



病理学工作者须知的免疫组化技术

罗德尼·米勒博士著 迈新公司技术部译

前 言

相对于免疫组化,更加新颖的分子学诊断方法被大量地引入诊断实验室,但在目前它们还不能处理那些用IHC就可很容易解决的许多诊断问题。另外,通过运用基因表达分析和其他技术在疾病分子学研究中,经常会产生更多诊断上有用的抗体,从而进一步扩展了IHC的用途(如,P504S用于前列腺癌和p16用于宫颈病变的检测)。尽管其他领域的病理学一直在发展,但IHC在未来若干年还将会是诊断病理学实践的重点。

IHC理论上是很简单的技术,而且它并不需要任何非常昂贵的设备,因此几乎可以在所有诊断实验室内进行。不过也有许多因素影响结果的质量,要想得到一个可靠且具有重现性的结果,必须在全过程都要注意到这些因素。

本文讨论和阐述了每位病理工作者都必须熟悉的IHC重要技术因素,这样就可以在自己的实验室获得一致性的、可靠的且具有重现性的免疫组化染色,及避免对染色的操作和解释上存在误区。

一、免疫组化检测方法:

(一) 卵白素—生物素方法

目前大多数诊断实验室都使用卵白素—生物素方法或基于聚合物的方法。前者利用生物素与卵白素的高亲和力,一个卵白素分子可以结合四个生物素分子。卵白素—生物素方法的基本步骤如下:

1. 切片并置于防脱片上,在二甲苯上脱蜡再过酒精水化
2. 如果有需要,进行抗原修复(酶消化或热引导抗原修复)
3. 阻断内源性生物素(但是许多实验室使用卵白素—生物素方法时并没有阻断内源性生物素,这是在自找麻烦,使用这种方法时一定要有关阻断内源性生物素的步骤,下面具体谈到这一问题)
4. 灭活内源性标记酶活性(如果使用过氧化物酶检测系统,必须灭活内源性过氧化物酶活性,等等)
5. 一抗孵育,冲洗
6. 生物素标记抗体孵育,冲洗
7. 卵白素—生物素检测复合物孵育,冲洗
8. 显色,复染,封片及镜下观察

内源性生物素问题:

不幸的是,许多使用卵白素—生物素方法的实验室并没有常规地加入内源性生物素阻断步骤。卵白素与生物素的结合力非常强,而且它不管生物素是在交联的抗体上还是在其他位点上。因此,如果细胞或其他组织成分上存在有可被卵白素结合的生物素,这些组织成分便会与那些特异性细胞一样被染上色。内源性生物素假阳性经常会呈现出粒状胞浆阳性,而且在包含有大量线粒体的细胞上特别明显,如肝细胞和肾近曲小管。由于热引导抗原修复(HIER)技术的广泛使用,内源性生

物素成为越来越严重的问题。这是由于HIER技术会明显提高组织上内源性生物素的检出率一样,正如它们也可以提高所需抗原的检出率。该假阳性也可以非常强,而且可能会精确地定位于肿瘤细胞,及具有清晰的基质背景。正因为如此,任何应用HIER技术的实验室都必须常规使用内源性生物素阻断步骤。另外必须记住的重要一点是阴性对照片也必须进行相同的HIER过程,因为只有这样才能在阴性对照标本上呈现出内源性生物素活性。

内源性生物素的阻断可有多种方法。阻断步骤必须在HIER或酶消化之后立即进行,而且应在一抗孵育之前加入(虽然理论上酶消化步骤可以在一抗孵育之后和生物素标记抗体孵育之前进行)。首先以含有0.05%卵白素的PBS(据报道0.001%到0.1%的浓度都可用)在室温下孵育20-30分钟。加入的卵白素可以结合组织上所有的内源性生物素。内源性生物素阻断步骤的第二部分为:加入含0.05-0.2%生物素的PBS(据报道低至0.001%的浓度也有效)室温下孵育15分钟。该步骤可以饱和和第一步加入卵白素所剩下的生物素结合位点。

当必须使用基于卵白素—生物素系统的方法时,也可以先加入蛋白稀释液(卵白素的来源)来阻断所有的内源性生物素,再用蒸馏水冲洗,然后再孵育于5%的奶粉溶液或含0.2%生物素的PBS。该方法非常有效,可明显地降低了非特异性背景。

(二) 基于聚合物方法

基于聚合物的方法并不依赖于卵白素和生物素的相互作用,而是利用了交联大量二抗和酶复合物的聚合物的一种方法,其步骤如下:

1. 切片并放于防脱片上,在二甲苯上脱蜡再过酒精水化
2. 如果有需要,进行抗原修复(酶消化或热引导抗原修复)

3.灭活内源性标记酶活性（如果使用过氧化物酶检测系统，必须灭活内源性过氧化物酶活性，等等）

4.一抗孵育

5.聚合物孵育（包含有交联抗体和酶复合物）

6.显色，复染，封片及镜下观察

基于聚合物的方法相对于卵白素—生物素方法有几个重要的优势。首先，由于二抗和酶结合到同一试剂上，节省了步骤。另外，由于不使用卵白素—生物素系统，该方法便不存在内源性生物素问题，因此无须进行内源性生物素阻断步骤，进一步简化了步骤并且可以更快完成。其最主要的缺点就在于它们比标准的卵白素—生物素试剂盒昂贵。不过，我认为这些多花的钱是值得的。我们实验室已经使用该试剂大约5年了，有着极佳的结果。

