

文章编号:1005-6947(2008)04-0322-05

· 结直肠癌专题研究 ·

新辅助化疗对结直肠癌的作用

任峰, 周建平, 刘栋才, 袁联文, 舒国顺, 周家鹏

(中南大学湘雅二医院 老年外科, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的 探讨短程5-FU/CF方案新辅助化疗对结直肠癌细胞凋亡、增殖和p53表达以及术后并发症和预后的影响。方法 分别采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)和免疫组化SP法检测68例患者结直肠癌组织的细胞凋亡指数(AI)和ki-67增殖指数(PI)及凋亡相关基因p53的表达,并比较新辅助化疗组和对照组患者术后并发症的发生情况和预后情况。结果 新辅助化疗组肿瘤细胞的AI均数为3.56%,明高于对照组的2.29% ($P < 0.01$),PI均数为22.60%明显低于对照组的33.60% ($P < 0.01$),p53阳性表达率为28.9% (11/38)明显低于对照组的56.7% (17/30) ($P < 0.05$)。两组中大肠癌细胞的AI与PI均呈负相关($r = -0.790, r = -0.663$) ($P < 0.01$)。两组术后并发症的发生差异无显著性($P < 0.05$)。两组的复发转移率和复发转移平均时间差异有显著性($P < 0.05$)。结论 短程5-FU/CF方案新辅助化疗可以显著诱导结直肠癌细胞凋亡,并抑制其增殖;降低结直肠癌组织p53的阳性表达率,而不增加术后并发症的发生,能延缓和减少结直肠癌术后的复发转移。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(4): 322-326]

关键词: 结直肠肿瘤; 新辅助疗法; 细胞凋亡; ki-67; p53; 预后

中图分类号: R 735.3

文献标识码: A

The effect of neoadjuvant chemotherapy on colorectal carcinoma

REN Feng, ZHOU Jianping, LIU Dongcai, YUAN Lianwen, SHU Guoshun, ZHOU Jiapeng
(Department of Geriatric Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of short-term neoadjuvant chemotherapy (NC) with 5-FU/CF on tumor cell apoptosis, tumor cell proliferation, expression of p53, postoperative complications and prognosis of colorectal carcinoma. **Methods** Apoptosis index (AI) of tumor cells was assayed by TUNEL, proliferation index (PI) and expression of p53 were examined by immunohistochemical S-P method in 68 colorectal carcinoma samples, while postoperative complications and prognosis were compared in NC groups and non-NC control group. **Results** AI in NC group ($\bar{x} = 3.56\%$) was significantly higher than that in control group ($\bar{x} = 2.29\%$) ($P < 0.01$). PI in NC group (22.60%) was significantly lower than that in control group (33.60%) ($P < 0.01$). The p53 positive expression rate in NC group (28.9%, 11/38) was significantly lower than that in control group (56.7%, 17/30) ($P < 0.05$). There was no significant difference in the occurrence rate of postoperative complications between NC group and control group. There was significant negative association between AI and PI in both groups ($r = -0.790; r = -0.663$) ($P < 0.01$). There was significant difference in the rate and average time of recurrence and metastasis between NC group and control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Short-term neoadjuvant chemotherapy with

收稿日期:2007-09-14; 修订日期:2007-12-06。

作者简介:任峰,男,中南大学湘雅二医院主治医师,主要从事胃肠道肿瘤和疝与腹壁外科方面的研究。

通讯作者:周建平 E-mail:zhoujp609@sohu.com

5-FU/CF could significantly induce cell apoptosis, inhibit tumor cell proliferation and decrease the positive rate of p53 expression in carcinoma of large intestine. Short-term 5-FU/CF neoadjuvant chemotherapy could delay and decrease the postoperative recurrence and metastasis in colorectal carcinoma without increasing the occurrence of postoperative complications.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (4) ; 322 - 326]

Key words: Colorectal Neoplasms; Neoadjuvant Chemotherapy; Apoptosis; ki-67; p53; Prognosis

