

乳腺癌前哨淋巴结活检及其微转移检测的临床意义

庄亚强, 莫军扬, 任占平, 梁志东

(广西医科大学第五附属医院//柳州市人民医院乳腺外科, 广西 柳州 545001)

摘要: 【目的】探讨美蓝法示踪和定位行乳腺癌前哨淋巴结活检(SLNB)的可行性及其临床意义,并探索常规病理检查(HE染色)、免疫组化染色(IHC染色)及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对判断前哨淋巴结(SLN)微转移灶的价值。【方法】66例乳腺癌患者,用美蓝示踪行SLNB,对SLN及腋窝淋巴结(ALN)进行HE染色;随机选取40例SLN进一步行细胞角蛋白19(CK19)的IHC染色及RT-PCR检测;比较3种方法对SLN微转移灶检出的敏感性、准确率及假阴性率的差异。【结果】66例中,美蓝示踪成功检出63例,检出率达95.5%。IHC与RT-PCR比较无差异,而与HE比较差异有显著性。【结论】美蓝法SLNB也有很高的检出率,由于常规病理检查对微转移的诊断率低,结合IHC及RT-PCR检测能更有效判断乳腺癌腋淋巴结转移状态,提高SLN中微转移的检出率,降低假阴性率。

关键词: 前哨淋巴结活检; 免疫组织化学; RT-PCR; CK19; 乳腺癌

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0553-04

Clinical Value of Sentinel Lymph Node Biopsy and Detection of Micrometastasis in Sentinel Lymph Node in Breast Cancer

ZHUANG Ya-qiang, MO Jun-yang, REN Zhan-ping, LIANG Zhi-dong

(Department of Breast Surgery, The Fifth Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Liuzhou 545001, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the possibility that methylene blue being used on sentinel lymph node biopsy (SLNB) in breast cancer and the value of hematoxylin and eosin staining (HE staining), immunohistochemistry (IHC) and RT-PCR in judging micrometastasis in sentinel lymph node (SLN). 【Methods】 Sixty-six patients with breast cancer were injected methylene blue to detect the axillary SLN. The SLN and axillary lymph node were examined with HE staining. Random 40 cases were evaluated with IHC examination of cytokine 19 (CK 19) and RT-PCR. The accuracy, sensitivity, and false-negative ratio of HE staining, IHC examination and RT-PCR were compared to see if they had any discrepancy. 【Result】 SLN were successfully identified in 63 (95.5%) of 66 patients. IHC had no discrepancy compared with RT-PCR in the accuracy, sensitivity, and false-negative ratio, but it had obvious discrepancy with HE staining. 【Conclusion】 Methylene blue can be used on the SLNB in breast cancer successfully. Since the sensitivity of HE staining was low, combined examination of IHC and RT-PCR would evaluate the micrometastasis more effectively, raise the efficiency of estimate of metastasis in SLN, and reduce the false-negative ratio.

Key words: sentinel lymph node biopsy; immunohistochemistry; RT-PCR; cytokine 19; breast cancer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):553-556]

目前的研究证实,对腋窝淋巴结转移阴性的乳腺癌患者行腋窝淋巴结清扫(ALND),并不能提高其总体生存率和延长无病生存期^[1],其术后的并

发症也一直是临床外科治疗的一大难题。近年来,通过前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)替代ALND来评价早期乳腺癌的腋窝淋巴结

收稿日期: 2007-04-25

基金项目: 广西卫生厅科技攻关项目(Z2005189)

作者简介: 庄亚强(1963-),男,1986年中山医科大学临床医疗系毕业,现任广西医科大学第五附属医院普外科副主任医师,主要研究方向: 乳腺外科, E-mail: zhuangyaqing222@sina.com

状况,从而使部分早期患者免行ALND,避免了其并发症。但常规病理在检测微转移灶方面相当困难,甚至可能漏诊,从而导致错误治疗决策。这一直是制约 SLNB 临床应用的重要原因。本研究在 HE 染色基础上,对其中 40 例联合应用免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC)及逆转录聚合酶链反应(retro-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测 SLN 中 CK19 的表达,评价其对预测腋窝淋巴结转移准确性及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本

