组织芯片简易制作方法及免疫组化有效性分析

漆楚波[1,2],朱润庆[1],夏和顺[2],王明伟[2]

A Simple Making Method of Tissue Microarray and Validation Study on Immunohistochemistry

QI Chu-bo[1,2], ZHU Run-qing[1], XIA He-shun[2], WANG Ming-wei[2]

1. *Department of Pathology, Basic Medical School of Wuhan University, Wuhan* 430071, *China*; 2. *Department of Pathology, Hubei Cancer Hospital*

Corresponding Author: ZHU Run-qing, E-mial: zhurq888@163.com

Abstract: Objective To search a simple making mothd of tissue microarray and evaluate its validation. **Methods** A new, simple and easy method was designed to improve the technology of TMA during the experiment. Tissue microarrays with 1.6 mm in diameter tissue core were constructed from 124 cases of breast cancer. The tissue microarrays were stained for oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and c-erBb2 using immunohistochemistry. At the same time the stains on the tissue microarrays were compared with that from the full tissue sections. **Results** A highly significant association was observed between the staining scores (0 ～ 7) obtained from the full tissue sections and from the tissue microarrays. Concordance for the receptor status (positive / negative) of the whole section and the tissue core were 94.35 % for ER, 93.55 % for PR. and 91.94 % for c-erBb2. The discordance between full section and tissue microarrays was studied using Two - Related - Samples tests and the result had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** Tissue microarays with 1.6 mm in diameter tissue core made by simple method can represent full tissue section on immunohistochemistry study. We believe our method of tissue microarray is a reliable and valid

Key words: Tissue microarrays; Making method; Oestrogen receptor; Progesterone receptor; c-erBb2 receptor; Immunohistochemistry

摘　要:**目的**　探索一种组织芯片的简易制作方法,并对它的有效性进行分析。**方法**　在实验中探索出组织芯片的制作方法,收集乳腺癌病例 124 例,制作成直径1.6 cm 的组织芯片,进行雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及 c-erBb2 受体免疫组化染色,同时与普通切片的免疫组化染色结果对比,并进行统计学分析。**结果**　组织芯片与普通切片的 ER、PR 及 c-erBb2 染色积分(0 ～ 7 分)显著相关,ER、PR 及 c-erBb2 的表达(阳性/ 阴性)一致率分别达94.35 %、93.55 %和91.94 %。比较组织芯片与普通切片的 ER、PR 及 c-erBb2 的表达,两者之间无统计学差异($P > 0.05$),即组织芯片的结果与普通切片的结果是一致的。**结论**　自制1.6 mm 直径的组织芯片在进行免疫组化染色时能够代表普通切片,自制组织芯片的方法可靠有效。

关键词:组织芯片;简易制作方法;雌激素受体;孕激素受体;c-erBb2 受体;免疫组化

中图分类号:Q5-33　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-8578(2007)08-0629-04

0　引言

组织芯片(tissue chip)又称组织微阵列(tissue microarray TMA)。它是将数十至上千个小组织按照设计,整齐地排放在一张载玻片上制成组织切片的技术。这一技术由美国国立癌症研究院的 Kononen 等[1]于 1998 年在 Nature Medicin 上首次报道。它是继基因芯片、蛋白质芯片之后出现的又一种重要的生物芯片技术。由于现有组织芯片设备昂贵且操作繁琐、取样点样本精度低等缺点,影响了组织芯片技术在病理诊断和研究中应用。我们参阅大量资料,自行设计工具,成功制作了高质量组织芯片。根据工作需要,我们选择比较乳腺癌组织芯片和普通切片中免疫组化的差别,来判断组织芯片的有效性,以期能用组织芯片技术提高工作效率。

1　材料与方法

1.1　供体蜡块的选择　收集湖北省肿瘤医院病理科 2005 年 12 月～2006 年 6 月诊断为乳腺癌并做

收稿日期:2007-01-31;**修回日期**:2007-06-05

作者单位:1. 430071 武汉大学基础医学院病理教研室;2. 湖北省肿瘤医院病理科

通讯作者:朱润庆,E-mail:zhurq888@163.com

作者简介:漆楚波(1975-),男,在读硕士,主治医师,主要从事病理技术操作

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

过受体检测的病例 160 例,复查组织切片,包括苏木素 - 伊红(HE)和雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、c-erBb2 受体染色切片,一些组织蜡块太薄的病例被排除,最终有 124 例入选本实验,均为 4 %甲醛固定、石蜡包理的组织。其中浸润性导管癌 101 例,浸润性小叶癌 14 例,大汗腺癌 1 例,化生性癌 1 例,髓样癌 7 例。

