

一种组织微阵列供体取样与受体蜡块制作的新器具和新方法*

范松青 张文玲 熊 炜 马 键 周 洁 周 鸣

肖炳燊 欧阳珏 张秋红 谭 琛 李桂源**

(中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 发明一种组织微阵列供体取样与受体蜡块制作的新器具和新方法. 利用这种新器具和新方法成功地制作了分别含 448 和 390 个供体组织点阵的组织微阵列受体蜡块和切片. 这种新方法制作的组织微阵列切片经 H&E 染色, 显微镜下观察证实, 所有切片均无供体点阵组织脱落, 切片厚度适中, 组织结构无挤压变形, 细胞形态均匀一致. 免疫组化检测 P53 和 P16 蛋白在组织微阵列切片与其相应的常规组织切片中的表达结果完全一致. 这种组织微阵列供体取样与受体蜡块制作新器具和新方法成本低廉, 操作简便, 具有在实验室推广应用的价值.

关键词 组织微阵列, 组织阵列仪, 免疫组化

学科分类号 Q-33

cDNA 微阵列等高通量技术获得大量在肿瘤和正常组织中差异表达的候选新基因^[1,2]. 阐明这些新基因的生物学功能, 从中筛选新的肿瘤诊断、治疗和预后预测的分子靶标, 迫切需要新技术能大规模、高通量地研究其在成百上千例肿瘤的不同发展阶段, 不同分化程度和相应正常组织标本中的定位、定量表达. 组织微阵列技术的出现解决了这一难题^[3-5]. 组织微阵列制作包括从石蜡包埋标本中穿取不同规格的圆条形供体组织移入受体蜡块中, 制作成微阵列受体蜡块. 组织微阵列的供体组织常取自于手术切除肿瘤的石蜡包埋标本, 但部分肿瘤如鼻咽癌因其诊治的特殊性, 制作组织微阵列的供体标本只能来源于其石蜡包埋的活检标本. 由于目前商品化组织微阵列仪的取样主要基于大体切除标本设计的, 利用活检标本制作组织微阵列时却存在诸多困难与不足之处^[3,4]. 基于上述目的, 我们探讨组织微阵列供体取样与受体蜡块制作新器具和新方法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本与临床资料. 鼻咽癌和慢性炎性鼻咽黏膜活检标本来源于中南大学湘雅医院、湘雅二医院、湖南省肿瘤医院和湖南省人民医院耳鼻喉科就诊患者, 其余手术切除的肿瘤组织和正常组织标本来源于中南大学湘雅二医院. 利用 Windows

Excel 软件建立组织标本和临床资料的 Excel 格式数据库.

1.1.2 组织微阵列制作工具和主要仪器. 新发明的组织微阵列制作器具 (专利申请号: 200410022818.X). 石蜡胶带转移系统 (Paraffin Tape-Transfer System, Instrumedics, Inc, USA). Nikon E600 型光学显微镜 (日本产). Ciede 2000 全自动组织脱水机 (英国产), Leica RM2135 轮转式切片机和一次性刀片.

1.2 方法

1.2.1 组织标本的收集、处理. 切取大小为 2.0 cm × 1.5 cm × 0.4 cm 的肿瘤组织和距肿块 5 cm 的癌旁非肿瘤组织或正常组织标本并编号, 10% 中性多聚甲醛 (0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 配制) 4℃ 固定过夜 (16~18 h). 鼻咽部活检标本按上述方法固定时, 为了便于包埋和切片, 先在标本上滴加 1~2 滴伊红染液使标本染成红色. 标本常规脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋, 制作成供体组织石蜡块. 常规石蜡切片, 每一标本切片 5 张, 用于 H&E 和免疫组化染色.

1.2.2 H&E 染色切片和供体石蜡块中目的组织区域的显微镜下标记定位. 由经验丰富的病理专家在

*国家“十五”科技攻关 (2002BA711A03) 和国家自然科学基金 (30200312, 30300201, 30470955) 资助项目.

