DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.039
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1333-02

论著

结直肠癌血液 CK20 mRNA 检测对血液微转移诊断的意义

孙念绪,王德虎,唐 波 (第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 研究结直肠癌患者血液中 CK20 mRNA 对血液微转移的价值。方法 采用 RT-PCR 技术对 50 例结直肠癌患者的血液进行检测。结果 CK20 mRNA 阳性率 68%(34/50),阳性率与肿瘤 Ducks 分期之间相差显著,而与肿瘤病理类型相差不显著。10 例结直肠良性病变均为阴性。结论 结直肠癌患者手术前、后检测血液中的 CK20 mRNA 对于预测预后和指导治疗有重要的参考价值。

关键词:结直肠癌;CK20 mRNA;微转移
中图法分类号:R446.1;R73-37;R735.3 文献标识码:A

Value of CK20 mRNA in the diagnosis of micro-metastasis to blood in patients with coloretal carcinoma

SUN Nian-xu, WANG De-hu, TANG Bo (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstracts: Objective To study the value of CK20 mRNA detection in the diagnosis of micro-metastasis to the blood in the patients of coloretal carcinoma. Methods CK20 mRNA was detected in the blood samples from 50 patients with coloretal carcinoma with RT-PCR. Results Positive rate of CK20 mRNA was 68%(34/50) and the difference of it with the Ducks stage was significant, but no difference was found with the pathological types. In 10 cases of benign lesion the CK20 mRNA was negative. Conclusion Detection of CK20 mRNA before and after operation is valuable in guiding the treatment and prognosis in colorectal carcinoma.

Key words: coloretal carcinoma; CK20 mRNA; micro-metastasis

转移和侵袭是恶性肿瘤的重要特征,也是肿瘤患者死亡的重要原因,临床上80%以上的病人死于晚期侵袭和转移。因此,早期预测结直肠癌病人的复发和转移,具有重要的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 实验标本

采集西南医院1998年9月至1999年10月住院结直肠癌手术患者50例,其中男性28例,女性22例,年龄20~77岁,平均54.0岁。其中高分化腺癌13例,中分化腺癌24例,低分化和粘液腺癌13例。按Ducks分期法分为:Ducks A期9例,B期19例,C期14例,D期8例。所有病人术前30 min抽取5 ml外周血并以肝素抗凝。所用注射器及玻管均以DEPC水处理,标本采集后立即存于-70 ℃低温冰箱中保存。对照组10例,皆为同期住院患者,其中溃疡性结肠炎4例,结肠息肉6例,男性3例,女性7例,年龄24~65岁,平均年龄30.2岁。

1.2 试剂

RT-PCR试剂盒购自美国 Promega Corp, RNA 提取试剂购自德国宝灵曼公司。

1.3 引物

CK20 mRNA 上游引物的碱基序列为:5′CAG GCA CAC GGT GAA CTA TGG 3′

CK20 mRNA 下游引物的碱基序列为:5′GAT CAG CTT CCA CTG TTA GAC G 3′

1.4 血液 CK20 mRNA 的检测

于淋巴细胞分离液中经 Ficoll 梯度离心(2 000 r/min)20 min,吸取淋巴细胞分离液表面的白膜层,用 PBS 液进行反复冲洗3遍并再次离心,沉淀细胞提取总 mRNA,RT-PCR 一步法扩增,去核酸水代谢 CK20 mRNA 上下游引物作为阴性对照,PCR 循环参数 94 ℃ 30 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,共35个周期。扩增产物同 marker 行2%琼脂糖凝胶电泳,溴乙啶染色。紫外光下照相记录。