选取 2005 年 6 月至 2006 年 10 月在本科室住院的乳腺癌患者 66 例,行 SLN 活检。66 例患者平均年龄 27~65(S=40.8)岁。其中 期 40 例,期 26 例。病理类型:浸润性导管癌 30 例,浸润性小叶癌 13 例,单纯癌 15 例,其它类型 8 例。术式:保乳术 6 例,改良根治术 60 例,术前均未行化疗。并对其中 40 例的 SLN 同时进行 3 种方法检测。

1.2 方法

1.2.1 SLN 的定位和取材 66 例患者经穿刺或术中切除乳腺肿块快速活检确诊后,术中将 1%美蓝分 4 点注射于乳晕下或肿瘤周围的皮下组织,按摩注射部位 5~10 min,向乳腺尾部用电刀解剖寻找蓝染的淋巴管,沿蓝染淋巴管解剖鉴别蓝染的淋巴结即为 SLN,共识别成功 63 例。切除 SLN 后,与随后清扫的腋窝 ALN 一起送常规病理检查。随机选取 40 例 SLN,每个 SLN 均从中间剖开,一半用于常规 HE 及 IHC 染色,另一半置 -80 冻存,用于 RT-PCR 检测。整个过程严格避免上皮细胞的交叉污染(导致假阳性)。

1.2.2 病理学和免疫组织化学检查 对所有 SLN 及 ALN 均行常规 HE 染色检查。其中 40 例 SLN 进一步行免疫组织化学染色。免疫组织化学染色采用 SP 法。抗人细胞角蛋白单克隆抗体 CK19 染色试剂盒, DAB 显色试剂盒等均购自福州迈新生物技术公司,染色步骤按试剂盒说明书进行,每批染色均设立阳性对照和阴性对照。光镜下见细胞膜及细胞质呈棕黄色颗粒判定为阳性染色。参照文献^[2],在显微镜下测量淋巴结内癌细胞巢直径 >2 mm 者判定为“转移”,直径 0.2~2 mm 者为“微转移”,直径 < 0.2 mm 者为“孤立肿瘤细胞群”。

1.2.3 应用 RT-PCR 检测 SLN 中 CK19 mRNA 的表达 SLN 中 RNA 提取、cDNA 合成、PCR 试剂均由中山大学达安基因股份有限公司提供,实验方法参考试剂说明书。CK19 的上游引物为 5-CTGAGTGACATGCGAAGCCAATA-3,下游引物为 5-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA-3。cDNA 模板对照: β_2 微球蛋白的 cDNA;阳性对照:乳腺癌细胞系 MCF-7 的 cDNA;阴性对照:胃肠道的良性病变淋巴结的 cDNA;假基因扩增对照:乳腺癌细胞系 MCF-7 的基因组 DNA(假基因是与已知的正常基因在碱基顺序上高度类似,有明显的相似性,但却失掉了作为基因机能的 DNA 区域。有文献报道用 RT-PCR 方法检测 CK19 基因表达时存在假基因干扰^[3],故本研究采用乳腺癌细胞系 MCF-7 的基因组 DNA 进行扩增作为对照,以消除假基因的干扰)。RT-PCR 反应的条件为 93 2 min,然后 93 1 min,55 1 min,共 40 个循环。

1.2.4 SLNB 的评价标准 参照美国 Louisville 大学对 SLNB 技术的评价标准计算 SLN 检出成功率=(SLN 检出例数/实验病人的总数)×100%;准确性=(SLN 真阴性与真阳性例数之和/SLN 活检成功的总例数)×100%;灵敏度=(SLN 阳性例数/腋窝淋巴结转移例数)×100%;假阴性率=(SLN 假阴性例数/腋窝淋巴结转移的例数)×100%;特异性=[SLN 真阴性例数/(SLN 阴性例数+SLN 假阳性例数)]×100%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件包对数据进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 SLN 检出情况

