

# 免疫組織化學染色發展的歷史回顧

曾慶誠<sup>1</sup>

<sup>1</sup>奇美醫學中心病理部，台南，台灣

## 摘要

免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry; IHC) 是運用免疫反應 (immune response) 中，抗原 (antigen; Ag) 和抗體 (antibody; Ab) 間的專一結合性，並藉抗體上所呈現的訊號，來觀察細胞或組織切片中，是否有目標抗原存在。這項單純的概念一直到1941年，才首次用帶螢光色素 (fluorochrome) 的抗體，在組織切片中，觀察到肺炎雙球菌 (diplococcus pneumoniae)。自此之後的七十年當中，各類的相關技術不斷地被改良。本文針對其中關鍵性的突破，包括單株抗體 (monoclonal antibody; mAb) 問世、石蠟組織 (paraffin tissue) 抗原修復 (antigen retrieval) 和偵測訊號強化等，加以闡述。歷經數十年的改進後，免疫組織化學染色法已是今日臨床醫學和研究上，相當常用的重要工具，它不但具有很好的特異性 (specificity) 和靈敏度 (sensitivity)，也更為簡便快速和成本低廉。(生醫2012;5(2):105-111)

關鍵字：免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry; IHC)、單株抗體 (monoclonal antibody; mAb)、抗原修復 (antigen retrieval)、辣根過氧化物酶 (horseradish peroxidase; HRP)、二氨基聯苯胺 (diaminobenzidine; DAB)、卵白素 (avidin)、鏈黴親和素 (streptavidin)、生物素 (biotin; 維他命H)

## 前言

免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry; IHC) 或簡稱免疫組化，正如其名稱所示，是結合了三個不同領域的專業—免疫學 (immunology)、組織學 (histology) 與化學 (chemistry) 一所發展出來的一項技術。它能在組織切片、細胞抹片或培養檢體上，運用免疫反應 (immune response) 中抗原

(antigen; Ag) 和抗體 (antibody; Ab) 間的專一結合性，並在抗體上呈現可供偵測的訊號 (reporter)，

以便觀察檢體中是否有目標抗原的存在。

免疫組化的理論想法早在1930年之前就被談論，但一直到1941年才實現以帶有螢光色素 (fluorochrome) 的抗體，在組織切片中成功觀察到肺炎雙球菌 (diplococcus pneumoniae) 抗原的存在。

通訊作者：曾慶誠 醫師

電話：886-6-281-2811 ext 52621

傳真：886-6-251-1235

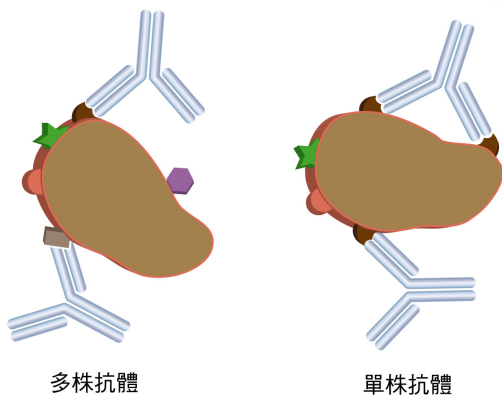
地址：710 台南市永康區中華路901號

電子郵件：530001@mail.chimei.org.tw

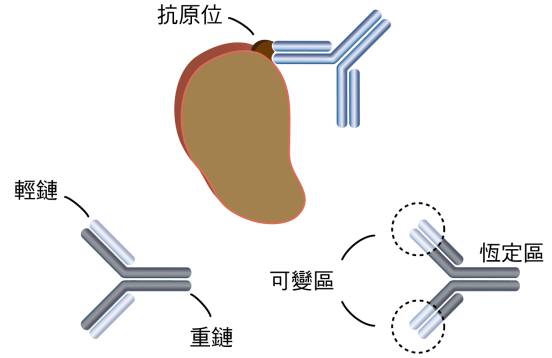
自此之後，一直到最近幾年裡，免疫組化技術不斷地被推陳出新。由於免疫組化實驗的常規操作步驟，以及許多應注意的細節，已有很多資料可供參考，因此本文中將不再重複，僅針對過去七十年中的一些關鍵性突破，加以詳述。期望藉由這段科技發展重要里程碑的串聯，能帶給讀者不同的感受與激盪。

