

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.14.051

免疫组织化学技术在临床中的应用及进展*

王 卉 综述,徐贵成[△],王 洋 审校
(中国中医科学院广安门医院,北京 100053)

关键词:免疫组织化学; 诊断; 免疫细胞化学

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)14-2178-04

免疫组织化学(IHC)又称免疫细胞化学(ICC),是通过观察组织或细胞切片中的抗原数量及其分布,对抗原进行定位、定性及定量的研究技术^[1]。组织切片可分为冰冻切片和石蜡切片,两种切片染色的操作过程大体相同,但石蜡切片需要进行抗原修复。组织标本封固后可长期保存,且可相对完整的保持组织形态,在临床中最为常用^[2]。细胞标本根据细胞是否贴壁生长,可使用细胞爬片、涂片或甩片的方法制片,主要用于检测蛋白质、核酸、多肽、糖类等,可在光镜和电镜水平显示目标分子。IHC 使用已知抗体检测抗原物质,首先需选择合适的抗体和检测方法。常用的抗体标记方法:(1)荧光素标记法,用不同颜色的荧光素标记不同抗体,临床应用广泛;(2)酶标抗体法,利用辣根过氧化物酶与过氧化氢和氨基联苯胺的结合,光镜下可见反应生成的棕色沉淀;(3)胶体金标记法,利用胶体金作为示踪标记物,抗体特点是标记物颗粒细,反应背景低,不会屏蔽阳性区域,且可多重标记;(4)亲和物质标记法,通过抗体与酶的活性部位或受体结合位点进行特异性结合的方法,将两种物质交联,提高了细胞化学的灵敏度,亲和物质能与多种物质结合,临床应用广泛^[3]。

1 IHC 技术在临床中的应用

目前,IHC 在临床中的应用主要有以下几方面:(1)判断肿瘤良恶性; (2)确定肿瘤临床分期; (3)确定转移瘤的原发部位; (4)及时发现肿瘤微小转移灶,实现早期诊断; (5)判断肿瘤细胞源性; (6)某些肿瘤标记物对疾病的治疗和预后有指导意义; (7)对某些感染性疾病进行诊断。

1.1 恶性肿瘤

1.1.1 恶性肿瘤的诊断 IHC 技术广泛应用于临床肿瘤的诊断,其价值不仅体现在能够判断肿瘤的良恶性,还在于能确定肿瘤的分期、类型及其来源。肿瘤良恶性的判定可通过 IHC 方法,使用免疫球蛋白轻链抗体检测 B 淋巴细胞的增生性质来实现; 肿瘤的分期对于疾病的治疗与预后具有重大的参考意义,需明确恶性肿瘤中是否存在淋巴管或血管的侵袭,IHC

结果通常作为主要鉴别依据^[2]。特定抗体可与细胞中的某些抗原成分相结合,从而判定肿瘤来源,如前列腺上皮可用前列腺特异性抗原标记,平滑肌肌动蛋白则可反映出肿瘤是否为平滑肌来源等。如胃间质瘤(GST)源于胃间叶组织,临床表现缺乏特异性,且对放化疗不敏感,沈道清等^[4]选取 40 例术后病理确诊的 GST 患者标本进行 IHC 的诊断研究,发现 40 例患者 CD117 抗体呈强阳性。此外,CD117 在神经鞘瘤和平滑肌瘤中呈阴性表达,可作为 3 种疾病鉴别诊断的标记物。GST 术前诊断困难,IHC 可明确肿瘤良恶性,为临床治疗提供可靠的诊断依据。

