

流式细胞术检测食管鳞癌淋巴结微转移的临床病理意义

刘向明 赵锡江 张熙曾

天津市肿瘤防治重点实验室 天津医科大学附属肿瘤医院食管肿瘤科 (天津市 300060)

摘要 目的: 选定食管鳞癌特异性标记物 CK-19 用流式细胞术检测食管鳞癌区域淋巴结是否存在微转移, 分析其与预后的关系, 探寻“逆向预后”的原因, 指导临床治疗。方法: CK-19 基因表达于食管上皮组织, 但在正常淋巴结不表达。1998 年 1 月至 1999 年 12 月随机抽取根治性切除食管鳞癌 100 例, 共清扫出淋巴结 1248 枚。用流式细胞术检测光镜下阴性的淋巴结分析影响淋巴结微转移的相关因素。结果: 279 枚常规病理学检测转移的淋巴结经流式检测证实, 67 例及 969 枚光镜阴性淋巴结, 流式细胞术检测其中 28 例及 156 枚淋巴结有微小转移, 其微小转移率为 41.8%, 微小转移度为 16.1%, 其 1、3、5 年生存率分别为 82.1%、53.5% 及 14.3%。淋巴结微小转移与病变浸润深度及癌细胞分化程度有关, 而与年龄、性别、病变部位、病变长度及分期无关。淋巴结微转移和预后密切相关。结论: 食管癌区域淋巴结确实存在普通光镜难以发现的微小转移, 部分淋巴结阴性患者生存期短预后差原因可能与该患者存在淋巴结微小转移有关即“逆向预后”, 因此对食管癌手术标本应常规检测其淋巴结微转移, 对存在淋巴结微转移者, 术后给予相应的辅助治疗。

关键词 流式细胞术 食管鳞癌 淋巴结 微转移

The Clinical and Pathological Significance of Detection of Lymph Node Micrometastasis by Flow Cytometry in Esophageal Squamous Carcinoma

Liu Xiangming Zhao Xijiang Zhang Xizeng

Esophageal Department, Tianjin Cancer Institute & Hospital, Tianjin

Abstract Objective: To investigate the expression of CK-19 in the resected lymph nodes of esophageal carcinoma patients using FITC-labeled flow cytometry and to analyze the correlation between lymph node micrometastasis and prognosis. Methods: The CK-19 gene is expressed in esophageal epithelium and it is not expressed in normal lymph nodes. A total of 100 patients were selected randomly from those who underwent radical surgery for esophageal carcinoma from January 1998 to December 1999, and 1248 lymph nodes were collected from these patients to be assessed for CK-19 expression by flow cytometry. Results: Two hundred and seventy-nine lymph nodes were confirmed to contain metastasis by both routine pathology and FITC-labeled flow cytometry. The other 969 lymph nodes without metastasis according to pathology were retested with FITC-labeled flow cytometry. Based upon the flow cytometry data, 156 lymph nodes from 28 patients showed micrometastasis(MM). The micrometastatic rate was 41.8%, and the micrometastatic degree was 16.1%. The 1-, 3-, and 5-year survival rates in MM(+) patients were 82.1%, 53.6%, and 14.3%, respectively. Micrometastasis was correlated with tumor cell differentiation and infiltrative depth of the tumor, and it was not correlated with age, gender distribution, and tumor stage. Lymph node micrometastasis was correlated with prognosis. Conclusion: Micrometastases, which cannot be detected microscopically, exist in the lymph nodes in the region of esophageal carcinoma. The poor prognosis of some patients without microscopically de-

tectable metastasis was attributable to micrometastasis. We suggest that the detection of micrometastasis by FITC- labeled flow cytometry should be a standard procedure so that those patients with micrometastasis can receive proper treatment.