CLC number: R 735. 3

Document code: A

结直肠癌是常见的消化道肿瘤,其发病率近年来呈上升趋势,已居恶性肿瘤死亡的第5位,每年有大约100万新发病病例和50万致死病例。随着辅助化放疗的发展,结直肠癌的治疗效果得到改善,但局部复发和远处转移仍是治疗失败的主要原因,据报道Ⅱ期和Ⅲ期结直肠癌根治切除后的局部复发率高达20%~40%^[1]。新辅助化疗可以降低肿瘤细胞的活性,控制、减小原发灶及微小转移灶,甚至可以消灭转移灶及血液中散在的癌细胞,使术中种植、术后复发转移的可能性降低。本研究通过对大肠癌细胞凋亡、增殖指数和p53表达的检测,对术后并发症和预后的比较,来观察短程5-FU/CF方案新辅助化疗的效果。

1 材料与方法

1.1 临床一般资料

68例选自本院老年外科于2004年9月—2006年9月手术治疗的结直肠癌患者。入选标准:年龄<80岁;经肠镜取材活检病理确诊为癌;术前分期DukesB、C期;各项检查无明显化疗禁忌证,血常规、肝功能和肾功能均正常,胸部X线片、腹部B超和全身骨扫描排除远处转移,无心肺功能不全等。(1)新辅助化疗组($n=38$):患者及家属知情并同意接受新辅助化疗。术前行5-氟尿嘧啶(5-FU)/甲酰四氢叶酸(CF)短程化疗^[2-3](第1~5天:CF 200 mg/m² 静脉滴注0~2h;5-FU 500 mg/m² 静脉滴注2~10h)共5d。预防性应用减轻副作用的药物,如中枢止吐药以提高患者食欲,保肝药维护肝功能。化疗后复查血常规、生化常规等无异常,且无明显化疗毒副反应者于化疗结束后1~2d手术。(2)对照组($n=30$):完善常规检查后直接手术。两组一般资料相匹配,具有可比性(表1)。

表1 两组临床病理资料比较

	新辅助化疗组	对照组	χ^2	P
病例数	38	30		
性别				
男	22	18	0.031	P>0.05
女	16	12		
年龄(岁)	57.45±11.87	59.07±11.04		P>0.05
肿瘤部位				
右半结肠	6	6	0.212	P>0.05
左半结肠	9	7		
直肠	23	17		
组织学分类				
腺癌	31	26	0.320	P>0.05
黏液癌	7	4		
临床分期(Dukes)				
A	2	1	1.325	P>0.05
B	15	16		
C	21	13		

1.2 研究方法

手术后肿瘤大体标本立即用10%福尔马林固定,并于取材后12h内脱水,石蜡包埋。常规切片、染色。在HE切片下选取含有肿瘤组织的标本编号。按编号取相应的病理蜡块连续切片3张,厚4 μ m;载玻片需经多聚-L-赖氨酸防脱片处理。采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)行细胞凋亡检测(细胞凋亡检测试剂盒购自Roche公司)。采用免疫组织化学SP法行ki-67和p53染色(免疫组化超敏SP试剂盒和ki-67, p53单抗均购自福州迈新公司)。将已知的阳性切片(福州迈新提供)作为阳性对照;TUNEL阴性对照不加TDT酶;SP法以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

细胞凋亡阳性表达定位于细胞核内,阳性细胞核有明显的棕色颗粒沉积,呈散在分布。在高倍镜下($\times 400$)选取5个具有代表性的视野,计

数1 000个肿瘤细胞中阳性细胞数,凋亡指数(AI) = 凋亡细胞数/观察细胞总数(1 000) × 100%。ki-67免疫组化阳性反应为黄-棕褐色颗粒,定位于胞核。在高倍镜下(×400)选取5个具有代表性的视野,计数1 000个细胞中阳性细胞数,增殖指数(PI) = ki-67阳性细胞数/观察细胞总数(1 000) × 100%。p53免疫组化阳性反应为黄-棕褐色颗粒,定位于肿瘤细胞核,表现为棕黄色-棕褐色颗粒。根据阳性细胞所占视野面积的百分比和染色强度分别记为:阴性(-)无明显阳性反应细胞;弱阳性(+):阳性细胞的面积小于25%,着浅棕色;强阳性(++):阳性细胞的面积大于25%,呈棕色或深棕色。

