

· 临床研究 ·

腔镜腋窝淋巴结清扫术与传统腋窝清扫术前后 外周血潜伏肿瘤细胞的对比研究

郭美琴 姜军 范林军 杨新华

【摘要】 目的 探讨乳腺癌腔镜腋窝淋巴结清扫术安全性。**方法** 64 例乳腺癌患者分为腔镜手术组和传统手术组,每组 32 例。应用荧光实时定量 PCR 技术分别检测乳腺癌患者术前和术后外周血 CK-19 mRNA 表达。**结果** 64 例乳腺癌患者外周血 CK-19 mRNA 阳性率 32.81%,腔镜手术组和传统手术组的外周血 CK-19 mRNA 阳性率分别为 31.25% 和 34.38%,两组手术可能造成的外周血潜伏肿瘤细胞(OTC)扩散几率分别为 4.34% 和 8.70%,两组间的差异无统计学意义。术前化疗后乳腺癌患者外周血中仍然存在 OTC,且随肿瘤分期的增高而增多。**结论** 腔镜腋窝淋巴结清扫手术与传统手术对外周血潜伏肿瘤细胞影响的差异无统计学意义;腔镜腋窝淋巴结清扫手术与传统腋窝淋巴结清扫术相比不增加肿瘤扩散的风险。

【关键词】 内窥镜检查法;乳腺癌;腋窝淋巴结清扫;潜伏肿瘤细胞

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Comparative study of preoperative and postoperative occult tumor cells in peripheral blood of breast cancer patients undergoing E-ALND and ALND GUO Mei-qin, JIANG Jun, FAN Lin-jun, YANG Xin-hua. Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To evaluate the safety of endoscopic axillary lymph node dissection (E-ALND) by liposuction. **Methods** Sixty-four cases of breast cancer were divided into an E-ALND group and a traditional ALND group, 32 cases in each group. CK-19 mRNA copy numbers in peripheral blood were detected with SYBR Green I real time polymerase chain reaction before and after operation. **Results** The positive expression rate of CK-19 mRNA was 32.81% in peripheral blood in the 64

patients, and 31.25% and 34.38% in the E-ALND group and the ALND group, respectively. The likelihood of hemogenous dissemination of tumor cells was 4.34% and 8.70% in the E-ALND group and the ALND group, respectively; OTC (occult tumor cell) in peripheral blood of patients who underwent preoperative chemotherapy could still be detected, and increased with the upgrading of breast cancer stage. **Conclusions** There is no difference in hemogenous dissemination of tumor cells in breast cancer between E-ALND and traditional ALND. Compared with the ALND group, the likelihood of hemogenous dissemination of tumor cells does not increase in the E-ALND group.

【Key words】 Endoscopy; Breast neoplasms; Axillary lymph node dissection; Occult tumor cell

乳腺癌患者腋窝淋巴结状态既是手术后选择治疗方案的重要标准,又是评价患者预后的主要指标。传统腋窝淋巴结清扫手术(axillary lymph node dissection, ALND)所致的上肢淋巴水肿和疼痛、感觉异常、肩关节活动受限等亦是影响患者生活质量的重要问题。腔镜腋窝淋巴结清扫手术(endoscopic axillary lymph node dissection, E-ALND)能够显著减少上述并发症的发生^[1],但其安全性如何尚无统一认识。脂肪抽吸、CO₂充气以及腔镜清扫腋窝淋巴结与传统手术相比是否会增加肿瘤细胞的血行扩散,有关该方面的研究报道很少。第三军医大学西南医院乳腺中心于2005年1月至2006年1月对32例腔镜乳腺癌腋窝淋巴结清扫手术前后及32例传统手术前后外周血潜伏肿瘤细胞(occult tumor cells, OTC)进行了研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择标准

