

细胞角蛋白20检测在大肠癌微转移中的临床意义

熊兵红, 程勇, 王严庆

■背景资料

大量研究表明, 微转移(micro-metastases)是大肠癌根治术后复发和转移的主要原因之一。近年来随着微转移在肿瘤研究领域中的广泛开展, 人们开始研究大肠癌微转移, 以期获得更准确、更早期的转移信息, 为临床分期及预后判断、辅助治疗提供更多的依据。随着分子生物学、分子免疫学的迅速发展, 使大肠癌的淋巴结、血液、骨髓及各脏器用常规组织学难以诊断的癌细胞微转移灶的检测成为可能。细胞角蛋白20(cytokeratin-20, CK20)是新近发现的一种多肽, 局限在胃肠上皮细胞, 几乎所有大肠癌都明显表达。通过检测大肠癌患者淋巴结、血液、骨髓中CK20 mRNA的表达来诊断微转移, 来指导临床大肠癌的分期、判断预后、指导治疗显示出较高的临床价值。

熊兵红, 程勇, 王严庆, 重庆医科大学附属第一医院普外科重庆市 400016
重庆市卫生局基金资助课题, NO. 205-2-115
通讯作者: 程勇, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院普外科, chengyonghcq@yahoo.com.cn
电话: 023-89011170
收稿日期: 2006-02-22 接受日期: 2006-03-03

摘要

近年来随着微转移在肿瘤研究领域中的广泛开展, 人们开始研究大肠癌微转移, 以期获得更准确、更早期的转移信息, 为临床分期及预后判断、辅助治疗提供更多的依据。随着分子生物学、分子免疫学的迅速发展, 使大肠癌的淋巴结、血液、骨髓及各脏器用常规组织学难以诊断的癌细胞微转移灶的检测成为可能。细胞角蛋白20(cytokeratin-20, CK20)是新近发现的一种多肽, 局限在胃肠上皮细胞, 具有严格的组织特异性, 几乎所有大肠癌都明显表达, 优于其他标志物, 尤其适用于检测大肠癌微转移。通过检测大肠癌患者淋巴结、血液、骨髓中CK20 mRNA的表达来诊断微转移, 对指导临床大肠癌的分期、判断预后复发、指导治疗显示出较高的临床应用价值。微转移是一项独立的预后指标, 其价值优于Dukes分期和肿瘤分级。现综述细胞角蛋白20检测在大肠癌微转移中的临床应用及意义研究进展。

关键词: 大肠癌; 细胞角蛋白20; 微转移

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. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1394-1402
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1394.asp>

0 引言

大肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。肿瘤的浸润和转移是恶性肿瘤的重要特征, 也是肿瘤患者死亡的主要原因。近年来大肠癌根治术的方法不断改进, 但是患者的预后未明显改善。随着免疫学及分子生物学的发展, 使大肠癌的微转移检测成为可能^[1]。细胞角蛋白20(cytokeratin20, CK20)是新近发现的一种多肽, 局限在胃肠上皮细胞, 具有严格的组

织特异性, 且几乎所有大肠癌都明显表达。通过逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和荧光定量PCR(fluorescence quantitative-polymerase chain reaction, FQ-PCR)技术检测CK-20 mRNA表达来诊断大肠癌转移成为目前研究热点之一。

1 微转移概述

自1869年Asworth首次在外周血中发现癌细胞以来, 肿瘤微转移逐步引起人们的重视。微转移(micrometastases, MM)又称隐性转移(occult metastasis), 一般指非血液系统的恶性肿瘤在发展过程中, 播散并存活于淋巴系统、血循环、骨髓、肝、肺等组织器官中的微小肿瘤细胞灶。他可以是单个瘤细胞或独立的瘤细胞灶, 无特殊血供。直径小于2 mm, 常无任何临床表现。能够逃免疫监视、侵犯血管和发展成为肉眼可见的病变。常规检查方法如CT、MRI、单抗放射显影技术、普通病理检查都很难发现。在不同的组织中这一概念又有具体的含义, 如淋巴结微转移指常规组织学水平淋巴结切片未能检出的转移; 在血液中, 常规方法不能检测出肿瘤细胞, 故任何能检出的血循环中的瘤细胞均属微转移; 骨髓的微转移则指在骨髓抽吸和活检标本中检出了瘤细胞, 而患者无任何临床上和放射影像上远处或骨髓转移的证据^[2]。研究认为, 临床转移一般由微转移发展而来。但仅少数微转移最终能发展为临床转移。微转移的瘤细胞灶常以单个细胞或微小细胞团形式, 通过淋巴系统、血液循环转移至其他组织器官。也可以直接侵袭周围组织或种植于体腔。微转移发展成为临床转移至少经过4个阶段: (1)微量肿瘤细胞自原发灶脱离; (2)适应新宿主代谢环境, 逃避宿主体免疫监控; (3)侵袭正常组织在新宿主组织中存活并增殖; (4)在新宿主中新血管形成, 肿瘤生长。微转移的转归取决于癌细胞的细胞生物学特性、机体的免疫状态及宿主器官的微环境。动物实验表明血循环中至少有10 000个肿瘤细胞才可以显性转移, 多数发生凋亡, 少数

进入休眠期, 极少数发生增殖. 微转移灶可长期处于G₀期, 其增殖与死亡处于平衡状态, 只有当机体遭受种种打击或免疫力下降时, 休眠中的肿瘤细胞摆脱抑制状态而持续增殖并发展为临床显性转移.

2 大肠癌微转移检测研究现状

2.1 大肠癌微转移检测方法

2.1.1 连续切片 是最早用于检测淋巴结转移的一种粗略方法, 主要是针对手术切除的淋巴结, 可使阳性率增加20%, 但缺点是敏感性差且工作量大、粗糙, 不适用于血循环、骨髓的微转移检测, 难以推广. 还有应用淋巴结廓清术(clearance technique)(二甲苯-乙醇清除术)和组织培养法、组织微阵列(tissue microarray, TMA)^[3]等技术进行微转移检测的报道.

