

• 检验技术与方法 •

建立荧光原位杂交法快速检测膀胱癌

熊传银¹, 潘小平², 傅泳航³, 洪晓绿⁴, 赖全国²

(1. 广州市中西医结合医院检验科, 广东广州 510000; 2. 广州市花都区人民医院检验科, 广东广州 510800; 3. 中国人民解放军第四五八医院检验科, 广东广州 510800; 4. 广州市花都区人民医院感染科, 广东广州 510800)

摘要:目的 建立全细胞荧光原位杂交法(FISH)检测膀胱上皮癌(BUC), 并与细胞学检测比较, 评价其检测 BUC 的临床应用价值。方法 针对易引起膀胱癌常见的 4 条染色体, 用不同的荧光素分别对其进行标记, 建立 FISH 法, 对 180 份疑似患有 BUC 患者尿液同时进行 FISH 和细胞学检测, 评价 FISH 检测 BUC 的临床应用价值。结果 建立的 FISH 法检测结果稳定, 在 180 例疑似 BUC 患者当中, 128 例经病理证实为 BUC, 在 BUC 患者中 FISH 总体检测出 84 (65.6%) 例阳性标本, 而细胞学检测只检测出 45 (35.2%) 例, 无论从 BUC 的病理类型(表浅性和侵袭性)、分化程度(低度恶性和高度恶性)还是患者是否有 BUC 史方面分析, FISH 法的敏感性均明显高于细胞学检测($P < 0.01$), 但它们之间的特异比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在 BUC 检测上, FISH 优于细胞学检测, 可能为 BUC 的诊断提供快捷、有效的诊断依据。

关键词:原位杂交; 膀胱肿瘤; 细胞学检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.050

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2892-03

膀胱上皮癌(bladder urothelia carcinoma, BUC), 简称膀胱癌, 是泌尿系统中发病率最高的肿瘤, 约占中国所有恶性肿瘤发病的 20% 左右; 它多发于男性, 男女发病的比例约为 3:1; 发病年龄多在 50 岁以上且随年龄增大而发病率增加, 近 2/3 的患者是 65 岁以上的老人。BUC 早期表现大多局限于膀胱, 但约有 6% 患者已有远处转移。各临床分期的 BUC, 包括早期疾病, 治疗后复发率都非常高。复发后的 BUC 生物学行为和原发疾病显著不同, 往往向更高的临床分期和病理分化级别发展^[1]。为此, 针对 BUC 的早期诊断和术后监测成为疾病治疗中关键的一个部分。大量研究表明, 基因的改变与 BUC 的病因、进展以及治疗预后有关^[2], 其中 3、7、9、17 号染色体与 BUC 的发生和进展关系密切^[3-4], 而人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 的扩增与 BUC 预后不良相关^[5]。因此, 本研究用不同的荧光素标记 3、7 及 17 号染色体的着丝粒以及 9 号染色体的 p16 位点, 建立全细胞荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH), 可快速检测这些染色体的改变, 为 BUC 的早期诊断以及术后监测提供及时有效的依据。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 选取广州市中西医结合医院 2009 年 6 月 1 日至 2012 年 9 月 10 日门诊或住院部疑似患有 BUC 患者 180 例, 其中, 男 107 例, 女 73 例; 平均年龄(59.7 ± 11.8) 岁, 所有患者均被告知参与本项研究, 且自愿接受膀胱镜检查, 其中 150 例患者在膀胱镜下可见膀胱损伤, 将损伤的膀胱组织切除部分做病理切片, 其中, 128 例患者被证实患有 BUC。

1.2 标本的构成及分类 膀胱镜检查: 乳头状 84 例; 结节状 20 例; 无蒂状 15 例; 黏膜红斑, 但无明显肉眼可见肿瘤 31 例。病理分型: pTis 8 例, pTa 56 例, pT1 42 例, pT2 22 例; 低度恶性 82 例, 高度恶性 46 例, 有 BUC 史 57 例, 无 BUC 史 71 例。

