

激光捕获显微切割技术进展与应用

王若宇, 孟 强

(云南省第一人民医院神经内科, 昆明 650032)

【摘要】激光捕获显微切割技术能从复杂的组织样品中精确地分离出纯净的单一类型细胞群或单个细胞, 是研究组织或细胞特异性表达及其分子机制的常用工具, 是 21 世纪生命科学领域不可缺少的技术。激光捕获显微切割技术现已广泛应用于缺血性脑血管疾病的研究。本文介绍了激光捕获显微切割的原理、分类、发展、应用及展望, 并对激光捕获显微切割在脑缺血中的应用作了简要分析。

【关键词】激光捕获显微切割; 脑缺血; 激光; 脑血管; 脑卒中

【中图分类号】R-331

【文件标志码】A

【收稿日期】2018-09-17

Advances in laser capture microdissection and its clinical application

Wang Ruoyu, Meng Qiang

(Department of Neurology, First People's Hospital of Yunnan)

【Abstract】Laser capture microdissection (LCM) technique can accurately separate a single type of cells or a single cell from complex tissue samples. It is a common tool for studying the specific expression of tissue or cells and their molecular mechanism and is an indispensable technique in the field of life sciences in the 21st century. At present, LCM has been widely used in the research on ischemic cerebrovascular diseases. This article describes the principle, classification, development, application, and perspectives of LCM and analyzes the application of LCM in cerebral ischemia.

【Key words】laser capture microdissection; cerebral ischemia; laser; blood vessel of brain; stroke

随着我国人口老龄化的日益加剧, 脑血管疾病越来越受到人们的关注及重视, 其中缺血性脑血管疾病更是成为威胁人类健康的主要疾病之一。我国每年约有 300 万人死于缺血缺氧性心脑血管疾病。因此, 对于缺血性脑血管病发病机制的研究越来越重要。

哺乳动物脑细胞具有很高的异质性^[1], 不同部位的各种细胞在缺血后的病理反应也不尽相同。为了研究各类细胞的功能, 必须将它们从周围的复杂细胞中分离出来。因此, 获得纯净的目的细胞以进行研究成为脑组织研究在分子水平上的一大目标。

获得目的细胞的方法多为体外细胞培养、免疫磁珠分选

或手工显微切割, 但传统的方法难以再现活体特征或无法保证切割精度^[2]。1996 年, 美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 国家肿瘤研究所的 Emmert-Buck 等开发出激光捕获显微切割技术 (laser capture microdissection, LCM)^[3]。激光捕获显微切割技术是目前最先进、自动化程度最高的组织纯化病理技术^[4-8], 能在显微镜下观察并分辨出特异的组织或细胞, 利用激光束, 从样品切片中收集到纯净的单一类型细胞群或单个细胞^[9-10], 成功解决了样品异质性的问题。LCM 以其快速、精确等优点, 成为研究组织或细胞的特异性表达和分子机制的有力工具, 特别适合于异质性较高的缺血性脑血管疾病研究。

1 激光捕获显微切割的基本原理及操作过程

LCM 主要由显微镜、激光装置、载物台控制系统等几部分组成。LCM 的基本原理是利用激光装置发出的低能红外激光脉冲, 使收集盖上的热塑膜——乙烯乙酸乙烯酯共聚物

作者介绍: 王若宇, Email: 15687131107@163.com,

研究方向: 脑卒中等脑血管疾病研究。

通信作者: 孟 强, Email: mq301@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81460188); 云南省医学领军人才资助项目 (编号: L-2017013)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200302.0905.002.html>
(2020-03-03)

(EVA)瞬间溶解,包埋特定细胞群以获得目的细胞。操作时,首先将附有组织切片的载玻片置于显微镜平台上,切片成像于电脑屏幕上,将选择的细胞调整至视区中心,然后操纵传动臂将附有 EVA 热塑膜的收集盖放置于切片正上方,按动按钮,激发脉冲光,融化薄膜,使其延展开并包埋其下的目的细胞。激光发射结束后,控制机械臂将收集盖移出,获得特定的目的区域细胞。将获得的细胞-EVA 复合物转移至解离缓冲液中,组织与薄膜解离,细胞进一步降解,获得蛋白质、DNA 等生物大分子成分;或使用多聚物溶解液,将复合物溶解,保持完整的细胞结构,以进行下一步细胞内特殊结构研究。

2 激光捕获显微切割的发展与分类

显微切割经历了手动显微切割、机械辅助显微切割、液压控制显微切割及激光捕获显微切割 4 个阶段。激光捕获显微切割技术是目前最先进、自动化程度最高的显微切割技术,其优点在于快速、简单、精确、特异性强,且适用范围很广,几乎适用于任何玻片类型。另外,激光捕获显微切割采用近红外光,能量低,不会对样品产生较大的影响^[11-13]。

