

探讨乳腺及腋窝淋巴结冰冻切片质量的优化条件

刘丹 王怀莉 王佳陪 郜晓莹 张宏亮

宁夏银川市妇幼保健院病理科 宁夏 银川 750001

【摘要】 目的: 探究乳腺及腋窝淋巴结清扫术标本在冰冻制片中的优化条件及质量把控。**方法:** 收集本院自 2021 年 1 月至 2021 年 12 月的 38 例乳腺癌术中送检标本, 根据组织的不同, 采用不同的方法进行处理后行冰冻切片、固定、HE 染色, 总结出冰冻切片中乳腺及腋窝淋巴结切片的操作技巧及改良方法。**结果:** 冷冻前对标本尽量剔除多余脂肪后应用厨房用纸进行吸水吸油处理, 将直径 > 0.5 厘米的淋巴结对剖后单个包埋, 直径 ≤ 0.5 厘米的淋巴结可直接包埋, 设置冰冻机样本头温度为 -30℃、-22℃、-14℃, 通过评分、比对后得出在 -22℃ 的条件下乳腺及淋巴结组织运用放卷板进行切片, 制片时间短, 质量佳。**结论:** 乳腺及淋巴结组织进行吸水吸油操作后, 对淋巴结进行对剖、分开放置包埋, 冷冻切片温度设置在 -22℃ 时可显著缩短乳腺及淋巴结的制片时间, 提高切片质量, 可推广实施应用。

【关键词】 乳腺 淋巴结 冰冻切片 淋巴结对剖 切片技巧及改良方法

【中图分类号】 R446.8

【文献标识码】 A

【文章编号】 2096-1685(2022)11-0169-03

【Abstract】 Objective: To explore the optimal conditions and quality control of breast and axillary lymph node dissection specimens in frozen section. **Methods:** From January 2021 to December 2021, 38 breast cancer specimens submitted for intraoperative examination in our hospital were collected. According to the different tissues, different methods were used to perform frozen section, fixation and HE staining, and the operation skills and improvement methods of breast and axillary lymph node sections in frozen section were summarized. **Results:** Before freezing, remove excess fat from samples as far as possible and use kitchen paper to absorb water and oil. Lymph nodes with a diameter of >0.5 cm are dissected and embedded individually, while lymph nodes with a diameter of ≤0.5 cm can be directly embedded. Temperature of sample head of freezing machine is set at -30℃, -22℃ and -14℃. After scoring and comparison, it is concluded that the mammary gland and lymph node tissues can be sliced with the unwinding plate at -22℃, which has a short preparation time and good quality. **Conclusion:** After the mammary gland and lymph node tissues were absorbed by water and oil, the lymph nodes were dissected, placed separately and embedded. When the temperature of the frozen slicer was set at -22℃, the preparation time of mammary gland and lymph node was significantly shortened and the section quality was improved, which can be popularized and applied.

【Keywords】 mammary gland; lymph nodes; frozen section; lymph node pair; section technique and improvement method

近年, 随着乳腺癌保乳术的开展, 乳腺冰冻切片逐渐被各家病理科应用。其目的主要是通过手术中送检的乳腺标本和淋巴结的检测来评估乳腺癌患者的状态^[1], 而冰冻切片的效率和质量直接影响术中病理诊断的快速性和准确性^[2]。然而, 送检乳腺组织及淋巴结往往带有过多的脂肪, 且淋巴结组织结构特殊, 给冰冻切片造成一定的困难。因此, 本着对这一技术难点进行多次试验, 从对送检标本吸水吸油处理^[3], 淋巴结对剖分开放置, 冷冻头温度设置这 3 个方面进行探讨, 以期总结冰冻切片的最佳条件, 提高冰冻切片的时效性与质量, 为诊断医生提供最优质的切片, 给临床医生评估患者状态提供依据。

1 资料与方法

1.1 资料

收集本院自 2021 年 1 月至 2021 年 12 月的 38 例临床病例的术中乳腺及淋巴结标本。

1.2 方法

1.2.1 仪器及材料

仪器 LEICA CN1950 冰冻切片机; 普通胶水、95% 乙醇固定液、苏木素染液、伊红染液、1% 盐酸乙醇分化液、95% 乙醇 1、95% 乙醇 2、无水乙醇 1、无水乙醇 2、二甲苯 1、二甲苯 2、中性树胶。

