出國報告 (出國類別：進修)

美國大學醫院進修 — 癌症免疫學與乳癌病理

服務機關：成大醫院

姓名職稱：陳文宗　醫師

派赴國家：美國

出國期間： **98** 年 **9** 月 **1** 日 至 **99** 年 **8** 月 **31** 日

報告日期：**99** 年 **10** 月 **21** 日

摘要

民國 98 年 3 月我到美國參加美加病理學會，發表論文，並藉由這個機會，獲得美國大學醫院的同意赴美進修。遂於 98 年 9 月至 99 年 5 月以及 99 年 7 月至 99 年 8 月至約翰霍普金斯大學(Johns Hopkins)實驗室進行研究進修，學習癌症免疫學及治療性癌症疫苗之相關研究，並在教授指導下完成一篇專書章節，探討有關子宮頸癌致病機轉以及子宮頸癌疫苗最新的進展; 另外實驗室的研究成果也正計畫要發表成論文。另外，我於 99 年 6 月赴哈佛大學教學醫院貝斯以色列醫學中心(Beth Israel Deaconess Medical Center)學習乳癌病理診斷一個月，並參加 99 年 6 月 7 日至 99 年 6 月 8 日於波士頓 Fairmont Copley Plaza Hotel 舉行之乳癌病理學術研討會。

目錄

一 目的..1

二 過程..1

(一)申請進修歷程..1

(二)免疫學課程..2

(三)原位雜合法實驗..3

(四)免疫染色實驗..3

(五)動物實驗..3

(六)乳癌病理..4

三 心得..5

四 建議事項..6

五 附錄..8

附錄一 『如何寫作論文』證書..8

附錄二 老鼠細胞丙型干擾素原位雜合染色法..9

附錄三 老鼠細胞丙型干擾素原位雜合染色與 F4/80 免疫化學染色『雙重染色』法..11

附錄四 老鼠細胞 IDO 免疫染色法..14

附錄五 哈佛大學乳癌病理研討會課程表..16

一 目的

成大醫院為南部重要醫學中心，也是南部癌症研究重鎮，隨著成大醫院第二醫療大樓『門診大樓 – 臨床研究暨癌症中心』於今年六月落成啓用，這個角色將更日益彰顯。然而，除了硬體的擴建，在軟體的部份也必須加以升級，才能使癌症研究與癌症醫療品質真正獲得提升。

有鑑於此，在兩年前開始申請這次出國進修時，及設定主要的目的有兩個：一是癌症研究，另一是乳癌病理診斷。前者是為了觀摩學習國外頂尖的癌症研究實驗室，以求提升本院癌症研究的水準；因為我本身在病理領域內是專攻乳房病理，故後者是希望藉由直接向國外一流的乳癌病理專家學習，以提升自己的診斷能力，近一步提升本院醫療品質。

二 過程

(一)申請進修歷程

為了達成以上目的，在申請國外進修機構的時候，一開始即設定以國外最頂尖的大學與醫院為目標。在 2009 年初，我出國參加於波士頓舉行之『美加病理學會』年會，那是全美國以及加拿大聯合病理學會一年一度的學術盛會，也是全球最大的病理學術討論會。我於會中以壁報展示我的研究成果[1]，在當時，很幸運地獲得 Johns Hopkins 病理學教授 Dr. T.-C. Wu 的青睞，吳教授是台灣旅美的優秀學者，他知道我正在申請出國進修，慨然地允諾我到他的實驗室學習；Jonhs Hopkins 醫院是世界頂尖醫學重鎮，每年在全美醫院評比中都是第一名，研究風氣非常興盛，我獲得這個機會非常高興，當下就決定到 Johns Hopkins 實現我的進修計畫。

另外在那一次年會中，我也積極參與乳癌病理學術課程，並向我後來出國進修的第二位老師哈佛大學教授 Dr. Stuart Schnitt 自我介紹與提問，Schnitt 教授是當今國際乳癌病理權威學者，是很多美國及國際乳癌病理研討會的主持人，也是現任美加病理學會的主席。Schnitt 教授服務於哈佛大學教學醫院 Beth Israel

[1] **Chen WC**, Chang MC, Chang TW. Grap2 and Cyclin-D Interacting Protein (GCIP) Nuclear Expression is Significantly More Frequent in Triple-Negative Breast Carcinomas (TNBCs) than Other Subtypes of Breast Carcinomas. *Mod Pathol.* 2009; 89:35A.

