

DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2016.19.034 文章编号: 1671-4695(2016)19-1963-02

骨髓活检在 EBER 原位杂交检测中消化时间的优化

滕孝静 周小鸽 毕阔 梅雪 杨秀静 王照情

(首都医科大学附属北京友谊医院病理科 北京 100050)

【摘要】 目的 优化骨髓活检样本在 EB 病毒编码的小 RNA (EBER) 原位杂交检测中的消化时间。方法 对 20 例 EB 病毒相关疾病的骨髓活检样本,连续切片 3 张,分为 3 组,使用同一浓度的蛋白酶 K,对 3 组切片进行间隔 5 min 的梯度时间消化,然后继续进行 EBER 原位杂交的其它检测步骤,并对结果进行判读。结果 消化时间为 10 min 组的切片,杂交效果最好,组织结构完整,阳性细胞着色深,定位准确,背景干净,结果清晰易辨。结论 骨髓活检样本与其他活检组织相比,在 EBER 原位杂交检测中的消化时间要适当延长,以 10 min 最佳。

【关键词】 EB 病毒编码的小 RNA 原位杂交 骨髓消化时间

Optimization of digestion time in EBER in situ hybridization on bone marrow bioptic tissues. TENG Xiao-jing, ZHOU Xiao-ge, BI Kuo, et al. Department of Pathology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China.

【Abstract】 Objective To obtain the optimal digestion time in EBER in situ hybridization on bone marrow biopsy tissues. **Methods** Twenty bone marrow biopsy samples of EBV-positive expression were tested in this study. Three serial sections from each sample were digested for 5 min, 10 min and 15 min in EBER in situ hybridization, respectively. Their results were comparatively observed. **Results** The efficiency of hybridization of these sections digested for 10 min is the best. **Conclusion** In comparison with other biopsy samples, the optimal digestion time for bone marrow bioptic tissues need extend to 10 min.

【Key words】 EBV-encoded RNA; In situ hybridization; Bone marrow; Digestion; Time

EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)越来越受到人们的关注,这不仅因为它以潜伏感染的形式广泛存在于健康人群,更重要的是它与越来越多的恶性肿瘤关系密切^[1-4]。EBV 编码的小 RNA (EBV-encoded RNA, EBER) 经 EBV 转录后,大量存在于 EBV 潜伏感染的细胞核中,具有稳定的二级结构,因此不像细胞内其他的 RNA 分子容易降解^[5]。所以 EBER 原位杂交技术检测石蜡组织切片中的 EBV 感染具有极高的特异性和灵敏性,目前此方法已成为组织和细胞中 EBV 的标准检测方法,广为使用^[6]。但这一方法在临床检测骨髓石蜡样本时,常常遇到因消化时间不适宜而导致染色弱或无,进而需要重复实验的现象。本研究通过采用同一酶浓度、不同时间的梯度消化实验,对骨髓样本在 EBER 原位杂交中的消化时间进行了优化。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集首都医科大学附属北京友谊医院病理科 2011~2016 年间骨髓活检石蜡包埋组织 20 例,其中 NKT 细胞淋巴瘤 10 例,EBV 相关淋巴组织增殖性疾病 10 例。所有标本均经 10% 中性甲醛固定,4% 硝酸脱钙 2 h,流水冲洗 30 min 后取材。

1.2 试剂 EBER 原位杂交检测试剂盒购自福建泰普公司。

1.3 方法 每个蜡块连续切片 3 张,厚度均为 3 μm 。实验分为三组:5 min 组、10 min 组、15 min 组,每组随机抽取切片 1 张,进行间隔 5 min 的时间梯度消化。具体步骤如下:切片脱蜡入水,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 15 min,蒸馏水冲洗 1 min,5% 蛋白酶 K 对三组切片分别进行 5 min、10 min、15 min 的酶消化处理。消

