



· 论 著 ·

肾活检免疫组织化学法与免疫荧光直接法染色结果对比分析

张莉鑫 连 平 (湖南省长沙泰和医院检验科 410000)

摘要:目的 探讨免疫荧光直接法染色和免疫组织化学法运用在肾活检中的临床效果。方法 选择 2015 年 10 月-2016 年 10 月期间我院收治的 87 例肾活检患者为研究对象, 分别行石蜡切片免疫组化和冷冻切片免疫荧光检查, 并且选择荧光免疫检测结果为对照组, 对免疫组化的染色情况进行观察。结果 免疫荧光冷冻切片组和免疫组化组的 C4c、C3c、C1q、IgM、IgG 以及 IgA 染色结果、表达部位、表达强度均一致, 组间比较无差异 ($P>0.05$)。结论 在肾活检中, 石蜡切片免疫组化检查可以作为免疫荧光冷冻切片结果不理想的一种补救方法。

关键词: 免疫组织化学 免疫荧光 石蜡切片 冷冻切片 肾活检

中图分类号: R692 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2018) 09-060-02

肾小球肾炎是比较常见的一种疾病, 以高血压、蛋白尿、水肿以及血尿等症状为主要表现, 其发病机制复杂, 可能与免疫、感染、遗传以及代谢等诸多因素有关^[1]。当前在诊断肾小球肾炎时, 检测异常免疫复合物沉积是比较有效的一种方法, 并且常用的冷冻切片免疫荧光法具有操作简单、能够保存抗原等优点, 但是在肾活检的过程中, 有诸多因素影响检测结果。因此, 本文对肾活检中运用免疫荧光直接法染色和免疫组织化学法的临床价值进行了探讨, 如下报道。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择我院 2015 年 10 月-2016 年 10 月期间收治的行肾活检患者 87 例为研究对象, 年龄 30—68 岁, 平均 (48.6 ± 12.5) 岁, 其中 37 例为女性、50 例为男性, 疾病类型: 膜性肾病 25 例、IgA 肾病 50 例、狼疮性肾炎 12 例。

1.2 方法

1.2.1 仪器和试剂: 选择 ZEISS 荧光显微镜、Nikon 80I 光学显微镜、Leica ASP300S 自动脱水机、Leica RM2245 石蜡切片机以及 Leica 恒温冷冻切片机。同时, 选择上海长岛生物科技有限公司提供的 Fn、C4c、C3c、C1q、IgM、IgG 以及 IgA; 运用 DAB 显色液、二抗、PBA 缓冲液、封闭液、修复液、PT-Link、OCT 包埋剂 (DAKO, 丹麦); 伊红、苏木精等。

1.2.2 分配标本: 在解剖显微镜或放大镜下观察新鲜的肾穿刺标本, 确定是否存在肾小球, 然后将含有肾小球的标本划分为 3 份, 其中常规石蜡切片 1 份、电镜检查 1 份以及冷冻切片 1 份。

1.2.3 石蜡切片免疫组化法: 常规切片脱蜡至水, 在 PT-Link 96°C 中放入切片进行 18min 修复, 冷却至室温后运用 PBS 进行 3 次冲洗, 在 37°C 下运用即用型胰酶进行 10min 消化, 运用 PBS 进行 3 次冲洗后, 在玻片上滴 100 μ l 封闭液, 在 37°C 湿盒内进行 10min 孵育, 运用 PBS 进行 3 次冲洗, 将稀释后的一抗工作液 IgM、IgA、C1q、IgG、Fn、C3c 滴入, 再次滴入新鲜配置的 DAB 显色液 100 μ l 进行 5min 作用, 水洗 2min 后, 在苏木精中进行 2min 复染, 运用流水进行冲洗, 在二甲苯中浸泡, 运用中性树脂进行封片, 并在光学显微镜下观察。

