

• 临床研究 •

纳米炭对乳腺癌腋窝淋巴结示踪效果及其安全性的初步研究

范林军 钟玲 郭德玉 贺青卿 姜军

【摘要】 目的 探讨国产纳米炭混悬液对腋窝淋巴结的示踪效果及其安全性。**方法** 2008 年 5 月至 2009 年 9 月间对 21 例乳腺癌患者在术前采用纳米炭进行淋巴结示踪。患者年龄 30~65 岁,平均 45.3 岁。术前 24~72 h 于乳晕周围分 4 点皮下均匀注射纳米炭混悬液共 1 ml。手术方式采用改良根治术 5 例,腔镜下乳房皮下腺体切除、腋窝淋巴结清除加假体植入术 12 例,乳腺癌局部扩大切除加腔镜腋窝淋巴结清除术 4 例。术后观察腋窝淋巴结的黑染情况并送病理检查。**结果** 21 例患者分别检出淋巴结 14~32 枚,平均每例 21.5 枚,共 452 枚。肉眼下黑染淋巴结共 435 枚,黑染率为 96.3%(435/452),其中明显黑染率为 85.4%(386/452)。腋窝淋巴结无转移 6 例,有转移 15 例。有转移的淋巴结共 45 枚,均为明显黑染淋巴结,转移淋巴结黑染率为 100%。经病理证实,未黑染的淋巴结均未出现癌转移。所有患者经 8 个月至 2 年的随访,均未出现复发转移及明显肝肾功能异常。有纳米炭残留的局部组织在术后 1 年行活组织检查,见乳腺组织间隙有较多的纳米炭颗粒沉积,但未见明显的炎症反应或组织变性。**结论** 纳米炭混悬液经乳晕周围皮下注射后 24~72 h 行腋窝淋巴结清除可达到良好的淋巴结示踪效果,有效避免转移淋巴结的漏检。残留体内的纳米炭无明显的毒副反应。纳米炭是一种安全可靠的腋窝淋巴结示踪剂。

【关键词】 乳腺肿瘤;纳米炭;腋窝淋巴结清除术

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Effect and safety of carbon nanoparticles dyeing in axillary lymph node dissection of breast cancer FAN Lin-jun, ZHONG Ling, GUO De-yu, HE Qing-qing, JIANG Jun. Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To explore the dyeing effect and safety of carbon nanoparticles suspension in axillary lymph node dissection of breast cancer. **Methods** From May 2008 to September 2009, 21 patients with breast cancer aged 30—65 years (mean, 45.3 years) underwent lymphatic tracing with carbon nanoparticles preoperatively. The carbon nanoparticles suspension (1 ml) was subcutaneously injected around the areola at 24—72 hours before operation. Then radical mastectomy in 5 cases, endoscopic subcutaneous mastectomy plus axillary lymph node dissection and immediate reconstruction with implants in 12 cases and breast conserving surgery in 4 cases were performed. After operation, the lymph nodes were dissected and pathologically examined to observe the dyeing status. **Results** The number of blackened lymph nodes ranged from 14 to 32, with a mean of 21.5 per case. The blacking rate under naked eye was 96.3% (435/452), among which obviously blacking rate was 85.4% (386/452). A total of 45 metastatic axillary lymph nodes that were stained obviously black were found in 15 patients, thus the blacking rate of metastatic lymph nodes was 100%. The rest 6 patients showed no metastatic axillary lymph nodes. No black-staining of axillary lymph nodes indicated no metastasis. All patients were followed up for 8 months to 2 years, and no

tumor recurrence, metastasis or dysfunction of liver and kidney was found. Carbon nanoparticles deposition was observed microscopically in breast stroma around the injection sites within 1 year after operation, but no inflammatory reaction or tissue degeneration occurred.

Conclusion A satisfactory effect of lymphatic tracing could be obtained in axillary lymph node dissection at 24–72 hours after the carbon nanoparticles suspension was subcutaneously injected around the areola, and the omission of metastatic lymph nodes could be validly avoided. There was no obviously toxic effect and adverse reaction of residue carbon nanoparticles *in vivo*. Therefore, carbon nanoparticles suspension is a safe and reliable axillary lymphatic tracer.

