

纳米炭在结直肠癌术中淋巴示踪的应用

卓文方¹, 朱建东¹, 张筱骅², 李忠朋¹, 李志平¹, 陈建武¹, 黄蓉蓉²

(1. 乐清市人民医院, 浙江 乐清 325600; 2. 温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要: [目的] 探讨纳米炭淋巴示踪剂在结直肠癌手术中的应用价值。[方法] 将 55 例结直肠癌患者随机分为实验组 (26 例) 和对照组 (29 例)。实验组于术中在癌旁周缘分 4~6 点浆膜下注射纳米炭注射液 1ml, 术中参考黑染的淋巴结适当调整淋巴清扫范围, 解剖标本, 取出淋巴结并依据黑染与否、淋巴结位置及大小分组, 送检病理检查。[结果] 标本中可见淋巴结有广泛的不同程度的黑染, 实验组平均每例检获的淋巴结数、淋巴结转移率、直径 < 3mm 的淋巴结检出率等均显著高于对照组; 区域外黑染淋巴结取出活检均呈阴性。[结论] 术中应用纳米炭注射液能明显提高淋巴结检获的数量, 最大可能地清除转移的淋巴结, 指导病理分期, 同时清扫范围外的黑染淋巴结均呈阴性, 对结直肠癌过大范围的淋巴清扫提出疑问, 因此对结直肠癌的淋巴清扫术有一定的指导意义。

关键词: 淋巴示踪; 结直肠肿瘤; 纳米炭

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)03-0210-05

Application of Carbon Nanoparticles to the Operative Lymphatic Tracer for Colorectal Carcinoma

ZHUO Wen-fang¹, ZHU Jian-dong¹, ZHANG Xiao-hua², et al.

(1. Yueqing People's Hospital, Yueqing 325600, China; 2. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: [Purpose] To explore the value of carbon nanoparticles on the operative lymphatic tracer for colorectal carcinoma. [Methods] Fifty-five patients with colorectal carcinoma were randomized into two groups: experimental group (26 cases) and control group (29 cases). For the experimental group, a total of 1ml carbon nanoparticles was injected at 4~6 locations subserously around the cancerous site, and intraoperative stained lymph nodes were used as markers to guide lymphadenectomy in the colorectal radical procedure. Specimens were carefully dissected, then the lymph nodes were divided according to dyed or not, the lymph node position and size. At last, pathological examination applied to all lymph nodes. [Results] Various degrees of stained lymph nodes were seen in specimens. In experimental group, the number of lymph nodes, metastatic lymph nodes per case, the rate of lymph nodes which diameter < 3mm were obviously higher than those in control group. Dyed lymph nodes outside the radical resection area were proved negative pathologically. [Conclusion] Intraoperative application of carbon nanoparticles can obviously increase the number of dissected lymph node with highest possibility to dissect metastatic lymph nodes, and guide pathological stage. The dyed lymph nodes outside the radical resection area are all negative, which challenge the over extended lymphadenectomy in radical surgery for colorectal carcinoma. Intraoperative application of carbon nanoparticles can significantly enhance lymph node clearance for colorectal carcinoma with predominate guiding significance.

Subject words: lymphatic tracer; colorectal neoplasms; carbon nanoparticles

结直肠癌发病率及死亡率均较高, 转移阳性的淋巴结残留是术后复发及死亡的主要原因, 美国癌症联合委员会 (AJCC) 和美国病理学家协会 (CAP)

建议至少需检出 12 枚淋巴结才能准确判断为 II 期结直肠癌^[1-3], 且转移阴性的淋巴结数目是 IIIb 期和 IIIc 期结肠癌的独立预后因素^[4], 提示淋巴结清扫数目在结直肠癌中有重要意义, 术后清除的淋巴结进行仔细的病理解剖检查对判断预后、指导术后辅助治疗、预防术后复发和提高生存率均具有重要意义。我们采用了纳米炭作为淋巴示踪剂, 通过术中标识结直肠

基金项目: 温州市 2012 年度医药卫生科学研究项目计划 A 类 (2012A015)

通讯作者: 张筱骅, 主任医师, 教授, 学士; 温州医学院附属第一医院肿瘤外科, 浙江省温州市瓯海区上蔡村南 (325000);

