

论著·临床研究

传统涂片联合细胞块及免疫细胞化学染色技术诊断浆膜腔积液的应用价值

范春阳¹, 马丽莉², 刘进军^{1△}
(1. 西安交通大学医学部基础医学院, 陕西 西安 710000; 2. 空军军医大学第一附属医院病理科, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的** 探讨传统涂片联合细胞块及免疫细胞化学染色技术诊断浆膜腔积液, 尤其是恶性浆膜腔积液的应用价值。**方法** 收集 2022 年 1—6 月空军军医大学第一附属医院病理科接收的浆膜腔积液标本 659 例, 其中胸腔积液 416 例, 腹腔积液 221 例, 心包积液 22 例; 男 389 例, 女 270 例, 年龄 11~102 岁, 中位年龄 64 岁。分析传统涂片制片方法、细胞块制作、免疫细胞化学染色技术和细胞病理学诊断结果并学习相关文献。**结果** 659 例患者中采用单纯传统涂片诊断为良性浆膜腔积液 303 例(45.98%), 恶性浆膜腔积液 123 例(18.66%), 意义不明的、可疑恶性 233 例(35.36%); 659 例患者中 72 例采用传统涂片联合细胞块及免疫细胞化学染色技术, 其中诊断为良性浆膜腔积液 8 例(11.11%)、恶性浆膜腔积液 64 例(88.89%), 并进一步确诊了恶性细胞的组织起源。**结论** 传统涂片联合细胞块及免疫细胞化学染色技术相对于单纯传统涂片不仅能提高阳性标本检出率, 还对确定组织来源、确诊肿瘤原发灶有很重要的帮助。

[关键词] 浆膜腔积液; 传统涂片; 细胞块; 免疫细胞化学染色技术; 细胞病理学
DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2023.14.018 **中图法分类号:** R442.5; R446
文章编号: 1009-5519(2023)14-2429-04 **文献标识码:** A

Application value of traditional smear combined with cell wax block and immunocytochemistry in the diagnosis of serous cavity effusion
FAN Chunyang¹, MA Lili², LIU Jingjun^{1△}
(1. School of Basic Medical Sciences, X'an Jiaotong University, X'an, Shanxi 710000, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the application value of traditional smear combined with cell wax block and immunocytochemistry staining in the diagnosis of serous cavity effusion, especially malignant serous cavity effusion. **Methods** A total of 659 serous effusion specimens in the Department of Pathology of this hospital were collected, from January 2022 to June 2022, including 416 cases of hydrothorax, 221 cases of ascites and 22 cases of pericardial effusion. There were 389 males and 270 females ranging in age from 11 to 102, with a median age of 64. The results of traditional smear preparation, cell block preparation, immunocytochemical staining and cytopathologic diagnosis were analyzed and related literature was studied. **Results** Among the 659 cases with serosal effusion, 303 cases(45.98%) were diagnosed as benign serous effusion, 123 cases(18.66%) were diagnosed as malignant serous effusion, and 233 cases(35.36%) were diagnosed as unknown significance and suspected malignancy by traditional smear. Among the 659 cases, 72 cases underwent traditional smear combined with cell wax block and immunocytochemistry, eight cases(11.11%) were diagnosed as benign serosal effusion, 64 cases(88.89%) were diagnosed as malignant serous effusion, and the tissue origin of malignant cells was further confirmed. **Conclusion** Compared with the traditional smear method alone, the traditional smear combined with cell wax blocks and immunocytochemical staining can not only improve the detection rate of positive specimens, but also help to determine the origin of the tissue and confirm the primary tumor.

[Key words] Serous cavity effusion; Traditional smear; Cell wax block; Immunocytochemistry; Cytopathology

浆膜腔积液是指在疾病的情况下胸腔、腹腔或心包腔(总称为浆膜腔)内积聚过多液体总称为浆膜腔

积液^[1]。浆膜腔积液是非常常见的临床症状,导致浆膜腔积液的疾病众多,发病机制各异,由于肿瘤转移引起的恶性浆膜腔积液十分常见^[1-2]。因此,临床工作中需鉴别浆膜腔积液的良、恶性及恶性浆膜腔积液肿瘤来源,特别是当肿瘤原发灶不明确时利用浆膜腔积液脱落细胞制作细胞块,并且采用免疫细胞化学染色技术对确定积液的良、恶性及恶性细胞的组织起源具有重要意义,对进一步治疗具有指导作用^[3]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2022 年 1—6 月空军军医大学第一附属医院病理科接收的浆膜腔积液标本 659 例,其中男 389 例,女 270 例;年龄 11~102 岁,中位年龄 64 岁;胸腔积液 416 例,腹腔积液 221 例,心包积液 22 例。

