

# 巢式 RT-PCR 扩增 CK20、MMP-7 诊断大肠癌淋巴结微转移的初步研究

龚丽明<sup>1</sup>, 林世杰<sup>2</sup>, 王忠明<sup>1</sup>, 李鸿钧<sup>3</sup>

**Study on Detecting Colorectal Cancer Micrometastases in Lymph Nodes by Nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Amplification of Cytokeratin 20 and Matrix Metalloproteinase-7**

GONG Li-ming<sup>1</sup>, LIN Shi-jie<sup>2</sup>, WANG Zhong-ming<sup>1</sup>, LI Hong-jun<sup>3</sup>

1. Department of Cardiovascular Surgery, The Second People Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021, China, 2. Hepatobiliary Surgery; 3. Research Center for Biochemistry and Molecular Biology, Kunming Biology Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College

**Abstract: Objective** To develop a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction method to amplify Cytokeratin 20mRNA and Matrix Metalloproteinase-7mRNA for detecting colorectal cancer micrometastases in lymph nodes. **Methods** The RT-PCR system was set up by using nest primer. The presence of CK20 mRNA and MMP-7 mRNA was investigated by nested RT-PCR in 100 lymph nodes from 30 colorectal cancer patients who underwent curative operation. Twenty-five lymph nodes from 10 patients with benign intestinal disease were served as negative control. The results of nested RT-PCR were compared with ones of routine histology. **Results** The positive rate of CK20 mRNA and MMP-7 mRNA in 187 lymph nodes from 30 colorectal cancer patients was 40.11% (75/187), 51.87% (97/187) respectively, while only 57 samples were histologically positive. The expression of CK20 mRNA and MMP-7 mRNA in 25 lymph nodes of 10 cases of control group were all negative. **Conclusion** Nested reverse transcriptase polymerase chain reaction was a sensitive and specific method to indicate the expression of CK20 mRNA and MMP-7 mRNA in lymph nodes as a helpful marker of micrometastases of colorectal carcinoma cells. It is superior to routine histopathological assay in examining lymph node metastases. The detection of CK20 mRNA and MMP-7 mRNA in lymph nodes may contribute to improve the accuracy of clinical staging, determine patients' prognosis and provide information for adjuvant therapy.

**Key words:** Colorectal neoplasms/pathology; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Keratin/ biosynthesis; Lymphatic metastasis

**摘要:目的** 建立巢式逆转录聚合酶链式反应(nested reverse transcriptase - polymerase chain reaction, nested RT-PCR)扩增 CK20mRNA、MMP-7mRNA,检测大肠癌淋巴结微转移。**方法** 据 CK20、MMP-7 基因序列设计四对引物,建立巢式 RT-PCR 扩增体系,检测 CK20 mRNA、MMP-7 mRNA 在 30 例行根治性手术大肠癌患者 187 个淋巴结中及 10 例良性肠道疾病患者 25 个淋巴结中的表达,并与传统组织学检查相比较。**结果** 大肠癌患者 187 个淋巴结中 75 个 CK20 mRNA 表达,阳性率 40.11% (75/187), 97 个 MMP-7 mRNA 表达,阳性率 51.87% (97/187), 61 个 CK20 mRNA 及 MMP-7 mRNA 表达,阳性率 32.62%。病理组织学检查仅 57 个淋巴结有肿瘤转移;10 例良性肠道疾病 25 个淋巴结扩增结果阴性。**结论** 巢式逆转录聚合酶链式反应检测淋巴结 CK20 mRNA、MMP-7 mRNA 的表达是诊断大肠癌微转移敏感特异的指标,其结果较常规病理组织学检查敏感,可对精确大肠癌的临床分期、判断患者预后及治疗提供一定理论依据。

**关键词:** 结肠直肠癌/病理学;逆转录聚合酶链式反应;角蛋白/生物碱;淋巴转移

**中图分类号:** R735.34; R73-37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)06-0346-04

## 0 引言

大肠癌是常见恶性肿瘤,早期诊断率低、预后

差,及时发现微转移对大肠癌复发、预后的判断及指导临床治疗有重要意义。本研究采用巢式逆转录聚合酶链式反应(nested reverse - transcriptase polymerase chain reaction, nested RT - PCR)技术,反转录并扩增淋巴结中细胞角蛋白 20 (cytokeratin