2.1.2 免疫学技术 大约有免疫组织化学技术(immunohistochemical technique, IHC)、免疫荧光法(immunofluorescence assay, IFA)、放射免疫导向法(radioimmunoguided surgery, RIGS)、流式细胞分析法(flow cytometry, FCM), 这些都具有重要应用价值, 但是由于抗体的标化和选择、单抗的质量、交叉反应、机体产生自身抗体、结果判断缺乏客观统一标准等因素影响其敏感性和特异性.

2.1.3 免疫磁珠分离技术(immunomagnetic separation, IMS)IMS是新近建立的方法, 用以改进循环单个瘤细胞的检测. 经此方法得到的细胞再进行mRNA分离. 富集的样本可以准备作IHC, FCM, IFA, RT-PCR检测. 比传统的采用全血直接用于RT-PCR的方法敏感性提高约10倍, 可有效检出10⁷的全细胞中的一个肿瘤细胞. 另一方面, 通过IMS分离得到的细胞进行RT-PCR研究, 可以有效避免由血液不正常转录而导致的假阳性的产生, 提高RT-PCR检测方法的特异性.

2.1.4 分子生物学方法 有核酸杂交法(如Southern、Northern印迹杂交法)、突变等位基因特异性扩增法(mutant allele-specific amplification, MASA)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及近年出现的荧光定量PCR技术(fluorescence quantitative-polymerase chain reaction, FQ-PCR). PCR技术又称体外基因扩增方法, 由美国的Kary Mullis博士在1983年发明, 并于1985年公开报道, 1993年荣获诺贝尔奖. 1991年Smith *et al*首次应用PCR技术检测到血循环中存在转移的肿瘤细

胞. 之后PCR技术被广泛应用于微转移的研究. PCR, RT-PCR检测具有高度敏感性、特异性, 可准确检测1 g组织或1 mL液体中的1个癌细胞^[4], 被认为是目前检测微转移的最有效的方法. RT-PCR具有较高的敏感性和特异性, 检测时间相对较短, 能在24-48 h内得出结果, 同时检测多个标本; 免疫组化法仅能反映标本的局部, 而RT-PCR能反映整个标本的情况; RT-PCR操作方法固定, 相对易标准化和控制, 人为因素干扰少, 且判断结果较形态学方法容易客观且准确. 其缺点是: 技术要求较高, 严格要求新鲜标本及其迅速处理, 易受污染.

还有PCR结合单链DNA构型多肽分析(PCR-SSCP), 异源双链分析法(HA), 等位基因特异性寡核苷酸杂交法(PCR-ASO), PCR产物的限制性片段长度多肽分析法(PCR-restriction-fragment-length-polymorphism assay, PCR-RFLP), DNA直接测序技术(DS).

FQ-PCR技术是由美国Applied Biosystems公司在1996年率先研制成功的荧光定量技术. 该技术是根据荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理, 设计相应的荧光标记核酸探针, 通过PCR反应对相应靶DNA进行均相定性定量测定的技术^[5]. 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0-10¹⁴个拷贝/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, 不需PCR后处理, 克服了传统的PCR技术易受污染, 造成假阳性等诸多缺点. 配以相应的荧光PCR仪, 整个PCR过程可实现自动化, 且耗时短, 操作方便, 较之传统的定量方法劳动强度小, 易于标准化和推广应用. 因此, FQ-PCR技术是基因诊断、疗效评价、技术创新和临床研究的高新技术手段, 具有广泛的开发应用前景.

2.2 大肠癌微转移检测的标志物

2.2.1 当今, 分子生物学研究发现肿瘤标志物种类众多, 主要包括: (1)特异性基因: 包括染色体的异常、基因点突变、基因缺失等. 正常组织一般不伴有这些改变, 检测相关特异性基因可诊断微转移. 如p53, ras, DCC, erbB-2等. (2)肿瘤特异性标志物: 指在肿瘤细胞中存在而在正常细胞中不存在, 如CEA、AFP. (3)组织特异性标志物: 指在肿瘤起源组织中存在, 而在其他组织中不存在, 特别是在淋巴细胞和血细胞中不存在, 如角蛋白20(cytokeratin-20, CK20). (4)转移

■研发前沿

利用RT-PCR或者FQ-PCR来检测大肠癌手术前后外周血和术中肠系膜静脉血中的CK20 mRNA来判断手术操作是否促进循环肿瘤细胞微转移, 确定CK20在大肠癌中的临床应用价值, 明确微转移与临床转移、复发、生存期的关系, 是否能为临床恶性肿瘤的病情判断、治疗以及预后评估提供更好的依据, 这是目前大肠癌微转移的研究热点之一.

■名词解释

患者可能在术前其外周血、骨髓或淋巴结就存在少量的肿瘤细胞或者手术期间由于手术操作挤压出现肿瘤细胞的播散。由此提出了许多不同新名词,例如:循环肿瘤细胞,潜伏肿瘤细胞,微小残存灶,播散肿瘤细胞,尽管命名不同,这些名词大都指用常规的临床诊断手段如CT、MRI、普通病理检查都很难发现,而用免疫学方法、分子生物学方法才能发现的少量肿瘤细胞。这些肿瘤细胞既可以是疾病早期或治疗前就存在的,也可以是疾病晚期出现或治疗后残存。广义的循环肿瘤细胞指恶性肿瘤在发展的过程中播散并存活于外周血、骨髓、淋巴管以及各组织器官中的肿瘤细胞,这些细胞尚未形成转移结节,当结节直径 ≤ 2 mm时称微转移。

