

· 技术与方法 ·

Van-clear 环保透明脱蜡剂在不同宫颈病变组织 HE 染色、蛋白及基因表达检测中的应用

詹晓芬, 王少洪*, 王媛媛, 吴璇, 肖坤胜

汕头市中心医院病理科, 广东 汕头 515031

[摘要] **目的:**对比环保透明脱蜡剂 Van-clear 与传统透明脱蜡剂二甲苯在不同宫颈病变组织 HE 染色、P16 及 Ki67 蛋白表达、hTERC 基因表达检测效果的差异,探讨 Van-clear 的实用价值。**方法:**收集 2016 年 1 月至 2018 年 7 月于汕头市中心医院病理送检的宫颈炎标本 42 例、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I 标本 53 例、CIN II 标本 61 例、CIN III 标本 56 例、宫颈癌标本 48 例,每例标本同一病变区域切取 2 块样本,随机分为 A、B 组。A 组使用二甲苯制作石蜡切片 260 张;B 组使用 Van-clear 制作石蜡切片 260 张。两组切片分别进行苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色、P16 和 Ki67 蛋白免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色、人端粒酶核糖核酸组分(human telomerase RNA component, hTERC)基因荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)检测,分析两组切片 HE 染色优良率、P16 及 Ki67 蛋白、hTERC 基因表达阳性率的差异。**结果:**① A、B 组切片 HE 染色、IHC 染色均达到行业质控标准;② A、B 组切片 HE 染色优良率分别为 98.08%、99.23%,两组间优良率的差异无统计学意义($\chi^2=1.30, P=0.25$);③ IHC 染色阳性率比较:A、B 组切片相对应的不同宫颈病变组织中 P16、Ki67 蛋白阳性率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);④ hTERC 基因阳性率比较:A、B 组切片相对应的不同宫颈病变组织中 hTERC 基因表达阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$),且两组间荧光显微镜下图像无明显差异。**结论:**Van-clear 作为一种新型环保透明脱蜡剂,在不同宫颈病变组织 HE 染色、P16 及 Ki67 蛋白表达、hTERC 基因表达检测效果与传统透明脱蜡剂二甲苯相当,且绿色环保,建议在临床推广使用。

[关键词] Van-clear;二甲苯;免疫组织化学;P16 蛋白;Ki67 蛋白;hTERC;宫颈上皮内瘤变;宫颈癌

[中图分类号] R446

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2019)07-1062-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190726

Application of environmental transparent dewaxing agent Van-clear in HE staining, protein expression and gene amplification in different cervical lesions

Zhan Xiaofen, Wang Shaohong*, Wang Yuanyuan, Wu Xuan, Xiao Kunsheng

Department of Pathology, Shantou Central Hospital, Shantou 515031, China

[Abstract] **Objective:** To compare the difference of Hematoxylin eosin (HE) staining, P16 and Ki67 protein expression, as well as hTERC gene hybridization effect between environmental transparent dewaxing agent Van-clear and traditional transparent dewaxing agent xylene in different cervical lesions, and to explore the practical value of Van-clear. **Methods:** A total of 42 cervicitis specimens, 53 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I specimens, 61 CIN II specimens, 56 CIN III specimens, and 48 cervical cancer specimens were collected from Shantou Central Hospital from January 2016 to July 2018. In group A, 260 paraffin sections were made from xylene, while in group B, 260 paraffin sections were made from Van-clear. HE staining, immunohistochemistry (IHC) staining, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of hTERC gene were used to detect the difference of HE staining excellence rate, P16 and Ki67 protein expression, and hTERC gene positive rate between the two groups. **Results:** ① Sections in group A and group B for HE staining and immunohistochemistry staining all met the quality control standard of industry. ② The excellent and good rates of HE staining in group A and group B were 98.08% and 99.23%, respectively. There was no significant difference between the two groups ($\chi^2=1.30, P=0.25$). ③ Comparison of positive rate of IHC staining showed there was no significant difference in the positive rate of P16 and Ki67 protein in different cervical lesions between groups A and group B ($P > 0.05$). ④ Comparison of the positive rate of hTERC gene

[基金项目] 汕头市科技计划医疗卫生类别项目(汕府科[2017]119号-18)

*通信作者(Corresponding author), E-mail::2550462133@qq.com

amplification showed there was no significant difference between group A and group B in different cervical lesions ($P > 0.05$), and no significant difference was observed between the two groups under fluorescence microscope. **Conclusion:** Van-clear, as a new environmental transparent dewaxing agent, has the same effect as traditional transparent dewaxing agent xylene in HE staining, P16 and Ki67 protein expression, and hTERC gene detection in different cervical lesions. It is also green and environment-friendly, we recommend that it be widely used in clinic.

