论著

文章编号:1000-5404(2007)08-0736-04

腹腔冲洗液沉淀STAT3和CEA检测与胃癌腹膜微转移的研究

刘 伟[1],余佩武[1],安 杰[2],张 超[1],赵永亮[1] ([1]第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038;[2]北京军区白求恩国际和平医院病理科,石家庄 050082)

提 要:目的 比较不同的实验方法对于检测胃癌患者腹膜微转移的效果。**方法** 收集66例胃癌和12例胃良性病变患者腹腔冲洗液以及临床病理资料,分别采用巢式RT-PCR检测腹腔冲洗液中CEA mRNA、STAT3 mRNA表达;采用HE染色进行腹腔冲洗液细胞学(PLC)检查。**结果** 患者腹腔冲洗液中STAT3 mRNA和CEA mRNA的阳性检出率分别为43.9%和48.5%,明显高于PLC(31.8%)($P<0.01$),且阳性率随肿瘤浸润深度、TNM分期及病程增加而增加。**结论** 巢式RT-PCR检测胃癌患者腹腔冲洗液中STAT3基因,可提高检测腹腔游离肿瘤细胞的灵敏性,适用于预测胃癌患者腹膜微转移。

关键词: 胃肿瘤;腹膜微转移

中图法分类号: R73-37;R730.43;R735.2 **文献标识码:** A

Detection of STAT3 mRNA and CEA mRNA in peritoneal washings for predicting peritoneal micrometastasis in patients with gastric carcinoma

LIU Wei[1], YU Pei-wu[1], AN Jie[2], ZHANG Chao[1], ZHAO Yong-liang[1] ([1]Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038;[2]Department of Pathology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

Abstract: Objective To compare detection of STAT3 and CEA by nest RT-PCR and peritoneal lavage cytology examination (PLC) in predicting peritoneal micrometastasis in gastric carcinoma patients. **Methods** Peritoneal washings of 66 patients with gastric carcinoma and 12 patients with benign gastric diseases were collected to detect the mRNA level of STAT3 and CEA by nest RT-PCR. PLC were carried out by H-E staining. **Results** The positive rates of STAT3 mRNA and CEA mRNA in peritoneal washings were 43.9% and 48.5%, respectively. The positive rates of STAT3 mRNA and CEA mRNA were significantly higher than those of PLC (31.8%). The positive rates of STAT3 mRNA and CEA mRNA were concurrently increased with the depth of tumor invasion, TNM staging and pathogenesis. **Conclusion** Detecting STAT3 mRNA in peritoneal washings by nest RT-PCR can improve the sensitivity of free tumor cell detection in peritoneal washings, and may be used to predict peritoneal micrometastasis of gastric carcinoma.

Key words: stomach neoplasm; peritoneal micrometastasis

腹腔转移及复发是胃癌患者主要致死原因,国内外研究表明,根治性手术切除加广泛淋巴结清扫术能有效减少较早期胃癌的复发,但即使行根治性治疗,对较晚期胃癌的治疗仍不理想。至少5%以上的患者术后会出现复发转移,从而导致手术失败。研究表明,患者就诊时多已处于浆膜受侵的进展期,半数以上患者最终死于腹膜种植转移[1]。有效筛检腹膜微转移的高危病例并予以及时治疗是提高胃癌疗效的关键。传统的腹腔冲洗液细胞学(peritoneal lavage cytology, PLC)检查和血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)检测灵敏性较低,难以早期发现胃癌腹腔脱落的游离癌细胞(exfoliated cancer cells, ECCs)。近年来,应用巢式RT-PCR技术检测胃癌患者腹腔冲洗液中CEA mRNA的表达已经成为预测胃癌腹膜转移的一个敏感性标准。JAK-STAT(janus kinase-signal trans-

作者简介:刘 伟(1975-),男,河北省沙河市人,博士,医师,主要从事胃肠道肿瘤发生机制方面的研究。电话:(023)66955796, E-mail: talismanliu@163.com

通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail: yupeiwu01@vip.sina.com

收稿日期:2006-04-28;修回日期:2007-01-19

ducer and activator of transcription）信号途径是近年来新发现的一条信号传导通路。本研究拟采用巢式 RT-PCR 方法检测胃癌患者腹腔灌洗细胞中癌基因 STAT3 mRNA 与 CEA mRNA 的表达情况，并评估两者在预测胃癌腹膜转移中的作用。

