

术中组织印片细胞 DNA 倍体分析在甲状腺疾病中的诊断意义*

张林重¹, 任力², 李炜², 李德昌², 岳颖², 郑吉春²

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 空军总医院 病理科, 北京 100142)

[摘要] **目的** 探讨术中组织印片细胞 DNA 倍体分析对甲状腺疾病良恶性的诊断价值, 提高术中快速诊断的准确率。**方法** 对 549 例甲状腺术中冷冻标本进行术中组织印片细胞 DNA 倍体分析及冷冻切片诊断, 并与术后常规石蜡切片诊断、免疫组化及 BRAF V600E 基因突变检测结果进行比较。**结果** 549 例甲状腺术中冷冻切片确诊 536 例, 确诊率 97.6%; 术中组织印片细胞 DNA 倍体分析确诊 543 例, 准确率 98.9%; 二者联合确诊 545 例, 确诊率 99.3%。**结论** 将冷冻切片联合组织印片细胞 DNA 倍体分析应用于甲状腺疾病手术中快速病理检查, 能减少误诊, 提高快速诊断的准确率。

[关键词] 甲状腺疾病; 术中病理诊断; DNA 倍体分析

[中图分类号] R736.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-8096(2016)08-0593-04

Clinical significance of DNA ploidy analysis of intraoperative thyroid tissue touch preparation

ZHANG Lin-zhong¹, REN Li², LI Wei², LI De-chang², ZHENG Ji-chun², YUE Ying² (1. Hebei North University, Zhanjiaokou 075000, China; 2. Department of Pathology, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China)

Corresponding author: REN Li (E-mail: renlifei2000@sina.com)

Abstract: **Objective** To investigate the diagnosis value of DNA ploidy analysis of intraoperative thyroid tissue touch preparation, and to improve the accuracy of the rapidly intraoperative diagnosis of the thyroid lesions. **Methods** 549 cases of the thyroid lesions were detected by touch preparation cytology and frozen section during operation, and the results were compared with the postoperative histopathologic diagnosis, immune phenotype and the status of BRAF V600E gene mutation. **Results** 536 cases were diagnosed properly with frozen section (536/549, 97.6%), 543 were diagnosed exactly with DNA ploidy analysis of intraoperative thyroid tissue on touch preparation cytology (543/549, 98.9%), and 545 cases were diagnosed properly by combination of touch preparation and frozen section (545/549, 99.3%).

Conclusion Both DNA ploidy analysis of touch preparation cytology and frozen section applied during operation can increase the accuracy of rapidly intraoperative diagnosis for the thyroid lesions.

Key words: Thyroid lesions; Intraoperative pathologic diagnosis; DNA ploidy analysis

术中快速冷冻病理检查是目前手术中病理诊断最快的一种方法, 术中快速冷冻病理诊断结果是临床医生明确肿瘤的良、恶性或交界性的依据。甲状腺疾病在内分泌系统中较为常见, 在时间较短的术中冷冻中, 有些甲状腺标本无论是在临床上、大体上、还是在显微镜下均较难确定其良、恶性。恶性肿瘤细胞的 DNA 倍体往往是非整倍体, 通过全自动细胞图像分析系统进行细胞 DNA 倍体分析在甲状腺疾病的诊断、疗效评价和预后评估中具有重要价值^[1,2]。本文通过冷冻切片、术中组织印片细胞 DNA 倍体分析对甲状腺疾病病变的性质进行判断,

并探讨冷冻切片联合组织印片细胞 DNA 倍体分析在甲状腺恶性肿瘤中的诊断价值及意义。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2014-01—2015-06 间空军总医院手术切除的甲状腺冷冻标本 549 例, 其中男性 121 例, 女性 428 例; 年龄 15~85 岁, 平均年龄 49.5 岁, 中位年龄 50 岁。甲状腺良性病变 372 例, 甲状腺恶性病变 177 例。术中送检标本均做冷冻切片、术中组织印片细胞 DNA 倍体扫描分析, 并与最终石蜡、免疫组化诊断及 BRAF V600E 基因检测结果进行对比。

