

文章编号:1005-6947(2007)09-0872-03

· 临床研究 ·

## 胃癌腹腔微转移检测及其临床意义

邱文才<sup>1</sup>, 王维刚<sup>1</sup>, 王志刚<sup>1</sup>, 陈刚<sup>2</sup>, 席时富<sup>2</sup>, 郑起<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学附属第六人民医院 普通外科, 上海 200233; 2. 南京大学附属鼓楼医院 普通外科, 江苏南京 210008)

**摘要:**目的 探讨胃癌检测胃癌腹腔微转移的作用及临床意义。方法 选择50例术前及术中检查均未发现腹膜转移的胃癌病例, 术中行道格拉斯窝处的腹膜活检并行HE常规染色和CK-20免疫组化染色检查, 同时用RT-PCR方法检测胃癌腹腔冲洗液中CK-20 mRNA的表达。结果 全部患者道格拉斯窝活检腹膜HE染色均为阴性。CK-20免疫组化检查的阳性率为24.0% (12/50); RT-PCR检测腹腔冲洗液中CK-20 mRNA的阳性率为36.0% (18/50); CK-20免疫组化检查阳性的12例患者腹腔冲洗液中CK-20 mRNA检查均为阳性。CK-20 mRNA阳性率与胃癌浸润深度、组织学类型和淋巴结转移数目有关( $P < 0.05$ )。CK-20 mRNA阳性和阴性胃癌患者3年生存率分别为22.2%和62.5% ( $P < 0.01$ )。结论 术前检查或术中探查未发现腹膜转移的胃癌患者, 可行腹腔冲洗液RT-PCR检查以发现有无腹腔微转移, 该项检查可为胃癌正确分期、腹腔内辅助化疗及预后判断提供证据。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(9): 872-874]

**关键词:** 胃肿瘤/病理学; 细胞角蛋白20; 肿瘤转移

**中图分类号:** R 735.2      **文献标识码:** A

## Detection of peritoneal micrometastases of gastric cancer and its clinical significance

QIU Wen-cai<sup>1</sup>, WANG Wei-gang<sup>1</sup>, WANG Zhi-gang<sup>1</sup>, CHEN Gang<sup>2</sup>, XI Shi-fu<sup>2</sup>, ZHENG Qi<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, Affiliated No 6 Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Gulou Hospital, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the clinical significance of the intraoperative detection of peritoneal micrometastases of gastric cancer. **Methods** In selected 50 cases of gastric cancer in which no obvious peritoneal metastasis was found preoperatively or during laparotomy, Douglas's pouch peritoneal biopsy was undertaken intraoperatively, then HE and CK-20 immunohistochemistry staining of the specimens was performed. The expression of CK-20 mRNA in peritoneal irrigation fluid was also determined by RT-PCR.

**Results** HE staining of all cases was negative. The positive rate of CK-20 immunohistochemistry staining was 24.0% (12/50), and 36.0% (18/50) with RT-PCR method. The positive rate of CK-20 mRNA was significantly related with the histological type, the depth of invasion and the number of lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The 3-year survival rate of patients with positive and negative expression of CK-20 mRNA was 22.2% and 62.5% respectively ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The detection of CK-20 mRNA expression by RT-PCR is a sensitive method for determining peritoneal micrometastases in gastric cancer. It may provide evidence for the correct staging, adjuvant chemotherapy and estimation of prognosis of gastric cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(9): 872-874]

**Key words:** Gastric cancer/pathol; Cytokeratin 20 (CK-20); Peritoneal Micrometastasis

**CLC number:** R 735.2      **Document code:** A

收稿日期:2007-06-25; 修订日期:2007-09-04。

作者简介:邱文才,男,上海人,上海交通大学医学院博士研究生,主要从事胃肠肿瘤和胃肠动力学方面的研究

通讯作者:郑起 E-mail:sh6\_zhengqi@126.com

胃癌的腹膜复发和转移占有胃癌术后复发的半数以上,而腹膜转移者的5年生存率低于20%<sup>[1-2]</sup>。临床所遇多数腹膜转移患者在已出现腹水、盆腔肿块或肠梗阻才得以确诊,已失去可治机会。

腹腔微转移的早期临床表现不明显。盆腹膜是发生腹膜转移的常见部位。腹腔微转移的发生率、腹腔微转移与肿瘤临床病理特征的关系等问题目前尚无定论。我科自2002年3月—2004年3月在胃癌术中行道格拉斯窝处的腹膜活检,并行HE常规染色和CK-20免疫组化染色检查,同时用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)方法检测胃癌腹腔冲洗液中CK-20 mRNA的表达情况,以期发现腹腔的微转移建立检测方法,并分析其与临床、病理参数的关系,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 一般资料

