

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.034

CEA mRNA 在大肠癌患者微转移早期预测中的意义*

欧阳亮 李洪君 唐小龙 张 强 孟庆辉[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院普外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的: 大肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,血行转移是大肠癌根治性手术失败的原因之一,在根治性切除肿瘤患者中,有大部分患者死于肿瘤的复发和转移,因此早期发现大肠癌微转移,对于延长患者预后指导下一步治疗具有重要意义。本研究已检测大肠癌患者外周血和引流静脉血中 CEA mRNA 的表达,以探索手术操作和微转移的关系,以及引流静脉血中微转移的发生与临床病理因素的关系,探讨早期发现大肠癌血循环微转移的意义。**方法:** 应用逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)法检测大肠癌患者手术前,手术后外周血及引流静脉血液中的 CEA mRNA 水平。**结果:** (1) 大肠癌患者术前外周血 CEA mRNA 阳性率 26.7%(16/60),引流静脉血阳性率 48.3%(29/60),引流静脉血明显高于外周静脉血($P<0.05$)。(2) 大肠癌引流静脉血中 CEA mRNA 在肿瘤大于 5 厘米者、Dukes C 期、中低分化程度、有淋巴转移者、浸及浆膜者比外周静脉血更有统计学上的意义。(3) 手术前后引流静脉血 CEA mRNA 阳性率具有显著差异($P<0.05$),外周血 CEA mRNA 阳性率无显著差异。**结论:** 大肠癌引流静脉血微转移是大肠癌肝转移的发生的早期阶段,引流静脉血 CEA mRNA 的表达能更早期反映出大肠癌患者微转移的发生,引流静脉微转移发生率与肿瘤分化程度、浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移相关,是反映大肠癌生物学行为的指标之一,手术对大肠癌血循环微转移有促进作用。

关键词: 大肠癌;外周静脉;引流静脉;微转移;RT-PCR;CEA mRNA

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)04-739-05

CEA mRNA Significance in the Early Prediction of Micrometastasis in Patients with Colorectal Cancer*

OUYang Liang, LI Hong-jun, TANG Xiao-long, ZHANG Qiang, MENG Qing-hui[△]

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: Colorectal cancer is the most common malignant tumor, the blood metastasis is one of the reasons for the failure of the colorectal cancer radical surgery, most of the patients died of tumor recurrence and metastasis in the radical resection of tumor patients, therefore, the early detection of colorectal micrometastases have great significance for an extension of the prognosis of patients to guide further treatment. In order to explore the relationship between operative and micrometastases, the occurrence of venous blood micrometastases and clinicopathological factors, the significance of early detection micrometastases with colorectal cancer blood circulation, the diagnostic value of micrometastasis of colorectal cancer blood circulation, CEA mRNA levels in the peripheral blood and venous drainage blood of patients with colorectal cancer were tested. **Methods:** CEA mRNA levels were detected by using Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) after and before surgery in the peripheral blood and venous drainage of blood with colorectal cancer. **Results:** (1) The patients with colorectal cancer preoperative peripheral blood CEA mRNA positive rate was 26.7% (16/60), drainage venous blood positive rate 48.3% (29/60), drainage venous blood is obviously higher than that of the peripheral venous blood ($P<0.05$). (2) Venous blood of colorectal CEA mRNA in tumors was larger than 5 cm, at Dukes C period, in poorly differentiated degree, lymph node metastasis, dip and serosal more statistically significant than the peripheral venous blood. (3) Before and after surgery drainage venous blood CEA mRNA positive rate had significant difference ($P<0.05$), peripheral blood CEA mRNA positive rate had no significant difference. **Conclusion:** The venous blood of colorectal cancer micrometastases is the early stages of colorectal liver metastases, the expression of venous drainage CEA mRNA can reflect more early colorectal cancer patients micro transfer occurs, which is one of the indicators reflect the biological behavior of colorectal, the incidence of draining veins micrometastases related to the degree of tumor differentiation, infiltration depth, TNM staging, lymph node metastasis and distant metastasis, the surgery have promoted role for colorectal cancer blood circulation micrometastasis.

