

GLPp16/CSP17 探针在膀胱尿路上皮癌诊断中的应用*

张宇 曾庆山 张宁 熊廷川 汪清[△]

(新疆维吾尔自治区人民医院泌尿外二科 新疆 乌鲁木齐 830001)

摘要 目的 探讨荧光原位杂交技术辅助诊断膀胱尿路上皮癌的可行性。方法:标记为 17 号染色体着丝粒及 9 号染色体 p16 位点 9p21 区带探针,采用荧光原位杂交技术(Fluorescence in Situ Hybridization FISH)对 80 例膀胱肿瘤患者尿液间期细胞核进行荧光原位杂交,以 20 例健康志愿者作为正常对照组,建立阈值。以术后病理结果作为诊断“金标准”,对 80 例膀胱肿瘤患者同时行尿脱落细胞学检查,与 FISH 进行比较。结果:17 号染色体和 9p21 的畸变率分别为 57.5%和 63.8%。17 号染色体畸变率主要表现为多倍体,与膀胱癌的分级有显著相关性($P<0.01$);9 号染色体畸变率主要变为染色体缺失,与膀胱癌分期分级均无相关性($P>0.05$)。尿脱落细胞学灵敏度为 12.2%,FISH 技术灵敏度为 86.5%,两者差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:荧光原位杂交技术可以作为膀胱尿路上皮癌诊断的一项重要方法,并可能在预后判断中具有重要临床意义。

关键词 尿路上皮癌;荧光原位杂交技术;膀胱肿瘤;染色体畸变

中图分类号:R737.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)07-1219-04

Application of GLPp16/CSP17 probe in the Diagnosis of Bladder Urothelial Carcinoma*

ZHANG Yu, ZENG Qing-shan, ZHANG Ning, XIONG Ting-chuan, WANG Qing[△]

(Second Department of Urology, The People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, 830001, China).

ABSTRACT Objective: To evaluate the possibility of Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in detecting Urothelial carcinoma of the urinary bladder. **Methods:** The probes of chromosome 17 centromeres and chromosome 9 9p21 region (p16) were labeled by random primer method. FISH was performed on interphase nuclei of 80 urine specimens of suspected bladder urothelial carcinoma, all the urine specimens were analyzed by urinary cytology at the same time. The pathological diagnosis was the "Golden standard", to analyse the sensitivity and specificity of FISH and urinary cytology to diagnose bladder urothelial carcinoma. 20 normal donors were analyzed to establish threshold value. **Results:** The rate of aberration was 57.5% for chromosome 17 and 63.8% for chromosome 9p21 in urothelial carcinoma of the urinary bladder. All the aberrations had no correlation to tumor stage ($P>0.05$), the aberration of chromosome 17 was correlated to pathologic grade significantly ($P<0.01$). The specificity was 100% with FISH and 100% with cytology, although this difference was not statistically significant ($P>0.05$). We found a significant difference between the sensitivity of FISH and cytology (86.5% vs. 12.2%, respectively; $P<0.01$). **Conclusion:** FISH was proved to be a very important method in diagnosis and prognosis of Urothelial carcinoma of the urinary bladder.

Key words: Urothelial carcinoma; Fluorescence in situ hybridization; Bladder cancer; Chromosome aberration

Chinese Library Classification: R737.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)07-1219-04

膀胱癌是我国泌尿男性生殖系统最常见的恶性肿瘤,其中最常见的是膀胱尿路上皮癌,占膀胱癌的 90%以上^[1]。膀胱镜检查 and 尿脱落细胞学检查是目前膀胱癌诊断普遍使用的两种手段^[2]。膀胱镜检查有创伤性,患者痛苦,并且难以发现微小扁平的肿瘤,患者还有引起潜在感染的风险;尿细胞学是一种无创的检测方法,特异性高,但敏感性低。因此急需寻找一种无创、安全和准确的诊断膀胱尿路上皮癌的方法。荧光原位杂交技术(FISH)可直接用于检测实体瘤间期核染色体的畸变,已成为近期的研究热点^[3]。为了了解 FISH 技术诊断膀胱尿路上皮癌的