E-mail: tomus0013@sina.com。

收稿日期: 2012-12-20; **修回日期:** 2013-02-03

癌引流区域的淋巴结,指导术中切除范围和术后标本的病理检取淋巴结,提高对转移淋巴结的切除率,合理进行临床病理分期,指导结直肠癌术后综合治疗。

1 资料与方法

1.1 主要实验材料

纳米炭注射液(商品名:卡纳琳注射液,批号H20041829,含纳米炭 50mg)由重庆莱美药业有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 病例资料

所有病例均来自 2012 年 4 月至 2012 年 7 月期间在温州医学院附属第一医院肿瘤外科行结直肠癌根治术的患者共 55 例,进行前瞻性研究。病例纳入标准为:术前未行放化疗,排除远处脏器转移,所有患者均行结直肠癌根治 3 式淋巴清扫及结直肠完整系膜切除术。其中右半结肠切除术 10 例,横结肠切除术 3 例,左半结肠切除术 5 例,乙状结肠癌根治术 15 例,直肠低位前切除术 21 例,经腹会阴联合直肠癌根治术 1 例。将所有患者随机分为两组:实验组(26 例)和对照组(29 例),两组资料具有可比性($P>0.05$)(Table 1)。

1.2.2 具体操作方法

实验组在剖开腹腔后,暴露术野,取纳米炭注射液 1ml,在癌旁周缘分 4~6 点浆膜下注射,观察淋巴

结黑染情况,15min 后再行手术操作,标本取下后立即解剖,将取下的淋巴结分 6 组并分别计算大小,标记部位,分别为第一站淋巴结即边缘淋巴结(N_1)黑染组和非黑染组,第二站淋巴结即中间淋巴结(N_2)黑染组和非黑染组,第三站淋巴结即主淋巴结(N_3)黑染组和非黑染组,如根治范围外有黑染的淋巴结(简称区域外淋巴结)也一并予取出,浸甲醛后送检病理科。对照组淋巴结检取后分为第一站淋巴结即边缘淋巴结(N_1)、第二站淋巴结即中间淋巴结(N_2)和第三站淋巴结即主淋巴结(N_3)。均常规行 HE 染色,由有经验的病理医师记录黑染及未黑染淋巴结的转移数,如常规 HE 染色不能明确诊断,可进一步行广谱 CK 免疫组织化学染色后再行病理学诊断。

1.3 统计学处理

应用 SPSS15.0 软件包进行统计学分析,采用 t 检验和 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

术中注射纳米炭注射液后 15min 再继续手术操作,一般注射纳米炭后约 5min 即开始见周边组织和肠系膜处有较多黑染的淋巴管和淋巴结,约 15min 后,淋巴结显影基本成型,黑染的淋巴结色泽清晰可见,边界清,多孤立,即使是系膜根部的淋巴结也清晰可辨,再常规行传统的结直肠癌根治 3 式清扫术,术中根据淋巴引流区域的染色,对手术清扫范围起到术野上的指导作用,特别是清扫范围边缘和区域外的淋巴结。术后较易于在标本中检获淋巴结,甚至直径为 3mm 的淋巴结也可染色。实验组均可观察到淋巴结广泛黑染,患者术后均无明显发热寒战等过敏反应,实验组术中平均出血量为 90ml,对照组术中平均出血量为 85ml,无明显差异。

2.1 两组检获淋巴结数目的比较

实验组共检获淋巴结 578 枚,平均每例检获 22.23 枚;对照组共检获淋巴结 205 枚,平均每例检获 7.06 枚;实验组检获淋巴结的总数明显高于对照组($P=0.000$)(Table 2);实验组检出淋巴结大于或等于 12 枚的病例数显著多于对照组($P=0.000$)(Table 3)。

Table 1 Clinical characteristic features of the two group

Features	Experimental group (n=26)	Control group (n=29)
Gender		
Male	16	18
Female	10	11
Age(years)	60.3±5.2	63.1±6.2
Diameter(cm)	3.35±1.24	3.27±1.33
Tumor clinical staging		
I	3	6
II	5	11
III	18	12
Differentiation		
Well	7	8
Middle	12	11
Poor	7	10
Tumor location		
Ascending colon	4	6
Transverse colon	1	2
Descending colon	3	2
Sigmoid colon	7	8
Rectum	11	11

Table 2 The number of seized lymph nodes

Groups	N_1	N_2	N_3	Total
Experimental group	132	334	112	578
Control group	40	98	67	205

Table 3 Comparison between the greater than or equal to 12 and less than 12

Groups	Seized lymph nodes		Total	χ^2	P
	≥12	<12			
Experimental group	24	2	26	28.3607	0.000
Control group	6	23	29		

