

实用临床诊断 病理学

郭冰沁等◎主编



 吉林科学技术出版社

实用临床诊断病理学

郭冰沁等◎主编

图书在版编目 (C I P) 数据

实用临床诊断病理学 / 郭冰沁等主编. -- 长春 :
吉林科学技术出版社, 2018. 6
ISBN 978-7-5578-4365-6

I. ①实… II. ①郭… III. ①诊断学—病理学 IV.
①R365

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第094461号

实用临床诊断病理学

主 编 郭冰沁等
出 版 人 李 梁
责任编辑 赵 兵 张 卓
封面设计 长春创意广告图文制作有限责任公司
制 版 长春创意广告图文制作有限责任公司
幅面尺寸 185mm×260mm
字 数 261千字
印 张 14
印 数 650册
版 次 2019年3月第2版
印 次 2019年3月第2版第1次印刷

出 版 吉林科学技术出版社
发 行 吉林科学技术出版社
地 址 长春市人民大街4646号
邮 编 130021
发行部电话/传真 0431-85651759
储运部电话 0431-86059116
编辑部电话 0431-85677817
网 址 www.jlstp.net
印 刷 虎彩印艺股份有限公司

书 号 ISBN 978-7-5578-4365-6
定 价 55.00元

如有印装质量问题 可寄出版社调换
因本书作者较多, 联系未果, 如作者看到此声明, 请尽快来电或来函与编辑部联系, 以便商洽相应稿酬支付事宜。
版权所有 翻印必究 举报电话: 0431-85677817

前 言

随着我国经济和科技飞速发展，临床医学和病理学领域发生了很大的变化，病理学科的内容不断丰富和完善，新技术和新理论不断涌现，国际的交流日益增强，病理学科的地位在医学中的地位逐日增高。病理科医师只有不断学习，才能掌握最新的理论和操作技术，从而更好地诊断疾病，减轻患者负担，促进社会和谐发展。本书正是在此背景下编写的。

《实用临床诊断病理学》共十八章，首先介绍了现代病理学的诊断技术，然后针对颅脑、鼻腔、鼻窦及鼻咽、喉、乳腺、肺、胸膜、纵隔、食管、胃肠、肛门、肝胆胰、泌尿及男性生殖系统、垂体及甲状腺、淋巴结、骨髓、软组织、妇科等各部分常见肿瘤的病理诊断进行了详细阐述。本书内容新颖，重点突出，科学实用。参编的作者，多系从事病理科专业多年，具有丰富的实践经验和深厚的理论功底的专家、教授及年轻的医师。在编写的过程中他们付出了辛勤的劳动，在此表示衷心的感谢。

由于参编人员较多，文笔不尽一致，加上编者的时间和篇幅有限，难免存在疏漏和不足之处，望广大读者提出宝贵意见和建议，以便再版时修订，谢谢。

编 者
2018年6月

目 录

第一章 病理检查技术	1
第一节 细胞学检查技术基本概念.....	1
第二节 细胞学标本采集原则和方法.....	2
第三节 细胞学涂片固定.....	3
第四节 细胞学常规染色技术.....	5
第五节 其他细胞学染色技术.....	9
第六节 浆膜腔积液细胞涂片制作	11
第七节 尿液细胞涂片制作	12
第八节 乳腺分泌物细胞涂片制作	13
第九节 阴道和宫颈细胞涂片制作	14
第十节 液基薄层细胞制作技术	15
第十一节 细针吸取细胞学技术应用和操作	19
第二章 临床分子诊断学基本技术	22
第一节 核酸与蛋白质纯化技术	22
第二节 分子杂交技术	28
第三节 DNA 测序技术	32
第四节 聚合酶链式反应技术	39
第五节 临床分子诊断学标准化	45
第三章 临床分子诊断学应用技术	52
第一节 荧光定量聚合酶链反应技术	52
第二节 流式细胞技术	58
第三节 荧光原位杂交技术	63
第四节 生物芯片技术	67
第五节 色谱-质谱技术	73
第六节 其他相关技术	77
第四章 肿瘤诊断技术	81
第一节 肿瘤病理学概论	81
第二节 肿瘤的一般形态和结构	84
第三节 肿瘤的病理诊断	85

