

文章编号:1005-6947(2005)12-0896-04

·腹腔镜手术专题研究·

腹腔镜结直肠癌根治术对肿瘤细胞微转移影响的研究

周坤¹, 葛海燕²

(1. 重庆市第三军医大学附属新桥医院 急诊科, 重庆 400037; 2. 上海同济大学附属第十人民医院 普通外科, 上海 200072)

摘要:目的 探讨腹腔镜结直肠癌根治术对术后肿瘤微转移的影响。方法 以细胞角蛋白20 (cytokeratin, CK-20) mRNA 为靶基因, 运用逆转录-聚合酶链反应方法 (RT-PCR), 检测48例结直肠癌患者手术前后外周血肿瘤细胞数量的变化。结果 腹腔镜手术组术后外周血肿瘤细胞增加数量高于传统开腹手术组 ($P < 0.05$)。腹腔镜手术组术后外周血肿瘤细胞数量增加的程度与患者年龄无关 ($P > 0.05$) 而与增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 阳性率有明显的关系 ($P < 0.05$)。结论 腹腔镜结直肠癌根治术有增加术后肿瘤血行转移的危险性; PCNA $\geq 50\%$ 的患者如果行腹腔镜结直肠癌根治术, 术后发生血行转移的危险性更大。

关键词: 结直肠肿瘤/外科学; 外科学, 腹腔镜; 肿瘤转移

中图分类号: R730.56; R735.35

文献标识码: A

A study on the influence of laparoscopic resection of colorectal cancer on micrometasis of tumor cells

ZHOU Kun¹, GE Hai-yan²

(1. Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of General Surgery, the 10th Affiliated Hospital, Shanghai Tongji University, Shanghai 200072, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of laparoscopic resection of colorectal cancer on postoperative micrometastasis of tumor cells. **Methods** Using cytokeratin, CK-20 mRNA as target gene, the RT-PCR method was used to examine the pre- and post-operative changes in the number of tumor cells in the peripheral blood of 48 cases of colorectal cancer. **Results** After operation, the number of tumor cells in peripheral blood was significantly higher in the laparoscopic surgery group as compared to that of traditional laparotomy operation group ($P < 0.05$). The degree of increase in the number of tumor cells in peripheral blood after laparoscopic surgery was not related to patient's age ($P > 0.05$), but was significantly related to positive rate of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ($P < 0.05$). **Conclusions** Laparoscopic resection of colorectal cancer may increase the risk of hematogenous tumor metastasis, and this risk is ever higher in patients with PCNA $\geq 50\%$ who undergo laparoscopic resection of colorectal cancer.

Key words: Colorectal Neoplasms/surg; Surgery laparoscopy; Neoplasms Metastasis

CLC number: R730.56; R735.35

Document code: A

近年来腹腔镜技术开始应用于恶性肿瘤根治

术。目前关于腹腔镜恶性肿瘤手术与传统开腹手术对术后肿瘤转移的影响有无差别的研究仍无定论^[1,2]。这些研究结论产生差异的重要原因之一是肿瘤细胞本身的生物学特性对结果有较大的影响^[3,4], 因此开展对诸如结直肠癌等不同类型的肿瘤的研究显然很有必要。本研究以肿瘤标志物细胞角蛋白20 (CK-20) mRNA 为靶基因, 通过逆转录-

收稿日期:2005-07-30; 修订日期:2005-11-25。

作者简介:周坤 (1979-), 男, 四川成都人, 重庆市第三军医大学附属新桥医院硕士研究生, 主要从事结直肠肿瘤治疗及术后肿瘤转移防治方面的研究。

通讯作者:葛海燕 E-mail: haiyange@163.net。

聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测结直肠癌患者手术前后外周血中CK-20的变化(表示肿瘤细胞数量的变化),以探讨腹腔镜结直肠癌根治术对肿瘤术后转移的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 常规试剂 RT-PCR试剂盒,EB(溴化乙锭),DNA Marker,上样缓冲液,TBE电泳缓冲液等由北京鼎国生物技术有限责任公司提供;PBS缓冲液(0.01 mol/L, pH7.2~7.4),三羟甲基氨基甲烷(Tris),总RNA提取试剂(TRIpure)等由本校试剂中心提供;琼脂糖,氯仿,盐酸(HCl),生理盐水,异丙醇,无水乙醇等国产分析纯试剂由本院实验技术中心提供。

1.1.2 RT-PCR用上下游引物 引物扩增片段长度370bp,序列如下(由上海基康生物技术有限公司合成)。上游引物(CKP1)为5'-CAGACACACGGT-GAACTATCG-3';下游引物(CKP2)为5'-GATCAGCT-TCCACTGTTAGACG-3'。

