

文章编号:1005-6947(2008)10-1030-03

· 简要论著 ·

RT-PCR 检测门静脉血CK20 mRNA对诊断结肠癌 肝脏微转移的意义

黄志恒, 刘民生, 王平, 王成友

(广东省深圳市第二人民医院 器官移植科, 广东 深圳 510085)

摘要:目的 探讨结肠癌患者门静脉血CK20 mRNA的检测对肝脏微转移的诊断价值。方法 采用RT-PCR技术检测31例结肠癌患者门静脉血中CK20 mRNA。结果 全组检出CK20 mRNA阳性率为25.81%,随访时间平均(18.5±10.6)个月(6~32个月)。1例术中发现肝转移且门静脉血CK20为阳性;术时未见肝脏转移而门静脉血CK20阳性的7例中3例术后(6~15个月)出现肝转移(42.85%);术时未见肝转移且门静脉血CK20阴性的23例,2例出现肝转移(8.69%)。结论 结肠癌术中门静脉血CK20 mRNA的检测对于患者的预后和指导治疗有参考价值。

[中国普通外科杂志,2008,17(10):1030-1032]

关键词: 结肠肿瘤; CK20 mRNA; 微转移; 实时荧光定量 RT-PCR

中图分类号: R 735.3

文献标识码: B

癌细胞转移是恶性肿瘤的重要特征。肝脏是结直肠癌转移最常见的器官。临床上结直肠癌患者根治术后出现肝转移是影响患者预后的主要因素^[1-2]。因此,早期预测结肠癌患者的复发和转移具有重要的临床意义。

1 材料和方法

1.1 分组及一般资料

(1)结肠癌组:31例,为2003年6月—2006年4月收住本院并经病理学确诊的31例结肠癌患者。男21例,女10例,年龄33~74(平均52)岁。其中Dukes A期+B期11例,Dukes C期11例,Dukes D期9例,术中1例发现肝转移。术后病理分型:高分化腺癌16例,中分化腺癌9例,低分化腺癌6例。(2)对照组:20例,为同期随机抽取非肿瘤患者。男12例,女8例,年龄35~68(平均50)岁。其中6例为结肠多发息肉,8例为粘连性肠梗阻,6例为胆道结石。

1.2 标本采集

所有患者术中经门静脉采集5 mL血并以肝素抗凝。所有注射器及玻管均以焦炭酸二乙酯(DEPC)水处理。标本采集后立即存于-70℃低温冰箱中保存。

1.3 主要试剂与仪器

Trizol(Gibco公司),逆转录酶M-MLV(Pro-mega公司),Tag酶(Sangon公司)。定量聚合酶链式反应(PCR)仪(PE公司7700),凝胶紫外成像仪(Alpha Innotech Corporation),低温离心机(Beckman公司),CK20检测试剂盒(上海久盛医疗用品有限公司)。

1.4 血液CK20 mRNA的检测及标准曲线绘制

将淋巴细胞分离液进行有核细胞分离,以Trizol提取并制备总RNA;采用荧光定量CK20试剂盒检测。25 μL逆转录(RT)体系中,含RT反应液18 μL、M-MLV逆转录酶1 μL,RNasin 1 μL,总RNA 5 μL。37℃水浴反应30 min;每个反应取PCR反应液43 μL,Tag酶2 μL,RT反应产物5 μL,按如下条件进行扩增:预变性95℃5 min后,95℃30 s,62℃15 s,75℃15 s;共40个循环,最后72℃充分延伸10 min。根据所获得的标准曲线,得到每个检测标本的浓度(拷贝数/mL)。

1.5 统计学处理

用SPSS统计软件包进行统计学处理。不同

基金项目:深圳市科技局资助项目(200603064)

收稿日期:2008-02-25; **修订日期:**2008-06-16。

作者简介:黄志恒,男,深圳市第二人民医院器主主治医师,主要从事肝脏肿瘤方面的研究。

通讯作者:刘民生 E-mail:ml518@126.com

分期及不同分化程度间表达阳性率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 两组外周血CK20 mRNA表达的差异

