

网络出版时间:2018-4-23 14:34 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180423.1433.027.html

改良 EDTA 脱钙液在骨髓活检组织中染色效果观察



翁丹枫, 张声, 李国平, 王鹏程, 黎三艳

关键词: 骨髓活检组织; EDTA; 脱钙液; HE 染色; 免疫组织化学

中图分类号: R 446.8 文献标志码: B

文章编号: 1001-7399(2018)04-0461-03

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.04.027

骨髓活检结合免疫组化染色对于血液系统疾病诊断、判断临床预后具有重要意义^[1]。骨髓组织细胞种类多和组织学形态丰富,部分病例需结合免疫组化染色以明确诊断^[2]。骨髓组织质地较硬,需脱钙后才能进行常规制片和免疫组化染色^[3]。其中最常用的酸类脱钙液易造成组织细胞表面抗原破坏或丢失,影响免疫组化染色结果^[4]。EDTA 的脱钙作用优于酸性脱钙液^[5],但脱钙速度慢、脱钙后组织会稍微变硬^[6]。本实验通过比较改良 EDTA 脱钙液脱钙骨髓与混合酸脱钙液脱钙及不脱钙骨髓的 HE 染色和免疫组化染色效果,探讨改良 EDTA 脱钙液在骨髓病理诊断中的意义。

1 材料与方法

1.1 脱钙液配制 (1)混合酸脱钙液(pH 3.2):10%中性福尔马林 500 mL + 95%乙醇 500 mL,加入甲酸 200 mL,最后缓慢加入浓盐酸 150 mL。(2)改良 EDTA 脱钙液(pH 7.0):取乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)250 g,溶于 1 350 mL 磷酸盐缓冲液中,待溶液彻底溶解后加入 40%甲醛 150 mL,加入氢氧化钠调溶液 pH 值为 7.0。

1.2 标本制备及分组 选取 2016 年 9 月~2017 年 2 月福建医科大学附属第一医院病理科骨髓活检标本 61 例,其中浆细胞骨髓瘤 20 例,行 CD56、CD38、Kappa 和 Lambda 免疫组化染色;淋巴瘤 21 例,行 CD3、CD20、CD42b、CD68、CD138、CD235a 和 MPO 染色;转移癌 20 例,行 Ki-67 染色。每例分为 3 段,分别放入已做分组标记的包埋盒中:A 组经 10%中性福尔马林固定后放入混合酸脱钙液,B 组直接放入改良 EDTA 脱钙液,C 组经 10%中性福尔马林固定后不脱钙直接制片。

1.3 脱钙及脱钙终点的判定 A 和 B 两组在室温下脱钙,

接受日期:2018-01-10

作者单位:福建医科大学附属第一医院病理科,福州 350005

作者简介:翁丹枫,女,技师。E-mail:wwdfs10719@163.com

黎三艳,女,硕士,主治医师,通讯作者。E-mail:lisan-yan2008emma@163.com

A 组脱钙时间视骨组织密度而定,一般为 3~4 h,B 组脱钙时间为 20~24 h。以尖镊探测组织已变软或大头针能轻松刺入组织为脱钙完成^[7]。

1.4 常规 HE 染色及免疫组化染色 切片行常规 HE 染色,免疫组化染色采用 EnVision 两步法。根据染色强度和表达的完整性分级:0 为阴性;1+ 为弱阳性;2+ 为阳性;3+ 为强阳性;其中 0 和 1+ 为低表达,2+ 和 3+ 为高表达。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计数资料采用配对 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色 混合酸脱钙液和改良 EDTA 脱钙液脱钙骨髓组织形态完整,胞核和胞质层次分明,染色均匀,色质鲜艳,对比度好。不脱钙骨髓组织可见钙盐残存,出现“返砂”和“刀痕”现象,组织皱褶,形态和结构破坏严重,核着色深,对比度较差。三组骨髓组织 HE 切片质量评分详见表 1,EDTA 脱钙液脱钙骨髓组织制片效果与混合酸脱钙液脱钙骨髓相当($P > 0.05$),明显优于不脱钙骨髓($P < 0.001$,图 1)。

表 1 不同脱钙处理组骨髓 HE 切片质量评分

改良 EDTA 脱钙	混合酸脱钙液脱钙(n)		P 值	不脱钙(n)		P 值
	效果佳	效果不佳		效果佳	效果不佳	
效果佳	51	2	>0.05	2	51	<0.001
效果不佳	4	4		0	8	

