

改良淋巴结显示液在大肠癌标本中的应用价值

向开敏,陈道瑾,陈远光

向开敏,陈道瑾,陈远光,中南大学湘雅三医院普外科 湖南省长沙市 410013
项目负责人:陈道瑾,410013,湖南省长沙市桐梓坡路,中南大学湘雅三医院普外科.

收稿日期:2002-08-03 接受日期:2002-08-23

摘要

目的:探索改良淋巴结显示液是否能更快更多发现更小淋巴结.

方法:20例大肠癌标本作为自身对照,先按传统法摘取系膜淋巴结得出检查结果后,再与用改良淋巴结显示液处理后的结果进行对照,结果用配对t检验进行统计学分析.

结果:改良淋巴结显示液法处理标本检出的淋巴结总数,小淋巴结数,阳性淋巴结数明显多于传统法,并改变部分标本的分期.

结论:改良淋巴结显示液法比传统法在大肠癌标本中能检出更多、更小淋巴结,能更准确地评估患者的分期,指导治疗,改善预后.

向开敏,陈道瑾,陈远光.改良淋巴结显示液在大肠癌标本中的应用价值.世界华人消化杂志 2003;11(1):120-122

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/120.htm>

0 引言

大肠癌是消化系统较常见的恶性肿瘤,其分期是决定其预后及治疗方案的重要指标,而分期的重要依据之一就是有无转移的淋巴结及转移淋巴结的多少.有淋巴结转移者5a生存率大大降低,且淋巴结转移数目愈多,预后愈差.常规手工法检测常有小淋巴结遗漏,直接影响着临床分期的准确性.预后预测及辅助治疗的选择.本实验目的是用改良淋巴结显示液(MLNRS)处理大肠癌手术切除标本,以探索此显示液是否能更快更多地发现小淋巴结.改良淋巴结显示液(专利申请号01119427.8)是在淋巴结显示液(LNRS)中加入美蓝少许而制成,他的根据是美蓝对淋巴结的亲合力及预实验的结果.

1 材料和方法

1.1 材料 中南大学湘雅三院普外科2001-06/2001-12期间共20例大肠癌根治术后标本,其中男11例,女9例.年龄从38-68岁,平均55.35岁,结肠癌13例,直肠癌7例.均为结直肠癌经手术完整切除原发灶肠段及其系膜.MLNRS溶液的组成成分95%无水酒精、乙醚、松节油、冰醋酸、缓冲甲醛、磷酸二氢钠、美蓝粉剂混合均匀,配成MLNRS液1000ml,用密封性较好的容器装好备用.

1.2 方法 采用自身对照法,因而每一标本都先后进行传统法和MLNRS法的分别处理.传统法即将手术后新鲜标本用10%甲醛浸泡24h后由同一病理科医师用眼看、手摸法将标本系膜组织中淋巴结取出,记下数目及直径,再将其进一步包埋、染色、切片、镜检.MLNRS法即将传统法处理后的标本之系膜从标本上剔除下来,用3倍于系膜体积的MLNRS液浸泡6-12h,然后取出标本,流水冲洗,尽量洗去系膜的染色,此时可见淋巴结呈深蓝色,在浅蓝色的脂肪背景下对比鲜明,便于挑拣.检出淋巴结再做病理切片检查.观察指标:分别观察传统法及MLNRS法检出的淋巴结数目、直径大小,分别记录下两法淋巴结转移数目(阳性淋巴结).

统计学处理 采用SPSS软件进行配对t检验 < 0.05

2 结果

本组20例标本用传统法检出淋巴结共205枚,其中直径 < 5 mm有37枚, > 5 mm有168枚.此标本进一步用MLNRS法处理后多检出220枚淋巴结,其中直径 < 5 mm有191枚,直径 > 5 mm有29枚.经过两次处理后20例大肠癌标本共检出淋巴结425枚,其中直径 < 5 mm共228枚,直径 > 5 mm共197枚.本组20例标本用传统法在常规镜检下检出24枚阳性,淋巴结阳性率为11.1%(24/205枚).总共有4例发生转移,为Dukes' C期,转移率为20%(4/20例),Dukes' B期共16例.在进一步用MLNRS法处理后,多检出56枚阳性,淋巴结阳性率为25.5%(56枚/220枚),多发现6例阳性标本,6例分期从B期变为C期.两步汇总后(经传统法和MLNRS法后)共发现阳性淋巴结80枚,总淋巴结为425枚,总阳性率为18.8%(80/425),总共有10例阳性,转移率为50%(10/20).

