

· 论著 ·

BRAF^{V600E}抗体的几种手工免疫组化染色方法在甲状腺乳头状癌中的表达情况比较*廖子龙^{1,*} 张培荣¹ 吴泽²

1. 深圳市盐田区人民医院病理科 (广东 深圳 518000)

2. 中南大学湘雅医院病理科 (湖南 长沙 410008)

【摘要】目的 探讨BRAF^{V600E}抗体通过两种不同厂家试剂、不同染色条件的手工免疫组化染色方法在甲状腺乳头状癌中的表达情况比较。**方法** 对5例BRAF^{V600E}强阳性表达的甲状腺乳头状癌标本进行石蜡切片, 根据罗氏DAB染色试剂盒(罗氏)、迈新即用型快捷免疫组化Maxvision HRP试剂盒(鼠/兔)(HRP)、即用型免疫组化Elivision Super试剂盒(鼠/兔)(ES)以及不同染色时间, 将每一例样本分为9组, 采用相同的修复方式和同一批号的罗氏一抗试剂, 进行手工免疫组化染色实验进行对比分析。**结果** 实验结果显示: 对照组均表达为强阳性。5例实验组1和实验组2表达均为阴性。而5例实验组3和实验组4以及2例实验组5表达为弱阳性; 5例实验组6和3例实验组5以及1例实验组8表达为中性; 其余实验组7和实验组8均表达为强阳性。对8组样本的实验结果进行分析显示: 实验组7和实验组8的表达强度与对照组的表达强度基本一致, 但实验组7的染色时间相对较短。**结论** 对照组BRAF^{V600E}抗体表达最理想, 但染色时间长, 费用也较高; 手工染色中实验组7的操作简单, 费用较低, 同时染色效果较理想, 能满足于病理诊断, 可供各单位参考。

【关键词】 甲状腺乳头状癌; BRAF^{V600E}; 免疫组化**【中图分类号】** R736.1**【文献标识码】** A**【基金项目】** 深圳市盐田区科创局医疗卫生类科技计划项目(YTWS20210104)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2022.06.011

Several Manual of BRAF^{V600E} Antibody Immunohistochemical Staining Method in Thyroid Papillary Carcinoma in the Expression in Comparison*LIAO Zi-long^{1,*}, ZHANG Pei-rong¹, WU Ze².

1. Department of Pathology, Shenzhen Yantian People's Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

2. Department of Pathology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Abstract: Objective Explore the BRAF^{V600E} antibody by two different manufacturers reagents, different dyeing conditions of manual immunohistochemical staining method in thyroid papillary carcinoma in the expression in comparison. **Methods** 5 cases of BRAF^{V600E} strong positive expression of thyroid papillary carcinoma specimens of paraffin section, according to the roche DAB staining kits (roche), Michael new ready-to-use rapid immunohistochemical Maxvision HRP kit (rat)/rabbit (HRP), ready-to-use immunohistochemical Elivision Super kit (rat)/rabbit (ES) and the different dyeing time, each sample was divided into nine groups, using the same repair methods and the same batch of roche one resistant reagent, manually immunohistochemical dyeing experiments were analyzed. **Results** Experimental results show that the control group were expressed as strong positive. 5 cases of experimental group 1 and group 2 expression are all negative. And 5 cases of experimental group 3 and group 4 and 2 cases of experimental group 5 expressed as weak positive; 5 cases of experimental group 6 and 3 cases of experimental group 5 and 1 cases in experimental group 8 expressed as positive; The rest of the group 7 and 8 are expressed as experimental group strong positive. The experimental results of 8 groups of sample analysis shows: the experimental group 7 and 8 expression of strength and controls the expression of intensity is almost the same, but the experimental group 7 dyeing time is relatively short. **Conclusion** Control group BRAF^{V600E} antibody expression of the ideal, but dyeing time is long, cost also is higher; Manual dyeing in the experimental group 7 of simple operation, low cost, at the same time the dyeing effect is ideal, can contented with pathological diagnosis, can be used for reference in the various units.

