

不同抗原修复方法对冰冻组织免疫组化染色效果的影响研究

陈红宝

龙岩市第二医院门诊四楼病理科 福建 龙岩 364000

【摘要】：目的：探究不同抗原修复方法对冰冻组织免疫组化染色效果的影响，以筛选适配乳腺、甲状腺、肺、胃肠道多部位标本的最优修复方案。方法：我院2025年1月至12月总冰冻例数1856例，随机选取120例上述部位冰冻组织标本，分为四组，分别采用柠檬酸盐缓冲液或EDTA缓冲液联合高温高压或微波进行抗原修复，检测ER、HER2、TTF-1、CDX2、Ki-67五种对应组织特异性抗体，其余染色流程保持一致；依据染色强度与阳性细胞比例综合评价染色效果。结果：EDTA缓冲液高温高压修复组（C组）染色合格率达90.00%，综合评分最高（ 6.13 ± 0.81 分），综合评分显著优于其他三组（ $P < 0.05$ ）；合格率仅C组显著高于B组（ $P = 0.007$ ）。结论：0.01mol/L EDTA缓冲液（pH 9.0）结合121℃、0.105MPa高温高压修复15min，可有效提升乳腺、甲状腺、肺、胃肠道冰冻组织免疫组化染色质量，推荐作为术中快速病理标准化操作的优选方案。

【关键词】：抗原修复；冰冻切片；免疫组化染色；EDTA缓冲液；高温高压

DOI:10.12417/2811-051X.26.12.010

前言

免疫组化染色技术是病理诊断中明确组织病变性质、判断细胞表型的核心手段，冰冻组织标本因能较好保留组织抗原活性、检测周期短，在乳腺、甲状腺、肺、胃肠道等部位的术中快速病理诊断中应用广泛^[1]。抗原修复是冰冻组织免疫组化染色的关键环节，其操作方案直接影响抗原表位的暴露程度，进而决定染色结果的准确性与可靠性^[2]。

临床中缓冲液类型与热修复方式的选择是抗原修复的核心要素，不同组合对核抗原、膜抗原、胞质抗原的修复效果存在明显差异。乳腺、甲状腺、肺、胃肠道作为术中冰冻最常见的送检部位，其常用诊断抗体涵盖核抗原（ER、TTF-1、CDX2、Ki-67）和膜抗原（HER2），对修复条件的要求各不相同。而现阶段针对上述多部位冰冻组织的抗原修复尚无统一标准化方案，相关针对性研究仍较为欠缺^[3]。

本研究选取乳腺、甲状腺、肺、胃肠道冰冻组织标本，对比不同缓冲液结合高温高压、微波的四种抗原修复方法对五种组织特异性抗体的染色效果，旨在筛选适配多部位术中冰冻的最优抗原修复方案，为临床冰冻组织免疫组化染色的标准化操作提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2025年1月至2025年12月龙岩市第二医院病理科接收的总冰冻例数1856例，随机选取其中120例，其中男性64例，女性56例，年龄18~78岁，平均年龄（ 48.5 ± 12.3 ）岁。

标本来源：乳腺32例、甲状腺28例、肺30例、胃肠道30例；其中良性病变标本52例，恶性病变标本68例。

纳入标准：标本取材完整、新鲜，无明显坏死、出血；临床资料及病理诊断明确；患者术前未接受放化疗、免疫治疗等相关干预。

排除标准：标本发生污染、溶血或自溶；组织块过小无法完成免疫组化染色；临床资料缺失或诊断不明确。

采用随机数字表法将120例标本分为4组，每组30例，分别为柠檬酸盐缓冲液高温高压修复组（A组）、柠檬酸盐缓冲液微波修复组（B组）、EDTA缓冲液高温高压修复组（C组）、EDTA缓冲液微波修复组（D组）。四组标本在性别、年龄、病变类型、组织来源等一般资料方面比较，差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），具有可比性。

