

一种新型细胞蜡块立埋技术在浆膜腔积液病理诊断中的应用

张兰兰^{1,2}, 杨 莉³, 郭 英^{2,4}, 杨 巧², 陈 佳², 张义磊¹

(1. 西安交通大学基础医学院, 西安 710065; 2. 西安大兴医院病理科, 西安 710016; 3. 空军军医大学第一附属医院(西京医院)病理科, 西安 710032; 4. 西北大学医学院, 西安 710069)

摘要 目的:介绍一种新型细胞蜡块立埋技术在浆膜腔积液病理诊断中的应用。**方法:**对西安大兴医院近9年4 437例浆膜腔积液细胞蜡块标本进行分组实验,比较1 472例传统细胞蜡块包埋和2 965例改良后立埋方法对细胞病理精准诊断的影响。**结果:**改良前细胞蜡块免疫细胞化学染色(ICC)精确诊断恶性肿瘤类型及来源为67.8%(206/304),用立埋改良后经ICC诊断明确类型及来源者为97.1%(469/483),差异有统计学意义($P<0.05$)。立埋后的细胞蜡块具有与组织学类似的形态学表现,改良后细胞蜡块结合ICC恶性肿瘤诊断精确率上升,已通过ICC明确诊断腺癌、鳞状细胞癌、小细胞癌、间皮瘤、乳腺癌、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤等多种肿瘤类型,腺癌最常见,其中呼吸系统来源最多,消化系统次之,阳性率在12.8%~21.0%。**结论:**对细胞蜡块包埋方法进行立埋改良,便于免疫细胞化学多项抗体标记时的比较分析,有效地协助细胞病理医生判断恶性肿瘤的来源及类型,提高细胞病理诊断的准确率,经临床实践效果好,应用价值高,值得推广。

关键词 细胞蜡块;立埋;浆膜腔积液;细胞病理诊断

中图分类号:R361.2 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2024)12-1664-07

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.012

Application of a new type of cell wax block vertical embedding technique in the pathological diagnosis of serous cavity effusion

ZHANG Lanlan^{1,2}, YANG Li³, GUO Ying^{2,4}, YANG Qiao², CHEN Jia², ZHANG Yilei¹. (1. School of Basic Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710065, China; 2. Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710016, China; 3. Department of Pathology, Xijing Hospital, the Air Force Medical University [the Fourth Military Medical University], Xi'an 710032, China; 4. Northwestern University School of Medicine, Xi'an 710069, China)

Abstract Objective: To introduce the application of a new type of cell wax block vertical embedding technique in the pathological diagnosis of serous cavity effusion. **Methods:** Group experiments were carried out on 4,437 cell wax block specimens of serous cavity effusion in Xi'an Daxing Hospital in the past nine years. The impacts of the traditional cell wax block embedding method in 1,472 cases and the modified vertical embedding method in 2,965 cases on the accuracy of cytopathological diagnosis were compared. **Results:** The accurate diagnosis of the type and origin of malignant tumors was 67.8% (206/304) by immunocytochemical staining (ICC) before the improvement, and 97.1% (469/483) by immunocytochemical staining after the improvement of embedding. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The cellular morphology of the embedded cell block closely resembled that observed in histology. Following the implementation of improved cell block techniques combined with immunocytochemical staining, there was a notable enhancement in the accuracy of diagnosing malignant tu-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.82260319)

[通信作者] 张义磊, E-mail: zhangyilei@xjtu.edu.cn

[收稿日期] 2024-08-07

mors. ICC clearly identified adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, small cell carcinoma, mesothelioma, breast cancer, malignant melanoma, soft tissue sarcoma, and other tumor types, with adenocarcinoma being the most frequently encountered subtype. Among these cases, respiratory system malignancies were found to be the most prevalent followed by those originating from the digestive system. The positive detection rates ranged between 12.8% and 21.0%. **Conclusion:** The improved embedding method of cell wax block is convenient for comparison and analysis of immunocytochemical multiple antibody labeling, effectively assisting cytopathologists to judge the source and type of malignant tumors, and improving the accuracy of cytopathological diagnosis. It has good effect in clinical practice and high application value, and thus is worthy of recommendation.