1.2 病例和样本

病例来自本院2003年9月~2004年3月收治的48例原发结直肠腺癌患者(均经术后组织病理检查确诊),其中男32例,女16例;年龄25~82岁(平均56.5岁)。患者随机分为腹腔镜手术组(腹腔镜组,25例)和传统开腹手术组(开腹组,23例)。腹腔镜组中肿瘤分化程度高者1例(4%),中等者16例(64%),低者8例(32%);Dukes A期者0例,Dukes B期者11例(44%),Dukes C期者10例(40%),Dukes D期者4例(16%)。开腹组中肿瘤分化程度高者1例(4.35%),中等者14例(60.87%),低者8例(34.78%);Dukes A期者0例,Dukes B期者9例(39.13%),Dukes C期者9例(39.13%),Dukes D期者5例(21.74%)。两组间比较无明显差异($P > 0.05$)。血液标本均于术前1d及术后第1天晨取自患者肘前静脉,以枸橼酸钠抗凝,-70℃保存。

1.3 实验方法

1.3.1 单个核细胞分离 全血解冻后取2.5mL加入Tris 250μL,12 000r/min高速离心5min;弃上清后细胞沉淀物以PBS(调pH值至7.2)500μL悬浮,12 000r/min高速离心5min,弃上清。

1.3.2 总RNA的提取 以TRIpure试剂提取细胞总RNA,加入经焦碳酸二乙酯处理的双蒸水(DEPC水)10μL重新溶解,于55℃下孵育10min备用。

1.3.3 RT-PCR反应 按如下比例在冰上配制反应体系(总体积50μL):DEPC水25μL,AMVI缓冲液10μL,DNTP 1μL,CKP1 2.5μL,CKP2 2.5μL,硫酸镁(MgSO₄,25mmol/L)2μL,禽成髓细胞瘤病毒(AMV)反转录酶1μL,DNA合成酶(TfDNA酶)1μL,RNA样品5μL;将反应体系于48℃反应45min进行逆转录反应,合成第一条cDNA链,然后于94℃2min灭活AMV逆转录酶及使RNA、cDNA及引物变性。尔后进行标准的PCR反应,循环参数为:变性94℃30s;退火55℃1min;延伸72℃2min;35个循环后最终延伸72℃7min,于4℃保存。

1.3.4 产物分析 定性分析:取产物行2%琼脂糖凝胶电泳,于紫外成像仪下观察并照相记录。凡于370bp处有清晰条带者为阳性,无此条带者为阴性。定量分析:取有阳性结果的PCR产物40μL加入双蒸水80μL混匀后共120μL,以紫外分光光度计测定 $\lambda = 260\text{nm}$ 及 $\lambda = 280\text{nm}$ 时的OD值,以分析纯度及产物量。凡A_{260nm}/A_{280nm}在1.9~2.0者说明纯度好。满足此条件者记录A_{260nm}值准备行数理统计分析。

1.4 统计学处理

采用SPSS11.0统计软件处理。实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性; $P > 0.05$ 为差异无显著性。

2 结果

2.1 手术前后外周血CK-20阳性细胞数量的变化

外周血中CK-20阳性分布情况:术前腹腔镜组阳性者20例(80%),传统开腹手术组15例(65.22%),($P > 0.05$);术后腹腔镜组阳性者20例(80%),传统开腹手术组15例(65.22%),($P > 0.05$),均无差异。腹腔镜组术前外周血CK-20阳性细胞数量少于开腹组($P < 0.05$);腹腔镜结直肠癌根治术后外周血CK-20阳性细胞数量明显高于术前水平($P < 0.01$);腹腔镜结直肠癌根治术后外周血CK-20阳性细胞增加数量明显高于开

腹手术后 ($P < 0.05$) (表1)。

表1 手术前后外周血 CK-20 阳性细胞数量 (以 OD 值表示)

腹腔镜组			开腹组		
术前	术后	差值	术前	术后	差值
1.50±0.46 ^{1),3)}	2.24±0.59 ²⁾	0.75±0.46 ⁴⁾	1.90±0.65 ⁵⁾	2.24±0.68	0.34±0.26

注:1)与开腹组术前值比较 $P < 0.05$; 2)与开腹组术后值比较 $P > 0.05$; 3)与腹腔镜组术后比较 $P < 0.001$; 4)与开腹手术组比较 $P < 0.001$; 5)与开腹组术后比较 $P < 0.05$

