

用于单切片双模态光学关联成像的肾脏组织样本处理方法

高歌 郭晓光 吴俊楠 陈海龙 史冰 黄振立

Methods for processing renal tissue samples for Single-Slice Dual-Mode optical correlation imaging

GAO Ge, GUO Xiao-guang, WU Jun-nan, CHEN Hai-long, SHI Bing, HUANG Zhen-li

引用本文:

高歌, 郭晓光, 吴俊楠, 陈海龙, 史冰, 黄振立. 用于单切片双模态光学关联成像的肾脏组织样本处理方法[J]. *中国光学*, 优先发表. doi: 10.37188/CO.2023-0105

GAO Ge, GUO Xiao-guang, WU Jun-nan, CHEN Hai-long, SHI Bing, HUANG Zhen-li. Methods for processing renal tissue samples for Single-Slice Dual-Mode optical correlation imaging[J]. *Chinese Optics*, In press. doi: 10.37188/CO.2023-0105

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.37188/CO.2023-0105>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

核酸功能化纳米探针在细胞荧光成像中的应用

Application in nucleic acid functionalized nanoprobe in cellular fluorescence imaging
中国光学 (中英文). 2018, 11(3): 363 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0363>

高温下数字图像相关散斑最优成像探究

Optimal imaging of digital image correlation speckle under high temperature
中国光学 (中英文). 2018, 11(5): 728 <https://doi.org/10.3788/CO.20181105.0728>

氧化石墨烯的多色发光及其在荧光成像中的应用

Multicolor fluorescent emission of graphene oxide and its application in fluorescence imaging
中国光学 (中英文). 2018, 11(3): 377 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0377>

多光子皮肤成像技术及其应用

Multi-photon skin tissue imaging technology and its applications
中国光学 (中英文). 2019, 12(1): 104 <https://doi.org/10.3788/CO.20191201.0104>

超分辨率成像荧光探针材料应用进展

Advances in application of materials of super-resolution imaging fluorescent probe
中国光学 (中英文). 2018, 11(3): 344 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0344>

深海光学照明与成像系统分析及进展

Analysis and research progress of deep-sea optical illumination and imaging system
中国光学 (中英文). 2018, 11(2): 153 <https://doi.org/10.3788/CO.20181102.0153>

文章编号 2097-1842(xxxx)x-0001-08

用于单切片双模态光学关联成像的 肾脏组织样本处理方法

高歌¹, 郭晓光¹, 吴俊楠¹, 陈海龙², 史冰¹, 黄振立¹

(1. 海南省生物医学工程重点实验室, 海南大学生物医学工程学院, 海南海口 570100;

2. 海南大学 计算机科学与技术学院, 海南海口 570100)

摘要: 明场成像能够提供细胞或组织的形态学信息, 荧光成像可以获得关键蛋白的表达信息, 基于两者的双模态关联成像是目前医学和科研中常用的组织样本检查方式。然而, 在临床检查时通常利用基于邻近切片之间的关联成像进行观察。此时, 组织结构和细胞层次均会有或多或少的改变, 这在样本量不足、切片上的细胞有限或需要获得点对点精准形态学信息的情景下显得十分不利。因此, 发展单切片双模态光学关联成像技术, 在单张切片上同时提供组织形态和多个目标蛋白的分布及表达, 有助于更准确地描述肿瘤及其微环境。在样本量稀缺的肾脏病理检测中, 该技术显得尤为重要: 肾脏病理需要利用明场成像获取苏木素-伊红染色后组织和细胞的病理形态学信息, 而利用荧光成像来获取多个目标蛋白的分布及表达情况则是肾脏免疫病理筛查的必检分子项目。本文重点研究了将苏木素-伊红染色和免疫荧光染色在同一张肾脏切片上实现的组织样本处理方法, 对染色、褪色及复染的流程进行改良和效果对比, 并探索将单切片双模态图像进行创新性融合。

关键词: 双模态关联成像; 免疫荧光成像; 褪色处理; 抗原修复; 关联成像分析

中图分类号: TP394.1; TH691.9 文献标志码: A doi: 10.37188/CO.2023-0105

Methods for processing renal tissue samples for Single-Slice Dual-Mode optical correlation imaging