二、组织的固定与处理

要得到高质量的IHC结果，首先要有高质量的组织。如果没有适当地处理和固定组织是很难得到好的IHC结果（或者好的形态学）。有人可能会认为病理工作者会适当地处理和固定组织，但正如我们所知，这些基础步骤经常得不到重视，结果导致了所有相关问题的出现。从大标本切出的组织应很薄（2 mm或更少），而且包埋盒不能塞满组织。我个人认为中性福尔马林缓冲液对于几乎所有用于免疫组化染色的石蜡切片来说都是最佳的固定液。众所周知，过度的福尔马林固定会遮盖抗原，因此应避免这种情况，但得益于抗原修复技术，适当处理的福尔马林固定组织也可以得到极佳的IHC染色结果。另外，不能马上处理的组织应先在福尔马林溶液内固定一段时间，然后在处理和包埋之前转移至70%酒精内以获得更长的储存时间。在我个人看来，福尔马林的替代品在常规IHC上并没有特殊的优势，而且有一些还有明显的缺点。虽然我使用锌—福尔马林固定液并没有发现任何大问题，但B5会破坏许多重要抗原（如，CD5 clone 4C7, BCL-6和CD30），而且我还见过许多用Hollande's和Bouin's固定液的染色结果极差，有时还会迫使病人需要进行重新活检。脱钙对不同的抗原有不同程度的影响，如果有可能的话应避免使用强酸来脱钙。如果在研究脱钙和不脱钙标本中选择的话，大多数情况下使用不脱钙标本能获得更好的结果。

三、染色结果解释：真阳性与假阳性

真阳性染色是指染色剂定位于包含有特定抗原的细胞或组织上。相反地，假阳性染色是指染色剂定位于不含特定抗原的细胞或组织上。当使用DAB显色剂于过氧化物酶检测系统时，该问题可以描述为“所有褐色阳性都不是真阳性”。整片区域内（包括肿瘤细胞及其之间的非肿瘤性基质）的染色为模糊的褐色阳性，可容易被几乎所有病理学家识别为假阳性。少数病理学家注意到假阳性染色经常发生于一种不同的情况下：肿瘤细胞为强阳性而非肿瘤性基质背景清晰且无染色剂沉淀。

在讨论后面一种假阳性染色情况之前（显色剂精确定位于特定的细胞上），有必要先回顾一下真阳性染色的反应类型。真阳性染色的一个主要特征就是具有细胞与细胞之间的异质

性。这是由于在不同的细胞之间，反应产物沉淀的强度经常也有差别，而且在单一细胞之间的不同部位经常也是如此。真阳性染色的另一特征是胞膜阳性非常清楚，这种情况在假阳性染色下很少见到。胞核阳性也是真阳性染色所特有的类型，而且胞核真阳性染色经常也会有一定程度上的胞间异质性。在解释胞核阳性时可能存在的问题：使用卵白素—生物素技术时，在妊娠期子宫内膜（以及在某些肺部胚胎细胞瘤上）会出现“看起来很清晰的”胞核假阳性，这是由于这些胞核内存在的内源性生物素导致的。我也在一些临近坏死组织区域见过胞核假阳性（特别在用CD15时），但在这些情况下显色强度是一致的而且经常还有些不清楚（如，缺乏胞间异质性及可能看起来“模糊”）。有时候胞核假阳性染色还有可能是由于重金属固定液的使用，如B-5或Zenkers，而且我还见过在使用强酸溶液作为脱钙液或作为抗原修复液时出现的强胞核假阳性，后一种情况其他人也有发表过。因此了解抗原的免疫反应显型（胞核、胞浆或胞膜）是很重要的。据报告，胞核假阳性染色也会发生于CD20 (L26)染色时，而我确实多次见到L26以及CD7和BCL-10存在这种情况。上面提到的重要一点是假阳性染色可能会非常强而且可以精确地定位于特定的细胞上（通称为肿瘤细胞），且无背景基质染色。不过如果能观察到这种类型的假阳性染色缺乏胞间异质性，则可以很容易地识别出来。在这些情况下，这些细胞会呈现出一致的胞浆着色，看起来“模糊”且不清晰。这些细胞经常看起来像是用显色剂喷上去似的。这种假阳性染色通常是由于使用了稀释不当的一抗所导致的。

四、免疫组化实验质控

(以及多肿瘤夹心蜡块MTSB的作用)

松懈的质控程序是许多实验室的通病。质控程序必须是一个持续不断的过程，而且每次染色的敏感性和特异性都必须得到验证。毫无疑问，有效的质控过程的关键在于多肿瘤对照切片的系统应用。MTSB的制作过程是IHC创立者之一，Dr. Hector Battifora发明的。我利用收集来的常规诊断外科病理标本制作我自己的多肿瘤蜡块（包含大约80种不同肿瘤）。我改进了Dr. Battifora的方法，使得在排列紧凑的小盒子里能放得下更多不同的小块肿瘤，而且总共就只占用玻片表面的一小部分空间。我的方法可以用于任何组织学实验室，因为那并不需要什么特殊设备。我一直在改进和简化该制作方法，而且我将会在下面讲述制作过程的最新改进。（详细制作步骤见附1）。现在也有许多其他文章发表了相似的制作过程，但在我看来我所使用的方法在多肿瘤蜡块的制作上是最好的。制作方法的不同并不是那么重要的，我会推荐实验室使用他们觉得最适合自己的方法。当然，我认为每个实验室都使用这种类型的对照方法是至关重要的。

（一）MTSB用于测定一抗的最佳滴度

多肿瘤夹心蜡块(MTSB)非常适合于测定一抗的最佳滴度，这是由于MTSB是由足够多的肿瘤制作而成的，它们可以允许在一张切片上同时测试多种阳性组织（具有不同的抗原位点），以及多种阴性组织。显然，确保阴性组织的确定为阴性（特异性）与确保阳性组织的确定为阳性（敏感性）是同样重要的。

（二）MTSB用于新抗体的研究

新抗体的研究是所有实验室都要面临的一项任务，而MTSB在这种情况下也是非常有用的。在你自己的实验室测试新抗体之前，千万不要盲目地相信说明书所写（滴度、敏感性或特异性）。另外，也不必按照说明书推荐的抗原修复方法进行。它们虽然是有效的，但你可能会发现你自己的方法更加有用。在研究新抗体时需要回答以下两个问题：

1. 该抗体是否需要抗原修复，如果需要，哪种抗原修复方法最佳（蛋白酶，高压还是微波炉），以及哪种蛋白酶或抗原修复液最佳？

2. 该抗体的最佳滴度是多少？

在检测最佳滴度之前最好先回答第一个问题，因为所应用的抗原修复类型不同，最佳滴度也会有差别。因此，当遇到一个新抗体时，我进行测试的步骤如下：

1. 由一已知阳性的标本上切片并与多肿瘤夹心蜡块对照片捞在同一张切片上。（在这种情况下，你只要使用一张切片就可以测试多种阴性肿瘤以及经常也会有许多不同的阳性肿瘤。）

