

荧光示踪法与染料法探测兔甲状腺前哨淋巴结有效性研究

金昌国,胡浩,魏小军,艾向南,易文,欧阳才国
(航天中心医院,北京 100049)

摘要:目的 比较荧光示踪法与染料法探测兔甲状腺前哨淋巴结的有效性,为临床开展甲状腺前哨淋巴结活检提供实验依据。**方法** 30只实验兔共计60侧甲状腺,每侧甲状腺分别注射 $600\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吲哚菁绿(ICG)和 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚甲蓝0.02 mL。切除所探测的组织进行病理检查,分别记录两种方法检测的淋巴结数量,比较两种方法的准确率和检出率。**结果** 荧光探测法和亚甲蓝染料法检出兔甲状腺前哨淋巴结的准确率分别为92.7%和70.8%,检出率分别为91.7%和75.0%,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 在探测兔甲状腺前哨淋巴结方面荧光示踪法优于亚甲蓝染料法,具有较高的检出率和准确率。

关键词:甲状腺;前哨淋巴结;吲哚菁绿;亚甲蓝;兔

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.05.031

The efficacy of fluorescence tracer method and dye method in detecting thyroid sentinel lymph nodes in rabbits

JIN Changguo, HU Hao, WEI Xiaojun, AI Xiangnan, YI Wen, OUYANG Caiguo
(Space Center Hospital, Beijing 100049, China)

Abstract: Objective To compare the efficacy of fluorescence tracer method and dye method in detecting thyroid sentinel lymph node in rabbit and to provide experimental evidences for clinical application of thyroid sentinel lymph node biopsy. **Methods** Sixty lobes of thyroid from thirty rabbits were injected with $600\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ indocyanine green and 0.02 mL of $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ methylene blue dye respectively. The detected tissues were resected for pathological examination and the amount of lymph nodes detected by two methods were separately recorded, and the accuracy and detection rate of the two methods were compared. **Results** The accuracy of fluorescence tracer method and dye method in detecting thyroid sentinel lymph node in rabbit was 92.7% vs 70.8%. The detection rates of sentinel lymph node in the two methods were 91.7% and 75.0% respectively. The difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions** In detecting the sentinel lymph node of rabbit thyroid, the fluorescence tracer has higher detection rate and accuracy when compared to dye method.

Keywords: thyroid gland; sentinel lymph node; indocyanine green; methylene blue; rabbits

参考文献

- [1] MU H, GAO J, KONG Q, et al. Prognostic factors and postoperative recurrence of calculus following small-incision sphincterotomy with papillary balloon dilation for the treatment of intractable choledocholithiasis: A 72-month follow-up study [J]. Dig Dis Sci, 2015, 60 (7): 2144-2149.
- [2] 皮勇, 尚红玲, 王宏博. 比较 EST 与开腹取石对胆总管结石患者机体炎症反应和免疫功能的影响 [J]. 安徽医药, 2015, 19 (2): 300-303.
- [3] 李仁宝, 尹志强. 经内镜逆行性胰胆管造影术对胆胰疾病的诊治效果研究 [J]. 安徽医药, 2015, 19 (3): 545-547.
- [4] LANGERTH A, SANDBLOM G, KARLSON BM. Long-term risk for acute pancreatitis, cholangitis, and malignancy more than 15 years after endoscopic sphincterotomy: a population-based study [J]. Endoscopy, 2015, 47 (12): 1132-1136.
- [5] 赖晓伟. 胆总管结石内镜治疗复发的危险因素分析 [D]. 上海: 上海第二军医大学, 2015.
- [6] 王子恺, 杨云生, 孙刚. 应重视胆总管结石 EST 术后远期并发症的防治 [J]. 中华医学杂志, 2014 (40): 3124-3126.
- [7] UCHIDA N, HAMAYA S, TATSUTA M, et al. Extracorporeal abdominal massage may help prevent recurrent bile duct stones after endoscopic sphincterotomy [J]. Endosc Int Open, 2016, 4 (8): E870-E873.
- [8] OLIVEIRA-CUNHA M, DENNISON AR, GARCEA G. Late complications after endoscopic sphincterotomy [J]. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 2016, 26 (1): 1-5.
- [9] 孟环. ERCP 取石后胆总管结石复发的相关危险因素研究 [J]. 肝胆外科杂志, 2015, 23 (3): 203-206.
- [10] ERSOZ G, TURAN I, TEKIN F, et al. Nonradiation ERCP with endoscopic biliary sphincterotomy plus papillary balloon dilation for the treatment of choledocholithiasis during pregnancy [J]. Surg Endosc, 2016, 30 (1): 222-228.
- [11] NAVANEETHAN U, KONJETI R, LOURDUSAMY V, et al. Precut sphincterotomy: efficacy for ductal access and the risk of adverse events [J]. Gastrointest Endosc, 2015, 81 (4): 924-931.

