文章编号:1000-5404(2011)12-1305-03

技术方法

荧光原位杂交技术在上尿路上皮癌早期监测中的应用

胡宝利[1],贾占奎[1],杨锦建[1],陈瑞廷[1],张 岚[2] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院:泌尿外科[1],病理科[2])

【摘要】 目的 探讨荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)在诊断和监测早期上尿路上皮癌中应用的可行性。**方法** 收取20例健康志愿者的新鲜晨尿,应用FISH检测尿液脱落细胞3、7、17号染色体着丝粒探针及9号染色体p16位点探针,建立健康人群的阈值。其后顺序留取20例初步诊断为上尿路上皮癌患者的新鲜晨尿,进行FISH检测和尿脱落细胞学检查,并进行泌尿系超声、多层螺旋CT检查(MMCT),将FISH结果和其他检查结果进行比较。留取20例术前诊断为肾癌患者的新鲜晨尿作为对照组,进行FISH检查和尿脱落细胞学检查,统计分析两者的特异性。**结果** 20例患者中术后病理诊断上尿路上皮癌18例,肾癌浸润肾盂1例,肾结石合并肾盂肾炎引起的肾盂上皮炎性增生1例。泌尿系超声、MMCT、尿脱落细胞学和FISH检查的敏感性分别为44.4%(8/18)、94.4%(17/18)、38.9%(7/18)、83.3%(15/18)。FISH诊断上尿路上皮癌的敏感性和MMCT相似($P>0.05$),高于泌尿系超声和尿脱落细胞学检查($P<0.05$)。20例对照组术后病理诊断均为肾透明细胞癌,FISH和尿脱落细胞学检查的特异性分别为95.0%和90.0%。**结论** FISH诊断上尿路上皮癌具有较高的敏感性和特异性,且可以发现早期的上尿路上皮癌,可用于上尿路上皮癌的诊断和早期监测。

【关键词】 原位杂交,荧光;尿道上皮;尿道肿瘤
【中图法分类号】 R730.43 **【文献标志码】** B

上尿路上皮癌临床少见,占所有尿路上皮癌的5%左右[1],诊断上尿路上皮癌的方法包括尿脱落细胞学、影像学和内窥镜检查,尿脱落细胞学有较高的特异性,但其敏感性较低,内窥镜检查虽然可以提高诊断的敏感性和特异性,但其对人体的创伤较大,给患者带来极大的痛苦和各种并发症,且对于较小的肿瘤和原位癌各种影像学检查和内窥镜检查均不能做出有效诊断[2-3]。近年来,荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)在宫颈癌、乳腺癌、血液肿瘤和膀胱癌的诊断方面应用较为广泛,实践证明FISH技术具有较高的灵敏度和特异度[4]。由于泌尿系上皮组织来源相同,本研究应用FISH技术检测上尿路上皮癌,并与其他检查相比,评价其诊断和检测早期上尿路上皮癌的应用价值。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 病例组 收集2009年1月至2010年10月在我院住院治疗的20例诊断为上尿路上皮癌患者的临床资料,男性12例,女性8例,平均年龄64.9(46~81)岁,诊断为肾盂癌13例(左侧8例,右侧5例),输尿管癌6例(左侧5例,右侧1例),左肾盂癌合并左输尿管癌1例,20例患者中18例均有不同程度的全程无痛肉眼血尿病史,2例患者有镜下血尿,6例患者出现腰部疼痛症状,3例患者可触及腰部包块,5例患者出现体质量下降,所有患者入院后行经腹部超声和多MMCT检查,必要时行内窥镜检查,排除泌尿系其他疾病,初步诊断为上尿路上皮癌。

【通信作者】 杨锦建,E-mail:yangjinjian2008@126.com

1.1.2 对照组 收集同期住院治疗的20例诊断为肾癌患者的临床资料,其中男性10例,女性10例,年龄28~68岁,平均42.5岁,其中左侧6例,右侧4例,因发现全程无痛肉眼血尿就诊者8例,体检发现肾占位者2例。