1.1.2 恶性肿瘤的鉴别诊断 某些肿瘤细胞由于处于低分化形态,或细胞特异性形态不明显,或处于器官交界区域,在 HE 染色切片上很难分辨其类型,在此基础上使用特异性抗体进行 IHC 可更为准确地对肿瘤类型进行鉴别。肺癌是肿瘤科常见病,临床常见类型有肺腺癌、肺鳞状细胞癌、大细胞癌、小细胞癌等。有研究显示^[5],腺癌常伴有表皮生长因子受体(EGFR)的基因突变,故腺癌对 EGFR 抑制剂治疗更为敏感。随着医学技术的发展及各种新型靶向治疗药的出现,药物作用靶点愈加精确,癌症的进一步鉴别分型对疾病的治疗和预后显得尤为必要。由于目前未发现特异度和灵敏度均达到 100% 的抗体,且某些肿瘤标志物在正常细胞中也有分泌,单一抗体的应用可能导致假阳性的出现,因此,在使用 IHC 技术进行诊断和鉴别时,应采用一组抗体而非一种抗体以提高诊断的准确性。张爱丽等^[6]收集北京大学肿瘤医院的若干原发性肺腺癌和原发性肺鳞状细胞癌患者的活检标本进行 IHC 检测,以探讨 p63、CK5/6、CK7、甲状腺转录因子 1(TTF-1)等肿瘤标记物的阳性率及特异度,认为相对于其他标记物,TTF-1 在低分化腺癌中更容易辨认; CK7 对腺癌灵敏度高,但特异度差; CK5/6 在鳞癌鉴定中优于 p63,但由于两者在细胞结构内的着色位置不同,联合应用可提高灵敏度和特异度。另有研究显示^[7],用 IHC 对高分化肝细胞癌进行诊断时,单一抗体的应用常缺乏灵敏度及特

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81573934)。

[△] 通信作者, E-mail: xuguicheng8005@126.com。

异度, IHC 诊断谱的构建可以在一定程度上弥补诊断缺陷, 这进一步说明使用一组抗体可提高鉴别诊断的准确率。

1.1.3 恶性肿瘤的治疗和预后 IHC 对某些恶性肿瘤的确诊对疾病的治疗和预后评估存在重大意义。在非小细胞肺癌(NSCLC)的患者中, 大约有 5% 的患者存在棘皮动物相关蛋白 4(EML4)与间变性淋巴瘤激酶(ALK)重排形成的融合基因, 此类患者经过 ALK 抑制剂治疗后, 疾病有效控制率可达 80%, 因此, 这类患者使用基因筛查方法确诊的重大意义, 但目前临床上可称为“金标准”的诊断技术价格昂贵, 操作过程较为复杂, 而 IHC 价格低廉, 操作相对简单, 更易被患者接受, 若在诊断疾病时能够呈现出较高的特异度, 可替代现有技术。刘畅等^[8]将筛选后的文章纳入 Meta 分析, 比较 IHC 与原位杂交法鉴别 NSCLC 患者 EML4-ALK 融合基因的特异度, 研究数据利用 SROC 曲线进行分析, 结果显示使用 IHC 鉴别此型患者的平均特异度为 0.95(95%CI: 0.94~0.96), 说明 IHC 诊断该型疾病的准确度高, 或有望成为筛查 EML4-ALK 融合突变 NSCLC 患者的快速诊断法。IHC 的优势在于它可以在保持细胞完整形态和内部结构的情况下, 完成对细胞内特异性抗原的检测以及与正常细胞的对比, 操作简便, 可实现快速筛查和诊断, 这为临床上仅对单一治疗方法敏感的恶性肿瘤提供了更加便捷的诊断渠道。

1.2 肾脏病变

1.2.1 肾淀粉样变 淀粉样蛋白质沉积在肾脏引起的肾病称为肾淀粉样变性, 临床常用 HE 染色确诊, 免疫荧光及 IHC 方法应用较少^[9]。赖英荣等^[10]分析上述 3 种检测方法对肾淀粉样变的确诊率, 结果显示 IHC 法不仅能确诊肾淀粉样变, 且能将其准确分为原发性淀粉样变(AL 型)和继发性淀粉样变(AA 型), 联合应用 HE 染色和 IHC 可更加精确的诊断淀粉样变, 指导临床治疗。