2. 将一抗稀释到说明书推荐的滴度。（它可能会相差很远，但你必须由某个数值开始）。如果说明书并没有推荐滴度，我经常以1:100开始。第一批切片按下列进行：

a) 一张切片无抗原修复

b) 一张或多张切片进行蛋白酶消化（我们使用无花果蛋白酶，胃酶，蛋白酶K，以及其他蛋白酶）

c) 多张切片进行不同的热引导抗原修复方法，（柠檬酸缓冲液，Tris缓冲液，EDTA，尿素，等等），利用高压锅（非EDTA适用）、vegetable steamer 蒸汽机（EDTA适用）或微波炉。

此时，便可看出该抗体是否需要抗原修复程序，如果需要，哪种方法是最有效的？如果每种情况下染色都很强或看起来都有很强的背景染色，一抗浓度可能太高，而此时你应该使用更低的一抗滴度重复进行上述步骤。如果是完全没有着色或染色非常弱，便需要使用更高的一抗滴度重复进行上述步骤。

使用在上一步骤中得出的最佳抗原修复方法，尝试用4-6个相差两倍的一抗浓度进行一系列的染色。例如，如果你由1:100的一抗滴度开始，便尝试将一抗稀释到1:200，1:400，1:800，1:1600和1:3200来进行另外的染色。在观察结果之后，根据其敏感性和特异性挑选出最佳的滴度。这些因素可以通过对你的多肿瘤组织块上各个肿瘤成分和位置的详细记录而进行判断。另外滴度的一些微调可能是必须的（使用进一步稀释的或更高浓度的一抗），这些步骤通常是非常有效的而且只需要两天时间。

（三）MTSB与对照片

MTSB是用作阳性对照片的理想材料。如果MTSB中的肿瘤成分选择得当的话，一例MTSB便可作为几乎所有染色的阳性对照片，避免了为每种抗体的染色都准备不同的阳性对照片（很明显，组织技术员最希望这样）。MTSB切片后捞至玻片的一端，并作为阳性对照片使用。当有组织要染色时，将该组织切片后捞至玻片的另一端。从而，病例组织与MTSB阳性对照组织便在同一张切片上，这样技术员所需操作的切片数几乎可以减少一半。通过将MTSB阳性对照组织和病例组织放在同一张切片上，我们可以确保这两者可以得到一致的染色过程。如果对某一病

例的一次染色结果存在疑问，可查看MTSB部分（在同一张切片上）以快速地得知该染色的敏感性和特异性。

（四）对照片：所需的数量及类型

在我的顾问生涯中，我经常审查其他实验室所进行的免疫组化染色，发现在有关所需对照片的数量这一问题上有一定程度上的混乱。许多次我见到有人为每种抗原染色都准备一张阴性对照片，就算是只有一个组织蜡块。例如，有一病例要进行CK, EMA, LCA, S100及HMB-45染色（都是同一例蜡块上并使用相同的抗原修复方法），将会有五张阴性对照片，标记上“CK阴性对照”，“EMA阴性对照”等等。这是没有必要的，既浪费时间又浪费试剂。我使用的对照片如下：

阴性对照片：如果你对所有切片只使用一种抗原修复方法，那么所染色的每例不同组织蜡块只需要一张阴性对照片。例如，如果在一例组织蜡块上要进行10张切片染色（所有抗原修复都是柠檬酸缓冲液高温加热），你只需要添加一张阴性对照片（而不是10张！）。阴性对照片必须包含已确认为阴性的组织蜡块，而且应该与其他切片的处理完全一致，除了不加一抗而用其他试剂代替之外（组织培养液、缓冲液、非免疫性血清稀释液等等）。特别重要的是阴性对照片必须使用相同的抗原修复方法（蛋白酶、微波、高压等等），因为这些抗原修复方法可以明显地增强内源性生物素活性及其他的假阳性现象。如果一次染色中一些切片用酶消化而其他的用热引导抗原修复，则每种不同的酶消化或热引导抗原修复技术都必须应用一张阴性对照片。例如，如果一些切片在尿素稀释液中加热而其他的都是用柠檬酸缓冲液，你需要在柠檬酸缓冲液中放一张阴性对照片，而在尿素稀释液中放入另一张阴性对照片。我推荐用McCoy培养液代替一抗用作阴性对照试剂，它是与单克隆抗体提取一抗后的上清液很相似的一种组织培养液。其他专家建议用稀释的正常鼠腹水液（用于单克隆抗体）或稀释的正常兔血清（用于兔多克隆或单克隆抗体）代替一抗用作阴性对照试剂，但当我将该试剂与我现在所用的对比之后，在我看来McCoy培养液作为阴性对照试剂效果更好。虽然有些免疫组织学家会不同意，但我还是认为用缓冲液代替一抗作为阴性对照试剂也能得到很好的效果。据我所知，CAP即将要求IHC实验室中每个组织蜡块只需一张阴性对照片，用“最强的抗原修复方式”处理。我个人认为文中的“最强的”一词不好定义，所以我还会继续为每种不同的抗原修复方法使用一种阴性对照组织。我见过一例CLL病例被误诊为套细胞淋巴瘤，由于只在一张进行高pH值Tris抗原修复的切片上有呈现出胞核假阳性（刚好是cyclin D1染色），但并没有被认为是假阳性。不幸的是，与该病例一起的阴性对照片却是用柠檬酸抗原修复，并没有呈现出胞核阳性。当该病例在肿瘤学家（他不相信套细胞淋巴瘤的诊断结果）的要求下重新检测时，阴性对照片也是进行高pH值Tris缓冲液抗原修复，此时阴性对照片上的胞核阳性与cyclin D1染色所呈现出来的阳性看起来是一致的。很明显肿瘤细胞并不是cyclin D1真阳性。