特异性基因。(5)肿瘤伴随的病毒。利用任何一种标志物虽然都可能建立一种检测微转移的方法,但一个理想的标志物应同时具备敏感性和特异性。目前,大肠癌标志物以k-ras、p53基因、CEA、CD44、CK19研究为多,但他们各有其优缺点。Hayashi *et al* 1995年采用PCR对120例大肠癌患者常规诊断无转移的淋巴结进行了k-ras、p53基因突变检测,发现71例(59%)有淋巴结微转移存在。然而,较多的研究显示,目前大肠癌患者中尚没有一种已知的突变类型一贯地出现,而且大肠癌细胞中k-ras、p53突变率仅为50%左右,该指标敏感性较低,从而限制了该方法的应用。Mori *et al* 1995年曾对65例行根治术的消化道肿瘤(大肠癌20例)及乳腺癌病人的406枚淋巴结分别进行组织学检测和CEA mRNA RT-PCR检测,并随访 24 ± 12 个月,结果163枚组织学检测阴性而RT-PCR检测阳性,微转移检出率为40.1%,82枚二者检测均阳性,其余161枚以及25枚对照组淋巴结二者检测均阴性。有淋巴结转移的15例病人6例复发,29例只有微转移的病人4例复发,21例无转移者无复发,证实了CEA mRNA RT-PCR诊断肿瘤淋巴结微转移的敏感性及其特异性。然而,1996年Jonas *et al*报道各类大肠癌细胞中只有65% CEA表达阳性,健康人群却有23% CEA mRNA表达阳性,肝转移患者中84%表达阳性。Mafune *et al*认为CEA虽被作为肿瘤标志物广泛存在,但在大肠癌的表达水平存在差异,且CEA还受到一些非肿瘤疾病的影响。CD44v mRNA其优点为正常人无表达,但可能存在假阴性或假阳性,报道结果不尽相同,甚至有人提出相反意见。也有人发现某些大肠癌无CD44突变,且CD44v6 mRNA在溃疡性结肠炎组织的隐窝区上皮细胞表达也增高,故特异性不高。CK19是常见的角蛋白之一,对于大肠癌,其RT-PCR的检测明显提高了区域淋巴结的微转移诊断率,但CK19 mRNA低、中度表达见于头颈部肿瘤、肺癌、乳腺癌、泌尿系肿瘤等多种肿瘤,特异性差,且也有假阳性结果,故降低了其诊断血循环、骨髓中微转移的价值。

2.2.2 CK20的理化特性和分布特点 细胞角蛋白(cytokeratin, CK)分布于外胚层起源细胞中的中间纤维丝,为细胞骨架成分之一。至少含有30种不同的蛋白链,大致包括20种上皮细胞角蛋白和10种头发角蛋白,分为I型和II型。I型为酸性蛋白(CK10-20),II型为中性蛋白(CK1-10),两型中各自特异对应,共同表达,与上皮的表达有

对应的特异性。CK20由Moll *et al*于1990年发现含424个氨基酸, M_r 为48553,等电点为5.66,属酸性CK。其编码总长18 kb,含8个外显子,7个内含子。其mRNA长1.75 kb,CK20的合成首先出现于第8周胚胎的肠黏膜上皮,之后分布于杯状细胞和绒毛细胞中。不同于其他CK,CK20具有更为严格的上皮组织特异性。正常组织中,CK20见于肠黏膜细胞、胃黏膜、幽门腺体细胞、十二指肠黏膜、泌尿伞状细胞、表皮Merkel细胞。而其他正常组织如乳腺、平滑肌、血细胞、淋巴细胞、造血细胞等均为阴性。CK20的表达在细胞发生化生、恶变、肿瘤转移、体外培养等改变时持续表达阳性。CK20的分布特点使其成为良好的肿瘤标志物,也被用来鉴别肿瘤组织来源。

3 CK20检测在大肠癌微转移的临床应用

RT-PCR检测肿瘤细胞敏感性高,其基本原理是通过扩增出肿瘤细胞“标志性”靶RNA来证实肿瘤细胞的存在。因此,选择适当的靶RNA是决定检测结果是否准确可靠的重要因素。目前,临床上作为检测大肠癌微转移的靶RNA主要有:(1)癌胚抗原(CEA) mRNA;(2)CD44剪接变异体(CD44v) mRNA;(3)细胞角蛋白(cytokeratin, CK) mRNA。前二者被视为肿瘤特异性RNA,而CK20为组织特异性RNA,仅在上皮来源的组织或细胞中表达。CK20不同于其他角蛋白,他非常局限在胃肠上皮细胞,几乎所有大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。国外学者研究表明采用CK20 mRNA RT-PCR法可以在1 mL全血中检出一个上皮来源的肿瘤细胞。可见CK20 mRNA RT-PCR法具有细胞形态学、免疫细胞化学技术不可比拟的敏感性。此外,Burchill *et al*对包括结肠癌在内的一系列细胞株进行检测还发现,CK18, CK19在正常外周血中均有较高的阳性率(分别为88%, 40%),而CK20仅在结肠癌细胞中表达,正常外周血细胞为阴性。可见,CK20 mRNA具有严格的上皮组织特异性,满足高灵敏的RT-PCR法对靶RNA的特殊要求。因此,通过检测大肠癌患者的淋巴结、血循环、骨髓中的CK20 mRNA的表达,可作为判断大肠癌患者淋巴结、血循环、骨髓中存在癌细胞的标志。故CK20被认为是检测大肠癌微转移的良好标志物。

