

# 不同固定时间对乳腺癌 CK5/6,E-Cadherin,P120 表达的影响

孙 燃 谢 闵 戴 敏

芜湖市第二人民医院 安徽 芜湖 241000

**【摘 要】**目的：研究不同组织固定时间对乳腺癌组织免疫组化标记物 CK5/6,E-Cadherin,P120 表达的影响。方法：从 2020-2021 年两年时间本科室送检的术中冰冻乳腺癌新鲜标本中选取 102 例标本进行研究，每例选取 4 组固定时间，固定结束分别进行三种抗体 CK5/6,E-Cadherin,P120 进行免疫组化染色，最后在显微镜下判读对比不同固定时间的表达情况。结果：离体 20 分钟固定 12 小时三个标记物表达效果最好，离体 20 分钟固定 1 小时和离体 20 分钟固定 30 天次之，而离体 48 小时固定 12 小时表达效果最差。结论：不同组织固定时间对免疫组化标记物 CK5/6,E-Cadherin,P120 的表达效果差异显著，具有统计学意义（ $P < 0.001$ ）

**【关键词】**：免疫组化；固定时间；CK5/6；E-Cadherin；P120

DOI:10.12417/2811-051X.26.05.066

乳腺癌目前是女性发病率高死亡率也高的恶性肿瘤，其特异性也很大，其不同的类型临床治疗方法以及患者的预后也存在差别，其中从恶性程度上分有浸润性乳腺癌和原位癌其鉴别的重要标记物之一就是 CK5/6。从肿瘤来源上分有导管癌和小叶癌其鉴别的重要标记物是 E-Cadherin, P120。所以 CK5/6, E-Cadherin, P120 三个标记物表达的正确与否直接影响到乳腺癌分型的诊断，免疫组化得结构影响因素众多：组织固定，脱水包埋，染色方法，判读标准等。本文着重探讨组织固定时间对免疫组化标记物 CK5/6, E-Cadherin,P120 表达结果的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 一般材料

在 2020-2021 年期间从芜湖市第二人民医院病理科送检的术中冰冻乳腺标本中找出确诊为非特殊类型乳腺癌的标本 102 例标本进行研究。病人年龄 30-65 岁，一般情况良好无合并其它肿瘤，术前无化疗，放疗，靶向治疗等辅助治疗。根据冰冻取材结果选取肿瘤直接大于 2cm 的标本。

### 1.2 仪器与试剂

(1) 仪器：罗氏全自动免疫组化仪 Bench Mark-XT, 莱卡石蜡切片机 2235, 莱卡全自动脱水机 PELORIS II

(2) 试剂：固定液 10% 中性福尔马林，一抗 CK5/6(MX040) 迈新，E-Cadherin(LBP2-ECAD)安必平，P120(MYR1-P120)安必平。二抗：罗氏二抗系统 HRP Multime

### 1.3 方法

(1) 实验方法：从 2020-2021 年两年时间本科室送检的术中冰冻乳腺癌新鲜标本中选取 102 例标本进行研究，每例选取 4 组固定时间：A:离体 48h 后固定固定 12h, B:离体 20min 内

固定固定 1h, C:离体 20min 内固定固定 12h, D:离体 20min 内固定固定 30day。每例标本取材 4 块组织大小都为 0.5cm×0.5cm×0.3cm，分别安上述 4 组时间进行固定。固定结束后选择同一脱水程序（75%乙醇 30min→85%乙醇 60min→95%乙醇 60min→无水乙醇 60min→无水乙醇 80min→二甲苯 40min→二甲苯 60min→二甲苯 60min→石蜡 40min→石蜡 60min→石蜡 60min）脱水。脱水完成后石蜡包埋制成蜡块，所有蜡块先制作一张 HE 切片显微镜下观察，选出四组标本都含有肿瘤成分（且肿瘤细胞 > 500 个）的病例。经过筛查有 96 组病例符合要求。把这 96 组病例 384 个蜡块安 1-A, 1-B, 1-C, 1-D 进行编号，每个蜡块切三张白片分别进行三种抗体（CK5/6, E-Cadherin, P120）的免疫组化染色。最后对所有切片免疫组化结果进行分析。