表1 传统法与MLNRS法的统计学分析

	检测淋巴结数		阳性淋巴结数(枚)	病理分期(C期)
	< 5 mm	> 5 mm		
传统法	37	168	24	4
MLNRS	228	197	80	10
t值	-7.90	10.02	-0.65	-2.08
P值	0.00003	0.52	0.00005	0.0451

3 讨论

淋巴结显示液是由Koren et al^[1-3]提出并广泛应用于各种肿瘤标本中以寻找淋巴结,在实际应用中证明其可

以显著提高检出正常的和转移的淋巴结数目,因而可以辨认出更小淋巴结.(其中酒精可溶解美蓝并渗透入组织;乙醚有渗透、助染及对抗组织收缩作用;松节油有脱水并透明、硬化淋巴结作用;冰醋酸可助染及对抗组织收缩;甲醛为固定组织作用;磷酸二氢钠为溶液缓冲剂)用LNRS处理标本后,淋巴结呈白垩状,在黄色背景下清晰可见.我们在预实验中,将2例经传统法处理后的系膜标本再用其3倍体积的LNRS浸泡6h,将标本用流水冲洗后,切成小片,可再检出淋巴结分别为8个和9个,直径为3-7mm.此2例系膜标本再进一步置入MLNRS中6h后同样用流水冲洗,仍又可分别检出4个和3个小淋巴结,直径1-4mm,而且发现淋巴结与背景的对比更加明显,更易辨认,可检出小至1mm的淋巴结.因此我们在正式实验中在LNRS中加入一种染色剂美蓝(methylene blue 亚甲蓝)少许后,就制成改良淋巴结显示液(MLNRS).美蓝与淋巴结有很强的亲和力^[4-6],染色后长时间冲洗浸泡也不易脱色;而周围的脂肪组织不易着色,且容易冲洗褪色,这样淋巴结被染成深蓝色,与周围浅蓝色的系膜背景对比明显,淋巴结更易被辨认,即使被包在系膜中.

从前面的结果可以看出MLNRS法较传统法有明显的优势,首先是发现更多更小的淋巴结,尤其是直径<5mm的淋巴结.本组20例标本中用传统法共发现205枚,平均每例10.3枚.用MLNRS法后总共发现425枚,平均每例21.25枚,配对t检验 $P < 0.01$,有显著性差异.对于直径<5mm的淋巴结,用传统法共找出37枚,占总205枚的18.05%.用MLNRS法后又找出直径<5mm的淋巴结191枚,占MLNRS法多找出淋巴结数220枚的86.8%,配对t检验 $P < 0.01$,有显著性差异,说明MLNRS法可找出更多小淋巴结.用MLNRS法后两步总共找出直径<5mm的淋巴结228枚,占总425枚的53.65%,说明经MLNRS法后找出的淋巴结大约一半为小淋巴结.对于直径>5mm的淋巴结,用传统法共找出168枚占传统法总数205枚的82%, $P > 0.05$ 说明传统法可以找出大部分直径>5mm的淋巴结.用MLNRS法后又找出29枚,只占13.2%,说明对于大淋巴结来说,MLNRS法与传统法比较并无太多的明显优势;另外也说明一些大淋巴结隐藏在较深厚的脂肪当中,用手指不易触摸出来,而用MLNRS法后,染色的淋巴结与周围的脂肪组织色彩对比分明,更易分辨出来.事实上,我们甚至发现MLNRS法可以辨认出<1mm的结节.

