

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.039

混合甲醛固定液固定大肠癌淋巴结标本的最佳免疫组化效果研究*

卢志承 陈世梁 符志龙 吴文川 陈春吉

(海南省人民医院病理科 海南 海口 570311)

摘要 目的:探讨混合甲醛固定液固定大肠癌淋巴结标本的最佳免疫组化效果。**方法:**采用不同 pH 值(6.0、7.0、8.0)的混合甲醛固定液对 39 枚大肠癌淋巴结标本进行不同时间(<6 h、6 h-12 h、1 d-7 d)的固定处理。以细胞角蛋白 20(CK20)为目标抗原,运用 Olympusdp 70 图像采集分析仪抽选出混合甲醛固定液最佳免疫组化染色的 pH 值及固定时间。**结果:**经 pH 值为 7.0 混合甲醛固定液处理后,阳性率为 92.31%,高于经 pH 值为 6.0、8.0 的混合甲醛固定液处理后的 76.92%、74.36%,且经 pH 值为 7.0、8.0 处理后的阳性率比较有统计差异($P<0.05$)。混合甲醛固定液的固定时间在 6 h-12 h 时的阳性率为 94.87%,高于固定时间为 <6 h、1 d-7 d 处理的 30.77%、76.92%($P<0.05$)。**结论:**对于大肠癌淋巴结标本,以 CK20 为目标抗原,选择 pH 值为 7.0 的混合甲醛固定液固定 6 h-12 h 能够得到质量较佳的免疫组化染色效果。

关键词:混合甲醛固定液;不同 pH 值;不同时间;免疫组化;大肠癌淋巴结标本;细胞角蛋白 20

中图分类号:R73535;R446.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)12-2379-04

Best Immunohistochemical Effect of Mixed Formaldehyde Fixative for Colorectal Cancer Lymph Node Specimens*

LU Zhi-cheng, CHEN Shi-liang, FU Zhi-long, WU Wen-chuan, CHEN Chun-ji

(Department of Pathology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, Hainan, 570311, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the best immunohistochemical effect of mixed formaldehyde fixative for colorectal cancer lymph node specimens. **Methods:** A total of 39 cases of colorectal cancer lymph node specimens were fixed treatment at different time (<6 h, 6 h-12 h, 1 d-7 d) by different pH values (6.0, 7.0, 8.0) of mixed formaldehyde fixative. The cytokeratin 20 (CK20) was used as the target antigen. Olympusdp 70 image acquisition analyzer was used to extract the best pH value and fixation time of mixed formaldehyde fixative. **Results:** After mixed formaldehyde fixative treated by pH values 7.0, the positive rate was 92.31%, which was higher than 76.92% and 74.36% of mixed formaldehyde fixative treated by pH values 6.0 and 8.0 respectively. And there were statistical differences between the positive rate after treated by pH values 7.0 and 8.0 ($P<0.05$). The positive rate of mixed formaldehyde fixative at 6 h-12 h was 94.87%, higher than 30.77% and 76.92% at the fixed time less than 6 h and 1 d-7 d. **Conclusion:** For colorectal cancer lymph node specimens, CK20 is used as the target antigen, a better quality of immunohistochemical stain effect could be obtained by fixing for 6 h-12 h with mixed formaldehyde fixative of pH values 7.0.

Key words: Mixed formaldehyde fixative; Different pH values; Different time; Immunohistochemical; Colorectal cancer lymph node specimens; Cytokeratin 20

Chinese Library Classification(CLC): R73535; R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)12-2379-04

前言

免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)又可称之为免疫细胞化学,是用标记的特异性抗体(或者是抗原)对组织内抗原(或者是抗体)分布情况进行组织和细胞原位检测技术,对探索疾病的发病机制、鉴别诊断提供有力的技术支持^[1-3]。随着石蜡切片、特殊染色、分子遗传学以及免疫组化在临床病理诊断上的普遍应用,实验室对组织标本的处理要求亦越来越严格^[4-6]。组织固定是组织标本处理过程中的一项重要环节,如固定时间及温度不适,固定试剂选择不当、量过少、浓度不均等都会引起

组织固定不良,导致制片质量不佳,影响免疫标记结果以及分子生物学分析效果,致使抗原检测效果存在着较大的差异,比如造成检测结果的假阳性,最终影响病理诊断^[7,8]。在标本免疫组化的过程中,固定时间是极其重要的关键点,另外,免疫组化中的背景染色和染色强度受固定液 pH 值的影响^[9,10]。因此,合适的固定液和固定时间对免疫组化技术的作用非常重要。为探寻混合甲醛固定液固定大肠癌淋巴结标本的最佳免疫组化效果,本实验从不同 pH 值以及不同固定时间两方面进行免疫组化染色效果探讨,现报道如下。