1.2 FISH检测方法

1.2.1 尿液标本的采集 征得志愿者和患者同意并签署知情同意书后,收集新鲜晨尿200 ml以上,2 h内送检。

1.2.2 FISH操作前尿液标本的处理 37 ℃水浴箱预热胶原酶、KCL低渗溶液。将尿液标本置于50 ml离心管中,1 850 r/min离心8 min,收集200 ml左右尿液沉渣。通过胶原酶B消化、低渗、固定,配置适当浓度的尿液标本。

1.2.3 尿脱落细胞FISH操作 把处理好的尿液标本混匀后滴片。烤片机46 ℃老化玻片2~3 h。将40 ml 0.01 mol/L HCl倒入考普林瓶中并置于37 ℃水浴箱中预热。室温下将玻片置于2×SSC溶液中漂洗2次,每次5 min。将配好的胃蛋白酶溶于预热至37 ℃的40 ml 0.01 mol/L HCl,混匀,制备成终浓度0.02 mg/ml的胃蛋白酶工作液,将玻片置于37 ℃胃蛋白酶工作液中孵育10 min。室温下于2×SSC溶液中漂洗玻片2次,每次5 min。甲醛固定10 min。室温下将玻片依次置入70%、85%、100%乙醇中脱水2 min。室温避光,将7 μl杂交缓冲液、1 μl去离子水、2 μl探针加入到离心管中,混匀后用迷你离心管短暂离心。将10 μl探针混合物滴于玻片杂交区域,立即加盖玻片,避免产生气泡,用橡皮胶封边。杂交仪变性温度78 ℃变性5 min。将玻片置于湿盒中,保持水平,42 ℃保温箱中杂交过夜。65 ℃水浴箱预热0.4×SSC/0.3% NP-40洗涤液。移去盖玻片,立即将玻片置于预热的0.4×SSC/0.3% NP-40洗涤液中,振荡1~3 s,漂洗1.5 min。将玻片置于室温2×SSC/0.1% NP-40洗涤液中,振荡1~3 s,漂洗0.5 min。70%乙醇洗涤5 min,自然干燥。10~15 μl DAPI复染,盖上中号盖

玻片,观察。

1.2.4 FISH结果的判断标准 探针组合1:CSP3(绿色)CSP7(红色),正常信号类型:2红/2绿,异常信号类型,3号及7号染色体的非整倍性。探针组合2:GLP16(红色)CSP17(绿色),正常信号类型:2红/2绿,异常信号类型,P16缺失或扩增,17号染色体的非整倍性。

1.3 正常阈值的建立

收集20例健康志愿者新鲜晨尿标本,对尿液标本中的脱落细胞进行FISH检测,每个探针组合观察100个细胞。阈值=平均值+3×标准差。CSP3 1个信号和多个信号(>2个信号)的阈值分别是3.75%和4.75%,CSP7 1个信号和多个信号的阈值分别是5.22%和7.57%,GLP16 0信号、1个信号和多个信号的阈值分别是4.50%、5.88%和4.12%,CSP17 1个信号和多个信号的阈值分别是5.75%和6.83%。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,行配对χ^2检验的连续校正公式和Fisher精确概率法。

