

· 临床研究 ·

乳腺癌前哨淋巴结微转移检测研究

范蕾 穆殿斌 高彦 仲伟霞 王春建 王永胜

【摘要】 目的 探讨更为合理的乳腺癌前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)微转移(micrometastasis, MMs)的病理检测方法和临床意义。**方法** 对 50 例常规病理证实阴性的 109 枚 SLN 以 100 μm 间距行多层切片(step section, SS), 给予 HE 染色及广谱细胞角蛋白单抗 AE1/AE3 免疫组化(immunohistochemical, IHC)检测, 比较不同的检测方法。**结果** 50 例 SLN 通过 SS-HE 法和联合 IHC 法检测分别检出新的转移灶 13 例和 17 例, 阳性检出率分别提高 26% 和 34%; 联合 IHC 新增 SLN 阳性检出 4 例, 提高检出率 8% ($P > 0.05$); 全部 1166 层切片中, SS 病理检测出阳性层面 57 层(4.9%), 联合 IHC 新增阳性层面 28 层(2.4%) ($P < 0.05$); 按 100、200、300、400、500 μm 不同间距进行 SS 对 MMs 的检出率分别是 26%、20%、20%、16%、14%; 联合 IHC 不同间距对 MMs 的检出率分别是 34%、32%、30%、32%、30%。**结论** SS 检测对于微小病灶的检出具有显著优势, 联合 IHC 显著提高阳性层数的检出, 但对 SLN 检出率的提高的差异无统计学意义。按 100、200、300、400、500 μm 不同间距进行 SS 对 MMs 的检出率无统计学差异。

【关键词】 前哨淋巴结; 乳腺癌; 微转移; 多层切片; 免疫组化

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Study on detection of micrometastasis of sentinel lymph node in breast cancer

FAN Lei, MU Dian-bin, GAO Yan, ZHONG Wei-xia, WANG Chun-jian, WANG Yong-sheng. Breast Disease Center, Tumor Hospital of Shandong Province, Jinan 250117, China

【Abstract】 Objective To explore a more rational pathological detection method for micrometastasis of sentinel lymph nodes (SLNs) and its clinical significance. **Methods** Fifty women with breast cancer were included. 109 SLNs of the 50 patients were identified negative by standard hematoxylin and eosin (HE) staining examination carried out on initial levels. All SLNs were step sectioned (SS) at 100 μm interval and for each level both HE stain examination and immunohistochemical detection with AE1/AE3 were performed. Then different

作者单位: 250117 济南, 山东省肿瘤医院乳腺病中心

通讯作者: 王永胜, E-mail: wangyush@hotmail.com

穆殿斌同为第一作者

detection methods were analyzed. **Results** In the 50 negative SLN patients, 13 and 17 cases were upstaged in node status by using SS-HE method and combined IHC method separately, therefore the positive detecting rate was increased by 26% and 34%, respectively. Four cases were upstaged in node status via using SS combined with IHC method, the positive detecting rate was increased by 8% ($P > 0.05$). In all 1166 slides, 57 slides (4.9%) were abnormal by SS, and 28 (2.4%) slides were abnormal by SS combined with IHC ($P < 0.05$). The rate of detection of MMs in 100-, 200-, 300-, 400-, and 500 μm intervals was 26%, 20%, 20%, 16%, and 14% by SS with HE stain respectively, and 34%, 32%, 30%, 32%, and 30% by the method of SS combined with IHC. **Conclusions** SS could significantly increase the detection of occult tumor deposits in negative SLN with routinely histological exam; IHC could increase the detection of abnormal slides; SS in different intervals does not add significance.