1.2.2 膜性肾病 膜性肾病是病理学诊断名词, 其典型的病理学特点是肾小球基底膜上皮侧可见大量免疫复合物沉积, 可伴基底膜弥漫性增厚^[11]。除却未能明确病因的特发性膜性肾病以外, 肿瘤、系统性红斑狼疮、乙型肝炎病毒感染等均可诱发肾脏膜性病变, 而 IHC 技术可供鉴别膜性肾病的类型, 从而指导治疗。特发性膜性肾病一般不侵犯系膜区, 病变多发生于肾小球基膜, 可见 IgG、C3 呈颗粒状分布, 若合并其他免疫复合物沉积, 则需考虑是否存在并发的系统性疾病。而在肿瘤相关的膜性肾病中, IgG1 和 IgG2 的蛋白表达则明显高于特发性膜性肾病, 可供鉴别^[12]。系统性红斑狼疮初期可发生肾脏膜性改变, 但血清学检查通常难以确诊, 易与其他膜性肾病混淆。膜性狼疮性肾炎的 IHC 特点是多种免疫球蛋白抗体阳性, 以 C1q 呈强阳性为主, 伴系膜区免疫复合物沉

积。有学者研究显示, 乙型肝炎病毒感染或亦可造成肾小球膜性增生^[13], 乙型肝炎病毒感染的患者标本除有 IgG、C3 表达阳性, 还可见 IgM、IgA 的沉积, 可伴肾小球不同组织中 HBsAg 抗体阳性。以上研究说明在此类隐匿的、潜伏期较长的、起病初期无特异度表现的疾病中, IHC 技术可帮助临床进行更加精确地鉴别诊断, 从而更有效的指导临床治疗。

1.2.3 IgA 肾病 IgA 肾病是临床常见的慢性肾病之一, 主要病理表现为在肾小球系膜区以 IgA 为主的免疫复合物沉积^[14]。由于 IgA 的亚类极其丰富, 且该病在组织学上的变异很复杂, 故单凭 IHC 技术检测出肾小球系膜区的 IgA 沉积并不能在诊断方面显示出较高的特异度, 通常需结合患者临床症状及其他实验室检查才可确诊^[15]。目前, 由于 IgA 肾病缺乏系统性治疗方案, 组织学信息多用于评估预后。

1.3 其他疾病

1.3.1 幽门螺旋杆菌感染 ¹³C-尿素呼气试验(¹³C-UBT)是诊断幽门螺旋杆菌感染的金标准, 徐翠等^[16]选取 102 例有上消化道症状表现的儿科患者进行¹³C-UBT 和胃窦黏膜活检 IHC 的灵敏度、特异度及准确性的比较研究, 发现 IHC 技术与¹³C-UBT 相比, 上述差异均无统计学意义($P>0.05$)。且 IHC 不仅能够确诊, 而且技术简单、结果易于观察、标本可长时间保存, 可作为病理学诊断的首选技术, 为相关临床患者提供更多选择。

1.3.2 输卵管妊娠 输卵管妊娠是妇科常见疾病之一, 可直接造成孕妇死亡。既往研究表示部分输卵管妊娠无肉眼可观测到的解剖异常。金晓霞等^[17]分别取正常输卵管黏膜组织、输卵管妊娠着床部位黏膜组织及宫内早孕子宫蜕膜组织, 通过 IHC 技术, 比较雌激素受体、黄体酮、人绒毛膜促性腺激素、CK(AE1/AE3)在上述 3 种组织中的蛋白表达水平, 结果显示, 4 种因子在 3 种组织中的蛋白表达水平存在差异, 其中, 输卵管妊娠患者黏膜组织的蛋白表达最少, 说明输卵管妊娠的发生与 4 种因子表达减少有关。

2 IHC 技术的局限性

2.1 假阳性 假阳性是指在经过特异性抗体处理后, 阳性信号定位不准确, 并非真实反映。造成假阳性的原因可能有抗体浓度不适或已过有效期、一抗孵育时间过长或二氨基联苯胺法(DAB)染色时间过长、组织边缘易于导致局部抗体浓度过高等。