1.2.4 免疫荧光直接法染色: 对肾穿刺标本一条中的一半组织进行切取, 放入冷冻机中, 待标本冷冻后, 以 3 μ m 的厚度在每例标本中切取 10—14 张, 采用免疫荧光直接法染色, 操作如下: ①在 PBS 液中放入冷冻切片, 进行 3 次洗涤, 然后运用记号笔在切片背面划一个小圈, 有助于镜检时确定组织位置; ②将组织四周的 PBS 擦干净, 将

兔抗人荧光素抗体 IgM、IgA、C1q、IgG、Fn、C3c 滴入; ③在湿盒内放置切片, 在 37°C 湿箱中进行 30min 的避光孵育; ④运用 PBS 液进行 3 次洗涤, 将 PBS 去掉后, 用缓冲甘油进行封片, 并且在荧光显微镜下直接观察。

1.3 判定结果

1.3.1 免疫组化: 在光学显微镜下放入石蜡切片, 可见 DAB 显色液在肾小球的间质细胞内、间质血管壁、肾小囊基底膜、系膜区以及毛细血管壁处着色, 其中棕色为阳性^[2]。

1.3.2 免疫荧光: 运用荧光显微镜对每张切片的 C4c、C3c、C1q、IgM、IgG 以及 IgA 荧光抗体沉积部位进行观察, 并且将视野内荧光的强度作为基本依据, 进行半定量评分, 通常强度可以分为 6 级: ①阴性 (-)。高倍镜下不见荧光; ② (+/-) 高倍镜下荧光隐约可见; ③ (+) 低倍镜下荧光隐约可见, 高倍镜下可见荧光; ④ (++)。高倍镜下荧光清晰可见, 且低倍镜下可见; ⑤ (+++)。低倍镜下荧光清晰可见, 且高倍镜下耀眼; ⑥ (++++)。高倍镜下荧光刺眼, 且低倍镜下耀眼^[3]。

1.4 统计学分析

运用 SPSS12.5 软件分析数据, 运用非参数秩和检验等级资料, 以 $P<0.05$ 表示有差异。

2 结果

25 例膜性肾小球肾炎, 免疫光镜下可见细颗粒状顺着毛细血管分布, IgG 表现为 (++) 阳性, 与免疫组化相比, 阳性分布和强度一致, 如图 1。12 例狼疮性肾炎, 经免疫荧光显示, 可见 C1q、IgA、C4c 以及 IgG 等均表现为 (++) 至 (+++) 的阳性染色, 并且分布于毛细血管壁和系膜, 见图 2。50 例 IgA 肾病, 光镜下可见主要为系膜基质和系膜细胞增生, 免疫荧光镜下可见 IgA 为 (++) 至 (+++) 阳性, 沉积在系膜区表现为团块状或颗粒状, 并且 C3c 和 IgG 表现为 (+) 至 (++) 阳性, 见图 3。

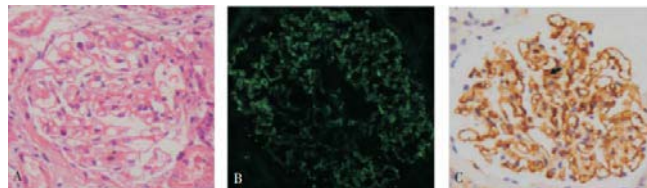


图 1 膜性肾小球肾炎 (A: 光镜下基底膜增厚明显 (HE, $\times 400$); B: 免疫荧光显示, IgG 顺着毛细血管壁 +++ 染色分布 ($\times 1000$); C: 免疫组化 IgG 可见毛细血管壁阳性染色 ($\times 400$))

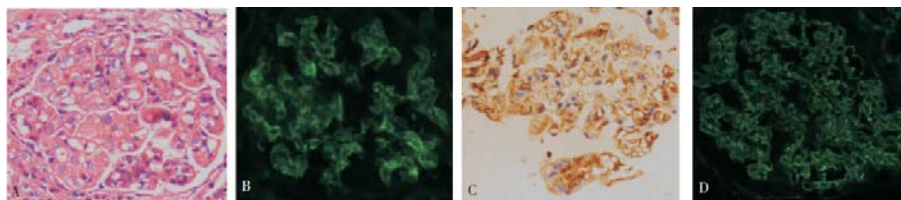


图 2 狼疮性肾炎 (A: 光镜下可见系膜细胞增生合并系膜基质增多 (HE, $\times 400$); B: 免疫荧光显示 IgA ($\times 1000$); C: 相对应的免疫组化 IgA ($\times 400$); D: IgG ($\times 1000$))

