

• 论 著 •

FISH 技术在诊断膀胱移行上皮细胞癌中的应用*

杨渝伟,唐 洁,陈小红,薛冰蓉,刘运双,俸家富[△]

(四川省绵阳市中心医院检验科 621000)

摘 要:目的 探讨荧光原位杂交(FISH)技术在膀胱移行上皮细胞癌诊断中的价值和意义。方法 用随机引物法标记 3、7、17 号染色体着丝粒及 *p16* 基因探针,对该院 103 例膀胱移行上皮细胞癌患者尿液或膀胱冲洗液中脱落细胞 FISH 进行检测,分析染色体畸变或数目异常情况与临床分期、病理分级的关系。结果 3、7、17 号染色体和 *p16* 基因的畸变率分别为 41.7%(43/103)、45.6%(47/103)、31.1%(32/103)和 55.3%(57/103),畸变与临床分期无相关性,除 *p16* 基因外其余染色体畸变与病理分级相关,其中 17 号染色体畸变与病理分级显著相关($P<0.01$)。4 个探针组合诊断膀胱移行上皮细胞癌的总阳性率为 46.6%,与临床分期无相关性($P>0.05$),但与病理分级显著相关($P<0.01$)。结论 FISH 技术检测有助于膀胱移行上皮细胞癌的诊断,并可用于探索染色体畸变与病理分级的关系。

关键词:膀胱; 癌,移行细胞; 原位杂交,荧光; 染色体畸变; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.21.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)21-2435-03

Clinical practice of fluorescence in situ hybridization in diagnosing bladder transitional cell carcinoma*

Yang Yuwei, Tang Jie, Chen Xiaohong, Xue Bingrong, Liu Yunshuang, Feng Jiafu[△]

(Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: Objective To investigate the value and significance of fluorescence in situ hybridization(FISH) in diagnosing bladder transitional cell carcinoma. **Methods** The probes of chromosome 3, 7, 17 centromeres and *p16* gene were labeled by random primer method. FISH was performed on interphase nuclei of exfoliated cells collected in urine and bladder washings in 103 samples of bladder transitional cell carcinoma, and analyzed the correlations between chromosome aberration or numerical abnormality with clinical stages and pathologic grades. **Results** The rate of aneuploidy was 41.7% for chromosome 3, 45.6% for chromosome 7, 31.1% for chromosome 17, and 55.3% for *p16* gene in bladder transitional cell carcinoma. All the aberrations had no correlation to clinical stages. The aberrations of chromosomes 3, 7, 17 were significantly correlated to pathologic grades ($P<0.01$), especially, chromosome 17. As using the 4 chromosome probes in combination, the sensitivity for diagnosing bladder transitional cell carcinoma was 46.6%, and had no correlation to clinical stages, but were significantly correlated to pathologic grades ($P<0.01$). **Conclusion** FISH detection may be helpful for diagnosing bladder transitional cell carcinoma, and can be used for exploration the relationship of chromosome aberrations and pathological grades.

Key words: urinary bladder; carcinoma, transitional cell; in situ hybridization, fluorescence; chromosome aberrations; diagnosis

膀胱癌是泌尿系统中最常见的肿瘤。近年来,中国部分城市肿瘤发病率报告显示膀胱癌发病率有增高趋势^[1]。膀胱癌中 90% 以上为移行上皮细胞癌,具有多病灶和高复发的特点,因此对于膀胱癌患者早期准确诊断和术后随访监测尤为重要。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^[2]。其具有快速、无创、敏感度高、特异性强等优点。国内外已有关于将 FISH 技术应用于尿路上皮癌诊断和术后监测的报道^[3-4]。本研究以本院临床及门诊患者为研究对象,运用 FISH 技术对膀胱癌移行上皮细胞患者与门诊健康人群泌尿道脱落细胞间期核中 3、7、17 号染色体着丝粒及 *p16* 基因异常情况进行检测比较,探讨 FISH 技术于膀胱移行上皮细胞癌诊断的应用前景。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 6 月至 2009 年 3 月四川省绵阳市中心医院泌尿科膀胱镜检查膀胱移行上皮细胞癌患者 103 例,其中男性 82 例,女性 21 例,年龄 35~87 岁,中位年龄 62 岁。根据国际联合抗癌协会(UICC)2002 年 TNM 分期标准和 1987 年改良 Bergkvist 分级标准,将该组膀胱癌患者分为:Ta 分期 6