2.2 假阴性 假阴性指阴性信号定位不准确, 并非真实反应。造成假阴性的原因可能有石蜡标本修复方式不当、一抗失效或已过有效期等。在抗体反应过程当中应严格控制孵育时间, 且确认抗体是否仍在有效期内, 以减少假阴性及假阳性的发生。此外, 应同时设定空白、阳性及阴性对照, 且使用一组多种抗体提高诊断率。

2.3 背景颜色过深 此问题主要存在于 DAB 染色

阶段, DAB 需避光冷藏, 现用现配, 且反应时需要显微镜下观察控制显色, 以最大程度达到阳性区域显色且背景颜色最浅为佳, 显色满意后, 应及时冲洗。

2.4 边缘反应 孵育过程中, 切片边缘可因反应时间过长出现组织干燥, 造成细胞收缩、损坏或死亡, 而非特异性抗体在坏死的组织中容易呈现深染, 影响观察结果。要最大程度避免操作过程对结果造成的影响, 需注意几个问题: (1) 规范操作技术, 严格控制试剂的添加顺序和反应时间, 不同试剂的反应温度需适宜, 操作过程中尽量减少气泡的产生; (2) 注意试剂的有效期, 摸索反应的最佳浓度和时间; (3) 设立对照, 须同时设立阳性对照、阴性对照和空白对照; (4) 抗体阳性定位, 不同抗体在组织或细胞中的定位可能不同, 应首先确认发生阳性反应的位置, 减少假阳性和假阴性的发生; (5) 抗原修复条件尽量保持一致^[2]。

3 IHC 技术的进展

IHC 技术在临床应用广泛, 但由于制片过程中, 某些步骤容易受主观影响, 故近几年来, IHC 诊断疾病技术出现了不同方面的优化。

用体液标本制作细胞学涂片诊断肿瘤操作简便, 是常规且可靠的方法, 但涂片中细胞数量过多会导致脱片、涂片不均或杂质过多影响观察。若将悬浮细胞聚集, 石蜡包埋制成细胞块, 连续切片, 再结合 IHC 技术则可在一定程度上避免由于细胞分布不均造成的观察结果不准确, 且细胞块可永久保存, 可随时切片制片。细胞中的特异性物质通过浓缩, 可在镜下显示出清晰的组织结构, 有助于提高诊断效率, 满足临床病理需要^[18]。

马洪星^[19]发现将液基细胞学联合细胞块 IHC 技术可提高肺癌患者的早期诊断率, 且该方法适用于不易于获取活检标本的晚期患者, 为 IHC 联合其他方法诊断临床疾病提供了新思路。

加热抗原修复是 IHC 技术中的关键步骤之一, 它能保留良好的标本组织学形态, 且能得到良好的 IHC 染色效果^[20]。YAMASHITA^[21]通过对不同 pH 值抗原修复液比较, 得出修复液的 pH 值是影响抗原修复的关键因素之一。O'LEARY 等^[22]的研究表明, 加热抗原修复技术的研究方向主要在于两个要素: (1) 如何修复甲醛固定石蜡包埋组织蛋白质的空间构象; (2) 如何修复蛋白质数量及其功能。

由此可见, 不论是 IHC 技术本身, 还是在 IHC 基础上优化诊断方法, 都需要技术人员的大力探索和相关研究, 克服已知障碍, 完善操作技术, 涉足未知领域, 才能充分发挥 IHC 在病理诊断中的作用。

4 IHC 技术临床应用的展望

随着该技术的日趋成熟, IHC 在中药方面的研究也日益增加。有国外学者研究发现肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 影响卵泡生成, 与多囊卵巢综合征 (PCOS) 的发病有关^[23-24]。张瑞瑞等^[25]认为在中医理论中, 肾

