

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.039

染色体畸变与膀胱癌发生发展的相关性研究

王洪波 杨德君 刘 岩 王科亮 王晓民[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院泌尿外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:通过荧光原位杂交技术(FISH)结合病理分级,探讨染色体畸变与膀胱癌发生和发展的关系。**方法:**采用3、7、9、17号染色体着丝粒探针和9P16区带探针对105例膀胱癌复发患者尿液脱落细胞进行荧光原位杂交,观察膀胱癌复发患者中3、7、9、17号染色体的畸变情况并分析其与患者临床和病理特征之间的关系。**结果:**105例膀胱癌复发患者中,3、7、9和17号染色体的非整数倍突变率分别是21.9%、29.5%、12.4%、和36.2%,与患者的性别、年龄无显著相关性($P>0.05$)。仅7号染色体畸变与膀胱癌的病理分级具有显著相关性($P<0.05$)。**结论:**7号染色体畸变与复发膀胱癌的病理分级显著相关。

关键词: 荧光原位杂交;膀胱肿瘤;染色体

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)01-156-03

Correlation of the Chromosomal Abnormalities with the Occurrence and Development of Bladder Cancer

WANG Hong-bo, YANG De-jun, LIU Yan, WANG Ke-liang, WANG Xiao-min[△]

(Department of Urinary Surgery, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To explore the correlation of chromosome abnormalities changes with bladder cancer occurrence and development by fluorescence in situ hybridization (FISH) combined with pathological grade. **Methods:** 3,7,9,17 chromosome centromeric probes and 9P16 zone probe 105 cases of bladder cancer recurrence in patients with urine exfoliated cells by fluorescence in situ hybridization, the 3,7,9,17 chromosome abnormal change in the patients with bladder cancer recurrence and the relationship between the clinical and pathological features were analyzed. **Results:** In 105 cases of recurrent bladder cancer, the non-integer multiple mutation rates of 3,7,9 and 17 chromosome was 21.9%, 29.5%, 12.4%, and 36.2%, respectively, which had no correlation with the patient's gender, age ($P>0.05$). Only the aberrations of chromosome 7 was significantly correlated with the pathological grade of recurrent bladder cancer ($P<0.05$). **Conclusion:** The aberrations of chromosome 7 was significantly correlated with the pathological grade of recurrent bladder cancer.

Key words: Fluorescence in situ hybridization; Bladder tumors; Chromosome

Chinese Library Classification(CLC): R737.14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-156-03

膀胱肿瘤是我国最常见的泌尿系统肿瘤,其中尿路上皮癌占90%以上,并呈上升趋势,且复发率很高^[1-3]。目前,临床上采取主要的检查手段包括膀胱镜下病理检查、腹部超声检查、尿路上皮细胞的形态学检查以及FISH检查。但患者出院后再次出现血尿以及膀胱肿瘤复发时,再次行膀胱镜检查会增加患者的住院时间和痛苦。因此,行术后随访,并进行统计分析总结,找出与复发率高的相关基因染色体,有利于判断患者的分级和提高临床诊断率。目前,腹部超声检查无法显示小于5 mm的肿瘤病灶,且因血块、炎症等其他因素的影响^[4-6]膀胱镜下病理检查虽然可作为金标准,但也会存在遗漏。随着对膀胱癌遗传学的深入研究,人们发现3、7、9、17号染色体的非整数倍改变与膀胱癌密切相关,本研究旨在通过荧光原位杂交技术(FISH)结合病理分级,探讨染色体畸变与膀胱癌复发的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择2010年7月至2011年6月120例因膀胱癌始发入院的患者为研究对象,年龄45~86岁,平均年龄65.9岁。所有患者在术前留有晨起尿液200 mL,术后经病理检查为尿路上皮癌,共105例。进行书面记录,以便后期进行随访。

1.2 标本处理

收集患者晨起尿液200 mL,经1200转/min后,将上清液弃出,将悬浊液保留,分别加入胶原酶B、低渗液以及固定液后,将其常规固片,将其老化玻片。

1.3 FISH检测

本实验研究采用北京金菩嘉医疗科技有限公司提供的DNA FISH探针。两组探针分别3号(红色)7号(绿色)9号(红色)和17号(绿色)探针。室温下将玻片预处理:应用RnaseA(100 μg/mL)和胃蛋白酶溶液进行处理,然后将玻片放在室温下行pH值等于7的2XSSC溶液中进行漂洗3次,时间为2分钟。放在预冷的乙醇之中进行梯度脱水,放在室温下干燥玻片。标本准备:将准备好的玻片放在pH=7.0的70%甲酰胺/2XSSC

