

• 综述 •

荧光原位杂交技术在尿路上皮肿瘤诊断中的作用

许庆均 叶烈夫 何延瑜

荧光原位杂交(FISH)技术是一种使用荧光标记的DNA探针评估细胞基因改变的技术,其依据为癌症是一种基因缺陷性疾病,大多数癌症伴有染色体的异常改变,采用FISH技术可检测到这些异常改变。目前美国食品药品监督管理局(FDA)已批准的通过尿液诊断膀胱癌的技术中,包括BTA、NMP22、ImmunoCyt以及FISH等,灵敏度和特异性最高的是FISH。近来研究还发现FISH技术有助于评估表浅膀胱癌患者对卡介苗治疗的反应,另外,FISH还可用于上尿路尿路上皮癌的诊断。本文对FISH技术在尿路上皮肿瘤诊断和随访监测中的临床应用进行综述。

尿路上皮癌包括肾盂癌、输尿管癌、膀胱癌及尿道癌等,以膀胱癌最为常见。全球范围内,膀胱癌发病率居恶性肿瘤的第十一位,在男性排名第七位,女性排在第十位之后^[1]。在我国,膀胱癌是最为常见的泌尿系统肿瘤,发病率和死亡率均呈逐年上升趋势^[2]。

临床上通常将膀胱癌分为肌层浸润性膀胱癌和非肌层浸润性膀胱癌,肌层浸润性膀胱癌患者发展为转移癌的风险高,通常需行根治性全膀胱切除术,而非肌层浸润性膀胱癌,即浅表性膀胱癌,包括原位癌(Tis)、局限于黏膜层的乳头状癌(Ta)以及侵及黏膜下固有层但未侵及膀胱肌层的T1期肿瘤^[2,4]。膀胱癌的初诊病例中,非肌层浸润性膀胱癌占大部分(75%~85%),这些浅表性膀胱癌患者可行经尿道膀胱肿瘤切除术,术后辅以膀胱内化疗/免疫治疗,疗效较好,但术后肿瘤复发率可高达50%~70%^[2,3]。因此,浅表性膀胱癌患者术后应定期行膀胱镜及尿液脱落细胞学检查以监测膀胱癌的复发。

一、膀胱镜检查及尿脱落细胞学检查在膀胱癌诊断中的局限性

目前,膀胱镜检查和尿液脱落细胞学病理检查是膀胱癌临床诊断和监测最常使用的两种手段。膀胱镜为侵入性检查,诊断膀胱癌准确性高,但对于肉眼难以辨别的小肿瘤或原位癌诊断存在困难,且对于上尿路肿瘤无法诊断^[3]。尿脱落细胞学检查特异性高,对于高级别尿路上皮癌,尿细胞学检查的敏感性相对较高,但对于低级别尿路上皮癌,其敏感性很低^[3]。因此,近十几年来,研究者一直致力于研发比尿液细胞学检查具有更高敏感性的膀胱癌无创检测方法,目前FDA已批准的检测尿液中膀胱癌肿瘤标志物的技术包括:检验分析尿液中的蛋白质(蛋白质组学分析)如BTA-Stat和NMP22、免疫组化检测如ImmunoCyt(免疫细胞荧光技术)以及使用UroVison探针组的FISH技术等。BTA、NMP22、ImmunoCyt等检测方法相对尿细胞学检查敏感性大大提高,但特异性不如后者,而FISH的敏感度和特异性是以上几种尿液肿瘤标志物检查方法中最高的一种,具有很好的应