敏感性及其特异性,我们于 2008 年 3 月至 2010 年 12 月共收集了 80 例膀胱肿瘤和 20 例正常人的晨尿中脱落间期细胞核进行了 FISH 检测,同时和尿脱落细胞学进行了比较研究,现将结果报告如下:

1 资料与方法

1.1 临床资料和标本的收集

80 例膀胱肿瘤患者的新鲜晨尿标本来自 2008 年 3 月至 2010 年 12 月就诊于我院泌尿外科门诊和住院患者,所有患者

* 基金项目:卫生部科研基金课题项目(WKJ2007-3-001)

作者简介:张宇(1976-),男,硕士,主治医师,研究方向:腔内微创技术与泌尿系肿瘤,

E-mail:zy7652@126.com. 电话:0991-8563851

[△]通讯作者:汪清(1963-),男,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:泌尿系肿瘤、

腔内泌尿外科、尿流动力学 E-mail:zy7652@126.com

(收稿日期:2011-09-12 接受日期:2011-10-08)

的尿液均为术前标本,其中男性 58 例,女性 22 例,年龄 41-89 岁,平均年龄 67.5 岁。80 例膀胱肿瘤患者经膀胱镜活检病理或手术切除后病理证实:膀胱尿路上皮癌 74 例,低分化鳞癌 3 例,低分化腺癌 3 例。74 例膀胱尿路上皮癌采用国际抗癌协会 2002 年第六版 TNM 分期法确定肿瘤分期:T_a 期 3 例、T₁ 期 13 例、T₂ 期 11 例、T₃ 期 16 例、T₄ 期 31 例。按照 WHO2004 分级法确定病理分级:乳头状尿路上皮癌(低级别) 32 例,乳头状尿路上皮癌(高级别)42 例。同时选择 20 名年龄大于 40 岁的无泌尿系统疾病健康者作为对照组。经每位患者同意并签署知情同意后连续 3 天留取晨尿 200ml,1 小时内送检,尿液均分为 2 部分,一部分送病理科行常规尿脱落细胞学检测,一部分行 FISH 检测,同样征得每位健康志愿者同意并签署知情同意后同样方法留取尿液 100ml 尿液行 FISH 检测,用于建立阈值作为阳性判定标准。

1.2 尿脱落细胞学检测

尿脱落细胞学检测由两位固定的高年资病理科医师进行操作,结果报告为阳性和阴性。

1.3 FISH 检测

1.3.1 标本的处理程序及玻片的制备 用北京金菩嘉医疗科技有限公司提供的试剂对尿液进行预处理。晨尿 200ml 经过离心去上清,加入胶原酶 B 37℃水浴 20 分钟,0.075mol/L 氯化钾低渗 20 分钟,加入 3:1 固定液(甲醇:冰醋酸)固定,重复 3 次,固定后制成单细胞悬液,常规滴片,室温过夜老化。37℃水浴箱中将玻片分别放入 RNaseA 溶液 30 分钟、胃蛋白酶中消化 15 分钟,室温下于 2 SSC 溶液中漂洗玻片 2 次,每次 5 分钟,然后依次置于预冷的 70%乙醇、85%乙醇和 100%乙醇梯度脱水 2 分钟,自然干燥玻片。

1.3.2 探针的标记 采用北京金菩嘉医疗科技有限公司提供的膀胱癌检测试剂盒 GLPp16/CSP17 探针分别标记 9 和 17 号染色体,同时还有相应的 GLP 杂交缓冲液、CSP/WPP 杂交缓冲液。

