

结直肠癌淋巴微转移免疫组化检测及其意义

程明荣 程志俭[△] 蔡元坤 赵家应 徐宏智
(复旦大学附属上海市第五人民医院普外科 上海 200240)

【摘要】 目的 观察Ⅰ、Ⅱ期结直肠癌术后病理因素和淋巴结微转移对术后5年无瘤生存率的影响。方法 纳入研究对象为Ⅰ、Ⅱ期结直肠癌患者共126例,均为我院胃肠组行结直肠癌根治术者,术后随访64~106月。平均每例结直肠癌患者检查淋巴结数10枚以上,将所有淋巴结进行免疫组化染色。对10个临床病理因素与免疫组化表达的关系及微转移对5年无瘤生存率的影响进行统计分析。结果 多因素分析仅见“淋巴管侵犯”与淋巴结免疫组化表达阳性有正相关,而其他临床病理因素与淋巴结免疫组化表达均无明显相关性。淋巴结免疫组化表达阴性、孤立肿瘤细胞巢(isolated tumor cells,ITCs)和微转移(micrometastasis,MCM)的患者,5年无瘤生存率分别为78.7%、65.5%和43.8%。ITCs与淋巴结(-)的患者5年无瘤生存率差异无统计学意义($P=0.144$),而MCM与淋巴结(-)的患者5年无瘤生存率差异有统计学意义($P=0.005$)。结论 对于Ⅰ、Ⅱ期结直肠癌患者,若淋巴结中检测出有微转移,其预后较差,术后复发率较高,术后应予以积极的辅助治疗。

【关键词】 结直肠癌; 淋巴结微转移; 上皮膜抗原; 癌胚抗原

【中图分类号】 R 574.62; R 574.63 **【文献标志码】** B

Clinical significance of lymph node micrometastasis of colorectal cancer detected by immunohistochemistry

CHENG Ming-rong, CHENG Zhi-jian[△], CAI Yuan-kun, ZHAO Jia-ying, XU Hong-zhi
(Department of General Sugery, Shanghai Fifth People's Hospital,
Fudan University, Shanghai 200240, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the prognostic impact of a wide spectrum of pathologic parameters in a consecutive series of homogenously treated and well-characterized patients with stage I and II colorectal cancer, and to investigate the prognostic value of lymph node occult disease (micrometastasis) in disease free survival rate detected by immunohistochemistry with epithelial membrane antigen and carcinoembryonic antigen. **Methods** The study included 126 patients operated on by a single surgeon for stage I and II colorectal tumors. The postoperative follow-up was performed for 64 to 106 months. At least 10 lymph nodes were harvested and examined in all the specimens. The prognostic value of 10 pathologic parameters, including lymph node occult disease (micrometastasis) detected by immunohistochemistry was investigated.

Results Multivariate analysis identified lymphatic vessel invasion (absent or present; $P=0.009$) in lymph node positive and negative by immunohistochemistry. The five-year disease-free survival rates were 78.7%, 65.5% and 43.8% for the lymph node negative, isolated tumor cells and micrometastasis groups, respectively. There was significant difference between the lymph node negative and micrometastasis groups ($P=0.005$). However, the difference between the lymph node negative and isolated tumor cells groups was not statistically significant ($P=0.144$). **Conclusions** We propose that for patients found micrometastasis in lymph node with high-risk stage I and II colorectal cancer, adjuvant therapies are justified and effective.

【Key words】 colorectal cancer; lymph node micrometastasis; epithelial membrane antigen; carcinoembryonic antigen

淋巴结转移是影响结直肠癌预后的最主要因素之一,也是决定肿瘤分期和制定个体化治疗方案的主要参考指标。结直肠癌患者,其局部原发灶采用手术为主的治疗方法基本可以控制。

但根治术后,肿瘤复发和转移率高达 30%~50% 左右,特别是无“淋巴结转移”的 I 期和 II 期患者,5 年内死于局部复发或转移的近 30%,这提示结直肠癌患者存在淋巴结微转移 (micrometastasis, MCM)^[1]。但检测出的 MCM 并不完全转化为临床转移,MCM 的出现虽然并不意味着一定形成明显的临床病灶,即转移的无效性,但一旦条件许可(癌细胞的生物学特性、机体的免疫状态及宿主器官微环境,血循环中至少有 10^4 个肿瘤细胞),即能进入增殖状态而发展为临床显性转移^[2]。随着微转移概念的发展,孤立肿瘤细胞巢(isolated tumor cells, ITCs)已经从 MCM 概念中区分开,故为了探讨术后结直肠癌淋巴结 MCM 是否对患者预后存在影响,我们运用癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)及上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)两项指标回顾性对结直肠癌淋巴结石蜡块切片进行染色,并随访其预后结果,现报告如下。