[Key words] Van-clear; xylene; immunohistochemistry; P16 protein; Ki67 protein; hTERC gene; cervical intraepithelial neoplasia; cervical cancer

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(07):1062-1066]

宫颈病变包括宫颈炎、宫颈上皮内瘤变、宫颈癌等,发病率高,且严重影响女性的身心健康。基于石蜡切片、苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色、免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色技术的病理诊断是诊断宫颈疾病的金标准,人端粒酶核糖核酸组分(human telomerase RNA component, hTERC)基因表达状态对宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)的转归及宫颈癌的筛查具有重要的临床意义。荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)可对基因表达情况进行定位检测。透明脱蜡是组织处理中必不可少的环节。长期以来,二甲苯被大量广泛应用于组织的透明脱蜡。然而,Wasserman等^[1]研究表明二甲苯对眼、呼吸道、中枢神经、女性月经、皮肤均有影响。因此,寻找一种绿色环保的透明脱蜡剂对临床实验室的可持续发展具有重要意义。刘柱新等^[2]使用一种需要加温的环保试剂脱蜡,进行手工快速染色,得到了稳定可靠的染色结果。然而,纵观国内外文献,环保试剂成分均受到商业化的严密保护,且多是对一种病理技术应用效果的研究,罕见公开环保试剂成分且对两种病理技术多个检测指标进行比较的报道。

本研究使用的Van-Clear是环保透明脱蜡剂,本文旨在通过观察Van-clear与二甲苯在不同宫颈病变组织HE染色、P16及Ki67的IHC染色、hTERC基因表达检测效果的差异,为Van-clear在临床推广使用找到实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

Van-clear环保透明脱蜡剂由武汉宏兹生物技术有限公司生产(生产备案号:鄂汉食药监械生产备20170066号,产品备案号:鄂汉械备20170101号。技术要求编号:0/JHS-2017-001)。

二甲苯购自汕头西陇科学股份有限公司。hTERC基因探针(北京金菩嘉医疗科技有限公司)。P16、Ki67抗体及Bench Mark XT免疫组化染色机由美国Ventana Medical Systems公司生产。SAKURA Tissue Tek Vip-TM电脑全封闭脱水机、樱花SAKURA Tissue-Tek Y0213990044全自动染色封片机由日本樱花公司生产,LEICA RM 2235石蜡切片由德国徕卡公司生产。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片制作

收集2016年1月至2018年7月于汕头市中心医院病理送检的宫颈炎标本42例、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I标本53例、CIN II标本61例、CIN III/原位癌标本56例、宫颈癌标本48例,患者年龄21.3~69.8岁,平均(40.6±6.2)岁。每例标本同一病变区域切取2块样本,随机分为A、B组。A组采用传统透明脱蜡剂二甲苯透明脱蜡,制作石蜡切片260张;B组采用环保透明脱蜡剂Van-clear透明脱蜡,制作石蜡切片260张。病理结果均由两位病理医师确诊,诊断标准参考2014年WHO分类执行^[3]。

1.2.2 HE染色及免疫组织化学染色

HE染色实验步骤及所用试剂参照中华医学会临床技术操作规范进行操作^[4]。P16、Ki67的IHC染色步骤及时间参照生产厂家推荐的程序^[5]进行,在Bench Mark XT免疫组化染色机中对所有的切片均设置了同一实验条件,并分别设置阴性和阳性对照。

染色结果判定参阅文献^[8]:P16:细胞核、细胞质出现棕黄色为阳性,阳性的细胞≤10%为(-),11%~30%为(+),31%~50%为(2+),>50%为(3+)。Ki-67:细胞核出现棕黄色且在基底层以上为阳性,仅出现在基底层判读为阴性;阳性细胞≤25%为(+),26%~50%为(2+),>50%为(3+)。本研究中将P16、Ki-67

