



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109975090 B

(45) 授权公告日 2021.08.10

(21) 申请号 201910297308.X

G01N 1/36 (2006.01)

(22) 申请日 2019.04.15

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 108020452 A, 2018.05.11

申请公布号 CN 109975090 A

EP 0856729 A2, 1998.08.05

EP 2542883 A1, 2013.01.09

(43) 申请公布日 2019.07.05

CN 105606413 A, 2016.05.25

(73) 专利权人 马晓丽

CN 106769278 A, 2017.05.31

地址 050000 河北省石家庄市新华区飞翼路2号1栋3单元501号

CN 102680295 A, 2012.09.19

审查员 黄彬

(72) 发明人 马晓丽

(74) 专利代理机构 石家庄国域专利商标事务所有限公司 13112

代理人 苏艳肃

(51) Int. Cl.

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

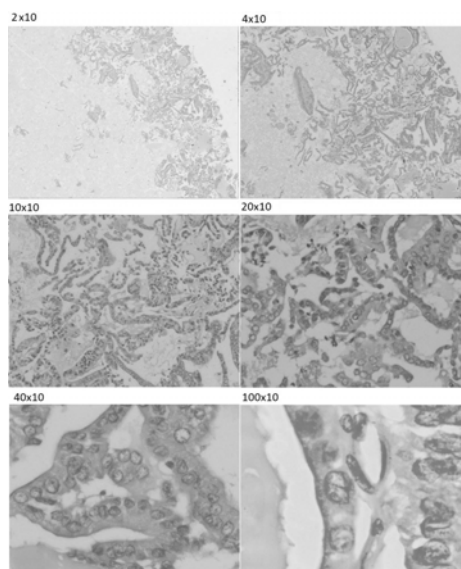
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法。包括以下步骤:a、预先将非传染性胸水或腹水进行离心,得到胸水或腹水上清液;b、取胸水或腹水上清液注入到离心管中;c、将细针穿刺的甲状腺或乳腺标本注入到离心管中,然后立即取95%的乙醇注入离心管内;d、将离心管离心并弃上清,得到细胞沉淀物,然后加入4%中性缓冲甲醛固定液,待离心管内的细胞沉淀物凝固后,采用石蜡组织标本处理程序进行常规包埋。本发明的制备方法能够保证组织碎片和自由漂浮的单细胞无丢失,细胞浆形态和结构保存良好,可以被连续或多次切片,适用于多种染色,从而提高了诊断功效。



1. 一种甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法,其特征是,包括以下步骤:

a、预先将非传染性胸水或腹水进行离心,得到胸水或腹水上清液;对得到的胸水或腹水上清液进行预检,其方法为:将0.5~2mL胸水或腹水上清液注入到离心管中,然后加入同体积的95%的乙醇,离心后弃上清,得到沉淀物,加入5~10倍于沉淀物体积的4%中性缓冲甲醛固定液,待沉淀物凝固后,取出放入包埋纸,然后置于脱水包埋盒中,采用石蜡组织标本处理程序进行常规包埋,经切片、HE染色后封固镜检,确保镜检无细胞成分;

b、取一次性的10mL离心管剪短一半,取0.5~2mL胸水或腹水上清液注入到离心管中;

c、将细针穿刺的甲状腺或乳腺标本注入到离心管中,穿刺组织在胸水或腹水上清液中立即凝集呈条带状或块状,然后立即取0.5~2mL 95%的乙醇注入离心管内;

d、将离心管离心并弃上清,得到细胞沉淀物,然后加入4%中性缓冲甲醛固定液,待离心管内的细胞沉淀物固定3~5h后,取出放入包埋纸,然后置于脱水包埋盒中,采用石蜡组织标本处理程序进行常规包埋。

2. 根据权利要求1所述的甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法,其特征是,步骤c中,所述细针穿刺所用针头为23G、直径0.573mm。

