

## • 技术交流 •

微波免疫组织化学检测冠状动脉  
粥样硬化早期病变细胞抗原\*韩晓男 赵培真 陈忠<sup>①</sup> 杨方 梁凤玲

(中国医学科学院阜外医院病理科, 北京 100037)

**关键词** 动脉粥样硬化早期病变; 微波免疫组织化学; 抗原检测; 人白细胞抗原; 增殖细胞核抗原

近年来, 由于微波免疫组织化学技术在病理检验中的运用<sup>[1]</sup>, 不仅使普通免疫组织化学检测阳性率大大提高, 流程简化, 而且实现了对一些低表达抗原的检测, 尤其是对福尔马林固定石蜡包埋标本的检测。本文通过运用微波免疫组织化学技术检测某些低表达抗原, 诸如增殖细胞核抗原 (proliferative cell nuclear antigen, PCNA)、人白细胞抗原-dr (human leukocyte antigen-dr, HLA-dr)、CD68 和 P<sub>53</sub> 等在冠状动脉粥样硬化内各种细胞中表达情况来讨论其原理和优点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

年轻人冠状动脉左旋支粥样硬化标本 7 例, 10% 福尔马林固定, 常规脱水包埋, 连续切片, 切片厚 4  $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 试剂

LSAB Kit 和一抗 PCNA、CD68、HLA-dr、P<sub>53</sub> 均为单克隆抗体, 来自 DAKO 公司

### 1.3 微波炉

日本产 SHARP R-5G14(G), 功率 2.05 kw。

### 1.4 方法

1.4.1 微波免疫组织化学 ①石蜡切片脱蜡 (二甲苯 3 次, 各 5 min) 后, 3% 过氧化氢处理 10 min。②蒸馏水洗片 3 次, 各 2 min。③将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液 (工作液) 的容器中, 置微波炉加热 10 min, 温度保持在 92℃~98℃ (微波炉功率选择可置于“中低档”, 功率约为 120 w)。④PBS 液冲洗 3 次, 各 3 min。⑤1:20 正常血清, 封闭湿盒 10 min。⑥吸净血清, 滴加一抗, 终

浓度分别是: HLA-dr 为 1:50, PCNA 为 1:50, P<sub>53</sub> 为 1:100, CD68 为 1:100, 4℃ 过夜。⑦同④。⑧生物素标记的兔抗鼠 IgG (1:400) 室温湿盒内孵育 30 min。⑨同④。⑩Streptavidin 试剂 (1:400), 室温湿盒内孵育 30 min。⑪同④。⑫DAB 显色 10 min。⑬脱水、透明、封片。

1.4.2 普通免疫组织化学 方法除使用 3% 过氧化氢甲醇、0.1% 胰酶以及无以上的②和③步外, 其余同上。

1.4.3 设对照组。阳性对照为肺组织切片 (HLA-dr CD68)、淋巴结 (PCNA、P<sub>53</sub>)。阴性对照用 PBS 液代替一抗。

## 2 结果

阳性物质为棕色, HLA-dr、CD68、PCNA、P<sub>53</sub> 阳性细胞均分布于冠脉粥样硬化内皮。

微波免疫组织化学以及连续切片同一层面普通免疫组织化学染色 HLA-dr 阳性情况对比如图 1~2。

冠脉内膜各种细胞内抗原在不同方法中的阳性情况比较如附表。

发现对于冠脉内膜细胞内抗原的检测, 微波免疫组织化学阳性率远远超过了普通免疫组织化学, 由此可见, 微波辐射可以大大提高普通免疫组织化学的敏感度。

## 3 讨论

近年来, 微波辐射作为辅助方法广泛应用于病理基本技术中, 并大大提高了效率。微波技术主要利用高频微波使组织内部分子、外部化学物质的运动或扩散加剧, 从而使组织反应能力增强。对于福尔马林固定、石蜡包埋的组织来说, 其结构蛋白质一般形成交联, 使其中抗体所针对的特异性糖链以及特异性蛋白被遮盖, 用普通消化物不能使这些交联充分打开、暴露抗原, 从而不能使抗原抗体充分结合达到显示抗原的目的。而使用微波则可打开这些蛋白交联, 充分暴露抗

\* 本文为国家“八五”课题 (85-915-03-04) 的技术交流部分。

① 来自广西医科大学病理学教研室的客座研究人员。

原,尤其对于那些表达低的细胞结构抗原来说就显得更为重要了

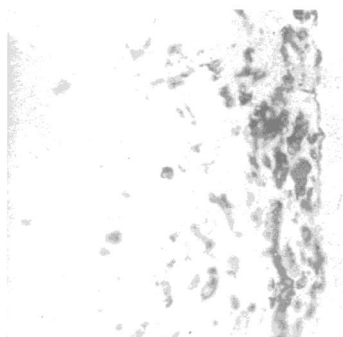


图 1. 冠脉内膜粥样病变微波免疫组织化学染色

HLA-dr 阳性细胞分布(未复染) 10×40



图 2. 冠脉内膜粥样病变普通免疫组织化学染色

HLA-dr 阳性细胞分布(未复染)10×20

#### 附表 冠脉内膜各种细胞抗原在不同方法中的阳性情况比较

| 细胞种类      | 微波免疫组织化学 |      |      |     | 普通免疫组织化学 |      |      |     |
|-----------|----------|------|------|-----|----------|------|------|-----|
|           | HLA-dr   | CD68 | PCNA | P53 | HLA-dr   | CD68 | PCNA | P53 |
| 巨噬细胞源性 FC | ++       | ++   | +    | +   | ±        | —    | ±    | —   |
| 肌源性 FC    | +        | —    | +    | +   | —        | —    | —    | —   |
| 淋巴细胞      | +        | +    | +    | +   | —        | —    | —    | —   |
| 内皮细胞      | +        | —    | —    | —   | —        | —    | —    | —   |

注:“++”为强阳性,“+”为阳性,“—”为阴性,“±”为弱阳性。

FC 为泡沫细胞(foam cell)。

CD68、HLA-dr 为细胞膜抗原,CD68 表达在病变冠脉壁内膜巨噬细胞源性的泡沫细胞,血液性的单核细胞以及少数淋巴细胞中,而 HLA-dr 一般只表达在内膜泡沫细胞、淋巴细胞以及变性的内皮细胞中。PCNA、P53 为核抗原,表达于内膜增殖细胞中,包括巨噬细胞以及平滑肌细胞。以上四种抗原经免疫组织化学观察在冠脉壁含量都较低,近年来仅可通过冠脉冰冻切片对其进行研究<sup>[1,2]</sup>。又由于福尔马林固定的原因,这些抗原的决定簇大部为蛋白交联所遮盖,而胰酶等普通消化物又不能打开这些交联,因此普通组织化学不能检测到这些抗原。但是由于微波具有以上的性能,能打开这些交联,并与有限的抗原充分结合达到检测的目的。

综上所述,微波免疫组织化学对福尔马林固定石蜡包埋标本,尤其对于低表达抗原以及陈旧标本的检测有着独特的优点。但对不同组织,运用微波所需的时间以及功率均需反复实验后,才能确定,且每次均需设对照组,方可取得满意的效果。

#### 参考文献

- 1 倪灿荣. 免疫组织化学实验新技术及应用. 北京, 北京科技出版社, 1993; 235~249.
- 2 Gown AM, Ross R, Kocher O, et al. immunocytochemical analysis of the cellular composition of human Aa. *Amer J Path*, 1986, 125:191~207.

(本文 1994-10-05 收到)