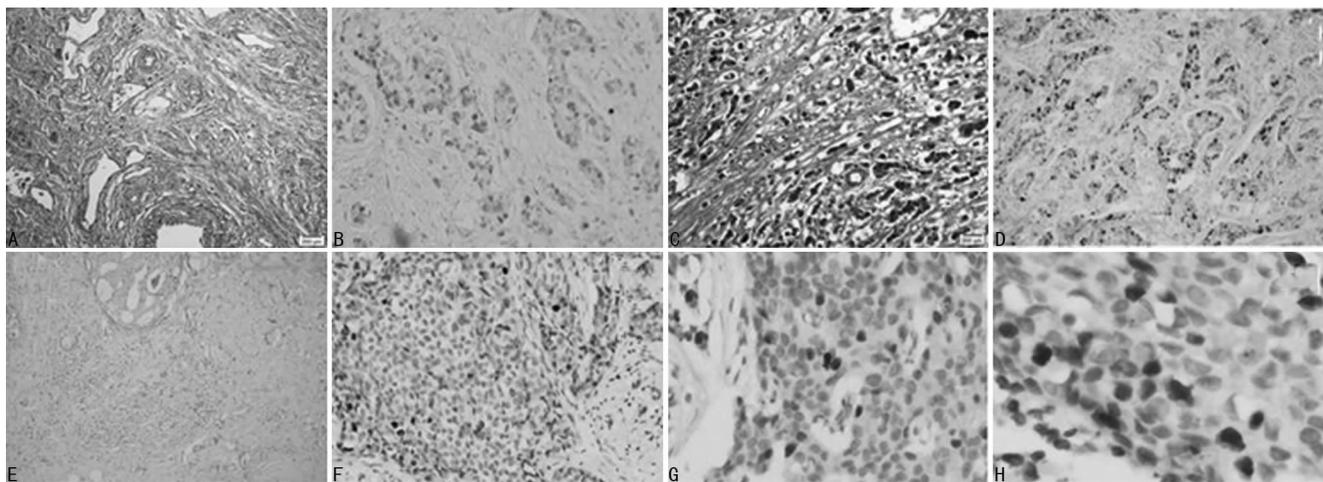
2.1 标本脱蜡时间对 Ki-67 染色结果的影响 标本常规脱蜡、水化,但染色结果较差。基本无阳性染色,显微镜下主要色调为蓝青色,图像模糊,看不到细胞核染色(图 1A)。考虑为脱蜡效果不佳,经调整脱蜡工序及时间(第 1 道 10 min,第 2 道 5 min,第 3 道 3 min)后,观察染色效果良好(图 1B),背景着色均匀,同时优化时间成本。

2.2 一抗封闭条件对 Ki-67 染色结果的影响 一抗封闭条件分别采用室温、真空干燥箱、37 °C 恒温水浴箱,染色前用吹风机烤片 15 min,可明显降低脱片概率。室温下、真空干燥箱中进行一抗封闭,均产生较强的非特异性染色(图 1C);恒温水浴箱中进行一抗封闭,镜下见阳性染色的棕褐色核抗原和蓝染的细胞核,境界清晰、分布有序。同时脱片率低,染色结果最好(图 1D)。

2.3 二抗显色系统对 Ki-67 染色结果的影响 二抗封闭显色系统,在不同的实验条件下经对比,室温下、真空干燥箱、恒温水浴箱中孵育染色等,对最后染色结果无明显影响。

2.4 分化时间对 Ki-67 染色结果的影响 DAB 显色、苏木素染色冲洗后,常规使用盐酸酒精分化并冲洗返蓝。但背景染色太深,抗原染色不明显(图 1E)。因苏木素复染与盐酸乙醇分化、冲洗时间不固定,应该镜下控制,根据着色程度调整时间,最后应水洗返蓝。通过调整不同分化时间,经对比时间控制在 2~3 秒为宜,镜下观察根据着色程度水洗返蓝(图 1F)。最终染色效果良好,镜下观察背景与抗原均各自染上不同颜色,细胞结构清晰,抗原着色明显易辨,易于镜下结果判断(图 1G、H)。

