

〔文章编号〕 1007-0893(2022)06-0066-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2022.06.020

# 多基因组合荧光原位杂交技术鉴别 皮肤黑色素瘤良恶性的价值

刘 亚 张娅娟

(商丘市第一人民医院, 河南 商丘 476100)

〔摘要〕 **目的:** 分析多基因组合荧光原位杂交技术(FISH)鉴别皮肤黑色素瘤良恶性的价值。**方法:** 在商丘市第一人民医院皮肤科2019年1月至2021年12月期间收诊的皮肤恶性黑色素瘤患者中选取40例作为恶性组, 另在同期收诊的皮肤良性黑色素瘤患者中选取40例作为良性组, 对两组患者进行FISH检查, 计算FISH检查的鉴别皮肤黑色素瘤的准确率、灵敏度、特异度, 并观察扩增表现。**结果:** 80例患者均经FISH检验获得满意荧光信号, 可以判读FISH结果。FISH鉴别皮肤黑色素瘤良恶性的准确率为92.50%(74/80), 特异度为95.00%(38/40), 灵敏度为90.00%(36/40)。恶性组中有36例经FISH检验为阳性, 表现为CCND1、RREB1和MYB基因异常改变, 其中CCND1扩增占36.11%, RREB1扩增占22.22%, RREB1扩增合并MYB缺失占36.11%, CCND1、RREB1和MYB同时异常的仅占5.56%。**结论:** FISH在皮肤黑色素瘤的良恶性鉴别中具有较高的效能, 并能在早期检出黑色素瘤异常的基因改变。

〔关键词〕 皮肤黑色素瘤; 多基因组合荧光原位杂交技术; 良恶性鉴别诊断

〔中图分类号〕 R 739.5 〔文献标识码〕 B

皮肤恶性黑色素瘤是皮肤与其他器官黑素细胞过度增生或分化引起的肿瘤, 其较为少见, 但是死亡率居皮肤恶性肿瘤的首位<sup>[1]</sup>。该病好发于白种人, 在我国的发病率不高, 而我国的皮肤恶性黑色素瘤患者被诊断时多已发展到中晚期, 平均生存期较白种人短。常见的皮肤恶性黑色素瘤主要可以分成4型, 即: 浅表扩散型、结节型、肢端雀斑样型和恶性雀斑样型, 在我国以肢端雀斑样型最为常见<sup>[2]</sup>。目前, 对于该病的发病机制尚未阐明, 多数学者认为与遗传因素、紫外线过度照射等因素有关。

皮肤恶性黑色素瘤虽然发病率不高, 但是其恶性程度居皮肤恶性肿瘤的首位, 具有转移发生早、死亡率高、生存期短的特点, 而早期诊断的患者生存率较晚期患者更高, 因此早诊断、早治疗是改善预后的关键<sup>[3]</sup>。在临床诊断中, 早期黑色素瘤与黑色素细胞痣之间常出现误诊情况, 影响临床治疗。近年来随着分子遗传学的发展, 临床上发现虽然皮肤恶性黑色素瘤和良性黑色素细胞痣都会出现基因突变, 但是基因突变却有明显差异<sup>[4-5]</sup>。而随着基因检测技术的发展进步, 多基因组合荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)逐渐成熟, 多基因组合的FISH试剂盒也被研发出来, 已逐渐开始在皮肤黑色素瘤的临床诊断上得到应用。基于此, 笔者探讨了FISH对皮肤黑色素瘤良恶性的鉴别效能, 现总结如下。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 研究对象

在商丘市第一人民医院皮肤科2019年1月至2021年12月期间收诊的皮肤恶性黑色素瘤患者中选取40例作为恶性组, 另在同期收诊的皮肤良性黑色素瘤患者中选取40例作为良性组。良性组患者中: 男17例, 女23例, 年龄33~72岁, 平均(52.1±6.7)岁; 患病部位: 上肢7例, 下肢16例, 面部4例, 胸壁7例, 脖颈6例。恶性组患者中: 男19例, 女21例, 年龄30~75岁, 平均(52.4±6.9)岁; 患病部位: 上肢8例, 下肢15例, 面部5例, 胸壁5例, 脖颈7例。两组患者的一般资料比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