【Key words】 Sentinel lymph node; Breast neoplasms; Micrometastasis; Step section; Immunohistochemistry

腋窝淋巴结切除术(axillary lymph node dissection, ALND)作为浸润性乳腺癌腋窝处理的标准模式,近一个世纪以来占据统治地位。而近 10 年来出现的前哨淋巴结活检术(sentinel lymph node biopsy, SLNB)为临床医师提供了新的选择。目前国际公认,腋窝淋巴结阴性的早期乳腺癌,SLNB可以替代ALND判断腋窝淋巴结状态^[1]。因此,明确 SLN 状态对确定乳腺癌分期、判断预后及指导治疗具有极其重要的意义。尽管如此,到目前为止关于 SLN 的病理检测还没有统一的方案。

美国癌症联合委员会(the American Joint Committee on Cancer, AJCC)将转移灶的分类定义为:最大直径超过 2 mm 的转移灶为肉眼可见转移(macro-metastasis),能通过常规方法检测出;0.2 ~ 2 mm 之间的转移灶为微转移(MMs);< 0.2 mm 的微小转移灶为孤立的肿瘤细胞(isolated tumor cells, ITCs)^[2]。是否应该对 SLN 进行更为详尽的病理检测、病理检测的程度、是否应该联合 IHC 检测等方面仍存有争议。

本研究对 50 例乳腺癌患者常规病理检测为阴性的 SLN 回顾性地进行 MMs 检测,以探讨更为合理的 SLN 病理诊断模式。

1 资料和方法

1.1 一般资料

连续选取 2001 年 12 月至 2003 年 7 月于山东省肿瘤医院乳腺病中心接

受 SLNB 并经病理证实 SLN 为阴性的女性乳腺癌患者 50 例,年龄 32 ~ 80 岁(平均 48.9 岁)。患者一般状况、临床及病理资料、肿瘤类型和分级见表 1。

表 1 50 例 SLN 阴性乳腺癌患者的临床及病理情况总结

临床及病理因素	患者例数
年龄	
范围(32 ~ 80 岁)	
中位数(47.3 岁)	
月经状况	
绝经前(≤50 岁)	33 (66%)
绝经后(>50 岁)	17 (34%)
手术方式	
乳房切除 + SLNB	16 (32%)
改良根治术	1 (2%)
肿物扩大切除 + SLNB	32 (64%)
肿物扩大切除 + ALND	1 (2%)
病理分期	
pTis	0
pT1	36 (72%)
pT2	14 (28%)
病理类型	
浸润性导管癌	30 (60%)
浸润性小叶癌	13 (26%)
复合癌	6 (12%)
髓样癌	1 (2%)

1.2 SLN 活检及标本收集

SLN 经核素和染料联合检测法于患者术中取得。所有 >5 mm 的 SLN 均延长轴对分,对分时尽量保证通过其最大圆周面,以保证第一层组织切片获得最大暴露面积。将 SLN 进行术中快速冰冻病理检查,阴性者不接受 ALND。冰冻剩余组织于术后常规进行福尔马林固定、脱水、石蜡包埋,于初始层面取 5 μm 厚切片,常规 HE 染色,光镜分析。

1.3 主要试剂

本研究所选择的广谱角蛋白抗体 AE1/AE3,为 Dako 公司单克隆小鼠抗人细胞角蛋白工作液(编号:GM351502),表达位于细胞质。二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒(ChemMate™ EnVision +/HRP/DAB Rb & Mo) Envision System 试剂盒为 Dako 公司工作液(编号:GK500705)。

1.4 SLN MMs 检测

50 例患者术中共检出 SLN 109 枚,最少 1 枚,最多 5 枚,平均数 2.1 枚,术

中及术后常规病理检查均证实为阴性。将石蜡包埋标本按100 μm 间距完整地进行SS。每个水平获得4张连贯的5 μm 厚切片:1张行HE染色,1张行IHC染色,2张备用。对切片进行连续编号,重新镜下分析。比较不同层面切片,测量转移灶大小。转移灶大小根据切片横断面或厚度的任一最大值确定;同一切片中如发现明显的多灶转移,由最大转移灶的值确定。肿瘤细胞的判断标准:(1)细胞核大,染色深,核质比例失调等异形表现;(2)AE1/AE3阳性。以上均由两名病理科医师在不知道HE/IHC是否有MMs的情况下,独立做出判断。