收稿日期:2004-01-06;修回日期:2005-02-21

作者单位:1. 650021 昆明,云南省第二人民医院心外科,2. 肝胆外科;3. 中国医学科学院中国协和医科大学昆明生物研究所分子生物学实验室



20,CK20) 基因及基质金属蛋白酶 7(matrix metalloproteinase 7,MMP-7) 基因的 mRNA 来检测大肠癌淋巴结的微转移。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

购自上海华舜、大连宝生物工程有限公司。

### 1.2 样品与标本

1.2.1 实验组 2002 年 5 月~2002 年 9 月我院普外科收治的部分大肠癌患者 30 例,男 16 例、女 14 例;年龄 29~77 岁,平均 58.433 岁。直肠癌 10 例、乙状结肠癌 8 例、升结肠癌 5 例、降结肠 4 例、盲肠癌 3 例;Dukes 分期:A 期 3 例、B 期 9 例、C 期 16 例、D 期 2 例;肿块型 8 例、溃疡型 11 例、浸润型 11 例;侵犯肠管周径 1/3 的 12 例,1/3~2/3 的 15 例,>2/3 的 3 例;高分化的 1 例,中分化的 17 例,低分化的 12 例;浸润深度 T1~T2 的 3 例、T3~T4 的 27 例;肝转移者 8 例、无肝转移者 22 例。30 例大肠癌诊断均有病理组织学证实,行肿瘤根治性切除术,术后立即收集切除肠段及系膜的淋巴结 187 枚,每枚淋巴结一分为二,一半液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱冷冻备用;一半编号后用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,送传统组织学检查。

1.2.2 阴性对照组 10 例良性肠道疾病 25 枚淋巴结一分为二,一半用于 RNA 抽提,另一半编号后行病理学检查。

1.2.3 阳性对照组 每例标本术后均取大肠癌组织 1 块,与淋巴结同时进行基因扩增检测。

1.2.4 内参对照(GAPDH) 验证提取的 RNA 是否完整,合成的 cDNA 是否充足。

1.2.5 病理切片 用于 PCR 检测的淋巴结所做病理检查切片,实验组 187 块,阴性对照组 25 块,阳性对照组 30 块。

### 1.3 实验步骤和方法

1.3.1 引物合成 据 gene bank 设计 CK20、MMP-7 序列。

1.3.2 总 RNA 提取 用 RNA 抽提试剂盒。

1.3.3 逆转录合成 cDNA 在 0.5μL 离心管内调制反应液 20μL:上述抽提 RNA 溶液 11.5μL,5 × Reverse Transcriptase XL Buffer 4μL,dNTP Mixture 2μL,Rnase Inhibitor 0.5μL,Random Primer 1μL,AMVRTase 1μL。搅拌后室温放置 10min,42℃ 恒温槽孵育 1h,冰水冷却 2min。

1.3.4 巢式多聚酶链反应第一循环 每个样品用 CK20、MMP-7 的外围引物和 GAPDH 引物进行 PCR 反应。反应体积 50μL:10 × Buffer 5μL,Mg<sup>2+</sup>

表 1 寡聚核苷酸引物

cDNA	引物	序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)
GAPDH	Sense	gacatcaagaagggtggtgaagcag	200
	Anti-sense	caccctgtgctgtgcatattc	
CK20	Sense(CK20-A)	gtttgttgcaatgagaa	260
	Anti-sense(CK20-B)	cagccagtttagcattat	
	Sense(CK20-C)	gtttgttgcaatgagaa	
	Anti-sense(CK20-D)	cagccagtttagcattat	
MMP-7	Sense(MMP7-A)	caaatagcccaaaatgga	288
	Anti-sense(MMP7-B)	tcatcgaagtgagcatct	
	Sense(MMP7-C)	tccaatagcccaaaatgga	
	Anti-sense(MMP7-D)	tcatcgaagtgagcatct	

