

不同固定时间对脑胶质瘤免疫组化染色质量的影响

韩 春^{1,2} 唐 峰^{2,3} 项耀钧^{1,4△}¹海军军医大学第一附属医院院办 上海 200433; ²上海市静安区中心医院病理科 上海 200040;³复旦大学附属华山医院病理科 上海 200040; ⁴上海蓝十字脑科医院院办 上海 201101)

【摘要】 目的 研究免疫标记物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、增殖指数(proliferation index, Ki67)在脑胶质瘤标本中因固定时间不同而对免疫组化染色结果产生的影响,以及GFAP和Ki67阳性表达的差异。**方法** 回顾性收集2018年1月至2019年12月上海市静安区中心医院71例脑胶质瘤标本,肿瘤直径 ≥ 2 cm,每例标本取6块大小为1 cm \times 1 cm \times 0.2 cm的肿瘤组织。4%甲醛固定处理,固定4 h、24 h、48 h、96 h、7 d和14 d后进行GFAP、Ki67免疫组化染色,比较不同固定时间对GFAP、Ki67阳性率的影响。**结果** 脑胶质瘤标本经过4 h、24 h、48 h、96 h、7 d和14 d固定处理后,GFAP有效阳性率分别为63.38%、97.18%、95.77%、92.95%、90.14%和77.46%,差异有统计学意义($\chi^2=51.802, P<0.001$),Ki67有效阳性率分别为87.32%、100%、100%、100%、98.59%和90.14%,差异有统计学意义($\chi^2=30.45, P<0.001$)。固定24 h、48 h、96 h和7 d的组别中GFAP、Ki67的有效阳性率比较,组间差异无统计学意义。**结论** 不同固定时间对脑胶质瘤组织中GFAP、Ki67的免疫组化染色结果有影响,固定24 h、48 h、96 h、7 d的染色结果优于固定4 h和14 d。

【关键词】 胶质纤维酸性蛋白(GFAP); 增殖指数(Ki67); 脑胶质瘤; 固定时间; 免疫组化

【中图分类号】 R739.41, R365 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2022.02.008

Effect of different fixation time on the quality of immunohistochemical staining of brain glioma

HAN Chun^{1,2}, TANG Feng^{2,3}, XIANG Yao-jun^{1,4△}

(¹Director's Office, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; ²Department of Pathology, Jing'an District Central Hospital of Shanghai, Shanghai 200040, China; ³Department of Pathology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; ⁴Director's Office, Shanghai Blue Cross Brain Hospital, Shanghai 201101, China)

【Abstract】 Objective To study the effects of immunological markers glial fibrillary acidic protein (GFAP) and proliferation index (Ki67) on the results of immunohistochemical staining in glioma specimens due to different fixation times, and to explore the difference in the positive expression of GFAP and Ki67. The difference in the positive expression of GFAP and Ki67. **Methods** Seventy-one cases of brain glioma specimens with tumor diameter ≥ 2 cm were collected during Jan 2018 to Dec 2019 in Jing'an District Central Hospital of Shanghai. Six tumor tissues of 1 cm \times 1 cm \times 0.2 cm were taken from each specimen. They were fixed in 4% formaldehyde for 4 hours, 24 hours, 48 hours, 96 hours, 7 days and 14 days. Immunohistochemical staining of GFAP and Ki67 was performed to compare the effects of different fixation time on the valid positive rates of GFAP and Ki67. **Results** After 4-hour, 24-hour, 48-hour, 96-hour, 7-day and 14-day fixation of glioma specimens, the valid positive rates of GFAP were 63.38%, 97.18%, 95.77%, 92.95%, 90.14% and 77.46% with the statistically significant difference ($\chi^2=51.802, P<$

[△]Corresponding author E-mail: xiangyaojun@sohu.com

网络首发时间: 2022-03-08 13:59:45 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.r.20220304.1750.024.html>

0.001), and the valid positive rates of Ki67 were 87.32%, 100%, 100%, 100%, 98.59% and 90.14% with the statistically significant difference ($\chi^2=30.45, P<0.001$). There was no significant difference in the valid positive rates of GFAP and Ki67 in the groups fixed for 24 hours, 48 hours, 96 hours and 7 days.

