

· 论著 ·

吲哚菁绿联合亚甲蓝在乳腺癌前哨淋巴结活组织检查中的应用价值

苑龙 周艳 胡滢 魏宏屹 潘沁汶 张孔涌 姜军

【摘要】 目的 探讨吲哚菁绿联合亚甲蓝在乳腺癌前哨淋巴结活组织检查(SLNB)中的应用价值。**方法** 根据纳入、排除标准,选取 2015 年 5~12 月在第三军医大学西南医院乳腺外科住院行术前检查提示腋窝淋巴结阴性的 104 例乳腺癌患者进行前瞻性研究。按照随机数字表法将患者分成 2 组(每组均为 52 例),分别采用吲哚菁绿联合亚甲蓝(试验组)或者核素联合亚甲蓝(对照组)作为淋巴示踪剂对患者进行 SLNB,术中根据冰冻检查结果决定是否行腋窝淋巴结清扫。比较两种方法在乳腺癌 SLNB 中检出率的差别。偏态分布的计量资料用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示。两组患者间前哨淋巴结(SLN)和转移性 SLN 检出率及检出数目的比较,采用 χ^2 检验、Fisher 确切概率检验或非参数检验。**结果** 试验组 52 例患者中,皮肤淋巴管荧光显影者 49 例(94.2%, 49/52),SLN 荧光显影者 52 例(100%, 52/52),SLN 检出率为 100% (52/52),而对照组的检出率为 96.2% (50/52)。试验组转移性 SLN 检出率为 32.7% (17/52),明显高于对照组的 15.4% (8/52) ($\chi^2 = 4.27, P = 0.039$)。试验组共检出 SLN 190 枚,中位数为 3(2~4)枚,对照组共检出 SLN 158 枚,中位数为 2(1~4)枚,两组患者 SLN 检出数目相似($Z = -1.58, P = 0.113$)。试验组共检出转移性 SLN 26 枚,中位数为 0(0~1)枚,而对照组共检出转移性 SLN 9 枚,中位数为 0(0~0)枚,两组相比,差异有统计学意义($Z = -2.15, P = 0.032$)。**结论** 在乳腺癌 SLNB 术中应用吲哚菁绿联合亚甲蓝法示踪,其 SLN 检出率与核素联合亚甲蓝双标法相当,且能提高转移性 SLN 的检出率,并可协助术者精准定位 SLN 的位置,降低手术难度,具有较高的临床应用价值。

【关键词】 乳腺肿瘤; 前哨淋巴结活组织检查; 吲哚花青绿

【中图分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Indocyanine green combined with methylene blue for sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients Yuan Long, Zhou Yan, Hu Ying, Wei Hongyi, Pan Qinwen, Zhang Kongyong, Jiang Jun.

Department of Breast Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: Jiang Jun, Email: JiangJunRX@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the application value of indocyanine green (ICG) combined with methylene blue (MB) for sentinel lymph node biopsy (SLNB) in breast cancer patients. **Methods** Totally 104 breast cancer patients with axillary node negative indicated by preoperative examination in Department of Breast Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, from May 2015 to December 2015 were enrolled for a prospective study. They were randomly divided into two groups ($n=52$) by the random number table method: experimental group with MB combined with ICG as lymph tracer, control group with nuclide combined with MB as lymph tracer for SLNB. During operation, the surgeon decided whether to perform axillary lymph node dissection according to the result of intraoperative frozen section examination. The detection rates in SLNB were compared between two groups. Skewed distribution data were described as $M(P_{25} \sim P_{75})$. χ^2 test and Fisher's exact probability test or non-parametric test were used to compare the number of detected sentinel lymph nodes (SLNs) and metastatic SLNs, and the detection rates of the two in two groups. **Results** In 52 patients of experimental group, subcutaneous lymphatic vessels were visualized in 49 patients (94.2%,