(收稿日期: 2016-09-19, 修回日期: 2016-11-04)

前哨淋巴结(SLN)活检用来判断区域淋巴结有无转移,用于淋巴结分期及治疗决策,在乳腺癌、黑色素瘤、胃癌、子宫内膜癌等恶性肿瘤中广泛采用。自从 Keleman 等证实 SLNB 有利于发现分化型甲状腺癌隐匿性转移灶,国内外开展了甲状腺癌前哨淋巴结活检相关研究^[1-4]。本实验分别采用了亚甲蓝染料法和吲哚菁绿(ICG)作为荧光剂的荧光示踪法,比较了大耳白家兔甲状腺前哨淋巴结检测中的有效性,为临床选择适宜的 SLN 检测方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 成年雄性大耳白兔 30 只(北京昌扬动物养殖场),体质量(2 500 ± 120)g,注射用吲哚菁绿(上海紫一试剂厂),亚甲蓝(江苏济川药业),实时荧光成像系统光子眼(PDE,日本滨松光子有限公司)。

1.2 实验方法 耳缘静脉注射苯巴比妥钠(1 mL · kg⁻¹)麻醉,先注射总量的 2/3,间隔 30 min,注射余下 1/3。兔取仰卧位并固定,颈正中切开显露甲状腺,结扎切断峡部。每侧甲状腺分别注射 600 μmol · L⁻¹的 ICG 和 5 g · L⁻¹的亚甲蓝 0.02 mL。PDE 监视及直视下观察淋巴显影,第一批荧光浓聚组织和蓝染组织定为前哨淋巴结,分别切除荧光浓聚组织和蓝染组织,其中部分组织同时具有荧光显影和蓝染。切除标本置入 10% 福尔马林溶液中固定,待石蜡包埋行 HE 染色组织学检查,明确是否为淋巴结。分别计算两种方法探测的准确率(每种方法探测的淋巴结总数/病理证实淋巴结总数)和前哨淋巴结检出率(病理证实淋巴结检出例数/实验例数)。

1.3 统计学方法 统计软件应用 SPSS22.0。资料主要为计数数据,采用 McNemar 检验比较两组率的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

30 只实验兔共 60 例甲状腺,荧光法共检出 104 枚荧光显影组织,病理证实 89 枚淋巴结,11 枚肌肉脂肪组织,2 枚胸腺组织,1 枚甲状旁腺,1 枚甲状腺组织。亚甲蓝法在 60 例甲状腺中检测出 91 枚组织,病理证实为 68 枚淋巴结,13 枚肌肉及脂肪组织,4 枚胸腺组织,6 枚甲状旁腺。病理检查中共发现 96 枚淋巴结,两种方法均探测到的有 64 枚,仅荧光法探测到的有 25 枚,仅亚甲蓝染法探测到的有 4 枚,两种方法均未探测到的有 3 枚。荧光法和亚甲蓝法检出的兔甲状腺前哨淋巴结的准确率分别为 92.7% (89/96)% 和 70.8% (68/96),差异有统计