3. 根据权利要求1所述的甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法,其特征是,步骤c中,所用95%的乙醇的体积与胸水或腹水上清液的体积相同。

4. 根据权利要求1所述的甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法,其特征是,步骤c中,用胸水或腹水冲洗针头,然后将针头内的穿刺组织注入离心管内。

5. 根据权利要求1所述的甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法,其特征是,步骤d中,离心条件为2000 r/min 离心10 min;加入的4%中性缓冲甲醛固定液的体积为离心所得细胞沉淀物体积的5~10倍。

一种甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞组织块制备技术领域,具体地说涉及一种甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法。

背景技术

[0002] 甲状腺癌、乳腺癌在世界范围内的发病率呈逐年迅猛上升的趋势,其中,甲状腺癌发病率每年以6%的速度逐年递增。目前国内平均甲状腺癌发病率为7.7/10万,在恶性肿瘤发病率排名中居第五位。85%的甲状腺腺癌为乳头状癌(Papillary Thyroid Carcinoma, PTC)。PTC的一种特殊的生物学行为是早期发生区域淋巴结转移。尽管分化型甲状腺癌愈后很好,但在近30年的随访过程中,约30%的甲状腺癌患者会复发,最终小部分患者会死于甲状腺癌。术前诊断甲状腺癌主要是甲状腺穿刺技术。

[0003] 甲状腺穿刺是一种简便、易行又可以在一定程度上达到病理学诊断的方法。穿刺分为细针与粗针。细针针头直径21-26G,粗针穿刺针头直径16-18G。细针穿刺,其最大的不同点是标本量少,因而多用来制备细胞涂片,标本中组织学结构和细胞间基质大部分或完全缺失,对肿瘤的分型不够准确,这就造成细针吸细胞学最大的局限性。其次,细胞涂片只能进行直接性免疫组织化学染色,无需抗原修复,但是背景着色较浅,涂片中目标细胞散在分布,数量稀少,并且在制片过程中容易造成细胞破坏,以及存在涂抹玻片数量的限制、试剂浪费、对细胞涂片不能进行多种类抗体标记以及无法正确判读染色结果等问题,造成检测结果不稳定。

[0004] 现有的关于细胞块制备方法的文献有很多,大致上可以分为直接法和间接法,间接法即使用了基质材料的制备方法。间接法包括以下几种:琼脂细胞块制备法、凝血酶-血浆细胞块制备法及HistoGel制备法等。上述方法细胞丢失较少,基质材料在相应条件下可以“有形”的结构将细胞网罗其中,有利于取材和包埋。但琼脂、HistoGel凝固后密度较大,组织内外液体不易渗透,因此对固定、脱水、透蜡等步骤要求的时间更长,需要摸索且操作复杂。而凝血酶-血浆包埋有可能对IHC或DNA提取等实验的结果造成影响。

[0005] 目前,由于甲状腺、乳腺等细胞的特殊性,其细针穿刺标本制作细胞组织块技术还不成熟,造成无法推广应用。有文献报道友谊医院余小蒙等采用执笔式穿刺针(直径0.8mm),采用新的蛋白乙醇凝固-甲醛固定法制作甲状腺细胞组织块,其所用穿刺针相对较粗,且由于标本置于玻璃片上,导致细胞在被聚集的过程有挤压损伤,细胞膜及细胞核结构不清晰,影响诊断及进一步免疫组化着色效果。综上所述,寻求一种较好的细针穿刺制备甲状腺、乳腺细胞组织块的方法对于减轻患者穿刺痛苦、提高诊断的准确性和效率具有重要意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的旨在提供一种甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法,以解决现有组织块制备方法不适宜细针穿刺的甲状腺、乳腺标本以及细胞涂片难以准确诊断的