3.1 CK20检测在大肠癌淋巴结微转移的临床应用 淋巴结转移与否是大肠癌病人重要预后因素之一。常规病理学检查易发生遗漏,直接影响着

临床分期的准确性、预后预测及辅助治疗的选择。赵旗 *et al*^[6]对80例Dukes B期大肠癌淋巴结行间断连续切片结合细胞角蛋白20抗体免疫组织化学染色方法检测淋巴结微转移, 并对全部患者进行随访。结果大肠癌淋巴结微转移与性别、年龄、肿瘤部位、大体分型、以及肿瘤最大径长无关, 而与肿瘤的分化程度和肿瘤侵犯肠周径有关; 微转移阳性组5 a生存率为36.7%, 微转移阴性组5 a生存率为72.2%, 经Log-Rank检验差异有统计学意义($P<0.01$), 微转移阳性组与阴性组复发率分别为75%和28.8%, 差异有统计学意义($P<0.01$)。这表明间断切片法结合CK20免疫组织化学方法有助于检出Dukes B期大肠癌淋巴结微转移, 增加每个淋巴结的切片数量有助于提高微转移的检出率; 低分化及癌肿侵犯肠周径 $>3/4$ 者易发生淋巴结微转移: 淋巴结微转移阳性组与阴性组的生存率与复发率有显著差异。于雁 *et al*^[7]应用抗细胞角蛋白(CK)和癌胚抗原(CEA)mAb, 对82例大肠癌(Dukes B期)根治术后经病理常规检查为转移阴性的667枚淋巴结进行免疫组化(SP法)检测, 结合随访资料进行临床预后分析。结果是转移阴性的82例667枚淋巴结中, 18例(21.9%, 18/82)42枚(6.3%, 42/667)淋巴结中发现微小转移的癌细胞, 其中13例10 a内因局部复发和远处转移死亡。64例免疫组化检测阴性的患者仅24例复发死亡。免疫组化诊断微转移阳性和阴性组10 a生存率分别是27.8%(5/18)和62.5%(40/64)。差异非常显著($P<0.05$)。结论显示应用肿瘤特异性抗体检测常规病理检查阴性的淋巴结有助于发现微小转移的癌细胞, 指导治疗有重要意义。而RT-PCR法可提高其检出率。Gunn *et al*^[8]对15例大肠癌病人的109枚淋巴结用RT-PCR法同时进行CK19和CK20 mRNA的检测, 结果84枚CK19阳性, 26枚CK20阳性。对照组的40枚淋巴结中, 34枚CK19阳性, 无CK20阳性。可见, 作为大肠癌淋巴结转移的标志, CK19 mRNA缺乏特异性, 相反, CK20 mRNA具有较高特异性。随后类似的一些研究^[9-11]证实了CK20分子检测的方法有着比传统的组织病理方法更高的灵敏度, 提高了淋巴结微转移检出率的临床分期准确性。以上结果均提示RT-PCR对检测淋巴结微转移有较大实用价值, 对患者分期判断预后、确定手术和术后的治疗方案具有重要的指导作用。

3.2 CK20检测在大肠癌血循环微转移的临床应用 血行转移是大肠癌另一种主要转移途径。检

测大肠癌血液微转移, 对判断病人预后、指导术后辅助治疗同样具有重要意义。常规组织学检查难以实现外周血微转移的诊断, 而RT-PCR技术由于其高度敏感性和特异性, 使外周血中癌细胞的检测成为现实。国外学者研究表明采用CK20 mRNA RT-PCR法可以在1 mL全血中检出一个上皮来源的肿瘤细胞。Funaki *et al*^[12]用RT-PCR法检测大肠癌患者外周血中CK20 mRNA结果显示该法具有高度敏感性, 1 mL健康志愿者血中混合1个肿瘤细胞即能检出。转移复发者全为阳性, 无远处转移者阳性率为50%, 2例阴性患者经过16 mo术后随访未见复发。Funaki *et al*^[13]又进一步研究了9例分期为Dukes C期的患者, 其中5例可在外周血检出CK20 mRNA阳性, 这5例中有3例在随后1,7和11 mo分别出现了复发, 而其余的6例阴性患者在20 mo的观察期内均未见复发。Xu *et al*^[14]的研究显示随着Dukes分期的进展, CK20 mRNA的表达水平增加, 但没有显著性意义。结果表明检测大肠癌患者外周血CK20 mRNA有助于鉴别肿瘤细胞的早期脱落, 也可监测疾病的进展和观察临床治疗效果。Koch *et al*^[15]的实验证明检测大肠癌肝切除的血源性肿瘤细胞可预测肿瘤复发, 有助于大肠癌肝转移患者的辅助治疗个体化和运用外科策略来阻止术中血源性肿瘤细胞脱落。骆成玉 *et al*^[16]应用RT-PCR法检测大肠癌患者术前和术后不同时期外周血中CK20 mRNA表达情况, 结果发现术前外周血中查出42例CK20阳性表达(58.3%), 术后3 d外周血中CK20阳性检出较术前多5例, 术后经早期化疗后22例转阴。袁正强 *et al*^[17]的研究显示CK20 mRNA阳性检出率与Dukes分期、淋巴结转移和肝转移存在显著性差异, 术后3 d内外周血CK20阳性检出较术前多出2例。随访发现, 外周血CK20扩增阳性者, 术后发生肝转移的机会增加(33.3%)。这说明检测大肠癌患者外周血液微转移CK20可提高大肠癌临床分期的准确性, 帮助综合判断患者的预后, 且可能有助于早期诊断大肠癌肝脏微小转移。他们认为, 对外周血中癌细胞检测阳性的大肠癌患者应密切追踪随访, 定期行肝脏B超、CT、MRI等检查, 以尽可能早的发现患者肝内转移灶, 使患者得到及时的治疗; 并积极给予针对性辅助或补救性治疗, 包括全身化疗、门静脉置管、手术切除等措施, 在微转移时就及时给予治疗, 有可能减少大肠癌患者术后复发和肝转移灶的形成。Iinuma *et al*^[18]用实时定量RT-PCR法(quantitative

■名词解释

荧光定量PCR: FQ-PCR基于荧光能量传递技术, 通过受体发色团之间偶极-偶极相互作用, 能量从供体发色团转移到受体发色团, 受体荧光染料发射出的荧光讯号强度与DNA产量呈正比, 检测PCR过程的荧光讯号便可得知靶序列初始浓度。PCR是1995年由美国PE(Perkin Elmer)公司研制出来的一种核酸定量技术。该技术较常规PCR具有简便、灵敏、准确等优点, 在临床具有广阔的应用前景。

real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay)检测大肠癌患者外周血中CEA和(或)CK20 mRNA及与临床病理和预后之间的关系,结果实时定量RT-PCR能在 3×10^6 个外周血单核细胞中检测出一个肿瘤细胞。CEA/CK20标志物基因的阳性率和肿瘤浸润深度、静脉浸润、淋巴结转移、肝转移和分期有显著相关性。CEA/CK20阳性的患者的无病生存和总体生存期明显短于CEA/CK20表达阴性的患者。肿瘤引流血(tumor drainage blood)标本中的CEA/CK20是无病生存和总体(全面)生存期的独立因子。研究显示用实时定量RT-PCR法测定结直肠癌患者肿瘤引流血中的CEA/CK20有预后价值。但还需要大规模和长期的临床试验来证实外周血游离肿瘤细胞(isolated tumor cells, ITC)基因测定的预后价值。Soeth *et al*^[19]用RT-PCR法检测胃肠癌患者外周血中CK20 mRNA,发现CK20 mRNA阳性患者的生存期明显较阴性患者的生存期短。Zhang *et al*^[20]的研究也发现外周血CK20 mRNA阳性患者1 a生存率(45.0%)较阴性患者的1 a生存率(66.7%)显著降低($P < 0.01$),且肿瘤后期的也比早期的表达高。