通过美兰示踪 66 名患者中,有 63 例检测到并切除 SLN,SLNB 成功率为 95.5%(63/66 例);共切除 SLN112 枚,每例 1~6 枚(平均 1.6 枚),其中 1 枚者 31 例,2 枚者 19 例,3 枚者 9 例,>3 枚者 4 例;NSLN 共切除 726 枚,每例 8~24 枚,平均 12 枚。未探测到 SLN 的 3 例肿瘤分别位于乳腺内上象限。

2.2 病理学观察

SLN 的 HE 结果与 IHC、RT-PCR 检测结果比较;在 40 例中 HE 检测 SLN 转移阳性 9 例,阴性 31 例,假阴性 2 例(即 SLN 检测转移阴性,而 ALN

检测转移阳性); ALN 转移阳性 11 例, 阴性 29 例。IHC 法除证实其中 9 例外, 对 HE 染色阴性 31 例 SLN 行间距为 100 μm 的 6~8 个层切片 HE 及 IHC 染色又发现 10 例微转移灶; RT-PCR 法除证实其中 9 例外, 又发现 11 例微转移灶; 两例 SLN HE 检测假阴性者, 经 IHC、RT-PCR CK19 检测均为阳性, 故可判定为假阴性。3 种检测 SLN 转移阳性率中, HE 分别与 IHC 和 RT-PCR 比较差异有显著性, 而 IHC 与 RT-PCR 两组间比较差异无显著性 (表 1)。3 种检测对腋窝淋巴结转移预测的敏感度、准确率、假阴性率比较, 经统计学处理, HE 分别与 IHC 和 RT-PCR 比较差异有显著性; 而 IHC 与 RT-PCR 比较差异无显著性 (表 2)。



图 1 蓝染的淋巴管及前哨淋巴结
Fig.1 Blue dyed lymphatic vessel and SLN

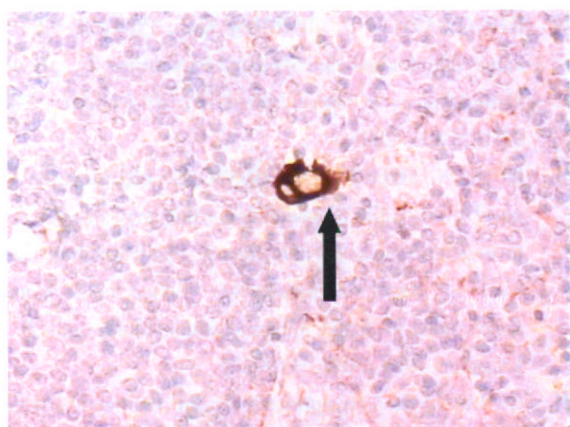


图 2 淋巴结内免疫组化染色微转移癌细胞
Fig.2 Micrometastasis in lymph node dyed by IHC examination ($\times 200$)

表 1 40 例 SLN 的 HE 检查与 IHC、RT-PCR 检测结果比较
Table 1 Comparison of HE staining, IHC, and RT-PCR on examination of 40 cases with SLN

Group	Positive SLN	Negative SLN	Positive rate (%)
HE	9	31	22.50
IHC	19	21	47.50
RT-PCR	20	20	50.00

Compared HE with IHC and RT-PCR, $\chi^2=4.45$, $P<0.05$; $\chi^2=5.4091$, $P<0.05$

表 2 三种方法对预测腋窝淋巴结转移的比较

Table 2 Comparison of HE staining, IHC, and RT-PCR on prediction of axillary lymph node metastasis

Group	Sensitivity (%)	Accuracy (%)	False negative rate (%)
HE	45.0% (9/20) ¹⁾	72.5% (29/40) ²⁾	55.0% (11/20) ³⁾
IHC	95.0% (19/20)	97.5% (39/40)	5.0% (1/20)
RT-PCR	100.0% (20/20)	100.0% (40/40)	0 (0/20)

