

- 4 吕繁, 栾荣生, 雷燕, 等. 四川省某市街头暗娼及其顾客艾滋病相关行为研究. 中国艾滋病性病, 2007, 13(2): 114 - 116
- 5 李南, 吕繁. 乘数法在艾滋病高危人群基数估计中的应用. 重庆医学, 2006, 35(16): 1505 - 1507
- 6 吕繁, 李平, 刘刚, 等. 捕获再捕获法估计四川乐山市中区吸毒人群基数. 中国药物依赖杂志, 2007, 16(2): 55 - 63
- 7 钟柳青, 吕繁. 我国男男性接触人群的特征及艾滋病流行状况. 中国艾滋病性病, 2006, 12(5): 484
- 8 雷燕, 栾荣生, 吕繁, 等. 四川省某市街头性服务嫖客规模估计. 中国公共卫生, 2007, 23(2): 168 - 169
- 9 李平, 吕繁. 艾滋病高危人群 - 吸毒人群基数估计研究方法进展. 传染病信息, 2005(1): 52 - 53
- 10 马烨, 吕繁, 卢培能, 等. 应用乘法法估计暗娼规模的方法学研究. 疾病控制杂志, 2005, 9(3): 205 - 208
- 11 查干花, 吕繁. 艾滋病疫情估计与预测方法. 华南预防医学, 2006, 23(3): 23 - 27
- 12 F Lu, Y Jia, S Bin, *et al.* Predictors for casual sex and/or infection among sexually transmitted disease clinic attendees in China. International Journal of STD & AIDS. 2009, 20: 241 - 248

(收稿: 2010 - 01 - 11)

(修回: 2010 - 03 - 14)

实时荧光定量 RT - PCR 检测胃癌腹腔冲洗液 CK19 mRNA 的临床意义

盛贤能 刘宏斌 朱万坤 韩晓鹏 苏琳

摘要 目的 评估实时荧光定量反转录聚合酶链式反应 (real - time fluorescent quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction, FQ - RT - PCR) 方法检测胃癌腹腔冲洗液沉渣中 CK19 mRNA 的表达, 探讨其对预测胃癌腹膜微转移的临床意义。方法 收集 36 例胃癌和 7 例胃良性病变患者腹腔冲洗液沉渣及临床病理资料, 分别采用 FQ - RT - PCR 检测腹腔冲洗液沉渣中 CK19 mRNA 的表达; HE 染色行腹腔冲洗液细胞学 (peritoneal lavage cytology, PLC) 检查。结果 胃癌 CK19 mRNA 的阳性检出率为 (23/36) 63.9%, 明显高于 PLC (9/36) 25.0% ($P < 0.01$), PLC 检查阳性的 9 例患者 CK19 mRNA 检测结果均为阳性; 且 CK19 mRNA 的检测阳性率与浆膜浸润与否、胃癌浸润深度、组织学分化程度、淋巴结转移情况及病期进展有关 ($P < 0.05$)。胃良性病变两项检查结果均为阴性。结论 FQ - RT - PCR 检测胃癌腹腔冲洗液沉渣中 CK19 mRNA, 可提高检测腹腔游离癌细胞的灵敏性, 适用于预测胃癌患者腹膜微转移, 有助于指导术后治疗及判断预后。

关键词 实时荧光定量 RT - PCR CK19 胃癌 腹腔冲洗液 细胞学检查

Clinical Significance of FQ - RT - PCR on Detection of CK19 mRNA Expression in Peritoneal Lavage Residues of Gastric Cancer. Sheng Xianneng, Liu Hongbin, Zhu Wankun, Han Xiaopeng, Su Lin. Department of General Surgery, Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Gansu 730050, China