阳性对照片：每个不同的抗体都必须使用一张阳性对照片。阳性对照组织必须与要染色的组织放在同一张玻片上，因为只有这样才能保证病例组织与阳性对照组织以一样的方式处理。由我上面所述，应将多组织蜡块（或者相似的多肿瘤蜡块）作

为阳性对照片。这种蜡块可以检测多种已知阳性的组织以及多种已知阴性的组织。在许多实验室中，阳性对照片只包含一例已知为特定抗原阳性的组织。在我看来，这种阳性对照是非常不充分的而且可能会很危险，因为它并不能检测和验证其敏感性（有多少阳性组织为阳性）或特异性（有多少阴性组织没有与该抗体反应）。如果有可能的话，这两个因素在每次染色时都必须得到验证，而用多肿瘤夹心蜡块（MTSB）或其他相似的方法则可以很容易做到。

（五）组织内部对照的重要性

除了要检测阴性对照片和多肿瘤蜡块阳性对照片之外，还注意到病人组织上理应为阳性的部分（组织内部阳性对照）和理应与一抗不反应的部分（组织内部阴性对照）。如果组织内部阳性或内部阴性对照并没有呈现出它们所应该呈现的反应形式，该染色结果无效。例如，如果要查看ER在包含有正常乳腺导管的乳腺组织上的表达情况，而又看不到任何正常乳腺导管细胞为ER阳性，这种情况下小心不要将肿瘤视为“ER阴性”，因为该组织可能正是ER阳性的肿瘤，但被误处理并使得抗原遭到破坏。一样地，如果你看到病人组织上的上皮细胞为CD45（白细胞共同抗原）阳性，肯定是出错了，该染色结果应视为无效。

五、IHC用于细胞学标本

（一）IHC与细胞学标本综述

当应用IHC于细胞学标本时我所能给出的最好建议就是：制作细胞蜡块！！给出该建议的原因在于细胞蜡块上进行IHC与处理所有其它石蜡切片都是一样的。另外，如果你有一个好的细胞蜡块，你还可以进行多次染色，而如果你只有细胞涂片，理论上你需要一张涂片作阴性对照片及另一张涂片用于所需的染色（除非你使用了下文提到的“细胞转移”技术）。众所周知，许多情况下（特别是在很难操作的针吸活检或FNA时）并不能得到所需的那么多涂片。我还在医院工作时就经常使用一个技巧，使用凝血酶和过期血浆（从血库中取得）作为“凝胶”试剂来协助细胞蜡块的制作。将凝血酶和血浆放置于“滴眼液”瓶子里或其他相似的地方。就算在一张玻片上只有一小滴血液或其他液体，只要滴加一滴的凝血酶（或一滴凝血酶之后再滴加一滴血浆）就会导致该标本马上凝结起来，然后便可以从玻片上刮下来（用刀片或另一玻片的一端）并放入福尔马林溶液内，这样便可以很容易地放入石蜡制作蜡块。如果有人试过将一滴血液或其他液体没有经过其他步骤而直接放入福尔马林，就会知道这滴血液或液体会马上散开而不能使用。与拥有多张细胞切片（都呈现一样的东西！）而没有细胞蜡块相比，拥有一张细胞学切片以及一例相应的细胞蜡块要更有用得多。在许多FNA病例中，有一些可以用来制作细胞蜡块的诊断标本，却由于被涂片到另一张切片上而浪费掉，当想到要制作细胞蜡块时已太晚了。以我个人经验来看，我认为如果细胞病理学教育者除了教导细胞病理形态学诊断的要点之外，能够花费更多的时间教导病理工作者如何制作正确的细胞蜡块，肯定会让病人获益更多。我见过无数的例子，许多高学历优秀的细胞病理学家在疑难病例面前一筹莫展，而这些病例中细胞蜡块

的缺乏是其一大问题（尽管已有无数制作优良的细胞涂片）。幸运的是，我们现在已经也可以用一种更加有效的方法解决这一类型的问题（见下文“组织转移/细胞转移技术”）。

（二）IHC用于细胞涂片的最佳处理方法

在上文讲述了制作细胞蜡块的重要性之外，我也清楚有些需要进行IHC的病例并不可以用细胞蜡块。涂片的最佳类型取决于病例的类型，不过以我看来所有的细胞涂片最好都使用非防脱片（因为这样还可以有使用细胞转移技术的机会）。当处理那些与淋巴造血功能有关的淋巴瘤、白血病或CSF标本时，涂片或细胞离心标本最好完全烘干。淋巴瘤和白血病标本也可用酒精固定，不过对于那些更喜欢烘干标本的血液病理学家来说，这种标本的细胞形态会较难让他们满意。对于其他所有类型的病例，推荐立即固定（不用烘干）。在95%的酒精中固定适合于所有需要快速固定的标本。考虑到涂片上ER和PR的染色，很重要的一点是任何烘干的涂片都会使得ER和PR难以检测到。记住如果使用卵白素—生物素系统，一定要阻断内源性生物素活性，因为细胞涂片（以及冰冻切片）上的内源性生物素假阳性要比石蜡切片标本上的要明显得多。

（三）细胞学标本的抗原修复

由于细胞涂片并没有浸入福尔马林，因此我们都会理所当然的认为这些标本的IHC染色并不需要抗原修复。的确，我在1998年7月之前也是这样认为的，那时我正开始研究高压热引导抗原修复对细胞涂片的IHC染色的影响。出乎我意料之外的是，当加入高压热引导抗原修复之后许多抗原的染色有了明显的增强，特别是在烘干的涂片上。有了这些研究的结果之后，我们所有的细胞学标本（在防脱片上或转移至防脱片上）都应用了抗原修复技术。我建议所有病理学家在他们的细胞学标本上都使用HIER。正如石蜡切片一样，我们会考虑到应使用哪种类型的切片。正如上面所述，我推荐所有细胞涂片都捞至非防脱片上，因为这种切片可以使用细胞转移技术。这种技术可以让包埋在塑性封片剂内的细胞从切片上转移出来，然后再分割并转移至防脱片上进行下一步染色。这样便可以对一张细胞涂片上的标本进行多种染色。（这也可用于在非防脱片上的石蜡切片标本）。如果涂片是在防脱片上，便可以不用对标本进一步的操作而就可以进行HIER，不过这样一张切片就只能进行一种染色。当然，如果细胞涂片是在非防脱片上，我不推荐用HIER或酶消化，因为标本会很容易从切片上脱落。我遇到的唯一例外就是，完全干燥且制作正确的外周血涂片在HIER过程中也会很好的粘附在切片上，就算是在非防脱片上也是如此。另外，如果你一开始就是非防脱片，可以使用组织或细胞转移技术将标本转移至防脱片上，这样就可以使用HIER方法。