本组男31例,女19例;年龄22~84(平均56.4)岁。术前常规检查及术中经仔细探查均未发现有腹膜转移灶。术后病理学检查显示胃癌组织学类型为高中分化腺癌者31例,低分化腺癌12例,黏液腺癌7例;未侵及浆膜18例,侵及浆膜25例,侵及胃外脏器7例;无淋巴结转移9例,有淋巴结转移的41例,其中转移数目在1~6枚者13例,7~12枚者18例,>12枚者10例。

### 1.2 标本采取

1.2.1 腹腔冲洗液收集 在胃癌根治术中,开腹后,将生理盐水100 mL倒入盆腔,轻轻搅动后收集冲洗液;若有腹腔积液则直接吸出。吸取后将冲洗液或腹腔积液于0℃下,2 000 r/min离心20 min,其余沉渣保存于-80℃以备提取RNA。

1.2.2 腹膜活检 从切口将消毒的乙状结肠镜经切口向下暴露道格拉斯窝(女性为直肠子宫陷凹),用活检钳在该窝夹取2处腹膜组织;必要时使用冷光源照明帮助钳夹。钳夹后,纱布压迫止血数分钟,并仔细观察确认已止血,以避免术后出血。

### 1.3 方法

1.3.1 腹膜标本染色 活检腹膜组织均经10%福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm切片。每例常规行HE染色,常规病理组织学诊断。免疫组化染色方法采用免疫组化S-P法。染色步骤如下:切片常规脱蜡,CK-20单克隆抗体(购自丹

麦Dako公司)均经胰酶消化;其他步骤按照S-P试剂盒说明书进行。用磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作为空白对照及阴性对照。免疫组化染色发现腹膜细胞核或胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性反应。

1.3.2 腹腔冲洗液的RT-PCR检测 采用Trizol试剂盒,按说明书进行RNA提取,获得总RNA。引物设计及合成参考文献报告的序列<sup>[3]</sup>。引物合成由上海生工技术有限公司合成。CK-20上游引物为5'-CAGACACACGGTGAAGTATGG-3',下游引物为5'-CAGACACACGGTGAAGTATGG-3';CK-20阳性扩增片段长度370 bp。相同条件下扩增β-actin作为内参照物,上游引物为5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',下游引物为5'-CTCCTTAATGTCAGGCACGATTTC-3';扩增片段长度500 bp。cDNA合成:取总RNA 5 μg于20 μL逆转录体系,42℃1 h合成cDNA。PCR反应体系为50 μL,扩增条件:94℃变性1 min,58℃退火1 min,72℃延伸1 min,循环35次,末次延长10 min。CK-20及β-actin产物在2%琼脂糖凝胶板中电泳,溴化乙锭染色、紫外光下照相。β-actin扩增阳性样本视为有效样本,CK-20扩增阳性视为有腹腔微转移。

### 1.4 数据处理

组间差异用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性。

## 2 结果

### 2.1 胃癌腹腔微转移阳性率

50例患者中活检腹膜HE染色无阳性者。活检腹膜CK-20免疫组化染色阳性率为24.0%(12/50);腹腔冲洗液CK-20 mRNA阳性率为36.0%(18/50)。免疫组化检查腹膜微转移CK-20阳性的12例腹腔冲洗液CK-20 mRNA检测均为阳性。

### 2.2 腹腔微转移阳性率与肿瘤病理因数的关系

2.2.1 与组织学类型的关系 高中分化腺癌,低分化腺癌和黏液腺癌组腹腔微转移阳性率分别为22.6%(7/31),50.0%(6/12)和71.4%(5/7),三者间两两比较差异均有显著性( $P < 0.05$ )。

2.2.2 与癌浸润深度的关系 未侵及浆膜,侵及浆膜和侵及胃外脏器组腹腔微转移阳性率分别为16.7%(3/18),40.0%(10/25)和71.4%(5/7),

3者间两两比较差异均有显著性( $P < 0.05$ )。

2.2.3 与淋巴结转移数目的关系 无淋巴结转移,转移数目1~6枚、转移数目7~12枚和转移数目>12枚腹腔微转移阳性率分别为0%(0/9),23.1%(3/13),38.9%(7/18)和80.0%(8/10),四者间两两比较差异均有显著性( $P < 0.05$ )。