1.3.3 荧光原位杂交操作步骤 (1)标本准备及变性:将 70%甲酰胺/2XSSC 变性液置于 72-74℃水浴箱中约 30 分钟,使溶液达到所需温度。将玻片在变性液中浸泡 8 分钟,依次将玻片置于预冷的 70%乙醇、85%乙醇和 100%乙醇各 3 分钟梯度脱水 3 分钟,玻片自然干燥后,置于 46℃考片机上预热等待与探针杂交。(2)探针混合物准备及变性 探针的配置如下:71 杂交缓冲液+11 去离子水+21 探针(1 人份,如有多人按比例加入以上试剂)。将装有探针混合物的试管置于 72-74℃水浴箱中变性 8 分钟。(3)探针与样本杂交:将 101 变性后的探针混合物滴于玻片杂交区域,立即加盖盖玻片,用封口胶封边。玻片置于预热的湿盒中,42℃保温箱中过夜杂交。(4)玻片的洗涤:①将 50%甲酰胺/2×SSC 溶液(A 液)倒入三个分别标记为"1"、"2"、"3"的考普林瓶中(使用前将盛有溶液的考普林瓶置于 46℃水浴箱中至少 30 分钟)玻片分别洗涤 10 分钟;②将玻片置于盛有 2×SSC 溶液(B 液)的瓶中 10 分钟;③将玻片置于盛有 2×SSC/0.1%NP-40 溶液(C 液)的瓶中 5 分钟;④玻片取出后浸泡在 70%乙醇中脱水 3 分钟,暗处自然干燥玻片。

1.3.4 观察信号 将 15 IDAPI 复染剂滴加于杂交区域位置,立

即盖上盖玻片。暗处放置 15 分钟在荧光显微镜下进行细胞信号的计数。

1.4 FISH 分析及判断标准

1.4.1 FISH 分析 计数结果有两个技术人员独立完成,结果一致方可认定,每例计数 100 个细胞核,细胞重叠、破损、未去除细胞质的细胞核以及淋巴细胞不计数,微弱杂交信号不计数,细胞内杂交信号相互靠近者为一个信号。一般情况下,正常细胞的 CSP3、CSP7、CSP17 着丝粒探针及 GLPp16 位点探针均表现为二倍体,即细胞核分别可以看到 2 红 2 绿信号。出现非二倍体改变即为异常表现。

1.4.2 结果判断 ①建立阈值:计数每位健康志愿者 100 个细胞核,统计出现不同类型异常情况细胞数目的百分比,建立正常阈值。②每个患者每组探针分析 100 个细胞,如果检测值大于阈值,判断为阳性结果,如果检测值小于阈值,判断为阴性结果。如果等于阈值,加大观测样本细胞数目。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,运用 McNemar 配对卡方检验, P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 正常健康志愿者 FISH 检测结果及阈值

正常细胞的 CSP17 号着丝粒探针及 GLPp16 位点均表现为二倍体,即细胞核分别可见 2 个红色和 2 个绿色信号(图 1)。出现非二倍体改变即为异常表现。17 号染色体表现为非整倍体改变,即每个细胞核内出现多余两个信号的表现,p16 位点主要变为缺失,即每个细胞核内出现少于两个信号的表现(图 2)。分析 20 例健康志愿者尿液 FISH 结果,每组探针分析 100 个细胞,统计出现不同异常情况细胞数目的百分比,建立阈值。阈值 = 平均值(M)+3×标准差(SD)(表 1)。

表 1 健康志愿者 FISH 检测阈值

Table 1 Threshold value of FISH in 20 normal donors

Probe	Mean percentages and three times standard deviations (M+3SD)		
	No signal	One signal	Three and more signals
GLPp16	2.2+3× 1.3	5.1+3× 1.7	1.4+3× 1.1
CSP17		1.5+3× 0.9	4.7+3× 2.