（四）细胞IHC诊断中的假象

在解释细胞涂片的IHC染色结果时，必须注意到细胞的三维空间结构，因为在一些病例中会有一些试剂被“困”在里面，导致假阳性出现。这种假阳性缺乏正常的细胞之间染色强度上的差异性，所以注意到该现象对假阳性的识别很有用。我们遇到的另一假象是由于吞噬了其他细胞而呈现出的假阳性，特别是当吞噬细胞为嗜中性粒细胞时。

六、组织转移/细胞转移技术

1994年Sherman等人发明了一种细胞转移的方法，可以应用于只有一张或两张细胞切片的小细胞标本的免疫组化染色。首先，病理学家应先观察要染色的切片，要染色的不同区域必须先用记号笔标记出来。这些区域应在切片的背面标记出来（这样技术员便可知道标本的哪个区域要用于染色，而且盖玻片将在下一步被移走）。在二甲苯中脱去盖玻片之后（或在丙酮内脱去塑性盖玻片），液体封片剂要马上滴加至刚浸完二甲苯还是潮湿的切片上，完全覆盖要染色的区域。水平地将切片放在烤箱内（我们使用56℃烤箱）。封片剂在烤箱内会变硬（可能需要几个小时或更久）。在封片剂变硬之后，将切片放置于温水中一个半小时左右，这样可以使得细胞包在液体封片剂上一起从切片上脱落下来。按照先前划在切片背面的标记，用刀片将封片剂切割成小片。每片都转移至不同的防脱片上（在新切片上的表面要与原来的一致），如果有需要的话在同一张切片上放入适当的对照组织。切片放入烤箱烘干，再浸入二甲苯以脱去液体封片剂，接着再水化并染色（包括所有的抗原修复程序）。我们已使用该技术无数次了且已在我们实验室作为常规使用，并且取得了非常好的效果。（有一次我们从一例已染过H&E的FNA细胞涂片上进行了30种染色！）我们也将“细胞转移”技术广泛地应用于染过H&E的组织切片上，而且在组织切片上也获得了与细胞涂片结果一样的成功。这一技术在前列腺的小区域穿刺活检时特别有用，很经常在进一步切片时微小病灶就消失了，只能在H&E的基础上使用组织转移技术并进行下一步染色。一般情况下，对先前染色过的组织或细胞转移标本进行染色时，如果要进行高压抗原修复或EDTA水煮抗原修复，便无需对切片进行脱色步骤，因为HIER会将H&E、pap染色和Wright-Giemsa染色很好地脱色。

H&E染色过切片的免疫组化再染色（细胞与组织切片）

如果组织是在非防脱片上，按下列步骤使用组织转移技术：（详见附2）

1. 观察切片，选出要染色的区域，并在切片的背面将其划出。
2. 移去盖玻片，滴加液体封片剂，并放入烤箱烘干。
3. 将切片浸入温水（大约一小时），除去液体封片剂，按照前面在切片背面所标记的区域切成小片，然后再将这些组织片（同一面朝上）转移至防脱片上。
4. 在烤箱内烘干，浸入二甲苯以溶解硬化的封片剂，水化并染色（包括抗原修复步骤）。如果使用高压抗原修复或EDTA水煮抗原修复步骤，便无需脱色，因为抗原修复过程可以完成这一步。

如果标本是在防脱片上，一样可以在该防脱片上进行免疫组化染色。以我们的经验，组织转移技术在防脱片上效果没有那么好，因为在防脱片上的标本不容易从切片上脱离出来，不过有时候放在水浴里更久时间会有足够的组织或细胞脱落。再次，如果使用高压抗原修复或EDTA水煮抗原修复步骤，在染色之前便无需脱色。然而，很明显在防脱片上就只能进行一次染色。

七、组织保护免疫组化（TPI）：

防脱片上的H&E已染色切片进行免疫组化再染色的新方法

Patty Kubier, H.T.发明了一种新方法，对于前列腺穿刺活检和其他相似标本很有用，一张切片上一般有一例以上的H&E标本，而蜡块的进一步切片却没有该小病灶。我们把这种技术命名为“组织保护免疫组化（TPI）”，而且成功地应用在无数病例上。为了使该技术有效，重要的是原H&E切片必须是防脱片。不同于组织转移技术，在TPI方法中的液体封片剂是用于“保护”不需染色的H&E部分。该方法的第一步是选出需要染色的H&E部分，并在切片背面将这部分圈起来。去掉盖玻片，将液体封片剂滴加至不需染色的H&E部分，而要染色的部分则没被液体封片剂覆盖到。接着就进行常规抗原修复和染色。如果要进行高压抗原修复或EDTA水煮抗原修复，便无需对切片进行脱色步骤，因为HIER会很好地脱色。在染色完成（苏木素适当复染以及必须的其他染色）之后，切片在酒精内脱水并过二甲苯（除去被“保护”H&E部分上的液体封片剂），最后封片。最后的结果是一例H&E切片进行了免疫组化染色，而其余部分仍然为原本的H&E染色（尽管H&E染色可能稍微有点褪色）。该方法的主要缺陷就在于每张切片只能进行一种免疫组化染色。要记住，组织转移技术需要原始标本是在非防脱片上，而TPI则相反，需要原始标本是在防脱片上。（详细制作步骤见附3）