Keywords cell wax block; vertical embedding; serous cavity effusion; cytopathological diagnosis

浆膜腔积液包括胸腔积液、腹腔积液及心包积液,是临床上常见的良性或恶性疾病的并发症^[1],最常见的诱因是恶性肿瘤^[2-3]。浆膜腔积液细胞病理诊断是病理学的重要分支,且具有应用范围广、微创、诊断快速、经济等优点^[4]。肠衣、琼脂、蛋清、液体胶等多种载体进行细胞蜡块技术^[5-8]解决了细胞学标本局限性,使细胞学标本可进一步免疫细胞化学染色(ICC)、分子病理等,且细胞病理及细胞蜡块技术具有组织学不具备的微创优势,因此,细胞蜡块制作是否成功极为重要。查阅以往文献^[5-11]均是对浆膜腔积液细胞蜡块应用试剂或者耗材进行探讨,对于细胞蜡块改良包埋方式的研究却鲜少见。本文旨在介绍一种改良后的新型包埋方式(专利号:CN201710940134),以期解决目前浆膜腔积液病例包埋后细胞量少,多次切片后出现恶性肿瘤细胞定位不同或多次切片后肿瘤细胞消失的问题,并收集西安大兴医院9年间浆膜腔积液病例进行验证,经临床应用效果好,实用价值高。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

回顾性分析2015年1月1日至2023年12月31日西安大兴医院病理科的4 437例浆膜腔积液标本,其中2015年1月1日至2020年12月31日1 472例浆膜腔积液标本为改良前期常规包埋标本作为对照组。比较传统细胞蜡块包埋方法后ICC细胞病理诊断明确率和细胞蜡块立埋方法后ICC对细胞病理

精准诊断的影响。ICC抗体及其他试剂购于DAKO公司;苏木素-伊红(HE)染液购于贝索公司。

1.2 实验方法

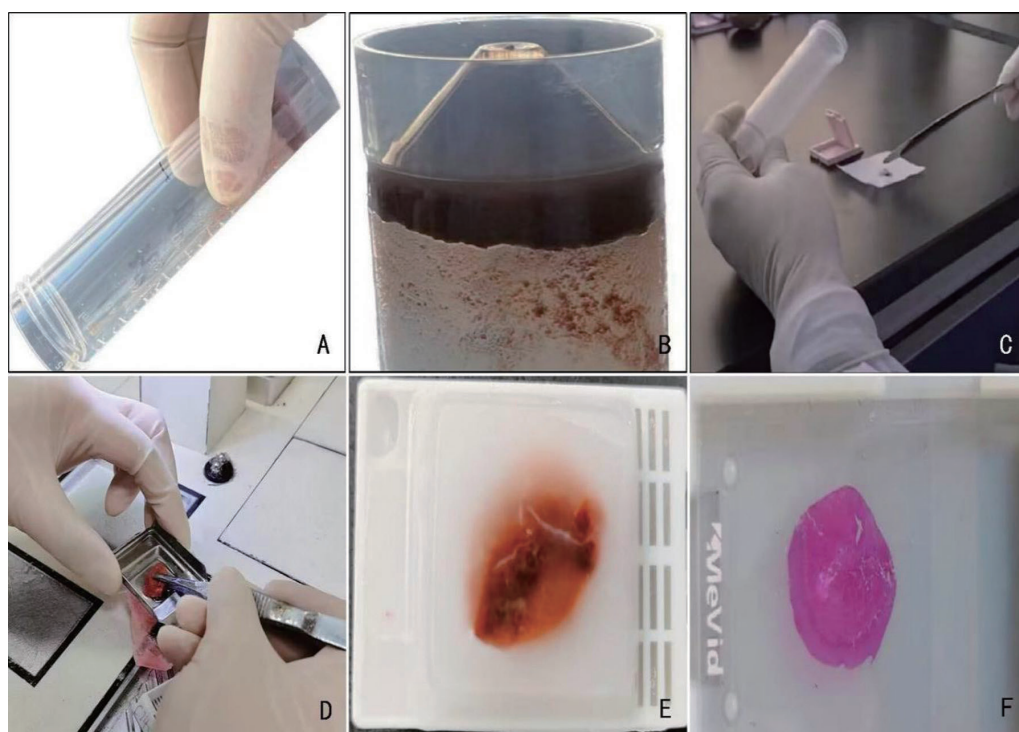
1.2.1 传统细胞蜡块制作方法 病理科收到到临床科室送检的浆膜腔积液放置4℃冰箱内过夜,次日一早将浆膜腔积液上清液弃取,取沉淀物置于50 mL离心管中,1 250 r/min离心5 min,离心后弃取试管中的上清液,留沉淀物2 mL,将沉淀物震荡均匀,加入5~10 mL的95%乙醇,再次震荡均匀,进行离心10 min,45°弃去上清液(图1A),然后将盛有沉淀物的离心管倒置15 min控出多余液体使细胞团块凝聚力更强(图1B),用勺勾深入试管底部轻轻将沉淀物滑动,顺着试管一侧壁取出(图1C),用滤纸包裹放进包埋盒并放入固定液中,常规脱水、浸蜡、普通包埋(图1D)、包埋后蜡块(图1E)进行切片、染色封片(图1F)。