Keywords: Papillary Thyroid Carcinoma; BRAF^{V600E}; Immunohistochemical

BRAF基因是一种原癌基因, BRAF^{V600E}位点突变导致细胞恶性增殖, 从而促进肿瘤的发生发展。近年来学者发现BRAF^{V600E}突变与甲状腺乳头状癌发病密切相关^[1]。通过BRAF^{V600E}基因检测与HE染色技术发现, BRAF^{V600E}在甲状腺乳头状癌患者中的突变比例达90%^[2]。而BRAF^{V600E}抗体是一种鼠单克隆抗体(克隆VE1), 是针对BRAF突变氨基酸序列(氨基酸596到606 GLATEKSRWSG)的人工合成肽。全部实体瘤中约有8%可检出BRAF^{V600E}突变, 其中包括39%的乳头状甲状腺癌^[3]。该抗体在免疫组化病理层面的临床应用有着重要的意

义; 特别在只能手工免疫组化染色的医疗单位, 为其提供一项具有操作较为简单、费用低等优点的方法, 也将给患者提供更有效的诊断证明和检查项目的选择。实验方法如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取甲状腺乳头状癌肿瘤标本, 其中BRAF^{V600E}在肿瘤细胞中强阳性表达的组织5例, 采用相同的高压修复方式和同一批号的罗氏一抗试剂。以二抗滴加HRP30min设为实验组1, 滴加ES(反应放大剂+高敏型酶标

【第一作者】廖子龙, 男, 主管技师, 主要研究方向: 甲状腺乳头状癌术前病理诊断。E-mail: 350158252@qq.com

【通讯作者】廖子龙

抗小鼠/兔IgG聚合物)并根据放大剂和聚合物的不同作用时间设为实验组2~8,分别为实验组2(放大剂15min+聚合物15min)、实验组3(放大剂30min+聚合物15min)、实验组4(放大剂60min+聚合物15min),实验组5(放大剂30min+聚合物20min),实验组6(放大剂30min+聚合物30min),实验组7(放大剂30min+聚合物45min),实验组8(放大剂30min+聚合物60min),以使用全自动免疫组化仪配套罗氏试剂染色设立对照组;在相同条件下同时进行染色。

1.2 切片前期处理 常规切片(厚3~4 μ m),电热恒温箱65℃烤片2h以上,二甲苯脱蜡10min×3—无水酒精2min×2—95%酒精1min—90%酒精1min—80%酒精1min—水洗。

1.3 试剂与仪器 BRAF^{V600E}(VE1)抗体;DAB染色试剂盒:(1)Optiview Peroxidase Inhibitor(3%);(2)Optiview HQ Universal Linker;(3)Optiview HRP Multimer;(4)Optiview DAB;(5)Optiview H2O2(0.04%)(6)Optiview Copper(上海罗氏诊断产品有限公司)。EDTA(PH9.0)修复液、HRP、ES、加强型DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。DHP-420型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司)。BenchMark XT 全自动免疫组化仪(上海罗氏诊断产品有限公司)。

1.4 免疫组化染色流程 (1)全自动免疫组化仪染色:按照BRAF^{V600E}该抗体设定好的染色程序进行染色,封片。(2)迈新试剂染色流程:EDTA(PH9.0)高压修复喷气后计时5min—H2O2(3%)37℃反应10min—BRAF^{V600E}抗体37℃孵育60min—HRP 37℃孵育30min或ES 37℃孵育(按不同实验组设定的时间)min—加强型DAB显色试剂盒37℃作用10min—复染、封片。每个步骤间均用PBS+Tween 20液进行清洗3次,每次3min。

