

# IHC 免疫组化园地

本期编译：杨清海/刘勇/唐娜 审稿：杨清海

2011年第2期

## 免疫组化在淋巴瘤鉴别诊断中的应用

供稿：江西省人民医院 刘勇

在淋巴瘤的病理诊断和分类工作中，免疫组化是一种不可缺少的工具，主要应用于：反应性病变与淋巴瘤的鉴别、淋巴瘤与其他肿瘤的鉴别、淋巴瘤分类分级、淋巴瘤预后评估和确定治疗性的靶标，如Rituximab。随着新抗体不断涌现，免疫组化标记在淋巴瘤诊断和鉴别诊断中发挥着更加重要的作用。

肿瘤诊断应当结合临床表现和形态学观察，而后基于组织形态学的表现选择有价值的免疫标志物。在淋巴瘤的鉴别诊断中，肿瘤细胞的大小、细胞形态、分化阶段和淋巴结浸润模式都是缩小抗体选择范围最有帮助的特征。在结外，形态学表现如：成片的增殖、淋巴上皮样病变、血管周围或血管破坏性生长、浆细胞样改变等特征均能指导抗体的选择。图1所示为工作流程，其主要阐述了采用免疫组化辅助诊断淋巴瘤的方法。

本文主要以图表形式从七个方面阐述抗体的选择：（1）小淋巴细胞增殖伴滤泡或弥漫生长方式；（2）包含非典型大细胞结节性或滤泡性增殖；（3）大B细胞弥漫增殖；（4）浆细胞增殖；（5）T细胞和NK细胞来源的大细胞和副皮质区增殖；（6）伴母细胞形态的淋巴瘤；（7）淋巴结窦内生长弥漫浸润的淋巴瘤。表1~表7所呈现的免疫组化抗体组的构建有两个目的：第一，能够精确地识别最新WHO分类所涵盖的淋巴瘤、组织细胞和树突状细胞；第二，通过细胞形态学特征缩小适用抗体的选择范围。为了强调重点使用的抗体和避免不必要抗体标记物的使用，而设计有一线和二线抗体。一线抗体可能足以帮助最终诊断；然而，当一线抗体不足以做出明确诊断时，二线抗体组的联合运用就很有必要了。免疫组化不能作为单一的辅助诊断工具，对于一些肿瘤需联合细胞遗传学和分子遗传学检测。