以拷贝数 ≥ 1 拷贝/mL为阳性界限。结肠癌组阳性率为25.81% (8/31),其中Dukes A期与B期为18.20% (2/11),C期与D期为30.00% (6/20);对照组20例中CK20 mRNA表达阳性率仅1例,阳性率为5.00%,两组差异有统计学意义($P < 0.025$)。

2.2 不同分期结肠癌患者门静脉血CK20 mRNA表达的差异

Dukes A期与B期患者CK20 mRNA表达较低,Dukes C期与D期CK20 mRNA表达逐渐增高,但不同分期表达阳性率相比均无统计学差异($P > 0.05$)。此外,Dukes A期与B期CK20 mRNA表达水平 > 10 拷贝/mL者占9.00% (1/11),而Dukes C期与D期患者中 > 10 拷贝/mL者占15.00% (3/20) (表1)。

2.3 不同分化程度的结肠癌患者间CK20 mRNA表达的差异

随着结肠癌病理分化程度的降低,CK20 mRNA的阳性率呈升高趋势,但3种病理分化程度的阳性率相比无统计学差异($P > 0.05$) (表2)。

表1 不同Dukes'分期结肠癌患者门静脉血CK20 mRNA的表达

Duke's 分期	n	CK20 mRNA(拷贝数/mL)			CK20 mRNA 阳性例数(%)
		1~10	10~100	>100	
A+B	11	1	1	0	2(18.18)
C	11	2	1	0	3(27.27)
D	9	1	1	1	3(33.33)

表2 不同分化程度的结肠癌患者门静脉血CK20 mRNA的表达

分化程度	n	CK20 mRNA(拷贝数/mL)			CK20 mRNA 阳性例数(%)
		1~10	10~100	>100	
高	16	2	2	0	4(25.00)
中	9	1	1	0	2(22.22)
低	6	0	1	1	2(33.33)

2.4 门静脉血中CK20 mRNA的表达与结肠癌肝转移

术中及术后随访发现,术中明确有肝转移的1例门静脉血CK20 mRNA阳性表达,而CK20 mRNA阳性表达术中肉眼未见转移灶的7例患者中,术后随访3例(第6~15个月)出现肝转移(表3)。

表3 门静脉血中CK20 mRNA的表达与结肠癌发生肝转移的关系

CK20 mRNA表达	例数	术中肝转移			总肝转移数			组间比较
		有	无	阳性率(%)	有	无	阳性率(%)	
阳性	8	1	7	14.28	4	4	50.00	$P < 0.025$
阴性	23	0	23	0	2	21	8.69	

3 讨论

在结肠癌患者中,肿瘤的肝转移是治疗失败的主要原因,也是结肠癌患者治愈率不能提高的主要影响因素之一。因此,在结肠癌患者中检测出肿瘤早期肝脏转移/微转移的指标具有一定的临床意义。细胞角蛋白(cytokeratin, CK)是上皮细胞骨架的组成部分,CK至少有20种,其中CK20表达范围较特异,仅局限在胃肠上皮细胞,几乎全部胃肠道肿瘤以及在侵袭、转移、扩散到其它组织器官时,CK20均保持稳定表达^[3-4]。因

此,当门静脉血中有恶性肿瘤细胞存在时,则可能检测到CK20 mRNA。检测肿瘤转移的方法包括利用肿瘤细胞膜表面抗原的单克隆抗体检测外周血、骨髓、淋巴结中的肿瘤细胞^[5];应用流式细胞仪技术检测患者骨髓中存在的微转移肿瘤细胞^[6]以及免疫组织化学技术等。但上述方法均存在敏感度或特异度不足的缺点。随着分子生物学的飞速发展,运用RT-PCR检测患者血液中某些特异性基因的表达已成为一种判断有无异位肿瘤细胞存在的重要手段^[7]。

