

· 临床论著 ·

UroVysion 荧光原位杂交技术在上尿路上皮癌诊断中的应用价值

彭伟彬 徐秀红 张士祥 郝钢跃 田野 张道新

【摘要】 目的 探讨用 UroVysion 探针标记的荧光原位杂交(FISH)技术在中国人群中诊断上尿路上皮癌的应用价值。**方法** 留取 70 例因血尿或影像学提示病变的可疑上尿路上皮癌患者尿液标本,分别行 UroVysion FISH,检测尿液脱落细胞 3、7、17 号染色体着丝粒探针及 9 号染色体 p16 位点探针,同时行尿细胞学检查,比较 UroVysion FISH 和尿液脱落细胞二者差异。**结果** 70 例可疑患者中术后病理确诊为上泌尿系尿路上皮癌患者共 61 例,其中 UroVysion FISH 和尿细胞学检查阳性例数分别为 44 例和 19 例,其敏感性分别为 72.1% 和 31.1%,差异有统计学意义($P < 0.005$),二者的特异性均为 90%。UroVysion FISH 和尿细胞学检查对非肌层浸润性肿瘤和肌层浸润性肿瘤的敏感度分别为 63.6%、82.1% 和 24.2%、39.3%,对 G1、G2、G3 期上尿路上皮癌患者的敏感度分别为 41.2%、76.2%、91.3% 和 11.8%、23.8%、52.2%。**结论** UroVysion FISH 检查为中国人尿路上皮癌的早期诊断和术后监测提供了快速、安全、灵敏度高的无创性检测方法。

【关键词】 原位杂交,荧光; UroVysion; 上尿路上皮癌; 尿脱落细胞学

Research on the application of UroVysion FISH in diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma

PENG Wei-bin, XU Xiu-hong, ZHANG Shi-xiang, HAO Gang-yue, TIAN Ye, ZHANG Dao-xin. Department of Urology, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: HAO Gang-yue, Email: haogangyue@126.com

【Abstract】 Objective To assess the clinical utility of UroVysion fluorescence insitu hybridization (UroVysion FISH) assay as a non-invasive methods for diagnosing and monitoring urothelial carcinoma (UC) in the upper urinary tract (UUT) in Chinese patients, as UroVysion FISH has been used in Western countries for detecting UC, but there are limited results in Asian populations. **Methods** Urine specimens from 70 consecutive patients with suspicious UUTUC were collected before endoscopy or surgery, and were performed simultaneously by UroVysion FISH and cytological analysis. For UroVysion FISH analysis, labelled probes to chromosomes 3, 7, 9, and 17 were used to assess chromosomal abnormalities indicative of malignancy. The sensitivity and specificity were calculated by software SPSS 13.3 based on the histology and pathology. **Results** Sixty one out of 70 patients had a histologically proven upper urinary tract urothelial carcinoma. The overall sensitivities of cytology and UroVysion FISH were 31.1% and 72.1% ($P < 0.005$), while their specificities were both 90.0%. The sensitivities of UroVysion FISH were 41.2%, 76.2%, 91.3% for the G1, G2 and G3 tumor, and were 11.8%, 23.8% and 52.2% by cytological analysis. For non-invasive tumor and invasive tumor, the sensitivities of UroVysion FISH were 63.6% and 82.1%, while 24.2% and 39.3% by cytological analysis. **Conclusions** UroVysion FISH assay of chromosomes 3, 7, 9, and 17 performed on exfoliated cells from voided urine specimens has greater sensitivity than cytology for detecting UUTUC whilst maintaining a similar specificity.