## 單株抗體的問世

免疫組化的基礎是建立在抗原和抗體的專一性結合，因此，「抗體」顯然扮演極重要的角色。免疫組化所用的抗體可分為多株（polyclonal）和單株（monoclonal）兩類型。早期使用的均屬多株抗體，其製造是將純化後的抗原，注射至動物體中引發免疫反應，然後再從動物血中，獲取含所需抗體的免疫血清。它們是由多個B淋巴細胞株，所產生的抗體混合物，這類抗體會與抗原上的多種抗原位（epitope）結合，因此，特異性（specificity）較差，也較易引起交叉反應（cross reaction）。單株抗體則是從已被免疫的動物體中，篩選一個符合需求的B淋巴細胞，再運用細胞融合雜交瘤（hybridoma）技術備製所要的抗體。這類抗體僅辨識抗原的某單一抗原位，所以用它進行免疫組化實驗時，其特異性強，敏感性也高。（圖一）



圖一、單株抗體在辨識目標抗原位的專一性遠優於多株抗體（彩圖詳見本刊網頁）



圖二、抗體結構中的可變區會與目標抗原位進行專一性結合（彩圖詳見本刊網頁）

在免疫學的發展里程中，有幾項重要發現與抗體關係最直接。首先是Paul Ehrlich（德國，1854-1915；獲1908年諾貝爾獎）於1897年最早描繪出今日抗體的雛型概念。1948年Astrid Fagraeus（瑞典，1913-1997）指出抗體的製造者是漿細胞（plasma cell）。1959-1962年間基於Rodney R. Porter（英國，1917-1985）和Gerald M. Edelman（美國，1929-至今）的研究，確立了今日「Y字型抗體」的分子結構，他們並分享1972年諾貝爾獎尊榮。他們指出抗體是由一對輕鏈（light chain）和另外一對重鏈（heavy chain）所組成，其間以二硫鍵（disulfide bond）將它們聯結在一起（圖二）。在Y形上半部的V處兩邊，分別由一條輕鏈及一條重鏈所組成，代表的是可變區（variable region，或稱Fab），負責與目標抗原的抗原位結合。而Y形下半部的其他重鏈部份是恆定區（constant region，或稱Fc），它將與其它抗體、補體（complement）或帶有Fc受體（receptor）的免疫細胞結合。現在免疫組化所使用抗體，幾乎都是單株類。單株抗體的備製是基於Niels K. Jerne（瑞典，1911-1994）、César Milstein（英國，1927-2002）和Georges J.F. Köhler（德國，1946-1995）三位學者長期研究，並於1975年所確立的技術。他們三位也併列為1984年的諾貝爾獎得主<sup>1,2</sup>。

## 石蠟組織抗原修復

免疫組化的存在是為了觀察組織或細胞上的「目標抗原 (target antigen)」。凡具有抗原性的物質，只要能夠為抗體所辨識與結合的，基本上都可以進行免疫組化檢測。抗原的類型可以是蛋白質 (protein)、多肽 (polypeptide)、核酸 (nuclear acid)、部份類脂 (lipoid)、多醣 (polysaccharide)、激素 (hormone)、各種病原體 (pathogen) (如寄生蟲 [parasite]、細菌 [bacterium]、病毒 [virus] 等)、受體、神經遞質 (neurotransmitter) 等。如何讓目標抗原能順利的與其對應抗體完成專一性結合，也是免疫組化所必須重視的關鍵。

早期的免疫組化運作，多侷限於培養細胞和冰凍組織切片，部份原因是與目標抗原無法順利和對應抗體結合有關。而病理作業通常包括組織切片和細胞抹片兩類檢體。前者又包括石蠟切片 (paraffin section) 和冰凍切片 (frozen section)，其中石蠟切片尤其常用。石蠟切片的病理組織，通常需經過福馬林固定，再進行石蠟包埋 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE)，如此處理後的病理組織，可長期性地保存其原來形態，並適合各種染色觀察<sup>3</sup>。除常規病理診斷使用外，也是許多回顧性研究的珍貴材料。因此，如何在石蠟切片上，可靠地進行免疫組化實驗，就格外為大家重視。