Conclusion Fixation time had influence on the immunohistochemical staining results of GFAP and Ki67 in brain glioma specimens, and the staining results of fixation for 24 hours, 48 hours, 96 hours and 7 days were better than those for 4 hours and 14 days.

【Key words】 glial fibrillary acidic protein (GFAP); proliferation index (Ki67); brain glioma; fixation time; immunohistochemistry

胶质瘤是最常见的颅内肿瘤,占颅内原发肿瘤的60%~80%^[1-2],发病率高、容易复发且难以治愈^[3]。胶质瘤治疗以手术为主,辅以术后放化疗^[4],故肿瘤的病理分类、分级对患者的个体化治疗和预后判断非常重要。病理诊断结果与免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)技术密不可分,但在实际工作中发现IHC结果的稳定性和准确性受到很多因素影响,如组织处理、染色方法、判读标准等^[5-6]。其中,组织固定是影响组织标本形态结构、细胞抗原保存及检测结果的重要因素。组织固定是固定液中甲醛的醛基与组织抗原决定簇的蛋白及侧链上的氨基起缩合反应,封闭细胞内抗原的活性,这是固定剂对抗原的交联封闭作用^[7]。目前,国内外关于人脑标本经不同固定时间处理后IHC结果的研究报道较少见,国外研究主要为动物脑组织^[8]和死亡后的人脑标本^[9]。本研究以胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和增殖指数(proliferation index, Ki67)为目标抗原,对不同固定时间处理后的脑胶质瘤标本行IHC染色,探讨脑肿瘤标本固定时长对IHC结果的影响,确定使脑肿瘤标本IHC结果稳定准确的固定时长范围,从而为脑肿瘤IHC的质量控制提供参考依据。

资 料 和 方 法

病例资料 回顾性收集2018年1月至2019年12月上海市静安区中心医院71例脑胶质瘤标本,其中男性38例,女性33例,年龄15~78岁,平均年龄49岁。71例脑胶质瘤的病例中,低级别胶质瘤17例,其中节细胞胶质瘤(Ⅰ级)3例、毛细胞型星形细胞瘤(Ⅰ级)1例、CD34阳性的低级别胶质瘤(Ⅰ级)3例、星形细胞瘤(Ⅱ级)9例、少突星形细胞瘤(Ⅱ

级)1例;高级别胶质瘤54例,其中间变性星形细胞瘤(Ⅲ级)17例、胶质母细胞瘤(Ⅳ级)37例。

纳入标准:(1)年龄<80岁;(2)一般情况良好;(3)原发性脑肿瘤;(4)影像学(MRI)资料显示肿瘤直径 ≥ 2 cm;(5)病理常规石蜡证实为胶质瘤。**排除标准:**(1)脑以外的胶质瘤;(2)合并严重的内科疾病;(3)合并其他恶性肿瘤;(4)术前接受过靶向、放射、化学药物、伽马刀等医学治疗方式。在神经外科医师的协助下,获得患者知情同意。

取材方法 将手术切除的标本立即固定于4%甲醛(本院中心实验室配置)中,送至病理科,即刻取材,每例标本取6块含肿瘤的组织,大小为1.0 cm \times 1.0 cm \times 0.2 cm,尽量附带周围脑组织,固定时间依次为4 h、24 h、48 h、96 h、7 d和14 d。