【Key words】 In situ hybridization, fluorescence; UroVysion; Urothelial cancer of the upper tract; Urine cytology

上尿路上皮癌(upper urinary tract urothelial carcinoma, UUTUC)

发病率较低,大约占所有尿路上皮肿瘤的5%及肾脏肿瘤的8%^[1]。UUTUC具有多中心发展特点,通常发现病灶时肿瘤临床分期较高,且预后较差^[2]。临床上诊断UUTUC的主要方法有尿脱落细胞学、影像学和内窥镜检查。影像学检查包括尿路造影、CT和MRI等,其对肿瘤的临床分期及判断有无远处转

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.01.106

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院泌尿科(彭伟彬、徐秀红、郝钢跃、田野、张道新);北京市房山区第一医院泌尿外科(张士祥)

通讯作者:郝钢跃,Email:haogangyue@126.com

移具有较大意义,但对原位癌及较小体积的肿瘤其诊断敏感性较低^[3]。输尿管镜检一直以来作为临床诊断 UUTUC 的金标准,其敏感性可高达 90%,但是存在着费用昂贵、操作有创性及主观性强等缺点^[4]。尿细胞学为无创性操作,且特异性较高,但敏感性可低至 25%,尤其是低级别肿瘤的敏感性更低^[5]。因此,探索一种创伤小、敏感性及特异性高的检查方法成为上尿路上皮肿瘤早期诊断的研究热点问题。随着尿液肿瘤标记物研究的不断发展,目前用于诊断尿路上皮肿瘤的尿液肿瘤标记物层出不穷,如 BTA-Stat、NMP22、Immunocyt 等,但其敏感性及特异性尚不尽人意而未能在临床上推广使用^[6]。研究者发现尿路上皮肿瘤的发生与 3、7、17 号染色体非整倍性及 9 号染色体 p16 位点缺失密切相关^[7],荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 可通过荧光标记的核酸探针检测肿瘤细胞染色体改变。近年来,国内外大量的研究应用 FISH 检测膀胱癌,文献报道 FISH 检测膀胱癌的敏感性高于尿脱落细胞学检查,且两者特异性相当^[8,9]。2005 年美国 FDA 认证 UroVysion™ 可用于无膀胱癌病史的血尿患者中诊断膀胱癌^[10]。泌尿系上皮组织来源相同,且细胞遗传学证实膀胱尿路上皮癌细胞核型改变与上尿路上皮细胞癌一致^[11],FISH 用于诊断 UUTUC 具有一定的可操作性及可行性。

资料与方法

1. 资料来源:收集首都医科大学附属北京友谊医院 2010 年 6 月至 2012 年 3 月期间,因血尿或体检行超声、CT 等影像学检查提示单纯上尿路占位,临床诊断可疑 UUTUC 患者共 70 例,其中男 45 例,女 25 例,平均年龄 61.3 (37 ~ 85) 岁。留取患者尿液标本行 UroVysion FISH 及尿细胞学检查后,行膀胱镜检排除膀胱肿瘤患者,进一步行输尿管镜检术,术中明确肿瘤存在的患者则行肾输尿管全长切除术,术中可疑病变的患者则钳取组织送病理检查,根据活检病理结果选择相应手术方法,诊断不明者继续随访。此项研究经医院伦理委员会同意,所有患者均签署知情同意书。

2. 试剂与仪器:探针及配套试剂均购置于美国 Vysis 公司生产的 UroVysion® 膀胱癌检测试剂盒 (CEP® 3 SpectrumRed™, CEP 7 SpectrumGreen™, CEP 17 SpectrumAqua™ 和 LSI® 9p21 SpectrumGold)。StatSpin Thermobrite 原位杂交仪 (必和国际贸易有限公司),水浴箱 (上海新苗医疗器械有限公司),Beckman Model J-6M 离心机 (美国 Beckman 公司)。

3. 尿液标本收集与处理:取患者清晨第一次新鲜尿液 (至少 33 ml),和防腐剂按 2:1 体积混匀放入 50 ml

离心管中,600 × g 离心力,室温离心 10 min。弃上清,剩余约 1 ~ 2 ml 细胞沉淀加入 10 ml 浓度为 1 × 的磷酸缓冲液 (PBS) 溶液冲洗,再次离心,弃上清,剩余约 0.5 ~ 1 ml 细胞沉淀,缓慢加入 1 ~ 5 ml 新鲜配制的 Carnoy 固定剂 (按甲醇和乙酸 3:1 比例配置),将固定好后的样品置 -20 °C 冰箱 30 min 以上。取出标本离心 3 次后制成玻片。

