

# 乳腺癌保留乳房手术和前哨淋巴结检测专题

## · 专家论坛 ·

### 乳腺癌前哨淋巴结活检术中分子诊断的研究进展

王永胜 李太玉

乳腺癌前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)能准确反映腋窝淋巴结的状况。前哨淋巴结活检术(sentinel lymph node biopsy, SLNB)已成为临床腋窝淋巴结阴性早期乳腺癌患者的标准腋窝处理模式<sup>[1]</sup>。准确、快速、客观的SLN术中诊断可以使SLN阳性患者通过一次手术完成腋窝淋巴结清除,避免二次手术带来的风险及并发症,为患者和术者节约了时间,降低了手术风险,并减少了二次手术带来的费用负担。近年来,术中分子诊断已成为乳腺癌SLN研究的热点之一。

#### 1 传统的SLN术中诊断

目前,术中快速冰冻切片(frozen section, FS)及印片细胞学(touch imprint cytology, TIC)单独或联合检查已被广泛应用于SLN术中诊断,但二者存在明显的不足,主要是对SLN微转移灶检测的灵敏度欠佳。Brogi等<sup>[2]</sup>报道FS、TIC总的灵敏度分别为59.0%和57.0%,其中对SLN大体转移灶检测的灵敏度分别为96.0%和93.0%,而对SLN微转移诊断的灵敏度均仅为27.0%。Menes等<sup>[3]</sup>报道了FS和TIC对大体转移的灵敏度分别为83.0%和78.0%,对微转移的灵敏度分别为78.0%和57.0%。

FS和TIC这两种方法各有优缺点,就灵敏度、特异度、准确率等方面来说没有很大的差异,而且两种方法均对较大的转移灶更敏感,假阴性与微转移和小叶癌相关。杨耿侠等<sup>[4]</sup>对150例患者的400例SLN进行术中FS、TIC及其联合检测,TIC和FS术中诊断的灵敏度分别为71.9%和83.1%( $P > 0.050$ );两者联合诊断的灵敏度为96.6%,显著高于FS和TIC单独诊断的灵敏度(均 $P < 0.001$ )。其他研究结果亦显示TIC联合FS检测灵敏度较两者单独应用为高,有更低的假阴性率<sup>[5]</sup>。

联合应用FS及TIC进行SLN术中诊断可以提高SLN术中诊断的灵敏度和特异度,能够在一定程度上满足临床需求,避免二次手术;但其均存在灵敏度较低、主观性强、非标准化、检测组织量少(远小于5%)等缺点,需要寻求更为准确的术中快速分子诊断技术。鉴于SLN的术中分子检测尚未在中国

作者单位:250117 济南,山东省肿瘤医院乳腺病中心

通信作者:王永胜,E-mail: wangysh2008@yahoo.com.cn

获准临床应用,在目前的临床实践中应推荐术中应用 FS 与 TIC 联合的方法检测 SLN 的转移。

## 2 SLN 术中分子诊断

近年来,灵敏度、准确率更高且更客观的分子诊断在 SLN 诊断中显现出巨大的优势,通过检测在乳腺组织和癌组织中高表达而在正常淋巴结中不表达的基因蛋白,可以快速、准确、客观地检测 SLN 转移。

### 2.1 SLN 分子诊断标志物

随着乳腺癌 SLNB 技术的广泛应用,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)用于检测淋巴结转移灶的研究日益受到重视。Mitas 等<sup>[6]</sup>研究显示乳腺球蛋白、乳腺组织特异度基因 PIP、细胞角蛋白 19(CK19)、乳腺球蛋白 B、黏蛋白 mucl 及癌胚抗原(CEA)可以用于检测乳腺癌 SLN 中的癌转移。Manzdtti 等<sup>[7]</sup>利用 CK19、maspin、乳腺球蛋白、CEA 及 mucl 检测乳腺癌 SLN 转移,发现乳腺球蛋白的灵敏度最高(77.8%),mucl 的特异度最高(100%)。Gimbergues 等<sup>[8]</sup>检测乳腺癌患者 SLN 中乳腺球蛋白、CEA、CK19 的表达情况后,发现乳腺球蛋白的灵敏度、特异度均为 100%,可作为诊断 SLN 转移最准确的标志物。Nissan 等<sup>[9]</sup>研究了 CK19、乳腺癌分化肿瘤抗原 NY-BR-1 和乳腺球蛋白 B 基因用于 SLN 检测,指出虽然 NY-BR-1 灵敏度高于乳腺球蛋白 B,但其在不同患者之间表达存在不一致性;联合 CK19 和乳腺球蛋白 B 可用于检测乳腺癌 SLN 转移状况。该研究同时用 DNA 印记的方法证实了上述 RT-PCR 结果。