(+)以上的病例定义为阳性病例。

1.2.3 FISH法检测hTERT基因

将切片放入72℃的变性液中浸泡5 min,将切片依次置入70%、85%、100%酒精中各3 min进行梯度脱水,切片自然干燥,置于45~50℃烤片机上预热2~5 min后与探针杂交,将10 μL变性后的探针混合物滴于玻片杂交区域,将玻片置于预热的湿盒中,42℃保温箱中过夜杂交。移去盖玻片,立即将玻片置于盛有50%甲酰胺溶液中,晃动玻片1~3 s,5~10 min后取出玻片。将玻片室温浸泡在70%酒精中,3 min后取出玻片。暗处自然干燥玻片,将15 μL 4,6-二脒基-2-苯基吲哚复染剂滴加于杂交区域位置,立即盖上盖玻片,暗处放置10~20 min后,在荧光显微镜下选用合适的滤光片组观察玻片。每个细胞内红色和绿色信号数量均多于2个为hTERT基因阳性细胞。hTERT基因阳性率为hTERT基因阳性例数占同期进行测试总例数的百分率。

1.2.4 比较指标

HE染色比较指标参照中国常规病理切片质控中心推荐的质控标准^[6]:切片完整度、背景洁净度、厚薄一致度、皱褶和刀痕情况、核浆鲜艳度、红蓝适度、透明洁净度及HE染色优良率。切片HE染色优良率=(优良片数+优质片数)/同期进行HE染色的

总例数×100%。免疫组织化学染色比较指标参照Kanthiya等^[7]推荐的研究标准执行:背景干净度、特异性染色度、阳性信号定位精准度、染色分布均匀度,染色强弱程度,是否出现人为造成的非特异性染色及P16及Ki67蛋白表达阳性率(P16、Ki-67蛋白阳性例数占同期进行测试总例数的比例)。hTERT基因扩增情况主要比较荧光显微镜下背景、细胞轮廓、探针定位、荧光信号的可见性及hTERT基因阳性率。

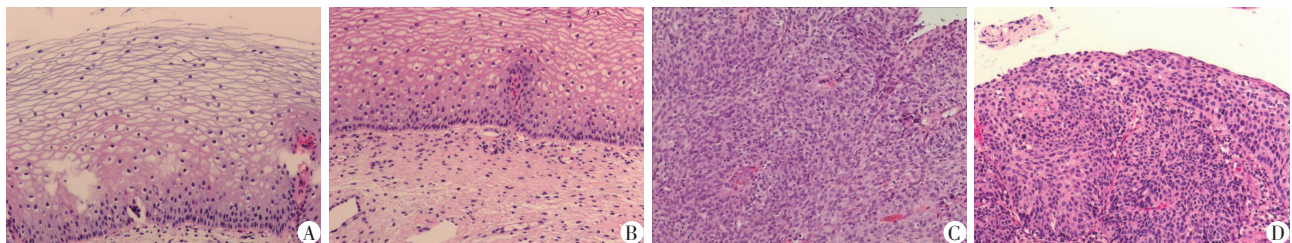
1.3 统计学方法

采用SPSS22.0软件包完成数据分析。两组切片HE染色优良率、P16和Ki-67蛋白阳性率、hTERT基因阳性率的比较采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组切片HE染色效果比较

两组切片不同宫颈病变的显微镜下观:切片完整、背景洁净、厚薄一致、核浆鲜艳,红蓝相称(图1)。其中A组优、良、中、差片数分别为206、49、4、1片。B组分别为212、46、2、0片。A、B组切片HE染色优良率分别为98.08%、99.23%,差异无统计学意义($\chi^2=1.30, P=0.25$)。



A:A组宫颈炎标本HE染色图像;B:B组宫颈炎标本HE染色图像;C:A组宫颈癌标本HE染色图像;D:B组宫颈癌标本HE染色图像。

图1 不同宫颈病变的A、B组切片HE染色图像(×100)

Figure 1 HE staining images of groups A and B with different cervical lesions(×100)