49/52) and SLNs were visualized in 52 (100%). The detection rate of SLNs was 100% (52/52) in experimental group, 96.2% (50/52) in control group. The detection rate of metastatic SLNs was 32.7% (17/52) in experimental group, significantly higher than 15.4% (8/52) in control group ($\chi^2 = 4.27, P = 0.039$). Totally 190 SLNs [median 3 (2-4)] were detected in experimental group, 158 [median 2 (1-4)] in control group, indicating no significant difference ($Z = -1.58, P = 0.113$). Twenty-six metastatic SLNs [median 0 (0-1)] were detected in experimental group, Nine [median 0 (0-0)] in control group, indicating significant difference ($Z = -2.15, P = 0.032$). **Conclusion** Compared with nuclide plus methylene blue, indocyanine green combined with methylene blue for intraoperative SLNB in breast cancer patients has similar detection rate of SLNs and higher detection rate of metastatic SLNs, with the advantages of precise positioning of SLNs, reducing the difficulty of operation, worthy of clinical application.

【Key words】 Breast neoplasms; Sentinel lymph node biopsy; Indocyanine green

乳腺癌前哨淋巴结活组织检查(sentinel lymph node biopsy, SLNB)是判断临床腋窝淋巴结阴性乳腺癌患者腋窝淋巴结状态的标准术式。目前,多项研究^[1-6]推荐核素联合染料双标法作为前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)的最佳示踪方法。然而,核素的使用存在术前准备较复杂、费用较高、有放射性污染等缺点,难以在广大基层医院开展,因此,寻找新的淋巴示踪剂是目前亟待解决的热点问题之一。本研究将吲哚菁绿应用于乳腺癌 SLNB,观察全程荧光显影的效果,将其与标准核素联合亚甲蓝的示踪法进行对比,以期寻找能够在 SLNB 中替代核素的示踪剂。

资料与方法

一、研究对象

1. 病例选择

在 2015 年 5~12 月就诊于第三军医大学西南医院乳腺外科的住院患者中,选取经超声等术前检查未发现临床腋窝淋巴结阳性的 104 例原发性乳腺癌患者进行前瞻性研究。该研究已通过第三军医大学医学伦理委员会批准,且术前患者已签署知情同意书。

2. 入组标准

(1)无乳腺及腋窝手术史;(2)术前空芯针穿刺或切除活组织检查(以下简称“活检”)确诊为乳腺癌;(3)术前体格检查及超声检查未见肿大或结构异常的腋窝淋巴结;(4)无远处转移。

3. 排除标准

(1)患者曾接受腋窝区手术或放射治疗而破坏此区域的淋巴回流;(2)多病灶或多中心乳腺癌。

4. 仪器和试剂

(1)1% 亚甲蓝注射液 1 ml(济川药业集团有限公司);(2) 3.7×10^7 Bq ^{99m}Tc -Dx 同位素(北京师宏

药物研制中心);(3) 1.25% 吲哚菁绿溶液 1 ml(中国丹东医创药业有限责任公司);(4)荧光脉管成像仪(明德医药公司)。

二、研究方法

1. 分组

按照随机数字表法,将符合入组标准的 104 例乳腺癌患者分为 2 组。试验组接受亚甲蓝及吲哚菁绿(经国家药品监督管理局批准用于临床试验)联合注射,对照组接受亚甲蓝及核素联合注射。术中冰冻提示 SLN 阴性者,不再进行腋窝淋巴结清扫(axillary lymph node dissection, ALND);SLN 阳性患者以及未检出者完成常规 ALND。

2. 注射部位

均选用乳晕区四点注射法,其中吲哚菁绿采用皮内注射,亚甲蓝及核素采用皮下注射。

3. 手术过程

(1)试验组:术前 10 min 于乳晕区皮下注射 1 ml 亚甲蓝,局部按摩,术前 5 min 于亚甲蓝注射部位附近皮内注射吲哚菁绿,局部按摩。5 min 后用观察荧光显影情况,根据荧光显影淋巴管走行标记 SLN 潜在位置后,于标记处做切口指引切开皮肤。术中切除全部发光淋巴结和/或蓝染的 SLN,切除的 SLN 术中快速冰冻病理检查及常规石蜡病理检查。(2)对照组:于术前 4~12 h 在患侧乳房乳晕区注射 1 ml 核素,手术前 10 min 皮下注射亚甲蓝,局部按摩。取腋皱襞下 2 横指处沿腋皱襞走行切口,长约 5 cm。在染料示踪的指引及同位素 γ 探测器探测下切除蓝染和/或放射性核素热点的 SLN,其余步骤同试验组。

