论著

文章编号:1000-5404(2010)01-0036-05

大肠癌患者腹腔冲洗液 CEA、GCC 和 CD44v6 mRNA 的检测及其临床意义

王浩斌[1],张才全[1],王崇树[2],赵明才[3],谢贤雍[4],侯华芳[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院普通外科[1];637000 四川 南充,川北医学院:附属医院普外一科[2],风湿免疫研究所[3],附属医院病理科[4])

[摘要] **目的** 探讨检测大肠癌患者术中腹腔冲洗液 CEA、GCC 和 CD44v6 mRNA 表达的临床意义。**方法** 收集 60 例大肠肿瘤患者的术中腹腔冲洗液,其中大肠癌 48 例(大肠癌组),大肠良性病变 12 例(阴性对照组),以上标本均经病理学证实,并以人大肠癌细胞株 SW480 作为阳性对照;应用基于 b-DNA 信号放大的基因表达定量检测技术测定腹腔冲洗液中脱落细胞的 CEA、GCC 和 CD44v6 mRNA 表达,同时做腹腔冲洗液细胞学检查(PLC),进而结合临床相关资料分析 CEA、GCC 和 CD44v6 mRNA 表达的临床意义。**结果** 大肠癌组腹腔冲洗液 CEA、GCC、CD44v6 的表达阳性率分别为 43.8%(21/48)、60.4%(29/48)、31.2%(15/48),总阳性率为 72.9%(35/48),高于腹腔冲洗液 PLC 的阳性率 4.2%(2/48),上述 3 项指标在人大肠癌细胞株 SW480 中表达均为阳性;在阴性对照组中有 1 例 CEA mRNA 检出阳性,其余均为阴性表达。不同 Dukes 分期、肿瘤分化程度、浆膜侵犯程度、是否淋巴结转移对 CEA、GCC 和 CD44v6 mRNA 的阳性率差异有统计学意义($P<0.05$),不同肿瘤大小、患者年龄和性别差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 检测腹腔冲洗液中 CEA、GCC 和 CD44v6 mRNA 的表达有助于大肠癌腹腔微转移的预测及术后治疗方案的制定;GCC、CD44v6 可作为检测大肠癌腹腔脱落癌细胞的指标;基于 b-DNA 信号放大的基因表达定量检测技术是一种预测腹腔微转移的有效方法。

[关键词] 结直肠肿瘤;肿瘤微转移;腹腔冲洗液;CEA;GCC;CD44v6;b-DNA;QuantiGene 2.0

[中图法分类号] R446.79; R730.43; R735.34 **[文献标志码]** A

Detection and clinical significance of CEA, GCC and CD44v6 mRNA in peritoneal lavages of colorectal cancer patients: report of 60 cases

Wang Haobin[1], Zhang Caiquan[1], Wang Chongshu[2], Zhao Mingcai[3], Xie Xianyong[4], Hou Huafang[2] ([1]Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]First Department of General Surgery, [4]Department of Pathology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, [3]Research Institute of Rheumatology and Immunology, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan Province, 637000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the significance of the transcripts of carcinoembryonic antigen (CEA), guanylyl cyclase C (GCC) and metastasis-related gene CD44v6 in peritoneal lavages of colorectal cancer patients. **Methods** The peritoneal lavages of 48 patients with identified colorectal cancer (colorectal cancer group) and 12 patients with benign colorectal disease (negative control group) were collected. All of the patients were pathologically confirmed. Human colorectal cancer cell line SW480 were taken as a positive control. The mRNA levels of CEA, GCC and CD44v6 in the collected cells were detected by QuantiGene Reagent System, which is a quantitative RNA detection method based on branched DNA (b-DNA) signal amplification technique. Meanwhile, cytologic examination with microscopy was performed. **Results** The positive expression rates of CEA, GCC and CD44v6 in the peritoneal lavages were 43.8% (21/48), 60.4% (29/48) and 31.3% (15/48) respectively, and the total positive rate was 72.9% (35/48) in colorectal cancer group, which was more sensitive than that of cytologic examination (2%, 1/48). All 3 marker genes were expressed in human colorectal cancer cell line SW480. There was only 1 sample positive to CEA mRNA in the negative control group. The positive rate of CEA, GCC and CD44v6 expressions were correlated with the Dukes staging, differentiation status, serosal involvement and lymph node metastasis ($P<0.05$), but not with tumor size, patient age and gender ($P>0.05$). **Conclusion** The detection of CEA, GCC and CD44v6 mRNA in peritoneal lavages is helpful for early diagnosis, prognosis assessment and suitable treatment selection for colorectal carcinoma.