2.2 两组切片P16和Ki67蛋白IHC染色效果比较

两组切片不同宫颈病变的P16和Ki67蛋白IHC染色显微镜下观:背景干净、特异性染色、P16阳性信号定位于细胞核和(或)细胞浆、Ki67阳性信号定位于基底层以上的胞核。P16、Ki67阳性细胞的染色分布不均,片状或点状散在分布,染色强弱不等,未出现人为造成的非特异性染色(图2)。实验所设置的阴性和阳性对照染色结果正确、符合预期目标。

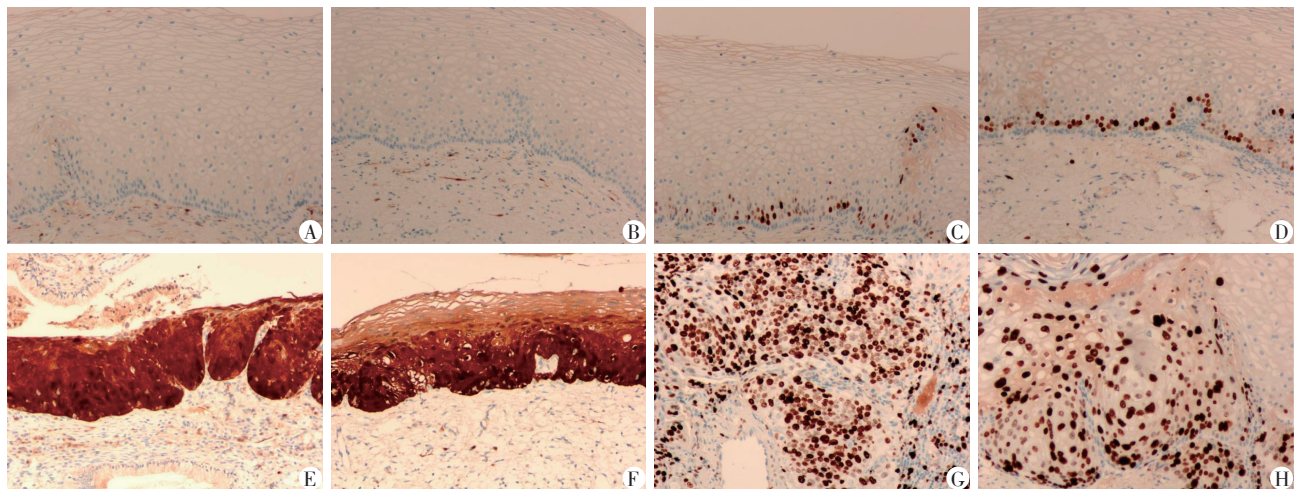
两组切片P16、Ki67蛋白阳性率见表1,两组切片相对应的不同宫颈病变组织中P16、Ki67蛋白阳性率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 两组切片hTERT基因扩增效果比较

荧光显微镜下可见两组切片hTERT基因扩增的背景洁净、细胞整体轮廓完整、探针定位精确、耀眼的红和绿色荧光信号。细胞核呈深蓝色荧光,TERC探针呈橘红色荧光;CSP3呈亮绿色荧光(图3)。两组切片相对应的不同宫颈病变组织中hTERT基因阳性率差异均无统计学意义($P > 0.05$,表2)。

3 讨论

宫颈癌对女性身心健康造成了极大的威胁。作为宫颈癌前病变的CIN是预防宫颈癌的重要阶



A: A组宫颈炎标本P16蛋白IHC染色阴性(-); B: B组宫颈炎标本P16蛋白IHC染色阴性(-); C: A组宫颈炎标本Ki67蛋白IHC染色阳性(1+); D: B组宫颈炎标本Ki67蛋白IHC染色阳性(1+); E: A组宫颈鳞癌标本P16蛋白IHC染色阳性(3+); F: B组宫颈鳞癌标本P16蛋白IHC染色阳性(3+); G: A组宫颈鳞癌标本Ki67蛋白IHC染色阳性(3+); H: B组宫颈鳞癌标本Ki67蛋白IHC染色阳性(3+)。

