

一种简便易行的组织芯片制作技术

秦广琪, 魏 巧, 顾燕子, 向春平, 蔡 旭, 周晓燕, 孙孟红

复旦大学附属肿瘤医院病理科组织库, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[关键词] 组织芯片; 肿瘤; 制作技术

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.09.007

中图分类号: R73-3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)09-0683-04

A simple and feasible method of tissue microarray QIN Guangqi, WEI Qiao, GU Yanzi, XIANG Chunping, CAI Xu, ZHOU Xiaoyan, SUN Menghong (Tissue Bank of the Department of Pathology, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: SUN Menghong E-mail: sunmh@shca.org.cn

[Key words] Tissue microarray; Tumor; Technology

组织芯片又称组织微阵列(tissue microarray)是将数十至数百个组织芯点按预先设计的阵列图排列在固相载体上形成矩阵的微缩组织块。1998年Kononen等^[1]首次提出组织芯片的概念并证实了组织芯片的实用价值,此后组织芯片技术得到了迅速发展。其最大潜在作用是将基因、蛋白水平的研究与组织形态学相结合,应用同一实验指标,同时将快速研究大量不同组织样本(高通量、多样本)的设想成为现实,减少了实验误差,几十倍、上百倍地提高组织形态学研究的效率,节约实验材料和试剂,同时使实验结果有更可靠的可比性,由于其巨大的应用潜力和实用价值,已经得到全球科学家的广泛关注。虽然已经有不少文章介绍组织芯片技术及其应用,但制作过程相对比较复杂,本文采用的是UNITMA公司手持式芯片仪,操作简便,价格低廉,是基层单位都能借鉴的技术方法。但在技术操作方面,有些技巧需要注意,本研究旨在介绍一种简便易行的组织芯片制作技术及关键环节的注意事项。

1 材料和方法

1.1 材料

选取复旦大学附属肿瘤医院病理科2003年—2011年间保存的淋巴瘤、食道癌、宫颈癌、乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌、肺癌、前列腺癌、尿路上皮癌、甲状腺癌组织及正常组织存档蜡块及相应的HE切片。

1.2 耗材与仪器

优质切片石蜡,熔点58℃购自德国Leica公司;蜂蜡,熔点为65~75℃,购自上海华灵康复器械厂;SuperFrost Plus显微防脱玻片购自德国MENZEL-GLASER公司;组织芯片仪Quick-Ray购自韩国UNITMA公司;组织切片机(2145型)购自德国Leica公司。

1.3 组织芯片制作步骤

1.3.1 供体蜡块选取定位

由病理医师对所有蜡块复片,镜下选取有代表性的区域,用记号笔在HE切片上标记该目标区域,然后通过标记好的切片与原蜡块进行仔细比对,将相应目标点点在供体蜡块上。一般肿瘤区域取3个点,正常区域取1个点,可供镜下对比观察。

1.3.2 受体蜡块

预铸的受体蜡块($\Phi 1$ mm、 $\Phi 2$ mm、 $\Phi 3$ mm和 $\Phi 5$ mm)购自UNITMA公司。本研究均以 $\Phi 1$ mm(12×10位点)的受体蜡块为例进行实验,供体蜡块组织厚度要达到2 mm。

1.3.3 组织微阵列的设计

以食道癌芯片蜡块陈列设计为例,一个完整的1 mm孔径芯片共29例样本蜡块(其中包括肿瘤蜡块及相应的正常蜡块)。根据预先的标记每个病例选取4个位点,肿瘤组织蜡块上取3个位点,正常组织蜡块上取1个位点。癌及正常组织间隔分布,便于阅片时对照。最后4个位点空出,以便于区分阵列的起尾,便于镜下定位观察。组织芯片的深度为