2.2 腹腔镜手术前后外周血肿瘤细胞数量与患者年龄的关系

将腹腔镜组患者分为 < 55 岁以及 ≥ 55 岁两个年龄段,两年龄组手术前后 CK-20 阳性细胞数量变化也无明显差别 ($P > 0.05$)。提示患者年龄对腹腔镜术后肿瘤细胞进入外周血循环无明显影响 (表2)。

表2 腹腔镜组内不同年龄段患者手术前后外周血 CK-20 阳性细胞数

< 55 岁组			≥ 55 岁组		
术前	术后	差值	术前	术后	差值
1.60±0.33	2.44±0.50	0.92±0.55	1.43±0.54	2.12±0.63	0.63±0.36

2.3 腹腔镜手术前后外周血肿瘤细胞数量变化与肿瘤 PCNA 的关系

腹腔镜组术中切除肿瘤标本经术后免疫组化染色,CK-20 阳性患者中 PCNA $< 50\%$ 者 10 例,PCNA $\geq 50\%$ 者 13 例。腹腔镜术后外周血肿瘤细胞数量增加与肿瘤的 PCNA 值有明显的相关性 ($P < 0.05$) (表3)。提示肿瘤增殖能力强的患者行腹腔镜手术后可能促进更多的肿瘤细胞进入外周血循环。

表3 腹腔镜手术前后外周血 CK-20 阳性细胞数量变化与肿瘤 PCNA 阳性半定量的关系

PCNA $< 50\%$			PCNA $\geq 50\%$		
术前	术后	差值	术前	术后	差值
1.63±0.53	2.20±0.81	0.49±0.30	1.40±0.40	2.29±0.38	0.95±0.48

注:与 PCNA $\geq 50\%$ 组比较 $P < 0.05$

3 讨论

血行转移是结直肠癌转移的重要途径之一,

也是根治性手术失败的主要原因之一。正常情况下,在血液中常规方法不能检测出癌细胞,故目前血液微转移的定义是凡是能检出血循环中存在癌细胞即提示有微转移存在。微转移概念的提出,是对目前临床分期的极大冲击。研究表明,即使目前临床所谓的“肿瘤早期”,其骨髓、血液、淋巴结、体液可能已经有肿瘤细胞的存在,且骨髓、静脉血癌细胞阳性率同临床分期、生存率及肝转移呈正相关^[5,6]。研究表明,结直肠癌的微转移与患者术后复发和预后密切相关。骆成玉^[7]等通过对 54 例结直肠癌患者的研究发现,术中门静脉的微转移率高达 75.9%;术后 1 年半随访,手术时肝转移阴性而门静脉血阳性的 31 例中有 9 例出现肝转移,而手术时肝转移和门静脉血均阴性的 12 例中仅 1 例发生肝转移,前者显著高于后者 ($P < 0.05$)。Hillaire 等^[8]对 21 例肝癌患者研究发现,术前外周血 9 例有微转移的患者术后有 4 例发现有远处转移,而术前外周血 12 例无微转移的患者术后有 4 例有远处转移,且两者有统计学意义 ($P < 0.05$)。

本研究检测外周血肿瘤细胞所用的肿瘤标志物 CK-20 具有严格的上皮特异性分布,正常血液不表达 CK-20^[9]。Burchill 等^[10]以 CK8,19,20 系列 mRNA 作为靶 RNA,采用核素 RT-PCR 方法,对包括结肠在内的一组培养细胞株及正常志愿者的外周血和骨髓标本进行了检测,发现 CK8 和 CK19 在正常人外周血中均有较高的阳性率,分别为 88% (8/9) 和 40% (6/15); CK-20 在正常外周血和骨髓中却均为阴性 (0/6),而 CK-20 在结肠癌细胞株中均阳性表达。RT-PCR 技术的应用,大大提高了结直肠癌微转移检测的敏感性和特异性^[11],可检测出浓度为 1/106 ~ 1/107 的肿瘤细胞^[12];该技术尤其适用于微量肿瘤细胞的检测。因此,通过检测外周血 CK-20 阳性细胞数量的变化推测腹腔镜肿瘤手术对术后肿瘤转移的影响是可靠的。