2 结果

对20例患者进行手术治疗,术后病理诊断20例患者中上尿路上皮癌18例(17例上尿路移行上皮细胞癌,1例肾盂结石合并肾盂鳞癌),肾癌浸润肾盂1例,肾结石合并肾盂肾炎引起的肾盂上皮炎性增生1例。18例上尿路上皮癌中肾盂癌11例,输尿管癌6例,肾盂癌合并输尿管癌1例。按病理分期,非肌层浸润(PT_a,PT_1,PT_{tis})7例,肌层浸润(PT_{2-4})11例。低级别肿瘤6例,高级别肿瘤12例。18例上尿路上皮癌患者中FISH结果阳性为15例,敏感性为83.3%,3例出现假阴性,其中2例为低级别肿瘤,1例为高级别肿瘤,探针3、7、p16和17出现异常的比例分别为50.0%、66.7%、55.6%和38.9%。对于低级别尿路上皮癌,FISH和尿脱落细胞学的敏感性分别为66.7%(4/6)和33.3%(2/6),两者敏感性相比较差异无统计学意义($P>0.05$)。高级别上尿路上皮癌两者的敏感性分别为91.7%(11/12)和41.7%(5/12),FISH敏感性高于尿脱落细胞学($P=0.031$)。在诊断非肌层浸润的上尿路上皮癌和肌层浸润的上尿路上皮癌中,两者的敏感性分别为85.7%(6/7)和28.6%(2/7)、90.9%(10/11)和45.5%(5/11),差异无统计学意义($P>0.05$)。FISH诊断上尿路上皮癌的敏感性和MMCT相似($P>0.05$),高于泌尿系超声和尿脱落细胞学检查($P<0.05$,表1)。

对照组20例患者,术后患者的病理诊断均为肾透明细胞癌,FISH检查和尿脱落细胞学检查的特异性分别为95.0%(19/20)和90.0%(18/20),两者相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 FISH和尿脱落细胞学检查、经泌尿系超声、MMCT的敏感性比较

FISH检查	尿脱落细胞		泌尿系超声		MMCT	
	+	−	+	−	+	−
+	7	8	8	7	14	1
−	0	3	0	3	3	0
*P*值	0.008		0.016		0.625	

3 讨论

上尿路上皮癌临床少见,包括肾盂癌和输尿管癌,肿瘤恶性程度较高,临床预后差,上尿路肿瘤患者的早期诊断和及时治疗对患者的预后非常重要。目前尚缺乏能早期诊断上尿路上皮癌的方法,因此,探索一种对人体创伤小、敏感性和特异性高的检查方法对上尿路上皮癌患者做出早期正确诊断至关重要。

近年来,国内外大量的研究应用FISH检测膀胱癌,文献报道FISH检测膀胱癌的敏感性高于尿脱落细胞学检查,且两者特异性相当[5-7]。上尿路上皮和膀胱上皮组织来源相似,在遗传学改变上相似[3]。应用FISH检测上尿路上皮癌从理论上可行。

目前,国内外已有文献报道应用FISH检测上尿路上皮癌的研究,FISH的敏感性为76.7%~100%,尿脱落细胞学敏感性为20.8%~60%,两者的特异性相当,为80%~100%[2-3,8]。本研究FISH检测结果表明,对于较小的上尿路上皮癌和原位癌应用影像学诊断较为困难,行FISH检查是不可缺少的辅助检查方法,FISH也可用于影像学检查阴性怀疑有尿路上皮肿瘤患者的随访。和FISH、MMCT相比较,超声作为无创检查,价格低廉,操作方便,但对于早期体积较小的肿瘤敏感性较低,可用于怀疑上尿路上皮癌患者的初步检查。随着影像学的发展,MMCT已广泛的应用于临床,可以检查出较小的上尿路肿瘤,并可对肿瘤进行分期,但对于小部分上尿路上皮肿瘤,单纯依靠MMCT对肿瘤的性质MMCT不能做出正确的诊断[9]。如将FISH和MMCT相结合,可提高诊断的正确性。