2.2 染色体畸变与肿瘤分期、分级的关系

在 74 例确诊为膀胱尿路上皮癌的患者中,17 号染色体畸变率为 62.2%(46/74)主要表现为非整倍性,三个及三个以上信号点为 59.5%(44/74),但有 2 例(2.7%)为单体;17 号染色体异倍体与病理分期无相关性(P>0.05)其统计值为 2 值为 10.609, P 值 0.225;但与分级有显著相关性(P<0.01)其统计值 2 值为 7.123, P 值 0.008。9 号染色体畸变率为 68.9%(51/74),9 号染色体主要变为染色体缺失,括单倍体和纯合性缺失。其中纯合性缺失 4.1%(3/74),单倍体 64.9%(48/74),未见有多倍体畸变的病例。9 号染色体畸变与病理分期无相关性(P>0.05),其统计值为 2 值为 14.196, P 值 0.288;同时与分级均无相关性(P>0.05)其统计值为 2 值为 1.192, P 值 0.275(表 2):

表 2 染色体畸变与不同病理分期、分级间膀胱尿路上皮癌的关系
Table 2 Chromosomal aberrations with increasing tumor grade and stage of urothelial carcinoma of the urinary bladder

Group	Cases	Chromosome aberrations(%)	
		9P21	17
Stage			
Ta	3	2(66.6)	1(33.3)
T1	13	7(53.8)	6(46.2)
T2	11	8(72.7)	7(63.6)
T3	16	10(62.5)	11(68.8)
T4	31	21(67.7)	21(67.7)
P		0.228	0.225
Grade			
Low	32	24(75)	13(54.2)
High	42	21(50)	29(69)
X ²		1.192	7.123
P		0.275	0.008

2.3 FISH 与尿脱落细胞学检测结果比较

80 例膀胱癌患者中 74 例为膀胱尿路上皮癌, 6 例为非尿路上皮癌, 其中低分化鳞癌 3 例, 低分化腺癌 3 例。64 例通过 FISH 技术被判断为阳性结果, 均为膀胱尿路上皮癌。所以得出 FTSH 技术的灵敏度为 86.5%(64/74), 特异度为 100%(6/6)。尿脱落细胞学结果中仅有 6 例尿液中发现癌细胞, 3 例查见异型细胞团, 灵敏度为 12.2%(9/74), 特异度为 100%(6/6)。FISH 检测膀胱尿路上皮癌的灵敏度明显优于尿脱落细胞学检查(P<0.01), 而两者的特异度差异无统计学意义(P>0.05)(表 3)。

表 3 FISH 和尿脱落细胞学检测膀胱尿路上皮癌的灵敏度和特异度比较

Table 3 Sensitivities and specificities of urinary cytology and FISH for the detection of bladder cancer

	Cases	Cytology(%)	FISH(%)	P-value
Sensitivity	74	9(12.2)	64(86.5)	<0.01
Specificity	6	6(100.0)	6(100.0)	>0.05

3 讨论

荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 是一种应用荧光物质依靠核酸探针杂交原理在核中或染色体中显示 DNA 序列位置的方法, 在中期和间期细胞均可检测 DNA 序列及其变化。细胞内染色体含量的不平衡是引起肿瘤的根本原因, 细胞遗传学表现为染色体数目或结构的异常, 分子水平表现为 DNA 片段扩增、缺失、碱基改变等。染色体畸变分析已被认为是人类恶性肿瘤诊断和预后指标之一。对膀胱癌细胞中染色体的异常进行检测, 可以为膀胱癌的临床诊断和预后提供有价值的依据。膀胱癌最常见的染色体异常发生在 3、7、17 号

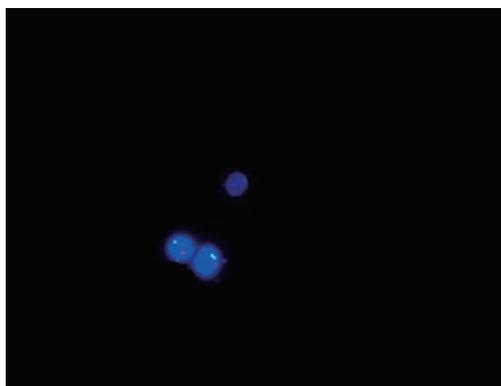


图 1 正常人 GLPp16/CSP17 探针 FISH 杂交结果(CSP17- 绿信号; GLPp16- 红信号)[100]

