

尿脱落细胞琼脂石蜡双包埋连续切片法*

郭智俊, 彭桂香

(广东省人民医院南海医院/佛山市南海第二人民医院病理科, 广东佛山 528251)

[摘要] **目的** 研究设计一种尿脱落细胞连续切片方法。**方法** 收集尿液标本离心沉淀,先用琼脂将沉淀物包埋成团块后进行脱水、透明、浸蜡,再用石蜡包埋,然后进行石蜡连续切片(3~4 μm)、苏木精-伊红(HE)染色。**结果** 镜下细胞集中、结构清晰、厚薄均匀,细胞量明显比涂片法丰富,部分可见组织结构;HE染色核质对比好,色彩鲜艳明亮。**结论** 尿脱落细胞琼脂石蜡双包埋连续切片法克服了涂片法的不足,设备简单,操作简便,宜于普及推广。

[关键词] 尿脱落细胞;琼脂;石蜡切片;细胞病理学

[中图法分类号] R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)18-2464-03

The consecutive section method of urine exfoliated cells with agar-paraffin double-embedded*

GUO Zhijun, PENG Guixiang

(Department of Pathology, Nanhai Branch of Guangdong General Hospital, /the Second Peoples Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528250, China)

[Abstract] **Objective** To study and design a new consecutive section method of urine exfoliated cells. **Methods** The centrifugated urine samples were collected. The precipitates were embedded with agar, and then the dehydration, transparency and waxdip have been done. Finally, the specimens were blocked in paraffin, and were consecutively cut into 3-4 μm sections. All Sections were stained with HE. **Results** Under the microscope, more urine exfoliated cells were observed in the consecutive sections than those in the smears, showed concentrated cells, clear structure and homogeneous thickness, and tissue structures were partially visible. The nucleoplasm was identified easily in the consecutive sections stained with HE with bright colour. **Conclusion** The consecutive section method of agar-paraffin double-embedded urine exfoliated cells overcomes the shortcomings of the smear method, and needs simple equipment with easier operation, which is suitable for popularization in primary medical institutions.

[Key words] exfoliated cells in urine; agar; paraffin section; cytopathology

泌尿系肿瘤是我国常见的恶性肿瘤之一,尿脱落细胞检查对泌尿系肿瘤的早期诊断、术后随访的意义已得到公认。常规的尿脱落细胞检查采用涂片法,该方法无创、快速、操作简易,在临床工作中得到了广泛应用。但常规涂片法细胞少而分散,细胞核易退变成毛玻璃状;当标本含有大量血液时,涂片见成片的红细胞,常常出现细胞堆积、重叠、厚薄不均匀,细胞结构及背景不清晰,细胞从玻片脱落等现象,往往导致癌细胞检出率低。近年来,切片技术在胸腔积液、腹水和痰脱落细胞学中的应用,提高了制片质量,但未见尿脱落细胞切片的研究报道。笔者在实际工作中经过研究探索,设计了尿脱落细胞琼脂石蜡双包埋连续切片法,克服了常规尿脱落细胞涂片法的缺点,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 采用普通水平式离心机,石蜡切片采用病理科的常规组织切片程序。

1.1.2 试剂配制 (1)5%琼脂:称取琼脂粉 5 g 置三角烧杯中,加蒸馏水 100 mL 加热煮沸使琼脂充分溶解,置 65 °C 恒温箱中,保持熔化状态备用。(2)0.3%伊红乙醇溶液:0.3 g 伊红加入 95%乙醇溶液至 100 mL。(3)10%醋酸乙醇溶液:10 mL 冰醋酸加入 95%乙醇溶液至 100 mL。

1.2 方法

1.2.1 标本留取 为患者备好一个容量为 500 mL 以上的洁净尿瓶,加入 10%醋酸乙醇溶液 100 mL,并在其 100 mL 处作一标记,备用。将晨起第 2 次尿液排入上述备用的尿瓶内,或者嘱患者在排空膀胱后,饮水 500 mL 左右,于 1~2 h 后收集第 1 次膀胱排空的尿液 200~300 mL 于上述备用的尿瓶中送病理科检查。

