

HER2免疫組織化學染色之技術考量

黃莉萍^{1,2}

¹國泰綜合醫院分子醫學科，台北，台灣

²社團法人台灣分子醫學會，台北，台灣

摘要

以免疫組織化學染色法（immunohistochemistry; IHC）偵測第二型人類表皮生長因子受體（human epidermal growth factor receptor 2; HER2）時，不論是手工或自動化儀器方式操作，在研發或確效方面，都應遵照制定的規程（protocols），堅持品質要求，提供醫師可判讀的染色。由於手工操作無法像自動化儀器具有能達到染色品質一致性的優點，因此，當以手工操作IHC時，更須注意技術層面上的考量，以維持最佳染色品質。（生醫 2011;4(4):202-206）

關鍵字：免疫組織化學染色法（immunohistochemistry; IHC）、第二型人類表皮生長因子受體（human epidermal growth factor receptor 2; HER2）

前言

腫瘤治療的進步，使得免疫組織化學染色從「協助病理診斷」的角色轉變為「決定臨床治療」的角色，其中乳癌的第二型人類表皮生長因子受體（human epidermal growth factor receptor 2; HER2）免疫染色就是個最好的例子。現在，此治療方向已延伸到胃癌的治療上了。

對於晚期胃癌的病人，即使給予最佳的支持照護（best supportive care），其存活中位數（median

survival）還是不到5個月；若以各種組合的化療方式，存活中位數也不到12個月；但是將Trastuzumab（Herceptin®；賀癌平）加入化療（Xeloda 加 cisplatin 或 5-Fu 加 cisplatin）後，存活中位數可增加到16個月。因此，Trastuzumab為胃癌的有效標靶藥物。然而，由於只有約16%的胃癌病人有HER2此標靶。因此，如何能正確地找出這些HER2陽性病人，在標靶治療上就非常重要了。

以免疫組織化學染色法（immunohistochemistry; IHC）偵測HER2時，可以用手工和自動化儀器兩種方式操作。組織經過10%中性福馬林（neutral

通訊作者：黃莉萍

電話：886-2-2690-7965 ext 2519

傳真：886-2-2691-9800

地址：221 新北市汐止區建成路160巷32號3樓

電子郵件：ally0779@gmail.com



圖一、進行免疫組織化學染色時，宜同步製作對照品和H&E。各部份之步驟由左至右依序進行。（彩圖詳見本刊網頁）

buffered formalin; NBF) 的固定 (fixation)、脫水 (dehydration)、澄清 (clearing)、浸潤 (infiltration)、石蠟包埋 (paraffin-embedded) 等過程後，即進入切片程序。不論是以手工或自動化儀器方式操作IHC，在研發或確效方面，都應遵照制定的規程 (protocols)，提供醫師可判讀的染色。

空白片的製作

IHC的製作過程，是從切片開始。組織切片的厚度會影響染色的品質、結果與判讀，因此須使用經校準過的切片機 (calibrated microtome)，將蠟片切成3至5 μm 之標準厚度來染色，並以具有良好黏著性的玻片撈取後，放入60°C烘箱內烤一小時，或是在室溫中放置12至24小時，使其水分乾燥。

由於脂肪組織或固定不好之組織很容易在染色操作過程中脫落，所以需要具有良好黏著性的玻片。例如先在玻片上塗抹一層多聚賴氨酸 (poly-L-Lysine) (一種帶正電的分子) 以產生很強的靜電引力，可使組織附著於玻片上較不易脫落。poly-L-Lysine玻片可於實驗室中自行製作，方法是先將玻片置於70%酒精中，再於空氣中乾燥；接著將玻片置入稀釋10倍之poly-L-lysine中10分鐘，再於55°C烘箱中烤30分鐘以上，使其乾燥。可儲存於4°C並儘快於一

星期內使用。另外，也可直接購買SuperFrost® 玻片使用，這是一種經過靜電 (electrostatic) 處理的彩色玻片，有白、藍、粉紅、黃、綠等顏色，方便於區別時使用。

如果因為切片乾燥時間不足、烘箱溫度過低，或者是二甲苯 (xylene) 和L-檸檬烯 (L-limonene) 中摻雜了水分；亦或玻片中有水泡、試劑使用次數過多等因素，都會造成脫蠟 (deparaffinisation) 不完全。殘餘的蠟會讓IHC染色的非特異性背景升高，造成斑片狀 (patchy) 或帶狀染色結果；而壞死組織的背景染色也會過強，造成奇怪的染色型態。另外，若烘箱的溫度過高、石蠟加熱過度則可能會破壞組織的抗原性；而脫水不良則會造成染色狀況不均勻。