Key words: Colorectal cancer; Peripheral venous; Drainage vein; Micro transfer; RT-PCR; CEA mRNA

Chinese Library Classification(CLC): R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-739-05

* 基金项目:黑龙江省博士后基金项目(LRB2010-331)

作者简介:欧阳亮(1980-),男,硕士研究生,普外科,E-mail: ouyangliang7753@163.com

[△]通讯作者:孟庆辉,E-mail: hui-90@163.com

(收稿日期:2013-05-08 接受日期:2013-05-31)

前言

大肠癌是常见的胃肠道恶性肿瘤,近年来发病率呈上升趋势,是癌症死亡的第三大原因^[1]。此病手术切除率较高,但术后约40%~50%发生肝转移,病死率高^[2]。常规的病理学检查和CEA等肿瘤标记物对其预后判断及指导术后治疗有一定价值,但不够理想,大肠癌的术后复发率及肝转移率仍居高不下。癌细胞经血循环转移是大肠癌肝转移的主要途径,血行转移是大肠癌根治性手术失败原因之一。检测血循环中的癌细胞对患者预后的判断,指导术后治疗,降低肝转移的发生率均有重要意义^[3]。近年来人们采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,发现了血循环中的癌细胞,为检测大肠癌循环中的微转移开辟了一个新途径。本研究采用RT-PCR技术定性和定量检测外周血和引流静脉血中的CEA mRNA,以探索早期预测大肠癌术后血循环微转移的检测方法,进而为选择合理的辅助治疗方案提供依据,最终达到改善大肠癌患者预后的目的。

1 实验方法

1.1 标本采集

开腹后,关腹前采集外周静脉和引流静脉血各5 mL/次。为了防止采血时混入表皮细胞,影响实验结果,所有标本均通过血管内置管取得。常规EDTA-Na抗凝,淋巴细胞分离液分离制备单个核细胞,置-80℃保存。

1.2 RT-PCR 检测

1.2.1 将单个核细胞采用硫氰酸胍一步法提取总RNA加入逆转录酶及RNA酶抑制剂,逆转录出cDNA。总体积为20 μL,包括0.5 μL cDNA, 2 μL 10× PCR缓冲液, 200 μM dNTP液, 0.2 μM CEA引物 a: 5'-TCTGGAAGTCTCTGGTCTCTCAGCTGG-3', 引物 b: 5'-TGTAAGCTGTTGCAAATGCTTTA AGGAAGA-AGC3' 0.5 μM Taq酶。95℃ 4分钟使之变性。变性后进行扩增,条件为: 95℃ 30秒, 69℃ 1分钟, 72℃ 30秒。总循环30次,最后72℃延伸6分钟。总体积为40 μL,包括1 μL第一步PCR产物, 4 μL 10× PCR缓冲液, 200 μM dNTP液, 0.2 μM CEA引物 b和引物 c: 5'-GGGCCACTGTTCGGCATCATGATTGG-3', 1 μM Taq酶。95℃ 4分钟使之变性。变性后进行扩增,条件为: 95℃ 30秒, 64℃ 1分钟 72℃ 30秒。总循环32次,最后72℃延伸6分钟。将第二步PCR反应产物置于2%凝胶电泳观察溴乙啶染色情况,成功扩增的RT-PCR产物为131 bp片段。设立(GAPDH)RT-PCR为对照,GAPDH RT-PCR产物通过2%凝胶电泳被溴乙啶染色。扩增片段为390 bp。证实PCR反应成功。

1.2.2 RT-PCR(定量)方法实验步骤 将标本中RNA作第一步RT-PCR(用引物A和B),将产物插入质粒,扩增、纯化并于SacI处酶切产生新的265的片段。用定点突变PCR方法从CW-2细胞株中提取RNA,逆转录成cDNA,在扩增片段105 bp处形成酶切位点SpeI(于SacI位点之外),插入质粒克隆、酶切,产生比野生型DNA长28个bp的竞争模板。将产物在3.5%凝胶上电泳,条带对比进行定量。

2 统计学分析

统计学分析采用SPSS13.0软件进行,CEA mRNA阳性率的组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 总RNA完整性及纯度的鉴定结果及PCR扩增电泳图