1.2.2 标本处理 将收到的尿液标本静止沉淀 30 min,慢慢倒掉尿液至 100 mL 标记处,并将此尿液分装在两个 50 mL 的离心管中,或者将尿液分装在 8 个 15 mL 的离心管中,经 1 800 r/min 离心沉淀 5 min,

弃上清液;然后将沉淀物集中到一支试管内,经 1 800 r/min 离心沉淀 5 min,弃上清液,取少量沉淀物做直接涂片 2 张,常规苏木精-伊红(HE)染色;再在剩余的沉淀物中加入 0.3%伊红乙醇溶液 1~2 mL,以 2 000 r/min 离心 8 min,吸去上清液,将保留管底沉淀物的试管置 65 °C 恒温箱中备用。

1.2.3 沉淀物琼脂石蜡双包埋处理 将 5%琼脂从 65 °C 恒温箱中取出。同时从恒温箱中取出保留管底沉淀物的试管,加入熔化的琼脂 1~3 滴,放置冰箱待凝固成细胞团块后取出细胞团块,用刀片将其周围的琼脂切去。将细胞团块放入已编号的包埋盒中,置脱水机常规脱水、透明、浸蜡,取出细胞团块进行石蜡包埋。或者将细胞团块放入已编号的包埋盒中进行人工脱水,步骤:(1)乙醇甲醛混合液(95%乙醇 9 份,浓甲醛 1 份)中 30 min;(2)95%乙醇 I 20 min;(3)95%乙醇 II 30 min;(4)100%乙醇 I 20 min;(5)100%乙醇 II 30 min;(6)叔丁醇 I 20 min;(7)叔丁醇 II 30 min;(8)石蜡(熔点 52 °C) I 30 min;(9)石蜡(熔点 58~60 °C) II 30 min。以上各步骤均放置在 62 °C 的恒温箱中进行。取出细胞团块进行石蜡包埋。

1.2.4 连续切片和染色 蜡块修整整齐,越小越好,连续切片,沉淀物少的标本一次切完,不换刀,不移动刀片。切片应薄而均匀,切片厚度为 3~4 μm,贴片时水温要恰当,使蜡片伸展无皱折,将切片分别贴在普通载玻片和涂胶载玻片上,每张载玻片根据切片的大小按顺序排列 3~6 排,其中第 1~3 片贴在普通载玻片上,第 4~6 片贴在涂胶载玻片上,按顺序以此类推。普通载玻片按常规方法脱蜡、HE 染色、封片;涂胶载玻片留做备用。

2 结 果

包埋好的蜡块经过切片、HE 染色后,镜下细胞量明显比常规涂片法丰富,细胞集中,厚薄均匀,结构清晰,核质对比好,色彩鲜艳明亮,部分可见组织结构,易于观察诊断,见表 1、图 1、2。

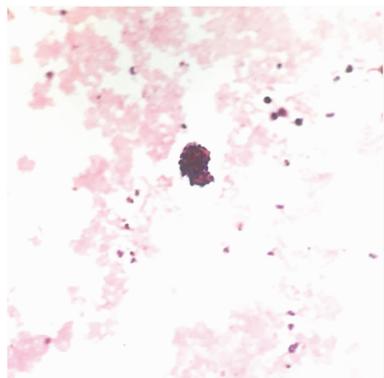


图 1 尿脱落细胞涂片法镜检(HE×200)

表 1 两种方法制片质量比较

质量指标/方法	涂片法	切片法
细胞数量	较少	较多
镜下观察范围	观察范围大,费时	观察范围小,省时
细胞变形及退变	常见	偶见

续表 1 两种方法制片质量比较

质量指标/方法	涂片法	切片法
细胞形态结构	形态结构不够清晰	形态结构清晰
细胞染色	染色不够鲜艳	色彩鲜艳明亮
异型细胞数量	较少,分散	较多,集中
细胞层次和排列	细胞重叠多层、团块状排列	细胞厚薄一致,小簇状、薄片状排列