3μL,2.5mmol dNTP 2.5μL,上述逆转录产物 4μL,CK20 外围引物(CK20 A、B,MMP-7 A、B)及 GAPDH 引物各 1μL,dW 32.5μL。振荡混匀放入 PCR 仪,95℃ 预变性 5min,70℃ 加入 Taq 酶 1μL 进入循环,循环参数:94℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 30s,30 次循环,72℃ 后延伸 10min。第二循环:用 CK20、MMP-7 内侧引物进行 PCR 反应。反应体系 50μL:10 × Buffer 5μL,Mg<sup>2+</sup> 3μL,2.5mmol dNTP 2.5μL,第一循环产物 1μL,内侧引物各 0.5μL(CK20 C、D,MMP-7 C、D),dW 36.5μL,Taq 酶 1μL。95℃ 变性 30s,70℃ 加入 Taq 酶 1μL 进入循环,循环参数:94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,30 次循环,72℃ 后延伸 10min。

1.3.5 对照组扩增 用不加 RNA 反应体系扩增作空白对照;不加 AMV 反转录酶反应体系扩增排除基因组 DNA 污染;10 例良性肠道疾病患者 25 个淋巴结扩增作阴性对照;30 例大肠癌患者的癌组织扩增作阳性对照;内参对照基因扩增在第一循环完成。

### 1.4 产物分析

取第二循环扩增产物 10μL,加溴酚兰 1μL,在含 0.5μg/mL EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶中行电泳,紫外灯下观察结果并照像。

### 1.5 统计分析

用 SPSS 11.0 统计软件包行统计学分析,统计学显著水平定为 P<0.05。

## 2 结果

### 2.1 病理学检查结果

30 例大肠癌患者 187 枚淋巴结,经病理学检查,18 例 57 枚淋巴结有癌细胞转移(30.48%),见图 1。

2.2 巢式 RT-PCR 检测大肠癌淋巴结转移,见图

2、3。

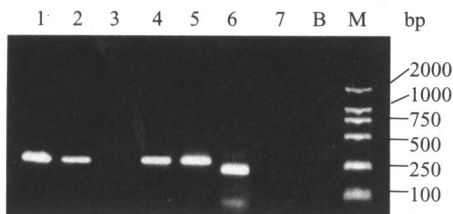


图2 大肠癌和良性肠道疾病病变组织及淋巴结中 CK20 mRNA 的表达

M 分子量参照物(DNA marker);B 空白对照;1、2 肿瘤组织;4、5 肿瘤淋巴结;6 内参照(GAPDH);3 良性肠道疾病病变组织;7 良性肠道疾病淋巴结(3、7 阴性对照)

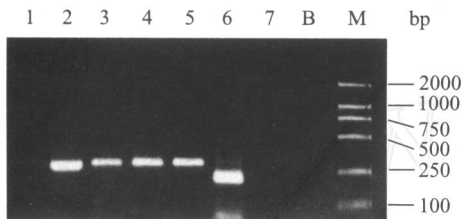


图3 大肠癌和良性肠道疾病病变组织及淋巴结中 MMP-7 mRNA 的表达

M 分子量参照物(DNA marker);B 空白对照;2、3 肿瘤组织;4、5 肿瘤淋巴结;6 内参照(GAPDH);1 良性肠道疾病病变组织;7 良性肠道疾病淋巴结(1、7 阴性对照)

30 例大肠癌患者的肿瘤组织基因扩增后,产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳,可见 260bp 和 288bp 条带,表示有 CK20 mRNA 和 MMP-7 mRNA 表达;10 例良性肠道疾病的病变组织、25 枚淋巴结扩增结果均为阴性。以上所有标本 GAPDH 产物都见 200bp 的条带,证实 RNA 完整无降解;不加 RNA 反应体系作空白对照扩增,结果阴性,证实无基因组 DNA 污染。

表2 巢式 RT-PCR 对淋巴结 CK20、MMP-7 的检测

		MMP-7 mRNA	
		阳性	阴性
CK20 mRNA	阳性	61	75
	阴性	97	76

30 例大肠癌 187 枚淋巴结,22 例 75 个 CK20 mRNA 阳性(40.11%),25 例 97 个 MMP-7 mRNA 阳性(51.87%),22 例 61 个 CK20 mRNA、MMP-7 mRNA 均为阳性,5 例 76 个均为阴性。