* 基金项目:海南省医学科研基金资助项目(20140163)

作者简介:卢志承(1977-),男,本科,主治医师,从事病理方面的研究, E-mail: poyyrl@163.com

(收稿日期:2018-10-31 接受日期:2018-11-24)

1 资料和方法

1.1 仪器与试剂

采用德国 Autostainer 720 型的全自动免疫组化机以及 Thermo HMS740 型全自动染色机, 标本固定液为 6.0、7.0、8.0 不同 pH 值的混合甲醛固定液, 细胞角蛋白 20(Cytokeratin 20, CK20)mAb、二抗以及染色试剂盒均购自美国 SantaCnu 公司。

1.2 标本预处理

将收集的 39 枚大肠癌淋巴结标本, 将其切取成 1.3 cm×1.0 cm×0.3 cm 的大小, 固定在 pH 值为 6.0、7.0、8.0 的混合甲醛固定液中, 固定时间分别为 <6 h、6 h-12 h、1 d-7 d 后取出, 常规脱水后进行浸蜡、包埋等处理, 将其放置温箱中, 温箱温度设置为 60℃, 烘烤 1 h。

1.3 免疫组化染色

采用 LSAB 法染色, 在进行染色前, 先行组织切片, 然后置于 60℃ 的温箱中保存 12 h, 经二甲苯、梯度乙醇脱水处理后, 在 3 mL/L 的 H₂O₂ 中停留 20 min, 高压煮沸 3 min。用 PBS 代替一抗做染色阴性对照, 大肠癌组织做阳性对照。CK20 表达阴性为正常组织细胞, CK20 阳性为大肠癌组织细胞。为了保证检测结果的客观性以及可信度, 每张组织切片均在相同条件下予以免疫组化染色。

1.4 图像分析与量化

运用 Olympusdp 70 图像采集分析仪挑选出混合甲醛固定液最佳免疫组化染色的 pH 值及固定时间^[1]。细胞染色强度分为无染色、染色弱、中等染色、染色强, 分别对应 0、1、2、3 分。细胞阳性表达率分为 <1%、1%-10%、11%-50%、51%-80%、>80%, 分别对应 0、1、2、3、4 分。以细胞阳性表达率与染色强度之和计算评分, 0-2 分计为阴性(-), 3-5 分计为阳性(+), 6-7 分计为强阳性(++)。阳性率=(阳性+强阳性)/总标本数×100%。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 进行统计分析, 免疫组化染色结果为计数资料, 以率表示, 实施 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同 pH 值混合甲醛固定液处理后标本免疫组化染色结果比较

对 39 枚大肠癌淋巴结标本, 采用不同 pH 值混合甲醛固定液行固定处理 12 h, 观察不同 pH 值对免疫组化效果的影响。结果显示, 经 pH 值为 7.0 混合甲醛固定液处理后, 阳性率为 92.31%, 高于经 pH 值为 6.0、8.0 的混合甲醛固定液处理后的 76.92%、74.36%, 且经 pH 值为 7.0、8.0 处理后的阳性率比较有统计差异($P<0.05$), 详见表 1。

表 1 不同 pH 值混合甲醛固定液处理后标本免疫组化染色结果比较[n(%)]

Table 1 Comparison of immunohistochemical staining results of treated by different pH values mixed formaldehyde fixative[n(%)]

pH values mixed formaldehyde fixative	Immunohistochemical staining results			Positive rate
	-	+	++	
6.0	9	12	18	30(76.92)
7.0	3	10	26	36(92.31)
8.0	10	19	10	29(74.36)*

Note: Compared with pH values were 7.0, * $P<0.05$.

2.2 对比不同固定时间标本免疫组化染色结果

39 枚大肠癌淋巴结标本, 采用 pH 值为 7.0 的混合甲醛固定液分别固定 <6 h、6 h-12 h、1 d-7 d, 结果显示: 混合甲醛固定液

的固定时间在 6 h-12 h 时的阳性率为 94.87%, 高于固定时间为 <6 h、1 d-7 d 处理的 30.77%、76.92%($P<0.05$), 详见表 2。

表 2 不同固定时间标本免疫组化染色结果比较[n(%)]

Table 2 Comparison of immunohistochemical staining results of specimens at different fixed time[n(%)]

Fixed time	Immunohistochemical staining results			Positive rate
	-	+	++	
<6 h	27	7	5	12(30.77)*
6 h-12 h	2	10	27	37(94.87)
1 d-7 d	9	11	19	30(76.92)*

Note: Compared with fixed time was 6 h-12 h, * $P<0.05$.