4. 统计学分析

利用 SPSS18.0 软件进行统计分析。分别对两组患者的 SLN 检出数目进行单个样本 K-S 检验, P 均 < 0.050 ,属于偏态分布数据,因此,SLN 检出数

目用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示。两组患者间一般资料、SLN 和转移性 SLN 检出数目及检出率的比较,采用 χ^2 检验、Fisher 确切概率检验或非参数检验;试验组内 SLN 及转移性 SLN 检出数目及检出率的比较采用配对 χ^2 检验。以 $P<0.050$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、入组患者的临床资料及肿瘤病理特征

共入组符合条件的研究对象 104 例,其中试验组与对照组各 52 例。患者年龄为 27~77 岁,中位年龄为 48 岁,一般情况及肿瘤病理特征见表 1。两组患者的年龄、体质指数等一般情况及肿瘤大小和位置、临床分期等病理特征的差异均无统计学意义,组间具有可比性(表 1)。

二、吲哚菁绿荧光示踪结果

试验组 52 例接受吲哚菁绿联合亚甲蓝注射的患者中,49 例在 2~5 min 时出现明显的皮肤淋巴管显影(图 1),皮肤淋巴管显影率为 94.2%,并且,3 例皮肤淋巴管未显影者,可以检出荧光显影的 SLN。

52 例患者均成功找到发光的 SLN,检出率为 100%。

三、试验组内吲哚菁绿与亚甲蓝检出 SLN 的效果比较

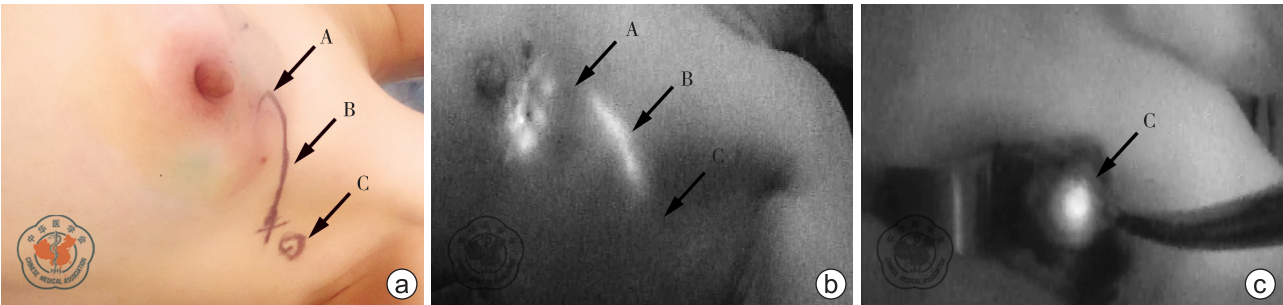
试验组 52 例患者无一例 SLN 检出失败,共检出腋窝淋巴结转移的患者 17 例,转移性 SLN 26 枚。进一步分析试验组中吲哚菁绿和亚甲蓝单独示踪 SLN 的效果,结果显示:吲哚菁绿检出了所有患者的 SLN,SLN 显影率为 100% (52/52),明显高于亚甲蓝的 SLN 蓝染率 84.6% (44/52) ($\chi^2=6.13, P<0.050$; 表 2)。吲哚菁绿的转移性 SLN 检出率为 32.7% (17/52),明显高于亚甲蓝的 21.2% (11/52) ($\chi^2=4.17, P=0.031$; 表 3)。

在试验组检出的 190 枚 SLN 中,吲哚菁绿共检出发荧光的 SLN 188 枚,中位数为 3 (2~4) 枚,而亚甲蓝检出 SLN 总数 90 枚,中位数为 2 (1~2) 枚,两组比较,差异有统计学意义 ($Z=-5.16, P<0.001$)。并且,吲哚菁绿共检出转移性 SLN 26 枚,中位数为 0 (0~1) 枚,而亚甲蓝共检出转移性 SLN 13 枚,中位数为 0 (0~0) 枚,组间比较,差异也有统计学意义 ($Z=-2.75, P=0.006$)。