1.2.2 细胞蜡块常规包埋方法改良后立埋 将临床送检的浆膜腔积液接收按照“1.2.1项”制作方法离心,沉淀物放入包埋盒常规脱水(图2A)、浸蜡、立埋,具体操作方法:将蜡块用刀片切开(图2B),将刀切面包埋于包埋盒平行(图2C),保证包到每层细胞(图2D),然后常规进行切片(图2E)、HE染色(图2F),根据诊断需求进行ICC。

1.2.3 EnVision 两步法ICC及细胞学涂片 均按照说明书操作方法进行。

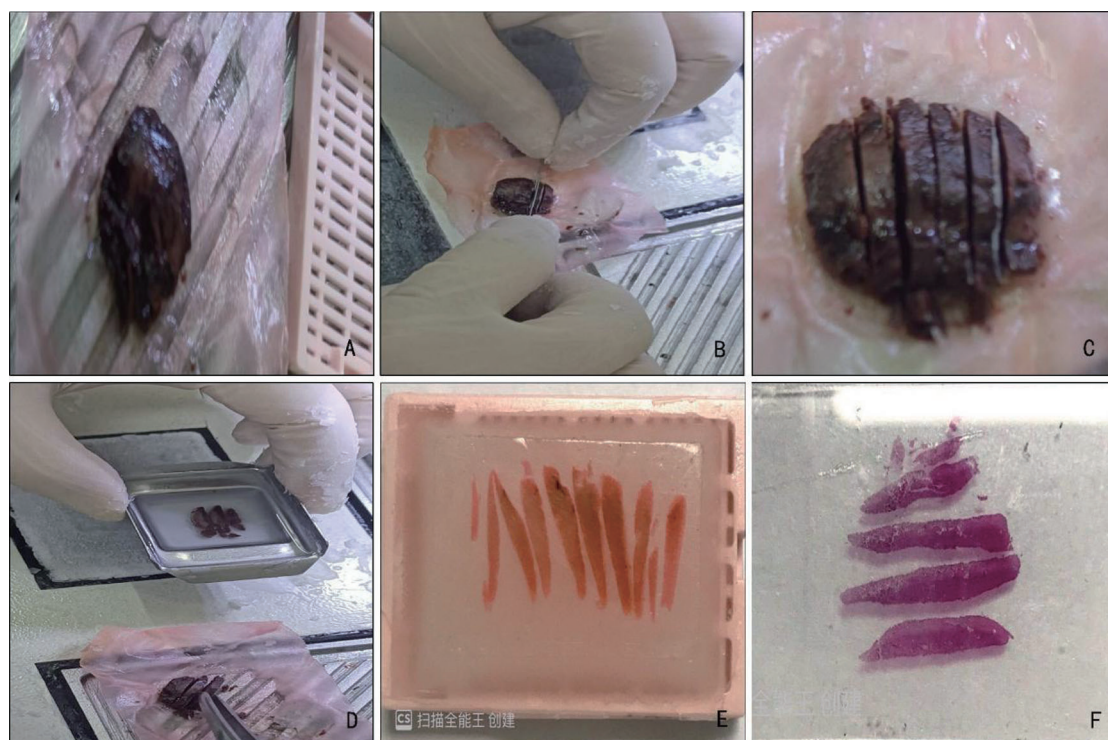
1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0统计学软件对实验数据进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。