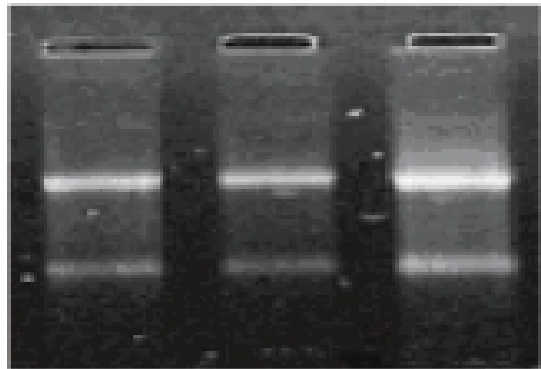


图1 RNA电泳图

Fig. 1 RNA electrophoretogram

*注:RNA样本OD 260/280在1.8-2.0间,琼脂糖凝胶电泳可见28S、18S和5S三条亮带,且28S条带亮度约是18S的1-2倍。

*Note: RNA sample OD 260/280 in 1.8-2.0, agarose gel electrophoresis visible 28s, 18s and 5s three light zone, and then 28s band intensity is about and 18s 1-2 times.

M 1 2 3 4 5 6

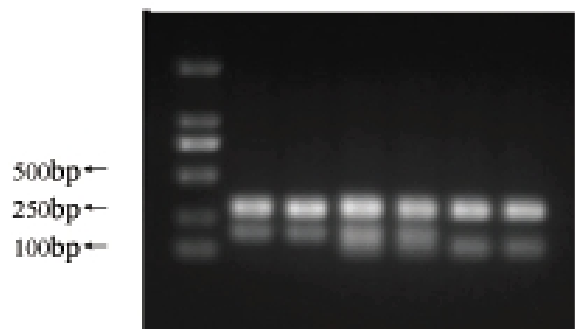


图2 PCR扩增电泳图

Fig. 2 PCR amplification electrophoretogram

*注:M:DL2000DNA marker;1~6;PCR扩增产物131 bp,对照PCR扩增产物390 bp。

*Note:M: DL2000DNA marker;1~6;PCR amplification product 131 bp, compared with PCR amplification product 390 bp.

3.2 大肠癌患者术前外周血 CEA mRNA 阳性率 26.7 %

引流静脉血 CEA mRNA 阳性率48.3%,引流静脉血高于外周血($P < 0.05$),说明引流静脉能够更早期发现血循环中的微转移细胞。见表1。

3.3 外周血及引流静脉血 CEA mRNA 水平与临床病理因素的关系

CEA mRNA的表达与Dukes C分期、中低分化程度、有淋巴转移者、浸及浆膜者、肿瘤大于5厘米者有统计学上的意义。 $(P < 0.05)$ 见表2。

3.4 开腹后,关腹前外周血及引流静脉血 CEA mRNA 水平手术前后引流静脉血 CEA mRNA 阳性率具有显著差异

($P < 0.05$), 外周血 CEA mRNA 阳性率无显著差异。见表 3。

表 1 外周血及引流静脉血 CEA mRNA 水平
Table 1 CEA mRNA level in Peripheral blood and venous blood

Groups		N	CEA mRNA positive	Positive rate(%)	P
Colorectal cancer patients Patients	Peripheral venous blood	60	16	26.7 %	0.014
	Drainage venous blood	60	29	48.3 %	

表 2 外周血及引流静脉血 CEA mRNA 水平与临床病理因素的关系
Table 2 Relationship of Peripheral venous blood and drainage CEA mRNA level with clinical pathologic factors

Groups		N	Peripheral vein positive	Venous drainage positive	χ^2 检验	
					χ^2	P
Age						
≤ 50		12	1	5	3.556	0.059
>50		48	15	24	3.498	0.061
Size(cm)						
≤ 5		36	6	10	3.745	0.052
>5		24	10	19	7.056	0.008
Differentiation						
High differentiation		36	4	7	0.966	0.326
Low differentiation		24	12	22	10.084	0.001
Dukes stage						
A		23	3	5	0.605	0.437
B		16	6	6	0.000	1.000
C		17	5	14	9.663	0.002
D		4	2	4	2.667	0.102
Lymphatic metastasis						
No transfer		39	5	11	2.831	0.092
Have transfer		21	11	18	5.459	0.019
Depth						
Less than serosa		21	7	8	0.104	0.747
More than serosa		39	9	21	7.800	0.005
Tumor site						
Colon		34	11	19	3.818	0.051
Rectum		26	5	10	2.342	0.126

表 3 开腹后, 关腹前外周血及引流静脉血 CEA mRNA 水平
Table 3 CEA mRNA levels before Opened and shut abdominal peripheral venous blood flow

