

免疫组化与原位杂交双标记技术检测 EB 病毒用于诊断鼻咽癌

罗俭权 曾秀英 吕镜雄 陈春梅 程思锐 冯天斌

基金项目: 广东省肇庆市科技创新计划项目(2016040301)

作者单位: 526200 广东肇庆, 广东省四会市人民医院

通讯作者: 罗俭权, Email: luo3335686@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.02.005

【摘要】 目的 探析鼻咽癌诊断中检测 EB 病毒更为快速及更灵敏的方法。**方法** 选择 2014 年 4 月至 2016 年 8 月广东省四会市人民医院收治的 36 例鼻咽癌患者, 分别采用 EB 病毒一抗、地高辛标记的寡核苷酸 EBER 探针进行免疫组化和原位杂交双重标记染色, 检测鼻咽癌细胞中 EB 病毒的表达情况。**结果** 免疫组化后的阳性细胞的胞膜表现为红色, 原位杂交后的阳性细胞胞核表现为蓝黑色, 而双阳性细胞的核与膜呈蓝红色, 不仅对比鲜明而且背景非常清晰, 双染成功后细胞及组织结构表现完整。**结论** EBER 原位杂交双标记技术检测 EB 病毒主要是检测病毒基因, 具有极高的特异性和灵敏度, 比免疫组化方法更灵敏、快速, 可以帮助临床进行鼻咽癌的分期诊断及判断治疗效果。

【关键词】 鼻咽癌; 病理诊断; 双标记原位杂交; 免疫组化

Detection value of serum retinol binding protein in diagnosis and treatment stage of diabetics with urinary tract infection

Luo Jianquan, Zeng Xiuying, Lyu Jingxiong, Chen Chunmei, Cheng Sirui, Feng Tianbin. The People's Hospital of Sihui City, Zhaoqing 526200, Guangdong, China

Corresponding author: Luo Jianquan, Email: luo3335686@163.com

【Abstract】 Objective Investigation on a more rapid and sensitive EB virus detecting method in the diagnosis of nasopharynx cancer. **Methods** 36 patients with nasopharynx cancer admitted in the People's Hospital of Sihui City, Guangdong Province from April 2014 to August 2016 were selected as objects. Double labeling staining respectively were immunohistochemistry and in situ hybridization were conducted using oligonucleotides EBER probe tagged with the primary antibodies of EB virus and digoxin to detect the expression of EB virus in the nasopharynx cancer cells. **Results** The positive cells' membrane of immunohistochemistry was red. The positive cells' nucleus of in situ hybridization was black blue. The double positive cells' nucleus and membrane were blue red, the color contrast of which was very obvious in a very clear background. The cell and tissue structure were intact after the double labeling staining. **Conclusions** The technology of EBER in situ hybridization with double tags is mainly applied in the detection of virus gene and has super specificity and sensitivity. It is more sensitive and rapid than the immunohistochemistry and could contribute to the staging diagnosis and therapeutic effect determination clinically.

【Key words】 Nasopharyngeal carcinoma; pathological diagnosis; double labeled in situ hybridization; immunohistochemistry

鼻咽癌是一种在我国南方地区(如广州等)发病率非常高的恶性肿瘤, 占鼻咽部恶性肿瘤的 97%^[1]。鼻咽癌的治疗除手术外, 中医药治疗对于提高患者的生存率有很好的作用^[2]。鼻咽癌又分为鳞状细胞癌和非角化鳞癌; 非角化鳞癌又分为混合型癌、圆形细胞癌(未分化型癌)及梭形细胞癌

(分化型非角化鳞癌)^[3-4]。我国南方地区发生的鼻咽癌 95% 属于非角化鳞癌。

鼻咽癌确诊前需活检病理诊断, 应用较多的指标是细胞角蛋白(CK)免疫组化染色。研究发现, EB 病毒感染与鼻咽癌尤其非角化型鼻咽癌密切相关^[5-6], 对于组织切片上检测 EB 病毒对鼻咽癌的诊

