

• 检验技术与方法 •

FISH 技术及细胞学技术检测尿脱落细胞对膀胱尿路上皮肿瘤诊断价值研究

陈 伟¹, 伊惠霞^{2△}, 张 睿¹

(1. 沙湾县人民医院检验科, 新疆塔城 832100; 2. 新疆医科大学第一附属医院
医学检验中心, 新疆乌鲁木齐 830054)

摘 要:目的 比较荧光原位杂交(FISH)技术及细胞学技术检测尿脱落细胞对膀胱尿路上皮肿瘤诊断价值。方法 采用 CSP3/CSP7 组合探针和 GLPp16/CSP17 组合探针对膀胱尿路上皮肿瘤疑似患者的尿脱落细胞进行 FISH 检测, 同时采用细胞学技术检测尿脱落细胞, 比较 2 种方法的灵敏度和特异度。结果 FISH 技术筛查膀胱尿路上皮肿瘤的灵敏度和特异度分别为 92.5% 和 85.0%, 细胞学技术的灵敏度和特异度分别为 27.5% 和 90.0%。FISH 技术的灵敏度显著高于细胞学技术($P<0.05$), 但 2 种方法的特异度差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 FISH 技术有望成为筛查膀胱尿路上皮肿瘤的新方法。

关键词: 荧光原位杂交; 脱落细胞; 细胞学诊断; 尿路上皮肿瘤; 膀胱

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)22-3094-03

Research on the diagnostic values of the detection of urine exfoliated cells by FISH and cytologic technology in bladder urothelial tumor

Chen Wei¹, Yi Huixia^{2△}, Zhang Rui¹

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Shawan County, Tacheng, Xinjiang 832100, China;

2. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang

Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To compare the diagnostic values of the detection of urine exfoliated cells by FISH and cytology technology in bladder urothelial tumor. **Methods** The combination probes of CSP3/CSP7 and GLPp16/CSP17 were both used in the FISH detection of urine exfoliated cells from suspected patients with bladder urothelial tumor. The urine exfoliated cells were detected by cytology technology at the same time. The sensitivity and the specificity of the two methods were compared. **Results** The sensitivity and specificity of FISH for bladder urothelial tumor screening were 92.5% and 85.0% respectively, and those of cytology technology were 27.5% and 90.0% respectively. The sensitivity of FISH was significantly higher than that of cytology technology ($P<0.05$), however, the specificity differences between FISH and cytology technology were not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** FISH is expected to become a new method for the screening of bladder urothelial tumor.

Key words: fluorescence in situ hybridization; exfoliated cells; cytologic diagnose; urothelial tumors; bladder

膀胱尿路上皮肿瘤是一种恶性程度较高的泌尿生殖系统肿瘤, 其发病率及复发率都比较高, 其病理学表现主要是移行性膀胱尿路上皮肿瘤, 对人类健康有严重威胁。美国癌症协会研究预计膀胱系统肿瘤将成为高发癌症第 5 位。截止到 2010 年, 有 14 680 例患者死于膀胱肿瘤, 同期新增患者 70 530 例^[1-2]。有研究者报道了使用 3、7、17 号染色体着丝粒区域探针以及定位 p16 抑癌基因的 9p21 位点特异探针在患者尿液中进行膀胱癌的检测^[3]。近 20 年, 随着对膀胱癌遗传学的深入研究, 研究者发现, 膀胱癌的发生与 3、7、17、9 号染色体 p16 位点缺失密切相关^[4]。膀胱镜检和尿脱落细胞学检查是目前用于诊断和检测膀胱癌的主要手段, 其中膀胱镜检查具有创伤性, 并且难以发现微小病变及肿瘤^[5]; 尿脱落细胞学检查具有方便、无创等优点, 但灵敏度不高, 且诊断膀胱癌和检测肿瘤复发准确性较差。因此, 需要寻找一种准确、无创、简便的诊断及检测膀胱尿路上皮肿瘤的方法。此项目在中国开展较晚, 对其产生误诊原因的分析和研究较少。本院于 2010 年正式开展该项检测, 主要比较荧光原位杂交(FISH)技术与细胞学技术在膀胱尿路上皮肿瘤检测中的灵敏度与特异度, 用于评估 FISH 在新疆人群中筛查膀胱尿路上皮肿瘤的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 20 例健康成人作为对照组, 用 FISH 法