Groups		N	After open the abdominal wall	After open the abdominal wall	P
Colorectal Cancer Patients	Peripheral venous blood	60	16	16	1.000
	Drainage venous blood	60	29	46	

4 讨论

目前大肠癌微转移主要依靠影像学和外周血 CEA 的检测。CEA 是肿瘤特异性癌胚抗原,升高主要见于消化道恶性肿瘤^[4],大约 95% 大肠癌有 CEA 基因表达^[5],CEA 是目前公认的最可信的与结直肠相关的肿瘤标记^[6],是监测大肠癌肝转移最敏感的免疫学指标^[7]。由于检测 CEA 阳性发现肝转移时癌灶往往较大,并诱发血管增生,这与大肠癌与对应的肝转移灶中的血管内皮生长因子具有相关性有关^[8],而失去治疗的机会。对于直径小于 1 cm 的微小转移灶,则很难作出明确的诊断。RT-PCR 法可从 $10^6 \sim 10^7$ 个正常细胞中检出一个肿瘤细胞,具有细胞形态和免疫组织化技术不可比的敏感性,使肿瘤微转移的检测成为可能^[9]。CEA mRNA 是指导合成 CEA 的模板,与肿瘤关系密切,几乎能在所有的癌细胞中被检出,是新近热点研究的肿瘤标志物^[10]。RNA 在细胞外环境中非常不稳定,如在血中检测出 CEA mRNA,则从理论上可以认为血中有肿瘤细胞存在。肿瘤引流静脉(肠系膜下静脉和结肠静脉)是大肠癌肝转移的主要途径,扩散进入血液的癌细胞,先经引流静脉进入门静脉系统在进入肝脏,因肝脏,脾脏的过滤作用及外周血的稀释造成外周血中癌细胞数量的减少,然而早期肿瘤已经存在微转移肿瘤^[11]。因此,从理论上讲,检测肿瘤引流静脉能更早期诊断肝转移。近来 Funaki^[12]等报道了用 RT-PCR 法定量检测胰腺肿瘤患者外周血和门静脉血中的 CEA mRNA,其结果较定性法更为精确,该研究还表明门静脉血 CEA mRNA 的检测较外周静脉血更为敏感。本研究采用 RT-PCR 技术检测外周血和引流静脉血中的 CEA mRNA,其结果显示大肠癌患者术前引流静脉血高于外周血 CEA mRNA ($P < 0.05$),说明引流静脉能够更早期发现血循环中的微转移细胞。这与理论是吻合的。

王金芝等^[13]对 50 例大肠癌患者外周血中 CEA mRNA 检测,发现对大肠癌诊断的敏感性为 62.0%,其阳性表达与患者的 Dukes 分期及有无远处转移有关,可作为大肠癌病情发展和判断预后的指标。本研究发现大肠癌患者引流静脉血中 CEA mRNA 在肿瘤组织大于 5 厘米,中低分化,DukesC 期,浸及浆膜及伴有淋巴转移者与外周静脉血中 CEA mRNA 相比具有统计学意义,而与年龄,部位等无具体意义。DukesC 期患者中存在着阴性表达的情况,可能与簇状方式进入血循环有关,采用连续采血方式可能得到更高的阳性表达^[14]。虽然 DukesD 期患者在统计学上无意义,但 DukesD 期患者早已出现远处转移,局部广泛浸润,且在外周静脉血中及引流静脉血中阳性率都高于其他 Dukes 分期,说明随着临床分期的增加,肿瘤的逐渐增大,浸润深度的增加,淋巴结转移,其引流静脉血 CEA mRNA 也随之增高。并且肿瘤分化程度差的患者引流静脉血中 CEA mRNA 水平多于分化好的患者。因此引流静脉血中 CEA mRNA 与疾病的进展及肿瘤的分化程度密切相关,术前常规检测引流静脉血中 CEA mRNA 可发现外周静脉血中 CEA mRNA 阴性患者的微转移,张彤^[15]等学者研究门静脉血 CEA-mRNA,CK20-mRNA 检测比外周血 CEA 检测和影像学检查更敏感,特异性更高。这对于大肠癌术前临床分期及术后早期辅助治疗可能具有重要的意义。