2.3 两种检测方法的比较

表3 大肠癌淋巴结样本 nested RT-PCR 检测与病理检查结果比较

RT-PCR 结果	病理检查结果	
	阳性	阴性
阳性	18	7
阴性	0	5

P = 0.011

组织学检查有肿瘤转移的 18 例 57 个淋巴结,

经 PCR 检测均为阳性,组织学检查阴性的 12 例 130 个淋巴结中,有 7 例 Dukes A、B 期患者 40 个淋巴结经 PCR 检测为阳性(例 1、5、12、13、15、25、28),将这 40 个淋巴结再次送交组织学检查仍为阴性,再经 RT-PCR 检测仍为阳性。2 种方法相比较,nested RT-PCR 法较病理学检查阳性率更高,敏感性 & 特异性更强 (P < 0.05)。

2.4 大肠癌微转移与患者各种病理因素的关系

单因素分析:CK20mRNA 及 MMP-7mRNA 阳性检出率与肿瘤侵袭深度、分化程度及 Dukes 分期存在显著性相关,肿瘤在肠壁中侵袭越深、分化程度越低、随 Dukes 分期的进展,其阳性检出率越高 (P < 0.05)。多因素分析:3 个变量(部位 2-升结肠、分化程度、Dukes 分期)进入回归方程:0.005 812 + 0.204分期 + 0.421部位(2) + 0.301分化程度,升结肠的阳性检出率高,随 Dukes 分期进展、分化程度降低(高 低),其阳性检出率也升高。

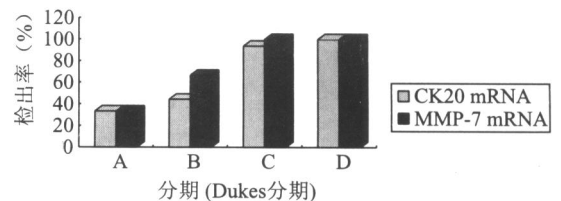


图4 CK20 mRNA、MMP-7 mRNA 阳性检出结果与大肠癌 Dukes 分期的关系

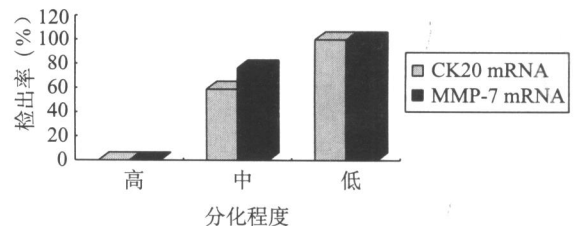


图5 CK20 mRNA、MMP-7 mRNA 阳性检出结果与大肠癌分化程度的关系

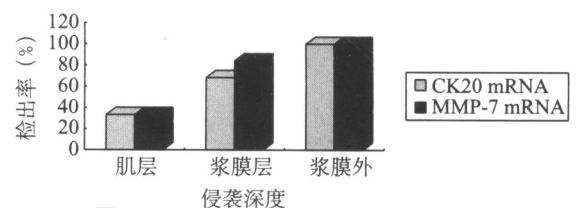


图6 CK20 mRNA、MMP-7 mRNA 阳性检出结果与大肠癌侵袭深度的关系

2.5 大肠癌分期升级

30 例大肠癌患者组织学检查行 Dukes 分期, Dukes A 期 3 例, Dukes B 期 9 例, Dukes C 期 16 例, Dukes D 期 2 例。7 例大肠癌患者,组织学检查阴性,而基因检测 40 枚淋巴结有微转移, Dukes 分期由 A 期升为 C 期(例 1)、B 期升为 C 期(例 5、12、13、15、25、28)。18 例 Dukes B、C、D 期患者,经基因

