

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.022

吲哚菁绿联合亚甲蓝在乳腺癌前哨淋巴结活检中的临床应用 *

寇德强¹ 迟崇巍² 徐 虎¹ 张 昉¹ 邱镜丹¹ 田 捷² 王建东^{1△}

(1 解放军总医院普通外科 北京 100853; 2 中国科学院自动化研究所中国科学院分子影像重点实验室 北京 100190)

摘要 目的:探讨吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)联合亚甲蓝在乳腺癌前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)中的临床应用价值。**方法:**共入组 39 例乳腺癌患者,在光学分子影像手术导航系统(surgical navigation system, SNS)的引导下,使用 ICG 联合亚甲蓝实施 SLNB。快速冰冻病理证实前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)转移者,即刻行腋窝淋巴结清扫(axillary lymph node dissection, ALND);SLN 阴性者免于 ALND。**结果:**联合法实施 SLNB 检出率 95%,成功检出 SLN125 个,平均检出 3.2 个 SLN,准确率 95.0%,灵敏度 100%,假阴性率 0%;蓝染法检出率 87.2%,成功检出 SLN71 个,平均检出 1.8 个 SLN,准确率 89.7%,灵敏度 93.7%,假阴性率为 6.3%;统计结果采用 χ^2 检验,检验结果具有统计学意义。**结论:** ICG 联合亚甲蓝实施乳腺癌 SLNB 成功率高,假阴性率低,临床效果不亚于亚甲蓝,是实施 SLNB 的新方法。

关键词:乳腺癌;前哨淋巴结活检;吲哚菁绿;亚甲蓝;荧光导航

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)19-3686-04

Application of Indocyanine Green Combined with Methylene Blue Dyes in Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients with Breast Cancer*

KOU De-qiang¹, CHI Chong-wei², XU Hu¹, ZHANG Fang¹, QIU Jing-dan¹, TIAN Jie², WANG Jian-dong^{1△}

(1 Department of General Surgery, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing, 100853, China; 2 Key Laboratory of Molecular Imaging, Chinese Academy of Sciences, Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100190, China)

ABSTRACT Objective: To test the feasibility of combination use of indocyanine green (ICG) and methylene blue dyes for sentinel lymph node biopsy (SLNB) in breast cancer. **Methods:** 39 breast cancer patients were enrolled in this experiment guided by our surgical navigation system (SNS) to detect sentinel lymph node (SLN) with the combination method. If the intraoperative pathology results of SLN were negative, axillary lymph node dissection (ALND) was avoided. **Results:** Using the combination method, 95% of SLNs were identified, 125 SLNs were dissected with the average of 3.2 and the accurate rate was 95.0% with the sensitivity of 100% and false negative rate of 0%. For the aspect of methylene blue method, the detection rate was 87.2%. 71 SLNs were dissected with the average of 1.8 and the accurate rate was 89.7% with the sensitivity of 93.7% and false negative rate of 6.3%. χ^2 test was used in our statistical results and the test results were statistically significant. **Conclusion:** ICG combined with methylene blue method have higher detection rate and lower false negative rate, which can be as a new method for SLNB.

Key words: Breast cancer; Sentinel lymph node biopsy; Indocyanine green; Methylene blue; Fluorescence guided surgery

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)19-3686-04

前言

乳腺癌居女性恶性肿瘤发病率的第一位。手术治疗是早期乳腺癌的首选治疗手段。资料显示,临床 I、II 期的乳腺癌腋窝淋巴结(axillary lymph node, ALN)的转移率不足 30%^[1]。腋窝淋巴结清扫(axillary lymph node dissection, ALND)对于 ALN 阴性患者,并不能带来生存获益,却可能导致不良术后并发症,因此传统的手术方法存在治疗过度^[2-4]。对合适的患者进行个体化保守治疗是现代乳腺癌外科的发展方向。

前哨淋巴结活检术(sentinel lymph node biopsy, SLNB)是一

项能准确提供腋窝分期的微创活检技术^[5-7],SLNB 替代腋窝淋巴结清扫(axillary lymph node dissection, ALND)降低了术后上肢淋巴水肿、感觉、运动障碍等的发生率,并在一定程度上减少了患者心理并发症的发生^[8],前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)阴性患者免于行 ALND 腋窝复发率低^[9-12]。循证医学 I 级证据证实 SLN 阴性患者可以避免行 ALND。目前,SLNB 代替 ALND 已经成为欧美国家早期乳腺癌的标准治疗模式。临床上,对 SLNB 的适应症逐渐放宽,2009 年 St. Gallen 专家共识支持对除炎性乳癌外的所有临床腋窝阴性的患者行 SLNB^[13]。同时,寻找一种可靠的方法以提高 SLNB 的准确性,降低假阴