以往研究表明有 40%~50% 大肠癌患者在根治性切除术

后出现复发性肝转移,大肠癌死亡病例尸检发现肝转移率高达 60%~70%^[16]。秦海春等^[17]检测 42 例大肠癌患者手术前后和 50 例健康对照组外周血 CEA 蛋白及 CEA mRNA 水平,发现手术后 CEA mRNA 阳性表达与大肠癌复发明显相关、对预测大肠癌的复发有重要意义。乔士兴等^[18]对 38 例结肠癌病人手术前后 CK-20mRNA 检测,发现结肠癌病人术前已有部分病人血中存在游离癌细胞,手术中的牵拉刺激可能增加癌细胞扩散的可能性。本研究发现大肠癌手术后与手术前引流静脉血中 CEA mRNA 具有统计学意义,引流静脉血中手术后 CEA mRNA 阳性率 76.7% 明显高于术前 48.3%,这说明手术过程亦可促进癌细胞进入血流的可能性,分析其原因:1 手术中牵拉肿瘤促使原发癌细胞脱落,进入体循环。2 存在癌细胞的淋巴结破碎,进入血循环。3 实验本身本身也存在假阳性的可能,如取血时针尖刺到癌组织,样品的污染等。因此,我们在手术中应遵循无瘤操作技术,减少挤压癌组织,术后常规 5-FU 冲洗等。以减少癌细胞微转移的发生。

对于那些在远处出现隐性微小转移灶的病人,存在一个接受针对血管形成和克隆化增殖的治疗“时间窗”^[15,17],因此进行早期化疗是很有必要的,因为在大部分新生血管形成和克隆化增殖并没有完成时,且原发肿瘤切除术后 C0 细胞进入增殖期,转移肿瘤细胞倍增时间缩短,生长迅速,术后早期肿瘤负荷最小,对化疗最敏感。直肠癌术后早期化疗,不会影响患者切口愈合能力和增加术后并发症,对患者的功能恢复影响不大,对延长结直肠癌患者的生存期,减少术后复发可能会起到积极的作用^[19]。

本实验通过 RT-PCR 方法检测外周静脉和引流静脉血中 CEA mRNA 阳性表达,在引流静脉发现癌细胞比外周静脉更加敏感,更加早期。引流静脉血中 CEA mRNA 的检测有助于筛选大肠癌肝转移的高危病例,有利于早期发现大肠癌血循环微转移,了解微转移与肿瘤生物学特性的关系,能够更准确地对大肠癌患者进行临床分期,有可能比现在的 Dukes 分期更为科学,对于这些患者我们早期进行针对性的治疗,包括全身化疗,门静脉置管化疗等,在微转移发生时及时治疗,以减少患者术后复发及肝转移灶的形成。手术后,关腹前常规经引流静脉采血进行 CEA mRNA 的检测,也是对手术成功的判断,对开展无瘤技术提供依据。但目前该项技术有一定的局限性,在国际上至今还没有统一的标准,而且在其检测过程中还存在检测的标准化设定,试剂浓度、模板制备以及分析方法的选择等问题^[20]在临床应用中尚未广泛开展,且这一方法检测微转移可能会导致假阳性和假阴性结果需要更进一步地研究。随着该项技术不断的成熟以及临床资料的积累,微转移的定量检测将在临床指导治疗方面发挥更大的作用。随着 RT-PCR 技术的不断改进,肿瘤患者微转移的定量检测将更为敏感、特异和可靠,从而进一步提高肿瘤微转移的检出率,尤其通过对治疗前后转移细胞的实时定量检测,动态的评估疗效,并进行有针对性的化疗,从而为临床个体化治疗提供有力的支持。

参考文献(References)

- [1] Jernail A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69
- [2] Rees M, Tekkis PP, Welsh F, et al. Evaluation of long-term survival