Deaconess Medical Center 擔任病理部主任，回國後我申請到 Beth Israel Deaconess Medical Center 當觀察員一個月，獲得 Schnitt 教授首肯，完成我進修乳癌病理診斷的心願。

我進修的安排是到 Johns Hopkins 病理部擔任研究員(Research fellow)一年，當中利用一個月的時間到 Beth Israel Deaconess Medical Center 當臨床觀察員(Observor)。

(二)免疫學課程

2009 年 9 月，我踏上旅程，正式開始我在美國的進修。一開始我到 Johns Hopkins 報到。吳教授實驗室主要是在開發癌症疫苗，尤其著重在子宮頸癌以及卵巢癌的治療性疫苗，早期以基因槍爲疫苗主要給予方式，近年來爲了加強疫苗效果，積極開發嘗試了很多新穎的方式。

吳教授非常用心地替我安排了一個免疫學的課程，目的是讓我能熟悉實驗室的研究主題與內容，盡快進入狀況，課程內容從最基本的免疫學原理談起，引進癌症免疫學的主軸，並著重在吳教授實驗室過往研究成果的探討。課程的安排令我印象深刻，總共上課的學生有六至七名，每週三個主題，每次上課前幾天會發給每一學員大量的有關該次上課主題的閱讀資料，上課前大家都要先自我學習，每一次並由一個學員負責〝上課〞，準備 Powerpoint 檔案，上課時主講者還要負責發問，並指定其他同學輪流回答，每個人都有機會回答，吳教授則只在旁引導，不時提出深刻的問題。整個課程基本上就像是一個強調自我學習的讀書會，再加上該領域研究專精的指導者，以開放討論的方式，學習與研究，並討論研究想法，由於探討的問題與內容，就是我們實驗室過去與當前進行的研究與遇到的問題，所以完全不同於一般紙上談兵的上課方式，這樣的方式我在台灣的課程前所未見。

經過一個多月癌症免疫學的課程後，我漸漸熟悉實驗室的研究主題與內容。在吳教授的指導下，我也完成了一篇專書章節，探討有關子宮頸癌致病機轉以及子宮頸癌疫苗最新的進展[2]。

另外，**Johns Hopkins** 有豐富的，各式各樣的學術研討會，除了我們實驗室自己每周的研究討論會、期刊研讀、外賓演講之外，在研究實驗之餘，我都會選擇我有興趣的參加其他研討會，以癌症及免疫學相關主題爲主。其中，我還參加了一堂專爲年輕研究者舉行的『如何寫作論文』，順利完成課程並獲得證書，請見附錄一。

---

[2] **Chen WC**, Ma B, Mao CP, Wu TC. “Molecular pathogenesis, detection and clinical management of pre-invasive cervical lesions.” Advances in understanding the basic pathogenesis and clinical management of pre-invasive disease. Ed. Rebecca Fitzgerald. Springer, 2010. (in press)