[基金项目] 四川省科技厅应用基础研究项目(04JY029-015-3)

[通信作者] 张才全,电话:(023)6811360,E-mail: zhangyu0323@21cn.com
王崇树,电话:(0817)2262361,E-mail: chongs-wang@163.com

Similar to CEA, GCC and CD44v6 may be used as indicators for peritoneal micrometastasis of colorectal cancer. The combined application of these 3 molecular markers will improve the positive detection rate of peritoneal micrometastasis. The b-DNA signal amplification technique-based mRNA detection is more sensitive and specific than that of cytologic examination, and is an effective way to predict peritoneal micrometastasis.

[Key words] colorectal cancer; tumor micrometastasis; peritoneal lavages; carcinoembryonic antigen; guanylyl cyclase C; CD44v6; b-DNA; QuantiGene 2.0 reagent system

Supported by the Application Basic Research Program of Science and Technology of Department of Sichuan Province(04JY029-015-3). Corresponding author: Zhang Caiquan, Tel: 86-23-6811360, E-mail: zhangyu0323@21cn.com; Wang Chongshu, Tel: 86-817-2262361, E-mail: chongs-wang@163.com

大肠癌(colorectal carcinoma)包括结肠癌和直肠癌,是消化系统常见的恶性肿瘤,随着人们生活水平的提高和膳食结构的改变,其发生率逐年上升,并有年轻化的趋势。目前仍以手术治疗为主要措施,但约有50%的患者在根治术后出现肿瘤复发和转移,其中腹腔内种植占20%[1]。研究证实腹腔内的微量脱落癌细胞或微小癌灶(又称腹腔微转移)是导致大肠癌术后腹膜播散、复发和转移的重要原因,严重影响了预后[2]。因此,早期检测出大肠癌患者腹腔内的微量癌细胞或微小癌灶对于诊断和预测腹膜转移、复发及改善患者预后具有十分重要的意义。本研究采用基于Branched-chain DNA(b-DNA)信号放大的基因表达定量检测技术联合检测了60例大肠肿瘤患者腹腔冲洗液中的癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、鸟甘酸环化酶-C(guanylyl cyclase C, GCC)和转移相关基因CD44v6的表达,并与常规腹腔冲洗液细胞学(peritoneal lavage cytology, PLC)检查结果进行比较,探讨3种肿瘤相关基因的阳性表达与大肠癌病理分期及预后临床相关指标的关系及临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 采集川北医学院附属医院2008年12月至2009年4月住院的48例大肠癌手术患者(病灶均位于腹膜返折以上)的腹水或腹腔冲洗液,均经病理学证实,男性30例,女性18例;年龄32~78岁,平均55岁;其中根治性手术43例,姑息性手术5例;升结肠癌4例,结肠肝曲6例,横结肠癌2例,结肠脾曲4例,降结肠癌1例,乙状结肠癌6例,直肠癌25例;管状腺癌36例,乳头状腺癌2例,印戒细胞癌2例,粘液腺癌8例;管状腺癌癌细胞分化程度:高分化20例,中分化10例,低分化6例;Dukes分期:A期7例,B期14例,C期20例,D期7例;有淋巴转移27例;有远处转移7例。同时采用同期12例经手术治疗的大肠良性肿瘤患者作为阴性对照,以人大肠癌细胞株SW480(引自美国,由重庆医科大学病理学教研室常规培养)作为阳性对照,以GAPDH mRNA作为内参对照。

