

乳腺癌前哨淋巴结活检术新型示踪剂的动物模型研究

田崇麟^{1,2}, 孙晓², 刘雁冰², 赵桐², 陈鹏²,

丛斌斌^{1,2}, 李盼盼^{1,2}, 张燕^{1,2}, 王永胜^{2,3}

1. 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250200 ;

2. 山东大学附属山东省肿瘤医院, 乳腺病中心, 山东 济南 250117 ;

3. 山东省医学科学院, 山东 济南 250062

[摘要] 背景与目的: 前哨淋巴结活检已成为临床腋淋巴结阴性早期乳腺癌患者的标准处理模式, 并对疾病的分期和治疗方案的选择至关重要。该研究将吲哚菁绿和利妥昔单抗进行偶联作为新型示踪剂, 采用小鼠后肢引流作为动物模型, 模拟乳腺癌前哨淋巴结活检术, 探索其定位效应。**方法:** 小鼠后肢脚背皮下注射不同剂量的示踪剂, 应用荧光脉管系统成像仪连续观测腋窝淋巴结(作为前哨淋巴结)至3 h, 探索最佳注射剂量和显像时间。注射最佳剂量的示踪剂, 观察至24 h, 探索其持续定位效应。**结果:** 随着注射剂量的增加, 前哨淋巴结开始显像与达到最佳显像的时间均逐渐缩短, 次级及第3级淋巴结显像率逐渐升高。新型示踪剂的最佳注射剂量为0.12 μg(吲哚菁绿的含量), 达最佳显像时间约为34 min。观察至24 h, 前哨淋巴结显像率维持在100%, 次级及第3级淋巴结显像率由6 h的0%和0%上升至20%和10%。**结论:** 吲哚菁绿-利妥昔单抗能清晰定位前哨淋巴结且6 h内无次级淋巴结显像, 具有较高的临床应用价值。

[关键词] 乳腺癌; 前哨淋巴结新型示踪剂; 吲哚菁绿-利妥昔单抗

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.07.002

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)07-0569-05

The study of a novel tracer for breast cancer sentinel lymph node biopsy in an animal model TIAN Chonglin^{1,2}, SUN Xiao², LIU Yanbing², ZHAO Tong², CHEN Peng², CONG Binbin^{1,2}, LI Panpan^{1,2}, ZHANG Yan^{1,2}, WANG Yongsheng^{2,3} (1.School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan and Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250200, Shandong Province, China; 2.Breast Cancer Center, Shandong Cancer Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250117, Shandong Province, China; 3. Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, Shandong Province, China)

Correspondence to: WANG Yongsheng E-mail: wangysh2008@aliyun.com

[Abstract] **Background and purpose:** Sentinel lymph node biopsy has replaced axillary lymph node dissection as the standard staging procedure in early breast cancer patients with clinically negative axillary lymph nodes. It is a critical step for staging and treatment. This study investigated the localization effect of a novel tracer for breast cancer sentinel lymph node biopsy [indocyanine green (ICG)-rituximab (R)], using the hind limb drainage in mice as an animal model. **Methods:** For exploring the optimal dose and imaging time, different doses of ICG-R were injected subcutaneously to the dorsum of the foot in the BALB/c mice. Then the fluorescence vasculature imaging instrument was used continuously to observe the popliteal fossa lymph node (as sentinel lymph node) from the injection to 3 h after injection. For exploring the sustained localization effect, the optimal dose of ICG-R was injected and the imaging instrument was used from imaging to 24 h after injection. **Results:** The time from injection to imaging and the time from injection to the optimal imaging were shortened with the increased doses, and the imaging rate of the second or third level node increased accordingly. The best dosage of the novel tracer was 0.12 μg (dosage of indocyanine green) and the time from injection to the optimal imaging was about 34 min. After the observation for 24 h, the imaging rate of sentinel lymph

node was maintained at 100%, and the imaging rate of the second and the third level lymph node increased from 0% to 20% and 10%, respectively. **Conclusion:** ICG-R could clearly locate the sentinel lymph node. There is no imaging of the second level lymph node within 6 h. The novel tracer has high value in the clinical application.