1.2.2 取材

保持取材台、取材器械干燥、干净, 将新鲜送检的乳腺及淋巴结组织取材时尽量剔除周围脂肪, 用厨房用纸对组织表面进行吸附, 对淋巴结组织可反复轻柔按压, 尽量挤出脂滴。此操作需注意吸水吸油过程中对组织的按压、滚动不能过于用力, 避免因人为因素造成组织形态的改变, 而影响诊断。随后再将吸水吸油后的组织取材大小为 1.5×1.5×0.3 立方厘米, 淋巴结组织直径 >0.5 厘米的对剖后单个包埋, 直径 ≤ 0.5 厘米的淋巴结直接单个包埋。

作者简介: 刘丹 (1989-1); 女; 汉族, 宁夏回族自治区银川市; 本科; 技师; 病理学技术; 通讯地址: 宁夏回族自治区银川市兴庆区文化西街 56 号, 750001; E-mail: 495674287@qq.com。

1.2.3 包埋

包埋时, 先将托头放入冷冻切片机中预冷, 放组织前将托头拿出加入普通胶水^[4]。此操作可作为人为增厚垫, 将取好的组织放在冷冻好的托头上可迅速与冷冻托头结合, 不会发生移位, 不会导致组织松散, 给切片带来难题, 影响诊断。将放好组织的托头放入冰冻机中在二次加胶, 将组织完全包埋后冷冻, 可有效避免冷冻过度, 有效减少冰晶的作用。

1.2.4 冷冻温度及时间

放入冰冻机的组织根据组织的不同, 将温度控制在 $-14^{\circ}\text{C} \sim -30^{\circ}\text{C}$ ^[5], 需严格控制冷冻时间, 冷冻 2-3min 可有效避免组织过度收缩, 冰晶产生。切片厚度为 5~6 微米。

1.2.5 切片及贴片

组织冻好后开始切片, 粗修去除多余包埋剂, 露出组织最大面后开始切片, 调整好切片厚度为 5-6 微米为宜。对于含有脂肪过多的组织可适当调整到 7 微米, 调整好防卷板后对脂肪少的组织使用防卷板可选择第二张薄厚均匀的组织片, 对脂肪多的组织可辅助细毛笔进行拉片, 也可切出满意切片。在贴片时, 需要快、稳、准, 将组织片吸附在载玻片的下 1/3 处为宜, 贴好后迅速放入 95% 乙醇固定液中固定 30s 以上进行染色。

1.2.6 染色封片

将固定好的新鲜组织片先充分水洗去除包埋剂, 由于新鲜组织对苏木素的亲和力较强, 易着色, 因此放入苏木素染液中仅需染色 2~3min 即可, 然后水洗观察染色情况, 如肉眼观染色尚浅可适当延长苏木素染色时间, 需注意气温变化对苏木素着色的影响, 气温低时可适当对苏木素加温^[6]。水洗后过 1% 盐酸乙醇分化液分化 1s, 伊红染色 1min, 水洗后过梯度酒精, 二甲苯透明 1min 后封片。

2 结果

对 202 张冰冻切片进行对比、分析后得出在 -22°C 用厨房用纸进行吸水吸油、淋巴结对剖后分开放置的组织切片较完整、平整、薄厚均匀, 无裂隙, 镜下结构完整, 红蓝对比鲜明, 细胞形态清晰、无冰晶产生、无人为明显裂隙。对含有脂肪过多的组织可能有轻微皱褶, 是因为在切片时, 脂肪的冰冻点和淋巴结组织的冰冻点不一致引起, 温度达到脂肪的冰冻点后切出脂肪组织, 但淋巴结组织会冰冻过度、出现严重裂隙、碎渣的情况。因此, 为了能够保证所检组织的完整性, 脂肪组织往往会出现粘刀的情况, 处理不当就会影响下一张切片的完整性。中和二者温度后, 最终定为在 -22°C 时能较大程度规避二者出现的问题。

2.1 吸水吸油方法图及组织摆放图



图 1 为淋巴结对剖后吸水 (左)

图 2 为淋巴结滚动吸水吸油 (右)