问题。

[0007] 本发明为实现以上目的所采用的技术方案如下：一种甲状腺、乳腺细针穿刺细胞组织块的制备方法，包括以下步骤：

[0008] a、预先将非传染性胸水或腹水进行离心，得到胸水或腹水上清液；

[0009] b、取一次性的10mL离心管剪短一半，取0.5~2mL胸水或腹水上清液注入到离心管中；

[0010] c、将细针穿刺的甲状腺或乳腺标本注入到离心管中，穿刺组织在胸水或腹水上清液中立即凝集呈条带状或块状，然后立即取0.5~2mL 95%的乙醇注入离心管内；

[0011] d、将离心管离心并弃上清，得到细胞沉淀物，然后加入4%中性缓冲甲醛固定液，待离心管内的细胞沉淀物固定3~5h后，取出放入包埋纸，然后置于脱水包埋盒中，采用石蜡组织标本处理程序进行常规包埋。

[0012] 步骤a中，对得到的胸水或腹水上清液进行预检，其方法为：将0.5~2mL胸水或腹水上清液注入到离心管中，然后加入同体积的95%的乙醇，离心后弃上清，得到沉淀物，加入5~10倍于沉淀物体积的4%中性缓冲甲醛固定液，待沉淀物凝固后，取出放入包埋纸，然后置于脱水包埋盒中，采用石蜡组织标本处理程序进行常规包埋，经切片、HE染色后封固镜检，确保镜检无细胞成分。

[0013] 步骤c中，所述细针穿刺所用针头为23G、直径0.573mm。

[0014] 步骤c中，所用95%的乙醇的体积与胸水或腹水上清液的体积相同。

[0015] 步骤c中，用胸水或腹水冲洗针头，然后将针头内的穿刺组织注入离心管内。

[0016] 步骤d中，离心条件为2000 r/min 离心10 min；加入的4%中性缓冲甲醛固定液的体积为离心所得细胞沉淀物体积的5~10倍。

[0017] 在本发明收集的甲状腺细针穿刺样品中，经过胸腹水的蛋白网罗后，即使样品细胞量少或者细胞松散，组织碎片和自由漂浮的单细胞也能保证无丢失，细胞浆形态学和结构保存良好，核沟和核仁也很清晰，从而提高诊断功效。同时采用免疫细胞化学细胞膜或细胞质着色的抗体，都可以判读；可以做基因方面的检测；且胸腹水病理科每天都有，没有成本，方便易得，也不涉及病人隐私等伦理学方面的问题。

[0018] 本发明的细胞组织块制作技术把甲状腺、乳腺穿刺细胞学与组织学中标本的固定、处理、石蜡包埋技术有机结合，既保存了穿刺组织良好的细胞形态学特征，又能进一步发掘组织形态学特征，同时便于进行免疫细胞化学染色等辅助检测的进一步研究之用，实践证明其应用效果良好，并且能节省甲状腺BRAFV600E检测费用，形成一定的经济及社会效益。这种细胞块技术可以有效地运用于日常细胞学工作中，也适宜在各级医院常规开展。

[0019] 本发明以胸腹水为载体，细胞组织块可以被连续或多次切片应用多种抗体（包括BRAFV600E）进行免疫组织化学等染色，并且细胞块和白胶片可以长期保存以备日后进行更多的常规检测，甚至分子方面的检测，这就弥补了对细胞涂片不能进行多次多种类染色的先天不足。另外，此项技术可以应用到淋巴结、肺、胰腺、腮腺等其他系统包块制作。