* 基金项目: 首都卫生发展科研专项基金(首发 2011-5041-01); 通讯作者: 任力。E-mail: renlifei2000@sina.com

1.2 方法

1.2.1 组织印片细胞 DNA 倍体分析 按常规书页状切开标本,用载玻片在新鲜标本的典型病变组织处轻轻按压数次,使病变组织的切面与载玻片均匀密切接触,避免推拉和过度按压,黏取适量细胞,制成细胞学印片,迅速用 95% 乙醇固定 2 ~ 3 min,水洗后苏木精染色 1 min,流水冲洗 30 s,0.5% 盐酸乙醇分化,流水冲洗 30 s,1% 氨水溶液返蓝,流水冲洗 30 s,梯度乙醇脱水,中性树胶封片。经过快速 DNA 苏木精染色后的印片用全自动细胞图像分析仪进行扫描、分析得出术中送检标本 DNA 倍体诊断结果,此种方法比 Feulgen 染色操作简便且用时短,能在 20 min 内迅速完成,适于术中冷冻诊断^[3]。

1.2.2 冷冻及常规组织病理方法 术中标本经冷冻后切片、HE 染色;常规标本经充分取材、脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色。病理诊断疑为恶性的标本进行免疫组化染色及 BRAF V600E 基因突变检测,准确判断病变的良、恶性。

1.2.3 BRAF V600E 基因检测 在 177 例恶性病变中随机选取 30 例,在 372 例良性病变中随机选取 20 例,分别于显微镜下标记典型病变区域,切片时选取相关区域,避免选择钙化区。切取 4 μm 厚组织切片 7 张,放入洁净的 EP 管中,每一例均使用一个新的切片刀,酒精消毒有关器具。将组织切片加

入 250 μl Buffer TL,90℃ 孵育 30 ~ 60 min,室温放置 1 min,12000 rpm 离心 2 min,小心穿过石蜡层,吸取 200 μl 包含组织的液体到另一个新的 1.5 ml EP 管中,然后加入 20 μl 蛋白酶 K,颠倒混匀。应用 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 试剂盒,对样本进行 DNA 提取,所提取 DNA 用紫外线分光光度计测定浓度及纯度;使用武汉友芝友生物制药有限公司生产的检测试剂盒,对 BRAF 基因 15 号外显子 V660E 突变基因进行实时荧光 PCR 检测,方法依据试剂盒说明书。

1.2.4 免疫组化 采用 EnVision 两步法,所用一抗 Ki-67、p53、CK19、TTF-1、CK34βE12、CD10 和 CD56 均为北京中杉金桥生物科技有限公司产品,EnVision 试剂盒购自 Dako 公司,实验操作步骤严格按照说明书进行。

1.3 结果判定 由 2 位高级职称病理医师对冷冻切片与 DNA 倍体分析结果进行双盲诊断,并分别统计诊断的准确率,然后联合分析 DNA 倍体扫描和冷冻切片结果,做出最终诊断。剩余标本经石蜡常规切片诊断作为对照。

2 结果

2.1 549 例术中甲状腺疾病冷冻切片、组织印片细胞 DNA 倍体分析、两者联合诊断结果、石蜡诊断结果 见表 1。冷冻切片确诊率 97.6%,DNA 倍体分析准确率 98.9%,二者联合确诊率 99.3%。

表 1 549 例术中甲状腺病变组织印片细胞 DNA 倍体分析和冷冻切片诊断结果比较

石蜡切片	n	冷冻切片			术中 DNA 倍体分析		联合诊断		
		确诊	延迟	误诊	(+)	(-)	确诊	延迟	误诊
恶性	177	168	5	4	172	5	173	3	1
良性	372	368	4	0	1	371	372	0	0
合计	549	536	9	4	173	376	545	3	1

