短篇论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2238-02

FQ-PCR法检测腹腔镜结直肠癌根治术患者外周血CK20 mRNA变化

程 勇,熊兵红,王子卫,张 伟 (重庆医科大学附属第一医院胃肠外科,重庆 400016)

摘 要:目的 检测腹腔镜结直肠癌根治术患者外周静脉血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。**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患者(腹腔镜组)和31例传统开腹结直肠癌根治术患者(开腹组)外周静脉血CK20 mRNA表达的变化。**结果** 腹腔镜组CK20 mRNA术前阳性率为29.17%(7/24),术后阳性率为37.50%(9/24),两者之间无显著性差异($P>0.05$);腹腔镜组和开腹组手术前后比较,也无显著差异($P>0.05$)。**结论** 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,即不增加术后肿瘤血循环微转移的危险性。

关键词: 结直肠癌;微转移;腹腔镜;CK20 mRNA;荧光定量-聚合酶链反应
中图法分类号: R730.43; R735.3 **文献标识码:** A

腹腔镜结直肠癌手术在临床得到较大范围的开展,而其手术方式的改进对结直肠肿瘤术后血液转移的影响也引起人们的重视。CK20 mRNA可用于检测结直肠癌的血行微转移,并判断患者的临床治疗效果和预后[1]。因此,我们将接受腹腔镜结直肠癌根治手术和传统开放根治手术的患者作对照研究,用荧光定量-聚合酶链反应(FQ-PCR)的方法分别检测两者手术前后外周血中CK20 mRNA表达的变化,以探讨腹腔镜结直肠癌根治术对术后肿瘤血循环微转移的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取本科2005年3月至2006年6月收治的结直肠癌患者55例作为研究对象,纳入的标准为无远处转移(Ⅰ~Ⅲ期)、无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。术前分期依据CT和腔内超声。采用随机数字表法将患者分成腹腔镜组和开腹组,淋巴结廓清均为D3程度。腹腔镜组:行腹腔镜辅助下结直肠癌根治术患者24例,年龄36~68(50±11)岁,其中男性14例,女性10例;开腹组:行开腹结直肠癌根治术患者31例,年龄34~80(62±13)岁,其中男性16例,女性15例。根据病史及病理报告,依据美国国家癌症综合治疗中心联盟(NCCN)标准进行TNM分期。

1.2 方法

1.2.1 手术方法 患者均于全麻下接受结直肠癌根治手术。常规探查腹腔内脏器,明确有无腹腔其他脏器转移及腹腔种植。腹腔镜组和开腹组均遵循肿瘤根治原则进行手术操作。2组手术均为同一组医师实施。

1.2.2 标本采集、处理和保存 2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,开腹组手术结束后立即抽取。2组均用肝素抗凝,淋巴细胞分离液分离,加入Trizol 500 μl,置-80 ℃冰箱保存,全部标本统一检测。

1.2.3 主要试剂 CK20 mRNA荧光定量PCR试剂盒(上海久盛医疗用品有限公司),上游引物:5′-CAGGCACACGGT-GAACTATGG-3′,下游:5′-GATCAGCTTCCACTGTTAGCG-3′。*Taq*man荧光探针:5′-CAGATCGGCACTTCTAGTA-3′。人淋巴细胞分离液、Trizol(日本TaKaRa公司),DEPC(Sigma公司)。

1.2.4 FQ-PCR实验步骤

1.2.4.1 外周血单核细胞和细胞总RNA提取 取静脉血5 ml肝素抗凝后,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 μl混匀置室温10 min,加入氯仿1 000 μl混匀,4 ℃ 10 000 r/min 10 min,取上层水相于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 15 min,弃上清,75%乙醇200 μl漂洗1次,快速离心吸干液体,气干后加入无菌DEPC水20 μl溶解RNA,进行逆转录反应和PCR扩增或置-80 ℃低温保存备用。

1.2.4.2 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 μl、M~MLV逆转录酶1 μl、RNasin l μl计算加入一总的无菌离心管中,混匀,用微量加样器加入20 μl上述反应液于每个反应管中,加入预变性的RNA 5 μl,37 ℃水浴反应30 min。

1.2.4.3 PCR扩增 按每个反应取PCR反应液43 μl、*Taq*酶2 μl计算加入一总的无菌离心管中,混匀,用微量加样器在每个反应管中加入45 μl反应液,加入RT反应产物5 μl,然后进行扩增:预变性95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,62 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,共35个循环,延伸72 ℃ 10 min,4 ℃保存。

1.2.4.4 结果判断 用美国ABI PRISM7000荧光仪进行检测,根据标准曲线,得到各检测标本CK20 mRNA的浓度(基因拷贝数/ml)。CK20阳性>1.0×10^3拷贝/ml,阴性<1.0×10^3拷贝/ml。

基金项目: 重庆市卫生局基金(2005-2-115)
Supported by the health bureau of chongqing(2005-2-115)
作者简介: 程 勇,男,安徽省舒城县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胃肠肿瘤基础与临床方面的研究。电话:(023)89011171,E-mail:chengyongcq@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-09-03;**修回日期:** 2008-10-12