GAO Ge¹, GUO Xiao-guang¹, WU Jun-nan¹, CHEN Hai-long², SHI Bing¹, HUANG Zhen-li¹

(1. Key Laboratory of Biomedical Engineering of Hainan Province, School of Biomedical Engineering,

Hainan University, Haikou 570100, China;

2. School of Computer Science and Technology, Hainan University, Haikou 570100, China)

Abstract: Bright-field imaging can provide cellular and histological morphological information, while fluorescence imaging can provide expression information of key proteins. Dual-modal correlation imaging based on both techniques is currently a common method for examining tissue samples in medical and scientific research. In clinical examination, however, correlation imaging between adjacent tissue slices is often used for observation. In such cases, both the tissue structure and the cellular level may be altered more or less, which

收稿日期: xxxx-xx-xx; 修订日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 海口市重点科技计划项目 (No. 2021-016)

Supported by Key science and technology plan project of Haikou (No. 2021-016)

is unfavorable when the sample volume is insufficient, the number of cells on the slices is limited, or precise point-to-point morphological information is required. Therefore, the development of single-slice dual-modal optical correlation imaging techniques which provides both tissue morphology and the distribution and expression of multiple target proteins on a single slice, can help to more accurately describe tumors and their microenvironment. This technique is particularly important in renal pathological testing where sample size is small. Renal pathology requires the use of bright-field imaging to obtain pathomorphological information of tissues and cells after hematoxylin-eosin staining, while the use of fluorescence imaging to obtain the distribution and expression of multiple target proteins is a mandatory molecular test for renal pathology screening. This paper focuses on the tissue sample processing methods that allow the coexistence of hematoxylin-eosin staining and immunofluorescence staining on the same renal slice. Improvements and comparative evaluations of the staining, de-colorizing and re-staining processes, as well as innovative fusion techniques for single-slice dual-modal imaging.

Key words: dual-modal correlation imaging; immunofluorescence imaging; decolorization; antigen retrieval; correlation imaging analysis

1 引言

病理学是基础医学和临床医学的桥梁,是重要的疾病诊断方法,长期以来被认为是诊断“金标准”^[1]。病理诊断主要是通过显微镜(普通光学显微镜^[2]、荧光显微镜^[3]、电镜等)首先观察细胞排列结构和细胞异型特征,并综合分子特征是否表达(免疫组织化学、免疫荧光^[4]等),做出疾病的最终诊断。临床上,诊断往往需要根据多张连续病理切片(3 μm –5 μm)的病理活检结果来判定疾病的具体类型。然而,当病灶部位特别小或者疾病情况复杂时,疾病的重要活检信息仅能在一张切片中反应出来,如癌细胞的侵袭性评估^[5]、早期病变内寻找有无小灶性癌变成分^[6]、评判手术标本切缘有无肿瘤细胞残留^[7]等。而利用连续切片时,由于每张切片的空间位置差异,不利于获得同一位置的组织形态学信息和特定蛋白表达情况。因此,在同一张组织切片上获取形态学信息与多种蛋白表达情况,变得至关重要^[8]。

肾脏疾病的种类繁多,病因多样。因此,肾脏病理检查需明确病理改变和病理类型,这对于肾脏疾病的诊断、治疗方案的制定、预后判断等具有重要意义^[9]。肾脏活检需要提取直径约 0.1 cm、长约 1.0 cm–1.5 cm 的组织样本进行肾活检病理检查,主要包括基于明场成像的形态学检测(苏木素-伊红 [Hematoxylin-Eosin, HE] 染色病理切片)

以及目标蛋白的荧光成像(免疫荧光染色切片)检查。然而,由于临床上会出现因样本取样不足、可用组织细胞较少,导致无法对疾病有效判定的情况,不得不对患者进行二次穿刺^[10]。因此,在单张切片上发展双模态的样本处理方法,有助于同时获取形态学信息与多目标蛋白表达情况,避免二次穿刺给病人带来痛苦和伤害。然而在实际实验过程中,HE 染色所用的苏木素和伊红若无效去除,会在激光下会发出较强荧光,干扰后续在同张切片上的免疫荧光实验^[11-12]。如何消除 HE 染色对后续免疫荧光染色的影响,是开展针对肾脏疾病的单切片双模态光学关联成像亟待解决的问题。