1.3 主要试剂及仪器 主要仪器包括 FISH 成像分析系统、杂交仪、恒温水箱、烤片机、立式考普林瓶、计时器、水银温度计、移液器、pH 计、载玻片、盖玻片、离心管等。主要试剂: 染色体探针、缓冲贮存液 ($20 \times \text{SSC}$, pH5.3)、缓冲液 ($2 \times \text{SSC}$, pH7.0 $\pm$ 0.2)、变性液 [70% (v/v) 甲酰胺/ $2 \times \text{SSC}$, pH7.0 $\sim$ 8.0]、乙醇、甲酰胺洗涤液 [50% (v/v) 甲酰胺/ $2 \times \text{SSC}$]、洗涤液 [0.1% NP-40/ $2 \times \text{SSC}$, pH(7.0 $\pm$ 0.2)], 胶原酶 B (1 mg/mL

Hank's BSS), 固定液(甲醇:冰乙酸体积比为 3:1), 胃蛋白酶工作液 (0.08 mg/mL), KCl 低渗液等。以上试剂和仪器均购自北京金菩嘉公司。

1.4 试验方法 参照 Knowles 等^[3]研究的方法在本实验室条件下作如下改良: (1) 收集细胞。收集至少 200 mL 尿液(晨尿最佳)置于离心管中, 1 500 r/m, 离心 10 min。 (2) 胶原酶消化。去上清液, 加入 5 mL 胶原酶 B 溶液, 用力吹打悬浮细胞, 37 °C 水浴温育 20~30 min 后 1 500 r/m, 离心 10 min。 (3) 低渗。去上清液, 加入 5 mL 预热至 37 °C 的去离子水, 吹打悬浮细胞, 37 °C 水浴温育 20 min 后加固定液 2 mL, 混匀, 1500 r/m, 离心 10 min。 (4) 固定。去上清液, 加入 5 mL 固定液, 混匀, 静置 10 min 后 1 500 r/m, 离心 10 min。 (5) 重复步骤(3)和步骤(4)两次。 (6) 制片。去上清液, 加适量固定液, 制成细胞悬液, 吸取少量, 滴至载玻片上, 自然晾干。 (7) 老化玻片。室温放置玻片过夜或 56 °C 烤片至少 30 min。 (8) 待老化的玻片冷却后, 置于 37 °C $2 \times \text{SSC}$ 溶液中浸泡 10 min。 (9) 洗涤玻片后置于 37 °C 浓度为 0.08 mg/mL 的胃蛋白酶液中浸泡 10 min。 (10) 洗涤玻片后, 再将玻片依次置于 70% 乙醇、85% 乙醇和 100% 乙醇中各 2 min 脱水, 自然晾干玻片。 (11) 将玻片置于 73 °C $\sim$ 78 °C 的变性液中浸泡 5 min, 然后依次置于 -20 °C 预冷的 70% 的乙醇、85% 的乙醇和 100% 乙醇中各 2 min 进行脱水, 自然晾干玻片。 (12) 将杂交缓冲液 7.0 μL , 去离子水 1.0 μL , 探针 2.0 μL 一起加入微量离心管中, 离心 1~3 s 后, 置于 73 °C 水箱中变性 5 min。 (13) 将 10 μL 变性后的探针混合物滴于玻片杂交区域, 盖上盖玻片, 用封片胶封好后置于 42 °C 杂交仪中杂交过夜。 (14) 移去盖玻片立即将玻片置于 50% 甲酰胺/ $2 \times \text{SSC}$ 溶液中漂洗 3 min, 后置于 0.1% NP-40/ $2 \times \text{SSC}$ 溶液中漂洗 5 min, 再置入 70% 乙醇中漂洗 3 min。在暗处自然晾干玻片。 (15) 将 15 μL 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 复染剂滴加于杂交区域, 盖上盖玻片, 10~20 min 后, 观察结果。 (16) 结果判断。随机计数 50 个细胞, 若 90% 以上的细胞显示正常信号则提示为正常标本, 60% 以上细胞出现异常信号则提示为异常标本, 如果无法判断则扩大计数至 100 个细胞, 以判断最后结果。正常和异常信号的判断根据试剂盒要求鉴定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计

