

荧光原位杂交技术在膀胱尿路上皮癌术后 复发患者早期检测中的临床价值

冯家成,张柏辉,梁嘉敏,任大宏

(广东省珠海市人民医院病理科,广东 珠海 519000)

摘要:目的 分析膀胱尿路上皮癌术后复发患者早期检测中应用荧光原位杂交技术(FISH)检测的临床意义。方法 选取 2012 年 3 月~2014 年 3 月于我院门诊及住院接受诊断的 90 例疑似膀胱尿路上皮癌患者作为研究对象(研究组),均行 FISH 检测,并同时行尿脱落细胞学检测,将病理检查结果作为基本诊断标准,并与 FISH 检测结果进行对比,选取 30 例正常健康人作为对照组,记录 FISH 检测标准值。结果 采取尿路脱落细胞学检测整体敏感度为 32.39%,明显低于采用 FISH 检测的研究组的 80.28%,组间对比差异有统计学意义($P < 0.05$),且不同分期、分级患者行 FISH 检测灵敏度均高于细胞学检测,对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 对膀胱尿路上皮癌术后复发患者早期采取 FISH 检测方案,有其无创性优势,且敏感度与特异性均比较高,在判断患者预后方面同时有其一定的指导作用,值得推广。

关键词:膀胱肿瘤;荧光原位杂交技术;检测;肿瘤复发,局部

中图分类号: R737.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2014)06-0898-02

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.06.044

膀胱尿路上皮癌属于常见恶性肿瘤之一,初次诊断时大部分均表现为非浸润癌膀胱尿路上皮癌,通常可采取尿道肿瘤切除术治疗^[1],但有文献提示,约有 20%左右患者在接受手术治疗后可能出现肿瘤复发现象,因此,必须对膀胱尿路上皮癌患者行长期随访调查与定期诊断^[2]。临床上对其诊断主要采取细胞学检查的方式,一般选用尿脱落细胞学及膀胱镜检查的方式,但由于膀胱镜检查有其有创性特征,可能给患者带来痛苦,同时对扁平及微小肿瘤的诊断可能出现误诊现象。但尿脱落细胞学检查虽然有其无创性特征,但灵敏度较低^[3]。基于此,为探讨对膀胱尿路上皮癌复发患者的有效、无创、兼具特异性与灵敏度的诊断方案,我院对 90 例疑似膀胱尿路上皮癌患者进行了研究分析,现整理报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 3 月~2014 年 3 月于我院泌尿外科门诊接受诊断及住院的 90 例疑似膀胱尿路上皮癌患者作为研究对象(研究组)。其中男性 78 例,女性 12 例;年龄 42~90 岁,平均年龄为(68.9±2.1)岁。经手术病理证实其中膀胱尿路上皮癌患者 71 例,低分化腺癌患者 4 例,腺性膀胱炎患者 9 例,膀胱内翻行乳头状瘤 2 例,后尿道息肉 2 例,子宫内膜异位症 1 例,膀胱移行上皮细胞增生患者 1 例。严格依照国际抗癌协会所颁布的肿瘤分期标准^[4]将 71 例膀胱尿路上皮癌患者分为 T₀ 期 15 例, T₁ 期 22 例, T₂ 期 28 例, T₃ 期 3 例, T₄ 期 3 例。并依照世界卫生组织颁布的病理学分级标准将其分为低级 41 例,高级 30 例。同时选取 30 例正常健康人作为对照组,其中男性 24 例,女性 6 例;年龄 40~88 岁,平均年龄为(66.7±3.1)岁;对照组正常健康人 FISH 检测,探针点均表现为二倍体,可见明显两红两绿信号。对照组探针分析 100 个细胞结果如表 1 所示,以其作为标准阈值,判定膀胱尿路上皮癌患者阳性率。入选研究的两组对象在性别、年龄等一般资料的对比方面差异无统计学意义($P > 0.05$),具有较强的可比性。

1.2 方法 收集每位患者的尿液样本。于入院后 3 d 取晨尿 200 ml。1 h 内送检。将每位患者尿液分为两个部分,一部分实施 FISH 检测,一部分于院内病理科行尿脱落细胞学检测。同时留取对照组正常健康人 100 ml 尿液进行 FISH 检测,以其为标准值,作为阳性界定值。①尿脱落细胞学检测均指派院内高资历病理科医师进行操作,记录检查结果。②FISH 检测。对所收集患者尿液行预处理,离心后,去上清,加入胶原酶 B,于