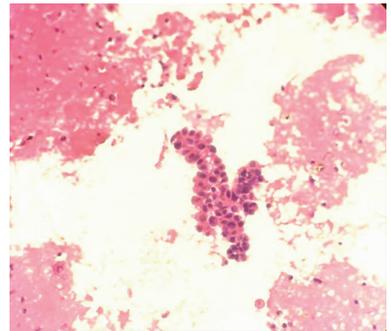


图 2 尿脱落细胞切片法镜检(HE×200)

3 讨 论

尿路上皮分布广泛,从肾盂、肾盏、输尿管、膀胱直到尿道起始部。尿路上皮细胞癌是继前列腺/乳腺癌、肺癌和结直肠癌后第 4 种最常见的肿瘤类型^[1]。尿路上皮细胞癌中膀胱癌最常见,占有尿路上皮细胞癌的 90%~95%^[2]。膀胱癌的发病率和病死率在泌尿系统疾病中均居首位^[3]。虽然其恶性程度低,但复发率较高^[4],一旦发生侵袭或转移预后极差^[5]。因此,早期发现并给予积极治疗是提高临床治愈率的关键^[6-8]。目前膀胱癌的诊断主要以膀胱镜、尿脱落细胞学和荧光原位杂交技术(FISH)为主,然而三者都存在一定缺陷^[9-10],膀胱镜检查是目前术前诊断和术后随访的“金标准”,膀胱镜虽然在检查过程中能够很好地直观病灶及取样活检,但是膀胱镜是有创检查,患者往往很抵触这种昂贵、痛苦的侵入性检查,在临床应用中受到了很大的制约;同时,膀胱镜由于观察范围有限并依赖操作者的经验,可能会遗漏位于膀胱前壁和肾小盏等难以窥视部位的肿瘤,另外一些平坦型病变或原位癌也是膀胱镜检查的盲区^[11]。FISH 诊断膀胱癌的特异性与常规尿脱落细胞相当,且敏感性大大提高,优于尿脱落细胞检查,有研究表明该检测有着较高的灵敏度(70%~96%)及特异度(65%~96%)^[12-14]。但是,FISH 检测费用昂贵,在一定程度上增加了患者的经济负担,同时其所需设备及技术要求高、操作流程复杂,大范围普及有一定的难度。超声、X 射线、CT 和磁共振成像(MRI)影像学检查,虽然整个尿路的情况能够显示出来,但对于血尿患者中常见的占位性病变如血凝块、炎性包块和肿瘤不易鉴别,常常不能明确病灶的性质。

尿液脱落细胞学检查是临床泌尿系肿瘤的有效筛查手段^[15-16]。尿脱落细胞学检测膀胱癌的灵敏度为 13%~75%,特异度为 85%~100%,其特异度不但是目前无创诊断指标中最高的,而且也得到了美国