测定结果确定阈值, 其中女 9 例, 男 11 例, 年龄 23~65 岁, 平均 45 岁。选取 2012 年 9 月至 2013 年 3 月新疆医科大学第一附属医院膀胱尿路上皮肿瘤疑似患者标本 80 例(有肉眼血尿症状或影像学可疑表现)作为病例组, 其中女 26 例, 男 54 例, 年龄 32~83 岁, 平均年龄 65 岁。本课题通过了医院伦理委员会批准, 在实验前通过签署知情同意书的形式告知患者。

1.2 标本收集 一次性收集健康人新鲜晨尿 250~400 mL, 平均 352 mL, 用于 FISH 检测。膀胱尿路上皮肿瘤疑似患者在进行膀胱镜检查或病理活检前收集新鲜尿液标本, 并且连续 3 d, 第 1 天收集 250~400 mL, 分别用于细胞学常规检查和 FISH 检测, 第 2、3 天每天收集新鲜尿液约 20 mL 用于细胞学常规检查。

1.3 方法

1.3.1 FISH 探针制备 FISH 技术使用的 3、7、17 号染色体着丝粒探针和 9p21 区带 p16 探针, 购自北京金菩嘉医疗科技有限公司。探针有 2 组: CSP3/CSP7 组合探针、GLPp16/CSP17 组合探针。CSP3、GLPp16 由四甲基罗丹明标记, 荧光显微镜下呈红色信号, CSP7、CSP17 由细胞绿标记, 荧光显微镜下呈绿色信号。

1.3.2 制备尿液脱落细胞玻片标本 留取患者晨尿 150~200 mL, 1 500 r/min, 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀的脱落细胞

经过 PBS 清洗,胶原酶 B 消化、加入 KCl 低渗溶液、采用固定液固定,滴片制取尿液脱落细胞玻片标本 2~3 张。

1.3.3 预处理尿液脱落细胞玻片标本 制取的玻片标本经过一系列过程后,放在烤片机上加热至 56℃,2 h。提前处理标本、荧光探针的变性与原位杂交过程:(1)将探针混合物 73℃ 水浴 5 min 使探针变性,置于 45~50℃ 水浴中,避光保存至杂交前取出。(2)将标本玻片放在(73±1)℃ 70%甲酰胺变性液中变性 5 min,依次经-20℃ 预冷的 70%乙醇 2 min、85%乙醇 2 min、100%乙醇 2 min 脱水处理,自然干燥,置 45~50℃ 烤片机预热 2~5 min。(3)在玻片杂交区域滴加变性好的探针混合物,立即盖上盖玻片,封口膜封边。将尿液脱落细胞玻片标本放在预热的湿盒中,在 42℃ 保温箱中杂交,过夜。

1.3.4 荧光探针与标本原位杂交后洗涤与复染 移去盖玻片,依次在预热的 3 瓶 50%甲酰胺 2×SSC 溶液中洗涤,每次洗涤 10 min,2×SSC 溶液中洗涤 10 min,2×SSC/0.1% NP-40/2×SSC 溶液中洗涤 5 min,室温下在 70%乙醇中浸泡 3 min,取出玻片,暗处自然干燥。在杂交区域位置加入 15 μL 二氨基苯基吡啶(DAPI)复染剂,立即盖上盖玻片,暗处放置 10~20 min。

