

抗原修复时间对不同克隆号 P40 免疫组化染色结果的影响

陈贵东, 杨通, 沈艳, 古婉仪

(广州医科大学附属第二医院病理科, 广东 广州 511447)

摘要 目的:探讨抗原修复时间对不同克隆号的P40免疫组化染色结果的影响。方法:选择本科室P40免疫组化染色异常的胸水细胞沉渣包埋蜡块,3 μm连续切片4张,按抗原修复时间不同分为两组(A组抗原修复40 min,B组抗原修复80 min),每组两张切片分别滴加C3B4和MXR010两种不同克隆号的P40抗体,进行免疫组化染色对比实验。结果:A组的C3B4出现胞浆胞膜中度非特异染色,而MXR010没有出现非特异染色。B组的C3B4出现胞浆胞膜高度非特异染色,而MXR010出现胞浆胞膜轻度非特异染色。同一克隆号,A组和B组相比,随着抗原修复时间的延长,MXR010从无非特异染色变为轻度非特异染色,而C3B4从中度非特异染色加重为高度非特异染色。结论:抗原修复时间对不同克隆号的P40免疫组化染色结果会产生影响,随着抗原修复时间的延长,越容易出现非特异染色。选择适当的抗原修复时间和特异性好的抗体,可以减少免疫组化的非特异染色。

关键词 免疫组化;抗原修复时间;P40

中图分类号:R392.33 文献标识码:A 文章编号:2095-9664(2024)02-0051-05

Effect of antigen retrieval time on the immunohistochemical staining results of P40 with different clones

CHEN Guidong, YANG Tong, SHEN Yan, GU Wanyi

(Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511447, Guangdong, China)

Corresponding author: CHEN Guidong, Email:cgd8565@163.com

Abstract Objective: To explore the effect of antigen retrieval time on the immunohistochemical staining results of P40 with different Clones. **Methods:** The pleural effusion cell sedimen with abnormal immunohistochemical staining of P40 was collected. Four sections of cell sediment with a thickness of 3 microns were divided into two groups according to antigen retrieval time. group A had a duration of 40 minutes and group B had a duration of 80 minutes. Performed immunohistochemical staining and added P40 antibodies of Clone C3B4 and MXR010 to two slices separately in each group. **Results:** In group A, C3B4 showed moderatenonspecific staining of cytoplasm and membrane, while MXR010 did not show nonspecific staining. In group B, C3B4 showed severe nonspecific staining of cytoplasm and membrane, while MXR010 showed mildnonspecific staining of cytoplasm and membrane. Compared the same clone between group A and group B, with the prolongation of antigen retrieval time, MXR010 changed from no nonspecific staining to mild nonspecific staining, while C3B4 changed from moderate nonspecific staining to severe nonspecific staining. **Conclusion:** The antigen retrieval time will have an effect on the immunohistochemical staining results of P40 with different clones. As the antigen retrieval time prolongs, nonspecific staining becomes more likely to occur. Choosing appropriate antigen retrieval time and antibodies with good specificity can reduce nonspecific staining.

Key words immunohistochemistry; antigen retrieval time; P40

免疫组化技术是病理诊断和精准治疗的重要检测手段。全自动免疫组化仪的应用,实现了染色流程的自动化和标准化,减少了人为因素的影响。不过,抗原修复条件仍然是影响免疫组化染色结果的重要因素^[1],NordiqC从2003年至2015年,对30 000多张免疫组化染色切片进行评估,发现导致染色结果不足的最常见原因是抗原修复不足或错误(27%)^[2]。抗原修复方法主要有酶修复和热修复,其中热修复的关键因素包括修复液pH值,修复温度和修复时间^[3-4]。利用不同的免疫组化仪进行抗原修复,染色结果阳性率有所不同,这与修复的温度、时间和pH值等因素有关^[5]。全自动免疫组化仪的抗原修复液常用pH6.0的柠檬酸和pH9.0的Tris-EDTA两种,相比而言,pH9.0的Tris-EDTA效果更好^[6]。全自动免疫组化仪的抗原修复温度可以自由控温。有研究发现,pH9.0的Tris-EDTA,97℃水煮修复45 min可以回收大部分抗原^[7]。本实验利用全自动免疫组化仪,在选择修复液pH9.0的Tris-EDTA,修复温度97℃的前提下,探讨抗原修复时间对不同克隆号P40免疫组化染色结果的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