1.1.1 纳入标准 (1) 经手术切除后病理组织学检查确诊, 由2名资深病理医师阅片切片, 诊断无误。

(2) 年龄≥18岁, 性别不限。(3) 无其他皮肤疾病。

(4) 知情同意本研究。

1.1.2 排除标准 (1) 既往有皮肤肿瘤病史的患者。

(2) 合并皮肤溃疡、皮肤破损的患者。(3) 合并其他严重疾病的患者。

### 1.2 仪器与试剂

本研究选用的FISH试剂盒为雅培公司生产, 试剂盒分别用绿色、红色、金色、青色四种荧光信号对应着

〔收稿日期〕 2022-01-17

〔作者简介〕 刘亚, 男, 技师, 主要研究方向是病理技术。

4 个染色体位点，并对应 3 个特定基因和 6 号染色体着丝粒信息。原位杂交仪为雅培公司生产，荧光显微镜为日本 Olympos 公司生产。

### 1.3 实验方法

患者术中切割的肿瘤病理组织送至病理科后，首先使用 10% 甲醛固定标本，然后用石蜡包埋处理。切片厚 4 μm，经 65 °C 烤片过夜。室温下用二甲苯脱蜡 10 min×2 次，依次放入梯度浓度（100%、85%、75%）乙醇中脱水各 3 min，然后在去离子水中浸泡 5 min，在 90 °C 去离子水中浸泡 30 min，37 °C 蛋白酶 K 溶液中 10~30 min。洗片后将玻片置入梯度浓度乙醇中脱水 3 min，自然晾干。然后在杂交区滴入 10 μL 探针，盖片封边。然后将玻片置入原位杂交仪中，75 °C 变性 5 min，37 °C 杂交过夜。然后将玻片置入洗涤液 I 中 73 °C 洗涤 2 min，置入洗涤液 II 中洗涤 1 min，将玻片置入 70% 乙醇中 3 min，然后自然晾干。最后在杂交区滴入 10 μL DAPI 复染剂，盖片，在荧光显微镜下取视野观察。

### 1.4 结果判读

选择 3 个视野，每个视野中选择 10 个肿瘤细胞，分别计数 4 个颜色的荧光信号数量。将任意 2 个及以上颜色的荧光信号缺失的肿瘤细胞排除在外。然后参照美国西北大学的 Gerami 等提出的判读标准（即 Gerami 标准<sup>[6]</sup>）进行判读：（1）CCND1（绿色）信号增加（即 > 2）之细胞数占计数细胞总数的百分比 ≥ 38%。（2）RREB1（红色）信号增加（即 > 2）之细胞数占计数细胞总数的百分比 ≥ 29%。（3）RREB1（红色）信号多于 CEP6（青色）信号的细胞数占计数细胞总数的百分比 ≥ 55%。（4）MYB（金色）信号少于 CEP6（青色）信号的细胞数占计数细胞总数的百分比 ≥ 40%。当经荧光显微镜下观察符合上述任意 1 条即可判断为阳性，反之则为阴性。

### 1.5 观察指标

以患者的病理组织学诊断结果为金标准，计算 FISH 检查的鉴别皮肤黑色素瘤的准确率、灵敏度、特异度，并观察扩增表现。

## 2 结果

80 例患者均经 FISH 检验获得满意荧光信号，可以判读 FISH 结果。FISH 鉴别皮肤黑色素瘤良恶性的准确率为 92.50%（74/80），特异度为 95.00%（38/40），灵敏度为 90.00%（36/40），见表 1。

在恶性组经 FISH 检验为阳性的 36 例患者中，CCND1、RREB1 和 MYB 表现出异常改变，其中以 CCND1、RREB1 扩增最常见，其中 CCND1 扩增占 36.11%（13/36），RREB1 扩增占 22.22%（8/36），还有 15 例患者表现为多基因异常，其中 RREB1 扩增合并 MYB 缺

