

免疫组织化学双标记结合激光显微切割技术在霍奇金淋巴瘤诊断中的应用

刘华庆,胡 莉

Application of Combination of Double-labelling with Immunohistochemistry and Laser Capture Microdissection in Hodgkin's Lymphoma

LIU Hua-qing, HU-Li

Department of Pathology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

Abstract: Objective To evaluate the Application of detecting Hodgkin's Lymphoma(HL) tumor cell and background cell with the combination of double-labeling with immunohistochemistry (IHC) and Later Capture microdissection (LCM). **Methods** This study includes 10 patients with HL diagnosed, tissue biopsy sample were fixed 10% formalin, paraffin-embedded, adopted different methods of antigen retrieval. The same sample were labeled with double labeling with IHC(CD20/CD45RO,CD30), then single tumor cell and background cell can get through LCM. **Results** In 10 cases of HL, tumor cells and background cells were detected with the combination of double labeling and LCM, they might show different color. The expression of tumor cell was CD30-postive with brown-yellow on cell membrane, and background cells were CD20-positive with red on cell membrane. **Conclusion** We can tell single tumor cells and background cell with double labeling and LCM, thus double labeling might play distinguish between different cells in HL.

Key words: Immunohistochemistry; Double labeling; Later Capture microdissection; Hodgkin's Lymphoma

摘 要:目的 探讨 IHC 双标记技术结合 LCM 技术在研究 HL 肿瘤细胞与背景细胞中的应用。**方法** 选取 10 例 HL 标本,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋组织,采用不同的抗原修复方法,通过 IHC 双标记与 LCM 技术获得单一的肿瘤细胞和背景细胞。**结果** 在 10 例 HL 标本中通过 IHC 双标记与 LCM 技术获得单一的肿瘤细胞和背景细胞,二者表现出不同的颜色以及表达不同的 CD 分子。**结论** 通过 IHC 双标记与 LCM 技术获得单一的肿瘤细胞和背景细胞,IHC 双标记在 HL 研究中起着区分不同细胞的作用。

关键词:免疫组织化学;双标记;激光捕获显微切割;霍奇金淋巴瘤

中图分类号:R733. 1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2010)04-0438-03

0 引言

霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma, HL)是恶性淋巴瘤的一种特殊类型,具有特定形态和表型,反应性细胞较多,背景杂乱^[1]。随着激光捕获显微切割(Laser Capture Microdissection LCM)技术和单细胞分子生物学技术的发展,对 HL 中肿瘤细胞的来源、性质及与背景细胞的关系的研究越来越深入,我们应用免疫组织化学双标记技术,分别标记肿瘤细胞和背景细胞,再应用单细胞显微切割技术,分别切取肿瘤细胞和背景细胞,供下一步研究两者

关系用。

1 材料与方法

1. 1 材料

1. 1. 1 标本来源 10 例 HL 均来自我院病理科,经 10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚 3 μm,经 HE 染色结合免疫组织化学证实。

1. 1. 2 主要设备 激光捕获显微切割系统(Leica ASLMD, Germany),HS 型洁净工作台(HS-1300-V 苏净集团安泰公司),全自动电压力锅(YBD60-100A 中山市鸿昌电器燃具厂),微波炉(HR-7751M 青岛海尔微波制品有限公司),专用抗原修复盒(购于基因公司),热塑性乙烯乙酸乙烯酯(Ethylenevinylacetate EVA)膜载片(购于 Leica 公司)。CD30

收稿日期:2008-12-15;修回日期:2009-07-17
作者单位:563003 贵州遵义医学院附属医院病理科
作者简介:刘华庆(1968-),男,本科,副主任技师,主要从事免疫病理和分子病理技术方面的研究

(克隆:Ber-H2)、CD20(克隆:L26)、CD45RO(克隆:UCHL-1)均为浓缩型鼠抗人单克隆抗体(丹麦 Dako 产品);EnVision 检测试剂盒、多聚赖氨酸、抗原修复液(Tris-EDTA pH9.0)(均购于基因公司)。AEC 显色剂(购于北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片的制备 (1)LCM 专用带 EVA 膜载片(分不锈钢框架型与玻片型),使用前用紫外线照射 1 h,然后浸泡多聚赖氨酸 2 min,晾干备用。石蜡切片厚度 8 μm,二次展片后平铺于专用载片上,60 ℃烤片 1 h。(2)用二甲苯脱蜡 3 次×10 min,PBS 洗。(3)抗原修复:修复液为 pH 9.0 Tris-EDTA;①微波中档分别 8、10、12、15 min。②压力锅:保压计时 1、2 min。③水浴法:在压力锅中加自来水约 2 000 ml,把抗原修复盒(装有修复液和切片)放入压力锅中不用加盖,直接加热^[2],从自来水沸腾开始计时分别为 10、15、20 min。热处理后自然冷却,PBS 洗涤。

