

荧光原位杂交技术在膀胱尿路上皮癌的诊断和复发中的应用

刘亚东¹ 顾沈阳¹ 王业华¹ 吴蔚¹

[摘要] 目的:探讨荧光原位杂交技术(fluorescent in situ hybridization, FISH)在膀胱尿路上皮肿瘤的诊断和术后复发中的应用。方法:选取 2008 年 8 月~2011 年 12 月 67 例膀胱肿瘤患者,包括 10 例非尿路上皮癌患者和 57 例膀胱尿路上皮癌患者,留取受检者的晨尿,做 FISH 检测。结果:FISH 检测初发膀胱肿瘤患者的敏感性是 81.3%,FISH 检测复发膀胱肿瘤的敏感性是 88.9%,FISH 检测初发膀胱肿瘤和复发膀胱肿瘤的敏感性差异无统计学意义。随着肿瘤分级的增高,FISH 检测的总敏感性逐渐增高(G_1 79.2%、 G_2 81.0%、 G_3 91.7%),但中低级肿瘤与高级别肿瘤的敏感性差异无统计学意义($\chi^2 = 0.267, P = 0.605 > 0.05$)。FISH 在检测肿瘤个数为 1 个、2~7 个、 >7 个时的总敏感性分别是 80.9%、88.9%、100%。FISH 在检测肿瘤直径 <3 cm、 ≥ 3 cm 时总的敏感性分别是 80.0%、91.7%。结论:FISH 在检测初发和复发膀胱肿瘤的敏感性均较高,所以 FISH 技术作为诊断和检测肿瘤复发的手段,能明显提高检测肿瘤的效率。

[关键词] 膀胱肿瘤;荧光原位杂交技术(FISH);肿瘤复发;敏感性

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2012)10-0770-04

Application of fluorescent in situ hybridization in the diagnosis and recurrence of bladder cancer

LIU Yadong GU Shenyang WANG Yehua WU Wei

(Department of Urology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou, Jiangsu, 225001, China)

Corresponding author: GU Shenyang, E-mail: billups0123@163.com

Abstract Objective: To explore the application of fluorescent in situ hybridization(FISH) in the diagnosis and recurrence of urothelial tumor of bladder. **Method:** From August 2008 to December 2011, 67 volunteers with informed consent were divided into three groups. In these groups, 10 non-urothelial tumor of bladder individuals as control, 48 patients were proven as urothelial tumor of bladder by pathological, and 9 patients were proven as recurrence of bladder tumor by pathological. Urine were collected and tested by FISH. **Result:** The sensitivity of FISH was 81.3% in initial bladder cancer and that of the recurrence bladder cancer was 88.9%, while The sensitivity of FISH in different grades(G_1 , G_2 , G_3) was 79.2%, 81.0%, 91.7%. Overall sensitivity of bladder carcinoma between G_1 , G_2 and G_3 hasn't significant difference. The sensitivity of FISH in detecting the different number of tumors(1, 2~7, >7) was 80.9%, 88.9%, 100.0%. The sensitivity of FISH in detecting different diameters(<3 cm, ≥ 3 cm) was 80.0%, 91.7%. **Conclusion:** FISH as a newly non-invasive technique has a high sensitivity in initial and recurrence bladder cancer. FISH may play an important role in improving the rate of bladder cancer.

Key words bladder tumor; fluorescent in situ hybridization(FISH); tumor recurrence; sensitivity

膀胱肿瘤是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,且复发率较高。约 70% 的非肌层浸润性膀胱癌患者在初次治疗后复发,另外约 10%~30% 的患者会发展成肌层浸润性膀胱癌^[1~3]。目前对膀胱癌的诊断和复发的检测主要依靠膀胱镜和尿细胞学检查,而膀胱镜和尿细胞学联合检查的敏感性和特异性分别是 78% 和 83%^[4],膀胱镜为有创检查,在随访中反复使用患者难以接受,而且容易造成尿道狭窄;而单独使用细胞学检查敏感性太低。FISH 作为快速敏感的一种检测方法,它主要是利用标记荧光的探针,与目标染色体或基因片段结合,再通过