表 1 两组乳腺癌患者一般情况及肿瘤病理特征比较(例)

组别	例数	年龄		绝经状态		体质指数			肿瘤大小		肿瘤部位	
		≤50 岁	>50 岁	绝经前	绝经后	18.5 ~ 23.9	24.0 ~ 27.9	≥28.0	T ₁	T ₂	左乳	右乳
对照组	52	31	21	30	22	29	20	3	27	25	22	30
试验组	52	33	19	36	16	29	20	3	24	28	21	31
检验值		χ ² = 0.16		χ ² = 1.49		Z = 0.00			χ ² = 0.35		χ ² = 0.04	
P 值		0.687		0.222		1.000			0.556		0.842	

组别	例数	肿瘤分布的象限				病理类型				临床分期		新辅助化疗		
		外上	外下	内上	内下	乳头乳晕区	浸润性导管癌	浸润性小叶癌	原位癌	其他	I	II	有	无
对照组	52	22	10	14	2	4	41	0	7	4	27	25	20	32
试验组	52	33	7	6	3	3	43	0	5	4	24	28	16	36
检验值		χ ² = 6.27					χ ² = 0.46				χ ² = 0.35		χ ² = 0.68	
P 值		0.180					0.931				0.556		0.410	



注:a 图为淋巴管走行及 SLN 潜在位点直视图;b 图为淋巴管走行及 SLN 潜在位点荧光视图;c 图为切开皮肤探查 SLN 的荧光视图;SLN 代表前哨淋巴结。A 点为吲哚菁绿皮内注射点;B 点为显影淋巴管走行;C 点为吲哚菁绿显影的 SLN

图 1 吲哚菁绿对乳腺癌患者腋窝淋巴引流示踪的效果

表 2 试验组 52 例乳腺癌患者中吲哚菁绿与亚甲蓝
对前哨淋巴结的检出效果比较(例)

亚甲蓝	吲哚菁绿		合计
	检出	未检出	
检出	44	0	44
未检出	8	0	8
合计	52	0	52

注:两种示踪剂的前哨淋巴结检出率比较, $\chi^2 = 6.13, P < 0.050$

表 3 试验组 52 例乳腺癌患者中吲哚菁绿与亚甲蓝
对转移性前哨淋巴结的检出效果比较(例)

亚甲蓝	吲哚菁绿		合计
	转移	未转移	
转移	11	0	11
未转移	6	35	41
合计	17	35	52

注:两种示踪剂的转移性前哨淋巴结检出率比较, $\chi^2 = 4.17, P = 0.031$

四、试验组与对照组患者 SLN 的检出率及检出数目比较

试验组患者全部成功检出 SLN, SLN 检出率为 100% (52/52), 而对照组患者成功检出 SLN 50 例, SLN 检出率为 96.2% (50/52) ($P = 0.495$, Fisher 确切概率法)。但是, 试验组患者转移性 SLN 检出率为 32.7% (17/52), 高于对照组的 15.4% (8/52) ($\chi^2 = 4.27, P = 0.039$)。

试验组共检出 SLN 190 枚, 中位数为 3 (2~4) 枚; 对照组共检出 SLN 158 枚, 中位数为 2 (1~4) 枚, 两组患者 SLN 检出数目相似 ($Z = -1.58, P = 0.113$)。但是, 试验组共检出转移性 SLN 26 枚, 中位数为 0 (0~1) 枚, 而对照组共检出转移性 SLN 9 枚, 中位数为 0 (0~0) 枚, 两组相比, 差异有统计学意义 ($Z = -2.15, P = 0.032$)。

讨 论

目前, SLNB 的应用面临许多实际问题。据不完全统计, 中国进行 SLNB 的普及率不到 5.0%^[7]。除此之外, 极少数有核素使用条件的医疗单位亦面临处理核垃圾困难、给人体及环境带来核污染风险等问题。而且, 目前应用于临床的示踪剂均不能实时淋巴管显影, 外科医师需要长时间的训练才能顺利找到 SLN, 且需要维持一定的手术量才能保证较高的检出率^[8]。如何改进现有示踪剂的诸多不足, 并利用示踪剂的特性缩短手术的学习曲线, 提高检出