实用临床诊断病理学

第四节	免疫组织化学在肿瘤病理诊断中的应用	91
第五节	肿瘤的组织、细胞病理学诊断	92
第六节	肿瘤病理学诊断的特殊技术	98
第五章	肿瘤标志物诊断	116
第一节	肿瘤标志物概论	116
第二节	癌抗原检验	122
第三节	肿瘤相关蛋白检验	131
第四节	肿瘤相关酶检验	136
第五节	肿瘤标志物的临床应用	138
第六章	乳腺	152
第一节	乳腺病变的病理学诊断方法	152
第二节	乳腺化生性病变	160
第三节	乳腺反应性和瘤样病变	165
第四节	良性肌上皮增生性病变	168
第五节	乳腺炎症性病变	171
第六节	乳腺癌的分类、病理及分级	177
第七节	病理学检查对乳腺癌治疗和预后的意义	192
第八节	浸润性乳腺癌	195
第九节	乳腺淋巴造血组织肿瘤及瘤样病变	210
参考文献	212

第一章

病理检查技术

第一节 细胞学检查技术基本概念

细胞学制片技术,包括标本的收集、涂片、固定、染色、脱水、透明、封固等。良好的制片是细胞学诊断的重要条件,高度的责任感和严格的操作流程,以及新技术的应用是提高细胞学制片质量的重要保证。

一、细胞学检查范畴

细胞病理学可分两大部分:脱落细胞学和针吸细胞学。

1. 脱落细胞学 采集人体中管腔器官表面脱落的细胞,其标本可来自与外界相通的脏器;如胃肠道、呼吸道、泌尿道、女性生殖道等;其次来自于与外界不相通的腔隙、脏器表面,如胸腹腔、颅脑腔、关节腔等积液。

2. 针吸细胞学 通过细针吸取的方法吸取组织中的活细胞,如乳腺、甲状腺、淋巴结、前列腺等穿刺。除了进行一般细胞形态学诊断外,尚可以进行细胞培养,细胞 DNA 检测。

二、细胞学检查程序

标本采集→涂片制作→涂片固定→涂片染色→涂片封固→涂片阅片→报告打印→玻片归档。

三、细胞学检查的特点和意义

1. 准确性 通常以阳性率来表示(诊断率、符合率、准确率)。目前国际统一标准,即用敏感性及特异性来表示。前者显示除去假阴性后的阳性率,后者显示除去假阳性后的诊断准确性。

2. 敏感性 细胞学诊断以子宫颈癌检查效果最佳,敏感性达 90% 以上。痰及尿液脱落细胞阳性率较低 50% ~ 60%, 细胞学诊断的特异性较高 98% ~ 99%, 即假阳性很低, 只占 1% ~ 2%, 可疑细胞只占 5%。一个可靠的诊断技术应为敏感度越高越好, 即假阳性和假阴性率越低越好。

3. 实用性 操作简便、创伤性小、安全性高,且费用少。有利于疾病的早期发现,早期诊断和早期治疗。细胞学检查技术已不再是一种单纯的诊断方法,对观察癌前期病变的演

变，指导临床用药和随访观察的重要指标。

4. 局限性 细胞学诊断有许多优点，但阳性率较低，时有漏诊和误诊。这主要由于取材局限性，制片方法不当有关；此外，缺乏组织结构也是影响诊断准确性的因素。

四、细胞学标本制作质量控制

细胞学制片是涂片技术重要的基本技能，优质的细胞制片直接关系到诊断的准确率和阳性率高低。

细胞学送检标本大概可分为以下三大类：

一类标本是临床医师取材后马上制成涂片固定后送细胞学检查（如妇科的宫颈涂片、纤支镜刷片涂片）；另一类是临床医师抽取标本后未经固定直接送到细胞室行细胞制片检查（如浆膜腔积液、痰液、尿液等）；第三类主要是妇科液基细胞学标本，临床医师用特殊的刷子取材后，将刷子上的细胞放入细胞保存液中送到细胞室行细胞制片检查。