1.1.2 主要仪器和试剂 高速冷冻离心机Heraeus BIOFUGE(德国Heraeus公司)、恒温箱(重庆永恒实验仪器厂)、WH-861涡旋混合器(麒麟医仪)、Flx800™荧光发光酶标仪(美国Bio-Tek公司)、温度调适器(美国Panomics公司)、QuantiGene 2.0试剂盒(美国Panomics公司),CEA、GCC、CD44v6和GAPDH mRNA的探针(由美国Panomics公司设计并合成)。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集与处理 手术均用电刀开腹,剖腹后注意保护皮肤(用腹壁切口保护器,以防止皮肤切口的上皮细胞及渗血进入腹腔),进腹后用大块纱布遮盖小肠,有腹水者即从盆腔抽取腹水,若无腹水,即向腹腔内注入温生理盐水(0.9%的氯化钠溶液)200 ml冲洗肿瘤所在局部腹腔,轻微搅动,2~4 min后抽出、离心、PBS液洗涤。将离心标本分为2份:1份做细胞涂片,HE染色后行细胞学检查;1份加入RNase-free Buffer,-80 ℃存放,待作b-DNA基因定量检测。一般收集细胞数量为10^5~10^6/ml。

1.2.2 细胞涂片及HE染色 将送检的冲洗液进行离心,4 000 r/min,离心5 min后取离心沉淀涂片,HE染色,干后镜检,经两位经验丰富的病理学专家阅片,发现癌细胞为阳性。

1.2.3 基于b-DNA信号放大的基因表达定量检测 使用QuantiGene 2.0样本处理试剂盒(美国Panomics公司)的裂解液将收集的细胞裂解,使总RNA释放出来。然后将总RNA分别加入96孔板的每个孔中,每孔加10 μl,之前捕获板的每个孔中已加入50 μl稀释的探针试剂,然后将96孔板放入恒温箱中使RNA和探针进行过夜杂交(16~20 h)从而捕获mRNA,温度须控制在(55±1)℃。所用的3个肿瘤相关基因和GAPDH的探针均由美国Panomics公司设计并合成。捕获的mRNA接着与b-DNA进行杂交可使信号放大400倍,然后加入底物最后在多功能酶标仪下检测发光信号。

1.2.4 基因表达结果的判定 按照QuantiGene 2.0试剂盒的说明,信号检出值若高于最低检出量(LOD)则为阳性结果,若低于LOD则为阴性结果。LOD=底物控制孔检出的相对光单位的平均值+3×底物控制孔检出信号值的标准差(LOD=AVG RLU background+3×SD background)。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,组间比较采用χ^2检验和Fisher精确概率法。

2 结果

2.1 细胞学检测结果

48例大肠癌患者腹水或腹腔冲洗液中均能找到形态各异的血细胞、间皮细胞和巨噬细胞,其中1例腹水离心涂片检查见印戒细胞(癌细胞)(图1,细胞里充满黏液空泡把细胞核挤向一边),1例查见腺癌细胞(图2),阳性率为4.2%(2/48)。

表1 48例大肠癌患者腹腔冲洗液中CEA、GCC和CD44v6的表达与临床病理因素的关系

临床病理因素	例数	CEA		P值	GCC		P值	CD44v6		P值	CGC		P值
		阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
性别				0.765			1.000			1.000			0.513
男	30	14	16		18	12		9	21		23	7	
女	18	7	11		11	7		6	12		12	6	
年龄(岁)				0.585			0.597			0.613			0.616
≥60	25	10	15		16	9		7	18		19	6	
<60	23	11	12		13	10		8	15		16	7	
肿瘤大小(cm)				0.302			0.583			0.875			0.784
≤5	20	7	13		13	7		6	14		15	5	
>5	28	14	14		16	12		9	19		20	8	
管状腺癌分化程度				0.103			0.000			0.149			0.000
高分化	20	2	18		3	17		1	19		6	14	
中低分化	16	6	10		14	2		4	12		15	1	
浆膜侵犯				0.044			0.049			0.037			0.005
有	34	18	16		24	10		14	20		29	5	
无	14	3	11		5	9		1	13		6	8	
淋巴结转移				0.014			0.028			0.004			0.030
有	27	16	11		20	7		13	14		23	4	
无	21	5	16		9	12		2	19		12	9	
Dukes分期				0.014			0.001			0.004			0.030
A+B期	21	5	16		7	14		2	19		12	9	
C+D期	27	16	11		22	5		13	14		23	4	

