

用于激光捕获显微切割的组织冰冻切片制作方法探讨

段仁杰^{1 2} 林爱琴² 汪根莲^{1 2} 李铁臣² 孙 青¹

(1. 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 妇产科,安徽 芜湖 241001; 2. 皖南医学院 分子生物学研究室,安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨经样本保存液处理的组织用于激光捕获显微切割技术冰冻切片的制作技术与方法。方法: 以手术中切取的子宫内膜组织为标本。经样本保存液处理后,置于冰箱冷冻保存,经切片、染色,用于激光捕获显微切割。结果: 在传统切片的基础上,改良后的切片更适用于激光捕获显微切割及相关实验。结论: 改良的切片满足了激光捕获显微切割技术的要求和组织学观察的精确性。

【关键词】激光捕获显微切割; 冰冻切片; 切片染色

【中图分类号】R 318. 51 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2016. 01. 005

Preparation of frozen tissue sections for laser capture microdissection

DUAN Renjie LIN Aiqin ,WANG Genlian LI Tiechen SUN Qing

Department of Obstetrics and Gynecology ,The First Affiliated Hospital ,Wannan Medical College ,Wuhu 241001 ,China

【Abstract】Objective: To investigate the technology and approaches to producing a frozen section for laser capture microdissection. **Methods:** Surgically resected endometrial tissue was obtained. Then the specimens were treated with preservation solution and frozen in an icebox and subjected to section and staining for laser capture microdissection. **Results:** On conventional section preparation basis ,the modified profile led to excellent quality of tissue sections for laser capture microdissection or use in related experiment. **Conclusion:** Our improved technology can result in quality sections to satisfy the laser capture microdissection and accurate histological observation.

【Keywords】 laser capture microdissection; frozen section; Slice dyeing

冰冻切片被广泛用于手术中,主要用于分辨疾病的良性和恶性病变^[1-2]。随着医学科学技术的不断发展,冰冻切片也被广泛运用于科学研究中^[3]。冰冻切片的制作是激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)^[4]技术中的关键一步,切片质量的好坏直接影响 LCM 对目标细胞的捕获及后续试验结果的准确性。一般经样本保存液处理过的组织标本,含水量大,增加了冰冻切片制作的难度。本文以本实验室所使用的 Leica CM 1900 型冰冻切片机(德国徕卡公司)为例,对经样本保存液处理的组织用于 LCM 中冰冻切片的制作技术与方法作一介绍。

1 资料与方法

1.1 标本来源 人子宫内膜组织标本来自皖南医

学院附属弋矶山医院妇产科。术中无菌条件下采集组织标本后置于存有样本保存液的无菌无 RNA 酶的离心管内,4℃ 冰箱过夜后转入干燥离心管中,-20℃ 低温冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 实验标本的处理 切片前用医用纱布包裹组织标本,吸干组织表面水分。

1.2.2 包埋 从冰冻切片机的机箱中取出包埋托,用纱布擦除表面冰霜。在包埋托上铺一层 OCT 包埋剂(德国徕卡产品),放入机箱内待其凝固后修平。将吸干的子宫内膜组织标本切成 0.2~0.4 cm 厚,切面向上平铺在包埋托近边缘处(图 1,传统方法是将组织平铺在包埋托中心处),再用 OCT 包埋剂在包埋托上覆盖一层并将组织完全包埋在內。

1.2.3 切片 包埋托含有组织的部位在下固定在

基金项目:安徽省高校省级自然科学研究重点项目(KJ2014A267)

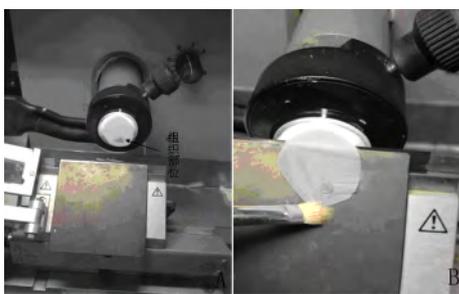
收稿日期:2015-07-30

作者简介:段仁杰(1987-),男,2013 级硕士研究生,(电话)18375348008,(电子信箱)545005120@qq.com;

孙 青,女,副主任医师,副教授,硕士生导师,(电子信箱)sunqingl@126.com,通讯作者。

冻头上,将组织削平至组织面最大为宜(图 1A)。切片时右手摇动转轮控制切片速度,左手用毛刷轻按切片边缘部分,边切边拉,待切片即将与包埋托分离时,停止切片(切片与包埋托分离易出现卷曲,不利贴片,图 1B)。将切片粘附在玻片的中央(传统方法固定好包埋托后,把防卷板调试切片最佳状态,然后切片)。重复此操作,尽量在玻片上多贴一些组织切片。

1.2.4 样本保存液处理、乙醇固定 滴加样本保存液覆盖玻片含有组织的部位,室温孵育 4 min。0.1% DEPC 水洗数秒。切片用梯度酒精固定,无水乙醇 30 s,95% 乙醇 30 s,70% 乙醇数秒,0.1% DEPC 水洗数秒(传统方法不经样本保存液处理,直接酒精甲醛固定)。