1.4 统计学处理

统计分析均使用SPSS(11.5版)统计软件。计量资料均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计方法包括 χ^2 检验、方差分析、Wilcoxon秩和检验、直线相关分析。显著性检验水平取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组术后并发症的比较

新辅助化疗组所有患者顺利完成化疗。化疗后的毒副反应以胃肠道为主,但均未影响手术的

如期施行。新辅助化疗组出现伤口脂肪液化2例,伤口感染1例,呼吸道感染1例,淋巴管瘘2例,术后出血1例;对照组出现伤口脂肪液化2例,呼吸道感染2例,淋巴管瘘1例。两组术后并发症的发生差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 两组肿瘤细胞凋亡指数(AI)的比较

新辅助化疗组AI为1.23%~7.37%,平均(3.56 ± 1.53)%;对照组AI为0.87%~4.63%,平均(2.29 ± 1.90)%。新辅助化疗组AI显著高于对照组,差异有极显著性($Z = -3.589$, $P < 0.01$)(图1-2)。

2.3 两组肿瘤细胞ki-67增殖指数(PI)的比较

新辅助化疗组的PI为8.3%~46.6%,平均(22.60 ± 8.48)%,对照组PI为11.7%~61.2%,平均(33.60 ± 11.60)%。新辅助化疗组PI显著低于对照组,差异有极显著性($Z = -3.953$, $P < 0.01$)(图3-4)。

2.4 结直肠癌组织凋亡相关基因p53的表达

新辅助化疗组的p53阳性表达率为28.9%(11/38),对照组为56.7%(17/30)。新辅助化疗组p53表达显著低于对照组,差异有显著性(图5-6)($\chi^2 = 5.318$, $P < 0.05$)。

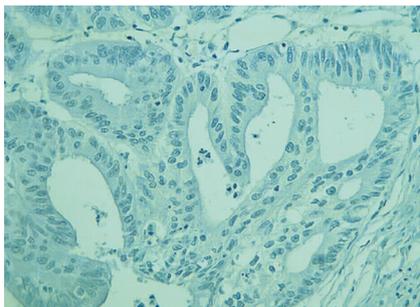


图1 细胞凋亡阴性对照(TUNEL法×400)

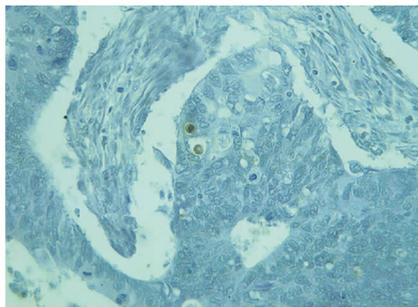


图2 细胞凋亡阳性表达(TUNEL法×400)

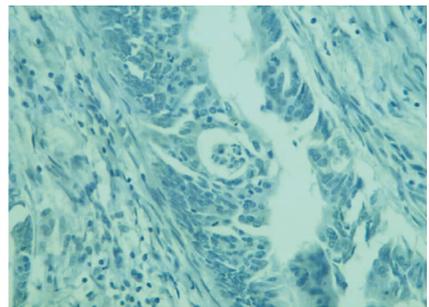


图3 ki-67表达阴性对照(SP×400)

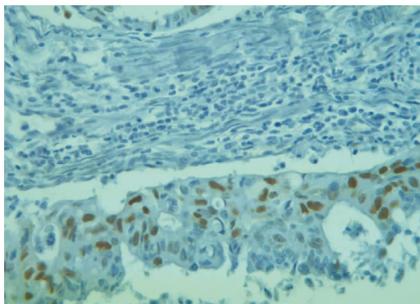


图4 ki-67阳性表达(SP×400)

