

荧光定量 PCR 对 N0 期结直肠癌淋巴结微转移的检测及其临床意义

陈维香¹, 费绍华¹, 祝 蕾², 伍 建¹, 丁 君¹, 陶 祥¹

Detection of Micrometastasis and Its Clinical Significance in Lymph Nodes from N0 Colorectal Cancers by FQ-PCR

CHEN Wei-xiang¹, FEI Shao-hua¹, ZHU Lei², WU Jian¹, DING Jun¹, TAO Xiang¹

1. Department of Pathology, Gongli Hospital, Shanghai 200135, China; 2. Department of Molecular Pathology, Cancer Hospital, Fudan University

Abstract: **Objective** To study the detection of lymph node micrometastasis in N0 colorectal cancer patients and its clinical significance in these patients. **Methods** In the study, 453 lymph nodes obtained from 45 cases of N0 colorectal cancer going curative operation were examined, using fluorescent quantity polymerase chain reaction (FQ-PCR) assay to detect cytokeratin 20 (CK20) mRNA expression for identifying micrometastasis. **Results** Micrometastasis was detected in 46 lymph nodes (10.2%, 46/453) of 20 cases (44.4%, 20/45). The presence of micrometastasis was correlated with invasion depth of primary tumor, but was not related to sex, age, size and differentiation of primary tumor. The mean follow-up time in the positive groups (20 cases) with micrometastasis and the negative groups (25 cases) without micrometastasis were 19.6 and 22.4 months respectively, but there were 7 cases post-operative recurrence, metastases and 5 cases died in positive groups (20 cases) with micrometastasis, only 1 case died because of recurrence or metastases in negative groups (25 cases) without micrometastasis ($\chi^2 = 7.305$, $P < 0.05$). The disease-free survival of positive and negative groups was 75.0% (15/20) and 96.0% (24/25), respectively. The two groups have significant difference ($\chi^2 = 4.240$, $P < 0.05$). **Conclusion** CK20 FQ-PCR assay is a sensitive and specific method to detect lymph node micrometastasis in the patients with N0 colorectal cancer. The detection of CK20 mRNA in lymph nodes may contribute to improve the accuracy of clinical staging, determine patients' prognosis and provide information for rational adjuvant therapy.

Key words: Colorectal neoplasms; Lymphatic metastases; Micrometastasis; Cytokeratin; Fluorescent quantity Polymerase Chain Reaction (FQ-PCR)

摘要: **目的** 探讨 N0 期大肠癌淋巴结微转移的检测及其临床意义。 **方法** 采用荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR) 检测 45 例行根治术的 N0 期大肠癌患者的 453 枚淋巴结中细胞角蛋白 20 (cytokeratin, CK20) mRNA 的表达以检出微转移。 **结果** 45 例 N0 期大肠癌病人的 453 枚淋巴结中, 有 20 例 (44.4%) 共 46 枚 (10.2%) 淋巴结检出微转移。微转移与患者年龄、性别、肿瘤大小、分化程度等无关, 但与肿瘤浸润深度相关 ($\chi^2 = 5.445$, $P < 0.05$)。20 例微转移患者与 25 例无微转移患者平均随访时间分别为 19.6 和 22.4 月。20 例微转移患者中 7 例发生复发转移, 5 例死亡; 而无微转移 25 例中仅 1 例因复发转移而死亡 ($\chi^2 = 7.305$, $P < 0.05$)。有微转移组和无微转移组的生存率分别是 75.0% (15/20) 和 96.0% (24/25), 两组患者之间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.240$, $P < 0.05$)。 **结论** CK20 mRNA 的 FQ-PCR 是检测 N0 期大肠癌淋巴结微转移灵敏而特异的方法, 可对精确临床分期、判断患者预后及制定合理的治疗方案提供一定的理论依据。