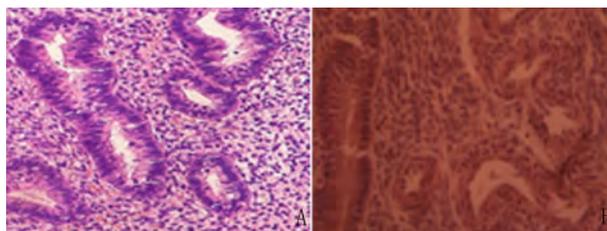
A. 固定包埋托; B. 切片方式。

图 1 冰冻切片的制作

1.2.5 染色 此过程所有需配制的试剂均用高温高压灭菌的 0.1% DEPC 水配制。①将固定后的切片放入苏木素染液染核 1~2 min,0.1% DEPC 水洗 30 s。②伊红染色 2 s,0.1% DEPC 水洗数秒。③70%、95%、100% 的乙醇分别脱水 10 s、30 s、30 s。④二甲苯 I、II 各透明 10 s。吹风机冷风吹干后,立即进行 LCM(传统染色试剂的配置均用蒸馏水,切片的清洗也用蒸馏水。在苏木素染核后还有盐酸分化,氨水返蓝两步)。

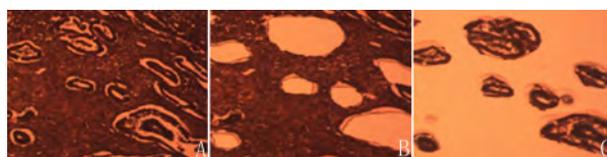
2 结果

2.1 切片的比较及目标细胞的捕获 样本保存液处理的子宫内膜组织经此染色过程所制冰冻切片,在 ABI Arcturus XT LCM 仪器(美国 ABI 公司)显微镜下观察,染色效果虽不及传统染色方法,但组织结构完整,细胞形态可分辨(图 2A、B)。按上述改良过的切片过程和染色方法,样本保存液处理的子宫内膜组织所制的冰冻切片,经 LCM 顺利捕获到上皮目标细胞(图 3)。



A. 传统切片染色; B. 改良后的切片染色。

图 2 改良前后子宫内膜组织切片图(HE × 400)



A. 捕获前的切片; B. 捕获后的切片; C. 帽子上捕获的目的细胞。

图 3 LCM 捕获结果(HE × 100)

2.2 两种切片 RNA 含量的比较 利用 LCM 技术从 12 例子宫内膜组织标本所制的两种切片上捕获相同数量上皮细胞。相同条件下,提取细胞内总 RNA,RT-PCR 方法检测目标基因 β -actin 的表达。采用 SPSS18.0 进行统计分析,传统切片组的平均 CT 值为 (21.76 ± 3.80) HU,改良后切片组平均 CT 值为 (18.38 ± 3.50) HU, $t = 2.26$, $P < 0.05$,两组之间差异有统计学意义。传统切片捕获后检测到的 CT 值较改良后切片 CT 值大,即传统切片所对应的初始模板 cDNA 量比较低,说明从传统切片上所取细胞中 RNA 含量比从改良后切片上所取细胞中 RNA 含量低。

3 讨论

LCM 技术是近几年发展起来的新兴技术,能在显微镜下观察特异性组织和细胞,在基本不损伤细胞内蛋白质、DNA 和 RNA 的条件下,从细胞群中分离出纯细胞群或单一细胞,成功解决了细胞异质性问题^[5-8]。冰冻切片的制作是 LCM 技术中关键的一步,切片质量的好坏直接影响 LCM 对目标细胞的捕获及后续试验结果的准确性。

冰冻切片中冰晶的形成,易在切片中形成空白区,细胞内空泡增多,使组织结构不易分辨。经样本保存液处理的组织标本通常含水量大,易形成冰晶。切片前,用干纱布将组织表面水分吸干。这样在很大程度上避免了因组织水分过多,冷冻后冰晶过多现象。LCM 冰冻切片要尽量将切片含有组织的部位粘附在玻片中央,这样有利于 LCM 中帽子的放置。在不能连续切片的情况下,按照常规用玻片直

(下转第 21 页)

检测器原理、流动相比和衍生试剂的不同等因素合理选择检测波长。

由于丙戊酸钠自身在紫外条件下无吸收,必须经历酸化、萃取、衍生化后才能在紫外波长下有吸收,因此合理选择酸化剂、萃取剂和衍生化催化剂直接关系检测结果。值得一提的是本实验观察到乙醚作为萃取剂时,由于其挥发性强、毒性大等特点,与正己烷作为萃取剂相比得到的峰型较小,而正己烷可以达到萃取完全、损失少、相对安全的效果。在实验水浴催化衍生化阶段,三乙胺作为催化剂加入体积为 20 μL ,当增加三乙胺加入的量为 50 μL 和 100 μL 时^[8-9],其实验结果并无改善,因此可选择节约的试剂成本。有文献显示实验在衍生阶段选择 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min^[10],结果发现主峰峰面积较小,且与内标峰面积比不稳定、波动大,可能是水浴反应不完全造成。最后,本实验选择 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min 后通入氮气并继续水浴直至溶剂挥发干,相对于自然挥发和水浴完全后再吹干,本实验采用的方法溶剂挥发完全浓缩好,且用时短一般 3 min 左右,降低了衍生物接触空气被氧化变质的风险,同时节省了氮气资源。因此本法适用于本院丙戊酸钠血药浓度检测,同时实验结果可靠、准确度高、重复性好和节约

