

# 腹腔冲洗液和腹膜组织检测胃癌腹腔微转移的临床意义

王夫景, 高岩, 黄跃南, 佟佰峰, 张秀云, 杨维良

王夫景, 黄跃南, 佟佰峰, 杨维良, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

高岩, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
张秀云, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研中心 黑龙江省哈尔滨市 150086

黑龙江省十五科技攻关资金资助项目, No. GC02C140-02  
通讯作者: 高岩, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科.

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

## Clinical significance of free cancer cells in peritoneal washes and tissues of patients with gastric cancer

Fu-Jing Wang, Yan Gao, Yue-Nan Huang, Bai-Feng Tong, Xiu-Yun Zhang, Wei-Liang Yang

Fu-Jing Wang, Yue-Nan Huang, Bai-Feng Tong, Wei-Liang Yang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Yan Gao, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Xiu-Yun Zhang, Research Center of the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Tenth Five-Year Program of Science and Technology of Heilongjiang Province, No. GC02C140-02

Correspondence to: Yan Gao, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-08

## Abstract

**AIM:** To detect the free cancer cells in the peritoneal washes and tissues, and to explore their significances in the prediction of peritoneal metastasis of gastric cancer.

**METHODS:** The peritoneal washes and tissues were collected during laparotomy from 38 patients with gastric cancer and 5 with benign gastric disease. Peritoneal lavage cytology was performed for the washes, and the carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA of the free cancer cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** The CEA mRNA positive rates of the free cancer cells in the peritoneal washes and tissues were 36.8% (25/68) and 38.2% (26/68), respectively, which were both higher than that of cytological examination [25.0% (17/68)]. The TNM staging, depth of invasion,

lymph node metastasis, serosal involvement were correlated with the positive rate of CEA mRNA.

**CONCLUSION:** CEA mRNA is more sensitive and specific in the detection of peritoneal micrometastasis of gastric cancer.

**Key Words:** Reverse transcription polymerase chain reaction; Carcinoembryonic antigen; Gastric cancer; Peritoneal metastasis; Peritoneal wash; Peritoneal lavage cytology

Wang FJ, Gao Y, Huang YN, Tong BF, Zhang XY, Yang WL. Clinical significance of free cancer cells in peritoneal washes and tissues of patients with gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2148-2150

## 摘要

**目的:** 运用细胞学及RT-PCR方法对胃癌患者术中腹腔冲洗液、腹膜组织进行检测, 以探讨对预测胃癌腹腔微转移的意义。

**方法:** 胃癌68例和胃良性病变5例, 收集患者术中腹腔冲洗液, 并同时切除少量大网膜、腹膜作为对照。用RT-PCR方法测定冲洗液中游离细胞的CEAmRNA表达, 同时作冲洗液细胞学检查(PLC)。

**结果:** 腹腔冲洗液和腹膜组织中的CEAmRNA的阳性率分别为36.8%(25/68), 和38.2%(26/68), 皆高于腹腔冲洗液细胞学25.0%(17/68)。CEAmRNA的阳性率与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移、浆膜侵犯深度呈正相关。

**结论:** CEART-PCR方法对于检测腹腔微量游离癌细胞较PLC有更高的灵敏度和特异性, 是一种检测胃癌腹腔微转移的有效方法。

**关键词:** RT-PCR; CEA; 胃癌; 腹膜转移; 腹腔冲洗液; 细胞学检查

王夫景, 高岩, 黄跃南, 佟佰峰, 张秀云, 杨维良. 腹腔冲洗液和腹膜组织检测胃癌腹腔微转移的临床意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2148-2150

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2148.asp>

## 0 引言

已侵及浆膜的胃癌患者, 术后易发生腹膜转移, 5 a生

存率低于35%<sup>[1]</sup>. 如何正确地筛检腹膜复发高危病例并予以有效的治疗是提高进展期胃癌手术效果的关键问题之一. 研究表明, 细胞学检查的阳性结果与低生存率之间有明显的统计学意义, 但传统的细胞学检查, 缺乏灵敏度, 一些阴性结果的患者, 术后仍有腹膜复发. 目前RT-PCR已被广泛地应用于检查外周血、淋巴结、骨等微转移病灶<sup>[2, 3]</sup>, 显示了较高的灵敏度和特异性. 我们采用RT-PCR法, 检测术中收集的腹水或腹腔冲洗液CEAmRNA的表达, 并与常规细胞学检测结果比较, 同时对腹膜转移病灶和腹膜组织亦进行CEAmRNA的检测如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2004-3/2005-4胃癌手术患者68例, 胃良性病变5例. 依据术中所见及术后病理分期, 浆膜类型, 病理类型分组. 根据病理结果和恶性肿瘤国际临床病期(TNM)分期. 组织学类型中将乳头状腺癌和管状腺癌 I II级归入分化类, 其余病理类型归入未分化类. 同时用人大肠癌细胞系株CCL187作为阳性对照. Trizol试剂购于Inlitrigen公司; RT-PCR试剂盒购于Promega公司; 大肠癌细胞系株CCL187取自校科研中心. 手术开腹后, 于Douglas窝或左膈下置入一根导尿管, 注入无菌生理盐水250 mL, 轻轻搅动后吸出. 若有自然腹水的病例则直接吸出. 吸取后将冲洗液或腹水于4℃下用2000 r/min离心20 min. 取少许沉渣做涂片, HE染色后, 行细胞学检查, 其余沉渣于-80℃下保存. 如有腹膜转移病灶则予部分切除, 否则切除少量大网膜、盆腔腹膜和膈腹膜, 也置于-80℃下保存.

