DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.037
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
1584 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)17-1584-02

EDTA抗原修复缓冲液在ER、PR免疫组化染色中的应用

Application of EDTA in immunohistochemical staining of ER and PR

刘丽梅,柳凤轩,段光杰 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 选择能显示最佳的ER、PR染色效果的抗原修复液。方法 分别采用柠檬酸和EDTA两种抗原修复液对50例乳腺癌切片进行微波抗原修复,比较二者对ER、PR免疫组化检测效果的影响。结果 经EDTA修复后,乳腺癌ER、PR染色++/+++者分别为44.0%(22/50)、64.0%(32/50),显著高于经柠檬酸修复的染色效果24.0%(12/50)、24.0%(12/50),且前者背景清晰。结论 乳腺癌ER、PR免疫组化染色采用EDTA进行微波抗原修复后,染色阳性强度明显优于经柠檬酸修复者,值得推广应用。

检测组织切片上某些肿瘤细胞的雌激素受体(Estrogen receptor, ER)和孕激素受体(Progestogen receptor, PR),对指导临床内分泌治疗及推测肿瘤预后有重要意义。要做好雌、孕激素受体(ER、PR)免疫组化染色,抗原修复是一个重要的步骤,修复液的选择会直接影响ER、PR的免疫组化染色质量,本实验通过对柠檬酸和EDTA两种抗原修复液进行分析和比较,旨在探讨显示最佳的ER、PR染色结果的抗原修复液。

1 材料与方法

1.1 材料

收集本院手术切除有明确病理诊断的乳腺癌共50例,均用10%的福尔马林固定,常规脱水石蜡包埋,5 μm连续切片,每例各切4张(共200张)。

1.2 修复液

0.01 mol/L的柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0);EDTA抗原修复液0.001 mol/L的乙二胺四乙酸钠(pH 9.9)。

1.3 试剂

抗ER、PR单抗,EnVision™ System试剂盒均购自DAKO基因公司,均为即用型抗体。APES胶购自Sigma公司。

1.4 操作步骤

①5 μm厚石蜡切片,常规脱蜡至蒸馏水洗。②微波抗原修复:50例病例分为两组,一组为0.01 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.0);另一组为乙二胺四乙酸钠溶液(0.001 mol/L EDTA, pH 9.9)作为抗原修复液,分别置切片于两组抗原修复液中,于中火档微波(92 ℃)处理2×5 min,蒸馏水洗置于PBS中。③3%甲醇H_2O_2,10 min蒸馏水洗。④特异性一抗ER、PR(4 ℃过夜),PBS漂洗3×5 min。⑤EnVision™ 37 ℃孵育30 min,PBS漂洗3×5 min。⑥DAB显色、苏木精复染,常规封固。

2 结果

ER、PR表达均定位于胞核,以胞核呈棕黄色颗粒为阳性。染色结果判断标准:无阳性细胞着色或阳性细胞数<10%为阴性(-);阳性细胞数10%~25%为弱阳性(+);阳性细胞数25%~50%为中阳性(++);阳性细胞数>50%为强阳性(+++)。经EDTA微波抗原修复处理过的切片,ER、PR染色强度明显强于经柠檬酸钠修复者,而且背景清晰,结果见图1,2,表1。

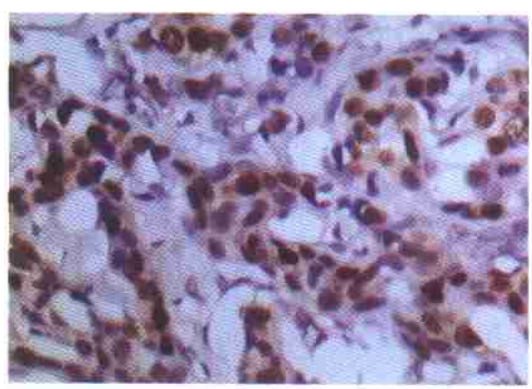


图1 经EDTA处理后,乳腺癌细胞ER强阳性,且背景清晰(EnVision×400)

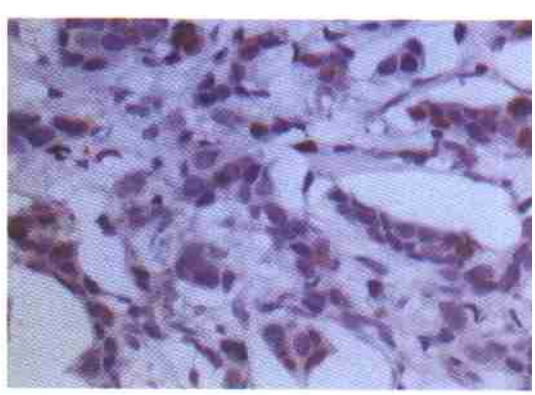


图2 经柠檬酸处理后乳腺癌细胞ER弱阳性 (EnVision×400)

作者简介:刘丽梅(1973-),女,四川省通江县人,技师,主要从事免疫组织化学方面的研究。电话:(023)68754434

收稿日期:2002-12-10;修回日期:2003-01-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 两种抗原修复液对乳腺癌组织 ER、PR 抗原修复效果的比较

组别	n	ER				PR			
		−	+	++	+++	−	+	++	+++
CB	50	13	25	11	1	6	33	10	2
EDTA	50	8	20	19	3	2	16	23	9