**通讯联系人.

Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2004-11-19, 接受日期: 2005-01-31

光学显微镜下观察每一标本的 H&E 染色切片, 重新进行病理诊断, 确定可用于研究的组织标本. 同时在光学显微镜的 10×物镜下, 利用标记笔进行 H&E 切片中的目的组织区域画圈标记. 随后在已标记的切片引导下, 在供体石蜡块的组织面上与 H&E 切片的目的组织区域相对应处画圈, 标记定位所需穿取的供体组织.

1.2.3 组织微阵列制作工具的制备. 按图 1a, b 制作不同规格的供体组织穿刺针和受体蜡块受体孔打孔针, 前端圆形锋利的薄壁组织穿刺针和打孔针杆外包针套, 用于限制穿刺深度和方便操作, 穿刺针和打孔针前端无针套包裹的长度均为 1.0 cm, 此外, 组织穿刺针和打孔针的衬芯长于其 1.0 cm. 打孔针外径分别大于其配套的组织穿刺针内径 0.1 mm, 如穿刺供体组织直径为 1.0 mm 的组织穿刺针, 其配套的打孔针外径为 1.10 mm, 印制不同规格和不同点阵间距的点阵列网格纸, 用于引导制作受体蜡块的受体孔.

1.2.4 组织微阵列受体石蜡块和切片的制作. 熔点为 58℃ 的来卡石蜡与蜂蜡 (9:1) 混合熔化在模具中, 制作成不同规格的原始受体石蜡块. 受体蜡块首先置于 37℃, 30 min, 依据制作组织微阵列供

体组织的密度和供体组织直径的大小, 相应配套规格的点阵列网格纸贴于受体蜡块表面, 在点阵列网格纸的引导下, 利用打孔针在受体蜡块上打孔, 制作深度一致, 不同规格点间距的受体孔 (图 1c). 利用新发明的组织穿刺针穿取石蜡包埋标本中标记区域的供体组织, 穿刺针衬芯推出圆条形供体石蜡组织 (图 1d), 镊子夹持供体组织移入相应受体石蜡块受体孔中. 由于石蜡容易变形, 每次供体组织移入相应的微阵列受体孔之前, 需重新用打孔针校正已制作的受体孔. 待全部受体孔填满组织后, 受体蜡块置于 37℃, 30 min, 载玻片轻压受体蜡块的供体组织面, 使全部供体组织位于同一平面, 并对受体蜡块进行适当修整, 使受体蜡块的含供体组织面与载玻片大小一致. 利用石蜡胶带转移系统在 Leica RM2135 轮转式切片机上切片, 使粘附组织的胶带移至专用载玻片上并依次编号, 具体操作按胶带转移系统说明书进行. 溶解并剥离胶带后的切片可以按常规方法脱蜡、水化等步骤, 直接用于常规染色、免疫组化和原位杂交等各种原位表达的研究. 需长期保存的切片, 在撕去胶带后的组织微阵列切片表面覆盖薄层石蜡, 4℃ 贮存备用.

