文章编号: 1000-5404(1999)12-0877-03

骨髓活检组织的免疫组织化学和核酸原位杂交研究

张林生[1],蒲 晓允[2] (第三军医大学: [1]附属西南医院血液内科; [2]医学检验系临床检验学教研室; 重庆 400038)

【提要】 目的: 建立既适用于常规病理检验又可进行免疫组化及核酸原位杂交研究的骨髓活组织检查方法。方法: 活检标本 10例,用 Lowy FMA液固定、脱钙,石蜡包埋。切片行常规染色、TGFβ1和 MIP-1α免疫组化及地高辛标记 DNA探针 mRNA原位杂交。结果: HE染色、鼠源性单抗和兔源性多抗的免疫组化及不同长度探针的 mRNA原位杂交均取得理想的效果。结论: Lowy FMA液固定、脱钙后石蜡包埋的骨髓活检组织不仅能满足常规病理检验需要,且适用于不同条件的免疫组化及原位杂交研究。

关键词 骨髓活检; 免疫组织化学; 原位杂交
中图法分类号 R550.2 文献标识码 A

免疫组织化学和核酸原位杂交技术可在组织原位显示基因转录或蛋白质表达水平,是分子病理学的重要研究手段。目前骨髓病理中广泛应用的塑料包埋技术处理的活检标本不能进行免疫组织化学和核酸原位杂交研究,限制了其在科研中的应用。国内尚未见骨髓活检组织进行核酸原位杂交研究的报告。本研究应用 Lowy FMA固定、脱钙液处理骨髓活检组织,石蜡包埋切片进行常规染色、TGFβ和 MIP-1α免疫组化及 DNA-RNA原位杂交,取得良好效果,现简要报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

骨髓组织标本 10例,取自非造血系统疾病,由于其他原因进行骨髓活检并经血象及骨髓涂片检验正常的患者。年龄 12~72岁,男 4例,女 6例。

1.2 取材方法

螺旋式活检针常规取材,取出骨髓组织直径 3 mm 长 10 mm左右,立即置 Lowy FMA液中。

1.3 Lowy FMA液

按 Gaulier等[1]的报告配制。氯化汞 20 g加入 60 ml双蒸水煮沸溶解,加 40% 甲醛 100 ml,冰乙酸 50 ml,双蒸水补足至 1 000 ml。

1.4 标本处理

活检组织在 Lowy FMA液中固定、脱钙 22~24 h,转入 70% 乙醇,常规脱水、透明及石蜡包埋、切片。载玻片涂以 APES防脱片胶。

1.5 TGFβ1及 MIP-1α免疫组织化学染色

美国 Lab Vision公司的 Ultravision Detection System药盒,按说明书提供的步骤进行。兔抗人 TGFβ1为 Santa Cruz公司产品,鼠抗人 MIP-1α抗体为 Pepro Tech公司产品。PBS代替一抗作阴性对照。

1.6 TGFβ1及 MIP-1α的 mRNA原位杂交

地高辛标记 cDNA探针原位杂交主要参考蔡文琴等[2]的方法进行。TGFβ1 cDNA由西南医院妇产科梁智清博士提供; MIP-1α cDNA由英国 Beatson癌症研究所 Graham博士赠送。酶切后探针片段长度分别为 1 500 bp及 300 bp,用宝灵曼公司的 DIG High prime labeling and detection starter Kit Ⅰ按药盒说明进行探针标记、检测。原位杂交主要步骤如下: 切片常规脱蜡水化。3% Triton X-100/PBS 25 min; 5μg/ml蛋白酶 K 37℃, 30 min; 1% 甘氨酸-PBS 1 min; 4℃ 4% 多聚甲醛 15 min; 新配 0.25% 醋酐-0.1 mol/L三乙醇胺 10 min; 预杂交 1~2 h; 每片按探针浓度 2μg/μl加杂交液 20μl,湿盒内 44℃杂交 24 h; 2× SSC洗 15 min× 2; 1× SSC, 0.5× SSC各洗 15 min; 0.05 mol/L PBS 10 min× 2; 1∶1 000 Anti-Dig-AP室温 12 h; 0.05 mol/L PBS洗 10 min× 3; pH 8.0~9.5的 Tris HCl-NaCl-MgCl (TSM)缓冲液各 10 min× 2; NBT/BCIP显色 5 h; 部分标本甲绿复染 15 min; 脱水,中性树胶封片观察。每组以不加探针的杂交液作阴性对照。