Key words FITC Esophageal carcinoma
Lymph node micrometastasis Micrometastasis

食管癌是常见的恶性肿瘤，在世界范围内我国属高发病国家，临床上评估食管癌患者的预后主要依据 UICC 的 TNM 分期。一般情况下肿瘤分期越早，预后越好，但也常发现有些病例虽 TNM 分期较早，却在术后短时间内发生淋巴结转移。本研究试图应用流式细胞术检测食管癌标本的淋巴结是否存在微转移，并分析其与预后的关系，进而指导临床治疗，以提高患者的生存率。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1998 年 1 月至 1999 年 12 月，天津医科大学附属医院肿瘤医院行食管癌根治切除的手术病例随机抽取 100 例，所有病例均经病理证实为鳞癌。依 UICC 的 TNM 标准(1997)分期，94 例有 5 年以上完整随访记录，6 例失访按死亡计(表 1)。

表 1 患者及其临床资料 例

项目		男性	女性
例数		70	30
平均年龄(岁)		59	62
病变长度(cm)	3	17	7
	3<a<5	29	9
	5	30	14
肿瘤部位	胸上段	3	2
	胸中段	43	19
	胸下段	24	9
浸润深度	T ₁	2	1
	T ₂	21	12
	T ₃	39	12
	T ₄	8	5
分化程度	高中度分化	43	20
	低分化	27	10
TNM 分期		2	0
	a	20	9
	b	26	12
		22	9

1.2 流式细胞术检测

100 例手术标本共清扫出淋巴结 1248 枚，按光镜病理淋巴结有无转移分类。取淋巴结蜡块标本，经二甲苯脱蜡，梯度酒精水化及 PBS 溶液缓冲后，将标本剪碎、过滤、离心，所得细胞沉淀分别加入 2 支流式标本管，一管加单抗 10ul；另一管加入同型对照。置 30min，上机检测。

FCM 为美国 Coulter 公司生产(型号: EPICSXL-MCL)。所用试剂为 BD Biosciences Pharmingen 公司生产 Cytokeratin-19。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件包统计分析，百分率之间的比较用 ² 检验，采用 Logistic regression 进行多因素分析，COX 模型多因素分析预后因素。

2 结果

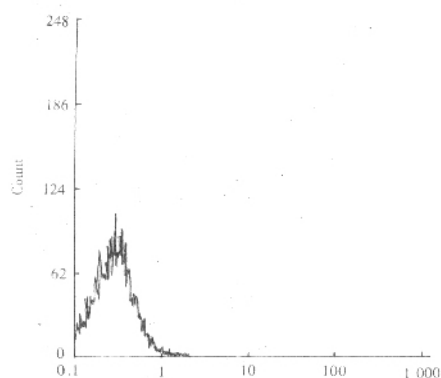
手术切除 100 例中，共清扫出淋巴结 1248 枚，其中 67 例及 969 枚淋巴结 HE 染色阴性，1、3、5 年生存率分别为 89.6%、71.6%及 47.8%。33 例及 279 枚 HE 阳性者，经流式细胞仪检测淋巴结阳性 279 枚，诊断符合率为 100%；67 例及 969 枚阴性淋巴结者经流式细胞仪检测，其中 28 例及 156 枚淋巴结有微小转移，其微小转移率为 41.8%，微小转移度为 16.1%，其 1、3、5 年生存率分别为 82.1%、53.5%及 14.3%；39 例及 813 枚无微小转移者，其 1、3、5 年生存率分别为 94.9%、84.6%及 71.8%。

经统计学分析发现淋巴结微转移与年龄、性别、病变长度及分期无关，而与病变浸润深度及癌细胞分化程度紧密相关，见表 2。

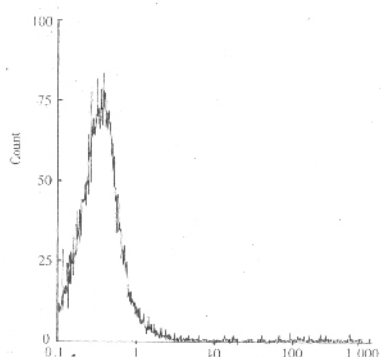
由 Logistic Regression 多因素分析可知，肿瘤浸润深度对淋巴结微转移有影响，P=0.000，OR=11.273；肿瘤分化程度与淋巴结也有关，P=0.011，OR=0.68。由 Cox 模型多因素分析预后因素可知，淋巴结与预后相关，P=0.001，OR=3.706，组强分化等级与预后亦相关，P=0.005，OR=2.833。光镜下阴性淋巴结经流式细胞仪检测，结果见图 1，图 2。

表2 HE染色阴性者淋巴结微转移与诸因素的关系 例

项目	MM(+)	MM(-)	P值
病变长度(cm)			
3	7	12	0.792
3<a<5	8	12	
5	13	15	
肿瘤部位			
胸上段	2	1	0.571
胸中段	16	26	
胸下段	10	13	
浸润深度			
T ₁	0	2	0.006
T ₂	5	21	
T ₃	16	13	
T ₄	7	3	
分化程度			
高中度分化	5	30	<0.001
低分化	23	9	
TNM分期			
	0	2	0.082
a	21	34	
	7	3	



