文章编号:1000-5404(2006)21-2183-03

论著

腹腔镜下胃癌根治术患者外周静脉血 CK_{20} mRNA 的检测及其临床意义

青 廉,罗华星,余佩武,王自强,刘 伟 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要: 目的 检测腹腔镜胃癌根治术患者外周静脉血 CK_{20} mRNA 的表达,并探讨其临床意义。**方法** 应用 RT-PCR 方法检测 44 例行腹腔镜辅助下胃癌根治术和 29 例开腹胃癌根治术患者外周静脉血的 CK_{20} mRNA。**结果** TNM 分期Ⅲ期胃癌患者外周静脉血的 CK_{20} mRNA 显著高于Ⅰ期、Ⅱ期患者($P<0.05$)。腹腔镜辅助下胃癌根治术患者 CK_{20} 手术开始时阳性率为 22.7%(10/44),手术结束时阳性率为 27.3%(12/44),两组之间无显著性差异($P>0.05$),手术前后和开腹组无显著差异($P>0.05$)。**结论** 胃癌患者外周静脉血 CK_{20} mRNA 的水平和 TNM 分期有关,腹腔镜胃癌根治术并不增加外周静脉血 CK_{20} mRNA 的阳性率。

关键词: 胃癌;聚合酶链反应;CK_{20} mRNA;腹腔镜;根治性胃切除
中图法分类号: R730.4; R730.56; R735.2 **文献标识码**: A

CK_{20} mRNA detection in peripheral blood of patients underwent laparoscopic radical gastrectomy

QING Lian, LUO Hua-xing, YU Pei-wu, WANG Zi-qiang, LIU Wei (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To detect CK_{20} mRNA expression in peripheral blood in patients underwent laparoscopic radical gastrectomy and to discuss its clinical significance. **Methods** CK_{20} mRNA was detected in peripheral blood of 44 gastric cancer patients underwent laparoscopic radical gastrectomy and 29 patients with open radical gastrectomy by RT-PCR. **Results** CK_{20} 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 CK_{20} mRNA was 22.7% (10/44), while the postoperative positive rate was 27.3% (12/44) in patients underwent laparoscopic radical gastrectomy, and there was no significant difference between the two groups ($P>0.05$). The positive rate of CK_{20} mRNA expression had no significant difference between the laparoscopic and open radical gastrectomy either preoperatively or postoperatively. **Conclusion** The amount of cancer cells in peripheral blood of gastric cancer patients concern with TNM staging. Laparoscopic radical gastrectomy does not increase the positive rate of cancer cells in peripheral blood.

Key words: gastric cancer; RT-PCR; CK_{20} mRNA; laparoscopy; radical gastrectomy

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。胃癌的转移和复发是影响预后的重要因素。而存在于患者淋巴结、外周血、骨髓和腹腔中的微转移是导致转移和复发的基础。自 1987 年腹腔镜应用于胆囊切除术以来,由于其微创优点,应用范围逐渐扩展到外科的各个领域。1999 年 Uyama 等[1]报道了腹腔镜下进展期胃癌根治术,包括腹腔镜下行全胃切除和 D2 淋巴结清扫。国内近年腹腔镜胃癌根治术也逐渐报道[2,3]。现在外科医师已基本认同对于合适的胃癌病例,有经验的手术医师行腹腔镜胃癌根治术能达到根治性切除的要求[4,5]。但进展期胃癌腹腔镜手术开展少,尚处于探索之中,我院自 2004 年 3 月开始腹腔镜辅助下胃癌根治术,术后近期效果良好[6]。腹腔镜辅助下胃癌根治术对胃癌微转移的影响是目前关注的重要课题。本研究用角蛋白片段 CK_{20} 为标记物,采用敏感的 RT-PCR 技术检测腹腔镜胃癌根治术患者外周血中的胃癌微转移的情况,探讨其临床意义。现报告如下。

作者简介:青 廉(1971-),男,四川省南充市人,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:13228686296
通讯作者:余佩武,电话:(023)68754061, yupeiwu01@vip.sina.com
收稿日期:2006-01-24;修回日期:2006-07-18