1.2 方法

1.2.1 传统涂片 浆膜腔积液标本要求在允许的情况下将至少 100 mL 送检。4℃冰箱过夜沉降后用长吸管吸取底部标本 10 mL,2 100 r/min 离心 10 min 沉淀,弃上清液,用吸管充分吹打离心管底部沉淀并吸取适量轻柔均匀地涂抹于载玻片上,用上述制片方法分别制备 2 张涂片,其中一张潮干固定于细胞固定液(1%冰醋酸—95%乙醇)中 20 min,进行苏木精-伊红(HE)染色。具体方法为 70%乙醇 1.0 min 后经水洗 1.5 min;水洗后苏木素(珠海贝索生物技术公司)染色;水洗后进 0.5%盐酸乙醇分化后再水洗 30 s 进弱氨水返蓝;再次水洗 5 min 后 0.5%伊红(珠海贝索生物技术公司)染色;水洗后经梯度乙醇脱水二甲苯透明封片。另一张涂片自然风干后进行迈-格-姬(MGG)染色。具体方法为将自然风干的涂片水平放置于染色架上,滴加数滴甲醇进行预固定;滴加 MGG 染液(珠海贝索生物技术公司)2~3 滴,以盖满玻片上细胞涂膜为宜;作用 0.5~1.0 min 后滴加缓冲液,并以橡皮吹气球将染液与缓冲液吹匀,缓冲液用量一般为染液的 1~3 倍,具体用量视室温而定;静置染色 20~30 min 后用流水轻轻冲去染液后自然干燥即可。浆膜腔积液大体标本性状不同则制片方式不同,如血性浆膜腔积液处理时经 4℃冰箱过夜沉降后上清液与血液成分中间常可见一层白色分界线,此时用长吸管吸取标本进行离心时要尽量吸取白色区域,不能吸取标本底部,血性浆膜腔积液具有较大的恶性概率,这样才能尽可能规避血细胞,收集更多的肿瘤细胞;如清亮浆膜腔积液经过过夜沉降后底部会凝结成凝胶状给取样增加难度,此时应尽可能地捣碎底部凝胶成分后再取样,不能只取上清液。

1.2.2 细胞块及石蜡切片 将所送标本经 4℃冰箱过夜沉降后弃上层液体,剩余 50~100 mL 液体(具体视标本情况而定)震荡底部沉淀物混合后倒入试管离

心沉淀,2 100 r/min 离心 10 min,弃上清液,向原试管中的沉淀加入 95%乙醇再以 2 100 r/min 离心 30 min,弃上清液后尽可能取出所有沉渣置于拭镜纸中包好,10%中性甲醛中固定 2 h 常规脱水、包埋、切片,并进行 HE 染色。

1.2.3 免疫细胞化学染色技术 石蜡包埋标本 3 μm 厚常规切片,具体操作:(1)烤片。65℃烤箱中烤 60 min。(2)脱蜡。脱蜡液(二甲苯或环保脱蜡液)3 缸,每缸 10 min。(3)水化。梯度乙醇 4 缸,即 100%、100%、95%、75%。每缸 2 min。纯化水浸泡 2 min。(4)内源性过氧化物酶阻断。3%过氧化氢浸泡 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡 2 min。(5)抗原修复。根据一抗说明书选择合适的修复方式,如酶修复、热修复等,热修复分为乙二胺四乙酸(EDTA)和 CBS 修复。以 EDTA 修复为例:修复盒中加入 EDTA 修复液,放入玻片,将修复盒放入 100℃水浴 20 min 或 120℃高压环境中 2~3 min,离开热源,自然降温,PBS 浸泡 2 min。(6)一抗孵育。在玻片上画上阻水圈,滴加 50 μL 一抗复盖组织,保湿盒中室温 60 min 或 4℃过夜。PBS 浸泡 3 次,每次 3 min。(7)二抗孵育。滴加 50 μL 二抗复盖,保湿盒中室温 20 min,PBS 浸泡 3 次,每次 3 min。(8)3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色。滴加 50 μL DAB 工作液(需现配现用,配制方法按 DAB 说明书操作),复盖组织,浸染 5 min。纯化水冲清中止显色反应。二抗中的过氧化物酶氧化 DAB 形成棕黄色沉淀。(9)苏木素复染。滴加 50 μL 苏木素复盖组织,浸染 3 min,纯化水冲洗,滴加 50 μL 酸洗液 1~2 s,纯化水冲洗。流水冲洗 3 min 返蓝。(10)脱水、透明、封片。梯度乙醇 75%,即 95%、100%每缸 2 min,透明液浸泡 3 min。取出玻片凉干滴上中性树脂,盖上盖玻片,轻压盖玻赶出气泡。

