

荧光原位杂交技术在膀胱尿路上皮癌中的 临床应用研究

王勇¹ 李杰² 李鹏超² 魏俊峰² 唐敏² 李永飞² 黄婷³ 吴云松³ 王增军² 张炜² 徐卓群¹

【摘要】 目的:本研究旨在利用荧光原位杂交技术(FISH)辅助诊断膀胱尿路上皮癌,以探讨其作为一种替代尿脱落细胞学的无创性检查在膀胱尿路上皮癌诊断中的应用价值。**方法:**收集 30 例健康志愿者的新鲜尿液,应用 3、7、17 号染色体及 9 号染色体 p16 位点探针标记,进行 FISH 检测,建立正常人群阈值;再收集 95 例因血尿或影像学检查拟诊为膀胱肿瘤的患者晨尿标本,分别作常规尿脱落细胞学检查和 FISH 检测,其中 79 例膀胱镜下活检或术后标本病理确诊为膀胱尿路上皮癌。FISH 检测统计目标染色体畸变情况,并进一步分析与病理分级的关系。**结果:**FISH 检测设定的正常阈值为 3 号染色体:3%;7 号染色体:4%;17 号染色体:3%;9 号染色体 p16 位点:10%。FISH 检测技术的敏感性为 74.68%(59/79),高于尿脱落细胞学检查的 35.44%(28/79),差异具有统计学意义($P>0.001$),而 FISH 检测的特异性为 93.75%(15/16),尿脱落细胞学检查特异性为 87.50%(14/16),两者差异无统计学意义($P>0.05$)。不同病理分级下 FISH 检测的敏感性呈现为高级别高阳性率:低度恶性倾向的尿路上皮肿瘤为 58.33%(7/12),尿路上皮癌 I 级为 54.17%(13/24),尿路上皮癌 I~II 级为 86.36%(19/22),尿路上皮癌 II 级和 II~III 级为 94.44%(17/18),尿路上皮癌 III 级为 100%(3/3),敏感性随着病理分级的提高而呈现增高趋势。**结论:**FISH 检测技术具备无创、高敏感性的特点,优于传统的尿脱落细胞学检查。不同分级的膀胱尿路上皮肿瘤其 FISH 检测的敏感性不同,表现为高级别高敏感性。FISH 检测上述位点在低级别膀胱尿路上皮肿瘤中敏感性较高,大大提高了低级别尿路上皮肿瘤的检出率,有望成为一种常规的膀胱肿瘤复查指标。

【关键词】 荧光原位杂交;脱落细胞;尿路上皮癌;分级

【中图分类号】 R737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-1420(2012)11-0824-04

Clinical utility of fluorescence in situ hybridization in bladder urothelial carcinoma

WANG Yong¹ LI Jie² LI Pengchao² WEI Junfeng² TANG Min² LI Yongfei²
HUANG Ting³ WU Yunsong³ WANG Zengjun² ZHANG Wei² XU Zhuoqun¹

(¹Department of Urology, Wuxi People's Hospital, Nan-jing Medical University, Wuxi, Jiangsu, 214000, China; ²Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University; ³Department of Pathologists, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University)
Corresponding author: Li Jie, E-mail: lijie203076@yahoo.com

Abstract Objective: Our study aims to use fluorescence in situ hybridization(FISH) for predicting the bladder urothelial carcinoma, in order to discuss its clinical utility in bladder urothelial carcinoma as a noninvasive test and a substitute for urine cytology. **Method:** Fresh urine samples were collected from 30 healthy volunteers, for FISH analysis, labeled probes specific for chromosomes 3, 7 and 17 and for the p16(9p21) gene were used to assess chromosomal abnormalities indicative of malignancy. Another 95 cases (including 79 bladder urothelial carcinoma cases diagnosed by pathological examination) suspected of having urothelial carcinoma because of hematuria or auxiliary examination were analyzed by means of cytology and FISH, statistical analysis of the experimental results were used for further analysis with pathologic stage. **Result:** The normal threshold of FISH was: chromosome 3: 3%, chromosome 7: 4%, chromosome 17: 3% and the p16(9p21) gene: 10%. The sensitivity of FISH examination of urothelial carcinoma was 74.68%(59/79), which was much higher than that of cytology 35.44%(28/79), $P>0.001$. The specificity appeared no difference between FISH and cytology of urothelial carcinoma: 93.75%(15/16) and 87.50%(14/16), respectively, $P>0.05$. The sensitivity of FISH examination was higher in high grade urothelial carcinoma than in low grade: 58.33%(7/12) for potential malignancy, 54.17%(13/24) for grade I, 86.36%(19/22) for grade I-II, 94.44%(17/18) for grade II and II-III, 100% for grade III. **Conclusion:** FISH is a non