1 材料与方法

1.1 研究对象

术前经腹部CT、电子胃镜、病理确诊为胃癌。腹腔镜组：行腹腔镜辅助下胃癌根治术患者44例，平均年龄51岁(30～71岁)，其中低分化腺癌31例，中分化腺癌10例，高分化腺癌2例，黏液腺癌1例。开腹组：行开腹胃癌根治术患者29例，平均55.9岁(32～78岁)，其中低分化腺癌20例，中分化腺癌7例，高分化腺癌1例，印戒细胞癌1例。两组均按照日本第13版胃癌处理规约[7]进行胃癌根治术。阴性对照病例：术前胃镜检查诊断为胃良性溃疡患者7例，平均年龄42.5岁(26～52岁)，行腹腔镜辅助胃大部切除术，术后病理证实排除胃恶性肿瘤。

1.2 标本采集

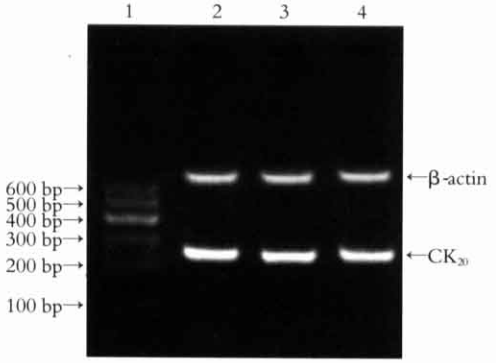
手术前1天，所有患者行深静脉置管，位置为右颈内静脉。麻醉后手术开始时从静脉导管抽10 ml静脉血，再抽第二个10 ml静脉血，肝素抗凝。第一个10 ml回推。主要操作结束时同法采集标本。

1.3 实验方法

1.3.1 总RNA提取 肝素抗凝静脉血用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离单核细胞。总RNA提取采用RNA抽提试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司)，操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 RT-PCR 上海生工生物工程技术服务有限公司合成引物序列。CK_{20} mRNA PCR引物A，5′-CCAACTGATGCAGATTCGGAGT-3′；B，5′-CCTCTTTGACTTCAGATGACACGAC-3′，产物248 bp；内对照β-actin引物序序列：5′-GCCACATCGCTCAGACAC-3′；5′-CATCACGCCACAGTTTCC-3′，产物614 bp；按RT-PCR试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司)说明，在反应系统中加入总RNA 2 μg。置于42 ℃孵育120 min，95 ℃热变性5 min。将mRNA反转录成cDNA。PCR反应条件，按94 ℃ 50 s －65 ℃ 50 s －72 ℃ 60 s循环32次，最后72 ℃ 延伸8 min。

1.3.3 结果分析 PCR扩增后产物，和β-actin扩增后产物，经含EB染色剂的2%琼脂糖凝胶电泳，以248 bp出现阳性条带为CK_{20} mRNA阳性，同时614 bp出现阳性β-actin扩增后产物，为阳性，见图1。



1：DNA标准；2：手术前；3：开腹组手术后；4：腹腔镜组手术后

图1 CK_{20} PCR电泳图

1.4 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件包，四格表χ^2检验。

2 结果

2.1 不同TNM分期患者外周血中CK_{20} mRNA的表达差异

TNM分期Ⅰ、Ⅱ期胃癌患者手术前后血液CK_{20} mRNA表达阳性率低，Ⅲ期明显增高，差异明显，P值均小于0.05，见表1。

表1 血液CK_{20} mRNA与胃癌TNM分期的关系

组别	Ⅰ期			Ⅱ期			Ⅲ期[a]		
	例数	阳性	阴性	例数	阳性	阴性	例数	阳性	阴性
腹腔镜组术前	16	1	15	5	1	4	23	8	15
开腹组术前	8	1	7	4	0	4	17	6	11
腹腔镜组术后	16	1	15	5	1	4	23	10	13
开腹组术后	8	1	7	4	0		17	8	9