1.2　组织芯片的构建

1.2.1　简易工具的制作

(1) 打孔针和取样针的制作　打孔针和取样针均可以用带实芯针的穿刺针自己磨制。一套针有四件,两个空心针及配套的两个实心针芯。针径可以是0.6～2.0 mm,须注意打孔针径比取样针径小 1 号(即打孔针的外径与取样针的内径一致),以便取样组织的直径和打孔孔径一致,以防组织芯孔与受体组织连接不紧脱落。我们使用的取样针直径是 1.6 mm,打孔针和取样针的外周套彩色塑料膜以标记针进入蜡块的深度,打孔针打孔的深度要比取样针深1.0 mm。有人报道是采用微雕开窗标记刻度技术,我们认为不可取,因为针用久不锋利时要磨,会影响刻度[2]。

(2) 通量定位模板的制作　根据自己的需要,可以使用不同直径的针制作不同通量的模板(最好用透明材料),孔间距可以为1.0 mm 到2.0 mm,建议刚开始操作不熟练时间距大一点(2.0 mm),四周留白距离大一点(3.0 mm),以防止打孔打歪或石蜡块断裂,影响效果。模板的四周最好是三周都有挡板,模板的内径大小和受体腊块相同,以便模板卡在受体蜡块上,操作起来很轻松。我们使用的通量模板有两种:①通量阵列 5 ×7,取样直径2.0 mm,间距 2.0 mm;②通量阵列 7 ×9,取样直径1.5 mm,间距 1.5 mm;蜡块大小统一为30.0 mm ×25.0 mm,厚度 15.0 mm,便于管理。

1.2.2　TMA 制作方法

(1) 受体蜡块的制作及打孔　①可以使用熔点在 60 ℃～62 ℃普通切片纯净石蜡制作,依据自己的需要设计制作规格与模板大小一致的各种包埋框;②倒入融化的液体石蜡,在蜡块的表面加上普通塑料包埋底盒,以便切片时固定蜡块和编号,也可直接用标签纸蜡封编号(切片时有可能使底盒与蜡块脱落,但蜡块依然很规整不影响切片)。浇注熔化石蜡后开始计时,40～50 min 后(具体时间可能因为室温的不同而不同)蜡块成型并且处于未完全固体化状态,剥离包埋框,开始打孔;③打孔时先将定位模板卡住受体蜡块固定,然后用对应型号的打孔针通过定位模板上的阵列孔打孔,深度为6.0 mm。打孔需快速进行,否则蜡块变冷变硬时容易发裂,此时也可以放入摊片机水箱中(水温 46 ℃),水浴加热 3～5 min,使蜡块受热变软而不易发裂。

(2) 待取位点标记及供体蜡块的制作　这是技术创新的关键。由于多数取材组织是四方形的,很少是不规则的,使我们在显微镜下阅片后很难回到蜡块上的某一点精准取材,常用方法是在玻片上画圈标记,再回到组织蜡块上目测找位点,这种方法由于取样位点象限不好确定而需要多处取样,这大大增加了我们的工作量和成本。我们的解决方法是坐标定位法准确定位:①在取材时用大头针在蜡块的左上象限 1/3 处打孔做标记(也可在已成形的蜡块上用小针打孔标记),作为 XY 轴的原点。②我们阅片时以此打孔点位为原点,分别在显微镜下测出我们要取材的位点在水平轴(X 轴)和垂直轴(Y 轴)上的坐标距离,再返回到蜡块上相应的坐标位点做标记,取样。从而实现点对点的精确位点取样,仅一次就可成功。

(3) 供体蜡块的取样　①供体蜡块取样前需加热,方法有烤箱加热和水浴加热,我们认为水浴更方便,且易于控制。水温 46 ℃～48 ℃,加热 5～10 min;②依据前面测量的坐标找到需要取材的位点,用采样针在供体蜡块欲取出部位上打孔采样,深度 5.0 mm(比受体蜡块孔浅1.0 mm),深度先在针上用彩色塑料膜标记,采样时需缓慢用力,防止供体蜡块裂开,到达要求的深度后要旋转两周以便针芯充满。③在阵列蜡块(受体蜡块)上找到要填入的位点,用实心针芯缓缓推出,准确植入,使组织芯的平面和蜡块的基本一致。④为了更方便准确的取样,我们制作了简单的取样定位工具,制作方法:在两个内空的矩形直角边上刻上精确刻度,取样时用两个矩形相对的直角两边组成一个中空矩形,按照前面显微镜下测量的距离和方向,以打孔点为矩形的一个直角的顶点,对角顶点就是要取样的位点的精确位置。以上创新方法我们取名为二维坐标定位矩形模板取样法。