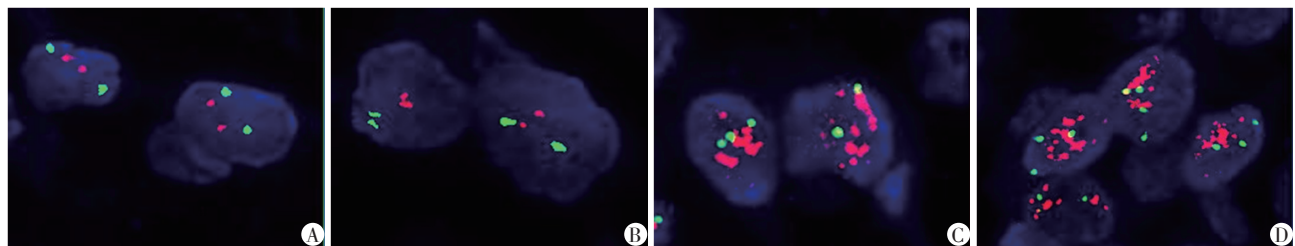
图2 不同宫颈病变的A、B组切片P16和Ki67蛋白免疫组化染色图像(x100)

Figure 2 Immunohistochemical staining images of P16 and Ki67 proteins in group A and B of different cervical lesions (x100)

表1 两组切片P16、Ki67蛋白阳性率比较

Table 1 Comparison of positive rates of P16 and Ki67 proteins in group A and B with different cervical lesions [n(%)]

疾病	A组				B组			
	P16	Ki67	χ^2 值	P值	P16	Ki67	χ^2 值	P值
宫颈炎(n=42)	3(7.14)	3(7.14)	0.00	1.00	4(9.52)	5(11.90)	0.12	0.72
CIN I (n=53)	21(39.62)	20(37.74)	0.04	0.84	25(47.17)	24(45.28)	0.38	0.85
CIN II (n=61)	29(47.54)	31(50.82)	0.13	0.72	28(45.90)	29(47.54)	0.03	0.86
CIN III (n=56)	45(80.36)	46(82.14)	0.06	0.81	48(85.71)	47(83.93)	0.07	0.79
宫颈癌(n=48)	46(95.83)	45(93.75)	0.21	0.65	47(97.92)	48(100.00)	1.01	0.32



A: A组宫颈炎标本hTERT基因扩增阴性图像; B: B组宫颈炎标本hTERT基因扩增阴性图像; C: A组宫颈鳞癌标本hTERT基因扩增阳性图像; D: B组宫颈鳞癌标本hTERT基因扩增阳性图像。

图3 不同宫颈病变的A、B组切片hTERT基因检测结果(x1 000)

Figure 3 Detection of hTERT gene in group A and B sections of different cervical lesions (x1 000)

段,是降低宫颈癌发生率及病死率的关键所在^[9]。组织学诊断是确诊不同宫颈病变的最终标准。然而,在日常宫颈疾病肿瘤病理诊断中,5%~10%的病例单靠HE染色难以作出明确的形态学诊断。2015年Besthesda指南指出P16、Ki67免疫组织化学染色能有助于CIN及宫颈癌的诊断。

选择恰当的透明脱蜡剂是病理组织切片处理中非常重要的环节,其透明脱蜡质量既会影响到组

织的HE染色,也能影响到后续的其他病理学技术,如IHC、FISH等。传统意义上,二甲苯作为经典的透明脱蜡剂一直广泛应用于病理实验中。但是,其毒性作用也是明显的。丁国娟等^[10]研究报道:职业性二甲苯中毒,主要引起神经系统为临床症状的疾病,包括记忆力衰退、幻觉、肢体麻木等。因此,寻找一种绿色环保的透明脱蜡剂对于病理实验工作的开展具有重要意义。

表2 不同宫颈病变的A、B组切片hTERC基因阳性率比较
Table 2 Comparison of hTERC gene positive rates in group A and B sections of different cervical lesions [n(%)]

疾病	A组	B组	χ^2 值	P值
宫颈炎(n=42)	4(9.52)	3(7.14)	0.16	0.69
CIN I (n=53)	8(15.09)	9(16.98)	0.07	0.79
CIN II (n=39)	39(63.93)	39(63.93)	0.00	1.00
CIN III (n=47)	47(83.93)	47(83.93)	0.00	1.00
宫颈癌(n=48)	48(100.00)	48(100.00)	0.00	1.00

本研究选择了临床上常见而多发的困扰女性身心健康的宫颈系列病变,分别用传统试剂与环保试剂制作石蜡切片,结合宫颈疾病诊断常用的HE染色,P16、Ki67免疫组织化学染色及hTERC基因扩增指标进行探讨。