八、IHC中的假象

IHC中可能会出现许多不同类型的假象，下面列出了一些常见的假象：

1. “褪皮假象” 我将该词用于描述我每天都会遇到的最经常发生的IHC假象。该问题是由于单独的鳞状细胞从我们人体的皮肤脱落并漂浮在空中，最后粘附到要进行IHC染色的防脱片上。这种假象只在检测高分子CK时才会被注意到（包括34βE12, AE1/AE3, CK5及CK5/6），因为鳞状细胞上有很多高分子CK，它们会与这类CK的抗体起反应。因此，切片上的所有鳞状细胞都会与这些抗体发生反应，如果它们覆盖在组织切片上，则看起来像是一大片颜色涂在组织上方。如果在高倍镜下观察这些区域时，很容易就可以看到鳞状细胞（无核的）在组织切片的上方。这些细胞与CK的反应太强了以至于经常会有显色剂渗入这些鳞状细胞旁边的组织里。除了让技术员戴上手套、头巾、面罩和手术衣（很明显有些不实际），我还不知道有什么方法可以解决该问题。

2. “渗透”假象 这种假象会出现于细胞或组织上具有大量的抗原时，以至于显色剂沉淀看起来像是“渗透”至邻近的细胞或组织上。当观察HCG在绒毛膜癌上的表达时最经常见到这种假象，因为绒毛膜癌会产生非常多的HCG。正如前段所述，有时候“脱皮假阳性”也会呈现出显色剂渗入到无核鳞状细胞旁边的区域。

3. 气泡假象 有时候一个小气泡可能出现于组织切片上，从而将试剂与组织隔绝起来，因此，在气泡下不会有任何的免疫反应，由于这一阴性区域为圆形，所以很容易识别。小心避免在试剂中产生气泡便可解决该问题。在冲洗液（PBS或蒸馏水）

中加入Tween 20也可减少这种现象,当我们开始加入Tween 20到冲洗液之后再也没有碰到该问题。

4. 干片假象 任何有操作IHC一段时间的人都肯定会碰到这种假象。如果在孵育期间试剂干掉,取决于什么时候干片,可能会发生不同的情况。组织可能会完全阴性,或整张切片都呈现出弥漫的褐色。如果切片只有部分干掉,很经常会看到干掉区域的边缘呈现出不规则的带状显色剂沉淀。要避免该问题,必须确保孵育盒和切片位置完全水平。在我们实验室很少碰到该问题,因为我们的孵育时间相当短,而且使用“批式”的染色方法(包括将切片完全浸入试剂内)可消除出现该假象的可能性。

5. 困住假象 如果有一非常小片的组织在染色时脱离切片,试剂就有可能被困在这些区域下面,导致了显色剂沉淀集中在这一区域。这种假象通常很容易辨认,因为它非常集中而且显色剂沉淀的类型通常与细胞反应的显色类型不一致。这经常是由固定差的组织或硬化组织进行了HIER步骤(高压或微波加热)之后引起的。我们观察到当使用酪胺增强技术时这种假象更加明显,但还不知是什么原因引起的。

6. 边缘效应 组织切片的边缘也会呈现出假阳性现象,我认为这很像是上述“困住假象”的另一种形式。

7. 抗体滴度不当引起的假象 这已在上文的“真阳性与假阳性”中有说明。

8. 固定不当假象 固定不足或过度固定都会导致组织的不同区域呈现出不同强度的阳性,取决于组织特定区域的固定情况如何。如果看见中央区域为强阳性而外围区域为弱阳性,这是由于外围部分的过度固定引起的,因为福尔马林渗透到这部分会比到中央区域更久。相反地,组织固定不足经常会导致组织中央区域为弱阳性(因为固定时间不足导致福尔马林没有最佳地渗透到中央区域),而外围区域为强阳性(因为外围区域已被很好地固定)。注意将大组织切到恰当的尺寸和厚度(最厚2mm)以及注意在福尔马林内的固定时间。Vimentin染色可用于检测组织不同区域过度固定的程度,因为事实上每张切片上都会包含一些vimentin阳性的细胞。

9. 细菌污染假象 当抗体或其他溶液中有细菌滋生时会发生这种假象,看起来像是一堆小粒状的显色剂沉淀随机分布于组织切片的表面。这种假象通常很容易识别,因为细菌丛位于组织切片平面的上方,而且在高倍镜下可辨别为细菌。当使用放置很长时间的抗体稀释液时最经常发生这种现象。使用干净的玻璃器具来混合新鲜抗体可避免该问题。或者加入少量的噻汞撒(一种抗菌剂)也可以很有效地防止该问题。

10. 石墨假象 这种假象并不止于染色时,因为它可以发生于使用铅笔标记切片的任何时候。这种假象会导致切片上出现非常小片的暗黑色物质,这是由于极小粒的石墨由切片的标签区域脱离并粘到组织部分(或者血涂片等)。很明显,该问题的解决方法就是不要使用铅笔来标记切片。

11. 内源性生物素假象 该假象已在上文提过,卵白素成分与组织或细胞内的内源性生物素相结合会导致的假阳性染色。这最经常发生于肝和肾内(因为这些组织内富含线粒体),看起来为胞浆内的粒状显色剂沉淀,在染色中及阴性对照标本上都很明显。先用稀释蛋白预孵育再用冲泡的奶粉或稀释的生物素溶液孵育之后便可消除该问题。(无生物素的聚合物检测系统

也可避免这些假阳性)。

12. 沉淀状显色剂假象 如果DAB显色剂在使用前没有过滤,小块的沉淀状DAB便会聚集于切片表面。该结果与细菌污染引起的假象很相似。

13. 长霉假象 有时候我们会观察到在一些对照片上会长霉,这是由切片储存盒的污染引起的。当你见过一次之后就很容易识别出这种假象。用稀释的漂白水定期清洗切片储存盒可防止这类问题。

九、结 论

总之,必须记住IHC是一种很有用的辅助技术。我也相信永远记住一些“主要规则”是非常重要的。这些规则中的一部分是我自己想出的,一部分是Dr. Hector Battifora的,还有一些是我的IHC导师Dr. Mark Wick教给我的。

MILLER的免疫组化规则:

