

文章编号:1000-5404(2014)14-1515-04

论著

## 两种方法冲洗胃癌腹腔网膜囊囊壁组织的病理诊断检出率对比

庞再林<sup>1</sup>,白 鍊<sup>1</sup>,温泽霖<sup>1</sup>,赵 鹏<sup>1</sup>,李启刚<sup>1</sup>,简 斌<sup>1</sup>,李中福<sup>1</sup>,杨 强<sup>1</sup>,吴 帅<sup>1</sup>,谢 建<sup>1</sup>,廖 娟<sup>2</sup>,钟正福<sup>3</sup>  
(402160 重庆永川,重庆医科大学附属永川医院:普外科<sup>1</sup>,中心实验室<sup>2</sup>,病理科<sup>3</sup>)

**[摘要]** 目的 探讨提高胃癌腹腔网膜囊亚临床转移诊断率的新方式。方法 选取我科2012年1月至2013年10月胃癌手术患者58例,随机分为A、B两组。A组35例应用0.25%胰蛋白酶细胞消化液消化、冲洗胃网膜囊囊壁组织,B组23例采取生理盐水冲洗网膜囊囊壁组织。采用免疫组织化学法与HE染色法检测、对比58例胃癌患者网膜囊冲洗液中癌细胞及CEA、CK7、CK20和HPA的表达。结果 A组患者HE染色阳性16例,阳性率45.71%,免疫组化染色阳性29例,阳性率82.86%。B组患者HE染色阳性4例,阳性率17.39%。免疫组化染色阳性11例,阳性率47.83%。两组数据间差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。胰蛋白酶消化冲洗液肿瘤标志物相关分析中,CEA阳性表达与HPA阳性表达呈正相关( $r = 0.488, P < 0.01$ ),CEA阳性表达与CK7阳性表达呈正相关( $r = 0.389, P < 0.05$ ),CEA阳性表达与CK20阳性表达无相关( $r = 0.299, P > 0.05$ ),CK7、CK20及HPA三者阳性表达呈正相关( $P < 0.05$ )。结论 胰蛋白酶细胞消化液网膜囊冲洗可提高胃癌腹腔亚临床转移的诊断率,免疫组化联合检测CEA、CK7、CK20及HPA,较单个肿瘤标志物检测胃癌腹腔网膜囊亚临床转移敏感性高。

**[关键词]** 胃癌;网膜囊转移;胰蛋白酶细胞消化液;免疫组织化学染色

**[中图分类号]** R73-37;R730.4;R735.2

**[文献标志码]** A

## Comparison and analysis of trypsin solution vs normal saline washing for omental bursa in gastric carcinoma for metastasis diagnosis

Pang Zailin<sup>1</sup>, Bai Lian<sup>1</sup>, Wen Zelin<sup>1</sup>, Zhao Peng<sup>1</sup>, Li Qigang<sup>1</sup>, Jian Bin<sup>1</sup>, Li Zhongfu<sup>1</sup>, Yang Qiang<sup>1</sup>, Wu Shuai<sup>1</sup>, Xie Jian<sup>1</sup>, Liao Juan<sup>2</sup>, Zhong Zhengfu<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of General Surgery, <sup>2</sup>Department of Central Laboratory, <sup>3</sup>Department of Pathology, Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 402160, China)

**[Abstract]** **Objective** To compare the trypsin solution and normal saline washing methods of omental bursa in gastric carcinoma for metastasis diagnosis. **Methods** We selected 58 patients with gastric carcinoma in our hospital from January 2012 to October 2013. The patients were randomly divided into 2 groups, group A ( $n = 35$ ) with omental bursa digestion and washing by 0.25% trypsin-EDTA solution and group B ( $n = 23$ ) with omental bursa washing by normal saline. The expression of carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin 7 (CK7), cytokeratin 20 (CK20) and heparanase (HPA) in the washing precipitation from the 58 patients was tested by immunohistochemical assay and hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** In group A, 16 cases showed positive results in HE staining, with positive rate 45.71%, and 29 cases showed positive results in immunohistochemical assay, with positive rate 82.86%. In group B, 4 cases showed positive results in HE staining, with positive rate 17.39%, and 11 cases showed positive results in immunohistochemical assay, with positive rate 47.83%. The difference was statistically significant ( $P = 0.005$ ). In the correlation analysis of tumor markers by the trypsin solution washing method, CEA was positively correlated with HPA ( $r = 0.488, P < 0.01$ ) as well as CK7 ( $r = 0.389, P < 0.05$ ), but not correlated with CK20 ( $r = 0.299, P > 0.05$ ). There were significant correlation among positive expression of CK7, CK20 and HPA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Omental bursa digestion and washing by trypsin-EDTA solution improves the diagnosis of peritoneal subclinical metastasis of gastric cancer. As compared to a single tumor marker, combined detection of CEA, CK7, CK20