作者简介:王洪波(1979-),男,硕士研究生,主要研究方向:泌尿系肿瘤的诊断与治疗

[△]通讯作者:王晓民,电话:0451-82576896,

E-mail: xiaomin_wang20001@yahoo.com

(收稿日期:2013-03-30 接受日期:2013-04-22)

中,于 73 摄氏度变性约 5 分钟,将其于预冷的乙醇中梯度脱水,自然干燥玻片。探针处理:按照探针 2 μL 、去离子水 1 μL 、杂交缓冲液 7 μL 于 12000 转/min 时间约 5 s 混匀,于 73 摄氏度中变性 5 分钟,置于 50 摄氏度恒温箱中,杂交前去出。杂交:将准备好的探针加到玻片的标本上,覆盖玻片,封片胶封片后置湿盒 42 摄氏度中避光杂交 12 小时。洗片:除去盖玻片后将玻片放入 50%甲酰胺 /2 $\times$ SSC 溶液中,46 摄氏度中洗涤约 10 分钟,共 3 次,2 $\times$ SSC 46 摄氏度摇洗 10 分钟,共 10 分钟,应用 70%乙醇脱水。室温暗处干燥玻片,加入 10 μL 二氨基苯基吡啶复染,然后封片,在 Olympus 显微镜下观察。

1.4 结果判定

正常的尿路上皮的 3、7、9、17 号染色体是正常的整数二倍

体,即表现 2 红和 2 绿。单一染色体畸变的病例,为该染色体畸变病例,存在多个染色体畸变的病例,则按畸变染色体种类不同概率计算出所归属的染色体畸变病例。

1.5 统计学分析

应用 SPSS17.0 软件,率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 105 例患者各组染色体的畸变率

在所选 105 例膀胱肿瘤患者中,各个染色体区段发生的畸变率都很高,其中 3、7、9、17 号染色体的总畸变率分别是 21.9%、29.5%、12.4%、36.2%(表 1)。

表 1 染色体畸变率与膀胱癌患者临床和病理分级的相关性

Table 1 Correlation of the rate of chromosomal abnormalities with the pathological grade of patients with bladder cancer(n=105)

Characteristics	CSP3	CSP7	CSP9	CSP17
Sex,n (%)				
M	12 (11.4)	15 (14.3)	7 (6.7)	18 (17.1)
F	11 (10.5)	16 (15.2)	6 (5.7)	20(19.0)
Age,mean(SD),years	68.3 (10.1)	65.5 (10.4)	67.2 (10.2)	68.1 (10.9)
pathological grades, n (%)				
G1	8 (7.6)	0 (0)	4 (3.8)	14 (13.3)
G2	8 (7.6)	10 (9.5)	4 (3.8)	14 (13.3)
G3	7 (6.7)	21 (20)	5 (4.8)	20 (19.0)

Note:G1-High differentiation; G2-Moderate differentiation; G3-low differentiation.

2.2 染色体畸变与膀胱癌患者临床和病理分级的关系

根据病理学检查结果,将 105 例尿路上皮癌患者依据染色体突变类型分为 CSP3 组、CSP7 组、CSP9 组和 CSP17 组,病理分级根据分化程度分为高分化(G1)、中分化(G2)、低分化(G3),并将患者的性别、年龄进行分档记录(表 1)。

3 号染色体:CSP3 的总畸变率占 21.9%,在各个病理分级中均出现 CSP3 的突变,其与肿瘤的病理分级无显著相关性($X^2=37, P > 0.05$)(见表 1)。

7 号染色体:CSP7 的总畸形率占 29.5%,在 G1 期患者中未发现 CSP7 的畸形变,但在病理分级 G2、G3 期的患者中可有 CSP7 的畸变,统计学显示其与肿瘤的病理分级具有显著相关性($X^2=29, P < 0.05$)。

9 号染色体:CSP9 的总畸变率为 12.4%,可出现于各个病理分级的患者中,与病理分级无明显的相关性 ($X^2=20.3, P > 0.05$)(见表 1)。其中 G1 期为 4 例,占总病例数的 3.8%,G2 期为 4 例占总病例数的 3.8%,G3 期为 5 例占总病例数的 4.8%,各阶段的突变率相差不大,具有一定的稳定性。