* 基金项目:北京市自然科学基金面上项目(7142151);军事医学创新专项计划面上项目(13CXZ058)

作者简介:寇德强(1986-),男,硕士,主要研究方向:普通外科,乳腺疾病

△ 通讯作者:王建东,电话:010-66938371, E-mail: vicky1968@163.com

(收稿日期:2015-02-18 接受日期:2015-03-11)

性率逐渐成为临床研究的热点。

我科于2014年1月至2014年6月对39例乳腺癌患者采用吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)联合亚甲蓝实施SLNB,以探讨该法的可行性及应用前景,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本实验入选2014年1月-2014年6月在我中心手术的39例女性乳腺癌患者,年龄31-70岁,中位年龄50岁,其中31例浸润性导管癌(79.5%),3例粘液腺癌(7.7%),2例导管内癌(5.1%),2例微乳头状癌(5.1%),1例浸润性小叶癌(2.6%)。入组条件:1)女性患者;2)术前经穿刺活检、麦默通旋切、或开放手术切除活检诊断为乳腺癌;3)初诊条件可直接手术的临床I、II期乳腺癌;4)临床检查腋窝无可疑阳性淋巴结;5)术前检查在临床或影像学方面均无远处转移相关证据(M0);6)自愿签署前哨淋巴结活检及临床试验相关知情同意书。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,或发现远处转移;4)曾接受乳腺区放疗或者新辅助化疗;5)炎性乳腺癌;6)妊娠、哺乳期乳腺癌患者;7)无人身自由及独立民事行为能力者;8)既往有严重过敏史,或对ICG过敏者。患者一般资料见表1。

表1 病例基本特征(n=39)

Table 1 Patients and tumor Characteristics(n=39)

Characteristic	n	%
AaAge		
30-40	6	15.4
41-50	14	35.9
51-60	11	28.2
61-70	8	20.5
BMI		
≥ 18.5,<22	11	28.2
≥ 22,<25	13	33.3
≥ 25,<30	13	33.3
≥ 30	2	5.2
Pathology		
intraductal carcinoma	2	5.1
invasive ductal carcinoma	31	79.5
mucinous breast carcinoma	3	7.7
micropapillary carcinoma	2	5.1
invasive lobular carcinoma	1	2.6
Clinical tumor size		
Tis	1	2.6
T1	15	38.5
T2	18	46.2
T3	1	2.6
Tx	4	10.3

1.2 试验方法

全组患者均采用同时注射亚甲蓝及ICG的方法行SLNB。具体方法是:全麻成功后,常规消毒铺单。使用5 mL注射器及

22G针头,于外上象限近乳晕皮内注入1%亚甲蓝注射液1 mL(购自江苏济川制药有限公司)。15 min后,用2 mL注射器抽取浓度为2.5 mg/mL的ICG 0.2 mL(购自丹东医创药业有限责任公司),于患侧乳晕区6点、9点和12点皮内分别注射。注射ICG后于乳晕区局部按摩30 s,用光学分子影像手术导航系统(surgical navigation system, SNS)(中国科学院自动化研究所自主研发)行患侧乳腺外上象限区域淋巴管引流实时显像,在淋巴管消失点远侧1-2 cm处确定为SLN的位置,拍照并行体表标记。取腋窝下端SLN活检切口,逐层切开皮肤及皮下组织,向胸壁解剖,注意发现并解剖荧光显影的高亮淋巴结,此为ICG法确定的SLN;同时注意观察蓝染的淋巴管,沿淋巴管追踪至蓝染淋巴结,此为亚甲蓝法确定的SLN。常规切除SLN后剔除表面脂肪组织,各淋巴结分别记录发光及蓝染情况,并送快速冰冻病理检验。SLN未转移者免除ALND,转移者即刻行ALND。手术方式按术前讨论方案进行,包括:单纯乳腺切除术、保乳手术、保留乳头乳晕复合体皮下腺体切除术等。接受保乳手术的患者同时一期行假体植入。切除乳腺组织及ALN组织送常规病理检查。

