

· 论 著 ·

腹腔镜结直肠癌根治术对血循环微转移影响的研究

董纯秀, 彭 波, 刘 月, 熊兵红, 程 勇

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 400016)

摘 要:目的 检测腹腔镜结直肠癌根治术患者外周静脉血肿瘤标志物细胞角蛋白 20(CK20) mRNA 的表达,探讨腹腔镜结直肠癌根治术对术后肿瘤细胞血循环微转移的影响及临床意义。方法 应用 FQ-PCR 方法检测 24 例行腹腔镜辅助下结直肠癌根治术和 31 例传统开腹结直肠癌根治术患者外周静脉血的 CK20 mRNA,并用免疫组化(IHC)SP 法测定术后组织标本的 CK20 和 CD44 v6 的表达水平。结果 TNM 分期Ⅲ期结直肠癌患者外周静脉血的 CK20 mRNA 阳性表达率显著高于Ⅰ期+Ⅱ期患者($P<0.05$)。腹腔镜辅助下结直肠癌根治术患者 CK20 手术开始时阳性率为 29.16%(7/24),手术结束时阳性率为 37.50%(9/24),两组之间差异无统计学意义($P>0.05$),手术前后和开腹组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。CK20 mRNA 阳性表达患者结直肠癌组织中 CK20(57.14%)和 CD44 v6(71.43%)阳性表达率明显高于 CK20 mRNA 阴性表达患者的 CK20(35.29%)和 CD44 v6(47.06%)阳性表达率($P<0.05$)。结论 结直肠癌患者外周静脉血 CK20 mRNA 的水平和组织学分级、TNM 分期、淋巴结转移有关,腹腔镜结直肠癌根治术和传统开腹手术一样,并不增加外周静脉血 CK20 mRNA 的阳性率,不增加术后肿瘤血行微转移的危险性。

关键词:结直肠癌;微转移;腹腔镜;细胞角蛋白 20;荧光定量-聚合酶链反应

中图分类号:

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)09-1056-03

A study on the influence of laparoscopic radical resection of colorectal cancer on hematogenous micrometastasis

DONG Chun-xiu, PENG BO, LIU Yu, et al.

(Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To detect CK20 mRNA expression in peripheral blood in patients underwent laparoscopic radical resection of colorectal cancer and to investigate the influence of laparoscopic resection of colorectal cancer(CRC) on postoperative micrometastasis of tumor cells, and to discuss its clinical significance. **Methods** CK20 mRNA was detected in peripheral blood of 24 colorectal cancer patients underwent laparoscopic radical resection of colorectal cancer and 31 patients with open radical resection of colorectal cancer by FQ-PCR. CK20 and CD44 v6 were determined in tissue samples of colorectal cancer by immunohistochemical (IHC) SP method. **Results** The CK20 mRNA expression was significantly higher in the patients categorized to phase Ⅲ than phase Ⅰ / Ⅱ according to TNM staging($P<0.05$). The preoperative positive rate of CK20 mRNA was 29.16%(7/24), while the postoperative positive rate was 37.50%(9/24) in patients underwent laparoscopic radical resection of colorectal cancer, and there was no significant difference between the two groups($P>0.05$). The positive rate of CK20 mRNA expression had no significant difference between the laparoscopic and open radical resection of colorectal cancer either preoperatively or postoperatively($P>0.05$). The expression of CK20 and CD44 v6 of tissue samples of colorectal cancer were higher in patients with positive expression of CK20 mRNA than that in patients with negative expression of CK20 mRNA($P<0.05$). **Conclusion** The expression of CK20 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients concern with TNM staging, tissue differentiation, and metastasis of lymph node. Laparoscopic radical resection of colorectal cancer does not increase the positive rate of cancer cells in peripheral blood, as in laparotomy group. Laparoscopic resection of colorectal cancer does not increase the risk of hematogenous micrometastasis of tumor cell.

Key words: colorectal cancer; micrometastasis; laparoscopy; CK20 mRNA; FQ-PCR

关于腹腔镜恶性肿瘤根治术与传统开腹根治术对术后肿瘤转移的影响有无差别的研究一直有争议。开展腹腔镜手术对结直肠癌肿瘤细胞转移影响的研究显然很有必要。本研究以肿瘤标志物细胞角蛋白 20(cytokeratin 20, CK-20)为肿瘤微转移标志物,通过荧光定量-聚合酶链反应(fluorescence quantitative-polymerase chain reaction, FQ-PCR)技术检测结直肠肿瘤患者手术前后外周血中 CK20 mRNA 的变化,以探讨腹腔镜结直肠癌根治术对肿瘤术后血循环微转移的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象的标准为无远处转移(Ⅰ~Ⅲ期)、无基础疾患、无放化疗和免疫药物治疗史、具备手术指征、可获根治性切除的结直肠癌患者。术前经电子结肠镜、病理确诊为