1) Compared with IHC and RT-PCR, $\chi^2=11.90$, $P<0.01$; $\chi^2=15.17$, $P<0.01$; 2) Compared with IHC and RT-PCR, $\chi^2=9.80$, $P<0.01$; $\chi^2=12.75$, $P<0.01$; 3) Compared with IHC and RT-PCR, $\chi^2=11.90$, $P<0.01$; $\chi^2=15.17$, $P<0.01$

3 讨 论

对乳腺癌来说, 前哨淋巴结 (SLN) 是乳腺癌细胞转移的第一站淋巴结, 其是否存在转移, 可预测区域淋巴结的状况。前哨淋巴结活检术 (SLNB) 是由 Cabanas^[4] 于 1977 年首次报道, 其后被 Alex 等^[5] 用 探头示踪法以及 Giuliano 等^[6] 用染料示踪法用于乳腺癌。随后, 乳腺癌 SLNB 的研究在国际上广泛开展, 取得了很大的进展。近年来国内外的研究显示, 乳腺癌 SLNB 能够准确评估区域淋巴结状态^[7], 在一定程度上可替代传统的腋窝淋巴结清扫术 (ALND), 避免 ALND 带来的后遗症。意大利米兰 SNB185 试验提供了 SLNB 与腋窝淋巴结清扫术比较的结果, 证实 SLN 阴性患者 SLNB 可以安全替代腋窝淋巴结清扫术, 同样具有较低的复发率^[8]。因此, 乳腺癌 SLNB 取代 ALND 并不是减弱外科治疗作用, 而是向更合理的发展方向。

目前公认乳腺癌是全身性恶性疾病, 在早期即可发生血行播散, 影响乳腺癌预后的主要原因是远处的转移。而淋巴结微转移预示着可能出现或已经发生了远处转移。临床发现, 仍有近 30% 腋窝淋巴结转移阴性患者于术后 5 年内出现复发、转移而导致死亡。其主要原因是淋巴结、骨髓及血液

中微转移灶的存在。因此,早期发现淋巴结微转移有着重要的意义。检测乳腺癌患者微转移,是预测乳腺癌患者无瘤生存率及长期生存率的重要指标。乳腺癌微转移是指常规病理学检查检测不到的存在于患者淋巴结、血液及骨髓等体内的微小转移灶。它常以单个细胞或微小细胞团的形式存在,并在一定的条件下分裂增殖成巨转移灶。大量研究表明,腋淋巴结转移与乳腺癌预后直接关系,但常规病理学检查(HE染色)阴性者并不完全表明腋淋巴结无转移。相对于HE染色而言,连续切片、免疫组织化学染色(IHC)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)等技术能提高对SLN微小转移癌的检出率^[9,10]。细胞角蛋白19(Cytokeratin, CK19)是一种针对上皮细胞的单抗,是上皮性细胞的标志基因,仅在正常乳腺细胞和乳腺癌细胞中表达,而在淋巴细胞、骨骼和外周血中表达,可作为乳腺癌在淋巴结、骨骼和外周血等间叶组织转移的标志物^[11]。因此,如果在SLN中检测到CK-19表达则表明有乳腺癌的微转移。RT-PCR技术是在分子水平上检测CK-19,是目前乳腺癌SLN微转移的检测中最敏感和特异的方法。Pendas等^[12]对478例乳腺癌进行前哨淋巴结图谱分析研究,其中385例HE染色检查阴性者中,以CK19为标志物经免疫组化法再次检测,有41例(10.6%)发现转移癌细胞,从而使这部分病例的临床病理分期由I期提高到II期。Choi等^[13]对行SLN活检术的81例乳腺癌进行复查,发现常规HE染色阳性15例(18.5%),经免疫组化法再次检测,则使阳性数增至23例(28.4%)。本组40例SLN常规HE染色阳性9例(22.5%),经免疫组化法再次检测,则使阳性数增至19例(47.5%),而RT-PCR检测则增至20例(50%)。可见常规病理学方法在SLN检测上并不可靠,故在SLNB中,应强调对SLN微小转移灶的检测。