荧光显微镜观察来确定细胞内染色体结构和数目的异常。我们的研究是利用 FISH 检测初发与复发的膀胱肿瘤,研究 FISH 诊断的敏感性,以及在不同分期分级以及不同肿瘤个数和肿瘤大小情况下 FISH 结果的变化。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2008 年 8 月~2011 年 12 月,选取我院收治初发膀胱肿瘤患者 48 例,男 35 例,女 13 例,年龄 45~81 岁,平均 69.2 岁;复发肿瘤患者 9 例,男 7 例,女 2 例,年龄 51~72 岁,平均 65.4 岁。对照组为 10 例非尿路上皮癌患者,男 7 例,女 3 例,年龄 42~75 岁,平均 62.4 岁。术后病理证实:初发肿

¹ 苏北人民医院泌尿外科(江苏扬州,225001)

通信作者:顾沈阳, E-mail: billups0123@163.com

瘤组 T_a 5 例, T_1 12 例, T_2 15 例, T_3 11 例, T_4 5 例; 复发肿瘤组 T_a 2 例, T_1 3 例, T_2 4 例。初发肿瘤组 G_1 17 例, G_2 21 例, G_3 10 例; 复发肿瘤组 G_1 7 例, G_3 2 例。初发肿瘤组肿瘤个数 1 个 41 例, 2~7 个 6 例, >7 个 1 例; 复发肿瘤组 1 个 6 例, 2~7 个 3 例; 初发组肿瘤直径 <3 cm 38 例, >3 cm 10 例; 复发组肿瘤直径 <3 cm 7 例, >3 cm 2 例(表 1)。

表 1 膀胱肿瘤患者基本资料

指标	患者例数		合计
	初发	复发	
肿瘤分期			
T_a	5	2	7
T_1	12	3	15
T_2	15	4	19
T_3	11	0	11
T_4	5	0	5
肿瘤分级			
G_1	17	7	24
G_2	21	0	21
G_3	10	2	12
肿瘤个数			
1	41	6	47
2~7	6	3	9
>7	1	0	1
肿瘤直径			
<3 cm	38	7	45
>3 cm	10	2	12

1.2 检测方法

FISH 的检测步骤: 取晨尿 200~400 ml, 分装入 50 ml 离心管中, 以 2 000 r/min 速度离心 10 min。弃上清, 加 5 ml 胶原酶 B, 用力吹打悬浊细胞, 然后 37℃ 水浴 20 min, 期间吹打 2~3 次。以 1 200 r/min 速度离心 10 min, 弃上清, 加入 5 ml 37℃ 预热的 0.075 mmol/L 的 KCL 低渗液, 轻轻吹打悬浮细胞后, 37℃ 水浴 30 min, 期间吹打一次。低渗后, 加入 2 ml 固定液(甲醇: 冰醋酸=3: 1), 吹打均匀, 预固定 10 min。1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加 5 ml 固定液于试管中, 吹打均匀后, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 此为一次固定, 重复两次。

探针杂交: 取适量悬浊液滴于干燥玻片上, 自然晾干后, 观察细胞密度, 以 10 倍镜下每视野 30~50 个为宜。将玻片放入, 37℃ 40 μ l 20 g/L 胃蛋白酶工作液消化 10 min。室温下将玻片依次放入, 70% 乙醇、85% 乙醇、100% 乙醇中脱水, 各 2 min。取出玻片, 自然晾干。将 10 μ l 探针混合物加入玻片杂交区域, 加盖玻片, 用封片胶封闭边缘, 80℃ 6 min 共变性, 42℃ 过夜杂交。

观察结果: 将玻片置于 0.4 $\times$ SSC, 70℃ 2 min; 2 $\times$ SSC, 37℃ 2 min。70% 乙醇, 3 min, 干透后备用。将 10 μ l DAPI 复染液滴加入杂交区域, 立即加盖盖玻片。暗处放置 10 min, 在荧光显微镜下观察。

1.3 结果判读

建立阈值: 取 10 例非尿路上皮癌患者的尿液, 每一个探针组合观察 100 个细胞。统计不同染色体异常情况细胞数目的百分比。阈值 = 平均值(M) + 3 $\times$ 标准差(SD), 见表 2。正常人细胞中可见 2 红色(2 个 9P16 基因片段或 2 个 3 号染色体)和 2 绿(2 个 7 号染色体或者 2 个 17 号染色体)。当细胞中 3 号染色体出现大于 2 红或 7、17 号染色体出现大于 2 绿或 9 号染色体少于 2 红时, 即判断该细胞阳性。