细胞学涂片制作前质控要求如下：

- (1) 涂片前应准备好各种用具，如干净的载玻片、固定液、吸管、玻璃棒、小镊子。
- (2) 各类标本要新鲜制作，4℃冰箱保存的标本不超过4h。
- (3) 涂片制作要轻巧，以免损伤细胞。
- (4) 涂片制作要均匀，厚薄要适度，掌握细胞量与溶液比例的稀释度。细胞量多的标本制片宜薄，细胞量少的标本制片宜集中。
- (5) 细胞应有效固定在载玻片的位置上，各类涂片制作后原则上应湿固定为佳，特殊情况下涂片亦可半湿干固定。

(郭冰沁)

第二节 细胞学标本采集原则和方法

一、标本采集原则

- (1) 采集标本必须保持新鲜，以免细胞自溶，影响细胞着色和正确诊断。
- (2) 采集方法应简便，以减轻患者痛苦，且不至于引起严重的“并发症”或促使肿瘤扩散。
- (3) 正确选择取材部位，尽可能由病区直接采取细胞并获取丰富有效的细胞成分。
- (4) 绝对避免错号和污染（器具和玻片干净、固定液及染液过滤、每份标本一瓶）。
- (5) 针吸穿刺操作时有两人配合完成采集标本较好，并了解病情和影像学资料，选择恰当的体位及穿刺点。

二、标本采集前准备

- (1) 所有细胞学送检标本容器清洁并要求即采集即送检。
- (2) 送检标本必须填写细胞送检申请单，每份标本一瓶并注明患者姓名、性别和年龄。
- (3) 临床送检血性胸水、腹腔积液、心包液为防止标本凝固，应在容器中加入抗凝剂。可用商品化的肝素抗凝试管或用100g/L浓度的乙二胺四乙酸钠（EDTA - Na），亦可用

3.8% 的柠檬酸钠，与标本量之比为 1 : 10。

三、标本采集方法

1. 标本采集方式

(1) 直观采集外阴、阴道、宫颈、穹隆、鼻腔、鼻咽、眼结膜、皮肤、口腔、肛管等部位，可用刮片、吸管吸取、擦拭或刷洗的方法。

(2) 宫颈细胞采集从早期棉棒阴道后穹隆分泌物法、木制宫颈刮片法到现代的专用扫帚状刷取样法。

(3) 用纤维光束内镜带有的微型网刷直接在食管、胃、十二指肠、气管、肺内支气管等部位的病灶处刷取细胞涂片。

(4) 体表可触及的原发病变和体内脏器标本收集可采用针刺抽吸收集方式，用穿刺针准确刺穿皮肤进入病区域后，通过提插针方式，使针尖斜面部对病变组织进行多次切割；并同时借助针管内的持续负压将切割获得的标本吸入针芯及针管内。

2. 分泌液收集法 细胞学检查收集的分泌液包括自然分泌液：尿液、痰液、前列腺液、乳头分泌液等。

(1) 尿液：男性用自然排尿，女性采取中段尿。尿量不应少于 50ml，标本要新鲜，尿液排出后 1~2h 内制成涂片。如不能立即制片，可在标本内加 1/10 尿量的浓甲醛液或等量的 95% 的乙醇。但尿内加入上述的固定液可使细胞变形或影响制片，因此，尽可能新鲜尿液离心沉淀制成涂片。

(2) 痰液：指导患者漱口、深咳痰液，约 3 口量的痰液。挑选来自肺、支气管内的带铁锈色的血丝痰，或透明黏液痰及灰白色颗粒状痰等有效成分进行薄层均匀的涂片，每例患者制片 2~3 张。

(3) 前列腺液：采用前列腺按摩取分泌物直接涂片。

3. 灌冲洗收集法 此法常用于采集胃脱落细胞，例如用于胃肠、腹腔、卵巢肿瘤术后向空腔器官灌冲。冲洗一定数量的生理盐水，使肿瘤细胞脱落，然后将冲洗液抽取离心沉淀后取细胞层直接涂片。

4. 浆膜积液收集法 此法常用于胸腔、腹腔、心包腔等器官内积液的抽取，抽取胸腔积液送检，通常由临床医师操作完成。送检胸腔积液的容器瓶必须事前加入抗凝剂 (3.8% 的柠檬酸钠)，送检浆膜腔积液的量为 20~200ml 较合适。因特殊原因不能马上制片的标本，应放入 4℃ 的冰箱内保存，时间不应超过 16h。

(郭冰沁)