1.3.5 细胞计数 在日本 Olympus BXS1 荧光显微镜下,选用合适的滤光片组观察荧光信号和杂交效果,以细胞核中有杂交信号的细胞比例大于 75%为有效标本,对有效标本进行计数、照相保存。荧光信号:GLPp16 呈红色,CSP17 呈绿色;CSP3 呈红色,CSP7 呈绿色。同一荧光信号点在 1 个细胞核内出现 2 个或 3 个,并且 2 个信号位点间距大于单个信号直径,荧光强度相近,计数为含有 2 条或 3 条染色体;如果 2 个信号位点间距小于单个信号直径则计数为 1 条染色体。在每份标本中,每个探针组合计数 100 个膀胱上皮细胞。

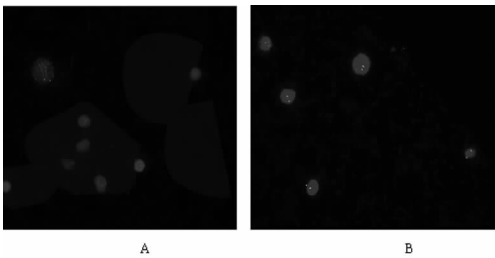
1.4 统计学处理 实验数据用百分比表示,采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理,差异比较采用配对 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

对照组 20 例标本按上述方法进行 FISH 检测,每份标本每个探针组合计数 100 个膀胱上皮细胞,统计出现不同类型异常情况细胞数目、正常细胞数目的百分比,建立参考阈值,阈值=平均值(\bar{x})±3 倍标准差(s),见表 1。CSP3 探针对应 3 号染色体,CSP7 探针对应 7 号染色体,CSP17 探针对应 17 号染色体,GLP p16 探针对应 9 号染色体,分别建立正常细胞、异常细胞(0 或 1 个信号点)、异常细胞(3 个或 3 个以上信号点)参考阈值。如果检测指标比阈值大,则判定该指标阳性;比阈值小就判定该指标阴性;等于阈值,则加大样本细胞计数,多次测量以确定最后结果。若有 2 种或 2 种以上染色体出现异常,或者同一染色体出现 2 种以上异常,表明膀胱癌细胞的存在(见图 1)。以膀胱镜检查结果或者术后病理诊断作为金标准,FISH 检查的灵敏度为 92.5%,尿脱落细胞学检查的灵敏度为 27.5%,二者差异有统计学意义($P<0.05$);FISH 检查的特异度为 85.0%,细胞学检查的特异度为 90.0%,二者差异无统计学意义($P>0.05$);FISH 检查与细胞学检查联合应用的特异度和灵敏度均为 85.0%,见表 2。

表 1 FISH 荧光信号参考阈值的建立(%, $\bar{x}\pm 3s$)

探针	细胞中出现信号数			
	0 个	1 个	2 个	3 个或更多
CSP3	0.7+2.2	1.6+2.6	97.0+4.2	1.1+2.7
CSP7	0.3+1.4	0.9+2.7	97.6+3.3	1.2+1.8
GSP16	1.2+2.3	3.2+5.1	94.2+6.2	1.3+2.8
CSP17	0.4+1.5	1.1+2.4	97.3+4.4	1.2+2.2



A:CSP7/CSP3 组合探针;B:CSP17/GLP16 组合探针。

图 1 FISH 阳性细胞

表 2 FISH 技术和细胞学技术诊断尿路上皮肿瘤的灵敏度、特异度比较(n)

金标准	细胞学		FISH		细胞学+FISH	
	+	-	+	-	+	-
+	22	58	74	6	68	12
-	2	18	3	17	3	17

3 讨 论

膀胱尿路上皮肿瘤是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,其最典型的症状就是间歇性肉眼血尿,基于其间歇性和无痛的特点,延误就诊时有发生。临床诊断膀胱尿路上皮肿瘤最传统、最常用的诊断和监测技术是细胞学检查和膀胱镜检查^[6]。美国食品药品监督管理局(FDA)推荐运用 FISH 技术采用荧光标记的核酸探针检测 9p21 及 3、7、17 染色体上的着丝点,用于确定染色体是否具有与膀胱尿路上皮肿瘤相关的非整倍体,该技术检测膀胱癌的灵敏度和特异度分别为 70%~86%和 66%~93%^[7],与膀胱肿瘤抗原(BTA)、核基质蛋白 22(NMP22)检测相比,FISH 技术的特异度更高^[8],而且 FISH 检查可以比膀胱镜更早发现膀胱癌复发。