选择本科室P40免疫组化染色异常的胸水细胞沉渣包埋蜡块,3 μm连续切片4张(每张切片上均附有扁桃体组织作为阳性对照),随机分为两组,每组两张切片。P40抗体克隆号C3B4购自赛诺特,克隆号MXR010购自迈新。赛诺特CNT-330全自动免疫组化仪及其配套二抗检测显色系统和试剂。

1.2 免疫组化染色方法

根据抗原修复时间不同分为两组,A组抗原修复40 min,B组抗原修复80 min。每组两张切片,一抗分别选择克隆号C3B4和MXR010的P40。免疫组化染色方法按赛诺特CNT-330全自动免疫组化仪标准流程处理,抗原修复液为pH9.0的Tris-EDTA,抗原修复温度97℃。

1.3 免疫组化染色结果判断

P40表达定位于细胞核,阳性细胞呈黄色或棕黄色。P40染色结果采用半定量方法判断:

①按细胞染色定位评分:阴性为0分;正确定位于细胞核为1分;非特异定位于胞浆胞膜为-1分。

②按细胞染色强弱评分:不着色为0分;浅黄色

为1分;棕黄色为2分;棕褐色为3分。

③计数DAB染色细胞占细胞总数的百分比:无DAB染色细胞为0分;DAB染色细胞数<10%为1分;DAB染色细胞数10%~50%为2分;DAB染色细胞数>50%为3分。

按以上三项评分乘积判断结果:0为阴性/无非特异染色;1~2为弱阳性;3~4为中等阳性;>4为强阳性。相反则,-1~-2为轻度非特异染色;-3~-4为中度非特异染色;<-4为高度非特异染色。

2 结果

2.1 不同克隆号的P40用相同抗原修复时间的染色结果

A组抗原修复40 min,C3B4出现明显的胞浆胞膜浅黄色中度非特异染色(图1);而MXR010染色背景干净,无非特异染色(图2)。B组抗原修复80 min,C3B4出现弥漫的胞浆胞膜棕黄色高度非特异染色(图3);而MXR010仅在局部散在个别细胞出现胞浆胞膜浅黄色的轻度非特异染色(图4)。

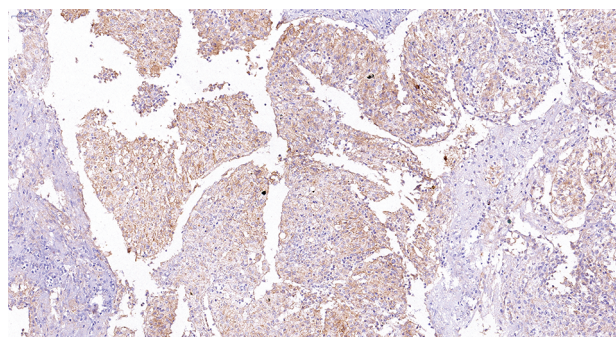


图1 抗原修复40 min的P40(C3B4)免疫组化染色结果(20×)

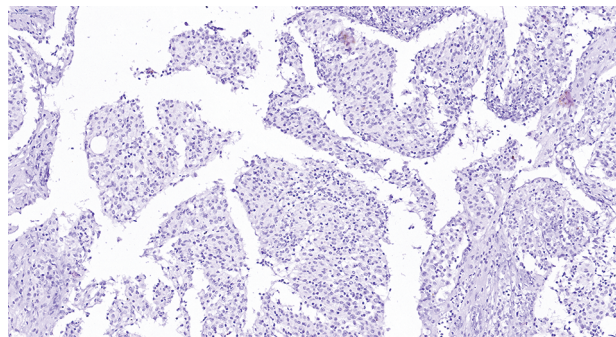


图2 抗原修复40 min的P40(MXR010)免疫组化染色结果(20×)

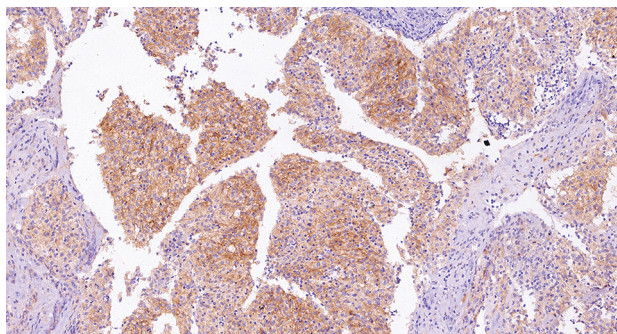


图3 抗原修复 80 min 的 P40(C3B4)免疫组化染色结果 (20×)