4. 原位杂交:(1) 预处理,浓度 2 ×, pH7.0 的柠檬酸钠缓冲液 (SSC) 溶液, (73 ± 1) °C 条件下处理 2 min,蛋白酶液 (37 ± 1) °C 条件下处理 10 min, 1 × PBS 室温清洗 5 min 左右,1% 甲醛液将玻片室温固定 5 min 左右,1 × PBS 室温清洗 5 min 左右 (± 1 min), 70%、85%、100% 乙醇室温依次各脱水 1 min。彻底干燥。(2) 变性与杂交,将 UroVysion 专用探针从 -20 °C 中取出,涡旋振荡混匀。向玻片上选定的目标区加入 3 μl 变性后的探针溶液。立即在探针溶液上盖一个 12 mm 的圆形盖玻片。轻轻压掉气泡。用橡胶胶水封住盖玻片。用水弄湿纸巾后将纸巾沿着加热面置于通道中。打开机器原位杂交仪,设定程序:ThermoBrite, 融化温度: (76 ± 1) °C 3 min, 杂交温度: (39 ± 1) °C 14 ~ 18 h, 受提示后,将玻片置于仪器的加热面,关上盖子并运行程序。(3) 杂交后洗涤,于暗室中去除盖玻片,分别于 0.4 × SSC/0.1% NP-40 溶液 1 min, 0.4 × SSC/0.1% NP-40 溶液洗涤,暗处干燥玻片染色:加 10 μl 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 复染剂于杂交区域,加盖盖玻片,避光放置 10 ~ 20 min。

5. 杂交信号检测:荧光显微镜下选择疑似恶性肿瘤 (形态学异常) 的细胞:细胞核体积大,细胞核形状异常,“斑驳的” DAPI 染色及细胞群集,上下调节聚焦来寻找细胞核内所有的信号。对至少 25 个形态学异常的细胞进行了分析。这些形态学异常的细胞的信号分布表现为多染色体增加 [即以下各种探针 (CEP 3 红色, CEP 7 绿色或者 CEP 17 蓝绿色) 中的一个以上探针有 3 个或以上的信号], 或是 9p21 位点同源缺失 (即没有 LSI 9p21 黄色的信号)。分析一直持续到检测出 ≥ 4 个细胞获得复染色体,或者检测到 ≥ 12 个细胞具有 9p21 同源缺失,或者对整个样本进行分析。测定检测到的染色体异常细胞的数量,即获得复染色体或 9p21 同源缺失;结果报告为阳性或阴性 (图 1 ~ 3)。

6. 质量控制:每次样本处理以及对每生产批的试剂盒都必须使用一张对照片 (每张载玻片中含有一个阴性和一个阳性靶区域,图 4,5)。对照片必须与检验样本片同时用 UroVysion 探针进行杂交。根据上述对照片的分析说明来进行信号计数。信号计数结果必须在对照片的说明书中提供的检验性能可接受标准的范

围之内。

7. 统计学分析:根据诊断实验配对四格表和计算公式,敏感度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) × 100%, 特异度 = 真阴性 / (假阳性 + 真阴性) × 100%, 率的比较运用 SPSS 13.3 软件进行卡方检验。