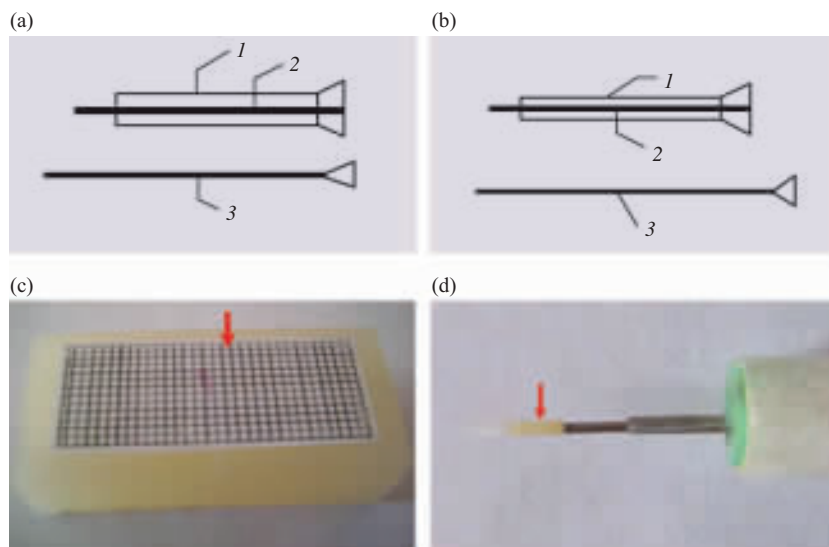


Fig.1 The tools for constructing the tissue microarrays

- (a) the sketch of puncher of graft tissue with a 1.0 mm inside diameter. (b) puncher of receptive hole with a 1.1 mm outside diameter. 1: the wrap of the puncher; 2: the hollow needle pole of puncher has sharp anterior edge with very thin wall; 3: the inside pole of puncher needle. (c) the array gridding paper adhered to the receptive paraffin block is guided to make the receptive hole. (d) a cylinder of graft tissue with a 1.0 mm diameter.

1.2.5 组织微阵列切片 H&E 和免疫组化染色. 每一种规格的受体蜡块分别切片 100 张, 选取连续切片的第 1、20、40、60、80 和 100 张切片进行 H&E 染色, 相应大小的盖玻片封片, 显微镜下观察切片质量. 同时随机选择 50 例标本的事先未穿取供体组织时的切片与已制作的组织微阵列切片, 免疫组化 S-P 法分别检测 P53 和 P16 在 50 例标本的常规切片和组织微阵列切片中的蛋白质原位表达, DAB 显色, 苏木素复染.

2 结 果

2.1 收集并建立具有临床资料的常见恶性肿瘤组织标本库

已收集的组织标本, 经常规石蜡包埋、切片, H&E 染色, 显微镜下观察证实符合要求并与临床

Table1 Specimens were used to construct the tissue microarrays

Tissue origin	Malignant tumors (n)	Adjacent-cancer nocancerous tissues or normal tissues(n)	Total specimens (n)
Nasopharynx	157	169	326
Lung	89	35	124
Colon and recta	62	32	94
Stomach	30	11	41
Esophagus	17	10	27
Liver	20	18	38
Breast	31	3	34
Larynx	11	13	24
Bladder	17	1	18
Kidney	12	6	18
Skin	12	4	16
Thyroid	6	4	10
Uterus	11	4	15
Ovary	12	1	13
Brain	7	3	10
Bone and cartilage	7	0	7
Soft tissue tumors	9	4	13
Other epithelial tumor	7	3	10
Total	517	321	838

病理诊断结果一致者共 838 例, 各种组织器官的标本数如表 1 所示. 所有符合要求的石蜡组织标本编号, 4℃保存, 建立供体石蜡组织标本库. 同时建立了每一标本 Microsoft Excel 格式的详细临床资料数据库, 包括患者姓名、性别、年龄、病理诊断、临床分期、肿瘤大小、有无淋巴结转移, 临床重要检查结果如 CT、血清 VCA-IgA, 免疫组化检测结果, 女性月经及生育状况、吸烟史、简要病史, 联系地址及通讯方式等.

2.2 组织微阵列制作新器具和新方法的建立

我们发明一种制作组织微阵列供体组织取样和受体蜡块制作的新器具和新方法: 包括供体组织穿刺针, 与穿刺针相配套的打孔针和引导制作受体蜡块受体孔的点阵列网格纸. 这种供体组织穿刺针可制备长度均为 10 mm, 直径分别为 0.6 mm、0.8 mm 和 1.0 mm 等多种规格的圆条形供体组织. 我们利用这种自制的供体取样和受体蜡块制作的新器具, 建立了一套简单实用、十分有效的组织微阵列受体蜡块制作的新方法, 并已申请发明专利 (专利申请号: 200410022818.X).