资 料 和 方 法

一般资料 收集 1998 年 1 月至 2002 年 12 月在我院施行根治性切除术的 126 例 pT₁₋₄N₀ 结直肠癌患者的临床资料,以及所有经常规苏木精-伊红染色为阴性的淋巴结石蜡包埋块。排除有其他脏器肿瘤及术前辅助放化疗的病例。本组病例男性 66 例,女性 60 例;平均年龄(63.0±11.4)岁。直肠癌 70 例,结肠癌 56 例;高分化癌 84 例,低分化癌 42 例。共获取淋巴结 2 032 枚。所有患者均由同一胃肠手术组医师实施根治性切除术。

方法 126 例结直肠癌的淋巴结经苏木精-伊红病理检查(单个淋巴结直径 2~10 mm)均为阴性,所有结直肠癌标本经 EMA、CEA 免疫组化染色均为阳性。将淋巴结石蜡包埋块,分别连续切片 7 张(厚 4 μm),其中 1 张行苏木精-伊红染色,另外 6 张分别行 CEA、EMA 免疫组化染色,经两位病理医师复检淋巴结苏木精-伊红染色片,如有转移,则排除在本研究之外。采用 SP 法,抗原预处理用 pH 6.0 的枸橼酸钠溶液微波加热;EMA、CEA 兔单克隆抗体(DAKO 公司,工作浓度为 1:100),SP 试剂盒(美国 Zymed 公司),按试剂盒说明进行操作。结直肠癌 EMA、CEA 染色,为淋巴结微转移的阳性对照,淋巴结免疫组化染色不加 EMA、CEA 抗体为阴性对照。肿瘤病理分期以美国癌症联合委员会(American Joint Commission on Cancer, AJCC)分期为标准,并区分了 MCM 和 ITCs 的概念,ITCs 直径<0.2 mm,记为 pN₀(i+);直径在 0.2~2 mm 之间为

MCM,记为 pN₁(Mi)^[3]。

随访 通过门诊、电话、信访和登门 4 种随访方式。随访内容主要包括:肛门指检,每 3 个月复查 1 次 CEA,每 6 个月随访 1 次胸片和腹部 B 超。对复发可疑病例行 CT 或 MRI 检查。

统计学方法 建立病例统计的量化表格及相应的数据库,运用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。利用 χ^2 检验对微转移与各种临床病理因素的统计数据的相关性进行检验。用 Kaplan-Meier 法绘制 5 年生存曲线,并对各组组结直肠癌患者生存资料采用 Long-rank 检验,水平间整体比较采用 Pooled over strata,水平两两比较采用 Pairwise over strata, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

PN₀ 期结直肠癌淋巴结中免疫组化的表达 在 126 例 PN₀ 的结直肠癌患者中,共有 2 032 枚淋巴结,每位患者淋巴结 10~28 枚不等,平均 16 枚。免疫组化染色后,淋巴结阳性表达占 20.67% (420/2 032),有 50.00% 患者(63/126)的淋巴结呈阳性表达,16 例(12.70%)中发现呈 MCM 阳性表达的淋巴结,47 例(37.30%)为 ITCs 阳性表达的淋巴结。EMA 染色后有 19.93% 患者(405/2 032)的淋巴结出现阳性表达,39.68% 患者(50/126)的淋巴结中找到 EMA 阳性表达的淋巴结。其中,13 例(10.32%)中发现 MCM 阳性表达(图 1),37 例(29.36%)为 ITCs 阳性表达(图 2)。CEA 染色后有 20.37% (414/2 032)的淋巴结出现阳性表达,45.24% (57/126) 患者的淋巴结中找到 CEA 表达阳性细胞。其中,13 例(10.32%)中发现 MCM 表达的淋巴结(图 3),44 例(34.92%)为 ITCs(图 4)表达的淋巴结。

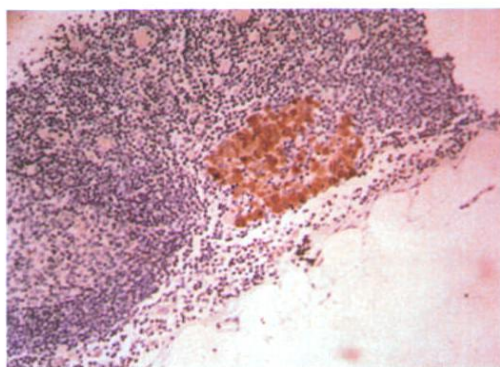


图 1 EMA 染色后淋巴结中 MCM 的表达(SP×100)

