论著

文章编号:1000-5404(2009)10-0948-04

荧光原位杂交检测尿脱落细胞染色体异常诊断膀胱肿瘤的研究

王 鹏,靳风烁,叶 锦,吴 刚,李彦锋,张 尧,梁 平 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨通过荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization,FISH)检测3、7、9、17号染色体数目畸变诊断国人膀胱尿路上皮癌的可行性和有效性。**方法** 采用3、7、17号染色体着丝粒探针和9p21区带探针对140例患者尿液脱落细胞核行荧光原位杂交,并同时行经腹部超声和尿脱落细胞学检查,以膀胱镜病理检查确诊,比较分析各种方法的敏感性和特异性。**结果** ①肿瘤组80例膀胱尿路上皮癌全部经病理检查确诊,其中68例FISH结果阳性,26例尿脱落细胞学阳性,71例经腹部超声诊断为膀胱癌。②非肿瘤对照组30例,其中29例FISH结果阴性,1例假阳性;尿脱落细胞学检查全部阴性;经腹超声检查23例阴性,7例假阳性。FISH、尿脱落细胞学、经腹部超声的灵敏度分别为85.00%、32.50%、88.75%,特异度分别为96.67%、100.00%、76.67%。**结论** 使用FISH技术检测尿脱落细胞3、7、9、17号染色体数目畸变具有敏感度高、特异性强的优点,并具无创性,对国人膀胱尿路上皮癌的诊断具有重要的临床应用价值。

关键词: 膀胱肿瘤;原位杂交;诊断

中图法分类号: R394.3;R730.43;R737.14 **文献标识码:** A

Chromosome aberration of urine exfoliated cells to diagnose bladder neoplasm by fluorescence *in situ* hybridization

WANG Peng, JIN Feng-shuo, YE Jin, WU Gang, LI Yan-feng, ZHANG Yao, LIANG Ping (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the possibility and validity of detecting numerical aberration of chromosomes 3, 7, 9 and 17 by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in order to diagnose urothelial carcinoma of bladder in Chinese. Methods A total of 140 volunteers were recruited as subjects, including 80 hematuria patients suffering from bladder urothelial carcinoma, 30 hematuria patients with benign bladder diseases, and 30 healthy individuals. Exfoliated cells from fresh urinary specimen was collected and examined by FISH using centromeric probes of chromosome 3, 7, 17 and region probe of 9p21. Cytology and transabdominal ultrasonography (US) was applied at the same time and all of the patients were definitely diagnosed by cystoscopy and biopsy. The sensitivity and specificity of each method in the diagnosis of bladder cancer were determined by comparative analysis. Results Among the 80 subjects in tumor group which were verified with pathology, 68 patients showed positive by FISH, 28 were positive by urine cytology, and 71 were positive by US. In non-tumor control group of 30 cases, 29 showed negative and 1 false-positive by FISH, all negative by urine cytology, 23 negative and 7 false-positive by US. The sensitivity and specificity of FISH, urine cytology and US on detecting bladder cancer were 85.00%, 32.50%, 88.75%, and 96.67%, 100.00%, 76.67%, respectively. Conclusion The sensitivity and specificity of FISH detecting 3,7,9,17 chromosome aberrations are high in the diagnosis of bladder cancer. It can be used as an effective method for assistance diagnosis of bladder cancer.

Key words: bladder neoplasm; *in situ* hybridization; diagnosis

膀胱癌是我国泌尿男性生殖系最常见的恶性肿瘤,其中尿路上皮癌占90%以上。目前,经腹部泌尿系超声检查、膀胱镜检查、尿脱落细胞学及尿液肿瘤标记物的检测是用于发现和监测膀胱癌普遍使用的4种手段。然而,尿脱落细胞学检测敏感性太低;而膀胱镜则为有创检查,患者痛苦,难以接受,对于肉眼见不到的肿瘤诊断也存在困难。经腹超声检查较尿脱落细胞

基金项目: 卫生部科研基金(WKJ2007-3-001)
Supported by the Foundation for Scientific Research of Ministry of Health of China (WKJ2007-3-001)

作者简介: 王 鹏,男,河南省驻马店市人,硕士研究生,医师,主要从事膀胱肿瘤疾病方面的研究。电话:(023)68757945,E-mail:Wodeyouxiang2006131@126.com