3 讨论

免疫组化染色作为实验室病理检测的一项重要工具, 可为临床诊断提供有效参考, 临床应用比较广泛^[12-14]。虽然近年来临床检验室、病理实验室操作已经逐渐趋于自动化, 所用试剂质量亦有大幅度提升, 但仍然存在标本免疫组化检测结果不稳定

情况^[15,16]。其中组织固定及处理作为病理实验室检验操作的第一步, 其成功与否对标本的检测质量具有直接的决定性作用, 它不仅直接影响着病理切片的制作质量, 还影响着免疫组化结果^[17,18]。在日常病理组织标本制备过程中, 实验室多采用甲醛进行组织固定处理, 但甲醛存在易挥发、刺激腐蚀性强、高毒性、易导致标本酸化、废液需特殊处理等缺点, 存放过久易产生

三聚甲醛,影响标本固定效果^[19,20]。尽管甲醛存在上述缺点,但是由于其价廉,对组织渗透能力强、固定均匀、能较好地保存组织结构,因此至今仍被人们普遍所接受,一直是病理实验室一种常用的组织固定液,适用于无特殊要求的组织染色^[21,22]。

组织固定的过程是利用某些化学试剂将组织浸润,致使组织内的细胞的形态结构及内物质均处于静止固定状态^[23,24]。在免疫组化染色操作过程中,不同的抗原或固定液的类型均会影响组织结构的保存及其抗原性的改变程度,并且 pH 值、环境温度、灌注速度也是不稳定因素,固定后的处理方法也直接决定着检测结果的质量,因此,免疫组化染色中的固定处理作用非常重要,其处理恰当直接影响着结果^[25,26]。本研究考察了混合甲醛固定液的 pH 值及固定时间对免疫组化染色的影响,实现免疫组化染色最佳效果,经研究结果显示,39 枚大肠癌淋巴结标本通过 pH 值为 7.0 混合甲醛固定液处理后,阳性表达率最高,这可能是由于当 pH 值为 6.0 时,混合甲醛固定液呈酸性,在处理过程中,组织中的产物相互作用,产生福尔马林色素,其容易被作为阳性物质而影响检测结果,并且,随着 pH 值的降低,混合甲醛固定液处理过程中的重聚现象会加重,最终影响固定结果。当混合甲醛固定液处于碱性环境下,如 pH 值为 8.0 时,一定程度上破坏了抗原细胞的形态,降解或扩散了组织中的抗原和核酸,导致细胞浆肿胀、细胞膜弥散,影响了抗原抗体的结合反应,免疫组化染色定位会出现较大偏差,并且背景染色的出现也会影响病理医生观察免疫组化切片中的组织形态。而中性 pH 值环境下,即 pH 值为 7.0 时,混合甲醛固定液能避免产生福尔马林色素,人工假象明显减少。并且,活体细胞的 pH 值大约为 7.0-7.4,中性环境下接近活体细胞的 pH 值^[27,28]。由此可见,固定液 pH 值可直接影响组织细胞的背景染色和染色强度,应选择 pH 值为 7.0 的混合甲醛固定液进行标本固定。

本实验结果还显示,混合甲醛固定液的固定时间在 6 h-12 h 时的阳性率 94.87%,高于固定时间为 <6 h、1 d-7 d 处理的 30.77%、76.92% ($P<0.05$)。当固定时间 <6 h 时,可能由于固定时间不足,并且组织固定时间太短,导致组织形态结构杂乱或是残缺,也有可能是只固定了组织表面的蛋白,但中间组织却为被及时固定,致使抗原发生弥散,降低了免疫组化结果的阳性信号强度,分布、定位不准,出现假阴性或者是假阳性。当固定时间在 1 d-7 d 时,可能甲醛与空气接触时间过长,容易氧化,进而产生甲酸等物质,导致溶液呈现酸性状态,或者还会形成福尔马林色素和黑色素,影响切片的染色程度,干扰整体染色情况以及定量分析结果的准确度。并且较长的固定时间容易引起组织硬化,缩小其体积,时间较长的组织内容易形成甲醛色素,其与含铁血黄素相混淆,严重影响病理诊断结果^[29,30]。因此,固定液要具有渗透快、减少细胞自溶性变化、不改变组织细胞原来态、保持组织细胞内抗原活性等特点。