1.3 SLNB技术标准

按美国Louisville大学SLNB技术评价标准对结果进行评价^[4]。成功率(检出率)=检出SLN的例数/接受活检的例数×100%;准确率=(SLN真阳性+真阴性例数)/SLNB总例数×100%。灵敏度(真阳性率)=SLN真阳性例数/(真阳性+假阴性例数)×100%;假阴性率(漏诊率)=SLN假阴性例数/(真阳性+假阴性例数)×100%。

1.4 统计学处理

应用SPSS 10.0软件进行统计分析,对一般性指标(如手术时间、成功检出的SLN个数)行t检验,以P<0.05为两种方法检测结果的差异有统计学意义。对主要观察指标(成功率,准确率,灵敏度,假阴性率)采用χ²检验,以P<0.05为两种检测方法的结果统计分析有统计学意义。

2 结果

39例患者共成功实施SLNB37例。37例患者在注射ICG后,均使用SNS在患侧乳腺外上象限观察到清晰的淋巴管引流图像,且于淋巴管消失点远侧皮下发现荧光示踪的淋巴结(见图1)。未成功实施SLNB的2例患者,使用联合法及蓝染发均未找到SLN,按SLN阳性给予ALND,后证实ALN无转移,按2例假阳性纳入统计结果。39例患者共有16例发现ALN转移(转移率41.02%),其中16例患者均使用联合法找到并证实SLN转移(真阳性率100%),亚甲蓝法出现1例假阴性(假阴性率6.3%)。23例ALN阴性患者中(未转移率58.97%),联合法SLNB活检失败2例,美蓝法失败3例,ICG失败2例,均按假阳性计入统计结果。最后,联合法实施SLNB检出率95.0%,成功检出SLN125个,平均检出3.2个SLN,准确率为95.0%,灵敏度为100%,假阴性率为0;蓝染法检出率87.2%,检出SLN71个,平均检出1.8个SLN,准确率为89.7%,灵敏度为93.7%,假阴性率为6.3%;ICG法检出率92.3%,成功检出SLN124个,平均检出3.17个SLN,准确率为92.3%,灵敏度100%,假阴性率为0。联合法平均检出个数优于亚甲蓝法,差异

有统计学意义($P<0.05$),主要观察指标(成功率,准确率,灵敏度,假阴性率)与单纯美蓝法一致($P<0.05$, Kappa 值 =0.897)。

表 2 两种方法检出结果比较

Table 2 Comparison of sentinel lymph node detection between two methods

Characteristic	methylene blue method	Combination method	P	Kappa
average	1.8 (71/39)	3.2 (125/39)	$p=0.0000<0.05$	
false negative rate	6.3% (1/16)	0 (0/16)	$p=0.0000<0.05$	0.897
detection rate	87.2% (34/39)	95.0% (37/39)	$p=0.0000<0.05$	0.897
accurate rate	89.7% (35/39)	95.0% (37/39)	$p=0.0000<0.05$	0.897
sensitivity	93.7% (15/16)	100% (16/16)	$p=0.0000<0.05$	0.897

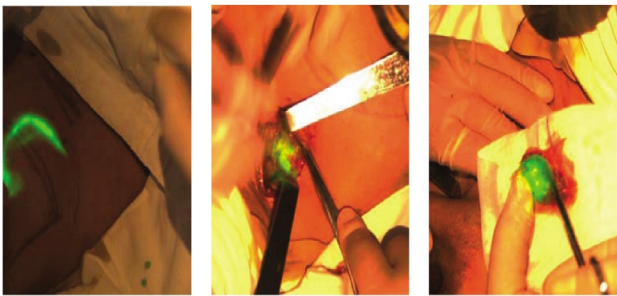


图 1 术中淋巴管示踪和淋巴结显影情况

Fig. 1 Intraoperative lymphatic and lymph nodes mapping

3 讨论

目前实施乳腺癌 SLNB 主要有染料法、核素法及二者的联合法。对于染料,国外一般使用专利蓝和异硫蓝,国内多使用亚甲蓝,二者检出率相似,约为 65-93%,且不引起超敏反应和其他严重的并发症^[5]。有学者使用纳米碳作为染色示踪剂取得了良好的临床效果^[16,17]。染色法的缺点是肉眼无法于皮肤表面看到蓝染的淋巴管及淋巴结,对术者的手术操作经验要求较高,检出率较低。核素示踪剂常用 99mTc 标记的硫胶体,检出率达 94%-97%^[18],但依赖于专业仪器设备,因放射性安全问题,术前准备时间较长,费用问题,在国内尚未批准使用。同时运用放射性核素和蓝染料的联合法可以进一步提高 SLN 检出率,同时降低假阴性率,并改变了学习曲线^[9]。在欧美国家综合法已基本取代染料法和核素法。文献报道的 5705 例 SLNB 患者,综合法检出率 94.63%,较染色法的 89.84%和核素法的 92.67%高^[20]。指南推荐使用综合法以提高检出率,降低假阴性率。针对国内 SLNB 方法选择现状,寻找可靠性强,方便开展,容易被临床医师掌握的 SLNB 方法成为乳腺外科发展的需求。