通信作者: 靳风烁,电话:(023)68757946,E-mail:jinfs5505@163.com

收稿日期: 2009-02-12;**修回日期:** 2009-03-16

学检查诊断敏感性高,但特异性差,且易受膀胱内血凝块、肿瘤大小及位置的影响从而导致假阳性或假阴性的诊断结果。尿液肿瘤标志物检测多用于膀胱肿瘤的筛查,易受血尿、尿路感染、膀胱灌注治疗的影响而出现假阳性结果,不能成为可靠的诊断指标。因此,人们一直在探索更为有效、简便、安全的诊断尿路上皮癌的方法。

近年来,随着对膀胱癌遗传学改变的深入研究,发现 9 号染色体部分(如 p16 位点)或全部丢失是最常见遗传学改变,且膀胱癌的发生、发展与 3、7 号及 17 号染色体的非整倍性密切相关。初步临床研究显示,对尿液中脱落细胞进行以上遗传学改变的检测对膀胱尿路上皮癌的诊断及预后评估具有很大意义[1,2]。我国学者有关膀胱癌遗传学研究表明,中国人与西方人膀胱癌的遗传学背景存在一定的差异[3],用荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization,FISH)技术检测 3、7、9、17 号染色体异常对中国人膀胱尿路上皮癌的诊断价值仍不明了。本研究采用 FISH 技术检测 140 例患者尿脱落细胞核 3、7、9、17 号染色体,并与经腹部超声、膀胱镜、尿脱落细胞形态学检测膀胱肿瘤方法比较,以探讨 FISH 技术在膀胱癌诊断中的应用价值。

1　资料与方法

1.1　受检者资料及分组

1.1.1　肿瘤组　　80 例膀胱尿路上皮癌血尿患者,其中男性 58 例,女性 22 例,年龄 26 ~ 83 岁。肿瘤的临床病理情况(膀胱肿瘤 2002 TNM 分期系统和 WHO 2004 分级法):T_a 17 例,T_1 29 例,T_2 21 例,T_3 8 例,T_4 5 例;G_1 35 例,$G_2$25 例,G_3 20 例。

1.1.2　正常对照组　　30 例正常人。其中男性 15 例,女性 15 例,年龄 20 ~ 60 岁。

1.1.3　非肿瘤对照组　　30 例同期治疗的血尿患者包括腺性膀胱炎患者 10 例,良性前列腺增生患者 10 例,慢性膀胱炎患者 10 例。其中男性 19 例,女性 11 例,年龄 29 ~ 81 岁。

标本来源:肿瘤组与非肿瘤对照组尿脱细胞标本来自于 2008 年 2 - 12 月本科和重庆医科大学附属第一医院泌尿外科血尿患者。正常对照组尿脱落细胞标本来自于本校正常志愿者。3 组在性别年龄方面无统计学差异($P > 0.05$)。

1.2　诊断方法

所有受检者均行经腹部泌尿系超声检查、尿脱落细胞学和 FISH 检测,肿瘤组及非肿瘤对照组以膀胱镜病理检查确诊。每例患者于膀胱镜检查前或手术前连续 3 d 收集新鲜尿液,每次 300 ml 左右,将每例尿样分为 2 份,分别行尿液脱落细胞学常规检查和尿液脱落细胞 FISH 检测。肿瘤组及非肿瘤对照组经膀胱镜活检或手术治疗取得组织标本,并送病理科常规石蜡切片,由同一病理科医师判读切片结果。

1.3　实验方法

FISH 技术使用的 3、7、17 号染色体着丝粒探针和 9p21 区带探针购自北京金菩嘉医疗科技有限公司。3、17 号染色体着丝粒探针为绿色荧光信号,7 号染色体着丝粒探针和杂交到 9 号染色体长臂(9p21)的 P16 探针为桔红色荧光信号。收集受检者新鲜尿液后分为 2 份,1 份按照试剂盒说明书方法进行 FISH 实验操作,另 1 份离心涂片,HE 染色寻找肿瘤细胞[4]。

