

文章编号:1005-6947(2010)05-0489-04

· 乳腺肿瘤专题研究 ·

纳米炭在乳腺癌前哨淋巴结示踪的实验研究

瞿欢, 张亚男, 陈卫东

(东南大学附属中大医院 普外二科, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 比较和评价纳米炭混悬注射液(卡纳琳)及亚甲蓝注射液进行乳癌淋巴结示踪的作用差别,为临床乳腺癌患者的治疗提供相关手段。**方法** 取40只雌性成年大耳兔,将VX2细胞株制成的瘤组织块悬液注射于兔乳腺下方制成乳腺癌模型,并将成癌模型分成卡纳琳组及亚甲蓝组,分别行淋巴结活检。记录第一枚淋巴结成功染色枚数、染色所需时间、褪色所需时间、染色淋巴结总枚数,并观察染色效果。**结果** 两组第1枚淋巴结染色成功率相同,所需时间无统计学差异;卡纳琳组淋巴结染色总枚数明显多于亚甲蓝组,差异有统计学意义($P < 0.05$);卡纳琳组褪色时间明显慢于亚甲蓝组,且染色效果优于亚甲蓝。**结论** 用VX2细胞株制成的瘤组织块悬液注射于兔乳腺下方可成功制成理想的兔转移性乳腺癌模型。纳米炭混悬液行淋巴结示踪染色效果优于亚甲蓝,为更理想的乳腺癌手术淋巴示踪剂。

[中国普通外科杂志,2010,19(05):489-492]

关键词: 乳腺肿瘤; 纳米炭; 前哨淋巴结; 疾病模型; 动物

中图分类号: R 737.9

文献标识码: A

ExpExperimental study on sentinel lymph node biopsy of breast cancer by carbon nanoparticles suspension injection

QU Huan, ZHANG Yanan, CHEN Weidong

(Department of General Surgery, Affiliated Zhongda Hospital, South East University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** To compare the efficacy of carbon nanoparticles suspension and methylene blue for the detection of axillary sentinel lymph nodes in rabbits with breast cancer, to provide a method for the clinical application of treatment of breast cancer. **Methods** The model of breast cancer was established in 40 rabbits by intramammary injection of VX2 tumor tissue suspension 1 ml. The successful model was divided into two groups. Carbon nanoparticles suspension and methylene blue were used in staining sentinel lymph node. The staining time, stain fading time of SLN, number of stained SLN, total number of the stained lymph node and the staining effect were observed. **Results** The staining time of SLN and number of stained SLN had no significant difference between the 2 groups, total number of the stained lymph nodes was 3.25 ± 0.56 and 2.3 ± 0.21 respectively in carbon nanoparticles suspension group and methylene blue group ($t = 6.99, P < 0.05$), while the stain fading time was more than 180 min in carbon nanoparticles suspension group and 105.75 min (average) in methylene blue group. The staining effect in carbon nanoparticles suspension group was much better than that in the methylene blue group. **Conclusions** This study confirms that the rabbit metastatic model of breast cancer set up by intramammary injection of VX2 tumor tissue suspension is an ideal model. Carbon nanoparticles suspension is superior to methylene blue for sentinel lymph node staining, and is a more ideal lymphatic tracer for breast cancer cancer surgery.

[Chinese Journal of General Surgery, 2010, 19(05): 489-492]

基金项目:江苏省科技厅社会发展资助项目(BS2006046)。

收稿日期:2010-01-07; 修订日期:2010-03-14。

作者简介:瞿欢,东南大学附属中大医院硕士研究生,主要从事乳腺外科方面的研究。

通讯作者:张亚男 E-mail:zhangyanan79@126.com

Key words: Breast Neoplasms; Carbon Nanoparticles; Sentinel Lymph Node; Disease Model, Animal

