

乳腺癌保留乳房手术和前哨淋巴结检测专题

· 综述 ·

乳腺癌前哨淋巴结微小转移的检测及其意义

郎荣刚 范宇 付丽

近年来,前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)技术研究的不断深入以及临床应用的不断普及,已经改变了一个多世纪来腋窝淋巴结清除(axillary lymph nodes dissection, ALND)作为乳腺癌外科治疗重要组成部分的历史。欧美一些学者认为,SLNB达到甚至超过了ALND在乳腺癌治疗中的重要地位。但是,部分患者的前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)中存在常规病理检查难以发现的微小转移,是导致SLNB出现假阴性的重要原因之一,从而影响乳腺癌患者的分期和治疗决策。笔者就目前乳腺癌SLN微小转移的检测方法及其临床意义综述如下。

1 乳腺癌SLN及微小转移的概念

SLN最初由Cabanas^[1]于1977年提出,从解剖学角度讲是指容纳某器官或某区域组织淋巴液的第一站淋巴结,从临床角度讲是某器官的某一部位原发肿瘤转移的第一站区域淋巴结。具体到乳腺癌,即为乳腺癌细胞转移的第一站淋巴结,SLN如无转移,理论上其他非SLN亦应无转移。英国ALMANAC试验^[2]、意大利米兰SNB185试验^[3]和美国NSABP B-32试验^[4]等许多大型前瞻性临床研究显示SLNB可用于代替ALND,能够准确预测腋窝淋巴结状态。SLNB既能避免ALND并发症,又能对乳腺癌进行准确的分期,具有操作简单、安全、准确性高、创伤小等优点,已显示出良好的应用前景。

SLNB的准确性除了有赖于临床操作技术外,准确的病理诊断是非常重要的环节。如果要以SLNB指导是否施行ALND,对肿瘤转移检测的准确性就提出了更高的要求,因为漏检出现的假阴性结果可能导致治疗方案选择错误。在实际工作中常规HE染色病理检查阴性者并不完全表明腋淋巴结无转移。文献报道,约有9%~30%的乳腺癌患者腋窝淋巴结存在常规病理检查无法检测到的微小转移灶^[5-7]。根据国际抗癌联盟(UICC)的乳腺癌分期,所谓微小转移是指常规单水平HE染色组织切片难以发现的转移灶,包括最大径 $>0.2\text{ mm}$ 且 $\leq 2\text{ mm}$ 的微转移灶和通过免疫组织化学或分子生物学方法

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30930038);教育部长江学者乳腺癌创新团队支持计划项目(IRT0743)

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院乳腺病理研究室 教育部乳腺癌防治重点实验室 天津市肿瘤防治重点实验室

通信作者:付丽, E-mail: fulijyb@hotmail.com

检测到的孤立肿瘤细胞或最大直径不超过 0.2 mm 的小细胞簇 (isolated tumor cells, ITC) 转移^[8]。

2 乳腺癌 SLN 微小转移的检测方法

目前,对乳腺癌 SLN 微小转移的检测方法可以分为有形态学和无形态学两种。有形态学方法包括组织连续切片法、多层切片法、免疫组织化学法等。无形态学方法有逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、流式细胞学技术等。各种方法对于 SLN 微小转移的检出率不同,各种方法也常常联合应用以提高 SLN 微小转移的检出率,目前常用的方法主要有以下几种。

2.1 多层切片

常规 1~2 张 HE 切片难以发现微小转移灶,增加切片数量将提高发现转移灶的概率。本院早期对 50 例患者的 1002 个经常规病理检查阴性的淋巴结进行连续切片,平均每个淋巴结切片 88 张,结果发现 10 例(20%)患者淋巴结内存在微小转移灶,连续切片可使微小转移灶的检出率比常规方法大大提高^[7]。Viale 等^[9]发现当切片间隔从 50 μm 增加到 290 μm 时,有 18% 的微小转移被漏检,但是连续切片检查耗时费力,实际工作中并不可行,最常用的方法为间隔多层切片。王永胜等^[10]对 245 例患者初始诊断为阴性的 SLN 做多层切片,发现 14.7% 的淋巴结转移,多层切片 HE 染色显著提高 SLN 转移的检出率,而且研究结果显示多层切片检测 SLN 微转移的最佳间距为 300 μm ,此间距检出效率最高。Krogerus 等^[11]采用二等分连续切片法和多等分切片法对 SLN 进行术中检查,结果发现:前者阳性检出率为 27%,后者为 40%,多等分切片法的检出效率更高。