附图说明

[0020] 图1是本发明实施例1中经HE染色后不同放大倍数下的甲状腺细胞形态图。

[0021] 图2是本发明实施例1中经免疫组化染色后20x10的甲状腺细胞形态图，其中，图

(a)为CK19膜强阳性,图(b)为TTF-1核强阳性。

[0022] 图3是对比例1中经HE染色后的甲状腺细胞形态图。

[0023] 图4是本发明实施例2中经HE染色后不同放大倍数下的乳腺细胞形态图。

具体实施方式

[0024] 下面以具体实施例详细描述本发明的制备方法。

[0025] 实施例1:甲状腺细针穿刺细胞组织块的制备。

[0026] 一、预实验步骤:取非传染性胸水经两次离心后得到上清液100mL,分别取0.5mL、1mL、1.5mL、2mL上清液各注入一次性10mL离心管内,加入同等体积的95%的乙醇,轻轻混匀,以2000 r/min 离心 10 min,观察沉淀的包块体积大小,取离心管底部的高度约0.3cm的包块(体积约为1.0cm*1.0cm*0.3cm)作为样品备用,其他离心管的包块丢弃不用。

[0027] 将选取的样品弃上清,加5~10倍 4%中性缓冲甲醛固定液。待凝固后,将离心管内凝固的细胞沉淀物取出放入包埋纸,随后放入脱水包埋盒中,采用石蜡组织标本处理程序(60℃ 4%中性缓冲甲醛固定 90 min ×2次,60℃ 无水乙醇 60 min ×5次,60℃ 二甲苯 60 min ×3次,60℃ 石蜡 50 min ×4次)进行常规包埋、切片、HE染色,并封固镜检。镜下见大量粉染物质,无细胞成分。

[0028] 二、实验步骤:取一次性的10mL离心管剪去一半,注入经镜检的胸水上清液0.5mL(预实验可形成高度约0.3cm的包块)。将细针穿刺的23G甲状腺穿刺针头用胸水或腹水冲洗,然后将针头内的穿刺标本注入离心管内,穿刺组织立即凝集呈条带状或块状。

[0029] 取0.5mL95%乙醇即刻注入离心管内,将离心管以2000 r/min 离心 5 min,弃上清,加5~10倍的4%中性缓冲甲醛固定液,3h-5h后离心管内细胞沉淀物凝固,取出放入包埋纸,随后放入脱水包埋盒中,采用石蜡组织标本处理程序进行常规包埋、切片、HE染色等,并封固镜检。组织块镜检结果如图1和图2所示。由HE切片可以看出,2x10中,细胞非常丰富,数目可达上万个以上;4x10中,可以看到乳头状结构与滤泡片段,滤泡片段的细胞数目大于10个;10x10中,细胞核透明,拥挤;20x10中,细胞浆保存完好,细胞核沟可见;40x10中,细胞核沟清晰,核膜增厚,可见1-2个核仁;在100x10,油镜中,核沟更清晰,核仁清楚,细胞浆保存完整。

[0030] 对比例1:血浆-凝血酶法制备甲状腺细胞组织块。

[0031] 取10mL离心管,加入4%中性缓冲甲醛液,将甲状腺23G针头穿刺样本注入离心管内,以2000 r/min 离心 5 min,弃上清,再向其中加入数滴新鲜的人类血浆悬浮细胞沉淀,再滴加数滴凝血酶混匀后待其凝集成块,取沉淀物用擦镜纸包好后置入包埋盒中,在10%中性甲醛溶液中固定2h后进行常规脱水包埋,镜检,其结果如图3所示。由图3可以看出,血液凝固,细胞成分少,细胞核与细胞浆结构不清晰,说明血浆-凝血酶法难以保障较满意的细胞量,因为细胞与血浆和凝血酶的组合形成的凝块通常是稀疏的、松散的,在H&E切片上容易脱片,而且细胞量非常少。

[0032] 实施例2:乳腺细针穿刺细胞组织块的制备。

[0033] 一、预实验步骤:取非传染性腹水经两次离心后得到上清液100mL,分别取0.5mL、1mL、1.5mL、2mL上清液各注入一次性10mL离心管内,加入同等体积的95%的乙醇,轻轻混匀,以2000 r/min 离心 5 min,观察沉淀的包块体积大小,取离心管底部的高度约0.3cm的包