断具有重要意义。在一张切片中行免疫组化细胞角蛋白染色与 EB 病毒编码的小 RNA (EBER) 原位杂交, 双标记方法进行套染, 可同时分析两种指标在鼻咽癌细胞中的表达情况。结外鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤则属于一种侵袭性结外淋巴瘤, 形态特殊, 预后差, 其与 EB 病毒感染亦密切相关。免疫组化是传统的检测方法, 但这种方法不易检测到低拷贝数 RNA 或 DNA 在细胞内的存在^[6-7]。

本研究通过分析我院收治的 36 例鼻咽癌患者临床资料, 比较免疫组化与原位杂交双重标记技术两种方法在鼻咽癌诊断中的检测结果, 现总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究选用的全部标本均取自我院 2014 年 4 月至 2016 年 8 月收治的 36 例鼻咽癌患者, 且经病理学诊断。病检组织切片厚 3~4 μm , 用中性甲醛固定, 常规石蜡包埋。实验所用全部试剂均由北京金桥生物技术有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化具体步骤 将显色后呈阳性的切片脱蜡、蒸馏水洗涤, 用 pH 6.0 的 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (95~100 $^{\circ}\text{C}$) 微波修复抗原 15 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 然后用 10% 羊血清封闭孵育 10 min, EB 病毒单克隆抗体 (单抗) 工作液 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后 PBS 冲洗; 37 $^{\circ}\text{C}$ 室温孵育 30 min, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 显微镜下仔细观察显色情况, 脱水、透明、水溶性封片剂封固。

1.2.2 原位杂交双标记具体步骤 将 3~4 μm 厚的切片常规脱蜡至水, 滴加 100 μL 蛋白酶 K 液, 放置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘烤 30 min, 蒸馏水洗涤后无水乙醇脱水, 空气干燥。切片组织上滴加 20 μL EBER 探针杂交液, 加上经灭酶处理的洁净盖玻片, 放入湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 3 h; 取出切片, Tris 缓冲盐溶液 (TBS) 冲洗 3 min; 滴加 100 μL 封闭液, 室温孵育 10 min; 甩干, 加入生物素标记的羊抗鼠单抗标记物室温孵育 30 min; TBS 冲洗 5 min, 加入 5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸 / 四唑硝基蓝 (BCIP/NBT) 显色液, 苏木精复染, 脱水、透明、封固。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果 送检鼻咽黏膜表面被覆假复层纤毛柱状上皮, 固有层内淋巴组织增生, 间质疏松水肿, 伴淋巴细胞、浆细胞和嗜酸粒细胞浸润, 部分细胞明显异型。免疫组化结果显示: CK (+)、

P63 (+)、T 淋巴细胞 CD3 (+)、B 淋巴细胞 CD20 (+)、CD56 (-)、GrB (灶状 +)、Ki67 (+, 20%)。见图 1。

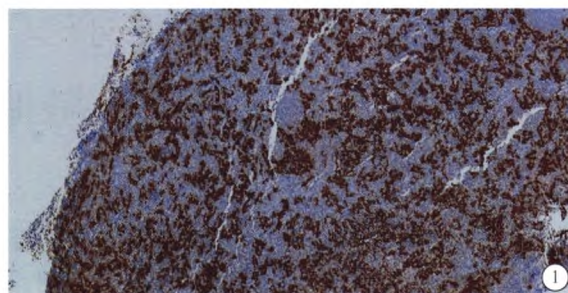


图 1 鼻咽癌免疫组化 CK 阳性结果

2.2 原位杂交结果 双染成功后细胞及组织结构表现完整; 采用免疫组化检测结果显示, CK 定位于细胞浆内, 阳性细胞的胞膜呈现红色; 采用原位杂交检测结果显示, EBER 阳性反应则定位于鼻咽癌细胞的细胞核上, 阳性细胞的胞核呈现蓝黑色, 而双阳性细胞的核与膜呈蓝红, 不仅背景非常清晰, 而且对比鲜明。