2.2 免疫组织化学染色

正常的淋巴结中通常没有上皮细胞,上皮标记物免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色有助于提高 SLN 中微小转移的可识别性,提高检测的准确性和阅片效率,使 SLN 中微小转移的检出率大大提高。实际应用中多采用细胞角蛋白(cytokeratin, CK) AE1/AE3、CK19、mucl (mucin 1)等抗体对 SLN 行 IHC 染色。NSABP B-32 试验对 IHC 在检测隐匿性转移中的诊断价值进行了研究,经 CK-IHC 染色后,最大径 >0.1 mm 的微转移均可被光镜检出^[12]。Turner 等^[6]报道,常规病理检查阴性的腋窝淋巴结,采用连续切片和 IHC 检查可以发现约 20% 的淋巴结有微小转移灶。利用 IHC 染色检查可使 SLN 微小转移的诊断率大大提高,较连续切片 HE 染色检查提高 14%,误诊率下降 6%~21%^[13]。作者认为将 SLN 作连续切片后,联合应用 HE 染色和 IHC 染色进行观察是最佳检测手段。快速 IHC 染色为术中检测淋巴结内的隐匿性转移提供了可能^[14]。Salem 等^[15]报道了一种对

细胞印片进行快速 IHC 染色的方法,可以在 30 min 内出结果,既可以满足术中快速诊断的需要,又可以提高准确性。

IHC 染色敏感性较高,可能产生一定的假阳性,因此加强实验室 IHC 染色的质量控制、选择合适的高质量抗体以及严格设立实验对照非常重要。同时,通过 IHC 染色发现的抗角蛋白阳性细胞并非均为转移癌细胞,有研究报道其中一部分为乳腺活检造成的正常上皮细胞移位^[16]。除假阳性外,IHC 染色也存在假阴性,每批染色(甚至每张切片)严格设立阳性对照可避免假阴性的出现。因此,对 IHC 染色切片的鉴别诊断非常重要,需要有经验的病理医师仔细观察,以避免误诊。在鉴别诊断中 HE 染色切片可以提供很大帮助,因此在多层切片中常同时做 IHC 和 HE 染色,互相对比,以便对是否存在微小转移做出正确的判断。

2.3 分子生物学检测

目前常用的方法为 RT-PCR 技术。RT-PCR 是一种非常敏感的检测方法,可以发现混在 1×10^6 个正常细胞中的 1 个癌细胞,其敏感性要远高于多层切片和 IHC 染色。本院应用 CK19 RT-PCR 检测淋巴结微转移,检测敏感性为 90.0%,准确率为 93.1%^[17]。目前,有多个基因可用于 RT-PCR 检查,如 CK19、CK8、CK18、mucl、PIP (prolactin-inducible protein)、mam (mammaglobin) 等。Mitas 等^[18]报道用 RT-PCR 方法检测 6 种基因作为诊断指标判断淋巴结是否存在微小转移,其准确性分别为 mam 99.6%,PIP 93.3%,CK19 91%,mamB 87.9%,mucl 81.5%,癌胚抗原(CEA)79.4%,其中 mam 准确性最高,特异性最强。但 Branagan 等^[19]的研究却显示 20%的乳腺癌不表达 mam,因此还需进一步寻找理想的检测基因。有学者建议联合检测多个基因或应用定量 RT-PCR 方法来综合判断淋巴结是否存在微小转移^[18]。