数资料用 χ^2 检验,率比较采用 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 方法学建立结果 用 FISH 法检测了 180 例疑似 BUC 患者的尿液标本,阴、阳性结果的鉴定根据试剂盒特性,在荧光显微镜下可见特异性荧光颜色,附图 1 为 3、7 号染色体探针组阴性结果,在荧光显微镜下可见 2 个 3 号染色体着丝粒探针信号(绿色)以及 2 个 7 号染色体着丝粒探针信号(红色);附图 2 为 9、17 号染色体探针组阴性结果,在荧光显微镜下可见 17 号染色体着丝粒探针信号(绿色)和 9 号染色体特异性序列探针信号(红色);附图 3 为 3、7 号染色体异常图像之一,在荧光显微镜下可见 7 号染色体的两个红色信号(正常)和 3 个 3 号染色体的绿色信号(异常);附图 4 为 9、17 号染色体异常图像之一,在荧光显微镜下可见多个红色和绿色信号(异常),说明该标本中 9 号染色体的特异性序列 p16 基因有扩增以及 17 号染色体有非整倍体扩增,附图 1~4 见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”。

表 1 FISH 和细胞学检测特异性和敏感性之间的比较

病理情况	FISH [n/n(%)]	细胞学检测 [n/n(%)]	P
总体			
敏感性	84/128(65.6)	45/128(35.2)	<0.01
特异性	48/52(92.3)	50/52(96.2)	>0.05
有 BUC 史			
敏感性	41/57(74.1)	25/57(43.9)	<0.01
特异性	5/8(62.5)	7/8(87.5)	>0.05
无 BUC 史			
敏感性	41/71(57.7)	21/71(29.6)	<0.01
特异性	41/44(93.2)	43/44(97.7)	>0.05
表浅性肿瘤((pTis、 pTa 和 pT1)			
敏感性	56/106(52.8)	34/106(32.1)	<0.01
特异性	43/45(95.6)	44/45(97.8)	>0.05
侵袭性肿瘤(pT2)			
敏感性	20/22(90.9)	14/22(63.6)	<0.05
特异性	7/9(77.8)	8/9(97.8)	>0.05
低度恶性肿瘤			
敏感性	44/82(53.7)	26/82(31.7)	<0.01
特异性	38/40(95.0)	39/40(97.5)	>0.05
高度恶性肿瘤			
敏感性	35/46(76.1)	21/46(45.6)	<0.01
特异性	11/14(78.6)	14/14(100.0)	>0.05

2.2 临床标本检测结果 在本研究的 128 例 BUC 患者中, FISH 检出 84 例阳性(65.6%),而细胞学检测只检出 45 例阳性(35.2%),两者之间检测的敏感性有显著性差异($P<0.01$),但特异性并无太大差异($P>0.05$)。本研究中有 BUC 史的 57 例, FISH 检测出阳性 41 例(74.1%),而细胞学检测出阳性的 25 例(43.9%),两种检测方法的敏感性存在显著性差异($P<0.01$),而在 71 例无 BUC 史患者中, FISH 检出 41 例阳性(57.7%),而细胞学检测只检出 25 例阳性(43.9%),两种检测方法的敏感性仍然存在显著性差异($P<0.01$),但它们之间的特异性差异无统计学意义($P>0.05$)。另外, FISH 和细胞学检测在检测表浅性肿瘤(pTis、pTa 和 pT1)时的敏感性分别为 52.8%和 32.1%($P<0.01$),在检测侵袭性肿瘤(pT2)时的敏感性分别为 90.9%和 63.6%($P<0.05$)。此外, FISH 和

细胞学检测在检测低度恶性肿瘤时的敏感性分别为 53.7%和 31.7%($P<0.01$),在检测高度恶性肿瘤时的敏感性分别为 76.1%和 45.6%($P<0.01$),但两种检测方法之间的特异性并没有显著性差异($P>0.05$)。两种检测方法的特异性和敏感性比较见表 1。在 22 例膀胱镜下可见损伤而病理证实为非 BUC 标本中, FISH 检测均为阴性。

3 讨 论

大部分泌尿道上皮肿瘤是一种表浅的低度恶性肿瘤,且能经尿道切除术或加以膀胱内放化疗治愈,但肿瘤的复发率高达 80%,10%~15%的肿瘤能发展成高度恶性肿瘤,需要根治性膀胱切除术治疗^[6],因此,泌尿道肿瘤的治疗重要是防止肿瘤的复发和阻止肿瘤的进展。

膀胱镜加细胞学检查是诊断和检测 BUC 的金标准。然而,膀胱镜检查是一个侵入性的检查且容易漏检,细胞学检测对低级别或初期的肿瘤缺乏敏感性^[7-8],虽然其他的生物或化学技术也应用于 BUC 的检测,但它们特异性较差^[9-11]。