用前景^[3,5,6]。

二、膀胱癌相关基因及用于膀胱癌检测的荧光原位杂交探针组的进展

FISH技术原理是采用已知的荧光色素标记的核酸作为探针,按照碱基互补的原则,与待检材料中的核酸进行特异性结合,形成可被检测的杂交双链核酸,可用于染色体数目的测定、基因定位、染色体结构分析等。尿液、唾液、血液、器官灌洗液中的细胞基因检测均可应用FISH技术来进行。研究表明:大多数膀胱癌细胞有染色体的异常,且非整倍体的程度和染色体结构的异常随肿瘤分级的增加而增加,9p21位点的部分或全部丢失是最常见的遗传学改变,且这一改变与膀胱癌的早期发生密切相关。此外,膀胱癌的发展与染色体不稳定性也紧密相连,特别是与3号、7号及17号染色体的非整倍性密切相关^[7,9]。因此,检测尿液脱落细胞的染色体异常是诊断膀胱癌的一种好方法。目前用于尿液脱落细胞FISH检测的探针有两种:染色体计数探针(CEPs)和基因位点特异探针(LSI)。CEP探针杂交于染色体的着丝粒区域,用于计数细胞中染色体的数目,而LSI探针通常用于感兴趣的目标基因的杂交。2000年8月,Sokolova等^[10]报道了一种新的被称为UroVysion的FISH探针组用于膀胱癌检测,这种4靶点、多色FISH探针组包括了3号、7号、17号染色体计数探针和9P21位点特异探针,选择4靶点探针组是因为4种探针组合的敏感性远高于一种或两种探针的组合。

三、FISH在膀胱癌中观察到的基因改变

正常人体细胞为二倍体,理论上FISH检测所用4种探针的每一种,正常细胞应显示为2个拷贝。然而,对正常人尿液样本进行的研究显示,大约5%~10%的细胞只显示为1个拷贝(单倍体),而且一小部分细胞(约1%~3%)甚至显示为三倍体或四倍体^[11]。正常细胞显示为单倍体,分析原因可能为两个信号的重叠看起来像一个信号,或者探针的杂交不是100%有效导致。偶尔三倍体或四倍体细胞的出现,最可能的原因是这些细胞正处于细胞周期的S期或G2期。因此,少量单倍体、三倍体或四倍体细胞的出现不能作为肿瘤存在的依据,而大量单倍体、三倍体或四倍体细胞的出现则提示膀胱肿瘤细胞的存在。同一细胞中,四种探针中的两种或两种以上探针的拷贝数均增加(表现为三倍体以上)的细胞被称为多倍体细胞,这种多倍体细胞,除了偶尔可能出现于细胞周期的G2期或S期,在正常人群的尿液标本中极为罕见,但在膀胱癌患者的尿液中却较为常见。采用UroVysion对膀胱癌患者的尿脱落细胞进行检测,可观察到四种类型的基因异常,包括多倍体、三倍体、四倍体以及9p21纯合子的缺失。

四、FISH检测膀胱癌的敏感性和特异性

许多研究对FISH技术与尿脱落细胞学检查在尿路上皮肿瘤早期诊断方面的敏感性和特异性进行了比较。2008年Hajdinjak^[12]对14项研究共2477次的FISH检测结果进行Meta分析得出结论:FISH诊断尿路上皮癌总的敏感性为72%,特异性为83%,而尿脱落细胞学检查的敏感性及特异性分别为42%

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.15.103

基金项目:中华医学会分子生物学临床应用研究专项资金

作者单位:350001 福州,福建医科大学省立临床医学院(许庆均、叶烈夫、何延瑜);福建省立医院泌尿外科(叶烈夫、何延瑜)

通讯作者:叶烈夫,Email:yeliefu@126.com

及96%。尤其对于低分级、低分期肿瘤, FISH检测膀胱癌的敏感度要远高于尿脱落细胞学检查。将Ta期肿瘤去除后再进行分析, FISH诊断膀胱癌的敏感度仍然高于尿脱落细胞学检查, 分别为86%及61%。曾铮等^[13]亦对14项研究共2689例的FISH检测结果进行Meta分析得出结论, FISH检测膀胱癌敏感性为69%, 特异性为84%; 细胞学检查检测膀胱癌敏感性为46%, 特异性为88%; 但FISH检查在总体诊断效能上与细胞学检查差异无统计学意义。尽管UroVysion FISH检测较尿脱落细胞学有更高的敏感性, 且特异性相当; 但作者认为目前FISH检测结果不能作为膀胱癌确诊的依据, 还不能代替膀胱镜检查。因此, 最新版的欧洲泌尿外科学会指南(EAU)尚未将FISH检测作为膀胱癌的常规检查项目, 但认为在膀胱癌高危人群中的筛查、对于肉眼不可见肿瘤包括原位癌的诊断以及非肌层浸润性膀胱癌术后随访以减少膀胱镜检查的频率等方面可发挥作用^[3]。