**[基金项目]** 重庆市永川区科委项目(YCSTC2012BE5003)

**[通信作者]** 白 鍊, E-mail:exy\_8966@aliyun.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140621.0850.005.html>(2014-06-21)

and HPA by immunohistochemical assay increases the diagnosis sensitivity of subclinical metastasis, providing a theoretical basis for individualized treatment and prognosis.

[Key words] gastric carcinoma, omental bursa metastasis, trypsin-EDTA solution, immunohistochemistry

Supported by the Project of Science and Technology Commission of Yongchuan District, Chongqing (YCSTC2012BE5003). Corresponding author: Bai Lian, E-mail: cxy\_8966@aliyun.com

胃癌是我国常见的消化道肿瘤,以进展期胃癌最为多见,手术治疗效果不佳,术后局部复发率可达38%~45%<sup>[1]</sup>。腹腔种植转移为胃癌根治术后复发的主要方式,是胃癌预后不良的独立危险因素。认识肿瘤腹腔转移途径,制定合理的手术切除范围,提高胃癌术后生存率,是胃肠外科医师面临的严峻挑战。

近年来,随着胃癌分子生物学的研究,腹腔肿瘤转移微环境被进一步认识,检测胃癌腹腔亚临床转移的分子标志物增多,通过对腹腔冲洗液检测肿瘤转移相关分子生物学标志物,有效地提高了肿瘤腹腔亚临床转移的诊断。既往研究常用生理盐水冲洗腹腔,检测冲洗液中肿瘤转移的分子标志物诊断胃癌腹腔亚临床转移。但是仅生理盐水冲洗,难以有效改变腹腔炎性产物以及黏附因子<sup>[2-5]</sup>等对肿瘤细胞黏附、聚集作用,致使肿瘤细胞冲洗检出率较低。实验研究胰蛋白酶细胞消化液可有效溶解细胞间粘连蛋白及黏附分子,可有效获取单细胞悬液<sup>[6]</sup>。本实验采用0.25%胰蛋白酶细胞消化液和生理盐水两种冲洗液方法冲洗网膜囊囊壁组织,检测冲洗液中脱落癌细胞及肿瘤分子标志物CEA、CK7、CK20及HPA,对比分析检测结果。探索胃癌腹腔网膜囊组织冲洗的新方式,以期提高胃癌腹腔亚临床转移诊断的敏感性,指导临床治疗。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取2012年1月至2013年10月我科诊断为胃癌患者76例,所有患者均经电子胃镜检查定位并取得病理确诊,均住院行手术治疗。按患者入院时编号,采取随机数字表法随机分为A、B两组。资料纳入标准:①在我院行胃癌D2根治术;②术前行彩超、CT或MRI等辅助检查无远处转移证据;③术前行放疗等特殊治疗;④术中探查胃部肿瘤未突破浆膜层,腹腔无肉眼所见转移灶;⑤术中尽量完整剥取网膜囊囊壁组织达整块组织2/3以上者。按上述标准排除18例(浸透浆膜层10例,肝转移2例,胰腺转移2例,术中取材不完整4例),选择入组病例58例,其中A组35例,B组23例。男性36例,女性22例。年龄34~74(54.8±10.3)岁,两组患者基本资料对比分析无统计学差异( $P>0.05$ ,表1)。