2.3 多肿瘤和鼻咽癌两种组织微阵列受体蜡块和切片的制备, 质量检测

成功地制作出 448 个组织点阵和 390 个组织点阵两种规格的组织微阵列受体蜡块和切片. 多肿瘤组织微阵列: 由多种肿瘤和癌旁非肿瘤标本组成, 共 448 例标本, 2 个受体蜡块大小为 6.5 cm×2.8 cm×3.0 cm (图 2a); 鼻咽癌组织微阵列: 390 例标本主要由鼻咽癌、癌旁非肿瘤上皮和慢性炎性鼻咽上皮标本组成, 2 个受体蜡块大小为 6.2 cm×2.8 cm×3.0cm (图 3a). 供体组织直径 0.8 mm, 每例标本包含 2 个供体组织, 孔间距均为 1.5 mm. 连续切片的第 1、20、40、60、80 和 100 张切片的 H&E 染色镜下观察, 结果证实所有供体组织点阵标本均无脱落, 切片厚度适中, 细胞形态均匀一致, 组织结构无挤压变形 (图 2b, c, d; 图 3b, c, d, e). 免疫组化检测 P53, P16 在 50 例标本的常规切片和其相应的组织微阵列切片中阳性表达, P53 在常规切片和组织微阵列切片中的阳性率完全一致(100%), P16 在常规切片和组织微阵列切片中的阳性表达一致率为 98% (图 4a~e).

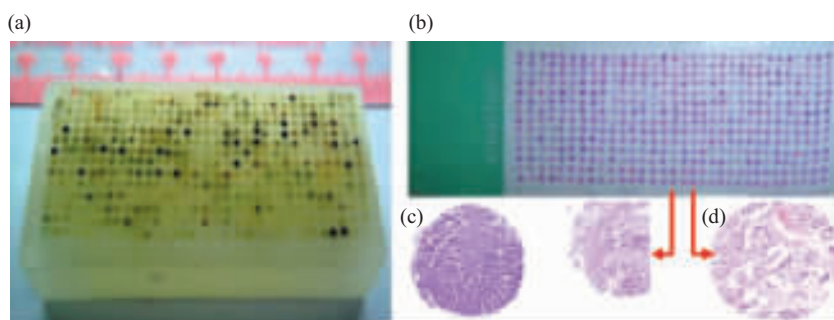


Fig.2 Multi-tumor tissue microarray

(a) the receptive paraffin block of multi-tumor tissue microarray (TMAs) containing 448 graft cylinders; (b) H&E stained slide of TMAs containing 448 graft cylinders; (c),(d) H&E TMAs sections showed the total picture of the graft cylinder, 4 $\times$.

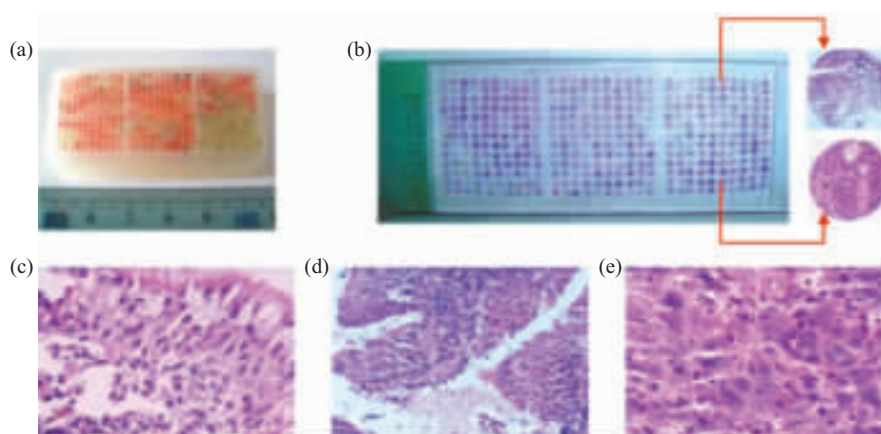


Fig.3 Nasopharyngeal carcinoma tissue microarray

(a) the receptive paraffin block of nasopharyngeal carcinoma (NPC) TMAs containing 390 graft cylinders; (b) H&E stained slide of TMAs containing 390 graft cylinders and the total picture of the graft cylinder, 4 $\times$; (c) nasopharyngeal columnar epithelia, H&E staining, 20 $\times$; (d) nasopharyngeal slight atypically hyperplasia squamous epithelia, H&E staining, 20 $\times$; (e) NPC, H&E staining, 40 $\times$.