光学分子影像技术的不断发展,促进了新的光学影像设备及荧光染料产生,是目前研究的新热点。它通过专门的体外影像检测设备使 SLN 在体外显影并进一步达到体表准确定位的目的。从而简化 SLNB 操作的手术程序,缩短手术学习曲线,并提高检出率及准确率,降低假阴性率,显示了较传统蓝染法更好的效果。Hojo^[21]等于 2009 年比较了 ICG 法与专利蓝法实施 SLNB 的差异,发现前者的检出率(100%)高于后者(93%)。Hirche^[22]等也于 2010 年使用 ICG 实施 SLNB,结果显示:特异性 97.7%,灵敏度 94.4%,假阴性率 5.6%。我们在研究中利用

ICG 联合亚甲蓝进行 SLNB,检出率 95%,平均检出 3.2 个淋巴结,准确率为 94.9%,灵敏度为 100%,假阴性率为 0%,与国外的临床数据相近。

SLNB 一直无法避免学习曲线的问题,有国外学者认为,经过 20~45 例的训练^[23-25],可使 SLN 检出率稳定在较高水平。在我们的研究中,基于 ICG 的快速显像特性,SNS 可以实时的进行淋巴管及淋巴结可视化显像,较传统方法简单快捷,容易被手术医生快速掌握。平均手术时间为 15 min(7~24 min)。事实上 10 例手术以后我们就将检出率维持在了较高水准。本实验中 SLNB 失败的 2 例手术,均发生于实验的初期(第 4 次实验及第 9 次实验),对失败原因加以分析,两例都为肥胖患者,术中由于皮下脂肪层较厚,术中发现对淋巴管及淋巴结的显像不理想,部分切断的淋巴管内 ICG 示踪剂外渗,导致伪影的产生,且于切口下未发现蓝染的淋巴管,从而导致 SLNB 失败。高体重指数是影响 SLNB 的重要因素,肥胖患者通常不能于皮肤直接观察到淋巴管汇集情况,使设备的导航功能不能充分的发挥。对于这类患者,联合法是提高 SLNB 成功率的有效途径。

SLNB 的假阴性率是评估治疗准确性的一个重要标准。如果遗漏转移淋巴结,就会导致人为降低分期造成后续辅助治疗不足,从而增加复发风险。本研究假阴性率为 0%,将误诊率降到了最低,一是取决于病理学检测手段的进步,另一方面也暗示了 ICG 在应用于乳腺癌 SLNB 中的高准确性。对于 ICG 的最佳使用部位和注射剂量,考虑液体的表面张力,我们选择皮内注射示踪剂,可以获得快捷,清晰的图像显示。文献报道的 ICG 剂量范围跨度较宽^[26],Micog^[27]等认为浓度介于 0.4~0.8 mg 之间时设备观察到的荧光最强。我们注射剂量是 0.5 mg,显影效果满意。现有的荧光手术导航设备在 SLNB 过程中须关闭无影手术灯,以减轻无影手术灯会对 ICG 荧光产生的干扰。SNS 上具有多光谱照明模块,可以提供可见光及近红外激发光源,实现了荧光和彩色同时显示配合手术操作,辅助医生快速、精确定位 SLN。

4 结论

ICG 联合亚甲蓝实施 SLNB 手术检出率高、创伤小、无辐射,较易开展,评估 ALN 状态结果准确,是乳腺癌 SLNB 的新方法。基于联合法的 SNS 在使用过程中效果稳定,操作简便,成像清晰,能够实时的进行手术操作的导航,简化了手术操作程序,是可普遍应用于乳腺微创外科的新设备,符合了乳腺外

科发展的新方向,值得进一步推广应用。

参 考 文 献(References)