Fig.1 Fluorescence in situ hybridization findings in healthy people (CSP17-green signals;GLPp16-red signals)[100]

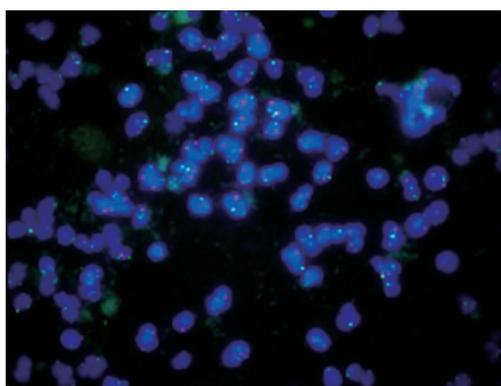


图 2 膀胱尿路上皮癌患者 GLPp16/CSP17 探针 FISH 杂交结果 (CSP17- 绿信号, GLPp16- 红信号)[100]

Fig.2 Fluorescence in situ hybridization findings in bladder cancer patients(CSP17-green signals;GLPp16-red signals)[100]

染色体数目的异常及 9 号染色体 2 区 1 带结构的缺失。美国 Vysis 公司在 1999 年研制的 Urovysion 试剂盒, 通过荧光原位杂交分析多靶点检测尿脱落细胞染色体 3、7、17 号非整倍体和染色体 9p21(P16 基因)丢失发现膀胱尿路上皮细胞癌, 其敏感性和特异性均较高^[4]。但是国内有学者研究表明中国人与西方人膀胱癌的遗传学改变存在差异^[5]。因此 Urovysion 试剂盒并不一定适合中国人群。

近年来随着对国内膀胱癌患者染色体畸变情况的深入研究, 适合中国人的高特异性探针也已出现, 本研究采用的是国内北京金普嘉医疗科技有限公司提供的膀胱癌检测试剂盒 GLPp16/CSP17 探针分别标记 9 和 17 号染色体对 80 例膀胱癌患者尿液脱落间期细胞核进行 FTSH 分析, 17 号染色体和 9p21 的畸变率分别为 57.5%和 63.8%。9 号染色体最常发生染色体的缺失, 位于此染色体的抑癌基因 p16, 通过 CDK4 对细胞增值分裂起负调控作用, CDK4 与 cyclinD 形成复合物促进细胞从 G1-S 转换, 促进细胞有丝分裂。本研究结果显示发生纯合性丢失和单倍体的比率分别为 4.1%(3/74) 和 64.9%(48/74); 有研究结果表明^[6]9 号染色体部分或全部丢失在膀胱肿瘤中最常见, 超过 50%膀胱癌患者有此染色体改变, 这与我们的研究结果基本一致, Eleuteri 称其与膀胱癌的早期发生密

切相关^[7]。本研究中,9号染色体畸变与病理分期无相关性($P>0.05$),其统计值为 X^2 值为14.196, P 值0.288;同时与分级亦无相关性($P>0.05$),其统计值为 X^2 值为1.192, P 值0.275。目前较多的研究认为9p21畸变与病理分期、分级无相关性,但9号染色体的单体畸变与复发、进展相关^[8],本研究也认为9p21畸变对膀胱癌预后判断和术后监测复发可能有重要的意义,这有待于今后进一步研究去证实。

本研究中17号染色体以三倍体多见,但也出现了四倍体及五倍体,大量的研究表明^[9]这可能与肿瘤的分期及分级有关,随着分期、分级的增高,出现四倍体及五倍体的比率也在增加。在我们的实验组中,在32例低级别尿路上皮癌中,未出现四倍体及五倍体;而在42例浸润性乳头状尿路上皮癌(高级别)中,有6例以四倍体及五倍体畸变为主,在所查阅的文献中还未报道发生四倍体及五倍体畸变的比率,这可能是他们把大于和等于三倍体统一计数,未将四倍体及五倍体单独计数。在本研究中17号染色体畸变率为62.2%(46/74),主要表现为非整倍性,三个及三个以上信号点为59.5%(44/74),与分级有显著相关性($P<0.01$)。因此,17号染色体的异常可能提示肿瘤的进展和浸润。

