

文章编号:1005-6947(2007)04-0301-04

· 胃癌专题研究 ·

MACS 检测胃癌腹腔冲洗液游离癌细胞的研究

温玉刚, 潘常青, 李克

(上海交通大学附属上海市第一人民医院 普通外科, 上海 200080)

摘要:目的 探讨胃癌腹腔微转移情况的检测方法及其意义。方法 手术中切除肿瘤前收集腹腔冲洗液,采用磁激活细胞分离术(MACS)对不同病理分期胃癌患者腹腔冲洗液中癌细胞进行富集并检测。分别标记带磁珠的细胞角蛋白(CK)抗体,经磁柱富集CK⁺上皮细胞,用流式细胞仪检测其含量,并比较胃癌组与胃平滑肌瘤组(对照组)以及胃癌不同分期之间、磁富集前后CK⁺上皮细胞含量的差异。结果 在未经MACS富集的标本中较少发现CK⁺CD45⁻细胞;在富集后的标本中其含量在胃癌组与对照组有显著差异(41/50,1/10, $P < 0.001$);pTNM I~II期与III~IV期之间(0.67%,3.42%, $P < 0.001$)差异有非常显著性。结论 MACS能有效地富集上皮来源细胞,提高上皮源细胞的检出率,并能反映腹腔游离癌细胞数量;上皮细胞数量与胃癌的存在及临床病理分期有关,其有利于判断肿瘤转移和预后并指导治疗。 [中国普通外科杂志,2007,16(4):301-304]

关键词: 胃肿瘤; 肿瘤转移; 腹腔灌注; 磁激活细胞分离术; 游离癌细胞; 流式细胞术

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

Detection of peritoneal lavage micrometastasis with magnetic activated cell sorting in patients with gastric cancer

WEN Yu-gang, PAN Chang-qing, LI Ke

(Department of General Surgery, the First People's Hospital of Shanghai City, Shanghai 200080, China)

Abstract: **Objective** To study a method for the detection of peritoneal micrometastasis of gastric cancer (GC) and its significance. **Methods** During operation, peritoneal washings were collected before tumor resection in patients with various stages of gastric cancer, and the tumor cells in the peritoneal lavage were enriched, collected and analyzed using magnetic activated cell sorting (MACS) technique. The cells were labeled by anti-cytokeratin (CK) antibody with magnetic microbeads and passed through magnetic columns. The CK⁺ epithelial cells were quantified by flow cytometry and the differences of amount of CK⁺ epithelial cells collected before and after magnetic enrichment in the gastric cancer group and the control group, and between different stages of gastric cancer were compared. There were 50 cases in gastric cancer group and 10 cases of gastric leiomyoma in the control group. **Results** CK⁺CD45⁻ cells were rarely detected in the samples without MACS; in the samples treated by MACS, the concentrations of CK⁺CD45⁻ cells were significantly higher in GC group than in control group (41/50 vs 1/10, $P < 0.001$), and lower in pTNM stage I - II group than in stage III - IV group. (0.67% vs 3.42%, $P < 0.001$) **Conclusions** MACS can effectively enrich epithelial tumor cells in peritoneal lavage, increase the detection rate of epithelial-derived cells, and close relationships were found between CK⁺CD45⁻ cell concentrations with free tumor cells and clinicopathologic stages. The technique could become a valuable tool to evaluate the risk of cancer metastasis and prognosis and to guide therapy.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(4): 301-304]

Key words: Stomach Neoplasms; Neoplasms Metastasis; Peritoneal Lavage; Magnetic Activated Cell Sorting (MACS); Free Cancer Cell; Flow Cytometry

CLC number: R735.2

Document code: A

收稿日期:2006-08-04; 修订日期:2006-12-20。

作者简介:温玉刚,男,山东招远人,上海交通大学附属第一人民医院主治医师,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通讯作者:温玉刚 E-mail:wenyg1502@sina.com

腹腔内脱落癌细胞所致腹膜转移是胃癌常见的转移方式,进展期胃癌根治术后腹膜转移约占30%~50%,是导致死亡的重要原因之一,系一独立的预后不良因素。因此,术中早期检测脱落的癌细胞,进而采取有效的阻断治疗,对提高胃癌临床疗效及预后具有重要意义。既往采用腹腔冲洗液细胞学检查,阳性率低,漏诊率高。临床亦有应用腹腔冲洗液癌胚抗原(CEA)蛋白测定及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测癌细胞CEA mRNA的表达,但部分阴性病例仍存在术后腹膜转移问题。本研究通过用磁激活细胞分离术(MACS)富集并检测腹腔冲洗液中游离的上皮细胞,以反映腹腔游离癌细胞的存在情况,旨在寻找一种更灵敏、准确的检测手段,为探讨胃癌的转移情况和评估预后提供一种新的方法。