在理想狀態下，HER2的IHC染色應該要在切片完成之後立即進行。因為切片放置太久，也會損失抗原性。因此切片完成後應儘量在二週內使用。若無法於二星期內染色，可將切片置於防潮箱，但不要超過四至六星期。

免疫染色

IHC染色之操作流程簡述如圖一。進行IHC染色時，必須同時執行對照品和H&E的製作，讓病理醫

師在IHC判讀時可作同步比對。當以手工方式操作IHC時，要注意幾個小細節：（1）使用免疫組化筆（PAP pen）在組織切片的周圍繪製一個防水圈，以確保組織切片能完全地被覆蓋在抗體或試劑中，亦可防止抗體或試劑流到切片以外的區域；（2）內源性的過氧化物酶（peroxidase）會影響之後的呈色反應。可先用3%過氧化氫（hydrogen peroxide; H₂O₂）處理；（3）在整個IHC染色進行的過程中，絕對不能讓組織切片乾掉。因此在每一個步驟進行前，要確認有一層薄薄的液體覆蓋在組織切片上。

由於組織經過福馬林處理時，巨分子（如蛋白質）之間會隨機交叉聯結（cross-linking），而遮蔽抗原決定位。因此福馬林固定時間不宜過長。由於單株抗體（monoclonal antibody; mAb）通常只能辨識少數個抗原決定位，而抗原抗體結合處很可能已因福馬林的作用被遮蔽掉，此時就需要做抗原修復（antigen retrieval）。

可用加熱法或酵素分解法來恢復抗原性，這兩種方法皆須在消除內源性過氧化物酶的活性後馬上進行。（1）加熱法：用熱破壞交叉性的聯結。但此法不建議使用微波爐或壓力鍋，因為瞬間加熱或壓力急速升高，易使切片上的組織脫落；（2）酵素分解法：利用蛋白水解酶的酵素（例如proteinase K）分解交叉性的聯結。此法需要特別注意正確的作用溫度，因為溫度會影響酵素的活性。

組織中包含許多高電荷的蛋白質或內源性生物素（endogenous biotin），它們可和一級抗體（primary antibody）形成非特異性的結合，而造成過量的背景染色。因此在加入一級抗體前，必須先去除這些干擾。方法有二種：（1）以2%牛血清白蛋白（bovine

serum albumin; BSA）滴在組織切片上；（2）以1%脫脂奶粉（powdered skimmed milk）配製成稀釋液，將切片浸入其中。但如果不是使用Avidin Biotin Complex（ABC）的方法，這道步驟就可以省略。

抗原和抗體的反應，並不是抗體濃度愈濃愈好。因此在使用抗體前，必需先決定最佳的一級抗體、二級抗體（secondary antibody）濃度再進行染色。一般常用的測試方法是將一級抗體、二級抗體各以4種稀釋倍數交叉配合染色，可得到棋盤表格式之16種結果。以圖二為例，可知此例之一級抗體、二級抗體各於稀釋150倍時為最適當的染色濃度。根據上述決定的最佳稀釋倍數使用一級抗體與二級抗體於室溫下染色，若溫度太高可能會造成背景染色太強。

在IHC中最常用的呈色劑為二氨基聯苯胺（diaminobenzidine; DAB）。加入DAB後呈色信號展開，讓目標抗原通過顯色的沉澱而能被觀察到。加入受質呈色劑（substrate-chromogen）反應時，要特別注意：（1）若組織內含有內源性過氧化物酶，會



圖二、一級抗體、二級抗體於此例中得知，各於稀釋150倍時為最適當的濃度（彩圖詳見本刊網頁）

與呈色劑反應，須先去除；（2）DAB為已知的致癌物，要小心處理；（3）DAB之稀釋比例可依照廠商提供的資訊操作，其作用時間可根據抗體種類不同而作調整；（4）呈色反應需避光。

呈色反應後即可用蘇木精（hematoxylin）進行對比染色（counterstain）以利後續觀察細胞。對比染色須和色原質（chromogen）相容，例如DAB是綠棕色，而蘇木精為藍紫色，就很適合作為對比染色。

IHC染色品質不良，造成背景染色太高的可能原因為：（1）內源性過氧化物酶的活性未被去除或去除不完全；（2）脫蠟不完全；（3）抗體濃度太高；（4）抗體作用時間過長；（5）呈色劑作用時間太久；（6）水洗的時間不足；（7）切片乾掉等。因此，在操作IHC染色時，必須要有對照品，才能控管染色品質。