目前,常用的 HE 染色褪色处理方法主要包括盐酸乙醇法^[13-15]、高锰酸钾-草酸法^[16-18]以及冰醋酸-草酸法^[19]。这些方法通过去除 HE 染色后组织切片上的苏木素和伊红的色素,在明场成像下能观察到组织近乎无色,不会再干扰后续的免疫组织化学染色。然而,对组织的 HE 染色褪色处理后,进行免疫荧光染色并成像的相关报道相对较少,多采用盐酸或乙醇溶液进行褪色处理。高洪彬等人^[20]提出了在 HE 染色后用 1% 盐酸乙醇分化液进行褪色处理方法,实现了对胰腺组织胰岛素 (Insulin, INS) 抗原的免疫荧光染色;Komura 等人^[21]对多种石蜡组织进行 HE 染色后,利用乙醇溶液进行褪色处理后,进行免疫荧光染

色,获得了明场图像和荧光图像融合后的全景图像,但荧光图像存在染色不均匀和非特异性染色问题;Li 等人^[22]利用流动室进行样本染色,对 HE 褪色处理后的冰冻切片,分别实现了多种染色。其中,在进行免疫荧光染色时,选用 1% 进行褪色处理,并获取了明场图像与荧光图像的融合图像。值得注意的是,褪色处理所用的试剂均为酸性溶液,会对组织造成一定损伤,导致抗体与组织中的抗原结合不佳,进而影响免疫荧光染色的效果^[23]。因此,在对 HE 染色切片进行褪色处理后,要预先进行抗原修复^[24-25],该步骤是决定荧光标记效果至关重要的一步。由此,褪色方法和抗原修复方法的选择与优化,是实现肾脏组织单切片双模态光学关联成像的关键。

本文研究了在单张组织切片上首先进行 HE 染色,褪色处理后,再进行免疫荧光染色的实验方法,最终实现单切片双模态成像工作。在这里我们对比了不同褪色处理方案下的各种抗原修复方案,选取最优方案以降低伊红-苏木素染料的残留对后续操作的干扰。我们分别对比了盐酸乙醇褪色法、冰醋酸-草酸褪色法及高锰酸钾-草酸褪色法三种褪色方案下,乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗原修复、三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Ethylenediaminetetraacetic acid, Tris-EDTA)抗原修复及柠檬酸抗原修复后的免疫荧光图像质量。我们选取荧光图像的信噪比这一参数作为参考值,分别计算每一种方案的信噪比,选取最适合肾脏组织进行单切片双模态光学关联成像的 HE 染色褪色-抗原修复处理方案。此外,我们尝试了将明场与荧光两种光学成像模态的图像进行融合,在单张切片上实现组织形态学和免疫学信息的进一步结合。

2 材料与方 法

2.1 褪色处理方案

(1) 盐酸乙醇褪色法^[13]: 盐酸乙醇中浸泡 1 min。通风橱中晾干,观察颜色褪去程度,若颜色未褪去,再次分化 1 min,重复操作数次,直到无色。

(2) 冰醋酸-草酸褪色法^[19]: 10% 冰醋酸中浸泡直到近无色,2% 草酸水溶液浸泡中 10 min。

(3) 高锰酸钾-草酸褪色法^[17]: 高锰酸钾溶液(0.1 mol/L)浸泡 10 min,蒸馏水洗后,2% 草酸水溶液漂白 2 min。

2.2 抗原修复方案

(1) EDTA 抗原修复法: EDTA 抗原修复液(pH 8.0)以 1:50 稀释,中低火 6 min 至微沸,断电间隔 10 min 让液体冷却,再次中低火 4 min 至沸。

(2) Tris-EDTA 抗原修复法: Tris-EDTA 抗原修复液(pH9.0)以 1:20 稀释,同等条件下进行修复。

(3) 柠檬酸抗原修复法: 柠檬酸抗原修复液(pH6.0)以 1:20 稀释,在同等条件下修复。

2.3 HE 染色与免疫荧光染色

HE 染色: 选用 3 μm 厚的小鼠肾脏石蜡组织切片,置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 电热恒温鼓风干燥箱中进行 2 次烤片,每次 30 min;按常规流程进行苏木素和伊红染色,最后中性树胶封片。