失占 36.11%（13/36），有 2 例患者表现为 3 种基因同时出现异常，占 5.56%（2/36）。

表 1 FISH 结果与病理组织学结果比较（例）

FISH	病理组织学		合计
	恶性组	良性组	
阳性	36	2	38
阴性	4	38	42
合计	40	40	80

注：FISH—多基因组合荧光原位杂交技术。

## 3 讨论

黑色素瘤是皮肤恶性肿瘤中恶性程度最高的一种，其病理表现具有多样性，而且部分患者在诊断时易与黑色素细胞痣、硬化性黑色素瘤等混淆<sup>[7]</sup>。另外，良性黑色素细胞病变的病理表现也与恶性黑色素瘤相似，在组织形态学特点上有重叠现象等，这为恶性黑色素瘤的诊断带来挑战。目前临床上对于皮肤黑色素瘤的诊断依然以传统的苏木精—伊红（hematoxylin-eosin, HE）染色切片为主，但是其诊断过程中也存在许多问题：阅片时存在一定的主观性，组织形态学特征的重叠等，影响了临床诊断的准确率。因此，探寻更为可靠、客观的辅助诊断方法是目前众多皮肤科医师研究的重点课题之一。FISH 是一项能在中性加权固定石蜡包埋切片上进行的基因检测技术，该技术已日渐成熟，目前已在多种疾病的诊断中得到应用，能直观的显示出不同基因位点是否发生扩增、缺失、异位等改变，从而指导临床诊断和治疗。

### 3.1 恶性黑色素瘤应用 FISH 检验的理论基础

目前，已有大量的研究表明恶性黑色素瘤与良性黑色素细胞痣都会出现一些基因突变，如都可能出现 BRAF 基因突变，但是二者的基因突变情况存在较大差异<sup>[8-9]</sup>。其中皮肤黑色素瘤的基因突变一般表现为数量和种类较多的基因异常、染色体异常<sup>[10]</sup>，最常出现 6q、9p、8p、10q 的缺失、1q、6p、11q、17q、21q 等的扩增，而黑色素细胞痣则一般不会出现这些染色体改变<sup>[11]</sup>。因此，在皮肤黑色素瘤的 FISH 检测中，最初也是基于分子遗传学的研究结果选择的检测位点。因此，黑色素瘤诊断中进行 FISH 检验是可行的，在石蜡包埋切片中进行 FISH 检验具有实用性、便捷性、经济性特点。

### 3.2 黑色素瘤的多基因组合 FISH 检验试剂盒

目前在皮肤黑色素瘤诊断中多基因组合 FISH 检验试剂盒应用最广的是雅培公司生产的 4 色黑色素瘤 FISH 检验试剂盒，本研究中亦选择的是该类试剂盒。该试剂盒采用 4 种荧光标记 4 个染色体位点，并对应 3 个特定基因与 6 号染色体着丝粒。这种多基因组合的 FISH 试剂盒检测的基因都是恶性黑色素瘤患者最易出现的异常改变的基因，因此被认为是辅助诊断恶性黑色素瘤的有

效方法之一。应用这种4色基因组合的FISH试剂盒检验时,能通过观察不同颜色荧光肿瘤细胞计数等来发现CCND1、RREB1和MYB是否存在显著的扩增、缺失等异常改变,或是发现有无染色体位点的异常等。虽然目前医学界对于CCND1、RREB1和MYB等基因在恶性黑色素瘤的发生发展中的作用机制尚未完全阐明,但是临床实践中发现,绝大多数恶性黑色素瘤患者的基因突变出现在上述3种类型,一般为单种基因异常或是多种基因异常;而在黑色素细胞痣中则很少出现上述基因的异常。因此用该试剂盒进行FISH检验能早期鉴别诊断恶性黑色素瘤与黑色素细胞痣。

在应用多基因组合FISH试剂盒进行基因检验中,结果的判读也有多个标准,目前最广为接受和应用的是Gerami标准,本研究中亦采用的是该标准。Gerami标准是美国西北大学的Gerami等通过大样本病例研究后得出的标准,适用于国内外的病例,灵敏度高。

### 3.3 多基因组合FISH检验的诊断效能

本研究中应用的4色FISH试剂盒是由国外生产的,由于欧美白种人在皮肤恶性黑色素瘤的发病率、发病部位、类型、基因改变等方面与我国黄种人之间存在一定差异,因此,应用于欧美人群的诊断试剂并不能完全照搬,近年来已有文献报道指出,该4色FISH试剂盒用于我国恶性黑色素瘤患者的辅助诊断中也具有较高的灵敏度。苏静等人<sup>[12]</sup>的文献报道指出,4色FISH试剂盒在我国恶性黑色素瘤患者辅助诊断中应用具有较高的特异度和灵敏度。任敏等<sup>[13]</sup>提出4色FISH试剂盒在鉴别良恶性黑色素细胞病变中的灵敏度和特异度高。而本研究发现:多基因组合FISH检验对皮肤黑色素瘤的诊断准确率为92.50%,诊断特异度为95.00%,诊断灵敏度为90.00%,也说明该试剂盒在我国皮肤恶性黑色素瘤辅助诊断中具有较高的灵敏度和特异度。本研究中诊断特异度略高于诊断灵敏度,说明应用该试剂盒辅助诊断时的假阳性病例少,而诊断灵敏度略低一点可能是因为皮肤恶性黑色素瘤的基因改变具有多样化特征,因此当检验结果为阴性时也不能完全排除恶性黑色素瘤的可能性。