目前临床上进行淋巴结的病理检查通常把淋巴结一分为二,取中间1~2个层面进行常规HE染色检查,可基本为临床提供较准确的病理分期资料,然而对微小转移灶很难避免假阴性问题,从而造成治疗决策上的失误,HE染色阴性的淋巴结微转移可达39%~40%^[14]。而本组微转移检出率达38.7%。文献报道,1~4个层面的切片加免疫组化检查可发现10%~15%单张HE染色阴性的淋巴结内有微小转移灶;如果行全淋巴结连续切片加免疫组化检查,则发现微小转移灶的机率更大^[15],但

其工作烦琐和费时,难以在临床常规开展。SLN是最有可能发生转移的淋巴结,而数量少,可以对其进行细致的检查,以便找出<2mm的微转移灶,对判断预后提供更加可靠的依据。本组对HE染色阴性病例SLN行间距为100 μ m的6~8个层切片HE及IHC染色;应用RT-PCR技术检测40例SLN中的CK19,结果显示,IHC染色及RT-PCR检测可有效的检出淋巴结微转移灶。本组有2例SLN的HE染色检测阴性,但是其它腋窝淋巴结阳性转移,通常称为“跳跃转移”,该2例SLN经IHC及RT-PCR检测CK19均阳性表达,提示微转移是导致假阴性的主要原因之一。本研究显示IHC及RT-PCR检测可解决这一问题。本研究结果显示,乳腺癌SLN中微转移现象较常见,仅凭常规病理切片阴性就放弃腋淋巴清扫术,易导致微小癌灶残留而复发、转移。

随着对乳腺癌SLNB研究的深入,SLN微转移检出率的提高,SLNB终将取代ALND进入临床,为无腋窝转移的早期乳腺癌患者提供最佳的治疗手段。有作者认为与ALND相比,SLNB上肢并发症降低,生活质量明显提高,应作为临床腋窝淋巴结阴性的早期乳腺癌患者的首选治疗^[16]。因此,随着SLNB技术的成熟,有望指导腋窝淋巴结的清扫范围,从而改变目前乳腺外科的治疗模式。

参考文献:

- [1] FISHER B, JEONG J H, ANDERSON S, et al. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(8): 567-575.
- [2] KLEVESATH M B, BOBROW L G, PINDER S E. The value of immunohistochemistry in sentinel lymph node histopathology in breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(12):2201-2205.
- [3] RUUD P, FODSTAD O, HOVIG E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(1):119-125.
- [4] CABANAS R. An approach for the treatment of Penile carcinoma. *Cancer*, 1977, 39(2):456-466.
- [5] ALEX J C, KRAG D N. Gamma-probe guided

(下转第 561 页 to page 561)

