

文章编号:1005-6947(2007)11-1115-03

· 简要论著 ·

# 乳腺癌前哨淋巴结活检对腋窝淋巴结状态的预测价值研究

陈波<sup>1</sup>, 陆云飞<sup>2</sup>, 薛明兴<sup>1</sup>, 叶春梅<sup>1</sup>, 黄自明<sup>1</sup>

(1. 湖北省妇幼保健院 乳腺外科, 湖北 武汉 430070; 2. 广西医科大学第一附属医院 胃肠腺体外科, 广西南宁 530021)

**摘要:**为探讨乳腺癌前哨淋巴结(SLN)组织学特征对腋窝淋巴结状态的预测价值,笔者应用专利蓝或锝<sup>99m</sup>标记的大分子右旋糖苷(<sup>99m</sup>Tc-DX)为示踪剂成功显示20例乳腺癌患者的SLN。术中先进行前哨淋巴结活检(SLNB),再行乳腺癌改良根治术。并应用常规病理(HE)、免疫组化(IHC)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测腋窝淋巴结转移。结果显示,20例患者共找到腋窝淋巴结254个,其中SLN48个,NSLN206个。常规病理证实3例患者7个前哨淋巴结有癌转移,NSLN206个均无癌转移。免疫组化染色检测到7例患者11个SLN CK-19表达阳性,2个NSLN表达阳性。RT-PCR检测CK-19 mRNA 14例患者30个SLN和22个NSLN表达阳性。提示乳腺癌前哨淋巴结活检能准确预测患者腋窝淋巴结的状态。

[中国普通外科杂志,2007,16(11):1115-1117]

**关键词:** 乳腺癌; 前哨淋巴结; 免疫组织化学; 逆转录聚合酶链反应

**中图分类号:** R 737.9

**文献标识码:** B

目前,早期乳腺癌的治疗越来越趋向于缩小手术范围。乳腺癌前哨淋巴结活检(SLNB)是这一领域的一大进展。笔者应用专利蓝(patent blue)或锝<sup>99m</sup>标记的大分子右旋糖苷(<sup>99m</sup>Tc-DX)作为示踪剂定位乳腺癌前哨淋巴结<sup>[1]</sup>,并应用免疫组化染色(IHC)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测腋窝淋巴结微转移,以探讨乳腺癌前哨淋巴结组织学特征对腋窝淋巴结状态的预测价值。现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 一般资料

应用专利蓝或<sup>99m</sup>Tc标记的大分子右旋糖苷(<sup>99m</sup>Tc-DX)为示踪剂成功显像SLN并经常规病理证实腋窝淋巴结阴性或仅有SLN阳性的乳腺癌患者20例,共获得腋窝淋巴结254个,其中SLN48个,NSLN206个。

### 1.2 标本处理

每个淋巴结平均分成2块,一块行HE常规病理检查和免疫组化染色检查,另一块立即投入液氮中冷冻,待提取RNA用于RT-PCR检测。

**收稿日期:**2007-04-04; **修订日期:**2007-09-17。

**作者简介:**陈波,男,湖北长阳人湖北省妇幼保健院主治医师,主要从事乳腺疾病基础与临床方面的研究。

**通讯作者:**陈波 E-mail:philard@sina.com.cn

- [6] Adams J, Carder P J, Downey S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (11): 2898 - 2905.
- [7] Duff SE, Li C, Renehan A, *et al.* Immunodetection and molecular forms of plasma vascular endothelial growth factor-C [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(2): 339 - 343.
- [8] 赵金伟,王广义. 胃癌患者血清 VEGF-C 和 VEGF-A 的水平变化及 VEGF-C 在胃癌组织中的表达[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2006, (03): 483 - 485.
- [9] 高鹏,周庚寅,魏军民,等. 乳腺癌 c-erbB2 过表达与生存率、内分泌治疗效果和预后的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(10): 735 - 738.
- [10] Aziz SA, Pervez S, Khan S, *et al.* Significance of immunohistochemical c-erbB-2 product localisation pattern for prognosis