本研究中FISH的灵敏度为86.5%(64/74);特异度为100%(6/6)。这与国外的文献报道相一致^[10]尿脱落细胞学结果中仅有6例尿液中发现癌细胞,3例查见异型细胞团,灵敏度为12.2%(9/74),特异度为100%(6/6)。在Planz^[11]等研究报道中尿脱落细胞学可确诊70%-100%的高度恶性移行细胞癌及移行细胞原位癌,这与我们得出的结果有很大差别,可能的原因是低度恶性肿瘤细胞间连接保存较好,很少发生自发脱落,而且其脱落细胞的形态与正常移行细胞也很相近。但尿脱落细胞学的诊断敏感性可随着肿瘤恶性程度增加而明显升高,PlanzB等对495例膀胱肿瘤患者的1380份尿标本进行细胞学评价,对G1级敏感性为15.4%,G2级为74.1%,G3级为78.3%。在本研究6例尿脱落细胞学阳性的患者,术后病理结果均为高级别尿路上皮癌。本研究FISH检测膀胱尿路上皮癌的灵敏度明显优于尿脱落细胞学检查($P<0.01$),而两者的特异度差异无统计学意义($P>0.05$)。因此从本研究结果看,FISH技术对膀胱癌的诊断有较高的敏感性及特异性。

综上所述,荧光原位杂交技术具有无创性、灵敏度高和特异性强等优点,可以作为膀胱尿路上皮癌诊断的一项新方法,并可能在膀胱肿瘤预后判断中具有重要临床意义。但我们也应看到膀胱尿路上皮癌中除9p21和17号染色体是最常发生的染色体畸变外,尚存在其他畸变率更高的染色体或区带,如

1p、2q、8p、11q、18q和Yq等^[12],因此如何选择最佳的探针组合,建立起合适的阈值判断标准,才能使得FISH技术能够早日在包括膀胱尿路上皮癌及其他实体性肿瘤、产前遗传性疾病诊断中得到广泛应用。

参考文献(References)

- [1] Fleshner NE, Herr HW, Stewart AK, et al. The National Cancer Data Base report on bladder carcinoma[J]. Cancer, 1996, 78: 1505-1513
- [2] 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
- [3] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74-108
- [4] Irina A, Kevin C, 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
- [5] Zhang J, Zheng S, Gao Y, A partial allelotyping of urothelial carcinoma of bladder in the Chinese[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(3):343-347
- [6] Strefford JC, Lillington DM, Steggall M, et al. Novel chromosome findings in bladder cancer cell lines detected with multiplex fluorescence in situ hybridization [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2002, 135(2):139-146
- [7] Eleuteri P, Grollino MG, Pomponi D, et al. Chromosome 9 aberrations by fluorescence in situ hybridisation in bladder transitional cell carcinoma[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(12):1496-1503
- [8] Eleuteri P, Grollino M G, Pomponi D, et al. Chromosome 9 aberrations by fluorescence in situ hybridisation in bladder transitional cell carcinoma [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(12): 1496-1503
- [9] 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
Zhang YG, Bi XG, Han YL, et al. Detection of urothelial carcinoma of the urinary bladder by multicolor fluorescence insitu hybridization[J]. Chinese Journal of Cancer, 2007, 26(2): 189-193
- [10] Kipp BR, Halling KC, Campion MB, et al. Assessing the value of reflex fluorescence in situ hybridization testing in the diagnosis of bladder cancer when routine urine cytological examination is equivocal[J]. Urology, 2008, 179(4): 1296-1301
- [11] 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
- [12] Qin SL, Chen XJ, Xu X, et al. Detection of chromosomal alterations in bladder transitional cell carcinoma from Northern China by comparative genomic hybridization [J]. Cancer Lett, 2006, 238(2): 230-239