化结束后,蒸馏水冲洗 5 min,梯度乙醇干燥。将杂交探针滴加到组织上,55℃ 孵育 60 min,37℃ 杂交 4~16 h。之后将切片冲洗 3 次,每次 3 min。滴加抗地高辛抗体,孵育 60 min,冲洗 3 次,每次 3 min。依次滴加 A、B 液,分别孵育 20 min、30 min,每次孵育完后需冲洗 3 次,每次 3 min。DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。

1.4 观察指标 EBER 原位杂交后,对三组切片的组织结构完整程度、杂交阳性信号的位置与强度、杂交背景的颜色进行观察。

1.5 EBER 原位杂交阳性的判读标准^[3] DAB 显色后,杂交阳性信号位于细胞核,呈棕黄色,杂交阴性细胞的胞核不显色。经苏木素复染后,阳性细胞的胞核仍呈棕黄色,阴性细胞的胞核呈淡蓝色,阳性与阴性细胞核对比鲜明,杂交背景干净无黄染。

2 结果

2.1 组织结构 5 min 组和 10 min 组的 20 张切片,组织结构均完整,无脱片现象。15 min 组,除 2 例组织完全脱片,无法判读外,其余 18 张切片组织结构完整,未见脱片现象。

2.2 杂交效果 10 min 组 20 张切片的原位杂交染色均呈阳性,阳性信号位于细胞核,呈棕黄色,定位准确,背景干净,阳性细胞易辨认。5 min 组,14 张切片染色阳性,3 张阴性,3 张因阳性细胞的细胞核着色淡而无法准确判读。该组切片背景干净,但阳性部位着色强度比 10 min 组淡,低倍镜下不易观察,需高倍镜仔细辨认。15 min 组,15 张切片染色阳性,2 张切片组织脱落,3 张切片因背景黄而无法准确判断。该组切片阳性细胞强度与 10 min 组相当,但背景出现不同程度的黄染。

3 讨论

EBV 相关疾病的报道已经越来越多,这与 EBV 检测方法的改进与发展有着密切的关系。常用的方法有:血清 EBV 抗体检测、血清 EBV-DNA 滴度检测、聚合酶链反应(PCR)、免疫组化和原位杂交技术。前三种方法属于非定位性的,主要用于病毒的普查、筛选及分型;后两种方法由于能够确定病毒与组织和细胞的关系而具有定位作用^[7]。后者中免疫组化方法检测的是 EBV 基因产物 LMP1,为蛋白水平。原位杂交检测的是 EBV 编码的 RNA,为分子水平。免疫组化方法对于细胞内低拷贝数 RNA 的 EBV 感染,阳性检出率远不及原位杂交方法。所以在 EBV 的定位检测上,EBER 原位杂交方法具有更高的敏感性和特异性^[8]。对于骨髓活检这样的小组织进行 EBV 检测时,原位杂交方法已被推荐为首选检测手段^[9]。

近年来血液病呈高发趋势,骨髓穿刺活检因能提供良好的组织结构,而被广泛地应用于临床。骨髓组织结构特殊,一小块组织中既含有造血细胞、软组织,又含有坚硬的骨质,以致成分复杂,组织软硬程度不一^[10]。随着 HE 染色、免疫组化、原位杂交等多种检测方法在骨髓样本中应用的增多,遇到的问题也越来越多,如 HE 染色时,核染色不鲜艳,核浆对比不鲜明及免疫组化染色时出现抗原表达变弱等问题^[11]。近年来,我们在对逐渐增多的骨髓样本进行 EBER 原位杂交检测时,发现组织常因酶消化时间不适宜而导致染色弱或无,进而需要重复实验的现象。本研究就这一现象,对骨髓样本在 EBER 原位杂交中的消化时间进行了优化。

酶消化是原位杂交实验中非常重要的预处理步骤。其目的是去除细胞核内与靶基因结合的蛋白,暴露靶基因,增强杂交信号强度^[12,13]。若消化时间不足,探针无法与靶基因很好地结合,常导致假阴性。若消化过度易造成组织细胞结构破坏,结果无法判读^[14,15]。酶消化的重要性在荧光原位杂交实验(FISH)中已得到广泛关注^[16],并被指出不同组织类型的样本,其对应的消化时间各不相同^[17]。但 EBER 原位杂交检测中对不同组织消化时间的探讨却很少,对骨髓样本消化时间的报道更少。