国立综合癌症网络(NCCN)指南作为无创诊断指标的惟一推荐。其在原位癌的诊断中具有较高价值^[17]。尿脱落细胞学检查不受肿瘤部位的限制,即使在发病早期由于肿瘤细胞代谢旺盛仍可有较多的癌细胞从病灶表面脱落,可以通过细胞学的方法早期发现及诊断。尿脱落细胞学检查方法简便,可反复多次检查,且可以发现膀胱镜检查不易观察到的特殊部位肿瘤,对患者无损伤,安全、经济、特异性较高,容易被患者接受,因此在基层医院广泛应用。但尿脱落细胞涂片检查的缺点是灵敏度低^[18]。尿脱落细胞涂片检查灵敏度低的原因是:(1)传统的留尿方法是每天留取早晨第 2 次尿的中段尿 10 mL,由于只留取 10 mL 中段尿,常常导致离心后无沉淀物,涂片镜下细胞成分少或看不到细胞成分,从而影响尿脱落细胞检出率;此外,在送病理科之前未对尿液标本进行处理,细胞成分易被变性。(2)常规尿液涂片法涂片范围大,镜下细胞分散、观察费时,易漏诊。(3)涂片细胞固定较困难,如果用湿固定法,直接将玻片放入 95%乙醇内固定,会造成大多数细胞脱落,造成漏诊,导致出现假阴性;如果干燥后再固定,细胞会发生退变,细胞核模糊不清,造成误诊,导致出现假阳性。(4)当尿液中有较多细胞时,特别是血尿患者有大量红细胞时,常规涂片镜下细胞出现堆积重叠现象,造成诊断困难。为了克服涂片法的不足,笔者设计了尿脱落细胞琼脂石蜡双包埋连续切片法,该方法收集晨起的第 2 次全部尿液,收集尿液更多,阳性率更高。同时,由于在留取尿液标本中加入了 10%醋酸乙醇溶液,细胞在液体中立即固定,避免常规涂片后空气干燥造成的细胞退变,保持了原有的细胞形态结构;其中的醋酸也能溶解过多的红细胞,既避免红细胞遮挡、细胞重叠,又节省了阅片时间,减少了漏诊,提高了工作效率。标本离心处理过程中加入 0.3%伊红乙醇溶液,使沉淀物着色,便于在包埋、切片和漂片时辨认。琼脂是一种从海藻类石花菜中提取的多分支的复杂多糖,具有三维空间网状多孔性结构,琼脂溶解度为 90℃,凝固度为 40℃。同时,琼脂易溶于水,在室温下几分钟就能凝固。琼脂具有凝固性、稳定性、支持性和耐切割性,在浸蜡的温度下仍为固态。由于固态琼脂含有网状孔隙,所以在脱水、透明、浸蜡的过程中乙醇、二甲苯或叔丁醇和石蜡都可通过琼脂渗透到组织细胞中,不影响组织细胞的脱水、透明和浸蜡。琼脂的浓度不能太高,低浓度的琼脂更有利于脱水剂、透明剂和石蜡的渗透;但浓度也不可太低,以保持其形状完整,不易碎裂为宜。本文使用 5%琼脂达到了良好的效果。尿脱落细胞用琼脂包埋后,在脱水、透明、浸蜡的过程中既可以避免细胞及碎小组织丢失及其他细胞、碎小组织的混入,又可克服尿脱落细胞沉淀物太小所造成的包埋困难。用该方法几乎能收集尿液中的所有细胞,制成的蜡块进行连续切片,各细胞及碎小组织可以完整切出,防止由于切片不完全所造成的漏诊。同时,笔者采取的贴片方法有利于切片连续不乱,整齐排列,每

张载玻片可多贴切片,既节省载玻片又有利于显微镜下观察。制出的切片镜下细胞量明显比常规离心涂片法丰富,切片观察范围比涂片小,观察省时,细胞无重叠,厚薄一致,细胞结构及背景清晰,部分可见组织结构;HE 染色核质对比好,色彩鲜艳明亮,可提高尿脱落阳性细胞的检出率。同时,蜡块便于长期保存及进行免疫细胞化学等检测。

综上所述,尿脱落细胞琼脂石蜡双包埋连续切片法克服了常规涂片法的不足,设备简单,操作简便,费用低廉,在尿路上皮癌的诊断和术后监测上具有重要的临床意义,值得普及推广应用,尤其是可以作为基层医院的常规筛查方法。同时,笔者目前正在研究应用尿脱落细胞涂片法和尿脱落细胞琼脂石蜡双包埋连续切片法进行对比观察并进行免疫细胞化学等检测,进一步寻找早期诊断膀胱癌的特异度和灵敏度更高的诊断指标,从而降低假阳性率和假阴性率。