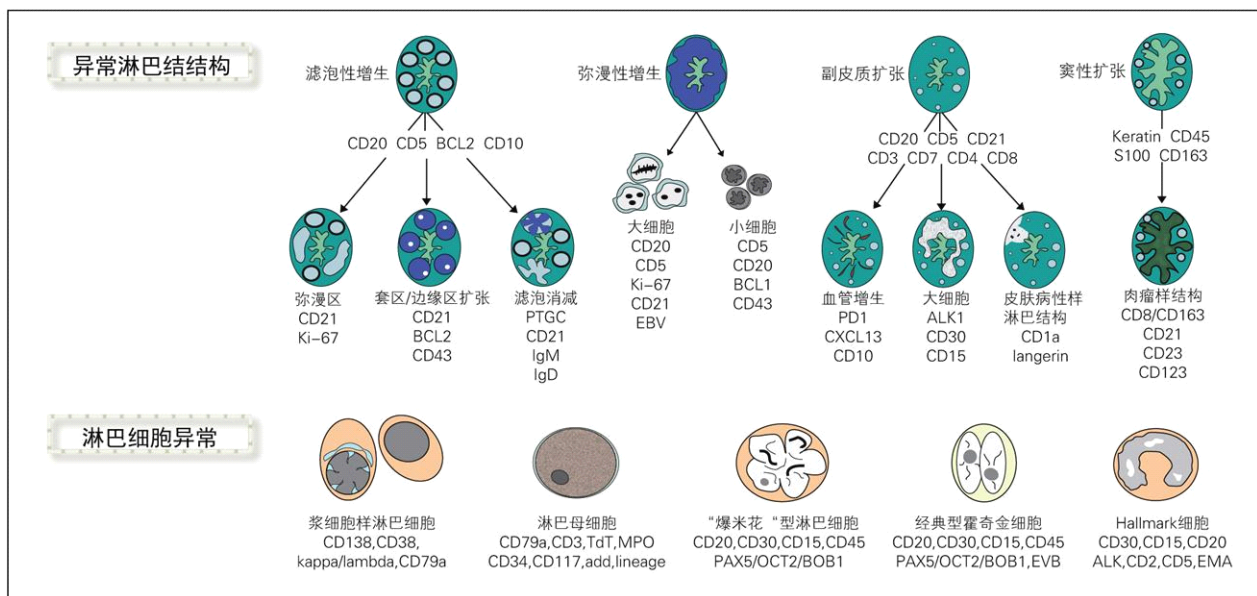


图1.淋巴瘤的诊断方法。此工作流程概括了基于形态学模式的淋巴瘤的免疫组化诊断方法。



表1. 小淋巴细胞增殖伴滤泡或弥漫生长方式，免疫组化抗体组合

抗体组合	
一线抗体	二线抗体
CD20	滤泡树突状细胞 ( FDC ) : CD21、CD23
CD5	附加的T细胞标志物: CD3、CD43
BCL2	增殖标志: Ki-67
CD10	免疫球蛋白: IgM、IgD、κ & λ 轻链 ( IHC或原位杂交 )
	Cyclins: BCL1、cyclin D2和cyclin D3
	附加的生发中心B细胞标志物: BCL6、HGAL、LMO2
	浆细胞样分化: CD138、CD38、CD79a
	特异性标志物: annexin A1、TRAP、DBA.44、CD25
具体运用和疾病诊断	
滤泡性淋巴瘤与滤泡反应性增生	BCL2染色定位于滤泡内, BCL2, CD20和1个或多个生发中心B细胞在滤泡或滤泡间区表达, t(14; 18)易位的出现证实淋巴瘤
慢性淋巴细胞白血病 ( CLL ) /小细胞淋巴瘤 ( SLL )	CD5和CD23共表达, CD10缺乏
边缘区淋巴瘤	CD43共表达, CD5和CD10缺乏
套细胞淋巴瘤 ( MCL )	BCL1、CD5和IgD共表达
淋巴浆细胞淋巴瘤	CD79a、CD138、κ 或 λ、CD20弱表达或缺失
毛细胞白血病	骨髓和脾脏网状纤维内浸润, CD20、CD25、TRAP、DBA.44和annexin A1表达
向大B细胞淋巴瘤演进	破坏的FDC网CD21显著表达, Ki-67评估弥漫区域增殖增加



表2. 包含非典型大细胞的结节性或滤泡增殖性病变的免疫组化抗体组合

抗体组合	
一线抗体	二线抗体
CD20	EBV: EBER原位杂交
CD3	CD45(LCA)
CD30	附加的B细胞转录因子: OCT2、BOB1、PU.1
CD15	生发中心T细胞: CD57、PD-1
PAX5	
具体运用和疾病诊断	
结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤	B细胞丰富的滤泡大网内出现CD20+的非典型大细胞, 该细胞CD30呈部分表达或缺失, CD15和EBV表达缺失, 并且CD45和B细胞转录因子强阳性; CD57和PD-1阳性T细胞环绕其周围
经典型霍奇金淋巴瘤 ( CHL )	CD30阳性大细胞伴CD15, EBV表达, CD20呈部分表达或缺失, B细胞转录因子弱表达或表达缺失, CD45表达缺失

未完待续……



## 客服问答

(1) 近期在免疫组化染色过程中时常出现组织不同程度的脱片现象，特别是切片经过抗原热修复之后脱片现象更加严重，请问出现这样的现象是由什么原因造成的，同时有什么好的办法可以防止组织脱片？