块(体积约为1.0cm*1.0cm*0.3cm)作为样品备用,其他离心管的包块丢弃不用。

[0034] 将选取的样品弃上清,加5~10倍4%中性缓冲甲醛固定液。待凝固后,将离心管内凝固的细胞沉淀物取出放入包埋纸,随后放入脱水包埋盒中,采用石蜡组织标本处理程序,常规包埋、切片、HE染色,并封固镜检。镜下见大量粉染物质,无细胞成分。

[0035] 二、实验步骤:取一次性的10mL离心管剪去一半,注入经镜检的腹水上清液0.5mL(预实验可形成高度约0.3cm的包块)。将细针穿刺的23G乳腺穿刺针头用胸水或腹水冲洗,然后将针头内的穿刺标本注入离心管内,穿刺组织立即凝集呈条带状或块状。

[0036] 取0.5mL95%乙醇即刻注入离心管内,将离心管以2000 r/min离心10 min,弃上清,加5~10倍的4%中性缓冲甲醛固定液,3h-5h后离心管内细胞沉淀物凝固,取出放入包埋纸,随后放入脱水包埋盒中,采用石蜡组织标本处理程序进行常规包埋、切片、HE染色等,并封固镜检。组织块镜检结果如图4所示。由图4可以看出细胞量丰富,细胞核与细胞浆保存完好。