FISH 技术是在放射性原位杂交技术的基础上发展起来的,是一种非放射性分子细胞遗传技术。它具有非放射性、安全、快速、高灵敏度等优点,被广泛运用于医学检验的诊断领域。FISH 技术的基本原理是用标记好的已知序列的单链核酸作为探针,按照碱基互补配对原则,与待检材料中未知的单链核酸进行杂交,形成可被荧光显微镜检测到的杂交双链核酸。FISH 探针稳定,操作安全,可以直接在染色体上定性、定量标记,通过碱基互补来保证其反应特异性。膀胱尿路上皮肿瘤最突出的遗传学改变为 3、7、17 号染色体的非整倍性以及 9p21(p16 基因)位点的缺失。本研究利用 FISH 技术对尿脱落细胞进行基因水平的检测,可以早于细胞形态学检查发现异常,并且灵敏度和特异度分别为 92.5%、85.0%。Jones^[9]报道运用 FISH 技术诊断膀胱癌的特异度及灵敏度分别为 86%~97%和 59%~86%。Kwak 等^[10]对 122 例确诊为膀胱尿路上皮肿瘤的患者进行 FISH 检查及细胞学检测,发现 FISH 检查的灵敏度高于细胞学检测,并且在不同肿瘤分期及分级亚组中,FISH 检查的灵敏度均高于细胞学检测,差异均有统计学意义($P<0.05$)。国外有文献报道 FISH 检查与细胞学检测的特异度差别无统计学意义($P<0.05$)^[11]。Skacel 等^[12]研究表明,FISH 技术在检测早期膀胱癌中具有显著优势。该研究得出结论:与细胞学检测相比,FISH 检查具有较高的灵敏度,但两者的特异度相似,因此 FISH 可以作为膀胱肿瘤的辅助检查方法以提高诊断率。本研究结果显示,FISH 检查的灵敏度为 92.5%,细胞学检查的灵敏度为 27.5%,2 种方法的灵敏度差异有统计学意义($P<0.05$),但特异度差异无统计学意义($P>0.05$),与前述同类研究结果类似。

本研究采用的探针不是 UroVysion 探针,而且其不能同时在同一细胞中显示 4 种遗传学改变,因此具有一定局限性。虽然本研究采用的探针组合能够筛选出膀胱尿路上皮肿瘤中出现最频繁的染色体异常,但其是否是诊断膀胱尿路上皮肿瘤最适合的探针组合,还有待进一步研究。本研究所得结果与 UroVysion 探针相似,证明其有可能成为在中国人群中检测膀胱尿路上皮肿瘤发病率的有效手段。本研究未涉及 FISH 检查在膀胱尿路上皮肿瘤术后和分期的诊断,尤其是姑息性治疗后随访中的作用问题,需要在以后的进一步研究中加以研究。

综上所述,利用 FISH 技术检测 3、7、17 号染色体和 p16 基因染色体数目畸变来诊断膀胱尿路上皮肿瘤的灵敏度明显优于细胞学检查,但 2 种方法的特异度差异不显著。p16 缺失作为膀胱尿路上皮肿瘤发生过程中最早的染色体改变,对临床诊断有着重要的作用。能明显提高膀胱尿路上皮肿瘤的筛查率是 FISH 技术的一大优点,该技术有望成为筛查膀胱尿路上皮肿瘤的一种新的无创性检查方法。

参考文献

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.

[2] Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: how far have we come? [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(4): 244-272.

[3] Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing[J]. Urol Oncol, 2008, 26(6): 646-651.

[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] Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, et al. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy[J]. J Urol, 2004, 171(1): 135-138.

[6] Halling KC. Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3(4): 507-519.

[7] van Rhijn BWG, Van der Poel HG, van Der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review[J]. Eur Urol, 2005, 47(6): 736-748.

