

## 荧光联合纳米炭在乳腺癌前哨淋巴结活检中的应用

岳健<sup>1</sup> 裴静<sup>1</sup> 任敏<sup>1</sup> 张敬杰<sup>1</sup> 杨帆<sup>1</sup> 张泽树<sup>2</sup> 陶丹丹<sup>1</sup> 王俊艳<sup>1</sup> 王本忠<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨乳腺癌前哨淋巴结活检(SLNB)中吲哚菁绿(ICG)联合纳米炭悬浊液的应用价值。方法 将110例腋窝淋巴结阴性的早期乳腺癌患者随机分成两组,分别采用注射用 ICG 联合纳米炭悬浊液(联合组,57例)和单用纳米炭悬浊液(纳米炭组,53例)为示踪剂行 SLNB。SLNB 后随即行腋窝淋巴结清扫。结果 联合组中55例可见荧光所示淋巴管道,荧光显像率96.49%(55/57),前哨淋巴结检出率98.25%(56/57),准确率96.43%(54/56),假阴性率6.67%(2/30),灵敏度93.33%(28/30);纳米炭组前哨淋巴结检出率94.34%(50/53),准确率96.00%(48/50),假阴性率8.33%(2/24),灵敏度91.67%(22/24)。联合组共检出前哨淋巴结309枚,纳米炭组共检出前哨淋巴结218枚,两组前哨淋巴结平均检出枚数比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而两组检出率、准确率、假阴性率和灵敏度这4个评价指标比较,差异均无统计学意义。结论 ICG 与纳米炭悬浊液联合应用相比单用纳米炭悬浊液可提高前哨淋巴结检出数量,减少漏诊概率。

**关键词** 纳米炭;吲哚菁绿;前哨淋巴结活检;荧光;乳腺癌中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0236-04  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.019

乳腺癌前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)是判断癌细胞有无腋窝转移的重要依据,是决定患者是否需要行腋窝淋巴结清扫(axillary lymph node dissection, ALND)的重要指征<sup>[1-2]</sup>。保留腋窝淋巴结可有效缓解术后淋巴水肿、感觉异常等不适,促进术后恢复,提高生活质量,为广大女性带来了福音。传统 SLNB 方式包括美蓝法、核素法等,但分别存在检出率较低、学习曲线较长和放射性污染等问题,近年来以吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)为示踪剂的荧光法与纳米炭法应用逐渐

增多,关于这两种方法的联合应用报道较少,该研究完成了110例早期乳腺癌 SLNB 的对照研究,现将结果报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 选取于安徽医科大学第一附属医院乳腺外科2014年1月~2016年6月住院患者中临床腋窝淋巴结阴性的原发性乳腺癌患者110例,年龄26~72岁,中位年龄49岁。其中103例浸润性癌(93.6%),1例粘液腺癌(0.9%),6例导管内癌(5.5%)。入组条件:①女性患者;②术前经穿刺活检、微创旋切或切检诊断为乳腺癌;③临床 I、II 期乳腺癌;④临床检查腋窝淋巴结阴性;⑤术前通过临床或影像学检查均未发现远处转移。

**排除标准:**①曾接受 SLNB 或腋窝区手术史;②多中心或多病灶的乳腺癌;③临床已发现有腋窝淋巴结转移;④曾接受乳腺区放疗;⑤发现远处转移;⑥妊娠、哺乳期乳癌患者;⑦ ICG 或碘过敏者。

**1.1.2 仪器和试剂** 荧光检测仪选用脉管系统成像仪 型号 MDM-I (廊坊市明德生物医药技术有限公司);前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)示踪剂为注射用 ICG (规格:25 mg, 丹东医创药业有限责任公司);纳米炭混悬注射液(规格:0.5 ml : 25 mg, 重庆莱美药业股份有限公司)。