光镜下病理 T₁N₀M₀, 中高分化
图1 无淋巴结微小转移患者流式细胞图



光镜下病理 T₂N₀M₀, 中高分化
图2 淋巴结微小转移患者流式细胞图

3 讨论

临床上有一些食管鳞癌患者肿瘤分期较早, 无明显的转移证据, 但在术后短时间内发生转移或死于癌转移, 这说明患者术前可能已存在常规病理学方法不能检出的癌细胞播散或隐性淋巴结转移^[1-3]。这种隐性淋巴结转移也称微小转移, 即: 恶性肿瘤发

展过程中, 播散并存在于血液循环、淋巴结、骨髓及各组织器官中的肿瘤细胞, 尚未形成明显转移灶, 且无任何临床表现, 按常规病理学、影像学方法难以发现和监测到的转移。

区域淋巴结转移(TNM分期)是食管癌重要的不利预后因素, 多数患者死于手术后肿瘤复发; 无淋巴结转移(TNM分期 N₀期)的食管癌患者, 根治切除后5年生存率可达70%, 但也仍有部分患者发生肿瘤的早期复发。N₀期食管癌患者手术后肿瘤的早期复发, 可能与常规病理检查漏诊的淋巴结微转移有关。目前HE染色常规病理检查是诊断食管癌淋巴结转移的标准方法, 但这种方法对淋巴结微小转移灶的漏诊率高达20%^[4], 淋巴结微转移导致了对于TNM分期的低估, 有淋巴结微转移者手术后早期复发率高于无转移者7倍^[5]。

流式细胞术检测癌的淋巴结微转移是一种快速有效的方法。当人体发生癌变时, 在其发生、发展过程中可伴随细胞DNA含量的异常改变, FCM可精确定量DNA含量的改变, 免疫组化目前应用广泛, 是一种形态学的方法。利用作为特异性上皮性标志物的一些单克隆抗体, 通过免疫组化染色来显示局部淋巴结内的癌细胞, 而RT-PCR法是依赖于特异标志基因扩增检测淋巴结标志mRNA, 来检测淋巴结微转移, 较免疫组化检测有更高的敏感性和检出率, 但也常出现非特异性扩增, 造成假阳性^[6]。Rostagno等^[7]的研究显示其灵敏度可达1/50 000, 与RT-PCR相比能更精确的定量, 但因其价格较昂贵, 较少采用。由于国人食管癌95%为鳞状细胞癌, 因而选用“上皮组织特异性标志物”——CK-19(Cytokeratin-19)作为检出标志物。CK-19基因在正常食管粘膜及相应来源的食管鳞癌中有表达, 而在正常淋巴结中无表达, 是较为理想的检测食管癌淋巴结微转移的标志物, 通过CK-19基因检测淋巴结微转移, 具有较高的灵敏度及准确度^[8]。

本研究33例及279枚淋巴结HE染色阳性者, 经流式细胞术检测淋巴结阳性279枚, 符合率为100%。67例及969枚阴性淋巴结中28例156枚淋巴结有微小转移, 其微小转移率为41.8%, 微小转移度为16.1%, 其1、3、5年生存率分别为82.1%, 53.5%及14.3%; 39例及813枚无微小转移者, 其1、3、5年生存率分别为94.9%、84.6%及71.8%。

肿瘤对食管壁侵及深度和淋巴结转移的发生率及淋巴结转移数量之间存在正相关关系^[9], 而食管癌淋巴结确实存在HE染色难以发现的微小转移, 微转移与肿瘤的分化程度及浸润深度有密切关系, 肿瘤分化越差, 浸润越深微转移的发生率越高; 微转