免疫荧光: 褪色和抗原修复后的切片用组化笔在距离组织 5 mm 处画线,组织自发荧光淬灭剂 A 液(赛维尔公司)室温孵育 30 min,蒸馏水洗 5 min。按常规流程进行免疫荧光标记。一抗: 用 3% 牛血清白蛋白(Bovine albumin, BSA)以 1:400 稀释水通道蛋白 2(Anti-Aquaporin 2 antibody, AQP-2); 二抗: 用 3%BSA 以 1:400 稀释羊抗兔 AF532。用荧光染料 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核,然后用 70% 乙醇 1:1 稀释组织自发荧光淬灭 B 液后,室温避光孵育 5 min;自来水洗 5 min,再用磷酸缓冲盐溶液(Phosphate Buffered Saline, PBS)洗 3 次,每次 5 min。稍甩干后,滴加抗荧光淬灭封片剂,并于载玻片两端加少量中性树胶封片。

2.4 成像及图像处理

HE 成像: 从显微镜(BX53, Olympus)下找到感兴趣的视野,用彩色相机(FL-20, 鑫图光电)拍照(曝光时间 200 ms)并记录下位移台的坐标信息。

免疫荧光成像: 按照前述 HE 成像流程所记录的位移台坐标信息,将黑白相机(C13440-20CU, 滨松)移动到相应的坐标点进行免疫荧光图拍摄。其中,曝光时间 200 ms,使用 LWGL532-6 激光器进行激发时,激光功率约 0.2 W,使用 405 激光器进行激发时,激光功率约 6 mW。获取的图像数据通过 Image J 软件进行处理。

3 结果与讨论

3.1 基于盐酸乙醇褪色方案的抗原修复方法对比

小鼠肾脏组织石蜡切片按常规流程进行 HE 染色, 拍照后用盐酸乙醇褪色, 然后采用不同条件抗原修复并进行免疫荧光标记, 得到的 HE 图和免疫荧光图如图 1 所示。图 1 c、g、k 所示, 在不同抗原修复条件下, AQP-2 都有很强的荧光信号, 分布在集合管的主细胞中, 且可以与 HE 图的结构对应。图 1 b、f、j 所示, DAPI 都有明亮的荧光信号, 还可以在每个细胞核中看到更明亮的点即核仁所在位置。为了对比褪色后免疫荧光图像的质量, 我们统计了不同抗原修复条件下的信噪比, 如图 1 m 所示。在 20 倍空气镜所拍摄的 AQP-2 蛋白荧光图像中, 柠檬酸修复的信噪比为 52.62, 图像质量最好; Tris-EDTA 修复的信噪比为 47.59, 效果次之。在 DAPI 荧光图像中, Tris-EDTA 和 EDTA 修复的信噪比差不多, 柠檬酸修复的效果较差, 为 21.30。综上所述, 盐酸乙醇褪色后采用 Tris-EDTA 抗原修复的综合效果较好。

3.2 基于冰醋酸-草酸褪色方案的抗原修复方法对比

小鼠肾脏组织切片 HE 染色后以冰醋酸-草酸法褪色, 然后再采用不同抗原修复条件进行免疫荧光标记, 得到的 HE 和免疫荧光结果如图 2 所示。图 2 中, AQP-2 蛋白在三种抗原修复条件下均显示较强的荧光信号, 可以清晰地显示出集合管的轮廓, 与周围背景信号有明显的区分。图 2 中, DAPI 在三种抗原修复条件下也有强荧光信号。与图 1 相比, 冰醋酸-草酸褪色后 AQP-2 免疫荧光图像背景低, 非特异性信号较少, 红细胞的自发荧光也不明显。



图 1 小鼠肾脏组织石蜡切片 HE 染色后盐酸乙醇褪色的单切片双模态图。a、e、i 为 HE 染色图; b-d 是图 a 褪色后 EDTA 抗原修复的同一视野免疫荧光图; f-h 是图 b 褪色后 Tris-EDTA 抗原修复的同一视野的免疫荧光图; j-l 是图 i 褪色后柠檬酸抗原修复的同一视野免疫荧光图; m 为盐酸乙醇褪色后不同抗原修复条件下的免疫荧光图像信噪比统计分析。标尺: 50 μm 。

Fig. 1 The single slice bimodal images of the decolorization of hydrochloric acid ethanol after HE staining of paraffin slices of mouse renal tissue. a, e and i are HE staining images. b-d are the same visual field immunofluorescence images of EDTA antigen retrieval after de-colorizing in Fig. a. f-h are the immunofluorescence images of the same field of view of Tris-EDTA antigen retrieval after the decolorization of Fig. b. j-l are the same visual field immunofluorescence images of citric acid antigen retrieval after de-colorizing in Fig. i. m is the statistical analysis of the signal-to-noise ratio of immunofluorescence images under different antigen retrieval conditions after hydrochloric acid ethanol decolorization. Scale: 50 μm .