实验室成本,可为临床合理用药提供参考。

【参考文献】

- [1] 班立丽,唐晓霞.丙戊酸钠血药浓度与抗癫痫疗效及不良反应关系研究[J].中国医院用药评价与分析,2013,13(12):1086-1088.
- [2] 朱斌.1214例丙戊酸钠血药浓度监测的回顾性分析[J].药物流行病学杂志,2008,17(1):48-49.
- [3] 王宏虹,毛桂福,谭强.丙戊酸钠血药浓度监测研究概况[J].齐鲁药事,2012,31(10):605-607.
- [4] 毛桂福,黄玉玲.HPLC测定血清中丙戊酸方法的改进[J].华西药理学杂志,2013,28(3):305-306.
- [5] 裔照国,戴月华,季中秋.对癫痫病人血清中丙戊酸钠浓度的监测[J].江苏药学与临床研究,2005,13(6):52-53.
- [6] 展翔,徐玫.高效液相色谱法测定人血清中丙戊酸钠含量[J].中国药业,2009,18(6):25-26.
- [7] 周莉华,涂琼,梅步云.HPLC法测定人血清中丙戊酸钠的浓度[J].中国药房,2011,22(26):2441-2442.
- [8] 胡琳.高效液相色谱法测定丙戊酸钠的血药浓度[J].中国药业,2013,22(12):16-18.
- [9] 李文艳,彭梅.HPLC测定人血浆中丙戊酸钠的浓度[J].南昌大学学报:医学版,2014,54(7):22-23.
- [10] 李炳东.柱前衍生化HPLC法测定人血清中丙戊酸钠的浓度[J].中国美容医学,2012,21(12):195-196.

(上接第17页)

接去粘附切片时,要将切片含有组织的部位贴在玻片的中央,冻头恰好阻碍了此操作过程。为此我们将组织包埋在包埋托的近边缘处,将包埋托含有组织的部位在下固定在冻头上,如此切出的切片含有组织的部位与冻头的距离拉远了,有利于将切片含有组织的部位贴在玻片的中央。

在冰冻切片中,防卷板对切片也会产生很大影响。每次切片都要对防卷板进行调试,如果调试不当,很难切出平整的切片。本实验在制作切片时,放弃使用防卷板,采用边切边用毛刷轻轻按住切片边缘向后拉的方式切片。省去了每次切片都要对防卷板的调试过程,缩短了切片时间。

LCM冰冻切片所有染色试剂的配制均用高温高压灭菌的DEPC水配制,保证切片在染色过程中不被DNA酶、RNA酶污染。同时在不影响切片观察和细胞筛选的情况下,省去了传统切片染色中分化和返蓝两步,缩短了染色时间。本实验通过对传统切片制作过程与染色上的改进,不仅成功制作出了经样本保存液处理的子宫内膜组织标本的冰冻切片,同时简化了切片和染色过程,缩短了制片时间,制作出更符合LCM要求的冰冻切片。

【参考文献】

- [1] ESBONA K, LI Z, WILKE LG. Intraoperative imprint cytology and frozen section pathology for margin assessment in breast conservation surgery: a systematic review [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(10):3236-3245.
- [2] GHAEEMMAGHAMI F, BEHNAMFAR F, ENSANI F. Intraoperative frozen sections for assessment of female cancers [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2007, 8(4):635-639.
- [3] 刘晓兰,刘燕,李峰,等.冰冻切片制作体会及常见问题[J].现代生物医学进展,2010,10(14):2737-2741.
- [4] EMMERT-BUCK MR, BONNER RF, SMITH PD, et al. Laser capture microdissection [J]. Science, 1996, 274:998-1001.
- [5] KUMMARI E, GUO-ROSS SX, EELLS JB. Laser capture microdissection—a demonstration of the isolation of individual dopamine neurons and the entire ventral tegmental area [J]. Vis Exp, 2015, 96: e52336.
- [6] LIU H, MCDOWELL TL, HANSON NE, et al. Laser capture microdissection for the investigative pathologist [J]. Vet Pathol, 2014, 51(1):257-269.
- [7] SUGIYAMA Y, SUGIYAMA K, HIRAI Y, et al. Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues [J]. Am J Clin Pathol, 2002, 117(1):109-116.
- [8] ESPINA V, WULFKUHLE JD, CALVERT VS, et al. Laser-capture microdissection [J]. Nat Protoc, 2006, 1(2):586-603.