五、FISH结果预期阳性(anticipatory positive)的临床意义

FISH检测结果阳性而膀胱镜/尿细胞学检查阴性的患者称为FISH预期阳性。Yoder等^[14]的一项研究发现, 大约27%尿细胞学检查阴性或不典型的患者其FISH结果为阳性, 而且同期行膀胱镜检查未发现肿瘤, 对这些患者进行临床随访发现, 其中约65%的患者在29个月内发现肿瘤复发, 而FISH结果阴性的对照组患者仅有5%肿瘤复发。这一研究结果表明FISH可在膀胱镜或尿细胞学检查发现有临床征象的肿瘤前更早发现膀胱肿瘤。

六、尿脱落细胞学结果可疑患者FISH检测的意义

模棱两可的尿脱落细胞学诊断在临床实践中非常常见, 包括那些被诊断为不典型增生、可疑或细胞学形态符合低分级肿瘤等。对尿脱落细胞学结果可疑的患者如何进一步检查尚无定论, 对这些患者进行的随访发现不到50%的患者可发生膀胱癌^[15]。尿脱落细胞学结果可疑的患者可能接受许多不必要的、额外的检查并承受过度的焦虑。国外一项研究显示, 对于细胞学结果不典型且膀胱镜检查可疑患者, 若既往无膀胱癌病史, FISH诊断膀胱癌的阳性预测值为100%且无一假阴性, 而既往有膀胱癌病史者, 所有4例高级别尿路上皮癌均为FISH检测发现且无一假阴性; 膀胱镜检查阴性且尿脱落细胞学可疑者, UroVysion检测可发现所有的肿瘤, 但阳性预测值仅分别为10%(有膀胱癌病史)及29%(无膀胱癌病史); 因此对于尿脱落细胞学结果可疑且膀胱镜检查阴性或可疑者, FISH技术有助于确定哪些患者需进一步检查随访, 从而避免不必要的检查和负担^[16]。

七、血尿患者FISH检测的临床意义

研究表明大约90%肌层浸润性膀胱癌患者, 在初诊时就有肌层浸润^[4, 17], 大多数的膀胱癌死亡来自这些患者, 早期诊断可降低膀胱癌的死亡率。血尿通常是膀胱癌最早出现的症状, 在有膀胱癌高危因素的人群中通过定期评估血尿, 可能是一种具有较好成本效益的膀胱癌筛查方法^[18]。但这种膀胱癌筛查方法的主要问题是血尿对于膀胱癌的诊断缺乏特异性, 许多良性病变如肾结石、膀胱炎等也可引起血尿。Messing等^[19]进行的一项膀胱癌筛查研究中, 约10%被筛查者通过血红蛋白试纸发现血尿, 而这些血尿患者中仅10%膀胱镜检查发现患有膀胱癌, 说明因血尿接受膀胱镜检查的患者大多没有膀胱癌。

对有镜下或肉眼血尿且既往无膀胱癌病史的患者进行的一项研究发现, UroVysion诊断各分期、分级膀胱癌的敏感性均显

著高于尿细胞学检查, 265位有吸烟史伴血尿者尿液FISH检测为阳性, 其中每年吸烟40包以上者膀胱癌发生率高达65%, 每年吸烟20~40包者为24.2%, 而每年吸烟少于20包者为13.6%^[20]。因此, FISH检测对于有膀胱癌发病风险的血尿患者的评估非常有益。

八、接受卡介苗免疫治疗的膀胱癌患者FISH检查的意义

膀胱T1期肿瘤、原位癌或多发高级别尿路上皮癌的患者术后通常行膀胱内卡介苗(BCG)灌注治疗以降低肿瘤复发率并可能减少肿瘤进展的概率^[3, 21]。BCG的抗肿瘤效应是由于卡介苗引发的免疫反应所致, 膀胱灌注BCG可诱发膀胱黏膜的显著炎症, 产生的黏膜红斑在膀胱镜检查时难以与原位癌鉴别, 此外膀胱黏膜的炎症使尿脱落细胞学表现不典型, 增加诊断的困难^[22]。Mengual等^[23]发现BCG治疗后FISH结果阳性的膀胱癌患者肿瘤复发的风险是FISH结果阴性者的2.7倍。此外, 在BCG治疗前后FISH结果均阳性的患者, 肿瘤复发是经BCG治疗后FISH结果由阳转阴患者的2.96倍。但术后FISH结果阳性与阴性两组之间肿瘤进展的发生率无明显差异。研究结果表明术后接受BCG治疗的高危膀胱癌患者FISH检测有助于评估肿瘤复发的风险。