率是目前临床研究的热点之一。

于是研究者将实时荧光显影技术应用到 SLNB 术中, 利用其可视性降低手术难度, 提高检出率。有关吲哚菁绿联合亚甲蓝示踪 SLN 的回顾性和非随机对照临床研究, 进一步验证了荧光物质在乳腺癌 SLNB 中的应用前景^[9]。2014 年 Ahmed 等^[9]对荧光 SLNB 进行了系统评价, 发现皮肤淋巴管的显影率为 57.0%~100%, SLN 检出率为 93.1%~100%。在其纳入分析的所有研究中, 吲哚菁绿的 SLN 检出率均高于亚甲蓝 ($P < 0.0001$), 而吲哚菁绿与核素相比, 不同研究的 SLN 检出率却略有差异, 并且, 系统评价显示, 后两种示踪剂的 SLN 检出率和假阴性率差异没有统计学意义。目前关于荧光 SLNB 的试验研究多为前瞻性队列研究, 核素联合亚甲蓝示踪 SLN 的前瞻性临床随机对照研究也较少, 因而吲哚菁绿作为示踪剂到底能否替代核素尚有争议^[9-10]。因此, 本研究采用随机分组的方法, 将吲哚菁绿和核素分别与亚甲蓝联合进行 SLN 示踪, 比较 SLN 检出率和检出数目的差异。

笔者首先对吲哚菁绿荧光示踪的效果进行观察, 结果显示其具有良好的实时显影示踪能力, 体外淋巴管荧光显影率为 94.2% (49/52), 切口内淋巴管的显影率为 100% (52/52)。有文献报道, 皮肤淋巴管未显影与体质指数显著相关^[11]。笔者认为, 淋巴管不显影可能与注射深度以及脂肪厚度等导致淋巴管和探测器之间距离增大的因素有关。但是, 淋巴管显影与否并不影响 SLN 的检出, 本研究中 3 例皮肤淋巴管未显影者腋窝可以探测到发荧光的 SLN。皮肤淋巴管显影有助于手术医师寻找 SLN 的位置, 能降低术中寻找 SLN 的难度, 有可能降低学习曲线, 但尚需大样本临床试验进一步验证。

在试验组内比较吲哚菁绿与亚甲蓝示踪 SLN 的效果时, 笔者发现吲哚菁绿在 SLN 及转移性 SLN 检出率和检出数目上均显著高于亚甲蓝。那么只用吲哚菁绿作为示踪剂, 是否可以弃用亚甲蓝染料呢? 笔者认为吲哚菁绿联合亚甲蓝作为示踪剂, 不仅可以提高 SLN 的检出率, 降低假阴性率, 也可弥补吲哚菁绿使用的局限性。因为在寻找 SLN 的手术过程中, 常常会将含吲哚菁绿荧光的淋巴管离断, 导致吲哚菁绿荧光泄露到腋窝的脂肪组织中, 造成术区荧光染料污染, 而荧光探头无法有效区分淋巴结还是污染的脂肪组织, 此时亚甲蓝可帮助医师肉眼直视下区别, 简单且高效。

本研究发现, 虽然吲哚菁绿联合亚甲蓝与核素

联合亚甲蓝在 SLN 的检出率、检出数目上没有差别,但其对转移性 SLN 检出率、检出数目却明显高于核素联合亚甲蓝法。在两组患者一般情况及肿瘤病理特征,包括年龄、体质指数、肿瘤大小及位置、临床分期、术前是否新辅助化疗等均无显著差异的情况下,这个结果虽不能直接说明吲哚菁绿联合亚甲蓝比核素联合亚甲蓝有更低的假阴性率,却能提示相比于核素联合亚甲蓝,吲哚菁绿组的 SLNB 结果可能更加准确。本研究结果也与 Verbeek 等^[12-13]的研究结果一致,即吲哚菁绿检出转移性 SLN 的数目要高于核素。另外,分析吲哚菁绿检出转移性 SLN 数目较高的原因,可能在于含有吲哚菁绿的示踪方案能够检出更多的 SLN(1.5~5.4 枚)^[9]。有文献报道:SLN 假阴性率随着 SLN 检出数目的增加而降低;仅切除 1~2 枚 SLN 时,会增加遗漏转移性淋巴结的机会,切除 3~4 枚 SLN 时假阴性率会降至 5% 以下^[14-15]。本研究中,两组患者 SLN 检出数目的差异无统计学意义,可能是由于病例数较少所致。