综上所述,pH 值为 7.0 环境下大肠癌淋巴结标本经混合甲醛固定液行固定处理 6 h-12 h 的阳性率较高,免疫组化染色效果最好。

参考文献(References)

- [1] 胡宁,丁辉,陈丽,等.免疫组织化学和骨髓形态学检测在非霍奇金淋巴瘤诊断和临床分期中的应用价值[J].中国实验血液学杂志,2018,26(2): 449-453
- [2] Bărbălan A, Nicolaescu AC, Măgăran AV, et al. Immunohistochemistry predictive markers for primary colorectal cancer tumors: where are we and where are we going?[J]. Rom J Morphol Embryol, 2018, 59(1): 29-42
- [3] Sidorin AV, Abrosimov AY, Rogunovich TI, et al. Clinical, morphological, and prognostic features of papillary thyroid carcinoma with different BRAF mutational status assessed by immunohistochemistry[J]. Arkh Patol, 2018, 80(3): 19-25
- [4] Valencia-Guerrero A, Dresser K, Cornejo KM. Utility of Immunohistochemistry in Distinguishing Primary Adnexal Carcinoma From Metastatic Breast Carcinoma to Skin and Squamous Cell Carcinoma[J]. Am J Dermatopathol, 2018, 40(6): 389-396
- [5] 张洁,徐长福,莫立平,等.CD11c 在新生儿及成人指皮组织表达的免疫组织化学研究[J].现代生物医学进展,2016,16(31): 6038-6041
- [6] Gupta P, Bhardwaj M. Sinonasal malignant melanoma with metastasis: Immunohistochemistry meeting the diagnostic challenge[J]. J Cancer Res Ther, 2018, 14(3): 709-711
- [7] 王耀辉,朱长乐,司海鹏,等.免疫组织化学在溃疡性结肠炎诊断中作用研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2015,29(1): 13-15
- [8] Mathieson W, Marcon N, Antunes L, et al. A Critical Evaluation of the PAXgene Tissue Fixation System: Morphology, Immunohistochemistry, Molecular Biology, and Proteomics[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 146(1): 25-40
- [9] Cheung CC, Swanson PE, Nielsen S, et al. Uneven Staining in Automated Immunohistochemistry: Cold and Hot Zones and Implications for Immunohistochemical Analysis of Biopsy Specimens[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2018, 26(5): 299-304
- [10] 黎相照,薛小磊,张中满,等.免疫组化染色检测脑胶质瘤 IDH1 的优化及染色特点[J].中华神经医学杂志,2016,15(6): 558-562
- [11] 乔秀玲.不同固定液和固定时间对大肠癌淋巴结免疫组化染色的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(5): 504-505
- [12] Xiong DD, He RQ, Lan AH, et al. Clinical significances of p27 in digestive tract cancers: a comprehensive analysis on immunohistochemistry staining, published literatures, microarray and RNA-seq data[J]. Oncotarget, 2018, 9(15): 12284-12303
- [13] Liu X, Pai RK, Zhao L, et al. Colorectal Carcinomas with Isolated Loss of PMS2 Staining by Immunohistochemistry[J]. Arch Pathol Lab Med, 2018, 142(4): 523-528
- [14] 林梅英,李伟,王伟源.免疫组化染色在肺腺癌胸水涂片褪色后的应用研究[J].临床肺科杂志,2018,23(3): 410-412
- [15] 隋燕霞,柳雨,蒋娜,等.142 例恶性胸水细胞蜡块的免疫组化检测及分子病理检测[J].临床与实验病理学杂志,2017,33(3): 292-296
- [16] Mu L, Chen J, Li J, et al. Immunohistochemical Detection of Motor Endplates in the Long-Term Denervated Muscle[J]. J Reconstr Microsurg, 2018, 34(5): 348-358
- [17] Kanitakis J, Karayannopoulou G. Applicability of an anti-trichophyton monoclonal antibody for the immunohistochemical diagnosis of human fungal skin infections (dermatophytosis) in tissue sections[J]. Am J Dermatopathol, 2015, 37(4): 343-344
- [18] 马喆,王洪岩,袁东辉,等.病理免疫组化质量控制过程中应注意的几点[J].诊断病理学杂志,2015,22(3): 187
- [19] Kaufman SK, Thomas TL, Del Tredici K, et al. Characterization of tau prion seeding activity and strains from formaldehyde-fixed tissue[J]. Acta Neuropathol Commun, 2017, 5(1): 41