1.5 结果判读 染色好的切片由副高以上病理诊断医师以及主管技师共同阅片,这种突变特异性抗体表现为一种细胞浆染色模式,对肿瘤BRAF^{V600E}抗体明确表达部位进行对比分析,以对照组染色结果为标准,判断其表达强度;结果以阴性(-)、弱阳(+)、中阳(++)、强阳(+++)进行标注比较^[4]。

2 结果

实验组1和实验组2,表达均为(-)(见图1)。而5例实验组3、4以及2例实验组5表达为(+);5例实验组6、3例实验组5以及1例实验组8表达为(++);除了1例实验组8表达为(++),其余实验组7、8均表达为(+++)。5例标本中对对照组对BRAF^{V600E}抗体均表达为(+++)(见图2)。

组实验进行比较,5例标本在相同条件下呈现较高的一致性。实验组7和实验组8的表达强度与对照组的表达强度基本一致,但实验组7时间较短;该方法可用于甲状腺乳头状癌BRAF^{V600E}抗体免疫组化项目检测。

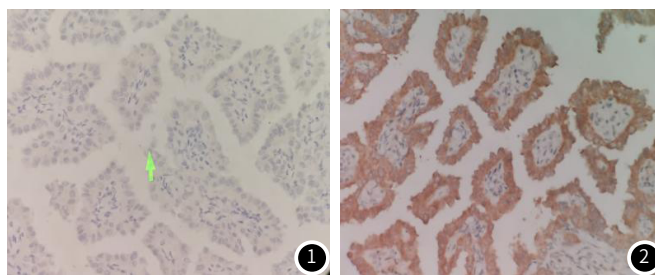


图1 BRAF^{V600E}阴性(-)。图2 BRAF^{V600E}强阳性(+++)。

3 讨论

近年来,甲状腺乳头状癌作为甲状腺癌的主要肿瘤类型,其发病率逐年增高。研究表明,BRAF基因^{V600E}突变检测在甲状腺乳头状癌诊断中具有重要的临床应用价值,该基因突变与甲状腺外侵犯、淋巴结或远处转移、肿瘤进展或复发密切相关^[5-6]。基于基因检测时间长、费用高等因素,BRAF^{V600E}抗体逐渐开始应用于病理免疫组化检测中。由于该抗体检测条件要求较高,目前并没有一个公认的较好的手工免疫组化操作方法。目前在罗氏全自动免疫组化仪加强型试剂染色效果较好,但仍有部分基层单位因各种原因未能使用全自动免疫组化仪;本项目通过对罗氏全自动染色流程的解读,对修复条件以及不同试剂的不同孵育时间进行摸索并试验,确定BRAF^{V600E}抗体手工免疫组化染色的最佳染色条件^[7-8]。实验结果显示,5例标本中对对照组BRAF^{V600E}抗体均表达为强阳性。各实验组间的表达结果呈现较高的一致性;其中实验组1和实验组2,结果显示均为阴性(-),未能表达BRAF^{V600E}抗体。而5例实验组3、4以及2例实验组5表达为弱阳性(+);5例实验组6、3例实验组5以及1例实验组8表达为中阳性(++);除了1例实验组8表达为中阳性(++),其余实验组7、8均表达为强阳性(+++)(表1)。提示适当增加反应放大剂和高敏型酶标抗小鼠/兔IgG聚合物的反应时间可以增强表达效果;从实验组2至实验组7的表达强度上看,试剂1(反应放大剂)反应时间为30min的表达强度最佳,与反应时间为60min的表达强度是一致的;试剂2(高敏型酶标抗小鼠/兔IgG聚合物)随着时间延长表达强度明显增强,但反应30min与45min强度基本一致。因此,从表达强度和时间内考虑,选择反应30min最理想。在染色成本方面,主要计算一抗修复液、一抗试剂、二抗试剂以及显示试剂费用,该数据为根据厂家采购价粗略计算;实验组1每人份为42.12元,实验组2~8每人份为41.99元,对照组每人份为103.7元;如此看来,使用全自动免疫组化仪的染色成本明显高于手工染色,这也是一部分单位考虑的因素。在完成染色时限方面,从抗原修复开始至DAB显色结束进行计时,实验组1与实验组2用时最短,均为117min,实验组4与实验组8用时较长,为162min,实验组3、5用时132min,实验组6用时137min,实验组7用时为147min,而全自动免疫组化仪染色时间最长,为248分min,明显高于手工染色时间(表1)。