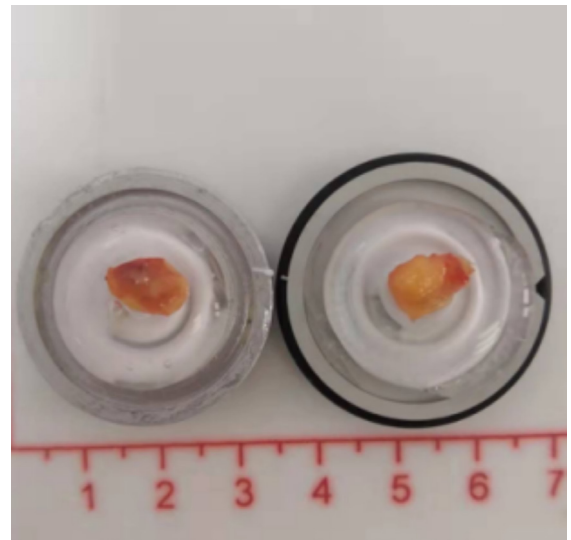


图 3 为对剖后淋巴结摆放方式

对 2.2 淋巴结组织是否对剖所做切片的对比图

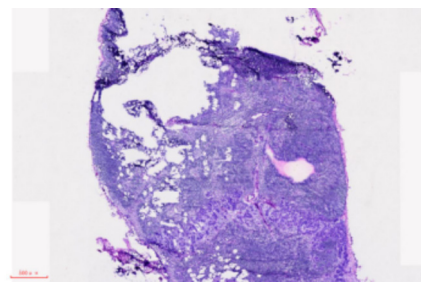


图 4 为淋巴结不对剖所制切片镜下观

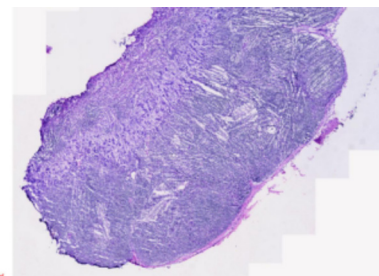


图 5 为淋巴结对剖后所制片镜下观

表1 温度设定

温度	-30°C	-22°C	-15°C
正常乳腺组织平均得分	8.9	9.6	9.0
剖割后吸水吸油处理的淋巴结平均得分	9.6	9.8	7.5
不进行处理淋巴结平均得分	9.0	9.1	7.1

通过对 202 张淋巴结冰冻切片和 59 张乳腺癌组织冰冻切片进行评分、分析后得出在 -22°C 时切出的切片质量最好, 稳定性最佳。

3 讨论

术中快速冰冻在病理工作中占有很重要的地位, 而临床送检的乳腺及淋巴结的冰冻切片质量更是直接对乳腺癌患者腋窝淋巴结状态的有效且可靠的预测指标^[7-8]。因此, 能够切出高质量的乳腺及淋巴结冰冻切片需对取材、包埋、切片、染色等各个环节进行质量把控。乳腺癌术中送检标本及淋巴结清扫标本往往含有过多的脂肪, 在取材时需尽量剔除脂肪组织, 对于难以剔除的脂肪用厨房用纸进行吸水吸油, 在吸试过程中一定要注意动作轻柔, 尽量去除油脂的同时不挤压使细胞变形。取材淋巴结时, 由于淋巴结组织结构致密, 细胞丰富, 包含致密的结缔组织, 因此对淋巴结取材时延长轴剖割, 然后进行吸水吸油, 对直径 <0.5cm 的淋巴结可吸水吸油后直接包埋。

组织包埋时, 提前对组织托制冷, 制冷的组织托滴加包埋剂后可在底层迅速凝固, 形成支架, 可有效托起过小组织, 不会引起因组织过小而无法粗修制片的情况, 且可减少组织的冷冻时间, 避免冰晶形成。组织放入冷冻柜后需二次加胶, 覆盖在组织上及周围, 此操作可在组织粗修时较完整的切出最大面而不会过多的修掉组织, 给诊断带来不必要的疑惑。对于送检的多个大小不一的淋巴结, 直径 ≥ 0.5cm 的淋巴结剖割, 分开放在不同的组织托上便于制片, 直径 <0.5cm 的淋巴结处理后可直接单个放置后进行冷冻制片。