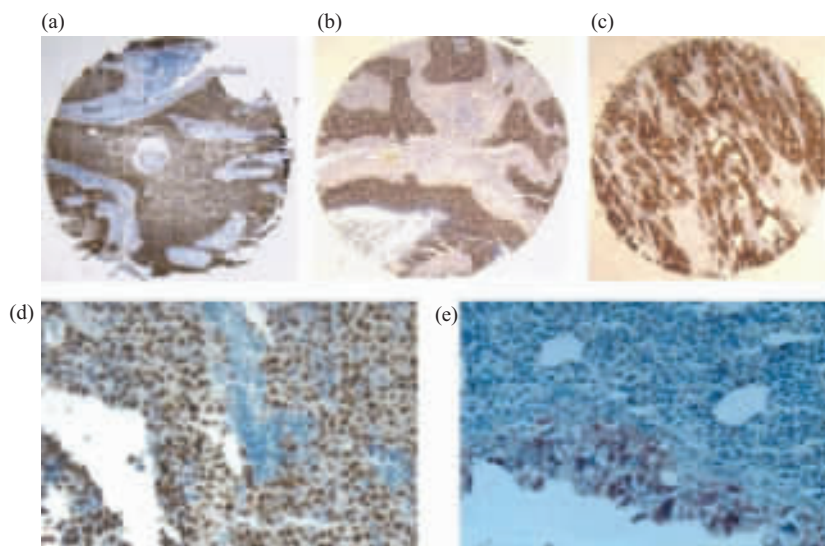


Fig.4 Expression analysis of P53 and P16 in the tissue microarrays by immunohistochemistry

(a) positive expression of P53 in the NPC, immunohistochemistry (ICH), DAB staining, 4 $\times$; (b) positive expression of P53 in the lung carcinoma, ICH, DAB staining, 4 $\times$; (c) positive expression of P16 in the colonic carcinoma, ICH, DAB staining, 4 $\times$; (d) positive expression of P53 in the NPC, ICH, DAB staining, 40 $\times$; (e) positive expression of P16 in the nasopharyngeal columnar epithelia, ICH, DAB staining, 40 $\times$.

4 讨 论

从组织细胞水平进行基因原位表达分析,有助于证实新基因在肿瘤临床诊断、治疗和预后预测中的作用,加快获取新的肿瘤诊断和预后预测分子靶标.但常规临床石蜡包埋的每一个组织标本最多保证制作 300 张 5 μm 厚的组织切片用于各种原位表达研究,300 个分子靶的研究不足人类基因组数的 0.75%,这样就浪费了有限的组织资源和昂贵的试剂^[1-4,9].组织微阵列与原位杂交、免疫组化等诸多技术的结合,能大规模、高通量地研究新基因在成百上千例肿瘤和其相应正常组织标本中的定位、定量表达研究,特别是研究特定基因表达的蛋白质与疾病之间的相互关系,在疾病的分子诊断、预后指标的确定、治疗靶点的定位、治疗效果的预测、抗体和药物的筛选等方面具有十分重大的实用价值^[3-8].组织微阵列还具有其他高通量阵列技术无可比拟的优点,即其标本可来源于常规存档的石蜡包埋组织标本,存档 20~40 年的石蜡包埋组织标本制作的组织微阵列用于基因原位表达研究仍然十分有效^[3,9].目前商品化的组织微阵列品种有单一或复合型肿瘤组织微阵列、正常组织微阵列等.但这些商品化的组织微阵列标本数目少,每一切片仅有 50~200 个组织标本,不能真正地满足高通量研究基因生物学功能的需要^[3-9].研究人员常可根据不同的研究目的,收集具有完整临床病理资料的手术切除和活检组织标本,有针对性地制作各种组织微阵列^[7-9].