目前,普遍认为乳腺球蛋白及 CK19 是检测 SLN 转移比较理想的分子标志物。各乳腺癌研究中心主要应用 GeneSearch<sup>TM</sup> breast lymph node assay (BLN 检测)和 SYSMEX GD-100 Assay(OSNA 检测)两种分子诊断技术进行乳腺癌 SLN 转移的术中检测。

### 2.2 GeneSearch<sup>TM</sup> BLN 检测

2006 年圣·安东尼奥乳腺癌研讨会上,Blume-ncranz 等<sup>[10]</sup>报告了一种基于 RT-PCR 的乳腺癌 SLN 术中快速检测技术——GeneSearch<sup>TM</sup> BLN 检测。检测目标为上皮细胞特异性 CK19 和乳腺球蛋白,检测阈值确定为  $>0.2$  mm 的转移灶。当乳腺球蛋白的循环阈值  $\leq 31.0$  和(或)CK19 的循环阈值  $\leq 30.0$  时,确定 SLN 为阳性。以石蜡组织学诊断为标准,BLN 检测总的灵敏度为 95.6%,特异度为 94.3%。Blumencranz 等<sup>[11]</sup>在一项 416 例的前瞻性试验中发现 BLN 在  $>2.0$  mm、 $>0.2$  mm 以及  $0.2 \sim 2.0$  mm 间的检出率分别为 98.0%、88.0%、57.0%。Viale 等<sup>[12]</sup>报道,在一项入组 293 例患者的试验中 BLN  $>2$  mm、 $>1$  mm 和  $>0.2$  mm 的检出率分别为 98.1%、94.7% 和

77.8%,总的准确率为90.8%,特异度为95.0%。BLN检测经过简单培训即可掌握,30~46 min内可以同时检测12个SLN,而且每个淋巴结可以检测50%的组织量,检测相对快速,并且具有客观、标准化、可重复等优点,可以对SLN转移作出“是”或者“否”的判断,对临床工作有很高的指导价值。

近2年的研究结果均证明BLN检测的灵敏度、特异度高,假阴性率低,且显著优于快速冰冻切片尤其是印片细胞学检查<sup>[13-14]</sup>。作为国际上BLN检测样本量最大的研究,中国抗癌协会乳腺癌专业委员会CBCSG-001a-GeneSearch™ BLN检测用于术中诊断乳腺癌前哨淋巴结转移的多中心、前瞻性临床研究已经完成<sup>[15]</sup>,6家临床中心共入组有效病例478例。以病例数为统计单位,以术后连续切片常规病理检查为标准,BLN检测的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值以及它们的95%可信期间(CI)分别为88%(81%~93%)、93%(90%~95%)、82%(74%~88%)和95%(92%~97%);以淋巴结数为统计单位,BLN检测的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值以及它们的95%CI分别为86%(80%~90%)、94%(93%~96%)、77%(70%~82%)和97%(96%~98%)。

### 2.3 OSNA 检测

OSNA检测应用逆转录-环状介导等温DNA扩增(RT-LAMP)原理,采用一步核酸扩增法(one-step nucleic acid amplification, OSNA)技术,检测SLN中的CK19表达。Chu等<sup>[16]</sup>认为CK19是乳腺癌组织中较合适的标志基因,因为它是几乎所有原发性乳腺癌组织中(98.2%)的骨架蛋白。OSNA检测技术具有不需mRNA纯化步骤、应用6个引物以提高特异度等优势,是SLN术中诊断的又一快速检测手段。

日本大阪国立医院首先进行了SLN术中OSNA检测研究。Tsujiimoto等<sup>[17]</sup>研究发现OSNA检测腋窝淋巴结和SLN的准确率分别为98.2%和96.4%,与淋巴结的大小无关,同时指出CK19是最好的用于OSNA检测的标志物,可以根据CK19阈值进行半定量检测:CK19 mRNA >5000拷贝数/ $\mu$ l为大体转移,250~5000拷贝数/ $\mu$ l为微转移,<250拷贝数/ $\mu$ l为无转移。Visser等<sup>[18]</sup>报道OSNA检测的灵敏性、特异度和准确率分别为94.7%、97.1%和96.8%。Schem等<sup>[19]</sup>则报道其准确率、灵敏度和特异度分别为91.8%、98.1%和90.8%,校正后的准确率、灵敏度和特异度分别为95.5%、100%和95.6%。