¹南京医科大学附属无锡市人民医院泌尿外科(江苏无锡, 214000)

²南京医科大学第一附属医院泌尿外科

³南京医科大学第一附属医院病理科

通信作者:李杰, E-mail: lijie203076@yahoo.com

invasive detecting method with high sensitivity which is better than traditional urine cytology. FISH not only showed higher sensitivity in higher grade urothelial carcinoma, but also could help us easy to detect low grade urothelial carcinoma, which was expected to be a regular test for urothelial carcinoma.

Key words FISH; urine cytology; urothelial carcinoma; grade

尿路上皮癌为泌尿系统最常见的恶性肿瘤,近年来发病率呈逐渐上升趋势^[1],常规的诊断为尿脱落细胞学检查和膀胱镜、输尿管镜检查,前者的敏感性较低,而后者为有创检查,患者接受检查时较痛苦,多不作为首选筛查手段。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术是近些年来发展起来的细胞遗传学与分子生物学相结合的技术,SKACEL 等^[2]研究显示在膀胱癌的诊断中 FISH 有较高的敏感性,并且为无创检查,对尿路上皮癌的临床诊断和复发监测有着很好的指导价值,本研究旨在利用 FISH 检测 3、7、17 号染色体及 9 号染色体 p16 区带的染色体畸变情况,辅助诊断膀胱尿路上皮癌,以探讨其作为一种无创性检查在临床中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2010 年 11 月~2011 年 1 月江苏省人民医院的 30 例健康志愿者的新鲜尿液,其中男 21 例,女 9 例,年龄 25~68 岁,平均 57.6 岁,应用 3、7、17 号染色体及 9 号染色体 p16 位点探针标记^[3],进行 FISH 检测,建立正常人群阈值;并收集 95 例因血尿或影像学检查拟诊为膀胱肿瘤的患者尿液标本,其中男 70 例,女 25 例,年龄 16~84 岁,平均 61.6 岁,分别作常规尿脱落细胞学检查和 FISH 检测,其中 79 例膀胱镜下活检或术后切取组织病理确诊为尿路上皮癌,包括低度恶性倾向尿路上皮肿瘤 12 例,低级别(尿路上皮癌 I 级、I~II 级)46 例,中高级别(尿路上皮癌 II 级、II~III 级)18 例,高级别^[4](尿路上皮癌 III 级)3 例,每例收集新鲜晨尿 500 ml。

1.2 试剂和仪器

FISH 探针 CSP3/CSP7、GLPp16/CSP17 探针(北京金菩嘉医疗科技有限公司);胶原酶 B 及蛋白酶 K 购自美国 Sigma 公司;甲酰胺、NP40(美国 Amresco 公司)。杂交仪(美国 Thermo 公司);荧光显微镜(日本 Olympus BX51);低温离心机(德国 Eppendorf 公司);微量加样器(德国 Eppendorf 公司);电热恒温电热恒温培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)。

1.3 FISH 检测技术

1.3.1 玻片制备 收集样本(晨尿)500 ml,分装于 50 ml 离心管中;2 000 RPM 离心 10 min,去上清,将所离心的沉淀集合于 10~15 ml 的离心管中,用 5 ml PBS 缓冲液(磷酸盐缓冲液)重新吹打

悬浮细胞,清洗残留尿液;1 200~1 400 RPM 离心 10 min,去上清,用 5 ml 胶原酶 B(0.005 g/5 ml HanK's BSS)用力吹打悬浮细胞;37℃水浴 20 min,期间吹打 2~3 次;1 200 RPM 离心 10 min,去上清,加入 5 ml 37℃预热的 0.075 M KCL 低渗液,重新吹打悬浮细胞,37℃水浴低渗 30 min;低渗结束后,缓慢加 2 ml 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)于试管中,轻轻吹打混匀,预固定;1 000 RPM 离心 10 min,去上清,室温下缓慢加入 5 ml 固定液,轻轻吹打悬浮细胞,固定 10 min,进行一固定;1 000 RPM 离心 10 min,去上清,室温下缓慢加入 5 ml 固定液,轻轻吹打悬浮细胞,固定 10 min,进行二固定;1 000 RPM 离心 10 min,去上清至适宜体积(根据所收获细胞量而定),轻轻吹打混匀后,静置 1 min,取适量悬液滴于处理好的干燥玻片上,自然晾干后于光镜下观察细胞密度,10X 下每视野 30~50 个左右细胞为宜;室温下过夜老化玻片或 56℃烤片机上烘烤 30 min 老化备用。

