

文章编号:1005-6947(2005)10-0725-03

·胃、结直肠癌专题研究·

## 胃癌腹腔微转移的研究及其临床意义

王夫景, 于洪亮, 杨茂鹏, 高岩, 黄跃南, 张秀云, 杨维良

(哈尔滨医科大学附属第二医院 普通外科, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**目的 运用细胞学及 RT-PCR 方法检测胃癌患者术中腹腔冲洗液和腹膜组织, 以探讨这些方法对预测胃癌腹腔微转移的意义。方法 收集 38 例胃癌和 5 例胃良性病变患者的术中腹腔冲洗液, 并同时切除少量大网膜、腹膜作为对照。用 RT-PCR 方法测定冲洗液中游离细胞的 CEA mRNA 表达, 同时作冲洗液细胞学检查(PLC)。结果 腹腔冲洗液和腹膜组织中的 CEA mRNA 的阳性率分别为 36.8% (14/38) 和 39.5% (15/38), 皆高于腹腔冲洗液 PLC 的 26.3% (10/38)。CEA mRNA 的阳性率与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移、浆膜侵犯深度有关。结论 CEART-PCR 方法对于检测腹腔微量游离癌细胞较 PLC 有更高的灵敏度和特异性, 是一种检测胃癌腹腔微转移的有效方法。

**关键词:**胃肿瘤/病理学; 肿瘤转移; 腹腔肿瘤/继发性

**中图分类号:** R735; R73-37 **文献标识码:** A

### Study of peritoneal micrometastasis of gastric cancer and its clinical significance

WANG Fu-jing, YU Hong-liang, YANG Mao-peng, GAO Yan, HUANG Yue-nan, ZHANG Xiu-yun, YANG Wei-liang

(Department of General Surgery, the Second Affiliate Hospital, Haerbin Medical University, Haerbin 150068, China)

**Abstract: Objective** To explore the significance of using cytologic and RT-PCR methods to examine peritoneal washings and peritoneal tissues of gastric cancer patients in prediction of peritoneal micrometastasis.

**Methods** The peritoneal washings of 38 patients with gastric cancer and 5 patients with benign gastric lesions were collected and, at the same time, a small amount of omentum and peritoneum were removed for control. CEA mRNA expression of free cells in peritoneal washings were detected by RT-PCR method and also cytology of the washings were performed. **Results** The CEA mRNA expression rate of peritoneal washings and peritoneal tissues were 36.8% (14/38) and 39.5% (15/38) respectively. Both were more sensitive than that of cytologic examination 26.3% (10/38). TNM staging, depth of invasion, lymph node metastasis, and serosal involvement were related to the expression rate of CEA mRNA. **Conclusions** mRNA of CEA is more sensitive and specific than cytologic examination for detecting free cancer cells in peritoneal cavity. It is an effective method for detecting peritoneal micrometastases in gastric cancer patient.

**Key words:** Stomach Neoplasms/pathol; Neoplasms Metastasis; Abdominal Neoplasms/second

**CLC number:** R735; R73-37 **Document code:** A

近年来, 由于检测手段的不断完善, 对胃癌的早期诊断已有了长足的进步。但对于已侵及浆膜

的胃癌患者, 术后易发生腹膜转移, 5 年生存率低于 35%<sup>[1]</sup>。如何正确的筛检腹膜复发高危病例并予以有效的治疗, 是提高进展期胃癌手术效果的关键问题之一。已有研究<sup>[2]</sup>表明, 细胞学检查(PLC)的阳性结果与低生存率之间有明显的统计学意义。但传统的 PLC 缺乏一定的灵敏度; 部分阴性结果的患者, 术后仍有腹膜复发。

目前(RT-PCR)反转录聚合酶链式反应已被广

**基金项目:**黑龙江省十五科技攻关资金资助项目(GC02C140-02)。

**收稿日期:**2004-11-04; **修订日期:**2005-08-29。

**作者简介:**王夫景(1963-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 哈尔滨医科大学附属第二医院教授, 主要从事消化道肿瘤的临床与基础方面的研究。

**通讯作者:**王夫景 电话:0451-86605575; E-mail:wangfujing-hyd@163.com。

泛地应用于检查外周血、淋巴结、骨等微转移病灶<sup>[3,4]</sup>,显示了较高的灵敏度和特异性。本研究采用巢式 RT-PCR 法,检测术中收集的腹水或腹腔冲洗液 CEA mRNA 的表达,并与常规 PLC 的检测比较;同时对腹膜转移病灶和腹膜组织亦进行 CEA mRNA 的检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 研究对象 收集 2003 年 8 月~2004 年 5 月间本院普外科的胃癌手术患者 38 例和胃良性病变 5 例的临床资料。依据术中所见及术后病理分期、浆膜类型、病理类型分组。根据病理结果和恶性肿瘤国际临床病期(TNM)分期。组织学类型中将乳头状腺癌和管状腺癌 I, II 级归入分化类,其余病理类型归入未分化类。同时用人大肠癌细胞系株 CCL187 作为阳性对照。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂购于 Inlrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司;大肠癌细胞系株 CCL187 取自本校科研中心。主要设备为 PCR 仪、凝胶成像系统及离心机。