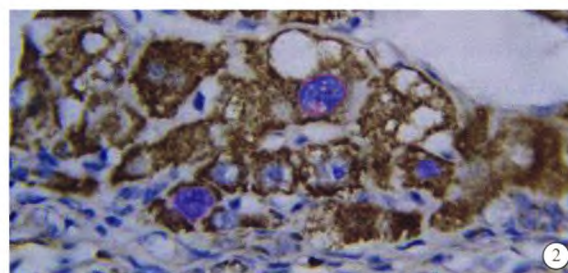


图 2 原位杂交 EBER 检测结果

3 讨论

EB 病毒感染较多的部位是人类口咽部的 B 淋巴细胞与上皮细胞^[8]。EB 病毒不仅可以感染 B 淋巴细胞, 还可以转化 B 淋巴细胞, 目前已发现的 EB 病毒潜伏基因表达有 10 余种。EBER 原位杂交技术是在组织切片上检测 EB 病毒敏感而有效的手段, 取同一鼻咽癌组织切片, 采用原位杂交与免疫组化双重标记技术检测 CK 和 EB 病毒, 这为观察阳性细胞是否也存在 EB 病毒感染提供了重要依据^[9-10]。

相对 EBER 原位杂交技术而言, CK 染色则是鼻咽癌诊断中应用广泛的一个免疫组化指标。但这种方法在临床诊断鼻咽癌病理中应注意与淋巴瘤、鼻咽肉瘤进行区别, 淋巴瘤细胞和肉瘤细胞的 CK 染色表现为阴性时, 鼻咽癌细胞 CK 则表现为阳性^[11]。鼻咽上皮性病变的细胞偶尔也呈现 CK 阳性,

极易误诊为鼻咽癌,但经 EB 病毒检测则呈阴性,据此可与鼻咽癌区分开。广州等南方城市 95% 以上的鼻咽癌是非角化性癌,鼻咽非角化性癌中特别是鼻咽型未分化癌多是 EB 病毒感染所致,因而可以说,检测组织切片 EB 病毒有助于鼻咽癌的病理诊断^[12-13]。原位杂交技术、免疫组化染色应用的显色剂有多种多样,选择不同的显色剂,其获得的颜色和阳性结果均不同^[14]。本研究的免疫组化结果显示:CK(+),P63(+),T 淋巴细胞 CD3(+),B 淋巴细胞 CD20(+),CD56(-),GrB(灶状+),Ki67(+,20%),与上述研究文献报道一致。

双重标记中选用的显色剂恰当,可清晰对比两种染色结果,从而便于临床的观察诊断。由于原位杂交技术和免疫组化两种方法原理不同,检测结果亦不相同。免疫组化检测的是用 EB 病毒编码的 LMP-1 膜蛋白,不仅价格便宜、检测灵敏度高,而且操作方便、步骤简单,但是无法检出 EB 病毒的定位及转录数量,因此往往作为 EB 病毒的初筛手段^[15]。原位杂交检测中采用的 EBER-1 探针,能够探查经甲醛固定、石蜡包埋的鼻咽癌标本,在肿瘤细胞原位即可检测是否存在 EB 病毒,不仅定位准确,而且特异性强。此外,有时由于鼻咽癌组织中有效结合点减少、核酸的变性、弥散,加上组织固定又欠佳,故染色可能会呈阳性标记弱,有时甚至假阴性。本研究中作者尝试用 EBER 原位杂交检测以及 CK 免疫组化检测,AEC 显色、DAB 显色,EBER 原位杂交染色结果表现为棕色,无弥散,也未褪色,但红色与棕色对比效果不佳,红色的 CK 不易观察。