例, T1 分期 45 例, T2 分期 40 例, T3 分期 9 例, T4 分期 3 例; G₀ 分级 5 例, G₁ 分级 38 例, G_{2A} 分级 31 例, G_{2B} 分级 19 例, G₃ 分级 10 例。所有病例均经病理诊断为膀胱移行上皮细胞癌。对照组为同期门诊健康人群 20 例,其中男性 15 例,女性 5 例,年龄 21~63 岁,中位 52 岁,与试验组患者间年龄、性别差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 标本的处理 收集门诊健康者 3~4 d 晨尿共 750~1 500 mL 或膀胱癌患者膀胱镜检查首次冲洗液 200~400 mL, 1 200~1 400 r/min 离心 10~15 min, 取沉淀物用胶原酶 II (每 5 mL 0.005 g Hank's BBS) 37 °C 水浴处理, 1 000 r/min 离心 10~15 min, 取沉淀物用 0.075 mol KCl 低渗溶液置于 37 °C 水浴 20~40 min, 缓慢加入 2 mL 甲醇/冰乙酸固定液(比例 3:1)预固定, 离心去上清液, 缓慢加入 5 mL 甲醇/冰乙酸固定液固定 2 次, 离心去上清液至适量体积, 制作成单细胞悬液, 将细胞悬液滴加于干净玻片上, 使细胞在全片分散适度, 无重叠和破损。置于 56 °C 环境中老化玻片 1~2 h 或室温下过夜老化玻片。

1.2.2 玻片预处理 将老化好的玻片置于 2×枸橼酸钠缓冲

* 基金项目:中华人民共和国卫生部科研基金课题(WKJ2007-3-001)。 △ 通讯作者, E-mail: jiafufeng@sina.com.cn。

液[SSC(pH7.0)]置于 37℃ 预热 30 min 至 1 h,用 37℃ 预热的含有胃蛋白酶(0.02 mg/mL)的 0.01 mol HCl 处理 8~10 min,室温下 2×SSC(pH7.0)溶液中漂洗玻片 2 次,每次 5 min。将玻片依次置于-20℃ 预冷的 70%乙醇、85%乙醇和 100%乙醇中脱水各 3 min,自然干燥玻片。加热玻片至 56℃,进行杂交试验。

1.2.3 原位杂交 在暗室按照膀胱癌 FISH 检测试剂盒(购自北京金菩嘉医疗科技有限公司)操作程序,将各探针和玻片置于 73℃ 环境中变性 6 min,探针置于 45~50℃ 环境中备用,同时将玻片依次置于-20℃ 预冷的 70%乙醇、85%乙醇和 100%乙醇中梯度脱水各 3 min,自然干燥玻片后,置 45~50℃ 烤片机上预热 2~5 min,将 10 μL 变性后的探针混合物滴加于杂交区域,加盖盖玻片(避免产生气泡),用封皮胶封片,42℃ 密封过夜。

1.2.4 玻片洗涤 在暗室移去盖玻片,立即将玻片置于 46℃ 预热的 50%(V/V)甲酰胺/2×SSC 溶液(pH7.0~8.0)洗涤 10 min,洗涤 3 次。用 46℃ 预热的 2×SSC 溶液(pH7.0)洗涤 10 min。用 46℃ 预热的 2×SSC/0.1% NP-40 洗液(pH 7.0)洗涤 5 min。室温置于 70%乙醇溶液中,浸泡 3 min。自然干燥后,DAPI 复染 15 min,封片。