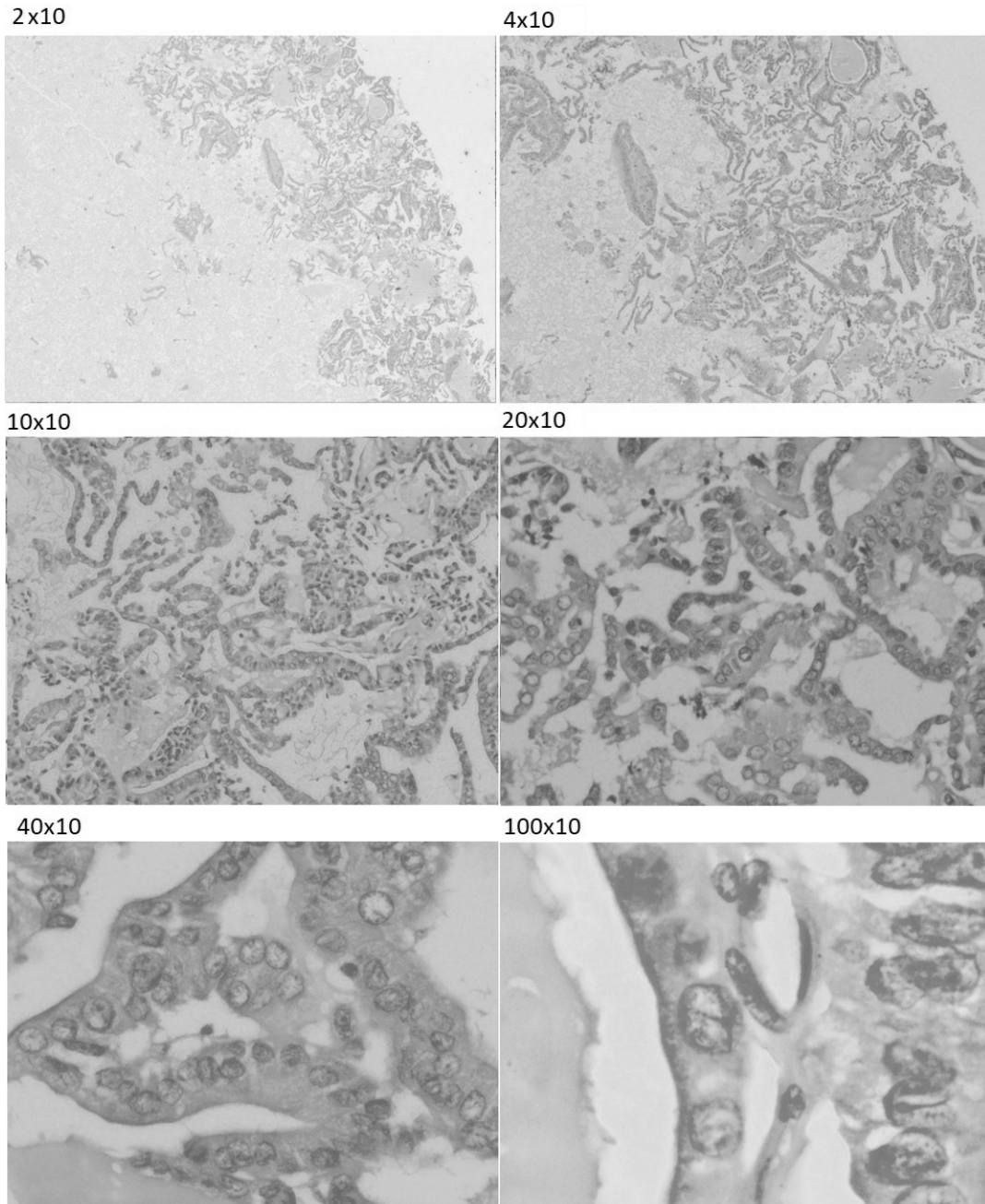


图1

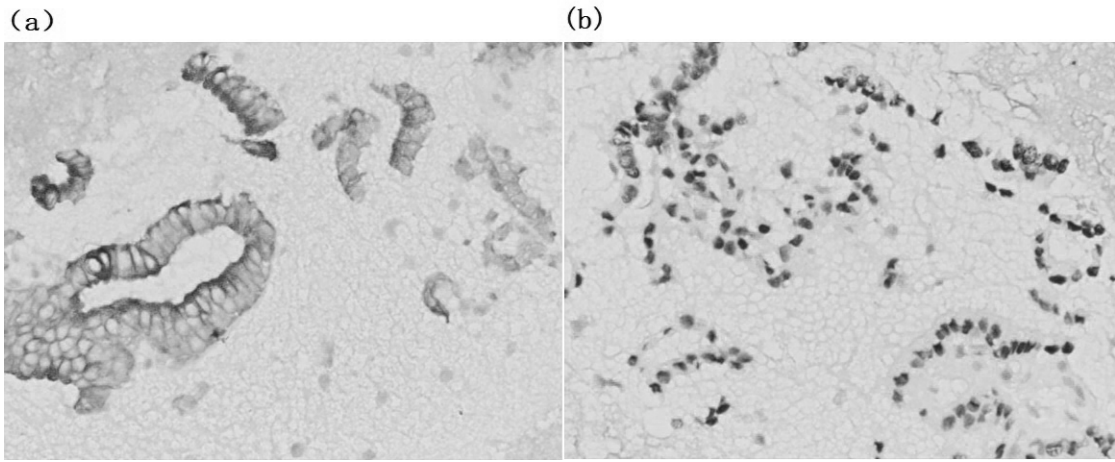


图2