毋庸置疑,准确的 SLN 术中诊断可以使大多数 SLN 阳性患者一次完成 ALND,避免二次手术风险,从而降低医疗费用、减少患者身心负担。近年来,SLN 的术中快速分子诊断进展迅速。2006 年美国圣·安东尼奥乳腺癌研讨会(SABCS)重点报告了基于 RT-PCR 的乳腺癌 SLN 术中快速检测技术——GeneSearch™ breast lymph node(BLN)检测^[20],检测目标为 CK19 和 mam,检测可于 30~40 min 内完成。以石蜡切片组织学检查作为金标准,BLN 检测总的敏感性为 95.6%,特异性为 94.3%,均显著优于冰冻快速病理检查,尤其是印片细胞学诊断。该项技术已于 2006 年获得美国食品和药物管理局(FDA)批准应用于临床。2007 年 SABCS 报告了 BLN 检测多中心研究的进一步结果:BLN 检测 SLN 转移的敏感性显著高于冰冻快速病理检查(91%比 82.1%, $P < 0.05$);在检测微转移方面,BLN 检测的优势更显著(68.2%比 40.9%),而 BLN 和冰冻快速病理检查的特异性并无差异^[21]。对于浸润性小叶癌、低分级癌及接受新辅助化疗等术中冰冻病理诊断困难的患者,SLN 的 BLN 检测敏感性更是优于冰冻

快速病理检查。日本神户 Sysmex 公司研制了另一项术中 SLN 快速分析方法——一步核酸扩增(one-step nucleic acid amplification, OSNA)检测,检测目标为 CK19。与基于 RT-PCR 的 BLN 检测相比,OSNA 具有不需要 mRNA 纯化步骤、用 6 个引物以提高特异性等优势,检测可在 30 min 左右完成。研究结果显示,其特异性和敏感性与 GeneSearch™ BLN 检测相当,为 SLN 的术中诊断提供了又一快速检测手段^[22]。GeneSearch™ BLN 和 OSNA 分子诊断技术是 SLN 术中冰冻快速病理诊断的可靠替代或有效补充,有助于 SLN 阳性患者一次完成 ALND,显示了广阔的临床应用前景。

分子生物学检测方法非常敏感,但由于需要高端设备、检测费用昂贵以及测定所需时间长等原因限制了其在临床中的应用。淋巴结中存在的正常微量上皮成分或取材时污染上皮类细胞均可造成假阳性结果。SLNB 前的局部按摩或 SLNB 本身都有可能导致上皮细胞移位^[23]。此外,淋巴结内的类上皮细胞与 CK19 基因序列有高度一致性的假基因干扰、外源性基因污染、RNA 非法转录、引物设计不合理等均可使检测结果出现假阳性^[24],这也是限制其临床应用的原因之一。目前,应用该技术发现微小转移的临床意义尚未明确,甚至有学者认为该技术过于敏感而无临床应用价值,因此关于该技术在淋巴结微小转移检测中的应用价值尚需进一步研究。

3 SLN 微小转移的临床意义

一般而言,如果患者 SLN 常规病理检查有转移,则应进行 ALND,但是 SLN 有微小转移对预后是否有影响尚存争议,如何处理腋窝也无定论。有研究显示 SLN 有微小转移对预后并无影响。Langer 等^[25]报道了 234 例乳腺癌 SLNB,对于 SLN 阴性或仅有微小转移的患者不施行 ALND,中位随访 42 个月,与 ALND 组相比,其复发率和远处转移率并无增加。Kahn 等^[26]的研究也显示,患者均未接受辅助治疗,淋巴结阴性、ITC 及微转移组的生存率差异同样无统计学意义。国内王永胜等^[10]的研究也显示,SLN 常规病理检查阴性的患者与行多层切片后 HE+IHC 检测阳性的患者比较,中位随访 50 个月时无瘤生存率及总生存率差异均无统计学意义。