### 1.2 标本采集

术中取横结肠系膜前叶、胰腺被膜、胃胰皱襞等网膜囊囊壁组织。A组取网膜囊囊壁组织行预热10 min 37℃的0.25%胰蛋白酶细胞消化液50 mL反复冲洗,吹打浆膜面,直至浆膜

面变苍白,PBS液冲洗网膜囊浆膜面3次,加入数滴胎牛血清终止消化。B组取网膜囊囊壁组织行生理盐水50 mL反复冲洗。取冲洗液302×g离心沉淀20 min,取沉淀物加入细胞固定液20 mL,薄层液基细胞涂片仪制片行HE及免疫组织化学染色检查。

表1 两组胃癌患者临床病理资料对比分析(例)

临床参数	A组(n=35)	B组(n=23)	$\chi^2$	P
性别				
男	23	13	0.498	0.480
女	12	10		
年龄(岁)				
>50	22	13	0.233	0.629
≤50	13	10		
肿瘤部位				
胃前壁	15	11	0.139	0.710
胃大小弯侧或胃后壁	20	12		
肿瘤分化程度				
中、高分化	22	15	0.033	0.855
低、未分化或印戒细胞癌	13	8		
肿瘤浸润深度				
T1	14	12	0.951	0.622
T2	12	7		
T3	9	4		
淋巴结转移情况				
≤2个	20	16	0.910	0.340
>2个	15	7		

### 1.3 HE及免疫组织化学检测

取薄层液基图片行常规HE染色,染色结果由我院两位病理科专家阅片找脱落癌细胞。选取鼠抗人单克隆抗体HPA(购自武汉博士德生物工程公司)、鼠抗人单克隆抗体CEA、鼠抗人单克隆抗体CK7(购于福州迈新生物技术公司)、鼠抗人单克隆抗体CK20及S-P免疫组化染色试剂盒(均购于北京中杉生物技术公司)。抗体均行1:200稀释,4℃冰箱保存备用。取液基涂片免疫组化染色,按S-P染色试剂盒染色说明书,行微波抗原修复,PBS液代替一抗行阴性对照。阳性结果判定:根据Fadda等<sup>[7]</sup>报道每张涂片20%细胞数呈现棕黄色表现即为阳性,4种肿瘤标志物当中任一标志物染色阳性表达即视为癌细胞腹腔网膜囊脱落转移。阳性对照以胃癌肿瘤区域免疫组化染色为准。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件包进行分析,采用 $\chi^2$ 检验和确切概率法、Spearman等级相关分析法处理数据。

## 2 结果

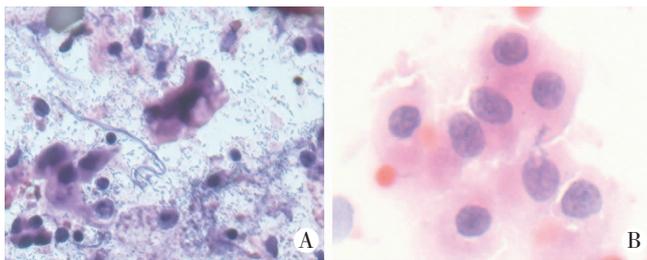
### 2.1 胰蛋白酶细胞消化液与生理盐水两种冲洗液离心涂片HE及免疫组化染色结果

胰蛋白酶细胞消化液冲洗脱落细胞HE染色阳性率

45.71%,生理盐水冲洗脱落细胞 HE 染色阳性率 17.39%,对比分析提示差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。免疫组化染色结果:胰蛋白酶细胞消化液冲洗脱落癌细胞肿瘤标志物联合检测诊断阳性率 82.86%,生理盐水冲洗脱落癌细胞肿瘤标志物联合检测诊断阳性率 47.83%,比较分析提示胰蛋白酶细胞消化液冲洗可提高胃癌腹腔网膜囊癌细胞脱落转移诊断的阳性率( $P < 0.05$ ,表 2,图 1,2)。

表 2 两种网膜囊冲洗液免疫组化及 HE 染色结果比较分析 [例(%)]