1 资料和方法

1.1 一般资料

1.1.1 胃癌组 为2003年10月—2005年10月我院普通外科收治的胃癌患者。随机选取其中50例;男28例,女22例;年龄39~83岁,中位年龄67.8岁。病理类型:低分化腺癌15例,中分化腺癌10例,高分化腺癌12例,黏液腺癌9例,印戒细胞癌4例。pTNM分期参照1997年UICC(国际抗癌联盟)发表的第5版《恶性肿瘤的TNM分期》^[1]: I期6例, II期18例, III期23例, IV期3例。

1.1.2 对照组 10例胃平滑肌瘤患者。男6例,女4例;年龄31~75岁,中位年龄64.5岁。

以上病例均经病理检查证实诊断。

1.2 仪器与试剂

德国Miltenyi Biotec公司的Midi磁激活细胞分离系统及癌细胞富集检测试剂盒、德国Eppendorf5804R离心机和美国Coulter公司的EPICS XL流式细胞仪。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 患者剖腹后,胃癌组于探查前用250 mL生理盐水冲洗肿瘤表面,对照组冲洗胃表面,收集冲洗液100 mL,于标本采集当日进行MACS检测。

1.3.2 MACS (1)100 mL腹腔冲洗液标本以

3 000 r/min不间断离心30 min。(2)仔细收集细胞层约5 mL,加缓冲液至40 mL,混匀。(3)加入5 mL MACS细胞裂解液,混匀,室温(20~25℃,下同)5 min以破坏红细胞等。(4)加入5 mL MACS细胞固定液,混匀,室温30 min终止反应。(5)3 000 r/min离心10 min,去上清液,加入30 mL MACS细胞染色液,混悬。(6)3 000 r/min离心10 min,去上清液,加入10 mL MACS细胞染色液混悬。(7)3 000 r/min离心10 min,去上清液,加入MACS细胞染色液混悬,最终容积为600 μ L。(8)加200 μ L免疫球蛋白恒定链受体(FCR)阻断剂,混匀;加200 μ L MACS角蛋白磁珠,混匀,室温45 min。(9)加100 μ L标记FITC的抗角蛋白抗体和100 μ L标记PE的抗CD45抗体,避光,室温15 min。(10)加4 mL MACS细胞染色液,3 000 r/min离心10 min,去上清液,细胞混悬于1 mL MACS细胞染色液中。(11)取1/2上述混悬液直接送流式细胞仪检测。(12)用缓冲液冲洗磁柱。(13)经滤器加入剩余的1/2细胞悬液,用1 mL缓冲液冲洗3次,收集未标记磁珠的细胞。(14)加1 mL缓冲液,用针芯快速推挤,压出磁珠标记细胞于另一试管中。

1.3.3 流式细胞仪分析 将上述标本分别送流式细胞仪分析,计数标本中阳性细胞CK⁺CD45⁻细胞的比例。

1.3.4 结果判断标准 将对照组测得的阳性细胞率最高值作为判定腹腔冲洗液中上皮源细胞的异常标准,即阳性细胞率 $\geq 0.20\%$ 的标本定为阳性, $< 0.20\%$ 的标本定为阴性。

1.4 统计学处理

差异的显著性用四格表精确计算法和 t 检验。使用SPSS 10.0 for Windows统计软件分析。所有计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 未经MACS检测患者的阳性细胞率

胃癌组50例中有15例发现阳性细胞,阳性细胞率为0.06%~1.06%(0.71% \pm 0.10%);其中pTNM I~II期患者4例,阳性细胞率为0.18%,0.15%,0.10%和0.06%, III~IV期11例,阳性细

胞率为 0.43% ~ 1.06% (0.75% ± 0.15%)。对照组未发现阳性细胞。

2.2 经 MACS 检测后患者的阳性细胞率

2.2.1 对照组 经 MACS 后,10 例中阳性细胞占检测细胞总数的 0% ~ 0.20%。其中 7 例未发现阳性细胞;1 例阳性细胞为 0.06%,1 例阳性细胞为 0.11%,1 例为 0.20%。