虽然多数研究支持 SLN 仅有微小转移者可以避免 ALND,但也有研究表明 SLN 微小转移是不良预后因素,有微小转移的患者无瘤生存率降低。Kuijt 等^[27]根据常规病理检查结果,将未接受辅助性治疗的患者分为 3 组,即无转移组($n=4263$)、转移灶 ≤ 2 mm 的微小转移组($n=87$)和仅单个淋巴结转移灶 > 2 mm 的转移组($n=155$),随访 5~27 年,结果表明淋巴结存在微小转移的患者生存率明显低于淋巴结无转移组($P=0.019$)。Cox 等^[28]分析了 SLN 微转移和预后的关系,生存分析显示 SLN 阴性患者的总生存期与无瘤

生存期明显优于 SLN 微转移患者,认为 SLN 微转移是乳腺癌预后不良的指标。

目前,大多数学者认为通过多层连续切片和 HE 染色发现的微小转移具有临床意义,该部分患者的预后较差,建议进行辅助治疗^[29]。通过 IHC 染色发现的微小转移是否具有临床价值尚有争议,建议在决定治疗方案时要慎重对待 IHC 染色结果。通过 RT-PCR 方法检测到的微小转移是否有临床意义尚不清楚。虽然有些研究表明 RT-PCR 发现的微小转移患者可能预后不佳,但目前尚无大样本长期随访的研究报告。第 6 版美国癌症联合委员会(AJCC)/国际抗癌联盟(UICC)肿瘤 TNM 分期标准将肿瘤微转移($>0.2\text{ mm}$, $\leq 2\text{ mm}$)暂归为 pN_{1mi} ;将 ITC(特殊检查发现的单个肿瘤细胞或直径 $\leq 0.2\text{ mm}$ 的转移灶)暂归为 pN_0 ^[8]。2005 年美国临床肿瘤协会(ASCO)指南推荐 SLNB 用于临床早期乳腺癌的腋窝分期,在没有进一步的资料明确 SLN 微转移和 ITC 的临床意义之前,推荐对无论何种方法检出的 SLN 微转移患者施行 ALND,对 SLN 中的 ITC 按腋窝淋巴结阴性处理。基于不断增加的研究资料,2009 年 St. Gallen 早期乳腺癌治疗共识会议上,69%的专家同意对存在 SLN 微转移或 ITC 的患者行 ALND;但对于肿瘤较小、分化较好、组织学类型较好的部分患者,92%的专家认为可以避免 ALND^[30]。

4 结语

综上所述,随着检测技术的不断发展,检测 SLN 微小转移的手段越来越多,SLN 微小转移的检出率也越来越高。通过检测 SLN 微小转移可以筛查出常规病理检查阴性的高危患者,进一步了解患者的预后信息。对有 SLN 微转移的患者行进一步的 ALND 或系统辅助治疗是否属过度治疗、SLN 微转移和 ITC 对乳腺癌患者的预后价值有多大,还需要进一步的多中心前瞻性随机临床研究提供证据。

【关键词】 乳腺肿瘤;前哨淋巴结活组织检查;微小转移

【中图分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*, 1977, 39:456-466.
- [2] Fleissig A, Fallowfield LJ, Langridge CI, et al. Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 95:279-293.
- [3] Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*, 2003, 349:546-553.
- [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. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 88:S11-S12.