检测指标	胰蛋白酶细胞消化液(n=35)	生理盐水(n=23)	$\chi^2$	P
HE(+)	16(45.71)	4(17.39)	4.928	0.026
CEA(+)	25(71.43)	8(34.78)	7.600	0.006
CK7(+)	24(68.57)	9(39.13)	4.905	0.027
CK20(+)	22(62.86)	7(30.43)	5.836	0.016
HPA(+)	17(48.57)	5(21.74)	4.244	0.039
CEA(+)/CK7(+)	20(57.14)	6(26.09)	5.412	0.020
CEA(+)/CK20(+)	18(51.43)	5(21.74)	5.112	0.024
CEA(+)/HPA(+)	17(48.57)	5(21.74)	4.244	0.039
CK7(+)/CK20(+)	20(57.14)	7(30.43)	3.979	0.046
CK7(+)/HPA(+)	17(48.57)	5(21.74)	4.244	0.039
CK20(+)/HPA(+)	16(45.71)	5(21.74)	3.454	0.063
CEA(+)/CK7(+)/CK20(+)	18(51.43)	5(21.74)	5.112	0.024
CEA(+)/CK7(+)/HPA(+)	17(48.57)	5(21.74)	4.244	0.039
CK7(+)/CK20(+)/HPA(+)	17(48.57)	4(17.39)	5.842	0.016
CEA(+)/CK20(+)/HPA(+)	16(45.71)	4(17.39)	4.928	0.026
任意标志物(+)	29(82.86)	11(47.83)	7.958	0.005



A:胰蛋白酶细胞消化液;B:生理盐水

图 1 胃癌网膜囊组织两种冲洗液离心涂片癌细胞显微观察结果 (HE ×400)

## 2.2 胰蛋白酶细胞消化液冲洗检测中 CEA、CK7、CK20 及 HPA 表达及相关分析

胰蛋白酶细胞消化液冲洗液肿瘤标志物相关分析结果提示:CEA 阳性表达与 HPA 阳性表达呈正相关( $r = 0.488, P < 0.05$ ),CEA 阳性表达与 CK7 阳性表达呈正相关( $r = 0.389, P < 0.05$ ),CEA 阳性表达与 CK20 阳性表达无相关( $r = 0.299, P > 0.05$ ),CK7、CK20 及 HPA 三者阳性表达呈正相关( $r_{CK7/CK20} = 0.626, r_{CK7/HPA} = 0.658, r_{CK20/HPA} = 0.629, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

手术为进展期胃癌治疗的主要方式。腹腔种植转移是胃癌无法手术根治的重要原因。腹腔冲洗液细胞学(peritoneal lavage cytology, PLC)检测已作为诊断胃癌细胞腹腔脱落转移的常规方法,在日本《胃癌处理规约》当中已经作为远处转移的依据之一。但是,当肿瘤细胞脱落入腹腔或浸润于“第五转移”<sup>[8]</sup>区内,受肿瘤细胞各种炎性因子、黏附分子等产物的影响<sup>[9]</sup>,浸润、定植于浆膜面,生理盐水冲洗难以有效的冲洗出黏附、定植于浆膜面的癌细胞,并且在腹腔脱落癌细胞较少的情况下,PLC 对微量癌细胞检测的敏感性低。因此,探索有效的网膜囊冲洗方式,成为提高胃癌腹腔网膜囊转移诊断的关键。胰蛋白酶消化技术<sup>[10]</sup>作为传统的单个细胞制备技术,常用细胞培养过程中单细胞的获取。本实验中,通过胰蛋白酶细胞消化液作用于手术剥离的网膜囊囊壁组织<sup>[11]</sup>,改变了传统的冲洗方式。经酶消化作用于脱落入网膜囊腔并定植于浆膜面的肿瘤细胞,解除细胞间炎性蛋白及纤维性渗出物的黏附,可增加癌细胞的脱落检出率。实验结果分析提示,胰蛋白酶细胞消化冲洗液癌细胞的检出率较生理盐水冲洗组明显提高( $P < 0.05$ )。实验中免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC)检测冲洗脱落