1.2.4 诊断标准

1.2.4.1 细胞病理学 涂片、细胞块石蜡切片 HE 染色可见恶性细胞为阳性,未见异型细胞为阴性,查见非典型细胞、异形细胞但不足以诊断恶性的为不确定病例。

1.2.4.2 免疫细胞化学染色技术 以靶细胞出现定位清楚的棕褐色颗粒为阳性,完全不着色为阴性。

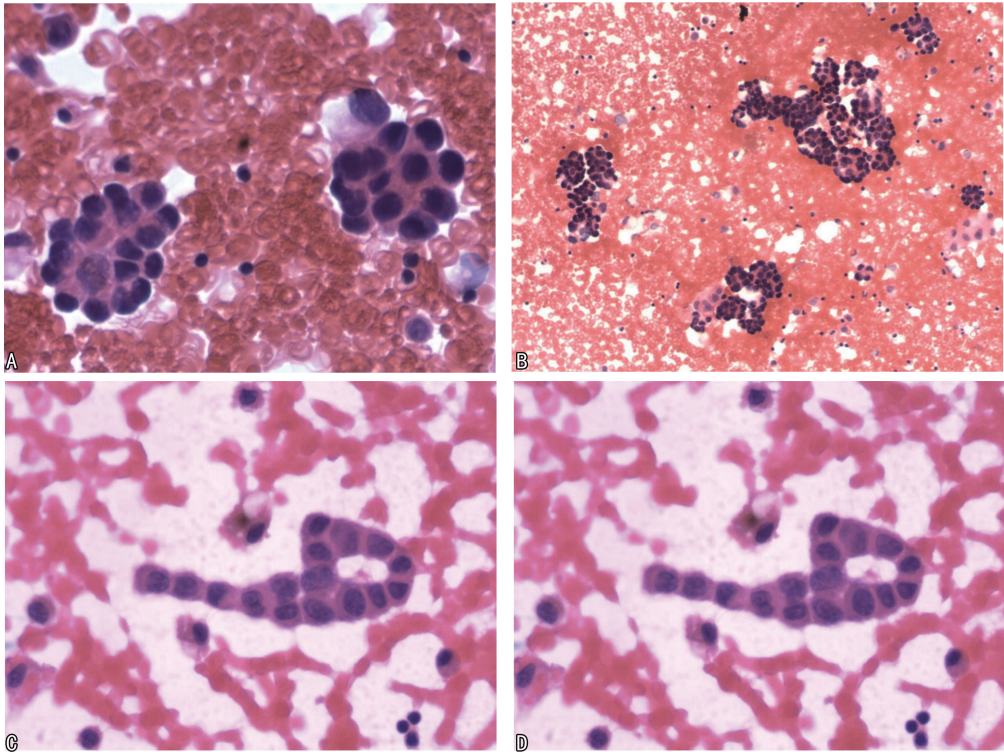
2 结果

2.1 传统涂片 (1)HE 染色:传统涂片中腺癌细胞排列呈团状、乳头状等三维立体结构。见图 1A。相互粘连,可见腺腔样排列。见图 1B。可见大小不一的分泌空泡;鳞状细胞癌约占浆膜腔积液转移性肿瘤的 5%~10%,癌细胞主要表现为排列较紧密,有站队状或成团状排列,细胞质界限不清。见图 1C。部分细胞质着色偏红,细胞核大小不一,有蝌蚪状、尾型改