37℃水浴箱内水浴 20 min,加入氯化钾渗透 20 min,同时加入配比为 3:1 的甲醇:冰醋酸固定液行固定处理,重复操作 3 次。完毕后制作单细胞悬液,行滴片处理,并于室温环境下过夜老化。在玻片中加入平衡液、溶液、漂洗液、洗脱缓冲液处理 0.5 h,并注入胃蛋白酶中消化 15 min,随后行漂洗处理,5 min/次,共计 2 次。依次将其放置于浓度 70%、80%、100%的乙醇中行梯度脱水,时间控制在 2 min。随后行探针标记,采用膀胱癌检测试剂盒,分别标记 3、7、9、17 号染色体。后行荧光原位杂交处理,行标准变性操作,加入浓度为 70%的甲酰胺变性液,放置于 73℃左右的水浴箱中水浴 30 min,并将玻片放置于变性液中浸泡 8 min,完毕后放置于不同浓度的乙醇液中行梯度脱水处理。配置探针,随后将装有探针的混合物试管置于 73℃水浴箱内变性 8 min。后行探针及样本杂交处理。随后洗涤玻片,滴入复染剂,盖上玻片,置于暗处,于荧光显微镜下观察细胞信号。每个标本检测 100 个尿脱落细胞,算出异常信号比,建立阈值。对不同肿瘤分期、分级及疾病情况患者的膀胱尿路脱落细胞信号进行对比,记录检查值。

表 1 30 例正常健康人尿液 FISH 检测阈值 (%)

探针	计数细胞	细胞异常	细胞异常	细胞异常
		0 个信号点 FISH 阈值	1 个信号点 FISH 阈值	≥3 个信号 点 FISH 阈值
CSP3	100	5.4	9.7	
CSP7	100	4.7	9.2	
CLPp16	100	6.2	9.2	4.6
CSP17	100	4.3	5.2	

1.3 FISH 检测结果评价及诊断标准 评定方法:指定两位不同技术人员独立对计数结果进行判定,以 100 个细胞核作为计数单位,由两方一致认定。破损、重叠细胞、淋巴细胞不参与计数。正常:细胞核均可观测到两绿两红信号,丝粒探针、位点探针均表现为二倍体。异常:出现非二倍体。膀胱尿路上皮肿瘤诊断标准:对 100 个非重叠细胞核行计数处理。异常:细胞核内出现 3、7、17 号染色体,非整倍体信号,且 P16 染色体缺损细胞率超过正常值。若出现两种探针信号异常则确诊为膀胱尿路上皮肿瘤。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件对上述数据进行处理,计数资料选用构成比(%)表示,对比进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FISH 与尿脱落细胞学检测膀胱尿路上皮癌整体敏感性 & 特异性对比 采取尿路脱落细胞学检测整体敏感度为 32.39%,明显低于采用 FISH 检测的研究组的 80.28%,组间对比差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 FISH 与尿脱落细胞学检测不同程度膀胱尿路上皮癌整体敏感性 & 特异性对比 (n, %)

检查方法	敏感度	特异性
细胞学检测	23(32.39)	19(100.00)
FISH 检测	57(80.28)	17(89.47)
χ^2	33.095	2.111
P	<0.05	>0.05

2.2 不同分期、分级、疾病情况行细胞学检查及 FISH 检测的敏感度 & 特异性对比 不同分期、分级患者行 FISH 检测灵敏度均高于细胞学检测,对比差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 FISH 与尿脱落细胞学检测不同程度膀胱尿路上皮癌敏感性 & 特异性对比 (n, %)

	n	细胞学检测	FISH 检测	χ^2	P
分期					
非肌层浸润	30	3(10.00)	22(73.33)	24.754	<0.001
肌层浸润	41	14(34.15)	35(85.37)	22.364	<0.001
分级					
低级别	41	5(12.20)	29(70.73)	28.941	<0.001
高级别	30	17(56.67)	27(90.0)	8.523	0.004
疾病情况					
初发	21	6(28.57)	17(80.95)	16.832	0.009
复发	50	19(38.0)	38(76.00)	14.729	<0.001

3 讨论

荧光原位杂交检测方法是分子遗传学较为常用的研究方式之一,主要应用于染色体数目及结构的畸变检测中,遵循碱基互补的补配原则,探针已知标记核酸,并待检材料与未知单链核酸行异性结合处理,并在荧光显微镜下观测杂交双链核酸的信号变化情况^[5-6]。近期有大量文献研究报道提示,采取 FISH 检测有其探针稳定、操作安全性较高的优势,目前已广泛应用于白血病、宫颈癌及肺癌等疾病的临床检测中^[7]。