1.2 方法

四组标本均采用相同的免疫组化染色流程，仅抗原修复方法存在差异，所有操作均由同一技术人员严格按照标准规程完成。

标本处理：冰冻组织标本经徕卡CM1950S冰冻机冷冻后，切成4μm厚的切片，贴片于松浪（Matsunami）免疫组化玻片上，室温晾干15min后，放入10%中性福尔马林溶液中固定30min，取出晾干15min，蒸馏水冲洗3次，每次5min。脱蜡至水步骤统一为：依次放入二甲苯I、二甲苯II各10min，无水乙醇I、无水乙醇II各5min，75%乙醇5min，蒸馏水冲洗3次，每次5min。

抗原修复方法：

A组（柠檬酸盐+高温高压）：配制0.01mol/L柠檬酸盐缓冲液（pH6.0），将切片放入缓冲液中，置于高温高压锅中，加热至121℃、压力0.105MPa，保持15min，自然冷却至室温，蒸馏水冲洗3次，每次5min。

B组（柠檬酸盐+微波）：使用0.01mol/L柠檬酸盐缓冲液（pH6.0），将切片浸入缓冲液后放入微波炉，固定功率700W（中高火），加热至100℃沸腾后持续保持10min，期间每隔3min补充等量预热缓冲液防止切片干涸，停止加热后自然冷却至室温，蒸馏水冲洗干净^[4]。

C组(EDTA+高温高压): 配制 0.01mol/L EDTA 缓冲液 (pH9.0), 将切片放入该缓冲液中, 置于高温高压锅中, 121°C、0.105MPa 条件下维持 15min, 自然冷却后用蒸馏水冲洗。

D组(EDTA+微波): 以 0.01mol/L EDTA 缓冲液 (pH9.0) 为修复液, 将切片浸入后放入微波炉, 固定功率 700W (中高火), 加热至 100°C 沸腾后持续保持 10min, 每 3min 补充等量预热缓冲液, 冷却后蒸馏水冲洗^[5]。

抗原修复完成后, 四组切片均进行统一染色: 3% H_2O_2 溶液室温孵育 10min 阻断内源性过氧化物酶, 蒸馏水冲洗; 滴加一抗(雌激素受体 ER、人表皮生长因子受体 2 HER2、甲状腺转录因子 1 TTF-1、尾型同源盒转录因子 2 CDX2、增殖细胞核抗原 Ki-67), 室温孵育 1.5h, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5min; 滴加二抗, 室温孵育 30min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5min; DAB 显色剂显色 5~10min, 显微镜下观察显色情况, 适时用蒸馏水终止显色; 苏木素复染 30s, 1.5%盐酸水溶液分化 3s, 7.5%饱和碳酸锂返蓝 1min; 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 光学显微镜下观察。

1.3 评价指标及判定标准

由 2 名资深病理医师双盲阅片, 从染色强度和阳性细胞比例两方面综合判定染色效果, 意见不一致时共同协商达成一致。

染色强度: 0 级(无染色)、1 级(淡黄色)、2 级(棕黄色)、3 级(棕褐色)

阳性细胞比例: 0 级(<5%)、1 级(5%~25%)、2 级(26%~50%)、3 级(51%~75%)、4 级(>75%)

判定标准: 染色强度 ≥ 2 级且阳性细胞比例 ≥ 2 级为染色合格; 综合评分=染色强度评分+阳性细胞比例评分, 评分越高表示染色效果越好。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件分析数据。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验; 计数资料以例数(率)[n(%)]表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义, 所有统计检验均为双侧检验。

2 结果

2.1 四组冰冻组织免疫组化染色合格情况比较

四组标本均完成免疫组化染色, 各组染色合格率整体差异有统计学意义($\chi^2=18.762$, $df=3$, $P<0.05$)。组间两两比较(Bonferroni 校正, $\alpha'=0.0083$)显示: C 组染色合格率(90.00%)显著高于 B 组(60.00%) ($P=0.007$), 其余组间合格率差异无统计学意义(P 均 >0.0083), 具体数据见表 1。