答：造成组织脱片的因素众多，主要有以下几方面，请结合自身实验室组织标本等情况采取相应的措施防止组织脱片。

- 1、组织前处理与蜡块选择：组织处理中特别是脱水、透明要彻底，浸蜡要适度，若以上组织前处理方式不当时易造成组织脱片，而且这个也是造成免疫组化染色过程中组织脱片的最常见原因；部分组织因为脂肪、坏死、钙化含量过多，特别是一些乳腺导管浸润癌，这些组织在抗原热修复时易发生脱片，在选择免疫组化实验蜡块时应尽量避免这些。
- 2、载玻片的质量：使用没有经过防脱处理的载玻片、载玻片清洗不干净就涂防脱胶或载玻片防脱处理不恰当，如多聚赖氨酸涂得不均匀或过厚等也容易造成免疫组化染色过程中组织脱片现象。
- 3、抗原修复：特别是进行抗原热修复（高温高压）时，以电磁炉配高压锅进行抗原修复为例：建议先使用大功率将修复液烧沸，然后将功率调至800-1000w，此时将装有切片的耐高温染色架放入修复液内盖上压力锅等喷气阀喷气时将电磁炉瓦数调定到200-500w，并维持1.5-2分钟，这样同大功率的修复对比，锅内压力都达到了所需的压力而温度也都达到124℃左右，只是使用大功率（如2100w）修复，修复液的沸腾程度过于剧烈（多余的压力通过喷气来卸载以保持锅内压力的恒定），且容易使组织脱片，若同时修复液pH值过高（≥9）更易使组织脱片。此外修复结束后应避免马上用冷水进行加速冷却，骤冷骤热使组织皱褶甚至脱片，而且也使抗原暴露不到位，建议修复结束后先在室温下自然冷却10min左右，再用冷水加速冷却，不能直接注入修复锅内，应在修复锅外壁冲淋。
- 4、切片质量不佳：切片厚度过厚，切片厚度不均匀，有皱褶、刀痕、气泡等，有这些现象的切片在抗原热修复及后续染色过程中易发生脱片，建议切片厚度为2-5 μm。
- 5、烤片温度和时间：烤片温度过低，烤片时间过短等均会造成组织脱片，建议烤片温度以高于使用包埋的石蜡的熔点3-5℃为宜，或在65-70℃中烤2-3h。
- 6、冲洗方式不正确：如PBS冲洗时，将冲洗瓶瓶口对着组织上方冲洗，也可选择浸泡方式。

(2) 我们在看贵公司的产品目录时候，发现一种抗体名称有多种不同克隆号，甚至种属也不一样，那我们在购买抗体时候要如何选择呢？

答：单克隆抗体的生产无法用整段抗原来进行免疫，而通常是用抗原中某一肽段进行免疫而产生的，因为选择免疫的肽段不同，所产生不同克隆的抗体虽然都表达某个特定的蛋白质，但这些抗体间也不尽相同，这些不同体现在抗体对特定蛋白质表达的敏感性、特异性甚至亲和性上。我们就用ki-67抗体来说明，常见的克隆有：MIB1、K2和兔单克隆的SP6等。克隆号为MIB-1的Ki-67，其对细胞核增殖表达的敏感性和特异性都很突出，但对脂肪来源肿瘤的识别能力一般，而且不能用于小鼠动物实验，故很多研究者都用这个克隆来测试人体组织的细胞核增殖指数；而克隆号为K-2，对细胞核增殖表达的敏感性和特异性都一般，但有资料说明该克隆可以很好的表达脂肪细胞及其来源的肿瘤，所以人们通常将其用于脂肪性肿瘤的鉴别；兔单克隆抗体Ki-67,其保持了兔抗体良好的亲和性，对细胞核蛋白表达的特异性和敏感性并不亚于MIB-1，而且可以表达小鼠等动物，通常研究者是将其用于细胞核增殖指数的测定和小鼠动物实验的使用。克隆号代表着抗体的唯一身份，不同克隆抗体表达不尽相同。研究者要通过自己使用的角度出发来选用不同克隆的抗体，这些选用因为其专业性通常在专业的书籍中有良好的说明，还有厂家说明书和其推荐有一点的参考意义。