1　材料与方法

1.1　病例选择

收集本院 2005 年 11 月至 2006 年 6 月收治的胃疾病患者 78 例，其中胃癌 66 例，男性 42 例，女性 24 例，年龄 35～77 岁，中位年龄 52 岁；胃良性病变 12 例。胃癌原发灶大小、组织学分化程度、浸润深度及分期情况见表 1。

表 1　CEA mRNA 和 STAT3 mRNA 表达与临床病理因素的关系

临床病理因素	n	PLC 检测		P	CEA mRNA 检测		P	STAT3 mRNA 检测		P
		+	−		+	−		+	−	
肿瘤大小										
<5 cm	32	8	24	>0.05	13	19	>0.05	12	20	>0.05
>5 cm	34	13	21		19	15		17	17	
组织类型										
分化好	14	1	13	<0.05	3	11	<0.05	2	12	<0.05
分化差	52	20	32		29	23		27	25	
浸润深度										
T1＋T2	18	1	17	<0.01	4	14	<0.01	2	16	<0.01
T3＋T4	48	20	28		28	20		27	21	
淋巴结转移										
阴性	21	2	19	<0.01	5	16	<0.01	4	17	<0.01
阳性	45	19	26		27	18		25	20	
TNM 分期										
Ⅰ＋Ⅱ	23	3	20	<0.05	7	16	<0.05	5	18	<0.05
Ⅲ＋Ⅳ	43	18	25		25	18		24	19	

1.2　标本采集

以电刀开腹，尽量避免出血，若有腹水则直接吸出；如无腹水，则于 Douglas 窝置入 16 号导尿管，注入 200 ml 无菌生理盐水，轻轻搅动后吸出，收集腹腔灌洗液，然后加入 12 500 U 肝素抗凝后离心，随后的检测过程采用盲法，将标本重新排列，另行编号，防止主观因素的干扰。

1.3　PLC 检测

腹腔冲洗液离心沉渣涂片，HE 染色，行 PLC 检测。

1.4　巢式 RT-PCR 检测

腹腔冲洗液沉淀，用 Trizol（Roche 公司）抽提试剂提取细胞 mRNA，采用 Promega RT-PCR 试剂盒行逆转录，操作步骤按照试剂盒说明书进行。引物序列由上海生工生物工程服务有限公司合成。CEA 巢式 RT-PCR 引物：A，5′-ACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGAG-3′；B，5′-ACGGTTGCCATCCACTCTTTCAC-3′；C，5′-GCCACAGCCTCACTTCTAACCTTC-3′。STAT3 巢式 PCR 引物：D，5′-GGGCTTCTCCTTCTGGGTCTGGC-3′；E，5′-TGGGTCTTACCGCTGATGTCCTT-3′；F，5′-TACATCATGGGCTTTATCAGTAAGG-3′。内参 β-actin 引物序列：5′-GGCATCGTGATGGACTCCG-3′；5′-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3′。PCR 参数设置：42 ℃条件下 45 min 行逆转录后第 1 轮 PCR：CEA 引物为 A、B，STAT3 引物为 D、E。反应条件：94 ℃变性3 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环。第 2 轮 PCR：取第 1 轮扩增产物 1 μl，稀释 100 倍，取 1 μl 进行扩增，CEA 引物为 B 和 C（退火温度为 55 ℃），STAT3 引物为 E、F（退火温度为 52 ℃），以同样步骤扩增 30 个循环。阴性对照除不加模板外，其他各种成分与待检样品相同。各样本 β-actin 作为内对照，以胃癌 MKN-45 细胞相应 mRNA 为阳性对照。巢式 RT-PCR 最终产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，CEA mRNA 阳性者可见 173 bp 条带，STAT3 mRNA 阳性者可见 149 bp 条带，β-actin 扩增产物为 613 bp，β-actin 阳性样本视为有效样本。