从我们重点考查的指标分析:两组切片分别使用二甲苯和Van-clear作为透明脱蜡剂制作石蜡切片,形态学上符合中国常规病理切片质控中心推荐的HE染色质控标准,说明两种不同的透明脱蜡剂均在HE染色中表现出了优异的性能。且本研究的A、B组切片无论从显微镜下观抑或是HE染色优良率均达到了三甲医院的要求(HE染色优良率>95%),A、B组HE染色的优良率差异无统计学意义,因而建议在临床推广应用。

为进一步验证Van-clear环保透明脱蜡剂在其他病理学技术中的性能,本研究还分析了两组切片p16、Ki67的IHC染色情况,结果显示,两组切片形态学上均达到了Kanthiya等^[7]推荐的研究标准,且两组切片相对应的不同宫颈病变组织中P16、Ki67蛋白阳性率差异均无统计学意义。Van-clear环保透明脱蜡剂在IHC技术中同样表现出了卓越的性能,值得在临床推广使用。陈玮等^[11]报道P63和Ki67在正常宫颈黏膜上皮、CIN I、CIN II、CIN III/原位癌、浸润癌表达的阳性率分别为6.7%、40.0%、44.0%、76.0%、97.8%和6.7%、35.0%、44.0%、80.0%、100%,本研究结果与之基本相符。

冯雨苗等^[12]研究认为:hTERC基因在宫颈CIN向宫颈癌转化中起到了重要的作用。因此,hTERC基因表达状态对于宫颈癌的筛查具有强烈的警示作用。本文分别从不同宫颈病变的A、B组切片hTERC基因扩增显微镜下及扩增阳性率比较了Van-clear环保透明脱蜡剂和二甲苯的制片效果。结合实验数据,我们的研究结论认为:Van-clear环保透明脱蜡剂替代二甲苯后,并不影响hTERC基因

扩增效果,说明环保透明脱蜡剂在hTERC基因扩增效果中并不差于传统试剂二甲苯。

本研究结合病理学自身的形态学特点对妇产科医师关注的P16、Ki67及hTERC基因表达情况进行观察,为病理实践工作中Van-clear环保透明脱蜡剂替代二甲苯的可行性找到了实验数据。但是由于研究时限和标本量的缘由,本研究结论存在一定的局限性。然而在提倡绿色、环保意识的当今时代,环保试剂的使用是大势所趋,后续的研究工作有待病理医师与临床医师密切配合,以更好地促进学科的发展、服务于患者。

[参考文献]

- [1] Wasserman EJ, Reilly SM, Goel R, et al. Comparison of biomarkers of tobacco exposure between premium and discount brand cigarette smokers in the NHANES 2011-2012 special sample [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27(5):601-609
- [2] 刘柱新,钟学军,梁英杰,等. 环保脱蜡剂在快速HE染色技术中的应用[J]. *诊断病理学杂志*, 2017, 24(9):717-718
- [3] 卢朝辉,陈杰. WHO女性生殖器官肿瘤学分类(第4版)解读[J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(10):649-650
- [4] 中华医学会. 临床技术操作规范病理学分册[M]. 北京:人民军医出版社, 2012:33
- [5] Xing Y, Wang C, Wu J. Expression of geminin, p16 and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(26):e7302
- [6] 王泊云,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:134
- [7] Kanthiya K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, et al. Expression of the p16 and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions and cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(7):3201-3206
- [8] 郭艳敏,周梅香. p16、Ki-67在宫颈上皮内病变中的表达及意义[J]. *诊断病理学杂志*, 2017, 24(2):105-107
- [9] 许驰,何玉,李旭. 细胞学检测与HPV检测在宫颈疾病筛查中的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(11):1593-1597
- [10] 丁国娟,任疆,俞士梅. 二甲苯中毒性脑病九例[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2014, 32(9):705
- [11] 陈玮,赵涌. P63和Ki67在CIN及宫颈癌组织中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医院*, 2017, 25(2):273-275
- [12] 冯雨苗,孙澜,刘标,等. 宫颈尖锐湿疣中hTERC基因扩增和CD105表达的意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(8):979-982

[收稿日期] 2018-09-05