基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0273-04

利用超声造影示踪兔 VX2 乳腺癌前哨淋巴结的实验研究

丁 炎,夏纪筑,丁雅明,贺雪梅,白 晋

(重庆医科大学生物医学工程系、重庆医科大学生物医学工程学重点实验室、重庆市超声医学工程重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过与亚甲蓝(Methylene blue,MB)示踪法比较,探讨超声造影检测乳腺癌前哨淋巴结(Sentinel lymph node,SLN)的前景。方法:建立兔 VX2 乳腺癌模型 24 只,皮下注射 SonoVue,超声造影显像 SLN,观察其造影增强情况;再经皮下注射 MB 示踪;行腋窝淋巴结清扫术切除 SLN 并行 AE1/AE3 免疫组化染色。结果:24 只瘤兔超声造影检出回声均匀性增强的 SLN 12 个,回声不均匀性增强和部分充盈缺损的 SLN 22 个;MB 示踪法检出 SLN 32 个;术中腋窝淋巴结清扫 SLN 38 个。以手术切除为标准,超声造影的检出率(89.47%)与 MB 示踪法检出率(84.21%)比较无显著差异($P>0.05$);以免疫组化结果为标准,超声造影的敏感性(95.24%)与 MB 示踪法敏感性(91.30%)比较无显著差异($P>0.05$),但其特异性(84.62%)和准确性(91.18%)均明显高于 MB 示踪法特异性(26.67%)和准确性(65.79%)($P<0.05$)。结论:经皮下注射超声造影剂显像乳腺癌 SLN 有较高的检出率、特异性、准确性和敏感性,与 MB 示踪法比较有一定优势,有望成为检测 SLN 的常用方法。

【关键词】超声造影;乳腺癌;前哨淋巴结;亚甲蓝示踪;AE1/AE3

【中国图书分类法分类号】R445.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2009-07-06

A study of using ultrasound contrast tracer on the sentinel lymph node in rabbit VX2 breast cancer

DING Yan, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the prospects of contrast-enhanced ultrasound and methylene blue (MB) detection of breast cancer sentinel lymph node (SLN). *Methods*: Twenty-four rabbit models of VX2 breast cancer was set up with, subcutaneous injection of SonoVue, to get contrast-enhanced ultrasound imaging of SLN. The situation of contrast-enhanced SLN was observed. Then

作者介绍:丁 炎(1984-),男,硕士,研究方向:超声治疗肿瘤。

通信作者:白 晋,女,教授,Email:sajinbai@haifu.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(编号:10774198)。

位。通常认为目标蛋白与 EGFP 融合后,并不影响前者的正确折叠、运输和胞内定位[9]。通过荧光显微镜观察及 RT-PCR 结果,我们认为目标蛋白 ZFP 在细胞可以正常表达。为了能进行 Western blot 印迹反应实验,将 flag tag 加载在目的基因 5'端构成 pEGFP-N1/ZFP-flag 重组质粒,结果显示重组质粒成功进行了 ZFP 的表达。

实验通过对 pEGFP-N1/ZFP、pEGFP-N1/ZFP-flag 重组表达载体的成功构建及表达,证明了利用生物信息学手段、人工设计特异性的锌指蛋白并进行体外真核细胞表达是可行的,为进一步设计完整的 ATF,进而干预 HBV X 基因的表达奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Sung W K.Deregulated direct targets of the hepatitis B virus (HBV) protein, HBx, identified through chromatin immu-unoprecipitation and expression microarray profiling[J].Biol Chem, 2009, 284(33): 21941-21954.

[2] 邵 清,成 军,白雪帆,等.乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究[J].世界华人消化杂志,2003,11(8): 1240-1242.

[3] Dewantoro O, Gani R A, Akbar, et al.Hepatocarcinogenesis in viral Hepatitis B infection: the role of HBx and p53[J].Acta Med Indones, 2006, 38(3): 154-159.

[4] Fernandez A F. The dynamic DNA methylomes of double- stranded DNA viruses associated with human cancer[J].Genome Res, 2009, 19(3): 438-451.

[5] Kramvis A, Kew M C.The core promoter of hepatitis B virus[J].J Viral Hepat, 1999, 6(6): 415-427.

[6] Quon D V, Delgadillo M G, Khachi A, et al.Similarity between a u-biquitous promoter element in an an cient eukaryote and mam- malian initiator elements[J].Proc Nail Acad Sci USA, 1994, 91(10): 4579-4583.