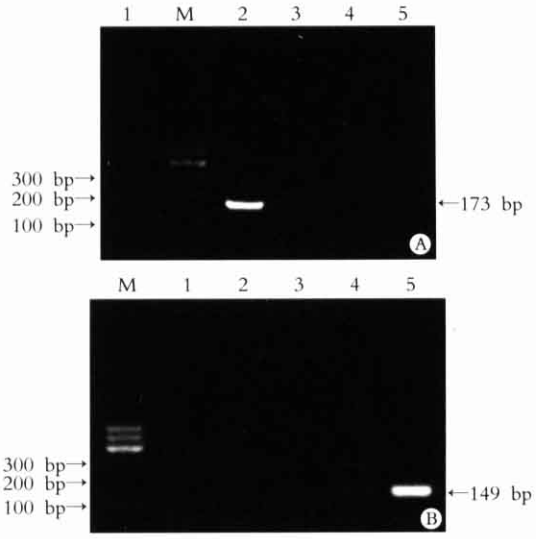
1.5　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验及相关性分析。

2　结果

2.1　巢式 RT-PCR 检测结果

部分胃癌患者腹腔冲洗液离心沉渣检测到明显的 CEA mRNA、STAT3 mRNA，与预计扩增产物大小一致，阴性对照均无阳性条带出现，阳性对照 MKN-45 细胞两者 PCR 结果呈明显的阳性。各样本 β-actin 对照均在相应位置出现明显扩增条带，表明提取的 mRNA 质量及 RT-PCR 反应过程良好（图 1）。



A：CEA mRNA；B：STAT3 mRNA

M：标准；1：阴性对照组；2：样本 1；3：样本 2；4：样本 3；5：样本 4

图 1　巢式 RT-PCR 检测胃癌患者腹腔冲洗液 CEA mRNA、STAT3 mRNA 的表达

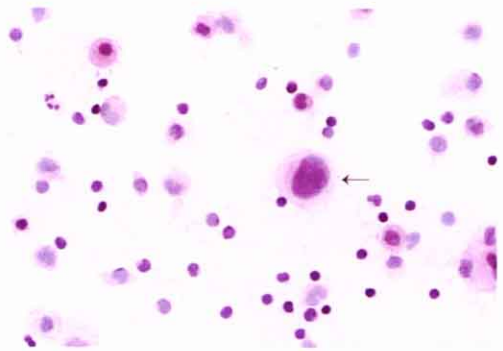
2.2　各项指标的检测结果

66 例胃癌患者腹腔肿瘤细胞阳性检出率依次为 PLC（21 例，31.8%）、CEA mRNA（32 例，48.5%）及 STAT3 mRNA（29 例，43.9%）。CEA mRNA 的阳性检出率与 PLC 相比较有显著性差异（$P=0.000$），STAT3 mRNA 的阳性检出率与 PLC 相比

较亦有显著性差异($P=0.000$)。PLC 阳性者,CEA mRNA 和 STAT3 mRNA 表达均阳性(表2)。12 例胃良性病变患者腹腔冲洗液检查各项指标均为阴性。

表2 PLC 与 PCR 检测之间的一致性分析

指标	n	指标	n
PLC(-)CEA PCR(-)	34	PLC(-)STAT3 PCR(-)	37
PLC(-)CEA PCR(+)	11	PLC(-)STAT3 PCR(+)	7
PLC(+)CEA PCR(-)	0	PLC(+)STAT3 PCR(-)	0
PLC(+)CEA PCR(+)	21	PLC(+)STAT3 PCR(+)	21



↑:癌细胞

图2 胃癌腹腔冲洗液中癌细胞呈阳性(腺癌细胞) (HE×400)

2.3 CEA mRNA、STAT3 mRNA 与病理、临床因素之间的关系

CEA mRNA 与肿瘤组织类型、浸润深度以及 TNM 分期有关($P<0.01$),而与肿瘤大小无关($P>0.05$);同样,STAT3 mRNA 阳性率与肿瘤组织类型、浸润深度以及 TNM 分期有关($P<0.01$),而与肿瘤大小无关($P>0.05$)。即随着肿瘤浸润深度增加、病期进展,CEA mRNA、STAT3 mRNA 阳性率增加。见表3。

表3 CEA mRNA、STAT3 mRNA 与病理、临床因素之间相关性分析

因素	CEA mRNA		STAT3 mRNA	
	r	P	r	P
肿瘤大小	0.153	0.221	0.126	0.314
组织类型	0.281	0.022	0.310	0.011
浸润深度	0.322	0.008	0.405	0.001
淋巴结转移	0.337	0.006	0.343	0.005
TNM 分期	0.264	0.032	0.327	0.007