关键词: 结肠直肠癌; 淋巴结转移; 微转移; 角蛋白; 荧光定量聚合酶链反应

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2008) 08-0583-03

收稿日期: 2007-08-08; 修回日期: 2008-03-25

基金项目: 上海市浦东新区青年基金资助项目 (PW2005B-1)

作者单位: 1. 200135 上海市公利医院病理科; 2. 复旦大学附属肿瘤医院分子病理室

作者简介: 陈维香 (1975-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤的病理诊断

0 引言

结直肠癌是我国常见恶性肿瘤之一。淋巴结转移是结直肠癌转移的主要途径, 是决定结直肠癌患者预后的最重要指标之一。但是, 常规 HE 染色“无淋巴结转移”的 N0 期大肠癌患者中, 15.1% ~

46.1%在术后5年内死于局部复发或远处转移,提示淋巴系统或全身存在微转移^[1]。细胞角蛋白20(CK20)在所有淋巴细胞中没有表达^[2],常局限在胃肠上皮细胞,具有更为严格的上皮组织特异性^[2,3]。本研究利用CK20这一特性,采用荧光定量PCR(FQ-PCR)法检测45例N0期大肠癌患者淋巴结中CK20的表达,及时发现微转移,为临床医师判断大肠癌患者术后复发、转移、预后及围手术期的合理治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 病理资料和标本采集

1.1.1 实验组 收集上海市公利医院2004年6月~2007年3月收治的部分结直肠癌患者行肿瘤根治性切除术标本,所有入组标本均经术后常规病理组织学确诊为N0期。共收集标本45例,其中直肠癌17例,结肠癌28例;男性23例,女性22例;年龄26~76岁,中位年龄61岁。按照1997年国际抗癌联盟制定的TNM分期标准,其中I期15例(T1~2 N0 M0),II期30例(T3~4 N0 M0)。本组资料中肿瘤浸润深度按AJCC标准,结肠癌分为:T1~T4期,直肠癌分为:T1~T3期;组织学类型按WHO肿瘤组织学分类标准分类为腺癌、粘液腺癌、印戒细胞癌。其中腺癌根据有无黏液分为腺癌伴黏液分化和单纯腺癌两种。手术后立即收集切除肠段及系膜淋巴结453枚,平均每例10枚。每枚淋巴结一分为二,一半液氮速冻后置入-80℃冰箱冷冻备用;一半编号后10%甲醛固定,石蜡包埋,送病理检查。

1.1.2 阴性对照组 2例良性肠道疾病(结肠腺瘤1例,直肠息肉1例)14枚淋巴结,淋巴结也每枚一分为二,一半用于RNA的抽提,另一半编号后行病理检查。

1.1.3 阳性对照组 2例II期大肠癌病人的8枚HE染色阳性淋巴结作为阳性对照。

1.1.4 内参对照 以管家基因 β -actin作内参对照。

1.2 荧光定量PCR检测CK20 mRNA

1.2.1 试剂盒 引物CK20 mRNA 荧光定量PCR试剂盒(上海久盛医疗用品有限公司)

1.2.2 总RNA的提取采用Trizol抽提法。

1.2.3 FQ-PCR检测 将提取的RNA样本进行逆转录反应;制备阳性模板的标准梯度;样本总RNA作逆转录反应后,取5 μ l 逆转录产物作为模板,制备样品检测体系;将制备好的阳性标准品和检测样本同时上机,仪器为PE7700荧光仪,严格按照试剂盒说明操作,反应条件:94℃ 5 min, 然后94℃ 30 sec, 62℃ 30 sec, 72℃ 30 sec 共40个循环。反

应结束后,由计算机软件分析计算定量结果。定量的单位是基因拷贝数/ml。

1.2.4 结果判断 根据标准曲线得到各检测标本的浓度(基因拷贝数/ml)。以浓度 $>1 \times 10^3$ 拷贝数/ml为阳性结果;浓度 $<1 \times 10^3$ 拷贝数/ml为阴性。