[7] Miller J, Mclachlan A D, Klug A, et al. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus cocytes[J].EMBO J, 1985, 4(6): 1609-1614.

[8] Sachs A B.Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail[J].Cell, 2000, 101(3): 243-245.

[9] Kain S R, Adams M, Kondepudi A, et al.Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization[J].J Biotech-niques, 1995, 19(4): 650-655.

(责任编辑:张学颖)

subcutaneous injection of MB was performed to trace SLN.SLN was resected from axillary lymph nods,which underwent immuno-histochemistry of AE1/AE3.*Results*: Among the twenty-four rabbits,12 SLN homogeneous echo-enhanced. 22 SLN enhanced non-uniformity were found by contrast-enhanced ultrasound.By MB tracer method 32 SLN were detected.38 SLN were resected from axillary lymph nodes. To make surgical resection as the standard, the detection rate of contrast-enhanced ultrasound (89.47%) and the MB tracer detection rate (84.21%) showed no significant difference (P>0.05).To make the results of immunohistochemistry criteria as the standard,contrast- enhanced ultrasound sensitivity (95.24%) and the MB tracer method sensitivity (91.30%) showed no significant difference (P >0.05), but the specificity (84.62%) and accuracy (91.18%) were significantly higher from contrast-enhanced ultrasound sensitivity than those from tracer MB method-specificity(26.67%) and accuracy (65.79%) (P<0.05). *Conclusion*:Contrast-enhanced ultrasound imaging indetecting SLN of breast cancer gets a higher detection rate, specificity, accuracy and sensitivity compared with the MB tracer method, which is expected to become the common method in detection of SLN.

【Key words】contrast-enhanced ultrasound; breast cancer; sentinel lymph node; methylene blue tracer; AE1/AE3

乳腺癌患者前哨淋巴结(Sentinel lymph node,SLN)的检测非常重要,它影响着乳腺癌的分期、治疗及预后。目前常用检测 SLN 的方法是术中染料示踪法,但此法存在着操作上盲目性,若经验不足将导致手术创口扩大。近期有研究报道,经皮下注射超声造影剂可显像猪黑色素瘤的淋巴管及 SLN[1,2]。本实验通过超声造影显像法检测兔 VX2 乳腺癌 SLN, 并与亚甲蓝(Methylene blue,MB)示踪法比较研究,探讨超声造影检测 SLN 的实用性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

健康纯种雌性新西兰大白兔 24 只,质量 2.0 ~ 2.5 kg,月龄 3 ~ 4 个月(重庆医科大学实验动物中心提供)。超声微泡造影剂 SonoVue(Bracco 公司,意大利);1% MB(上海诺泰,中国);鼠抗兔细胞角蛋白单克隆抗体[Keratin,Pan Ab-1(AE1/AE3),北京中山,中国];即用型 SABC 试剂盒和 DAB 显色剂(福建迈新,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 采用组织块种植法: 切取 VX2 肿瘤种兔(实验室自备)生长旺盛的"鱼肉样"肿瘤组织块(1 mm × 1 mm × 1 mm),种植于兔左侧第 2 乳腺皮下组织。术后 3 d 内,每只瘤兔注射青霉素 80 万 U/d。

1.2.2 联合 SonoVue 超声显像 SLN 于种植后 14 d 对实验兔进行超声造影检查。使用 Philip IU22 彩色多普勒超声诊断仪,探头频率 7 ~ 10 MHz,机械指数 =0.2 ~ 0.7[3]。常规行肿瘤部位扫查,观察其大小、形态、内部回声结构及其与周边组织关系;SonoVue 配置前为白色冻干粉末,加入 5 ml 生理盐水配备振摇 30 s 后,形成乳状微泡悬液备用。在肿块周边 5 mm处皮下 3、6、9、12 点方向分别注射 0.25 ml SonoVue 悬液。局部按摩注射部位 3 ~ 5 min,以加速造影剂进入淋巴管,这些淋巴管是引流入 SLN 的[4]。用龙胆紫标记超声探查中第一个回声增强的淋巴结,即 SLN,观察其造影特点,统计超声造影检出 SLN 的个数。在注射 SonoVue 同时开启超声仪内置计时器,用超声工作站和内置磁光盘记录扫查全过程。