虚血瘀是 PCOS 的基本病机, 该课题组研究补肾化瘀方对 PCOS 大鼠卵巢、肝脏等组织中 TNF- α 的表达影响, 发现与正常对照组相比, PCOS 大鼠组织中 TNF- α 表达水平明显升高; 与模型组相比, 中药组组织中 TNF- α 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明补肾化瘀汤药对 PCOS 的治疗有指导意义。郭继龙^[26]利用基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 在肿瘤组织中的表达, 探讨收涩药乌梅对小鼠移植瘤生长的影响, 研究显示中药在抑制血管生长方面未见显著作用, 而中药各剂量干预组可抑制移植瘤生长, 与模型组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明收涩药治疗移植瘤有效。

在 IHC 技术出现以前, 临床对于肿瘤相关疾病的诊断仅停留在细胞水平, IHC 技术将人类对于疾病的认识提高到了分子生物水平。目前, IHC 技术在临床中应用于多种疾病的诊断, 对部分疾病, 特别是肿瘤的治疗及预后有至关重要的作用。在肿瘤相关疾病中, IHC 不仅能判断肿瘤细胞的良恶性、分期, 提高早期诊断率, 还能判断肿瘤分型以进行合理治疗改善预后。但目前已知的部分标记物还存在一定的缺陷, 即便使用一组抗体也难以进行明确诊断, 如本文中提到的 IgA 肾病等。随着特异性抗体不断被挖掘, IHC 技术在疾病的诊断和预后评估还有很大的研究空间, 应大力支持 IHC 技术的发展, 研究发现灵敏度和 (或) 特异度更高的标记物, 以便更好地为临床疾病的诊断、治疗及预后服务。

5 总 结

IHC 技术目前在临床较多用于肿瘤的诊断、鉴别诊断等, 有望部分代替传统诊断技术, 或与其他诊断联用, 得到更加精准的诊断结果, 然而该技术在临床其他病种中用之甚少, 故 IHC 在其他领域疾病的诊断或鉴别价值方面存在很大空间。随着新型特异性抗体不断被挖掘, 它的应用也将更广泛。目前, IHC 技术还存在很多不足之处, 需要技术人员在操作过程中不断改进、完善和优化操作流程, 总结经验教训; 而在某些疾病中的阳性诊断率不高, 需要熟悉抗体的阳性定位, 在通过与其他技术权衡比较的情况下选择最合适的诊断方法, 实现 IHC 技术操作的标准化, 充分发挥 IHC 技术的诊断价值。

参考文献

- [1] 泊沅, 李玉松, 黄高昇, 等. 病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 975.
- [2] 张卫琴. 免疫组化技术在病理诊断中的应用 [J]. 安徽医药, 2012, 16(11): 1700-1702.
- [3] 杨恬. 细胞生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 49-50.
- [4] 沈道清, 唐承刚. 胃间质瘤患者病理及免疫组化分析研究 [J]. 当代医学, 2012, 18(2): 70.

[5] MAEMONDO M,INOUE A,KOBAYASHI K,et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. N Engl J Med,2010,362(25): 2380-2388.

[6] 张爱丽,孙宇,徐少艳,等. 免疫组化在肺小活检中对鳞状细胞癌和腺癌的鉴别诊断意义[J]. 诊断病理学杂志, 2016,23(1):70-73.

[7] JIN G Z,DONG H,YU W L,et al. A novel panel of bio-markers in distinction of small well-differentiated HCC from dysplastic nodules and outcome values [J]. BMC Cancer,2013,13:161-171.

[8] 刘畅,蔡璐,钟殿胜,等. 免疫组化法检测 EML4-ALK 融合突变价值的 meta 分析[J]. 中国肺癌杂志,2016,19(1):38-45.

[9] JENNETTE J C,OLSON J L,SCHWARTS M M,et al. Heptinstall's pathology of the kidney[M]. 6th ed. Philadelphia:Lippincott Raven,2006:853-910.

[10] 赖英荣,刘俊峰,谢文林,等. 免疫组化方法在检测肾淀粉样变中的应用[J]. 中山大学学报(医学科学版),2014,35(6):897-900.

[11] 王艳勤,李荣山. 老年膜性肾病诊断进展[J]. 中国药物与临床,2017,17(4):529-532.