CB: 柠檬酸缓冲液; EDTA: 乙二胺四乙酸钠

3 讨论

ER 和 PR 是调节性器官细胞生长发育的雌激素和孕激素的受体, 有文献报道雌激素刺激乳腺管生长, 孕激素刺激乳腺腺泡生长。当乳腺管内上皮细胞异型增生而癌变时, 癌细胞仍保留其 ER 和 PR, 这意味着这些细胞功能仍然存在, 还保留着激素依赖性生长的特性, ER、PR 阳性率高, 说明细胞分化好, 恶性程度低, 对各种治疗有效, 尤其对内分泌治疗敏感性高, 与病人的预后和治疗有密切关系。因此, 对乳腺癌 ER、PR 的检测, 已作为许多病理科常规检测项目。

外检组织经过甲醛固定, 脱水, 透明及浸蜡过程, 组织中的抗原成分已被破坏或封闭, 为了充分暴露抗原, 普遍采用微波或高压锅使封闭的抗原成份暴露, 其原理尚不清楚[1]。由于组织中含有钙离子, 与蛋白质形成牢固的复合物, 产生了许多羟基(−OH)、羧酸根($-COOH^-$)、磷酸根(PO_4^{3-})。Morgan 等[2] 报道在福尔马林固定过程中钙离子和其它二价离子与蛋白质形成紧密复合物封闭抗原, 怎样使这些离子螯合成沉淀可能是抗原热修复的关键。因而抗原修复液的选择就显得很重要。在热修复中, 我们使用两种修复液: 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液、0.001 mol/L EDTA, 于微波抗原修复发现阳性强度 EDTA 明显强于柠檬酸, 这可能与 EDTA 是一种强螯和剂, 能与钙离子和其它二价离子有效结合, 形成螯合双价金属离子盐(螯合剂), 使钙离子与蛋白质解聚, 充分暴露抗原决定簇。柠檬酸盐与二价离子的结合力较差, 故阳性强度较 EDTA(pH 9.9)组弱。在染色中, 我们亦发现抗原修复的 pH 值很重要, 而与溶液的浓度关系不大。Shi 等[3] 强调修复缓冲液的 pH 对某些抗原的修复十分重要, 要获得满意的结果, 必须选择抗原修复的最适 pH。

通过对上述两种抗原修复液的比较, 我们认为用 EDTA 抗原修复液作为 ER、PR 的抗原修复液, 结合 EnVision™ System 免疫组化染色[4], 其染色阳性强度优于柠檬酸, 可以获得理想的结果, 值得推广应用。

关键词: 抗原修复; EDTA; 免疫组织化学染色
中图法分类号: R446 文献标识码: B

参考文献:

[1] 熊正文. 免疫组织化学技术中抗原修复的研究进展[J]. 中华病理学杂志, 1997, 26(2): 124−128
[2] Morgan J M, Navabi H, Schmid K W, *et al*. Possible role of tissue bound calcium inos in citrate-mediated High-temperatuye antigen retrieval[J]. J Pathol, 1994, 174(4): 301−307.
[3] Shi S R, Imam S A, Yong L, *et al*. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies[J]. J Histochem Cytochem, 1995, 43(2): 193−201
[4] 刘丽梅, 柳凤轩. EnVison System 在免疫组织化学方法中应用的体会[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(4): 491−492.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2003)17-1585-02

个案与短篇

$^{99}Tc^m$-MIBI 显像诊断异位甲状旁腺腺瘤合并结节性甲状腺肿 1 例

Ectopic parathyroid adenoma nodular goiter diagnosed with $^{99}Tc^m$-MIBI scintigraphy: a case report

李前伟 (第三军医大学附属西南医院核医学中心, 重庆 400038)

患者, 女, 19 岁, 因反复发作性游走性大关节疼痛 2 年, 加重伴乏力 1 月于 2001 年 6 月 13 日收入我院内分泌科。查体: 皮肤紧张, 甲状腺右叶外侧可扪及 2 cm×1.5 cm 结节, 随吞咽上下移动, 质中, 无压痛, 双膝关节内侧轻压痛, 下肢肌力Ⅳ级, 余无异常。实验室检查: 血清甲状旁腺激素(PTH) 1 730 ng/L (正常参考值< 200 ng/L), 血钙 2.88 mmol/L, 碱性磷酸酶 2 972 IU/L, 无机磷 1.02 mmol/L; 磷重吸收率降低(76.93%), 磷廓清率增加(14.07%); 骨密度测定示重度骨质疏松, X 线平片示骨质疏松; $^{99}Tc^m$-MIBI(555 MBq)双时相显像, 早期(15 min)左叶甲状腺轮廓清楚, 紧邻右叶下极见一局限性放射性浓聚影, 延迟相(90 min)上述浓聚影对比明显增强, 提示该部位存在代谢异常增高的组织, 结合临床判断为异位甲状旁腺腺瘤, 见图 1A。临床诊断甲状旁腺腺瘤伴功能亢进, 继发性骨质疏松。遂转外科手术

(下转 1590 页)

作者简介: 李前伟(1963−), 男, 贵州省安顺县人, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事肿瘤分子核医学显像与治疗方面的研究, 发表论文 8 篇。电话: (023)68754422

收稿日期: 2002-02-28; 修回日期: 2002-06-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net