中国抗癌协会乳腺癌专业委员会CBCSG-001c-SYSMEX GD-100 OSNA检测用于术中诊断乳腺癌前哨淋巴结转移的多中心、前瞻性临床研究已于2010年2月开始入组患者,预计2010年7月底完成500病例入组。

### 3 结语

FS与TIC联合应用于SLN术中诊断可以提高诊断的灵敏度和特异度,能够在一定程度上满足临床需求,避免二次手术,是中国目前乳腺癌SLN临床实践中的首选。FS及TIC均存在敏感性较低、主观性、非标准化、检测组织量少(远小于5%)等缺点,需要寻求更为准确的术中快速分子诊断技术。以GeneSearch™ BLN检测和OSNA检测为代表的SLN术中分子诊断已开始应用于临床,具有显著优于FS尤其是TIC的高灵敏度、高特异度、低假阴性率,检测组织量大、相对快速、易于掌握,而且客观、标准化、重复性好,可以对SLN转移作出“是”或者“否”的判断。基于其良好的应用前景,乳腺癌SLN的术中乃至术后诊断将进入分子诊断与病理诊断联合应用的时期。

【关键词】 乳腺肿瘤;前哨淋巴结活组织检查;分子诊断技术

【中图分类号】 R737.9      【文献标识码】 A

#### 参考文献

- [1] Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology Guideline Recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 7703-7720.
- [2] Brogi E, Torres Matundan E, Tan LK, et al. The results of frozen section, touch preparation, and cytological smear are comparable for intraoperative examination of sentinel lymph nodes: A study in 133 breast cancer Patient. *Ann Surg Oncol*, 2005, 12: 173-180.
- [3] Menes TS, Tartter PI, Mizrahi H, et al. Touch preparation or frozen section for intraoperative detection of sentinel lymph node metastases from breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10: 1166-1170.
- [4] 杨耿侠, 王永胜, 陆作为, 等. 印片细胞学联合冰冻切片术中诊断前哨淋巴结的研究. *肿瘤研究与临床*, 2008, 20: 803-806.
- [5] Alsahaf M, Alshaban B, Mulsow J, et al. Intra-operative examination of the sentinel node in breast cancer. *Ir Med J*, 2008, 101: 120-122.
- [6] Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer*, 2001, 93: 162-171.
- [7] Manzotti M, Dell'Orto P, Maisonneuve P, et al. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Int J Cancer*, 2001, 95: 307 - 312.
- [8] Gimbergues P, Dauplat MM, Cayre A, et al. Correlation between molecular metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients and St Gallen risk category. *Eur J Surg Oncol*, 2007, 33: 16-22.
- [9] Nissan A, Jager D, Roystacher M, et al. Multimarker RT - PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *Br J Cancer*, 2006, 94: 681-685.
- [10] Blumencranz P, Deck K, Whitworth PW, et al. Multiplex molecular assay has improved sensitivity over histological intra-operative nodal metastases tests for breast cancer patients—results from a large multi-center trial. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 100: S1-S299.
- [11] Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K, et al. Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am J Surg*, 2007, 194: 426-432.
- [12] Viale G, Dell'Orto P, Biasi MO, et al. Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Ann Surg*, 2008, 247: 136-142.
- [13] Mansel RE, Goyal A, Douglas Jones A, et al. Detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes using intra-

operative real time GeneSearch™ BLN assay in the operating room; results of the Cardiff study. *Breast Cancer Res Treat*, 2009,115:595-600.

- [14] Veys I, Durbecq V, Majjaj S, et al. Eighteen months clinical experience with the GeneSearch breast lymph node assay. *Am J Surg*,2009,198:203-209.
- [15] Wang YS, Ouyang T, Liu YH, et al. Chinese validation study of GeneSearch breast lymph node assay for the diagnosis of sentinel lymph node of breast cancer: CBCSG-001a interim results. *Cancer Res*,2009,69:S544-S545.
- [16] Chu PG, Wiess LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002,40:403-439.
- [17] Tsujimoto M, Nakabayashi N, Yoshidome K, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*,2007,13:4807-4816.
- [18] Visser M, Jiwa M, Horstman A, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer*,2008,122:2562-2567.
- [19] Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, et al. One-step nucleic acid amplification;a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch*,2009,454:203-210.

(收稿日期:2010-03-17)

(本文编辑:周艳)

王永胜,李太玉.乳腺癌前哨淋巴结活检术中分子诊断的研究进展[J/CD].*中华乳腺病杂志:电子版*,2010,4(3):247-251.