Abstract Objective To evaluate the effect of real - time fluorescent quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (FQ - RT - PCR) on detection of CK19 mRNA expression in peritoneal lavage residues of gastric cancer and to discuss the clinical significance on prediction of peritoneal micrometastasis of gastric cancer. **Methods** Peritoneal lavage residues and clinical pathologic data of 36 patients with gastric cancer and 7 patients with benign gastric lesion were collected. CK19 mRNA expression in peritoneal lavage residues was checked through FQ - RT - PCR and peritoneal lavage cytology (PLC) respectively. **Results** CK19 mRNA positive rate of gastric cancer was (23/36) 63.9% which was obviously higher than that of PLC (9/36) 25.0% ($P < 0.01$). CK19 mRNA results of the 9 patients with positive PLC result was all positive. CK19 mRNA positive rate was related to serosa infiltration, tumor infiltration depth, histopathological differentiation, lymph node metastasis and illness progress ($P < 0.05$). The two results of benign gastric lesion were both negative. **Conclusion** The detection of CK19 mRNA expression in peritoneal lavage residues of gastric cancer through FQ - RT - PCR could enhance the sensibility of peritoneal free cancer cells. FQ - RT - PCR is suitable for predicting peritoneal micrometastasis of patients with gastric cancer, which is good for guiding postoperative treatment and evaluating prognosis.

基金项目: 全军医学科学技术研究“十一五”计划课题项目 (06MA082)

作者单位: 730050 甘肃省兰州大学第二临床医学院 (盛贤能); 兰州军区兰州总医院普外科 (刘宏斌、朱万坤、韩晓鹏、苏琳)

通讯作者: 刘宏斌, 电子邮箱: Lihongbin999@163.com

Key words Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; CK19; Gastric cancer; Peritoneal lavage; Cytology examination

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤,在我国其病死率仍居恶性肿瘤首位^[1]。临床上诊治的多为进展期胃癌,即使进行了根治性手术切除等治疗,其术后5年生存率仍仅为20%~50%,究其原因主要是术后的复发转移,其中约50%存在腹膜复发转移,并最终导致死亡^[2]。腹腔内脱落癌细胞(exfoliated cancer cells, ECC)的存在是胃癌根治术后腹膜复发转移的前提,因此,有效地筛检ECC并予以及时治疗是提高胃癌疗效的关键^[3]。本研究采用FQ-RT-PCR技术检测胃癌患者腹腔冲洗液沉渣中CK19 mRNA的表达情况,探讨其在预测胃癌腹膜微转移中的价值,以期对胃癌的精确分期和腹腔内温热灌注化疗提供依据。

材料与方法

1. 一般资料:收集本院2008年12月~2009年10月收治的胃疾病患者43例,其中胃癌36例,男性27例,女性9例,年龄31~75岁,平均年龄54岁。胃良性病变7例,男性5例,女性2例,年龄26~61岁,平均年龄46岁。临床病理资料:胃癌浸润深度、原发灶大小、淋巴结转移情况、组织学分化程度及TNM分期情况详见表1。PS因素按日本胃癌病理规约标准,即P(+):肉眼腹膜转移;S(+):镜下浆膜受侵。

2. 标本采集:手术开腹后若有腹腔积液则直接吸出,如无腹腔积液则在对肿瘤进行探查及侵入性操作前,用300ml生理盐水冲洗胃床、脾窝及Douglas窝,轻轻搅动后吸出100ml冲洗液。混血标本弃用。腹腔液于0℃下以2000r/min离心15min,取少许沉渣涂片1~5张,HE染色后行细胞学检查,凡有1张查到癌细胞即为PLC阳性,其余沉渣于-80℃下保存,用于总RNA提取。7例胃良性病变腹腔冲洗液作为阴性对照。

3. 仪器和试剂:PrimeScript RT试剂盒、SYBR Premix Ex Taq II试剂盒、Trizol、引物(宝生物工程大连有限公司)。ABI Prism 7300 System(Applied Biosystems公司, Foster City, CA, 美国)。

4. 方法:RNA提取:采用Trizol试剂盒,按说明书步骤进行RNA提取。紫外分光光度法检测总RNA的含量和纯度,其OD₂₆₀/OD₂₈₀(R值)在1.8~2.2之间表明所提总RNA纯度较好。引物设计及合成均参考文献报告的序列^[4]。引物合成由宝生物工程大连有限公司完成。CK19(F)5'-AGA GGT GAA GAT CCG CGA CTG-3';(R)5'-ACA ATC CTG GAG TTC TCA ATG GTG-3';扩增片段长度132bp。相同条件下扩增β-actin作为内参照,(F)5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGAA-3';(R)5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AG-CA-3';扩增片段长度186bp。cDNA合成:在10μl反应体系(5×PrimeScript™ Buffer 2μl, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5μl, Oligo Dt Primer 0.5μl, Random 6 mers 0.5μl, 总RNA +