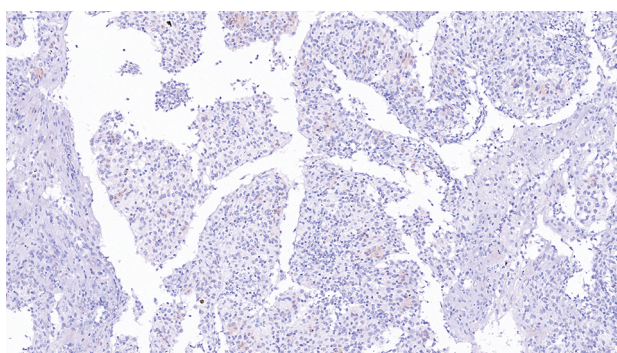


图4 抗原修复 80 min 的 P40(MXR010)免疫组化染色结果 (20×)

2.2 同一克隆号的P40用不同抗原修复时间的染色结果

比较A组和B组的C3B4,随着抗原修复时间从40 min 延长到80 min,其染色结果从中度非特异染色(评分乘积为-3)加重至高度非特异染色(评分乘积为-6)。比较A组和B组的MXR010,随着抗原修复时间的延长,其染色结果从无非特异染色(评分乘积为0)到出现轻度非特异染色(评分乘积为-1),具体见表1。

3 讨论

免疫组化是一个多步骤的实验过程,涉及抗体

试剂广,影响染色质量的因素很多,其中抗体的质量和抗原修复条件是关键因素^[8]。通常实验室新进的抗体均需通过预实验来检测抗体的特异性和敏感度,摸索最佳实验条件,保证染色效果。一般可以根据抗体说明书,查阅相关文献,通过Nordiqc免疫组化室间质评机构等查询了解抗体的信息,包括免疫组化染色平台的选择,抗体稀释及孵育时间,抗原修复条件等。本科室在新进P40(C3B4)抗体,正式使用之前,通过以上途径了解的抗体信息,结合赛诺特CNT-330全自动免疫组化仪的使用情况和预实验结果,最终确定该抗体的最佳抗原修复条件为:抗原修复液pH9.0的Tris-EDTA,97℃修复40 min。按此条件,扁桃体对照组织的细胞核阳性强度合适,背景干净。

但在后续使用过程中,本科室自2022年3月至2023年3月,一共进行了118例P40(C3B4)免疫组化染色,其中5例胸水细胞沉渣切片出现不同程度的胞浆胞膜染色,异常染色率4.2%(5/118)。这5例出现胞浆胞膜染色的病例均为胸水细胞沉渣,没有组织学标本出现此类现象;并且这5例胸水细胞沉渣切片上只有待检细胞沉渣出现胞浆胞膜染色,而同一张切片上的扁桃体对照组织均定位正确,表现为正常的细胞核阳性。郭凯等^[9]报道了类似情况,CD20免疫组化染色结果,阑尾对照组织正确定位于淋巴细胞胞膜上,而子宫低分化癌组织中部分表达在癌细胞核上。其认为全自动免疫组化仪与第一抗体不匹配导致假阳性的出现,Matsuda等^[10]也曾报道过这类现象。但本科室使用的P40(C3B4)购自赛诺特,与赛诺特CNT-330全自动免疫组化仪及其配套的二抗检测显色系统理论上应该是匹配的。为何还会出现P40(C3B4)胞浆胞膜染色?为了进一步分析这种情况,本科室在发现第一例P40(C3B4)胞浆胞膜染色时,第一时间对本科室的试剂、实验流程进行自查,核验无误,并重复了一次检测,染色结果与第一次一致。于是又将该病例重新切白片,送给其他病理科实验室进行验证。对方使用迈新

表1 抗原修复时间不同的两组P40免疫组化染色结果

编号	①细胞染色定位评分	②细胞染色强弱评分	③DAB染色细胞百分比评分	①②③评分乘积	染色结果
A组C3B4	-1	1	3	-3	中度非特异染色
A组MXR010	0	0	0	0	无非特异染色
B组C3B4	-1	2	3	-6	高度非特异染色
B组MXR010	-1	1	1	-1	轻度非特异染色

P40(MXR010)抗体,在罗氏 ventena- ultra 全自动免疫组化仪上进行免疫组化染色。结果表明,胸水细胞沉渣切片呈阴性,且没有胞浆膜染色;同一张切片上的扁桃体阳性对照组织也正常定位于细胞核,背景干净。这说明本例胸水细胞沉渣切片的P40(C3B4)胞浆膜着色属于非特异染色。