a：$P<0.05$，与Ⅰ、Ⅱ期比较

2.2 胃癌患者外周血液CK_{20} mRNA检出情况与胃癌病理类型的关系

胃癌患者血液CK_{20} mRNA阳性率在最常见的两种病理类型低分化管状腺癌和中分化管状腺癌的手术前后检出均无显著差异($P>0.05$)，见表2。

表2 胃癌患者血液CK_{20} mRNA检出情况和病理类型的关系

病理类型	例数	术前血液CK_{20} mRNA		术后血液CK_{20} mRNA	
		阳性例数	阴性例数	阳性例数	阴性例数
低分化管状腺癌	51	12	39	15	36
中分化管状腺癌	17	5	12	6	11
高分化管状腺癌	3	0	3	0	3
黏液腺癌	1	0	1	0	1
印戒细胞癌	1	0	1	0	1
合计	73	17	56	21	52

2.3 手术前后胃癌患者外周血中CK_{20} mRNA的表达差异

腹腔镜手术后患者外周血中CK_{20} mRNA的表达虽然有所增加，但同术前相比无显著性差异。和开腹组手术前后比较也无显著差异($P>0.05$)，见表3。

表3 手术前后胃癌患者外周血CK_{20} mRNA表达

组别	手术前		手术后		病例数
	阳性	阴性	阳性	阴性	
腹腔镜组	10	34	12	32	44
开腹组	7	22	9	20	29

3 讨论

虽然血液中存在癌细胞并不一定会发生转移瘤，

但癌细胞进入血液是肿瘤发生远处转移的先决条件。微转移播散并存活于血循环中是肿瘤发生显性远处转移的前提。近年来高灵敏度 PCR 方法的出现使得检测循环肿瘤细胞成为可能。而 RT-PCR 技术可检测出 $10^6 \sim 10^7$ 个正常细胞中的一个肿瘤细胞，为非常敏感的一种检测方法。CK_{20} mRNA 为上皮特异性的标志物，在上皮来源的肿瘤细胞中表达阳性，在细胞外环境中非常不稳定，故若在患者外周血中能检测出，则从理论上可认为有循环肿瘤细胞或微转移灶的存在。我们在术前 1 天对患者行颈静脉置管，在手术时采血，可以避免上皮细胞在采血时进入静脉血，同时用的是第 2 管血，杜绝了外源性上皮细胞进入检测标本的可能。所以如果胃癌患者外周静脉血中检测出 CK_{20} mRNA，可以认为外周血中存在胃癌细胞。

本研究采用敏感的 RT-PCR 方法检测腹腔镜辅助下胃癌根治术手术前后外周静脉血的癌细胞。手术操作结束虽然较开始有所增加，但无统计学意义（$P > 0.05$）。TNM 分期Ⅰ、Ⅱ期胃癌患者手术前后 CK_{20} mRNA 表达阳性率低，Ⅲ期明显增高。两者差异明显。说明胃癌外周静脉血循环癌细胞可能与病程早晚关系更大。各种类型胃癌血液 CK_{20} mRNA 表达无明显差异。腹腔镜手术和开腹手术比较，血液 CK_{20} mRNA 阳性无明显差异，说明较开腹手术而言，腹腔镜胃癌根治术并不增加血液微转移。腹腔镜辅助下胃癌根治术就我们术中体会，可能因为以下原因，较开腹手术不会增加外周循环的癌细胞：①由于腹腔镜有一定的放大效应，对组织解剖更加精细，对周围组织损伤更少；②超声刀使组织内的水分子汽化、蛋白质氢键断裂、细胞崩解、组织被切开或者被凝固、血管闭合。超声刀有良好止血效果，可以安全凝固 3 mm 以下的动静脉，甚至可以凝固 5 mm 的血管[8]。切割局部高温有可能灭活局部可能存在的癌细胞，同时闭合了可能存在的淋巴管等，减少了癌细胞进入循环的机会；③只需要用抓钳对少量组织抓持进行暴露，游离过程中基本上可以不接触挤压肿瘤组织；④腹腔镜手术靠气腹取得视野和操作空间，而我们所用气腹压力较低，较开腹手术对肿瘤及周围组织的大力牵拉的机械作用小。所以腹腔镜胃癌根治术并不增加胃癌术后血液微转移，进而增加术后的转移和复发。