九、FISH技术在上尿路尿路上皮癌诊断中的作用

上尿路尿路上皮癌主要包括肾盂肿瘤和输尿管肿瘤, 虽然发生率不高, 约占所有尿路上皮肿瘤的5%, 但临床发现的上尿路尿路上皮癌多为高分级、高分期的肿瘤, 预后较差, 死亡率及复发转移率较高^[24]。尿路上皮肿瘤有多器官发病的倾向, 虽然原发性膀胱癌术后发生上尿路尿路上皮癌的发生率很低, 约0.7%~4.0%, 但上尿路肿瘤术后很容易在膀胱内复发, 其发生率约40%~70%^[24]。目前上尿路肿瘤的诊断主要依靠影像学检查, 并辅以尿液脱落细胞学检查, 必要时行输尿管镜检查。然而影像学检查对上尿路小肿瘤的诊断敏感性较低, 对原位癌无法诊断, 因此不能单独作为早期诊断的工具。输尿管镜检查是诊断上尿路肿瘤比较可靠、有效的方法, 但输尿管镜系有创检查并可能造成输尿管穿孔、断裂等严重的并发症, 另有报道称输尿管镜的水流压力可能促进肿瘤细胞向黏膜下层或淋巴转移, 此外, 输尿管镜检查对原位癌的诊断欠敏感, 因此临床上较少采用输尿管镜检查诊断上尿路肿瘤^[24]。尿脱落细胞学对上尿路尿路上皮癌的诊断敏感性很低, 假阴性率极高^[24]。因此, 目前上尿路肿瘤尚缺乏理想的早期诊断和术后随访监测方法。

分子遗传学研究表明上尿路尿路上皮癌的染色体畸变与膀胱癌无明显差别, 因此理论上FISH技术同样可应用于上尿路尿路上皮癌的诊断, 但目前国内外关于FISH应用于上尿路肿瘤诊断的研究报道很少, 并且有关报道的病例数均较少, 初步研究表明FISH诊断上尿路尿路上皮癌的敏感性高于尿液脱落细胞学^[25-27]。Marha-Aguilera等^[25]报道FISH诊断上尿路尿路上皮癌的敏感性为76.7%, 优于尿液细胞学检查(36%), 而特异性高达94.7%, 与尿液细胞学检查相当(100%)。但近来Johannes等^[26]的结果显示FISH诊断上尿路癌路的敏感性及其特异性分别为54%及78%, 而尿液细胞学检查则分别为18%及100%, 认为FISH对上尿路尿路上皮癌的诊断价值不如膀胱癌。

十、结论

研究表明FISH技术检测尿路上皮肿瘤较尿脱落细胞学具有更高的敏感性, 且特异性与尿脱落细胞学检查相似。但目前FISH检测结果还不能作为膀胱癌确诊的依据, 更不能代替膀胱镜检查, 包括EAU在内的多个指南尚未将FISH检测作为膀胱