2.2 BRAF V600E 基因突变检测 见表 2。

表 2 50 例术后甲状腺病变 BRAF V600E 基因突变的检测结果

病变	n	BRAF V600E 突变	突变率(%)
良性	20	0	0
恶性	30	25	83.3
总计	50	25	50

2.3 冷冻诊断 诊断结果分为确诊(良、恶性与最终诊断一致)、延迟(不能确定诊断,需待石蜡切片、免疫组化及 BRAF 基因突变检测确诊)和误诊(假阴性或假阳性)3 类。冷冻切片确诊 536 例(图 1),延迟诊断 9 例(常出现于滤泡上皮乳头状增生,确定有无癌变)(图 2),误诊 4 例(甲状腺乳头状癌,

误诊为甲状腺腺瘤伴轻度非典型增生)。

2.4 印片细胞 DNA 倍体分析 阴性诊断标准:正常二倍体(2C)细胞为主,未见异倍体细胞及异倍体细胞峰;阳性诊断标准:出现 3 个或以上 >5C 细胞或出现异倍体细胞峰。在 DNA 倍体诊断中凡有 >5C 细胞的玻片,需要在显微镜下再逐一核查,以排除系统将污染物或重叠的核误认为癌细胞或异常细胞。分析结果:①173 例为阳性(图 3),其中假阳性 1 例。②376 例阴性病例未见 >5C DNA 倍体异常细胞(图 4),其中假阴性 5 例。

2.5 免疫组化 肿瘤细胞 Ki-67(1% ~ 7%) p53、CK19(图 5 ~ 6)、TTF-1、CK34βE12、CD10 和 CD56 均(+)

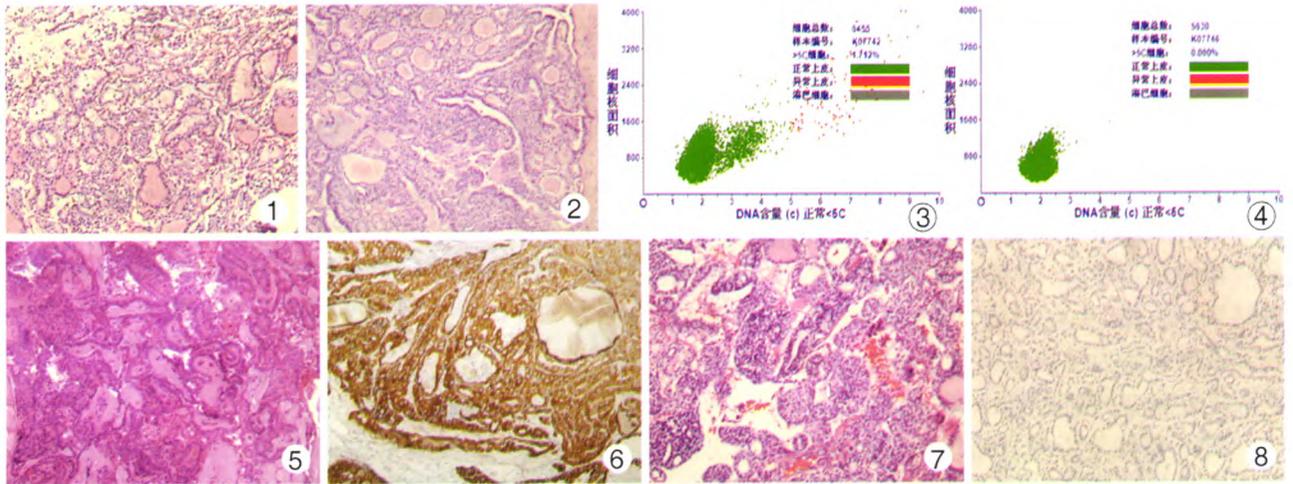


图1 冷冻切片,甲状腺滤泡上皮增生 图2 冷冻切片,甲状腺滤泡上皮乳头状增生 图3 可见大量>5C细胞,扫描结果(+),提示恶性 图4 未见>5C细胞,扫描结果(-),提示良性 图5,6 石蜡切片,甲状腺滤泡上皮乳头状增生,细胞异型性明显、可见核沟及毛玻璃样核,诊断恶性;瘤细胞CK19(3+) EnVision法 图7,8 石蜡切片,术后多取材未见不典型增生,诊断良性;瘤细胞CK19(-) EnVision法