表 2 10 例非尿路上皮癌人群 FISH 阈值

探针	阈值	细胞数
3	5.6%	100
7	5.3%	100
17	6.2%	100
9	8.5%	100

注: 大于阈值判读为该探针结果阳性, 小于阈值者读为阴性, 等于阈值则按形态学判读标准(北京金普嘉科技公司形态学判读标准)

FISH 结果阳性: 两组或两组以上探针阳性即判读为 FISH 阳性; 9P16 基因缺失阳性, 也判读为 FISH 阳性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 对样本进行 χ^2 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

我们对 67 例患者进行 FISH 试验, 其中包括 10 例排除尿路上皮癌的患者(建立阈值)、48 例初发膀胱肿瘤患者和 9 例复发膀胱肿瘤患者。检测结果得出初发肿瘤患者的总敏感性是 81.3%, 复发肿瘤患者的总敏感性是 88.9%, 两者的敏感性差异无统计学意义($\chi^2 = 0.06$, $P > 0.05$)。按肿瘤的分期不同, 初发肿瘤 T_a 、 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 期的敏感性分别是 60.0%、87.5%、93.3%、90.9%、40.0%; 复发肿瘤中 T_a 、 T_1 、 T_2 期的敏感性分别是 50%、100%、100%(表 3)。按肿瘤的分级不同, 初发肿瘤的敏感性 G_1 、 G_2 、 G_3 分别是 76.5%、81.0%、90.0%; 复发肿瘤的敏感性 G_1 、 G_3 分别是 85.7%、100%, 总体上 FISH 检测中低级别肿瘤(G_1 、 G_2)和高级别肿瘤(G_3)的敏感性差异无统计学意义($\chi^2 = 0.267$, $P = 0.605 > 0.05$)(表 4)。按照肿瘤数目的不同, 初发肿瘤为 1 个、2~7 个、大

于 7 个时, FISH 的敏感性是 80.5%、87.5%、100%; 而 FISH 对于复发肿瘤为 1 个、2~7 个检测的敏感性是 87.5%、100%; 总体来说, 肿瘤个数 1 个和大于 1 个的敏感性差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.054, P = 0.816 > 0.05$) (表 5)。根据肿瘤最大直径的不同, 初发肿瘤中 < 3 cm、 ≥ 3 cm 两组的敏感性分别是 78.9%、90.0%, 而对于复发肿瘤分别是 85.7%、100%; 总体来说, 肿瘤直径 < 3 cm、 ≥ 3 cm 两组的敏感性差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.267, P = 0.605 > 0.05$) (表 5)。FISH 图片介绍见图 1①~③。

表 3 不同分期初发和复发膀胱肿瘤患者的敏感性 例(%)

UICC 分期	例数	初发	例数	复发	χ^2 值
T _a	5	3(60.0)	2	1(50)	
T ₁	12	10(87.5)	3	3(100)	
T ₂	15	14(93.3)	4	4(100)	
T ₃	11	10(90.9)	0	0	
T ₄	5	2(40.0)	0	0	
合计	48	39(81.3)	9	8(88.9)	0.006

表 4 不同分级初发和复发膀胱肿瘤患者的敏感性 例(%)

WHO 分级	例数	初发	例数	复发	总敏感性
G ₁	17	13(76.5)	7	6(85.7)	19(79.2)
G ₂	21	17(81.0)	0	0	17(81.0)
G ₃	10	9(90.0)	2	2(100)	11(91.7)
合计	48		9		

表 5 FISH 在检测不同肿瘤个数和最大肿瘤直径的敏感性 例(%)

肿瘤个数	例数	初发	例数	复发	总敏感性
1 个	41	33(80.5)	6	5(87.5)	38(80.9)
2~7 个	6	5(87.5)	3	3(100)	8(88.9)
>7 个	1	1(100)	0	0	1(100)
合计	48		9		
<3 cm	38	30(78.9)	7	6(85.7)	36(80.0)
≥ 3 cm	10	9(90.0)	2	2(100)	11(91.7)
合计	48		9		