癌细胞从原发病灶脱落入肠系膜血管,通过血流经门静脉入肝脏,可以通过术中直接穿刺肠系膜静脉根部或经过胃网膜右静脉置管取门静脉血获得标本。检测发现门静脉血中CK20蛋白阳性表达的结直肠癌病人可能具有肝转移倾向或手术时就已存在早期肝转移,只是尚未形成一定大小的肝转移灶。周广军 *et al*^[21]报道42例大肠癌患者手术后48 h RT-PCR检测外周血中CK20 mRNA阳性率59.5%,高于手术前的50.0%,即有9.5%大肠癌患者手术前外周血中CK20 mRNA阴性表达,手术后转为阳性表达,另外部分术前阳性表达病例术后阳性表达增强。与Weltz *et al*发现大肠癌患者术后外周血中CK20 mRNA阳性表达率较术前高相似。说明手术操作促使肿瘤细胞进入外周血中。因此手术过程中应采取预防措施减少癌细胞的播散,应严格执行“不接触肿瘤的游离技术”,最大限度地减少围手术期医源性癌细胞播散的可能。林国乐 *et al*^[22]的研究结果表明手术操作能明显增加血循环微转移的发生几率。术中单纯靠先结扎肿瘤回流静脉的方法无法完全阻断血循环微转移的发生。可能因为手术开始前对肿瘤回流静脉的结扎并不能阻断肿瘤附近淋巴管内可能已有的癌细胞,由于术中牵拉、挤压等而进

入血循环。动物实验表明,手术操作可引起肿瘤播散入血循环,这增加了术后转移灶的发生。血循环中存在微转移,提示肿瘤有发展为远处转移瘤的可能。他们的研究提示,手术过程中的无瘤接触技术无法彻底阻断术中癌细胞的血行微转移。在目前尚无更有效措施的情况下,术中全身静脉化疗不失为一种针对性强、效果显著的方法。有研究^[23]认为通过增大采样、分析的血样量或从同一个体身上采集多种样本来提高CK20的检出率可能为一种可行的方法。Zhang *et al*^[20]通过RT-PCR测定了58例大肠癌和47例胃癌患者外周血,结果单次实验CK20 mRNA阳性率分别为44.8%(26/58)和42.6%(20/47),重复实验阳性率提高到69.0%和74.5%,而6例正常人外周血未见表达,认为用RT-PCR检测外周血胃肠道肿瘤细胞CK20 mRNA表达是敏感的、特异的、方便和可靠的,具有重要的临床意义。从外周重复采样、联合检测CK20和CEA均可提高其阳性检出率^[20, 24]。因此,CK20 mRNA检测可用于筛选大肠癌血行微转移,可以判断患者的临床治疗效果和判断预后。

3.3 CK20检测在大肠癌骨髓微转移的临床应用
血流丰富的骨髓易发生癌细胞转移。早期大肠癌就有血路播散的可能,因此了解大肠癌患者骨髓微转移的状况,有助于转移的早期诊断,并对判断肿瘤恶性程度和病人预后及指导术后辅助治疗方案的选择都有重要意义。Gunn *et al*^[8]对15例大肠癌患者骨髓进行CK20 mRNA和CK19 mRNA检测,结果CK19阳性者6例,但无一例CK20阳性。而对照组12个骨髓标本中5个CK19阳性,无一例对照标本CK20阳性。因此CK19的特异性值得怀疑。相反,倾向于以CK20 mRNA作为大肠癌骨髓微转移的标志。Soeth *et al*^[25]用巢式RT-PCR(nested RT-PCR)检测了57例大肠癌患者骨髓的CK20 mRNA表达,发现CK20阳性表达率与肿瘤分期密切相关。I期0%,II期为24%,III期为31%,IV期为71%。Soeth *et al*^[19]随后又检测了胃肠癌患者的141份骨髓标本和104份静脉血标本,发现骨髓检测微转移较外周血敏感、稳定,两者吻合率为87%。Lindemann *et al*^[26]报道结直肠癌患者骨髓检测阳性,其无病生存期减少。而且,Cox回归分析表明骨髓转移的出现是复发的一个独立预测指标。Koch *et al*^[15]的研究也表明检测结直肠癌患者术中($P = 0.009$)和骨髓中($P = 0.013$)的肿瘤细胞是肿瘤复发的一个独立预测指标。

4 CK20检测在大肠癌微转移中的临床意义

目前, 我们推断大肠癌患者预后和选择术后治疗方案主要是根据肿瘤的分期, 但这些分期指标仍然存在不足, 已经不能作为唯一指导治疗和判断预后的标准. Hayashi *et al* 研究表明, 37例伴淋巴结微转移的大肠癌患者中有27例5 a内复发, 而34例无微转移的患者, 无1例复发. Dorudi *et al* 研究了18例中期大肠癌患者162枚区域淋巴结, 应用CK20 RT-PCR检测发现, 21% Dukes B期患者已有淋巴结转移, 实属Dukes C期. Funaki *et al*^[12] 认为微转移可能是Dukes B期患者术后复发的主要原因. Soeth *et al*^[25] 报道显示, 骨髓中CK20 mRNA表达阳性的大肠癌患者2 a内死亡率为60%, 表达阴性的患者同期死亡率为11%, 两者差别很明显. 上述研究表明, 大肠癌微转移对大肠癌精确分期、指导治疗、判断预后方面有重要的临床意义, 其价值优于Dukes分期和肿瘤分级.