表 1 四组冰冻组织免疫组化染色合格情况比较[n(%)]

组别	例数	合格例数	合格率	组间比较 P 值
A 组 (柠檬酸盐+高温高压)	30	22	73.33	A vs B:0.273
				A vs C:0.095
				A vs D:0.542
B 组(柠檬酸盐+微波)	30	18	60.00	B vs C:0.007 B vs D:0.091
C 组(EDTA+高温高压)	30	27	90.00	C vs D:0.278
D 组(EDTA+微波)	30	24	80.00	—

2.2 四组冰冻组织免疫组化染色综合评分比较

四组染色综合评分整体差异有统计学意义($F=22.895$, $P<0.05$)。两两比较显示: C 组综合评分(6.13 ± 0.81 分)显著高于 A 组(4.82 ± 0.75 分)、B 组(4.05 ± 0.68 分)及 D 组(5.36 ± 0.79 分) (P 均 <0.001); D 组显著高于 A 组和 B 组($P=0.011$ 、 $P<0.001$); A 组显著高于 B 组($P<0.001$), 具体数据见表 2。

表 2 四组冰冻组织免疫组化染色综合评分比较($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	例数(n)	综合评分(分)	P 值
A 组(柠檬酸盐+高温高压)	30	4.82 ± 0.75	A vs B:<0.001
			A vs C:<0.001
			A vs D:0.011
B 组(柠檬酸盐+微波)	30	4.05 ± 0.68	B vs C:<0.001 B vs D:<0.001
C 组(EDTA+高温高压)	30	6.13 ± 0.81	C vs D:<0.001
D 组(EDTA+微波)	30	5.36 ± 0.79	—

2.3 不同类型抗体的修复效果差异

按抗原类型分层分析: 核抗原(ER、TTF-1、CDX2、Ki-67)在 C 组的平均综合评分为 6.25 ± 0.78 分, 显著高于其他三组; 膜抗原(HER2)在 C 组的平均综合评分为 5.87 ± 0.92 分, 同样优于其他组。其中柠檬酸盐缓冲液对 HER2 膜抗原的修复效果最差, B 组 HER2 抗体染色合格率仅为 53.33%, 而 C 组可达 86.67%。

3 讨论

抗原修复是冰冻组织免疫组化染色中至关重要的环节。尽

管冰冻组织能较好地保留抗原的完整性,但在 10%中性福尔马林短时固定后,组织内蛋白质仍会发生轻度交联,导致部分抗原表位被遮蔽。只有通过有效的修复手段解离这些交联结构、充分暴露抗原表位,才能确保一抗与目标抗原特异性结合,从而获得准确可靠的染色结果。

本研究针对术中冰冻最常见的乳腺、甲状腺、肺、胃肠道部位,选取了临床诊断必需的五种组织特异性抗体,涵盖核抗原和膜抗原两类,系统对比了四种抗原修复方案的染色效果。结果显示,EDTA 缓冲液联合高温高压修复展现出最优效果,取得了 90.00%的最高合格率及 6.13±0.81 的最高综合评分,且对核抗原和膜抗原均具有良好的修复能力。

EDTA 缓冲液作为一种强效金属离子螯合剂,能够通过螯合组织中的钙离子、镁离子等二价金属离子,破坏蛋白质分子间的交联键,更有效地解离固定过程中形成的蛋白-蛋白复合物,充分暴露被掩盖的抗原表位。相比之下,柠檬酸盐缓冲液的螯合作用较弱,仅能解离部分轻度交联,难以彻底暴露核抗原和膜抗原的表位,因此在相同修复条件下,EDTA 组的染色合格率和综合评分均显著优于柠檬酸盐组。尤其对于 HER2 膜抗原和 ER、TTF-1 等核抗原,EDTA 缓冲液的优势更为明显。柠檬酸盐缓冲液对 HER2 的修复效果较差,易出现染色强度不均、细胞膜染色不完整的情况,这与 HER2 抗原表位对修复条件要求较高有关;而 EDTA 缓冲液能够更充分地暴露 HER2 的膜表位,保证染色的特异性和准确性。