癌的常规检查项目。但 FISH 在膀胱癌高危人群中的筛查,对于肉眼不可见肿瘤包括原位癌的诊断、尿细胞学结果可疑且膀胱镜检查阴性或可疑者、术后接受 BCG 治疗的高危膀胱癌患者评估其复发风险、上尿路尿路上皮癌的早期诊断及术后随访、非肌层浸润性膀胱癌术后随访以减少膀胱镜检查的频率等方面可能发挥较大的作用,但这些问题需更多循证医学的证据来说明。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61: 69-90.
- [2] 李宁忱, 谢立平. 膀胱癌诊断治疗指南. 那彦群, 叶章群, 孙光, 主编. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南. 2011 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 17-48.
- [3] Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update. *Eur Urol*, 2011, 59: 997-1008.
- [4] Stenzl A, Cowan NC, Santis MD, et al. Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Update of the EAU Guidelines. *Eur Urol*, 2011, 59: 1009-1018.
- [5] Song MJ, Lee HM, Kim SH. Clinical usefulness of fluorescence in situ hybridization for diagnosis and surveillance of bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 198: 144-150.
- [6] Black PC, Brown GA, Dinney CP. Molecular markers of urothelial cancer and their use in the monitoring of superficial urothelial cancer. *Clin Oncol*, 2006, 24: 5528-5535.
- [7] Richter J, Jiang F, Gorog JP, et al. Marked genetic differences between stage pT_a and stage pT₁ papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, 1997, 57: 2860-2864.
- [8] Bittard H, Lamy B, Billery C. Clinical evaluation of cell deoxyribonucleic acid content measured by flow cytometry in bladder cancer. *Urol*, 1996, 155: 1887-1891.
- [9] Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, et al. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 29: 256-265.
- [10] 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. *Mol Diagn*, 2000, 2: 116-123.
- [11] Halling KC, Kipp BR. Fluorescence in situ hybridisation for the detection of bladder cancer. *Eur Ren Genitourinary Dis*, 2006, 2: 51-54.
- [12] Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol*, 2008, 26: 646-651.
- [13] 曾铮, 周晓军. 荧光原位杂交技术对膀胱癌诊断价值的 Meta 分析. *中华病理学杂志*, 2010, 39: 75-78.
- [14] Yoder BJ, Skacel M, Hedgpeth R, et al. Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am J Clin Pathol*, 2007, 127: 295-301.
- [15] Voss JS, Kipp BR, Kruger AK, et al. Changes in specimen preparation methodology may impact urine cytology evaluation. *Am J Clin Pathol*, 2008, 130: 428-433.
- [16] Schlomer BJ, Ho R, Saqalowsky A, et al. Prospective validation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder. *Urol*, 2010, 183: 62-67.
- [17] Kryger JV, Messing E. Bladder cancer screening. *Semin Oncol*, 1996, 23: 585-597.
- [18] Foresman WH, Messing EM. Bladder cancer: natural history, tumor markers, and early detection strategies. *Semin Surg Oncol*, 1997, 13: 299-306.
- [19] Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology*, 1995, 45: 387-396.
- [20] Sarosdy MF, Kahn PR, Zifer MD, et al. Use of a multitarget fluorescence in situ hybridization assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria. *J Urol*, 2006, 176: 44-47.
- [21] Uchida A, Yonou H, Hayashi E, et al. Intravesical instillation of bacille Calmette-Guerin for superficial bladder cancer: cost-effectiveness analysis. *Urology*, 2007, 69: 275-279.
- [22] Mack D, Frick J. Diagnostic problems of urine cytology on initial follow-up after intravesical immunotherapy with Calmette-Guerin bacillus for superficial bladder cancer. *Urol Int*, 1994, 52: 204-207.
- [23] Mengual L, Marin-Aguilera M, Ribal MJ, et al. Clinical utility of fluorescent in situ hybridization for the surveillance of bladder cancer patients treated with Bacillus calmette-guerin therapy. *Eur Urol*, 2007, 52: 752-759.
- [24] Roupert M, Zigeuner R, Palou J, et al. European guidelines for the diagnosis and management of upper urinary tract urothelial cell carcinomas; 2011 Update. *Eur Urol*, 2011, 59: 584-594.
- [25] Marha-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, et al. Utility of fluorescence in situ hybridization as a non-invasive technique in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Eur Urol*, 2007, 51: 409-415.
- [26] Johannes JR, Nelson E, Bibbo M, et al. Voided Urine Fluorescence In Situ Hybridization Testing for Upper Tract Urothelial Carcinoma surveillance. *J Urol*, 2010, 184: 879-882.
- [27] Akkad T, Brunner A, Pallwein L, et al. Fluorescence in situ hybridization for detecting upper urinary tract tumors—a preliminary report. *J Urol*, 2007, 70: 753-757.

(收稿日期: 2012-02-20)

(本文编辑: 郝锐)

许庆均, 叶烈夫, 何延瑜. 荧光原位杂交技术在尿路上皮肿瘤诊断中的作用[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(15): 4419-4421.