4.1 确定综合治疗方案、指导辅助化疗、评价化疗疗效 Xu *et al*^[27] 报道CK20表达和结直肠癌的分期和转移有关. 结论认为结直肠癌组织的血管生成和这些患者外周血肿瘤细胞的微转移密切相关. 用RT-PCR测定CK20 mRNA评价结直肠癌患者外周血肿瘤细胞的微转移是一个敏感的方法, 有助于预测预后, 疗效评价和指导综合的治疗. Na *et al*^[28] 的报道与此相似. Huang *et al*^[29] 的报道显示胃肠道肿瘤患者外周血循环肿瘤细胞的分子测定明显和肿瘤的恶性生物学性质相关, 有助于选择临床治疗和判断预后. 此外, 骆成玉 *et al*^[10] 应用CK20 mRNA RT-PCR法检测72例大肠癌术前和术后不同时期外周血中微转移情况, 从临床化疗疗效和分子水平分析术后化疗后微转移消退的相关因素. 结果发现, 术前外周血中CK20阳性表达42例(58.3%), 术后3 d外周血中CK20阳性检出较术前多5例, 故认为术后早期短程化疗对控制大肠癌微转移有一定作用, 有助于指导辅助治疗药物的选择和治疗方案的确定, 可作为临床个体化治疗的重要参考. Zhang *et al*^[20,30] 报道CK20 mRNA阳性的患者1 a复发率高于CK20 mRNA阴性者. RT-PCR测定患者骨髓和门静脉的肿瘤细胞是一个敏感和特异的方法, 诊断胃癌和大肠癌的微转移是可靠和方便的, 可评价预后和治疗方案. 检测外周血微转移有助于大肠癌临床分期的准确性, 并帮助判断患者预后和提高综合治疗效果.

4.2 准确判断预后、监测肿瘤复发、转移 Funaki

et al^[12] 检测了28例大肠癌患者外周血CK20 mRNA, 其中8例复发患者和4例伴远处转移患者均为阳性, 5例CK20 mRNA表达阳性但无复发或转移的Dukes C期患者在随访11 mo时有3例复发, 11例正常人或良性患者外周血CK20 mRNA均为阴性. 上述研究表明, 采用CK20 mRNA RT-PCR法检测大肠癌患者微转移外周血中CK20 mRNA具有较高的敏感性和特异性, 而且可能是大肠癌患者术后复发的主要原因, 是预测大肠癌复发和转移的实用指标. Illert *et al*^[31] 的研究表明CK20的表达是TNM分期的一个独立指标. 多变量分析表明CK20是一个独立的预后标志物. CK20测定对早期肿瘤分期有很大作用. 测定胃癌患者静脉血中的播散肿瘤细胞(disseminated tumor cells, DTC)是预后不良的一个独立预测标志物, 能帮助患者定位实体肿瘤的辅助治疗. Yuan *et al*^[32] 用RT-PCR测定结直肠癌组织淋巴结的微转移, PN0, PN1和PN2期的5 a无病生存率分别是100%, 61.9%, 55.6%, 都有显著性意义. 结论显示RT-PCR测定结直肠癌组织淋巴结的微转移比传统的病理形态学更敏感, RT-PCR能定义TNM分期, 对结直肠癌患者能做出准确的预后判断. 大肠癌淋巴结转移的有无及转移淋巴结数目的多少均与患者预后密切相关. 无淋巴结转移患者多数可获治愈, 5 a生存率可达70%以上; 有淋巴结转移者5 a生存率大大降低, 不足30%. 淋巴结转移数目愈多预后愈差, 1-5个转移者5 a生存率为24%, 而6-10个者则降为9%. 辅助性化学药物治疗(化疗)作为有淋巴结转移者的标准治疗, 可以明显增加其生存率, 但通常对无淋巴结转移者不予辅助治疗, 其5 a复发转移率达30%-40%. 常规组织学检测淋巴结微小转移常有遗漏, 直接影响着临床分期的准确性、预后预测以及辅助治疗的选择. 徐青 *et al*^[33] 报道58例大肠癌患者外周血中32例CK20 mRNA阳性表达(32/58), 术后48 h有35例阳性表达(35/58), 其中根治性切除组有21例阳性表达(21/44), 非根治性手术组12例阳性表达(12/14), 21例根治性切除患者术后7-14 d有11例转为阴性, 12例非根治性切除患者术后7-14 d有11例阳性表达. 结论显示CK20 mRNA阳性表达与大肠癌病理分化程度无关, 但与Dukes分期、区域淋巴结转移及远处转移情况相关($P<0.01$). CK20 mRNA阳性表达患者大肠癌组织中微血管密度(MVD)计数(88.5 ± 15.1)与VEGF阳性表达率(65.6%)明显高于CK20 mRNA阴性表达患

者的MVD计数(31.0 ± 12.9)和VEGF阳性表达率(19.2%)(分别 $P < 0.01$, $P < 0.001$). 这表明大肠癌组织中MVD和VEGF阳性表达与大肠癌的病理分化程度、Dukes分期、淋巴结及远处转移情况相关. 大肠癌组织血管生成与周围静脉血中癌细胞微转移情况密切相关. CK20 mRNA的检测对大肠癌预后判断、疗效评估及指导综合治疗有重要意义. 骆成玉 *et al*^[11]使用CK20的RT-PCR方法, 检测大肠癌淋巴结微转移情况, 并探讨其与预后的关系. 随访中发现, 淋巴结微转移多者预后差. 结论表明CK20 RT-PCR法较常规组织学检查具有更高的敏感性, 提高了淋巴结微转移的检出率和临床分期的准确性. 大肠癌淋巴结微转移的检测方法与临床疾病行为和预后较为符合, 是预测预后、指导治疗的重要指标. 随后, 骆成玉 *et al*^[34]又使用靶向CK20的RT-PCR技术, 对58例大肠癌患者外周血和骨髓微转移癌细胞在术前和术后不同时间进行了动态检测. 结果术后肿瘤无复发转移的大肠癌患者CK20的阳性率(16.3%)显著低于复发转移者(88.9%). 这表明大肠癌血路播散在术后复发转移中起重要作用. 动态追踪检测大肠癌CK20的变化有助于预测肿瘤的复发转移, 术前存在血路播散者预后差. 总之, 通过CK20 RT-PCR方法, 动态追踪大肠癌血路播散的变化, 可作为观察大肠癌术后复发转移和治疗反应及判断预后的一种非侵入性、可测量的客观指标, 他能提请临床对阳性结果患者的注意, 有较大的临床实际应用价值. 因此, 术后定期随访监测大肠癌患者血路播散可早期预测日后复发转移的风险、指导治疗.