参考文献

- [1] MONTEIRO-REIS S,LECA L,ALMEIDA M, et al. Accurate detection of upper tract urothelial carcinoma in tissue and urine by means of quantitative GDF15, TMEFF2 and VIM promoter methylation[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(1):226-233.
- [2] ALTIERI V M,CASTELLUCCI R,PALUMBO P, et al. Recurrence and progression in non-muscle-invasive bladder cancer using EORTC risk tables[J]. *Urol Int*, 2012, 89(1):61-66.
- [3] 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析[J]. *癌症进展*, 2013, 11(1):89-95.
- [4] KIM S Y,MYUNG S J. Optical molecular imaging for diagnosing intestinal diseases [J]. *Clinic Endosc*, 2013, 46(6):620-626.
- [5] 那彦群. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013:21-28.
- [6] 宋正尧,梁朝朝,江长琴,等. FISH 技术在中国人膀胱尿路上皮癌诊断及复发监测中应用的研究[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2011, 26(11):823-826.
- [7] 沈瑞存,邵可可. 新辅助化疗在经尿道膀胱肿瘤电切除术中的应用[J]. *实用药物与临床*, 2014, 17(7):875-878.
- [8] 何非平. 吡柔比星不同灌注方法对膀胱癌术后复发的影响[J]. *实用药物与临床*, 2014, 17(1):50-52.
- [9] RAITANEN M P,KAASINEN E,LUKKARINEN O, et al. Analysis of false-positive BTA STAT test results in patients followed up for bladder cancer [J]. *Urology*, 2001, 57(4):680-684.
- [10] INOUE T,NASU Y,TSUSHIMA T, et al. Chromosomal numerical aberrations of exfoliated cells in the urine detected by fluorescence in situ hybridization:clinical implication for the detection of bladder cancer[J]. *Urol Res*, 2000, 28(1):57-61.
- [11] TSCHIRDEWAHN S,VOM DORP F. Diagnostics of non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder[J]. *Urologe A*, 2015, 54(4):480-483.
- [12] MALKHASIAN K A,PETROV S V. (下转第 2473 页)

性,4 份切片标本 A、B 两组均为阴性。在相同切片标本的 21 号检测靶点中,A、B 两组均有 11 份疑似阳性标本,两组扩增曲线 CT 值之差均小于 0.99;结合内质控(内参)CT 值分析,最终结果判定 6 份切片标本 A、B 两组均为阳性,5 份切片标本 A、B 两组均为阴性。本研究中只检测到 18、19、21 这 3 个靶点的阳性结果进行比对,其他的 3 个靶点未检测到阳性结果。最终结果分析表明同一份切片标本分为 A、B 两组经不同的脱蜡剂处理后同时实时荧光定量 PCR 分析,结果无差异,阳性及阴性结果判定相符。A、B 组各检测靶点扩增曲线比较,见图 2。

3 讨论

EGFR 基因共 28 个外显子,其中编码酪氨酸激酶的是第 18~21 号外显子。关于 EGFR 基因突变的研究表明,尽管突变部位分散整个酪氨酸激酶编码区,但绝大多数突变集中在第 19 外显子的缺失和第 21 外显子的 L858R 点突变。本实验使用的 EGFR 突变检测试剂盒由上海源奇生物公司提供,检测 18、19、20、21、S768I、T790M,共 6 个靶点,方法简便、快速、准确。进行 EGFR 基因突变检测时,本研究将每份石蜡切片分入 A、B 两组,分别用二甲苯和松节油脱蜡处理后^[7],同时进行实时荧光定量 PCR 扩增,探讨两组扩增曲线的差异性,保证 EGFR 基因突变检测结果判读的客观性和准确性^[8-9],同时又为实验室塑造一个良好的工作环境,确保实验操作每一个过程有效合理^[10]。分析 A、B 两组同一份石蜡切片检测相同靶点时有效扩增曲线 CT 值,以及内质控(内参)CT 值之差均小于 0.99,最终判定两组阳性、阴性结果均相符,确定采用二甲苯和松节油两种脱蜡剂后实时荧光定量 PCR 扩增实验结果判读一致,完全相符。本报道旨在研究石蜡块 EGFR 基因突变检测时使用不同的脱蜡剂后,实时荧光定量 PCR 扩增曲线形态的相似性,CT 值结果比对的差异性,以及最终对实时荧光定量 PCR 扩增结果相符度的比较。至于在基因突变检测诸多方法中,如荧光原位杂交技术(FISH)和 DNA 测序,不同的脱蜡剂对结果有无影响则需要进一步的研究。

综上所述,采用二甲苯和松节油对石蜡切片行脱蜡处理后,其实时荧光定量 PCR 分析结果判读无差异。对于靶点的检测无影响^[11-12]。由于二甲苯具有极强的挥发性,对人体健康有一定的影响,而松节油对人体无害,采用松节油脱蜡既保证了分子实验室的空气环境,保护了工作人员的身体,同时又不影响实时荧光定量 PCR 结果分析的准确性及可靠性^[13],可使实验室的操作更加规范、科学、合理。