CLC number: R 737.9

Document code: A

2010年2月1日,中国人口协会在京发布了《中国乳腺疾病调查报告》,报告显示:我国城市地区乳腺癌的病死率增长了38.91%,乳腺癌已成为对妇女健康威胁最大的疾病,发病率位居大城市女性肿瘤的第一位。手术治疗在乳腺癌综合治疗中仍有着不可替代的地位。术中均强调腋窝淋巴结的清扫(ALND),乳腺癌腋窝淋巴结的状态是重要的预后因素之一,有利于判断预后和术后辅助治疗的选择,但其诸多并发症如上肢淋巴水肿、功能障碍、皮下积液和切口愈合不良等,严重影响患者的生存质量,一直是临床乳腺外科治疗的一大难题^[1]。经过一系列研究,ASCO, NCCN, St. Gallen 等有关乳腺癌 SLNB 的指南或专家共识指出前哨淋巴结活检(SLNB)目前已成为临床腋窝淋巴结阴性患者腋窝处理的金标准^[1]。英国 ALMANAC 试验^[2]、意大利米兰 SNB185 试验^[3] 和美国 NSABPB232 试验^[4] 等大样本的前瞻性随机试验结果均证实 SLNB 可提供准确的腋窝淋巴结分期,SLNB 组与 ALNB 组有相同的腋窝淋巴结阳性率(循证医学 I 级证据)。本实验使用 VX2 细胞株制成瘤组织块悬液,建立乳腺癌淋巴转移动物模型,并使用目前临床上逐渐广泛用于手术淋巴示踪的纳米炭混悬注射液(卡纳琳)及国内临床上乳腺癌手术淋巴示踪常用的亚甲蓝注射液(methylene blue, MB),模仿临床上乳腺癌腋窝淋巴结示踪,比较两种染料在动物体内前哨淋巴示踪的效果,为临床乳腺癌术中前哨淋巴示踪染料的选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验方法

1.1.1 VX2 瘤组织块悬液的制备 VX2 细胞株(东南大学附属中大医院放射科腾高军主任惠赠)制成瘤组织块悬液 1 mL。将其注射于兔后腿外侧肌肉内,2 周左右即形成实质性肿块(直径约 5 cm)。在严格无菌条件下切取实体瘤边缘生长旺盛的鱼肉样组织,约 5 mm × 5 mm × 5 mm,生理盐水冲洗后,放置于盛有 20 mL RPMI1640 培养液的无菌弯盘中,用眼科剪剪成直径 0.5 ~ 1.0 mm 的组织块,混匀后抽入至 1 mL 注射器内,

即制成 VX2 瘤组织块悬液。

1.1.2 兔乳腺癌模型制作 取日本大耳兔 40 只,体质量 1.8 ~ 2.3 kg(购于东南大学动物实验中心)。兔清醒状态下仰卧,取组织块悬液 1 mL 注射于兔胸壁右侧第 2 乳头的乳垫下(图 1)。1 周后每日触诊检查肿瘤生长情况并观察有无腋窝淋巴结转移及其生长情况。

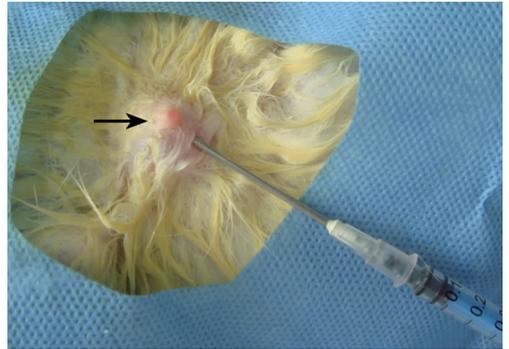


图 1 乳垫下方注射肿瘤组织块悬液

1.1.3 淋巴结的染色及观察指标 将成功制成的腋窝淋巴结转移乳腺癌兔 36 只随机分成亚甲蓝组 20 只和卡纳琳组 16 只。以 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)经兔耳缘静脉注射麻醉动物,取仰卧位并予固定。在右侧第 2 对乳腺及腋窝连线处取倒“L”形切口,长约 12 cm,切开皮肤,在筋膜前钝性分离,暴露第 2 对乳腺引流的腋窝肿大淋巴结以利于观察。在乳垫下方分别注射卡纳琳 0.3 mL 及亚甲蓝 0.5 mL。观察腋窝第 1 枚淋巴结染色的时间、第 1 枚淋巴结染色的个数、腋窝染色淋巴结总枚数和第 1 枚淋巴结褪色的时间。