(三)原位雜合法實驗

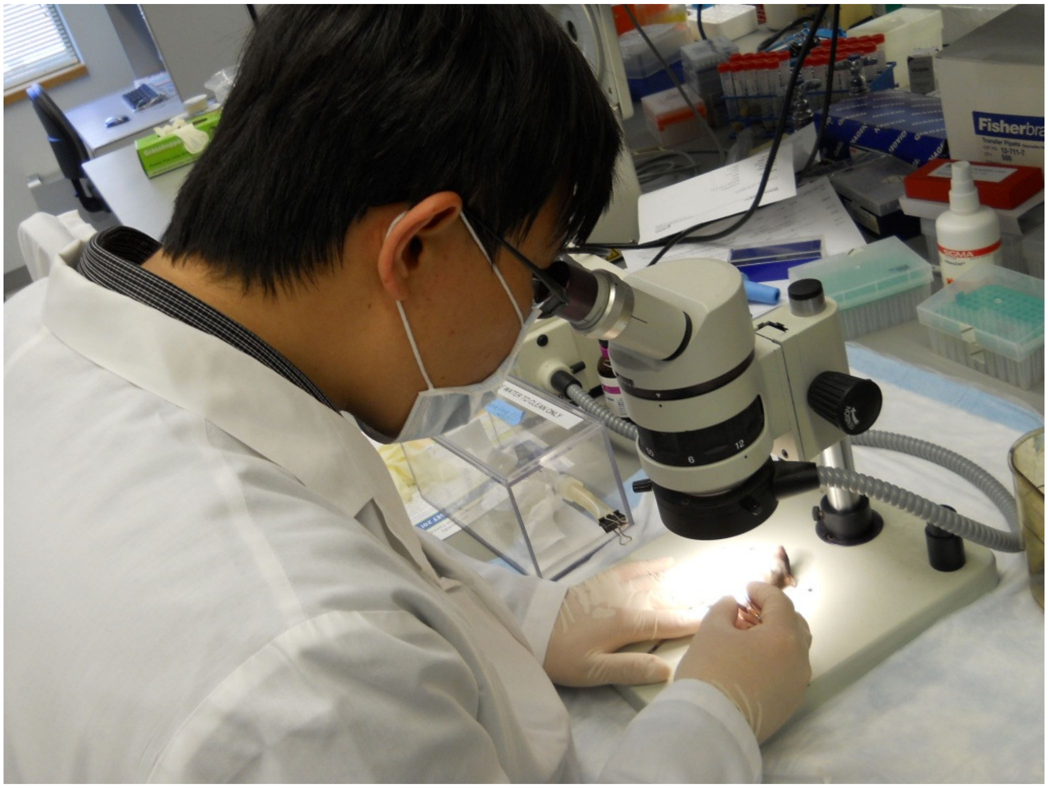
我在實驗室所做的第一個實驗，是嘗試用原位雜合法來做丙型干擾素(Interferon-gamma, INF-γ)的染色。傳統上細胞激素染色是用新鮮細胞，用細胞內染色法，再用流式細胞儀分析，此法的缺點是沒辦法同時做組織型態及細胞組織分部的分析。如果要在組織切片上作細胞激素染色，由於細胞激素是分泌形的物質，比較理想的方式是以原位雜合染細胞激素的 mRNA 而不是用一般傳統免疫組織化學法染蛋白質。這是這個實驗特殊之處。經過數月的摸索，我終於開發出老鼠細胞 INF-γ 原位雜合法染色的方法 (詳細內容請見附錄二)。同時，為了能在研究 INF-γ 染色時，能判讀出製造 INF-γ 的是屬於何種細胞，我也研究了原位雜合與免疫染色同時進行的『雙重染色』，我選擇了老鼠吞噬細胞標記 F4/80 的免疫染色，嘗試與 INF-γ 原位雜合同時進行，這樣的實驗著實令我感到興奮，因為很少人做過那樣的嘗試 (詳細內容請見附錄三)。

(四)免疫染色實驗

接著我進行了一個實驗室的子計畫，是有關於 IDO 的免疫染色。IDO 全名是 Idoleamine 2, 3-dioxygenase，在腫瘤組織中，IDO 是促進 tryptophan 代謝的酵素，tryptophan 是 T 細胞增生重要的胺基酸，一旦 tryptophan 被代謝了，T 細胞的增生會受到抑制。在腫瘤中，目前 IDO 被認為扮演抑制免疫 T 細胞的角色，而在治療性癌症疫苗裡，IDO 可能抑制了疫苗的作用。為了證實這樣的假設，我們必須進行老鼠癌細胞或癌症組織是否分泌 IDO 的實驗。這個實驗具有挑戰性的部分是如何找到合適的針對老鼠細胞的 IDO 抗體，因為大部分 IDO 抗體是針對人類的。我們嘗試了兩種抗體，最後找到成功的染色方法 (詳細內容請見附錄四)。

(五)動物實驗

我們實驗室致力於開發嶄新的、有效的治療性癌症疫苗，這些疫苗都要在實驗動物身上進行試驗已決定初步成效，所以有很多時候動物實驗無法避免。我們實驗室使用的實驗動物多為老鼠，品系以 C57/BL6 為主。我也進行了一個動物試驗，以觀察基因槍是否對 C57/BL6 老鼠的毛髮生長有所影響。Johns Hopkins Hospital 的動物實驗室設備非常完善，所有必須進入動物中心工作的人員都必須參加課程研習，通過考核後才能取得通行證。動物中心管控嚴謹，進入必須穿戴無菌衣，做好消毒工作。這個動物實驗，我也取得了一些成果，目前正計畫要發表論文。



我在 Johns Hopkins 實驗室做實驗的情形

(六)乳癌病理

除了在 Johns Hopkins 的實驗室研究癌症腫瘤學，我也利用今年六月一個月的時間到 Beth Israel Deaconess Medical Center 進修乳癌病理。有幸能與 Schnitt 教授一起看片，我獲益良多。Schnitt 教授每年接受兩位乳房病理次專科的病理醫師訓練，但是礙於 Beth Israel Deaconess Medical Center 的規定，必須要有美國麻州的醫師執照才能申請，所以我只能申請為期一個月的觀察員。