组织微阵列的制作常利用手工或半自动组织微阵列仪,目前组织微阵列仪向两个方面发展,即更加昂贵和复杂化的全自动组织微阵列仪和简单实用、易于操作的手工组织微阵列制作工具^[3,4,8,10,11].高质量的组织微阵列制作技术应该在切片时能使所有供体组织完整性地转移至载玻片上,并能在一个组织微阵列受体蜡块上切出最大数目的切片.实际上成功制作组织微阵列的前提条件是能提供有足够长度的供体组织,其中至关重要的步骤是微阵列受体蜡块切片.目前商品化的组织微阵列制作仪虽能最大限度地保证受体组织点阵的均匀分布,但微阵列受体蜡块切片的质量保证必须有其他相关技术的支持.

组织微阵列仪的供体组织取样主要基于手术切除的大体标本设计的,但其利用小而且形状不规则的活检标本制作组织微阵列时存在一定难度和缺

陷,因此,有必要研制组织微阵列的组织取样和受体蜡块制作的替代工具.基于组织微阵列的制作原理和现有组织微阵列制作仪的功能特点,我们发明一种简单、实用的制作组织微阵列的供体组织取样和受体蜡块制作的新器具和新方法.这种前端圆形锋利的薄壁组织穿刺针可穿刺出直径为 0.6 mm、0.8 mm 或 1.0 mm 等不同规格的圆条形供体组织.为保证受体蜡块的受体孔间距整齐,并按点阵列形式排列,我们创新性地印制不同规格和不同间距的阵列网格纸引导制作受体蜡块的受体孔.这种新的组织取样穿刺针和受体孔的打孔针均有深度的限制,因此,能保证受体蜡块中所有供体组织基本上在同一平面上.一个经验丰富、操作熟练的研究人员,利用这种组织微阵列制作器具和制作方法,一天能制作 250~300 个微阵列组织点阵,其工作效率与目前商品化的手工操作或半自动化的组织阵列仪相当.我们利用这种新器具和新方法成功地制作了 448 个组织点阵和 390 个组织点阵 2 种规格的组织微阵列受体蜡块.一种为多肿瘤组织微阵列,包含多种肿瘤组织和相应癌旁非肿瘤组织共 448 例标本;另一种由鼻咽部活检标本组成的组织微阵列,由鼻咽癌、癌旁非肿瘤上皮和鼻咽慢性炎性上皮组成共 390 例标本.这种组织穿刺针成本低廉、操作简单方便,不但适于组织微阵列的大体标本取样,而且特别适用于活检小标本制作供体组织.

受体蜡块显微切片是组织微阵列制作成败的最为关键环节.我们也试验过常规切片,水上漂浮法贴片,由于组织微阵列的受体蜡块的切面比常规石蜡包埋组织宽,而且供体标本呈点阵分布并有石蜡间隔,常规方法不可能制作出高质量的组织微阵列切片,尤其是高密度的组织微阵列受体蜡块.国外普遍利用原本用于制作大切片的石蜡胶带转移系统辅助切片,这样可保证所有微阵列切片中的组织按同一方向整齐地转移载玻片上^[3,9].我们也利用石蜡胶带转移系统,对 448 个组织点阵和 390 个组织点阵这 2 种中、高密度的组织微阵列蜡块进行切片.此外,我们还采取如下措施保证制作高质量和最大数目的组织微阵列切片.由于石蜡组织在打孔和移入供体组织后,受体蜡块表面常会外凸变形.受体蜡块在适当加温软化的条件下,对受体蜡块进行压平整形处理,可使受体蜡块保持原有形状并能使供体组织完全处于一个平面.同样,我们对组织微阵列的第一张切片、最后一张切片和每隔 20 张的 H&E 切片进行显微镜下质量检测,证实我们这种

制作组织微阵列的新器具和新方法完全可以制作出高质量的组织微阵列切片. 同时免疫组化检测随机抽取的 50 例常规切片和 2 种规格的组织微阵列切片中 P53 和 P16 基因的蛋白质表达, 对检测结果进行对比分析, 证明组织微阵列完全可代替常规组织切片用于各种基因的原位表达研究.