3 讨论

甲状腺癌是内分泌系统中一种比较常见的恶性肿瘤,每年甲状腺癌的新发病例占有癌症发病的1%~5%,女性甲状腺癌的发病高于男性,约为男性的3倍,甲状腺癌的发病年龄相对较年轻,发病率随年龄的增长而升高。甲状腺患者的早期症状不明显,多数患者通过体检发现甲状腺结节,手术切除后经病理诊断证实为甲状腺癌。甲状腺乳头状癌最为常见,在甲状腺恶性肿瘤中占90%^[4]。甲状腺肿瘤切除术中,尤其在术前疑为甲状腺癌的患者或具有隐匿性的甲状腺微小癌,术前常漏诊,术中冷冻切片检查尤为重要。临床外科医师往往根据冷冻切片检查结果决定手术切除范围,选择恰当的手术方式^[5]。

术中冷冻切片由于其诊断速度快,能够完整地观察病变的组织结构,具有细胞学检查不可替代的优势和作用,对临床有很好的指导作用,大大降低了二次手术率^[6]。由于术中送检冷冻标本时会发生形态改变,加上微小癌病变组织体积较小,冷冻取材时较难发现,临床上易误诊。本文549例标本中,延迟及误诊的13例皆由术中冷冻切片的这些局限性所造成。虽然术中标本冷冻时会产生形态学上的改变,但细胞中的DNA含量不变。

印片细胞学诊断由Dudgcon等^[7]在1927年首次应用于术中冷冻,在甲状腺疾病的诊断中,国外有学者认为术中冷冻病理检查不是主要的手段,应该

主要依靠细胞学检查方法。Taneri等^[8]比较分析了103例甲状腺患者,印片细胞学确诊率为96%,冷冻切片确诊率为95%,可见印片细胞学诊断具有优势^[9]。本文通过对549例甲状腺标本联合应用组织印片细胞DNA倍体分析和术中冷冻切片诊断的结果分析得出,这种联合诊断方法一方面提高了术中快速病理诊断的准确率,另一方面又克服了术中快速冷冻切片的局限性,并且此诊断方法快速简捷易于推行^[1]。

甲状腺良性及增生性病变中,DNA倍体分析结果显示大部分细胞为二倍体细胞,在增生性病变中可见少量的四倍体细胞^[10,11]。在甲状腺癌病例中,DNA倍体分析结果显示有数量不等>5C异倍体细胞^[12]。在术中冷冻延迟诊断和误诊的病例中,5例冷冻诊断甲状腺滤泡上皮乳头状增生,不除外癌变,待石蜡切片;DNA倍体扫描查到3个以上>5C异倍体细胞,二者联合诊断为甲状腺乳头状癌,经石蜡切片、免疫组化Ki-67(2%+)、CK19(1+)、TTF-1(2+)、CK34βE12(+)、MC(-)及BRAF V600E基因突变检测(+)证实为甲状腺乳头状癌。4例冷冻诊断甲状腺滤泡上皮增生,不除外局灶癌变的标本,DNA倍体扫描均未查到>5C异倍体细胞,再次回顾冷冻切片联合DNA倍体扫描结果诊断为甲状腺腺瘤,石蜡切片(图7),免疫组化Ki-67<1%(+),CK19(-)(图8)、TTF-1、CK34βE12和BRAF V600E基因突变检测(-),与二者联合诊断为甲状腺腺瘤一致。4例冷冻诊断甲状腺滤泡乳头上皮增