17 号染色体:CSP17 的畸形占 36.2%,也可出现于各个病理分级的患者中,其中 G1 期为 14 例占总病例数的 13.3%,G2 期为 14 例占总病例数的 13.3%,G3 期为 20 例占总病例数的 19.0%,与尿路上皮癌的病理分级无明显的相关性($X^2=62, P > 0.05$)。

此外,本研究显示尿路上皮癌中,3、7、9、17 染色体畸形变

与患者的性别、年龄无相关。

3 讨论

自从 FISH 技术在临床上应用以来,其在泌尿系尿路上皮肿瘤早期诊断中发挥的作用是不可取代的,对于临床筛选和复查也很有帮助,其敏感性和肿瘤相关染色体畸变率的统计在学界成为一个很大的热点。2006 年 Jones 等^[13]对大量此类研究进行分析后得出结论:FISH 的敏感性高于尿脱落细胞检查的敏感性,而在特异性存在很大的差异,这为临床提供参考,帮助我们选择必要可行的检查,从而提高诊断水平。

本研究结合膀胱癌临床分级 G1 G2 G3 与畸形变基因变化所构成的比率进行分析。3 号染色体畸变阳性的病例经病理检查诊断为尿路上皮癌在相关文献中也有记载^[7,8]。但由于其突变率不高,特异性低,虽然对尿路上皮癌的诊断有着重要的临床意义但也具有一定的局限性。Sandberg 等认为 CSP7 的畸形变可以单独出现在膀胱肿瘤中,也可以与其他染色体变化一起出现在膀胱肿瘤中^[9]。本实验结果也显示 CSP7 畸变可与其他染色体突变同时存在。ELeuteri 等也认为其与膀胱癌的早期发生关系密切^[10,11],这与我们的研究结果不谋而合。因此,对于 CSP9 突变的病例应引起我们足够的重视,对于尿路上皮癌的早期诊断具有重要的意义。Ishiwata 和 Pycha 的研究也认为 84.7%的 CSP17 畸形,标志膀胱癌处在浸润期^[12],可见 CSP17 的畸形变主要出现于病理分级的 G2、G3 期,可与 CSP7 的畸变共同预测

肿瘤的 G2/G3 期, 对于尿路上皮癌的肿瘤分级及预后具有重要的意义。

因此, 膀胱癌的发生与染色体畸变有很大关系, 为临床筛选检查提供帮助, 从而减少患者通过膀胱镜检查结合病理所带来的痛苦, 可以引起我们的高度警惕, 虽然单独染色体的阳性率不及两个同时畸变率高, 但是在统计中也出现在每个分级中, 我们也应该引起注意。Ribal 等^[14,15]发现很多膀胱癌与 17 号染色体的畸变有关, Skacel 等^[16]的研究验证了使用 FISH 技术能够检测膀胱癌的早期形成。Sarosdy 等^[17]报道 36 例膀胱镜检查阴性而 FISH 检查阳性者, 经过随访发现 41% 可确诊为膀胱癌, Steidl 等^[18]报道 11 例膀胱癌中至少有 1 条染色体异常, 其中在 Skacel 等研究中有 28.6% 的复发。以上研究结果说明 FISH 在临床上的应用可以帮助膀胱癌早期诊断以及检测。

很多实验现在已经证实 FISH 技术在临床中的实用性^[19,20], 其也为术后随访检查提供了很有效的方法, 虽然存在敏感性和特异性的差异, 且不及膀胱镜下检查病理强, 但是作为一种很有前景的检查方法, 在整个泌尿系的尿路上皮癌中, 对于影像学不易发现的或者病理回报模糊的时候, FISH 技术的筛查可以有很大的帮助, 特别是在膀胱癌复查以及随访时, 可以及时通过检测染色体的相关性变化来对患者行临床观察。总之, FISH 不仅在初步筛选的时候作用很大, 在对患者复查以及临床不能明确诊断的时候, 根据染色体的变化比率可以为临床提供更有利的诊断依据^[21,22]。

参考文献(References)