### 1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 手术开腹后,于 Douglas 窝或左膈下置入 1 根导尿管,注入无菌生理盐水 250 mL,轻轻搅动后吸出。若有自然腹水的病例则直接吸出。吸取后将冲洗液或腹水于 4℃ 下以 2 000 r/min 离心 20 min。取少许沉渣用作细胞学检查其余沉渣保存于 -80℃ 下。如有腹膜转移病灶则予部分切除,否则切除少量大网膜、盆腔腹膜和膈腹膜,也置于 -80℃ 下保存。

1.2.2 RT-PCR 检测总 RNA 提取 将标本内加入 Trizol 试剂,按 Trizol 说明书步骤进行 RNA 提取,获总 RNA。先行逆转录,按说明书操作;再行 PCR,引物序列参照文献<sup>[5]</sup>。CEA 巢式 PCR 特殊引物序列如下: A ( outersense ) 为 5-TCTGGA ACTTCTCCTGGT CTCTCAGCTGG-3'; B ( antisense ): 为 5-TGTAGC TGTT-GCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC-3'; C ( innersense ) 5-GGGCCACTGTCGGCATCATGAATTGG-3'。

第 1 轮采用引物 A 和 B,第 2 轮采用引物 B 和 C。反应条件相同,94℃ 变性 1 min,72℃ 退火和延伸 2.5 min;反应体系为 25 μL。将第 1 轮产物 1 μL 在第 2 轮中扩增,皆为 30 个循环;第 2 轮产物 5 μL 置于 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色。呈现 131 bp 条带为阳性,凝胶成像仪扫描记录。取阳性

产物测序鉴定。另外,每例标本均用管家基因 β-actin 作为内参照以检验 RNA 样本的完整性,同时用 CCL187 大肠癌细胞系株 RNA 样本作阳性对照以排除假阴性;用不含 RNA 的样本扩增作阴性对照以排除假阳性。对 5 例胃良性病变的腹腔冲洗液和 12 个腹膜组织标本也行 CEA mRNA 的巢式检测,作为阴性对照。

1.2.3 PLC 涂片后作 HE 染色行 PLC

1.2.4 统计学方法  $\chi^2$  检验或确切概率法,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 CEA mRNA 的阳性率

2.1.1 不同病期者 CEA mRNA 和 PLC 阳性率的比较 38 例胃癌腹腔液和腹膜组织中 CEA mRNA 的阳性率为 36.8% (14/38) 和 39.5% (15/38),均高于腹腔液 PLC 阳性率的 26.3% (10/38)。在 13 例早中期(癌组织侵犯固有肌层但未侵犯浆膜下层)患者中,有 1 例 CEA mRNA 阳性,PLC 均为阴性;而在晚期 1 组(癌组织侵犯浆膜下层但无大体腹膜转移)中,CEA mRNA 阳性率均明显高于 PLC ( $P < 0.05$ );晚期 2 组(癌组织侵犯浆膜下层有大体腹膜转移)CEA mRNA 阳性率与 PLC 阳性率无统计学意义(表 1)。

表 1 不同病期胃癌腹腔液 RT-PCR CEA mRNA 和 PLC 阳性率的比较

病期	n	RT-PCR(+) 例(%)	PLC(+) 例(%)	P 值
早中期	13	1(7.6)	0	-
晚期 1 组	21	9(42.8)	6(28.5)	<0.05
晚期 2 组	4	4(100)	4(100)	NS
总计	38	14(36.8)	10(26.3)	<0.05

### 2.1.2 腹膜组织及腹腔液 CEA mRNA 和 PLC 比较

腹膜组织 CEA mRNA 阳性者 PLC 均阳性,腹腔液 PLC 阳性者 CEA mRNA 亦阳性。腹腔液 CEA mRNA 阳性者腹膜组织 CEA mRNA 皆阳性。5 例胃良性病变患者的腹腔液均为阴性,但其 12 个腹膜标本中有 1 个 CEA mRNA 阳性。同时 4 例肉眼腹膜转移病例的腹膜转移病灶 CEA mRNA、腹水或冲洗液中 PLC 和 CEA mRNA 均阳性。