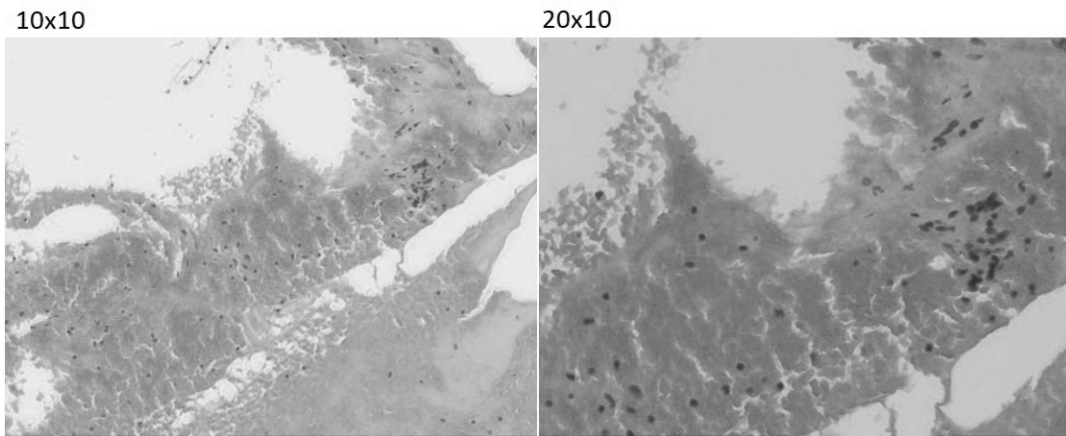


图3

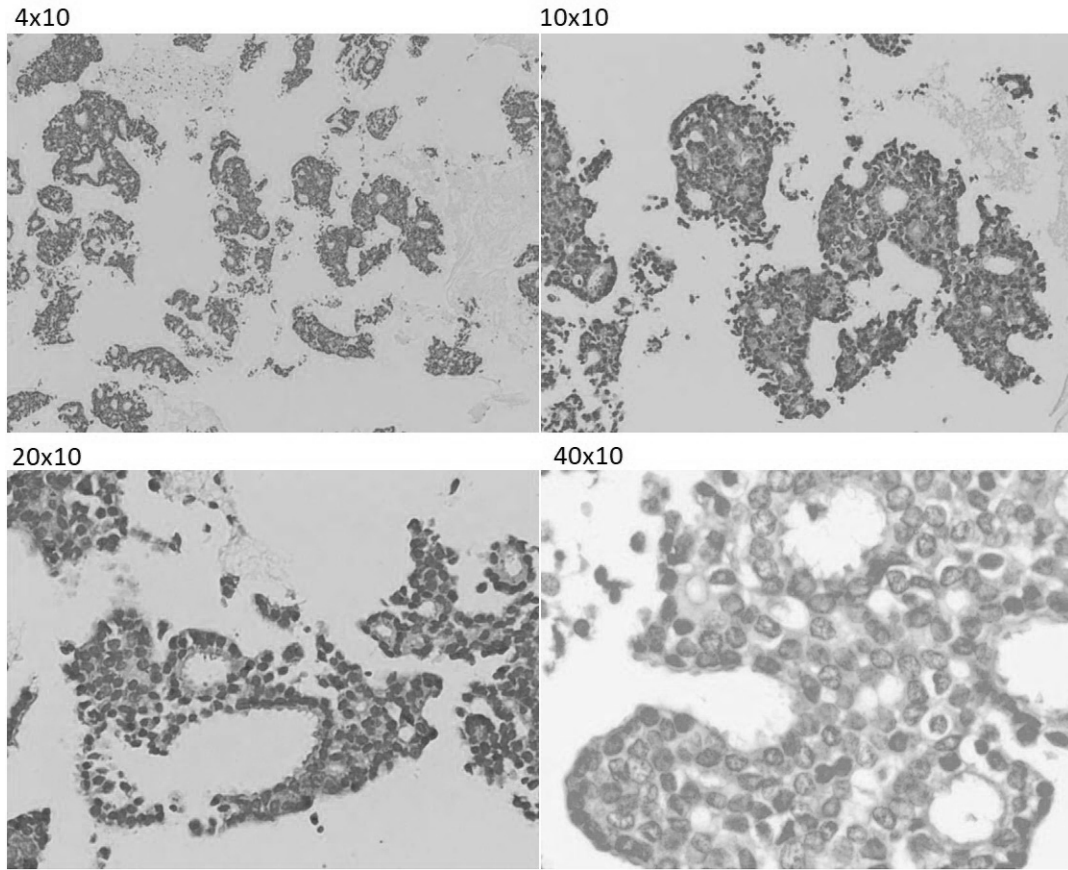


图4