DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.062
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0491-02

技术方法

EnVision System 在免疫组织化学方法中应用的体会

Experiences of application of EnVision System in immunohistochemical assays

刘丽梅,柳凤轩 (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 介绍 EnVision System 这种免疫组织化学染色技术的新方法。方法 分别用 EnVision System 与S-P 两种染色方法在40例活检组织中的各种抗体(CD44、Cytokeratin、ER、PR、GFAP、Vimentin)标记进行对比观察。结果 EnVision System 法的灵敏度、阳性强度都优于 S-P 法,而且非特异性着色浅,背景低,时间短。结论 相对于 S-P 法,EnVision System 法的确是一种灵敏度高、低背景、快速、操作方便的免疫组化染色新方法,值得在医院外科病理诊断中推广应用。

免疫组织化学是利用已知的特异性抗体与抗原的特异性结合来检测组织或细胞内某种物质的性质,并利用酶作用于底物所产生的颜色反应来显示某种物质的分布与细胞内定位的一种技术。自 Nakane(1966)建立免疫酶标技术以来,这门技术得到了迅速的发展,在科研和临床诊断已被广泛应用。现对 EnVision 免疫组化新方法进行介绍。

1 材料和方法

1.1 材料

本院活检标本共40例,其中乳腺癌10例、脑胶质瘤10例、肠癌10例、胃癌10例。10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,所有标本均取3~4μm厚切片4张备用。

1.2 试剂

第一抗体细胞角蛋白(Cytokeratin)、神经胶质原纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)、雌激素受体(Estrogen receptor, ER)、孕激素受体(Progesterone receptor, PR)、细胞粘附分子(CD44)、波形蛋白(Vimentin)以及 S-P 试剂盒(广谱型)均为 Maxim 公司产品;EnVision™试剂盒,编号为 K4001,购自丹麦 DAKO 公司。以上试剂均为即用型。

1.3 方法

乳腺癌分别染 ER、PR;脑胶质瘤分别染 GFAP、Vimentin;肠癌染 CD44;胃癌染 Cytokeratin。每例用1张进行 EnVision 法染色,另一张进行 S-P 法染色。阴性对照由 PBS 代替一抗,由已知阳性标本切片作阳性对照。

EnVision™法:(1)石蜡切片常规脱蜡到水。(2)预处理组织切片(根据第一抗体具体说明而定)。(3)3%H_2O_2 消除内在过氧化物酶5 min,蒸馏水漂洗,PBS 漂洗(4)一抗孵育30 min,PBS 漂洗3×5 min。(5)EnVision™孵育10~30 min,PBS 漂洗3×5 min。(6)DAB-H_2O_2 显色2~10 min,流水冲洗。(7)苏木素复染,常规封片。S-P 法:参照使用说明书进行。

2 结果

阳性物质呈棕黄色,因被检测组织所用一抗不同,分别定位于细胞膜(CD44);细胞浆(Cytokeratin);细胞核(ER、PR);细胞浆(GFAP);细胞浆(Vimentin)。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(+++)。EnVision™法与 S-P 法比较,见表1、2。

表1 EnVision™法与 S-P 法染色结果比较

第一抗体	n	EnVision™法			S-P 法		
		-	+	++~+++	-	+	++~+++
CD44	10	2	5	3	3	4	3
Cytokeratin	10			10		2	8
ER	10		1	9	1	3	6
PR	10		2	8	1	4	5
GFAP	10	1	3	6	1	2	7
Vimentin	10		1	9		2	8

表2 两种方法染色时间的比较(*t*/min)

项别	EnVision™法	S-P 法
石蜡切片脱蜡至水	30	30
3%H_2O_2	10	10
抗原修复或酶消化	20	20
血清		15
特异性一抗	30	60
生物素二抗		30
多聚物酶结合物(Streptavidin-HRP)	30	30
DAB	5	5
复染、封片	5	5
合计	130	205

3 讨论

常用的免疫组化如 S-P 法或 ABC、LSAB 法均为三步法,虽可获得比较满意的结果,但染色步骤多,所需时间长。在医院常规病理诊断中,需要及时、准确为患者提供诊断报告,应用近年丹麦 DAKO 公司推出的 EnVision™免疫组化新方法我们能达到这个效果。

EnVision™是两步法,该方法中的第二抗体是将特异性的抗体和辣根过氧化物酶(HRP)通过一个多聚葡聚糖骨架联接成一个多聚体(即 EnVision)。由于多聚体结构的特异性,可以连接更多的鼠、兔的免疫球蛋白,增强信号扩大系统,使第二抗体充分和第一抗体结合,具有更高的敏感性。EnVision™法是将传统的二抗

作者简介:刘丽梅(1973-),女,四川省通江县人,技师。电话:(023)68754000-73107

收稿日期:2000-04-26;修回日期:2000-10-11

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

与三抗分别孵育合成一次孵育，第二抗体不存在生物素，因而避免了内源性生物素干扰，不会出现交叉反应的现象，因此 EnVision™ 法背景染色优于 S-P 法或 LSAB 法。此外，EnVision™法是两步法，只需第一抗体和第二抗体分别孵育 10～30 min，即可显色镜下观察结果，反应时间大大地缩短。用时只需滴加，省去了抗体的配置、稀释、测试等步骤。通过 60 例的各种抗体（CD44、Cytokeratin、ER、PR、GFAP、Vimentin）应用进行了对比观察以及一年来我科在临床病理诊断中的应用我们认为，EnVision™法与 S-P 法或 LSAB 法相比，的确是一种灵敏度高、低背景、快速、操作方便的免疫组化染色新方法，值得在医院外科病理诊断中推广应用。

关键词：EnVision 法；应用
中图法分类号：R446 文献标识码：B

参考文献：

[1] Elias J M, Margiotta M. Gaborc D. Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods [see comments] [J]. Am J Clin Pathol, 1989, 92(1): 62—67.
[2] Shi Z R, Itzkowitz S H, Kim Y S. A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues[J]. J Histochem Cytochem, 1988, 36(3): 317—322.
[3] 任占平. 应用 SP 免疫组化染色法的体会[J]. 诊断病理学杂志, 1994, 1(3): 176.