2.5 图像分析 20 例 BC 患者组织标本,免疫组织化学染色后图像分析软件摄取全色图片(图 2),蓝色通道观察染色结果(图 3A),根据灰度值标示阳性染色细胞(图 3B);红色通道观察结果(图 3C),根据灰度值标示细胞总数(图 3D)。软件计数得到每份标本的平均灰度值及阳性细胞数(表 1),以及阳性表达程度结果。定量指标:平均灰度值为 111.43±13.08;阳性细胞比例为(42.38±25.56)%。方法一:低表达阳性率为 0,高表达阳性率为 20;方法二:阳性程度(-)为 2,(+)为 9,(++)为 6,(+++为 3。检测得到所有的 TNBC 标本均 Ki-67 阳性高表达。



注:A 为第 1 次免疫组织化学 Ki-67 染色,脱蜡不完全($\times 20$);B 为经过 3 道时间递减的脱蜡后染色结果($\times 20$);C 为室温下/真空中干燥箱中进行一抗封闭,非特异性染色较强($\times 20$);D 为恒温水浴箱中以抗封闭效果($\times 20$);E 为常规使用盐酸乙醇分化后效果,背景染色较深,抗原染色不明显;F 为调整分色时间后的染色效果($\times 10$);G、H 为逐步调整染色条件后的最终染色结果($\times 20, \times 40$)

图 1 Ki-67 细胞染色

表 1 标本中 Ki-67 染色后细胞的平均灰度与阳性细胞百分比

| | | | | | | | | | | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|
| 项目 | 标本 1 | 标本 2 | 标本 3 | 标本 4 | 标本 5 | 标本 6 | 标本 7 | 标本 8 | 标本 9 | 标本 10 |
| 平均灰度值 | 104.595 | 106.472 | 112.704 | 110.627 | 112.04 | 102.192 | 101.353 | 98.352 | 99.998 | 103.39 |
| 阳性细胞比例(%) | 18.82 | 29.16 | 36.98 | 55.61 | 49.78 | 34.14 | 47.89 | 20.39 | 67.94 | 27.78 |
| 项目 | 标本 11 | 标本 12 | 标本 13 | 标本 14 | 标本 15 | 标本 16 | 标本 17 | 标本 18 | 标本 19 | 标本 20 |
| 平均灰度值 | 124.511 | 109.525 | 110.136 | 116.199 | 108.067 | 111.293 | 112.642 | 119.62 | 120.628 | 114.222 |
| 阳性细胞比例(%) | 19.58 | 16.82 | 46.60 | 47.86 | 36.51 | 37.19 | 64.00 | 21.13 | 27.50 | 59.29 |

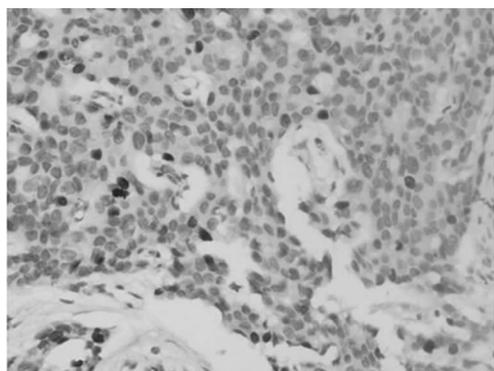
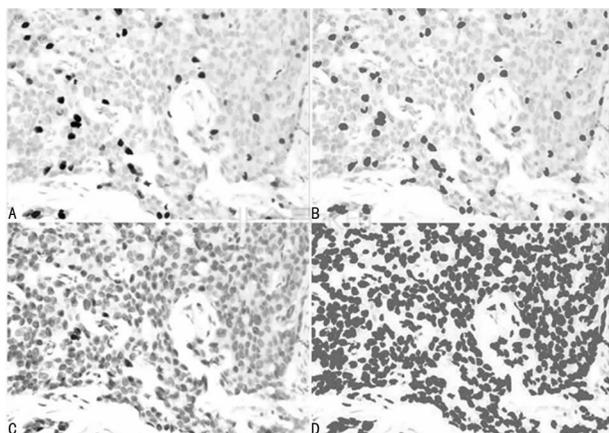