2.1 样品制备的发展

样品的制备包括固定、包埋、切片等步骤。激光捕获显微切割要求样品既要保持其细胞学形态,又要保证其中生物分子如 RNA 等的完整性,要求特殊,一度成为激光捕获显微切割推广应用的阻碍。目前应用于激光显微切割的切片主要有石蜡切片和冰冻切片,其中冰冻切片没有盖玻片覆盖,无法长时间保存,制备完成后需立即进行后续激光显微切割,因此石蜡切片被广泛应用。

2.2 RNA 提取扩增技术的发展

对于用激光显微切割所得的少量细胞进行芯片分析这一技术得益于微量 RNA 抽提和高保真 RNA 扩增技术^[14]。Epicentre、Arcturus 等公司生产的 RNA 提取扩增试剂盒为芯片分析提供了保证,在各实验室操作中已被成功应用^[12]。

2.3 激光捕获显微切割与其他技术的结合

2.3.1 与免疫组化的结合 对于常规染色、不加盖玻片或本身结构特点不明显的组织样品,激光捕获显微切割操作中的视觉分辨会受到很大限制,对实验结果产生很大程度的影响。通过特殊的染色方法,特别是免疫组化方法,可以使目的细胞与周围其他细胞表现出明显的区别,成功避免了上述组织分辨率过低的问题^[8]。但是,与免疫组化结合的激光显微切割具有一定的局限性,即由于抗体与目标蛋白的结合使蛋白质表达的研究受限^[15]。因此,可以通过采用高浓度、高亲和力的抗体并缩短染色时间以减少 RNA 降解,优化免疫激光显微切割过程^[12]。

2.3.2 与线性扩增技术的结合 激光捕获显微切割虽然可以获得较为纯净的目的细胞,但捕获的细胞数量有限,且获得的 RNA 容易降解丢失,因此,由样品得到的 RNA 总量很少,给后续研究造成极大的困难^[1]。将由激光显微切割获得的 RNA 样品进行线性扩增,可在保持原有丰度不变的基础上对其进行放大^[16]。

2.3.3 与 RT-PCR 的结合 RT-PCR 和激光捕获显微切割的结合可以用于下游 RNA 的研究,进而对细胞类型的特异性或组织区域的特异性进行分析^[17]。

2.3.4 与蛋白组学的结合 蛋白组学的研究可以补充基因组学研究产生的大量基因信息,完善基因组学对病理生理学、分子诊断等方面的诠释^[18]。

2.4 激光捕获显微切割的分类

激光捕获显微切割法可分为激光压力弹射法、激光切割消融法、静电收获法等^[9]。这些方法都有各自的优势,要根据具体实验要求进行合理的选择。比如,激光压力弹射的主要好处在于不接触样品就能对目的细胞组织进行收集,此过程可以利用内置显微镜进行实时监控并及时记录存盘,借助纤维光束仪器的自动激光压力弹射功能,细胞在弹射过程中已经被均质化,从而可以直接取得蛋白质,为进一步处理做好准备^[19]。

3 激光捕获显微切割的应用

3.1 激光捕获显微切割在缺血性脑血管疾病研究中的应用

由于大脑细胞的异质性,脑缺血后,不同细胞的病理反应不同。缺血半暗带在缺血过程中的发展变化直接决定脑缺血的预后状况,其中微血管内皮细胞和神经元细胞相互作用,在缺血的损伤及修复过程中起着非常重要的作用^[9]。应用激光捕获显微切割技术可以精确地获得大脑组织中的微血管内皮细胞和神经元细胞,为下游进一步的分析和研究提供可能^[7]。

3.2 激光捕获显微切割在肿瘤研究中的应用

目前,激光捕获显微切割在肿瘤的研究中已经得到广泛应用,其中单细胞分析、蛋白质大分子分析、DNA 分析、mRNA 及 cDNA 分析的应用最为广泛^[10]。

3.3 激光捕获显微切割在其他领域研究中的应用

近年来,激光显微切割技术的发展日益加快,已经广泛应用于生命科学各领域研究,除了上述在脑血管疾病中的应用外,激光捕获显微切割技术也成功地应用于其他某些疾病的研究中,如肿瘤、获得性免疫缺陷综合征、子宫内膜异位症、丙型肝炎、结核病等^[18-19]。另外,激光显微切割还可用于实时 PCR、蛋白质组和染色体组表达谱分析等领域的研究^[15]。