1.4　判断标准及结果分析

荧光显微镜下观察,通过 FISH 点计数分析 2.0 软件控制的冷电荷耦合设备(CCD)相机摄取图像,每组探针分析 100 ~ 200 个细胞。结果判断的标准:判定单体的标准为单个信号的核比例 > 15%;3 倍体及多倍体的标准为 3 个及多个信号的核 > 10% 细胞总数。组合探针阳性判定标准参照 UroVysion 推荐标准[5]:至少在 4 个细胞中同时存在 3、7、17 号中的 2 个染色体的扩增,或至少在 12 个细胞中存在 9p21 纯合性缺失。尿脱落细胞学以发现肿瘤细胞为阳性,其余为阴性。根据诊断实验配对四格表和计算公式[6],灵敏度 = 真阳性/(真阳性 + 假阴性),特异度 = 真阴性/(假阳性 + 真阴性)。

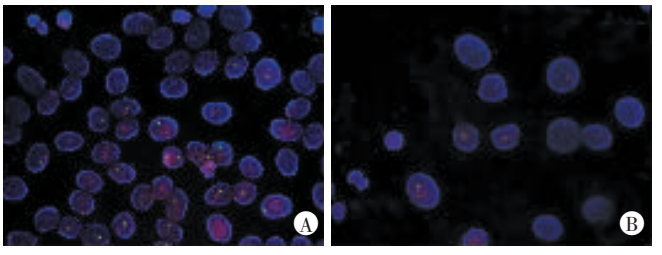
1.5　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件行 χ^2 检验。

2　结果

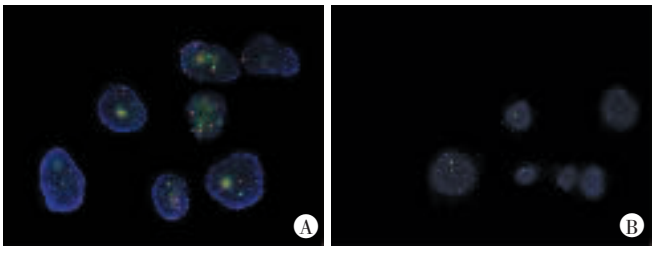
2.1　FISH 及尿脱落细胞学检测检查结果

在正常人和非尿路上皮癌患者中,FISH 结果显示各探针表现为 2 红、2 绿 2 个杂交信号(图 1)。在尿路上皮癌患者中,FISH 结果可见不同程度的染色体数目异常(图 2)。30 例正常人 FISH 及尿脱落细胞学检测结果均为阴性。



A:3/7 探针均表现为 2 绿/2 红 2 个杂交信号点;B:P16/17 探针均表现为 2 红/2 绿 2 个杂交信号点

图 1　正常尿路上皮细胞 FISH 结果　(DAPI × 100)



A:3/7 探针可见多个杂交信号点;B:P16/17 探针见红色信号点缺失,为单个和多个绿色信号点

图 2　尿路上皮癌细胞 FISH 结果　(DAPI × 100)

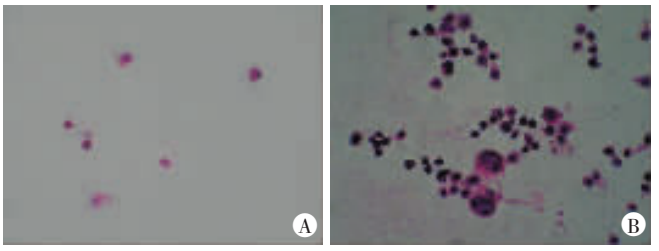
2.2　尿脱落细胞学及膀胱组织病理检查结果

正常人尿脱落细胞形态规则,核浆比例正常(图 3A)。膀胱尿路上皮癌患者尿脱落细胞形态不规则,核浆比例失调,可见病理性核分裂象(图 3B)。正常膀胱组织病理切片可见细胞极象排列正常,形态规则(图 4A)。尿路上皮癌组织病理切片可见细胞形态异常,极象紊乱,乳头细胞层超过 6 层,核浆比例失调,可见病理性核分裂象(图 4B)。

表1 肿瘤组与对照组诊断结果的对比(例)