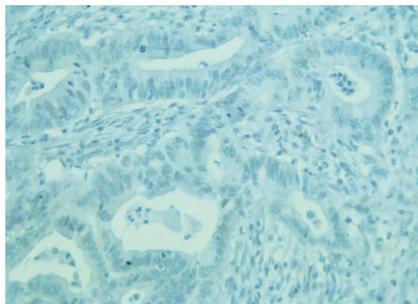


图5 p53表达阴性对照(SP×400)

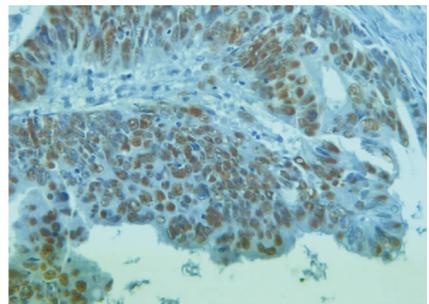


图6 p53阳性表达(SP×400)

2.5 结直肠癌肿瘤细胞 AI 与 PI 的关系

分别对两组 AI 与 PI 进行直线相关分析,新辅助化疗组 AI 与 PI 之间呈负相关($r = -0.790$, $P < 0.01$);对照组 AI 与 PI 之间亦呈负相关($r = -0.663$, $P < 0.01$)。表明无论有无术前化疗,结直肠癌肿瘤细胞的 AI 与 PI 均呈明显负相关。

2.6 随访资料

随访 1 ~ 3 年,平均 17.8 个月,随访率 86.8%,失访 9 例(新辅助化疗组 3 例,对照组 6 例)。两组 1 年生存率分别为 91.4% (32/35) 和 87.5% (21/24),差异无显著性($P > 0.05$)。59 例中发生复发转移 11 例(18.6%),新辅助化疗组 5 例(14.3%),对照组 6 例(25%),差异有显著性($P < 0.05$)。两组出现复发转移的平均时间分别为 16 个月和 11 个月,差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 5-FU / CF 短程新辅助化疗对术后并发症的影响

化疗药物对肿瘤细胞杀灭抑制的同时,对正常组织细胞的代谢也有一定影响,尤其是化疗后短时间即行手术的患者,手术切口的愈合会受到一定阻碍。此外,化疗导致的免疫力下降,在一定程度上也可增加感染的机会。化疗药物引起的组织脆性增加,导致渗血增多及解剖困难,是新辅助化疗的另一负面影响。但只要轻柔操作、耐心解剖、彻底止血,一般不会造成太大的威胁。Buie 等^[4]认为新辅助化疗增加了结直肠癌术后发生盆腔脓肿的危险。本组未见盆腔脓肿的发生,估计与肠道准备、免疫受损及盆腔引流情况有关。Turner II 等^[5]报道 257 例大肠癌患者,发现新辅助疗法并不增加并发症的发生。本研究两组两组术后并发症的发生率差异无显著性,5-FU / CF 短程新辅助化疗并未增加患者术后并发症的发生率。

3.2 5-FU / CF 短程新辅助化疗对结直肠癌肿瘤细胞凋亡的影响

细胞凋亡是多细胞生物的重要的自稳机制之一,在肿瘤的发生、发展中主要起负调控作用。一旦凋亡机制被抑制,便会出现细胞寿命的延长及细胞的过度积累,而凋亡减少和细胞的异常生长、存活过长将导致肿瘤的发生^[6-7]。临床上目前使用的大部分的抗癌措施如化疗、放疗、基因

治疗、免疫治疗等均与癌细胞凋亡信号转导途径激活相关^[7-8]。Sturm 等^[9]对 66 例结直肠癌患者行 5-FU / CF 新辅助化疗,4 ~ 6 周后行手术治疗,发现肿瘤细胞的凋亡增加。蔡伟等^[10]对 63 例结直肠癌患者术前行以 5-FU 为主的短疗程选择性动脉灌注化疗,亦获得了肿瘤细胞凋亡显著增加的结果。本组资料显示,新辅助化疗组和对照组之间结直肠癌肿瘤细胞 AI 的差异显著($P < 0.01$)。表明 5-FU / CF 短程新辅助化疗能显著诱导人体结直肠癌肿瘤细胞凋亡。