【Key words】 Breast neoplasms; Carbon nanoparticles; Axillary lymph node dissection

区域淋巴结转移是乳腺癌最早发生且是最常见的转移途径,腋窝淋巴结状态是乳腺癌独立的重要预后因素。准确判断腋窝淋巴结状态,控制或彻底清除转移的淋巴结是乳腺癌诊断和综合治疗的重要组成部分^[1-3]。前哨淋巴结活组织检查可判断腋窝淋巴结状态,使前哨淋巴结阴性乳腺癌患者避免腋窝淋巴结清除^[4-6],降低手术并发症,但由于其仅适用于较早期的乳腺癌,因此腋窝淋巴结清除术仍是浸润性乳腺癌最常用的治疗方式。为了避免腋窝淋巴结清除中的淋巴结漏检,本研究于 2008 年 5 月至 2009 年 9 月间对 21 例乳腺癌患者在术前采用纳米炭进行术中淋巴示踪,现将结果报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

术前经穿刺活组织检查明确诊断为浸润性乳腺癌 21 例,年龄 30~65 岁,平均 45.3 岁;左侧 9 例,右侧 12 例;肿瘤最大直径 2.5~5.0 cm,平均直径 3.6 cm;肿瘤位于乳房外上象限 8 例,中央区 5 例,外下象限 4 例,内上象限 2 例,内下象限 1 例;肿块表面皮肤均无破溃;术前检查肿块均未侵及胸肌,超声或体检发现腋窝有肿大淋巴结,影像学检查未发现远处转移。术前均经 TE 方案(多烯紫杉醇 75 mg/m² 或紫杉醇 175 mg/m²,静脉滴注,第 1 天;表柔比星 80 mg/m²,静脉滴注,第 1 天)化疗 2~3 个周期。手术方式采用改良根治术 5 例,腔镜乳房皮下腺体切除加腋窝淋巴结清除术加假体植入术 12 例,乳腺癌局部扩大切除加腔镜腋窝淋巴结清除术 4 例。所有患者注射纳米炭之前均签署知情同意书。

1.2 纳米炭行腋窝淋巴结示踪方法

术前 24~72 h 于乳晕周围分 4 点皮下均匀注射纳米炭(carbon nanoparticles, CNP)混悬液(每支 50 mg/ml,重庆莱美药业股份有限公司)。先用 1 ml 注射器抽取纳米炭混悬液 1 支,将其注射于乳晕上方及外侧皮下各 0.5 ml,然后取 1 ml 生理盐水冲洗药瓶,并将其注射于乳晕内侧及下方皮下各 0.5 ml,注射完成后轻压注射点约 1 min 以防药液渗出(图 1)。



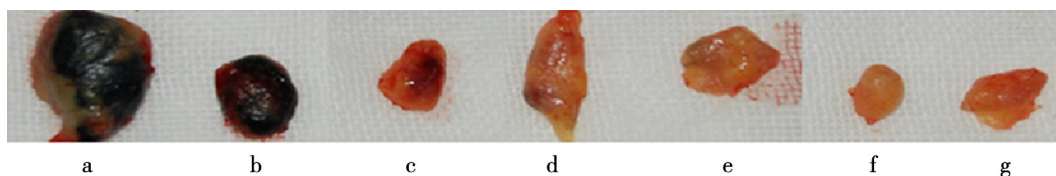
图 1 纳米炭混悬液乳晕周围皮下注射示意图

1.3 腋窝淋巴结清除的方法及范围

改良根治术采用乳房和腋窝组织整块切除的方法,按先行乳房切除后行腋窝淋巴结清除的顺序;乳腺癌局部扩大切除术及腔镜乳房皮下腺体切除术均先行腔镜下清除腋窝淋巴结,后行肿块局部扩大切除或皮下腺体切除。腔镜下清除腋窝淋巴结时先在腋窝均匀注射溶脂液(每 500 ml 溶脂液中含 250 ml 生理盐水,250 ml 灭菌注射用水,400 mg 利多卡因,1 mg 肾上腺素)200~400 ml,注射溶脂液后间隔 10 min 进行吸脂,为防止吸脂过程中对淋巴结的损伤并保护重要神经血管,吸脂时吸引头的侧孔始终朝向上方或外侧。腋窝淋巴结清除范围均为 Level I 和 Level II,具体清除方法按文献[7]进行。如术中发现腋尖部有肿大淋巴结,加做 Level III 淋巴结切除。腋静脉上方的淋巴结不作常规清除,如术中发现腋静脉上方有肿大或黑染淋巴结,加做该区域的淋巴结切除。