第三节 细胞学涂片固定

一、固定目的

细胞离体后如果不及时固定，就会释放出溶酶体酶将细胞溶解，导致组织自溶，丧失原有结构。因此，细胞采集后应选用合适的固定液进行固定，使细胞内的蛋白质凝固、沉淀成不溶性，并使细胞尽可能保持原有的形态结构和所含的各种物质成分。细胞涂片的固定在细

实用临床诊断病理学

胞学制片中极为关键。细胞固定的好坏会直接影响后续的涂片和染色，进而影响细胞学诊断的准确性。

通过乙醇能迅速凝固细胞内的蛋白质、脂肪和糖类，使其保持与活细胞状态相仿的成分和结构，使细胞各部分尤其是细胞核染色后能清楚地显示细胞的内部结构。进行经典的巴氏染色，用乙醇和乙醚或甲醇固定细胞涂片是极为重要的。假如乙醇浓度不够细胞核固定不佳，易造成人为的假阴性报告。

二、固定液种类

乙醇是细胞涂片常用的固定液，可使细胞内的蛋白质、核蛋白和糖类迅速凝固，产生不溶于水的沉淀。乙醇很少单独使用，通常与冰醋酸、乙醚等混合使用。在巴氏染色中，乙醇类固定液更是首选的固定液。

常用的固定液如下：

(1) 95%的乙醇-冰醋酸固定液

95%的乙醇 100ml

冰醋酸 1ml

常用的细胞涂片固定液，冰醋酸渗透力强，可加快细胞的固定。

(2) 乙醇-乙醚固定液

无水乙醇 49.5ml

乙醚 49.5ml

冰醋酸 1ml

常用的细胞涂片固定液，固定快速，尤其是作巴氏染色，为首选的固定液。乙醚容易挥发，气味较大，应密封保存。

(3) Carnoy 固定液

无水乙醇 60ml

三氯甲烷 30ml

冰醋酸 10ml

适用核酸、糖原、黏蛋白等特殊染色；也适合固定含血较多的细胞标本，冰醋酸能够加强细胞核染色，也能溶解红细胞，并可减低细胞由于乙醇引起的收缩。一般固定3~5min，再用95%的乙醇继续固定15min。

(4) 甲醇固定液：用于干燥固定的涂片（血片）和某些免疫细胞化学染色。

(5) 丙酮固定液：冷丙酮常用于酶的细胞化学染色和免疫荧光染色。

(6) 10%的中性缓冲甲醛固定液：主要用于固定细胞沉渣制作细胞蜡块。如果用于固定细胞涂片，固定较慢，也容易引起细胞脱落，因此，不适宜直接固定细胞涂片。

三、固定方法

1. 浸泡湿固定法

(1) 固定操作：将细胞涂在玻片上后，应稍晾干，但不能完全干燥，在涂片快干且还湿润时，立即浸泡在固定液中固定15~20min。这种固定方法也称为湿固定。

(2) 注意事项：①玻片标本固定时应将玻片垂直置入固定液，避免涂片相互摩擦；

②各种细胞涂片均应及时用湿固定法进行固定，否则涂片干燥后会严重影响染色效果。

2. 喷雾固定法 将采集的细胞涂好片后，平放在架子上，将乙醇等固定液喷洒在涂片上进行固定，干燥后保存或待染色。染色前需要在蒸馏水中浸泡约 10min。优点是简单快速，缺点是容易固定不均匀。

四、质量控制

1. 制作标本要新鲜 送检标本要新鲜制作，在室温下不能停留超过 2h，脑脊液更不能超过 1h。胸腹腔积液、心包积液、痰液可在冰箱内放置 12 ~ 24h。尿液在冰箱中停放不超过 2h。

2. 湿固定的原则 制片后标本玻片尾部最易干燥，干燥后的玻片会引起细胞核膨胀和着色不清，胞质干燥后巴氏伊红、亮绿着色不鲜艳，诊断受影响。

3. 固定液要过滤 每天每次使用后的固定液要用滤纸或棉花过滤后才能重复使用，但乙醇浓度不能低于 90% 的含量，否则要更换新固定液，主要是防止交叉细胞污染。

(郭冰沁)