图 2 m 是我们对用冰醋酸-草酸褪色后不同抗原修复的免疫荧光图进行信噪比分析结果。用冰醋酸-草酸褪色后, 在 AQP-2 蛋白荧光图像中, Tris-EDTA 修复的信噪比最高为 49.05, EDTA 修复的信噪比为 46.19, 效果次之; 但是 EDTA 修复的标准差较小。在 DAPI 荧光图像中, 三种抗原修复条件下的信噪比相差不大。综上所述, 当使用冰醋酸-草酸褪色后, 选用 EDTA 进行抗原修复可以获得质量好的荧光图像。



图2 小鼠肾脏组织石蜡切片 HE 染色后冰醋酸-草酸褪色的单切片双模态图。a、e、i 为 HE 染色图; b-d 是图 a 褪色后 EDTA 抗原修复的同一视野免疫荧光图; f-h 是图 b 褪色后 Tris-EDTA 抗原修复的同一视野的免疫荧光图; j-l 是图 i 褪色后柠檬酸抗原修复的同一视野免疫荧光图; m 为冰醋酸-草酸褪色后不同抗原修复条件下的免疫荧光图像信噪比统计分析。标尺: 50 μm 。

Fig. 2 The single-slice bimodal images of glacial acetic acid-oxalic acid decolorization after HE staining of paraffin slices of mouse renal tissue. a, e and i are HE staining images, and b-d are the same visual field immunofluorescence images of EDTA antigen retrieval after de-colorizing in Fig.a. f-h are the immunofluorescence images of the same field of view of Tris-EDTA antigen retrieval after the decolorization of Fig. b. j-l are the same visual field immunofluorescence images of citric acid antigen retrieval after de-colorizing in Fig.i. m is the statistical analysis of the signal-to-noise ratio of immunofluorescence images under different antigen retrieval conditions after glacial acetic acid-oxalic acid decolorization. Scale: 50 μm .

3.3 基于高锰酸钾-草酸褪色方案的抗原修复方法对比

小鼠肾脏组织切片 HE 染色用高锰酸钾-草

酸褪色后, 采用不同条件抗原修复进行免疫荧光标记, 得到的 HE 和免疫荧光结果如图 3 所示。图 3 中, 高锰酸钾-草酸褪色后, 不论哪种抗原修复方法, 在 DAPI 荧光图像中都没有标记到细胞核结构, 只有一些网格状结构。将 DAPI 荧光图像与其相对的 HE 图像对比, 我们发现 DAPI 荧光图像内的网格状结构可以与 HE 图像的肾小管边缘对应, 其细胞核没有被标记到。推测可能肾脏组织被高锰酸钾的强氧化性破坏, 导致丧失了细胞核的核酸, 导致 DAPI 不能结合。图 3 中 AQP-2 蛋白依然有强烈的信号, 但其结构不完整, 呈断断续续状。综上所述, 高锰酸钾对组织有较大的破坏性, 组织和细胞内结构缺失, 部分区域还有脱片、折叠现象, 因此高锰酸钾-草酸法不适用于组织切片 HE 染色后的褪色。

综上所述, 使用高锰酸钾-草酸法对肾脏组织切片褪色再染色后, 成像效果较差。我们猜测强氧化性破坏了组织中的蛋白结构, 尤其是细胞核最为严重; 并可见部分区域的组织出现折叠现象。在肾脏组织上进行单切片双模态光学关联成像时, 如需褪色处理, 应将高锰酸钾-草酸法排除。在使用盐酸乙醇褪色后, 采用 Tris-EDTA 进行抗原修复更适合用于肾脏的单切片双模态光学关联成像中; 在使用冰醋酸-草酸褪色后, 采用 EDTA 进行抗原修复更适合用于单切片双模态光学关联成像中。在这两种组合中, 冰醋酸-草酸褪色法搭配 EDTA 抗原修复可以获得质量最好的免疫荧光图像, 且肾脏组织的红细胞自发荧光不明显, 信噪比效果好。