1. 在临床和形态学研究的基础上做出合理的鉴别诊断,使用一组的抗体来缩减鉴别诊断的范围。当对不同病例使用不同组的抗体时不要拘泥于“免疫组化罪恶感”,因为一次误诊的损失比一例疑难病例进行多种免疫组化分析所需的成本要高得多。

2. 组织处理要正确(切薄片,不要装满包埋盒,不要在福尔马林内泡太久)。记住“garbage in - garbage out”。

3. IHC并不完美而且肿瘤未必会按照教科书上所述的形态出现。因此,如果IHC结果没有任何意义,必须寻找其他解决方案。

4. 当使用IHC来诊断组织为良性或恶性时要特别小心。这里并没有识别恶性肿瘤的神奇标记物,对肿瘤为良性或恶性来源的检测最好要由一资深病理学家根据形态学标准作出诊断。

5. 制作自己的多肿瘤夹心蜡块。虽然有多肿瘤切片销售,但一张切片大约\$13-\$15,很明显在用于大量必须的质控步骤时没人能用得起。因此你必须自己制作。

6. 不要盲目按照说明书提供的一抗滴度进行实验,因为它们可能会有所出入。

7. 要知道所使用标记物的反应范围及预期的反应类型,且要注意外部和内部阳性与阴性对照。知道真阳性与假阳性染色的特征。还有,不要解释固定不好的组织、坏死组织或标本边缘区域,因为这些经常会产生假象。

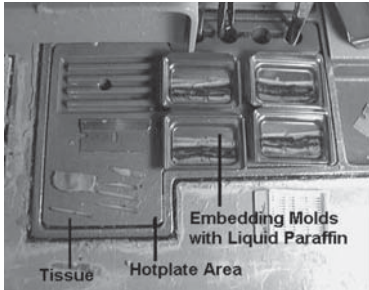
8. 如果使用卵白素-生物素检测系统,在所有病例中都必须阻断内源性生物素活性。

9. 如果处理细胞学标本,最好制作细胞蜡块。如果处理细胞涂片标本,使用非脱片以便有需要时可以使用组织转移技术。

10. 不要做落后的实验室。要不断地对新的方法、固定方式、试剂和技术进行试验并作出改进。只有这样你的实验室才会一直成长和进步。

附1、多肿瘤夹心蜡块制作方法

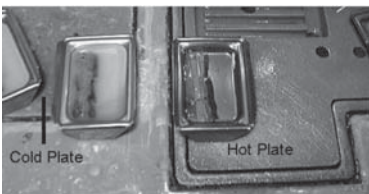
1. 先由石蜡包埋好的肿瘤组织开始。对于诊断实验室，对



照标本最好以与常规诊断标本一样的方式处理。将组织放在烤盘上软化，然后用温的单边刀片将其切成薄片（将刀片放在烤盘上以使其变暖）。

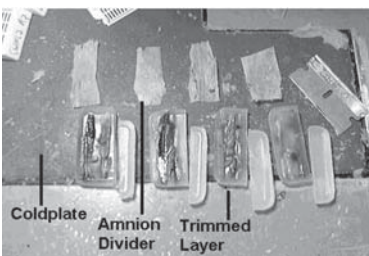
2. 取一个大的包埋盒，放入少量液体石蜡，并将其放在烤盘上以保持组织温暖及石蜡溶化。将那些对照组织薄片一根挨一根地纵向放入包埋盒的底部（类似于排火柴棒）。

3. 当添加完所需的肿瘤条时，将包埋盒放在冷却台上。当



石蜡凝固起来之后组织条便固定起来。现在再加入足够的液体石蜡来覆盖组织，并很快地将其放回冷却台上。此时，便已完成了夹心蜡块的第一层。

将包埋盒放入冰箱一会儿，然后把里面的东西倒出来。你就会得到包含有许多相邻组织条的石蜡方块。

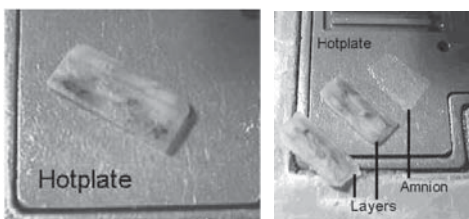


4. 根据要做多少层的夹心蜡块而重复1-3步那么多次。

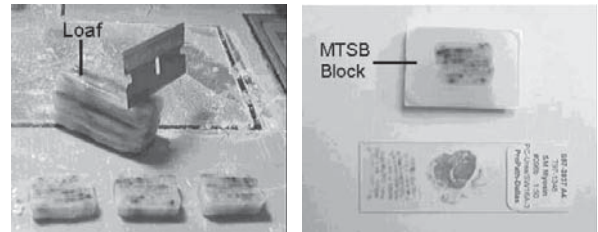
5. 可选步骤：如果你拥有已涂上石蜡的羊膜或者其他容易切割的隔膜，将它们切成能盖过一层夹心的方块状，并将其放在烤盘上以保持暖和，这些将用于隔开夹心蜡块的相邻层。

6. 将各层多余的石蜡去除掉。将一层夹心块的背面放在烤盘上暖一下，但不要在烤盘上放太久，否则会由于石蜡溶化而导致肿瘤组织条散开。滴一滴液体石蜡在该层的上表面，并马上将第二层放在第一层的上方。如果有需要在两层之间用羊膜或其它隔膜分割开来，也必须滴加液体石蜡并将其放置于相邻层之间。

7. 重复第6步骤多次以获得所需的层数。此时已获得了一“大块”的对照组织。在这块组织还是暖和的时候，就用一暖和的刀片横向切该块（如果切一块冷的蜡块，可能会碎掉）。



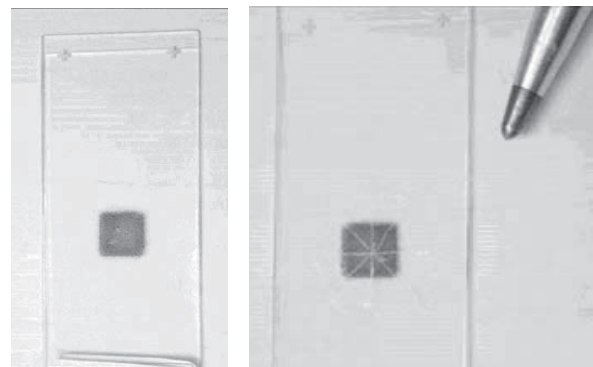
8. 将这些小块包埋至蜡块内（小心不要让石蜡过热以免肿瘤组织散开）。此时便拥有一完整的多肿瘤夹心蜡块。最后将这与病例组织捞在同一张切片上。