A:浆膜腔积液离心 10 min, 45°弃去上清液; B:离心管倒置 15 min 控出多余液体使细胞团块凝聚力更强; C:用药勺深入试管底部轻轻将沉淀物滑动, 顺着试管一侧壁取出细胞团块; D:细胞蜡块平埋; E:常规包埋后蜡块图; F:常规切片图, 细胞呈现一体化。

图1 改良前平埋细胞蜡块制作步骤



A:细胞蜡块脱水完毕状态; B:细胞蜡块用刀片平行切开; C:均等间隔 2 mm 切开蜡块; D:将刀切平面与包埋盒平行依次包埋; E:平行包埋后蜡块图; F:常规切片图, 细胞分成了很多等份, 每层都切到了各层细胞。

图2 改良立埋后细胞蜡块制作步骤

2 结果

2.1 立埋改良前、后恶性浆膜腔积液精准诊断及定性诊断分析结果

统计2015年1月1日至2020年12月31日改良前1 472例与2021年1月1日至2023年12月31日改良后2 965例,共9年期间4 437例浆膜腔积液,其中恶性浆膜腔积液经细胞蜡块普通平埋及改良立埋后ICC的诊断结果显示,改良前细胞蜡块ICC精确诊断恶性肿瘤类型及来源为67.8%、20.7%,用立埋改良后经ICC诊断明确类型及来源者为97.1%、16.3%,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示立埋改良后ICC,浆膜腔积液精准诊断率显著提升(表1)。

表1 改良前、后恶性浆膜腔积液精准诊断及定性诊断分析结果

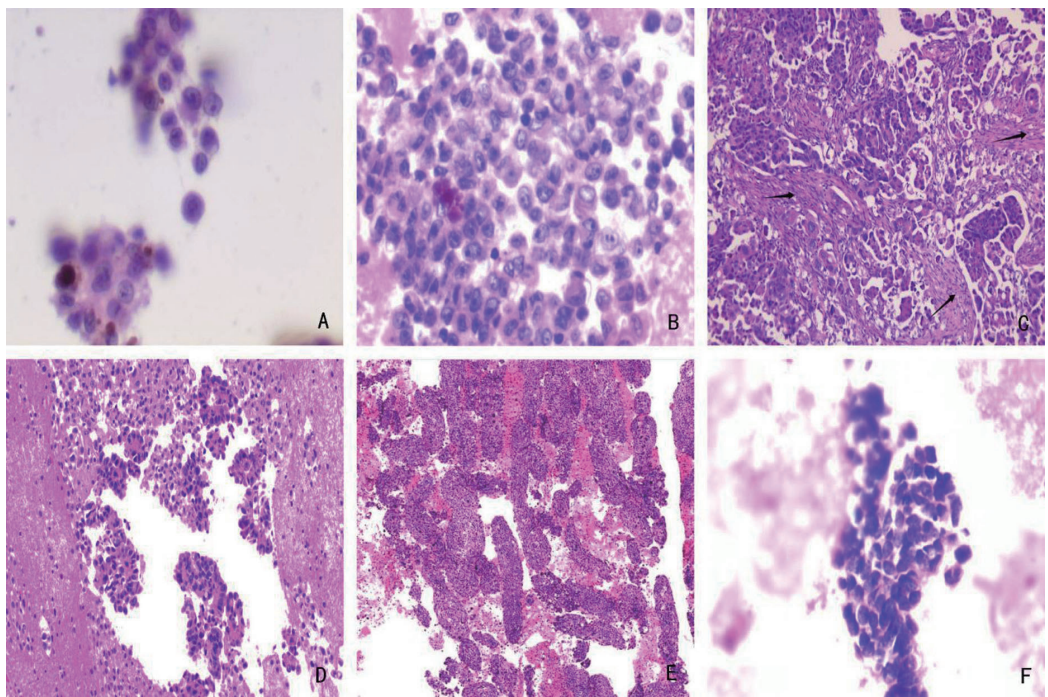
组别	精准诊断	定性诊断	阳性样本量	浆膜腔样本总量
改良前	206(67.8%)	98(32.2%)	304(20.7%)	1 472
改良后	469(97.1%)*	14(2.9%)	483(16.3%)	2 965