2.0~3.0 mm, 是实际蜡块组织的厚度, 一般不会有钻取蜡块比受体蜡块高的现象。

1.3.4 芯片蜡块的制作

芯片蜡块的制作过程: ① 预热: 先将供体蜡块于37℃烘箱中预热30 min, 目的是防止钻头取芯时使石蜡块断裂, 尤其是质地比较硬的组织, 如宫颈组织等。② 点阵: 按照组织阵列设计图把相应的蜡块按顺序排好, 用UNITMA公司手持式芯片仪配置的直径1 mm的钻头按阵列图分别钻取出预先标记的组织位点, 然后按照顺序分别注入到受体蜡块的相应孔位, 压实, 注意要严格按照阵列图对号入座, 以免对后续工作造成不可挽回的后果, 直至依次将所有样本植入受体蜡块中。③ 抹平: 将植入芯柱的蜡块表面抹平, 保证组织芯柱在同一平面内。组织芯柱若不在同一个面上, 往往切不出完整的点数, 不能将所有位点完整用于研究, 造成巨大损失。④ 熔蜡: 将组织芯片蜡块抹平面朝下放入熔蜡框内, 放入恒温箱内, 保证连续30 min, 50℃条件下熔蜡。当蜡块达到要求的溶解状态时取包埋筐进行包埋, 包埋的液体石蜡尽量和受体蜡块的熔点接近, 包埋前用手轻轻挤压受体蜡块把液体蜡内的气泡挤出保证芯柱和受体蜡能紧密结合在一起; 经过步骤③和④, 组织芯可自然落在同一个平面上, 直至包埋, 一直维持朝下的位置, 不会造成高低不平的现象。如果是供体组织块本身高度不一, 应在选取组织块时不用那些过于薄的组织, 或可以选择两次重复取样, 在一个芯的位置放置两个薄芯, 叠加后和弥补原蜡块太薄的不足, 技术上称为stacking(堆垛)。⑤ 制作完成及蜡块贮存: 将包埋处理好的蜡块放入速冻台让其冷却, 待蜡块完全冷后将其从熔蜡筐内剥出修去四周多余的蜡备用。

1.3.5 组织芯片的切片制作

组织芯片的切片制作步骤: ① 切片前先将组织芯片蜡块置于4℃冰箱中预冷4 h, 保证每一个组织芯柱的硬度相同, 有利于切片的质量。取出后固定于切片机上,

耐心调试切面与刀片的角度, 减少修片对组织芯片造成的损失, 然后作4 μm厚连续切片, 先凉水漂片, 后45℃温水展片, 防脱玻片捞片, 待自然风干后于-20℃保存备用。② 切片过程应注意不同组织的芯片切片要求不同, 如淋巴瘤组织的肿瘤细胞小且比较丰富, 切片要求要薄, 尽量切2~3 μm厚, 此时注意防止切片形成皱褶。宫颈及乳腺组织的细胞纤维组织较多, 经脱水等处理后质地变硬, 切片时对刀片的磨损较大, 容易出现刀痕, 应仔细观察, 及时更换刀片, 保证切片的质量。③ 不同组织类型的肿瘤, 质地不同, 硬度不同, 要求不同, 但又要在同一平面切出完整、美观且优质的切片。因此, 多种肿瘤的芯片制片难度较大, 所以需要技术人员能熟练掌握芯片制作技巧, 且要极具细心和耐心地做好每个环节, 才能保证组织芯片上的每个位点都达到要求。

1.3.6 组织芯片的染色

以食道癌组织和肠癌组织芯片为例, 取相对完整组织芯片切片, 按常规方法进行: ① HE染色; ② Six1、Six4蛋白免疫组织化学染色; ③ CK20和SMA蛋白免疫组织化学染色; ④ 实验步骤更为复杂的miRNA原位杂交检测, 包括作为阳性对照的小rRNA以及miRNA185。

2 结 果

2.1 芯片制作结果

制备完成的109个芯片蜡块。芯片中的组织芯点为所需要的组织形态学区域。所有受体蜡块均未见裂开, 组织位点排列整齐, 位点无丢失。组织芯柱与受体蜡块结合紧密, 熔蜡过程中均未见明显气泡产生。每个蜡块均能切出120张完整的芯片切片, 其余因为组织芯柱的组织薄厚不一, 一般不能保证芯片上所有组织位点的完整。切好的组织芯片及芯片蜡块均放在-20℃冰箱保存。

2.2 芯片HE染色结果

以食道癌组织芯片为例, 制备完毕抽取一套完整切片进行HE。HE染色个别位点有脱片现象, 其他位点组织形态及细胞结构均清晰可辨(图1)。

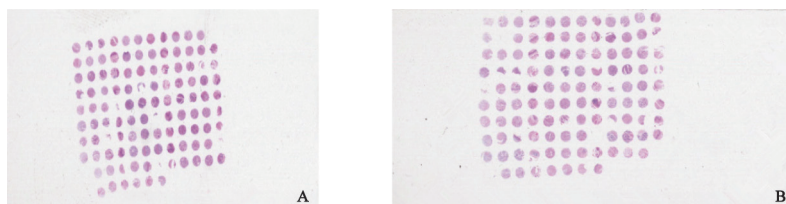


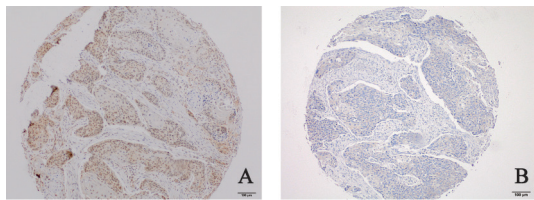
图1 食道癌组织芯片HE染色结果

Fig. 1 HE staining of TMA of esophageal cancer

A: TMA 7, from Fudan University Shanghai Cancer Center; B: TMA 9, from Fudan University Shanghai Cancer Center