学意义($P < 0.05$),见表 1。在所有 60 例甲状腺中,两种方法均检测到淋巴结的有 42 例,仅荧光法检测到淋巴结的有 13 例,仅亚甲蓝法检测到淋巴结的有 3 例,两种方法均未检测到淋巴结的有 2 例。荧光法和亚甲蓝法的淋巴结检出率分别为 91.7% (55/60) 和 75.0% (45/60),差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 荧光法与亚甲蓝法探测兔甲状腺前哨淋巴结的结果/枚			
项目	荧光法检出	荧光法未检出	合计
亚甲蓝法检出	64	4	68
亚甲蓝法未检出	25	3	28
合计	89	7	96

注:McNemar 检验两种方法的准确率, $\chi^2 = 13.79$,自由度 = 1, $P = 0.0002$ 。

表 2 荧光法与亚甲蓝法探测到淋巴结的兔甲状腺例数/例			
项目	荧光法检出	荧光法未检出	合计
亚甲蓝法检出	42	3	45
亚甲蓝法未检出	13	2	15
合计	55	5	60

注:McNemar 检验两种方法的检出率: $\chi^2 = 5.06$,自由度 = 1, $P = 0.0200$ 。

3 讨论

对于颈部淋巴结阴性(cN0)的甲状腺癌患者,由于临床影像学手段无法准确诊断颈淋巴结隐匿性转移,因此对于预防性颈部淋巴结清扫及清扫范围等尚处于争论之中^[5]。SLN 活检这项技术的开展为判断 cN0 甲状腺癌淋巴结转移提供了一种新方法。目前,检测 SLN 检测方法主要有核素法、染料法以及近年来开始兴起的荧光示踪法。核素法虽有较高的 SLN 检出率,但具有辐射危害,操作繁杂,探测设备昂贵,核素的载体(硫胶体)并没有通过中国食品药品监督管理局的批准,不便普及应用。染料法常用的生物染料有异硫蓝、专利蓝 V、亚甲蓝以及纳米碳等,其中亚甲蓝价廉、易获得,是国内染料法检测 SLN 的常用染料。邱树升等^[6]运用亚甲蓝进行甲状腺癌前哨淋巴结活检,其检出率为 90.4%,每例患者平均检出 3.9 枚。荧光示踪法是通过荧光成像仪观察荧光示踪剂在淋巴管中运行至淋巴结并聚集,根据荧光浓聚点标定前哨淋巴结。由于荧光可以穿透近 1 cm 厚度的组织,可在皮肤外或筋膜组织外探测深藏的淋巴结,并可以实时观测淋巴流向,具有很高的淋巴结检出率,并且检

测技术容易学习,拥有良好的应用前景。常用的荧光示踪剂为 ICG,其无毒性,1958 年被 FDA 批准用于临床试验,临床上作为造影剂用于检测脉络膜视网膜炎和肝脏储备功能。后来发现 ICG 在 760 nm 波长红外光激发时,发射波长为 845 nm 的荧光,作为荧光示踪剂用于乳腺癌^[7]、胃癌^[8]、口咽癌^[9]的前哨淋巴结探测并取得了很好的效果,但用于甲状腺癌方面的研究鲜有报道。

本研究比较了荧光探测法与亚甲蓝染色法的前哨淋巴结检出效能。荧光探测法检出兔甲状腺前哨淋巴结的准确率高亚甲蓝染色法的准确率(92.7% vs 70.8%, $P=0.000\ 2$)。荧光探测法检出兔甲状腺前哨淋巴结的检出率同样高于亚甲蓝染色法的检出率(91.7% vs 75.0%, $P=0.02$)。由于亚甲蓝分子量小,局部注射后很容易通过毛细血管内皮细胞间隙,进入血管,引起周围大量组织染色,无法清晰区分淋巴结与周围组织,导致淋巴结检出率下降。本实验中,亚甲蓝探测法检出 91 枚组织中包含 13 枚肌肉或脂肪组织,4 枚胸腺组织,6 枚甲状旁腺。ICG 虽然分子量易较小,但与血清蛋白结合后直径可以达到 7 nm,不易通过血流移动,减少了对周围组织的荧光污染。即使有通过血流的荧光剂流动,也可以在荧光探测仪实时监测下与淋巴管进行分辨。因为血流快,可以看到注射即刻出现细长的荧光条带,而淋巴流动相对较慢,多在注射数秒钟后见相对粗而短的荧光条带并缓慢向远离甲状腺的方向延伸。本实验中检出 104 枚荧光显影组织,仅含有 11 枚肌肉脂肪组织,2 枚胸腺组织,1 枚甲状旁腺,1 枚甲状腺组织,而且其中部分是由于注射后自针孔溢出的荧光剂直接沾染周围组织所致。通过甲状腺深部潜行注射(3 s 内匀速注射),注射后迅速用棉签压迫针孔可以减少荧光剂溢出导致的周围组织沾染。荧光可以穿透厚达 1 cm 的组织,可以探测直视下无法看到的筋膜或脂肪覆盖的深部的淋巴结,通过实时观察荧光转运过程而确定淋巴管走行并追踪至确认前哨淋巴结。这是染料示踪法不具备的优势。本研究获得了清晰的荧光显影,并可以实时观测荧光转运过程,追踪所有淋巴管至所属前哨淋巴结。通过荧光示踪法每例平均检出 1.48 枚前哨淋巴结,而通过亚甲蓝探测法每例平均仅检出 1.13 枚。研究表明,