1.2.3 MB 示踪 SLN 超声造影检查后,即刻在肿块周边 5 mm 处皮下 3、6、9、12 点方向分别注射 1% MB 0.5 ml。局部按摩注射部位 5 min,以促进 MB 充分扩散。10 min 后处死实验兔,暴露左侧腋窝部位,做 8 cm 倒"L"形切口,分离并暴露淋巴引流区,沿蓝染的淋巴管追踪到蓝染的淋巴结即为 SLN,并行腋窝淋巴结清扫术,切除 SLN。分别统计超声造影和 MB 示踪法 SLN 检出数及腋窝淋巴结清扫检出 SLN 数,计算SLN 检出率。检出率 =(超声造影或 MB 示踪法 SLN 检出数/腋窝淋巴结清扫 SLN 数) × 100%。

1.2.4 SLN 的 AE1/AE3 免疫组化染色 对手术切除的 SLN 行常规固定,石蜡包埋,常规制片,HE 染色及行免疫组化染色。免疫组化采用 SABC 法,DAB 显色。一抗为鼠抗兔细胞角蛋白单克隆抗体,效价 1:100,使用即用型 SABC 试剂盒和 DAB 显色剂,严格按免疫组化试剂盒说明进行操作。判定标准:AE1/AE3 阳性部位主要在细胞浆, 有棕黄色颗粒且染色强度高于背景的非特异性着色为阳性细胞。若 SLN 内有阳性细胞则提示 SLN 有转移灶[5]。统计 SLN 阳性数。按临床诊断性试验研究的评判标准进行计算[6],方法如下:敏感性 =SLN 真阳性数/(SLN 真阳性数 +SLN 假阴性数) × 100%;特异性 = [SLN 真阴性数/(SLN 真阴性数 +SLN 假阳性数)] × 100%;准确性 =[(SLN 真阳性数 +SLN 真阴性数)/SLN 总数] × 100%。

1.3 统计学分析

采用统计分析软件 SPSS 13.0 统计分析软件。以病理免疫组化结果为诊断金标准,计算超声造影和 MB 示踪法检测 SLN 的敏感性、特异性和准确性。2 组间的检出率、敏感性、特异性和准确性比较采用确切概率法进行检验,以 P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乳腺癌模型建立情况

实验兔 100%成活,肿瘤成瘤率 100%。

2.2 超声造影显像 SLN

超声检查见肿瘤形态呈类圆形,边界清晰,内部回声分布欠均匀,可见点状强回声(图 1),部分出现不规则无回声

坏死液化区，未探查到明显淋巴结及淋巴管。注射 SonoVue 后约 1 min 后，淋巴管显示为从注射部位发出的线性强回声（图 1），跟随它发现第一个增强的淋巴结即为 SLN。随着时间延长，SLN 回声呈逐渐增强的趋势（图 2）。当淋巴管或 SLN 增强回声轮廓逐渐消退时，按摩注射部位后，重新出现淋巴管和 SLN 回声增强，但与前期比较强度减弱、范围减小。超声造影检出 SLN 34 个，其中回声均匀性增强的 12 个，回声不均匀性增强和部分充盈缺损的共有 22 个（图 3）。

2.3 超声造影与 MB 示踪法 SLN 检出率比较

MB 示踪法检出 SLN 32 个，腋窝淋巴结清扫检出 SLN 38 个。超声造影检出率 89.47%（34/38），与 MB 示踪法检出率 84.21%（32/38）比较，统计学无显著差异（$P>0.05$）。

2.4 AE1/AE3 免疫组化染色结果显示

38 个 SLN 中有 24 个 AE1/AE3 染色阳性，超声造影检出的 SLN 中 AE1/AE3 染色阳性有 21 个，MB 示踪法检出 23 个 AE1/AE3 染色阳性（图 4）。

表 1 超声造影检测 SLN 结果与 AE1/AE3 免疫组化结果比较

超声造影	AE1/AE3 免疫组化		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	2	22
阴性	1	11	12
合计	21	13	34