参考文献

- [1] 王伯云,李玉松,黄高昇,等.病理学技术[M].北京:人民卫生出版社,2000:128-134.
- [2] 傅春燕,胡康新,肖德胜,等.松节油香味封片剂在 HE 制片中的应用[J].诊断病理学杂志,2006,13(5):397.
- [3] 谭俊,符弘枚.松节油型生物制片透明剂在 HE 制片中的应用[J].国际检验医学杂志,2010,31(8):908-909.
- [4] 曹晖,胡平,方力.松节油与二甲苯混合液替代单纯二甲苯进行组织透明的实验体会[J].黑龙江医药科学,2000,23(1):70.
- [5] 杨军.组织标本处理的经济环保流程[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(46):9015-9017.
- [6] 韩庆伟,詹彦萍.松节油透明在冰冻切片中的应用[J].实用医技杂志,2007,14(14):1866-1867.
- [7] 邓昂.病理切片中松节油代替二甲苯脱蜡[J].中华医学杂志,2002,26(5):262.
- [8] 阙丹,肖何,陈川,等. REDE-DHPL(检测 NSCLC 血浆 EGFR 突变及其临床意义[J].重庆医学,2016,45(13):1767-1769.
- [9] 喻巍,梁剑平,杨德松,等.连续 100 例肺癌术后 EGFR 基因突变检测结果分析[J].肿瘤药学,2016,6(2):150-153.
- [10] 罗勇军,刘昕.实时荧光定量 PCR 标准品的制备及应用[J].重庆医学,2005,34(3):414-415.
- [11] 王鑫,支修益.2009 年非小细胞肺癌靶向治疗新进展[J].中国处方药,2010,8(4):42-44.
- [12] 王梁燕,洪奇华,张耀洲.实时定量 PCR 技术及其应用[J].细胞生物学杂志,2004,26(1):62-67.
- [13] 高云,陈嘉昌,朱振宇,等. EGFR 基因突变及其检测方法的研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2011,3(1):51-57.

(收稿日期:2017-08-13 修回日期:2018-03-12)

(上接第 2463 页)

- [9] 王实,赵秋,戴一杨,等.中药清胰汤对 ERCP 术后胰腺炎预防作用的探讨[J].中华中医药学刊,2012,30(10):2276-2278.
- [10] 刘存根,冷大跃,刘欢,等.清胰汤预防经内镜逆行性胆管造影术后所致胰腺炎和高淀粉酶血症的临床研究[J].中国中西医结合杂志,2009,29(7):607-610.
- [11] 张俊.清胰汤对 ERCP 术后胰腺炎的预防作用[J].河南中医,2016,36(8):1419-1421.
- [12] 张廷凯,郭东梅,李启菊,等.清胰汤灌肠对 ERCP 术后胰腺炎及高淀粉酶血症发生的预防[J].中国中西医结合消化杂志,2012,20(6):269-270.
- [13] 杨德平,王荣.中西医结合预防 ERCP 术后胰腺炎研究[J].江西中医药,2007,38(10):47.
- [14] SOFUNI A, MAGUCHI H, MUKAI T, et al. Endoscopic pancreatic duct stents reduce the incidence of post-endo-

scopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis in high-risk patients [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011,9(10):851-858.

- [15] 廖雯斐,王红玲,江平,等.不同方法预防 ERCP 术后胰腺炎效果的 Meta 分析[J].中华消化外科杂志,2014,13(9):702-708.
- [16] 周庆,王鸣,吴丽丽.鼻胆管引流术预防内镜逆行胆管造影术后胰腺炎的 Meta 分析[J].北京医学,2017,39(3):232-235.
- [17] 陈道华.空肠营养管联合清胰汤治疗重症胰腺炎疗效评价[J].河南医学研究,2014,23(8):63-65.
- [18] 吴承堂,黎沾良,黄祥成,等.中药清胰汤及双歧杆菌合剂对急性坏死性胰腺炎肠道细菌移位影响的比较研究[J].世界华人消化杂志,1999,7(6):525-528.

(收稿日期:2017-04-15 修回日期:2018-03-24)