图3 小鼠肾脏组织石蜡切片 HE 染色后高锰酸钾-草酸褪色的单切片双模态图。a、e、i 为 HE 染色图; b-d 是图 a 褪色后 EDTA 抗原修复的同一视野免疫荧光图; f-h 是图 b 褪色后 Tris-EDTA 抗原修复的同一视野的免疫荧光图; j-l 是图 i 褪色后柠檬酸抗原修复的同一视野免疫荧光图; m 为高锰酸钾-草酸褪色后不同抗原修复条件下的免疫荧光图像信噪比统计分析。标尺: 50 μm 。

Fig. 3 The single-slice bimodal images of potassium permanganate-oxalic acid decolorization after HE staining of paraffin slices of mouse renal tissue. a, e, i are HE staining. b-d are the same visual field immunofluorescence images of EDTA antigen retrieval after de-colorizing in Fig.a. f-h are the immunofluorescence images of the same visual field of Tris-EDTA antigen retrieval after de-colorizing in Fig.b. j-l are the same visual field immunofluorescence images of citric acid antigen retrieval after de-colorizing in Fig.i. m is the statistical analysis of the signal-to-noise ratio of immunofluorescence images under different antigen repair conditions after potassium permanganate-oxalic acid decolorization. Scale: 50 μm .

3.4 单切片双模态光学关联成像分析

小鼠肾脏组织 HE 染色及成像后,用冰醋酸-草酸褪色并进行 Tris-EDTA 抗原修复及免疫荧光标记,得到 HE 和免疫荧光结果如图 4 所示。我们对 HE 和免疫荧光图像进行了基于 Python 算法的图像融合,得到 HE 和免疫荧光融合图,如图 4 c 所示。图 4 所示, a 中 HE 染色图像结构清晰; b 中免疫荧光图像在经过褪色、复染后效果依然良好,细胞显微结构清晰,可与 HE 图像中的组织和细胞结构对应,且背景噪声低; c 中融合图可以将 HE 图像和免疫荧光图像的组织 and 细胞一一对应结合在一起,可以在获得组织的整体结构信息的同时,得到特定分子的表达信息和对应位置。单切片同一视野的两种模态保存完好,形态结构和细胞可以一一对照吻合,确保可以用于形态对比和互补学习。



图4 小鼠肾脏组织 HE 染色后,使用冰醋酸和草酸褪色后并用 EDTA 修复所获得的单切片双模态图。a 为 60 \times 镜下所采的 HE 染色; b 为同视野下 AQP-2 和 DAPI 双标记的肾集合管免疫荧光图像; c 为 HE 和免疫荧光融合图。

Fig. 4 After HE staining, the mouse renal tissue was decolorized with glacial acetic acid and oxalic acid and repaired with EDTA to obtain a single-slice bimodal image. a is HE staining obtained under a 60 \times microscope. b is an immunofluorescence image of the renal collecting duct labeled with AQP-2 and DAPI in the same field of view. c is the fusion image of HE and immunofluorescence.

4 总 结

单张石蜡组织切片经 HE 染色后,其伊红和苏木素染料残留会对后续免疫荧光成像造成干扰,本文在 3 种褪色处理方案下,分别搭配 3 种抗原修复方案进行了图像质量对比。实验结果证实,经冰醋酸-草酸褪色后,选取 EDTA 抗原修复获得的图像效果最好。对 HE 染色后的小鼠肾脏组织切片的 AQP-2 抗原进行免疫荧光染色与图像处理分析,结果表明, AQP-2 荧光图像信噪比为 46.19, DAPI 荧光图像信噪比为 24.22, 实现了基于小鼠肾脏组织的高质量单切片双模态光学关联成像。最后,将获得的小鼠肾脏组织切片的明场图像和荧光图像进行融合,通过融合后的图像,可以同时获取组织的形态学信息、特定蛋白的表达信息和位置信息,这对于辅助病理学家高效判断某些特殊蛋白在细胞和组织上的表达位置有重要的意义。本研究方法的提出,实现了组织病理明场图像(HE 染色)和荧光图像(免疫荧光染色)的单切片双模态光学关联成像分析,为小样本病理诊断提供了新可能,同时也为虚拟染色数据集的获得提供了新方法。值得注意的是, HE 染色和褪色处理在目前的实验中对于后续标记没有明确影响,其是否会导致某些抗原位点的标记效果欠佳、蛋白结构域改变尚未可知,有待进一步研究。另外,本研究以获取高质量图像为目标,仅从