1.3 统计学方法

所有数据用Epidata 3.02录入计算机,采用SPSS 11.5统计软件包对分类数据进行 χ^2 检验及Fisher精确概率法进行检验。

2 结果

2.1 大肠癌病人的淋巴结样本和对照组样本结果

45例N0期大肠癌病人的453枚淋巴结中,有20例(44.4%)共46枚(10.2%)淋巴结FQ-PCR结果为阳性,即存在微转移(LNMM),N0期升为N1期。阳性标本浓度为 $1.333 \times 10^3 \sim 2.188 \times 10^8$ 拷贝数/ml。2例良性胃肠道病变的14枚淋巴结FQ-PCR结果均为阴性;而2例II期病人的8枚HE染色阳性淋巴结FQ-PCR结果均为阳性。

2.2 结直肠癌患者淋巴结中CK20的表达率与各临床病理因素的关系

45例N0期大肠癌病人微转移的发生和病人的阳性率与患者的性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型、肿瘤分化程度及肿瘤侵犯肠管周径等无相关性,而与肿瘤浸润深度相关,见表1。

2.3 结肠癌患者与直肠癌患者淋巴结中CK20 mRNA的表达差异

28例N0期结肠癌病人共302枚淋巴结中有15例(53.57%)35枚(11.59%)淋巴结检测出微转移。17例N0期直肠癌病人的151枚淋巴结中有5例(29.41%)11枚(7.25%)淋巴结检测出微转移。结肠癌患者比直肠癌患者更容易发生淋巴结微转移,但FQ-PCR结果差异无统计学意义($\chi^2 = 2.501, P = 0.114$)。

2.4 随访资料

(1)与肿瘤复发转移的关系:所有患者均进行随访,随访时间最长为42月,最短为4月,平均为20.3月。20例微转移患者与25例无微转移患者平均随访时间分别为19.6和21.4月,但20例患者淋巴结CK20mRNA阳性表达中7例发生肿瘤复发或转移(术后8~26月),转移复发率达35%,呈阴性表达的25例中有1例发生转移,转移复发率仅4%,两者相比差异有统计学意义($\chi^2 = 7.305, P < 0.05$)。

(2)与患者生存期的关系:N0期有LNMM患者术后生存率75.0%(15/20)低于无LNMM者的96.0%(24/25),两组生存率差异有统计学意义($\chi^2 = 4.240, P < 0.05$)。

表 1 结直肠癌患者临床病理特征与淋巴结中 CK20 mRNA 表达之间的关系

Tab 1 Correlation of Clinicopathologic Features to Cytokeretin 20 mRNA Expression in Lymph Nodes of Patients with Colorectal Cancer

临床病理特征	例数	CK20 mRNA 阳性		²	P
		阳性数 (例)	阳性率 (%)		
性别					
男	23	10	43.48		
女	22	10	45.45	0.018	0.894
年龄					
60 岁	31	16	51.61		
< 60 岁	14	4	28.57	2.074	0.150
部位					
结肠	28	15	53.57		
直肠	17	5	29.41	2.501	0.114
大小					
5cm	27	13	48.15		
< 5cm	18	7	38.89	0.488	0.784
侵犯肠管周径					
> 1/2	38	19	50.00		
1/2	7	1	14.29	3.054	0.081
组织学类型					
腺癌	32	14	43.75		
腺癌伴黏液分化	8	4	50.00	0.146	0.929
黏液腺癌	5	2	40.00		
分化程度					
高分化	3	0	0		
中分化	31	15	48.39	2.600	0.273
低分化	11	5	45.45		
浸润深度					
T2	15	3	20.00		
T3	30	17	56.67	5.445	0.020