与改良前比较,* $P<0.05$ 。

2.2 立埋后细胞蜡块HE切片与细胞学液基制片、组织学蜡块HE切片的差异性分析

2.2.1 细胞学液基制片、立埋后细胞蜡块切片HE形态表现 细胞学涂片镜下可见核大深染的肿瘤细胞(图3A),立埋后细胞蜡块切片,光镜下肿瘤细胞多层面分布,与组织学小标本多切片捞片类似,形态学与组织学相似,核浆比高,核膜清晰,染色质粗,核异型性明显,核分裂象易见(图3B),与常规组织学切片(图3C)类似。显示立埋后细胞蜡块与液基细胞相比,具有与组织学类似的形态学表现。

2.2.2 恶性浆膜腔积液细胞蜡块HE切片形态学表现 HE细胞蜡块切片显微镜下可见腺癌大多呈乳头状、腺样排列(图3D)、鳞状细胞癌多呈巢团状(图3E),小细胞神经内分泌癌多呈镶嵌状排列,细胞质极少(图3F),细胞呈二维结构,异型性突出,细胞经脱水处理成细胞蜡块之后的切片与组织学相似,仅缺少组织学标本的间质成分,比如纤维血管等。提示恶性浆膜腔积液细胞蜡块具有与组织学表现类似的各种细胞学表现。



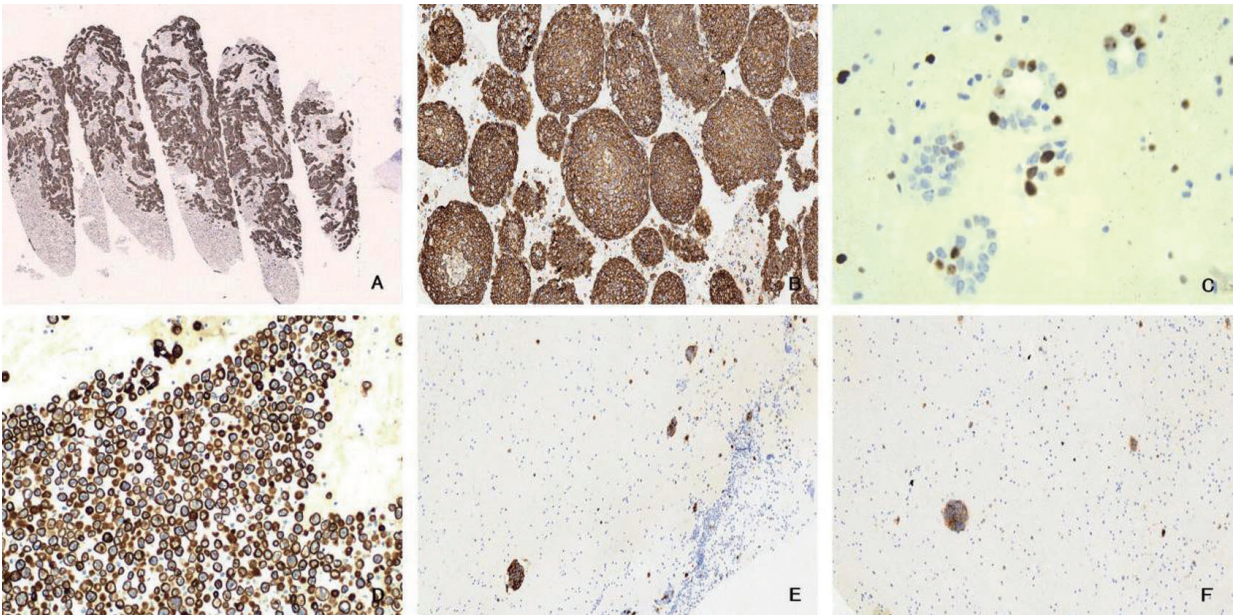
A:MSCE标本,细胞液基制片见细胞核大,核浆比高,嗜酸性大核仁,部分细胞细胞质内可见色素颗粒(HE×40);B:立埋后细胞蜡块,HE染色,肿瘤细胞密集排列,核仁明显,浆内见色素颗粒(HE×40);C:组织学标本,卵巢高级别浆液性腺癌,癌细胞之间可见促纤维间质反应,如黑色箭头所标注区域(HE×20);D:细胞蜡块,胸腔积液,肺腺癌转移,癌细胞呈腺样排列(HE×20);E:细胞蜡块,胸腔积液,宫颈鳞癌转移,癌细胞呈巢团状排列(HE×4);F:胸腔积液,肺小细胞癌转移,癌细胞呈镶嵌状排列,细胞质极少(HE×20)。