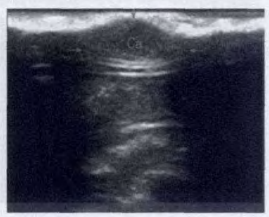
表 2 MB 示踪法检测 SLN 结果与 AE1/AE3 免疫组化结果比较

MB 示踪法	AE1/AE3 免疫组化		合计
	阳性	阴性	
阳性	21	11	32
阴性	2	4	6
合计	23	15	38

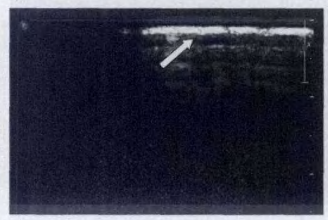
表 3 超声造影与 MB 示踪法检测 SLN 结果的对比

	超声造影检测 SLN	MB 示踪法检测 SLN	P 值
检出率	89.47%(34/38)■	84.21%(32/38)	0.497
敏感性	95.24%(20/21)■	91.30%(21/23)	0.605
特异性	84.62%(11/13)◆	26.67%(4/15)	0.002
准确性	91.18%(31/34)◆	65.79%(25/38)	0.010
Youden 指数	79.86%	17.97%	-

注：■. 与 MB 示踪法比较，$P>0.05$；◆. 与 MB 示踪法比较，$P<0.05$

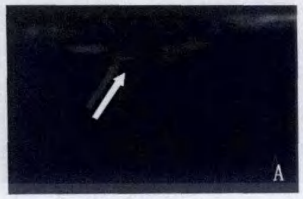


A. 超声检查见肿瘤呈类圆形，边界清晰，内部回声分布欠均匀，内部可见点状强回声声像图



B. 注射造影剂后，淋巴管显示为从注射部位（左方低回声区域为肿瘤部位）发出的线状强回声（白色箭头），跟随它很容易发现前哨淋巴结

图 1 肿瘤和淋巴管造影的声像图



A. 注射造影剂后 150 s



B. 注射造影剂后 200 s



C. 注射造影剂后 300 s

图 2 同一淋巴结，注射造影剂后，回声逐渐增强声像图

以 AE1/AE3 免疫组化染色为标准判定 SLN 转移与否，超声造影中良性 SLN 造影表现为均匀性高回声增强（超声造影阴性），转移性 SLN 造影表现为不均匀性增强和部分充盈缺损（超声造影阳性）[1,2]，见表 1；MB 示踪法中以被 MB 染色的 SLN 定义为阳性，未被 MB 染色，但手术切除的 SLN 定义为阴性，见表 2[6]。实验结果显示，超声造影的特异性 84.62%（11/13）和准确性 91.18%（31/34）均明显高于 MB 示踪法的特异性 26.67%（4/15）和准确性 65.79%（25/38）（$P<0.05$）；超声造影的敏感性 95.24%（20/21）和 MB 示踪法的敏感性 91.30%（21/23）之间无显著差异（$P>0.05$），见表 3。

3 讨 论

SLN 的概念是基于实体肿瘤的淋巴引流是可预测的，且形成淋巴结转移是有序的；某些特定淋巴结（通常有 1、2个）



箭头所指为充盈缺损

图 3　注射造影剂后，回声不均匀增强的 SLN 声像图



图 4　AE1/AE3 表达阳性的 SLN（SABC 法、DAB 显色，×200）

是接受原发灶区域淋巴引流的第一站淋巴结，在转移发生时首先被波及，此即 SLN。如果 SLN 无肿瘤转移，该区域淋巴结发生恶性肿瘤转移的可能性很小，如果 SLN 有肿瘤转移，则该区域淋巴结恶性肿瘤转移的危险性增大[7]。

目前探测 SLN 常用的方法是活性染料示踪法，如临床上广泛使用的 MB 示踪法[8]，可用于辨别引流的淋巴管和 SLN，简单实用，有较高检出率，但存在皮肤切口较盲目、易造成毗邻淋巴结染色、特异性较低造成过度清除、扩大创口且费时、假阴性率高等缺点，其原因与操作者实践经验有关。

本实验选择经皮下注射超声造影剂，由于内微淋巴丛由一层没有平滑肌的内皮组成，其内皮层细胞之间重叠疏松，从而形成一个微瓣膜的渗漏系统。通过淋巴内皮细胞间隙或出胞入胞作用，造影剂可进入毛细淋巴管，回流至 SLN，使毛细淋巴管、集合管及 SLN 在超声下显影[4]。运用实时超声动态观察淋巴道的造影情况，可探查到 SLN。由于微泡被 SLN 内的网状内皮细胞吞噬[9]，使微泡不能穿透 SLN，从而不能进入下一个淋巴结，不会造成毗邻淋巴结显影。实验结果显示，超声造影和 MB 示踪法对 SLN 的检出率和敏感性统计学无显著差异（$P>0.05$），提示超声造影可以作为定位 SLN 的一种方法。