[**Key words**] Breast cancer; A novel tracer for sentinel lymph node; Indocyanine green (ICG)-rituximab (R)

目前, 前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)活检术(sentinel lymph node biopsy, SLNB)已替代腋淋巴结清扫术成为临床腋淋巴结阴性的早期乳腺癌患者的标准处理模式^[1]。国内外指南推荐的示踪剂为核素和蓝染料联用。然而, 核素示踪剂存在放射性核素污染、其载体(硫胶体)并未通过中国食品药品监督管理局的批准、患者对于放射性核素检查的排斥及基层医院无核医学科等问题, 限制了核素示踪剂在国内的推广^[2]。因此, 部分医院仍然单用染料法进行SLNB, 易造成较高的假阴性率。

吲哚菁绿是近年来新兴的荧光示踪剂, 但其具有颗粒小、次级淋巴结显影率高的缺点; 利妥昔单抗是针对淋巴结中B淋巴细胞膜上CD20分子的特异性人源化单克隆抗体^[3]。鉴于两种物质特殊的分子特性, 我们设想可将吲哚菁绿和利妥昔单抗进行偶联, 作为新型示踪剂进行乳腺癌SLNB, 预计该示踪剂将兼顾荧光示踪剂和淋巴靶向药物的优点, 具有良好的临床应用前景。本研究采用小鼠后肢引流作为动物模型, 应用新型示踪剂模拟乳腺癌患者的SLNB, 以确定新型示踪剂定位小鼠SLN的最佳注射剂量、达到最佳显像的时间、次级淋巴结显像率等指标, 为临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

利妥昔单抗购自上海罗氏制药有限公司; 注射用吲哚菁绿购自丹东医创药业有限责任公司; 半透膜直径22 mm, 截留相对分子质量为 $4 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$, 购自美国光谱医学公司; MDM-1型荧光脉管系统成像仪购自廊坊明德生物医药技术有限公司。BALB/c小鼠, 18~22 g, 雌性, 无菌级, 购自北京华阜康生物技术股份有

限公司。

1.2 新型示踪剂的制备

我们的前期基础研究证实, 吲哚菁绿和利妥昔单抗的最佳偶联质量比为1:4, 且结合后仍保持了利妥昔单抗的免疫原性^[4]。

① 室温避光条件下, 按无菌原则将100 mg利妥昔单抗用10 mL注射用水配制成10 mg/mL的溶液, 将25 mg吲哚菁绿用10 mL注射用水配制成质量浓度为2.5 mg/mL的溶液。

② 按照最佳偶联比将吲哚菁绿溶液缓慢滴入利妥昔单抗溶液中, 迅速用电磁搅拌器振荡混匀5 min。将装有偶联反应物的离心管进行离心沉淀($2\ 012 \times g$, 20 min)后, 取上清液置于用半透膜制成的透析袋中。

③ 偶联反应物混合液与灭菌注射用水按体积比为1:200的比例进行透析, 每2 h更换灭菌注射用水透析液, 后收集吲哚菁绿-利妥昔单抗的偶联物。

1.3 小鼠前哨淋巴结动物模型的建立

结合文献对小鼠淋巴结解剖的命名标准^[5], 前期我们应用联合法对10只BALB/c小鼠进行了实验, 于小鼠后肢脚背皮下注射^{99m}Tc-硫胶体10 μ L(5 μ Ci), 3 h后脱颈椎处死小鼠, 解剖膈窝及后续引流淋巴结。解剖前5 min以同样方式注射亚甲蓝, 染料法取出膈淋巴结、髂淋巴结、主动脉旁淋巴结和肾旁淋巴结。 γ 手持探测器测量核素计数平均值分别为 35.50 ± 6.75 、 2.00 ± 1.15 、 0.00 ± 0.00 和 0.00 ± 0.00 。按核素法大于最高计数10%为SLN, 我们定义膈窝淋巴结为后肢引流的SLN, 髂淋巴结为次级淋巴结, 主动脉旁或肾旁淋巴结为第3级淋巴结(个别小鼠主动脉旁淋巴结缺如, 此时选取肾旁淋巴结为第3级淋巴结)(图1)。

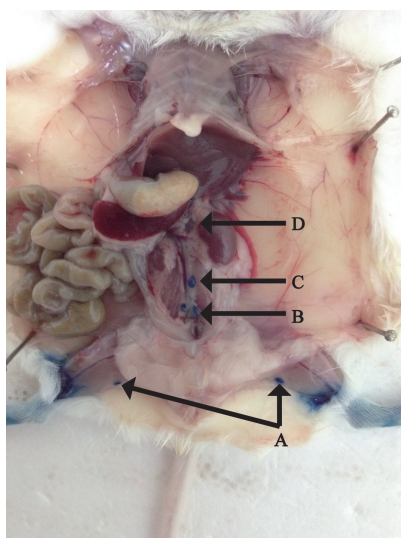


图1 小鼠后肢淋巴引流

Fig. 1 The hind limb lymphatic drainage in mice

A: Popliteal lymph node; B: Iliac lymph node; C: Lumbar aortic lymph node; D: Renal lymph node