CGC表示CEA+GCC+CD44v6联合检测

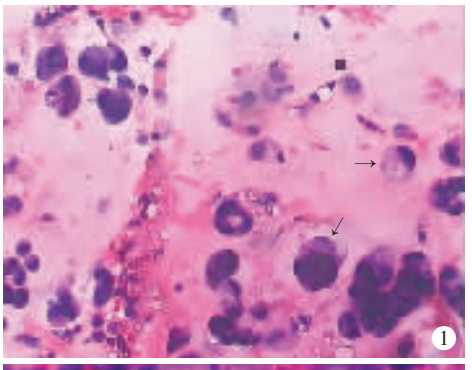


图1 结肠癌患者腹水中的印戒细胞病理观察 (箭头示,HE ×400)

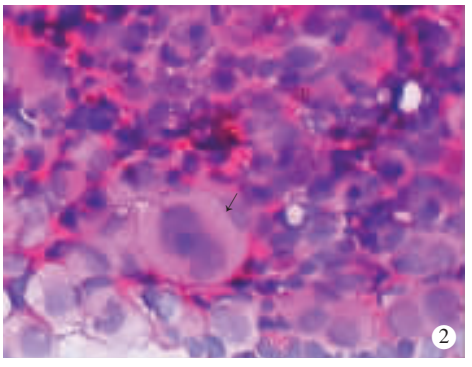


图2 结肠癌患者腹水中的腺癌细胞病理观察 (箭头示,HE ×400)

2.2 标本的检测结果

采用QuantiGene 2.0检测48例大肠癌患者腹水或腹腔冲洗液中CEA、GCC、CD44v6 mRNA的阳性率分别为43.8%(21/48)、60.4%(29/48)和31.2%(15/48),总阳性率为72.9%(35/48),明显高于PLC方法的4.2%(2/48)($P<0.01$)。12例大肠良性肿瘤患者的腹腔冲洗液中有1例CEA mRNA表达阳性,其余均为阴性;3个指标在人大肠癌细胞株SW480中的表达均为阳性。

2.3 各指标检测结果与临床病理因素的关系

经统计学分析,不同肿瘤分化程度、浆膜侵犯程度、Dukes分期、是否淋巴结转移对CEA、GCC、CD44v6 mRNA以及联合三指标CGC(CEA mRNA+GCC mRNA+CD44v6 mRNA)的表达差异均有统计学意义($P<0.05$),不同肿瘤大小、患者性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.4 CEA、GCC和CD44v6联合检出率与单一CEA检出率的比较

经统计学分析,不仅在总检出率上,联合CEA、GCC和CD44v6较单一CEA检测有显著性提高($P<0.01$),而且在检测浆膜受侵标本和中分化腺癌标本都有显著性提高($P<0.01$)。见表2。

表2 CEA、GCC和CD44v6联合检出率与单一CEA的检出率比较

临床病理因素		例数	CEA(+)[n(%)]	CGC(+)[n(%)]	P值
浆膜受侵	有	34	18(52.9)	29(85.3)	0.004
	无	14	3(21.4)	6(42.9)	0.420
淋巴结转移	有	27	16(59.3)	23(85.2)	0.033
	无	21	5(23.4)	12(57.1)	0.028
管状腺癌分化程度	高	20	2(10.0)	6(30.0)	0.114
	中	10	2(20.0)	9(90.0)	0.005
	低	6	4(66.7)	6(100)	0.455
Dukes分期	A	7	1(14.3)	2(28.6)	0.500
	B	14	4(28.6)	10(71.4)	0.028
	C	20	11(55.0)	16(80.0)	0.091
	D	7	5(71.4)	7(100.0)	0.231
总计		48	21(43.8)	35(73.0)	0.004