结 果

70 例可疑 UUTUC 患者经肾输尿管全切或局部电烧术后病理及内镜取活检等方法确诊为 UUTUC 者共计 61 例,其中肾盂肿瘤 28 例,输尿管肿瘤 25 例,肾输尿管合并肿瘤 8 例。内镜下直接诊断为 UUTUC 并行手术切除患者共 49 例,术后病理提示均为非尿路上皮肿瘤,单纯内镜诊断阳性率为 80.3% (49/61), 特异度为 100% (9/9)。按肿瘤病理分期计算,非肌层浸润性肿瘤(Ta, Tis, T1) 33 例,肌层浸润性肿瘤(T2 ~ T4) 28 例。按肿瘤病理分级计算,G1、G2、G3 期 UUTUC 患者分别为 15 例、13 例、33 例。61 例 UUTUC 患者中 UroVysion FISH 和尿细胞学检查阳性例数分别为 44 例和 19 例,其敏感度分别为 72.1% (44/61) 和 31.1% (19/61),有统计学差异($P < 0.005$),而二者的特异度均为 90% (9/10)(表 1)。在肿瘤分期中,FISH 和尿细胞学检查对非肌层浸润性肿瘤和肌层浸润性肿瘤敏感度分别为 63.6%、82.1% 和 24.2%、39.3%。在肿瘤分级中,FISH 和尿细胞学检查对 G1、G2、G3 期 UUTUC 患者的敏感度分别为 41.2%、76.2%、91.3% 和 11.8%、23.8%、52.2% (表 2)。UroVysion 探针中 3、7 和 17 号染色体非整倍性扩增分别为 52.3% (23/44)、56.8% (25/44) 和 65.9% (29/44),p16 杂合性缺失丢失 38.6% (17/44)。

表 1 UroVysion FISH 与尿细胞学在诊断上尿路系统尿路上皮肿瘤中的效能评价(%)

项目	UroVysion FISH	尿细胞学	输尿管镜
特异度	90.0(9/10)	90.0(9/10)	100(9/9)
敏感度	72.1(44/61)	31.1(19/61)	80.3(49/61)
阴性预测值	36.0(9/25)	18.0(9/50)	42.9(9/21)
阳性预测值	97.8(44/45)	95.0(19/20)	100(49/49)

讨 论

本组病例中,UroVysion FISH 与尿细胞学检查诊断 UUTUC 的敏感度分别为 72.1% 和 31.1%,具有统计学差异,二者特异度相当,提示 UroVysion FISH 诊断 UUTUC 的效能优于尿细胞学检查。另外,在不同病理分期及分级肿瘤中,UroVysion FISH 与尿细胞学亦略有不同。在肿瘤分期中,FISH 和尿细胞学检查对非肌层浸

润性肿瘤和肌层浸润性肿瘤的敏感度分别为 63.6%、82.1% 和 24.2%、39.3%,在肿瘤分级中,FISH 和尿细胞学检查对 G1、G2、G3 期 UUTUC 患者的敏感度分别为 41.2%、76.2%、91.3% 和 11.8%、23.8%、52.2%。虽然总体上,随着肿瘤分期分级升高,二者敏感度均不同程度升高,但 UroVysion FISH 在浅表性肿瘤及低级别肿瘤中的敏感度均明显高于尿细胞学检查,提示 UroVysion FISH 在早期诊断 UUTUC 具有重要临床意义。其可能的原因是早期 UUTUC 的肿瘤脱落细胞数目较少及分化程度较高,而荧光原位杂交技术为计数染色体数目畸变,不依赖于形态学诊断,因此具有相对较高的阳性率^[12]。

表 2 UroVysion FISH 与尿细胞学在上尿路系统尿路上皮肿瘤中病理分期、分级间的比较[例,(%)]

项目	例数	UroVysion FISH 阳性	尿细胞学阳性	P 值
病理分期				
非肌层浸润性	33	21(63.6)	8(24.2)	<0.005
肌层浸润性	28	23(82.1)	11(39.3)	<0.005
病理分级				
G1	17	7(41.2)	2(11.8)	<0.005
G2	21	16(76.2)	5(23.8)	<0.005
G3	23	21(91.3)	12(52.2)	<0.005