1.4 实验步骤

1.4.1 最佳注射剂量与最佳显像时间研究

选取BALB/c小鼠(18~22 g), 每10只1组。

(1) 实验组: 于小鼠后肢脚背皮下注射吲哚菁绿-利妥昔单抗10 μL, 每组注射的吲哚菁绿的含量从0.48 μg(通过王雪鹃等^[6]关于⁹⁹Tc^m-IT-利妥昔单抗的动物实验研究及预实验结果确定)开始做爬坡实验, 分别为: 0.48、0.24、0.12和0.06 μg。荧光脉管系统成像仪连续观测腠窝SLN至开始显像, 后每隔5 min观察1次持续至3 h, 记录SLN荧光开始显像以及达最佳显像的时间。3 h后脱颈椎处死小鼠, 解剖腠窝及后续引流淋巴结。解剖前5 min以同样方式注射亚甲蓝, 染料法取出SLN、次级淋巴结及第3级淋巴结, 应用荧光脉管系统成像仪测量有无荧光显像。

(2) 对照组: 小鼠后肢脚背皮下注射吲哚菁绿10 μL(吲哚菁绿的含量为0.12 μg)。荧光脉管系统成像仪连续观测腠窝SLN至开始显像, 后每隔5 min观察一次持续3 h, 记录SLN荧光开始显像以及达最佳显像的时间。余步骤同前。

1.4.2 SLN持续定位效应研究

(1) 实验组: 小鼠后肢脚背皮下注射吲哚菁绿-利妥昔单抗(10 μL, 吲哚菁绿的含量为0.12 μg)分3组, 分别于6、12和4 h脱颈椎处死小鼠, 解剖腠窝及后续引流区域淋巴结。解剖前5 min以同样方式注射亚甲蓝。染料法取出SLN、次级淋巴结及第3级淋巴结, 应用荧光脉管系统成像仪测量有无荧光显像。

(2) 对照组: 小鼠后肢脚背皮下注射吲哚菁绿(10 μL, 吲哚菁绿的含量为0.12 μg)分3组, 余步骤同前。

2 结果

2.1 最佳注射剂量与最佳显像时间

随着新型示踪剂注射剂量的增加, SLN开始显像的时间与达到最佳显像的时间均逐渐缩短, 分别由0.06 μg的18.4和39.6 min缩短至0.48 μg的8.0和21.9 min(表1)。随示踪剂注射剂量的增加, 次级及第3级淋巴结的显像率逐渐升高, 分别由0.06 μg的0%和0%上升至0.48 μg的90%和90%。而单纯吲哚菁绿对照组3 h时次级及第3级淋巴结的显像率分别为100%和90%。当新型示踪剂的剂量增加到0.24 μg时, 次级及第3级淋巴结开始显像, 而剂量为0.06 μg时荧光脉管系统成像仪测量的SLN亮度较低, 因此, 选定0.12 μg为最佳注射剂量, 对应的最佳显像时间为34 min(图2)。

表1 吲哚菁绿-利妥昔单抗注射剂量对各级淋巴结显像的影响

Tab. 1 Lymph nodes imaging at all levels effected by different doses of ICG-R

Dose <i>m</i> /μg	SLN		3 h		
	Imaging time <i>t</i> /min	Optimal imaging time <i>t</i> /min	SLN	Secondary	Tertiary
0.06	18.40±2.46	39.60±3.63	100%(10/10)	0%(0/10)	0%(0/10)
0.12	10.50±1.72	34.30±2.79	100%(10/10)	0%(0/10)	0%(0/10)
0.24	8.30±2.21	29.70±4.00	100%(10/10)	30%(3/10)	20%(2/10)
0.48	8.00±1.70	21.90±4.01	100%(10/10)	90%(9/10)	90%(9/10)
0.12*	9.10±1.37	28.00±3.13	100%(10/10)	100%(10/10)	90%(9/10)