本组18例上尿路上皮癌患者中1例FISH结果阳性,而超声和MMCT均提示肾盂壁增厚,考虑为慢性炎症,行输尿管镜检查高度怀疑肾盂癌,术后病理诊断为肾盂癌。2例误诊患者,1例术前MMCT考虑肾盂癌侵犯肾实质,FISH和尿脱落细胞学检查均为阴性,术后病理诊断为肾透明细胞癌。另1例术前FISH检查阴性,MMCT、超声、MRI和尿脱落细胞学检查均怀疑为肾盂癌,术后病理结果为肾盂慢性炎症合并结石,出现肾盂上皮炎性增生。2例误诊患者FISH定性诊断均为阴性,由此可见FISH在上尿路上皮癌定性诊断中的意义非常重要,即使影像学诊断为上尿路上皮癌的患者,行FISH技术检测也是不可缺少的。但是,对于低级别肿瘤,由于尿脱落细胞减少,或者一些输尿管肿瘤引起尿路梗阻较重,患侧肾脏分泌尿液不能下排至膀胱,导致尿液中肿瘤脱落细胞较少,出现FISH技术检测的假阴性[7]。

综上所述,FISH对诊断上尿路上皮癌有较高的敏感性和特异性,对诊断较小的上尿路上皮癌及原位癌有一定的意义,为临床医师做出正确诊断提供参考,亦可用于肾癌和肾盂癌的鉴别及上尿路上皮癌患者术后的复查和监测。

参考文献：

[1] Oosterlinck W, Solsona E, Van-der-Meijden A P, *et al*. EAU guidelines on diagnosis and treatment of upper urinary tract transitional cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2004, 46(2): 147-154.

[2] 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(4): 753-757.

[3] Luo B, Li W, Deng C H, *et al*. Utility of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2009, 189(2): 93-97.

[4] 李伟，梁建波，韦华玉，等. 应用荧光原位杂交技术诊断尿路上皮癌的临床研究[J]. 中国癌症杂志，2010，20(1)：36-39.

[5] 王鹏，靳风烁，叶锦，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2009，31(10)：948-951.

[6] Marin-Aguilera M, Mengual L, Ribal M J, *et al*. Utility of a multiprobe fluorescence in situ hybridization assay in the detection of superficial urothelial bladder cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2007, 173(2): 131-135.

[7] Laudadio J, Keane T E, Reeves H M, *et al*. Fluorescence in situ hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice[J]. BJU Int, 2005, 96(9): 1280-1285.

[8] Mian C, Mazzoleni G, Vikoler S, *et al*. Fluorescence in situ hybridisation in the diagnosis of upper urinary tract tumours[J]. Eur Urol, 2010, 58(2): 288-292.

[9] 王晓华，谭石. 64排螺旋CT诊断早期原发性输尿管癌的临床价值[J]. 中国医学影像学杂志，2010，18(1)：36-38.

（收稿 2010-11-21 修回 2010-12-09）

（编辑 王小宴）

（上接1304页）

3 讨论

AIP临床表现为上腹部胀痛、腹泻、明显消瘦，多数伴有黄疸甚至为首发症状，可合并糖尿病。60%～70%的患者有血清IgG特别是IgG4升高。Hirano等[3]报道，血清IgG4升高诊断AIP的敏感性为95%，特异性为97%。