2.3 芯片免疫组织化学染色及miRNA原位杂交结果

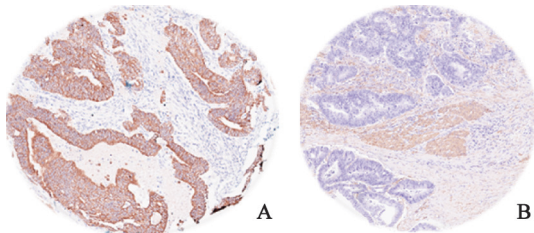
食管癌中Six1、Six4蛋白免疫组织化学染色均特异性表达(图2), 肠癌组织中CK20和被侵犯的肠壁平滑肌中SMA表达、CK20只在上皮性癌组织中表达和SMA只在平滑肌组织中表达也均有很好的特异性(图3)。本研究利用步骤更为复杂的原位杂交技术分析miRNA在食管鳞癌组织芯片肿瘤细胞的细胞质中的表达(阳性对照小rRNA-5S和miR-185)(图4)。除个别位点消化过程中脱片, 其他位点完好无损, 且某单个位点脱落不影响实验的进行。以上结果证明, 我们的组织芯片制作技术的成熟, 已达到技术标准。



(×100)

图2 食管癌中Six1(A)和Six4(B)免疫组织化学阳性染色结果

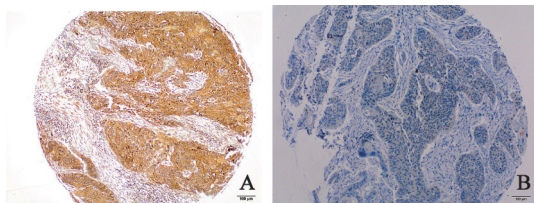
Fig. 2 Immunohistochemistry staining of Six1 (A) and Six 4 with positive expression



(×100)

图3 结肠癌组织中CK20(A)和SMA(B)免疫组织化学染色结果

Fig. 3 Immunohistochemistry staining of CK20 (A) and SMA (B) in TMA for colorectal cancer



(×100)

图4 食管鳞癌组织中rRNA-5S(A)和miR-185原位杂交阳性结果(B)

Fig. 4 Positive expression of rRNA-5S (A) and miR-185 (B) in the *in situ* hybridization staining

3 讨论

组织芯片制作是一种点取石蜡包埋组织中具有代表性的组织位点按一定的规律重新排列的技术, 组成组织微阵列, 可以将许多样本集中在一张切片上进行免疫组化、原位杂交和原位PCR等实验。组织芯片与传统石蜡切片相比其在实验条件的均一性, 对实验结果的可靠性、科学性、可比性几个方面都能够体现其优越性^[2,4]。

鉴于组织芯片在实验研究中的优越性, 为了更好地服务科研, 我院组织库开展组织芯片技术。从本研究结果可见, 我们制作组织芯片的技术成熟, 制作的组织芯片质量良好, 可用于科学研究。由于制作组织芯片涉及较多的蜡块和切片, 制作步骤较多, 因此, 其操作过程要求细致精准, 否则组织芯片的完整性就难以保证^[5-6]。采用UNITMA公司手持式芯片仪制作的组织芯片可以用于多种用途的研究分析, 包括免疫组织化学染色、原位杂交和荧光原位杂交^[7-9]。通过组织芯片制作实践, 我们总结以下几点。① 目标组织位点的选取: 蜡块经过切片、封蜡、存放等过程, 可导致切片和蜡块上的组织形状往往不能很好对应, 使得标记好的组织位点从切片到蜡块的转换过程中产生位置偏离, 从而取到无效的组织芯。因此, 在组织位点的选取过程中, 除了考虑组织形态的典型性, 还要选择目标组织尽量丰富的区域。细致的准备工作非常重要, 可以使整个制作事半功倍。② 芯片蜡块的制作: 由于我们使用UNITMA公司预铸的受体蜡块, 使得操作步骤和以往手工芯片技术相比, 步骤简化, 操作简单, 减少了出错的机会。为了使我们的工作更有效, 特总结几个小窍门: 钻头在使用前, 可以用二甲苯浸泡除去残留的蜡, 充分干燥后备用; 严格按照组织阵列设计图操作很重要, 注意不要错点、漏点; 操作过程要严格按照预热、点阵、抹平、熔蜡及储存的步骤进行。其制作过程相辅相成需要技术员细心、耐心。③ 组织芯片的切片: 切片前的蜡块切面校对过程要求严格, 操作不易把握。前期角度校对好, 可以保证组织薄的位点不至于在修蜡过程中丢失过多。接下来的制片过程, 由于我们的受体蜡块的特殊成分及制作过程的特异性, 使我们的整个切片过程简便易于操作, 漂片时不会出现熔蜡、漏点等普通芯片存在的问题。但是组织芯片的每一张切片都是由116个直径为1 mm的组织点组成, 要保证最终切出一张优质的切片, 就要