2.2 淋巴结转移率的比较

实验组中有 18 例伴有淋巴结转移,对照组中有 12 例伴有淋巴结转移,实验组转移率为 69.23%,对照组转移率为 41.38%,实验组转移率明显高于对照组 ($P=0.038$);实验组内第二、三站淋巴结转移率分别为 61.54%、38.46%,明显高于对照组的 17.24%、17.24% ($P<0.05$) (Table 4)。

Table 4 The metastatic rate of lymph nodes between the two groups

Position	Experimental group			Control group		
	Non-metastatic	Metastatic	Metastatic rate(%)	Non-metastatic	Metastatic	Metastatic rate(%)
N (-)	8			17		
N ₁ (+)		4	15.38		2	6.90
N ₂ (+)		16*	61.54		5	17.24
N ₃ (+)		10*	38.46		5	17.24
Total	8	18	69.23	17	12	41.38

Note: compared with control group, * $P<0.05$.

2.3 直径<3mm 的淋巴结检出率比较

实验组共检出直径<3mm 微小淋巴结 158 枚,占检出淋巴结总数的 27.34%,明显高于对照组的 14.63% ($\chi^2=13.381, P=0.000$)。

2.4 实验组内淋巴结的黑染度

实验组共检获 578 枚淋巴结,其中有 386 枚黑染,黑染度为 66.78%,第一站淋巴结黑染度明显低于第二、三站 ($P=0.000$) (Table 5)。

Table 5 The rate of dyed lymph nodes in experimental group

Position	Number of lymph node		Rate of dyed (%)	χ^2	P
	Dyed	Total			
N ₁	53	132	40.15	13.347	0.000
N ₂	239	334	71.55		
N ₃	94	112	83.93		
Total	386	578	66.78		

2.5 实验组内黑染淋巴结与非黑染淋巴结转移率的比较

实验组内黑染淋巴结的转移率 (69/386, 17.88%) 显著高于非黑染淋巴结 (11/192, 5.73%) ($P=0.000$)。

2.6 区域外淋巴结的检查结果

实验组病例中,2 例升结肠癌分别见腹主动脉

旁和肠系膜上动脉旁黑染淋巴结各 1 枚,1 例降结肠癌见腹主动脉旁淋巴结 1 枚,4 例直肠癌分别见 4 枚左髂总动脉旁黑染淋巴结、1 枚左髂内动脉旁黑染淋巴结,均送检病理科,常规 HE 染色加 IHC (广谱 CK) 诊断均未发现癌细胞转移。

3 讨论

影响结直肠癌患者的预后有很多因素,包括原发肿瘤的病理学特征、淋巴结转移与否及其数量。Saha 等^[5]研究证实 I~II 期结直肠癌患者尽管进行了结直肠癌根治术,仍有约 30% 患者的癌肿局部复发和(或)远处转移;Bernini 等^[6]也同样证实了这个观点。而转移阳性淋巴结的残留是导致患者术后复发和死亡的重要原因^[7],因此需要合理的淋巴结清扫。能否根据淋巴结转移情况相应施治,决定了术后复发率及生存时间^[8]。邵小林等^[9]认为淋巴结检出数对 II 期结直肠癌的分期非常重要,且认为淋巴结转移度是 II、III 期结直肠癌独立的预后因素。所以,提高淋巴结的检出率,尤其是转移淋巴结的检出率具有重要的临床意义^[10]。国外不同研究都提出了最少淋巴结检获数,即为 12~17 个^[11-13]。研究也发现^[14],淋巴结检获数目不仅因患者而异,而且与病理检查详尽程度及手术切除范围相关。目前临床医师主要采用触诊检查来判断淋巴结是否转移,其灵敏度较低,这也是本研究对照组中平均淋巴结检出数只有 7.06 枚的主要原因。如果有一种能显示转移淋巴流向的试剂,其作用尤为重要。1978 年获原明郎开始对活性炭这种新的淋巴结示踪剂进行研究^[15]。其中比较理想的示踪剂就是纳米炭注射液,以往常被用于乳腺癌和胃癌的淋巴清扫术中^[16,17]。这种纳米级别颗粒的直径平均为 150nm,注射至肿瘤周围组织中后,由于毛细血管内皮细胞间隙为 20~50nm,而毛细淋巴管内皮细胞间隙为 100~500nm,因此纳米炭颗粒不进入血管而直接进入淋巴管,滞留聚集到淋巴结,使淋巴结染成黑色,加上组织液和淋巴液的压力差、淋巴液的向心流向、巨噬细胞对纳米炭颗粒的吞噬作用等,共同实现了肿瘤区域引流淋巴结的活体染色,表明了其明显的淋巴趋向性,达到示踪淋巴结的目的。傅骏等^[18]用纳米炭对 50 例结直肠癌患者进行