（编辑 冯崇英）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)04-0492-01

脑桥中央髓鞘溶解症 1 例报道

A case report of central pontine myelinolysis

黄 文，周华东，陈曼娥 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所脑血管病二科，重庆 400042）

患者，女，63 岁，因“反复中上腹隐痛 3 年，加重 1 月”入当地医院。当时查体神经系统无明显阳性体征。患者因长期慢性胃炎导致营养不良。患者入院后第 2 天大便后，出现四肢无力，进行性加重，初尚能言语，后发展致四肢迟缓性瘫痪，不能言语，精神科会诊，诊断为“亚木僵状态”，头颅 MRI 提示脑桥基底部基本对称的长 T1，长 T2 信号，转入神经内科治疗，再次头颅 MRI 检查提示脑桥基底部对称性的长 T1 长 T2 信号，诊断为桥脑中央髓鞘溶解症。给予营养神经，改善循环，清除自由基等治疗。出院时，患者构音不良，双下肢肌力Ⅴ级，右上肢为Ⅴ级，左上肢为Ⅳ级，伴左上肢疼痛，双侧病理症（＋）。此次因“左上肢疼痛无力”到我院神经内科就诊。入院时查：神志清楚，构音不良，咽反射灵敏，无明显面瘫，双下肢肌力Ⅴ级，右上肢Ⅴ级，左上肢Ⅳ级，感觉检查均正常，共济检查除左上肢因无力较差外，其他均正常。双侧病理征（＋），颈抵抗二横指，Kernig 征（－），Brudzinski 征（－）。入院后给予营养神经、改善脑循环、针灸理疗等治疗，左侧上肢痛消失，肌力恢复到Ⅴ级弱，好转出院。患者因经济原因未做 MRI 复查。

讨论

桥脑中央髓鞘溶解症（Central pontine myelinolysis，CPM）是一种临床少见而危重的疾病，由 Adams 于 1959 年首次报道[1]，临床表现与脑桥梗塞极相似，很难将两者区分开来。CPM 诊断依据中最具特异性的表现为影像学，MRI 可见桥脑及其他地方对称弥散的长 T1、长 T2 信号，而脑室系统形态对称无变形、中线结构无移位。

CPM 的发病机制尚不清楚，一般认为是低血钠造成，也有人认为是纠正低血钠速度过快。Schmidt 等[2]报道酗酒患者出现低血钠时，即使纠正钠的速度很慢，也可出现 CPM，因此认为酗酒是 CPM 的诱因。Laureno 等[3]通过向狗重复注射垂体后叶加压素和腹腔注水使狗呈严重低血钠状态，然后用高渗盐水纠正低血钠状态。在血钠恢复正常的同时，狗出现了四肢僵直性无力。将狗解剖后发现在桥脑和桥脑外出现与人 CPM 在病灶分布和组织学特性相一致的改变。如果只有低血钠状态或缓慢纠正低血钠状态，则不出现上述情况。Mckee 等[4]认为血中极度高渗状态比快速或过度纠正低血钠状态在 CPM 发病中更有意义。总之，本病的发病机制可能与脑内某些区域，特别是桥脑基底部中央区对某些代谢缺陷存在着特殊易损伤性有关。

预防该病的发生，多数作者强调纠正低钠不可过快，慎重应用高渗盐水，应限制液体总入量。目前该病尚无特殊治疗，脱水疗法及纠正电解质紊乱可以试用，同时应加强营养和控制感染。该病的预后较差，但也有完全康复的报道。

关键词：脑桥中央髓鞘溶解症；诊断
中图法分类号：R742.89 文献标识码：B

参考文献：

[1] Brunner J E, Redmond J M, Haggar A M, *et al*. Central pontine myelinolysis and pontine lesions after rapid correction of hyponatremia: a prospective magnetic resonance imaging study[J]. Ann Neurol, 1990, 27(1): 61—66.
[2] Schmidt J A, Krause A, Feddersen C O, *et al*. Central pontine myelinolysis following severe hyponatremia[J]. Klin Wochenschr, 1990, 68(3): 191—198.
[3] Laureno R, Karp B I. Pontine and extrapontine myelinolysis following rapid correction of hyponatraemia[J]. Lancet, 1988, 1(8 600): 1 439—1 441.
[4] Mckee A C, Winkelman M D, Banker B Q. Central pontine myelinolysis in severely burned patients: relationship to serum hyperosmolality[J]. Neurology, 1988, 38(8): 1 211—1 217.

（编辑 薛国文）

作者简介：黄 文（1972－），男，重庆市垫江县人，硕士，医师，主要从事缺血性脑血管病方面的研究。电话：(023)68704390

收稿日期：2000-07-05；修回日期：2001-01-03

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