CGC表示CEA+GCC+CD44v6联合检测

3 讨论

近年来,虽然大肠癌的外科手术治疗有了长足的进步,但在我国大肠癌患者以中晚期多见,其经根治性手术后仍有半数在5年内出现复发和(或)远处转移,其主要原因是中晚期大肠癌容易侵犯浆膜,使癌细胞脱落到腹腔,或手术中癌肿被挤压进入腹腔,被切口处腹腔表面纤维蛋白所捕获,导致术后复发。因此早期检出并清除脱落于腹腔内的微量癌细胞对于防止复发和转移、改善预后、提高生存率可能具有十分重要的意义。

3.1 QuantiGene 2.0 检测腹腔脱落癌细胞的意义

目前国内外均有报道采用细胞学、免疫组化、RT-PCR及real-time PCR(q-PCR)等方法检测腹腔内的脱落癌细胞,但由于检出率低、敏感性差和步骤繁琐、易受干扰等因素影响了检测结果的准确性。本实验采用的QuantiGene 2.0是一种基于Branched DNA(b-DNA)技术,完成核酸水平的精确定量检测的试剂盒。它无需抽提纯化RNA、反转录、PCR扩增,对样本量下限无要求,灵敏度高(每孔有50个拷贝数即可得到阳性结果,并且可以检测目的基因20%的变化量),样本裂解后经探针杂交和信号放大(可放大400倍)即可迅速得到比real-time PCR更加精确的定量结果[3,4]。本研究应用QuantiGene 2.0所检测到的腹腔冲洗液中的CEA、GCC、CD44v6 mRNA的阳性率分别为43.8%、60.4%、31.2%,联合3个指标的总阳性率为71.9%,均显著高于采用PLC方法的4.2%($P<0.01$)。由于腹腔内存在大量RNA酶,大肠癌细胞溶解破坏所释放的CEA、GCC、CD44v6 mRNA会立即被降解,本研究应用QuantiGene 2.0所检测到的腹腔冲洗液中的CEA、GCC和CD44v6 mRNA,可视为来自于腹腔内播散的存活癌细胞,这些存活癌细胞具备种植转移的能力。而细胞学仅能反映细胞的形态,无法反映癌细胞的存活状态。因此,我们认为基于b-DNA信号放大的基因表达定量检测技术可有效地检测出腹腔内的微量脱落癌细胞,可作为另一种预测肿瘤患者腹腔微转移的检测手段。

3.2 检测指标的选择

目前用于检测肿瘤腹腔微转移的标志物有很多,但我们认为用于研究腹腔微转移的标志物除了需具备肿瘤特异性、组织特异性及转移相关特性外,还需注意尽量排除其在腹腔内存在的大量炎性细胞、间皮细胞及成纤维细胞上表达的干扰。因此,鉴于以上几点我们选择了以下3种肿瘤标志物。

癌胚抗原(CEA)是一种检测消化道肿瘤特异性较高的肿瘤相关抗原,临床上已将其作为大肠癌的诊断、治疗和预后判断的监测指标。CEA mRNA几乎只存在于某些肿瘤细胞内,细胞外不存在游离CEA mRNA,因此,如果在腹水或腹腔冲洗液中检测到CEA mRNA,则提示发生了相关肿瘤细胞的转移[5]。之前,国内外均有学者通过检测CEA mRNA的表达来判断胃肠道肿瘤的腹腔微转移并取得明确结果[6-10]。在本实验中,有1例阴性对照组中的病例CEA mRNA出现阳性表达,我们分析这可能是由于CEA mRNA在腹腔内炎性细胞中表达的结果。骆成玉等[11]也认为CEA在正常白细胞中有非特异性表达,再加之其在结直肠癌组织中的表达率仅为65%,因此,我们不建议单独使用CEA检测大肠癌腹腔微转移。