结直肠癌,术前分期依据 CT 和腔内超声。将入选 55 例本院普通外科 2005 年 3 月至 2007 年 1 月收治的结直肠癌患者随机分成开腹手术组和腹腔镜手术组,淋巴结廓清均为 D3 程度。两组临床资料比较详见表 1。正常组 20 例,为本院健康体检者,男、女各 10 例,年龄 25~48 岁,平均 38 岁。

1.2 方法

1.2.1 手术方法 腹腔镜组和开腹组均遵循直肠全系膜切除(TME)原则和无瘤原则进行手术,两组均严格按照肿瘤根治原则进行手术操作,两组手术均为同一组医师实施。

1.2.2 标本采集、处理和保存 两组患者均于术前 1 d 抽取空腹静脉血 5 mL(第 2 管血),腹腔镜组于气腹结束后抽取静脉血 5 mL(第 2 管血),开腹组手术结束后立即抽取静脉血 5

mL(第 2 管血)。均用肝素抗凝,离心后取上清液置于-80℃冰箱保存,全部标本统一检测。手术后切除的组织标本甲醛浸泡,4℃保存统一测定。

1.2.3 实验步骤 FQ-PCR 实验步骤:(1)外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)和细胞总 RNA 提取:清晨空腹负压针筒抽取静脉血 5 mL(第 2 管血),肝素抗凝。用淋巴细胞分离液分离有核细胞,置 1.5 mL 进口无菌管中,离心去上清,加入 Trizol 500 μ L 混匀置室温 10 min,加入氯仿 1 000 μ L 混匀,4℃10 000 r/min 离心 10 min,取上层水置于 1.5 mL 管中,加入 3 倍体积的异丙醇(预冷)混匀,置冰上 20 min,15 000 r/min 离心 15 min,弃上清,75%乙醇 200 μ L 漂洗 1 次,快速离心吸干液体,吸干后加入无酶水 20 μ L 溶解 RNA,进行逆转录反应和 PCR 扩增或置-80℃低温保存备用。(2)逆转录反应:标本处理后的 RNA 70℃预变性 5 min,迅速置于冰浴以防 RNA 复性。按每个反应取 RT 反应液 18 μ L 逆转录酶 1 μ L, RNasin 1 μ L 计算加入无菌离心管中,混匀,用微量加样器加入 20 μ L 上述反应液于每个反应管中,加入预变性的 RNA 5 μ L,37℃水浴反应 30 min。(3)PCR 扩增:按每个反应取 PCR 反应液 43 μ L、Taq 酶 2 μ L 计算加入无菌离心管中,混匀,用微量加样器在每个反应管中加入 45 μ L 反应液,加入 RT 反应产物 5 μ L,然后进行扩增:预变性 95℃5 min,按以下步骤进行循环 95℃30 s,62℃20 s,72℃20 s,共 35 个循环,延伸 72℃10 min,4℃保存。扩增曲线见图 1。

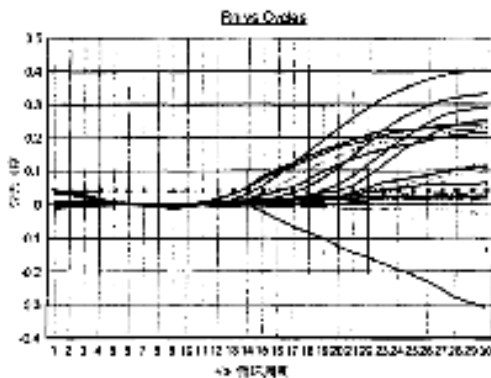


图 1 扩增曲线

1.3 统计学方法 采用 SPSS11.0 软件包进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组临床资料比较 两组患者年龄、性别、肿瘤 TNM 分期和清除淋巴结总数比较差异无统计学意义($P>0.05$),但腹腔镜组手术时间要长于开腹组($P<0.05$)。见表 1。

2.2 手术前后结直肠癌患者外周血中 CK20 mRNA 的表达差异 正常组 20 例中没有阳性表达。腹腔镜组和开腹组 CK20 mRNA 表达率均高于正常组。腹腔镜辅助下结直肠癌根治术患者 CK20 mRNA 手术开始时阳性率为 29.16%(7/24),手术结束时阳性率为 37.50%(9/24),CK20 mRNA 的表达虽然有所增加,但两组之间差异无统计学意义($P>0.05$),与开腹组手术前后比较差异也无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.3 TNM 分期不同的患者外周血中 CK20 mRNA 的表达差异 在 I+II 期中,腹腔镜组手术前后 CK20 mRNA 表达阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。与开腹组比较,差异无统