临床检测工作中,影响原位杂交双重标记技术和免疫组化的因素较多,要想取得最佳染色结果,作者有以下几点体会:①由于 CK 的孵育时间比平时的要短些,因而显色最好在镜下控制,防止由于显色过深,影响与 EBER 染色结果的对比。②用 EBER 进行杂交时需防止探针被 RNA 酶降解,操作时除严格遵循戴口罩、手套原则外,各项实验设备还必须经过 200℃烤箱过夜或焦碳酸二乙酯(DEPC)水充分浸泡。原位杂交显色过程在 4℃冰箱中进行(过夜),可使显色的过程减慢,从而减少了背景着色,充分进行冲洗又利于减轻背景的非特异性染色。③原位杂交技术检测完成后需进行抗原修复,选择再放入 pH 8.0 的 Tris/EDTA 缓冲液进行中、高压修复比应用 pH 6.0 柠檬酸缓冲液或不修复效果都要

更好。EBER 阳性定位在细胞核,不需要复染苏木素,以免遮盖 EBER 的阳性表达。如果必须染色可淡染核固红,此时细胞核表现为红色。④中性树脂中含有的二甲苯会导致 EBER 阳性颗粒弥散,从而使检测结果的准确性受到影响,因而选择水溶性封片剂封固切片较佳。封片后还应尽早采集图片,进行保存,防止显色时间过长导致褪色。

综上所述,EB 病毒与鼻咽癌的发生密切相关,在鼻咽癌病理诊断工作中,EBER 原位杂交双标记技术优于传统的免疫组化技术。

参考文献

- 1 程剑华.中西医结合治疗晚期鼻咽癌 96 例疗效分析[J].中国中西医结合急救杂志,1999,6(5):221.
- 2 范松青,张文玲,徐丽娜,等.组织微阵列技术研究肿瘤转移相关基因在鼻咽癌中的表达与临床意义[J].生物化学与生物物理进展,2009,36(5):616-623.
- 3 金哲,王慧慧.延边地区淋巴瘤和鼻咽癌中 EB 病毒类型分布特点[J].中国现代医生,2008,46(21):44-46.
- 4 胡志勇,邓云特.鼻咽癌 96 例临床病理分析[J].中国医师进修杂志,2009,32(22):44-45.
- 5 罗耀凌,欧国萍,池沛冬,等.联合检测 EB 病毒相关抗体和抗原对诊断鼻咽癌的价值[J].癌症,2009,28(1):96-99.
- 6 柯霞,洪苏玲.526 例鼻咽癌患者临床资料分析[J].重庆医学,2010,39(3):278-279,282.
- 7 梁英杰,凌启波,张威.临床病理学技术[M].北京:人民卫生出版社,2011:279-280.
- 8 许茂轩,林少民,梁荣,等.Cyclin D1 及 Survivin 蛋白表达与鼻咽癌放疗敏感性的关系[J].实用检验医师杂志,2012,4(1):11-14.
- 9 罗耀凌,陈浩,彭颂国,等.联合检测 EB 病毒不同抗体及 EB 病毒 DNA 在鼻咽癌血清学诊断中的价值[J].中华医学杂志,2013,93(44):3516-3519.
- 10 雍娟娟,吴秋良,宗永生,等.局部复发性鼻咽癌的临床病理学特征[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(4):389-392.
- 11 刘泳冬,梁英杰,刘妮,等.免疫组化与原位杂交双标记技术在鼻咽癌诊断中的应用[J].临床医学工程,2014,21(3):288-289.
- 12 白志瑶,宋建新.EB 病毒相关性噬血细胞综合征患儿 T 淋巴细胞 CD69 的表达及意义[J].实用检验医师杂志,2014,6(3):173-175.
- 13 陈应智,储兵,曾玉梅,等.CK、P63 与原位杂交 EBER 在诊断复发性鼻咽癌中的应用[J].齐齐哈尔医学院学报,2015,36(6):787-789.
- 14 邓卓霞,王勇利,杜海军,等.广西地区三类人群 EB 病毒潜伏膜蛋白 2 特异性细胞免疫状态的研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2016,30(2):194-198.
- 15 杜云,俞霞,李明芳.EB 病毒血清抗体水平与鼻咽癌临床分期相关性研究进展[J].中国肿瘤临床,2016,43(19):869-872.

(收稿日期:2017-03-09)

(本文编辑:李银平)