变;淋巴瘤细胞以散在的幼稚淋巴细胞为主,弥漫分布,成分单一,细胞胞质少,核质比高,裸核状。见图 1D。(2)MGG 染色:细胞核呈紫红色,细胞质呈紫蓝色,红细胞为粉红色。见图 2A。黏液为紫红色或紫蓝色,核浆分色清楚。MGG 染色的涂片未经乙醇固定处理细胞不收缩,镜检时同样的细胞是 HE 染色涂片的 1.5。见图 2B。核仁、核分裂象等显示得更清晰。因此,对小细胞性肿瘤,如血液病、淋巴瘤等诊断非常有利^[4]。

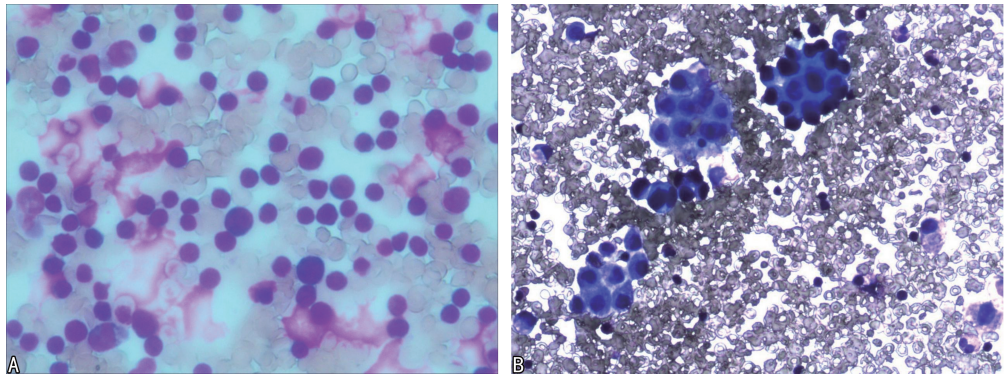
2.2 免疫细胞化学染色技术 659 例浆膜腔积液患

者中采用细胞块及免疫细胞化学染色技术 72 例,确诊为良性病变 8 例,CD68(5/8)、CR(4/8)、Vimentin(4/5);诊断为鳞癌 1 例,肿瘤细胞 CK(AE1/AE3)、P40、P63 阳性,CK7、TTF-1、Napsin A、Vimentin、CR、D2-40 阴性;诊断腺癌 58 例,AE1/AE3(45/48)、CK7(47/56)、NapsinA(29/39)、TTF-1(34/50)、Vil-lin(6/14)、Pax-8(10/28)、D2-40(4/50)、CDX2(7/19)、CA125(12/17)、WT-1(11/19)。其余 5 例免疫细胞化学检查诊断恶性、分型不明。肿瘤细胞蛋白阳性检测结果见表 1。



注:A. 肿瘤细胞呈团状,可见三维立体结构传统涂片;B. 相互粘连,呈腺腔样排列传统涂片;C. 排列紧密,有站队状或成团状排列,细胞质界限不清传统涂片;D. 弥漫分布的幼稚淋巴细胞传统涂片。

图 1 HE 染色



注:A. 淋巴细胞传统涂片;B. 腺癌细胞传统涂片。

图 2 MGG 染色

2.3 2 种方法检测结果比较 659 例患者中采用单纯传统涂片诊断为良性浆膜腔积液 303 例(45.98%),恶性浆膜腔积液 123 例(18.66%),意义

不明的、可疑恶性 233 例(35.36%);659 例患者中 72 例采用传统涂片联合细胞块及免疫细胞化学染色技术,其中诊断为良性浆膜腔积液 8 例(11.11%),恶性

浆膜腔积液 64 例(88.89%)。2 组方法相比,单纯传统涂片诊断意义不明、可疑病例的比例过高,阳性检出率较低;联合方法检出率更有效,并能一定程度确诊恶性细胞的组织起源,见表 1。

表 1 肿瘤细胞蛋白阳性检测结果(n)			
肿瘤	n	TTF-1	CK7
肺癌	33	33	32
女性生殖系统肿瘤	9	0	8
胃肠道肿瘤	7	1	5
胰胆管肿瘤	1	0	1
淋巴系统肿瘤	4	0	0
乳腺癌	1	0	1