5 问题及展望

总之, 尽管近年来对CK20、大肠癌微转移的研究取得了很大进展, 但CK20的分子学行为、基因特征还有待进一步研究, 微转移与预后的确切关系有待观察. 正常人^[20,24,35]、慢性炎症性肠病^[35](chronic inflammatory bowel disease, CID)患者、慢性胰腺炎患者、肝腺瘤患者分别出现外周血、骨髓CK20表达阳性, 从而怀疑CK20的特异性^[36]. 由于肿瘤转移过程机制复杂, 影响因素众多, 不少地方尚存在争议, 微转移的临床意义也有待进一步的研究, 检测的方法有待统一, 检测结果有待标准化. 普通PCR技术本身存在一定的缺点, 如(1)因未直接见到癌细胞, 即使存在突变型基因或基因产物, 也不一定存在活的肿瘤细胞; (2)PCR技术极为敏感, 需要有经验

的人员操作; (3)沾染基因物质可产生假阳性结果; (4)扩增mRNA常需新鲜标本, 库存的石蜡包埋块有时不适用于RT-PCR测定; (5)激素干扰可下调标记基因的表达, 因之产生假阴性结果. 另外, PCR检测费用昂贵, 限制了其广泛的临床研究, 对早期的诊断意义也不大. 且肿瘤的转移、复发是多阶段过程, 故肿瘤微转移的确切意义尚待进一步商讨, 与预后的确切关系有待进一步观察. 这些都是大肠癌微转移检测有待解决的问题. 杜雅菊 *et al*^[37]为探求大肠癌患者早期诊断的外周血分子标记物, 采用RT-PCR检测28例大肠癌、8例腺瘤中重度不典型增生、18例腺瘤轻度不典型增生、11例炎性息肉患者和10例正常对照者的外周血中CK-20、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST), 端粒酶催化活性亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT), 生存素(survivin)及细胞S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase associated protein 2, skp2)的mRNA表达情况. 实验结果是大肠癌患者外周血CK20 mRNA阳性率为89.3%(25/28), 腺瘤中重度不典型增生阳性率75%(6/8), 腺瘤轻度不典型增生组和炎性息肉组阳性率为61.1%和63.6%, 正常组有2例表达. 大肠癌组CK20 mRNA表达与腺瘤中重度不典型增生、腺瘤轻度不典型增生及炎性息肉组之间没有明显差别, 与正常组间有差别. 他们认为CK20作为大肠癌分子标记物的证据不够充分, 但对大肠癌及增生性疾病的监测尚有一定意义. 但叶敏 *et al*^[38]报道CK20具有较高的敏感性, 可用于膀胱肿瘤的早期诊断. 王保华 *et al*^[39]报道尿脱落细胞(HE染色)联合CK20免疫组化检测方法简单, 敏感度高, 对早期筛查膀胱癌有一定临床价值. Yang *et al*^[40]报道他们已经开发出一种纯化人类大便总RNA的方法, CK19在有转移的结直肠癌患者的大便中高度表达, 在正常人和转移的结直肠癌患者中不表达. 从大便中提取纯化RNA的方法可用来测定不同表达的基因, 这项技术能有助于非侵袭性筛选结直肠癌患者鉴别有意义的大便RNA标志物. 这开辟了一种无侵袭性检测的新途径, 这也为用非侵袭性方法检测粪便中脱落细胞CK20以便为临床筛查及早期诊断大肠癌提供了一条新思路. 利用RT-PCR或者FQ-PCR测定大肠癌患者外周血或粪便中的CK20 mRNA是否能为大肠癌早期诊断提供依据, 是否能为大肠癌临床筛查提供早期、可靠、简便易行的有效方法, 还需大规模的前瞻

性临床研究试验. 相信随着分子生物学技术的不断发展以及对大肠癌基因和肿瘤相关抗原研究的深入, 对微转移检测的认识和不断研究, 将建立更科学的检测方法, 揭示微转移的机制, 会逐步确定CK20在大肠癌中的临床应用价值, 明确微转移与临床转移、复发、生存期的关系, 为临床恶性肿瘤的病情判断、治疗以及预后评估提供更好的依据.