1.4 腋窝淋巴结的分离计数

手术完成后,由专门的技术人员对腋窝淋巴结进行精细的解剖分离、计数,观察黑染程度和比例。淋巴结按黑染程度分为:明显黑染,整个淋巴结染成深黑色;轻度黑染,淋巴结染色较浅或仅部分黑染;无明显黑染,肉眼下无黑染(图 2)。由于吸脂过程中可能吸出少量较小的淋巴结,术后用纱布过滤吸脂瓶中的液体以避免遗漏。检出的淋巴结及剩余的腋窝脂肪结缔组织送病理科进行常规石蜡切片及 HE 染色组织学检查,并由同一病理科专家对所有淋巴结病理切片进行组织学观察。



a、b 为明显黑染;c-e 为轻度黑染;f、g 为无明显黑染

图 2 淋巴结不同染色程度示意图

1.5 术后处理

术后根据组织学类型和病理分期进行辅助化疗 3~6 疗程,方案同术前。

化疗结束后局部扩大切除术者行全乳房照射,腋窝淋巴结转移 4 枚以上者行相应区域放射治疗。激素受体阳性者化疗结束后开始接受内分泌治疗 5 年。

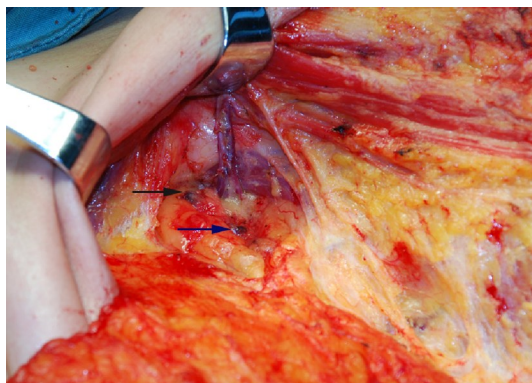
1.6 复查和随访

所有患者术后每 3~6 个月到门诊复查 1 次,未至门诊复查者行电话随访。记录复发转移的时间、部位,纳米炭残留局部的皮肤颜色变化。复查肝肾功能。

2 结果

2.1 纳米炭对腋窝淋巴结的示踪效果

21 例乳腺癌患者术前均在乳晕皮下注射了纳米炭示踪剂。在腋窝淋巴结清除过程中,多数腋窝淋巴结黑染明显,手术视野中黑染淋巴结清晰易辨,而淋巴结周围组织未受染色影响,且可避免非常规清除部位(如腋静脉上方)的淋巴结遗漏(图 3)。21 例患者检出淋巴结 14~32 枚,平均 21.5 枚,共 452 枚。肉眼下黑染淋巴结共 435 枚,黑染率为 96.3%(435/452),明显黑染率为 85.4%(386/452)。其中,有 2 例患者淋巴结黑染率为 100%,分别为 21/21 和 17/17(图 4)。



