

大肠肿瘤中所占的比例,文献报告不一,从 6% ~ 26.4% 不等^[2]。由于解剖学的特点,回盲部区域处于消化道的“中间地带”,在肿瘤早期缺乏特异性的临床表现,故早期诊断往往比较困难,一旦出现右下腹肿块、肠梗阻、贫血、恶病质等表现时,病程多已进入晚期,根治的希望已很小^[3]。本研究试图通过免疫组化方法检查 EGFR 在回盲部癌组织中的表达情况,研究其与者临床病理学和患者生存率之间的关系,从而为临床判断预后和指导治疗提供依据。近年来,国内外许多研究表明,EGFR 在许多实体瘤中均有不同程度的表达,其阳性表达率为 40.40% ~ 77.14% 不等,而在正常组织的对照研究中,EGFR 的阳性表达率很低,提示 EGFR 与恶性肿瘤的发生发展关系密切^[4-8]。本研究发现 EGFR 在回盲部癌中的表达率为 53.85%,与患者年龄、性别、肿瘤类型无显著性差异,这一结果与 EGFR 表达与结直肠癌之间的关系基本一致^[9]。EGFR 阳性表达提示患者肿瘤组织分化差,浸润深并广,更容易发生淋巴结转移和远处转移,存活时间短。病理分类中以低分化和黏液腺癌以及印戒细胞癌居多,具有侵袭力强、容易转移等特点,相对于其他部位的结肠肿瘤,其预后较差。本研究发现分化差的(组织学Ⅲ级)患者全部死亡,而分化较好(组织学Ⅰ级)的患者在随访期内全部存活。回盲部癌组织病理分级由低到高伴随 EGFR 阳性率增高,提示 EGFR 表达可能与肿瘤细胞分裂、增生和浸润,肿瘤细胞转移能力增强有关。

总之,我们认为肿瘤的浸润深度、和分化程度有无淋巴结和远处转移是影响回盲部癌预后的重要因素,EGFR 阳性表达是预后不良的指标。但由于本研究病例数不多,随访时间不长,统计结果尚不足以代

表回盲部癌患者的整体特征。还有待长期的追踪随访,以及扩大研究的样本数量来阐述 EGFR 表达与回盲部癌之间的关系。

参考文献

- 1 Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21 (14): 2787 - 2799
- 2 品川长夫, 王澄. 盲肠癌的症状和诊断. *日本医学介绍*, 1990, 11 (2): 56 - 59
- 3 Stamatakis M, Ch S, Tsaknaki S, *et al.* Primary adenocarcinoma of the appendix: an update. *Chirurgia (Bucur)*, 2009, 104(4): 389 - 392
- 4 Delektorskaya VV, Chemeris GY, Kononets PV, *et al.* Clinical significance of hyperexpression of epidermal growth factor receptors (EGFR and HER-2) in esophageal squamous cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med*, 2009, 148(2): 241 - 245
- 5 Hama T, Yuza Y, Saito Y, *et al.* Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncologist*, 2009, 14(9): 900 - 908
- 6 Meche A, Cimpean AM, Raica M. Immunohistochemical expression and significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer. *Rom J Morphol Embryol*, 2009, 50(2): 217 - 221
- 7 Tanaka K, Otake K, Mohri Y, *et al.* Clinical significance of the gene expression profile in residual tumor cells after neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer. *Oncol Rep*, 2009, 21(6): 1489 - 1494
- 8 Keizman D, Issakov J, Meller I, *et al.* Expression and significance of EGFR in malignant peripheral nerve sheath tumor. *J Neurooncol*, 2009, 94(3): 383 - 388
- 9 Deng Y, Kurland BF, Wang J, *et al.* High epidermal growth factor receptor expression in metastatic colorectal cancer lymph nodes may be more prognostic of poor survival than in primary tumor. *Am J Clin Oncol*, 2009, 32(3): 245 - 252

(收稿: 2010 - 01 - 14)

(修回: 2010 - 04 - 05)