求每个点都要切得完整、美观, 没有皱褶、刀痕等问题存在。这就对操作人员的技术水平有相当高的要求。

④ 组织芯片的染色: 组织芯片在染色过程中容易发生由于各种试剂的涂布不均匀和冲洗后残留从而影响染色效果的情况, 其原因在于芯片各组织位点之间存在空隙, 整张芯片并未形成连续的表面, 不利于液体的流动和扩散。组织芯片免疫组织化学实验中, 将各步骤间的PBS冲洗步骤由5 min/次×3次改为5 min/次×5次后, 背景着色明显减轻。以上4点是我们制作芯片实践中总结的经验, 希望通过此文能对同行制作芯片有一定的帮助。

组织芯片是一项经济高效的实用技术。在制备过程中操作人员必须把握好各项操作细节, 胆大心细, 保证所制备芯片的质量。

[参 考 文 献]

- [1] KONONEN J, BUBENDORF L, KALLIONIEMI A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. *Nat Med*, 1998, 4(7): 844-847.
- [2] FEDOR H L, DE MARZO A M. Practical methods for tissue microarray construction [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 103: 89-101.
- [3] AVNINDER S, YLAYA K, HEWITT S M. Tissue microarray: a simple technology that has revolutionized research in pathology [J]. *J Postgrad Med*, 2008, 54(2):158-162.
- [4] 刘银华, 张修稳, 卢林明, 等. 改良组织芯片技术在胃癌研究中的应用及体会 [J]. *皖南医学院学报*, 2012, 31(2): 112-115.
- [5] 霍红梅, 翟德忠, 朱 卿, 等. 神经胶质瘤组织芯片制作中影响因素的分析 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2008, 24(4): 492-493.
- [6] 孙璐瑛, 巨宏亚, 陈 妮, 等. 组织芯片的简易制作方法 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2013, 29(6): 688-689.
- [7] 魏 巧, 郁玮玮, 赵快乐, 等. Six1和Six4在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其与预后的关系 [J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(7): 446-450.
- [8] GRAHAM A D, FARATIAN D, RAE F, et al. Tissue microarray technology in the routine assessment of HER-2 status in invasive breast cancer: a prospective study of the use of immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Histopathology*, 2008, 52(7): 847-855.
- [9] GABER R, WATERMANN I, KUGLER C, et al. Correlation of EGFR expression, gene copy number and clinicopathological status in NSCLC [J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9(1): 165.

(收稿日期: 2014-10-23 修回日期: 2015-03-22)

2015 AACR “癌症研究新视野” 大会将于上海举行

继首届“癌症研究新视野”大会在2014年成功举办后, 美国癌症研究学会(AACR)又将于2015年11月12—15日在上海举办第二届“癌症研究新视野”大会。本次大会将围绕“如何利用癌症研究成果造福患者”这一主题, 重点介绍癌症研究各个重要领域最新和最振奋人心的研究成果, 为来自全世界各地的研究人员提供宝贵的交流机会, 加强学术科研合作。

此次会议将推动癌症科学和医学的发展, 搭建富有活力的平台, 帮助在国际层面上建立全新的合作关系。4天的会议将吸引来自多个学科的研究人员参与和互动, 学科范围将覆盖整个癌症研究领域——从基础研究到转化医学, 再到临床医学。大会将邀请数十名国内外专家发表主题演讲, 充分体现高参与性、高互动性及多学科的特点。会上, 我们还将展示第106届AACR全球年会上的精彩内容(2015年4月18—22日, 美国宾夕法尼亚州费城)。精彩不容错过!

届时, 将有来自全球各地的1 200多位专家学者共聚于此, 其研究领域包括了实验性治疗、分子靶向治疗、化学、分子生物学、遗传与表观遗传学、免疫学与免疫疗法、肿瘤生物学以及临床与转化研究等。我们期待您的加入!

会议时间: 2015年11月12—15日

会议地点: 上海宝华万豪酒店

会议网站: <http://www.aacr.com.cn>

论文投稿截止日期: 2015年8月10日

注册参会咨询热线: registration@aacr.com.cn, 021-23123581