图3 各种细胞学液基制片、立埋后细胞蜡块形态

2.2.3 立埋后细胞蜡块ICC表现 细胞蜡块可结合ICC明确肿瘤类型及来源,ICC多层次定位肿瘤细胞(图4A),指导临床治疗方案,如乳腺癌HER-2细胞膜阳性(图4B),Ki67细胞核阳性(图4C)、CK19细胞浆阳性(图4D),尤其是细胞量较少的,同一层面互相之间可进行对比分析,如肺小细胞癌胸水病例,细胞量极少,CD56(图4E)与Syn(图4F)同时阳性定位于极少量肿瘤细胞,利于精准诊断。

2.4 恶性浆膜腔积液细胞蜡块病理诊断肿瘤的类型及占比

本科室2015年1月1日至2020年12月31日,浆膜腔积液细胞学标本每年仅百余例,对于细胞蜡块技术重视不足,常规细胞蜡块平埋,部分细胞脱水包埋后阳性细胞量少,无法进行足够量的ICC鉴别诊断,病理诊断多为定性诊断,未判定来源及亚型,自2021年1月1日改良后,已通过ICC明确诊断腺癌、鳞状细胞癌、小细胞癌、间皮瘤、乳腺癌、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤等多种肿瘤类型(表2),腺癌最多见,其中呼吸系统来源最多,消化系统次之。



A:细胞蜡块后ICC多层次定位肿瘤细胞(HE×4);B:细胞蜡块,胸腔积液,乳腺导管癌转移,癌细胞呈球形“炮弹”样排列,肿瘤细胞HER-2表达+++ (EnVision法,×10);C:细胞蜡块,胸腔积液,恶性间皮瘤,癌细胞呈球形“花环”样排列,肿瘤细胞Ki67高(EnVision法,×20);D:细胞蜡块,浆膜腔积液,肝内胆管细胞转移,癌细胞分化差,平铺排列,肿瘤细胞CK19细胞浆阳性表达(EnVision法,×20);E:细胞蜡块,胸腔积液,肺小细胞癌转移,癌细胞量极少,肿瘤细胞Syn表达(EnVision法,×10);F:图3E与图3D同一病例,癌细胞量极少,肿瘤细胞CD56表达(EnVision法,×10)。

图4 各种MSCE细胞蜡块后ICC染色表达情况

表2 2015—2023年恶性浆膜腔积液细胞蜡块病理诊断肿瘤的类型					
时间/年	腺癌	鳞癌	小细胞癌	乳腺癌	n(%)
2015—2020	127(42.1)	3(1.0)	3(1.0)	46(15.8)	125(42.0)
2021	91(81.2)	7(6.3)	2(1.8)	5(4.5)	7(6.3)
2022	107(77.5)	2(1.4)	7(5.1)	1(0.7)	21(15.2)
2023	172(80.3)	2(0.9)	13(3.0)	8(6.1)	19(8.9)
总计	378(78.3)	11(2.3)	22(4.6)	17(3.5)	55(11.3)