效果佳: ≥ 75 分;效果不佳: < 75 分

2.2 免疫组化染色 CD3、CD20、C38、CD42b、CD56、CD138 和 CD235a 阳性定位于细胞膜,MPO、CD68、Kappa 和 Lambda 阳性定位于细胞质,Ki-67 阳性定位于细胞核。三组不同脱钙处理骨髓的 12 个指标免疫组化染色阳性定位均准确。其中 CD56、Kappa、Ki-67、Lambda 和 MPO 经 EDTA 脱钙液脱钙高表达率与不脱钙组相仿,差异无统计学意义,但明显高于混合酸脱钙液脱钙组,差异具有统计学意义(表 2,图 2)。其余 7 个指标经 EDTA 脱钙液脱钙组高表达率与其余两组差异均无显著性。

3 讨论

骨髓组织形态学观察及免疫组化染色前需进行脱钙处

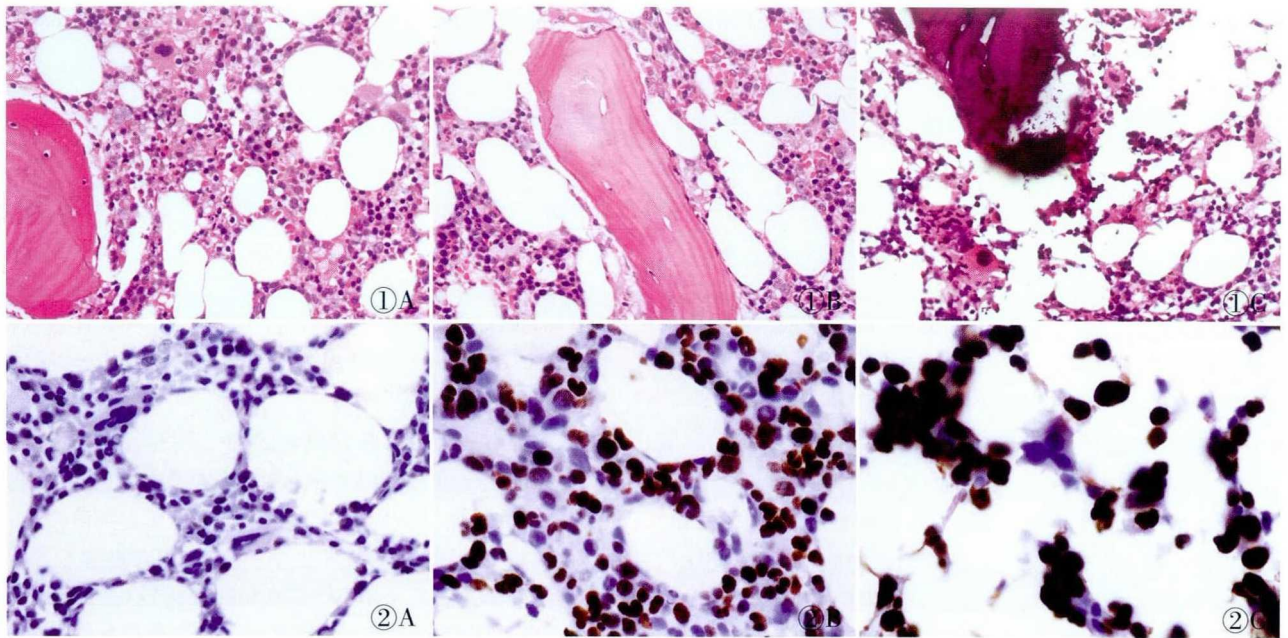


图1 不同脱钙处理骨髓 HE 染色: A. 混合酸脱钙液脱钙; B. 改良 EDTA 脱钙液脱钙; C. 不脱钙

图2 不同脱钙处理骨髓免疫组化染色

(Ki-67): A. 混合酸脱钙液脱钙; B. 改良 EDTA 脱钙液脱钙; C. 不脱钙, EnVision 两步法

表2 不同脱钙处理组骨髓免疫组化表达

改良 EDTA 脱钙	混合酸脱钙液脱钙		P 值	不脱钙		P 值
	高表达	低表达		高表达	低表达	
CD56 (n = 20)						
高表达	1	13	0.002	14	0	>0.05
低表达	0	6		1	5	
Kappa (n = 20)						
高表达	7	13	<0.001	20	0	>0.05
低表达	0	0		0	0	
Ki-67 (n = 20)						
高表达	0	20	<0.001	20	0	>0.05
低表达	0	0		0	0	
Lambda (n = 20)						
高表达	3	14	<0.001	17	0	>0.05
低表达	0	3		1	2	
MPO (n = 21)						
高表达	8	13	<0.001	21	0	>0.05
低表达	0	0		0	0	