2.2.2 胃癌组 全组患者腹腔冲洗液均发现阳性细胞,阳性细胞率为 0.15% ~ 6.27% (3.09% ± 0.38%)。其中 I ~ II 期患者阳性细胞率为 0.15% ~ 1.34% (0.67% ± 0.15%); III ~ IV 期阳性细胞率为 1.16% ~ 6.27% (3.42% ± 0.43%)。

2.3 两组富集前后及两组间阳性率的比较

对照组 MACS 富集前无阳性病例,富集后 1 例阳性(1/10,10%);富集前后差异无统计学意义(0,10%, $P > 0.05$)。胃癌组富集前 11 例阳性(11/50,22%)(均为 III ~ IV 期患者),富集后 41 例阳性(41/50,82%)。胃癌组富集前后阳性率差异有高度显著性(22%,82%, $P < 0.01$)(附表)。对照组与胃癌组富集前阳性率差异有统计学意义(0,22%, $P < 0.05$);对照组与胃癌组富集后阳性率差异有高度显著性(10%,82%, $P < 0.001$)。胃癌组富集前 I ~ II 期与 III ~ IV 期之间阳性率差异有极显著性(0,42.5%, $P < 0.001$),MACS 富集后不同分期间阳性率差异亦有极显著性(0.67%,3.42%, $P < 0.001$)。

附表 胃癌腹腔冲洗液 MACS 富集前后阳性率的比较

	阳性例数	阴性例数
富集前	11	39
富集后	41	9
<i>P</i> 值	<0.01	

3 讨论

据文献^[2]报道,在胃癌术后复发的诸类型中,腹膜种植性复发约占 50%,且系多数复发患者致死的直接因素。因此术中检测腹腔游离癌细胞对于胃癌的临床诊治具有重要意义。MACS 是一种快速、高效的分选系统,有极高的回收率和纯度,已广泛应用于造血干细胞分选等基础与临床研究^[3]。王贵英等^[4]应用 MACS 检测胃癌患者外周

组织(骨髓、外周血)微转移,发现具有较高的敏感性和特异性。但该技术在检测胃癌腹腔游离癌细胞方面的研究报告尚少。

腹膜转移的早期诊断极为困难。尽管近年来影像诊断学如超声、CT 和磁共振显像(MRI)已有迅速发展,但非侵入性诊断对早期腹膜播散仍不可靠。既往采用的常规细胞学方法检测腹腔内游离癌细胞,阳性率较低,漏诊率高^[5]。特别是当肿瘤细胞较少并散布在炎性细胞和间皮细胞中时,更难依靠形态学作出诊断;而且在冲洗液中细胞往往有较明显的退变现象,更增加了诊断的困难,其检测阳性率仅 14% ~ 21%^[6]。张岩松等^[7]报道采用 RT-PCR 检测胃癌患者腹腔灌洗液中 CEAmRNA 表达,大大提高了检测的灵敏度,阳性率可达 47.7%。但 RT-PCR 对腹腔液标本采集和检测均有较高的要求,要有严格的对照和采用复杂的操作才能取得满意结果,且费用昂贵,亦可能有假阳性,故降低了其应用价值。免疫细胞化学染色方法有较高的敏感性,且方法简单、快速;其敏感度几乎与 RT-PCR 相当,更适于临床应用^[8]。

MACS 检测胃癌微转移常用的标志物为细胞角蛋白(CK)。CK 是上皮细胞中间丝的成分,是上皮分化的可靠标志物。胃癌细胞属于上皮来源,仍保留上皮细胞的某些特征如细胞内含有 CK;CK19 在各种类型的胃癌组织中均有高表达,故可通过测定 CK 来检测游离胃癌细胞的存在。正常腹腔内游离上皮细胞少,所以检测腹腔冲洗液中上皮细胞近似于反映腹腔游离癌细胞的数量。因部分白细胞也可能表达某些 CK,为排除干扰,将白细胞共同抗原 CD45 与 CK 组合,分别以抗 CK-FITC 和抗 CD45⁻PE 抗体标记上皮细胞和白细胞;视 CK⁺CD45⁻细胞为阳性细胞,可有效地排除白细胞造成的干扰,分离、检测出腹腔冲洗液中的上皮细胞,再由流式细胞仪进行定性、定量分析。

MACS 检测时用包被有 CK 抗体的微磁珠标记上皮来源的细胞,以磁柱富集标有微磁珠的上皮来源细胞,可提高受检细胞的检出率和敏感性。本组胃癌患者标本未经 MACS 而直接行流式细胞仪检测时仅 15 例检测出阳性细胞(30.0%);而经 MACS 后 50 例患者标本全部发现阳性细胞,阳性