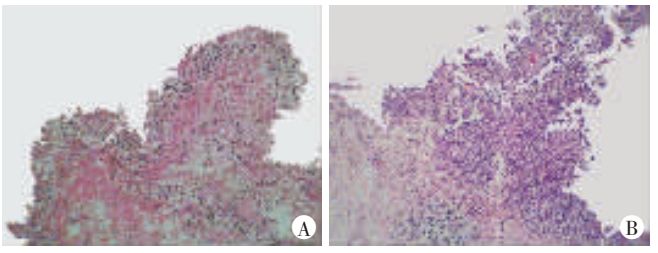
组别	n	腹部超声检查		灵敏度(%)	特异度(%)	尿脱落细胞学		灵敏度(%)	特异度(%)	FISH		灵敏度(%)	特异度(%)	膀胱镜病检		灵敏度(%)	特异度(%)
		阳性	阴性			阳性	阴性			阳性	阴性			阳性	阴性		
肿瘤组	80	71	9	88.75		26	54	32.50[a]		68	12	85.00		80	0	100.00[a]	100.00
非肿瘤组照组	30	7	23		76.67[a]	0	30		100.00	1	29		96.67	0	30		100.00
正常对照组	30	0	30			0	30			0	30			0	30		

a: $P<0.05$,与 FISH 比较



A:正常人;B:膀胱尿路上皮癌患者

图3 尿脱落细胞病理学观察 (HE×40)



A:正常膀胱组织;B:膀胱尿路上皮癌组织(高级别尿路上皮癌,T_2G_3)

图4 膀胱组织病理学观察 (HE×20)

2.3 FISH 与经腹部超声检查、尿脱落细胞学、膀胱镜检查的灵敏度、特异度比较

FISH 诊断膀胱尿路上皮癌的灵敏度与经腹部超声检查相似($\chi^2=0.493$, $P=0.482$),低于膀胱镜检查($\chi^2=12.973$, $P=0.000$),显著优于尿脱落细胞学($\chi^2=45.493$, $P=0.000$);特异性接近尿脱落细胞学($\chi^2=1.017$, $P=0.313$)和膀胱镜检查($\chi^2=1.017$, $P=0.313$),优于经腹部超声检查($\chi^2=5.192$, $P=0.023$)(表1)。

2.4 各分期、分级肿瘤的 FISH 检测结果

使用 FISH 技术诊断膀胱尿路上皮癌,T_a、T_1、T_2、T_3、T_4 的检出例数分别为 11(11/17)、25(25/29)、20(20/21)、7(7/8)、5(5/5)例,T_a 与 T_1~T_4 相比敏感性较低。在各个级别的膀胱肿瘤中,FISH 的敏感性均高于尿脱落细胞学(表2),在 G1 级肿瘤中的敏感性也能达到 71.43%。

表2 膀胱肿瘤级别与诊断敏感性比较 [$n=80$,例数(%)]

级别	n	FISH	尿脱落细胞学
G_1	35	25(71.43)	7(20.00)[a]
G_2	25	24(96.00)[b]	10(40.00)[a]
G_3	20	19(95.00)[b]	9(45.00)[a]

a: $P<0.05$,与 FISH 比较; b: $P<0.05$,与 G_1 比较

3 讨论

FISH 技术是分子细胞遗传学最常使用的研究手段之一,其主要用于染色体数目和结构畸变的研究。FISH 技术的发展使得细胞遗传学与分子遗传学紧密地结合在一起,既可显示中期染色体,也可以显示间期核中的染色体数目和结构上的异常,而染色体分析已被认为是许多恶性肿瘤的诊断和预后指标之一。在本研究中,FISH 技术采用荧光标记的核酸探针检测 3、7、17、9p21 号染色体,以确定有无与膀胱癌相关的非整倍体来诊断膀胱尿路上皮癌。国外研究报道膀胱尿路上皮癌患者 9p21 的纯合性缺失率高达 83.00%[7],研究表明 9p21 含有重要的抑癌基因 p16,与细胞周期调控有关,不论是纯合性缺失还是单体,都意味着遗传物质的缺失,这可能对肿瘤的发生、发展起重要作用,所以认为 9p21 缺失是尿路上皮癌早期最常见的改变之一,其有可能作为早期诊断和监测复发的重要分子标志。Veeramachaneni 等[8]报道 3 号染色体多倍体高达 76.00%,定位于 3p25 的 RAFI 基因过表达与膀胱尿路上皮癌的病理分级相关[9]。7 号染色体多倍体发生率大约为 76.20%[7]。Sauter 等[10]认为 7 号染色体多倍体与病理分期、分级显著相关,7 号染色体畸变可能在膀胱尿路上皮癌发生、发展中起重要作用。Gallucci 等[11]研究表明,17 号染色体畸变率为 74.00%,17 号染色体的异倍体与分期、分级显著相关,认为 17 号染色体的异倍体是膀胱尿路上皮癌进展和侵袭的标志。