①肿瘤位于外上象限以外,因为外上象限肿瘤距离腋窝较近,切除肿瘤之后不利于建立密闭的腔镜操作空间,而且部分病例可以通过此切口完成腋窝淋巴结清扫;②肿瘤直径 ≤ 3 cm且与皮肤及胸肌筋膜无粘连;③同侧腋窝体检或彩超检查无明显肿大的淋巴结或淋巴结直径小于1 cm;④术前检查无远处转移;⑤无同侧腋窝手术史。

1.2 临床资料

腔镜手术组32例患者均为女性,年龄29~62岁,平均46.2岁。病理分期(AJCC,第6版):Ⅰ期15例,Ⅱ期14例,Ⅲ期3例。病理类型:浸润性导管癌

26 例,浸润性小叶癌 5 例,内分泌癌 1 例。传统手术组 32 例患者均为女性,年龄 34 ~ 66 岁,平均 46.9 岁。两组患者术前均经空芯针穿刺或院外切除活检确诊,术前化疗 1 ~ 3 周期,方案为 CEF 或 TE。两组患者的临床资料具有可比性(表 1)。

表 1 腔镜腋窝淋巴结清扫术和传统手术患者外周血 OTC 检测的临床资料比较

临床资料	腔镜手术组(例)	传统手术组(例)	χ^2 值	P 值
例数	32	32		
肿瘤分期			3.388	0.184
I 期	15	8		
II 期	14	19		
III 期	3	5		
手术方式			5.600	0.067
MRM ^a	20	28		
BCT ^b	8	2		
NS-MRM ^c	4	2		
肿瘤类型 ^d			0.504	0.777
浸润性导管癌	26	24		
浸润性小叶癌	5	6		
内分泌癌	1	0		
鳞状细胞癌	0	2		

a: MRM 为乳腺癌改良根治术;b: BCT 为乳腺癌保乳手术;c: NS-MRM 为保留乳头乳腺癌改良根治术;

d: 由于浸润性导管癌和浸润性小叶癌之外的病理类型较少,故合并进行统计处理

1.3 腔镜乳腺癌腋窝淋巴结清扫手术方法

患者全麻后于腋窝多点分层次注入脂肪膨胀液(生理盐水 200 ~ 250 ml, 灭菌蒸馏水 200 ~ 250 ml, 2% 利多卡因 20 ml, 肾上腺素 0.5 mg), 范围内侧达胸大肌外缘, 外侧到背阔肌前缘, 上界为腋顶部腋窝外皱襞, 下界到背阔肌与前锯肌的夹角处。20 min 后于腋中线背阔肌与前锯肌的夹角处切开皮肤 1 cm, 依次抽吸腋窝皮下、深部、胸小肌后方及背阔肌和前锯肌之间的脂肪。完毕后经吸脂孔放入 10 mm Trocar, 充入 CO₂, 充气压力维持在 6 mm Hg (1 mm Hg = 1.33 kPa); 向上距此吸脂孔约 5 ~ 7 cm 于胸大肌外侧缘和背阔肌前缘分别置入 5 mm Trocar, 与皮肤固定, 插入分离钳和超声刀。由于腋窝组织疏松, 加上大部分脂肪已经被吸除, 即可按照常规腋窝清扫术的做法, 将 I、II 组淋巴结及其周围的少量脂肪、结缔组织整体切除, 对于腋窝淋巴结肿大明显可疑转移的病例, 尤其胸小肌后 II 站淋巴结可疑转移者, 继续腔镜下清扫锁骨下淋巴结。

1.4 外周血潜伏肿瘤细胞的检测^[2]

1.4.1 标本收集和保存:乳腺癌患者麻醉后术前和术后采集外周血各 10 ml,肝素抗凝。同期乳房良性疾病患者 20 例术前各采外周血 10 ml 肝素抗凝作为阴性对照。所有抗凝血采集后立即进行单个核细胞分离(人淋巴细胞分离液,天津灏洋生物制品科技有限公司),将细胞悬液分装入灭菌冻存管内,标记后放入液氮保存待测。MCF-7 乳腺癌细胞作为阳性对照。