3 讨论

胃癌细胞的腹膜种植是腹膜转移极为重要的过程,部分患者腹膜是肿瘤复发的唯一部位,目前手术仍然不能解决浆膜受侵的复发问题,多数学者认为复发源于腹膜内游离癌细胞的种植。ECC 是形成腹膜转移的先决条件,是胃癌独立的预后不良因素之一。20 世纪 70 年代以来,日本等国外学者运用腹腔灌洗细胞学检测胃癌腹腔脱落癌细胞,检测到胃癌患者,特别是侵及浆膜的胃癌患者腹腔冲洗液中有游离癌细胞存在,目前的研究者已经将其作为预测胃癌腹膜微转移的重要手段,但采用 PLC 阳性检出率不高,一般在 21%~30%[2],而且有一定漏诊率,限制了该方法在临床的应用,本研究中 PLC 检出的阳性率仅为 31.8%。

近几年 RT-PCR 方法广泛应用于各种实体恶性肿瘤微转移检测,亦是目前检测胃癌微转移最常用技术。RT-PCR 可以从基因组 DNA 中大量制备所需 DNA 片段,使极微量的 ECC 检测成为可能,显示出较高的灵敏性。近来巢式 RT-PCR 进一步改善了原有技术的不足,由于采用了 2 对以上的引物扩增目的片段,与单对 RT-PCR 相比,检测的敏感性和特异性都明显增加,可检出 10^7 个正常细胞中的 1 个肿瘤细胞[3]。

CEA 主要存在于肿瘤细胞内,是一种特异性较高的肿瘤相关抗原,因其作为肿瘤标志物进行微转移检测可以在骨髓、外周血、淋巴结及腹腔灌洗液等进行[4],临床上将它作为胃癌筛选普查的重要参考指标[1]。腹腔冲洗液 CEA mRNA 和细胞学检查一样,是检测腹腔游离癌细胞腹膜转移的有效方法,这在国内外的诸多研究中得到了证实[5,6]。临床的随访也同证实了胃癌患者体内 CEA 检测能够更好地预测有无腹腔播散,是判断胃癌预后的独立因素,同时为术后有目的的治疗提供依据。朱孝成等[7]对 60 例胃疾病腹腔灌洗液样本(其中胃癌 50 例,胃良性病变 10 例)进行了 CEA 检测,并对患者进行了术后 2 年的随访,发现腹腔灌洗液 CEA 检测具有较高敏感性,其同腹膜复发及 2 年生存密切相关。王建俊等[8]对 62 例进展期胃癌术后随访 1 年以上,发现胃癌患者手术前胃液 CEA 水平与术后复发有关。Kodera 等[9]运用荧光定量 RT-PCR 法对 193 例胃癌患者术前腹腔冲洗液游离癌细胞 CEA 加以检测,并对患者术后加以随访,认为 CEA mRNA 检测与胃癌的预后、转移和治疗的关系密切。

本实验采用巢式 RT-PCR 技术检测腹腔冲洗液中的游离癌细胞 CEA mRNA 和 STAT3 mRNA 的表达。JAK-STAT 信号途径是近年来发现的一条信号传导通路。STAT 激活转位入核后与特定序列 DNA 片段结合,调控相关基因的表达,产生生物学效应[10,11]。JAK-STAT 信号传导途径与恶性肿瘤发生发展的关系是最近才为人们所认识的,主要表现在:① STAT3 的持续性激活能通过上调 Bcl-xL、cyclins D1/D2、c-myc

的表达，干扰细胞的增殖和分化，抑制肿瘤的凋亡。② STAT3 是 VEGF 基因直接的转录激活子[12]，阻断 STAT3 可以消除 VEGF 过表达，产生抗血管生成作用[13]。③ 肿瘤细胞中组成性表达的 STAT3 能够抑制促炎症介质的产生，阻断肿瘤细胞 STAT3 信号可激活先天性免疫细胞[14]，刺激机体的抗肿瘤免疫反应[15]。由此可见，STAT3 的过表达可能同肿瘤的扩散和转移是密切相关的，但检测 STAT3 表达可否预测有无腹腔播散及判断胃癌患者预后，目前还少见研究证实。