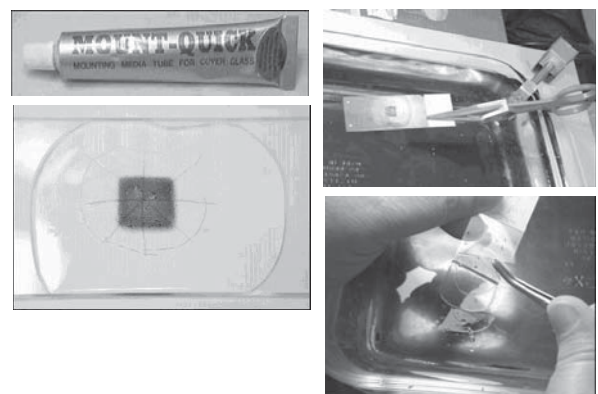
附2、组织转移免疫组化技术

Miller RT, Kubier P: Immunohistochemistry on Cytologic Specimens and Previously Stained Slides (When No Paraffin Block Is Available). Journal of Histotechnology, 25(4):251-257, 2002.

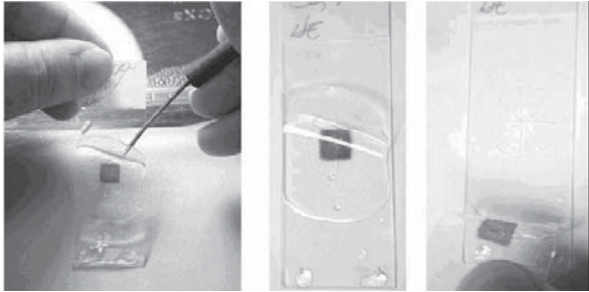
1. 观察切片，选出要染色的区域，在切片的背面标记出来。如下图所示，该已染过H&E的组织可切成8小部分。



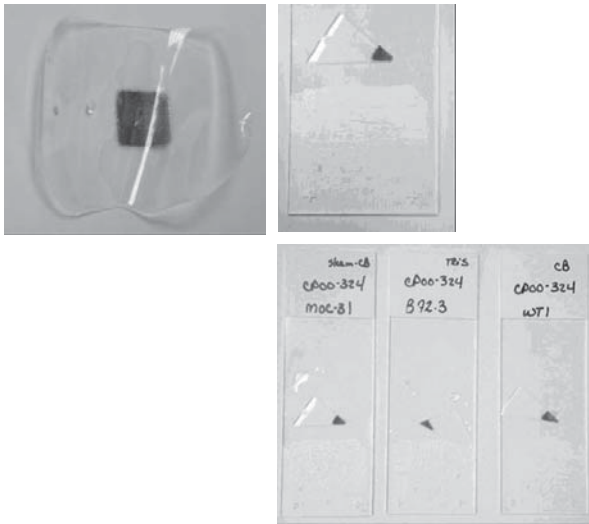
2. 移去盖玻片，浸入二甲苯，加入Mount-Quick封片剂至切片表面，并放至烤箱烘干，如下图所示。



3. 将切片浸泡于温水中，用镊子慢慢地将标本从切片上取下。用一尖锐的针头也可协助标本从切片上脱离，如下图所示。



4. 标本一旦脱离切片便马上按照前面所标记的切成小片，然后放至防脱片上（相同面朝上），如下图所示。接着放入烤箱烘干，二甲苯脱蜡（溶解液体封片剂），正常染色。



5. 总共8例染色中的3例在右边列出，以及1张染过H&E的切片。如下图所示。



附3、组织保护免疫组化技术

(Excerpted from: Kubier P, Miller RT: Tissue Protection Immunohistochemistry (TPI): A Useful Adjunct in the Interpretation of Prostate Biopsies and Other Select Cases Where Immunostains are Needed on Minute Lesions., American Journal of Clinical Pathology 117:194-198, 2002)

图1

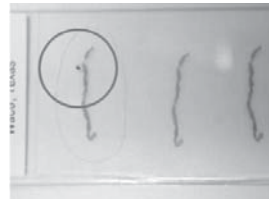


图2

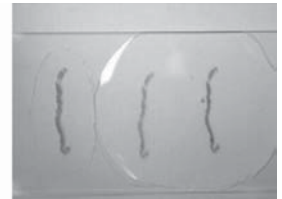


图1为一例在防脱片上（TPI的必要条件）的前列腺穿刺活检病例的H&E染色照片。活检上包含有一微小的疑似区域（在图1的左侧，用一小点标出），而且只呈现于该切片上，进一步切片时便消失了。该切片的左侧那部分组织将进行高分子量CK免疫组化染色。TPI的第一步便是在切片的背面标记出要染色的部分（图1）。在移去盖玻片之后，用液体封片剂覆盖住不进行免疫组化染色的另外两个H&E部分（保护这些H&E组织，图2）。此时，切片照常进行高压抗原修复和高分子量CK免疫组化染色。

图3



图4

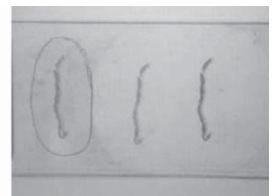


图3为切片刚从高压锅拿出时的情况。高压抗原修复步骤已将左侧的组织褪色，而剩下的H&E组织由于受到液体封片剂的保护而得以保持它们的H&E染色。图4为完整的TPI染色。常规复染之后，在封片之前的脱蜡步骤将溶解封片剂。在切片右边的两例“被保护”H&E组织没有改变，而左边的组织已进行了高分子量CK染色。该方法使得免疫组化染色跟与之相对应的H&E染色之间的对比和联系变得简单。