1.5 统计学处理

应用SPSS 10.0软件包进行统计学处理,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

50例常规病理检测阴性患者中,有17例(34%)患者SLN中发现新的转移灶,其中16例为单枚SLN转移,1例有2枚SLN转移。阳性患者临床及病理情况见表2。

表2 微转移检测阳性患者的临床及病理情况总结

临床及病理因素	患者例数
年龄	
范围(33~60岁)	
平均数(47.3岁)	
SLN数目	
中位数(2.3枚)	
月经状况	
绝经前(≤ 50 岁)	10 (59.0%)
绝经后(> 50 岁)	7 (41.0%)
肿瘤部位	
外上	12 (70.6%)
外下	3 (17.6%)
内上	2 (11.8%)
手术方式	
乳房切除+SLNB	8 (47.1%)
肿物扩大切除+SLNB	9 (52.9%)
发现时的病理分期	
pT ₁	11 (65.0%)
pT ₂	6 (35.0%)
病理类型	
浸润性导管癌	9 (52.9%)
浸润性小叶癌	6 (35.3%)
复合癌	2 (11.8%)

SS 切片中隐匿转移灶可被 HE 和 IHC 单独或共同检出。HE 染色发现转移 13 例(26%), 13 枚 SLN; 与常规病理检测相比差异有统计学意义($P = 0.00$)。IHC 染色发现转移 16 例(32%), 18 枚 SLN。二者联合检出 17 例(34%), 较单纯 HE 染色提高检出率 8%, 差异无统计学意义($P = 0.38$)。

17 例新发转移灶中, 1 例发现肉眼可见转移, 10 例发现 MMs(其中 7 例为 0.2 ~ 1.0 mm, 3 例为 1.0 ~ 2.0 mm), 6 例检出 ITCs。

全部 1166 张 HE 染色切片中有 57 张(4.9%)发现新转移灶, IHC 染色增加检出 27 张(2.3%), 联合法检出 84 张(7.2%)。联合法与 HE 染色病理检测比较, 在阳性切片层数的检出方面差异有统计学意义($P = 0.015$)。

按 100、200、300、400、500 μm 间距进行 SS 所获得的阳性结果见表 3、4。不同间距对 MMs 的检出率在各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。任何间距中, 肉眼可见转移($> 2.0 \text{ mm}$)都未被遗漏。

表 3 不同间距阳性切片的检出率

间距/ μm	HE(+)/HE 总(%)	IHC(+)/IHC 总(%)
100	57/1166 (4.9%)	84/1166 (7.2%)
200	29/580 (5.0%)	44/580 (7.6%)
300	20/419 (4.8%)	29/419 (6.9%)
400	12/330 (3.6%)	24/330 (7.3%)
500	10/274 (3.7%)	21/274 (7.7%)

表 4 不同间距 MMs 检出率

间距/ μm	SS-HE(+)/总(%)	联合(+)/总(%)
100	13/50 (26%)	17/50 (34%)
200	10/50 (20%)	16/50 (32%)
300	10/50 (20%)	15/50 (30%)
400	8/50 (16%)	16/50 (32%)
500	7/50 (14%)	15/50 (30%)

肉眼可见转移通过 HE 或 IHC 两种方法均可被检出。2 例经 IHC 证实为 MMs。MMs(尤其是 $> 1.0 \text{ mm}$)通过 HE 染色均可发现异常, IHC 染色可进一步证实。HE 染色检出 ITCs 4 例, 经 IHC 证实 2 例为 MMs; 4 例 ITCs 仅通过 IHC 染色发现; 1 例 ITCs 通过 HE 染色发现, IHC 染色未见异常。

3 讨论

SLN 阳性, 特别是超过 2 mm 的肉眼可见转移, 是乳腺癌重要的预测因子^[3], 应该常规进行 ALND, 以便了解淋巴结状态确定分期、指导治疗^[4]。但