## 迈新·病理基金项目专栏

病理诊断技术准确性的提高离不开病理工作者和免疫组化试剂研发人员的不懈努力，为了增强病理技术的创新和应用，促进免疫组化技术应用的标准化和普及，以推动我国病理学工作的深入开展，2009年，福州迈新生物技术开发有限公司投入伍拾万人民币全资设立了“迈新·病理基金”，并由以吴秉铨教授为主席的国内5位知名专家组成基金管理委员会评定委员会，秉持“择优支持、公正合理”的原则，全权负责项目评审立项、监督管理。

### 基金宗旨

贯彻落实国家鼓励原始创新，加快国家创新步伐，挖掘和培养优秀的人才，大力弘扬科学精神，回馈病理界对迈新的长期支持，促进我国病理事业发展、科技进步和病理人才成长。

### 基金运作方向

“基金”研发经费面向全国病理学科，主要用于免疫组化诊断试剂的研发、技术改进与新试剂应用以及免疫组化标准化的研究和中青年专业人才的培养。

### 申请条件

凡所在单位具备项目研究基本条件，已从事病理专业五年以上，具有副高（含副高）以下，从事病理技术和诊断的中青年专业人员，在具备科研项目研究时间和能力的基础上均可申请。

迈新·病理基金活动自开展以来，得到了病理界各位老师的大力支持和踊跃参与，在此表示衷心的感谢！期间收到了众多的迈新·病理基金项目申请书，其中不乏创新性、可行性好的项目，经以吴秉铨教授为主席的专家评定委员会审核通过，截止到目前为止，共有12个项目获得不同额度的资助，具体项目如下：

年份	序号	姓名	单位	课题名称
2009	1	刘从容	北京大学医学部	利用液基细胞涂片剩余材料制作宫颈细胞蜡块技术及相关免疫组化指标的应用研究
	2	刘岩	天津市胸科医院	脱落细胞石蜡切片制备及免疫组化染色
	3	郑莉	上海交通大学附属上海第六人民医院	53BP1蛋白表达与前列腺癌的临床病理相关性及对肿瘤预后的意义
2010	1	梁英杰	中山大学附属第一医院	免疫组化辅助诊断鼻咽癌抗体的选择
	2	曾亮	湖南省肿瘤医院	非石蜡切片免疫组织化学检测的开展及标准化研究
	3	梅开勇	广州医学院第二附属医院	SALL4等干细胞标记在胚胎性肿瘤中的诊断价值
	4	魏兵	四川大学华西医院	运用免疫组化染色对乳腺浸润性小叶癌进行分子分型
	5	许三鹏	华中科技大学同济医学院附属同济医院病理研究所	免疫组化标准物的研制、验证与应用
	6	刘爱军	解放军总医院	卵巢组织中肿瘤干细胞相关标记物的表达
	7	李百周	浙江大学医学院附二院	不同类型的淋巴瘤内浸润性FOXP3+的Treg细胞对临床预后的相关性研究
	8	黄文斌	南京医科大学附属南京第一医院	胰腺癌形态蛋白质组学研究及化疗耐药之间的关系
	9	饶秋	南京军区总院	Cathepsin - K在Xp11肾癌及MITF家族其它肿瘤成员中的诊断价值研究

2011年迈新·病理基金计划项目申请报告提交截止时间为：10月14日，您可以登录迈新公司主页：<http://www.maxim.com.cn/>下载或通过Email：[maxim.fund@gmail.com](mailto:maxim.fund@gmail.com)或[maxim.fund@maxim.com.cn](mailto:maxim.fund@maxim.com.cn)索取相关表格进行申请。本着“择优支持、公正合理”的评审原则，迈新·病理基金管理委员会将组织知名专家进行统一评审，项目将通过通讯评审和基金常务会议评审相结合的方式进行评审，评审时间：10月24日—11月24日，评审结果公布时间：12月中下旬。欢迎病理界同仁踊跃参与！具体动态请关注迈新公司主页或与相关工作人员联系，联系人：唐娜 13665019968。