### 2.3 腹腔微转移阳性率与胃癌预后的关系

3年随访发现,18例胃癌腹腔微转移阳性者生存3年以上仅4例,生存率为22.2%(4/18);32例胃癌腹腔微转移阴性者生存3年以上20例,生存率为62.5%(20/32),两者差异有非常显著性( $P < 0.01$ )。随访病例死亡原因均为肿瘤转移或复发。

## 3 讨论

Raj GV等<sup>[4]</sup>提出,微转移是指非造血系统恶性肿瘤在其发展过程中,肿瘤细胞播散并存活于淋巴系统、血循环、骨髓、肝、肾、肺等组织和器官中的微小肿瘤灶,常无任何临床表现。常规检查难以检测到微转移,但微转移灶可以迅速生长成为复发和转移灶。检测肿瘤患者的微转移对肿瘤的分期、治疗、复发及预后都有重要的指导意义<sup>[5]</sup>。RT-PCR法可以从 $10^6 \sim 10^7$ 个正常组织细胞中检出1个肿瘤细胞,有较高的敏感性<sup>[6-7]</sup>。细胞角蛋白CK-20具有严格的特异性分布,主要分布于胃肠道黏膜上皮、泌尿道移行细胞等,而在腹膜间皮细胞缺乏表达,因而它可作为胃癌肿瘤细胞标记物,有较高的特异性。通过RT-PCR法检测腹腔冲洗液中CK-20 mRNA的表达,可较灵敏地检获腹腔中的游离癌细胞,可反映胃癌腹腔微转移状态。Yonemura等<sup>[8]</sup>报告用RT-PCR的方法对腹腔灌洗液检测腹腔微转移,检出CEA-mRNA阳性率为31%(15/48),本文结果与之相似。本文结果发现,道格拉斯窝腹膜HE染色均为阴性;而腹膜CK-20免疫组化检查腹膜微转移的阳性率为24.0%(12/50);RT-PCR检测腹腔冲洗液中CK-20 mRNA阳性率为36.0%(18/50)。但CK-20 mRNA阳性者是否一定发展成为腹膜转移,值得探讨。这是因为胃癌腹腔游离癌细胞种植必须具备2个条件:一是游离癌细胞具有活性;二是应有适宜癌细胞种植的场所。本组50例患者中发现腹腔微转移18例,进一步研究发现,腹腔微转移阳性率与肿瘤浸润深度、组织学类型和淋巴结

转移数目有关;肿瘤浸润深度越深、分化越差、淋巴结转移数目越多则发生腹腔微转移的几率越大。提示分化差、侵犯浆膜或浆膜外和淋巴结转移数目多是胃癌出现腹腔微转移的高危因素。

本文随访结果显示:腹腔冲洗液CK-20 mRNA阴性胃癌患者3年生存率(62.5%),高于阳性患者(22.2%)( $P < 0.01$ )。说明腹腔冲洗液中CK-20 mRNA阳性,发生远期腹膜转移的多于CK-20 mRNA阴性患者。CK-20 mRNA阳性者是否必然发展成为腹膜转移取决于游离癌细胞是否有活性和有适宜癌细胞种植的场所。因而,以RT-PCR检测腹腔冲洗液中的癌细胞,有利于尽早发现腹腔内亚临床微转移灶,为术后进一步治疗及预后判断提供帮助。

### 参考文献:

- [1] 朱正纲. 充分重视胃癌腹膜转移的预防、诊断与治疗[J]. 外科理论与实践, 2003, 8(1): 16-17.
- [2] 温玉刚, 潘常青, 李克. MACS检测胃癌腹腔冲洗液游离癌细胞的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(4): 301-304.
- [3] Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, et al. Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung [J]. Cancer, 1999, 86(11): 2398-2405.
- [4] Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors [J]. Cancer, 1998, 82(2): 1419-1442.
- [5] 王昭, 詹文华, 何裕隆, 等. 胃癌患者N2淋巴结转移和腹膜扩散的相关因素和预后分析[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(9): 645-649.
- [6] Nishida S, Kitamura K, Ichikawa D, et al. Molecular detection of disseminated cancer cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2000, 20(3B): 2155-2159.
- [7] Zhong XY, Kaul S, Lin YS, et al. Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with reverse transcriptase/polymerase chain reaction for cytokeratin-19 [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, 126(4): 212-218.
- [8] Yonemura Y, Fujimura T, Ninomiya I, et al. Prediction of peritoneal micrometastases by peritoneal lavaged cytology and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for matrix metalloproteinase-7 RNA [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(6): 1647-1653.