图像信噪比的角度分析了褪色和抗原修复效果, 细胞的数量等更多角度来进行实验设计和分析, 因此在后续的研究中, 可以从蛋白表达量、阳性 佐证该样本处理方法的可行性。

参考文献:

- [1] MASOOD S. The changing role of pathologists from morphologists to molecular pathologists in the era of precision medicine[J]. *The Breast Journal*, 2020, 26(1): 27-34.
- [2] 王义强, 林方睿, 胡睿, 等. 大视场光学显微成像技术[J]. *中国光学*, 2022, 15(6): 1194-1210.
WANG Y Q, LIN F R, HU R, *et al.*. Large field-of-view optical microscopic imaging technology[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(6): 1194-1210. (in Chinese)
- [3] 王鹏, 周瑶, 赵宇轩, 等. 用于多尺度高分辨率三维成像的双环光片荧光显微技术[J]. *中国光学*, 2022, 15(6): 1321-1331.
WANG P, ZHOU Y, ZHAO Y X, *et al.*. Double-ring-modulated light sheet fluorescence microscopic technique for multi-scale high-resolution 3D imaging[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(6): 1321-1331. (in Chinese)
- [4] HARMS P W, FRANKEL T L, MOUTAFI M, *et al.*. Multiplex immunohistochemistry and immunofluorescence: a practical update for pathologists[J]. *Modern Pathology*, 2023, 36(7): 100197.
- [5] LIM H G, LIU H C, YOON C W, *et al.*. Investigation of cell mechanics using single-beam acoustic tweezers as a versatile tool for the diagnosis and treatment of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study[J]. *Microsystems & Nanoengineering*, 2020, 6: 39.
- [6] MCNAMARA K K, KALMAR J R. Pearls and pitfalls in the diagnosis of small oral biopsies[J]. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 2023, 40(5): 313-320.
- [7] LÜTGERATH C, WEIß C, BÖER-AUER A. Clinicopathological features and histological tumor residues in re-excision specimens of incompletely resected basal cell carcinomas[J]. *JDDG:Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2022, 20(11): 1476-1483.
- [8] MORRISON L E, LEFEVER M R, LEWIS H N, *et al.*. Conventional histological and cytological staining with simultaneous immunohistochemistry enabled by invisible chromogens[J]. *Laboratory Investigation*, 2022, 102(5): 545-553.
- [9] FENG CH Y, LIU F. Artificial intelligence in renal pathology: current status and future[J]. *Biomolecules and Biomedicine*, 2023, 23(2): 225-234.
- [10] WALKER P D, CAVALLO T, BONSI S M. Practice guidelines for the renal biopsy[J]. *Modern Pathology*, 2004, 17(12): 1555-1563.
- [11] OZAWA A, SAKAUE M. New decolorization method produces more information from tissue sections stained with hematoxylin and eosin stain and masson-trichrome stain[J]. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2020, 227: 151431.
- [12] FRANCIS R J, FERGUSON D, KEMPSTER S, *et al.*. Blood identified and quantified in formalin fixed paraffin embedded lung sections using eosin fluorescence[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2022, 158(4): 383-388.
- [13] 李丽, 杨桂芳. HE 染色切片褪色后再进行免疫组化染色方法的比较[J]. *数理医药学杂志*, 2015, 28(11): 1618-1619.
LI L, YANG G F. Comparison of immunohistochemical staining methods for HE stained sections after de-colorizing[J]. *Journal of Mathematical Medicine and Pharmacy*, 2015, 28(11): 1618-1619. (in Chinese)(查阅网上资料, 未找到对应的英文翻译, 请确认).
- [14] 王兴波, 陈怀敏, 王秀珍, 等. HE 染色褪色后免疫染色的病理观察[J]. *中国医药导报*, 2007, 4(22): 124, 157.
WANG X B, CHEN H M, WANG X ZH, *et al.*. Pathological observation of immunostaining after HE staining de-colorizing[J]. *Chinese Medical Bulletin*, 2007, 4(22): 124, 157. (in Chinese) (查阅网上资料, 未找到对应的英文翻译, 请确认).
- [15] 梁龄尹, 朱小兰, 骆新兰. 小标本切片 HE 染色褪色后再进行 4 种特殊染色方法的探讨[J]. *诊断病理学杂志*, 2020, 27(6): 443-444.
LIANG L Y, ZHU X L, LUO X L. Discussion on four special staining methods after HE staining de-colorizing of small specimen sections[J]. *Chinese Journal of Diagnostic Pathology*, 2020, 27(6): 443-444. (in Chinese) (查阅网上资料, 未找到对应的英文翻译, 请确认).