這一個月收穫最多的是關於乳癌一些癌前病變的病理。在美國由於乳癌篩檢的發達，很多癌前病變在演變成乳癌前就提早被發現，例如柱狀細胞病變 (Clumnar cell lesion)。這些病變在從前因為比較少見，所以病理醫師對他們了解有限，然而近年來這些癌前病變的病理研究方興未艾，Schnitt 教授即是定義及分類柱狀細胞病變 (Clumnar cell lesion)這方面重量級的學者。

Schnitt 教授每年都會在波士頓舉辦乳癌病理的再教育研討會，也是哈佛大學再教育課程的一項活動，每年都吸引來自全美及全球各地的病理醫師前來參加，我以前就一直很想參加，但因為報名費所費不低，又必須加上飛美東來回機票，所以一直沒有下定決心。然而美夢成真，今年正好在六月舉辦，Schnitt 教授又邀

請我參加，而且免了報名費。兩天的課程，針對乳癌病理的各個重要議題與概念，由哈佛大學以及邀請自其他大學的學者主講，令我收穫豐碩 (課程內容請見附錄五)。

在 Beth Israel Deaconess Medical Center，平常我就每天跟著他們本院的兩個乳癌病理次專科受訓醫師一起工作，互相切磋，並跟著他們的乳癌病理團隊 (由 Schnitt 醫師、Collins 醫師、Connolly 醫師及 Johnson 醫師組成)看片，Schnitt 教授並借我他收藏的教學片讓我能隨時閱片自學，我很感謝 Schnitt 教授給我這樣的機會，即使我沒有美國麻州的醫師執照，讓我滿載而歸。

我在 Beth Israel Deaconess Medical Center 每天工作的地方

三 心得

我有機會在 Johns Hopkins 的動物實驗室工作，對美國研究者尊重生命的堅持有深刻的認識。他們非常注重動物福祉，不能從事對動物造成巨大痛苦的實驗，食物飲水鋪料都有專人定時更換，每一個老鼠籠不能養超過五隻老鼠，以免對老鼠造成空間擠迫感；動物一旦因爲腫瘤長太大而行動受限，再腫瘤太大造成動物死亡前就要進行安樂死。動物中心工作人員每天都會詳細檢查，如果違反規定就

會在籠子上貼上警告標籤，要求實驗人員做出適當處置。從這一點也讓人看出西方社會對人的尊重，及於對動物的尊重，其文明的程度確實在我們社會之上，也值得我們學習。

我們常常提到美國的研究者擁有的資源比較多，經費比較充裕，這些都沒錯，也確實是他們的優勢，但我覺得還不是他們的最大優勢。在國外做了一年的研究，我發現美國的研究水準之所以可以長期領先全球，關鍵在於創造力與邏輯思考能力，這是台灣的環境非常欠缺的。我們做研究，常常是爲了研究而研究，缺乏興趣爲出發點，不敢或無法提出有創造性的觀點，研究框框狹窄或自我設限。或者我們常常從事『轉譯』醫學研究，其實是應用型的研究，研究的出發點太過『功利』，相對地我們有創新性的基礎研究就太少，實力薄弱。其實真正主導研究方向的應該是研究者的想法，任何想法都應該被認真看待。

在乳癌病裡看片學習上，我發現國外病理醫師看片時，對基本 H&E 切片所花的時間遠在免疫染色切片之上，這一點和台灣目前的情形有點相反。當然不是說免疫染色不重要，但他們都事先經過詳細深入的 H&E 切片研究，理出頭緒，必要時常做免疫染色研究，且不做任何非必要的染色。而且在 H&E 切片的診斷上，『深入細節』，即使已經有了主診斷，也不放過任何其他輕微變化。此點實應令我們引爲借鏡。

四 建議事項

(一) 建議以研究爲主的出國進修可延長出國年限爲兩年

現在很多國外知名的實驗室在接受研究人員的申請時，常常要求至少待上兩年的時間。主要是著眼於剛到國外，必須面臨生活安頓及語言上適應的問題，接著要設法融入實驗室的環境，熟悉該實驗室的研究主題、研究方法以及研究模式，接著才能真的開始找到研究方向或題目，而這常常要花至少半年的時間。一年的短期進修，常面臨當正要開始全力投入埋首研究時，也就是要準備打道回府之時。所以短期一年的進修要有好的成果，甚或發表好的論文，有實際上的困難度，以投資報酬率來看其實不划算。我在 Johns Hopkins 遇到的其他國家來的研究員，待在實驗室的時間，最常見是兩年至四年不等。