### 3.4 FISH检验中的技术问题

在皮肤黑色素瘤的诊断中,4色FISH检验的流程与其他疾病的FISH检验流程相似。由于我国的恶性黑色素瘤患者以肢端雀斑样型最为常见,而此类患者在4色FISH检验中,由于鳞状上皮细胞连接紧密,这会对组织的消化、杂交造成一定影响,因此在FISH检验中还需进行一些验证性的试验。另外,主要还存在2方面的问题:(1)固定处理对检验结果的影响。标本固定及时且充分,在多基因组合FISH检验中往往能获得满意的荧光信号,便于临床诊断;但是当标本固定处理中存在不及时、不充分等问题,可能导致荧光信号不佳的情况,影响

临床医师观察诊断。对于较大的标本应切开固定。(2)黑色素的影响。在本研究中,应用多基因组合FISH检验中发现,当肿瘤细胞内仅含有少量或是中等量的黑色素时,并不会对检验结果造成明显影响;只有当含有的黑色素过多时,方会产生荧光背景,从而影响对结果的判读。若在选取视野时发现此类情况,可及时另选择视野重新判读。因此,黑色素对于多基因组合FISH检验的干扰性不大。在色素性或非色素性的黑色素细胞病变,应用该方法均能获得较准确的诊断结果,指导临床诊断。

综上所述,FISH在皮肤黑色素瘤的良恶性鉴别中具有较高的效能,并能在早期检出黑色素瘤异常的基因改变,可作为辅助诊断手段应用。由经验丰富的技师操作,并将FISH结果与临床信息和组织学特点等结合进行综合诊断,可有效减少误诊和漏诊。

### [参考文献]

- (1) 王娜,李彩霞,袁肖海. 缝隙连接蛋白43与 $\beta$ -连环蛋白在皮肤恶性黑色素瘤中的表达及临床意义分析(J). 癌症进展, 2021, 19(1): 49-52.
- (2) 段文超,马禹昕,王亚玲,等. 皮肤恶性黑色素瘤血清IL-17、VEGF表达及与MVD的相关性研究(J). 国际医药卫生导报, 2021, 27(4): 494-496.
- (3) 高菲,辛琳琳. 恶性黑色素瘤的皮肤镜特征研究进展(J). 山东医药, 2018, 58(1): 109-112.
- (4) 王永芳,谭谦. 皮肤恶性黑色素瘤诊断和外科治疗的研究进展(J). 东南大学学报(医学版), 2021, 40(5): 721-725.
- (5) 程亮,赵大春,刘力玮,等. 黑色素瘤的分子病理诊断和个体化治疗进展(J). 中华病理学杂志, 2014, 43(9): 639-643.
- (6) Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, et al. Fluorescence in situ hybridization(FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma (J). Am J Surg Pathol, 2009, 33(8): 1146-1156.
- (7) 张明媚. 皮肤恶性黑色素瘤的临床病理特征和鉴别诊断(J). 医疗装备, 2017, 30(16): 49-50.
- (8) 《中国黑色素瘤规范化病理诊断专家共识(年版)》编写组. 中国黑色素瘤规范化病理诊断专家共识(2017年版)(J). 中华病理学杂志, 2018, 47(1): 7-13.
- (9) 秦文华. 33例恶性黑色素瘤患者临床病理特点和BRAF基因突变分析(J). 肿瘤基础与临床, 2019, 32(6): 527-529.
- (10) 陈君君,郑洪. BRAF基因V600E突变在恶性肿瘤中作用的研究进展(J). 山东医药, 2019, 59(26): 91-94.
- (11) 唐黎瑞,代杰,毛丽丽,等. 黏膜黑色素瘤基因组学研究进展(J). 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8(1): 22-28.
- (12) 苏静,王宇辰,柳剑英. 多位点荧光原位杂交辅助诊断皮肤黑色素瘤(J). 中华病理学杂志, 2018, 47(1): 70-74.
- (13) 任敏,柏乾明,孔蕴毅,等. 不同基因组合荧光原位杂交在黑色素瘤中的辅助诊断价值(J). 中华病理学杂志, 2020, 49(8): 827-833.