为了寻找这种非特异染色的原因,作者使用赛诺特 CNT-330 全自动免疫组化仪,在选择修复液 pH9.0 的 Tris-EDTA,修复温度 97 °C 的前提下,通过 40 min 和 80 min 不同的抗原修复时间对 C3B4 和 MXR010 两种克隆号的 P40 进行对比实验。结果表明,相同的抗原修复时间,C3B4 比 MXR010 更容易出现非特异染色。这说明不同克隆号的同一抗体其染色结果有差异,有报道甚至可能出现完全相反的结果^[11]。一抗质量的优劣是影响免疫组化染色结果的重要因素之一,选择特异性好、灵敏度高的抗体很重要。另外,同一克隆号的抗体用不同的抗原修复时间,染色结果也不同。MXR010 随着抗原修复时间从 40 min 延长到 80 min,从原来的无非特异染色变为局灶个别细胞出现轻度非特异染色。而 C3B4 随着抗原修复时间的延长,从中度非特异染色加重到高度非特异染色。这说明延长修复时间可能造成修复过度,会引起和加重非特异染色。因过度修复导致非特异染色时,缩短抗原修复时间会一定程度改善非特异染色。本科室在前期摸索 P40(C3B4)的预实验时,发现修复时间 30 min 时,扁桃体对照的细胞核阳性强度偏弱,当修复时间提高到 40 min 时,扁桃体对照的细胞核阳性强度足,效果更好。所以,在上述对比实验中,没有选择缩短修复时间,是为了避免因修复不足导致阳性强度减弱甚至出现假阴性。相反选择了延长修复时间至 80 min,以此来验证过度修复会导致和加重非特异染色的观点。综上所述,抗原修复时间对不同克隆号的 P40 免疫组化染色结果会产生影响,随着抗原修复时间的延长,越容易出现非特异染色。选择适当的抗原修复时间和特异性好的抗体,可以减少免疫组化的非特异染色。

另外,福尔马林固定会引起血浆蛋白渗透到某些细胞的胞质中,导致非特异性的扩散假象^[12]。例如霍奇金淋巴瘤中的 RS 细胞和霍奇金细胞的胞质对 kappa 和 lambda 链均呈多克隆阳性。这种看似阳性信号,实际只是一种非特异染色。根据上述观点,本研究中 P40(C3B4)胞浆膜非特异染色或许

有另一种解释:即胸水细胞沉渣可能含有丰富的血浆蛋白,经福尔马林固定,血浆蛋白渗透到某些细胞的胞质中,血浆蛋白与 P40(C3B4)存在交叉反应性,从而导致胞浆膜非特异染色。

值得一提的是,Ki-67 通常定位于细胞核,当 Ki-67 出现胞浆膜而非细胞核定位时,病理医生很容易识别其定位是非特异性的。但甲状腺透明化小梁瘤对克隆号 MIB-1 的 Ki-67 表现出细胞膜阳性^[13],这种 MIB-1 膜阳性不是非特异染色,而是诊断甲状腺透明化小梁瘤的特征指标。此外,肺硬化性血管瘤^[14]、乳腺肿瘤^[15]等也有 MIB-1 膜阳性的现象。Takada 等^[16]报道抗原修复方式会影响甲状腺透明化小梁瘤的 MIB-1 细胞膜染色结果,全自动染色仪容易出现假阴性,建议手工进行抗原修复。本研究中的 P40(C3B4)也是原本定位于细胞核,但在某些胸水细胞沉渣切片中出现胞浆膜定位,这是否与 Ki-67(MIB-1)在甲状腺透明化小梁瘤中的膜定位一样对某些特定的疾病具有诊断意义?目前尚无这方面的报道。综上,本科室没有选择更改使用其他克隆号的 P40,而是选择继续使用 P40(C3B4),进一步收集病例和积累数据,以其分析 P40(C3B4)是否具有类似 Ki-67(MIB-1)的诊断价值。