#### 1.2 方法

**1.2.1 手术方法** 消毒铺巾后,使用1 ml 注射器,联合组在乳晕周围3、6、9、12点处皮下分别注射 ICG(1 mg/ml)0.1 ml 及纳米炭注射液(50 mg/ml)0.1 ml(图1A),随后用指腹轻轻按揉10 min 使示踪剂充分弥散。关闭手术灯,使用脉管系统成像仪寻找荧光,观察到皮肤淋巴管荧光行走消失处做标记(图1B、1C、1D),切开皮肤、皮下组织后继续寻找荧光所示及黑染 SLN(图1E、1F);纳米炭组的术前示踪剂注射剂量及位置同联合组,取腋窝沿皮纹切口,切开皮肤,找到黑染的淋巴管,沿淋巴管溯流而上,显示的第1枚(组)淋巴结为 SLN。切下的 SLN(见

2016-11-04 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M180)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院乳腺外科,合肥 230022

<sup>2</sup>中国科学技术大学工程科学学院,合肥 230000

作者简介:岳健,男,硕士研究生;

王本忠,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wangbenzhong2459@126.com

图 1G、1H) 术中冰冻及术后行石蜡切片常规 HE 染色。待 SLN 收集完毕后, 行 I、II 级 ALND, 根据术后石蜡切片病理以明确最终腋窝状态。



图 1 手术过程

A: 注射示踪剂; B: 寻找荧光; C: 淋巴管显影; D: 标记出的淋巴管; E: 黑染的 SLN; F: 荧光所示 SLN; G: 切下的 SLN; H: 近红外光下的 SLN

**1.2.2 技术指标计算方法** 参照美国 Louisville 大学对 SLNB 技术的评价标准<sup>[3]</sup> 计算 SLNB 灵敏度、准确率、假阴性率。灵敏度 (%) = SLN 阳性例数 / 腋窝淋巴结转移例数 × 100%; 准确率 (%) = SLN 真阳性与真阴性的例数之和 / SLNB 总例数 × 100%; 假阴性率 (%) = SLN 假阴性例数 / 腋窝淋巴结转移例数 × 100%。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 计量资料比较采用 *t* 检验, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验, 数据以  $n(\%)$  表示, 当  $P < 0.05$  时差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 基本资料** 根据乳腺癌的 TMN 分期方法, 患者肿瘤大小分为: Tis: 原位癌; T1: 肿瘤长径  $\leq 2$  cm; T2:  $2 \text{ cm} <$  肿瘤长径  $\leq 5$  cm; T3: 肿瘤长径  $> 5$  cm。

各组患者的年龄及月经状况、肿瘤大小、部位、组织学分级及雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体-2 (Her-2) 等方面比较差异无统计学意义, 见表 1。

表 1 两组患者临床资料

临床资料	联合组 ( <i>n</i> = 57)	纳米碳组 ( <i>n</i> = 53)	<i>t</i> / $\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
年龄 (岁 $\bar{x} \pm s$ )	48.1 $\pm$ 8.1	49.9 $\pm$ 10.1	0.888	0.377
月经状况 [ <i>n</i> (%)]			1.204	0.334
未绝经	36 (63.2)	28 (52.8)		
已绝经	21 (36.8)	25 (47.2)		
肿瘤大小 (T) [ <i>n</i> (%)]			1.692	0.429
Tis	3 (5.3)	2 (3.8)		
T1	21 (36.8)	26 (49.1)		
T2	33 (57.9)	25 (47.2)		
肿瘤部位 [ <i>n</i> (%)]			2.949	0.127
左侧	24 (42.1)	31 (58.5)		
右侧	33 (57.9)	22 (41.5)		
肿瘤象限 [ <i>n</i> (%)]			5.667	0.225
内上	9 (15.8)	9 (17.0)		
内下	3 (5.3)	6 (11.3)		
外上	37 (64.9)	28 (52.8)		
外下	3 (5.3)	8 (15.1)		
中央	5 (8.8)	2 (3.8)		
组织学分级 [ <i>n</i> (%)]			2.791	0.248
1	5 (8.8)	4 (7.5)		
2	45 (78.9)	47 (88.7)		
3	7 (12.3)	2 (3.8)		
ER 状态 [ <i>n</i> (%)]			0.046	1.000
+	42 (73.7)	40 (75.5)		
-	15 (26.3)	13 (24.5)		
PR 状态 [ <i>n</i> (%)]			0.006	1.000
+	34 (59.6)	32 (60.4)		
-	23 (40.4)	21 (39.6)		
Her-2 状态 [ <i>n</i> (%)]			0.242	0.695
+	37 (64.9)	32 (60.4)		
-	20 (35.1)	21 (39.6)		