细胞比例显著提高。肿瘤细胞经过磁柱后不会遭到破坏,仍可进行原代培养。这对实体瘤微转移的深入研究极为有利。

本研究采用免疫细胞化学染色结合 MACS 富集分离肿瘤细胞。显示了未经 MACS 前,对照组无阳性细胞,胃癌组阳性细胞比例较低;经 MACS 富集后,胃癌组全部检测到阳性细胞,比例明显提高。富集前后及对照组与胃癌组比较差异均有显著性($P < 0.01$, $P < 0.001$)。同时, TNM I ~ II 期阳性细胞远较 III ~ IV 期为低($P < 0.001$)。表明腹腔内癌细胞的脱落与浆膜受累、肿瘤分期有密切关系;腹腔内脱落癌细胞检出率随着胃癌临床分期的进展而增加,提示其预后不良。Seeliger 等^[9]用免疫组织化学法检测发现胃癌腹腔冲洗液阴性患者的预后优于阳性者,并观察到阳性者可经腹腔内化疗获益^[10]。

值得注意的是,本研究发现未侵犯到浆膜层甚至仅侵犯到黏膜下层的肿瘤患者中也有15例检测到腹腔游离上皮细胞。它们可能是从转移淋巴结被膜上脱落的癌细胞或从显微镜下未能发现的浆膜微小癌灶脱落的癌细胞,也可能是正常脱落上皮细胞造成的污染。Sano 等^[11]报道约1%的早期胃癌在根治术后发生腹膜转移。对此问题不容忽视。本实验胃癌组阳性细胞检出率较高,除了归因于 MACS 的高效能外,可能还与所抽选的病例肿瘤分期较晚有关。另外,对照组有3例检测到阳性细胞,可能是由于腹腔冲洗液中含有少量正常上皮细胞。与循环血的检测不同,由于腹膜腔表面覆盖有上皮细胞,因此腹腔冲洗液中检测出的 CK⁺ CD45⁻ 阳性细胞中可能有一小部分属于正常的脱落上皮细胞。鉴于经 MACS 富集后的肿瘤细胞形态、功能不受影响,故认为,通过基因测定和细胞形态学等方法可望能减少假阳性的产生。

MACS 作为一种检测胃癌腹腔内游离癌细胞的高新技术,可明显提高阳性细胞检出率。胃癌组腹腔游离癌细胞阳性率明显高于对照组,且与肿

瘤分期亦有关,因此,采用 MACS 方法检测腹腔内游离癌细胞,选择阳性患者进行积极的治疗(如腹腔内温热灌注化疗),对预防腹膜复发、改善预后将会产生积极的影响。故有较高的临床实用价值。

参考文献:

- [1] Kodera H, Yamamura Y, Torii A, *et al.* Postoperative staging of gastric cancer: a comparison between the UICC Stage Classification and the 12th edition of the General Rules for Gastric Cancer Study [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1996, 31 (5): 476 - 480.
- [2] 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 (6): 429 - 433.
- [3] 何劲松,陈积圣,闵军,等. 免疫磁性分选骨髓干细胞亚群 Thy-1 low Lin-Sca-1 + [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12 (3): 195 - 197.
- [4] 王贵英,李勇,王卫杰,等. 胃癌患者外周血及骨髓微转移检测的临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31 (7): 405 - 407.
- [5] 刘树范,陈有中. 体腔冲洗液细胞学 [A]. 见: 马正中, 闵秀, 刘树范. 诊断细胞病理学 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000. 253 - 258.
- [6] Fetsch PA, Simsir A, Brosky K, *et al.* Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry [J]. *Diagn Cytopathol*, 2002, 26 (1): 61 - 66.
- [7] 张岩松,罗光华,许军,等. 胃癌术中腹腔灌洗液的 CEAmRNA 的检测及意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (9): 664 - 666.
- [8] Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas [J]. *Cancer*, 1997, 79 (6): 1069 - 1076.
- [9] Seeliger H, Spatz H, Jauch KW. Minimal residual disease in gastric cancer [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2003, 162 (1): 79 - 87.
- [10] Kaibara Y, Yonemura Y, Bandou E, *et al.* Effective therapy for peritoneal dissemination in gastric cancer [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2003, 12 (3): 635 - 648.
- [11] Sano T, Sasak M, Kinoshita T, *et al.* Recurrence of early gastric cancer follow up 1475 patients and review of the Japanese literature [J]. *Cancer*, 1993, 72 (10): 3174 - 3178.