对于 MMs 目前没有标准的病理检测方案,对于是否能从 ALND 中获益尚未明确^[5-6]。普遍的观点认为,对 SLN 的评估至少应发现 >2.0 mm 的转移灶^[7]。但较小的转移灶可能被漏检,常见的原因包括标本取材的错误、切片方式、淋巴结大小、标本在蜡块中的位置、转移灶在淋巴结中的位置较深、阅片时错误判断等^[8-10]。MMs 的预后意义以及是否应该与 ITCs 和 N_0 组等同施治尚有争议^[10-12]。总体而言,多数学者建议对 MMs 给予腋窝处理及辅助治疗。

本研究对常规病理检测阴性者的 SLN 进行了全面细致地检测,结果证实 SS 对于微小病灶的检出具有显著优势。该结果与过去相关研究的结果比较一致。在 SS 基础上,联合 IHC 可显著提高阳性层数的检出率,但对 SLN 检出率提高的差异也无统计学意义。按 100、200、300、400、500 μm 不同间距进行 SS 对 MMs 检出率的差异无统计学意义。

最近 Falconieri 等^[13]间隔 50 μm 对 67 例 SLN 进行 SS,并比较 100、150、200、250 及 500 μm 间距对 MMs 的检出情况。该试验显示对目标病灶为 1.0 mm 的 MMs 灶,各间距对 MMs 检出率的差异有统计学意义。该结果与本研究结果比较符合。

大量研究证实:HE 染色能在 1×10^4 正常细胞中检出 1 个癌细胞,而 IHC 能在 1×10^5 正常细胞中检出 1 个癌细胞,敏感性提高了 10 倍,更有助于发现微小转移灶。欧洲有机构最近统计发现,连续或多层切片 HE 染色、IHC 染色均可显著提高 SLN 中 MMs 及 ITCs 的检出率,两者联合可使检出率提高 9% ~ 47%^[14]。这项调查提示,研究方法不同使联合法的结果存在很大的差异。本研究也提示:IHC 染色可显著提高 ITCs 的检出率;联合法在阳性切片层数的检出率与 SS-HE 法比较,差异有统计学意义($P = 0.015$);但对于 0.2 mm 以上的病灶,两者检出率差异无统计学意义。作者考虑可能存在以下原因:(1)切片由两位有经验的病理医师进行阅片,提高了 HE 阳性例数的检出。(2)检测方法细致、间距小,使阳性例数的检出差异变小,更多地影响到阳性层数的检出。(3)由于本研究为回顾性研究,所有的标本于术中均接受快速冰冻病理检查,冰冻剩余组织经常规处理接受常规 HE 染色。由于两次检测均需获得最大平面,致使剩余组织量明显减少。这也是 SS 获得的切片层数较少的原因。

MMs 或 ITCs 的预后意义尚未明确,致使临床处理复杂化。SLN 阴性患者由于 MMs 或 ITCs 的发现变为阳性,其 TNM 分期将相应的升高(upstaging),对这部分患者如果按新的分期给予治疗可能造成过度治疗。就目前观点,SLN 肉眼可见转移的患者有必要接受腋窝淋巴结清扫术及相应的辅助治疗^[1,15];SLN pN_{1mi} 的临床意义正逐渐被证实^[1,16]。2006 年美国临床肿瘤学会(ASCO)会议发布了对 702 个独立机构 6676 枚经 SS 和 IHC 检测的腋窝淋巴结的分

析,中位随访时间 8 年。研究显示:淋巴结 pN_{lmi}是影响无病生存率和转移性复发的强烈危险因素,支持在 TNM 分期中包含 MMs 检测^[17]。ITCs 对预后的影响至今仍存在争议^[16,18-19]。现有研究不支持对 ITCs 行常规 ALND^[20]。由于 MMs 的预后意义尚未明确,多数指南中不推荐常规应用 IHC 检测^[1,21-22]。

虽然 SS 可显著提高 MMs 的检出率,但这种将 SLN 近乎完全切光的检测方法有很多缺点。SS 工作量大、费用高、时间消耗影响治疗等诸多因素,限制其在日常工作中的应用,对发展中国家更不实用。本研究证实:SS 时,100、200、300、400、500 μm 不同间距切片对 MMs 检出率的差异无统计学意义。如果按 500 μm 间距对整个 SLN 进行 SS,可在不影响检出率的基础上显著减少人力、时间及费用,从而使 SS 检测成为可行。虽然本研究中联合 IHC 没有显著提高 MMs 的检出率,但研究中发现 IHC 结果明确、容易判断及测量。对于 HE 染色可疑 MMs 者,SS 检测是非常好的补充。