利用这种组织微阵列供体组织取样与受体蜡块制作的新器具和新方法, 我们成功地制作了多肿瘤和鼻咽癌组织微阵列两种中、高密度的组织微阵列受体蜡块和切片. 质量检测证实这种新器具和新方法操作简便, 成本低廉, 具有在实验室推广应用的价值.

参 考 文 献

- DeRisi J, Penland L, Brown P O, *et al.* Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet*, 1996, **14**: 457~460
- Luo J, Isaacs W B, Trent J M, *et al.* Looking beyond morphology: cancer gene expression profiling using DNA microarrays. *Cancer Invest*, 2003, **21** (6): 937~949
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998, **4**: 844~847
- Kallioniemi O P, Wagner U, Kononen J, *et al.* Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, 2001, **10** (7): 657~662
- Swierczynski S L, Maitra A, Abraham S C, *et al.* Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum Pathol*, 2004, **35** (3): 357~366
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, *et al.* High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 1999, **154**: 981~986
- Skotheim R I, Abeler V M, Nesland J M, *et al.* Candidate genes for testicular cancer evaluated by in situ protein expression analyses on tissue microarrays. *Neoplasia*, 2003, **5** (5): 397~404
- Hidalgo A, Piña P, Guerrero G, *et al.* A simple method for the construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol*, 2003, **56**: 144~146
- Lewis F, Maughan N J, Smith V, *et al.* Unlocking the archive-gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol*, 2001, **195** (1): 66~71
- Wang L, Deavers M T, Malpica A, *et al.* Tissue macroarray: a simple and cost-effective method for high-throughput studies. *Appl Immunohistochem & Mol Morphol*, 2003, **11** (2): 174~176
- Matysiak B E, Brodzeller T, Buck S, *et al.* Simple, inexpensive method for automating tissue microarray production provides enhanced microarray reproducibility. *Appl Immunohistochem & Mol Morphol*, 2003, **11** (3): 269~273

One Novel Tool and New Methods to Punch The Graft Tissues and Make The Receptive Blocks for Constructing The Tissue Microarrays *

FAN Song-Qing, ZHANG Wen-Ling, XIONG Wei, MA Jian, ZHOU Jie, ZHOU Ming, XIAO Bing-Yi,
OUYANG Jue, ZHANG Qiu-Hong, TAN Chen, LI Gui-Yuan**
(Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract One novel tool and new methods used to punch the graft tissues and make the receptive blocks for constructing the tissue microarrays (TMAs) were devised. Two kinds of receptive blocks of TMAs consisting 390 and 448 spots of the graft tissues respectively were made successfully by the novel tool and new methods. These two kinds of TMAs sections had no loss of tissue spot. The H&E staining TMAs slides, which were observed under the light microscope, showed that the morphologic structure of all graft tissues had not be changed by punching, and the sections were appropriated thickness with symmetrical cells morphology. The positive expressions of P53 and P16 proteins in specimens of general sections were well consistent with that in TMAs sections by immunohistochemistry. The new tool and novel methods to punch the graft tissues and make the receptive blocks for constructing TMAs, which have many advantages such as low expense, easy operation, convenience and practicality, might be popular in future of the practical application in laboratory.

Key words tissue microarrays, tissue arrayer, immunohistochemistry

*This work was supported by grants from The State "Ten-five" High Technology R&D Project of China (2002BA711A03) and The National Natural Sciences Foundations of China (30200312, 30300201 and 30470955).

**Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligu@xyism.net

Received: November 19, 2004 Accepted: January 31, 2005