第四节 细胞学常规染色技术

一、染色作用

没有经过染色的细胞，难以通过显微镜观察到细胞核和细胞质内部各种细微的结构。因此，需要用不同的染料将细胞的形态结构及不同的成分显示出来，以便在显微镜下进行观察。

二、染色机制

细胞染色机制比较复杂，一般认为细胞染色主要是通过物理吸附作用和化学结合作用来使细胞核和细胞质染上不同的颜色，并且产生不同的折射率，从而能通过显微镜来观察。

1. 物理吸附作用 染料的色素成分被吸附进入组织和细胞间隙内而显色。

2. 化学结合作用 染料的助色团具有与组织细胞很强的亲和力，能够与细胞及其细胞内相应物质结合生成有色的不溶性的化合物沉淀而显色。

三、染料分类

(1) 染料根据其来源可分为天然染料如苏木精和人工合成染料如结晶紫等。

(2) 根据染料所含有的发色团分为硝基染料、偶氮染料、醌亚胺染料、咕吨染料、苯甲烷染料、蒽醌染料、重氮盐和四重氮盐类和四唑盐类染料等。

(3) 根据染料所含有的助色团性质分为酸性染料、碱性染料和中性染料等。

四、常规染色方法

细胞学染色方法有多种，主要有常规染色、特殊染色（或称细胞化学染色）和免疫细胞化学染色。可根据不同的检验要求和研究目的加以选择应用。

常规染色法有巴氏 (Papanicolaou) 法、HE 法和迈格林华 - 吉姆萨染色 (MGG 染色) 法等。

(一) 巴氏 (Papanicolaou) 染色

巴氏染色起初仅用于阴道上皮雌激素水平的测定以及检测生殖道念珠菌、滴虫等病原体的感染。染色方法经过不断改良后,胞质染色液分别有 EA36、EA50 和 EA65。目前主要用于妇科细胞学涂片染色,多采用 EA36 和 EA50 染色液,是用来筛查宫颈癌及癌前病变的常用细胞学染色方法。巴氏染色也适合胸、腹腔积液、痰液等非妇科标本的染色,常采用 EA65 染色液。

巴氏染色法染液中含有阳离子、阴离子和二性离子,具有多色性染色效能。因此,染出的细胞质具有色彩多样、鲜艳、透明性好及细胞核的核膜、核仁、染色质结构清晰的特点。巴氏染色主要有两组染液,胞核染液如苏木精和胞质染液如 EA36,以达到核质对比清晰鲜艳的目的。

1. 试剂配制

(1) 改良 Lillie - Mayer 苏木精染液

苏木精 (hematoxylin) 5g
无水乙醇 (absolute alcohol) 50ml
硫酸铝钾 (aluminium potassium sulphate) 50g
蒸馏水 650ml
碘酸钠 (sodium iodate) 500mg
甘油 (glycerine) 300ml
冰醋酸 (glacial acetic acid) 20ml

分别将苏木精溶于无水乙醇,硫酸铝钾溶于蒸馏水(可加热至 40 ~ 50℃ 使硫酸铝钾更容易溶解),用玻璃棒轻轻搅动使彻底溶解,待恢复至室温后,与苏木精无水乙醇液充分混合,再加入碘酸钠,最后加入甘油和冰醋酸。