*: Indocyanine green in the control group

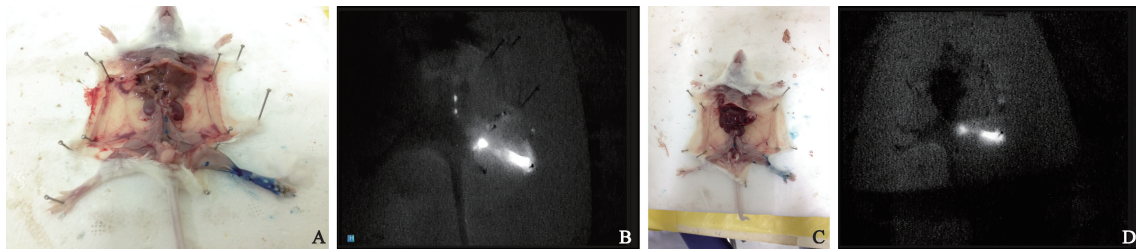


图2 新型示踪剂高低剂量对比

Fig. 2 Comparison between high-dose and low-dose of the novel tracer

A, B: 0.48 µg dosage of indocyanine green; C, D: 0.12 µg dosage of indocyanine green

2.2 SLN持续定位效应

在注射最佳剂量后, 随着时间的延长, 吲哚菁绿-利妥昔单抗组SLN的显像率维持在100%, 次级及第3级淋巴结的显像率分别由6 h的0%和0%上升至24 h的20%和10%(图3)。单纯吲哚菁绿组SLN的显像率逐渐降低, 由6 h的100%降低为24 h的10%, 次级及第3级淋巴结的显像率逐渐降低, 分别由6 h的80%和70%降低为24 h的0%和0%(表2)。

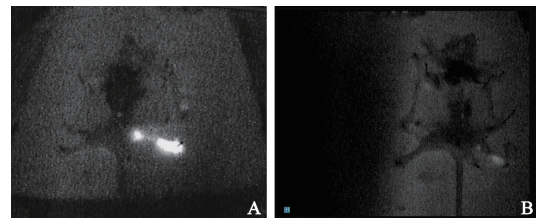


图3 12 h各级淋巴结显像情况

Fig. 3 Lymph node imaging at all levels after 12 h

A: IGC-R 0.12 µg; B: Indocyanine green 0.12 µg

表2 3 h后各级淋巴结显像情况

Tab. 2 Lymph node imaging at all levels after 3 h

Dose m/µg	6 h			12 h			24 h		
	SLN	Secondary	Tertiary	SLN	Secondary	Tertiary	SLN	Secondary	Tertiary
0.12 [△]	100%(10/10)	0%(0/10)	0%(0/10)	100%(10/10)	10%(1/10)	10%(1/10)	100%(10/10)	20%(2/10)	10%(1/10)
0.12*	100%(10/10)	80%(8/10)	70%(7/10)	30%(3/10)	30%(3/10)	10%(1/10)	10%(1/10)	0%(0/10)	0%(0/10)

[△]: IGC-R; *: Indocyanine green in the control group

3 讨论

作为一项腋窝准确分期的微创活检技术, SLNB代表目前乳腺癌外科治疗的发展水平^[7]。目前推荐联合使用核素和蓝染料进行SLNB, 以获得较高的成功率和较低的假阴性率^[2]。然而, 种种因素限制了核素示踪剂在国内医院中的推广使用。SLNB在中国的现状是, 部分医院仍然单用染料法进行SLNB, 单用染料法对外科医生的手术操作有极高的要求, 易造成较高的假阴性率。

荧光成像技术是当前新型示踪技术研究的亮点。吲哚菁绿作为常用的荧光示踪剂, 其注射于乳腺组织后, 通过荧光脉管成像系统的近红外光源(760 nm)激发产生荧光(820~830 nm), 荧光穿透人体组织, 利用成像仪可清晰直观地观察到淋巴管的引流途径和SLN。但由于吲哚菁绿的颗粒较小, 该方法具有SLN显像持续时间短、次级淋巴结显影率高、需在暗光下操作且易损伤淋巴管污染术区等缺点^[10-12]。利妥昔单抗是针对淋巴结中B淋巴细胞膜上CD20分子的特异性人源化单克隆抗体, 可与淋巴结中的