1.5 结果判断

RT-PCR 部分电泳条带位于370碱基处有清晰、明亮条带为阳性,无此条带者为阴性。

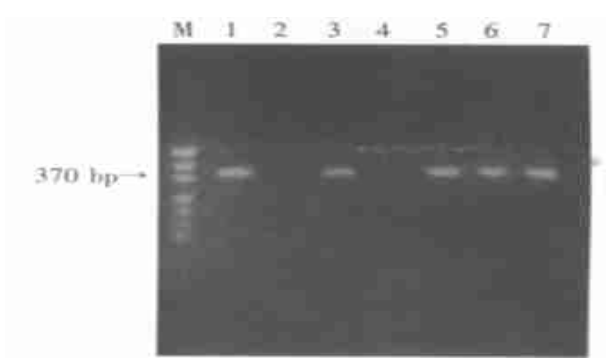


图1 结直肠病患者外周血 CD20 mRNA 的表达

Fig 1 Expression of CK20 mRNA in the blood of colorectal cancer patients

M: Marker; 1~7: CK20 mRNA expressions of 7 different patients. Among them, 2, 4 are negative and others are positive

1.6 统计学处理

采用 Excel 软件,率的比较采用 χ^2 检验。$P>0.05$ 差异不

作者简介:孙念绪(1954-),男,河北省肃宁县人,副主任医师,副教授,主要从事胃肠道肿瘤的研究,发表论文30余篇。电话:(023)65387301

收稿日期:2000-12-30;修回日期:2001-09-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

显著，$P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异非常显著。

2 结果

50 例结直肠癌患者，外周血检出 CK20 mRNA 阳性表达 34 例，阳性率 68%，良性病变组 10 例，均为阴性。其中 Ducks A、B、C 和 D 期的阳性表达率分别为 33.3%(3/9)、62.50%(15/24)、92.31%(12/13)，各病理类型组间比差异显著($P<0.05$)，见表 1。

表 1 结直肠癌血液 CK20 mRNA 检测结果

Tab 1 CK20 mRNA detection in the blood of colorectal cancer patients

Group	n	Male rate in the blood(%)
Dukes stage		
A	9	3(33.33) **##
B	19	10(52.63) **##
C	14	13(92.85)
D	8	8(100)
Tipe of cancer		
High differentiation adenocarcinoma	13	7(53.85)
Mid- differentiation adenocarcinoma	24	15(62.50)
Low differentiation and mucinous adenocarcinoma	13	12(92.31)
Benign lesion	10	0(0)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Ducks stage C; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* Ducks stage D; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* low differentiation and mucinous adenocarcinoma