鸟苷酸环化酶C(GCC)是受体鸟苷酸环化酶家族成员之一,仅存在于肠黏膜细胞,不在肠外组织中表达,在细胞发生化生、恶变、肿瘤转移等改变时持续表达[12],因此GCC具有肠上皮和大肠癌特异性,且不在间皮细胞和炎性细胞中表达。Frick等[13]认为GCC是检测肠外大肠癌细胞高度敏感和特异的生物学指标,有助于大肠癌手术分期和术后随访。国内外均有报道,GCC mRNA已成功应用于大肠癌外周血、淋巴结和骨髓微转移的检测[2,14,15-17]。但关于GCC在大肠癌患者腹腔中的微转移检测,目前尚少见相关报道。本实验结果证实了该基因具有相对较高的肿瘤和组织特异性,可作为研究大肠癌腹腔微转移的良好标志物。

细胞表面粘附分子(CD44v6)是一种肿瘤转移相关基因,主要出现在病理过程中,有助于肿瘤细胞获得转移潜能,在肿瘤组织中呈高表达,而在肿瘤发生器官正常组织中呈低表达或不表达,其在大肠癌细胞中呈无序的过度表达,且与大肠癌的转移和复发密切相关[18]。Wong等[19]认为CD44v6可以作为一种肿瘤标志物来检查组织或体液(如血液、尿液、腹腔渗液)中的肿瘤细胞。有文献报道,CD44v6可作为检测大肠癌外周血、淋巴结微转移的指标[19,20]。但将其用于大肠癌腹腔、骨髓微转移研究的报道仍较少。本实验结果显示:随着Dukes分期的进展,其表达量较CEA mRNA和GCC mRNA高,这表明该基因在反映大肠癌腹腔微转移的潜能价值上相对较好。

综上所述,可看出GCC、CD44v6 mRNA与CEA mRNA一样,可作为大肠癌患者腹腔微转移的指标,且三者联合应用可提高大肠癌腹腔微转移的检出率,联合使用3个指标的检出率高于使用单一指标($P<$

0.01)。在研究中还发现,31.2%(15/48)的大肠癌患者CEA、GCC mRNA和CD44v6 mRNA同时出现阳性表达,这表明恶性肿瘤的发生和转移是多基因协调作用的,其协调机制有待于进一步研究证明。

3.3 腹腔内脱落癌细胞的检出率与病理因素的关系

本研究显示通过QuantiGene 2.0所检测到的大肠癌患者腹腔冲洗液中CEA、GCC、CD44v6 mRNA的阳性表达率随着肿瘤Dukes分期的进展而增加($P<0.05$),这可能是由于随着肿瘤浸润程度的增加,肿瘤细胞突破浆膜、进入腹腔的机会增加。但在我们的研究中,除3例浆膜未受侵的标本CEA mRNA呈阳性表达外尚有1例没有CEA mRNA表达却同时检出GCC mRNA和CD44v6 mRNA,这说明在排除腹腔内白细胞非特异性表达CEA mRNA的影响后,癌细胞很可能经浆膜层以外的其他途径进入腹腔。Nakanishi等[21]则认为癌细胞很可能经淋巴结或微细淋巴管开口进入腹腔。这值得我们进一步研究。

本研究还说明3项指标的阳性检出率随着肿瘤分化程度的降低而升高($P<0.05$)。这可能是由于分化程度越低,肿瘤侵袭性越强,肿瘤细胞进入腹腔的机会就越高。

术中检测腹腔中的脱落癌细胞对于大肠癌患者的重新分期、术后的辅助治疗及预后具有重要意义。常规PLC检出率低,尤其是无腹水或腹腔脱落癌细胞较少的病例常会漏诊,这也是部分患者细胞学阴性而术后仍有复发转移的主要原因。本实验结果提示,采用基于b-DNA信号放大的基因表达定量检测技术检测大肠癌患者腹水或腹腔冲洗液中CEA、GCC和CD44v6 mRNA的表达,有望成为辅助诊断预测大肠癌腹腔微转移的手段。

参考文献:

[1] Akasu T, Sugihara K. Solitary peritoneal metastasis from colon carcinoma[J]. Surgery, 1998, 124(5): 938-940.