术中淋巴结染色,发现纳米炭判断区域淋巴结转移状态简单而且明确,可作为结直肠癌手术的参考。

本研究结果提示,①实验组平均每个病例检获22.23枚,而对照组只有7.06枚,实验组检获的淋巴结总数显著高于对照组;检获大于或等于12枚淋巴结的病例数显著高于对照组,符合临床指南对结直肠癌淋巴结检获数目的要求,指导临床医师对结直肠癌进行正确的病理分期和对肿瘤的合理评估,经纳米炭染色淋巴结后,病理科医师能检获到更多的淋巴结,同时术者能完整地清扫淋巴转移的区域,尤其是第三站淋巴结,该处淋巴结多在清扫范围的边缘,容易漏掉,而染色后能为临床外科医师划定较为明确的界限;②实验组中有18例伴有淋巴结转移,而对照组中只有12例,实验组转移率明显高于对照组,实验组内第二、三站淋巴结转移率分别为61.54%、38.46%,显著高于对照组的17.24%、17.24%,提示经过淋巴示踪剂染色后,提高了阳性淋巴结的检出,尤其是第二、三站淋巴结,而第一站淋巴结所在位置临近癌肿,故一般不会漏治,过小范围的淋巴清扫极易漏掉阳性淋巴结,使用淋巴示踪剂后,淋巴结假阴性患者的诊断得到了纠正,提高了癌症的病理分期;③实验组共检出直径<3mm微小淋巴结158枚,占检出淋巴结总数的27.34%,明显高于对照组。传统的淋巴结活检依靠病理科医师眼看、手摸来寻找淋巴结,而临床上淋巴结病理检测往往由于工作量大,对微小淋巴结的检测如不仔细或经验不足,极易被遗漏或疏忽,且很多较小的淋巴结(<3mm)隐藏于结直肠系膜及肠旁脂肪中而无法检出。Rodriguez-Bigas等^[19]在一项实验中证实,转移的淋巴结中,45.4%为直径<3mm的小淋巴结,极易漏检,导致分期偏低,影响对治疗及预后的评估。纳米炭染色的淋巴结呈黑色点状,容易辨认,可帮助病理科医师更快、更多地找到这些微小的转移淋巴结;④实验组清除淋巴结的黑染度为66.78%,说明纳米炭显色效果佳,是很好的淋巴结示踪剂。第一站淋巴结黑染度明显低于第二、三站,这与肿瘤浸润生长有关,周围正常组织被不规则分割,局部注射纳米炭后不能均匀扩散,且部分患者伴有脉管癌栓形成,阻塞淋巴管致第一站淋巴结不能显色,而通过侧枝循环到后一站,这一点对结直肠癌的前哨淋巴结活检术提出挑战。由于第一站淋巴结距癌灶较近,术中

均被完全清除,因而不影响该站的淋巴结清扫;⑤实验组内黑染淋巴结的转移度显著高于非染色淋巴结,说明纳米炭染色淋巴结后,能更多地清除阳性淋巴结,减少术后癌细胞的残留,从而为患者的综合治疗争取更好的基础;⑥在本研究中,结直肠癌常规手术解剖范围之外,如腹主动脉旁、肠系膜上动脉旁、左髂总动脉旁及左髂内动脉旁,我们发现黑染的淋巴结,故扩大了手术切除范围,并及时清除了该处黑染的淋巴结,病理科常规HE染色加IHC检查均提示阴性,说明过大范围的淋巴清扫不一定符合临床需要,反而增加了患者的手术损伤和并发症,尤其是腹膜反折下的直肠癌患者,是否行侧方淋巴结清扫一直是有争论的问题,本研究提示可能不需要过大的手术范围,但由于目前样本数还较少,尚不能下定论。

综上所述,纳米炭能清楚显示淋巴结的分布情况,有利于淋巴结的彻底清除,又可避免盲目扩大清扫范围,以尽可能减少对正常组织的损伤;同时提高了结直肠肿瘤临床分期的准确性,为合理制定手术方案、手术清扫淋巴结及后续治疗提供了帮助。