1.2.2 染色步骤 (1)加 3% H₂O₂ 10 min,PBS 洗 3 次×5 min。(2)加 CD30(1:50)37 ℃ 60 min,PBS 洗 3 次×5 min。(3)加 EnVision 37 ℃ 20 min,PBS 洗 3 次 5×min。(4)DAB 显色,镜下控制,PBS 洗 3 次 5×min。(5)加 CD20(1:50)或 CD45RO(1:50),37 ℃ 60 min,PBS 洗 3 次×5 min。(6)加 EnVision 37℃20min,PBS 洗 3 次 5×min。(7)AEC 显色,镜下控制,蒸馏水洗。(8)苏木精对比染色 1 min,蒸馏水洗。(9)单细胞切割:依次打开 PC 机、显微镜和激光器的开关,待自检完成后,再打开软件,放置切片时组织块朝下,调节好亮度和焦面,点“select”

选择“line”或“circle”,以线条或圆圈的形式圈住单个目的细胞,调整好激光参数(孔径、能量、切割速度),进行切割。切下单细胞后,在“collector”状态下,观察收集管里切下的细胞。根据需要切取所需的细胞和细胞数量,供下一步研究用。

2 结果

2.1 肿瘤细胞和背景细胞的表达情况

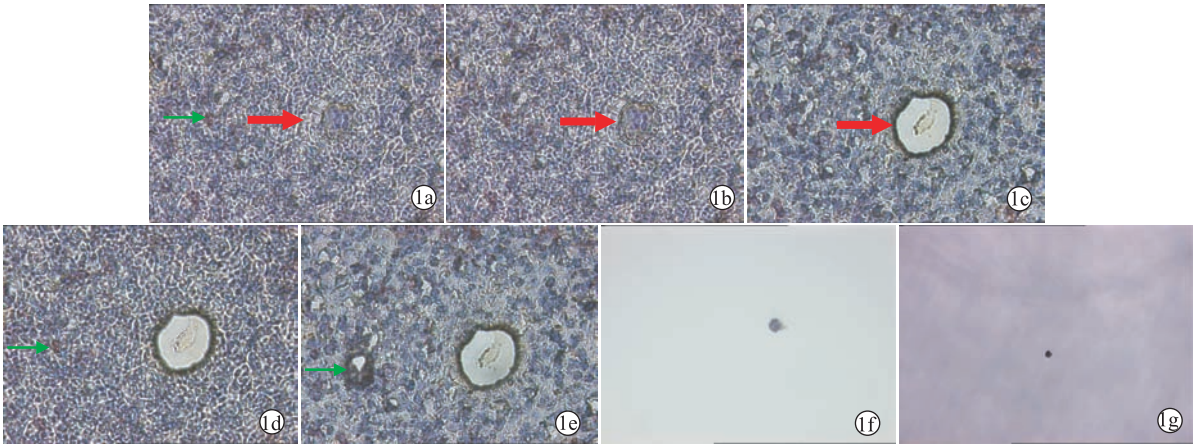
霍奇金淋巴瘤中肿瘤细胞 CD30 阳性,呈棕黄色,位于细胞膜/质,散在分布。背景细胞 CD20 阳性,呈红色,位于细胞膜,散在或呈团分布;CD45RO 阳性,呈红色,位于细胞膜,散在或弥漫分布^[3]。阳性表达及切割情况见图 1。

2.2 抗原修复方法比较

(1)微波中档 8min EVA 膜有小气泡产生,10 min 有大气泡,12 min 有小皱折形成,15 min 有大皱折形成。(2)压力锅 1 min、2 min 均有大皱折形成。(3)水浴法 10 min EVA 膜完整,15 min 有小气泡形成,20 min 有大气泡形成。(4)带 EVA 膜载片不锈钢框架型与玻片型相比易脱片。

3 讨论

LCM 的激光切割过程快速简单,用 EVA 膜捕获细胞,对目的细胞无损伤破坏,能保持其良好的细胞形态,切割的单细胞直接落入收集管中,避免了污染。切割的目的细胞内 DNA、RNA 以及蛋白质均无损伤,细胞内分子结构保持完整;EVA 膜良好的水溶性对 DNA、RNA 以及蛋白质的提取并没有影响^[4]。我们应用免疫组织化学双标记技术,分别标