- [1] Christopher B. Allard, Abdulaziz Alamri, Shawn Dason, et al. The method of bladder cuff excision during laparoscopic radical nephroureterectomy does not affect oncologic outcomes in upper tract urothelial carcinoma[J]. World Journal of Urology, 2013, 31(1): 175-181
- [2] Jeffrey K. Wang, Stephen A. Boorjian, John C. Cheville, et al. Outcomes following radical cystectomy for micropapillary bladder cancer versus pure urothelial carcinoma: a matched cohort analysis[J]. World Journal of Urology, 2012, 30(6): 801-806
- [3] Gottfrid Sj dahl, Martin Lauss, Kristina L vgren, et al. A Molecular Taxonomy for Urothelial Carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(12): 3377-3386
- [4] 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 Ya-gui, Bi Xin-gang, Han Ya-ling, et al. Detection of Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder by Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization[J]. Cancer, 2007, 26(2): 189-193
- [5] 乔忠杰, 王国民, 刘银坤, 等. 高复发性膀胱移行细胞癌基因组非平衡变化[J]. 中华实验杂志, 2005, 22(7): 871-872
Qiao Zhong-jie, Wang Guo-min, Liu Yin-kun, et al. The change of genomic imbalance on high recurrent transitional cell carcinoma of urinary bladder [J]. Chin J Ex p Sur g, 2005, 22(7): 871-872
- [6] Arshad Rahmani, Mohammad Alzohairy, A. K. Mandal, et al. Rizvi. Expressional Evaluation of Androgen Receptor in Transitional Cell Carcinoma of Urinary Bladder Patients[J]. British Journal of Medicine & Medical Research, 2011, 1(4): 233-238
- [7] Matthias May, Sabine Brookman-Amissah, Jan Roigas, et al. Prognostic Accuracy of Individual Urologists in Noninvasive Urinary Bladder Carcinoma: A Multicentre Study Comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation Classifications[J]. Eur Urol, 2010, 57: 850-858
- [8] Lambertus A Kiemeny, Patrick Sulem, Soren Besenbacher, et al. A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer[J]. Nature Genetics Volume, 2010, 42: 415-419
- [9] Vanni R Scarpa RM, Nieddu M, et al. Cytogenetic investigation on 30 bladder cancer inomas[J]. Cancer Genet Cytogenet, 1988, 30(1): 35-42
- [10] Eleuteri P, Grollino M G, Pomponi D, et al. Bladder Transitional Cell Carcinomas: A Comparative Study of Washing and Tumor Biopsies Samples by DNA Flow Cytometry and FISH Analyses [J]. Eur Urol, 2000, 37: 275-280
- [11] P Eleuteri, M.G Grollino, D Pomponi, et al. Chromosome 9 aberrations by fluorescence in situ hybridisation in bladder transitional cell carcinoma[J]. European Journal of Cancer, 2001, 37(12): 1496-1503
- [12] Pycha A, Mian C, Posch B, et al. Numerical aberration of chromosomes 7 and 17 in squamous and transitional cell cancer of the bladder: A comparative study performed by Fluorescence in situ Hybridization[J]. Eur Urol, 2004, 45(5): 593-599
- [13] Jones JS. DNA-based molecular cytology for bladder cancer surveillance[J]. Urology, 2006, 67(3Suppl): 35-45
- [14] Ribal Mj A, Mengual L. Chromosome high polysomies predict tumour progression in T1 transitional cell carcinoma of the bladder [J]. Eur Urol, 2004, 45(5): 593-599
- [15] Arnulf Stenzl, Nigel C. Cowan, Maria De Santis, et al. Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Update of the EAU Guidelines[J]. Eur Urol, 2011, 59: 1009-1018
- [16] Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and a typical or negative urine cytology[J]. Uro, 2003, 169(6): 2101-2105
- [17] MF Sarosdy, P Schellhammer, G Bokinsky et al. Clinical Evaluation of a Multi-target Fluorescent In Situ Hybridization Assay for Detection of Bladder Cancer [J]. The Journal of Urology, 2002, 168(5): 1950-1954
- [18] Steidl C, Simon R, Burger H, et al. Patterns of chromosomal aberrations in urinary bladder tumors and adjacent urothelium [J]. Pathol, 2002, 198(1): 115-120
- [19] JD Kelly, TJ Dudderidge, A Wollenschlaeger, et al. Bladder Cancer Diagnosis and Identification of Clinically Significant Disease by Combined Urinary Detection of MCM5 and Nuclear Matrix Protein 22 [J]. PLoS One, 2012, 7(7): 40305
- [20] George J. Netto MD, Liang Cheng MD. Molecular Pathology of Urinary Bladder Cancer[J]. Molecular Surgical Pathology, 2013: 229-253
- [21] Si. Murata, M. Iseki, M. Kinjo, et al. Molecular and Immunohistologic Analyses Cannot Reliably Solve Diagnostic Variation of Flat Intraepithelial Lesions of the Urinary Bladder [J]. Am J Clin Pathol, 2010, 134: 862-872
- [22] H.-M. Fritsche, M. Burger, W. Dietmaier, 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