**1.2 方法** 将标本内加入Trizol试剂, 按Trizol说明书所示步骤进行RNA提取, 得到RNA. 先行逆转录, 按说明书操作; 再行PCR, 引物序列参照文献<sup>[4]</sup>. CEA巢式PCR特殊引物序列为: A(outersense): 5-TCT GGA ACT TCT CCT GGT CTC TCA GCT GG-3', B(antisense): 5-TGT AGC TGT TGC AAA TGC TTT AAG GAA GAA GC-3', C (innersense): 5-GGG CCA CTG TCG GCA TCA TGA ATT GG-3'. 第1轮采用引物A和B, 第2轮采用引物B和C. 反应条件相同, 94℃变性1 min, 72℃退火和延伸2.5 min; 反应体系为25μL. 将第1轮产物1 μL在第2轮中扩增, 皆为30个循环; 第2轮产物5 μL置于20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 呈现131 bp条带为阳性, 凝胶成像仪扫描记录. 取阳性产物测序鉴定. 另外, 每例标本均用管家基因β-actin作为内参照以检验RNA样本的完整性, 同时用CCL187大肠癌细胞系株RNA样本作阳性对照以排除假阴性, 用不含RNA的样本扩增作阴性对照以排除假阳性. 对5例胃良性病变的腹腔冲洗液和12个腹膜组织标本行CEAmRNA的巢式检测, 作为阴性对照. 涂片后作HE染色行细胞学检查.

**统计学处理**  $\chi^2$ 检验或确切概率法,  $P<0.05$ 为有显著

性差异.

## 2 结果

胃癌68例腹腔液和腹膜组织中CEAmRNA的阳性率为36.8%(25/68)和38.2%(26/68), 均高于腹腔液细胞学阳性率25.0%(17/68). 胃良性病变5例的腹腔液均为阴性, 但其15个腹膜标本中有1个CEAmRNA阳性. 同时5例肉眼腹膜转移病例的腹膜转移病灶CEAmRNA腹水或冲洗液中细胞学和CEAmRNA均阳性. 腹膜组织CEAmRNA阳性者细胞学检查均阳性; 腹腔液细胞学阳性者CEAmRNA亦阳性, 腹腔液CEAmRNA阳性者中有8例腹腔液细胞学检查阴性; 腹腔液CEAmRNA阳性者腹膜组织CEAmRNA皆阳性.

**2.1 病期和阳性率** 在早中期22例病例中, 有3例CEAmRNA结果阳性, PLC均为阴性( $P<0.05$ ); 在晚期1组中, CEA mRNA阳性率均明显高于PLC( $P<0.05$ ); 晚期2组CEAmRNA阳性率与PLC阳性率无差别(表1).

表1 不同病期胃癌腹腔液 C EAmRNA和PLC阳性率的比较

病期	<i>n</i>	RT-PCR(+)	PLC(+)
早中期	22	3(13.0%) <sup>a</sup>	0
晚期1组	41	17(41.5%) <sup>a</sup>	12(29.3%)
晚期2组	5	5(100%)	5(100%)
总计	68	25(36.8%)	17(25%)

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs PLC(+); 早中期: m-m p癌; 晚期1组: ss-si癌无大体腹膜转移; 晚期2组: ss-si癌有大体腹膜转移.

**2.2 CEA mRNA 表达与临床病理因素** CEA mRNA表达与淋巴结转移、浆膜侵犯程度、肿瘤分化程度和分期呈明显相关性( $P<0.05$ ). 浆膜侵犯者、淋巴结转移者、肿瘤分化程度差者、TNM分期越晚者CEAmRNA表达阳性的可能性大(表2).

表2 CEA mRNA表达与临床病理因素的关系

临床病理因素	<i>n</i>	腹腔液CEAmRNA	
		阳性	阴性
肿瘤大小<5 cm	29	10	19
肿瘤大小≥5 cm	39	15	24
分化	28	7	21
未分化	40	18	22 <sup>a</sup>
浆膜侵犯(-)	25	2	23
浆膜侵犯(+)	43	23	20 <sup>a</sup>
淋巴结转移(-)	23	5	18
淋巴结转移(+)	45	20	25 <sup>a</sup>
I+II期	26	6	20
III+IV期	42	19	23 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ .

## 3 讨论

近年来, 虽然胃癌的外科手术治疗有了长足的进步, 但手术仍然不能解决浆膜受侵胃癌术后腹膜复发的问题,

许多术中直视下貌似完整的浆膜,实际上已被各种水解酶溶解,癌细胞裸露并脱落入腹腔.进展期胃癌腹膜转移率约为10%<sup>[5]</sup>,而术后腹膜复发率高达50%<sup>[6]</sup>.但无论是复发或腹膜转移均与腹腔存在的癌细胞有关,检测这些癌细胞对于诊断和预测腹膜转移和复发有重要意义,但常规细胞学检查检出率低,尤其是那些无腹水或腹腔癌细胞较少的患者常会漏诊,这也是有些患者虽然细胞学阴性但术后仍有复发的原因之一.

近年来,RT-PCR方法已被用于检测微量癌细胞中的特殊mRNA,如淋巴结、肝脏和血液癌细胞的微转移检测,显示了较高的灵敏性.我们采用该方法检测腹腔冲洗液的游离细胞,因为腹膜间皮细胞不表达CEA,所以选择CEA的mRNA作为标志,从而明确地区分开皮细胞和肿瘤细胞.但值得注意的是,腹腔液中白细胞可以表达CEA相关基因,因此在进行PCR扩增的时候,应将退火温度控制在65℃以下,以避免由于白细胞表达CEA所造成的假阳性<sup>[7]</sup>.尽管5例胃良性病变的15个腹膜标本中有1个CEAmRNA阳性,使其特异性有所下降,这可能与白细胞少量表达CEA相关基因有关.作者认为,对胃癌患者术中切除少许网膜、腹膜组织行CEAmRNA的检查,至少可辅助证实腹腔液CEAmRNA的检测结果.我们以细胞系为标本作为阳性对照,获得阳性结果的最低细胞数量级为 $10^3$ ,说明RT-PCR实验可以检测很微量的癌细胞,并与细胞学检查进行比较,结果敏感性明显提高,特别在无明显大体腹膜转移以前,统计学表明有显著差异.结果表明,RT-PCR方法检测腹腔液CEAmRNA表达较细胞学检

查的敏感性显著升高,而且与淋巴结转移、肿瘤浸润深度、浆膜侵犯程度和TNM分期呈正相关,对腹膜组织同时行此检查,可进一步证实其结果.对于CEAmRNA表达阳性者可在随访中作为高危人群监测.

#### 4 参考文献

- 1 Kodera Y, Yamamura Y, Torii A, Uesaka K, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T, Kito T. Postoperative staging of gastric carcinoma. A comparison between the UICC stage classification and the 12th edition of the Japanese General Rules for Gastric Cancer Study. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:476-480
- 2 Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ. The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer* 1995;72:268-276
- 3 Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnett HD, Coombes RC. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1994;54:2986-2990
- 4 Kodera Y, Nakanishi H, Yamamura Y, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T, Kito T, Tatematsu M. Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytology. *Int J Cancer* 1998;79:429-433
- 5 Tsujitani S, Oka S, Suzuki K, Saito H, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Prognostic factors in patients with advanced gastric cancer treated by noncurative resection: a multivariate analysis. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1504-1508
- 6 Yoo CH, Noh SH, Shin DW, Choi SH, Min JS. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg* 2000;87:236-242
- 7 Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M, Satta T, Hasegawa T, Oikawa S, Kondoh K, Akiyama S, Itoh K, Nakashima I. Expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA) in gastrointestinal cancer; the correlation with degree of differentiation. *Br J Cancer* 1993;68:130-136

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 恶性消化道肿瘤晚期患者血TNF- $\alpha$ 与胰岛素抵抗和胰岛素分泌的功能关系

冯青青, 王占科, 吕小林, 刘亚诚, 余文, 涂云

冯青青, 王占科, 余文, 涂云, 解放军第九四医院 江西省南昌市 330002

吕小林, 江西医学院第一附属医院 江西省南昌市 330006

刘亚诚, 江西省人民医院 江西省南昌市 330006

通讯作者: 冯青青, 330002, 江西省南昌市, 解放军第九四医院.

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

**Relations of plasma TNF- $\alpha$  with insulin resistance and insulin**

**excretion in terminal patients with malignant gastrointestinal tumor**

Qing-Qing Feng, Zhan-Ke Wang, Xiao-Lin Lv, Ya-Cheng Liu, Wen Yu, Yun Tu

Qing-Qing Feng, Zhan-Ke Wang, Wen Yu, Yun Tu, the 94<sup>th</sup> Hospital