(2) 碳酸锂水溶液

碳酸锂 (lithium carbonate) 1g
蒸馏水 100ml

(3) 橘黄 G 染液

橘黄 G (Orange G) 0.5g
蒸馏水 5ml

用橘黄 G 0.5g 溶于 5ml 蒸馏水,再加无水乙醇 95ml,然后加 0.015g 磷钨酸,使用前过滤。存储在深棕色瓶中。

(4) 0.5% 的淡绿乙醇储备液

淡绿 (light green) 0.5g
95% 的乙醇 100ml

(5) 0.5% 的伊红 Y 乙醇储备液

伊红 Y (eosin Y) 0.5g
95% 的乙醇 100ml

(6) 1% 的伊红 Y 乙醇储备液

伊红 Y (eosin Y) 1g

95% 的乙醇 100ml

(7) 0.5% 的俾斯麦棕乙醇储备液

俾斯麦棕 (Bismarck brown) 0.5g

95% 的乙醇 100ml

(8) EA36 染液配方

0.5% 的淡绿乙醇储备液 45ml

0.5% 的伊红 Y 乙醇储备液 45ml

0.5% 的俾斯麦棕乙醇储备液 10ml

磷钨酸 (phosphotungstic acid) 0.2g

(9) EA50 染液配方

0.5% 的淡绿乙醇储备液 6ml

1% 的伊红 Y 乙醇储备液 40ml

纯甲醇 25ml

冰醋酸 2ml

95% 的乙醇 21ml

磷钨酸 2g

2. 染色操作流程

(1) 涂片用 95% 的乙醇, 冰醋酸固定液固定 10 ~ 15min。

(2) 95% 的乙醇、80% 的乙醇、70% 的乙醇、蒸馏水分别浸泡 1min。

(3) 改良 Lillie - Mayer 苏木精染液染色 5 ~ 10min。

(4) 自来水中冲洗多余染液。

(5) 1% 的盐酸乙醇液分化约 4s。

(6) 1% 的碳酸锂水溶液蓝化 1min, 自来水洗 5min。

(7) 依次置入 70% 的乙醇、80% 的乙醇、95% 的乙醇 (I) 和 95% 的乙醇 (II) 各 1min。

(8) 橘黄 G 液染色 1 ~ 2min (此步可省略)。

(9) 依次在 95% 的乙醇 (I)、95% 的乙醇 (II) 漂洗去掉多余橘黄 G 染液。

(10) EA36 染液染色 3 ~ 5min。

(11) 依次用 95% 的乙醇 (I)、95% 的乙醇 (II)、无水乙醇 (I) 和无水乙醇 (II) 脱水各 1min。

(12) 二甲苯透明, 中性树脂封片。

3. 结果 角化细胞胞质呈粉红色, 全角化细胞胞质呈橘黄色, 角化前细胞胞质呈浅蓝色或浅绿色, 细胞核呈蓝紫色, 核仁呈橘红色, 白细胞核呈蓝色, 胞质呈淡蓝淡绿, 红细胞呈橙红色。

(二) 苏木精 - 伊红 (HE) 染色方法

1. 试剂配制

(1) 改良 Lillie - Mayer 苏木精染液。

实用临床诊断病理学

(2) 0.5% 的伊红 Y 乙醇液。

2. 染色操作

(1) 涂片从 95% 的乙醇 - 冰醋酸固定液内取出, 80% 的乙醇浸泡 1min。

(2) 蒸馏水洗 1min。

(3) 改良 Lillie - Mayer 苏木精染液染色 5 ~ 10min。

(4) 自来水冲洗 1min。

(5) 0.5% 的盐酸乙醇液分化 3 ~ 5s。

(6) 自来水冲洗促蓝 10min, 80% 的乙醇浸洗 1min。

(7) 0.5% 的伊红 Y 乙醇液染色 1min。

(8) 80% 的乙醇浸洗 1min。

(9) 依次用 95% 的乙醇 (I)、95% 的乙醇 (II)、100% 的乙醇 (I) 和 100% 的乙醇 (II) 脱水各 1min。

(10) 二甲苯透明, 中性树胶封片。

3. 结果 胞质呈淡红色, 胞核呈紫蓝色, 核仁呈红色。

(三) 迈格林华 - 吉姆萨染色 (MGG 染色) 法

1. 染液配制

(1) 迈格林华染液

迈格林华 (May - Grunwald) 原液 1ml

蒸馏水 9ml

新鲜配制, 不能保存。

(2) 吉姆萨染液

吉姆萨 (Giemsa) 原液 1ml

蒸馏水 9ml

新鲜配制, 不能保存。

2. 染色操作

(1) 涂片固定后蒸馏水洗 2ml。

(2) 迈格林华染液滴染 15min。

(3) 倒弃涂片上的染液, 用自来水冲洗干净。

(4) 吉姆萨染液滴染 15min。

(5) 倒弃涂片上的染液, 用自来水冲洗干净。

(6) 甩干水分, 镜检。必要时干燥后用中性树胶封片。

3. 结果 细胞核呈紫红色, 细胞质和核仁呈深浅不同的蓝色。

4. 注意事项

(1) 适用于淋巴造血系统 (血片) 或胸、腹腔积液等标本。

(2) 必要时可干燥染片后用中性树胶封片, 不宜用乙醇脱水, 否则容易脱色。

五、质量控制

1. 固定好细胞涂片是染色质量的保证 细胞样本涂片完成后应及时固定, 但要注意涂片含水太多, 立即固定时容易使细胞脱落; 太干燥又会使细胞胀大, 甚至溶解, 导致胞核染