经皮下注射超声造影剂除了可以对 SLN 定位之外，还能对 SLN 是否转移进行判断。本实验选择的 AE1/AE3 免疫组化染色检测 SLN 微转移较传统组织病理学检测有更高准确性，更具有诊断意义。角蛋白广泛存在于上皮组织细胞中，在上皮源性肿瘤中角蛋白稳定表达，而在间叶组织如淋巴结中缺乏表达[5]。本实验所用的 VX2 鳞癌保留了上皮细胞的部分特征，当 SLN 未发生转移时，AE1/AE3 染色阴性；当 SLN 发生转移时，AE1/AE3 染色阳性。本实验中超声造影的特异性、准确性、敏感性分别为 84.62%、91.18%、95.24%。超声造影检测 SLN 的特异性和准确性都明显高于 MB 示踪法（$P<0.05$），可较准确判断 SLN 转移情况，诊断价值高，从而做到术前精确定位，制定合适手术方案，避免不必要的过度清除和创口扩大。

在注射造影剂后发现有转移的 SLN（即超声造影阳性），其图像呈充盈缺损或整个 SLN 呈不均匀性增强，可能的原因是正常 SLN 被转移灶浸润和替代；淋巴管道被肿瘤组织阻塞，以致造影剂不能充分顺利进入 SLN[5]。出现的 2 个假阳性可能是由于按摩时间不够，造影剂未充分充盈 SLN；淋巴结内有其他病变，如炎性坏死等。出现的假阴性可能是因为 SLN 呈大部分高回声增强而致使将小部分充盈缺损覆盖所致。

超声显像 SLN 有以下优越性：（1）可反复检查，操作简单方便；（2）可以实时观察淋巴管走行，并跟踪找到 SLN，利于定位以便引导穿刺活检；（3）与 MB 示踪法比较，能更为准确的判断淋巴结转移与否，提供了用无创方法来确定 SLN 内转移灶的可能性。

总之，经皮下注射超声造影剂显像乳腺癌 SLN 有较高的特异性、准确性、敏感性，与 MB 示踪法比较有一定优势，可有望成为检测 SLN 的常用方法，对指导乳腺癌腋淋巴结清扫的必要性和合理性有较大的应用价值。

参 考 文 献

[1] Leopoldo Rubaltelli, Yeganeh Khadivi, Alberto Tregnaghi, et al. Evaluation of lymph node perfusion using continuous mode harmonic ultrasonography with a second-generation contrast agent[J]. J Ultrasound Med, 2004, 23(6): 829-836.

[2] Lurie D M, Seguin B, Schneider P D, et al. Contrast-Assisted ultrasound for sentinel lymph node detection in spontaneously arising canine head and neck tumors[J]. Invest Radiol, 2006, 41(4): 415-421.

[3] Goldberg B B, Merton D A, Liu J B, et al. Sentinel lymph nodes in a Swine model with melanoma: contrast-enhanced lymphatic US[J]. Radiology, 2004, 230(3): 727-734.

[4] Goldberg B B, Merton D A, Liu J B, et al. Contrast-enhanced sonographic imaging of lymphatic channels and sentinel lymph nodes[J]. J Ultrasound Med, 2005, 24(7): 953-965.

[5] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Clinical impact of micrometastasis of the lymph node in gastric cancer[J]. The American surgeon, 2003, 69(7): 573-577.

[6] 吴泰相，刘关键，李　萍，等. 循证医学与循证检验医学的概念[J]. 中华检验学杂志，2001，24(1)：50-52.

[7] Cserni G, Boross G, Baltas B. Value of axillary sentinel nodal status in breast cancer[J]. World J Surg, 2000, 24(3): 341-344.

[8] Wilson L L, Giuliano A E. Sentinel Lymph Node Mapping for Primary Breast Cancer[J]. Current Oncology Reports, 2005, 7(1): 12-17.

[9] 洪玉蓉，刘学明. 超声造影在浅表淋巴结疾病的应用[J]. 中国医学影像学杂志，2007，15(3)：212-214.

（责任编辑：关蕴良）