检测发现更多淋巴结转移。

### 3 讨论

大肠癌根治性手术后,50%仍死于复发转移<sup>[1]</sup>,病理检测淋巴结阴性的患者中,20%~30%5年内死于转移复发,说明这些患者存在常规方法不能检测出的微小残余病灶<sup>[2]</sup>。微转移是常规临床病理学方法不能检出的非血液系统恶性肿瘤的转移,是离开原发灶的镜检<2cm癌细胞沉积,逃避免疫监视,侵犯血管和发展成肉眼可见的病变,常无任何临床表现,巢式逆转录聚合酶链反应法是目前检测肿瘤微转移最敏感、最有效的方法,可检测出10<sup>7</sup>白细胞中1个癌细胞的存在,已用来检测大肠癌淋巴结微转移肿瘤细胞的mRNA<sup>[3,4]</sup>。

#### 3.1 条件控制

RT-PCR技术的扩增目标为RNA,操作技术要求较高,为避免假阳性、假阴性:(1)加设阳性及阴性对照;(2)设立内参对照<sup>[5]</sup>;(3)操作小心,防污染;(4)优化反应条件。

#### 3.2 检测标记物的选择

角蛋白(cytokeratin,CK)是细胞骨架系统中中间丝组成成分之一,包括20种上皮细胞角蛋白、10种头发角蛋白,分I型、II型,两型与上皮的表型有对应的特异性,CK19(40Kb)、CK8共同表达标记单层上皮,CK20(46Kb)、CK8共同表达标记肠上皮。CK20是一种多肽,其表达限于胃和肠上皮,几乎在所有的结肠癌中稳定表达<sup>[6]</sup>。Dorudi等<sup>[6]</sup>用CK20 mRNA巢式RT-PCR法检测18例大肠癌根治术后的癌组织及淋巴结,5例良性肠道疾病的病变组织作对照,肿瘤组织、淋巴结显示CK20强阳性,对照组阴性。正常情况下血液中不存在上皮细胞,如从外周血中检出上皮细胞,则说明上皮源性肿瘤细胞已转移入血。Funaki等<sup>[7]</sup>检测大肠癌患者外周血微转移癌细胞(75%),转移复发者全为阳性(100%),无远处转移者阳性率50%,后者29例阳性患者中1例11个月后出现腹腔转移,2例阴性患者经16个月临床观察无复发。CK20 mRNA是检测大肠癌微转移的有效标记物。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMPS)是Zn<sup>2+</sup>依赖性蛋白水解酶,能降解多种基底膜和细胞外基质成分,在肿瘤的浸润和转移中起重要作用。MMP-7(28Kda)是MMPS中唯一由上皮性肿瘤细胞特异性表达的酶,与大肠癌的浸润和转移密切相关。Mcdonnel研究发现MMP-7由大肠癌细胞及个别的异型性上皮细胞表达,而肿瘤间质和淋巴细胞中不表达,说明MMP-7在大肠癌中

的表达具有很强的癌细胞特异性<sup>[8]</sup>。淋巴结中MMP-7 mRNA的阳性表达可作为诊断大肠癌淋巴结微转移的依据。

有报道多项基因指标联合检测有助提高癌细胞检出率,本研究未能得出此结论,可能是样本量不够大,下一步研究中拟扩大样本量,使结论更加可靠。

#### 3.3 两种方法检查淋巴结转移的比较

组织学检查阳性的淋巴结(30.48%),经基因检测也为阳性;组织学检查阴性的40枚淋巴结,经基因检测阳性(51.87%)。PCR法能检测出组织学检查不能查出的淋巴结转移<sup>[6]</sup>。

#### 3.4 微转移与临床病理因素

原发肿瘤侵袭越深、分化程度越低、随Dukes分期进展,检出率越高(P<0.05)。经PCR检测,7例Dukes A、B期患者升为C期,微转移检测可精确临床分期、判断患者预后、筛选具高复发风险因素的患者。应对淋巴结中存在CK20 mRNA、MMP-7 mRNA阳性细胞的患者(包括一些Dukes A、B期患者)进行有针对性地及早治疗<sup>[8]</sup>。

#### 3.5 肿瘤细胞检出与肿瘤转移形成的关系

肿瘤的浸润、转移是一个多阶段过程,肿瘤细胞脱落、侵袭、进入循环只是这一过程的最初阶段,并非检出的所有癌细胞都一定能形成转移,但癌细胞检出增加了转移的危险性,为最终形成临床转移灶提供了可能<sup>[1]</sup>。许多早期常规检查阴性的大肠癌患者根治术后仍有复发转移,可用肿瘤的微转移解释。