1.3.2 玻片预处理 将老化好的玻片于(37±1)℃,2×SSC(pH 7.0)溶液中缓冲 10 min;新鲜胃蛋白酶工作液 40 ml,消化 10 min;或取 40 μl 的 20 mg/ml 胃蛋白酶工作液消化 10 min。2×SSC(pH 7.0)溶液处理完毕后,立即将玻片置于 37℃胃蛋白酶溶液中 8 min;室温,2×SSC(pH 7.0)溶液中漂洗玻片 2 次,各 5 min;将玻片依次置于 4℃预冷的 70%乙醇、85%乙醇和 100%乙醇中脱水,各 3 min;取出玻片,自然晾干;56℃,烤片 3 min。

1.3.3 杂交仪变性杂交 探针准备(杂交液 7 μl,去离子水 1 μl,探针 2 μl),加入到 0.5 ml 离心管中混匀,离心 1~3 s,备用;将 10 μl 探针混合物滴加于玻片杂交区域,立即加盖盖玻片,用橡皮胶封盖玻片边缘;准备杂交仪器,共变性条件:73℃ 5 min;杂交条件:42℃过夜杂交。

1.3.4 玻片洗涤及观察 杂交完毕后,轻轻揭掉橡皮胶,移去盖玻片,立即将玻片依次置于(46±1)℃,50%甲酰胺/2×SSC(pH 7.0)溶液“1”、“2”、“3”号考普林瓶中洗涤各 8 min,4 min 时提洗玻片 1~3 s,充分洗脱;(46±1)℃,2×SSC(pH 7.0)溶液中漂洗 10 min;(46±1)℃,0.1%NP-40/2×SSC(pH 7.0)溶液 5 min;室温,70%乙醇溶液 3 min;洗脱完毕暗处自然干燥玻片;室温,将 10~12 μl DAPI 复染剂滴加于玻片杂交区域,立即盖上盖玻片(DAPI 自冰箱取出平衡到室温,涡旋混匀离心后使用);暗处放置 10~20 min,在荧光显微镜下

选用合适的滤片组观察玻片。

1.4 结果判定

正常细胞的 3、7、17 号染色体着丝粒探针及 9 号染色体 p16 位点均表现为二倍体,表现为细胞核分别可见 2 个绿色及 2 个红色信号,当出现非两倍体改变时即为异常表现。3、7 和 17 号染色体主要表现为非整倍体改变(每个细胞核内出现大于或等于 3 个信号的表现),p16 位点主要表现为缺失(每个细胞核内出现小于或等于 1 个信号的表现)。计数每例志愿者的 100 个不重叠的细胞核,统计 3、7 和 17 非整倍体改变数值及 p16 缺失的细胞数目,并计算其所占的百分比,建立正常阈值(阈值=均数+3×标准差)^[5]。异常结果的判断标准:计数 100 个不重叠的细胞核,细胞核出现 3、7 和 17 非整倍体信号与 p16 缺失的细胞百分比大于正常阈值时为异常,当患者出现至少 2 种探针信号异常时诊断为尿路上皮癌。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,敏感性和特异性结果以百分率表示,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

30 例健康志愿者的新鲜晨尿标本行 FISH 检测,阈值=均数+3×标准差,正常阈值为 3 号染色体:3%;7 号染色体:4%;17 号染色体:3%;9 号染色体 p16 位点:10%。

收集的 95 例高度怀疑尿路上皮肿瘤的患者,经术后组织病理为尿路上皮中度或重度不典型增生 3 例(不计入肿瘤),13 例为正常黏膜或黏膜慢性炎,确诊为尿路上皮癌的有 79 例(其中低度恶性倾向的尿路上皮肿瘤 12 例,尿路上皮癌 I 级 24 例,尿路上皮癌 I~II 级 22 例,尿路上皮癌 II 级和 II~III 级 18 例,尿路上皮癌 III 级 3 例),其中 FISH 检出阳性的有 59 例,敏感性为 74.68%,尿脱落细胞学检出阳性的有 28 例,敏感性为 35.44%,低于 FISH 的敏感性($P>0.001$, $\chi^2=24.581$);对病理诊断为正常或非肿瘤病变的 16 例患者, FISH 的特异性为 93.75%(15/16),尿脱落细胞学检查特异性为 87.50%(14/16),两者无统计学差异($P>0.05$, $\chi^2=0.368$)。