综上所述,吲哚菁绿联合亚甲蓝进行 SLNB 示踪,具有高效、直观、简便的优点,并避免了放射性核素使用的诸多问题。其示踪效果明显优于单用亚甲蓝,且在转移性 SLN 检出率、检出数目上也优于核素联合亚甲蓝法。本研究是一项随机对照的前瞻性研究,受限于病例数较少,因此还不足以证实吲哚菁绿联合亚甲蓝可替代推荐的核素联合亚甲蓝双标法,但是,研究结果提示吲哚菁绿联合亚甲蓝是一种可行的乳腺癌 SLNB 示踪剂替代方案。

参 考 文 献

- [1] Purushotham AD, Upsoni S, Klevesath MB, et al. Morbidity after sentinel lymph node biopsy in primary breast cancer: results from a randomized controlled trial [J]. J Clin Oncol, 2005, 23 (19): 4312-4321.
- [2] Benson JR. An alternative to initial axillary-lymph-node dissection [J]. Lancet Oncol, 2010, 11(10): 908-909.
- [3] Goyal A, Newcombe RG, Chhabra A, et al. Factors affecting failed localisation and false-negative rates of sentinel node biopsy in breast cancer--results of the ALMANAC validation phase [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 99(2): 203-208.
- [4] Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial [J]. Lancet Oncol, 2007, 8(10): 881-888.
- [5] Zavagno G, De Salvo GL, Scalco G, et al. A Randomized clinical trial on sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection in breast cancer: results of the Sentinella/GIVOM trial [J]. Ann Surg, 2008, 247(2): 207-213.
- [6] Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(7): 1854-1861.
- [7] Leong SP, Shen ZZ, Liu TJ, et al. Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? [J]. World J Surg, 2010, 34(10): 2308-2324.
- [8] Cox CE, Salud CJ, Cantor A, et al. Learning curves for breast cancer sentinel lymph node mapping based on surgical volume analysis [J]. J Am Coll Surg, 2001, 193(6): 593-600.
- [9] Ahmed M, Purushotham AD, Douek M. Novel techniques for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a systematic review [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(8): e351-e362.
- [10] Niehling MG, Pleijhuis RG, Bastiaannet E, et al. A systematic review and meta-analyses of sentinel lymph node identification in breast cancer and melanoma, a plea for tracer mapping [J]. Eur J Surg Oncol, 2016, 42(4): 466-473.
- [11] Hirche C, Mohr Z, Kneif S, et al. High rate of solitary sentinel node metastases identification by fluorescence-guided lymphatic imaging in breast cancer [J]. J Surg Oncol, 2012, 105(2): 162-166.
- [12] Verbeek FP, Troyan SL, Mieog JS, et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping in breast cancer: a multicenter experience [J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 143(2): 333-342.
- [13] Sugie T, Kinoshita T, Masuda N, et al. Evaluation of the clinical utility of the ICG fluorescence method compared with the radioisotope method for sentinel lymph node biopsy in breast cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2016, 23(1): 44-50.
- [14] Yi M, Meric-Bernstam F, Ross MI, et al. How many sentinel lymph nodes are enough during sentinel lymph node dissection for breast cancer? [J]. Cancer, 2008, 113(1): 30-37.
- [15] Ban EJ, Lee JS, Koo JS, et al. How many sentinel lymph nodes are enough for accurate axillary staging in t1-2 breast cancer? [J]. J Breast Cancer, 2011, 14(4): 296-300.

(收稿日期:2016-01-21)

(本文编辑:罗承丽)

苑龙,周艳,胡滢,等.吲哚菁绿联合亚甲蓝在乳腺癌前哨淋巴结活组织检查中的应用价值[J/CD].中华乳腺病杂志:电子版,2016,10(2):87-91.