2 结果

2.1 制片与常规染色

标本脱钙效果非常理想,较 Clayden氏 5% 硝酸脱钙时切片更加顺利,未遇到骨刺脱钙不完全现象。常规 HE染色见骨髓组织结构保存完好,细胞分布及定位正常,高倍镜下大部分细胞形态可大略辨认。

2.2 免疫组织化学染色

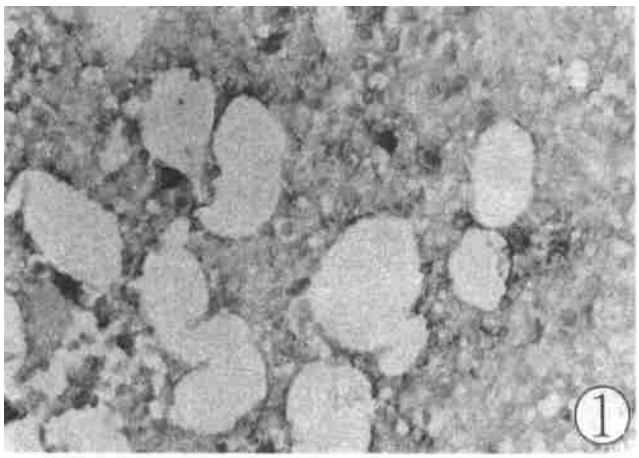
鼠源性 MIP-1α单克隆抗体及兔源性 TGFβ1多克隆抗体进行免疫组化染色均获得较好效果,但可见较明显的背景染

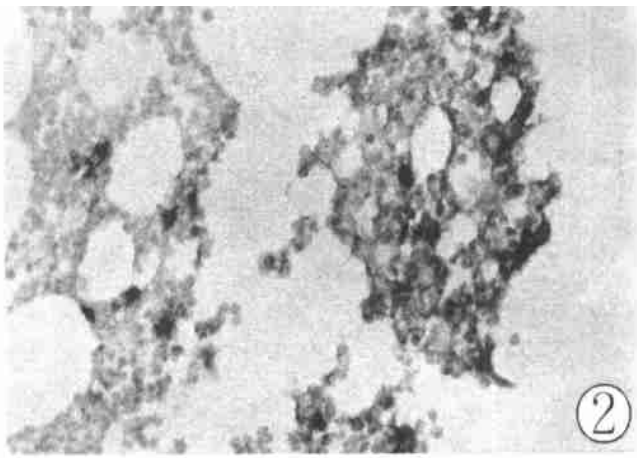
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39600052)
作者简介: 张林生,男, 1966.04.24生,福建省上杭县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事造血干细胞移植方面的研究,发表论文 6篇。电话: (023)68754353
收稿日期: 1999-03-02 修回日期: 1999-11-03
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

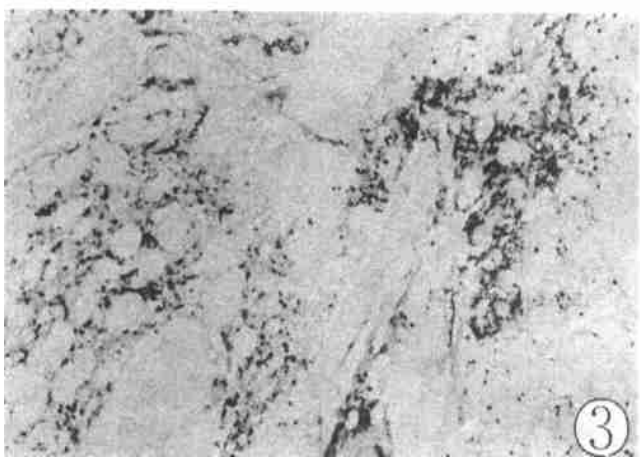
色,加用抗原热修复后信噪比有所改善,见图 1 2 阴性对照切片细胞浆未见任何染色。