制片方法 固定后的标本经脱水、石蜡包埋和切片。切片分为常规HE切片和IHC防脱切片,厚度为3 μ m。HE切片染色后确定为目标标本,再对IHC防脱切片进行GFAP、Ki67 IHC染色。用于IHC的切片在65℃烤箱中烤片过夜,采用SP法,由Dako Link48自动免疫组化机进行染色。染色所用的抗体均经过质量控制;标本在染色过程中设立阳性、阴性对照。GFAP阳性对照选择正常脑组织,阴性对照选择自淋巴组织;Ki67阳性对照选择自淋巴组织,阴性对照选择正常脑组织。二氨基联苯胺(DAB)显色,阳性细胞呈黄褐色,苏木精复染,背景阴性细胞呈蓝色。脱水、透明、封片后, Nikon光学显微镜不同倍数物镜下观察。固定液为4%甲醛,一抗选用长岛生物技术有限公司的工作液:鼠抗GFAP(克隆号:GA-5)、Ki67(克隆号:SP6);二抗选用Dako公司自动免疫组化仪器的配套抗体。

结果判读依据 IHC阳性细胞按阳性程度不同呈现黄色、棕黄色、褐色。免疫标记物GFAP和

Ki67的着色部位分别是细胞质和细胞核。

IHC 染色结果分析参考 Allred score 标准^[10],这一评分标准的优点在于最大程度去除主观判断误差:首先对阳性细胞数量与阳性强度分别评分,再将二者分值相加为 Allred 评分(0~8分)。细胞阳性表达强度:无着色、黄色、棕黄色和褐色分别设定为 0、1、2 和 3 分。GFAP 阳性细胞数目:无、<1%、1%~10%、11%~33%、34%~66% 和 67%~100% 分别设定为 0、1、2、3、4 和 5 分;Ki67 阳性细胞数目:无、<1%、1%~4%、5%~10%、11%~20% 和 >20% 分别设定为 0、1、2、3、4 和 5 分。将以上两项分数分别相加,结果 0 分为(-),2~4 分为弱阳(+),5~6 分为中阳(++),7~8 分为强阳(+++),阳性结果(++)及以上作为 GFAP、Ki67 有效阳性表达。所有结果均采用人工计数,由两位资深的病理科医师在

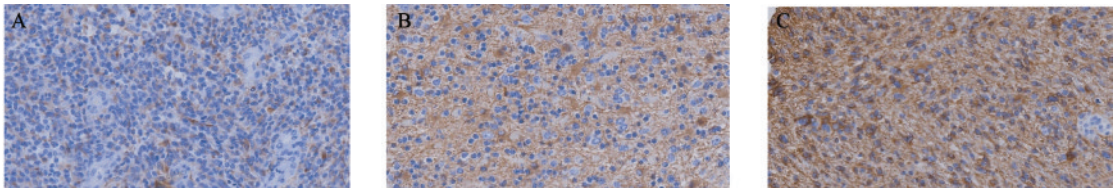
光镜下独立完成并记录,最后进行综合评估,分组计算有效阳性率(即有效阳性表达所占比例)。

统计学方法 研究结果采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

肉眼观察 71 例标本均为灰白灰褐色,组织最大径 2~9 cm,质地偏韧,其中 3 例有囊变,1 例有沙砾感。

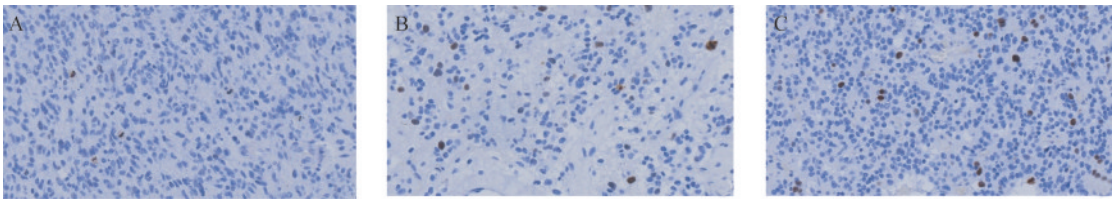
IHC 镜检 脑胶质瘤标本经不同固定时间处理后,GFAP、Ki67 的阳性表达情况见图 1~2。固定时间不同,GFAP、Ki67 阳性染色有差异,直接影响病理诊断中阳性判读结果。



A: Weak positive expression; B: Medium positive expression; C: Strong positive expression.