3 讨 论

浆膜腔包括胸膜腔、腹膜腔、心包腔及鞘膜腔 4 个部分。因鞘膜腔积液量少,一般出现在一些专科医院,故本文不作叙述。浆膜腔膜由单层扁平上皮细胞构成,膜较薄易受炎症因子、药物、消化液等有害因素伤害,肿瘤细胞也极易侵犯。因此,浆膜腔积液在临床十分常见,结核分枝杆菌感染、肝脏疾病、营养障碍、结缔组织疾病、恶性肿瘤转移等均是浆膜腔积液的常见原因^[5]。而肿瘤转移导致的恶性浆膜腔积液多见于腺癌^[6]。传统涂片腺癌细胞常呈巢状、乳头状、腺管状等,具有三维立体结构,肿瘤细胞核增大,为间皮细胞的 4~5 倍,常偏位,有时可见黏液空泡^[7]。但仅利用传统涂片诊断恶性肿瘤细胞并非易事,浆膜腔积液的传统涂片采用直接涂片或离心涂片染色,检测迅速、快捷、方便操作,在临床上已广泛应用。但这种传统涂片方法仍具有其不足:(1)制成的涂片背景中常存在大量血细胞、渗出物等,干扰视野清晰度。本研究制片方法中细胞固定液为 1%冰醋酸-95%乙醇,虽能去除部分血细胞,但仍没有办法完全消除影响^[8-9]。(2)人为制片技术不足等原因导致涂片厚薄不均,细胞重叠;手法过重导致细胞被破坏,结构观察不清楚;未能及时固定导致细胞蜕变严重等对阅片造成的困难。(3)标本中存在的或涂片收集的细胞不足,异型细胞存在,但过少不足以确诊恶性也是传统涂片的短板。(4)传统涂片镜下观察时腺癌细胞的一些特征在增生活跃的间皮细胞或上皮样间皮瘤中也可出现,单纯依靠 HE 染色的形态常常难以鉴别。(5)涂片结合免疫细胞化学染色技术时常出现染色“掉片”现象,染色定位不准确,很难通过传统涂片结合免疫细胞化学染色技术鉴别良、恶性。有学者也指出,传统涂片结合免疫细胞化学染色技术的灵敏度仅为 50%~75%^[10]。而传统涂片联合细胞块及免疫细胞化学染色技术主要是在传统涂片基础上通过标

本离心沉淀进行脱水、石蜡包埋、切片后进行免疫细胞化学染色技术。免疫细胞化学染色技术是采用生物素标记的特异性抗体检测细胞中的特异性抗原,其特点是可将细胞结构和功能相结合,在提示浆膜腔积液的良、恶性方面具有较高的灵敏度和特异性^[11]。

浆膜腔积液的细胞成分较为复杂,恶性浆膜腔积液常见细胞包括鳞癌细胞、腺癌细胞等,良性积液常见的细胞包括嗜酸粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、间皮细胞、组织细胞等。在脱离了组织结构,仅以脱落细胞进行诊断效果十分有限^[12]。细胞在经外在因素影响下其形态及排列方式均会出现非典型性。因此,传统涂片联合细胞块及免疫细胞化学染色技术诊断浆膜腔积液不仅能提高阳性标本检出率,还对确定组织来源、确诊肿瘤原发灶有很重要的帮助^[13]。石蜡包埋切片技术要点为充分收集细胞,离心沉淀标本后用甲醛固定液固定,促进细胞块的形成,然后进一步石蜡包埋、切片、染色^[14]。有研究表明,在良、恶性浆膜腔积液的鉴别诊断中细胞块石蜡包埋切片比传统涂片具有更高的阳性检出率^[15-16]。

参考文献

[1] 杨丽英,朱杰. 细胞块切片联合免疫组化在浆膜腔积液诊断中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2019,26(1):93-96.

[2] 李红华,刘平,李丹. 胸腹水细胞块切片结合免疫组化在病理诊断中的应用体会[J]. 中外医学研究,2014,12(35):83-84.

[3] 熊基玲. 传统涂片与细胞蜡块联合免疫组化在渗出性胸腔积液诊断中的价值[J]. 医疗装备, 2021,34(5):55-56.

[4] 方正清,杨莉,赵一岭,等. MGG 染色在临床细胞学中的应用及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,1997(增 1):57-58.

[5] 秦叔逵,马军,李进,等. 重组改构人肿瘤坏死因子治疗恶性胸、腹腔积液的临床应用专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志,2018,23(1):67-72.

[6] 郭周庆,王红霞,吴又明. 196 例体液恶性肿瘤细胞学诊断分析[J]. 吉林医学,2012,33(2):292-293.