AIP的MR及MRCP表现特征与其病理基础密切相关，主要表现在胰腺形态、病变周围组织改变、胰腺增强方式的变化、胰胆管改变及激素治疗后变化等几个方面[4-8]。胰腺形态改变多表现为胰腺弥漫性肿大，外廓平直，正常的羽毛样结构消失，替代为腊肠样外观，也可为胰腺局限性肿大，为胰腺内大量淋巴细胞、浆细胞浸润及胰腺实质内纤维化所致。本组6例表现为弥漫性肿大，1例为局限性肿大。病变区胰周脂肪组织由于受到大量淋巴细胞、浆细胞进入及其纤维化，常在病变区形成包膜样结构。这是AIP的重要特征，罕见于其他胰腺疾病，在MR上表现为在T_1WI呈现略低或等信号，在T_2WI上均呈现低信号，MR增强可见较明显延迟强化。本组5例可见包膜样结构。本组7例平扫时胰腺信号改变在T_1WI表现为均匀或不均匀降低，在T_2WI表现为均匀或不均匀增高，胰腺病变区增强扫描表现为动脉期强化不同程度减弱，强化可以均匀或不均匀，静脉期及延迟期表现为明显均匀强化，表现出延迟均匀强化的特征。这是由于AIP胰腺内腺体遭到不同程度的破坏、闭塞性静脉炎及纤维化所致。胰管周围广泛的淋巴细胞及浆细胞浸润，导致主胰管局限性或弥漫性狭窄，在MRCP上可表现为主胰管粗细不均匀或节段性显示，胰管可以稍扩张。本组3例有此表现。胆总管胰头段受压、管壁淋巴细胞、浆细胞浸润及纤维化，导致管腔炎性狭窄，多呈鸟嘴样，无突然截断现象。本组5例有此表现。激素治疗后胰腺的形态大小、MR信号、强化、胆总管胰头段狭窄及主胰管狭窄，可以有明显改善，多数患者可以恢复正常，也是AIP的重要特征。胰周纤维组织增生明显可包绕周围血管，增强强化明显，胰腺内罕见钙化及囊肿，无远处转移及周围淋巴结肿大。

AIP属于慢性胰腺炎的一种特殊类型，在病理上难以直接诊断。而在影像学上AIP与常见的慢性胰腺炎鉴别不难。典型的慢性胰腺炎往往出现胰腺形态萎缩、胰管扩张、胰腺实质钙化或胰管内结石、胰腺假性囊肿；而AIP胰腺形态肿大，僵硬、胰管表现为狭窄、更无胰腺实质钙化或胰管内结石影像表现。急性胰腺炎胰腺形态肿大，同时伴有胰周明显的渗出，腹水等；而AIP胰周脂肪间隙较清晰，二者也易鉴别。

综上，AIP的MRI表现具有特征性，是诊断AIP的必备条件。因此正确认识其MRI表现，有助于临床诊断与治疗。

参考文献：

[1] Shimosegawa T, Chari S T, Frulloni L, *et al*. International Consensus Diagnostic Criteria for Autoimmune Pancreatitis: Guidelines of the International Association of Pancreatology[J]. Pancreas, 2011, 40(3): 352-358.

[2] Otsuki M, Chung J B, Okazaki K, *et al*. Asian diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: consensus of the Japan-Korea Symposium on Autoimmune Pancreatitis[J]. J Gastroenterol, 2008, 43(6): 403-408.

[3] Hirano K, Komatsu Y, Yamamoto N, *et al*. Pancreatic mass lesions associated with raised concentration of IgG4[J]. AM J Gastroenterol, 2004, 99(10): 2038-2040.

[4] Takahashi N, Fletcher J G, Hough D M, *et al*. Autoimmune pancreatitis: differentiation from pancreatic carcinoma and normal pancreas on the basis of enhancement characteristics at dual-phase CT[J]. AJR Am J Roentgenol, 2009, 193(2): 479-484.

[5] Suzuki K, Itoh S, Nagasaka T, *et al*. CT findings in autoimmune pancreatitis: assessment using multiphase contrast-enhanced multisection CT[J]. Clin Radiol, 2010, 65(9): 735-743.

[6] Bodily K D, Takahashi N, Fletcher J G, *et al*. Autoimmune pancreatitis: pancreatic and extrapancreatic imaging findings[J]. AJR Am J Roentgenol, 2009, 192(2): 431-437.

[7] 谭晔，方金洲，杨正汉，等. 自身免疫性胰腺炎影像特征的显示：MRI与CT对照[J]. 中华放射学杂志，2009，43(8)：835-839.

[8] 刘焦枝，李光，高平，等. 自身免疫性胰腺炎的MRI表现及临床分析[J]. 临床放射学杂志，2006，25(12)：1140-1142.

（收稿 2011-04-07 修回 2011-04-18）

（编辑 汪勤俭）