[12] OHTANI H,WAKUI H,KOMATSUDA A,et al. Distribution of glomerular IgG subclass deposits in malignancy-associated membranous nephropathy [J]. Nephrol Dial Transplant,2004,19(3):574-579.

[13] BHIMMA R,COOVADIA H M. Hepatitis B virus-associated nephropathy[J]. Am J Nephrol,2004,24(2):198-211.

[14] 高娜,王祥,黄燕萍. IgA 肾病发生及进展恶化相关机制的研究进展[J]. 中国妇幼健康研究,2015,26(5):1092-1094.

[15] HIKI Y,HORIE A,YASUDA Y,et al. IgA nephropathy and tonsils-an approach from the structure of IgA1 produced by tonsillar lymphocytes[J]. Acta Otolaryngol Suppl,2004,124(555):28-31.

[16] 徐翠,王涛,周平. 儿童幽门螺杆菌免疫组化染色检测分析[J]. 山东大学学报(医学版),2014,52(9):81-84.

[17] 金晓霞,李巍,高辉. 有关 48 例胎盘早剥临床分析[J]. 中国实用医药,2010,5(14):130.

[18] 陈坚平,康凯夫,吴国标,等. 液基细胞学联合细胞块免疫组化检测对肺癌诊断价值研究[J]. 临床肺科杂志,2016,21(1):16-19.

[19] 马洪星. 液基细胞学联合细胞块免疫组化检测在肺癌组织诊断中的应用研究[J]. 实用中西医结合临床,2017,17(3):109-111.

[20] SHI S R,TAYLOR C R. Antigen retrieval immunohistochemistry based research and diagnostics [J]. Wiley, 2010,56(3):87-99.

[21] YAMASHITA S. pH or ionic strength of the antigen retrieval solution;a potential role for refolding during heating treatment[M]. Hoboken:John Wiley,2010:303-321.

[22] O'LEARY T J,FOWLER C B,EVERS D L,et al. Commentary: future directions [M]. Hoboken: John Wiley, 2010:323-331.

[23] CHOI Y S,YANG H I,CHO S,et al. Serum asymmetric dimethylarginine,apelin, and tumor necrosis factor-alpha levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome[J]. Steroids,2012,77(13):1352-1358.

[24] MATTYASOVSKY S G,HOFMANN A,BROCHHAUSEN C,et al. The effect of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha on human joint capsule myofibroblasts[J]. Arthritis Res Ther,2010,12(1):R4.

[25] 张瑞瑞,冯丽萍,雍志强,等. 补肾化瘀方对 PCOS 模型大鼠中 TNF- α 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2016,32(9):1331-1332.

[26] 郭继龙. 乌梅煎剂抑制小鼠 S180 肉瘤血管生成机理的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志,2017,12(6):779-782.

• 综 述 •

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.14.052

纳米粒药物载体靶向模体在治疗肿瘤方面的研究进展

郭永川 综述,许建利,帅磊渊[△]审校
(重庆市江津区中心医院普通外科 402283)

关键词:纳米粒; 药物载体; 癌症; 靶向治疗
中图法分类号:R917 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2018)14-2181-04

癌症仍然是导致人类死亡的主要原因,严重影响了人类健康。虽然过去几十年对癌症的生物学行为有了进一步的认识,并产生了一系列更好的诊断和治疗方法,但是癌症的病死率仍居高不下。有研究表明,我国 2015 年癌症的新发病例和死亡病例可能分别高达 429.2 万人和 281.4 万人^[1]。化疗药物能够高效地杀死肿瘤细胞,但是由于缺乏特异性,致使化疗药物很难集中在肿瘤组织发挥作用,因此也产生严重的不良反应^[2]。纳米医学是随着纳米生物医药发展起来用纳米技术解决医学问题的学科,由于纳米粒粒径小、成分多变、表面功能稳定,为靶向肿瘤微环境及其相互作用提供了可能,弥补了传统化疗药物的局

[△] 通信作者,E-mail:2481515173@qq.com.