3.3 5-FU / CF 短程新辅助化疗对结直肠癌肿瘤细胞 ki-67 的表达及细胞增殖的影响

恶性肿瘤缺乏成熟分化程度,具有较强的增殖活性和无限增殖的倾向。因此检测肿瘤组织的增殖状态是评价肿瘤生物学行为的重要方面之一。ki-67 单克隆抗体是一个极好的能准确地反映肿瘤细胞增殖活性的标记^[11]。ki-67 标记指数可以作为结直肠癌的预测指标,具有显著的预后价值^[12]。Matsuura 等^[13]用替加氟对 20 例结直肠癌患者进行新辅助化疗,发现该组的 PI 明显低于对照组。本组资料显示,对照组的 PI 明显高于新辅助化疗组($P < 0.01$),表明 5-FU / CF 短程新辅助化疗能明显降低结直肠癌组织中 ki-67 的表达;提示 5-FU / CF 短程新辅助化疗可以降低结直肠癌肿瘤细胞的 DNA 合成速度,抑制其肿瘤细胞的增殖。

3.4 5-FU / CF 短程新辅助化疗对 p53 表达的影响

野生型 p53 作为抑癌基因,起着阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、促进细胞分化等作用。Borralho PM 等^[14]的研究表明 5-FU 通过 p53 (野生型) / Fas 依赖的细胞凋亡途径而达到其细胞毒性效应的。突变型 p53 蛋白失去上述功能,不能使受损细胞凋亡,不能抑制细胞增殖,从而使其向恶性转化,致使细胞内含量增加。因此认为突变型 p53 在结直肠癌的发生发展中起着重要作用。因其半衰期较长,故免疫组化可检测。研究显示,p53 过度表达的肿瘤其 AI 明显低于无 p53 过度表达者^[15]。p53 的过度表达还显示了肿瘤复发和转移的可能^[16-17],是肿瘤复发和生存的独立预测因素^[18]。因此,降低细胞突变型 p53 基因表达和活性是一种治疗肿瘤的有效方法。国内外报道结直肠癌 p53 阳性表达率为 50% ~ 80%。本研究中对照组的 p53 阳性表达率为 56.7%,明显高于新辅助化疗组的 28.9% ($P < 0.05$),表明

5-FU /CF 短程新辅助化疗可以降低结直肠癌肿瘤细胞 p53 基因的表达和活性。

3.5 结直肠癌肿瘤细胞凋亡与 ki-67 表达的关系

正常器官组织细胞的凋亡和增殖保持着动态平衡,这种生理平衡的改变会导致细胞的恶性转变和肿瘤发生。AI 和 PI 分别从细胞凋亡与增殖的角度反映肿瘤组织的生物学行为。文献报道^[10,20], AI 高表达、ki-67 低表达的肿瘤预后较好, AI 表达、ki-67 高表达的肿瘤预后较差。Inoue Y 等^[21]以 CPT-11 和 5-FU 联合术前化疗治疗进展期的结直肠癌,发现肿瘤表现出较高的细胞凋亡率和较低的细胞增殖率。本研究结果与之相似。表明在肿瘤发展的过程中,结直肠癌肿瘤细胞的凋亡与增殖之间互相影响和制约。

3.6 5-FU /CF 短程新辅助化疗对预后的影响

两组 1 年生存率差异无显著性 ($P > 0.05$), 尚不能说明 5-FU /CF 短程新辅助化疗能延长的生存期。但本组病例数较少,随访时间亦短,故难以结论,还需扩大病例数及随访时间。然而两组的复发转移率和平均时间差异有显著性 ($P < 0.05$),表明 5-FU /CF 短程新辅助化疗能延缓和减少结直肠癌术后的复发转移。

参考文献:

[1] 晏仲舒. 大肠癌辅助化疗[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(11): 641-642.