但組織經福馬林固定後，會使細胞內的抗原產生改變，進而封閉部份抗原位，同時蛋白間也會發生交叉聯結 (cross-linking)，使更多抗原位被隱蔽住<sup>3</sup>。因此在進行免疫組化實驗前，要有「抗原修復 (antigen retrieval)」的步驟，往往是藉由破壞前述分子間的交聯，來恢復抗原的原本空間形態，使其抗

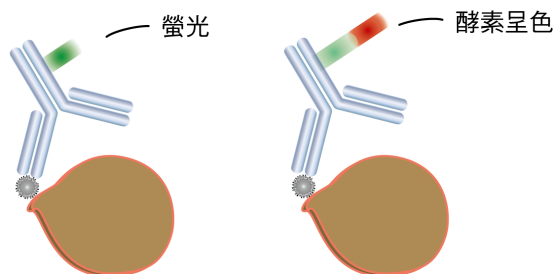
原重新露出，以利對應抗體的結合。冰凍切片和細胞抹片因為沒有這類阻礙，所以在免疫組化實驗的發展過程中，比較容易成功。

在各類企圖解決抗原修復的方法中，最先被廣泛採用的是1975年所提出的酵素消解 (enzymatic digestion) 法<sup>4</sup>，隨後有許多不同的酵素 (enzyme) 被用來進行抗原修復，但這類方式終究只能達成一部份抗原的修復，卻又會同時破壞組織原本的形態，因此，並不理想。直到1991年發現的加熱方式<sup>5</sup>，它可以輕易地改善前述的缺點。隨後有多種類似的改良做法被報導。有關加熱修復抗原的原理雖有許多報導，但迄今仍無被廣泛認同的說法。由於加熱修復抗原的效果好、簡單又便宜，自然成為今日病理作業的主流選擇<sup>6</sup>。

## 偵測訊號的強化

最早的免疫組化運用發表於1941年，當時是以有螢光標示的抗體，在組織切片中觀察到肺炎雙球菌抗原的存在<sup>7</sup>。他們當時所用的技術，現在稱之為「直接型檢測法」，或稱一階式檢測法 (one-step method) (圖三)。每個抗原位置只被一個對應抗體所結合，而該抗體上也只攜帶一個螢光色素，因此靈

直接型檢測法 (一階式檢測法)

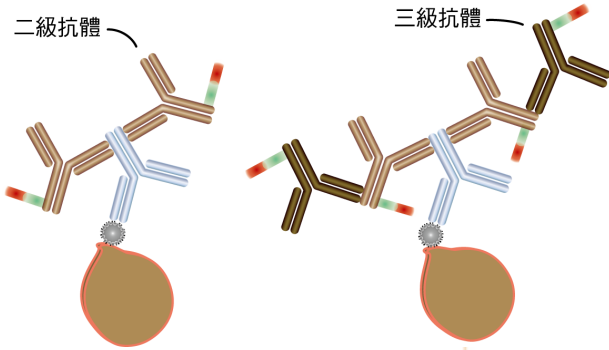


圖三、與抗原結合後的抗體可藉其上的各種訊號來進行觀察 (彩圖詳見本刊網頁)

間接型檢測法

二階式檢測法

三階式檢測法



圖四、最早用來增強訊號的做法是逐步堆砌式增加訊號抗體 (彩圖詳見本刊網頁)