表 1　2 组病例临床资料比较

组别	n	TNM 分期(例)			手术时间(min)	手术中失血量(ml)	清除淋巴结数(枚)	肿瘤部位(例)	
		Ⅰ期	Ⅱ期	Ⅲ期				结肠	直肠
腹腔镜组	24	2	10	12	270 ± 75	100 ± 28	8.0 ± 6.5	8	16
开腹组	31	1	19	11	190 ± 62	110 ± 35	9.0 ± 8.5	13	18
P 值			>0.05		<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	

1.3　统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料用 t 检验。

2　结果

2.1　2 组临床资料比较

2 组患者在年龄、性别、肿瘤 TNM 分期和清除淋巴结总数的比较上差异无统计学意义($P>0.05$),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

腹腔镜组手术开始时 CK20 mRNA 阳性率为 29.17%(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,但两者之间无显著性差异($P>0.05$);开腹组手术前后的阳性率分别为 32.26%(10/31)、41.94%(13/31),开腹组和腹腔镜组手术前后比较也无显著差异($P>0.05$)。

3　讨论

微转移(micrometastasis,MM)是指非血液系统恶性肿瘤在发展过程中,播散并存活于血液循环、淋巴系统、骨髓、肝和肺等组织器官中的微小瘤细胞灶,它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]。细胞角蛋白 20(cytokeratin20,CK20)是新近发现的一种多肽,不同于其他角蛋白,它非常局限在胃肠上皮细胞,几乎所有结直肠癌都明显表达且在侵袭、转移、扩散到其他组织器官时始终保持稳定。CK20 被认为是检测结直肠癌微转移的良好标志物[1]。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和免疫细胞化学检查具有更高的敏感性,可从 10^6 ~ 10^7 个正常细胞中检出 1 个肿瘤细胞。国外学者研究表明采用 CK20 mRNA RT-PCR 法可以在 1 ml 全血中检出 1 个上皮来源的肿瘤细胞。荧光定量 PCR 技术(FQ-PCR)具有技术操作简便、快速、结果判断客观、重复性能好、定量范围宽(可包括 0 ~ 10^{14} 拷贝/L)、无需样品梯度稀释,高灵敏性,高特异性,高精确性的特点,采用完全封闭式的操作系统,克服了传统的 PCR 技术易受污染,造成假阳性等诸多缺点。因此本研究采用 FQ-PCR 检测结直肠癌患者外周血 CK20 mRNA 这一血循环中癌细胞的敏感标志物,可准确判断结直肠癌患者是否存在血循环微转移。

腹腔镜组 CK20 mRNA 手术前后阳性率无显著性差异,和开腹组手术前后比较也无显著差异,说明较开腹手术而言,腹腔镜结肠癌癌根治术并不增加血液微转移的概率。Lecuru 等[2]的动物实验表明 CO_2 气腹和无气腹腔镜组或开腹组比较,CO_2 气腹无不良作用,CO_2 气腹不促进肿瘤的远处转移。Tomita 等[3]的动物实验也表明 CO_2 气腹与开腹组比较,不影响肿瘤的生长和肝转移。Raa 等[4]认为外科手术能增加肿瘤细胞的种植,但不增加肿瘤细胞株的生长。但也有动物研究显示腹腔镜技术能增加进展期结肠癌生长的危险性[5]。虽然目前腹腔镜结直肠癌根治术的安全性还存在争议,但手术中严格遵循无瘤原则和肿瘤根治原则并采取适当的措施是可以将腹腔镜结直肠癌手术术后肿瘤转移的危险性控制于较低水平的。我们的研究表明腹腔镜辅助结直肠癌根治术没有增加肿瘤血循环微转移,但有待进一步研究和循证医学证实,其检测方法也有待于规范统一。

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 - 1402.

[2] Lecuru F, Agostini A, Camatte S, *et al*. Impact of pneumoperitoneum on tumor growth[J]. Surg Endosc, 2002, 16(8): 1170 - 1174.

[3] Tomita H, Marcello P W, Milsom J W, *et al*. CO_2 pneumoperitoneum does not enhance tumor growth and metastasis: study of a rat cecal wall inoculation model[J]. Dis Colon Rectum, 2001, 44(9): 1297 - 1301.

[4] Raa S T, Oosterling S J, van-der-Kaaij N P, *et al*. Surgery promotes implantation of disseminated tumor cells, but does not increase growth of tumor cell clusters[J]. J Surg Oncol, 2005, 92(2): 124 - 129.

[5] Leister I, Manegold S, Schuler P, *et al*. Effect of laparotomy and CO(2) pneumoperitoneum on tumor growth of human colon carcinoma and expression pattern of tumor-associated proteins in the SCID mouse[J]. Int J Colorectal Dis, 2003, 18(6): 508 - 513.

(编辑　薛国文)