部分研究者对泌尿肿瘤染色研究表示,一般人体膀胱癌肿瘤较易出现非随机染色体改变现象,包括染色体数目异常及结构畸变等表现^[8-10]。同时也提示膀胱肿瘤是人体多项目基因突变的结果,且染色体丢失是其常见的遗传学改变特征,同时与膀胱癌早期的产生与进展存在较强的相关性。另外有文献提示,膀胱癌的进展与染色体的不稳定性也存在一定的联系,尤其以 3 号、7 号及 17 号染色体更为显著。采用 FISH 检测方法可检测出人体肿瘤组织染色体数目的异常,同时可反馈其结构的异常表现,在膀胱肿瘤的检测中有其较高的应用价值^[11]。

也有部分观点认为,人体膀胱尿路上皮癌的进展及复发与肿瘤细胞染色体异常的程度相关^[12-13],与本次研究结果基本

一致。在本组研究中,不同分级及分期膀胱尿路上皮癌患者其肿瘤细胞染色体的异常程度也伴随着肿瘤分期及分级的提升而上升,提示染色体改变是膀胱尿路上皮癌患者疾病进展的重要标志物,对判断其预后有其重要的意义。

在利用 FISH 检测膀胱癌术后复发方面,有研究者对膀胱癌术后复发的 40 例患者进行了持续 30 个月的随访调查,结果提示尿路 FISH 检测结果呈阳性患者复发率高达 66%,提示 FISH 检测阳性与膀胱尿路上皮癌术后复发存在一定的相关性。且本次研究结果为 FISH 检测对膀胱尿路上皮癌检出的阳性率明显高于尿脱落细胞学检测,提示可将 FISH 检测结果作为检测膀胱尿路上皮癌患者术后复发的重要指标,这与近期研究报道的内容基本一致,同时可提高细胞学检测的敏感度,提升肿瘤检出的准确率。

综上,对膀胱尿路上皮癌术后复发患者早期采取 FISH 检测方案,有其无创性优势,且敏感度与特异性均比较高,在判断患者预后方面同时有其一定的指导作用,具备较高的应用价值,值得推广。

参考文献:

- [1] 肖立,王朝夫,朱雄增,等.具有内翻生长特征的尿路上皮增生性病变的临床病理学研究[J].中华病理学杂志,2011,40(5):319-323.
- [2] 闫伟,康雯婷,陈山,等.荧光原位杂交技术在膀胱尿路上皮癌术后复发的早期检测中的临床应用价值[J].首都医科大学学报,2014,11(3):298-301.
- [3] 张宇,胡岚亭,倪泽称,等.荧光原位杂交技术诊断和监测膀胱尿路上皮癌复发的临床应用[J].国际泌尿系统杂志,2012,32(1):12-17.
- [4] 肖兰,杨继洲,康照利,等.荧光原位杂交在膀胱尿路上皮癌中的应用[J].肿瘤防治研究,2011,38(3):302-304.
- [5] 邵斯亮,冷江涌,黎勤,等.荧光原位杂交技术在膀胱尿路上皮癌术后复发诊断中的价值[J].浙江临床医学,2014,12(6):888-889.
- [6] 张宇,倪泽称,胡岚亭,等.双色荧光原位杂交技术在膀胱尿路上皮癌诊断中的应用价值[J].国际肿瘤学杂志,2012,39(3):237-240.
- [7] 邱晓拂,胡卫列.荧光原位杂交应用于尿路上皮癌尿液早期诊断的研究进展[J].现代生物医学进展,2011,11(15):2986-2988.
- [8] 徐志秀,周晓秋,王琳琳,等.荧光原位杂交法检测尿液膀胱癌细胞标本制片体会[J].山东医药,2010,50(39):5.
- [9] 吕远.荧光原位杂交(FISH)技术在泌尿患者中筛查尿路上皮癌的应用研究[D].郑州:郑州大学,2012:1-63.
- [10] 王勇,李杰,李鹏超.荧光原位杂交技术在膀胱尿路上皮癌中的临床应用研究[J].临床泌尿外科杂志,2012,27(11):824-826.
- [11] 穆大为,周利群,丁义.应用荧光原位杂交技术检测上尿路的尿路上皮癌可显著提高诊断敏感性[J].北京大学学报:医学版,2010,42(4):381-383.
- [12] 姚昊,韩永,蔡明.荧光原位杂交技术诊断膀胱尿路上皮癌临床研究[J].中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(6):535-537.
- [13] 刘跃新,刘小超,康雯婷.荧光原位杂交技术在膀胱癌检测中的临床应用研究[J].北京医学,2013,35(1):1-4.

收稿日期:2014-09-25;修回日期:2014-11-27