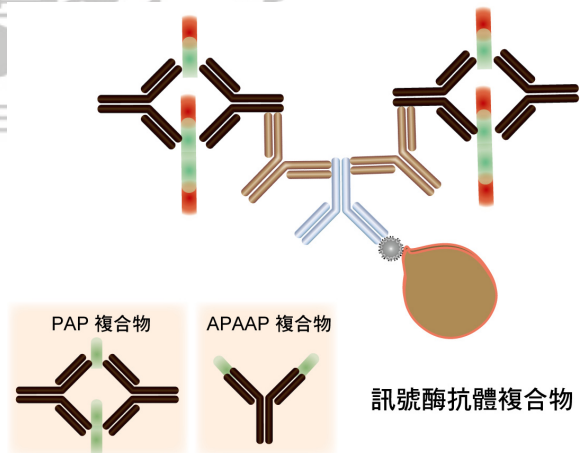
敏感度 (sensitivity) 並不好。此外，這種方法若運用在石蠟組織切片上，其檢測效果更是不理想。

以上缺失在1966年，才由美、法兩國學者，分別提出解決的辦法。他們將上述抗體所攜帶的螢光色素，以一種會誘發呈色反應的過氧化物酶 (peroxidase) 來取代<sup>8,9</sup>。這項技術性的改善，使得免疫組化實驗，在常規病理FFPE組織切片的運用上，獲得重大的突破，也因此加速了相關研發的腳步。

現今病理作業中，已有多種可被用來誘發呈色反應的酶 (簡稱訊號酶)，其中最常用的是辣根過氧化物酶 (horseradish peroxidase; HRP)，也有一些實驗室採用鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase; ALP)。抗體所攜帶的HRP會在含過氧化氫 (hydrogen peroxide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 情況下，使原本無色的基質 (substrate) 產生有顏色的沉積物，以便於在光學顯微鏡下觀察。最常用的基質是二氨基聯苯胺 (diaminobenzidine; DAB)，它會呈現穩定的褐色，而且長期不褪色。另一較少用的基質是3-胺基-9-乙基咪唑 (3-Amino-9-ethylcarbazole; AEC) 它會呈現紅色，但容易褪色，且需要特別的處理<sup>10</sup>。

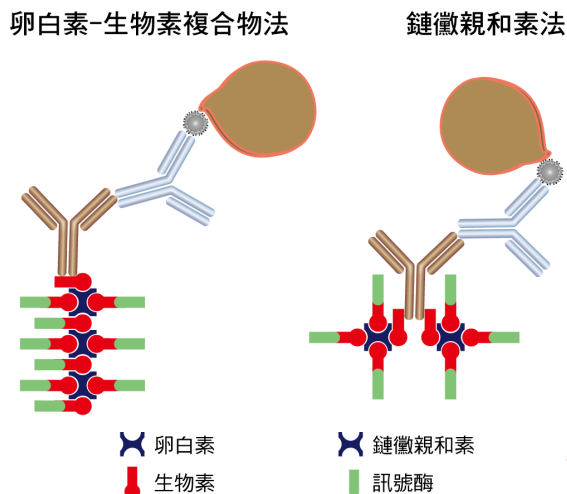
在1966年之後的一段時間裡，主要是想辦法增加抗體上訊號酶的數量，因此發展出「間接型檢測法」。初期採用直接「堆砌式」的做法，包括使用二級抗體 (secondary Ab)，甚至三級抗體 (tertiary Ab)，分別稱之二階與三階式檢測法 (two or three-step method) (圖四)。每一級抗體均產自於不同的動物，且上一級的抗體可與下一級的抗體做專一性的結合。由於最終抗體群變大了，其上訊號酶的數量也就相對增加，進而提高目標抗原處所呈現的訊號。後來發展出另類新的做法，即過氧化物酶-抗過氧化物酶 (peroxidase-antiperoxidase; PAP) 和鹼性磷酸酶-抗鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase; APAAP) 兩種染色法<sup>11,12</sup>。他們相當於「堆砌式」中的三級抗體，先另外處理，使之攜帶較多訊號酶。但此攜帶酶的抗體群，與一級抗體均來自相同的動物。而二級抗體的角色是將此前述兩者連接在一起 (圖五)。

或許是在這種概念延伸下，徐世銘教授在美國的研究室，於1981年率先報導「卵白素-生物素複合物 (avidin-biotin complex; ABC)」的技術，並證實