SLN 假阴性率随着 SLN 检出数量的增加而降低^[10],而假阴性率是前哨淋巴结的很重要的指标,因为假阴性导致肿瘤区域淋巴结分期的低估和治疗的不充分。本研究中发现荧光示踪法不仅提高前哨淋巴结活检成功率,又可以减少前哨淋巴结假阴性率,明显优于亚甲蓝染色探测法,与寇德强等^[11]关于乳腺前哨淋巴结探测中研究结论相似。

本实验结果说明,荧光示踪法探测甲状腺前哨淋巴结优于亚甲蓝染色法,临床上可作为首选方法推荐。

参考文献

- [1] 吴炜,费哲为. 荧光示踪法在 cN0 期甲状腺乳头状癌的临床应用研究[J]. 中国普外基础与临床杂志,2016,23(10):1178-1181.
- [2] 李传书,高明,孔辉. 纳米碳在甲状腺乳头状癌前哨淋巴结活检中的应用[J]. 医学信息,2014(18):235-236.
- [3] PORTINARI M, CARCOFORO P. Radioguided sentinel lymph node biopsy in patients with papillary thyroid carcinoma[J]. Gland Surg,2016,5(6):591-602.
- [4] CABRERA RN, CHONE CT, ZANTUT-WITTMANN DE, et al. The role of SPECT/CT lymphoscintigraphy and radioguided sentinel lymph node biopsy in managing papillary thyroid cancer[J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg,2016,142(9):834-841.
- [5] 万华俊,张生来. 分化型甲状腺癌预防性颈中央区淋巴结清扫术的争论与共识[J]. 外科研究与新技术,2013(3):173-176.
- [6] 邱树升,李良,李新兵,等. 美蓝法定位前哨淋巴结活检在 cN0 分化型甲状腺癌治疗中的应用[J]. 中国肿瘤外科杂志,2012,4(4):242-244.
- [7] 姬逸男,蒋奕,韦薇,等. 吲哚菁绿荧光导航技术联合亚甲蓝示踪在乳腺癌前哨淋巴结活检技术的应用研究[J]. 广西医学,2015,37(9):1275-1277.
- [8] MIYASHIRO I, MIYOSHI N, HIRATSUKA M, et al. Detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging: comparison with infrared imaging[J]. Ann Surg Oncol,2008,15(6):1640-1643.
- [9] BREDELL MG. Sentinel lymph node mapping by indocyanin green fluorescence imaging in oropharyngeal cancer-preliminary experience[J]. Head Neck Oncol,2010,2:31.
- [10] BAN EJ, LEE JS, KOO JS, et al. How many sentinel lymph nodes are enough for accurate axillary staging in t1-2 breast cancer[J]. J Breast Cancer,2011,14(4):296-300.
- [11] 寇德强,邱镜丹,王全胜,等. 吲哚菁绿在乳腺癌前哨淋巴结活检中的应用观察[J]. 解放军医学杂志,2015,40(5):392-395.

(收稿日期:2017-06-16,修回日期:2017-08-06)