(二) 建議鼓勵出國攻讀博士學位

我在 Johns Hopkins 實驗室遇到很多博士後研究員，其研究實力在台灣均足以獨當一面，但在國外常常還要在大主持人的實驗室繼續磨練幾年，國外的研究實力可見一斑。而國外的博士班訓練扎實，尤其著重邏輯思考、獨立研究與問題解

決，再加上有很多優秀博士後研究員可供請教切磋，學習環境非常優良。國內有志於攻讀博士學位者，到國外去事一個很好的選擇。目前，國內私立大學醫院也願意投資在這樣的人才上(例如長庚醫院)，提供五年留職停薪的選擇，栽培醫師到國外攻讀博士班，甚至提供貸款。公立大學在這個方向上可以重新思考，急起直追，這會關係到中長期的競爭力表現。

五 附錄

附錄一　『如何寫作論文』證書

JOHNS HOPKINS
MEDICINE

Certificate of Completion

Writing for Publication

May 2010

awarded to

Wen-Chung Chen

Associate Dean
Graduate Student Affairs

Director
Professional Development Office

附錄二　老鼠細胞丙型干擾素原位雜合染色法

INF-γ CISH protocol for paraffin-embedded mouse tumors

Mar 08, 2010　Chen

Slides Preparation

1. Deparaffinize： preheat slide at 65℃ for 10 min; xylene 3 times 5 min each; 100% ETOH; 95%ETOH; 70%ETOH; dH_2O with 1% Tween-20
2. Steam in 0.5mM EDTA + 1mM Tris-HCl (PH7.5) for 15 min. Remove and put in PBST, allow to cool at RT for 5 min
3. Rinse with dH_2O 3 times; 2x SSC rinse one time
4. Pepsin treatment 3-4 drops per slide, cover with PARAFILM, incubate at 37℃ for 2 min (about 200 µl for each slide)
5. 2x SSC rinse
6. Rinse with dH_2O 3 times
7. Through 70%ETOH; 95%ETOH; 100%ETOH and air dry
8. Put in 80℃ Denature solution (preheated) for 3 min
9. Dehydration in cold 70%ETOH; 95%ETOH; 100%ETOH 2-5 min each
10. Air dry (Remember to mark tissue after air dry)

Probe preparation

Denature RNA probe (sense and antisense) probe at 80℃ for 3 min, put on ice quickly (avoid light)

Slide 34：antisense 0.5 µg/ml, anti-AF488： 1：400
Slide 35：antisense 0.3 µg/ml, anti-AF488： 1：400
Slide 36：antisense 0.7 µg/ml, anti-AF488：1：400
Slide 37：antisense 0.7 µg/ml, anti-AF488：1：1000
Slide 38：antisense 0.7 µg/ml, anti-AF488：1：2000
PCDNA(+)INFγ product is Sense
PCDNA(-)INFγ product is Antisense

Hybridization

Add 15 µl probe for one slide (prediluted with hybridization buffer to concentration of 1 µg/ml), cover with PARAFILM, put the slides in the humidified container and

incubate at 55℃ overnight

Washes and signal detection

Before starting, warm wash solution to 55℃

1. 1.5M urea/0.1Xssc (PH7.2) 55℃ for 10 min twice
2. 2xSSC/0.1%Igepal CA-630 55℃ 10 min twice
3. 2xSSC for 5 min at RT
4. PBST rinse once
5. 3% Hydrogen peroxide (fresh made) in dH_2O 10 min, **on ice**
6. Rinse with PBST once
7. Block with Universal IHC Blocking/Diluent (Powervision) 4 drops for 10 min
8. Rinse and soak with **PBST** for 1 min, once
9. Apply primary antibody 200 µl (anti-AF488, dilute in Antibody dilution buffer (Ventana)) 200 µl
   (Slides 34-36： 1：400; slide 37： 1：1000, slide 38： 1：2000)
   Cover with PARAFILM, 45 min at RT
10. Rinse and soak with **PBST** for **2 min, 3 times**
11. Apply secondary antibody (Powervision poly-HRP anti-rabbit AB) 3 drops per slide, cover with RARAFILM, 30 min at RT
12. Rinse and soak with PBST for **2 min, 3 times**
13. Apply DAB for 3 min, rinse with PBST once
    (For DAB： mix one drop (33 µl) DAB substrate solution & one drop (33 µl) DAB chromogen Solution with 0.93 ml dH_2O, filtered by 0.45 µm filter)
14. Hematoxylin for 2 min (Hematoxylin filtered by 0.45 µm filter)
15. Rinse in running tap water for 2-5 min
16. Through warm water (preheated in 40℃), 70%ETOH; 95%ETOH; 100%ETOH; and xylene 2x
17. Clear in xylene for 5 min
18. Coverslip