2.5 精确诊断率升高,浆膜腔积液送检量逐年升高

浆膜腔积液细胞蜡块常规制作后,对细胞蜡块包埋方法进行改良,细胞蜡块结合ICC恶性肿瘤诊断精确率上升,疾病治疗获益,临床送检浆膜腔积液标本量持续升高,阳性率在12.8%~21.0%之间,与文献报道相似^[9],见表3。

表3 2015—2023年浆膜腔积液病理总量、阳性率及阴性率
n(%)

标本类型	2015—2020年	2021年	2022年	2023年
阳性标本数量	304(21.0)	112(20.5)	138(18.6)	214(12.8)
阴性标本数量	1 168(79.0)	435(79.5)	604(81.4)	1 462(87.2)
总计	1 472	547	742	1 676

3 讨论

恶性浆膜腔积液是晚期恶性肿瘤患者常见的并发症^[12],也是部分肿瘤患者的首发症状^[13],很难也没有必要再次取材进行组织学对照,因此,浆膜腔积液细胞学诊断不应局限于定性诊断,要结合细胞蜡块ICC、分子检测判定肿瘤来源及亚型,这对治疗及预后至关重要。根据TNM分期,无论患者原发肿瘤及淋巴结转移情况,只要出现恶性浆膜腔积液,即表示患者出现远处转移,临床分期达到Ⅳ期,此类患者往往预后不佳^[14-15]。引起恶性浆膜腔积液的病因甚多,当临床出现恶性浆膜腔积液时,应尽快微创穿刺送检积液确定肿瘤性质并寻找原发灶。病理医生对恶性浆膜腔积液性质精确判定决定了临床治疗及患者的预后。细胞脱水后制作的蜡块中肿瘤细胞形态与组织学蜡块类似,并且结合ICC不仅可以鉴别浆膜腔积液良恶性,还能判断疾病来源,因此立埋后制作细胞蜡块保证足够量的细胞数量进行ICC确诊肿瘤类型及来源具有重要的意义^[16]。

细胞蜡块的制作及其重要,其中细胞蜡块的包埋方则是其中关键的一个步骤。细胞蜡块制作过程中,多次离心,由于离心力的作用,肿瘤细胞易于沉淀在试管的尖部,在传统包埋方法中,需要将试管沉淀物的尖端(此处大量癌细胞沉积)朝下放置于包埋盒进行包埋,该操作是为了保证将大量癌细胞保留在切片上,提高细胞蜡块的诊断准确率。传统包埋方法,肿瘤细胞极其多的样本细胞蜡块成功率高,但对于脱水后的细胞蜡块包埋时,一方面不好辨认包埋方向,尤其是细胞蜡块量极少的细胞团块,另一方面会出现包埋面仅有肿瘤细胞或者血细胞等,影响免疫细胞化学对多量白片的要求,改良后每张细胞蜡块切片均能展现同种细胞层面,避免在多次切片后出现恶性肿瘤细胞定位不同,或者肿

瘤细胞切完消失的事故,有利于多项抗体标记时ICC的对比分析,使恶性浆膜腔积液细胞蜡块ICC的成功率极大的提高,有效地帮助细胞病理医生精确判断恶性肿瘤的来源及类型。

恶性浆膜腔积液经过离心固定制作成细胞蜡块经过脱水后,即可常规立埋制片,简单易行。而且通过对比细胞蜡块、细胞学涂片和组织学蜡块,发现细胞蜡块细胞量丰富、与组织学蜡块相似,可连续切片进行ICC染色,同时运用多种抗体进行肿瘤细胞来源进行鉴别,且可长时间保存,为后期治疗需要进一步基因检测等靶向治疗^[17]提供样本。基于细胞蜡块可结合ICC、基因检测进行诊断的优点,本科室恶性浆膜腔积液中已确诊来源于消化系统、生殖系统、呼吸系统、淋巴瘤、间皮瘤、乳腺癌等多种类型肿瘤,对临床治疗有指导意义。

