

以下特征: (1) 单侧或双侧发生。本组 9 例中 7 例单侧, 2 例双侧, 单侧脑裂畸形较双侧者多见。单侧脑裂畸形多数一侧一裂, 但本组 1 例左侧双裂实属罕见。(2) 根据裂隙壁是否融合而分为分离型和融合型。分离型 CT 可清晰显示其裂隙, 裂隙两旁内衬灰质。融合型因 CT 无裂隙显示, 容易漏诊, 但若发现横贯大脑半球的与灰质密度相同的带状影, 其外端脑表面出现凹陷, 内端脑室呈现天幕状憩室, 即可作出明确诊断。(3) 裂隙多位于中央前或后回区。但本组左侧双裂者裂隙分别位于左颞、枕叶。从发病机制来看, 胚生发组织产生于整个侧脑室壁, 任何部位的胚生发组织的节段性形成缺损或早期移行失败均可产生相应部位的脑裂畸形。(4) 常与其他脑先天性发育畸形并存, 如巨脑回、多微脑回、灰质异位、无脑回、胼胝体发育不全及透明隔缺如等。其中以透明隔缺如为多, 本组 9 例中 7 例伴有透明隔缺如。

脑裂畸形需与脑发育不全和脑穿通畸形鉴别, 裂隙旁有

异位的灰质是其特征性表现。

[参考文献]

[1] Oshiro S, Fukushima T. Two adult cases of unilateral schizencephaly manifesting as minor neurological signs—importance of radiographic CT assessment[J]. *Noto Shinkei*, 2003, 55(5): 431-434  
 [2] 刘可夫, 刘斌, 张家文, 等. 脑裂畸形的 CT 表现[J]. *放射学实践*, 2003, 18(8): 566-567.  
 [3] 沈庆隆, 詹阿来, 余主花, 等. 脑裂畸形的 CT、MRI 诊断价值[J]. *医学影像学杂志*, 2001, 11(4): 230-232  
 [4] 魏启春, 李森华, 胡爱妹. 脑裂畸形的 CT 诊断[J]. *实用放射学杂志*, 1999, 15(3): 168-169.  
 [5] 曹代荣, 李银官, 倪希和, 等. 脑裂畸形的 MR 影像征象分析[J]. *放射学实践*, 2002, 17(6): 468-470  
 [收稿日期] 2004-02-19 [修回日期] 2004-06-20  
 [本文编辑] 孙岩

· 短篇报道 ·

## 组织芯片的制备及在免疫组织化学中的应用

### Preparation of tissue microarray and its application in immunohistochemistry

倪灿荣 (第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433)

[关键词] 组织芯片; 石蜡切片; 免疫组织化学; 成功率

[中图分类号] R 361.2 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)10-1156-02

\* 组织芯片或称组织微阵列(tissue microarray, TMA)技术, 是近年来发展起来的以形态学为基础的分子生物学新技术。Kononen 等创立了真正意义的 TMA, 目前已应用到肿瘤的早期诊断、预后, 以及与 cDNA 基因芯片相结合, 进行高表达基因的定位研究<sup>[1-5]</sup>。本研究将重点介绍组织芯片构建的原则及如何提高 TMA 切片成功率。

#### 1 材料和方法

1.1 仪器和材料 组织芯片及其 0.6 mm、2 mm 组织穿刺针均为 Beecher Instruments 产品, 组织切片机为德国 Leica 公司产品, 型号 RM 2145。肝癌组织 150 例, 胰腺癌组织 250 例, 均为本院 1998~2001 年外科手术标本, 200 例各种肿瘤和正常组织均为 2000 年本院外科手术标本或尸检取材标本。

1.2 组织芯片制作 组织标本先在 H-E 切片上确定典型的肿瘤和相应的正常组织, 并在相应的蜡块上作好标记, 根据要求选择不同大小孔径的穿刺针, 将组织按一定规则转移至长 45 mm × 宽 28 mm × 高 15 mm 的蜡模中。