- [16] 蒋绍仟. HE 褪色后免疫组化染色防脱片方法的应用[J]. 四川肿瘤防治, 2000(3): 176.
JANG SH Q. Application of immunohistochemical staining anti-stripping method after HE de-colorizing[J]. *Cancer Prevention and Treatment in Sichuan*, 2000(3): 176. (in Chinese) (查阅网上资料, 未找到对应的英文翻译, 请确认).
- [17] 刘海芳. HE 染色切片褪色后免疫组化染色方法研究[J]. 中国现代医生, 2011, 49(17): 81-82.
LIU H F. Explore the method of immunohistochemical staining for HE slides after decoloration[J]. *China Modern Doctor*, 2011, 49(17): 81-82. (in Chinese)
- [18] 李钦丽, 张继伟. HE 切片经不同方法褪色后行 EGFR 基因突变检测的对比分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(8): 1004-1006.
LI Q L, ZHANG J W. Comparative analysis of EGFR gene mutation detection after different Methods of de-colorizing HE slices[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2021, 37(8): 1004-1006. (in Chinese) (查阅网上资料, 未找到对应的英文翻译, 请确认).
- [19] 章克萍, 龙飞. 组织苏木精-伊红染色的石蜡切片褪色后还原对比染色[J]. 实用临床医学, 2008, 9(1): 16.
ZHANG K P, LONG F. Reduction contrast staining after de-colorizing of paraffin slices stained with hematoxylin eosin in tissue[J]. *Practical Clinical Medicine*, 2008, 9(1): 16. (in Chinese) (查阅网上资料, 未找到对应的英文翻译, 请确认).
- [20] 高洪彬, 梁十, 郭扬清, 等. HE 切片褪色后进行免疫荧光染色的方法探讨[J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(10): 1241-1242.
GAO H B, LIANG SH, GUO Y Q, *et al.*. Discussion on the method of immunofluorescence staining after HE section de-colorizing[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2020, 36(10): 1241-1242. (in Chinese) (查阅网上资料, 未找到对应的英文翻译, 请确认).
- [21] KOMURA D, ONOYAMA T, SHINBO K, *et al.*. Restaining-based annotation for cancer histology segmentation to overcome annotation-related limitations among pathologists[J]. *Patterns*, 2023, 4(2): 100688.
- [22] LI ZH M, MUENCH G, GOEBEL S, *et al.*. Flow chamber staining modality for real-time inspection of dynamic phenotypes in multiple histological stains[J]. *PLoS One*, 2023, 18(5): e0284444.
- [23] JOHANN D J, SHIN I J, ROBERGE A, *et al.*. Effect of antigen retrieval on genomic DNA from immunodissected samples[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2022, 70(9): 643-658.
- [24] GEORGE B, HAQUE A, SAHU V, *et al.*. Enhancing antigen retrieval to unmask signaling phosphoproteins in formalin-fixed archival tissues[J]. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2022, 30(5): 333-339.
- [25] DUNKENBERGER L, DEL VALLE L. *Antigen retrieval and signal amplification*[M]//DEL VALLE L. Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Methods and Protocols. New York: Humana, 2022: 65-74.

作者简介:



高歌 (1998—), 女, 河南平顶山人, 硕士研究生, 就读于海南大学生物与医药专业。E-mail: 20086000210009@hainanu.edu.cn