理,常规工作中采用的酸脱钙液脱钙程度不易掌握,脱钙时间过长,损害组织抗原导致免疫组化染色阳性率低;脱钙时间过短,脱钙又不彻底,不易制作切片^[8]。EDTA 是一种优良的钙螯合剂,其脱钙液性质温和,能够有效地保存组织细胞形态结构的完整性(特别是细胞的抗原成分)^[9]。有研究比较 4% ~ 16% 不同浓度 EDTA 的脱钙效果,结果表明 10% 和 13% 的 EDTA 脱钙效果最佳^[5]。因此,本实验选用的是浓度为 13% 的 EDTA。另有研究表明用 0.5 mol/L EDTA 脱钙液脱钙骨髓组织 DNA 提取效率最高^[10],本实验选用的 EDTA 浓度为 0.45 mol/L,能较大程度保存抗原。本实验 EDTA 脱钙液中加入 40% 甲醛固定液使固定和脱钙同时进行,可在 24 h 内使骨髓组织脱钙完全,制片质量良好,抗原保存完整,提高诊断速度和准确度,可以满足临床快速诊断的需要。

本实验中 EDTA 脱钙骨髓组织 CD56、Kappa、Ki-67、Lambda 和 MPO 的免疫组化表达强度均好于混合酸脱钙组织;定位于细胞膜 (CD56)、细胞质 (Kappa、Lambda、MPO) 和细胞核 (Ki-67) 阳性的指标均准确,表达效果较好。有研究显示 EDTA 能够更完整地保留 DNA、RNA 和蛋白信号,浆细胞骨髓瘤和多克隆浆细胞浸润经 EDTA 脱钙者 Kappa 和 Lambda 表达完整,均好于酸脱钙组织。另有研究表明 EDTA 脱钙组织中 Ki-67 表达优于酸脱钙组织^[11],EDTA 作为钙离子和镁离子螯合剂,可释放内皮细胞间接触抑制,促进细胞增殖,表现为 Ki-67 核表达和有丝分裂象,并呈现为剂量和时间依赖效应^[12],经 EDTA 处理后更多的人角膜细胞可见核 Ki-67 表达^[13],与本组中得出的结论一致。MPO 是由活化的单核细胞和中性粒细胞脱颗粒释放的血红蛋白^[14],EDTA 通过结合钙离子阻止多形核白细胞脱颗粒抑制 MPO 从中性粒细胞中释放^[15],因此本组中骨髓组织细胞 MPO 表达良好,可能与此有关。本组经改良 EDTA 脱钙液脱钙骨髓除 CD56 外的白细胞分化抗原表达与混合酸脱钙骨髓无明显差异,其机制有待于大样本进一步分析。

综上所述,改良 EDTA 脱钙液脱钙骨髓 HE 切片质量佳,免疫组化染色效果好,定位准确,且脱钙时间短,是骨髓活检组织较理想的脱钙液。此外,我们发现 CD56、Kappa、Ki-67、Lambda 和 MPO 抗原容易受常规酸性脱钙液影响,而 EDTA 脱钙液可以弥补该缺陷,提高骨髓疾病诊断的准确性,值得在骨髓活检处理过程中广泛使用。

参考文献:

[1] 商 臻,周剑峰. 骨髓活检免疫组化在血液系统疾病诊断中的应用[J]. 内科急危重症杂志, 2011,17(2):115 - 118.