移也与预后有明显的关系,无微转移者预后明显好于有微转移者,与许运龙等^[10]的报道相符。

目前的 PTNM 分期存在缺陷,它难以解释临床常见的“逆向预后现象”(即:PTNM 分期早,而生存时间短;反之,PTNM 分期较晚者,有时生存时间却较长),这可能与淋巴结存在光镜不易发现的微转移有关。据 Hermanek 等^[11]报道,局部淋巴结常规病理检查无转移的食管癌患者,骨髓和淋巴结内的孤立性肿瘤细胞(isolate tumor cells, ITC)检出率可分别高达 40%和 25%~50%。这些在临床上日益被作为相关的预后标志和评价辅助治疗效果的标志,甚至被作为选择破坏性手术或辅助治疗的标准,从而导致了 TNM 分期系统的不同解释和应用的差异。我们认为对食管癌检测淋巴结的微转移应作为一种常规方法,用流式细胞仪检测出 ITC 病例在 pN₀ 后括号内加“mi”表示以区别不同同类型 pN₀ 病例。pN₀(mi-)代表常规病检局部淋巴结癌转移(-),流式细胞仪检测 ITC(-);pN₀(mi+)代表常规病检局部淋巴结癌转移(+),流式细胞仪检测 ITC(+).对有局部淋巴结微转移的病例,则在 pN₀ 后括号内加“mi”表示如 pN₁(mi)。微转移检测应作为 PTNM 分期的补充。对微转移阳性者,术后应按有淋巴结转移对待,给予相应的辅助治疗。

参考文献

- 1 Izbickei JR, Hosch SB, Pichlmeier U, et al. Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer [J]. N Engl J Med, 1997, 337(17): 1188~1194
- 2 Natsugoe S, Mueller J, Stein HJ, et al. Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma: frequency, associated tumor characteristics, and impact on prognosis[J]. Cancer, 1998, 83(5): 858~866
- 3 Glickman JN, Torres C, Wang HH, et al. The prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with esophageal carcinoma[J]. Cancer, 1999, 85(4): 769~778
- 4 王 洲,刘相燕,刘凡英.食管癌淋巴结隐匿性转移的基因诊断[J].中国癌症杂志,2002,12(4):317~319
- 5 王 洲,刘相燕,刘凡英,等.N₀期食管癌术后早期复发与淋巴结微转移的相关性研究[J].中华外科杂志,2004,42(2):68~71
- 6 张兆祥,朱忠尧.食管癌淋巴结微转移的研究进展 [J].中国肿瘤临床,2004,21(7):416~419
- 7 Rostagno P, Moll J, Bisconte JC, et al. Detection of rare circulating breast cancer cells by filtration cytometry and identification by DNA content: sensitivity in an experimental model [J]. Anticancer Res, 1997, 17(4A): 2481~2485
- 8 顾 林,冯玉梅,潘乐康,等.应用 RT-PCR 法检测 CK-19 表达提高乳腺癌前哨淋巴结微转移检出的研究 [J]. 中国肿瘤临床,2004,31(3):144~148
- 9 张 逊.食管癌 TNM 分期的现状及发展趋势[J].中华肿瘤杂志,2004,26(11):641~644
- 10 许运龙,郭昭扬.胸部食管癌转移淋巴结数与预后的临床研究[J].中华肿瘤杂志,2000,22(3):244~246
- 11 Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, et al. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis[J]. Cancer, 1999, 86(12): 2668~2673

(2007-01-03 收稿)

(2007-07-10 修回)

(董恒磊校对)

《中国肿瘤临床》杂志网站开通

借助现代信息技术,使刊物进一步贴近科研与实践,跟上国际网络化步伐,更及时有效地反映国内外肿瘤研究最新进展,《中国肿瘤临床》杂志网站于 2005 年 10 月 1 日正式开通(<http://www.cjco.cn>)。

独立网站的开通,将大大缩短读者、作者、编者的距离,为国内外肿瘤学科临床医生、研究人员以及医学院校从事肿瘤医学教育工作者提供又一全新快捷的学术园地。我们将充分利用这一崭新的互动交流平台,为关心和支持我们的广大读者、作者提供知识更新课堂,为连接肿瘤学科基础理论与临床应用架起高效的信息桥梁。

《中国肿瘤临床》网站依托杂志本身,通过杂志概况、投稿指南、杂志新闻、下期预告、本期文章、网上审稿、在线投稿、稿件查询、广告发布等栏目,对实用信息进行有效的整合,为读者和作者提供高品质的信息内容和服务。

《中国肿瘤临床》杂志网站的开通是杂志创刊 44 年来的又一件大事,是传统纸型期刊向数字化期刊迈出的大一步。网站界面新颖和谐,内容丰富,功能实用,更新快捷。我们殷切希望在广大读者和作者的支持下不断完善,最终成为大家喜爱的专业网站。