3 讨论

血液微转移定义是在血液中常规方法不能检测出瘤细胞，故任何能检出血循环中的瘤细胞均有微转移存在。微转移概念的提出，是对目前临床分期的极大冲击。研究表明，即使目前临床所谓的“肿瘤早期”其骨髓、血液、淋巴结、体液已经有肿瘤细胞的存在。Soeth 等[1]采用 RT-PCR 技术检测骨髓和外周血中的癌细胞，结果 31%结直肠癌患者骨髓阳性，采用 UICC 分期，其中Ⅰ期 12.5%(1/8)；Ⅱ期 13.6%(2/32)；Ⅲ期 33.3%(4/12)；Ⅳ期 92.3%(12/13)。静脉血阳性率 17%，其中Ⅰ期 0(0/8)；Ⅱ期 6%(1/17)；Ⅲ期 11%(1/9)；Ⅳ期 39%(7/18)，且骨髓、静脉血癌细胞阳性率同临床分期、生存率及肝转移呈正相关，同样的研究亦见于 Weitz 等[2,3]，因此目前临床上用于指导病人术后辅助治疗的病理分类及临床分期不可靠，即遗漏了确需做辅助治疗的病人，又给那些不需要做辅助治疗的病人而进行了化疗、放疗，带来了不必要的痛苦。许多研究表明，结直肠癌的微转移与患者术后复发和预后密切相关。骆成玉等[4]通过对 54 例大肠癌患者的研究发现，术中门静脉的微转移率高达 75.9%，术后 1 年半随访观察，术时肝转移阴性而门静脉血阳性的 31 例中有 9 例出现肝转移，而术时肝转移和门静脉血均阴性的 12 例中仅 1 例发生肝转移。前者显著高于后者($P<0.05$)。Hillaire 等[5]对 21 例肝癌患者研究发现，术前外周血 9 例有微转移的患者术后有 4 例发现有远处转移，而术前外周血 12 例无微转移的患者术后有 4 例发现有远处转移，且两者有统计学意义($P<0.05$)。这就提醒我们，凡恶性肿瘤的病人，术前均应检查外周血，据此采取必要的辅助治疗。微转移是转移灶的萌芽阶段，患者此时癌细胞随血行定植某一组织器官，但由于机体自身的防御性屏障性作用，癌细胞处于休眠状态，随着病情的发展，当癌细胞冲破机体自身防御屏障时开始生长。由于初始转移灶的体积小，生长部分的癌细胞所占比例就大，对抗癌药物的敏感性则高，此时辅以辅助治疗，可以将微转移扼杀在摇蓝中，这对减少术后复发、转移，争取良好的预后有重要作用。我们所用的肿瘤标志物 CK20 具有严格的上皮特异性分布，正常血液不表达 CK20[6]。Burchill 等[7] CK8、19、20 系列 mRNA 作为靶 RNA，采集核素 RT-PCR 方法，对包括结肠在内的一组培养细胞株及正常志愿者的外周血和骨髓标本进行了检测，发现 CK8、CK19 在正常人外周血中均有较高的阳性率，分别为 88%(8/9)和 40%(6/15)；CK20 在正常外周血和骨髓中却均为阴性(6/6)，而 CK20 在结肠癌细胞株中均阳性表达。RT-PCR方法具有较高的敏感性，可检测出浓度为 $10^6\sim10^7$的肿瘤细胞[8]，尤其适用于微量肿瘤细胞的检测。本研究检测了 50 例结直肠癌患者的外周血，阳性率为 68%(34/50)，DukesA、B、C 及 D 的阳性率分别为 33.3%(3/9)、52.63%(10/19)、92.86%(13/14)和 100%(8/8)，这表明，随着肿瘤的发展，外周血微转移明显增加，统计学处理发现 C 和 D 期患者显著高于 A 和 B 期的患者($P<0.01$)，但血行转移同病理类型之间无明显关系($P>0.05$)，本研究还证实，即使是 DukesA 期病人，外周血微转移率已高达 33.3%(3/9)，说明大肠癌的早期就已可能累及全身，并不是 A 期所有病人都不需化疗，部分病人确需化疗。结直肠癌病人术时和定期复查血液，能检测病情，评估病人预后，为进一步辅助治疗提供依据，是一种简便易行的有临床应用价值的检测方法。

参考文献：

[1] Soeth E, Vogel I, Roder C, *et al*. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gestrointestinal cancer patients for the detection of disseminatel tumor cells using reverse transcription PCR Cancer Res, 1997, 57(15): 3 106—3110.

[2] Salsbury A T, The significance of the circulation cell[J]. Cancer Treat Rev, 1975, 2(1): 55—72.

[3] Weitz J, Kienle P, Lacroix J, *et al*. Detection of hematogenous tumor cell dissemination of colorectal carcinomas Langenbecks Arch Chir Surg Suppl Kongressbd, 1997, 114(2): 733—736.

[4] 骆成玉、李世拥，大肠癌患者门静脉血癌细胞的检测及临床意义[J]. 中华外科杂志，1999, 37(4): 214—215.

[5] Hillaire S, Barbu V, Boucher E, *et al*. Albumin messenger RNA as a marker of circulating hepatocytes in hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology 1994, 106(1): 239—242.

[6] Moll R, Lowe A, Laufer J, *et al*. Cytokeratin 20 in human carcinomas Am J Pathol, 1992, 140(1): 427—447.

[7] Burchill S A, Bradbury M F, Pittman K, *et al*.. Detection of epithelial cancer cell in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Br J Cancer, 1995, 7(2): 278—281.

[8] Datta Y H, Adams P T, Drobyki W R, *et al*. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. J Clin Oncol, 1994, 12(4): 475—483.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net