图 2 免疫组织化学染色



注:A 为软件蓝色通道图像($\times 40$);B 为软件蓝色通道图像,红色标记阳性染色细胞($\times 40$);C 为软件红色通道图像($\times 40$);D 为软件红色通道图像,红色标记细胞总数($\times 40$)

图 3 Ki-67 细胞染色后图片分析

3 讨论

理想肿瘤标记物必须具有高灵敏度、准确度和特异性,增殖细胞核抗原 Ki-67 广泛应用在肿瘤的研究中,而近年来 Ki-67 作为 TNBC 诊治和预后的独立指标,越来越受到关注^[8-9]。Ki-67 抗原可能在正常 BC 和非癌性 BC 组织中表达,但是表达率极低,一般小于 3%,然而在 TNBC 中表达率很高,并且显著高于 NTNBC。祝玉祥等^[10]报道, TNBC 的 Ki-67 阳性表达率为 86.5%,而非 TNBC 的只有 79.0%。张晓锋等^[11]报道,对 522 例 NTNBC 与 61 例 TNBC 作了各方面的研究, TNBC 的 Ki-67 阳性表达率高达 90.2%, NTNBC 则为 79.9%,徐婷等^[12]研究中发现, Ki-67 阳性表达在 TNBC 与 NTNBC 中分别是 68.2% 与 47.1%,表达率总体偏低,但是 TNBC 与 NTNBC 之间的 Ki-67 阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$)。本研究中,利用软件计数方式得到 TNBC 肿瘤组织切片的 Ki-67 阳性细胞百分比最高值为 67.94%,最低值为 16.82%,较所参考文献中得出的结论偏低,考虑可能与本次研究的标本量偏小有关。

具体的表达水平和阳性水平的评判标准在各地区的报道不一样,本研究主要采用 2011 年瑞士 St. Gallen 共识^[13]里面提到的 14% 作为 Ki-67 阳性细胞表达高低的标准^[14],以及 Beesley 免疫分级法,根据阳性细胞表达率在组织内 $< 5\%$ 为阴性(-), $5\% \sim < 25\%$ 为弱阳性(+), $25\% \sim < 50\%$ 为中等阳性(++), $\geq 50\%$ 为强阳性(+++)。根据这两种标准对

检测结果进行判定,得到了近似结果。

制订一个免疫组织化学染色判断结果的规范化标准是必不可少的,只有结果判读标准统一了,才能在临床诊断中充分发挥免疫组织化学染色的作用,为临床医生提供准确、可靠的数据信息。本研究中,通过对特异性抗原标记物检测过程中的一些关键步骤进行时间、温度和湿度等条件的对比观察,进而对标准化的免疫组织化学检测方法进行了改良^[15]。使用 3 道工序脱蜡,时间递减,既保证了效果,又节约了时间成本。而一抗封闭,较传统的室温下操作,恒温水浴箱中染色可以达到更好的阳性染色,而时间可以缩短至 50 min。苏木素对细胞核的染色,盐酸乙醇分化的时间控制在 2~3 s 为宜,镜下冲洗并动态观察,根据实际着色效果判断是否需要复染。本改良方法来自于《Oncogene》,经过适当调整,通过彻底脱蜡使染色效果更好、背景着色更均匀,通过恒温一抗封闭使细胞境界更清晰,降低非特异染色,通过镜下控制苏木素复染与乙醇分化时间和水洗返蓝,使背景与抗原均很好地着色,细胞结构清晰,抗原着色明显易辨,多数情况按本操作中的改良条件操作,一次就可以达到理想的观察效果^[16]。