色不佳、结构模糊。

2. 常用 EA 染色液有 EA36、EA50 和 EA65 三种 均由淡绿、伊红 Y、俾斯麦棕和磷酸钨酸组成，各自比例不同，但染色结果相似。EA36 适用于妇科标本染色，而 EA65 比较适合用于非妇科的标本。

3. 橘黄 G 和 EA 类染液通常使用 15 天 时间过久，会使胞质染色的颜色不够鲜艳，应根据染片量定期更换。

4. 配制 EA 染液时，pH 的调节对胞质分色好与差较大影响 如 pH 偏高，则上皮细胞质染色偏红，可加少许的磷酸钨酸降低其 pH；如 pH 偏低，则上皮细胞质染色偏蓝或绿色，可加少许饱和碳酸锂溶液调高其 pH。

5. 细胞核在盐酸分化时要把握好时间和盐酸的浓度 着色浅或过深对细胞学的诊断都会造成严重的影响。

6. 血液多和蛋白质多的液体标本 容易造成核染色过深或背景复杂，应先用缓冲液或标本清洗液处理后再制作标本涂片。

7. 商品化学色剂 可选用商品化的染色试剂，建立规范的操作流程。

8. 苏木精注意事项 使用染色时应控制好苏木精染色时间，掌握盐酸、乙醇的浓度及分化时间避免核染色过深或太浅。苏木精质量较差或使用过久的苏木精染液，会导致核浅染或核染色质不清，也会出现蓝染的结晶颗粒。

9. 注意脱水 应及时更换脱水透明的 100% 乙醇或在其后增加一道苯酚，二甲苯脱水透明剂（在南方潮湿天气尤其适合选用），避免脱水不彻底引起片子出现雾状，使细胞轮廓模糊不清，不利于镜下观察。如果细胞片封片不及时，吸入空气中的水分，鳞状上皮细胞胞质出现深褐色斑点。

10. 分开固定 细胞涂片中的细胞较容易脱落，不同病例的细胞片应分开固定，避免样本之间的交叉污染；染片中有皱褶而且重叠的细胞，应考虑在染色中有可能发生的交叉污染。

11. 涂片量较多时选用分多次染色 应该先染脑脊液和尿液等细胞量较少的标本，其次是宫颈脱落细胞标本，最后染痰、支气管冲洗、纤支镜毛刷和体液等细胞涂片；并每天过滤染色所用的试剂和染色液。

（郭冰沁）

第五节 其他细胞学染色技术

在临床细胞学诊断中，许多在常规巴氏染色和 HE 染色难以诊断的疾病，需要通过应用其他一些细胞学染色技术进一步确诊。

一、特殊染色和组织化学染色技术

在细胞学诊断中，用常规的染色方法很难观察到细胞中的一些物质如细菌、黏液和色素等，需要用特殊染色方法来将这些特殊的物质显示出来。因此，通过应用特殊染色和组织化学染色技术，可使一些细胞学常规染色难以诊断的疾病得到进一步确诊，有助于提高细胞病理诊断水平。

细胞学特殊染色方法有很多种，显示不同的物质可选用相应的染色方法，其试剂配制和染色操作和组织的特殊染色操作相似。

二、免疫细胞化学技术

免疫细胞化学技术是在常规染色和细胞化学染色的基础上，根据抗原抗体反应原理而发展起来的染色技术，广泛应用于临床病理诊断，也是细胞诊断中重要的辅助技术之一。尤其是对于判断肿瘤细胞的来源、分类和鉴别诊断起着重要作用。许多在常规染色依靠细胞形态学难以诊断的疾病，通过应用免疫组织化学技术大部分可得到确诊。

细胞涂片的免疫细胞化学技术染色操作和组织的免疫组化技术染色操作相似，但也有其不同之处，如固定液的选用，是否需要抗原修复等会有所差异；尤其是细胞涂片中细胞膜完整，抗原抗体要通过细胞膜浸入，往往需要进行增加细胞膜通透性等处理。而细胞蜡块切片的染色操作和组织切片的染色相同。