[2] Micev M, Micev-Cosic M, Todorovic V, *et al.* Histopathology of residual rectal carcinoma following preoperative radiochemotherapy[J]. *Acta Chir Jugosl*, 2004, 51(2): 99-108.

[3] Gerard JP, Chapet O, Nemoz C, *et al.* Preoperative concurrent chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer with high-dose radiation and oxaliplatin-containing regimen: the Lyon R0-04 phase II trial[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(6): 1119-1124.

[4] Buie WD, MacLean AR, Attard JA, *et al.* Neoadjuvant chemoradiation increases the risk of pelvic sepsis after radical excision of rectal cancer[J]. *Dis Colon Rectum*, 2005, 48(10): 1868-1874.

[5] Turner II, Russell GB, Blackstock AW, *et al.* Impact of neoadjuvant therapy on postoperative complications in patients undergoing resection for rectal adenocarcinoma[J]. *Am Surg*, 2004, 70(12): 1045-1049.

[6] Schulze-Bergkamen H, Krammer PH. Apoptosis in cancer - implications for the-rapy[J]. *Semin Oncol*, 2004, 31(1): 90-119.

[7] Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy[J]. *Oncogene*, 2006, 25(34): 4798-4811.

[8] Kostanova-Poliakova D, Sabova L. Anti-apoptotic proteins-targets for chemosen-sitization of tumor cells and cancer treatment[J]. *Neoplasma*, 2005, 52(6): 441-449.

[9] Sturm I, Rau B, Schlag PM, *et al.* Genetic dissection of apoptosis and cell cycle control in response of colorectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy[J]. *B-MC Cancer*, 2006, 10(6): 124.

[10] 蔡伟, 李非, 孙家邦. 大肠癌术前选择性动脉灌注化疗的临床病理观察[J]. 中国普通外科杂志, 2001, 11(6): 484-486.

[11] Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein: from the known and the unknown[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3): 311-322.

[12] Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, *et al.* Prognostic value of thymidylate synthase, ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(2): 241-250.

[13] Matsuura T, Fukuda Y, Fujitaka T, *et al.* Preoperative treatment with tegafur suppositories enhances apoptosis and reduces the intratumoral microvessel density of human colorectal carcinoma[J]. *Cancer*, 2000, 88(5): 1007-1015.

[14] Borralho PM, Moreira da Silva IB, Aranha MM, *et al.* Inhibition of Fas expr-ession by RNAi modulates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT116 cells expressing wild-type p53[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(1): 40-47.

[15] Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, *et al.* Prognostic value of thymidylate synthase, ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(2): 241-250.

[16] Gasser M, Gerstlauer C, Grimm M, *et al.* Comparative Analysis of Predictive Biomarkers for Therapeutical Strategies in Colorectal Cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(4): 1272-1284.

[17] Ivyna Bong PN, Patricia L, Pauline B, *et al.* Quantitative analysis of the expr-ession of p53 gene in colorectal carcinoma by using real-time PCR[J]. *Trop Biomed*, 2006, 23(1): 53-59.

[18] Schwandner O, Schiedeck TH, Bruch HP, *et al.* Apoptosis in rectal cancer: prognostic significance in comparison with clinical histopathologic, and immun-ohistochemical variables[J]. *Dis Colon Rectum*, 2000, 43(9): 1227-1236.

[19] Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, *et al.* Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, 52(2): 294-303.

[20] Evans C, Morrison I, Heriot AG, *et al.* The correlation between colorectal cancer rates of proliferation and apoptosis and systemic cytokine levels; plus their influence upon survival[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(10): 1412-1419.

[21] Inoue Y, Shirane M, Miki C, *et al.* Gene expression profiles of colorectal carcinoma in response to neo-adjuvant chemotherapy[J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(6): 1641-1649.