1.2.5 结果观察和判断 荧光显微镜下观察,通过 Imstar FISH 软件控制的 CCD(ProgRes MFcool)摄取图像,每例分析 100~200 个间期细胞核,细胞重叠、破损、未去除细胞质的细胞核不计数,微弱杂交信号不计数,细胞内杂交信号互相靠近者计为一个信号。以 20 例门诊健康者检测结果设定阴性对照,参考国内外文献报道的阳性阈值,制定判断标准。

1.3 统计学处理 各染色体畸变率的比较用 χ^2 检验,二者的相关性用 r 表示。采用 SPSS17.0 统计软件处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 探针阳性判定标准的设定 根据获得的实验结果计算出

各染色体探针检测阳性信号百分比 3s 限值(表 1),均小于国内外文献报道的阳性阈值,证明本研究所用探针灵敏度和可信度均接近国内外标准,故用“无杂交信号和单个杂交信号的核比例大于 15%,3 个及多个杂交信号的核比例大于 10%”标准判断该探针检测结果为阳性。组合探针阳性判断标准参照试剂盒标准:同时出现 2 种以上探针检测结果阳性者,判为组合探针检测阳性。

2.2 103 例膀胱移行上皮细胞癌患者尿脱落细胞各染色体探针杂交信号分析 4 种探针的异常表达率均较高,90 例(87.4%)患者存在至少 1 个上述染色体或区带的异常。3、7 和 17 号染色体畸变率分别为 41.7%(43/103)、45.6%(47/103)和 31.1%(32/103),均以多倍体为主,3 种染色体单体出现比例分别为 6.8%(7/103)、10.7%(11/103)和 11.7%(12/103);p16 畸变率为 55.3%(57/103),其中单体 36.9%(38/103)、混合性缺失 12.6%(13/103)、多倍体 5.8%(6/103)。结果见表 2。

表 1 门诊对照组各染色体探针杂交信号 3s 限值(%)		
探针	1 个以下杂交信号点	3 个以上杂交信号点
CSP 3	6.8	9.2
CSP 7	5.8	8.0
GLP p16	12.0	6.4
GLP 17	7.9	9.8

表 2 103 例膀胱移行上皮细胞癌患者尿脱落细胞各染色体探针杂交信号分析[n=103,n(%)]

探针	混合性缺失 (0、1 个信号)	单体 (1 个信号)	多倍体 (3 个以上信号)
GLP p16	13(12.6)	38(36.9)	6(5.8)
CSP 3	2(1.9)	7(6.8)	34(33.0)
CSP 7	10(9.7)	11(10.7)	26(25.2)
GLP 17	0(0.0)	12(11.7)	20(19.4)

表 3 不同临床分期、病理分级膀胱移行上皮细胞癌患者尿脱落细胞各染色体异常情况[n(%)]

分组	n	CSP3	CSP7	CSP17	p16	组合诊断阳性率
临床分期						
Ta	6	1(16.7)	1(16.7)	0(0.0)	2(33.3)	1(16.7)
T1	45	15(33.3)	19(42.2)	9(20.0)	25(55.6)	21(46.7)
T2	40	19(47.5)	17(42.5)	16(40.0)	20(50.0)	19(47.5)
T3	9	6(66.7)	7(77.8)	5(55.6)	7(77.8)	5(55.6)
T4	3	2(66.7)	3(100.0)	2(66.7)	3(100.0)	2(66.7)
χ^2		6.285	7.837	7.117	5.371	2.917
P		0.160	0.082	0.106	0.243	0.605
病理分级						
G ₀	5	2(40.0)	2(40.0)	1(20.0)	5(100.0)	2(40.0)
G ₁	38	13(34.2)	16(42.1)	5(13.2)	17(44.7)	13(34.2)
G _{2A}	31	11(35.5)	12(38.7)	8(25.8)	15(48.4)	15(48.4)
G _{2B}	19	10(52.6)	11(57.9)	11(57.9)	14(73.7)	12(63.2)
G ₃	10	7(70.0)	6(60.0)	7(70.0)	6(60.0)	7(70.0)
χ^2		9.876	10.334	20.302	3.592	12.183
P		0.041	0.033	0.000	0.471	0.014