1.3 载玻片的准备 市售载玻片经洗涤剂煮沸, 流水冲洗干净, 晾干 80 烤干, 清洁液泡 18 h, 充分水洗, 蒸馏水洗, 95% 乙醇和无水乙醇洗, 1% APES 泡 1~2 min, 取出后无水乙醇洗 2 min, 晾干后即可使用。

1.4 TMA 模块制备 取 97.5 g 莱卡石蜡与 2.5 g 蜂蜡

(2.5%) (上海华灵) 混合, 制成长 45 mm × 宽 28 mm × 高 15 mm 的空白蜡块, 在该蜡块 30 mm × 18 mm 范围内设计 14 × 32 点组织阵列, 用组织仪打孔(0.6 mm)制成 TMA 模块。将构建好的 TMA 芯片蜡块用一金属框架包埋, 放入 60 温箱中约 1 h, 在蜡将要完全溶解前, 取出室温下冷却, 使其与新插入的小圆柱状组织溶为一体, 取下蜡块, 于 4 冰箱中保存备用。

1.5 切片过程 切片前蜡块需在 4 中预冷 4 h 左右, 然后取出, 快速夹在切片机上进行修正。等修到全部组织完整为止。此时, 将 -20 预冷冰袋贴在蜡块上 5~10 min 左右, 快速连续切片 30~50 张左右, 再用冰袋冷冻组织块, 重复上述过程, 直至将组织切完。将 4 μm 连续切片分别漂在凉水中, 让其自然展开, 按顺序将切片转移至 42 的温水中展片 2 min 左右, 将其贴在涂有 APES 切片粘合剂的载玻片上, 晾干, 60 中烤片 3 min 左右, 58 中继续烤片 18 h, -20 保存备用。

1.6 TMA 免疫组化标记 3 张组织芯片分别用 Cyclin D1、Cyclin D3、Cyclin A、Cyclin B、p73、p53、MDM2、ATM、p33<sup>NI</sup>、ki-67、Survivin、p16、p27、p21、Caspas3 抗体及改进后的 IHC-CSA 法进行免疫组化标记。方法参阅相关文献<sup>[6]</sup>。

\* [作者简介] 倪灿荣(1957-), 男(汉族), 高级实验师  
E-mail: nicanrong@hotmail.com

## 2 结果和讨论

在 TMA 的构建和切片中,蜡块存在易碎、裂开、脆等问题,切片时不利于切片的完整和连续性。因此,要切好一张完整并且能够连续的切片,必须对常规用的石蜡进行改进。TMA 所用蜡必须做到既要有一定的硬度,又要有一定的韧性。我们比较了国内几家石蜡生产厂家生产的蜡和莱卡公司石蜡,发现石蜡的硬度是够了,但均缺乏韧性。我们在几种型号的石蜡中分别加入 1%、2% 和 3% 的蜂蜡,结果在 58 的石蜡加入 2.5% 左右的蜂蜡,并经过反复的加温、冷却,制成的蜡模效果非常好,能够非常稳定、完整地连续切片。

除了要有适合 TMA 的蜡外,切片中的一些小细节,也会影响切片的成功率。(1)蜡模块要足够大,组织四周预留 0.5~0.7 cm 的空间。(2)构建好的 TMA,要用金属框架包好,并在 58 温箱中存放 1 h,使蜡和组织重新溶为一体,室温下冷却,如果温度太高,时间过长,会使 TMA 蜡块完全溶解,组织排列混乱,造成不必要的失败。(3)TMA 块不要放在 -20 中冷藏,否则易裂开,造成切片不完整。我们采用在 4 中保存 4 h,修完蜡块后用冰袋(-20)冰组织,这样效果非常理想,并最大限度地一次切完整个蜡块,每次冰后可连续切 30 张左右,将切片刀换一个位置,切完片后应保存在 -20 ~ -40 的冰箱中备用。(4)组织芯片设计时,每个圆柱状组织之间应留一定的间距,一般 0.2 mm 为最佳,文献报道<sup>[7]</sup>预留 2 倍于组织的空间最为理想。