本组病例中,在输尿管镜下可看到典型尿路上皮肿瘤表现并直接行肾输尿管全切术的患者共 49 例,输尿管镜诊断 UUTUC 敏感度为 80.3%, 特异度为 100%,Guarnizo 等^[4]曾报道“内镜 + 活检”诊断 UUTUC 的阳性率为 90%。UroVysion FISH 检测方法具有高敏感性、高特异性、无创性等优点,其取代输尿管镜检查具有一定的可信度,但仍需更多大样本、多中心研究来佐证。本组患者均基于血尿或影像学筛查为疑似 UUTUC 患者后再进行 UroVysion FISH、尿细胞学及内镜检查,具有一定的局限性。而对于原位癌或较小肿瘤而无症状表现或影像学阴性的患者,文献报道 UroVysion FISH 检查对此类患者的随访也有意义,Skacel 等^[11]发现在 9 例 FISH 假阳性的患者中,8 例在 3 ~ 12 个月后发展为膀胱癌,而第 9 例患者在 15 个月后原位复发。在活检阴性或影像学阴性的病例中,所谓 FISH 假阳性不能除外已有基因的改变并可能发展为膀胱癌。

UroVysion 探针是一种使用 4 种荧光分子标记的 DNA 探针,分别是 3、7、17 号染色体着丝粒区域探针(CEP3 红色,CEP7 绿色,CEP17 浅蓝色)以及定位 p16 抑癌基因的 9p21 位点特异探针(LSI 9p21 金黄色)。相比较于传统的双色荧光探针标记物,UroVysion FISH 可同时在一个细胞中显示肿瘤细胞 4 种遗传学改变,

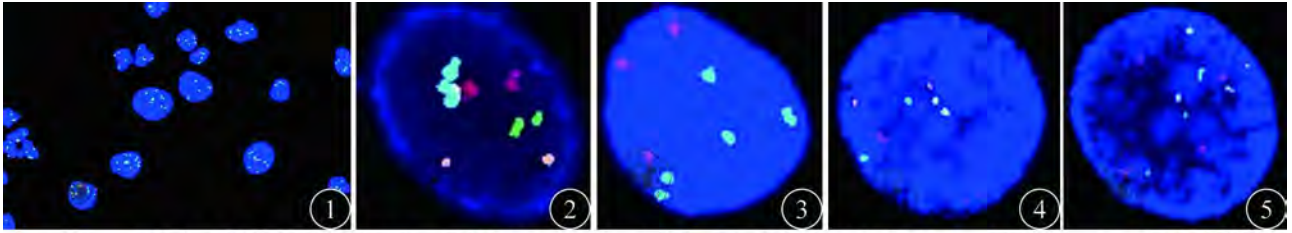


图1 上尿路上皮癌患者UroVysion FISH结果图。细胞群中可见多数细胞中CEP3-红、CEP7-绿、CEP17-浅蓝等染色体扩增及LSI 9p21-金黄缺失 图2 正常细胞,可见CEP3-红、CEP7-绿、CEP17-浅蓝及LSI 9p21-金黄各一对 图3 异常细胞,可见CEP3-红、CEP7-绿染色体非整倍性扩增及LSI 9p21-金黄缺失 图4 阴性对照片 图5 阳性对照片

提高了诊断膀胱癌的特异性及敏感性^[13]。美国 Vysis 公司生产的 UroVysion 试剂盒完成了 FDA 的评估并被批准用于膀胱癌的诊断和检测,由于应用于临床的时间还较短,且各家报道其对膀胱癌诊断的准确性差异较大,使临床医师对其诊断价值产生疑惑。杨明根等^[14]的 Meta 分析显示,UroVysion FISH 诊断尿路上皮肿瘤的敏感性为 74%,特异度为 88%,UroVysion FISH 和尿脱落细胞学检查的敏感度随肿瘤分级、分期的升高而增高。Mian 等^[15]为目前文献报道的最大样本量的前瞻性多中心队列研究,其结果显示 UroVysion FISH 用于诊断 UUTUC 的敏感度和特异度分别达 100% 和 89.5%。Chuang 等^[16]用 UroVysion FISH 对台湾人群的研究显示其诊断膀胱尿路上皮肿瘤的敏感度为 96.8%。本研究所得结果与上述结果相接近,表明 UroVysion FISH 在中国大陆人群中的同样具有较高临床应用价值。