对于不同病理分级的尿路上皮癌患者, FISH 的敏感性也有差异:低度恶性倾向的尿路上皮肿瘤为 58.33%(7/12),尿路上皮癌 I 级为 54.17%(13/24),尿路上皮癌 I~II 级为 86.36%(19/22),尿路上皮癌 II 级和 II~III 级为 94.44%(17/18),尿路上皮癌 III 级为 100%(3/3),但 χ^2 检验分析仅提示低级别组(尿路上皮癌 I 和 I~II 级)和中级别组(尿路上皮癌 II 级和 II~III 级)之间的 FISH 敏感性有统计学差异($P>0.05$),而低度恶

性倾向组与低级别组以及中级别组与高级别尿路上皮癌组之间无统计学差异,这可能与低度恶性倾向组、高级别尿路上皮癌组样本数偏少有关。

3 讨论

尿路上皮癌,尤其是膀胱尿路上皮癌的发病率在人群中可高达 0.1%,其中约 70%为非肌层浸润性肿瘤,30%为肌层浸润性膀胱肿瘤^[6],且部分患者复发后出现进展,危及患者生命,因此对它的早期诊断工作显得十分重要。目前临床上常用的诊断方法多有其局限性:尿脱落细胞学检查虽具有无创、特异性高的优点,但因敏感性较低^[7]而无法作为有效的诊断方法,即使连续送检 3 次晨尿,结果仍不够可靠;对于高度怀疑膀胱占位性病变的患者,门诊可采取局麻下膀胱镜检查以发现肉眼可见的病灶,取活组织送病理检查可基本明确诊断。

但对于原位癌和上尿路肿瘤的诊断仍然是临床工作的难点和重点,对于有血尿症状的患者,经过常规检查及泌尿系统 B 超、静脉肾盂造影、泌尿系统 CT 检查仍无法明确病因并排除其他良性病变的,通常只能采取观察等待,有可能延误原位癌的治疗,而影像学发现有上尿路占位性病变的患者,输尿管镜检查可以直观的反映占位情况,对于上尿路尿路上皮癌的诊断敏感性很高,但需要住院在手术室麻醉下检查,增加患者的痛苦和经济负担,且存在相关的并发症^[8]和根治性术后病理为良性的风险可能,许多患者难以接受,而 FISH 是基于染色体水平检测目标染色体异常扩增或缺失的新技术,它利用脱落肿瘤细胞的 DNA 特异性片段作为模板,人工合成带有放射性或生物素标记的单链 DNA 片段,可用来快速检测病原体,再将一段已知序列的多聚核苷酸用荧光染料标记后制成探针,与固定在硝酸纤维素膜的 DNA 进行互补结合,经荧光显影就可以判定同源核酸分子的存在。由于 FISH 技术的特殊性,在临床检测过程中不易受到诸如血尿、尿路感染和膀胱灌注化疗的影响^[9,10],结果十分可靠,优于传统的细胞学检测,自 2000 年 SOKOLOVA 等^[11]建立首个膀胱尿路上皮癌 FISH 探针以来,目前已基本确立将 3、7、17 号染色体及 9 号染色体 p16 位点探针作为常规检测目标,在本次研究中我们采用了这一组国际认可的探针组合,结果显示 FISH 的敏感性高达 74.68%,远大于尿脱落细胞学的 35.44%,尤其在低度恶性倾向组(58.33%)和低级别尿路上皮癌组(69.57%)中的优势更加明显,这对于尿路上皮癌的早期诊断十分重要。

同时,我们对不同病理分级膀胱尿路上皮癌患者的 FISH 敏感性进行了统计,结果发现随着肿瘤级别的提高, FISH 敏感性呈现出明显的增高趋势,这与国外的研究相类似^[12],虽然因部分实验组

样本量偏少造成统计学分析不能完全支持两者的相关性,但就膀胱尿路上皮癌的病理机制而言,恶性程度越高,细胞核发生异质的比例会越大^[13],与我们的统计数据相符,从而间接提示我们 FISH 检测在高级别肿瘤组中敏感性较高。