本研究通过对骨髓样本采用相同酶浓度、不同时间梯度的酶消化实验,结果发现:酶消化时,若采用试剂盒推荐或多数文献报道的时间(5 min),尽管对其它活检组织消化适宜,但对骨髓样本来说,消化程度不够充分,易导致着色淡或无,加之骨髓穿刺样本多为小标本(直径 0.2 cm,长度 <1.5 cm),容易造成漏诊。应将消化时间适当延长,以 10 min 为宜,此时 EBER 原位杂交效果最好。若消化时间过长(>15 min),可因消化过度导致组织脱片或背景黄,使阳性细胞不易或不能准确识别。

4 结论

总之,骨髓活检样本在进行 EBER 原位杂交检测时,与其他活检组织相比,为避免漏诊和重复实验,需将消化时间适当延长。我们的实验认为 10 min 为最佳。

参考文献

- [1] 刘淑云,顾依群,李宁,等. 肠道淋巴瘤临床病理、免疫表型及与 EB 病毒相关性的研究[J]. 诊断病理学杂志, 2003, 10(6): 336-338.
- [2] Zhou Y, Attygalle AD, Chuang S, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: histological progression associates with EBV and HHV6B viral load[J]. Br J Haematol, 2007, 138(1): 44-53.
- [3] 郑晓丹,周小鸽,金妍,等. 成年人系统性 EB 病毒阳性 T/NK 细胞淋巴瘤组织增殖性疾病的临床病理研究[J]. 中华病理学杂志, 2011, 40(4): 227-234.
- [4] Ha SY, Sung J, Ju H, et al. Epstein-Barr virus-positive nodal peripheral T cell lymphomas: Clinicopathologic and gene expression profiling study[J]. Pathol Res Pract, 2013, 209(7): 448-454.
- [5] 许亮国,陈曲侯,王珣章,等. 用 EBER-1 作探针原位杂交检测鼻咽癌组织中的 EB 病毒[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(3): 218-219.
- [6] 滕孝静,王卫东,谢建兰,等. 原位杂交与免疫组化双染法在淋巴瘤诊断中的应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(14): 1106-1107, 封 3.
- [7] 周小鸽,张小平,张劲松. EB 病毒及其相关疾病[J]. 诊断病理学杂志, 2001, 8(1): 58, 59.
- [8] 许文兵,倪仰鹏,刘祖宏,等. 不同类型霍奇金淋巴瘤 EBV 检测的原位杂交和免疫组化方法比较[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(4): 440-442.
- [9] 何耀鑫,黄欣,周春菊,等. EB 病毒编码的小 RNA 检测在噬血细胞综合征骨髓活检中的意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2011, 20(9): 532-534.
- [10] 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, 111.
- [11] 谢燕,黄晓楠,陈红. Rapidcal. Immuno 在骨髓脱钙中的应用[J]. 诊断病理学杂志, 2012, 19(5): 399.
- [12] Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin-Embedded Tissue[J]. J Mol Diagn, 2006, 8(2): 141-151.
- [13] Zordan A. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections[J]. Methods Mol Biol, 2011, 730: 189-202.
- [14] Brown LA, Huntsman D. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions[J]. J Mol Histol, 2007, 38(2): 151-157.
- [15] Weremowicz S. Preparation of Cells from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue for Use in Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Experiments[J]. Curr Protoc Hum Genet, 2015, 84: 8.
- [16] Tojo M, Perez-Becerra R, Vazquez-Boquete A, et al. Looking for ferns: optimization of digestion pretreatment in fluorescence in situ hybridization (FISH) technique on paraffin-embedded tissues[J]. Diagn Mol Pathol, 2008, 17(1): 59-63.
- [17] Petersen BL, Sorensen MC, Pedersen S, et al. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004, 12(3): 259-265.

(收稿日期: 2016-06-14)