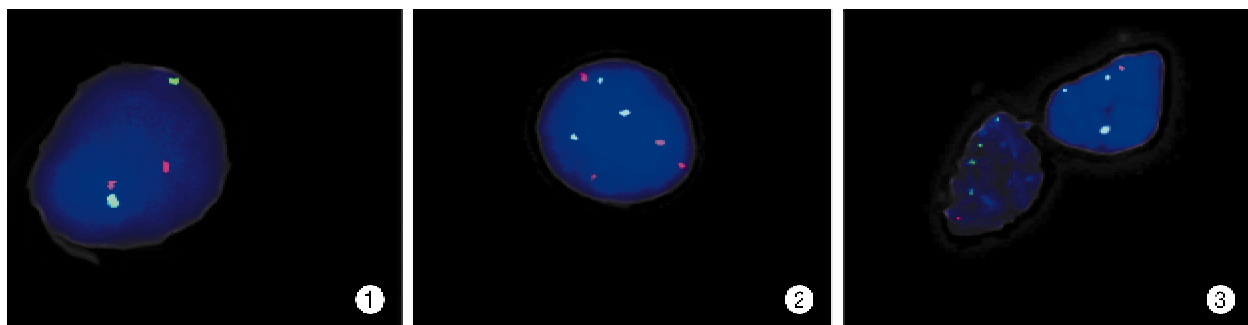
3 讨论

我们的研究表明 FISH 在检测膀胱肿瘤初发和复发时的敏感性分别是 81.3%、88.9%, 两者差异无统计学意义。本试验将膀胱肿瘤的个数和肿瘤的最大直径作为参考指标纳入实验, 主要考虑肿瘤的多少和直径的大小均增加了肿瘤的表面积, 可能会增加肿瘤细胞脱落的可能, 增加了肿瘤脱落细胞数, 从而提高了检测的敏感性和准确率。目前研究的最大限制是病例数较少, 且所有患者术后的病理都显示为膀胱肿瘤, 这会导致患者的选择性偏倚。而且本实验未包括原位癌的患者, 所以对

FISH 检测膀胱肿瘤患者的敏感性有影响。

我们对 57 例膀胱肿瘤的患者进行了 60 次 FISH 实验, 其中有 3 例患者进行了 2 次 FISH 检测, 原因是样本中脱落细胞数太少或者是杂质较多。对于初发肿瘤, FISH 检测的敏感性随着分级的增高, 敏感性逐渐增高, G₁、G₂、G₃ 期的敏感性分别是 76.5%、81.0%、90.0%, 而对于复发的肿瘤 G₁、G₃ 期的敏感性分别是 85.7%、100%; 中低级别肿瘤(G₁、G₂)与高级别肿瘤(G₃)的敏感性无统计学差异 ($\chi^2 = 0.267, P = 0.605 > 0.05$)。对于初发肿瘤 FISH 检测的敏感性随着分期的不同而有差别, T_a、T₁、T₂、T₃、T₄ 分别是 60.0%、87.5%、93.3%、90.9%、40.0%; 而对于复发的肿瘤 T_a、T₁、T₂ 期的敏感性分别是 50%、100%、100%。对于初次诊断为膀胱肿瘤患者, FISH 检测的敏感性随着肿瘤个数的增加, 1 个、2~7 个、>7 个的敏感性分别是 80.5%、87.5%、100.0%; 而对于复发肿瘤来说, 1 个、2~7 个两组敏感性分别是 87.5%、100%; 肿瘤个数 1 个和大于 1 个的敏感性差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.054, P = 0.816 > 0.05$)。FISH 检测膀胱肿瘤初发患者, 当肿瘤 < 3 cm 时的敏感性 78.9%, 当肿瘤 ≥ 3 cm 的敏感性 90.0%; 而对于复发肿瘤来说, 肿瘤 < 3 cm 的敏感性是 85.7%, ≥ 3 cm 时敏感性为 100%; 肿瘤直径 < 3 cm、 ≥ 3 cm 两组的敏感性差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.267, P = 0.605 > 0.05$)。ONISHI 等^[5]做了 FISH 和尿细胞学诊断膀胱肿瘤的研究得出, FISH 的敏感性、特异性、准确率分别是 81.2%、72.3%、74.1%; 而对于尿细胞学检查则分别是 37.5%、98.5%、86.4%。FISH 在对低中级别膀胱肿瘤诊断的敏感性明显高于尿细胞学检查。ELIJAH 等^[6]对 178 例怀疑或者已知的膀胱肿瘤患者, 其中初发诊断的患者 43 例, 复发患者 58 例, 缓解期患者 77 例, 分别进行尿细胞学检查、NMP22、FISH 检测; 对初发肿瘤患者的敏感性分别是 28%、88%、80%, 对复发肿瘤的敏感性分别是 33%、57%、85%; 而对于肿瘤的特异性分别是 95%、67%、48%。MAFFEZZINI 等^[7]对 133 例浅表性膀胱肿瘤患者进行随访, 比较 FISH 和尿细胞学、膀胱镜的预测价值。在随访的 36 个月中, 58 例患者复发, FISH 检测出 42 例(72.6%), 尿细胞学检出 27 例(46.6%), 两者存在统计学差异。