FISH 是一种基于细胞遗传学的检测技术,利用荧光素标记的 DNA 探针或染色体的着丝粒或基因的特异性序列杂交,以检测恶性肿瘤染色体数量异常或结构改变。

在本研究中, FISH 在检测 BUC 时敏感性明显高于细胞学检测,在 128 例证实有 BUC 患者的尿液标本中, FISH 检测出阳性 84(65.6%)例,而细胞学检测只有 45(35.2%)例阳性,2 种方法的敏感性存在显著性差异。另外,从 BUC 所表现的类型、肿瘤的分化程度以及有无 BUC 史三方面来比较两者之间差别, FISH 的敏感性均高于细胞学检测,但特异性并无太大差异。也有研究表明, FISH 的敏感性和特异性均高于细胞学检测^[12],这与本研究不一致。

然而,本研究的敏感性仍低于前人的许多研究^[13-14],可能的原因有:(1)肿瘤自身的条件决定其敏感性和特异性存在差异。肿瘤的大小,肿瘤的分化程度以及肿瘤所处的时期与检测的特异性和敏感性有关^[15]。(2)收集标本的方式。通过膀胱镜或膀胱冲洗液收集的尿液比直接排出体外的尿液检测的敏感性高^[16]。(3)统计的方式不同。在其他研究中,只统计证实患有 BUC 患者的例数,而本研究统计的例数除证实患有 BUC 外,还包括接受经尿道前列腺切除术的良性前列腺增生患者,即疑似患有 BUC 患者;(4) FISH 阳性的判读标准不一。目前,关于判读 FISH 阳性的标准还不统一^[17],各个实验室根据自己的试验条件和其他的检查来确定阳性标准,而本研究只是将 4 个指标中,有 2 个或 2 个以上指标异常者,或一个指标有复杂异常者定义为阳性结果,并没将一个指标出现异常而怀疑 BUC 患者统计在内。

综上所述,同细胞学检测相比较,本研究建立的 FISH 法可特异、敏感地检测出 BUC,为 BUC 的诊断提供一条快捷有效的途径,宜在临床实验室推广应用。

参考文献

[1] Matanoski GM, Elliott EA. Bladder cancer epidemiology[J]. Epidemiol Rev, 1981, 3: 203-229.
[2] Kausch I, Böhle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer[J]. Eur Urol, 2002, 41(1): 15-29.
[3] Knowles MA. The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application[J]. BJU Int, 1999, 84(4): 412-427.
[4] Cianciulli AM, Leonardo C, Guadagni F, et al. Genetic instability

in superficial bladder Cancer and adjacent mucosa; an interphase cytogenetic study[J]. Hum Pathol, 2003, 34(3): 214-221.

[5] Miyamoto H, Kubota Y, Noguchi S, et al. C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder Cancer[J]. Urology, 2000, 55(5): 679-683.

[6] Raghavan D, Shipley W, Garnick MB, et al. Biology and management of bladder Cancer[J]. N Engl J Med, 1990(322): 1129-1138.

[7] Maier U, Simak R, Neuhold N. The clinical value of urinary cytology: 12 years of experience with 615 patients[J]. J Clin Pathol, 1995, 48(4): 314-317.

[8] Konety BR, Getzenberg RH. Urine based markers of urological malignancy[J]. J Urol, 2001, 165(4): 600-611.

[9] Lokeshwar VB, Soloway MS. Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity[J]. J Urol, 2001, 165(4): 1067-1077.

[10] Glas AS, Roos D, Deutekom M, et al. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review[J]. J Urol, 2003, 169(6): 1975-1982.

[11] Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses[J]. Urology, 2003, 61(1): 109-118.

[12] Kwak KW, Kim SH, Lee HM. The utility of fluorescence in situ hybridization for detection of bladder urothelial carcinoma in routine clinical practice[J]. J Korean Med Sci, 2009, 24(6): 1139-1144.

[14] Placer J, Espinet B, Salido M, et al. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder Cancer and its recurrences, compared with urinary cytology[J]. Eur Urol, 2002, 42(6): 547-552.

[15] Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, et al. Clinical evaluation of a multitarget fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder Cancer[J]. J Urol, 2002, 168(5): 1950-1954.

[16] Boman H, Hedelin H, Holmög S. Four bladder tumor markers have a disappointingly low sensitivity for small size and low grade recurrence[J]. J Urol, 2002, 167(1): 80-83.