**2.2 两种示踪方法的检出情况** 联合组 57 例中 55 例可见荧光所示淋巴管道, 荧光显像率为 96.49%。其中 1 例未探及 SLN, 共获取 309 (5.5  $\pm$  3.4) 枚 SLN, SLN 检出率为 98.25% (56/57)。其中 SLN 阳性 28 例, 阳性 SLN 共 52 枚, 行 ALND 术后病理示 2 例假阴性, 假阴性率为 6.67% (2/30)。纳米碳组检出 SLN 者 50 例, 共获取 218 (4.4  $\pm$  2.0) 枚 SLN, SLN 检出率为 94.34% (50/53)。其中 SLN 阳性 22 例, 阳性 SLN 共 37 枚, 行 ALND 术后病理示 2 例假阴性, 假阴性率为 8.33% (2/24)。两组 SLN 检出枚数差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而两组间准确率、灵敏度和假阴性率比较差异无统计学意义。

表2 两组 SLN 检测情况

指标	联合组 (n=57)	纳米碳组 (n=53)	t/ $\chi^2$ 值	P 值
阳性 SLN (枚)	52	37	-0.760	0.449
平均获得 SLN 数(枚 $\bar{x} \pm s$ )	5.5 $\pm$ 3.4	4.4 $\pm$ 2.0	-2.158	0.034
准确率 (%)	96.43 (54/56)	96.00 (48/50)	0.013	0.908
灵敏度 (%)	93.33 (28/30)	91.67 (22/24)	0.054	0.816
假阴性率 (%)	6.67 (2/30)	8.33 (2/24)	0.054	0.816
SLN 检出率 (%)	98.25 (56/57)	94.34 (50/53)	1.196	0.274

### 3 讨论

SLNB 是指导患者后续手术方式的风向标,是改善患者术后生活质量重要的一环,目前应用于乳腺癌 SLNB 的方法主要核素法和染料法等。核素法存在示踪剂及检测所用仪器具有放射性,需在 SLNB 前提前较长时间注射示踪剂等不足。蓝染法在我国大多使用亚甲蓝作为示踪剂,具有价格较低、毒副作用较小的优点,且检出率和国外所用专利蓝相当,皮肤变色率也较专利蓝要低<sup>[4]</sup>,但存在与操作者技术有较大关系、学习曲线较长等问题。荧光法技术由近红外荧光的激发、采集与成像和荧光造影剂组成。近红外荧光的波长在 700 ~ 900 nm。此波段范围内一般生物组织的吸收系数到达最低值,其自发荧光是最小值,而光子进出组织则处于相对最高值,故光子的收集在此区域有最大的信息值,并由于此波段的光肉眼不可见<sup>[5-6]</sup>,需要光学采集仪器来采集显示出特定的信息。荧光造影剂在注射入人体后,在激发光的作用下,造影剂释放出不同于激发光波长的处于近红外波段的光<sup>[7]</sup>,采集这些光的信息可获得造影剂的作用位置信息。

ICG 是一种无毒的荧光造影剂,静脉注射或皮下注射后,1 mol 人类血清白蛋白可与 1 ~ 2 mol 的 ICG 结合,在水溶液中,ICG 发射光谱的峰值为 810 ~ 820 nm<sup>[8]</sup>。Kitai et al<sup>[9]</sup> 将 ICG 应用于乳腺癌的 SLNB。在乳腺癌手术中,由于淋巴液中巨噬细胞的作用,ICG 会流动汇聚到 SLN 并在激发光的作用下显像,从而使 SLN 能被定位与切除行病理检查,从而为判断患者是否发生淋巴转移提供重要依据并指导手术<sup>[10]</sup>。纳米炭则是一种具有高度的淋巴系统趋向性的淋巴示踪剂,在纳米炭混悬液中,主要成分为碳颗粒,并加进聚乙烯吡咯烷酮生理盐水<sup>[11]</sup>,平均粒径 21 nm,具有很大的吸附活性,故容易形成平均 150 nm 的纳米炭团,相对于毛细血管内皮间隙的 30 ~ 50 nm,从而基本不会进入血管,但对于内皮间隙为 100 ~ 500 nm 的毛细淋巴管内皮间隙则大多纳