### 2.2 CEA mRNA 表达与临床病理因素的关系

本组资料 CEA mRNA 表达与组织学类型、淋巴结转移、浆膜侵犯程度、肿瘤分化程度和分期有关

( $P < 0.05$ )。浆膜侵犯者、淋巴结转移者、肿瘤分化程度差者、TNM分期越晚者 CEA mRNA 表达阳性的可能性较大(表2)。

表2 CEA mRNA 表达与临床病理因素的关系

临床病理因素	病例数 (n)	腹腔液		P	腹膜组织		P
		CEA mRNA			CEA mRNA		
		阳性 (n)	阴性 (n)		阳性 (n)	阴性 (n)	
肿瘤大小							
<5cm	17	6	11	NS	7	10	NS
≥5cm	21	8	13		1	11	
组织学类型							
分化	6	1	5	<0.05	1	5	<0.05
未分化	32	13	19		14	18	
浆膜侵犯							
阴性	11	2	9	<0.05	2	9	<0.05
阳性	27	12	15		13	14	
淋巴结转移							
阴性	12	4	8	<0.05	4	8	<0.05
阳性	26	10	16		11	15	
TNM分期							
I+II	13	3	10	<0.05	4	9	<0.05
III+IV	25	11	14		11	14	

### 3 讨论

胃癌术后腹膜复发的问题迄今尚未解决。许多术中直视下貌似完整的浆膜,实际上已被各种水解酶溶解,癌细胞裸露并脱落入腹腔。文献报道,进展期胃癌腹膜转移率约为10%<sup>[6]</sup>,而术后腹膜复发率高达50%<sup>[7]</sup>。无论是复发或腹膜转移均与腹腔存在的癌细胞有关。检测这些癌细胞对于诊断和预测腹膜转移和复发有重要意义。但常规PLC检出率低,尤其是无腹水或腹腔癌细胞较少的病例常会漏诊。这也是部分患者细胞学阴性而术后仍有复发的原因之一。

近年RT-PCR方法已被用于测量癌细胞中的特殊mRNA如淋巴结、肝脏和血液癌细胞的微转移检测,显示了较高的灵敏性。本实验采用该方法检测腹腔冲洗液的游离细胞。由于腹膜间皮细胞不表达CEA,故选择CEA的mRNA作为标志,以明确地区分开间皮细胞和肿瘤细胞。值得注意的是,腹腔液中白细胞可以表达CEA相关基因,因

此在进行PCR扩增时,应将退火温度控制在65℃以下,以免由于白细胞表达CEA所造成的假阳性<sup>[8]</sup>。5例胃良性病变的15个腹膜标本中有1个CEA mRNA阳性,使其特异性有所下降;这可能与白细胞少量表达CEA相关基因有关。笔者认为,对胃癌患者术中切除少许网膜和腹膜组织行CEA mRNA的检查,至少可辅助证实腹腔液CEA mRNA的检测结果。本实验以细胞系作为阳性对照,获得阳性结果的最低细胞数量级为10<sup>3</sup>。说明RT-PCR技术可以检测很微量的癌细胞。本结果显示其敏感性较PLC明显提高( $P < 0.05$ )。本结果还显示CEA mRNA的表达与淋巴结转移、肿瘤分化程度、浆膜侵犯程度和TNM分期有关,对腹膜组织同时行此检查,进一步证实其结果。对于CEA mRNA表达阳性者可在随访中作为高危人群监测。本资料由于缺少大量的病例随访,其临床意义尚待研究确定。

### 参考文献:

- [1] Kodera Y, Yamamura Y, Torii A, *et al.* Postoperative staging of gastric cancer; A comparison between the UICC stage classification and the 12th Edition of the Japanese General Rules for Gastric Cancer Study [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1996, 31(5): 476-480.
- [2] Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, *et al.* Prognostic value of positive cytology findings from abdominal washing in patients with gastric cancer [J]. *Br J Surg*, 1990, 83(5): 672-674.
- [3] Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ, *et al.* The molecular detection of circulating tumor cells [J]. *Br J Cancer*, 1995, 72(2): 268-276.
- [4] Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, *et al.* Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(11): 2986-2990.
- [5] Kodera Y, Nakanishi H, Yamamura Y, *et al.* Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytology [J]. *Int J Cancer*, 1998, 79(4): 429-433.
- [6] Tsujitani S, Oka S, Suzuki K, *et al.* Prognostic factors in patients with advanced gastric cancer treated by noncurative resection: a multivariate analysis [J]. *Hepato-gastroenterology*, 2001, 48(41): 1504-1508.
- [7] Yoo CH, Noh SH, Shin DW. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma [J]. *Br J Surg*, 2000, 87(2): 236-242.
- [8] Kodera Y, Isoe K, Yamauchi M, *et al.* Expression of carcino-embryonic antigen and nonspecific crossreacting antigen in gastrointestinal cancer: the correlation with degree of differentiation [J]. *Br J Cancer*, 1993, 68(1): 130-136.