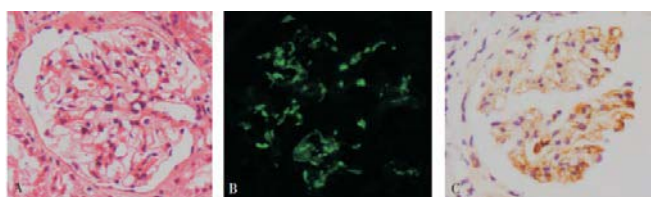


图3 IgA肾病(A: 光镜下可见系膜细胞轻度增生(HE×400); B: 免疫荧光可见Ig系膜区+++染色(×1000); C: 免疫组化IgA可见系膜区着色(×400))

3 讨论

临床上在对肾病进行诊断时,肾穿刺活检是比较重要的一个依据,其中免疫荧光染色具有强度易于判断、准确定位、染色步骤简单、敏感性高以及特异性强等诸多优点,是简单、快捷的一种方法^[4]。但是冷冻切片免疫荧光染色也存在着诸多的问题,包括设备要求高、检测周期短、肾穿刺组织少等,从而影响结果判断。石蜡切片通过甲醛固定,能够维持组织结构的原有状态,本次研究运用胰蛋白酶修复+水浴热修复,能够充分暴露抗原决定簇,其与免疫荧光冷冻切片的染色结果基本一致,与于冀洋^[5]等研究相同,说明肾穿刺免疫荧光失败后,可以将免疫组化作为一种有效补救措施。但是运用免疫组化染色时,有以下几点需要注意:①在合理范围内控制稀释度,避免发生背景染色而出现假阴性;②将适量蒸馏水加入湿盒内,不用完全擦除组织周围液体,避免出现干片现象;③操作时,坚持无菌原则,严格按照操作流程进行,避免违规操作^[6]。

(上接第56页)

[2] 陈旭民. COPD患者血清瘦素、骨密度与中医分型的关系[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(5):325-326.

[3] 覃家盟, 陈昌枝, 邵有和等. 老年男性慢性阻塞性肺疾病患者骨密度及骨代谢生化指标临床分析[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2017, 10(4):468-470.

(上接第57页)

卫生产业, 2016, 13(2):149-151.

[3] 夏君. 急诊外科创伤患者病死的危险因素及急救措施[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(8).

[4] 王飞. 急诊外科创伤患者死亡危险因素及急救措施分析[J]. 大家健康:学术版, 2016, 10(10).

[5] 胡建国. 急诊外科创伤患者病死危险因素及急救措施[J]. 健康之路, 2016(2).

[6] 唐昌华. 急诊外科创伤患者死亡危险因素及临床救治[J]. 医

(上接第58页)

参考文献

[1] 刘丹. 癌性疼痛中医综合治疗方案的临床研究[J]. 北京中医药大学, 2013, 08(3):445-494.

[2] 邓育. 中医综合疗法治疗癌性疼痛的效果评价[J]. 中医临床研究, 2014, 20(5):77-78.

(上接第59页)

非癌组织在3.0TMR动态增强灌注成像中的强化表现[J]. 放射学实践, 2016, 31(8):756-759.

[2] 张军霞, 王颖毅, 王敏, 等. MR动态磁敏感对比增强灌注技术在胶质瘤复发和放射性脑损伤鉴别诊断中的价值[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018(1):20-24.

[3] 许洋, 吕晋浩, 马林, 等. 多参数动脉自旋标记与动态磁敏感增强脑灌注成像在诊断短暂性脑缺血性发作中的对比[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(6):768-774.