1.4.2 SYBRGreen 1 实时定量 PCR 及产物分析:两步法完成 SYBRGreen 1 实时定量 PCR,检测外周血中 CK-19 mRNA 水平,了解 OTC 情况:①总 RNA 提取和 cDNA 合成。应用 Tripure(Roche 公司)提取总 RNA,紫外分光光度计检测其浓度和 A 值,保证 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.65$;随机抽选 10 个样本经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,再次验证 RNA 无降解。按照 TaKaRa 反转录反应试剂盒(大连宝生物工程公司)说明进行逆转录合成 cDNA。②实时定量 PCR。以上述方法获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。CK-19 mRNA 和内参照 β -actin 引物序列参考相关文献,由大连宝生物公司合成。CK-19 上游引物为 5'-AGGTG GCCGCTCCGCA-3',下游引物为 5'-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA-3'; β -actin 上游引物为 5'-ATCATGTTTGAGACCT-TCAA-3',下游引物:5'-ATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'。优化后的 PCR 反应体系如下:SYBR Rremix ExTaqTM 10.0 μ l,上、下游引物各 0.4 μ l,模板 2.0 μ l,加无菌双蒸水至 20 μ l。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环 40 次后进行溶解曲线分析,根据设定临界域值时的循环数(Ct 值)对 cDNA 水平进行定量。PCR 产物可通过溶解曲线来确认。若为单峰,表示未形成引物二聚体,非特异性扩增多,定量结果可靠。

1.5 统计学方法

应用 SPSS10.0 统计软件进行 t 检验和 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 OTC 检测

64 例浸润性乳腺癌患者中,外周血 CK-19 mRNA 阳性者 21 例,占 32.81% (21/64);20 例乳腺良性疾病患者外周血中均未检测到 CK-19 mRNA。腔镜组外周血 CK-19 mRNA 阳性者 10 例,占 31.25% (10/32),其中术前、术后外周血 CK-19 mRNA 均为阳性者 6 例,仅术前阳性者 3 例,仅术后阳性者 1 例,手术可能造成的外周血 OTC 扩散几率为 4.34% (1/23);传统手术组外周血 CK-19 mRNA 阳性

11 例,占 34.38% (11/32),其中术前、术后 CK-19 mRNA 均阳性 3 例,仅术前阳性 6 例,仅术后阳性 2 例,传统手术可能造成的外周血 OTC 扩散几率为 8.70% (2/23)。腔镜腋窝淋巴结清扫术与传统腋窝淋巴结清扫手术前后外周血 OTC 的比较见表 2。

表 2 腔镜腋窝淋巴结清扫与传统手术前、后外周血 OTC 的比较

术后	腔镜手术组(术前)		传统手术组(术前)	
	OTC(+)	OTC(-)	OTC(+)	OTC(-)
OTC(+)	6	1	3	2
OTC(-)	3	20	6	21

2.2 手术对外周血 OTC 的影响

对手术前后外周血均可检测到 CK-19 mRNA 的病例进行分析,CK-19 mRNA 拷贝数于术前平均为 82 519 413.5 拷贝/ μ l,术后平均为 28 656 541.55 拷贝/ μ l,两者的差异无统计学意义,且术后未显示比术前更高的拷贝数。

2.3 外周血 OTC 与肿瘤分期的关系

随着乳腺癌分期的增高,外周血 OTC 的检出率增加。其中,腔镜手术组术前外周血 OTC 阴性,术后阳性的 1 例患者病理分期为 $T_2N_3M_0$,传统手术组术前 OTC 阴性,术后阳性的 2 例患者病理分期为 $T_1N_2M_0$ 和 $T_2N_1M_0$ (表 3)。

表 3 患者外周血 OTC 与肿瘤分期的关系

分期	腔镜手术组				传统手术组			
	阳性 例数	阴性 例数	χ^2 值	P 值	阳性 例数	阴性 例数	χ^2 值	P 值
I 期	2	13			1	7		
II 期	6	8			6	13		
III 期	2	1	10.68	0.005	4	1	6.45	0.04