1.2 统计学处理

采用成组设计资料 *t* 检验,所有检验的显著性水平(α)为 0.05,双侧。使用 SPSS10.0 统计分析软件进行统计分析。

2 结果

2.1 兔乳腺癌肿瘤模型制作成功率及腋窝淋巴结转移率

40 只实验兔注射瘤组织块悬液后 1 周,均在注射部位形成可触及的实体瘤,乳腺癌动物模型的成功率为 100%。中途意外死亡 3 只,剩余

37只中36只可触及腋窝肿大淋巴结,平均每只可触及3~4枚,直径约0.3~0.8 cm,淋巴结转移率97.3%(36/37)。

2.2 不同染料到达前哨淋巴结(SLN)染色时间

第2对乳腺至第一枚淋巴结的淋巴管长度约7~8 cm,向乳垫下方注射染料随即可见染料从一条或多条淋巴管向腋窝部位流动,最后汇聚于第一枚淋巴结,平均时间亚甲蓝组为11.23 s,卡纳琳组为11.32 s;两组差异无统计学意义($t = 1.422, P > 0.05$)。

2.3 不同染料腋淋巴结染色的枚数

36只动物,每侧肉眼可辨认直径在0.3 cm以上的腋淋巴结3~4枚;注射染料后,36只兔第一枚肿大淋巴结均被染色。亚甲蓝组20只,腋淋巴

结总数46枚,纳米炭组16只,腋淋巴结总数52枚,两组差异有统计学意义($t = 6.99, P < 0.05$)。

2.4 不同染料SLN褪色时间

注射染料后,每10 min观察染色的淋巴结,共180 min。结果亚甲蓝组平均褪色时间为105.75 min;卡纳琳组180 min后仍未见明显褪色。

2.5 淋巴结显影效果及转移瘤病理检查

比较两组淋巴结染色效果,卡纳琳组可见1条清晰的淋巴管引流至淋巴结,周围组织及血管未见染色;而亚甲蓝组淋巴管周围可见外渗的染料,且周围血管可见蓝染(图2-3)。

切取肿瘤及肿大淋巴结,行HE染色,病理检查证实其内均可见肿瘤细胞(图4)。

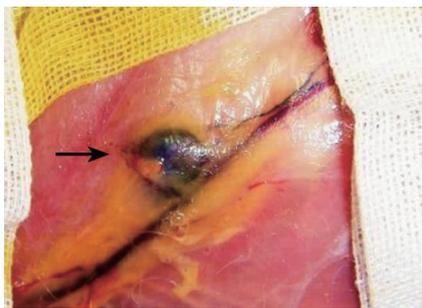


图2 卡纳琳组淋巴结显影(大体观)

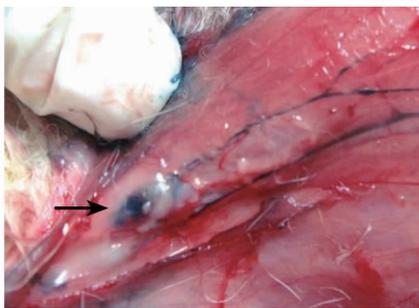


图3 亚甲蓝组淋巴结显影(大体观)