参考文献

- [1] 马秀丽,周立新,吴琪.探索不同抗原修复条件对微卫星不稳定性阳性表达的影响[J].诊断病理学杂志,2019,26(2):121-124.
- [2] Vyberg M, Nielsen S. Proficiency testing in immunohistochemistry—experiences from Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiqC) [J]. Virchows Arch,2016,468(1):19-29.
- [3] 李碧奇,韦康来.抗原修复方法在免疫组织化学染色中的应用及研究进展[J].实用医技杂志,2023,30(4):292-296.
- [4] 李梅,龙卫国,钟安菁.不同抗原修复条件对肠癌 MMR 蛋白免疫组织化学染色效果的影响[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2021,30(2):185-188.
- [5] 虞飞,冯立文,项鹏程,等.不同抗原修复方法在淋巴瘤免疫组化检测中的应用[J].诊断病理学杂志,2019,26(9):622-623.
- [6] Hira VVV, de Jong AL, Ferro K, et al. Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry [J]. Acta Histochem,2019,121(2):125-134.
- [7] George B, Haque A, Sahu V, et al. Enhancing antigen

- retrieval to unmask signaling phosphoproteins in formalin-fixed archival tissues [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2022, 30(5): 333-339.
- [8] Janardhan KS, Jensen H, Clayton NP, et al. Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology[J]. *Toxicol Pathol*, 2018, 46(5): 488-510.
- [9] 郭凯, 张金秋, 梁洁, 等. 全自动免疫组化仪与第一抗体不匹配导致假阳性分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, (8): 1409-1411.
- [10] Matsuda I, Sugihara N, Yunokizaki H, et al. A case of immunohistochemical false positive staining caused by incompatibility between a CD4 antibody and an autostainer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 1019-1024.
- [11] 廖德贵, 赖妙玲, 唐甜, 等. 免疫组化抗体的选择与优化对报告结果的影响[J]. *热带医学杂志*, 2016, 16(9): 1126-1128.
- [12] Tsutsumi Y. Pitfalls and Caveats in Applying Chromogenic Immunostaining to Histopathological Diagnosis[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1501.
- [13] Hirokawa M, Shimizu M, Manabe T, et al. Hyalinizing trabecular adenoma of thyroid: its unusual cytoplasmic immunopositivity for MIB-1[J]. *Pathol Int*, 1995, 45(5): 399-401.
- [14] Hattori H. Sclerosing haemangioma of the lung is positive for MIB-1 in cell membrane and cytoplasmic staining pattern[J]. *Histopathology*, 2002, 40(3): 291-293.
- [15] Cserni G. Analysis of membranous Ki-67 staining in breast cancer and surrounding breast epithelium [J]. *Virchows Arch*, 2018, 473(2): 145-153.
- [16] Takada N, Hirokawa M, Ohbayashi C, et al. Re-evaluation of MIB-1 immunostaining for diagnosing hyalinizing trabecular tumour of the thyroid: semi-automated techniques with manual antigen retrieval are more accurate than fully automated techniques [J]. *Endocr J*, 2018, 65(2): 239-244.

(收稿日期: 2023-09-10)

(本文编辑: 欧阳菁)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

医学论文中阿拉伯数字的使用规则

本刊关于阿拉伯数字的使用规则如下: (1) 凡是可以使用阿拉伯数字而且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。(2) 公历世纪、年代、年、月、日和时刻必须使用阿拉伯数字。(3) 日期可采用全数字式写法, 例如: 1999-02-01 或 1999 02 01 或 19990201, 本刊采用如下格式: 1999年2月1日, 年份用4位数表示, 不能简写, 如1999年不能写成99年。(4) 日的的时间表示按以下写法, 如下午3时20分50秒, 写成15:20:50。(5) 计量和计数单位的数字一律使用阿拉伯数字。(6) 引文标注中的版次、卷、期、页码等使用阿拉伯数字。(7) 小数点前或后超过4位数(含4位), 应从小数点起向左或向右每3位空半个阿拉伯数字的空隙(1/4汉字), 不用千分撇分节法, 年份、部队代号、仪器型号、标准号等非计量数字不分节。

关于论文的关键词选取

为了便于读者从浩瀚如海的书刊中寻找文献, 特别是适应计算机自动检索的需要, 现代科技期刊均应在学术论文的摘要之后、正文之前给出3~5个关键词。关键词的标引应按GB/T 3860-2009《文献主题标引规则》的规定, 在审读文题、前言、结论的基础上, 选定能反映论文特征内容、通用性比较强的关键词, 首先要选取列入《汉语主题词表》、《MeSH》等词表中的规范性词, 医学论文的关键词尽量从美国国立医学图书馆的MeSH数据库中选取, 其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。对于那些反映新技术、新学科而尚未被主题词表录入的新产生的名词术语(自由词), 亦可用非规范的自由词标出, 建议排在最后。要强调的是: 一定不要为了强调反映主题的全面性, 把关键词写成是一句内容“全面”的短语。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称, 每个关键词之间用分号(;)隔开。