计学意义($P>0.05$)。在 III 期中,腹腔镜组手术前后 CK20 mRNA 表达阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。与开腹组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。III 期 CK20 mRNA 表达阳性率均明显高于 I 期+II 期,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 1 两组病例临床资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	腹腔镜组(24)	开腹组(31)	P
年龄(岁)	50 $\pm$ 11	62 $\pm$ 13	>0.05
性别(男/女)	14/10	16/15	>0.05
TNM 分期(n)			
I 期	2	1	
II 期	10	19	>0.05
III 期	12	11	
手术时间(min)	270 $\pm$ 75	190 $\pm$ 62	<0.05
手术中失血量(mL)	100 $\pm$ 28	110 $\pm$ 35	>0.05
清除淋巴结数(枚)	8 $\pm$ 6.5	9 $\pm$ 8.5	
肿瘤部位(n)			
结肠	8	13	>0.05
直肠	16	18	

表 2 手术前后结直肠癌患者外周血 CK20 mRNA 表达

组别(n)	术前		术后	
	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
正常组(20)	0	0		
开腹组(31)	10	32.25	13	41.93
腹腔镜组(24)	7	29.16	9	37.50

表 3 血液 CK20 mRNA 阳性率与结直肠癌 TNM 分期的关系

组别	I 期+II 期			III 期		
	n	阳性数	阳性率(%)	n	阳性数	阳性率(%)
腹腔镜组术前	12	2	16.67	12	5	41.93
腹腔镜组术后	12	3	25.00	12	6	50.00
开腹组术前	20	5	25.00	11	5	45.45
开腹组术后	20	6	30.00	11	7	63.64

2.4 结直肠癌患者外周血液 CK20 mRNA 检出情况与结直肠癌病理类型的关系 结直肠癌患者血液 CK20 mRNA 阳性率在低分化腺癌和黏液腺癌中表达较高,明显高于高中分化腺癌组, $P<0.05$ 。但在手术前后检出比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

2.5 结直肠癌患者外周血液 CK20 mRNA 检出情况与结直肠癌淋巴结转移的关系 开腹组和腹腔镜组中,淋巴结转移组 CK20 mRNA 阳性率在手术前后均明显高于无淋巴结转移组($P<0.05$)。在淋巴结转移组中,开腹组术前和腹腔镜组术前比较,CK20 mRNA 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),开腹组术后和腹腔镜组术后比较,CK20 mRNA 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。在无淋巴结转移组中,开腹组术前和腹腔镜组术前比较,CK20 mRNA 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),开腹组术后和腹腔镜组术后比较,CK20 mRNA 阳性

率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

表 4 结直肠癌手术患者血液 CK20 mRNA 检出情况和病理类型的关系

组别	病理类型	n	术前		术后	
			阳性	阳性率(%)	阳性	阳性率(%)
腹腔镜组	高中分化腺癌	19	3	15.78	5	26.31
	低分化腺癌及其他	5	4	80.00	4	80.00
开腹组	高中分化腺癌	28	8	28.57	11	39.29
	低分化腺癌及其他	3	2	66.67	2	66.67

表 5 结直肠癌患者外周血液 CK20 mRNA 检出情况与淋巴结转移的关系

组别	淋巴结转移	n	术前		术后	
			阳性	阳性率(%)	阳性	阳性率(%)
腹腔镜组	有	14	5	35.71	6	42.85
	无	10	2	20.00	3	30.00
开腹组	有	0	4	44.44	6	66.67
	无	22	6	27.27	6	31.82

3 讨论

微转移(micrometastasis, MM)可以是单个瘤细胞或独立的瘤细胞灶,无特殊血液供应,直径小于 2 mm,常无任何临床表现,常规检查方法如 CT、MRI 及普通病理学检查都很难发现^[1]。对于腹腔镜结直肠癌根治术后微转移,周坤等^[2]已经证实肿瘤分化程度是重要影响因素,因此本研究不再重复分析。