根据组织类型的不同, 切片时所需冷冻的时间也有所差异。含脂肪多的组织在 -22°C 时冷冻时间控制在 2-3min, 观察胶水凝固情况, 以胶水完全凝固时切片最佳。淋巴结的冷冻时间要控制在 1.5min 左右, 看胶水量定时间, 以胶水刚刚凝固即切片为最佳时间, 可有效避免因细胞丰富, 温度过低导致组织易裂、易碎。

切片前粗修暴露组织最大面, 调节防卷板与刀片之间的距离后取第二张薄厚均匀且无皱褶的切片进行贴片, 贴片时采用病理级无尘载玻片, 标记冰冻号, 快速、轻柔、均匀用力吸贴, 确保贴片完整、无褶皱, 无空洞。不可用力拉片, 造成组织变形挤压或空洞破碎。贴片完成后因立即放入 95% 乙醇固定液中固 1min, 固定的作用是使蛋白质变性、凝固、沉淀, 保持细胞、组织原有形态, 细胞核结构清晰^[9]。切记在室温中停留过久使组织干燥, 干燥后在固定易造成组织细胞退变, 使组织原有结果变形。固定后在 HE 染色前需充

分水洗, 目的是洗去固定液及包埋剂, 尤其使用的胶水一定充分洗净, 可避免苏木素染色不匀称及载玻片上背景色深影响诊断医师判读。苏木素染色时需控制时间在 2min 以上, 水洗后观察颜色, 略浅可适当延长染色时间, 充分水洗反蓝, 在进伊红染色前必须进入分化液中分化 1s, 使得胞核、胞质染色清晰易于判读。从伊红进入第一道 95% 乙醇液时要注意时间不超过 3s, 以免伊红脱色, 引起镜下胞浆着色浅胆, 红蓝对比色差而影响诊断。染色结束后切记不可吹风机吹干或自然晾干, 这两种方法均会引起组织细胞一定程度的退变皱缩。可过两缸二甲苯, 充分透明后湿封晾干再进行诊断。

综上所述, 在进行乳腺癌组织及淋巴结组织冰冻切片时均需注意取材时的细节问题, 吸油吸水和淋巴结剖割分开摆放的应用能够显著提高切片质量, 避免皱褶。样本托头的提前预冷及冷冻柜的温度设置在 -22°C 时可有效避免正常组织冻过或脂肪组织太软的情况, 均可增加组织切片的效率及质量, 为病理诊断医生提供质量保障。

参考文献

- [1] 叶春梅, 高丹, 黄自明, 等. 前哨淋巴结冰冻切片检查在乳腺癌手术中的应用价值 [J]. 临床外科杂志, 2015, 23(10): 763-765.
- [2] 方庆全, 廖永强, 张海芳. 一种提高冷冻切片染色效率的苏木精加热组件. 中华病理学杂志, 2015, 44(7): 521-522.
- [3] 郑捷, 方全庆, 陈安敏等. 淋巴结组织术中快速冷冻切片的优化. [J]. 中国组织化学与细胞学杂志, 2019, 28(6): 537-542.
- [4] 李晓锋, 邓元, 曹培龙, 等. 普通胶水代替进口 O.C.T 包埋剂制作冰冻切片. 现代检验医学杂志, 2008, 23(3): 51.
- [5] 韩福兰, 毛荣军, 谢乐. 冰冻切片组织固定及染色的温度调控对切片质量的影响 [J]. 国际医药卫生导报, 2015, 21(12): 1652-1654, 1657.
- [6] 沈勤, 张彪等. 提高冰冻切片质量的常见方法 [J]. 临床合理用药, 2011, 4(10): 98-99.
- [7] Banuelos-Andrio L, Rodriguez-Caravaca G, Arguelles-Pintos M, et al. Diagnostic validity of the intraoperative analysis in frozen section of the sentinel lymph node in the urgical management of breast cancer [J]. Rev Esp Med Nucl Imagen Mol, 2014, 33 (4): 193-198.
- [8] Pohlodek K, Bozikova S, Meciarova I, et al. Prediction of additional lymph node involvement in breast cancer patients with positive sentinel lymph nodes [J]. Neoplasma, 2016, 63(3): 427-434.
- [9] 董芸蓉. 高质量冷冻切片的制作技术探讨 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(3): 349-350