Fig 1 Micrometastasis detected by immunohistochemical staining with monoclonal antirabbit epithelial membrane antigen antibody (SP×100)

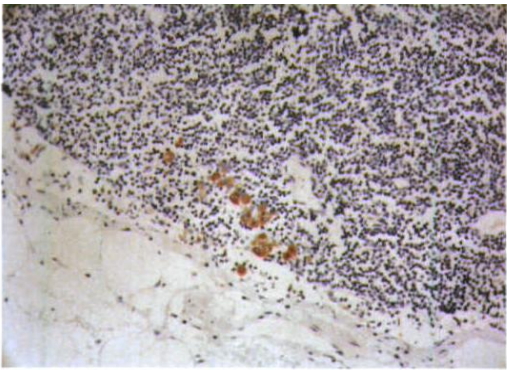


图2 EMA染色后淋巴结中ITCs的表达(SP×100)
Fig 2 Isolated tumor cells detected by immunohistochemical staining with monoclonal antirabbit epithelial membrane antigen antibody (SP×100)

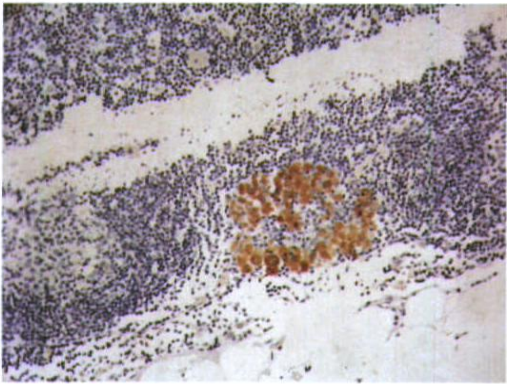


图3 CEA染色后淋巴结中MCM的表达(SP×100)
Fig 3 Micrometastasis detected by immunohistochemical staining with monoclonal antirabbit carcinoembryonic antigen antibody (SP×100)

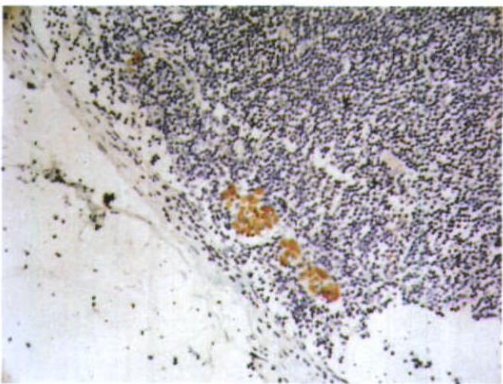


图4 CEA染色后淋巴结中ITCs的表达(SP×100)
Fig 4 Isolated tumor cells detected by immunohistochemical staining with monoclonal antirabbit carcinoembryonic antigen antibody (SP×100)

临床病理因素与阳性表达的关系 如表1所示,淋巴结阳性表达与“淋巴管浸润”(P=0.009)明显相关,而其他临床病理因素中与阳性表达无明显相关性。

表1 结直肠癌患者的临床病理资料与微转移的关系

Tab 1 Clinicopathological features associated with micrometastases in lymph nodes by

immunohistochemistry					(n)	
Clinicopathologic		Immunohistochemistry		Positive (%)	χ ²	P value
Features	Number	+	−			
Gender						
Male	66	37	29	56.06	1.559	0.212
Female	60	26	34	43.33		
Age (y)						
≥63	70	33	37	47.14	0.289	0.591
< 63	56	30	26	53.57		
Location						
Colon	56	24	32	42.86	2.057	0.151
Rectum	70	39	31	55.71		
Tumor size (cm)						
≥4.5	57	30	27	52.63	0.288	0.591
< 4.5	69	33	36	47.82		
Growth pattern						
Expanding	61	30	31	49.18	2.194	0.533
Ulcering	37	22	15	59.46		
Infiltrating	13	4	7	30.77		
Other	15	7	8	46.67		
Tumor stage						
T1	2	1	1	50.00	1.467	0.690
T2	53	23	20	43.40		
T3	30	14	16	46.67		
T4	41	25	16	60.97		
Histologic grade						
Well differentiated	84	44	40	52.38	0.571	0.450
Low differentiated	42	19	23	45.24		
Venous invasion						
Positive	6	2	4	33.33	0.700	0.403
Negative	120	61	59	50.83		
Lymphatic invasion						
Positive	26	18	8	69.23	6.784	0.009
Negative	100	45	65	45.00		

Tumor size (4.45±1.79) cm in this group.