- in human breast cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2001, 7 (3): 190 - 196.
- [11] Yen L, Benlimame N, Nie ZR, *et al.* Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(11): 4029 - 4044.
- [12] Gottfried E, Konecny GE, Meng YG, *et al.* Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(5): 1706 - 1716.
- [13] 易晓雷,易文君,冉承茂,等. 乳腺癌 c-erbB-2 的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(4): 297 - 299.
- [14] Weich HA, Bando H, Brokelmann M, *et al.* Quantification of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) by a novel ELISA [J]. *J Immunol Methods*, 2004, 285(2): 145 - 155.

### 1.3 检测项目及方法

1.3.1 免疫组化染色检测 CK-19 按 S-P 免疫组化染色试剂盒(福州迈新)说明书进行,石蜡切片脱蜡至水,用柠檬酸盐抗原修复液煮沸法对组织抗原进行修复,加过氧化酶阻断溶液(试剂 A)室温孵育,正常非免疫动物血清(试剂 B)室温孵育,加第一抗体(CK-19,福州迈新)4℃过夜,加生物素标记的第二抗体(试剂 C)室温孵育,链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液(试剂 D)室温孵育。用新鲜配制的 DAB 溶液显色。胞浆黄染为阳性结果(图 1)。

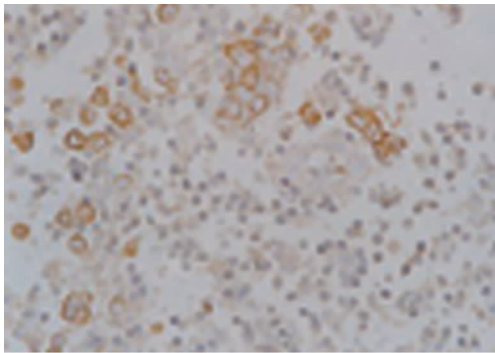


图 1 免疫组化染色 CK-19 阳性淋巴结(胞浆黄染)×400

### 1.3.2 RT-PCR 检测方法

(1)总 RNA 抽提:取约 100 mg 组织于 10 mL 的离心管( DEPC 水处理)中,加入 TRIZOL (GIBCO)1 mL 匀浆,室温孵育 5 min。加入 0.2 mL 氯仿,振荡 15 s,室温孵育 3 min。1 2000 r/min 4℃离心 15 min,取上清置于另一 1.5 mL 干净离心管中,弃沉淀物。室温孵育 10 min。1 2000 r/min 4℃离心 10 min,弃上清。加入 75%乙醇 1 mL,振荡混匀。7500 r/min 4℃离心 5 min,弃上清。空气中干燥 10 min。加入 100 μL DEPC 处理水,溶解 RNA。取 5 μL 测 A260、A280 值及其比值,测定其浓度和纯度。取 10 μL RNA 液进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,未降解的 RNA 可见到 28 S、18 S、和 5 S 三条区带,余下的 RNA 在 -80℃ 保存,待作 RT-PCR 用。

(2)引物合成:引物按文献报道的基因序列<sup>[2]</sup>,由上海生工生物工程公司合成。CK-19 上游、下游引物分别是 5'-AGGTGGATCCGCTCCGGCC-3'和 5'-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA-3',β-肌动蛋白(β-actin)上游、下游引物分别是 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'和 5'-TCATCACCAT-

TGGCAATGAC-3',它们各自扩增的片段分别是 460 bp 和 154 bp。β-actin 为内对照。

(3) cDNA 合成:反应体系 20 μL 包括 totalRNA 0.1~5 μg, oligo(dT) 18 primer (0.5 μg/μL) 1 μL, 5×反应液 4 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL (20 U/μL), 10 mM dNTP 混合液 2 μL, M-MULV 逆转录酶(MBI) 1 μL (200 U/μL)。42℃ 孵育 60 min, 70℃ 孵育 10 min。终止反应,冰上冷却,-20℃ 保存。