- [5] Al Shibli KI, Mohammed HA, Mikalsen KS. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma: analysis of 70 cases by frozen section. *Ann Saudi Med*, 2005, 25:111-114.
- [6] Turner RR, Ollila DW, Stern S, et al. Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Surg Pathol*, 1999, 23:263-267.
- [7] 傅西林, 张立华, 张国珩, 等. 常规检查淋巴结转移阴性之乳腺癌腋窝组织再连续切片检查的研究. *肿瘤临床*, 1985, 12:20-23.
- [8] Greene FL, Compton CC, Shah JP, et al. *AJCC. Cancer Staging Atlas*. New York: Springer Verlag, 2006:219-233
- [9] Viale G, Maiorano E, Mazzarol G, et al. Histologic detection and clinical implications of micrometastases in axillary sentinel lymph nodes for patients with breast carcinoma. *Cancer*, 2001, 92:1378-384.
- [10] 王永胜, 欧阳涛, 王启堂, 等. 中国 SLNB 多中心协作研究 CBCSG-001 最新资料报告. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2009, 3:8-12.
- [11] Krogerus LA, Leidenius MH, Toivonen TS, et al. Towards reasonable workload in diagnosis of sentinel lymph nodes: comparison of two frozen section methods. *Histopathology*, 2004, 44:29-34.
- [12] Weaver DL, Krag DN, Manna EA, et al. Detection of occult sentinel lymph node micrometastases by immunohistochemistry in breast cancer: an NSABP protocol B-32 quality assurance study. *Cancer*, 2006, 107:661-667.
- [13] Pfeifer JD. Sentinel lymph node biopsy. *Am J Clin Pathol*, 1999, 112:599-602.
- [14] Choi YJ, Yun HR, Yoo KE, et al. Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by ultrarapid immunohistochemistry in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 2006, 36:489-493.
- [15] Salem AA, Douglas Jones AG, Sweetland HM, et al. Intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes using touch imprint cytology and immunohistochemistry: I. Protocol of rapid immunostaining of touch imprints. *Eur J Surg Oncol*, 2003, 29:25-28.
- [16] Bleiweiss IJ, Nagi CS, Jaffer S. Axillary sentinel lymph nodes can be falsely positive due to iatrogenic displacement and transport of benign epithelial cells in patients with breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 2006, 24:2013-2018.
- [17] 顾林, 冯玉梅, 潘乐康, 等. 应用 RT-PCR 检测 CK19 表达提高乳腺癌前哨淋巴结微转移检出的研究. *中国肿瘤临床*, 2004, 31:144-148.
- [18] 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.
- [19] Branagan G, Hughes D, Jeffrey M, et al. Detection of micrometastases in lymph nodes from patients with breast cancer. *Br J Surg*, 2002, 89:86-89.
- [20] Blumencranz P, Deck KB, Whitworth PW, et al. Multiplex molecular assay has improved sensitivity over histological intraoperative node metastases test for breast cancer patients results from a large multi-center trial. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 100:S14.
- [21] Blumencranz P, Deck KB, Whitworth PW, et al. An investigational rapid RT-PCR assay for the detection of metastasis in sentinel lymph nodes shows improved performance over frozen section H&E: Analysis by primary tumor characteristics. *J Clin Oncol*, 2007, 25:10 561.
- [22] Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:2879-2884.
- [23] Diaz NM, Cox CE, Ebert M, et al. Benign mechanical transport of breast epithelial cells to sentinel lymph nodes. *Am J Surg Pathol*, 2004, 28:1641-1645.
- [24] Creager AJ, Geisinger KR. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes for breast carcinoma: current methodologies. *Adv Anat Pathol*, 2002, 9:233-243.
- [25] Langer I, Marti WR, Guller U, et al. Axillary recurrence rate in breast cancer patients with negative sentinel lymph node (SLN) or SLN micrometastases: prospective analysis of 150 patients after SLN biopsy. *Ann Surg*, 2005, 241:152-158.
- [26] Kahn HJ, Hanna WM, Chapman JA, et al. Biological significance of occult micrometastases in histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer patients using the recent American Joint Committee on Cancer breast cancer staging system. *Breast J*, 2006, 12:294-301.
- [27] Kuijt GP, Voogd AC, van de Poll Franse LV, et al. The prognostic significance of axillary lymph node micrometastases in

breast cancer patients. Eur J Surg Oncol, 2005, 31: 500-505.

- [28] Cox CE, Kiluk JV, Riker AI, et al. Significance of sentinel lymph node micrometastases in human breast cancer. J Am Coll Surg, 2008, 206: 261-268.
- [29] Weaver DL. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma: which micrometastases are clinically significant? Am J Surg Pathol, 2003, 27: 842-845.
- [30] 江泽飞, 王永胜. 2009年第11届 St. Gallen 国际早期乳腺癌治疗研讨会: 争议与共识. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2009, 3: 381-386.

(收稿日期: 2010-03-22)

(本文编辑: 罗承丽)

郎荣刚, 范宇, 付丽, 等. 乳腺癌前哨淋巴结微小转移的检测及其意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2010, 4(3): 267-273.