- [1] Dominguez FJ, Golshan M, Black DM, et al. Sentinel node biopsy is important in mastectomy for ductal carcinoma in situ [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15 (1): 268-273
- [2] Fisher B, Jeong JH, Anderson S, et al. Twenty-five-years follow-up a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347: 567-575
- [3] Miltenburg DM, Miller C, Karamlou TB, et al. Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy in breast cancer [J]. *J Surg Res*, 1999, 84 (2): 138-142
- [4] Wong SL, Edwards MJ, Chao C, et al. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: impact of the number of sentinel nodes removed on the false-negative rate[J]. *J Am Coll Surg*, 2001, 192(6): 684-689
- [5] Giuliano AE, Hunt KK, Baliman KV, et al. Axillary dissection vs no axillary a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2011, 305(4): 569-575
- [6] Straver ME, Meijnen P, Van Tienhoven G, et al. Role of axillary clearance after a tumor positive sentinel node in the administration of adjuvant therapy in early breast cancer [J]. *Clin Oncol*, 2010, 28(5): 731-737
- [7] Veronesi U, Viale G, Paganelli G, et al. Sentinel node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study [J]. *Ann Surg*, 2010, 251(4): 595-600
- [8] Purushotham AD, Upponi 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
- [9] Fleissig A, Fallowfield LJ, Langridge CI, et al. Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomized trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 95(3): 279-293
- [10] Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(6): 546-553
- [11] Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomized phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(10): 927-933
- [12] Helyer LK, Coburn NG, Law CH, et al. Axillary staging is more accurate today than ever before: no increase in the false negative rate with wide-spread adoption of sentinel node technique [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 106(Suppl 1): s127-s128
- [13] Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(8): 1319-1329
- [14] 张保宁, 白月奎, 陈国际, 等. 乳腺癌前哨淋巴结活检的临床意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2000, 22(5): 395-397
- Zhang Bao-ning, Bai Yue-kui, Chen Guo-ji, et al. Clinical significance of sentinel lymph node biopsy in breast cancer[J]. *Chin J Oncol*, 2000, 22(5): 395-397
- [15] Varghese P, Mostafa A, Abdel-Rahman AT, et al. Methylene blue dye versus combined dye-radioactive tracer technique for sentinel lymph node localization in early breast cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2007, 33(2):147-152
- [16] 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]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2010, 4(3): 313-321
- Fan Lin-jun, Zhong Ling, Guo De-yu, et al. Effect and safety of carbon nanoparticles dyeing in axillary lymph node dissection of breast cancer [J]. *Chin J Breast Dis (Electronic Edition)*, 2010, 4(3): 313-321
- [17] 瞿欢, 张亚男, 陈卫东. 纳米碳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): 489-492
- Qu Huan, Zhang Ya-nan, Chen Wei-dong. Experimental study on sentinel lymph node biopsy of breast cancer by carbon nanoparticles suspension injection[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2010, 19 (5): 489-492
- [18] Mariani G, Morsco L, Viale G, et al. Radio guided sentinel lymph node biopsy in breast cancer surgery [J]. *J Nucl Med*, 2001, 42(8): 1198-1215
- [19] East JM, Valentine CS, Kanchev E, et al. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer using methylene blue dye manifests a short learning curve among experienced surgeons: a prospective tabular cumulative sum (CUSUM) analysis[J]. *BMC Surg*, 2009, 27(9): 2
- [20] 秦叔逞, 马军. 乳腺癌前哨淋巴结活检临床应用现状的考虑[A]. 北京人民卫生出版社, 2011: 132-134
- Qin Shu-chen, Ma Jun. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer-review of current clinical status [A]. Beijing People's Medical Publishing House, 2011: 132-134
- [21] Hojo T, Nagao T, Kikuyama M, et al. Evaluation of sentinel node biopsy by combined fluorescent and dye method and lymph flow for breast cancer[J]. *Breast*, 2010, 19(3): 210-213
- [22] Hirche C, Murawa D, Mohr Z, et al. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 121(2): 373-378
- [23] Cox CE, Pendas S, Cox JM, et al. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer [J]. *Ann Surg*, 1998, 227(5): 645-653
- [24] Snider H, Dowlatshahi K, Fan M, et al. Sentinel node biopsy in the staging of breast cancer[J]. *Am J Surg*, 1998, 176(4): 305-310
- [25] Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, et al. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(6): 2345-2350
- [26] Sevic-Muraca EM, Sharma R, Rasmussen JC, et al. Imaging of lymph flow in breast cancer patients after microdose administration of a near-infrared fluorophore: feasibility study[J]. *Radiology*, 2008, 246 (3):734-741
- [27] Mieog JS, Troyan SL, Hutteman M, et al. Towards optimization of imaging system and lymphatic tracer for near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping in breast cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(9): 2483-2491