生,符合腺瘤,但 DNA 倍体扫描查到 3 个以上 >5C 异倍体细胞,二者联合诊断为甲状腺乳头状癌。

由此可见 DNA 倍体扫描结果能够真实地反应细胞的生物学特性,准确地判断肿瘤的良好、恶性。3 例因为术中冷冻未充分取材,导致出现假阴性结果,另 2 例假阴性结果是由于纤维组织及炎细胞较多,印片细胞数量较少,导致结果呈假阴性。1 例假阳性结果经石蜡、免疫组化及 BRAFV600E 基因突变检测结果证实为甲状腺不典型腺瘤,由此说明该甲状腺良性病变的细胞 DNA 倍体也可发生改变^[13]。

DNA 倍体分析与石蜡结果比较后我们得出甲状腺病变良恶性可以通过 DNA 倍体扫描分析做出准确的诊断,也表明在甲状腺癌组织中细胞已发生了 DNA 倍体改变。

综上所述,组织印片细胞 DNA 倍体分析是术中快速病理诊断准确而可靠的方法之一。印片细胞学可以多点取材;冷冻切片能观察完整的组织结构,因此二者联合诊断,能够有效地提高甲状腺术中冷冻病理诊断的准确率。

参考文献:

[1] Camargo RS, Maeda M, di Loreto C, *et al.* Is agNOR and DNA ploidy analysis useful for evaluating thyroid neoplasms? Analytical and quantitative cytology and histology/the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology, 2005,27(3): 157 - 161.

[2] 郑吉春,任力,李德昌,等. DNA 倍体分析应用于甲状腺旁腺癌病理诊断[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(7): 1561 - 1563.

[3] 赵久飞,任力,李炜,等. 术中组织印片细胞 DNA 倍体

分析在乳腺疾病诊断中的意义[J]. 诊断病理学杂志,2013,20(12): 744 - 747.

[4] 高颖,沈兵,张建英,等. 甲状腺肿瘤组织中 BrafV600E 基因突变的检测[J]. 诊断病理学杂志,2015,22(3): 162 - 165.

[5] 李伟,张铭. 冰冻切片在甲状腺肿瘤术中的应用分析[J]. 中外医学研究,2013,11(12): 127 - 128.

[6] 陈友权. 印片细胞学和冰冻切片检查在甲状腺乳头状癌诊断中的应用分析[J]. 中国现代医生,2012,50(16): 111 - 112.

[7] Suen K, Wood W, Syed A, *et al.* Role of imprint cytology in intraoperative diagnosis: value and limitations[J]. Journal of clinical pathology,1978,31(4): 328 - 337.

[8] Taneri F, Poyraz A, Salman B, *et al.* Using imprint and frozen sections in determining the surgical strategies for thyroid pathologies[J]. Endocrine regulations,2001,35(2): 71 - 74.

[9] 蓝松,彭娟,尤芳. 142 例甲状腺肿块术中印片细胞学与冰冻切片诊断分析[J]. 哈尔滨医药,2012,32(1): 4 - 5.

[10] Pinto AE, Silva GL, Pereira T, *et al.* S-phase fraction and ploidy as predictive markers in primary disease and recurrence of papillary thyroid carcinoma[J]. Clinical endocrinology,2012,77(2): 302 - 309.

[11] McLeod M. The measurement of DNA content and ploidy analysis in thyroid neoplasms [J]. Otolaryngologic clinics of North America,1990,23(2): 271 - 290.

[12] Hu J-l, Hu S-s, Hou X-x, *et al.* Abnormal Expression of DNA Double-Strand Breaks Related Genes, ATM and GammaH2AX, in Thyroid Carcinoma[J]. International journal of endocrinology, 2015,2015.

[13] 孟家榕,吴波,张闵峰,等. 甲状腺肿瘤细胞印片的 DNA 图象分析[J]. 肿瘤防治研究,2003,30(2): 104 - 105.

收稿日期:2015 - 12 - 09

欢迎订阅

《诊断病理学杂志》