淋巴结黑染后清晰易辨(箭头指示),甚至腋静脉上方的淋巴结也被明显黑染(左上箭头指示)。

图 3 术中黑染淋巴结示意图

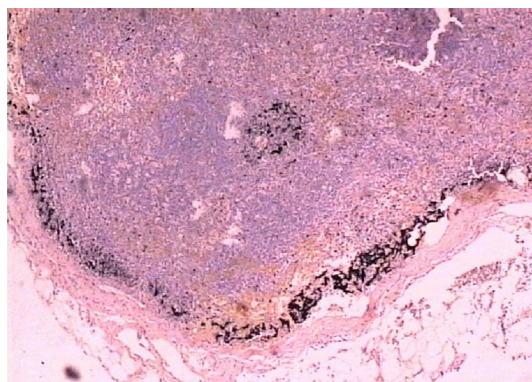


术前 3 d 乳晕周围皮下注射纳米炭,腋窝清除术后分离出的淋巴结 17 枚全被染成黑色。

图 4 某例乳腺癌患者腋窝淋巴结示意图

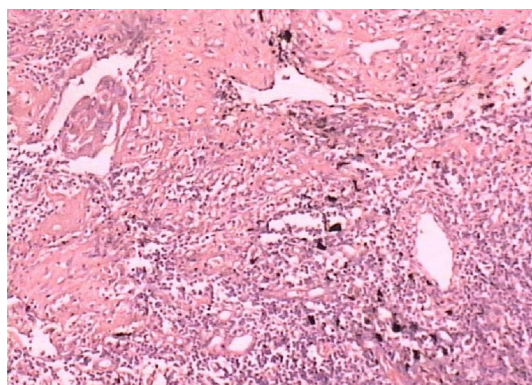
2.2 术后病理结果和黑染淋巴结的显微镜下表现

21 例中浸润性导管癌 18 例,黏液腺癌 1 例,浸润性小叶癌 1 例,大汗腺癌 1 例。腋窝淋巴结无转移 6 例,有转移 15 例。其中 1 枚淋巴结转移 5 例,2 枚淋巴结转移 6 例,4~8 枚转移 3 例,10 枚淋巴结转移 1 例,有转移的淋巴结共 45 枚,均为明显黑染淋巴结,转移淋巴结黑染率为 100%(45/45)。未黑染的淋巴结均未出现癌转移。显微镜下观察:黑染的淋巴结在边缘窦内可见到大量的纳米炭颗粒(图 5),转移的淋巴结中可见癌细胞团周围有滞留的纳米炭颗粒,部分纳米炭颗粒被巨噬细胞吞噬(图 6)。术后病理分期Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 9 例,Ⅲ期 7 例。



大量纳米炭颗粒滞留在边缘窦和中央窦中。

图 5 纳米炭黑染淋巴结的显微镜下形态(HE 染色 ×40)



纳米炭颗粒被巨噬细胞吞噬。

图 6 癌转移淋巴结的显微镜下形态(HE 染色 ×200)

2.3 纳米炭皮下注射后局部反应

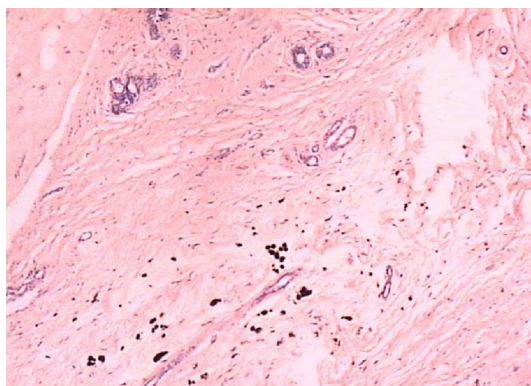
皮下注射纳米炭后注射部位轻度疼痛,在术前的 24~72 h 内可见到纳米炭沿皮下有一定程度的扩散,但均未见到明显的局部红肿(图 7),也未出现全身发热反应。乳腺癌局部扩大术和腔镜皮下腺体切除术共 16 例患者在术后经 8 个月至 2 年的随访,局部皮下仍可观察到黑色的纳米炭残留物,但有逐渐变淡的趋势。其中,有 1 例局部扩大切除术患者在术后 12 个月复查时因超声发现切口下

方有直径约 0.5 cm 的低回声结节,行 Mammotome 微创活组织检查,病理结果提示:腺病伴纤维腺瘤形成,周围组织间隙可见较多的纳米炭颗粒沉集,但未见明显的炎症反应或组织变性(图 8)。



乳晕周围皮下注射后 24h,纳米炭在皮下有一定程度的扩散,但未出现局部红肿或炎症反应。

图 7 纳米炭混悬液注射后局部皮肤改变



纳米炭示踪并行局部扩大切除术后 1 年,病理活组织检查显示乳腺间质中仍有较多纳米炭颗粒残留,但炭颗粒周围未见明显间质反应。

图 8 残留纳米炭组织的显微镜下形态(HE 染色 ×200)