图 1 GFAP 在不同固定时间的脑胶质瘤标本中的阳性表达 (HE 染色, ×200)

Fig 1 Positive expressions of GFAP in brain glioma specimens treated with different fixation time (HE staining, ×200)



A: Weak positive expression; B: Medium positive expression; C: Strong positive expression.

图 2 Ki67 在不同固定时间脑胶质瘤标本中的阳性表达 (HE 染色, ×200)

Fig 2 Positive expressions of Ki67 in brain glioma specimens treated with different fixation time (HE staining, ×200)

在 4% 甲醛固定液中固定 4 h、24 h、48 h、96 h、7 d 和 14 d 的脑胶质瘤标本,经过组织处理后,进行免疫标记物染色,GFAP 有效阳性率分别为 63.38%、97.18%、95.77%、92.95%、90.14% 和 77.46%,Ki67 有效阳性率分别为 87.32%、100%、100%、100%、98.59% 和 90.14%(表 1~2)。

表 1 不同固定时间处理后 GFAP 在脑胶质瘤中的有效阳性表达结果

Tab 1 Valid positive expression of GFAP in brain glioma treated with different fixation time (n=71)

Fixation time	Positive intensity after staining				Number of valid positives	Valid positive rate (%)
	-	+	++	+++		
4 h	1	25	39	6	45	63.38
24 h	0	2	10	59	69	97.18
48 h	0	3	11	57	68	95.77
96 h	0	5	19	47	66	92.95
7 d	0	7	23	41	64	90.14
14 d	0	16	22	33	55	77.46

表 2 不同固定时间处理后 Ki67 在脑胶质瘤中的有效阳性表达结果

Tab 2 Valid positive expression of Ki67 in brain glioma treated with different fixation time

(n=71)

Fixation time	Positive intensity after staining				Number of valid positives	Valid positive rate (%)
	-	+	++	+++		
4 h	0	9	53	9	62	87.32
24 h	0	0	9	62	71	100
48 h	0	0	12	59	71	100
96 h	0	0	20	51	71	100
7 d	0	1	27	43	70	98.59
14 d	0	7	29	35	64	90.14

GFAP、Ki67 有效阳性结果统计分析

GFAP 脑胶质瘤标本固定 4 h、24 h、48 h、96 h、7 d 和 14 d 后,比较 GFAP 的有效阳性率,差异有统计学意义($\chi^2=51.802, P<0.001$)。两两组间比较发现,固定 24 h、48 h、96 h 和 7 d 的 GFAP 有效阳性率差异无统计学意义;固定 24 h、48 h、96 h 和 7 d 的 GFAP 有效阳性率显著高于固定 4 h 和 14 d,组间差异有统计学意义($P<0.05$),说明固定时间过短或太长都会影响 GFAP 染色结果(表 3)。

表 3 不同固定时间的 GFAP 有效阳性率组间比较

Tab 3 Comparison of valid positive rate of GFAP treated with different fixation time

(n=71)

Comparison	χ^2	P
4 h vs. 24 h	25.624	<0.001
4 h vs. 48 h	22.923	<0.001
4 h vs. 96 h	18.199	<0.001
4 h vs. 7 d	14.251	<0.001
4 h vs. 14 d	3.381	0.066
24 h vs. 48 h	0.207	1.000
24 h vs. 96 h	1.352	0.438
24 h vs. 7 d	2.966	0.168
24 h vs. 14 d	12.47	<0.001
48 h vs. 96 h	0.530	0.716
48 h vs. 7 d	1.721	0.190
48 h vs. 14 d	10.269	0.001
96 h vs. 7 d	0.364	0.546
96 h vs. 14 d	6.762	0.009
7 d vs. 14 d	4.202	0.040