- 2001, 88(Suppl): 27- 34.
- [4] WYNDAELE J J. The overactive bladder [J]. BJU Int, 2001, 88(2):135- 138.
- [5] RAYMOND JR, HOATOWICH M, LEFKOWITZ, et al. Adrenergic receptors models for regulation of signal transduction processes[J]. Hypertension, 1999, 15:119- 131.
- [6] MORITA T, MASUDA H, TOSAKA A, et al. Sex different in function and distribution of beta - adrenoreceptor in rabbit urinary bladder [J]. J Urol, 1998, 159: 555- 558.
- [7] KAKIZAKI H, KOYANAGI T. Current view and status of the treatment of lower urinary tract symptoms and neurogenic lower urinary tract dysfunction [J]. BJU Int, 2000, 85(Suppl 2): 25- 30.
- [8] GU BAOJUN, ASHIZUKA O, IGAWA Y. Role of supraspinal α_1 -adrenoceptors for voiding in conscious rats with and without Bladder outlet obstruction [J]. J Urol, 2002, 167: 1887- 1891.
- [9] MALLOY B J, PRINCE D T, PRICE P R, et al. α_1 - Adrenergic receptor subtypes in human detrusor [J]. J Urol, 1998, 160: 937- 943.
- [10] HAMPEL C, DOLBER P C, SMITH M R, et al. Modulation of bladder α_1 -adrenergic receptor subtype expression by bladder outlet obstruction [J]. J Urol, 2002, 167(2): 1513- 1521.
- [11] BOSCH R. Instability of the bladder: Pathophysiology unknown? A synopsis of clinical points of interest [J]. Neurourol Urodyn. 1990, 9(7): 563- 565.
- [12] CHEN Q, TAKAHASHI S, ZHONG S, et al. Function of lower urinary tract in mice lacking α_1 d - adrenoceptor [J]. J Urol, 2005, 174(1): 370- 374.
- [13] STEWARD W F, VON ROOYEN J B, CUNDIFF G W, et al. Prevalence and burden of overactive bladder in United States [J]. World J Urol, 2003, 20(4):327- 336.
- [14] ELBADAWJ A, MAILEMARIAM S, YALLA S V. Structural basis of geriatric voiding dysfunction: prospective ultrastructural/urodynamics evaluation of its natural evolution [J]. J Urol, 1997, 157(5):1814- 1822.
- [15] BOSCH R. Instability of the bladder: Pathophysiology unknown? A synopsis of clinical points of interest [J]. Neurourol Urodyn, 1990, 9(4):563- 565.

(编辑 徐 杰)

(上接第 556 页 from page 556)

- localization of lymph node [J]. Surg Oncol, 1993, 2(2): 137- 143.
- [6] GIULIANO A E, HAIGH P I, BRENNAN M B, et al. Prospective observational study of sentinel lymphdenectomy with out further axillary dissection in patients with sentinel node negative breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(13):2553- 2559.
- [7] KLEVESATH M B, BOBROW L G, PINDER S E. The value of immunohistochemistry in sentinel lymph node histopathology in breast cancer [J]. Br J Cancer, 2005, 92(12): 2201- 2205.
- [8] GALIMBERTI V. How safe is a sentinel node biopsy [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(2):114- 118.
- [9] AL SHIBLI K I, MOHAMMED H A, MIKALSEN K S, et al. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma: analysis of 70 cases by frozen section [J]. Ann Saudi Med, 2005, 25(2):111- 114.
- [10] 郑镇木, 黄少明, 徐达传. 乳腺癌前哨淋巴结活检的研究进展 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2003, 21(3): 293- 294.
- [11] STATHOPOULOS E N, SANIDAS E, KAFOUSI M, et al. Detection of CK19 mRNA - positive cell in the peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes [J]. Ann Oncol, 2005, 16(3): 240- 246.
- [12] PENDAS S, DAUWAY E, COX C E, et al. Sentinel node biopsy and cytokeratin staining for the accurate staging of 478 breast cancer patients [J]. Am Surg, 1999, 65(6):500- 505.
- [13] CHOI S H, BARSKY S H, CHANG H R. Clinicopathologic analysis of sentinel lymph node mapping in early breast cancer [J]. Breast J, 2003, 9(3): 153- 162.
- [14] 冯玉梅, 郝希山, 于 泳, 等. CK19 作为微转移癌检测基因标志的假基因干扰及解决方法 [J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(4): 330- 331.
- [15] VAILE G, SANZAGNI A, PRUNERI G, et al. Histopathologic examination of axillary sentinel lymph node breast carcinoma patients [J]. J Surg Oncol, 2004, 85(3): 123- 128.
- [16] FLEISSIG A, FOLLOWFIELD L J, LANGRIDE C L, et al. Post-operative arm Morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel lymph node biopsy with standard axillary treatment in the management of patient with early breast cancer [J]. Breast cancer Res Treat, 2006, 95(3): 279- 293.

(编辑 徐 杰)