综上所述,尽管免疫组织化学已经为一项很成熟的实验技术,然而在标准化上仍存在充满争议的关键性问题。本实验以 ER、PR、HER-2 均为阴性的临床 BC 标本进行 Ki-67 免疫组织化学染色,得到高阳性表达结果,有力证实了其可以作为 TNBC 的特异性标志物。本结果初步为临床及病理医生、科研人员提供了一个可靠的免疫组织化学检测方法的参照标准。接下来,本课题将通过更大的标本量以进一步验证,同时对 TNBC 淋巴结转移、组织学分级、导管浸润及肿瘤临床分期进行深入探讨。

参考文献

- [1] BREWSTER A M, CHAVEZ-MACGREGOR M, BROWN P. Epidemiology, biology, and treatment of triple-negative breast cancer in women of African ancestry[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(13): e625-e634.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] BERNIER J, POORTMANS P M. Surgery and radiation therapy of triple-negative breast cancers: From biology to clinics[J]. *Breast*, 2016, 28(28): 148-155.
- [4] MOHAMED Y, FONTANIL T, SOLARES L, et al. Fibulin-5 downregulates Ki-67 and inhibits proliferation and

invasion of breast cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(4): 1447-1456.

- [5] GUI Y, XU S, YANG X, et al. A meta-analysis of biomarkers for the prognosis of triple-negative breast cancer patients[J]. *Biomark Med*, 2016, 10(7): 771-790.
- [6] 张莹, 任占平, 张莹. 三阴与非三阴乳腺癌的临床病理特征及 Ki-67 表达的对比研究[J]. *天津医药*, 2015, 57(8): 896-898.
- [7] CHANGAVI A A, SHASHIKALA A, RAMJI A S. Epidermal growth factor receptor expression in triple negative and nontriple negative breast carcinomas[J]. *J Lab Physicians*, 2015, 7(2): 79-83.
- [8] EL BENNA H, ZRIBI A, LAABIDI S, et al. Ki-67: role in diagnosis, prognosis and follow-up after treatment of breast cancers[J]. *Tunis Med*, 2015, 93(12): 737-741.
- [9] MADANI S H, PAYANDEH M, SADEGHI M, et al. The correlation between Ki-67 with other prognostic factors in breast cancer: a study in Iranian patients[J]. *Indian J Med Paediatr Oncol*, 2016, 37(2): 95-99.
- [10] 祝玉祥, 章佳新, 邵稳喜, 等. ki-67 在三阴性乳腺癌组织中的表达及意义[J]. *中国现代普通外科进展*, 2010, 13(9): 679-680.
- [11] 张晓锋, 徐阿曼, 韩文秀. 三阴乳腺癌组织中 Ki-67 表达与临床病理的关系及意义[J]. *中国现代医生*, 2014, 52(34): 39-41.
- [12] 徐婷, 何奇, 吴克瑾, 等. 三阴性乳腺癌中 p53 和 Ki-67 表达的相关研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2013, 33(6): 833-837.
- [13] COATES A S, WINER E P, GOLDFHIRSCH 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.
- [14] GOLDFHIRSCH 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.
- [15] LESAR M, STANEC M, LESAR N, et al. Immunohistochemical differentiation of triple negative breast cancer[J]. *Acta Clin Croat*, 2016, 55(1): 3-8.
- [16] SONG C L, TANG H, RAN L K, et al. Sirtuin 3 (SIRT3) inhibits hepatocellular carcinoma growth through the glycogen synthase kinase-3 β /BCL2-associated X protein-dependent apoptotic pathway[J]. *Oncogene*, 2016, 35(5): 631-641.

(收稿日期: 2018-09-15 修回日期: 2019-01-18)