對照品（control）的使用

在進行HER2染色時，一定要同時加做陽性及陰性對照品。技術人員於染色完成後，必須先檢視染色狀況，是否有掉片、烤焦、染色不好、封片不良等情形，或是有其他潛在性的錯誤發生。並利用陽性、陰性對照品來評估IHC染色的結果。假若狀況不佳，就必須依據標準操作手冊中正確的步驟重新進行染色，並將錯誤紀錄下來，以作為品質管制。若確定為技術人員經驗不足，則需接受人員再教育訓練，以改善品質。

對照品必須要經原位雜交法（*in situ* hybridization; ISH）來確認。如螢光原位雜交法（*fluorescence in situ* hybridization; FISH）、顯色原位

雜交法（*chromogenic in situ* hybridization; CISH）、或是銀染原位雜交法（*silver in situ* hybridization; SISH）等。陽性對照品須選擇IHC 3+或是經FISH確認為有基因擴增（*amplification*）的案例。目的是為確認所使用的方法是正確的。而陰性對照品則應選擇IHC 0/1+或經FISH確認為無基因擴增的案例。若在陰性對照品上出現陽性結果，表示所使用的方法缺乏特異性或是操作過程有問題。如果可能的話，模稜兩可（*equivocal*）的結果（也就是IHC 2+檢體）最好也包括在對照品內，但並非絕對必要的。如果沒有辦法在每一個要染色的切片上都搭配著陽性及陰性對照品一起染色，那麼，至少在每一批染色時要附上陽性及陰性對照品。

病人組織檢體中非腫瘤的地方可用來當作內部的陰性對照。因為在正常的組織中不會出現HER2的染色。如果染色出現，就表示方法或操作過程有問題。同一個病人的組織多作一片切片，而不加一級抗體，也可作為陰性對照品。若這種陰性對照品還可染出顏色來，那麼在腫瘤中看到的顏色就不應該被評估。用同一個病人的檢體來當對照品是非常適當的，因為固定、保存等狀況及條件幾乎完全相同。

另外，可拿乳癌病人已知之HER2結果為陽性的檢體來當陽性對照，與待測之檢體一起處理。拿來作為對照品的檢體，最好跟待測檢體採用同樣開刀術式。如待測檢體是粗針切片（*core needle biopsy*）或部份切除（*excision*），作為對照品的檢體種類最好也相同。因為檢體種類相同，包括固定時間、方法等各種條件相似，作為對照會更有意義。儘可能把已知為HER2陽性的檢體做成數個蠟塊，當成一批陽性對照品，每次要染色時切一片下來使用。但是不能每次

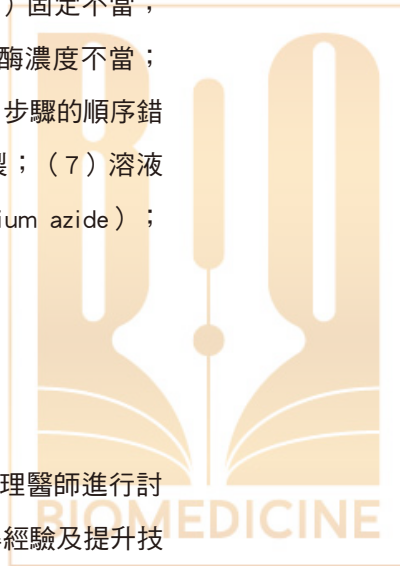
染色時，隨便拿一個來切，必須在同一段時間中都使用同一個蠟塊，用完了再換下一個，才能監控對照品連續性的狀況。前一批陽性對照品快用完時，下一批陽性對照品也同時切片跟著染色，才能確定下一批陽性對照品也是正確的。依照如此模式，才能長久監控陽性對照品連續性的狀況，而達到監控品質管制的目的。

造成偽陰性的可能原因包括：（1）固定不當；（2）玻片太過潮濕；（3）過氧化物酶濃度不當；（4）抗體濃度及作用時間不當；（5）步驟的順序錯誤或被省略；（6）呈色劑非新鮮配製；（7）溶液或緩衝液裡含有防腐劑疊氮化鈉（sodium azide）；（8）染色過程中切片乾掉等。

結語

IHC染色完成後，技術人員應和病理醫師進行討論，此評估結果可讓技術人員從中獲得經驗及提升技術能力。討論結果應作成紀錄，以確定IHC不論在手工操作及自動化分析過程中的前、中、後階段，都能堅持品質要求，嚴格實施品質管制（quality control; QC）及品質評估（quality assessment; QA）。

在IHC的操作上，專業的技術人員扮演重要的角色，必須與病理學家密切配合，才能確保精確的染色品質，使乳癌及胃癌的HER2測試結果具有可靠性（reliable）及可再現性（reproducibility），並可提供醫師作HER2正確的判讀，對於病人在乳癌及胃癌之適當診斷及治療上是非常重要的。



生物醫學
BIOMEDICINE JOURNAL