为探讨 STAT3 表达与腹膜种植能力的关系，我们收集了临床胃癌患者的腹腔灌洗液，采用常规 PLC 方法、巢式 RT-PCR 技术检测腹腔冲洗液中的游离癌细胞 CEA mRNA 和 STAT3 mRNA 的表达，将检测结果进行统计学分析，结果显示：CEA mRNA 及 STAT3 mRNA 有较高检测阳性率，明显优于传统 PLC 方法；而且前两者检测与客观指标 PLC 检测是具有一致性的，即说明应用巢式 PT-PCR 方法检测肿瘤细胞 CEA mRNA 及 STAT3 mRNA 表达是可靠的。腹腔灌洗液中胃癌细胞 STAT3 mRNA 的表达与胃癌腹腔微转移筛查的“金标准”CEA mRNA 表达呈现明显的相关性，有明确的统计学意义（$r=0.836$，$P<0.01$）。研究同样显示：CEA mRNA 及 STAT3 mRNA 表达与胃癌的临床病理因素具有一定相关性，两者均与肿瘤侵犯深度及 TMN 分期密切相关，而与肿瘤大小无密切关系。综上，本研究说明 STAT3 mRNA 的表达与胃癌腹膜种植瘤的形成密切相关，检测腹腔内 STAT3 表达取材简便、阳性率更高，如联合检测 CEA mRNA 可作为预测胃癌早期腹腔转移及疾病预后的重要临床指标。在患者术后进行的短期随访中，同样显示了其同胃癌复发的密切关系。针对检测结果，我们在给予胃癌患者术后定期化疗的同时，辅以卡培他滨口服以抑制胃癌发生腹腔种植的发生，并进行长期随访，观察疗效。

尽管如此，恶性肿瘤的发病包含多基因多水平致病机制，仅从 STAT3 单一基因表达的变化，远不能阐明胃癌细胞腹膜种植的发生过程；并且二者联合检测的合理性仍有待于大宗临床病例随访及术后以肿瘤的腹膜复发为观察终点加以证实。

参考文献：

[1] Wang Z, Zhang X, Xu H, *et al*. Detection of peritoneal micrometastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for heparanase mRNA and cytology in peritoneal wash samples[J]. J Surg Oncol, 2005, 90(2): 59-65.

[2] Rosenberg R, Nekarda H, Bauer P, *et al*. Free peritoneal tumour cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma[J]. Br J Surg, 2006, 93(3): 325-331.

[3] Hirata H, Hisatomi H, Kawakita M, *et al*. Genetic detection for hematogenous micrometastasis in patients with various types of malignant tumors using Uroplakin Ⅱ derived primers in polymerase chain reaction[J]. Oncol Rep, 2003, 10(4): 963-966.

[4] 王志新，高明发. 非小细胞肺癌癌胚抗原表达的临床意义[J]. 第三军医大学学报，2001，23(1)：102-104.

[5] 邹寿椿，张成武，吕火祥，等. 术中实时 RT-PCR 检测胃癌患者腹腔冲洗液癌胚抗原 mRNA 的初步研究[J]. 中华胃肠外科杂志，2004，7(3)：184-188.

[6] Ito S, Nakanishi H, Kodera Y, *et al*. Prospective validation of quantitative CEA mRNA detection in peritoneal washes in gastric carcinoma patients[J]. Br J Cancer, 2005, 93(9): 986-992.

[7] 朱孝成，林超鸿. 胃癌腹腔灌洗液 CEA 测定的临床意义[J]. 中国肿瘤临床，1997，24(2)：89-91.

[8] 王建俊，王金鹏，张克伟，等. 胃液 CEA 和 CA50 检测在胃癌诊断及术后复发预测中的价值[J]. 肿瘤防治杂志，2005，12(17)：1333-1334.

[9] Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, *et al*. Quantitative detection of disseminated free cancer cells in peritoneal washes with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a sensitive predictor of outcome for patients with gastric carcinoma[J]. Ann Surg, 2002, 235(4): 499-506.

[10] Bromberg J, Darnell J E, Jr.. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function[J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2468-2473.

[11] 青　廉，余佩武，王自强，等. 腹腔镜胃癌根治术后腹腔冲洗液 CEA mRNA 的变化及意义[J]. 消化外科，2006，5(2)：102-104.

[12] Wei D, Le X, Zheng L, *et al*. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis[J]. Oncogene, 2003, 22(3): 319-329.

[13] Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, *et al*. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(41): 40026-40031.

[14] Wang T, Niu G, Kortylewski M, *et al*. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells[J]. Nat Med, 2004, 10(1): 48-54.

[15] Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self?[J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 807-839.

（编辑　张大春）