附錄三　老鼠細胞丙型干擾素原位雜合染色與 F4/80 免疫化學染色『雙重染色』法

Combined F4/80 IHC and INF-γ ISH protocol for paraffin-embedded mouse tumors

Mar 16, 2010　Chen

Solution preparation： PBST：0.01M PBS, 0.05% Tween 20, PH 7.4

Slide labeling：

Slide 49　case (IHC and ISH)

Slide 50　only IHC

Slide 51　only ISH

IHC (Slide 49, 50)

(Slide 51 start with step 13)

11. Deparaffinize： preheat slide at 65℃ for 10 min; xylene 3 times 5 min each; 100% ETOH; 95%ETOH; 70%ETOH; dH_2O ; citrate buffer
12. **Steam** in **Target retrieval solution (PH 6)(preheated), 40 min**
    Remove and put in PBST, allow to cool at RT for 5 min
13. Rinse with PBST 2min, twice
14. Block with Universal IHC Blocking/Diluent (Powervision) 4 drops for 10 min
15. Rinse with PBST once
16. 3% Hydrogen peroxide blocking 10 min (Room Temperature)
17. Rinse with PBST for 2 min, 3 times
18. Apply First primary antibody 200 μl (**Rat anti-mouse F4/80**, **1：100** dilute in Antibody dilution buffer (Ventana)**)**
    Cover with PARAFILM, Room Temperature 60 minutes
19. Rinse with PBST for 2 min, 3 times
20. Apply First secondary antibody **(Goat anti-Rat polyclonal-HRP), 1：100** diluted in PBS**)**, cover with RARAFILM, 30 min at RT,
21. Rinse and soak with PBST for 2 min, 3 times
22. Apply **DAB** for 3 min, PBST for 2 min, 3 times

(For DAB： mix one drop (33 µl) DAB substrate solution & one drop (33 µl) DAB chromogen Solution with 0.93 ml dH_2O, filtered by 0.45 µm filter)

For slide 50, proceed directly to steps 37

Prepare for ISH (Slide 49, 51)

23. dH_2O with 1% Tween-20 rinse for 1 min
    For Slide 51, preheat slide at 65℃ for 10 min; xylene 3 times 5 min each; 100% ETOH; 95%ETOH; 70%ETOH; dH_2O with 1% Tween-20

24. **Steam in 0.5mM EDTA + 1mM Tris-HCl (PH7.5) for 15 min**. Remove and put in PBST, allow to cool at RT for 5 min
25. Rinse with dH_2O 3 times; 2x SSC rinse one time
26. **Pepsin** treatment 3-4 drops per slide, cover with PARAFILM, incubate at **37℃** for **2 min** (about 200 µl for each slide)
27. 2x SSC rinse
28. Rinse with dH_2O 3 times
29. Through 70%ETOH; 95%ETOH; 100%ETOH and air dry
30. Put in **80℃** Denature solution (preheated) for 3 min
31. Dehydration in cold 70%ETOH; 95%ETOH; 100%ETOH 2-5 min each
32. Air dry **(Remember to mark tissue after air dry)**

Probe preparation

Denature RNA probe (sense and antisense) probe **1 µg/ml** at **80℃** for 3 min, put on ice quickly (avoid light)

Hybridization

33. Add 15 µl probe for one slide (prediluted with hybridization buffer to concentration of 1 µg/ml), cover with PARAFILM, put the slides in the humidified container and incubate at **55℃** overnight

For slide 20, add sense probe; For slides 19, 21, 23, add antisense probe

ISH signal detection

Before starting, warm wash solution to **55℃**

34. 1.5M urea/0.1Xssc (PH7.2) 55℃ for 10 min twice
35. 2xSSC/0.1%Igepal CA-630 55℃ 10 min twice
36. 2xSSC for 5 min at RT

37. PBST rinse once
38. Block with **Ultra V Block (UltraVision LP)** 5 min at RT (3-4 drops)
39. Rinse and soak with PBST for 1 min, once
40. Apply **second primary antibody 200 µl (Rabbit anti-AF488, 1：400** dilute in ABD (Ventana))

    Cover with PARAFILM, 45 min at RT
41. Wash with PBST, 4 times
42. Apply **Primary Antibody Enhancer (UltraVision LP)** for 20 min at RT (3-4drops)
43. Wash with PBST 4 times
44. Apply **second secondary antibody (UltraVision LP AP polymer anti-rabbit AB)**