虽然目前腹腔镜结直肠癌根治术的安全性受到质疑,但近来许多学者的研究表明^[13,14],采取适当的措施是可以将腹腔镜结直肠癌手术术后肿

瘤转移的危险性控制于较低水平的。其中对于临床工作首要的且具有指导意义的是手术适应证的掌握和选择患者的标准。Anthuber^[15]等报道在6年内接受手术治疗的435例原发直肠癌患者中有选择的只对101例肿瘤早期患者施行腹腔镜手术,而中晚期患者均施行开腹手术;随访结果显示腹腔镜组与开腹手术组在术后病死率、切口肿瘤种植(PSR)发生率等方面没有显著差别。一些学者^[16,17]进行了大量动物实验也表明腹腔镜术后肿瘤转移的危险性和肿瘤的增殖能力相关,本研究结果与之吻合,提示腹腔镜术后发生肿瘤转移的危险性与患者年龄无明显关联,而与肿瘤增殖能力强弱有明显的关系。可见肿瘤的分化程度、增殖能力对腹腔镜术后发生肿瘤转移有很大的影响,不同增殖能力的肿瘤在腹腔镜手术后促进肿瘤细胞进入外周血循环的危险程度是显著不同的。这也提示临床选择腹腔镜手术患者时,应当主要考虑肿瘤的增殖能力,而年龄标准则可以适当放宽,对临床工作有一定的指导意义。

目前引起腹腔镜结直肠癌根治术后患者外周血中肿瘤数量显著增加的机制并未阐明,降低术后肿瘤转移危险性的预防措施也无定论,这些问题对临床工作均有重要的指导意义,值得进一步的研究。

参考文献:

[1] Vukasin P, Ortega AE, Greene FL, *et al.* Wound recurrence following laparoscopic colon cancer resection: results of the American Society of Colon and Rectal Surgeons Laparoscopic Registry [J]. *Dis Colon Rectum*, 1996, 39(10): 20-23.

[2] Neuhaus SJ, Texler M, Hewett PJ, *et al.* Port-site metastases following laparoscopic surgery [J]. *Br J Surg*, 1998, 85(6): 735-741.

[3] Lecuru FR, Agostini AF, Coplet FP, *et al.* Effect of pneumoperitoneum on circulating tumor DNA [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(3B): 2029-32.

[4] Jacobi CA, Bonjer HJ, Puttick MI, *et al.* Oncologic implications of laparoscopic and open surgery [J]. *Surg Endosc*, 2002, 16(3): 441-445.

[5] Soeth E, Vogel L, Roder C, *et al.* Comparative analysis of bone

marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR [J]. *Cancer-Res*, 1997, 57(15): 3106-3110.

- [6] Weitz J, Kienle P, Magener A, *et al.* Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow [J]. *Clin-Cancer-Res*, 1999, 5(7): 1830-1836.
- [7] 骆成玉,李世拥. 结直肠癌患者门静脉血癌细胞的检测及临床意义 [J]. *中华外科杂志*, 1999, 37(4): 214-215.
- [8] Hillaire S, Barbu V, Boucher E, *et al.* Albumin messenger RNA as a marker of circulating hepatocytes in hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 1994, 106(1): 239-242.
- [9] Moll R, Lowe A, Laufer J, *et al.* Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies [J]. *Am J Pathol*, 1992, 140(2): 427-447.
- [10] 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(2): 278-81.
- [11] 林国乐,邱辉忠. 应用逆转录聚合酶链反应技术检测结直肠癌微转移及其临床意义 [J]. *中国实用外科杂志*, 2000, 20(10): 634-636.
- [12] Datta YH, Adams PT, Drobyski WR. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction [J]. *J Clin Oncol*, 1994, 12(3): 475-482.
- [13] Wilkinson NW, Shapiro AJ, Harvey SB, *et al.* Port-site recurrence in the VX-2 rabbit carcinoma model: an in vivo model comparing laparoscopic port-site and open incision [J]. *JSLs*, 2001, 5(5): 221-226.
- [14] Schneider C, Jung A, Reymond MA, *et al.* Efficacy of surgical measures in preventing port-site recurrences in a porcine model [J]. *Surg Endosc*, 2001, 15(2): 121-125.
- [15] Anthuber M, Fuerst A, Elser F, *et al.* Outcome of laparoscopic surgery for rectal cancer in 101 patients [J]. *Dis Colon Rectum*, 2003, 46(8): 1047-1053.
- [16] Targarona EM, Pera M, Martinez J, *et al.* Laparoscopic treatment of pancreatic disorders: diagnosis and staging, palliation of cancer and treatment of pancreatic pseudocysts [J]. *Int Surg*, 1996, 81(1): 1-5.
- [17] Brundell M, Tsopelas C, Chatterton B, *et al.* Experimental study of peritoneal blood flow and insufflation pressure during laparoscopy [J]. *Br J Surg*, 2002, 89(5): 617-622.