- [20] 何婉婷,孙晶,原琳.在骨髓病理活检中应用双重固定法与传统甲醛固定法的比较研究[J].哈尔滨医科大学学报, 2017, 51(4): 383-384
- [21] 朱小兰,骆新兰,张科平,等.不同 pH 值甲醛固定液对肾脏标本特殊染色的影响[J].临床与实验病理学杂志, 2017, 33(4): 458-460
- [22] Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ, et al. Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy[J]. EMBO J, 2018, 37(1): 139-159
- [23] Bauer DR, Otter M, Chafin DR. A New Paradigm for Tissue Diagnostics: Tools and Techniques to Standardize Tissue Collection, Transport, and Fixation[J]. Curr Pathobiol Rep, 2018, 6(2): 135-143
- [24] Turunen MJ, Khayyeri H, Guizar-Sicairos M, et al. Effects of tissue fixation and dehydration on tendon collagen nanostructure[J]. J Struct Biol, 2017, 199(3): 209-215
- [25] 董淑慧. 免疫组化染色在甲状腺良恶性乳头状病变鉴别诊断中的应用[J].河北医药, 2017, 39(1): 140-142
- [26] John AM, Holahan HM, Singh P, et al. Fading Signals: How Long Does Antigenicity in Immunohistochemical Staining Last? [J]. Skin-med, 2017, 15(4): 277-279
- [27] Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, et al. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde[J]. Eur J Histochem, 2015, 59(3): 2530
- [28] 田玉旺,朱红艳,李红霞,等.GS 无醛固定液与甲醛固定液对免疫组化染色结果的影响[J].诊断病理学杂志, 2013, 20(6): 363-365
- [29] Nakagawa T, Ohnishi K, Kosaki Y, et al. Optimum immunohistochemical procedures for analysis of macrophages in human and mouse formalin fixed paraffin-embedded tissue samples [J]. J Clin Exp Hematop, 2017, 57(1): 31-36
- [30] Koh SS, Cassarino DS. Immunohistochemical Expression of p16 in Melanocytic Lesions: An Updated Review and Meta-analysis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2018, 142(7): 815-828

(上接第 2306 页)

- [14] Mathieu L, Grosset A, Bertani A, et al. Type III open tibia fractures in low-resources setting. Part 1: strategy and principles of limb salvage [J]. Med Sante Trop, 2018, 28(2): 133-139
- [15] Fioravanti M, Maman P, Curvale G, et al. Amputation versus conservative treatment in severe open lower-limb fracture: A functional and quality-of-life study [J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2018, 104(2): 277-281
- [16] Fu Q, Zhu L, Lu J, et al. External Fixation versus Unreamed Tibial Intramedullary Nailing for Open Tibial Fractures: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12753
- [17] Morgenstern M, Vallejo A, McNally MA, et al. The effect of local antibiotic prophylaxis when treating open limb fractures: A systematic review and meta-analysis[J]. Bone Joint Res, 2018, 7(7): 447-456
- [18] Singh A, Jiong Hao JT, Wei DT, et al. Gustilo IIIB Open Tibial Fractures: An Analysis of Infection and Nonunion Rates [J]. Indian J Orthop, 2018, 52(4): 406-410
- [19] Mehta D, Abdou S, Stranix JT, et al. Comparing Radiographic Progression of Bone Healing in Gustilo IIIB Open Tibia Fractures Treated With Muscle Versus Fasciocutaneous Flaps [J]. J Orthop Trauma, 2018, 32(8): 381-385
- [20] Liu X, Zhang H, Cen S, et al. Negative pressure wound therapy versus conventional wound dressings in treatment of open fractures: A systematic review and meta-analysis[J]. Int J Surg, 2018, 53: 72-79
- [21] Johnson JP, Goodman AD, Haag AM, et al. Decreased Time to Antibiotic Prophylaxis for Open Fractures at a Level One Trauma Center [J]. J Orthop Trauma, 2017, 31(11): 596-599
- [22] Yun HC, Murray CK, Nelson KJ, et al. Infection After Orthopaedic Trauma: Prevention and Treatment [J]. J Orthop Trauma, 2016, 30(3): S21-S26
- [23] Page PR, Trickett RW, Rahman SM, et al. The use of secure anonymised data linkage to determine changes in healthcare utilisation following severe open tibial fractures [J]. Injury, 2015, 46(7): 1287-1292
- [24] Bonnevalle P. Operative treatment of early infection after internal fixation of limb fractures (exclusive of severe open fractures) [J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2017, 103(1S): S67-S73