网络出版时间:2018-4-23 14:34 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180423.1433.028.html>

HE 退行性染色及其在改良美蓝染色中显示幽门螺杆菌的应用



丁桂龄, 白辰光, 郑建明

关键词: 幽门螺杆菌; HE 退行性染色; 美蓝染色

中图分类号: R 446.8 文献标志码: B

文章编号: 1001-7399(2018)04-0463-02

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.04.028

随着免疫组化和分子病理学技术的迅猛发展, 特殊染色技术在病理诊断工作中已被日渐忽略。然而在临床病理诊断工作中, 经常遇到 HE 染色难以明确诊断情况, 由于组织病变微小, 组织本身微小或会诊白片数量有限, 而又无有效组织或白片继续进一步染色来辅助病理诊断时, 需将现有的 HE 切片褪色后再行其它染色以明确诊断, 因此特殊染色便有了不可或缺的地位。幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, HP)

是慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃 B 细胞淋巴瘤重要的危险因子^[1]。在多种 HP 检测方法中, 胃黏膜活检组织切片经亚甲蓝染色 HP 检出率最高^[2]。在实际工作中, 我们发现改良美蓝染色法操作简便、时间短、结果稳定、实用性强。本文旨在探讨 HE 染色切片褪色后再行改良美蓝染色显示 HP 的可行性, 以期能反复利用有效资源、重复染色, 弥补样本的不足, 满足临床病理诊断。

1 材料与方法

1.1 材料 选取海军军医大学附属长海医院病理科胃镜活检标本 40 例 (据临床要求, 申请 HP 检测), 常规取材, 均经 10% 中性福尔马林固定, 脱水, 透明, 浸蜡, 包埋等。制成 3 μm 厚 HE 切片的实验组和对照组, 其中实验组先行常规 HE 染色。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制 (1) 美蓝染液: 美蓝 0.5 g, 硼酸 0.5 g, 蒸馏水 100 mL。(2) 醋酸染液: 醋酸 0.1 mL, 蒸馏水 100 mL。(3) 高锰酸钾硫酸染液: 高锰酸钾 0.5 g, 蒸馏水 100 mL, 3%

接受日期: 2018-01-10

作者单位: 海军军医大学附属长海医院病理科, 上海 200433

作者简介: 丁桂龄, 女, 技师。Tel: (021) 31162260, E-mail:

DGL517723@163.com

郑建明, 男, 教授, 博士生导师, 通讯作者。E-mail:

jmzheng1962@163.com

- [2] 夏朝霞. 改良骨髓脱钙液对免疫组化染色结果的影响[J]. 现代实用医学, 2014, 26(8): 1002-1003.
- [3] 罗灿桥, 莫木琼, 钟觉民. 不同的脱钙液在骨组织制片中的比较应用[J]. 中国实用医药, 2011, 6(19): 27-28.
- [4] 陈世梁, 卢志承, 董玉英. 介绍一种改良脱钙液在骨组织制片中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(5): 557-558.
- [5] 沈溪明, 何欣欣, 吴东霞, 等. 不同浓度和 pH 值 EDTA 脱钙液对下颌骨免疫组化结果的影响[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(6): 696-698.
- [6] 黄美雅, 黄云梅, 林燕萍, 等. EDTA 脱钙方法的实验观察[J]. 福建中医药, 2007, 38(4): 46-47.
- [7] 陈昕, 王仪. 骨髓活检组织脱钙终止时间的确定及分析 (附 112 例分析)[J]. 福建医药杂志, 2007, 29(4): 102.
- [8] 兰森, 巩丽, 李艳红, 等. 不同脱钙液对骨髓组织切片 HE 染色效果的对比研究[J]. 陕西医学杂志, 2010, 39(10): 1299-1300.
- [9] Kora P, Jones M, Dominis M, et al. Application of the FICTION technique for the simultaneous detection of immunophenotype and chromosomal abnormalities in routinely fixed, paraffin wax embedded bone marrow trephines[J]. J Clin Pathol, 2005, 58(12): 1336.
- [10] 董慧婷, 路志勇, 焦章平, 等. 不同浓度 EDTA 脱钙液对骨髓 DNA 提取效率的影响[J]. 中国法医学杂志, 2015, 30(4): 393-395.
- [11] Choi S E, Hong S W, Yoon S O. Proposal of an appropriate decalcification method of bone marrow biopsy specimens in the era of expanding genetic molecular study[J]. J Pathol Transl Med, 2015, 49(3): 236-242.
- [12] Senoo T, Obara Y, Joyce N C. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(10): 2930-2935.
- [13] Li W, Sabater A L, Chen Y T, et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(2): 614-620.
- [14] Gandley R E, Rohland J, Zhou Y, et al. Increased myeloperoxidase in the placenta and circulation of women with preeclampsia[J]. Hypertension, 2008, 52(2): 387-393.
- [15] Shih J, Datwyler S A, Hsu S C, et al. Effect of collection tube type and preanalytical handling on myeloperoxidase concentrations[J]. Clin Chem, 2008, 54(6): 1076-1079.