FISH 不能仅仅作为一种诊断膀胱肿瘤的方法, 应当把 FISH 的检测结果同膀胱肿瘤的治疗方案结合, 与肿瘤术后化疗药物的选择结合, 根据不同的 FISH 结果选择不同的化疗药物, 还可以研究肿瘤的化疗方案与肿瘤复发时间及 FISH 检测结果的关系。有报道称 FISH 在低级别膀胱肿瘤随



①正常尿脱落细胞 FISH 图片,2 红/2 绿($\times 1\,000$);②为 3、7 号染色体扩增的尿路上皮癌 FISH 图片,多红/多绿($\times 1\,000$);③为 P16 单缺、17 号染色体扩增的尿路上皮癌 FISH 图片,1 红/多绿($\times 1\,000$)

图 1 FISH 图片介绍

访中的应用可以明显减少膀胱镜的使用,现在的研究还没有建立 FISH 监测与肿瘤随访的关系。对于高级别肿瘤,在随访过程中可以根据 FISH 的结果调整随访的方案,如对于 FISH 阴性的患者,医生可以适当延长随访时间间隔,而对于阳性患者则应密切随访。

FISH 作为一种诊断膀胱肿瘤的方法具有敏感性好,能提前预测肿瘤发生的特点。在今后膀胱肿瘤的诊断和随访中的应用有巨大的前景。

参考文献

- [1] CLARK P E. Bladder cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2007,19:241-247.
- [2] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2007[J]. CA Cancer J Clin, 2007,57:43-66.
- [3] PAREKH D J, BOCHNER B H, DALBAGNI G. Superficial and muscle-invasive bladder cancer: principles of management for outcomes assessments[J]. J Clin Oncol, 2006,24:5519-5527.
- [4] FRITSCH H M, BURGER M, DIETMAIER W, et

al. Multicolor FISH(UroVysion) facilitates follow-up of patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder[J]. Am J Clin Pathol, 2010,134:597-603.

- [5] 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 Kiyo, 2008,54:253-256.
- [6] KEHINDE E O, AL-MULLA F, KAPILA K, et al. Comparison of the sensitivity and specificity of urine cytology, urinary nuclear matrix protein-22 and multi-target fluorescence in situ hybridization assay in the detection of bladder cancer[J]. Scand J Urol Nephrol, 2011,45:113-121.
- [7] MAFFEZZINI M, CAPPONI G, CASAZZA S, et al. The UroVysion F. I. S. H. test compared to standard cytology for surveillance of non-muscle invasive bladder cancer[J]. Arch Ital Urol Androl, 2008,80:127-131.

(收稿日期:2012-05-11)

(上接第 769 页)

- [7] MCLSAAC W J, MAZZULLI T, PERMAUL J, et al. Community-acquired antibiotic resistance in urinary isolates from adult women in Canada[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2006,17:337-340.
- [8] SMITH S P, MANGES A R, RILEY L W. Temporal changes in the prevalence of community-acquired antimicrobial-resistant urinary tract infection affected by Escherichia coli clonal group composition[J]. Clin Infect Dis, 2008,46:689-695.
- [9] MANGES A R, PERDREAU-REMINGTON F, SOL-

BERG O, et al. Multidrug-resistant Escherichia coli clonal groups causing community-acquired bloodstream infections[J]. J Infect, 2006,53:25-29.

- [10] COSTELLOE C, METCALFE C, LOVERING A, et al. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis [J]. BMJ, 2010, 340:c2096.

(收稿日期:2012-02-20)