UroVysion FISH 在西方国家较早前已在临床中获批准推广使用,本研究证明其同样适用于中国人群。虽然目前上尿路上皮肿瘤的诊断仍然依赖于影像学联合尿细胞学及内镜检查,UroVysion FISH 尚不能完全取代内镜检查操作,但 UroVysion FISH 以其高度的敏感性、特异性以及安全、无创性,必将有助于提高上泌尿系尿路上皮肿瘤的诊断水平,特别是在早期肿瘤、浅表性及低分化肿瘤的诊断和术后监测中,UroVysion FISH 联合影像学检查筛查可疑患者,可减少内镜检查次数,节约成本,减轻患者痛苦,同时可以获得较高诊断水平。

参 考 文 献

- [1] Gupta R, Paner GP, Amin MB. Neoplasm of the upper urinarytract: a review with focus on urothelial carcinoma of the pelvical system and aspects related to its diagnosis and reporting. *Adv Anat Pathol*, 2008, 15:127-139.
- [2] Stewart GD, Barial SV, Grigor KM, et al. A comparison of the pathology of transitional cell carcinoma of the bladder and upper urinarytract. *BJU Int*, 2005, 95:791-793.
- [3] Mills IW, Laniado ME, Patel A. The role of endoscopy in the manage-

ment of patients with upper urinarytract transitional cell carcinoma. *BJU Int*, 2001, 87:150-162.

- [4] Guarnizo E, Pavlovich CP, Seiba M, et al. Ureteroscopic biopsy of upper tract urothelial carcinoma: improved diagnostic accuracy and histopathological considerations using a multi-biopsy approach. *J Urol*, 2000, 163:52-55.
- [5] Chow NH, Tzai TS, Cheng HL, et al. Urinary cytodiagnosis: can it have a different prognostic implication than a diagnostic test? *Urol Int*, 1994, 53:18-23.
- [6] Bassi P, De Marco V, DeLisa A, et al. Non-invasive diagnostic tests for bladder cancer: a review of the literature. *Urol Int*, 2005, 75:193-200.
- [7] Sandberg AA, Berger CS. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol*, 1994, 151:545-560.
- [8] 王鹏, 靳风烁, 叶锦. 荧光原位杂交检测尿脱落细胞染色体异常诊断膀胱肿瘤的研究. *第三军医大学学报*, 2009, 31:948-951.
- [9] Marin-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, et al. Utility of a multiprobe fluorescence in situ hybridization assay in the detection of superficial urothelial bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 173:131-135.
- [10] Sarosdy MF, Kahn PR, Ziffer 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.
- [11] Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, 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 Urol*, 2003, 169:2101-2105.
- [12] 丁雪飞, 高鹰, 周广臣. 荧光原位杂交用于上泌尿系统尿路上皮癌的诊断研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5:1579-1582.
- [13] 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.
- [14] 杨明根, 赵晓昆, 侯轶, 等. 荧光原位杂交和尿细胞学检查对膀胱癌诊断意义的 Meta 分析. *癌症*, 2009, 28:655-662.
- [15] Mian C, Mazzoleni G, Vikoler S, et al. Fluorescence in situ hybridisation in the diagnosis of upper urinary tract tumours. *European Urology*, 2010, 58:288-292.
- [16] Chuang KL, Chuang HC, Ng KF, et al. Urinary fluorescence in situ hybridization assay for detecting urothelial carcinoma in Taiwanese patients. *BJU Int*, 2009, 105:1413-1416.

(收稿日期:2012-04-05)

(本文编辑: 郝锐)