圖五、橋樑式抗體導入訊號抗體群的方式也曾用來增強訊號 (彩圖詳見本刊網頁)





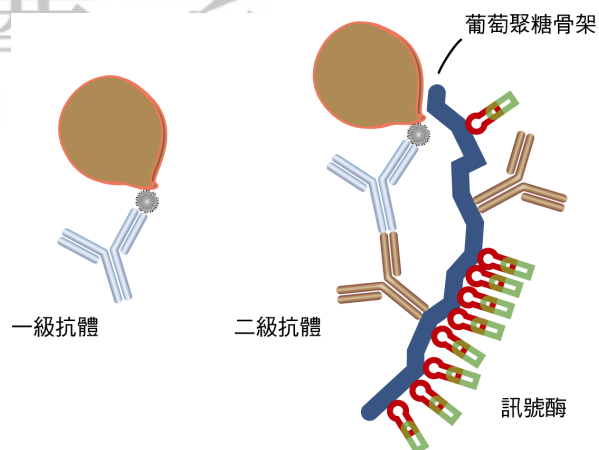
圖六、抗體群訊號的強化也可採用生物素與卵白素等複合物（彩圖詳見本刊網頁）

它可顯著增強免疫組化的偵測訊號，因而大幅改善實驗的靈敏度<sup>13</sup>（圖六）。有趣的是ABC方法中的幾個主角，其相關性質與功能，多年前便已知曉。在1941年就已知卵白素（avidin）是一種萃取自卵蛋白（ovalbumin; OVA）的醣蛋白（glycoprotein; GP）<sup>14</sup>；另一種極類似的物質為鏈黴親和素（streptavidin; SA）也於1964年被發現，它可由streptomyces avidinii (S. avidinii) 此種鏈黴菌中獲得<sup>15,16</sup>。生物素（biotin; 維他命H）也大約在此前後，被發現其特殊的結構中，有四處可分別與卵白素或鏈黴親和素，以及訊號酶（如HRP和ALP等）結合<sup>17-19</sup>。

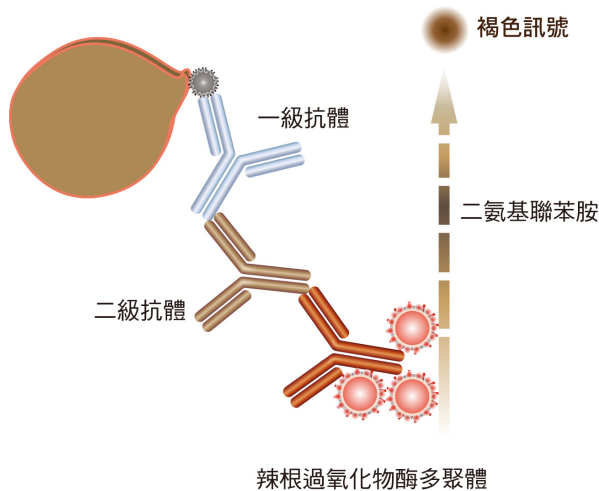
值得注意的是，採用生物素攜訊號酶的免疫組化方法，現在很多病理實驗室幾乎已不再使用卵白素的ABC方法，但也許還用鏈黴親和素類的方法（labeled streptavidin-biotin; LSAB），這是因為卵白素具有嚴重非專一性背景干擾。由於卵白素的等電點（isoelectric point; pI）為10，所以在組織常態酸鹼值下，它與外源凝集素（lectin）類物質和其他帶負電荷的組織成份，具有很好的親和性之故。鏈黴親和素的pI值接近中性，所以上述類背景干擾的缺失較

少。但LSAB方法在很多狀況下，還是會有背景干擾狀況，主要是因為某些組織細胞中，特別是肝臟和腎臟，就存在有大量的生物素（統稱內源性生物素〔endogenous biotin〕）<sup>10</sup>。