Rnase Free dH₂O 6.5μl)中用PrimeScript RT试剂盒反转录成cDNAs。cDNA产物在-20℃冰箱保存。FQ-RT-PCR反应:SYBR Premix Ex Taq II试剂盒在50μl反应体系[SYBR Premix Ex Taq II 25μl, PCR上游引物2μl, PCR下游引物2μl, ROX Reference Dye(50×) 1μl, DNA模板4μl, dH₂O 16μl]中扩增。用ABI Prism 7300检测实时荧光定量PCR反应,反应条件:95℃预变性10s, 95℃变性5s, 60℃退火延伸31s, 共40个循环。梯度稀释cDNAs产生的标准曲线法计算PCR反应的效率,用熔解曲线和凝胶电泳检测各引物特异性。β-actin扩增阳性视为有效样本, CK19扩增阳性视为腹腔内有游离癌细胞。

5. 统计学分析:采用SPSS 11.5统计软件包进行χ²检验和方差分析, P<0.05差异有统计学意义。

结 果

1. 胃癌腹腔冲洗液中CK19 mRNA的表达与临床病理因素的关系。36例胃癌患者腹腔冲洗液沉渣中CK19 mRNA检测阳性率(23/36)63.9%,明显高于PLC(9/36)25.0%(P<0.01),且PLC检查阳性的9例患者CK19 mRNA检测结果均为阳性。对照组7例胃良性病变无一例腹腔冲洗液沉渣CK19 mRNA表达或PLC检测阳性。且CK19 mRNA的检测阳性率与肿瘤浸润深度、组织学分化程度、淋巴结转移与否及病期进展有关(P<0.05),结果见表1和第124页彩图3)。作为内参照的β-actin在胃癌及胃良性疾病中表达稳定。

2. 不同PS因素与CK19 mRNA阳性率的比较。本组浆膜内癌即S(-)的7例中仅1例CK19 mRNA阳性,阳性率为14.3%(1/7);浆膜受侵S(+),无肉眼腹膜转移P(-)的23例中CK19 mRNA阳性率为69.6%(16/23);合并肉眼腹膜转移P(+)的6例中CK19 mRNA阳性率为100%(6/6),组间差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。

讨 论

腹膜转移是胃癌根治术后主要的复发方式和死亡原因,而腹腔内脱落癌细胞是形成腹膜转移的先决条件,是胃癌独立的预后不良因素之一,因此,有效地筛检ECC并予以及时治疗是提高胃癌疗效的关键。PLC是检测ECC的金标准,但其敏感性低,难以检出腹腔内微量癌细胞,且有较高的漏诊率,特别是当癌细胞较少并散布在间皮细胞和炎性细胞中时,难以仅靠形态学检查作出诊断,而且在冲洗液中癌细胞

表1 FQ-RT-PCR检测CK19 mRNA表达阳性率与临床病理因素的关系

临床病理因素		<i>n</i>	CK19 mRNA(+)[<i>n</i> (%)]	<i>P</i>	PLC(+)[<i>n</i> (%)]	<i>P</i>
浸润深度	T ₁ + T ₂	9	2 (22.2)	<0.05	1 (11.1)	<0.05
	T ₃ + T ₄	27	21(77.8)		8(29.6)	
肿瘤大小	<5cm	15	10(66.7)	>0.05	4 (26.7)	>0.05
	≥5cm	21	13(61.9)		5(23.8)	
分化程度	分化	13	5(38.5)	<0.05	3(23.1)	>0.05
	未分化	23	18(78.3)		6(26.1)	
淋巴结转移	无转移	11	4(36.3)	<0.05	1(9.1)	<0.05
	有转移	25	19(76.0)		8(32.0)	
TNM 分期	I + II	10	3 (30.0)	<i>P</i> <0.05	1 (10.0)	<i>P</i> <0.05
	Ⅲ+Ⅳ	26	20(80.0)		8 (30.8)	