(2) 统计学方法：分析软件 spss22.0，检验方法：秩和检验（Kruskal-Wallis）以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

抗体 CK5/6 在正常乳腺导管肌上皮上表达如果癌组织周围 CK5/6 不表达则提示肿瘤浸润。抗体 E-Cadherin 为细胞表面的一种粘附蛋白在乳腺正常细胞和癌细胞膜上多有表达。P120 是和 E-Cadherin 蛋白紧密链接的一种蛋白，当 E-Cadherin 蛋白缺失时其表达部位会从膜表达转变成细胞浆表达，这也是乳腺小叶癌的特征性表达。每种抗体根据表达强弱分为四类分别为：

- (1)  $\geq 60\%$ 靶细胞阳性且着色清晰记阳性+++。
- (2) 30%-60%靶细胞阳性记阳性++。
- (3) 1%-30%靶细胞阳性记阳性+。
- (4)  $< 1\%$ 靶细胞阳性记阴性-。

现将 48 组实验结果总结如下表：

作者简介：

第一作者：孙燃，男（1988-），安徽芜湖人，主管技师，主要从事病理学技术方面工作。通讯地址：安徽省芜湖市第二人民医院门诊部三楼病理科。

通讯作者：戴敏，男（1969-），安徽芜湖人，主任医师，病理科主任，硕士生导师，主要病理诊断方面工作。

表 1 CK5/6 抗体表达情况与组织固定时间的关系

Tab.1 The relationship between CK5/6 antibody expression and tissue fixation time

Fixed time	Expressive intensity			
	+++	++	+	-
A:After 48 h,they were fixed for 12 h	0	0	6	90
B:After 20min,they were fixed for 1 h	10	32	50	4
C:After 20min,they were fixed for 12 h	94	2	0	0
D:After 20min,they were fixed for 30d	40	20	18	18

注：N=96,H=267.83，P<0.001，四组实验方法结果具有显著差异，其中 C 组实验方法，表达强度最高，随后是 D.B，A 组效果最差。

Note：N=96,H=267.83，P<0.001.The results of the four experimental methods showed significant difference,In Group C,the expression intensity was the highest.Then came D.B.,and Group A was the least effective.

表 2 E-Cadherin 抗体表达情况与组织固定时间的关系

Tab.2 The relationship between E-Cadherin antibody expression and tissue fixation time

Fixed time	Expressive intensity			
	+++	++	+	-
A:After 48 h,they were fixed for 12 h	0	0	4	92
B:After 20min,they were fixed for 1 h 12	12	30	48	6
C:After 20min,they were fixed for 12 h	92	4	0	0
D:After 20min,they were fixed for 30d	30	38	22	6

注：N=96,H=287.02，P<0.001，四组实验方法结果具有显著差异，其中 C 组实验方法，表达强度最高，随后是 D.B，A 组效果最差。

Note：N=96,H=287.02，P<0.001.The results of the four experimental methods showed significant difference,In Group C,the expression intensity was the highest.Then came D.B.,and Group A was the least effective.

### 参考文献：

[1] Valencia-Guerrero Aida and Dresser Karen and Cornejo Kristine M.Utility of Immunohistochemistry in Distinguishing Primary Adnexal Carcinoma From Metastatic Breast Carcinoma to Skin and Squamous Cell Carcinoma.[J].The American Journal of dermatopathology,2018,40(6):389-396..