2.3 不同临床分期、病理分级膀胱移行上皮细胞癌患者尿脱落细胞各染色体异常情况 CSP3、CSP7 和 CSP 17 号染色体异常与临床分期无相关性($P>0.05$),但与病理分级有相关性($P<0.05$),其中 17 号染色体异常与病理分级显著相关($P<0.01$)。p16 基因畸变与临床分期、病理分级均无相关性($P>0.05$)。3、7 和 17 号染色体畸变之间显著相关,3 者间统计值

分别为[$\chi^2=28.802,r=0.529$ (CSP 3 vs CSP 7)],[$\chi^2=43.326,r=0.649$ (CSP 7 vs CSP 17)],[$\chi^2=35.959,r=0.623$ (CSP 3 vs CSP 17)], P 值均为 0.000,在部分病例中此 3 者都发生变化,但是这 3 个染色体的畸变与 p16 的畸变无相关性,统计值分别为[$\chi^2=2.588,P=0.091,r=0.166$ (p16 vs CSP 3)],[$\chi^2=0.155,P=0.859,r=-0.017$ (p16 vs CSP 7)],[χ^2

$=1.987, P=0.159, r=0.139(p16 \text{ vs CSP } 17)]$ 。根据试剂盒组合探针阳性判断标准,4 种探针组合诊断膀胱癌的总阳性率为 46.6%;阳性率与临床分期无相关性($P>0.05$),但与病理分级显著相关($P<0.01$),G₃ 级肿瘤组合探针阳性率显著高于其他各级肿瘤,见表 3。

3 讨 论

泌尿系统最常见的肿瘤膀胱癌近年来发病趋势逐年升高,大量研究资料表明,多数膀胱癌由癌基因诱导形成,环境因素、吸烟、长期慢性感染或异物刺激成为膀胱癌诱发因素的原因所在,这些因素最终导致了癌基因的激活或抑癌基因的失活。Sandberg 和 Berger^[5]在对泌尿系统肿瘤染色体研究中发现,膀胱癌患者膀胱移行细胞多发生非随机性染色体改变,包括染色体结构畸变和(或)数目异常。常见的发生结构畸变的有 3、9、15、11、21、17 号染色体,而数目异常的有 3、9、7、10、11、Y、1、8、17、15 号染色体^[6]。目前,用于膀胱癌诊断研究的染色体主要有 3、7、9、11 和 17 号染色体。

据报道,3 号染色体异常在膀胱移行细胞癌患者中约占 30%,主要表现为染色体移位或数量变化,且常与其他染色体异常并存^[5,7]。7 号染色体异常可单独出现在膀胱癌细胞中,但更多情况下还伴随了其他染色体异常,其异常以三倍体多见,可能与膀胱癌的复发和浸润性膀胱癌关系密切,有报道 7 号染色体倍数与肿瘤分期、分级密切相关,可用于预测肿瘤的浸润性。17 号染色体畸变在膀胱癌中也很常见,多个研究发现 17 号染色体高多倍体(五倍体或更多)对肿瘤进展有预测价值,有此改变的患者具有更大风险的发展为肌浸润^[5,7-8]。*p16* 基因是 1993 年有研究者确定的一个编码人类周期素依赖性激酶 4(CDK4)抑制因子(*p16*)的基因,属抑癌因子,在 9p21 区域存在一个 *p16* 的完整编码序列和两个内含子,其缺失参与了多种类型肿瘤包括膀胱癌的发生和发展^[9-10]。