米活性炭团颗粒能够进入其中,加之巨噬细胞的吞噬作用以及组织间液和淋巴液的压力,使得碳颗粒能迅速进入淋巴管并停留于 SLN 内,从而清楚显示出黑染的 SLN<sup>[12-13]</sup>。Wu et al<sup>[14]</sup> 进行了 83 例纳米炭 SLNB,检出率、准确率和假阴性率分别为 100%、96.4% 和 11.1%。本研究结果显示,两组的检出率、准确率、灵敏度均较高,并无显著差异,原因可能是由于纳米炭已经有较高的检测效果,故联合 ICG 后效果提升并不明显,但检出 SLN 数量上联合组高于纳米炭组,一定程度上说明联合组有提高检出效率的趋势,加大样本量后或许会得出相对明显的差异。

采用 ICG 和纳米炭作为示踪剂各有优点,但也不乏一些不足。联合组中有 1 例未检出 SLN,该患者体型较胖,皮下脂肪较多,并未见到明显荧光所示的淋巴管管道,可能与近红外光的穿透能力不足有较大关系,据 Stoffels et al<sup>[2]</sup> 观察,近红外光在临床术中的穿透力仅有 1 ~ 1.5 cm。而纳米炭着色的淋巴系统的寻找和定位依靠医师的经验进行切开寻找,存在一定不确定性及可能带来一些不必要的损伤,且肉眼的观察相对于染色较浅或者位置较为隐蔽的淋巴结来说不易发现。术中显示淋巴管及淋巴结的明显程度,能否成功摘取所有 SLN 与 ICG 注射的位置、剂量及术者的操作熟练程度等密切相关。因此,在操作前应选择合适的注射部位,调整相应的 ICG 浓度并适当按摩协助示踪剂的扩散。ICG 注射部位包括肿瘤实质、肿瘤周围和乳晕周围,从层次上有皮内、皮下和腺体内注射。目前有学者认为,示踪剂注射在乳腺不同部位可引流至同一 SLN,通常选择乳晕周围皮下或皮内注射,乳腺腺体内注射用于显示内乳淋巴结<sup>[15]</sup>。在示踪剂浓度剂量方面,到目前为止关于用 ICG 行 SLNB 所用剂量尚无完全统一的标准,当浓度剂量过大,则容易在切断淋巴管后渗漏,污染手术区域导致无法分清淋巴结。纳米炭也存在类似问题,Wu et al<sup>[14]</sup> 报道了 3 种不同的剂量 (2、1、0.5 ml) SLN 检出率为 66.7% (4/6)、100% (6/6)、16.7% (1/6) 3 种不同的注射时间 (术前 10 ~ 15 min、术前 1 天、术前 2 天) 检出率为 100% (6/6)、16.7% (1/6)、0 (0/6),尽管例数较少,但在一定程度上说明不同的剂量和注射时间点确实影响着 SLN 检出的效率。