Ki67 脑胶质瘤标本固定 4 h、24 h、48 h、96 h、7 d 和 14 d,比较 Ki67 的有效阳性率,差异有统计学意义($\chi^2=30.450, P<0.001$)。进一步进行两两组间比较发现,固定 24 h、48 h、96 h 和 7 d, Ki67 有效阳性率差异无统计学意义;固定 24 h、48 h、96 h 和 7 d 的 Ki67 有效阳性率高于固定 4 h 和 14 d,组间差异有统计学意义($P<0.05$),说明固定时间过短或太长都会

影响 Ki67 染色结果(表 4)。

表 4 在不同固定时间分组中 Ki67 有效阳性率组间比较

Tab 4 Comparison of valid positive rate of Ki67 treated

with different fixation time

(n=71)

Comparison	χ^2	P
4 h vs. 24 h	9.609	0.006 ⁽¹⁾
4 h vs. 48 h	9.609	0.006 ⁽¹⁾
4 h vs. 96 h	9.609	0.006 ⁽¹⁾
4 h vs. 7 d	6.885	0.009 ⁽¹⁾
4 h vs. 14 d	0.067	0.796 ⁽¹⁾
24 h vs. 48 h	—	—
24 h vs. 96 h	—	—
24 h vs. 7 d	1.007	1.000 ⁽²⁾
24 h vs. 14 d	—	—
48 h vs. 96 h	1.007	1.000 ⁽²⁾
48 h vs. 7 d	1.007	1.000 ⁽²⁾
48 h vs. 14 d	8.478	0.011 ⁽¹⁾
96 h vs. 7 d	8.478	0.011 ⁽¹⁾
96 h vs. 14 d	8.478	0.011 ⁽¹⁾
7 d vs. 14 d	4.769	0.029 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ χ^2 test; ⁽²⁾Fisher's exact test.

讨 论

研究发现,组织标本在固定过程中,抗原活性与固定时间直接相关,固定时间过短会造成固定不均匀,固定液不能完全渗透到组织内部,部分抗原失活;固定时间过长会使组织变得脆硬,抗原减少或定位不准^[7,11]。本研究中组织样本固定 24 h、48 h、96 和 7 d 后 GFAP、Ki67 的 IHC 染色结果较好,固定 4 h 的标本 IHC 染色阳性率明显低于固定 24 h、48 h、96 h 和 7 d 的标本,与何蕾蕾等^[11]在不同固定时间对乳腺浸润性癌 ER、PR 免疫组化染色影响的研究结果基本一致;固定 24 h~14 d 的标本 IHC 染色阳性结果呈下降趋势,与 Aniol 等^[8]延长鼠

海马固定时间对PCNA和DCX免疫染色结果的影响相符,两种抗原在组织固定7d或更长时间内免疫阳性下降。张共和等^[12]在神经元-nAChR免疫反应的研究中发现,固定时间过长直接影响免疫组化结果。不同器官组织在不同固定时长下的IHC染色结果有差异,乔秀玲等^[13]研究了不同固定液和不同固定时间对大肠癌淋巴结免疫组化染色的影响,指出淋巴结最佳免疫组化染色效果的固定时间为6~12h,固定时间越长,免疫染色效果越差。Kai等^[14]发现不同固定时间处理的相同外科手术胃癌标本在7d内Her-2和PD-L1表达无明显差异。因此认为,组织的固定时长对IHC染色结果有重要影响,不同组织器官最佳IHC染色效果的固定时长也不同。

本研究中,固定24h、4h、96h和7d的GFAP和Ki67的IHC染色结果优于固定4h和14d。固定4h的GFAP和Ki67阳性率明显低于固定24h、48h、96h和7d,组间差异有统计学意义($P<0.05$),说明新鲜标本的固定时间太短,肿瘤组织内部固定不充分,抗原活性减低,导致免疫标记物的阳性表达率下降。固定14d的GFAP和Ki67阳性率低于固定24h、48h、96h和7d,组间差异有统计学意义($P<0.05$),说明新鲜标本的固定时间过长,会导致组织内抗原活性减低,免疫标记物的阳性率下降。