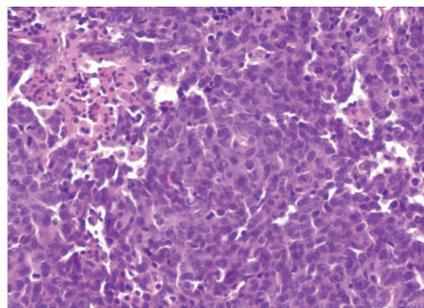


图4 淋巴结可见肿瘤细胞(HE×100)

3 讨论

VX2肿瘤最初源于1930年代Shope病毒诱发的乳头状瘤,是一种鳞状上皮源性肿瘤。其具有快速生长、稳定的生物学特性,较强的淋巴转移倾向性,被广泛应用于转移性肿瘤模型的制作^[5]。使用组织块悬液注射法制作兔乳腺癌模型操作简单,成瘤率高,为理想的乳腺癌模型制作方法^[6]。

临床上70%乳腺癌患者分期为I/II期,均需行腋窝淋巴结分期。2009年美国国家综合癌症网(NCCN)乳腺癌临床实践指南指出,前哨淋巴结活检(SLNB)是腋窝淋巴结分期的首选方法^[7]。自Giuliano等^[8]采用异硫蓝行乳腺癌SLNB以来,各国医生都在尝试不同的染色方法以达到最佳的SLNB效果。目前主要有染料法、放射性核素探测法及两者相结合的方法,放射性核素探测法对仪器设备要求高,术前准备复杂,费用高;如果原发肿瘤接近腋窝,探测时干扰大,对SLN

的准确定位有一定影响。染料法中常用的有异硫蓝(Isosulfan blue, IB)、专利蓝(patent bltie, PB)和亚甲蓝,前2种活性染料与蛋白的结合力弱,注射于皮下或乳腺组织之后会很快进入淋巴管,很少扩散到周围组织中,但维持淋巴结蓝染状态时间短,价格贵,国内较难购得,限制了其在SLNB中的应用^[9]。而亚甲蓝价格低廉,不需要特殊设备,操作简便、直观,无放射污染,易于推广。近年来,亚甲蓝作为淋巴示踪剂已广泛应用于SLNB中。

一般认为,一种好的淋巴示踪剂应具备如下条件:(1)淋巴组织吸收快,能清楚地显示淋巴管和淋巴结;(2)不进入毛细血管,避免大量组织被染色;(3)在SLN中聚集并停留较长的时间;(4)成本低,无不良反应。以MB为主的染料法在实际应用中还存在一定的不足之处:(1)由于注射液中亚甲蓝以溶解状态存在,故注射后即可进入毛细淋巴管又可进入毛细血管;若注射剂量较多或深度较浅则易造成淋巴管、组织间隙及血管等

被广泛染色,不能有效的勾勒出病灶的范围,不利于捕捉病灶并准确活检;(2)溶液迁移速度较快,MB易向下一级淋巴结蔓延,导致SLNB定位不准确^[10]。

Madokoro等^[11]发现,临床上以炭染料指导的食管癌根治术淋巴清除更彻底,预后更好,并发症更少。Kitamura等^[12]采用类似方法对直肠癌、胃癌及胰腺肿瘤手术也有相同的结论,目前纳米炭混悬注射液行淋巴结染色已广泛应用于胃癌等肿瘤的淋巴结示踪^[13]。纳米炭混悬液具有高度的淋巴系统趋向性^[14]。当其注射至局部组织时,可被巨噬细胞吞噬。由于毛细血管内皮细胞间隙为30~50 nm,纳米活性炭团粒粒径平均为150 nm,且毛细血管基底膜发育较完全,其基本不进入血管。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,故纳米炭混悬液可迅速进入淋巴管;加以组织间液和淋巴液的压力差,淋巴液呈向心流向,及巨噬细胞对ACNP颗粒的吞噬作用等^[15],使其迅速滞留集聚于淋巴结,使淋巴结染成黑色。实现了肿瘤区域引流淋巴结的活体染色,达到示踪淋巴的目的^[16]。