[17] Bhuiyan J, Akhter J, O' Kane DJ. Performance characteristics of multiple urinary tumor markers and sample collection techniques in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Clin Chim Acta, 2003, 331(1/2): 69-77.

[18] Junker K, Fritsch T, Hartmann A, et al. Multicolor fluorescence in situ hybridization(M-FISH) on cells from urine for the detection of bladder Cancer[J]. Cytogenet Genome Res, 2006, 114(3/4): 279-283.

(收稿日期: 2013-05-28)

• 检验技术与方法 •

血清组织蛋白酶 D 水平与胃癌患者临床病理特征的关系

熊海燕, 史小波, 谢 玮

(南通市第一人民医院检验科, 江苏南通 226001)

摘 要:目的 探讨胃癌患者血清 Cath-D 浓度的变化及其与临床病理特征的关系。方法 选择原发性胃癌患者 68 例作为胃癌组, 将同期接受正常体检的 30 例健康者作为对照组。检测胃癌组患者血清 Cath-D 浓度, 并分析其与临床病理特征的关系。结果 胃癌组患者血清 Cath-D 浓度为 (52.13 ± 9.12) pmol/mL, 明显高于对照组 $[(36.25 \pm 6.12)$ pmol/mL], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。血清 Cath-D 浓度与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移及临床分期有关 ($P < 0.05$)。结论 血清 Cath-D 水平与胃癌临床病理特征密切相关, 可作为判断胃癌生物学行为和预后的重要指标。

关键词: 胃肿瘤; 组织蛋白酶 D; 病理特征; 预后; 血清

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.051 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)21-2894-02

胃癌是中国常见的消化道恶性肿瘤, 由于易发生浸润和转移, 患者术后 5 年生存率较低^[1]。近年来研究提示, 胃癌的发生、发展过程与组织蛋白酶 D (cathepsin-D, Cath-D) 的浓度变化密切相关^[2-3]。为探讨胃癌患者血清 Cath-D 浓度的变化, 笔者检测了胃癌患者血清 Cath-D 浓度, 并分析了 Cath-D 与临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2009 年 2 月至 2012 年 10 月收治的原发性胃癌患者 68 例作为胃癌组, 其中, 男 50 例, 女 18 例; 年龄 (53.61 ± 12.53) 岁。组织学分化 I 级, 即高分化乳头状(或管状)腺癌 15 例; II 级, 即中分化管状腺癌 20 例; III 级, 即低分化腺癌、黏液细胞癌和黏液腺癌共 33 例。淋巴结有无转移、肿瘤浸润深度、有无胃外器官转移等以术中记录、术后病理证实为准。将同期接受正常体检的 30 例健康者作为对照组, 其中, 男 21 例, 女 9 例; 年龄 (47.47 ± 13.79) 岁, 均无肝、肾、生殖等系统疾病。

1.2 主要试剂与仪器 试剂盒纯牛脾 Cath-D、血红蛋白购自美国 Sigma 公司, 主要仪器为 755B 型紫外可见分光光度计, 为

上海仪电分析仪器有限公司产品。

1.3 标本采集 全部患者术前采集静脉血 2 mL, $4\ 000 \times g$ 离心 5 min, 所有标本均无溶血、脂血, 收集血清后置 $-70\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.4 检测方法^[4] 取血清 150 μL 4 份, 分别加入 pH 3.5 的 1.0 mol/L 甲酸液 100 μL 和 5% 血红蛋白 150 μL , 混匀, 其中 2 份先加入 3% 醋酸 2 mL, 终止反应后于 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴中温育 8 h, 作为样本空白对照; 另 2 份, 先于 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴中温育 8 h 后加入 3% 醋酸 2 mL 终止反应。再取纯 Cath-D 液 150 μL 及生理盐水 150 μL 分别作为标准管及空白管, 分别加入 pH 3.5 的 1.0 mol/L 甲酸液 100 μL 和 5% 血红蛋白 150 μL 混匀, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴中温育 8 h 后加入 3% 醋酸 2 mL 终止反应。在波长 280 nm 处测定各管的光密度 (optical density, OD) 值, 测定管 OD 值平均值减去样本空白对照平均 OD 值, 并在纯牛脾 Cath-D 标准曲线上查对样本的 Cath-D 活性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。