结直肠癌患者淋巴结中免疫表达与无瘤生存率的关系(图5) 所有病例平均随访时间19~109个月。通过Kaplan-Meier法绘制5年生存曲线,淋巴结表达为阴性的5年无瘤生存率为78.7%;以ITCs为特征的结直肠癌患者,5年无瘤生存率为65.5%;而以MCM为特征的患者,5年无瘤生存率仅为43.8%。淋巴结表达MCM患者的5年无瘤生存率明显低于淋巴结阴性表达患者($\chi^2=8.055, P=0.005$)。而ITCs的结直肠癌患者与淋巴结阴性表达患者比较,5年无瘤生存率差异无统计学意义($\chi^2=2.493, P=0.144$)。表达ITCs的结直肠癌患者与呈MCM表达患者比较,5年无瘤生存率差异无统计学意义($\chi^2=2.459, P=0.117$)。

根据免疫组化结果重新分期 根据淋巴结免疫组化染色检测病理因素与5年无瘤生存率的关系(表2),16例(12.70%)结直肠癌患者被检测出MCM与淋巴结阴性表达患者的5年无瘤生存率差

异有统计学意义,应重新划分为 pN₁(Mi) 期。而 63 例结直肠癌患者淋巴结(-) 和 47 例为 ITCs, 分别被记为 pN₀(i-) 和 pN₀(i+) , 不建议重新分期, 仍为 pN₀ 期。

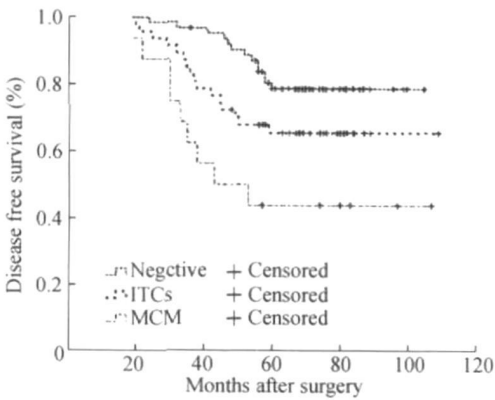


图 5 结直肠癌患者淋巴结中免疫表达与无瘤生存率的关系
Fig 5 Disease free survival curves for patients with stage I and stage II colorectal carcinoma according to ITC, MCM and immunohistochemical staining negative in lymph nodes

表 2 病理因素与 5 年无瘤生存率的关系

Tab 2 Associations between 5 years disease-free and clinicopathological features

Clinicopathologic		Disease free survival		χ^2	P value
Features	Number	n	%		
Gender					
Male	66	50	75.58	2.303	0.129
Female	60	38	63.33		
Age (y)					
≥63	70	45	64.28	2.308	0.129
< 63	56	43	76.79		
Location					
Colon	56	37	66.07	0.680	0.410
Rectum	70	51	72.28		
Tumor size (cm)					
≥4.5	57	36	63.16	2.207	0.137
< 4.5	69	52	75.36		
Growth pattern					
Expanding	61	44	72.13	3.874	0.275
Ulcering	37	27	72.97		
Infiltrating	13	6	46.15		
Other	15	11	73.33		
Tumor stage					
T 1	2	2	100	1.569	0.666
T 2	53	38	71.70		
T 3	30	19	63.33		
T 4	41	29	70.73		
Histologic grade					
Well differentiated	84	57	67.86	0.471	0.493
Low differentiated	42	31	73.81		
Venous invasion					
Positive	6	5	83.33	0.544	0.461
Negative	120	83	69.17		
Lymphatic invasion					
Positive	26	18	69.23	0.006	0.939
Negative	100	70	70.00		

Tumor size (4.45 ± 1.79) cm in this group.

讨 论

淋巴结转移状态是决定结肠癌患者预后的重要因素之一,但对淋巴结中单个或少数癌细胞,常规苏木精-伊红染色很难检出,因而导致分期错误并影响治疗。1992 年,国际抗癌联合会 (International Union Against Cancer, UICC) 推荐定义 MCM 为单个转移肿瘤细胞或细胞团< 2 mm。在这期间,有大量关于结直肠癌淋巴结 MCM 方面的研究,并且通过各种手段如免疫组化、RT-PCR 等方法进行研究,最终发现免疫组化法既简单可行、假阳性又较低,是研究结直肠癌 MCM 推荐的方法^[4]。