3 讨论

大肠癌是最常见的恶性肿瘤之一。近 20 年来,大肠癌根治术的方法不断进展,但是患者的预后并未明显改善。大约 50 % 的患者死于腹腔局部或区域的复发和转移。而癌细胞在腹腔内、淋巴结、骨髓及外周血中的微转移则是导致大肠癌术后复发转移的重要因素。目前国内学者大多用 RT-PCR 检测淋巴结微转移,尤其是前哨淋巴结的微转移^[4];也有作者用 FQ-PCR 检测上皮性恶性肿瘤患者外周血的肿瘤标记物检测微转移^[5]。我们用 FQ-PCR 对常规病理“无淋巴结转移”的大肠癌患者的淋巴结作微转移检测,应用 CK20 作为本次实验的淋巴结微转移的标记。实验结果显示 44.4 % (20/45) 患者,10.2 % (46/453) 淋巴结存在微转移,低于殷红专等^[6]用 FQ-PCR 检测发现 19/31 (61.29 %) 大肠癌患者术后外周血存在微转移。但本研究介于文献报道的用 RT-PCR 检

测发现 21 % ~ 100 % 的 N0 期大肠癌患者有淋巴结微转移^[7,8]之间。这表明 FQ-PCR 检测淋巴结微转移是比较可靠的诊断方法。也表明部分 N0 期结直肠癌患者淋巴结确有癌细胞,已具备了淋巴结转移的条件。应对淋巴结中存在 CK20 mRNA 阳性细胞的患者进行有针对性的及早治疗^[9]。

本研究结果显示,淋巴结微转移与患者的年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小及肿瘤组织学无关,而与肿瘤浸润深度密切相关,尤其是 p T3 患者,其淋巴结微转移率高达 56.7 % (17/30)。因此我们建议对 p T3 结直肠癌应行常规淋巴结微转移检测,以便早期发现微转移并及时给予合理的治疗。

目前,淋巴结微转移检测对预后的影响有不同的报道。本研究结果:淋巴结微转移组的生存期低于无微转移组,说明微转移与预后密切相关,无淋巴结转移的患者预后较好。但也不排除本研究结果与研究样本量小,随访时间短等原因有关。Greenson 等^[9]报道,经长期随访(6 月 ~ 10 年),微转移阳性患者复发率高、复发早、生存期短,微转移阴性患者的预后相对较好。故大肠癌微转移与预后的关系值得继续深入研究,我们研究的远期结果尚在追踪观察之中。

参考文献:

[1] 范跃祖,李新平,刘文方,等. 大肠癌患者淋巴结微转移与肿瘤复发转移和预后[J]. 中华普通外科杂志,2005,20(10):669-670.

[2] Burchill SA,Bradbury MF,Pittman K, et al. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Br J Cancer,1995,71:278-281.

[3] 张宴,何东华,何蕴绍. 荧光定量 RT-PCR 检测 AFP mRNA 基因表达方法的建立[J]. 现代诊断与治疗,2005,16(1):43-45.

[4] Masuda N,Tamaki Y,Sakita I, et al. Clinical significance of micrometastases in axillary lymph nodes assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction in breast cancer patients[J]. Clin Cancer Res,2000,6(11):4176-4185.

[5] 吕蕾,蔡菊芬,冯建国. 荧光定量 PCR 检测上皮性恶性肿瘤患者外周血 CK19,CK20 mRNA [J]. 中国肿瘤,2004,13(5):313-315.

[6] 殷红专,韩霞,苏琪,等. 荧光定量 PCR 检测 CK20 在直肠癌外周血中表达的意义[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(24):2892-2895.

[7] Futamura M,Takagi Y,Koumura H, et al. Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen and cytokeratin20[J]. J Surg Oncol,1998,68(1):34-40.

[8] Dorudi S,Kinrade E,Marshall NC, et al. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancer[J]. Br J Surg,1998,85(1):98-100.

[9] Greenson J K,Isenhardt CE,Rice R, et al. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival[J]. Cancer,1994,73(3):563-569.

[编辑:刘红武;校对:贺文]