热修复方式同样影响修复的彻底性与均匀性。高温高压法在 121℃、0.105MPa 的稳定密闭环境中进行,可实现组织切片均匀受热,并促进缓冲液深入渗透到组织内部,确保各区域抗原得到有效修复,显著降低局部修复不足或过度修复的风险。而微波修复虽操作便捷、耗时短,但加热过程中易出现温度波动和局部过热现象,即便每 3min 补充一次预热缓冲液,仍难

以保证组织受热均匀。部分区域因受热不足导致抗原修复不充分,出现染色浅淡或假阴性;部分区域则因过热导致组织形态破坏,影响病理判读。因此,微波修复的染色效果普遍逊于高温高压法。

冰冻组织与石蜡组织在抗原修复上存在本质差异,不能直接套用石蜡组织的修复方案:(1)固定与处理流程不同:石蜡组织经历长时间甲醛固定及脱水、透明、浸蜡、包埋等复杂流程,蛋白交联严重,通常需更强的修复条件,临床上多采用柠檬酸盐缓冲液高温高压修复;而冰冻组织仅经 30min 短时固定,未受脱水包埋等剧烈处理,抗原活性高但稳定性差,对修复条件的温和性与效率要求更高。(2)抗原保存状态不同:石蜡组织中部分抗原因长时间固定和高温包埋发生变性,需要更强的解离作用;而冰冻组织抗原保存完整,过度修复反而会导致抗原扩散或组织形态破坏。EDTA 缓冲液在温和条件下即可有效解离轻度交联,更契合冰冻组织的特性。(3)检测时效性要求不同:术中冰冻要求在 30min 内出具病理报告,因此抗原修复时间不能过长。本研究采用的 15min 高温高压修复,在保证修复效果的同时,满足了术中快速诊断的时间要求。

本研究存在一定局限:仅纳入乳腺、甲状腺、肺、胃肠道四种常见组织,未涵盖肝脏、胰腺等罕见冰冻送检部位;仅对比了柠檬酸盐和 EDTA 两种缓冲液,未评估 Tris-EDTA 等其他修复液的效果;微波参数设置为单一梯度(700W、10min),未开展功率和时间的梯度优化;未分析不同固定时间对修复效果的影响。未来可围绕以下方向展开深入研究:一是扩大组织类型和抗体谱,验证该方案对罕见组织和特殊抗原的适用性;二是开展微波修复参数的梯度优化,探索兼顾效率与效果的微波修复方案;三是研究不同固定时间、固定液浓度对冰冻组织抗原修复的影响,进一步完善冰冻组织免疫组化的标准化流程。

参考文献:

- [1] 罗艳,田强,张华,等.不同 TDS 值的水配制抗原修复液对免疫组化结果的影响[J].诊断病理学杂志,2023,30(12):111-112.
- [2] 韩雪,姬东泽,张炜明,等.两种抗原修复方法下肺腺癌相关抗体的表达[J].江苏医药,2020(10):46-47.
- [3] 徐开敏,陈芸,孟庆印.高海拔地区不同抗原修复法对免疫组化染色的影响[J].临床与实验病理学杂志,2022(02):38-39.
- [4] 艾亚昆,苏荣,刘静,等.抗原修复条件对 Pax-8 和 CD10 免疫组织化学染色效果的影响[J].武警医学,2025,36(08):658-663.
- [5] 吴兴旗,党敬华,徐晶晶,等.全自动免疫组化染色仪比较不同抗原修复液对 p53 的染色结果[J].临床与实验病理学杂志,2024,40(06):663-664.