参考文献:

- [1] Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond[J]. CA Cancer J Clin, 2004, 54(6):295-308.
- [2] Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(7):979-994.
- [3] Sobin LH. TNM classification: clarification of number of regional lymph node for pN0[J]. Br J Cancer, 2001, 85(5):780.
- [4] Johnson PM, Porter GA, Ricciardi R, et al. Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long term survival in stage III b and III c colon cancer[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(22): 3570-3575.
- [5] Saha S, Nora D, Wong JH, et al. Sentinel lymph node mapping in colorectal cancer—a review [J]. Surg Clin North Am, 2000, 80(6):1811-1819.
- [6] Bernini A, Spencer M, Frizelle S, et al. Evidence for colorectal cancer micrometastases using reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of MUC2 in lymph nodes[J]. Cancer Detect Prev, 2000, 24(1):72-79.
- [7] Chen ZY. Full lymph node dissection can improve the

- prognosis of stage B colon carcinoma[J]. Foreign Medical Sciences Subbranch Surgery, 2002, 29(5):320-321.[陈宗佑. B期结肠癌的预后可经充分淋巴结清除所改善[J]. 国外医学(外科学分册), 2002, 29(5):320-321.]
- [8] Koyama Y, Kotake K. Overview of colorectal cancer in Japan: report from the Registry of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum[J]. Dis Colon Rectum, 1997, 40(10 Suppl):S2-S9.
- [9] Shao XL, Han HQ, He XL, et al. Impact of number of retrieved lymph nodes and lymph node ratio on the prognosis in patients with stage II and III colorectal cancer[J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery, 2011, 14(4): 249-252.[邵小林, 韩洪秋, 何小玲, 等. 淋巴结检出数和淋巴结转移度对II~III期结直肠癌患者预后的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2011, 14(4):249-252.]
- [10] Bipat S, Glas AS, Slors FJ, et al. Rectal cancer: local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging—a meta analysis [J]. Radiology, 2004, 232(3):773-783.
- [11] Wong JH, Bowles BJ, Bueno R, et al. Impact of the number of negative nodes on disease-free survival in colorectal cancer patients[J]. Dis Colon Rectum, 2002, 45(10): 1341-1348.
- [12] Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(7):979-994.
- [13] Wang C, Zhou Z, Wang Z, et al. Patterns of neoplastic foci and lymph node micrometastasis within the mesorectum[J]. Langenbecks Arch Surg, 2005, 390(4):312-318.
- [14] Baxter NN, Virnig DJ, Rothenberger DA, et al. Lymph node evaluation in colorectal cancer patients: a population-based study[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(3):219-225.
- [15] Hagiwara Akiro, Takahashi Toshio. Treatment of activated carbon adsorption of mitomycin C on malignant pleural peritonitis[J]. Jposoc Cancer Ther, 1985, 20(9):2144-2153.
- [16] Lin CL, Yang TL, Chen BF, et al. Sentinel lymph node mapping with emulsion of activated carbon particles in patients with pre-mastectomy diagnosis of intraductal carcinoma of the breast[J]. J Chin Med Assoc, 2003, 66(7): 406-410.
- [17] Huang B, Li A, Zhang B, et al. Effect of lymph node-targeted chemotherapy with carbon nanoparticles absorbing 5-fluorouracil on expressions of bcl-2, bax and caspase-3 in gastric cancer tissues and metastatic lymph nodes[J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2009, 16(1):18-22.[黄斌, 李昂, 张波, 等. 纳米炭吸附5-FU淋巴靶向化疗对胃癌组织及转移淋巴结 bcl-2、bax 及 caspase-3 表达的影响[J]. 中国普外基础和临床杂志, 2009, 16(1):18-22.]
- [18] Fu J, Yu BM, Bian WG, et al. Preliminary assessment of carbon nanoparticles labelling in detection of sentinel lymph nodes in colorectal cancer[J]. World Clinical Drugs, 2009, 30(2):98-100.[傅骏, 郁宝铭, 卞伟国, 等. 纳米炭标识前哨淋巴结检测结肠直肠癌腹腔淋巴结转移的评估[J]. 世界临床药物, 2009, 30(2):98-100.]
- [19] Rodriguez-Bigas MA, Maamoun S, Weber TK, et al. Clinical significance of colorectal cancer: metastases in lymph nodes <5mm in size[J]. Ann Surg Oncol, 2000, 7(2):124-130.