本研究结果证明了本试剂盒各探针的灵敏度和可信度均接近国内外标准,故设立了染色体异常判定标准:无杂交信号和单个杂交信号的核比例大于 15%,三个及多个杂交信号的核比例大于 10%,判为该探针检测结果阳性。组合探针阳性判断标准参照试剂盒标准:同时出现 2 种以上探针检测结果阳性者,判为组合探针检测阳性。

本研究结果与国内外的研究基本相符,*p16* 畸变率和组合诊断率略低于国内外研究,可能与入种、地域差异有关,另外国外主要采用的是 9p21 区带探针,这也可能是导致这一探针检测灵敏度产生差异的原因之一。FISH 技术可以与临床其他

诊断技术共同用于膀胱癌的诊断和复发检测,可提高诊断阳性率,提早发现复发肿瘤,指导临床治疗以期获得良好转归。但同时也需要研究人员努力寻找更适用于中国人群的基因探针组,以提高 FISH 技术对膀胱癌早期诊断和复发监测的敏感性。

参考文献

[1] 全国肿瘤研究办公室,卫生部统计信心中心. 中国试点县、市 恶性肿瘤的发病与死亡[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:24-34.

[2] Pinkel D, Straume T, Gray J. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(9):2934-2938.

[3] Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine[J]. Mol Diagn, 2000, 2(3):116-123.

[4] Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of bladder transitional cell carcinoma[J]. J Urol, 2000, 164(5):1768-1775.

[5] Sandberg AA, Berger CS. Review of chromosome studies in urological tumors. III. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer[J]. Urol, 1994, 151(3):545-560.

[6] 余凯远, 翁志梁, 李澄棣. 尿脱落细胞荧光原位杂交技术诊断膀胱癌的价值[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2005, 25(4):449-452.

[7] Vanni R, Scarpa RM, Nieddu M, et al. Cytogenetic investigation on 30 bladder carcinomas[J]. Cancer Genet Cytogenet, 1988, 30(1):35-42.

[8] Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, et al. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer[J]. Cancer Res, 1991, 51(14):3807-3813.

[9] Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. Nature, 1993, 366(6456):704-707.

[10] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 264(5157):436-440.

(收稿日期:2010-10-09)

(上接第 2434 页)

3 讨 论

从血型反性别遗传现象不仅可以预知下一辈子女的血型及遗传趋势,而且有可能推定上一辈父或母的血型,从而完整地体现出一个家族的血型趋势及走向,并建立血型家谱图。在本研究拟就的条件下,ABO 血型系统存在反性别遗传模式,其基因遗传频率为 50%~100%。ABO 血型系统反性别遗传现象有其必然的规律性,但是由于缺乏相应的研究报告及文献,因而只能作出上述初步结论,并供进一步研究论证^[1]。

参考文献

[1] 唐爱华, 祝卫平. ABO 血型系统反性别遗传现象的发现与分析[J]. 医学实验室与临床, 2007, 14(3):1-3.

[2] 喻琼, 吴国光, 梁延连, 等. 一个中国汉族 ABO 血型 B 亚型家系中

发现新的 B 等位基因[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(2):129-133.

[3] 喻琼. ABO 血型基因研究进展[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(1):75-80.

[4] 陶苏丹, 和艳敏, 应燕玲, 等. ABO 血型新等位基因 O61 的分子生物学研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(5):1327-1330.

[5] Liop RE, Henríquez BH, Morage VM, et al. Molecular characterization of ABO * O alleles at the ABO group Locus in these Chilean populations[J]. Rev Med Chil, 2006, 134(7):833-840.

[6] 陶苏丹, 和艳敏, 应燕玲, 等. 一例 ABO 新等位基因 B112 的分子生物学研究及其家系分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(4):469-472.

(收稿日期:2011-07-21)