[7] 郭晓宁,洪蕾,方长青,等. 常规涂片联合细胞块及免疫细胞化学技术在恶性胸腹腔积液的应用[J]. 吉林医学,2019,40(4):708-710.

[8] 奉孝荣,陈莉,梁辉,等. 胸腹水沉渣切片在脱落细胞学中的作用[J]. 西部医学,2010,22(7):1230-1231.

(下转第 2437 页)

[7] SHEN H, HE M, LIN R, et al. PLEK2 promotes gallbladder cancer invasion and metastasis through EGFR/CCL2 pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):247.

[8] WANG J, HE Z, SUN B, et al. Pleckstrin-2 as a prognostic factor and mediator of gastric cancer progression[J]. Gastroenterol Res Pract, 2021, 2021:5527387.

[9] 李晓梅. 微生物中次级代谢产物的挖掘和 PLEK2 在结直肠癌中的作用机制研究[D]. 济南:山东大学, 2020.

[10] BACH T L, KERR W T, WANG Y, et al. PI3K regulates pleckstrin-2 in T-cell cytoskeletal reorganization[J]. Blood, 2007, 109(3): 1147-1155.

[11] CHAI B, GUO Y, ZHU N, et al. Pleckstrin 2 is a potential drug target for colorectal carcinoma with activation of APC/ β catenin[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(6):862.

[12] 杨会锋, 牛志鹏, 冯新献. 血清 miR-182 与 CA153 联合检测在胆囊癌诊断中的意义[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(6):758-761.

[13] CANCER A J C O, GREENE F L, PAGE D L, et al. AJCC Cancer Staging Manual [M]. Springer, 2017:303-311.

[14] ALARABIYAT M, RAZA S S, ISAAC J, et al. Incidental gallbladder cancer diagnosis confers survival advantage irrespective of tumour stage and characteristics[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(18):1996-2007.

[15] 刘利民. 外周血循环肿瘤细胞、CA199 联合中性粒细胞淋巴细胞比值对胆囊癌预后评估价值[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(20):3339-3340.

[16] 朱云楼, 王巍. 术前血清 CA125 水平对于胆囊癌诊治的临床价值[J]. 复旦学报(医学版), 2018, 45(3):384-390.

[17] TANG H, LU W, LI B, et al. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in biliary tract cancers: A systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(22):36857-36868.

[18] YANG G, LU Z, MENG F, et al. Circulating miR-141 as a potential biomarker for diagnosis, prognosis and therapeutic targets in gallbladder cancer [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 10072.

[19] WANG Y F, FENG F L, ZHAO X H, et al. Combined detection tumor markers for diagnosis and prognosis of gallbladder cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(14): 4085-4092.

(收稿日期:2022-11-28 修回日期:2023-03-16)

(上接第 2432 页)

[9] 林秋月, 林秀香. 胸腔积液病理诊断中细胞蜡块技术与传统涂片技术的应用对比[J]. 中外医疗, 2022, 41(4):42-45.

[10] 余燕琪. 胸腔积液病理诊断中应用细胞块切片免疫组化染色检测的价值[J]. 医疗装备, 2017, 30(24):68-69.

[11] 龙兆博, 唐晓梅, 司婷婷, 等. 细胞块制片免疫组化对胸腹腔积液转移性腺癌的诊断价值[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(11):1787-1790.

[12] 王晗, 赵杰, 雷芹, 等. 细胞块石蜡包埋切片和细胞涂片鉴别诊断良、恶性胸腹腔积液的临床效果比较[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(1):77-80.

[13] 梁储财, 邵少慰. 细胞蜡块在免疫细胞化学和分子病理中的应用价值[J]. 诊断病理学杂志, 2022, 29(1):27-30.

[14] 肖同浩, 陈寿松, 熊丽萍, 等. 提高胸腹水肿瘤细胞检出率的方法探讨[J]. 临床军医杂志, 2009, 37(2):277-278.

[15] CHEN D, LI X, ZHAO H, et al. The efficacy of pemetrexed and bevacizumab intrapleural injection for malignant pleural mesothelioma-mediated malignant pleural effusion [J]. Indian J Cancer, 2014, 51(Suppl 3):e82-85.

[16] 梁海红. 细胞学诊断在浆膜腔积液中的应用现状[J]. 医学信息, 2020, 33(13):30-34.

(收稿日期:2022-09-19 修回日期:2023-02-25)