(4) 阵列位点信息记录　①在植入组织芯时在左上象限非对角线上的某一个位点要空出,以便识别阵列的方位。有报道采用植入脑组织来定位,我们实践后认为还是不植入方便,因为:一方面不植入组织芯的阵列,我们肉眼就可以确定方位,而植入脑组织的阵列要在显微镜才能确定;二是脑组织在摊片时有时容易散开,从而增加确定方位难度。②信息记录采用二维记录方式,精确记录每一位点的信息。水平方向从左到右每个点坐标标记为 A、B、C、…,垂直方向每个点坐标标记为 1、2、3 …,这样每个

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

位点都有由一个由字母和数字组成的坐标,如(A3),(B5),(G2)等等。可以在登记本上记录每个位点的信息,很方便的建立组织芯片库。

(5)阵列蜡块的处理　阵列制作完毕后,将阵列蜡块含有组织的一面平放在一玻璃板上,置于 56 ℃恒温箱内,每 5 min 观察一次,待蜡块和玻璃板中间出现液体状的石蜡把蜡块取出,置于冰箱内冰块上冷却。有报道是在常温下冷却,我们实践和比较后认为冰箱内冷却效果更好,因为:常温下冷却蜡块必须底面(有组织芯片的面)朝上,这时液体石蜡容易流出,使蜡块的边角变钝,这样影响边角的组织芯的切片。

(6)切片　冰腊块好后以 4 μm 厚切片,裱贴于经 2 % 3-氨丙基三乙氧硅烷(APES)丙酮液处理过的载玻片上。微阵列蜡块的切片用德国徕卡一次性刀片在徕卡切片机上切片,与常规组织切片基本相同,但是因为蜡块内的组织块多,在裱片时操作要轻,速度掌握适宜,否则容易离断或组织阵列偏移,另外,还要注意水温,过低切片展不开,过高易拉长,拉断,保持在 48 ℃左右较合适。用一次性切片刀比用普通厚钢刀切片质量要好。

共制作腊块 4 个,各切片 3 张共 12 张切片,每张切片留一个为定位用空白点,其余 62 个为有效组织位点。372 例免疫组化只做了 12 张玻片。工作量相当于以前免疫组化的 3 %。

1.3　免疫组织化学标记　将组织芯片蜡块进行连续切片,厚度为 4 μm,裱贴于 APES 丙酮液处理过的载玻片上。60 ℃烤箱内烤片 1 h,脱蜡入水,3 % H_2O_2 室温孵育 10 min,灭活内源性过氧化物酶,微波修复抗原 100 ℃15 min,一抗均为单克隆即用型抗体,免疫组织化学染色检测采用非生物素即用型 EliVision ™二步法,DAB 显色。抗体及 DAB 显色剂及即用型第一代免疫组化 Elivision™ plus 广谱试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.4　染色结果的判断　ER 和 PR 均为细胞核着色,c-erBb2 为胞膜着色。阳性判断采用快速积分法[3],首先将染色强度打分:0 分为未着色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。再将阳性细胞所占的百分比打分:阴性为 0 分,阳性细胞 < 25 %为 1 分,25 %～50 %为 2 分,51 %～75 %为 3 分,> 75 %为 4 分。最后将染色强度的得分与百分比的得分相加。根据两种方法评定:0～3 分为阴性,4～7 分为阳性。

1.5　统计学处理　采用直线相关分析比较组织芯片与普通切片之间的 ER、PR 及 c-erBb2 得分的相关性,采用配对的卡方检验检测组织芯片与普通切片之间的 ER、PR 及 c-erBb2 表达(阴性/阳性)一致率。

2　结果

2.1　组织芯片质量　所有组织芯片组织排列整齐,12 张切片,共 744 个组织位点,只有 35 个位点发生了部分缺失,且均低于 50 %,不影响结果的判断。由于我们采取的是精确位点取样,未出现无效组织。

2.2　免疫组织化学染色　普通切片与组织芯片相比,两者的 ER、PR、c-erBb2 得分显著相关($P < 0.001$),见表 1.

表 1　组织芯片与普通切片 ER、PR 和 c-erBb2 得分的相关性检验

组织芯片普通切片	例数	相关系数	P
ER 得分	124	0.912	< 0.001
PR 得分	124	0.923	< 0.001
c-erBb2 得分	124	0.918	< 0.001

普通切片 ER、PR 和 c-erBb2 的阳性率分别是 72.58 %、65.32 %和42.74 %,组织芯片的 ER、PR 和 c-erBb2 的阳性率分别是 75.00 %、69.35 %和 47.58 %组织芯片与普通切片之间的 ER、PR 和 c-erBb2 的阳性率表达(阴性/阳性)一致率分别为 97.58 %、95.97 %和95.16 %。若采用阴性/弱阳性/阳性系统评定染色结果,则两者之间的 ER、PR 及 c-erBb2 表达一致率分别为 94.35 %、93.55 %和 91.94 %。尽管两者一致率很高,但并不是完全一致,因此我们选用配对卡方检验检测它们之间的 ER、PR 和 c-erBb2 表达是否有差异,见表 2。