表 3 P120 抗体表达情况与组织固定时间的关系

Tab.3 The relationship between P120 antibody expression and tissue fixation time

Fixed time	Expressive intensity			
	+++	++	+	-
A:After 48 h,they were fixed for 12 h	0	0	4	92
B:After 20min,they were fixed for 1 h	4	24	50	18
C:After 20min,they were fixed for 12h	92	4	0	0
D:After 20min,they were fixed for 30d	30	36	28	2

注：N=96,H=299.548，P<0.001，四组实验方法结果具有显著差异，其中 C 组实验方法，表达强度最高，随后是 D.B，A 组效果最差。

Note：N=96,H=299.548，P<0.001.The results of the four experimental methods showed significant difference,In Group C,the expression intensity was the highest.Then came D.B.,and Group A was the least effective.

### 3 讨论分析

三个标记物 CK5/6,E-Cadherin,P120 都是 C 组达效果最好且位置准确着色均匀醒目，A 组表达效果最差大部分病例出现完全不表达。第 B,D 组三个标记物表达部分病例出现表达减弱少数病例不表达。因此组织固定时间对抗体 CK5/6，E-Cadherin，P120 表达有影响（p<0.001）有统计学意义。免疫组织化学就是检测组织内的相应抗原分子所以抗原的保存完好与否是免疫组织化学成败的关键，而组织固定就是通过福尔马林固定液使蛋白质分子发生较链聚集从而防止组织自溶从而防止抗原丢失。人体组织在离体后如果不能及时固定就会在外界微生物的作用下迅速发生自溶。离体 48 小时后抗原基本完全丢失。如果虽然及时固定但是固定时间不足（<12h）也会因为蛋白较链聚集不够而在后续的脱水包埋过程中发生抗原丢失。而固定时间过长也会使抗原“丢失”因为固定时间过长超过 30d 会使蛋白质发生过度较链从而使抗原不能很好暴露影响和抗体结合。组织固定及时相比固定不足和过度固定对免疫组化得影响更重要，及时合适的固定时间对免疫组化标记物 CK5/6，E-Cadherin,P120 正确表达很重要，离体 20min 内固定固定 12h 的固定效果最好。

- [2] 孙河龙,李耀洋,李丹,等.组织固定液与固定方法选择的探讨[J].甘肃医药,2019,38(12):1061-1064+1069.
- [3] 何蕾蕾,赵弓泉,马宁,等.不同固定时间对乳腺浸润性癌非特殊型组织 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.
- [4] 金玉,王艳辉,杨乐欣,等.953 例乳腺癌患者 CK5/6、EGFR 和 AR 的表达与临床病理分析[J].天津医科大学学报,2022,28(01):85-90.
- [5] 王昭君,卢鸯鸯,戴燕燕,等.CK5/6 在浸润性乳腺癌中的表达及预后意义[J].医学研究杂志,2020,49(12):99-103.
- [6] 杜文英,贾维.三阴性乳腺癌组织 p53、Ki-67、Twist 及 E-cadherin 的表达及其意义[J].实用医院临床杂志,2021,18(06):84-87.
- [7] 张卫星,张波涛,乔海军.E-钙黏蛋白、Ki-67、A20 在浸润性乳腺癌患者中的表达及其临床价值[J].实用癌症杂志,2021,36(05):740-743.
- [8] 陈刘镇,王在国,郑惊雷.P63、P120ctn 在 Her-2 阳性乳腺癌中的表达及临床意义[J].罕见疾病杂志,2021,28(02):32-33.
- [9] 郑丹,范春妮,雷影,等.E-cadherin、P120ctn 在乳腺癌组织中的表达及其意义[J].中国实验诊断学,2019,23(02):376-378.
- [10] 苟继周,李晓星,孙炎,张鸿英,彭程,赵霞,孙宜康,喻宏,罗伟仁.组织固定对下游基因和蛋白分子检测的影响[J].临床与实验病理学杂志,2020,36(04):439-441.
- [11] 陈志强,王莹,米贤军,钟守军,陈昂,邓文同.不同固定时间和烤片时间对乳腺浸润性导管癌 HER-2、p16 免疫组化染色的影响[J].临床与实验病理学杂志,2017,33(08):927-928.