#### 3.6 微转移与预后的关系

有报道,经长期随访(6个月~10年),微转移阳性患者复发率高、复发早、生存期短,微转移阴性患者的预后相对较好<sup>[8]</sup>。故大肠癌微转移检测的研究值得继续深入进行,本研究的远期结果尚在追踪观察之中。

(本文图1见封3)

#### 参考文献:

- [1] Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, et al. Genetic diagnosis of lymph node metastasis in colorectal cancer[J]. Lancet, 1995, 345(8960): 1257-1259.
- [2] Hayashi N, Arakawa H, Nagase H, et al. Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method[J]. Cancer Res, 1994, 54(14): 3853-3856.
- [3] Mori M, Mimori K, Inoue H, et al. Detection of cancer micro-metastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase reaction[J]. Cancer Res, 1995, 55(15): 3417-3420.
- [4] Wong IS, Cantrill JE, Fahmy M, et al. Detection of circulating tumour cells and nodal metastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique[J]. Br J Surg, 1996, 83(Suppl 1): 20(Abtract).

(下转第365页)

间的相互黏附力下降,造成细胞容易分散而向外周浸润性生长,一旦获得转移的必要条件,就可脱离原发灶而发生侵袭和转移<sup>[1,2]</sup>。PTEN 是 1997 年发现的继 p53 之后在人类肿瘤中缺失和突变率最高的一种新型抑癌基因。通过结构预测显示,PTEN 与细胞骨架蛋白和张力蛋白高度同源,提示 PTEN 可能参与细胞骨架重组并影响细胞迁移能力;对 PTEN 基因功能研究提示 PTEN 具有磷酸酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP3)和磷酸质酶(PTP)活性,能使 PIP3 去磷酸化而抑制 PIP3/Akt(PKB)信号传导途径,进而影响细胞的分化。当 PTEN 抑癌基因突变或缺失可能构成一个新的信号转导途径,与人类恶性肿瘤的发生、发展关系密切<sup>[3,4]</sup>。本研究结果显示,ED 和 PTEN 基因蛋白表达阳性率在胆管癌组织中均显著低于慢性胆管炎组织。ED 和 PTEN 阳性表达的胆管癌分化程度高、TNM 分期高和转移率低。表明 ED 和 PTEN 的下调与胆管癌的发生密切相关,并在胆管癌的细胞分化、临床进展和转移过程中

起着重要的作用。检测两者基因的表达对估计胆管癌的转移及判断患者生存状况有重要意义,可作为评估胆管癌生物学行为和预后的参考指标。

(本文图见封 3)

#### 参考文献:

- [1] 谷化平,刘艳茹,尚培中.nm23H1 和 E-cadherin 基因蛋白在胆管癌组织中的表达[J]. 中国现代普通外科进展,2002,5(1):29-31.
- [2] Chen HC,Chu RY,Hsu Pn,et al. Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas[J]. Cancer lett,2003,201(1):97-106.
- [3] Mutter GL,Ince TA,Baak JP,et al Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium[J]. Cancer Res,2001,61(11):4311-4314.
- [4] Depwski PL,Rosenthal SI,Roes JS. Loss of expterssion of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer[J]. Mod Pathol,2001,14(7):672-676.

[编辑:贺文;校对:安凤]

(上接第 349 页)

- [5] 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(8):1327-1332.
- [6] Dorudi S, Kinrade E, Marshall NC, et al. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancer[J]. Br J Surg,1998,85(1):98-100.
- [7] Funaki NO, Tanaka J, Itami A, et al. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin20mRNA[J]. Life Sciences,1997,60(9):643-652.
- [8] McDonnell S,Navre M,Coffey RJ Jr,et al. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1(MMP-7) in

human gastric and colon carcinoma[J]. Mol Carcinog,1991,4(6):527-533.

- [9] Denis MG,Lipart C,Leborgne J,et al. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients[J]. Int J Cancer,1997,74(5):540-544.
- [10] Greenson J K,Isenhardt CE,Rice R,et al. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of DukesB colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49[J]. Cancer,1994,73(3):563-569.