本实验31例结肠癌患者门静脉血中

CK20 mRNA表达的总阳性率为 25.81%。随着 Dukes 分期的提高阳性率亦随之提高,但各分期间的阳性率并无统计学差异($P > 0.05$)。这可能与病例数较少有关。此外,在 Dukes D 期有明确转移灶的 9 例患者中 6 例为阴性,可能原因有:(1) 肿瘤细胞释放入血的时间有所不同,单点时间的检测可产生一定的偏倚;(2) 部分结肠上皮不表达 CK20 mRNA。本研究还发现,在临床诊断为 Dukes A + B 期的患者中亦有较高的 CK20 mRNA 表达(18.18%)。说明早期患者已有肿瘤细胞脱落入血循环,应加强对这部分患者的检测。

随访发现,术时肝转移阴性但门静脉血中 CK20 mRNA 表达阳性的病例,术后发生肝转移的机会增加(42.85%),其中 2 例分别在术后 4 个月和 6 个月出现肝转移;而术时无肝转移和门静脉血中 CK20 mRNA 表达阴性的 23 例患者中只有 2 例出现肝转移(8.69%)($P < 0.05$)。提示门静脉血 CK20 mRNA 表达阳性的结肠癌患者可能具有肝转移倾向或术时已经存在早期肝转移^[6],只是尚未形成一定大小的肝脏微转移灶而已。研究表明,CK20 mRNA 表达水平高低的检测对于结肠癌门静脉血中是否存在肿瘤细胞有一定的提示意义。因此门静脉血 CK20 的检测可能有助于筛选结肠癌肝转移的高危病例;对于此类患者应密切追踪随访,定期行肝脏 B 超,CT,磁共振显

像(MRI)等检查,以期尽可能早地发现患者肝内转移灶,使其得以及时治疗;并积极给予针对性辅助治疗,包括全身化疗,门静脉置管等,在微转移时即应及时实施治疗,有可能减少结肠癌患者术后复发和肝转移灶的形成。

参考文献:

- [1] Wyld DK, Selby P, Perren TJ, *et al.* Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin20 [J]. *Int J Cancer*, 1998, 79(3):288-293.
- [2] Chen YH, Gao WH, Zhou TL, *et al.* Department of bone marrow micrometastasis [J]. *Hybridoma*, 1999, 18(4):464-466.
- [3] Ghossein RA, Rosai J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastasis and circulating tumor cells [J]. *Cancer*, 1996, 78(1):10-16.
- [4] 刘民生, 黄志恒, 杨锋, 等. 大肠癌患者门静脉血 CK20 mRNA 检测的临床意义 [J]. *实用诊断与治疗杂志*, 2007, 21(1):1-2.
- [5] 蔡成机. 对胃、结肠癌肝转移几个临床问题的思考 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(10):721-722.
- [6] Deans G T, Parks T G, Rowlands B J, *et al.* Prognostic factors in colorectal cancer [J]. *Br J Surg*, 1992, 79(5):608-613.
- [7] 段明松, 苏加庆, 周增祥. 结直肠癌转移相关基因的研究进展 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(9):890-891.

本刊为新闻出版总署首批出版规范检查 A 类期刊

国家新闻出版总署 2007 年对全国期刊进行了一次全面的出版规范检查,这项工作是从 2007 年 7 月 1 日启动的,检查组将 7300 多种期刊全部初检、复检,并经各省新闻出版局报刊处认真核实,首批合格期刊名单已在媒体和中国记者网上公布。《中国普通外科杂志》顺利通过这次检查,成为新闻出版总署首批出版规范检查合格(A类)期刊。同时国家新闻出版总署对多年来严格遵守出版法规的期刊进行了表扬,认为这些期刊是全国期刊树立学习的榜样。

多年来,中国普通外科杂志在期刊主管主办单位和新闻出版管理部门的正确指导和管理下,坚持科学发展观,严格遵守新闻出版规范、法规和相关规定,保证了刊物按既定的办刊宗旨出版。今后本刊将进一步做好期刊的编辑出版工作,使《中国普通外科杂志》更上一个新的台阶,在读者心中树立更好的形象,为中国期刊增光添彩。