三、分子病理学技术

细胞学分子生物学技术是新兴的病理学诊断辅助技术之一，是指在细胞学的基础上，将分子生物学和细胞遗传学的一些技术，在分子水平上检测细胞中的生物性标志物来辅助细胞学诊断。在肿瘤的早期诊断、鉴别诊断以及指导和评估临床治疗有着重要作用。随着技术的稳定，也越来越广泛地应用于临床细胞学诊断，成为临床细胞学诊断中不可缺少的辅助技术，有助于提高细胞学诊断水平。在临床细胞学诊断中，主要应用显色原位杂交技术和荧光原位杂交技术。细胞学原位杂交和组织学原位杂交相似，但也有所不同。目前大多采用商品化检查试剂盒，不同的试剂盒操作步骤不同，应按试剂盒说明书进行操作。

四、涂片重染方法

常规涂片染色一般都有2张或2张以上的涂片，当诊断需要再行其他特殊染色或免疫细胞化学染色时，需要将其中一张片脱色来重新染色；一些旧片因褪色，或染色错误，也需要将其脱色后再进行重染。

(1) 去除盖玻片：将片子先轻微加热，使中性树胶软化，然后浸入二甲苯并经常上下移动玻片，直到盖玻片自然脱下。不能人为将盖玻片移除，否则容易一起把细胞脱下。

(2) 水化脱去盖玻片：再用二甲苯完全洗去中性树胶，用95%的乙醇洗去二甲苯，80%的乙醇洗1min，蒸馏水洗2min。

(3) 胞核褪色：将涂片浸入1%的盐酸乙醇液浸泡15~30min，或更长时间，在镜下观察，直至将苏木精完全脱去。流水冲洗10~15min完全除去盐酸。

(4) 胞质褪色：将细胞核脱色后的涂片浸泡在80%的乙醇中，至胞质颜色脱去，蒸馏水洗2min。

(5) 完全脱色的涂片根据需要重新染色。

(郭冰沁)

第六节 浆膜腔积液细胞涂片制作

一、标本采集和处理

1. 离心沉淀 将标本液体上半部轻轻倒掉，保留底部沉淀物 20ml。摇匀后注入 2~4 支锥形离心管内，平衡后中速（2 000 转/分），离心 5~10min。

2. 标本取材 将离心后上清液用毛细吸管吸出弃掉，若为血性胸、腹腔积液则吸取红细胞沉淀层与上清液接触液面的灰白色薄层液进行混匀涂片，此灰白色层为有效细胞成分，是涂片制作的材料。若非血性积液则将上清液吸出后留约 0.2ml 与离心管底的沉渣混匀涂片。

二、涂片制作

(1) 取离心沉淀标本，用毛细吸管滴 1 小滴位于载玻片 1/3 处，即置于载玻片的一侧端。

(2) 然后取一玻片与载玻片呈 30° 的夹角，将标本液夹在两玻片之间向前推进，涂片形成头、体、尾三部分，肿瘤细胞多数集中在尾部。

三、涂片固定

1. 固定液选择 细胞涂片以高浓度的固定液为佳，常用乙醇-乙醚固定液。高浓度的固定液无论是细胞形态的保存，还是细胞在玻片上的黏附都优于其他固定剂。

2. 固定方法 涂片制作完成后应立即垂直投进细胞固定液内固定，固定液必须浸泡整个涂片。

3. 固定时间 10~15min。

四、涂片染色

染色前先按次序整理申请单，并与玻片核对名字、编号及玻片数量。细胞学常规染色方法首选巴氏染色法，大量妇科宫颈细胞学检查或穿刺涂片亦可用常规 HE 染色。血液细胞学涂片检查可用瑞氏染色、吉姆萨染色。

五、质量控制

(1) 细胞样本离心后，如果细胞数量较多，制作涂片时，除了吸取底层细胞外，还应吸取小许上层液体混合后再涂片，避免细胞过多重叠，引起细胞脱落。

(2) 用做推片的载玻片与液体接触的角度大小，直接影响涂片的均匀与细胞成分分布的厚度。推片夹角角度小涂片的厚度显示薄，相反推片夹角角度大涂片的厚度显示厚，合适的夹角度数为 30°。

(3) 细胞量多的标本制片宜薄，细胞量少的标本制作时涂片宜集中偏厚。

(郭冰沁)