(4) PCR 反应:反应体系 25 μL 包括 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL, 10 mM dNTP 0.5 μL, 10 μM 引物混合物(CK-19、β-actin 的上下游引物) 1 μL, 逆转录产物 2 μL, TaqDNA 聚合酶(5 U/μL) 0.3 μL, 94℃ 先变性 5 min, 然后 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s 共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。

(5) PCR 产物分析:取 5 μL PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶(EB 染色)上 80 V 稳压下电泳 40~60 min。紫外观察仪上观察结果。以出现 460 bp 的扩增片段为阳性(图 2)。

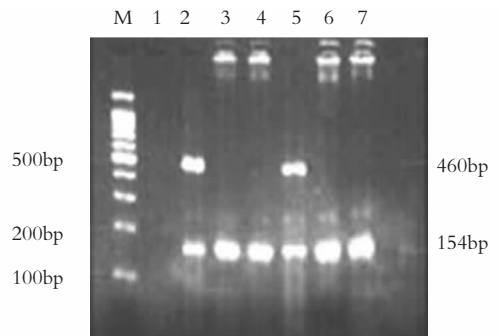


图 2 HE 染色阴性淋巴结 CK-19、β-actin PCR 扩增产物表达情况 M: Marker (100bp DNA ladder); 1:阴性对照;2~7 均出现 β-actin PCR 154bp 扩增产物,说明 RNA 未降解;2,5 出现 CK-19 PCR 460bp 扩增产物,说明这两个淋巴结存在微转移;3,4,6,7 未出现 CK-19 PCR 460bp 扩增产物,说明这 4 个淋巴结不存在癌转移。

## 2 结果

20 例患者中 SLN 48 个,每例患者为 1~4 个,平均 2.4 个。NSLN 206 个,每例患者为 6~17 个,平均 10.3 个。HE 常规病理检测证实 3 例患者 7 个前哨淋巴结有癌转移,NSLN 206 个均无癌转移。免疫组化染色检测到 7 例患者 11 个 SLN CK-19 表达阳性,2 个 NSLN 表达阳性。RT-PCR 检测 14 例患者 30 个 SLN 和 22 个 NSLN CK-19 mRNA 表达阳性(附表)。

附表 20 例患者 SLN 和 NSLN 不同检测方法检测结果

| 编号 | SLN 个数 | NSLN 个数 | HE  |      | IHC |      | RT-PCR |      |
|----|--------|---------|-----|------|-----|------|--------|------|
|    |        |         | SLN | NSLN | SLN | NSLN | SLN    | NSLN |
| 1  | 2      | 7       | 0   | 0    | 0   | 0    | 1+     | 2+   |
| 2  | 3      | 15      | 3+  | 0    | 3+  | 0    | 3+     | 0    |
| 3  | 3      | 9       | 0   | 0    | 0   | 0    | 0      | 0    |
| 4  | 3      | 10      | 0   | 0    | 1+  | 0    | 3+     | 5+   |
| 5  | 4      | 9       | 0   | 0    | 1+  | 0    | 2+     | 0    |
| 6  | 3      | 6       | 0   | 0    | 0   | 0    | 0      | 0    |
| 7  | 4      | 10      | 0   | 0    | 0   | 0    | 4+     | 5+   |
| 8  | 1      | 12      | 0   | 0    | 0   | 0    | 0      | 0    |
| 9  | 4      | 10      | 0   | 0    | 0   | 0    | 3+     | 1+   |
| 10 | 3      | 7       | 3+  | 0    | 3+  | 1+   | 3+     | 1+   |
| 11 | 1      | 8       | 1+  | 0    | 1+  | 1+   | 1+     | 1+   |
| 12 | 2      | 10      | 0   | 0    | 1+  | 0    | 1+     | 0    |
| 13 | 1      | 8       | 0   | 0    | 0   | 0    | 0      | 0    |
| 14 | 4      | 12      | 0   | 0    | 0   | 0    | 3+     | 3+   |
| 15 | 1      | 12      | 0   | 0    | 0   | 0    | 1+     | 2+   |
| 16 | 2      | 16      | 0   | 0    | 0   | 0    | 0      | 0    |
| 17 | 2      | 17      | 0   | 0    | 1+  | 0    | 2+     | 0    |
| 18 | 2      | 12      | 0   | 0    | 0   | 0    | 0      | 0    |
| 19 | 1      | 8       | 0   | 0    | 0   | 0    | 1+     | 0    |
| 20 | 2      | 8       | 0   | 0    | 0   | 0    | 2+     | 2+   |
| 合计 | 48     | 206     | 7+  | 0    | 11+ | 2+   | 30+    | 22+  |