2.3 mRNA原位杂交

尽管 MIP-1α 与 TGFβ1的 DNA探针长度差距较大,在完全相同的杂交条件下,二者均取得了良好的杂交效果,其背景及信噪比优于免疫组化染色。石蜡块保存时间最长为 7个月,对杂交效果没有影响,见图 3 4。对照切片未见任何阳性信号。对 MIP-1α 和 TGFβ1的阳性细胞计数初步分析,免疫组化与原位杂交之间 10个高倍视野阳性细胞数有显著相关性 (MIP-1α,r= 0.8984; TGFβ1,r= 0.8547)。







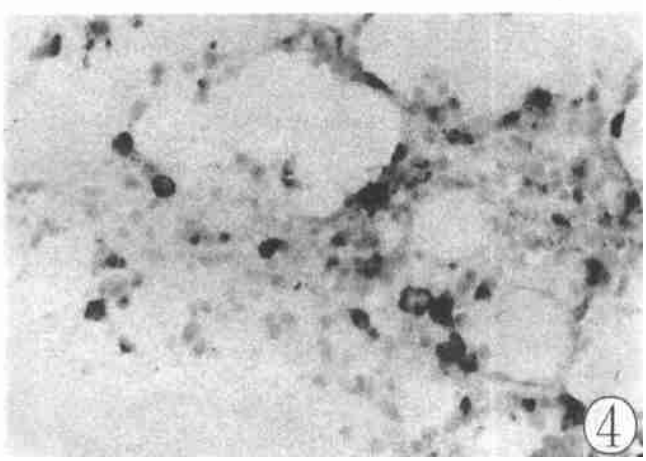


图 1 正常骨髓组织 TGFβ1免疫组化染色 (S-P× 400)

Fig 1 TGFβ1 immunohistochemistry of normal bone marrow biopsy tissue (S-P× 400)

图 2 正常骨髓组织 MIP-1α 免疫组化染色 (S-P× 400)

Fig 2 MIP-1α immunohistochemistry of normal bone marrow biopsy tissue (S-P× 400)

图 3 TGFβ1原位杂交,未复染,显示骨髓结构及阳性细胞信号 (ISH× 100)

Fig 3 *In situ* hybridization of TGFβ1, without counterstain, showing bone marrow structure and positive signal (ISH× 100)

图 4 MIP-1α 原位杂交,甲绿复染,显示阳性细胞及其细胞核 (ISH× 400)

Fig 4 *In situ* hybridization of MIP-1α, counterstain with methyl green, showing positive cells and their nuclei (ISH× 400)

3 讨论

骨髓活组织检查可以原位分析造血情况,在血液病临床诊断及研究中的应用价值日益受到重视。与一般组织不同的是,骨髓组织石蜡包埋前需要强烈的脱钙处理,通常使用 5% ~ 20% 的甲酸或 5% 硝酸脱钙 1~ 6 h。脱钙后结构容易破坏,细胞显著缩小,影响结果观察。脱钙不全则切片时易发生骨刺崩裂,损伤组织结构。这促成了塑料包埋技术的广泛应用[3]。但进行免疫组织化学和核酸原位杂交研究仍然依赖于石蜡包埋切片,因此近年国内外进行了较多探讨[4]。

我们根据 Gaulier等[1]的报告。应用 Lowy FMA液处理骨髓活检标本作石蜡包埋。Lowy FMA液用 5% 冰醋酸脱钙 22~ 24 h,比较温和,速度适中而脱钙完全,切片非常顺利。其中甲醛含量仅 4%,浓度较低,24 h以内不会导致过度固定,因此不影响免疫组化和原位杂交实验。二者结合不仅固定与脱钙同时完成,甲醛还可保护细胞免遭酸的损害。实验证明,其脱钙效果优于我院病理科常规应用的脱钙方法,HE染色证实骨髓组织结构及细胞形态均得到很好的显示,完全可