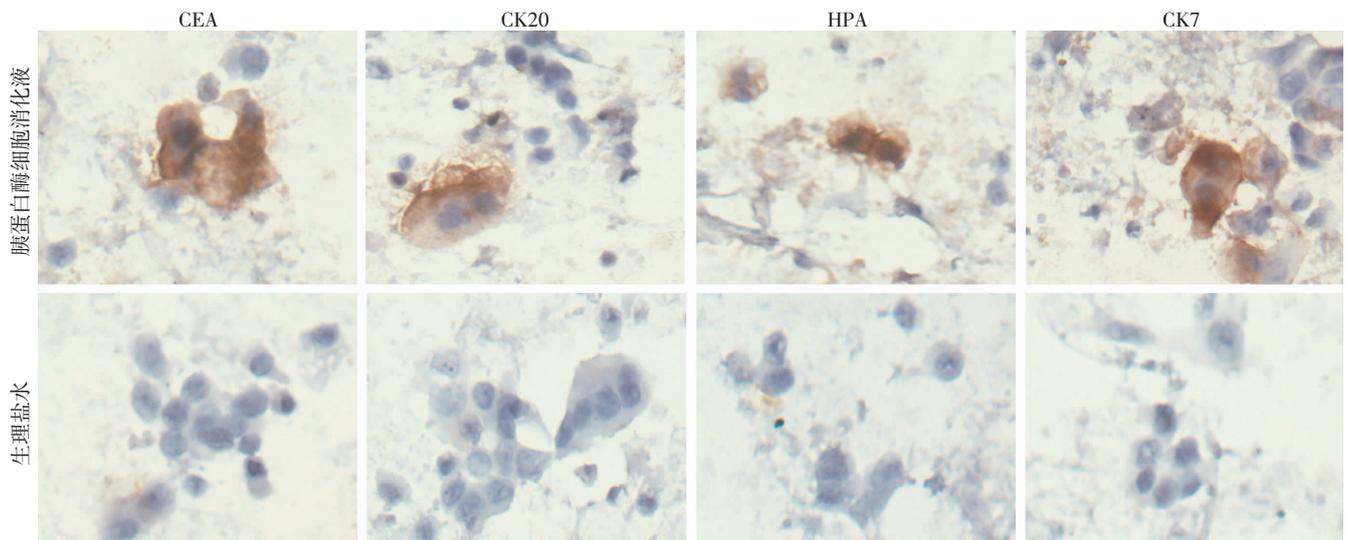


图 2 两种方法冲洗胃癌网膜囊组织癌细胞后涂片免疫组化染色结果 (S-P ×400)

细胞胃癌分子生物学标志物分析显示:经胰蛋白酶细胞消化液冲洗后,脱落癌细胞肿瘤标志物检测阳性率较生理盐水冲洗组明显提高( $P < 0.05$ )。而生理盐水冲洗组检测结果与既往报道一致。因此,胰蛋白酶细胞消化液网膜囊冲洗,可提高胃癌腹腔网膜囊脱落癌细胞诊断的敏感性。

诊断胃癌腹腔亚临床转移的肿瘤标志物众多,癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)主要表达于消化道肿瘤的细胞膜与细胞质中,在诊断胃癌脱落转移方面具有较高的敏感性与特异性<sup>[12-13]</sup>。细胞角蛋白(cytokeratin,CK)是一种细胞骨架蛋白,其亚型CK7/CK20在胃肠道原发性肿瘤中具有较高的阳性表达<sup>[14-15]</sup>。乙酰肝素酶(Heparanase,HPA)在胃癌肿瘤细胞浸润转移中发挥了重要的作用,在预测胃癌腹膜转移和腹膜亚临床转移方面具有较高的敏感性与特异性<sup>[16]</sup>。既往对以上4种肿瘤标志物的研究报告中,多为单个标志物或两两结合检测,在提高胃癌腹腔网膜囊亚临床转移方面,具有一定临床意义。本实验通过联合CEA、CK7、CK20及HPA4种肿瘤标志物,检测胃癌网膜囊脱落癌细胞,诊断阳性率达82.86%,较CK20、HPA或两两结合检测阳性率明显增高( $P < 0.05$ ),与CEA及CK7比较显示,联合检测阳性率虽有提高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),分析原因可能是由于实验样本例数、病期判断等因素有关,有待大样本临床试验进一步验证。在免疫组化CEA、CK7、CK20和HPA检测相关分析中,CK7、CK20与HPA三者阳性表达呈正相关( $P < 0.05$ ),表明CK7、CK20及HPA在胃癌腹腔网膜囊脱落癌细胞检测中具有协同作用。因此,联合检测CK7、CK20和HPA可有效提高胃癌细胞腹腔网膜囊脱落转移诊断的敏感性。