- after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients[J]. *Ann Surg*, 2008, 247(1): 125-135
- [3] Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, et al. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection[J]. *Ann Surg*. 2000, 232: 58-60
- [4] 田满福, 韩波. 检测 CA199、CA125、CA153 及 CEA 在肿瘤诊断中的意义[J]. *临床和实验医学杂志*, 2010, 9(7): 483-485
Tian Man-fu, Han Bo. The clinical value of the detection of CA199、CA125、CA153 and CEA in malignant tumors [J]. *Journal of Clinical and Experimental medicine*, 2010, 9(7): 483-485
- [5] 肖维, 彭健, 张阳德. 联合检测外周血癌胚抗原 mRNA 及 livin mRNA 对早期发现大肠癌微转移肿瘤的意义研究[J]. *中国全科医学*, 2011, 14(6): 2040-2045
Xiao Wei, Peng Jian, Zhang Yang-de. Significance of peripheral blood CEA mRNA and livin mRNA in combined detection of micro metastases in colorectal cancer patients [J]. *Chinese General Practice*, 2011, 14(6): 2040-2045
- [6] Catharine Sturgeon. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic[J]. *Clinical chemistry*, 2002, (48): 1151-1159
- [7] 王传海, 李承红. 肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的意义[J]. *江汉大学学报(自然科学版)*, 2009, 37(12): 508-511
Wang Chuan-hai, Li Cheng-hong. Diagnosis value of combined detection of tumor markers in lung cancer[J]. *Journal of Jiangnan University (Natural Sciences)*, 2009, 37(12): 508-511
- [8] Kobayashi H, Sugihara K, Uetake H, et al. Messenger RNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis[J]. *Ann of Surg Oncol*, 2008, 15: 1232-1238
- [9] Miyake Y, Fujiwara Y, Ohue M, et al. Quantification of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer using realtime fluorescence polymerase chain reaction[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(2): 289-293
- [10] Miura M, Ichikawa Y, Tanaka K, et al. Real-time PCR (Taq Man PCR) quantification of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in the peripheral blood of colorectal cancer patients[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(25): 1271-1275
- [11] Weihrauch MR, Skibowski E, Koslowsky TC, et al. Immunomagnetic enrichment and detection of micro metastases in colorectal cancer: correlation with established clinical parameters[J]. *Clin Oncol*, 2002, 20(21): 4338-4343
- [12] Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, et al. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients [J]. *Br J Cancer*, 1998, 77: 1327-1332
- [13] 王金芝, 燕善军. Survivin mRNA、CEAmRNA 在大肠癌患者外周血中表达及意义[J]. *肿瘤学杂志*, 2010, 16(2): 93-96
Wang Jin-zhi, Yan Shan-jun. Expression of Survivin mRNA and CEA mRNA in colorectal carcinoma and significance [J]. *Journal of Oncology*, 2010, 16(2): 93-96
- [14] Castells A, Boix L, Bessa X, et al. Detection of colonic cell in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction [J]. *Br J Cancer*, 1998, 78: 1368-1372
- [15] 张彤, 温学文, 罗劲根, 等. 门静脉血 CEA-mRNA、CK20-mRNA 动态检测对早期诊断结直肠癌肝转移的意义[J]. *岭南现代临床外科*, 2008, 8(6): 439-441
Zhang Tong, Wen Xue-wen, Luo Jing-gen, et al. Clinical significance of dynamic CEA mRNA and CK20 mRNA expression in portal-vein blood of early-diagnosis for liver metastasis from colorectal cancer [J]. *Lingnan Modern Clinics in Surgery*, 2008, 8(6): 439-441
- [16] Sasson AR, Sigurdson ER. Surgical treatment of liver metastases[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29: 107-118
- [17] 秦海春, 刘俊, 杜廷义, 等. 大肠癌手术前后外周血 CEA 蛋白、CEA mRNA 的变化及临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(3): 499-500
Qin Hai-chun, Liu Jun, Du Ting-yi, et al. Clinical significance of peripheral blood CEA protein and CEA mRNA change in patients with colon cancer before and after operation [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2012, 32(3): 499-500
- [18] 乔兴, 乔昕, 宋斌. 结肠癌病人手术前后血中 CK-20mRNA 检测的临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(3): 317-319
Qiao Shi-xing, Qiao Xin, Song Bin. Detection of CK-20mRNA in peripheral blood in patients with colon cancer before and after operation [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2007, 11(3): 317-319
- [19] 刘正勇, 刘宝华, 张安平, 等. 直肠癌术后早期化疗疗效观察[J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11(18): 1473-1475
Liu Zheng-yong, Liu Bao-hua, Zhang An-ping, et al. Clinical evaluation of early postoperative adjuvant chemotherapy for rectal cancer [J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2012, 11(18): 1473-1475
- [20] Mori T, Fujiwara Y, Sugita Y, et al. Application of molecular diagnosis for detection of peritoneal micrometastasis and evaluation of preoperative chemotherapy in advanced gastric carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2003, 11(1): 14-20