[编辑:周永红;校对:贺文]

## 紫杉醇抗人骨肉瘤作用的实验研究

(正文见 333 页)

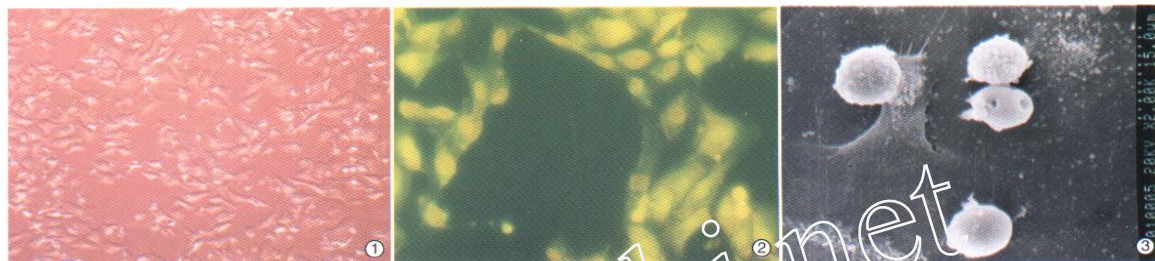


图 1 10nM 紫杉醇处理 48h 后对 MG-63 细胞的细胞毒作用

图 2 紫杉醇处理 24h 后诱导 MG-63 细胞凋亡, 凋亡细胞数增加

图 3 G2 期 MG-63 细胞扫描电镜 ( $\times 2000$ )

## 肝左叶纤维板层型肝细胞癌 1 例

(正文见 353 页)

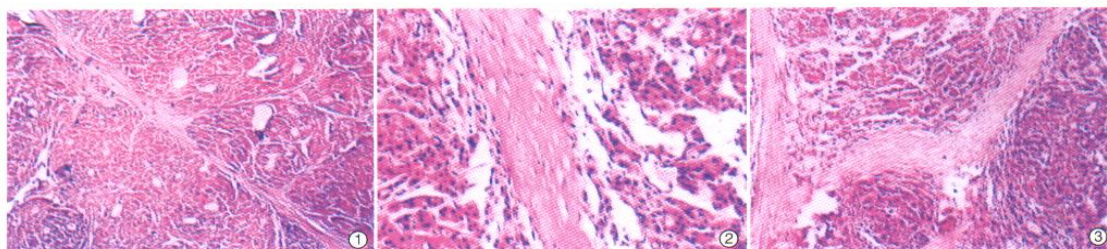


图 1 癌细胞呈团、梁状排列 (HE  $\times 20$ )

图 2 癌细胞多角形、胞浆丰富、颗粒状, 伊红染色深; 胞核多形, 染色质集中于核周, 呈囊泡样, 核仁明显, 可见核分裂 (HE  $\times 100$ )

图 3 癌巢间可见呈板层排列的纤维基质, 富含血管 (HE  $\times 40$ )

## 巢式 RT-PCR 扩增 CK20、MMP-7 诊断大肠癌淋巴结微转移的初步研究

(正文见 346 页)



图 1 大肠淋巴结转移性腺癌 (微小转移)( $\times 200$ )

## E- 上皮钙黏附素和 PTEN 在胆管癌中的表达

(正文见 364 页)

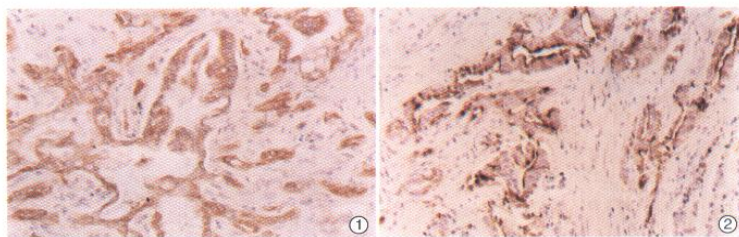


图 1 胆管癌组织 ED 免疫组织化学阳性染色 (CSA  $\times 200$ )

图 2 胆管癌组织 PTEN 免疫组织化学阳性染色 (CSA  $\times 200$ )