3 讨论

外周血是肿瘤细胞容易到达的部位,其成分主要是血细胞,缺乏其他类型细胞特别是上皮细胞,因而为实体瘤微量肿瘤细胞的检测开了一扇窗口^[2]。由于目前在实体瘤中尚无特异、明确的肿瘤标记物,因此主要采用组织特异 mRNA 转录物为标志,肿瘤细胞特异性 mRNA 阳性则预示着可能出现或已经发生了远处转移。有学者认为,CK-19、mam、PIP 等是检测乳腺癌隐匿性转移最可信的指标,特别是 CK-19 对于外周血及干细胞产品中的 OTC 检测显示出更高的特异

性^[3, 4]。本组病例采用荧光实时定量 PCR 技术,检测腔镜辅助与传统乳腺癌腋窝淋巴结清扫手术前后外周血 CK-19 mRNA 表达的变化,以了解腔镜手术和传统手术对外周血 OTC 的影响。

在本研究中,腔镜手术组可能导致的外周血 OTC 扩散几率为 4.34%,传统手术导致的扩散几率则为 8.70%,说明腔镜腋窝淋巴结清扫和传统开放手术对外周血 OTC 的影响没有差异,腔镜手术不会比传统手术增加肿瘤细胞的血行扩散。对手术前后外周血 OTC 均阳性者的 CK-19 mRNA 含量进行分析,未发现术后 CK-19 mRNA 拷贝数的显著增加。术前外周血阳性术后却未检测到 OTC 者于两组患者中均存在,其确切机制尚不明确。有学者认为手术本身不一定会增加肿瘤的扩散^[5],但是大多数研究支持手术可促进肿瘤细胞扩散的观点。产生此差异的原因可能与各学者研究采用的基因标记物不同、检测方法不同及病例数过少有关。我们分析可能的原因有:术后血液稀释,单位外周血 OTC 含量较术前减少,不能被现有技术检测出来;手术切除了原发肿瘤,使进入循环血的肿瘤细胞减少;或者术前采取外周血时穿刺皮肤使上皮细胞入血出现假阳性。

本研究还发现即使是 I 期腋窝无淋巴结转移的浸润性乳腺癌患者,循环血中也存在 OTC,而且随着分期的增加,外周血 OTC 的检出率增加,再次验证了乳腺癌是一个全身性疾病的理论。即使按照现行的 TNM 分期为 I ~ II a 期的乳腺癌,如果病理学可观察到血管或/和淋巴管癌栓,则外周血 CK-19 mRNA 阳性率增加^[6]。经过术前化疗的乳腺癌患者外周血仍然存在 OTC,在手术切除原发病灶后,术前已入血的 OTC 仍有半数存活,这部分患者仍有可能发生远处转移,因此术后合理的综合治疗是必需的。

参考文献

- [1] Salvat J, Knopf J F, Ayoubi J M, *et al.* Endoscopic exploration and lymph node sampling of the axillary preliminary finding of a randomized pilot study comparing clinical and anatomo-pathologic results of endoscopic axillary lymph node sampling with traditional surgical treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996,70:165 - 173.
- [2] 周生余,石远凯. 乳腺癌患者骨髓和外周血中潜伏肿瘤细胞的检测与临床意义. *国外医学·肿瘤学分册*, 2001,28:213 - 216.
- [3] Vannucchi A M, Glinz S, Bossi A, *et al.* Detection of contaminating tumor cells by RT-PCR in breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*, 1999,24:228 - 229.
- [4] Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, *et al.* Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer*, 2001,93:162 - 171.
- [5] Carcia Olmo D, Ontanon J, Garcia Olmo D C, *et al.* Experimental evidence does not support use of the "no-touch" isolation technique in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 1999,42:1449 - 1456.
- [6] 徐青,陈瑞新,王志伟,等. 大肠癌组织血管生成与患者外周血 CK-20 mRNA 表达的临床研究. *中华医学杂志*, 2005,85:1 205 - 1 208.

(收稿日期:2007-04-18)

(本文编辑:罗承丽)