本实验创新性地改变网膜囊组织冲洗液性质,对网膜囊组织行新的处理方式,诊断胃癌网膜囊癌细胞脱落转移阳性率明显提高,为预后的判断和术后个体化治疗提供了有效指导。但在实验取材中,手术的机械性操作可能造成癌细胞的脱落转移,致使假阳性的出现。因此还需大样本、前瞻性的临床研究进一步探讨。

#### 参考文献:

[1] Courtney M, Townsend Jr. Stomach[M]//Sabiston D C. Sabiston Textbook of Surgery. Philadelphia: Elsevier Saunders Co., 2012: 1218.  
[2] Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek P W, et al. The inflammatory cyto-

kine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells [J]. Cancer Res, 2005, 65 (22): 10355 - 10362.  
[3] Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, et al. IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (2): 734 - 739.  
[4] Scherbarth S, Orr F W. Intravital videomicroscopic evidence for regulation of metastasis by the hepatic microvasculature: effects of interleukin-1alpha on metastasis and the location of B16F1 melanoma cell arrest [J]. Cancer Res, 1997, 57(18): 4105 - 4110.  
[5] McKenzie R C, Oran A, Dinarello C A, et al. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits subcutaneous B16 melanoma growth in vivo [J]. Anticancer Res, 1996, 16(1): 437 - 441.  
[6] 王志强, 梁锐, 陈明清, 等. 胰蛋白酶消化法和组织块法原代培养人包皮成纤维细胞的比较 [J]. 生命科学研究, 2012, 16(3): 242 - 247.  
[7] Fadda G, Rossi E D, Mule A, et al. Diagnostic efficacy of immunocytochemistry on fine needle aspiration biopsies processed by thin-layer cytology [J]. Acta Cytol, 2006, 50(2): 129 - 135.  
[8] 龚建平. 胃癌第五转移与第三根治原则 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2013, 16(2): 109 - 110.  
[9] Li Z, Miao Z, Jin G, et al.  $\beta$ ig-h3 supports gastric cancer cell adhesion, migration and proliferation in peritoneal carcinomatosis [J]. Mol Med Rep, 2012, 6(3): 558 - 564.  
[10] 戴国, 李焯, 彭彬, 等. AcSDKP 对体外培养条件下人骨髓间充质干细胞增殖周期的影响 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2010, 33(4): 115 - 120.  
[11] 陈心足, 杨昆, 胡建昆, 等. 完整网膜囊切除在腹腔镜辅助胃癌根治术中的可行性与安全性 [J]. 消化肿瘤杂志: 电子版, 2012, 4(2): 89 - 92.  
[12] Rossi-Del-Monte S, Ranieri D, Mazzetta F, et al. Free peritoneal tumor cells detection in gastric and colorectal cancer patients [J]. J Surg Oncol, 2012, 106(1): 17 - 23.  
[13] Yamamoto M, Yoshinaga K, Matsuyama A, et al. CEA/CA72-4 levels in peritoneal lavage fluid are predictive factors in patients with gastric carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(4): 607 - 612.  
[14] Takami H, Sentani K, Matsuda M, et al. Cytokeratin expression profiling in gastric carcinoma: clinicopathologic significance and comparison with tumor-associated molecules [J]. Pathobiology, 2012, 79 (3): 154 - 161.  
[15] Lee S R, Kim H O, Shin J H, et al. Prognostic significance of quantitative carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 mRNA detection in peritoneal washes of gastric cancer patients [J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(125): 1237 - 1244.  
[16] 张昊. 应用 Real-time RT-PCR 进行胃癌腹膜亚临床转移相关标志物的检测 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.

(收稿:2014-02-06;修回:2014-03-21)

(编辑 王红)