[8] Friedrich MG, Toma MI, Hellstern A, et al. Comparison of multi-target fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer[J]. BJU Int, 2003, 92(9): 911-914.

[9] Jones JS. DNA-based molecular cytology for bladder cancer surveillance[J]. J Urol, 2006, 67(3): 35-45.

[10] 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.

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

[12] Skacel M, Fahmy M, Brainard J A, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology[J]. J Urol, 2003, 169(6): 2101-2105.

(收稿日期: 2014-03-18)

(上接第 3093 页)

但因几对引物同时在一个体系里反应,容易出现交叉反应,出现非特异扩增,从而不容易寻找到能高通量的反应体系,而且检测时需要多种荧光探针,所以它的推广受到限制。Takizawa 等^[5]采用基因芯片技术对 HCV 和 HIV 进行了检测。基因芯片技术作为一种高通量的检测新技术,可以同时检测数以万计的生物分子^[6]。但目前通用的多种基因芯片技术,都存在着检测技术复杂、条件和设备要求高等问题,限制了该技术在临床检测中的应用。

本研究应用基因芯片的点样技术把每对引物中的 1 条 5' 端固化在 RT-PCR 反应管上^[3],然后在管内进行 RT-PCR 检测,利用荧光强度确定是否存在 HIV-1 或 HCV 并确定病毒载量,利用溶解曲线不同区分病毒种类。达到了多重 RT-PCR 和基因芯片技术同时检测 HCV、HIV-1 的优点,同时又避免了它们的缺点。灵敏度试验说明该体系在 1×10^3 copy/mL 及以上 RNA 载量时检测 HCV、HIV-1 的重复性好,能准确检测的最低载量为 1×10^3 copy/mL。在特异性试验中,对阴性标本和阳性标本 PCR 产物的电泳验证说明该系统特异性好。在临床标本验证实验中, RNA 载量范围在 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ copy/mL 的临床标本能准确检测,与其他厂家 PCR 结果吻合率达 100%。本研究建立的 RT-PCR 平台能对 HCV、HIV-1 RNA 载量达到 1×10^3 copy/mL 的临床标本进行准确检测。

在特异性试验中,对引物序列进行同源性比较,结果显示所用引物均具有种属特异性,并有电泳图作支撑,但如果能用多种病毒标准品进行验证则说服力会更强。建立的 RT-PCR 平台只是同时针对 HCV、HIV-1 的检测,还达不到血站血液筛查同时检测 HCV、HIV-1、HBV 和梅毒螺旋体的要求,要让这个技术转化成产品还有一段距离,但这种方法为同时快速检测

多种病毒带来了全新思路。

综上所述,本研究建立的基于芯片点样技术的 RT-PCR 平台灵敏度、特异度基本满足临床试验要求,为同时快速检测 HCV、HIV-1 提供了新的方法,也为同时检测多种病毒提供了新的思路。

参考文献

[1] Cheng KC, Gupta S, Wang HW, et al. Current drug discovery strategies for treatment of hepatitis C virus infection[J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(7): 883-892.

[2] 聂滨,王元素,逯心敏,等. 输血前患者血液传染指标检查结果分析[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(10): 796.

[3] Rubina AY, Pan'kov SV, Dementieva EI, et al. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production[J]. Anal Biochem, 2004, 325(1): 92-106.

[4] Paryan M, Mohammadi-Yeganeh S, Mirab SS, et al. Design and development of a multiplex real-time PCR assay for detection of HIV-1 and HCV using molecular beacons[J]. Indian J Microbiol, 2012, 52(3): 456-463.

[5] Takizawa K, Nakashima T, Mizukami TA, et al. Degenerate polymerase chain reaction strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus during blood screening [J]. Transfusion, 2013, 53(10 Pt 2): 2545-2555.

[6] 段梦,李志军,黄恒柳,等. SNP 基因芯片方法的建立及在 MTHFR 多态性检测中的初步应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24): 3322-3323.

(收稿日期: 2014-03-26)