大网膜在胃癌腹膜微转移检测中的价值

汪树利 韩晓鹏 刘宏斌 朱万坤

摘要 目的 探讨大网膜在胃癌腹膜微转移检测中的价值。**方法** 采用实时荧光定量 RT-PCR 检测 36 例胃癌患者和 6 例非肿瘤开腹手术患者大网膜及腹腔冲洗液 CK20mRNA, 大网膜取材分邻近网膜血管 1、2 级分支取材和无血管区取材两种方

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: 730000 兰州大学第二临床医学院(汪树利); 兰州军区兰州总医院普外科(韩晓鹏、刘宏斌、朱万坤)

通讯作者: 刘宏斌, 电子信箱: liuhongbin999@163.com

式,通过统计学方法分析大网膜在胃癌腹膜转移中的价值。**结果** 胃癌患者腹腔冲洗液检测 CK20mRNA 阳性率为 55.5% (15/30),大网膜邻近血管取材检测阳性率为 43.33% (13/30),无血管区取材检测阳性率为 6.66% (2/30),大网膜检测阳性者,冲洗液检测均阳性;冲洗液检测阳性者,大网膜检测不一定阳性,非肿瘤开腹手术患者腹腔冲洗液及大网膜检测均为阴性。**结论** 利用大网膜检测胃癌腹膜转移阳性率与腹腔冲洗液相似,腹腔冲洗液检测是一种预测性指标,大网膜检测是一种确定性指标,邻近血管区是更好的取材方式。

关键词 胃癌 大网膜 腹腔冲洗液 实时荧光定量 RT-PCR 腹膜转移

Value of Great Omentum in Detection of Gastric Cancer Peritoneal Micrometastasis. Wang Shuli, Han Xiaopeng, Liu Hongbin, Zhu Wankun. Second Medicine College of Lanzhou University, Gansu 73000, China

Abstract Objective To explore the value of great omentum in gastric cancer peritoneal micrometastasis detection. **Methods** Real-time quantitative RT-PCR was used to detect CK20mRNA in great omentum and peritoneal washing fluid of 36 gastric cancer patients and 6 abdominal surgery patients without tumor. Collecting means of great omentum included adjacent sub-branches of omental 1,2 grade vessels and non-vascular area. Statistical methods were used to analyze the value of greater omentum in detecting gastric cancer peritoneal metastasis. **Results** CK20mRNA positive rate of peritoneal lavage fluid was 50% (15/30). Positive rate of greater omentum close to blood vessels was 43.33% (13/30). And positive rate of greater omentum in non-vascular area was 6.66% (2/30). Flushing fluid testing must be positive while omentum was positive, but greater omentum tests may not be positive while washing fluid testing positive. Peritoneal lavage fluid and omentum test were negative for patients undergoing abdominal operation without tumor. **Conclusion** The positive rate of great omentum was lower than that of peritoneal lavage fluid in patients with gastric cancer. The peritoneal lavage fluid testing is a predictive indicator while the omentum testing is a deterministic target detection, and materials near the omental 1,2 grade vessels is better for testing.

Key words Gastric; Omental; Peritoneal lavage fluid; Real-time quantitative RT-PCR; Peritoneal metastasis

胃癌是消化道最常见恶性肿瘤,病死率居所有恶性肿瘤首位^[1],其中约 50% 死于腹膜转移。胃癌腹膜转移检测和治疗是胃癌研究的热点领域之一,腹腔冲洗液和盆腹膜是用于腹膜转移检测最常用的两种材料。我们采用实时荧光定量 RT-PCR,以大网膜为检测材料,通过与腹腔冲洗液对比,评价大网膜在胃癌腹膜转移检测方面的价值,效果满意,现报道如下。