表 2　组织芯片与普通切片 ER、PR 和 c-erBb2 表达结果卡方检验

	普通切片	组织芯片 +	组织芯片 -	P
ER	+	90	3	
	-	0	31	> 0.05
PR	+	81	5	
	-	0	38	> 0.05
Her2	+	53	6	
	-	0	65	> 0.05

由 2 表可见,ER、PR 和 c-erBb2 在组织芯片和普通切片上的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),即组织芯片有很好的代表性。

3　讨论

组织芯片、基因芯片和蛋白质芯片并称为分子遗传学的三大芯片技术,而组织芯片结合了形态学、基因学和蛋白质学,能够同时分析成百上千种组织

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和细胞的核酸和蛋白质与临床疾病的关系[4]。因此,开展组织芯片技术建立肿瘤和正常组织芯片库有着重大的意义。

本实验结果表明,1.6 mm 直径的组织芯片从总体是能够代表普通组织切片进行免疫组化研究的。如果照标准的程序制作组织芯片(特别是准确选取组织芯),1.6 mm 直径的组织芯片代表性不会出现明显偏差,能够避免无效组织芯片的出现。同时本实验结果也显示,并不是组织芯片上每一个组织芯都能完全代表其原来的普通切片,但这细小的差异并不影响免疫组化的结果,在统计学上没有意义,经统计学处理后,单一数据的变异不会影响总体的估计,本研究的观察结果与 Kallioniemi 等相同[5],因此,只要选择病例得当完全可以利用组织芯片免疫组化取代常规免疫组化,从而提高工作效率和科研水平。本实验的切片和免疫组化的工作量仅常规的 3 %,节约了试剂也减少了实验误差。

组织芯片由于它的高通量,平行性和科学性无疑会给科学发展的飞跃提供一个非常优秀的平台,由于这项技术还不很成熟,需要专门的昂贵设备,且可操作性不好,国内对它的研究还处于起步阶段,我们设计制作的组织芯片质量较高,技术成熟,成本低廉(已申请专利,专利申请号:200710040165.1),非常有利于组织芯片技术在我国的发展,应用该技术可以迅速地在全国建立系列组织库。

我们技术的优势:(1)依托石蜡切片的现有设备,自己设计和制作各种工具和设备,成本低,可操作性强,非常有利于开展工作。(2)成功实现点对点的精确位点取材,从而避免了以前报道的由于肿瘤异质性所造成的无效芯片偏差。(3)精确记录每一个芯片位点的信息,便于以后试验。能够有效的建立系列正常和肿瘤组织芯片库。(4)我们的各种组织芯片蜡块全部统一大小规格,能够与包埋常用的底板兼容,方便了切片,也能够使技术规范化、标准化,便于以后计算机阅片。(5)在实践中可以很方便的组合所需要的各种组织芯片。

TMA 技术的提出,使以免疫组织化学和原位 PCR 为代表的分子病理学研究进一步迈向规范化、科学化和高技术化[6],TMA 具有普通切片无法比拟的优越性:非常微小(直径0.6～2.0 mm),数量多(目前可达1 000个点阵),形状规则,排列有序,具有高通量和平行性,检测结果的科学性和可比性强,信息量大,效率高,消耗试剂少。在对肿瘤的分子改变与临床病理特征的联系研究上,TMA 将提供巨大帮助,同时 TMA 也可用于基因产物的筛选、生物试剂的测试、病理质量的控制及标准化、教学和考试以及制作微缩组织学和病理学图谱。随着 TMA 技术的不断发展,肿瘤及正常组织库的建立,TMA 的构建形成系列化,病理学的作用将面临转变,即在肿瘤分型时不再把重点放在组织学形态改变上,而是从多方面、多水平地为临床治疗提供更多资料。相信在不久的将来,TMA 技术在肿瘤的诊断和研究领域中将发挥更加重要的作用。

参考文献:

[1] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrys for high-throughput molecular profiling of tumor specimens[J]. Nat Med,1998,4:844-847.

[2] 蒋时红,刘旺根,王雪萍,等. 组织芯片手工制作工具[J]. 解剖学杂志. 2006,29(2):145.

[3] Barnes DM, Harris WH, Smith P,et al. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer[J]. Br J Cancer, 1996, 74(9):1445-1451.

[4] Torhorst J, Bucher C, Kononen J, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints[J]. Am J patlol, 2001,159(6): 2249-2256.

[5] Kallioniemi O,Wagner U,Kononen J, et al. Tissue microarray technology for high - throghput molecular profiling of cancer [J]. Hum Mof Genetics, 2001, 10:657-662.

[6] Hsu FD, Sielsen TO, Alkushi A, et al. Tissue microarravs are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry[J]. 2002, 15(12):1374-1378

[编辑:贺　文;校对:马福元]

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net