本实验采用VX2瘤组织块悬液制作乳腺癌动物模型,成功率为100%,腋窝淋巴结转移率为97.3%,两组实验兔的第一枚淋巴结均染色,差异无统计学意义,但卡纳琳组淋巴结3 h后仍维持染色,而MB则在平均105 min时已完全褪色。

结合临床,在行乳腺癌SLNB时,追寻染色的淋巴管及前哨淋巴结,MB会扩散到周围组织,且将血管蓝染,影响前哨淋巴结的寻找,而纳米炭仅将淋巴管黑染,便于寻找。若术中快速冷冻病理学检查提示SLN为阳性,则需行腋窝淋巴结清扫。纳米炭较亚甲蓝可将更多的腋窝淋巴结显影,且染色时间较长,有助于增加淋巴结清扫率。

综上所述,纳米炭混悬液在乳腺癌淋巴示踪中体现了更大的优越性;且目前淋巴靶向化疗正逐渐用于临床,纳米炭可作为一种很好的化疗药物载体应用于临床。

参考文献:

[1] 瞿欢,张亚男. 纳米炭在乳腺癌治疗中的应用[J]. 中国普通外科杂志,2009,18(5):495-497.
[2] Fleissig A, Fallowfield LJ, Langridge CI, *et al.* Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALM-

NAC randomised 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.

- [3] 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.
[4] Julian TB, Krag D, Brown A, *et al.* Preliminary technical results of NSABP B-32, a randomized phase III clinical trial to compare sentinel node resection to conventional axillary dissection in clinically node-negative breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res& Treat*, 2004, 88 (Suppl 1): s11-s12.
[5] Wu H, Xu X, Ying H, *et al.* Preliminary study of indirect CT lymphography-guided sentinel lymph node biopsy in a tongue VX2 carcinoma model [J]. *Intern J Oral Maxillofacial Surg*, 2009, 38(12): 1268-1272.
[6] 姚青,陈江浩,凌瑞,等. 组织块悬液注射法制作兔VX2乳腺癌模型[J]. 中国癌症杂志,2004,14(1): 22-24.
[7] NCCN 乳腺癌临床实践指南(中国版)[M]. 第1版. 沈镇宙等译. 北京,2009:29.
[8] Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, *et al.* Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer [J]. *Ann Surg*, 1994, 220(3): 391-398.
[9] 刘奇,左文述,王永胜,等. 乳腺癌哨位淋巴结临床意义的研究[J]. 肿瘤防治杂志,2000,7(3): 217-253.
[10] 杨瑞,王淑君,张颖. 亚甲蓝作为淋巴示踪剂的研究与展望[J]. 中国药剂学杂志,2009,7(2): 65-70.
[11] Madokoro S, Kumashiro R. Evaluation of the lymphatic dissection at the operation of carcinoma of the thoracic esophagus applying the carbon particle (CH 40) for blackstaining of the lymph nodes as a guide [J]. *Igaku Kenkyu (Japanese)*, 1993(1), 63: 5-14.
[12] Kitamura K, Yamane T, Oyama T, *et al.* Rapid and accurate method for delineating cancer lesions in laparoscopic colectomy using activated carbon injection [J]. *J Surg Oncol*, 1995, 58(1): 31-33.
[13] Hagiwara A, Torii T, Sawai K, *et al.* Local injection of anti-cancer drugs bound to carbon particles for early gastric cancer-a pilot study [J]. *Hepatogastroenterology*, 2000, 47(32): 575-578.
[14] 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 [J]. *Can J Surg*, 2000, 43(3): 191-196.
[15] Bianco A, Kostarelou K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, 9(6): 674-679.
[16] 张波,陈佳平,胡建昆. 纳米炭混悬注射液检测胃癌前哨淋巴结的临床研究[J]. 华西医学,2006,21(3): 514-515.