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

以满足临床病理检验的要求。

鼠源性单克隆抗体及兔源性多克隆抗体进行免疫组化研究显示,染色效果比较理想,背景染色可能反映基质中这些因子的存在。保存达 7个月的石蜡块切片进行 RNA原位杂交同样取得了理想的结果,提示该方法可用于长期保存标本的研究。免疫组化与原位杂交之间阳性细胞数有显著相关性,提示实验结果可靠,未受其他客观条件的明显干扰。

骨髓细胞涂片进行免疫组化和原位杂交的研究国内早有报告,但造血调控很大程度上都属于自分泌与旁分泌作用,因此在造血组织原位显示这些因子的表达尤其重要。我们建立的骨髓组织免疫组化和原位杂交技术具有简便、稳定的特点,可利用常规骨髓活检保存的石蜡块进行研究,值得推广应用。

参考文献

[1] Gaulier A, Fourcade C, Szekeres G, *et al*. Bone marrow one step fixation-decalcification in Lowy FMA solution: An immunohistological and in situ hybridization study[J]. Pathol Res Pract, 1994, 190(12): 1149-1161.

[2] 蔡文琴,王伯龙.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M].四川:四川科学技术出版社,1994. 406-422.

[3] 蒲 权.骨髓活组织的检查与诊断[M].广西:广西师范大学出版社,1988. 6-15.

[4] Blythe D, Hand N M, Jackson-P, *et al*. Use of methyl methacrylate resin for embedding bone marrow trephine biopsy specimens[J], J Clin Pathol, 1997, 50(1): 45-49.

(编辑 汪勤俭)

Study of bone marrow biopsy samples with immunohistochemistry and *in situ* hybridization

ZHANG Lin-sheng, PU Xiao-yun (Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To establish a method that may fulfill the need for routine pathological examination, immunohistochemistry and *in situ* hybridization researches of bone marrow biopsy samples. Methods: After fixation and decalcification with Lowy FMA solution, bone marrow biopsy samples were stained routinely as well as with immunohistochemistry and *in situ* hybridization of TGF-β1 and MIP-1α. Results: The samples showed a good preservation of morphology in routine examination while immunohistochemistry and *in situ* hybridization with different antibodies and probes achieved perfect staining too. Conclusion: Fixation and decalcification of bone marrow biopsy samples with Lowy FAM solution may not only be used as a routine method for clinical bone marrow pathological examination, but also provide a perfect procedure for immunohistochemistry and *in situ* hybridization research.

Key words bone marrow biopsy; immunohistochemistry; *in situ* hybridization

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39600052)

文章编号: 1000-5404(1999)12-0879-01

控制性过度通气和纳洛酮辅助抢救重度休克并发脑疝成功 1例

Emergency treatment of infantile severe shock complicated with cerebral hernia with controlled hyperventilation and naloxone

张雨平,李为明,刘 立 (第三军医大学附属新桥医院儿科,重庆 400037)

1 临床资料

患者,男,1岁 4个月,因“坠入酒糟池后 2 h”于 1996年 12月 9日急诊入院。溺池数分钟被救起,已无呼吸,心跳“微弱”,脉搏未扪及。当地医生做人工呼吸至有自主呼吸后送我院,途中出现抽搐。入院查体:体温 36.1℃,脉搏 112次/min,呼吸 24次/min,体重 10 kg,血压 0,深昏迷,四肢强直,唇周发绀,呼吸深大,不规则,双肺满布干鸣音。入院后血气分析:pH 6.934, $PaCO_2$ 11.27 kPa, PaO_2 2.4 kPa, HCO_3^- 18.1 mmol/L。肾功:

作者简介:张雨平,女,1972.07.07生,四川省雅安市人,在读硕士生,住院医师。电话:(023)68755192

收稿日期:1999-07-15;修回日期:1999-10-21

(下转 883页)

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