由于膀胱尿路上皮癌属于高复发性肿瘤,且有家族遗传性的相关报道^[14],对它的早期诊断和复发的监测十分重要,我们的实验结果显示 FISH 较尿脱落细胞学可显著提高低度恶性倾向和低级别尿路上皮癌的诊断率,这对于 B 超、CT 和膀胱镜下难以发现的早期膀胱尿路上皮肿瘤的诊断和早期治疗起到了很大的辅助作用,从而大幅度提高了治疗效果,改善了患者的预后情况。

综上所述,FISH 检测技术具备无创、高敏感性等特点,尤其在低度潜在恶性和低级别尿路上皮肿瘤的诊断中优于传统的尿脱落细胞学检查。不同分级的膀胱尿路上皮肿瘤其 FISH 检测的敏感性不同,表现为高级别者敏感性高。我们希望在下一步的研究中,跟踪经尿道膀胱肿瘤电切(TURBT)术后患者,运用 FISH 检测技术更早的提示膀胱肿瘤复发,从而使 FISH 检测成为一种常规的膀胱肿瘤早期诊断指标。

参考文献

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, *et al.* Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59: 225—249.
- [2] SKACEL M, FAHMY M, BRAINARD J A, *et al.* Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology[J]. J Urol, 2003, 169: 2101—2105.
- [3] SAROSDY M F, KAHN P R, ZIFFER M D, *et al.* Use of a multitarget fluorescence in situ hybridization assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria[J]. J Urol, 2006, 176: 44—47.
- [4] EBLE J N, SAUTER G, EPSTEIN J I. Tumours of the urinary system[M]//. EBLE J N, SAUTER G, EPSTEIN J I. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. 3rd ed. Lyon: IARC Press, 2004: 93—113.
- [5] SOKOLOVA I A, HALLING K C, JENKINS R B, *et al.* The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine[J]. J Mol Diagn, 2000, 2: 116—123.
- [6] FERLAY J, AUTIER P, BONIOL M, *et al.* Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006[J]. Ann Oncol, 2007, 18: 581—592.
- [7] ONISHI T, ICHIKAWA T, IGARASHI T. Study on the diagnosis of urothelial cancer using multi-colour fluorescence in situ hybridization (FISH)—comparative analysis between FISH and cytology[J]. Hinyokika Kyo, 2008, 54: 253—256.
- [8] AKKAD T, BRUNNER A, PALLWEIN L, *et al.* Fluorescence in situ hybridization for detecting upper urinary tract tumors—a preliminary report[J]. Urology, 2007, 70: 753—757.
- [9] LI L Y, YANG M, ZHANG H B, *et al.* Urinary fibronectin as a predictor of a residual tumour load after transurethral resection of bladder transitional cell carcinoma[J]. BJU Int, 2008, 102: 566—571.
- [10] FRIEDRICH M G, TOMA M I, HELLSTERN A, *et al.* Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer[J]. BJU Int, 2003, 92: 911—914.
- [11] SOKOLOVA I A, HALLING K C, JENKINS R B, *et al.* The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine[J]. J Mol Diagn, 2000, 2: 116—123.
- [12] LOTAN Y, ROEHRBORN C G. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses[J]. Urology, 2003, 61: 109—118; discussion 118.
- [13] BOLLMANN M, HELLER H, BÁNKFALVI A, *et al.* Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer[J]? BJU Int, 2005, 95: 1219—1225.
- [14] LJIĆ M, STOJADINOVIĆ M, MILOSAVLJEVIĆ Z. Familial aggregation of bladder cancer[J]. Vojnosanit Pregl, 2011, 68: 447—451.

(收稿日期: 2011-12-15)

欢迎订阅 2013 年《临床泌尿外科杂志》

(邮发代号 38—124)

《临床泌尿外科杂志》(邮发代号 38—124)是中华人民共和国教育部主管,华中科技大学附属协和医院和同济医院联合主办的泌尿外科学专业学术期刊。主要刊登泌尿外科学及男科学的相关科技论文,辟有专家论坛、临床研究、实验研究、流行病学调查、综述、研究报告、病例报告、国外医学新进展等栏目。现为 16 开本,80 页,封面为 157 g 铜版纸四彩封塑,内芯为 105 g 铜版纸精印。每期订价 13.00 元,半年价 78.00 元,全年价 156.00 元。

订阅《临床泌尿外科杂志》可以在第一时间掌握国内泌尿外科学的最新研究动态,了解最新专业信息。欢迎全国泌尿外科医生及相关人员订阅!

《临床泌尿外科杂志》编辑部