综上所述,细胞蜡块的制作弥补了细胞学相对于组织学的所有不足,又有组织学不具备的微创优势,改良后的使用立埋的方法,使细胞蜡块ICC的成功率极大提高,细胞学的诊断精确率明显提升。本包埋方法的创新性在于立埋后的每张细胞蜡块切片均能展现同一种细胞层面,避免在多次切片后出现恶性肿瘤细胞定位不同,或者肿瘤细胞切完消失的事故,且操作简单易于推广,尤其是恶性浆膜腔积液标本,绝大部分无法进行组织学结果再次验证,此立埋技术提高了细胞病理诊断的准确率,对临床治疗及预后具有重大意义,经临床应用效果好,实用价值高,值得推广。

参考文献:

[1] 梁海红,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.
[2] 赵维聪,彭江兰,牙冬雪,等.免疫组织化学特异性抗体诊断浆膜腔积液转移性腺癌与增生性间皮细胞的应用价值[J].生命科学仪器,2024,22(2):64-65,69.
[3] 马燕红,陆夏良,覃玲艳,等.浆膜腔积液转移性乳腺癌17例细胞病理学特征及分子分型分析[J].中国肿瘤临床,2024,51(4):192-196.
[4] 胡羽丽,唐萌,金菊,等.浆膜腔积液标本中检出鳞状细胞癌38例的临床及病理特征分析[J].江苏医药,2024,50(2):178-181,217.
[5] 李春梅,陈佳雪,任玉波.肠衣在细胞蜡块制备中的应用

- [J]. 临床与实验病理学杂志, 2024, 40(6): 665-667.
- [6] 苏讷敏,易驰喆,黄灵泉,等. 宫颈细胞蜡块制作方法在宫颈病变筛查中的比较研究[J]. 医学信息, 2021, 34(7): 170-173.
- [7] 李欣,李建盈,邢萌,等. 蛋清细胞块制作方法的改良[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2017, 5(4): 221-225.
- [8] 席大力,孙少华,席大力,等. 液体胶在细胞蜡块制作中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(7): 863.
- [9] 范春阳,马丽莉,刘进军. 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[J]. 现代医药卫生, 2023, 39(14): 2429-2432, 2437.
- [10] 刘芳,刘增辉,张丹芳,等. 试剂盒法制备细胞块的效果及其技术要点[J]. 天津医科大学学报, 2019, 25(6): 657-658.
- [11] 刘甜,周颖,胥素娟,等. 细胞蜡块制作方法精细化改良及在腹腔积液病理诊断中的应用[J]. 诊断病理学杂志, 2022, 29(8): 774-776.
- [12] MA Q, HE X, ZHANG B, et al. A PD-L1-targeting chimeric switch receptor enhances efficacy of CAR-T cell for pleural and peritoneal metastasis[J], 2022.
- [13] NIRAG JHALA, AILEEN ARRIOLA, LIRON PANTANOWITZ. Serous cavity metastasis: Evaluation of unknown primary[J]. Cytojournal, 2022, 19: 16.
- [14] 于鸿滨,张连杰,于鸿滨,等. 浆膜腔积液细胞形态学与细胞病理学诊断恶性积液的价值[J]. 中外医学研究, 2023, 21(30): 65-68.
- [15] 王雪,张璐璐,薛庆亮,等. 恶性胸腔积液预后评分系统的研究进展[J]. 中国现代医生, 2023, 61(7): 108-111, 116.
- [16] CHANG Y H, ZOU B Q, CAI Y, et al. Cytopathological characterization of ascites for the diagnosis of serous ovarian carcinoma[J]. 2023: 424-432.
- [17] 黄艳超,崔虎军,姜红锦,等. 贝伐珠单抗治疗恶性浆膜腔积液的研究进展[J]. 中国老年保健医学, 2024, 22(1): 101-105.

本文引用格式:

张兰兰,杨莉,郭英,等. 一种新型细胞蜡块立埋技术在浆膜腔积液病理诊断中的应用[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(12): 1664-1670. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.012

ZHANG L L, YANG L, GUO Y, et al. Application of a new type of cell wax block vertical embedding technique in the pathological diagnosis of serous cavity effusion[J]. Journal of Guangxi medical university, 2024, 41(12): 1664-1670. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.012