用 PCR 方法或其他方法检测出来的循环肿瘤细胞或微转移灶对恶性肿瘤患者的预后有无影响意义现在还存在争议，因为循环肿瘤细胞的存在并不一定可致显著的临床转移灶的发生，大部分循环肿瘤细胞可以被免疫的、机械的及其他机制所消灭。但尽管如此，如果血液中存在循环胃癌细胞或微转移灶的存在毕竟增加了胃癌远处转移的危险性。检测腹腔镜胃癌根治术患者外周血中的 CK_{20} mRNA 可作为其微转移变化的一个监测指标。现在国内外的研究表明，胃癌患者外周血的 CK_{20} mRNA 阳性率和胃癌的术后转移和复发密切相关。那光玮等[9]的研究认为，胃肠道癌患者外周血 CK_{20} mRNA 的表达与肿瘤生物学特性密切相关，CK_{20} mRNA 阳性表达肿瘤侵袭力强、病期晚，易转移和复发。Illert 等[10]应用 RT-PCR 方法检测 70 例胃癌患者手术前静脉血 CK_{20} mRNA，结果阳性率为 40%（28/70）。术后平均随访 20 个月（1 ~ 57 个月），静脉血 CK_{20} mRNA 阳性者胃癌根治术后生存期明显比阴性者短（$P = 0.0363$），说明血液 CK_{20} mRNA 阳性和胃癌预后密切相关。

腹腔镜胃癌根治术对于进展期胃癌的治疗现在还处于探索阶段，其临床疗效及其对术后癌症复发、转移的影响还有待术后长期的随访观察。

参考文献：

[1] UYAMA I, SUGIOKA A, FUJITA J, *et al*. Laparoscopic total gastrectomy with distal pancreatosplenectomy and D2 lymphadenectomy for advanced gastric cancer [J]. Gastric Cancer, 1999, 2(4): 230 - 234.

[2] 张　健，韩广森，王存川. 腹腔镜胃癌手术的临床应用与体会[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2005, 12(6): 537 - 539.

[3] 陈　凛，李　荣，田　文，等. 腹腔镜下胃癌根治术三例[J]. 中华胃肠外科杂志, 2004, 7(3): 175 - 176.

[4] DULUCQ J L, WINTRINGER P, STABILINI C, *et al*. Laparoscopic and open gastric resections for malignant lesions: a prospective comparative study[J]. Surg Endoec, 2005, 19(7): 933 - 938.

[5] KIM M C, KIM K H, KIM H H, *et al*. Comparison of laparoscopy-assisted by conventional open distal gastrectomy and extraperigastric lymph node dissection in early gastric cancer[J]. J Surg Oncol, 2005, 91(1): 90 - 94.

[6] 余佩武，王自强，钱　锋，等. 腹腔镜辅助下胃癌根治术 71 例临床报告[J]. 中华胃肠外科杂志, 2005, 8(5): 401 - 403.

[7] 陈峻青. 日本胃癌处理规约第 13 版重要修改内容简介[J]. 中国实用外科杂志, 2000, 20(1): 60 - 62.

[8] 王存川，陈　鋆，徐以浩，等. 超声刀在腹部外科腹腔镜手术中的应用[J]. 中国现代手术学杂志, 2000, 4(2): 83 - 86.

[9] 那光玮，李军，何科基，等. 胃肠道癌外周血 CK20 mRNA 的表达及临床意义[J]. 癌症, 2004, 23(11): 1350 - 1353.

[10] ILLERT B, FEIN M, OTTO C, *et al*. Disseminated tumor cells in the blood of patients with gastric cancer are an independent predictive marker of poor prognosis [J]. Scand J Gastroenterol, 2005, 40(7): 843 - 849.

（编辑　王　红）