2.4 随访结果

所有患者均经过 8 个月至 2 年的随访,随访率为 100%。所有患者均未出现局部复发或远处转移,化验检查未出现肝肾功能的异常。

3 讨论

纳米炭是由普通活性炭经过技术处理制成的直径为 21 nm 的光滑炭颗粒,加助悬剂聚乙烯吡咯烷酮和生理盐水后最终制成黑色混悬液^[8]。纳米炭在其混悬液中以平均直径 150 nm 的团粒形式存在。由于毛细血管内皮细胞间隙为 30~50 nm,基底膜发育较完全,纳米炭基本不进入血管。而毛细淋巴管内皮细胞呈叠瓦状排列,间隙达 100~500 nm,且基底膜发育不完全,纳米

炭可迅速经淋巴管集聚于淋巴结,使淋巴结染成黑色,实现区域淋巴结的活体示踪^[9]。因此纳米炭已被较多的用于胃癌、结肠癌等根治手术的术中淋巴示踪^[10-12]。在乳腺癌淋巴示踪领域,目前应用最为广泛的示踪剂包括染料与核素两类,其中美兰等染料显色快但保留时间短,待腔镜腋窝手术溶脂吸脂完成后,部分低位淋巴结的蓝染已消退,而 Level II 及以上淋巴结则由于染料被机体吸收而无法显色,因此染料法仅适用于示踪前哨淋巴结,不能达到腔镜腋窝淋巴结清除术的要求。核素示踪淋巴结操作较为繁琐,需要特殊检测设备,且核素存在放射性污染、直观性差,同样不利于腔镜下的观察和手术操作。

既往采用纳米炭示踪乳腺癌腋窝淋巴结的研究中,术者在注射纳米炭后立即进行手术,结果显示,淋巴结总的黑染率为 63.4%(668/1053),纳米炭示踪组淋巴结检出率明显高于未示踪的对照组,黑染淋巴结转移率明显高于未黑染淋巴结转移率,但由于纳米炭扩散时间不足导致仍有 25.1%(74/295)的转移淋巴结未被黑染^[13]。纳米炭在注射后能较快地特异性进入淋巴管并引流至淋巴结,淋巴窦内滞留的纳米炭颗粒部分被巨噬细胞吞噬,部分继续向下一级淋巴结迁移,从而在足够长的时间内可染黑所有区域淋巴结^[9]。本研究注射纳米炭后 24~72h 后进行手术,结果显示淋巴结黑染率为 96.3%(435/452),大部分的腋窝淋巴结可染成黑色,提示纳米炭是一种较为理想的淋巴结示踪剂。可见,由于纳米炭在淋巴结中被巨噬细胞吞噬后滞留时间较长,皮下注射后适当延长其扩散时间,有利于区域淋巴结的充分染色。本研究中 21 例患者中共有 15 例出现腋窝淋巴结转移,转移淋巴结共 45 枚,均被明显黑染,转移淋巴结黑染率为 100%。理论上,如果腋淋巴结完全为肿瘤占据,示踪剂则难以到达淋巴结内。而本研究结果显示应用纳米炭能够实现转移淋巴结的全部染色,推测其可能原因:一方面临床体检及超声检查发现的肿大淋巴结并非全部被癌细胞侵袭,有部分仅为反应性增生,同时 2~3 个周期的新辅助化疗虽难以实现淋巴结降期,但仍具有遏制癌细胞的效果;另一方面,单个癌细胞直径约 10~20 μm ,而纳米炭团粒仅 150 nm,即使癌细胞完全占据淋巴结,其细胞间隙仍可供纳米炭通过。此外,本研究病例数较少,确切结果有待更多临床研究证实。由于腔镜手术无法像常规开放手术直视操作且无法用手的触觉感知,而采用纳米炭示踪后黑染淋巴结在手术视野中清晰可辨,可在一定程度上简化手术操作,并有效避免转移淋巴结的漏检。

纳米炭作为一种淋巴示踪剂对机体无明显毒性,无致畸作用^[14-16],但长期残留人体内的纳米炭对机体的影响尚研究不多。本研究发现注射后 24~72 h 纳米炭在注射部位有一定程度的扩散,但是除局部有轻度疼痛外,无局部红肿及全身发热等反应。本研究中 12 例患者行保留皮肤的腔镜皮下腺体切除,4 例行局部扩大切除术,术后由于注射部位局部皮肤和皮下组织未完全切除,