综上所述,ICG 联合纳米炭悬浊液应用于 SLNB 不仅仅是提高 SLN 检出数量,减少漏诊概率,而且是增加了一种新的思路,既是荧光材料和新型染料

的结合,又是检测仪器与传统人眼的结合,在将来的临床工作中值得应用。

### 参考文献

- [1] Wiatrek R, Kruper L. Sentinel lymph node biopsy indications and controversies in breast cancer [J]. *Maturitas*, 2011, 69(1):7-10.
- [2] Stoffels I, Dissemond J, Pöppel T, et al. Intraoperative fluorescence imaging for sentinel lymph node detection: prospective clinical trial to compare the usefulness of indocyanine green vs technetium Tc 99m for identification of sentinel lymph nodes [J]. *JAMA Surg*, 2015, 150(7):617-23.
- [3] Krag D, Weaver D, Ashikaga T, et al. The sentinel node in breast cancer - a multicenter validation study [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(14):941-6.
- [4] Fattahi A S, Tavassoli A, Rohbakhshfar O, et al. Can methylene blue dye be used as an alternative to patent blue dye to find the sentinel lymph node in breast cancer surgery? [J]. *J Res Med Sci*, 2014, 19(10):918-22.
- [5] 余柳丹, 罗一帆, 陈小菊, 等. 吲哚菁绿稳定性及光敏性和声敏性研究 [J]. *化学研究与应用*, 2016, 28(3):400-3.
- [6] 丛斌斌, 孙晓, 宋现让, 等. 新型前哨淋巴结示踪剂的制备及动物实验研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(3):245-50.
- [7] Tagaya N, Yamazaki R, Nakagawa A, et al. Intraoperative identification of sentinel lymph nodes by near-infrared fluorescence imaging in patients with breast cancer [J]. *Am J Surg*, 2008, 195(6):850-3.
- [8] Desmettre T, Devoisselle J M, Mordon S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography [J]. *Surv Ophthalmol*, 2000, 45(1):15-27.
- [9] Kitai T, Inomoto T, Miwa M, et al. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer [J]. *Breast Cancer* 2005, 12(3):211-5.
- [10] Pitsinis V, Provenzano E, Kaklamanis L, et al. Indocyanine green fluorescence mapping for sentinel lymph node biopsy in early breast cancer [J]. *Surg Oncol*, 2015, 24(4):375-9.
- [11] 王宗洪. 纳米炭在乳腺癌前哨淋巴结活体术中应用 [J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(5):743-5.
- [12] 瞿欢, 张亚男, 陈卫东. 纳米炭在乳腺癌前哨淋巴结示踪的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19(5):489-92.
- [13] Araújo F, Shrestha N, Granja P L, et al. Safety and toxicity concerns of orally delivered nanoparticles as drug carriers [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, 11(3):381-93.
- [14] Wu X, Lin Q, Chen G, et al. Sentinel lymph node detection using carbon nanoparticles in patients with early breast cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0135714.
- [15] 杨振林. 乳腺癌前哨淋巴结研究的现状与评价 [J]. *中华临床医师杂志:电子版* 2015, 9(6):8-12.

## Combination of fluorescence and carbon nanoparticles for mapping sentinel lymph nodes in early breast cancer patients

Yue Jian, Pei Jing, Ren Min, et al

(Dept of Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the feasibility of the combination of fluorescence and carbon nanoparticles as tracer for sentinel lymph node biopsy in early breast cancer patients. **Methods** 110 early breast cancer patients without clinical lymph node metastasis in axillary eligible for sentinel lymph node biopsy were randomly assigned to combination group (57 cases) receiving indocyanine green (ICG) and carbon nanoparticles as the lymphatic mapping tracers and carbon nanoparticles alone group (53 cases). After sentinel lymph node biopsy, axillary lymph node dissection was performed. **Results** In the combination group, subcutaneous lymphatic channels were successfully visualized in 55 patients and the detection rate was 98.25% (56/57), and the accuracy, the false-negative rate, the sensitivity of SLNB were 96.43% (54/56), 6.67% (2/30), 93.33% (28/30) respectively. In the carbon nanoparticles group, the detection rate, the accuracy, the false-negative rate, the sensitivity of SLNB were 94.34% (50/53), 96.00% (48/50), 8.33% (2/24), 91.67% (22/24). The number of detected SLN was 309 in combination group versus 218 in carbon nanoparticles alone group. The difference of the average number of detected SLN was obvious between two groups ( $P < 0.05$ ). However, there were no significant differences of the detection rate, the accuracy, the false-negative rate and the sensitivity of SLNB between the two groups. **Conclusion** Combination of ICG and carbon nanoparticles for mapping SLN can increase the number of the SLN detected and reduce the chance of misdiagnosis compared to using carbon nanoparticles alone.

**Key words** carbon nanoparticles; indocyanine green; sentinel lymph node biopsy; fluorescence; breast cancer