目前,膀胱镜活检组织病理检查为诊断膀胱癌的金标准,尿脱落细胞学、经腹部超声检查、尿核基质蛋白 22(NMP22)、膀胱肿瘤抗原(BTA)及 ImmunoCyt 等肿瘤标记物是发现和检测膀胱癌的常用方法。但膀胱镜为有创检查,严重时可导致出血、膀胱穿孔等并发症,患者常不愿接受,对于处于泌尿系统急性感染期、尿道狭窄、膀胱容量过小、出血性疾病、女性月经期及不能接受膀胱截石体位的患者无法行膀胱镜检查。膀胱镜的视野也有一定的盲区,如膀胱颈部,尤其是近 12 点处,因而用于筛查膀胱癌患者受到很大限制。尿脱落细胞学检查方便、简单、无创、特异性高,但灵敏度太低,文献[12]报道阳性率为 20%~30%。在本研究中,尽管我们对细胞学检查给予了足够的重视,其阳性率也只有 32.50%,这些结果都提示仅依赖细胞学检

查会造成大量患者漏诊。另外,尿标本中细胞不典型或退行性变、泌尿系感染、结石以及膀胱灌注治疗等也可导致尿脱落细胞学诊断困难。经腹部泌尿系超声检查经济、简单、无创、灵敏度较高,可重复性强,已成为膀胱癌的常规检查方法,但其特异性较低,且对于非隆起性病灶及直径小于 0.5 cm 的肿瘤,难以发现,位于膀胱顶部及前壁的肿瘤因易受肠腔气体等因素的影响更加容易遗漏,位于膀胱颈部的肿瘤也不易与前列腺增生和前列腺癌相鉴别,而对于腺性膀胱炎更易误诊为膀胱癌。另外患者如果无法保持膀胱充盈状态,则不能行经腹部超声检查[13]。本研究被经腹部超声检查误诊为膀胱肿瘤的 7 例患者中有 4 例腺性膀胱炎,2 例慢性膀胱炎伴膀胱内陈旧性血凝块,1 例良性前列腺增生,而所有腺性膀胱炎和慢性膀胱炎的患者 FISH 结果均为阴性。相对于膀胱镜检查,FISH 具有无创性、无禁忌证、无并发症的优点,患者易于接受;相对于尿脱落细胞学,FISH 具有敏感度高,不受泌尿系感染、细胞退行性变、泌尿系结石及主观因素影响的优点,并可与形态学相结合;相对于经腹部超声检查,FISH 特异性强,且不受膀胱充盈程度、膀胱内血凝块及肿瘤大小、位置的影响;相对于尿核基质蛋白 22、膀胱肿瘤抗原及 ImmunoCyt 等肿瘤标记物,FISH 具有特异性强且不受血尿、尿路感染影响的优点,因此具有明显的优越性。FISH 还有一个特点是不会受卡介苗(bacillus Calmette-Guerin, BCG)的干扰。Sarosdy 等[14]使用 BCG 治疗膀胱肿瘤 3 个月或更长时间行 FISH 检查,其结果不受影响,而尿脱落细胞学和 BTA 则有影响。