本研究中所有结直肠癌标本免疫组化均呈阳性表达。20.67% 的淋巴结出现了阳性表达,其阳性表达率与文献报道相近^[5]。50.00% 患者的淋巴结呈阳性表达,37.30% 患者的淋巴结表达为 ITCs, 12.70% 患者的淋巴结表达为 MCM 特征。故免疫组化方法是检测结直肠癌淋巴结隐匿转移较为敏感的方法之一。本研究发现淋巴结呈阳性表达与“淋巴管浸润”有明显相关性,故淋巴管浸润的结直肠癌患者的淋巴结出现 MCM 或 ITCs 的可能性增加,为今后寻找淋巴结 MCM 提供了重要的理论依据。这与文献报道并不一致^[6,7],可能与研究中选择病例数及检测指标不同有关。临床病理因素是否与 5 年无瘤生存率有关,一直是学者关心的问题之一,本研究表明临床病理因素与结直肠癌患者 5 年无瘤生存率无相关性,与 Cianchi 等^[8]报道一致。但由于本研究病例较少,可能存在偏移,其确切关系需扩大病例数,多中心随机对照研究进一步证实。

淋巴结微转移对结直肠癌术后无瘤生存率(或死亡率)是否存在相关性,一直存在争议。一部分学者认为无相关性^[9];另一部分学者认为存在相关性,可能与 MCM 概念不同有关。2002 年 AJCC 将结直肠癌淋巴微转移纳入分期,淋巴结中肿瘤直径< 0.2 mm,定义为 ITCs,记为 pN₀(i+),直径为 0.2~ 2 mm 为 MCM,分期为 pN₁(Mi)。根据此标准,本组病例有 16 例结直肠癌需重新分期,由 II 期重新分为 II 期,重新分期率为 12.70%,比万进等^[10]报道的重新分期率(18%)低,这与 MCM 概念定义不同有关。本组研究表明 pN₀(i+) 和 pN₀ 的结直肠癌患者 5 年无瘤生存率无明显差别,而 pN₁(Mi) 与 pN₀ 的无瘤生存率差异有显著统计学意义。目前常规病理检查结直肠癌淋巴结为阴性的患者,术后是否进行放化疗还不确定,尚未提供放化疗依据,轻易采取放化疗都可能导致过多或过少治疗,均对术后患者的生存质量产生影响,

所以结直肠癌患者术后应予以适度治疗。本研究表明, 淋巴结中找到 MCM 的结直肠癌患者较淋巴结(-) 的 5 年无瘤生存率明显降低, 而 ITCs 的患者的 5 年无瘤生存率与淋巴结(-) 的比较差异无显著统计学意义, 故我们认为对于结直肠癌淋巴结中找到 MCM 的患者应加强术后辅助放化疗, 而对于淋巴结阴性或表达 ITCs 的患者术后不推荐辅助放化疗。本研究为进一步深入探讨结直肠癌术后复发转移的机制及术后适度治疗方案提供了实验依据, 并可为社会医保资源的合理支配提供参考意见。

参 考 文 献

[1] Feezor RJ, Copeland EM, Hochwald SN, *et al.* Significance of micrometastases in colorectal cancer[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2002, 9(10): 944- 953.

[2] 程明荣, 蔡元坤. 结直肠癌微转移基因的研究进展[J]. 国外医学: 外科学分册, 2005, 32(5): 366- 371.

[3] Greene FL, Compton CC, Fritz AG, *et al.* AJCC cancer staging atlas 6th ed[M]. New York: Springer-Verlag, 2006: 1- 352.

[4] Fleming FJ, Hayanga AJ, Glynn F, *et al.* Incidence and prognostic influence of lymph node micrometastases in rectal

cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2007, 33(8): 998- 1 002.

[5] Isaka N, Nozue M, Doy M, *et al.* Prognostic significance of perirectal lymph node micrometastases in Dukes' B rectal carcinoma: an immunohistochemical study by CAM5. 2[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(8): 2 065- 2 068.

[6] Lee M R, Hong CW, Yoon SN, *et al.* Isolated tumor cells in lymph nodes are not a prognostic marker for patients with stage I and stage II colorectal cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2006, 93(1): 13- 19.

[7] Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, *et al.* Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2001, 8(4): 300- 304.

[8] Cianchi F, Messerini L, Comin CE, *et al.* Pathologic determinants of survival after resection of T3N0 (Stage II A) colorectal cancer: proposal for a new prognostic model[J]. *Dis Colon Rectum*, 2007, 50(9): 1 332- 1 341.

[9] Fleming FJ, Hayanga AJ, Glynn F, *et al.* Incidence and prognostic influence of lymph node micrometastases in rectal cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2007, 33(8): 998- 1 002.

[10] 万进, 吴泽宇, 杜嘉林. 中下段直肠癌淋巴结微转移的临床研究[J]. 中华普通外科杂志, 2007, 22(1): 18- 20.

(收稿日期: 2009- 04- 23; 编辑: 王蔚)