    3-4 drops per slide, cover with RARAFILM, 30 min at RT
45. Wash with PBST, 4 times
46. Apply **Fast Red Substrate** for 15 min

    prepare：
    a. 1 Fast Red Tablet to 5 ml Naphthol Phosphate Substrate
    b. Shake until tablet is dissolved
    c. filtered by 0.45 µm filter
47. Wash with PBST 4 times
48. Hematoxylin for 2 min (Hematoxylin filtered by 0.45 µm filter)
49. Rinse in running tap water for 2-5 min
50. Apply Aqueous mounting medium (DAKO Glycegel)
51. Coverslip

附錄四　老鼠細胞 **IDO** 免疫染色法

IDO IHC staining in mouse

May 25, 2010　Chen

Solutions：

1. Washing Buffer (PBST)：0.01M PBS(1XPBS), 0.1% Tween-20, PH 7.4
2. Antibody Diluent： 5% BSA/0.5% Tween-20 (To 5ml, 250mg BSA and 25µl Tween-20 in 5 ml 1X PBS)
3. Block： 5% BSA/0.5% Tween-20 (To 5ml, 250µl BSA and 25µl Tween-20 in 5 ml 1X PBS)

IHC

52. Deparaffinize： preheat slide at 65℃ for 10 min; xylene 3 times 5 min each; 100% ETOH; 95%ETOH; 70%ETOH; dH_2O
53. PBST washes twice
54. 3% Hydrogen peroxide blocking 10 min (Room Temperature)
    Then Proteinase K (DAKO 3020) 10 min
55. PBST washes twice
56. Block with **5% BSA/0.5% Tween-20** 4 drops for 10 min
57. Rinse with PBST once quickly
58. Apply primary antibody 200 µl (**Rabbit anti-mouse IDO, polyclonal, Enzo life science,** dilute in 5% BSA/0.5% Tween-20, Cover with PARAFILM, **Room Temperature 2 hours**
59. Rinse with PBST for 2 min, 3 times
60. Apply secondary antibody **(anti-Rabbit poly-HRP, PowerVision),** diluted 1：100 in PBS, cover with RARAFILM, 30 min at RT,
61. Rinse and soak with PBST for 2 min, 3 times
62. Apply **DAB** for 3 min
    (For DAB： mix one drop (33 µl) DAB substrate solution & one drop (33 µl) DAB chromogen Solution with 0.93 ml dH_2O, filtered by 0.45 µm filter)
63. Decant excess chromagen, place in dH_2O and rinsed with dH_2O for 1 min
64. Hematoxylin for 2 min (Hematoxylin filtered by 0.45 µm filter)
65. Rinse in running tap water for 2-5 min
66. Through water, 70%ETOH; 95%ETOH; 100%ETOH; and xylene 2x
67. Clear in xylene for 5 min

68. Coverslip

Results：

1. **Proteinase K** treatment is OK, but citrate buffer is not suitable for IDO
2. **IDO (rabbit to mouse, polyclonal, Enzo life science) dilution is 1：100, incubation time 2 hours at RT**
3. For rabbit poly to mouse, block and dilute AB with **5% BSA/0.5% Tween-20** is OK
4. Next time try to diminish mild background：
   a. Prolong hydrogen peroxide block to 30 mins
   b. Prolong **5% BSA/0.5% Tween-20 block** to 30 mins
   c. Reduce Ab incubation time to 1 hour
   d. Try other block：
      Protein block
      Serum block
5. **Negative control**：
   Purchase negative control for rabbit polyclonal (boicare medical or thermo scientific)
   Whole pre-immuned rabbit serum fro **Shi-Wen** and **Sabacini** both don’t work (strong positive results)

附錄五　哈佛大學乳癌病理研討會課程表

BREAST PATHOLOGY:
CURRENT CONCEPTS AND CONTROVERSIES

June 7-8, 2010

at

The Fairmont Copley Plaza Hotel
Boston, Massachusetts

under the direction of:
Stuart J. Schnitt, M.D.
and
Laura C. Collins, M.D.