### 3 讨论

乳腺癌前哨淋巴结的状态对腋窝淋巴结有无癌转移有预测价值<sup>[3]</sup>。本组结果表明,前哨淋巴结有癌转移的14例中,9例(64.3%)腋窝淋巴结有癌转移,前哨淋巴结没有癌转移的6例中,腋窝淋巴结均没有癌转移。本研究从微转移的角度进一步证实前哨淋巴结是可能转移的最初部位。Morton等<sup>[4]</sup>对皮肤恶性黑色素瘤和Giuliano等<sup>[5-6]</sup>对乳腺癌的研究表明,淋巴池中的第一站淋巴结即前哨淋巴结能够被准确定位和切除。前哨淋巴结是可能转移的最初部位,前哨淋巴结的组织学特征能反映淋巴池中其余淋巴结的组

织学特征,这在恶性黑色素瘤患者中已得到证实。Giuliano等<sup>[5]</sup>对成功定位前哨淋巴结的114例患者的前哨淋巴结和非前哨淋巴结进行常规病理检测发现,109例(95.6%)患者的前哨淋巴结的状态能准确反映腋窝淋巴结的状态。Dabbs等<sup>[7]</sup>的研究也表明,SLND切除的SLN明显较ALND切除的NSLN更具有转移的可能。本研究通过HE、IHC和RT-PCR三种不同的检测方法证实,前哨淋巴结能准确预测腋窝淋巴结的状态。

前哨淋巴结定位活检在乳腺癌患者治疗中是一种可行的技术,且其组织学特征能反映腋窝淋巴结的状态。加上较常规HE更为敏感的淋巴结检测技术的成熟,前哨淋巴结切除代替传统的腋窝淋巴结清扫将成为可能,使早期乳腺癌的治疗更趋合理。

#### 参考文献:

- [1] 陆云飞,陈波,曾健,等. 乳腺癌前哨淋巴结定位活检及其临床意义研究[J]. 广西医科大学学报,2003,20(5):633-635.
- [2] Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes [J]. Lancet, 1997, 349(9069):1864-1867.
- [3] 申郑堂,罗沙阳,王守满,等. 乳腺癌哨兵淋巴结转移与肿瘤大小和癌基因及激素受体表达关系的临床观察[J]. 中国普通外科杂志,2006,15(10):728-731.
- [4] Morton DL, Wen DR, Foshag LJ, et al. Intraoperative lymphatic mapping and selective cervical lymphadenectomy for early-stage melanomas of the head and neck. J Clin Oncol, 1993,11(9):1751-1756.
- [5] Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. Ann Surg. 1994,220(3):391-398.
- [6] Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, et al. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. J Clin Oncol, 1997,15:2345-2350.
- [7] Dabbs DJ, Fung M, Landsittel D. Sentinel lymph node micrometastasis as a predictor of axillary tumor burden [J]. Breast, 2004,10(2):101-105.