CK20 是检测血循环中癌细胞的敏感标志物;而 FQ-PCR 或逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法较常规病理组织学具有更高的敏感性,可从 $10^6 \sim 10^7$ 个正常细胞中检出一个肿瘤细胞。因此检测结直肠癌患者外周血液微转移 CK20 可提高结直肠癌临床分期的准确性,帮助综合判断患者的预后,且可能有助于早期诊断结直肠癌肝脏微小转移。本组 20 例对照组外周血中均无 CK20 mRNA 表达,所以,一旦结直肠癌患者外周血中 CK20 mRNA 阳性表达可能提示癌细胞的存在。文献报道结直肠癌患者术前外周血 CK20 mRNA 的阳性表达率为 44.8%~76.67%^[3-5],本研究阳性表达率为 30.91%,较文献报道偏低。偏低原因可能为:(1)外周血中的肿瘤细胞较少,或者在单核细胞分离过程中丢失了肿瘤细胞使得靶 mRNA 过少,难以达到检测肿瘤细胞靶基因及转录翻译蛋白的阈值;(2)由于抽提的 mRNA 受到残余 RNAase 的作用或因保存条件不当而发生降解;(3)实验过程中的操作污染,杂质蛋白可使靶基因发生错配;(4)肿瘤细胞可能是间歇性进入血流,采用单一时点采取外周血标本就可能使得 RNA 的检测存在假阴性,不同时间多次抽血或加大抽血量也许能够提高检出率;(5)大肠癌患者血中的循环肿瘤细胞生长增殖处于静止期,如在此期抽血就可能无法检测到 mRNA;(6)入选病例中 TNM 各期病例数不同以及检测方法和试剂不一样。

腹腔镜辅助下结直肠癌根治术患者 CK20 mRNA 手术开始时阳性率为 29.16%(7/24),手术操作结束时阳性率为 37.50%(9/24),CK20 mRNA 的表达虽然有所增加,但两组之间差异无

统计学意义($P>0.05$),与开腹组手术前后比较差异无统计学意义($P>0.05$)。TNM 不同分期结直肠癌患者手术前后 CK20 mRNA 表达阳性率不同,Ⅲ期明显增高,差异明显,说明结直肠癌外周静脉血循环癌细胞可能与病程早晚关系有关。腹腔镜手术与开腹手术比较,血液 CK20 mRNA 阳性无明显差异,说明较开腹手术而言,腹腔镜结直肠癌根治术并不增加血液微转移的概率,与 Lelievre 等^[6]研究结果相符。

现在国内外的研究表明,结直肠癌患者外周血的 CK20 mRNA 阳性率与结直肠癌的术后转移、复发密切相关。许多研究结果显示,患者的预后与外周血有无肿瘤细胞有关^[1,3-5,7-8]。为了预防术中癌细胞的播散,应采取有效的预防措施,如游离肿瘤前结扎淋巴血管和不接触游离操作技术等,以减少癌细胞转移。

综上所述,初步证实腹腔镜组不增加肿瘤细胞的血循环微转移,但腹腔镜结直肠癌根治术对术后肿瘤复发、转移的影响还有待术后长期的随访观察。尽管近年来对 CK20、大肠癌微转移的研究取得了很大进展,但 CK20 的分子学行为、基因特征还有待进一步研究,微转移与预后的确切关系有待观察。随着分子生物学技术的不断发展以及对大肠癌基因和肿瘤相关抗原研究的深入,将会逐步确定 CK20 在大肠癌中的临床应用价值;并且随着对微转移检测的认识和研究不断深入,将建立更科学的检测方法,揭示微转移的机制,明确微转移与临床转移、复发的关系,为临床恶性肿瘤的病情判断、治疗以及预后评估提供更好的依据。

参考文献:

- [1] 熊兵红,程勇,王严庆. 细胞角蛋白 20 检测在大肠癌微转移中的临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(14): 1394.
- [2] 周坤,史忠,葛海燕. 肿瘤分化程度对大肠癌腹腔镜根治术后肿瘤细胞微转移影响的研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(18): 1809.
- [3] 徐栋,郑树. RT-PCR 检测大肠癌患者 CK20 mRNA 的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(8): 473.
- [4] 袁正强,曹建林,陈微微,等. 大肠癌患者外周血癌细胞 CK20 检测及其意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2005, 10(1): 74.
- [5] 孙建伟,华映坤,贾玲,等. 大肠癌患者外周血 CK20 mRNA 的表达及其意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2004, 11(2): 119.
- [6] Lelievre L, Paterlini-Brechot P, Camatte S, et al. Effect of laparoscopy versus laparotomy on circulating tumor cells using isolation by size of epithelial tumor cells[J]. Int J Gynecol Cancer, 2004, 14(2): 229.
- [7] 郑民华,林森旺. 腹腔镜结、直肠癌手术切口及脏器转移的实验研究[J]. 中国实用外科杂志, 2002, 22(6): 337.
- [8] 徐杰,杨蕊,陈爱平. 卵巢肿瘤组织中 EGFR、CK10 表达及其意义[J]. 山东医药, 2008, 48(48): 28.

(收稿日期:2009-11-03 修回日期:2010-02-24)