综上所述,本实验结果表明,使用全自动免疫组化仪染色效果最理想,但涉及仪器采购问题,染色时间较长,染色成本也较高;而手工免疫组化染色中实验组7的染色效果较理想,

能满足于病理诊断，染色时间较全自动免疫组化仪短，其费用也更低；为满足基层单位BRAF^{V600E}抗体手工免疫组化染色的需求，本实验提供两家不同厂家、不同染色条件的手工免疫组化染色方法，可根据各单位需求做出选择。基于手工染色和结果

判读上仍存在一定的人为因素，判读结果存在个别差异性。另本实验由于病例数较少，未能产生统计学意义，数据还需进一步积累分析；并且单一厂家实验试剂较局限，其他厂家试剂对BRAF^{V600E}抗体的表达情况如何？还需进一步实验摸索。

表1 5例实验组以及对照组的时效性、经济性对比情况

序列	对照组	实验组1	实验组2	实验组3	实验组4	实验组5	实验组6	实验组7	实验组8
第一例	+++	-	-	+	+	++	++	+++	+++
第二例	+++	-	-	+	+	+	++	+++	++
第三例	+++	-	-	+	+	++	++	+++	+++
第四例	+++	-	-	+	+	++	++	+++	+++
第五例	+++	-	-	+	+	+	++	+++	+++
时限(min)	248	117	117	132	162	132	137	147	162
试剂费用(元)	103.7	42.12	41.99	41.99	41.99	41.99	41.99	41.99	41.99

参考文献

[1]王晶,刘龙腾,崔娣等. BRAF V600E突变与甲状腺乳头状癌发生及预后相关因素分析[J],中华病理学杂志,2019,48(4):288-292.

[2]王新玲. 探讨BRAF V600E基因突变检测在甲状腺乳头状癌术前诊断中的临床价值[J],国际感染病学,2019,8(4):98-99.

[3]Davies H,Bignell G R,Cox C,et al.Mutations of the BRAF gene in human cancer[J].Nature,2002,417(6892):949-954.

[4]王德田,董建强. 实用现代病理学技术[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2012,1.

[5]Tufano R P,Teixeira G V,Bishop J,et al.BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: A systematic review and meta-analysis[J].Medicine (Baltimore),2012,91(5):274-286.

[6]张颖,罗渝昆,张艳,等. 超声引导下细针穿刺细胞学检查联合BRAF(V600E)检测与甲状腺乳头状癌侵袭性病理特征的相关性[J].中国医学科学院学报,2019,41(4):517-523.

[7]周小鸽. 免疫组织化学染色的干预因素及其处理[J].临床与实验病理学杂志,2006,22(4):389-392.

[8]骆新兰,蔡秀玲,刘艳辉,等. 不同的抗原修复条件对免疫组织化学染色结果的影响[J].中华病理学杂志,2005,34(1):52-57.

[9]Capper D,Preusser M,Habel A,et al.Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody[J].Acta Neuropathol,2011,122(1):11-19.

[10]Kuan S F,Navina S,Cressman K L,et al.Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization[J].Hum Pathol,2014,45(3):464-472.

[11]Sukumar J S,Sukumar S,Purohit D,et al.Activating BRAF mutation in sclerosing mucoepidermoid carcinoma with eosinophilia of the thyroid gland: two case reports and review of the literature[J].J of Med Case Rep,2019,13(1):385.

(收稿日期：2021-10-25)