1a: HL tumor cell expressing CD30-positive with brown-yellow(red arrow), B-cell expressing CD20-positive red(green arrow) (× 630); 1b: HL tumor cell was captured before cell cut(red arrow)(× 630); 1c: The blank was left after tumor cell cut(red arrow)(× 630); 1d: B-cell was captured before cell cut(green arrow)(× 630); 1e: The blank was left after B-cell cut(green arrow)(× 630); 1f: HL tumor cell was in collection tube (× 400); 1g: B-cell was in collection tube(× 400)

图 1 HL 肿瘤细胞和背景细胞阳性表达(EnVision 法×630)及切割后在收集管里的情况(×400)
Figure 1 The positive expression of HL tumor cell and backgrouhd cell (EnVision×630) and tumor cell and back-ground cell was cut in the collection tube(×400)

记霍奇金淋巴瘤中的肿瘤细胞和背景细胞,使其在同一切片上显示两种不同的颜色,分别切取两种细胞即肿瘤细胞和 B 淋巴细胞或 T 淋巴细胞,该方法增强了取材的特异性和目的性,保证了目的细胞的同质性和可比性^[5],为研究肿瘤细胞和背景细胞的相关性提供了更科学的研究方法。

切割下来的 HL 肿瘤细胞与背景细胞可做珠蛋白基因扩增和基因重排检测等试验,以观察 HL 肿瘤细胞与背景淋巴细胞是否存在克隆相关性,是否来源于同一克隆群体;同时也可观察背景淋巴细胞是单纯反应性增生细胞,还是具有瘤样增生活性的 HL 肿瘤细胞的前体细胞。这对明确肿瘤细胞来源于何种细胞,与背景细胞有什么关系有重要意义。

LCM 专用带 EVA 膜载片包括不锈钢框架型和玻片型,框架型由外围的不锈钢框架和中央的单层 EVA 膜构成;玻片型为一面带 EVA 膜的载玻片。铺组织片时应铺在框架型的 EVA 膜面(即背面)和玻片型的中央 EVA 膜区(即正面)。若组织块较大,超过框架型中央的 EVA 膜区,再抗原修复时则容易脱片;框架型在操作时没有玻片型方便,如擦干组织周围液体时框架型易损坏 EVA 膜,免疫组织化学笔划圈也不方便;另外在激光参数相同的状态下,在框架型切片上的激光切割线虽较玻片型上的切割线细,有利于从密集细胞群中挑取单个目的细胞,但切割下的单细胞更易吸附在框架型载片的 EVA 膜表面。故在该方法中选择玻片型比框架型载片更为恰当。

抗原修复是石蜡切片免疫组织化学成败的关

键,加热处理是其最根本的因素^[6]。LCM 专用带 EVA 膜载片与常规做免疫组织化学用的玻片不同,我们采用不同的修复方法及时间,EVA 膜均不会破裂,证明 EVA 膜能耐受高温,但容易起泡和皱折,影响免疫组织化学的结果观察。应用水浴法 10 min 既可见明显的阳性结果,EVA 膜又完整,没有气泡及皱折,较为理想。

双标记时一般先用 DAB 显色,再用 AEC 显色,因为 DAB 比 AEC 要稳定,受影响的因素少;AEC 可溶于乙醇,暴露在强光下易褪色^[7]。对比染色完后不要脱水、透明、封固等过程,暗处保存,否则会导致 AEC 褪色,也不利于细胞切割。

参考文献:

[1] 郗彦凤,白文启,王晋芬,等. B 细胞特异性激活蛋白/CD30 双标记在经典型 Hodgkin 淋巴瘤中的表达及意义[J]. 中华病理学杂志,2007,36(2):136-137.

[2] 骆新兰,许洁,刘艳辉,等. HE 染色切片褪色后免疫组织化学染色抗原修复方法[J]. 中华病理学杂志,2007,36(1):59-60.

[3] 倪灿荣,马大烈,戴益民. 免疫组织化学实验技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2006:323-333.

[4] 周庚寅. 组织病理学技术[M]. 北京:北京大学医学出版社,2006:353-362.

[5] 陈凌,付丽. 利用激光显微切割技术提取高质量 RNA[J]. 中华病理学杂志,2005,34(10):680-682.

[6] 石善溶,石砚,Clive R Taylor. 抗原修复技术研究进展[J]. 中华病理学杂志,2007,36(1):7-9.

[7] Moon WS, Park HS, Yu KH, et al. Expression of betacellulin and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma: implications for angiogenesis[J]. Human Pathology, 2006, 37(10):1324-1332.

[编辑校对:刘红武]