本次研究的不足之处在于:(1)单中心实验,样本量较小,还需要更多样本量来验证;(2)在4h和24h之间以及14d之后未设观察组,设立的组别越多,实验结果的准确性越高;(3)仅选择2种免疫标记物进行研究,今后的研究范围可扩大到更多肿瘤相关抗原,以了解不同抗原表达与固定时长的关系,更有利于辅助病理诊断。

综上所述,人脑胶质瘤标本的固定时间对GFAP和Ki67表达有影响,为脑肿瘤标本的IHC室内质量控制提供了参考。在病理工作中要控制好标本的固定时间,避免固定不足或过度,从而提高免疫组化染色质量,得出准确可靠的判读结果,以辅助病理诊断。

作者贡献声明 韩春 病例收集,切片判读,论文构思、撰写和修订。唐峰 论文设计和指导,切片判读,结果分析。项耀钧 论文指导和修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益

冲突。

参 考 文 献

- [1] 王文岩,薛晓英.2020年低级别脑胶质瘤诊疗指南解读[J].河北医科大学学报,2020,41(9):993-998.
- [2] OSTROM QT, CIOFFI G, GITTLEMAN H, et al. Cbtrus statistical report: primary brain and other central nervous system tumor diagnosed in the united states in 2012—2016[J].*Neuro Oncology*, 2019, 21(Suppl 5):1-100.
- [3] CUDDAPAH VA, ROBEL S, WATKINS S, et al. A neurocentric perspective on glioma invasion [J].*Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(7):455-465.
- [4] 国家卫生健康委员会医政医管局.脑胶质瘤诊疗规范(2018年版)[J].中华神经外科杂志,2019,35(3):217-239.
- [5] 杨美娟.组织标本固定方法与免疫组织化学染色效果的关系[J].解剖科学进展,2003,9(1):89-90.
- [6] 杨红.免疫组化质量控制中的3个基本影响因素[J].临床与实验病理学杂志,2001,17(2):183-185.
- [7] 杨毅,陆江阳.标本固定时间对免疫组化染色结果的影响[J].诊断病理学杂志,2005,12(3):233-234.
- [8] ANIOL VA. The effects of prolonged formalin fixation on immunohistochemical staining of PCNA and Dcx proteins in the mouse hippocampus [J].*Neurochem J*, 2016, 10(3):244-247.
- [9] PIKKARAINEN M, MARTIKAINEN P, ALAFUZOFF I. The effect of prolonged fixation time on immunohistochemical staining of common neurodegenerative disease markers [J].*J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(1):40-52.
- [10] ALLRED DC, CLARK GM, ELLEDGE R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer [J].*J Natl Cancer Inst*, 1993, 85(3):200-206.
- [11] 何蕾蕾,赵弓泉,马宁,等.不同固定时间对乳腺非特殊型浸润性癌组织ER、PR免疫组化染色的影响[J].临床医学研究与实践,2020,5(21):27-29.
- [12] 张共和,金行藻,张太和,等.225例大肠腺瘤癌变的临床病理、免疫组化及其超微结构[J].临床肿瘤学杂志,2008,13(2):152-154.
- [13] 乔秀玲.不同固定液和固定时间对大肠癌淋巴结免疫组化染色的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(5):504-505.
- [14] KAI K, YODA Y, KAWAGUCHI A, et al. Formalin fixation on HER-2 and PD-L1 expression in gastric cancer: a pilot analysis using the same surgical specimens with different fixation times [J].*World J Clin Cases*, 2019, 7(4):419-430.

(收稿日期:2021-06-18;编辑:段佳)