CD20分子特异性结合,另外,其具备有与其他小分子结合的结构域,能够与小分子物质进行偶联反应。我们探索的新型示踪剂吲哚菁绿-利妥昔单抗是荧光示踪剂和淋巴结靶向治疗药物的结合物,其中大分子的利妥昔单抗与小分子的吲哚菁绿进行偶联。新形成的偶联物综合了以上两种物质的特点,其制备工艺简单,无放射性,既能在近红外线的激发下使SLN荧光显像,又能特异地定位SLN。因此,进行SLNB时不必再循荧光显像的淋巴管找寻SLN,只需术中用红外线荧光显像系统探测荧光显像SLN的位置,将SLN周围组织解剖游离后,直接解剖检出荧光显像定位的SLN,从而避免了SLN的漏检和周围组织荧光显像污染的情况。

小鼠SLN动物模型技术简单、可行,具有啮齿动物模型成本效益佳的优点。从动物模型的研究结果可以看出,吲哚菁绿-利妥昔单抗的注射剂量可影响SLN及次级引流淋巴结的显像,SLN开始显像的时间与达到最佳显像的时间随注射剂量的增加均逐渐缩短,次级及第3级淋巴结的显像率随注射剂量的增加逐渐升高。这说明吲哚菁绿-利妥昔单抗具有饱和性,当注入的吲哚菁绿-利妥昔单抗超过SLN内B细胞CD20的结合能力时,多余的示踪剂将向下级淋巴结引流,从而导致次级及第3级淋巴结显像。当吲哚菁绿-利妥昔单抗注射剂量为0.12 μg(吲哚菁绿的含量)时,6 h内次级及第3级淋巴结均不显像,并且在后续24 h内SLN显像率始终维持在100%,次级及第3级淋巴结显像率低于20%,而相同剂量的单纯吲哚菁绿,在3 h时次级及第3级淋巴结的显像率为100%和90%,后续24 h内SLN、次级及第3级淋巴结显像率均逐渐降低。由此说明,吲哚菁绿在进入引流区域淋巴结后,由于没有偶联利妥昔单抗不能与淋巴结内CD20分子特异性结合而进入血液,最后在肝脏内被代谢。因此,随时间延长,SLN、次级及第3级淋巴结显像率逐渐降低。

需要指出的是,应用吲哚菁绿-利妥昔单抗

组12 h次级及第3级淋巴结开始显像,显像率虽然很低,且次级淋巴结相对于SLN的亮度明显降低,但不能保证后续淋巴结100%不显像。因此,在后续工作中,我们将对新型示踪剂获取的SLN进行荧光强度的探索,将有无荧光显像的定性资料转为不同荧光强度的定量数据,制定荧光示踪剂进行SLNB的阈值规范,同时将进一步研究吲哚菁绿-利妥昔单抗在乳腺癌方面的应用,以尽快在临床推广应用。

[参 考 文 献]

- [1] LYMAN G H, TEMIN S, EDGE S B, et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(13): 1365-1383.
- [2] AHMED M, PURUSHOTHAM A D, DOUEK M. Novel techniques for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a systematic review [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(8): 351-362.
- [3] REFF M D, CARNER K, CHAMBERS K S, et al. Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20 [J]. *Blood*, 1994, 83(2): 435-445.
- [4] 丛斌斌, 孙 晓, 宋现让, 等. 新型前哨淋巴结示踪剂的制备及动物实验研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(3): 245-250.
- [5] VAN DEN BROECK W, DERORE A, SIMOENS P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclature standardization in BALB/cAnNCrl mice [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 312(1-2): 12-19.
- [6] 王雪鹃, 王荣福, 杨 志, 等. 前哨淋巴结示踪剂^{99m}Tc-IT-Rituximab的制备及初步动物实验研究 [J]. *中国医学影像技术*, 2006, 22(1): 139-143.
- [7] 王永胜. 乳腺癌前哨淋巴结活检的安全性 [J]. *中国癌症杂志*, 2006, 16(9): 685-688.
- [8] WISHART G C, LOH S W, JONES L, et al. A feasibility study (ICG-10) of indocyanine green (ICG) fluorescence mapping for sentinel lymph node detection in early breast cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2012, 38(8): 651-656.
- [9] GUO W, ZHANG L, JI J, et al. Breast cancer sentinel lymph node mapping using near-infrared guided indocyanine green in comparison with blue dye [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4): 3073-3078.
- [10] HIRCHE C, MURAWA D, MOHR Z, et al. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 121(2): 373-378.

(收稿日期: 2015-12-10 修回日期: 2016-03-23)