6 参考文献

- Chen XM, Chen GY, Wang ZR, Zhu FS, Wang XL, Zhang X. Detection of micrometastasis of gastric carcinoma in peripheral blood circulation. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 804-808
- 龚丽明, 程若川, 李恩全. 大肠癌微转移检测的现状与展望. *大肠肛门病外科杂志* 2003; 9: 137-142
- Hernandez BY, Frierson HF, Moskaluk CA, Li YJ, Clegg L, Cote TR, McCusker ME, Hankey BF, Edwards BK, Goodman MT. CK20 and CK7 protein expression in colorectal cancer: demonstration of the utility of a population-based tissue microarray. *Hum Pathol* 2005; 36: 275-281
- Oberg AN, Lindmark GE, Israelsson AC, Hammarstrom SG, Hammarstrom ML. Detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR for CEA and CK20 mRNAs. *Int J Cancer* 2004; 111: 101-110
- 施林祥, 李东辉. 实时荧光PCR研究新进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 596-599
- 赵旗, 戴冬秋. Dukes B期大肠癌淋巴结微转移与临床病理关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 268-269
- 于雁, 毛银玲, 尚丽华. 大肠癌淋巴结微转移免疫组化检测与预后关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2504-2506
- Gunn J, McCall JL, Yun K, Wright PA. Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse-transcription polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996; 75: 611-616
- Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, Tamura S, Yano M, Shiozaki H, Matsura N, Monden M. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2001; 92: 2056-2064
- Yun K, Merrie AE, Gunn J, Phillips LV, McCall JL. Keratin 20 is a specific marker of submicroscopic lymph node metastases in colorectal cancer: validation by K-RAS mutations. *J Pathol* 2000; 191: 21-26
- 骆成玉, 李世拥, 赵丹宁, 邓永江, 曲军, 祝学光. 大肠癌淋巴结微转移的预后意义. *中华普通外科杂志* 2000; 15: 133
- Funaki NO, Tanaka J, Itami A, Kasamatsu T, Ohshio G, Onodera H, Monden K, Okino T, Imamura M. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA. *Life Sci* 1997; 60: 643-652
- Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, Onodera H, Maetani S, Imamura M. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 1998; 77: 1327-1332
- Xu D, Li XF, Jiang WZ, Cao J, Zheng S. Significance of CK20 mRNA expression in peripheral blood of colorectal cancer patients by real-time fluorescent quantitative RT-PCR. *Zhejiang Daxue Yixue Ban* 2004; 33: 403-406
- Koch M, Kienle P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J. Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2005; 241: 199-205
- 骆成玉, 李世拥. 大肠癌患者外周血中微转移化疗疗效的相关因素. *中华外科杂志* 1999; 37: 421-423
- 袁正强, 曹建林, 陈微微, 刘道生, 张历, 温建立, 郑小华, 李良庆, 邓飞. 大肠癌患者外周血癌细胞CK20检测及其意义. *临床肿瘤学杂志* 2005; 10: 74-76
- Iinuma H, Okinaga K, Egami H, Mimori K, Hayashi N, Nishida K, Adachi M, Mori M, Sasako M. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol* 2006; 28: 297-306
- Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997; 57: 3106-3110
- Zhang XW, Yang HY, Fan P, Yang L, Chen GY. Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 436-438
- 周广军, 沈洪薰, 王志伟, 陈瑞新, 陈玉泉. CK20 mRNA在大肠癌患者外周血中阳性表达的临床意义. *南通医学院学报* 2002; 22: 24-26
- 林国乐, 邱辉忠, 徐彤, 钱家鸣. 大肠癌患者术前和术中外周血微转移的检测及其临床意义. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 605-607
- Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, Burchill SA. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998; 79: 288-293
- Wharton RQ, Jonas SK, Glover C, Khan ZA, Klokouzas A, Quinn H, Henry M, Allen-Mersh TG. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4158-4163
- Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996; 69: 278-282
- Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992; 340: 685-689
- Xu Q, Chen RX, Wang ZW, Ni QC, Qian JJ, Sheng HX. Clinical research on angiogenesis in colorectal carcinoma and expression of CK20 mRNA in peripheral blood. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1205-1208
- Na GW, Li J, He KJ, Li HH, Zhao XN, Li XW, Mi HN. CK20 mRNA expression in peripheral blood of patients with gastrointestinal carcinoma and its

- clinical significance. *Ai Zheng* 2004; 23: 1350-1353
- 29 Huang P, Wang J, Guo Y, Xie W. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood in patients with gastrointestinal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 192-198
- 30 Zhang XW, Fan P, Yang HY, Yang L, Chen GY. Significance of detecting disseminated tumor cells in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2003; 25: 66-69
- 31 Illert B, Fein M, Otto C, Cording F, Stehle D, Thiede A, Timmermann W. Disseminated tumor cells in the blood of patients with gastric cancer are an independent predictive marker of poor prognosis. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 843-849
- 32 Yuan HY, Cheng FL, Wei ZZ, Yang GL, Chen JK. Clinical significance of detecting lymph node micrometastasis of colorectal cancer by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Aizheng* 2004; 23: 1069-1073
- 33 徐青, 陈瑞新, 王志伟, 倪启超, 钱晶晶, 沈洪薰. 大肠癌组织血管生成与患者外周血CK20 mRNA表达的临床研究. *中华医学杂志* 2005; 85: 1205-1208
- 34 骆成玉, 李世拥, 赵丹宁. 大肠癌术后血路播散的动态追踪监测. *中华普外科杂志* 2001; 16: 118-119
- 35 Dandachi N, Balic M, Stanzer S, Halm M, Resel M, Hinterleitner TA, Samonigg H, Bauernhofer T. Critical evaluation of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in colorectal cancer patients. *J Mol Diagn* 2005; 7: 631-637
- 36 Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 1813-1820
- 37 杜雅菊, 刘晓琨, 金英敏, 曲波, 李宝杰. RT-PCR寻找大肠癌患者外周血早期分子标记物的研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 280-286
- 38 叶敏, 沈海波, 黄云腾, 虞永江, 朱英坚. 几种新瘤标对膀胱癌早期诊断价值的比较. *临床泌尿外科杂志* 2004; 19: 151-153
- 39 王保华, 李颢. 尿脱落细胞及CK20免疫组化检测对膀胱癌的早期诊断价值. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册* 2005; 26: 126-127
- 40 Yang SH, Chien CC, Chen CW, Li SY, Huang CJ. Potential of faecal RNA in diagnosing colorectal cancer. *Cancer Lett* 2005; 226: 55-63

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文

本刊讯 中华医学会外科学分会胰腺外科学组定于2006-09-08/11在西部高原城市青海省西宁市举行第十一届全国胰腺外科学术研讨会, 届时将邀请全国普外科百位知名专家到会就胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范进行专题讨论, 欢迎全国普外科同仁参加此次研讨会, 共同商定我国胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范。

投稿及联系事项: 北京协和医院基本外科, 李丽君. 截稿日期2006-06-30. 通信地址: 北京市东城区王府井大街帅府园1号, 邮编: 100730. 联系电话: 010-65296021, 010-65296016; 传真: 010-65296021 (世界胃肠病学杂志社 2006-05-18)