从本研究中可以看出,随着肿瘤级别的增高,FISH 的灵敏度也随之升高,FISH 对 G_3 的灵敏度高于 G_1($\chi^2=4.420$, $P=0.036$),对 G_2 的灵敏度也高于 G_1($\chi^2=5.881$, $P=0.015$),但 G_3 与 G_2 比较无显著性差异($\chi^2=0.026$, $P=0.872$),可能是由于随着肿瘤级别升高,肿瘤细胞内染色体畸变率增高,肿瘤细胞容易脱落的缘故。张业贵等[5]采用 FISH 技术对 57 例膀胱尿路上皮癌进行研究,也发现随着肿瘤级别升高,阳性率增高,因使用标本为手术中切除的新鲜膀胱尿路上皮癌组织的细胞,所以只能用于术后研究,不能用于术前诊断。本研究显示 T_a 与 $T_1 \sim T_4$ 相比敏感性较低,且有研究者用流式细胞仪分析 T_a 期膀胱肿瘤 90% 为 2 倍体,比较基因组研究结果显示高分化 T_a 较少有基因变异[15],这些可以解释 FISH 技术不能发现部分 T_a 期膀胱尿路上皮癌患者的原因。此外尿量不够、低肿瘤负荷、肿瘤细胞脱落较少也可能对敏感性有影响。

本研究证实,使用尿脱落细胞荧光原位杂交技术检测 3、7、9、17 号染色体数目畸变诊断国人膀胱尿路上皮癌具有敏感度高、特异性强的优点,并具无创性,尤其对早期尿路上皮癌患者有辅助诊断作用,对膀胱癌的诊断具有重要的临床应用价值。

参考文献:

[1] Daniely M, Rona R, Kaplan T, *et al*. Combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis of voided urine samples for the detection and follow-up of bladder cancer in patients with benign urine cytology[J]. Cancer, 2007,111(6): 517 - 524.

[2] Lotan Y, Bensalah K, Ruddell T, *et al*. Prospective evaluation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder[J]. J Urol, 2008,179(6): 2164 - 2169.

[3] Zhang J, Zheng S, Gao Y, *et al*. A partial allelotyping of urothelial carcinoma of bladder in the Chinese[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(3): 343 - 347.

[4] 由　然, 宋卫东, 丁　义, 等. 核基质蛋白 22 检测与尿脱落细胞学检查在膀胱癌诊断中的价值[J]. 中华泌尿外科杂志, 2003,24(11):751-752.

[5] 张业贵, 毕新刚, 韩亚玲, 等. 多色荧光原位杂交在膀胱尿路上皮癌诊断中的应用[J]. 癌症, 2007, 26(2): 189 - 193.

[6] 熊洪燕, 易　东. 医学科研方法——设计、测量与评价[M]. 重庆:西南师范大学出版社, 2005: 42 - 45.

[7] Kruger S, Mess F, Bohle A, *et al*. Numerical aberrations of chromosome 17 and the 9p21 locus are independent predictors of tumor recurrence in non-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder[J]. Int J Oncol, 2003, 23(1): 41 - 48.

[8] Veeramachaneni R, Nordberg M L, Shi R, *et al*. Evaluation of fluorescence in situ hybridization as an ancillary tool to urine cytology in diagnosing urothelial carcinoma[J]. Diagn Cytopathol, 2003, 28(6): 301 - 307.

[9] Mhawech-Fauceglia P, Fischer G, Beck A, *et al*. Raf1, Aurora-A/STK15 and E-cadherin biomarkers expression in patients with pTa/pT1 urothelial bladder carcinoma; a retrospective TMA study of 246 patients with long-term follow-up[J]. Eur J Surg Ongol, 2006, 32(4): 439 - 444.

[10] Sauter G, Haley J, Chew K, *et al*. Epidermal-growth-factor-receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer[J]. Int J cancer, 1994, 57(4):508 - 514.

[11] Gallucci M, Guadagni F, Marzano R, *et al*. Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters[J]. J Clin Pathol, 2005, 58(4): 367 - 371.

[12] Planz B, Jochims E, Deix T, *et al*. The role of urinary cytology for detection of bladder cancer [J]. Eur J Surg Oncol, 2005, 31(3): 304 - 308.

[13] 王　琼, 易珊林. 膀胱癌 50 例超声诊断及分期结果分析[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(27): 6733 - 6734.

[14] Sarosdy M F, Schellhammer P, Bokinsky G,*et al*. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer[J]. J Urol, 2002, 168(5): 1950 - 1954.

[15] Bittard H, Lamy B, Billery C, *et al*. Clinical evaluation of cell deoxyribonucleic acid content measured by flow cytometry in bladder cancer[J]. Urol,1996, 155 (6): 1887 - 1891.

(编辑　王　红)