BREAST PATHOLOGY: CURRENT CONCEPTS AND CONTROVERSIES
Course Directors: Stuart J. Schnitt, M.D. and Laura C. Collins, M.D.
June 7-8, 2010
The Fairmont Copley Plaza Hotel, Boston, MA

MONDAY, JUNE 7, 2010

Registration and Continental Breakfast	7:30-8:00
Welcome and Introduction	8:00-8:10
Laura C. Collins, M.D.	
SESSION I: Benign and Precursor Lesions of the Breast	
Moderator: Stuart J. Schnitt, M.D.	
1) Benign Breast Disease and Breast Cancer Risk	8:10-8:40
Jean Simpson, M.D.	
2) Ductal Carcinoma in Situ	8:40-9:10
Laura C. Collins, M.D.	
3) Lobular Carcinoma in Situ and Problematic in Situ Lesions	9:10-9:40
Jean Simpson, M.D.	
4) Panel Discussion/Questions & Answers	9:40-10:00
BREAK	**10:00-10:30**
SESSION II: Prognostic and Predictive Factors in Invasive Breast Cancer	
Moderator: Laura C. Collins, M.D.	
1) Traditional and Newer Prognostic and Predictive Factors	10:30-11:00
Deborah Dillon, M.D.	
2) Update on AJCC Staging System and Sentinel Lymph Node Evaluation	11:00-11:30
Susan C. Lester, M.D., Ph.D.	
3) Special Type Breast Cancers	11:30-12:00
James L. Connolly, M.D.	
LUNCH (on your own)	**12:00-1:15**
SESSION III: Diagnostic Challenges I	
Moderator: Stuart J. Schnitt, M.D.	
1) Spindle Cell and Vascular Lesions of the Breast	1:15-1:45
Christopher D. M. Fletcher, M.D.	
2) Important Inflammatory and Reactive Lesions	`1:45-2:15
Stuart J. Schnitt, M.D.	
3) Panel Discussion/Questions & Answers	2:15-2:30

BREAK	**2:30-2:45**

<u>SESSION IV</u>: <u>Issues in Radiologic Pathologic Correlation</u>

Moderator: Laura C. Collins, M.D.

1) A Pathologist's Guide to Breast Imaging *Susan C. Lester, M.D., Ph.D.*	2:45-3:15
2) Controversies and Problematic Issues in Core Needle Biopsies *Timothy W. Jacobs, M.D.*	3:15-3:45
3) Panel Discussion/Questions & Answers	3:45-4:00

<u>SESSION V:</u> <u>Case-Based Presentations I</u>	4:00-5:00

Moderators: Laura C. Collins, M.D. and Stuart J. Schnitt, M.D.

<u>TUESDAY, JUNE 8, 2010</u>

<u>Continental Breakfast</u>	7:30-8:00

<u>SESSION VI:</u> <u>Diagnostic Challenges II</u>

Moderator: Stuart J. Schnitt, M.D.

1) Papillary Lesions *Laura C. Collins, M.D.*	8:00-8:30
2) Combined Epithelial/Myoepithelial Lesions *Susan C. Lester, M.D., Ph.D.*	8:30-9:00
3) Mucinous Lesions *Nicole A. Johnson, M.D.*	9:00-9:30
4) Fibroepithelial Lesions *Timothy W. Jacobs, M.D.*	9:30-10:00
5) Panel Discussion/Questions & Answers	10:00-10:15

BREAK	10:15-10:45

<u>SESSION VII:</u> <u>Contemporary Issues in Breast Pathology</u>

Moderator: Laura C. Collins, M.D.

1) Molecular Classification of Breast Cancer: What the Practicing Pathologist Needs to Know *Stuart J. Schnitt, M.D.*	10:45-11:15
2) Pathology Evaluation of Breast Cancers After Neoadjuvant Chemotherapy *Deborah Dillon, M.D.*	11:15-11:45
3) Panel Discussion/Questions & Answers	11:45-12:00

LUNCH (on your own)	**12:00-1:15**

SESSION VIII: Immunohistochemistry in Breast Pathology

Moderator: Stuart J. Schnitt, M.D.

1. Immunohistochemistry in Breast Pathology I-Therapeutic Issues *Deborah Dillon, M.D.*	1:15-1:45
2) Immunohistochemistry in Breast Pathology II-Diagnostic Issues *Stuart J. Schnitt, M.D.*	1:45-2:15
3) Panel Discussion/Questions & Answers	2:15-2:30
BREAK	**2:30-2:45**

SESSION IX: Diagnostic Challenges in Breast Pathology III

1) Medico-Legal Issues in Breast Pathology *James L. Connolly, M.D.*	2:45-3:15
2) Hereditary Breast Cancer *Laura C. Collins, M.D.*	3:15-3:45
3) Panel Discussion/Questions & Answers	3:45-4:00

SESSION X: Case-Based Presentations II	4:00-5:00

Moderators: Laura C. Collins, M.D. and Stuart J. Schnitt, M.D.

ADJOURN	**5:00**