4 激光捕获显微切割展望

激光捕获显微切割技术是目前自动化程度最高的组织纯化病理技术^[5-8],有效地解决了细胞组织样品异质性的问题,具有快速、精确等诸多优点,在生命科学领域已经得到广泛应用,并且显示出良好的发展前景。但目前仍存在一些不足,需要进行发展和完善。一方面,样品切片的制备和染色过程可能会对细胞的状态及 RNA 和蛋白质的正常生理功能产生影响,能够成功避免这类问题的制片方法仍需进行探索;另一方面,激光捕获显微切割后续获得的 RNA 样品极易降解^[12,20]。因此,RNA 的保存也是亟待解决的问题。就激光捕获显微切割技术本身而言,发展更精确、单一的细胞捕获技术,将有利于减少基于 PCR 技术引起的污染。另外,激光捕获显微切割技术的自动化程度尚可可在一定程度上进行提高,如计算机控制组织细胞的捕获,以提高研究效率。总之,激光捕获显微切割技术以其高精度度的样本捕获优势成为近些年分子生物学领域不可或缺的技术,但进步空间依然很大,扩大应用的方法仍待探索。

参 考 文 献

- [1] Kamme F, Salunga R, Yu J, et al. Single cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(9): 3607–3615.
- [2] Park JA, Choi KS, Kim SY, et al. Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule to cell based approaches[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(2): 247–253.
- [3] 马军亮, 刘伦旭. 激光捕获显微切割技术在分子生物学研究中的应用[J]. *广东医学*, 2009, 30(10): 1574–1576.
- [4] 王振宁, 张学, 徐惠绵, 等. 激光捕获显微切割技术的原理及应用[J]. *国外医学遗传学分册*, 2001, 24(2): 61–63.
- [5] Gutstein HB, Morris JS. Laser capture sampling and analytical issues in proteomics[J]. *Expert Rev proteomics*, 2007, 4(5): 627–637.
- [6] Park JA, Choi KS, Kim SY, et al. Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule-to cell-based approaches[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(2): 247–253.
- [7] Datta S, Malhotra L, Dickerson R, et al. Laser capture microdissection: big data from small samples[J]. *Histol Histopathol*, 2015, 30(11): 1255–1269.
- [8] Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, et al. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis[J]. *Trends Genet*, 1998, 14(7): 272–276.
- [9] 刘迎福, 肖志强, 张鹏飞, 等. 人原发性肺腺癌转移相关分子的定量蛋白质组学研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(4): 448–457.
- [10] 孙昱皓, 樊军卫, 袁国强, 等. 激光捕获显微切割和基因芯片技术用于肿瘤实质细胞转录组的构建[J]. *肿瘤*, 2008, 28(9): 802–804.
- [11] Makino H, Uetake H, Danenberg K, et al. Efficacy of laser capture microdissection plus RT-PCR technique in analyzing gene expression levels in human gastric cancer and colon cancer[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 210.
- [12] 王文勇, 黄晓峰, 闫庆国, 等. 激光捕获显微切割技术新进展[J]. *诊断病理学杂志*, 2010, 17(3): 226–228.
- [13] Sun M, Ma L, Xu L, et al. A human novel gene DERPC on 16q22.1 inhibits prostate tumor cell growth and its expression is decreased in prostate and renal tumors[J]. *Mol Med*, 2002, 8(10): 655–663.
- [14] Ball HJ, McParland B, Driussi C, et al. Isolating vessels from the mouse brain for gene expression analysis using laser capture microdissection[J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2002, 9(3): 206–213.
- [15] Klink VP, Alkharouf N, Macdonald M, et al. Laser capture microdissection (LCM) and expression analyses of glycine max (soybean) syncytium containing root regions formed by the plant pathogen *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode)[J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(6): 965–979.
- [16] Dilillo M, Pellegrini D, Ait-Belkacem R, et al. Mass spectrometry imaging, laser capture microdissection, and LC-MS/MS of the same tissue section[J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(8): 2993–3001.
- [17] 伊正君, 朱道银. 蛋白质组学的相关技术研究进展[J]. *国外医学生物医学工程分册*, 2005, 28(5): 318–320.
- [18] 田应选, 杨拴盈, 南岩东, 等. 激光捕获显微切割联合 SELDI 蛋白质芯片筛选肺腺癌早期诊断标志蛋白[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2009, 40(1): 157–161.
- [19] Micke P, Ostman A, Lundberg J, et al. Laser-assisted cell microdissection using the PALM system[J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 293: 151–166.
- [20] 田英芳, 魏朝明, 张蓬勃, 等. 激光显微切割联合功能分类表达谱芯片技术在脑缺血研究中的应用[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2005, 26(4): 395–398.

(责任编辑: 冉明会)