综上所述,在肾穿刺活检中,免疫荧光检测是观察异常免疫复合物沉着的一种有效方法,而免疫组化染色的结果与其基本一致,可以作为补救方法,为临床诊断提供依据。

参考文献

[1] 金晶晶, 肖立, 顾晏, 殷于磊. 肾活检免疫组织化学法与免疫荧光直接法染色结果比较[J]. 诊断学理论与实践, 2017, 16(01):79-83.

[2] 符克英, 蔡俊宏, 符生苗, 韩叶光, 王茹, 张培. 抗磷脂酶A2受体抗体检测在老年人特发性膜性肾病肾组织及血液中的表达[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(17):4281-4283.

[3] 崔静, 姜景秋, 李文娜, 邱世磊, 齐栋, 吕伟, 张燕. M型磷脂酶A2受体及其抗体和Nephrin在不同类型膜性肾病患者的表达[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(04):628-634.

[4] 魏佳莉. 狼疮肾炎患者肾组织及尿液中缺氧诱导因子-1 α 表达及相关性研究[A]. 中华医学会、中华医学会风湿病学分会. 第17次全国风湿病学学术会议论文集[C]. 中华医学会、中华医学会风湿病学分会, 2012:2.

[5] 于冀洋, 朱光华, 史青, 何威逊. 肝细胞生长因子与转化生长因子- β 在肾脏病患儿肾组织中的表达[J]. 实用儿科临床杂志, 2008(17):1346-1348.

[6] 聂树涛, 张勇. 利用细胞块检测肾小球疾病患者尿中足细胞和巨噬细胞的应用研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008(06):610-611+614.

[4] 陈少藩. 中山市中老年人慢性阻塞性肺疾病继发骨质疏松症中医证候研究[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(15):21.

[5] 王志刚, 王梅, 林学军等. 老年慢性阻塞性肺疾病患者继发骨质疏松症的影响因素[J]. 中国当代医药, 2016, 23(5):35-37.

[6] 杜洁, 朱火兰, 柴春艳等. 慢性阻塞性肺疾病与骨质疏松症的相关性探讨[J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(1):14-16.

学理论与实践, 2016, 29(7):915-916.

[7] 黄方, 刘青霞, 胡思琴. 急诊外科创伤患者切口感染的危险因素分析[J]. 养生保健指南, 2016, 13(43):211-211.

[8] 何洪芹. 急诊外科创伤患者病死的危险因素及急救措施[J]. 中国药物经济学, 2015(10):85-86.

[9] 凌洪. 探讨创伤患者的死亡危险因素及临床救治措施[J]. 中国急救医学, 2016, 36(z1).

[10] 李承宁, 李百来, 陈闽希. 急诊创伤患者死亡因素及急救措施研究分析[J]. 医药前沿, 2015(20):133-134.

[3] 周之毅, 刘慧, 尤圣富. 中医综合三阶梯法治疗癌性疼痛30例临床观察[J]. 中医杂志, 2010, 10(8):890-894.

[4] 潘彩虹. 中医综合疗法治疗原发性痛经临床效果观察[J]. 亚太传统医药, 2013, 11(15):83-84.

[5] 董昌盛, 王菊勇, 郑展. 中医外治癌性疼痛临床研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 02(14):161-163.

[4] 杨晓棠, 张建新, 杜笑松, 等. 动态增强MRI定量与半定量分析在直肠癌术前T、N分期中的应用价值[J]. 中华解剖与临床杂志, 2016, 21(2):109-114.

[5] 林祺, 邓燕芳, 邱清香, 等. 动态磁化率对比增强MR灌注成像对脑星形细胞瘤分级诊断的价值[J]. 功能与分子医学影像学(电子版), 2016, 5(2):9-12.

[6] 胡兰花, 于韬, 徐婷婷, 等. 动态磁敏感对比增强MRI和动态对比增强MRI鉴别诊断胶质瘤复发和放射性脑损伤[J]. 中国医学影像技术, 2017, 33(1):11-16.