资料与方法

1. 临床资料:本组 30 例,男性 18 例,女性 12 例,年龄 38~78 岁,平均年龄 58 岁。均无肉眼腹膜转移,术后病理证实浆膜浸润 10 例,未浸润浆膜 20 例,均有淋巴结转移,低、中分化腺癌 20 例,高分化腺癌 10 例。另取 3 例非肿瘤开腹手术患者同样标本作为阴性对照,排除假阳性;3 例胃癌组织标本做阴性对照,排除假阴性。内对照用以检测被测样品 RNA 的完整性和可靠性,确保 RNA 质量。

2. 实验资料:TaKaRa 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,引物由大连宝生物工程有限公司设计提供,7300 Real-time PCR Systems 扩增仪购自美国 Applied Biosystems 公司。内参照基因为 β -actin mRNA,引物序列:(上游)5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3',(下游)5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3';目的基因 CK20mRNA 引物序列:(上游)5'-AAC TGA GGT TCA ACT AAC GGA GCT G-3',(下游)5'-GGT TGG CTA ACT GGC TGC TGT AA-3'。

3. 方法:开腹后切口彻底止血防血液污染,在盆底倒入 100ml 生理盐水轻轻搅动后吸出。在大网膜血管 1,2 级分支附近和无血管区切取小块网膜组织,病灶离体后切取小块胃癌组织,生理盐水洗涤去除血液。组织标本-80℃ 冷冻后研磨法制备细胞悬液,用 DEPC 水 1ml 混匀后,放置 10min,再 2000r/min 离心 15min,吸去上清液去除残余红细胞。冲洗液 4℃ 静置后取 50ml 沉淀液,2000r/min 离心 15min 弃上清液。Trizol 法 RNA 提取及反转录按试剂盒说明书操作。PCR 反应体系:SYBR PremixTaq 25 μ l,PCR Forward Primer 2 μ l,PCR Reverse Primer 2 μ l,ROX Reference Dye 1 μ l,cDNA 4 μ l,dH₂O 16 μ l,总共 50 μ l。PCR 扩增采用两步法,预变性 95℃ 30s,1 个循环;PCR 反应 95℃ 5s,40 个循环,60℃ 延伸 31s。反应结束后由仪器软件自动分析计算结果。

4. 统计学处理:用 SPSS11.0 统计软件进行分析,计量资料多组间差异比较用 R $\times$ C 表卡方检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 有统计学意义。

结 果

由表 1 可知,有 2 例腹腔冲洗液检测阳性的患者,网膜检测为阴性;网膜血管区检测阳性率低于冲洗液检测,但 $P<0.05$,差异具统计学意义;网膜血管区检测阳性率高于无血管区, $P<0.05$,差异具统计学意义。由表 2 可知,网膜血管区检测阳性率与浆膜浸润情况、临床分期及肿瘤分化程度呈正相关,与淋巴结转移情况无关。

表 1 3 种取材方式的 CK20mRNA 检测结果

	阳性 (n)	阴性 (n)	P
腹腔冲洗液	15	15	0.001
网膜血管区	13	17	0.000
网膜非血管区	2	28	0.000

表 2 不同临床分组网膜血管区 CK20mRNA 检测结果

		阳性 (n)	阴性 (n)	P
浆膜浸润	有	8	2	0.004
	无	4	16	
淋巴结转移	多	8	6	0.730
	少	8	8	
临床分期	I、II	4	12	0.001
	III、IV	12	2	
分化程度	低、中	11	9	0.024
	高	1	9	