為解決上述的困擾，另一類完全不涉及生物素的方法（biotin-free polymeric visualization systems; BFPS），也就在十多年前被開發出來。這類方法中最早的产品，為DAKO公司所發展的EPOS（Enhanced Polymer One Step）系列。它是藉一龍骨狀的葡萄聚糖（dextran）骨架（backbone）合成物（例如酵母葡聚多醣體〔glucopolysaccharide; GPS〕）同時攜帶抗體及70個訊號酶結合而成。由於訊號酶數量多，隨後的呈色訊號自然也就較強。此系列葡萄聚糖上的抗體，可直接與組織切片上的目標抗原形成複合體，即所謂直接型一階式反應。其缺點是所攜帶之抗體為第一階抗體，因而只能用來檢測其鎖定的目標抗原，也限制了其運用範疇。但有研究報告指出，當冷凍切片診斷需要免疫組化協助時，它恐怕是一項不錯的選擇<sup>20-22</sup>。DAKO繼續開發的EnVision™+Kits系列，即以二階式間接反應方式，將葡萄聚糖上的抗體改為第二階性質，來擴張其運用範疇（圖七）<sup>23,24</sup>。然而，它



圖七、葡萄聚糖骨架的方式是藉攜帶大量訊號酶來增強訊號（彩圖詳見本刊網頁）



圖八、新發展的訊號強化方法採用體積較小的訊號酶聚合物（彩圖詳見本刊網頁）

還是有缺失，因為整個葡萄聚糖及所承載的抗體和訊號酶，因分子結構很大，所以不容易接近某些目標抗原，因而導致較差或偽陰性（false-negative）的實驗結果。

為解決上述以葡萄聚糖為骨架的缺點，近年來已有多家廠商，提供另類新系統。基本上它們是藉由化學技術操作，將數個訊號酶，形成體積較小的聚合物，稱之微聚合體（micropolymer）或密質聚合體（compact polymer）等（圖八），如Advance（DAKO）、NovoLink（Leica）、OptiView（Ventana/Roche）、ImmPRESS（Vector）、SuperPicTure/PicTure Max（Zymed）、Super Sensitive non-biotin（Biogenex）、Mouse/Rabbit Polydetector HRP/DAB（Cell Marque）等。值得注意的是，這類BFPS商品試劑，顯然有快速取代LASB染色法的傾向<sup>25-27</sup>。

## 結語

免疫組化歷經數十年不斷地改進後，現在已成為今日臨床醫學和生物研究上的重要工具。它不

但具有很好的特異性和靈敏度，也更為簡便快速和成本低廉。實驗結果可以呈現多種螢光色彩，或是經化學反應後，顯現不同的可見光顏色。搭配光學顯微鏡（light microscope）或螢光顯微鏡（fluorescence microscope），甚至共焦顯微鏡（confocal microscope）的觀察，可研判組織或細胞中，是否存有目標抗原，以及其存在的位置，也能為目標抗原進行半定量測定。如果搭配顯微分光光度計（microspectrophotometer）、圖像分析儀（image analyzer）等特殊設備，還能進行更客觀的半定量測定。

在臨床上運用免疫組化染色進行病理診斷時，除了必須做好相關的品質管制（quality control; QC）和品質保證（quality assurance; QA）外，一定要特別注意兩件事，首先，在運用免疫組化染色前，基本的H&E染色切片評估，一定要先做好，千萬不可本末倒置。其次，是在運用免疫組化染色協助診斷時，往往需要針對數種目標抗原進行染色，因此，如何選擇合適的抗體，也是一門大學問，若缺乏恰當的認知，往往因浮濫使用，而浪費許多資源，甚至可能會誤導診斷<sup>28</sup>。所幸，目前已有很多的網路資料<sup>29</sup>，可供即時查詢。

## 引用文獻

1. Gronski P, Seiler FR, Schwick HG. Discovery of antitoxins and development of antibody preparations for clinical uses from 1890 to 1990. *Mol Immunol* 1991;28:1321-1332.
2. Llewelyn MB, Hawkins RE, Russell SJ. Discovery of antibodies. *BMJ* 1992;305:1269-1272.
3. Boon ME, Kok LP. Theory and practice of combining coagulant fixation and microwave histoprocessing. *Biotech Histochem* 2008;83:261-277.
4. Huang SN. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab Invest* 1975;33:88-95.
5. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-

- fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-748.
6. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga PP, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 1997;183:116-123.
  7. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941;47:200-202.
  8. Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 1966;14:929-931.
  9. Avrameas S, Uriel J. [Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]. [Article in French] *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1966;262:2543-2545.
  10. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005;42:405-426.
  11. Mason TE, Phifer RF, Spicer SS, Swallow RA, Dreskin RB. An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J Histochem Cytochem* 1969;17:563-569.
  12. Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970;18:315.
  13. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
  14. György P, Rose CS. CURE OF EGG-WHITE INJURY IN RATS BY THE "TOXIC" FRACTION (AVIDIN) OF EGG WHITE GIVEN PARENTERALLY. *Science* 1941;94:261-262.
  15. STAPLEY EO, MATA JM, MILLER IM, DEMNY TC, WOODRUFF HB. ANTIBIOTIC MSD-235. I. PRODUCTION BY STREPTOMYCES AVIDINII AND STREPTOMYCES LAVENDULAE. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 1963;161:20-27.
  16. CHAIET L, WOLF FJ. THE PROPERTIES OF STREPTAVIDIN, A BIOTIN-BINDING PROTEIN PRODUCED BY STREPTOMYCES. *Arch Biochem Biophys* 1964;106:1-5.
  17. GREEN NM. AVIDIN. 3. THE NATURE OF THE BIOTIN-BINDING SITE. *Biochem J* 1963;89:599-609.
  18. WEI RD, WRIGHT LD. HEAT STABILITY OF AVIDIN AND AVIDIN-BIOTIN COMPLEX AND INFLUENCE OF IONIC STRENGTH ON AFFINITY OF AVIDIN FOR BIOTIN. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964;117:341-344.
  19. LICHSTEIN HC, BIRNBAUM J. COMBINABILITY OF AVIDIN AND STREPTAVIDIN WITH ANALOGS OF BIOTIN. *Biochem Biophys Res Commun* 1965;20:41-45.
  20. Chilosi M, Lestani M, Pedron S, Montagna L, Benedetti A, Pizzolo G, Menestrina F. A rapid immunostaining method for frozen sections. *Biotech Histochem* 1994;69:235-239.
  21. Tsutsumi Y, Serizawa A, Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen: application to intra-operative frozen diagnosis. *Pathol Int* 1995;45:108-115.
  22. Richter T, Nährig J, Komminoth P, Kowolik J, Werner M. Protocol for ultrarapid immunostaining of frozen sections. *J Clin Pathol* 1999;52:461-463.
  23. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* 1998;51:506-511.
  24. Vosse BA, Seelentag W, Bachmann A, Bosman FT, Yan P. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15:103-107.
  25. Ramos-Vara JA, Miller MA. Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: ENVISION+ and ImmPRESS. *J Microsc* 2006;224:135-139.
  26. Rocha RM, Miller K, Soares F, Schenka N, Vassallo J, Gobbi H. Biotin-free systems provide stronger immunohistochemical signal in oestrogen receptor evaluation of breast cancer. *J Clin Pathol* 2009;62:699-704.
  27. Skaland I, Nordhus M, Gudlaugsson E, Klos J, Kjellevoid KH, Janssen EA, Baak JP. Evaluation of 5 different labeled polymer immunohistochemical detection systems. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:90-96.
  28. Rüdiger T, Höfler H, Kreipe HH, Nizze H, Pfeifer U, Stein H, Dallenbach FE, Fischer HP, Mengel M, von Wasielewski R, Müller-Hermelink HK. Quality assurance in immunohistochemistry: results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am J Surg Pathol* 2002;26:873-882.
  29. An immunohistochemical vade mecum-Dr Paul W Bishop, BA MB BCh FRCPath, Consultant Histopathologist, Wythenshawe Hospital, South Manchester, M23 9LT, UK, [http://e-immunohistochemistry.info/web/histopathology\\_help.htm](http://e-immunohistochemistry.info/web/histopathology_help.htm) (accessed May, 10, 2012)