本研究分别选用 2 种切片粘贴方式,一种是用胶带粘贴连续的 TMA,然后转移到涂有聚合胶的载玻片上,用滚筒轻轻压平,使胶带上的组织紧紧粘在玻片上,紫外线照射 2 min,再用特制的去油污洗液浸泡,使胶带从玻片上脱离、晾干,-20 保存。另一种是常规的贴片方式。2 种贴片方式的实验结果表明,采用胶带方法主要是胶带很难从玻片上分离,经常会带一部分组织下来,造成贴片不完整,而且操作有一定难度,价格也较昂贵,常规方法既方便,又经济,而且用

IHC 方法的强抗原修复也不脱片。但 Rimm 等<sup>[7]</sup>则认为胶袋法要优于常规方法。

本研究利用原发性肝癌和胰腺癌 TMA,分别检测了 14 种不同抗体,其阳性率和阳性强度要略高于文献报道;和大切片的组织相比,其阳性细胞数基本一致,其中有 3 例 TMA 呈阳性表达,而常规却是阴性。Caspase 和 p21 TMA 全部阴性,大组织切片同样也呈阴性。

### [参考文献]

- [1] Barlund M, Forozan F, Kononen J, *et al* Detecting activation of ribosomal protein s6 kinase by complementary DNA and tissue microarrays analysis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92 (15): 1252-1259.
- [2] Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, *et al* Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer [J]. *Nature*, 2001, 412 (6849): 822-826.
- [3] Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, *et al* Identification of differentially expressed gene in human gliomas by cDNA microarray and tissue chip techniques [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (23): 6617-6622.
- [4] Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, *et al* Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5 (8): 1966-1975.
- [5] Moch H, Schraml P, Bubendorf L, *et al* High throughput tissue microarray analysis to evaluate the significance of gene uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154: 981-986.
- [6] 倪灿荣, 范淼, 许丙基 CSA 系统在免疫组织化学中的应用 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 1999, 15 (3): 267-269.
- [7] Rimm DL, Camp RL, Charette LA, *et al* Amplification of tissue by construction of tissue microarrays [J]. *Exp Mol Pathol*, 2001, 70 (3): 255-264.

[收稿日期] 2004-03-20

[修回日期] 2004-07-16

[本文编辑] 李丹阳

## KLRL1, a novel killer cell lectin-like receptor, inhibits natural killer cell cytotoxicity

Han Y, Zhang M, Li N, Chen T, Zhang Y, Wan T, Cao X. (Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai, China)

**[ABSTRACT]** NK cell inhibitory receptors play important roles in the regulation of target susceptibility to natural killing. Here we report the molecular cloning and functional characterization of a novel NK cell receptor, KLRL1, from human and mouse dendritic cells. KLRL1 is a type II transmembrane protein with an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif and a C-type lectin-like domain. The KLRL1 gene is located in the central region of the NK gene complex in both humans and mice, on human chromosome 12p13 and mouse chromosome 6F3, adjacent to the other KLR genes. KLRL1 is preferentially expressed in lymphoid tissues and immune cells including NK cells, T cells, dendritic cells and monocytes/macrophages. Western blot and fluorescence confocal microscopy analyses indicated that KLRL1 is a membrane-associated glycoprotein, which forms a heterodimer with an as yet unidentified partner. Human and mouse KLRL1 are both predicted to contain putative immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs), and immunoprecipitation experiments demonstrated that KLRL1 associates with the tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. Consistent with its potential inhibitory function, pretreatment of target cells with human KLRL1-Fc fusion protein enhances NK-mediated cytotoxicity. Taken together, our results demonstrate that KLRL1 belongs to the KLR family and is a novel inhibitory NK cell receptor.

[Blood, 2004, Epub ahead of print]