表2 CK19 mRNA 的表达与 PS 因素的关系

PS 因素	<i>n</i>	CK19 mRNA 阳性[<i>n</i> (%)]	<i>P</i>
P(-) S(-)	7	1(14.3)	<0.05
P(-) S(+)	23	16(69.6)	
P(+) S(+)	6	6(100)	

往往有很明显的退变现象,更增加了诊断的难度^[5]。本研究中 PLC 检测阳性率仅为 25.0%,因此寻找一种高灵敏和特异的检测胃癌腹膜微转移的方法成为近来研究的热点。近年来随着分子生物学技术的迅速发展,尤其是具有高敏感性和特异性的 FQ-RT-PCR 技术的出现,该技术可以检测到 10⁶~10⁷ 个正常细胞中或 1ml 液体中存在的一个癌细胞,使得检测微量癌细胞成为可能^[6]。其通过荧光标记,不仅提高了检测的特异性,而且能够检测并准确定量计算待测样本中目的基因的原始数量,此外由于其实实现完全闭管检测,无 PCR 后处理,避免了交叉污染,因此 FQ-RT-PCR 相对于常规 RT-PCR,具有灵敏度高、特异性强、所需时间短等优点^[7]。

CK 是细胞骨架系统中间丝的组成成分之一,肿瘤发生时仍保持其标记特性。迄今已发现 20 种 CK 多肽,其中 CK19 及 CK20 在胃肠道肿瘤中有较高表达,间叶细胞恶变后仍不表达角蛋白,这为角蛋白的应用提供了理论依据^[8]。本研究采用 FQ-RT-PCR 技术检测胃癌腹腔冲洗液沉渣中 CK19 mRNA 的表达情况,结果显示 CK19 mRNA 的阳性检出率为(23/36) 63.9%,明显高于 PLC (9/36) 25.0% (*P* < 0.01),且 PLC 检查阳性的 9 例患者 CK19 mRNA 检测结果均为阳性;说明 FQ-RT-PCR 检测较 PLC 检测敏感,对照胃良性病变无表达,证实了 FQ-RT-PCR 方法的特异性。本实验中 PLC 与胃癌浸润深度、淋巴结转移与否及 TNM 分期呈正相关(*P* < 0.05),而 CK19 不仅与上述 3 项有关,并与胃癌浆膜

浸润与否及组织学分化程度成正相关(*P* <0.05),结果与文献报道相符。表明 CK19 不仅与 PLC 具有一致性,而且要明显优于 PLC。所以,采用实时荧光定量 RT-PCR 检测腹腔冲洗液沉渣中 CK19 mRNA 的表达,有利于尽早发现腹腔脱落癌细胞,预测胃癌腹膜微转移,为术后进一步治疗及预后判断提供依据。

参考文献

1 Lee CC, Lo SS, Wu CW, *et al.* Peritoneal recurrence of gastric adenocarcinoma after curative resection. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50 (53) :1720-1722

2 Wang Z, Zhang X, Xu H, *et al.* Detection of peritoneal micrometastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for heparanase mRNA and cytology in peritoneal wash samples. *J Surg Oncol*,2005, 90 (2) :59-65

3 吴涛,徐惠绵. 胃癌腹膜转移预测和治疗进展. *国外医学肿瘤学分册*,2005,32(1) :61-65

4 Peck K, Sher YP, Shih J Y, *et al.* Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res*, 1998,58 (13) :2761-2765

5 Nakagawa S, Nashimoto A, Yabusaki H. Role of staging laparoscopy with peritoneal lavage cytology in the treatment of locally advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2007, 10(1) :29-34

6 Zhong XY, Kaul S, Lin YS, *et al.* Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with reverse transcriptase/polymerase chain reaction for cytokeratin-19. *J Cancer Res Clin Oncol* , 2000,126(4) :212-218

7 Suo J, Wang Q, Jin HJ, *et al.* K-19 mRNA RT-PCR in detecting micro-metastasis in regional lymph nodes of gastric cancer. *World J Gast-roenterol*, 2006,12 (32) :5219

8 Sugita Y, Fujiwara Y,Taniguchi H ,*et al.* Quantitative molecular diagnosis of peritoneal lavage fluid for prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. *Int J Oncol*,2003,23(5) :1419-1423

(收稿:2010-01-06)
(修回:2010-03-12)