参考文献

- [1] Gary H L, Armando E G, Mark R. American Society of Clinical Oncology Guideline Recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*,2005,23:7703-7720.
- [2] Greene F L, Page D I, Fleming I D, *et al* . *AJCC Cancer Staging Manual*, 6th Edition. New York: Springer,2002:255-281.
- [3] Reynolds C, Mick R, Donohue J H, *et al* . Sentinel lymph node biopsy with metastasis: Can axillary dissection be avoided in some patients with breast cancer? *J Clin Oncol*,1999,17:1720-1726.
- [4] Morrow M. Is axillary dissection necessary after positive sentinel node biopsy? *Ann Surg Oncol*,2001,8:74S-76S.
- [5] Fournier K, Schiller A, Perry R R, *et al* . Micrometastasis in the sentinel lymph node of breast cancer does not mandate completion axillary dissection. *Ann Surg*,2004,239:859-863.
- [6] Weaver D L. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma: which micrometastases are clinically significant? *Am J Surg Pathol*,2003,27:842-845.
- [7] Cserni G, Amendoeira L A N, Bellocq J P. Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. *J Clin Pathol*,2004,57:695-701.
- [8] Cserni G. A model for determining the optimum histology of sentinel lymph nodes in breast cancer. *J Clin Pathol*,2004,57:467-471.
- [9] Cummings M C, Walsh M D, Hohn B G, *et al* . Occult axillary lymph node metastases in breast cancer do matter: results of 10-year survival analysis. *Am J Surg Pathol*,2002,26:1286-1295.
- [10] Quan M L, Cody H S III. Missed micrometastatic disease in breast cancer. *Semin Oncol*,2004,31:311-317.
- [11] Guenther J M, Hansen N M, DiFronzo L A, *et al* . Axillary dissection is not required for all patients with breast cancer and positive sentinel nodes. *Arch Surg*,2003,138:52-56.
- [12] Weaver D L. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: creating controversy and defining new standards. *Adv Anat Pathol*,2001,8:65-73.
- [13] Falconieri G, Pizzolitto S, Gentile G. Comprehensive examination of sentinel lymph node in breast cancer: a solution without a problem? *Int J Surg Pathol*,2006,14:1-8.
- [14] Rivera M, Merlin S, Hoda R, *et al* . Minimal involvement of sentinel lymph node in breast carcinoma: prevailing concepts and challenging problems. *Int J Surg Pathol*,2004,12:301-306.
- [15] Cserni G, Weaver D L. Expert opinion: evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Histopathology*,2005,46:697-706.
- [16] Cote R, Peterson H, Chaiwun B, *et al* . Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management

- of breast cancer. *Lancet*,1999,354:896 – 900.
- [17] Querzoli P, Pedriali M, Rinaldi R, *et al* . Axillary lymph node nanometastases are prognostic factors for metastatic relapse in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*,2006,15,12:6696 – 6701.
- [18] Cserni G, Bianchi S, Boecker W, *et al* . Improving the reproducibility of diagnosing micrometastases and isolated tumor cells. *Cancer*,2005,103:358 – 367.
- [19] Singletary S E, Greene F L, Sobin L H. Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *Cancer*,2003,98:2740 – 2741.
- [20] Kristine E C, Nora M H, Roderick R T, *et al* . Nonsentinel node metastases in breast cancer patients with isolated tumor cells in the sentinel node: implications for completion axillary node dissection. *Am J Surg*,2005,190:588 – 591.
- [21] Kuehn T, Bembenek A, Decker T, *et al* . Consensus Committee of the German Society of Senology. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer*,2005,103:451 – 461.
- [22] Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, *et al* . Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. *J Clin Pathol*,2004,57:695 – 701.

(收稿日期:2007-09-07)

(本文编辑:谢竞)