讨 论

胃癌腹膜微转移检测是胃癌研究的热点之一,传统的细胞学检测(PLC)被认为是金标准^[2],但检出率低,其临床应用价值有限。随着分子生物学技术的发展,各种 PCR 技术被广泛应用于临床,在目前常用的各种检测技术间具有最高的灵敏度,并且在操作程序和定量检测方面逐步得到改进,大有取代其他检测手段的趋势。在胃癌腹膜微转移检测取材方面,应用最多的是腹腔冲洗液,日本胃癌处理规约明确将腹腔冲洗液阳性作为胃癌的独立预后指标。但冲洗液收集的量及收集部位仍无统一的标准,而且冲洗液检测阳性的患者,活组织检测未必阳性。活组织检测在胃癌腹膜转移的确定性方面无疑优于冲洗液,但何种取材方式最好,也尚未达成一致。盆腹膜取材应用最多,但取材相对不便,可造成副损伤,尤其对于较为肥胖的胃癌患者。大网膜与胃癌腹膜转移关系密切,动物实验已证实^[3],胃癌腹腔转移顺序依次为大网膜、盆腹膜、膈腹膜、肠系膜及腹壁,这是因为腹膜乳斑是胃癌腹膜转移的选择性位点,而乳斑分布的密度与上述胃癌转移顺序基本一致,且乳斑在大网膜主要分布于邻近 1、2 级血管分支附近。国内也有文献报道^[4],胃癌网膜转移主要集中在乳斑区。因此,对于胃癌腹膜转移的确定性来说,邻近血管区大网膜应是最好的检测材料,而且大网膜取材远较其他腹膜方便,也是胃癌根治术常规切除的组织,该处取材不会造成患者额外的组织损伤。文献报道^[5],以 CEA mRNA 为检测靶点,利用实时 RT-PCR 技术检测 90 例胃癌患者网

膜组织及腹腔冲洗液,通过比较认为以网膜为检测对象查找癌细胞是一种有前途的新方法,但仍然存在问题:①哪一部分的网膜组织是最好的取材部位;②间皮细胞及炎细胞有少量弱表达,容易造成假阳性。

我们应用当前阳性率高且能定量对比的实时荧光定量 RT-PCR 方法,以特异性较好的 CK20mRNA 作为癌细胞检测靶点,对邻近血管区和非血管区两种取材方式与常用的腹腔冲洗比较,考察了大网膜在胃癌腹膜微转移检测上的价值。我们发现邻近血管的网膜是一种较好的取材方式,其检测的阳性率略低于腹腔冲洗液,但差异无统计学意义。大网膜检测阳性者,腹腔冲洗液检测均阳性,而冲洗液检测阳性者,有两例大网膜检测为阴性。网膜检测对胃癌腹膜转移具有诊断意义,而非腹腔冲洗液那样的预测价值。邻近血管区网膜检测的阳性率远高于非血管区,差异具统计学意义。但我们样本量由于受到仪器的限制,数量较少,结论的科学性需要进一步的病例累积来证实,而且网膜取材相对易于受到血液的污染,除了取材时尽量避免以外,必要时需要同时进行网膜血液或门静脉血的定量对比检测以除外假阳性。另外,我们报道的阳性率低于文献报道,这与我们病例纳入排除了肉眼可见的腹膜转移患者及晚期胃癌患者所占比例较小有关。

总之,我们认为邻近网膜血管取材是胃癌腹膜转移检测的一种较好的取材方式,阳性率与腹腔冲洗液检测相当,取材较盆腹膜方便,是胃癌腹膜转移的诊断性指标,值得进一步研究并在实践中推广。

参考文献

- 1 吴在德. 外科学[M]. 6 版, 北京: 人民卫生出版社, 2004:460
- 2 Benevolo M, Mottolese M, Cosimelli M, *et al.* Diagnostic and prognostic value of peritoneal immunocytology in gastric cancer [J]. *Clinic Oncol*, 1998, 16(10):3406-3411
- 3 Yoshinari Mochizukil, Hayao Nakanishi, Yasuhiro Kodera, *et al.* TNF- α promotes progression of peritoneal metastasis as demonstrated using a green fluorescence protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line[J]. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2004, 21:39-47
- 4 纪俊鹏. 人大网膜乳斑与胃癌腹膜种植性转移的相关性研究[J]. *中国厂矿医学*, 2007, 2(20):5-6
- 5 Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, *et al.* Quantitative detection of disseminated cancer cells in the greater omentum of gastric carcinoma patients with real-time RT-PCR: a comparison with peritoneal lavage cytology [J]. *Gastric Cancer*, 2002, 5(2):69-76

(收稿:2010-01-14)

(修回:2010-04-06)