导致部分纳米炭残留于体内。术后经 8 个月至 2 年的随访,局部皮下仍可观察到黑色的纳米炭残留物,但有逐渐变淡的趋势。随访过程中未出现过敏反应及肝肾功能的异常。术后 1 年局部残留部位病理活组织检查结果显示纳米炭颗粒残留部位未见明显的炎症反应或纤维组织增生。上述结果均提示纳米炭在体内有较高的安全性。

腋窝淋巴结状态是乳腺癌重要的预后因素,对腋窝淋巴结阳性的乳腺癌患者彻底清除腋窝淋巴结直接影响其准确分期和预后^[17]。采用纳米炭示踪后可增加腋窝淋巴结的检出率,且由于转移的淋巴结均被黑染,减少了转移淋巴结漏检的可能性,从而改善预后^[9]。本研究 21 例中术后病理分期 I 期 5 例,II 期 9 例,III 期 7 例,有淋巴结转移的 15 例中 4~8 枚转移者 3 例,10 枚淋巴结转移 1 例,但经 8 个月至 2 年的随访均未出现复发转移。以上结果说明纳米炭示踪淋巴结增加淋巴结切除的彻底性对改善乳腺癌的预后可能有一定作用,但其对预后的确切效果还需要较长时间的随访和随机对照研究以明确。

参考文献

- [1] Chua B, Ung O, Taylor R, et al. Frequency and predictors of axillary lymph node metastases in invasive breast cancer. *ANZ J Surg*, 2001, 71: 723-728.
- [2] Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, et al. Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol Histopathol*, 2002, 17: 863-870.
- [3] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 2005, 366, 2087-2106.
- [4] Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a meta analysis. *Cancer*, 2006, 106: 4-16.
- [5] Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American society of clinical oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 7703-7720.
- [6] Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. Sentinel lymph node biopsy as a staging procedure in breast cancer: update of a randomized controlled study. *Lancet Oncol*, 2007, 7: 983-989.
- [7] 范林军,姜军.全腔镜乳腺癌改良根治手术技术. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2010, 4: 11-14.
- [8] Fiorito S, Serafino A, Andreola F, et al. Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 2006, 6: 591-599.
- [9] Yokota T, Saito T, Narushima Y, et al. Lymph-node staining with activated carbon CH40: a new method for axillary lymph-node dissection in breast cancer. *Can J Surg*, 2000, 43:191-196.
- [10] 郑春雷,许军.国产纳米活性炭在胃癌根治术中的应用. *齐齐哈尔医学院学报*, 2008, 29: 275-277.
- [11] 雷建,黄炯强,胡明,等.活性炭示踪指导进展期胃癌手术淋巴结清除的意义. *岭南现代临床外科*, 2008, 8: 187-188.
- [12] 于永扬,王存,郑阳春,等.比较研究纳米炭示踪剂在低位直肠癌淋巴结清除及病理检查中的价值. *中国普外基础与临床杂志*, 2008, 15: 358-361.
- [13] 秦平,张海燕,龙泉伊,等.纳米炭示踪剂在乳腺癌淋巴结转移的价值和运用. *华西医学*, 2009, 24: 864-865.
- [14] Tongeren MJ, Kromhout H, Gardiner K. Trends in levels of inhalable dust exposure, exceedance and overexposure in the European carbon black manufacturing industry. *Ann Occup Hyg*, 2000, 44: 271-280.

- [15] Magrez A, Kasas S, Salicio V, et al. Cellular toxicity of carbon- based nanomaterials. Nano Lett, 2006, 6: 1121-1125.
- [16] Ito T, Hagiwara A, Takagi T, et al. Local administration of methotrexate bound to activated carbon particles for treating cancers in mice. Anticancer Res, 2003, 23: 1401-1404.
- [17] Kuru B, Bozgul M. The impact of axillary lymph nodes removed in staging of node-positive breast carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 66: 1328-1334.

(收稿日期:2010-05-55)

(本文编辑:梁燕)

范林军,钟玲,郭德玉,等. 纳米炭对乳腺癌腋窝淋巴结示踪效果及其安全性的初步研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2010,4(3):313-321.