[2] Schott A, Vogel I, Krueger U, *et al*. Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker[J]. Ann Surg, 1998, 227(3): 372-379.

[3] Canales R D, Luo Y, Willey J C, *et al*. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms[J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(9): 1115-1122.

[4] Knudsen B S, Allen A N, McLerran D F, *et al*. Evaluation of branched-chain DNA assay for measurement of RNA in formalin-fixed tissues[J]. J Mol Diaqn, 2008, 10(2): 169-176.

[5] Nishida S, Kitamura K, Ichikawa D, *et al*. Molecular detection of disseminated cancer cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2000, 20(3B): 2155-2159.

[6] Kodera Y, Nakanishi H, Yamanura Y, *et al*. Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase- polymerase chain reaction and cytology[J]. Int J Cancer, 1998, 79: 429-433.

[7] 李良辉, 池畔, 陈大良. 结直肠癌腹腔微转移的检测[J]. 中华胃肠外科杂志, 2004, 7(2): 151.

[8] 钱俊, 郑树, 中西速夫, 等. 实时荧光定量PCR检测大肠癌腹腔微转移及其临床意义[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(5): 351-355.

[9] 于洪亮, 杨茂鹏, 王夫景, 等. 大肠癌腹腔灌洗液CK20及CEA mRNA的表达及意义[J]. 中国医师进修杂志, 2007, 30(6C): 21-23, 26.

[10] 刘伟,余佩武,安杰,等.腹腔冲洗液沉淀STAT3和CEA检测与胃癌腹膜微转移的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 736-739.

[11] 骆成玉, 赵丹宁, 李世拥, 等. 大肠癌患者腹腔微量游离癌细胞的研究[J]. 中华外科杂志, 2001, 39(6): 433-435.

[12] Fava T A, Desnoyers R, Schulz S, *et al*. Ectopic expression of guanylyl cyclase C in $CD34^+$ progenitor cells in peripheral blood[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(19): 3951-3959.

[13] Frick G S, Pitari G M, Weinberg D S, *et al*. Guanylyl cyclase C: a molecular marker for staging and postoperative surveillance of patients with colorectal cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(5): 701-713.

[14] 宗祥云, 师英强, 孙孟红, 等. 大肠癌患者外周血中鸟苷酸环化酶C的表达及其意义[J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(4): 339-342.

[15] Conzelmann M, Dieterle C P, Linnemann U, *et al*. Cytokeratin 20 and guanylyl cyclase C mRNA is largely present in lymph node and liver specimens of colorectal cancer patients[J]. Int J Cancer, 2003, 107(4): 617-628.

[16] 黄东航, 李乐, 郑长森, 等. 大肠癌患者血清CD26水平的变化及其意义[J]. 中华消化外科杂志, 2008, 7(2): 150.

[17] 刘彬, 程勇, 李役. Notch1与Smad4在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(3): 300-303.

[18] Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, *et al*. CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Oncol Rep, 2003, 10(6): 1919-1924.

[19] Wong L S, Cantrill J E, Odogwu S, *et al*. Detection of circulating tumour cells and nodal metastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique[J]. Br J Surg, 1997, 84(6): 834-839.

[20] Chun S Y, Bae O S, Kim J B. The significance of CD44 variants expression in colorectal cancer and its regional lymph nodes[J]. J Korean Med Sci, 2000, 15(6): 696-700.

[21] Nakanishi H, Kodera Y, Torii A, *et al*. Detection of carcinoembryonic antigen-expressing free tumor cells in peritoneal washes from patients with gastric carcinoma by polymerase chain reaction[J]. Jpn J cancer Res, 1997, 88(7): 687-692.

(**收稿**:2009-07-06;**修回**:2009-09-07)

(编辑 王小寒)