在传统法确认为C期的有4例,传统法分别找出阳性淋巴结6个、4个、2个、12个共24个,用MLNRS法后这4例又分别找出8个、9个、8个、3个阳性淋巴结,共28个,用传统法确定为C期的用MLNRS法又都找出新的阳性淋巴结.另外,在传统法确定为B期的16例标本中,用MLNRS法找到6例有阳性淋巴结,分别找出5枚、3枚、4枚、8枚、4枚,共

24枚.那么在传统法确定为B期的这6例标本用MLNRS法可确定为C期, $(P < 0.05)$ 说明传统法有一定的漏诊.而我们可看出MLNRS法多找出的淋巴结中直径<5mm的占相当大部分86.8%(191/220).因此我们用MLNRS法多找出的阳性淋巴结多为直径<5mm的小淋巴结,而小淋巴结的转移率是比较高的^[7-10],据文献报道可达11%,不容忽视.

大肠癌是一种高发性的恶性肿瘤,复发率及死亡率都很高,对于大肠癌的分期、预后、术后辅助性治疗来说,准确地了解淋巴结的状况都是非常重要的.据报道,无淋巴结转移的患者多数可获治愈,5a生存率可达70%,而有淋巴结转移者5a生存率大大降低,不足30%.而淋巴结转移数目愈多,预后愈差,1-5个阳性淋巴结者5a生存率为24%,而6-10个阳性者则降为9%.对于大肠癌标本应该采集的淋巴结数目,不同的资料有不同的说法,Scott Caplin et al认为少于6个将导致分期降低,可能造成转移淋巴结的漏诊.而法国人Jean Maurel et al作的研究结论认为至少要有8个淋巴结才能减少错误分期和分期过低的风险.

Scott et al认为如果Dukes B期标本检出淋巴结少于13个时建议用脂肪清除法(fat clearance)来增加检出数,因为少于13个将导致约4.8%的阳性淋巴结漏诊.Jan h Wang则认为要将切除的结直肠癌标本区别T2或T3至少要14个才比较准确.而国内有研究者作过相当深入的研究,认为每例标本检出不少于16枚淋巴结时,从统计学意义上来讲就可以足够准确地分期了.因而从上述的资料,我们认为16个以上淋巴结是比较理想的,当然,从本实验结果以及新的TNM分期系统对N(淋巴结)的描述更为具体这两点来说,可以认为检出淋巴结数目多多益善,即使已确定为三期的患者,转移淋巴结的多少对于进一步分出亚期有好处,因而可以更准确地判断其预后及辅助治疗的价值,如1-5个阳性淋巴结的患者5a生存率(24%)与多于6个阳性淋巴结者(9%)明显不同.从本实验结果看来,平均21.25枚/例的检出数说明MLNRS法是完全符合条件的.

对于大肠癌标本淋巴结检出的直径大小来看,显而易见,用传统法即眼看手摸法找到的大部分为直径>5mm的大淋巴结,对于直径<5mm的淋巴结且又藏在周围脂肪组织中显然无能为力.从本实验数据看,MLNRS所检出的大部分为<5mm的淋巴结,占新检出总数的86.8%(191/220),MLNRS法可辨认出1mm大小的淋巴结.本实验MLNRS法检出淋巴结平均直径<5mm.据报道^[11],对LNRS法作了大量深入研究的Koren et al检验膀胱癌标本时,用传统法检出淋巴结平均直径为7.96mm,而用LNRS法为3.81mm.而Ustum et al^[12]在检测一组膀胱癌、乳癌及大肠癌标本的淋巴结时,传统法检出淋巴结平均直径为6.8mm,而LNRS法为4.2mm.由此可以看出LNRS法在检出小淋巴结时有明显的优

势,这就为进一步镜检查出小淋巴结的微转移灶提供了可能.

4 参考文献

- 1 Koren R, Kyzer S, Paz A, Veltman V, Klein B, Gal R. Lymph node revealing solution: a new method for detecting of minute axillary lymph nodes in breast cancer specimens. *Am J Surg Pathol* 1997;21:1387-1390
- 2 Koren R, Siegal A, Klein B, Halpern M, Kyzer S, Veltman V, Gal R. Lymph node revealing solution: Simple new method for detecting minute lymph nodes in colon carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1997;40:407-410
- 3 Koren R, Kyzer S, Levin I, Klein B, Halpern M, Rath-wolfson L, Paz A, Melloul MM, Mishalim, Gal R. Lymph node revealing solution: a new method for lymph node sampling: results in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep* 1998;5:341-344
- 4 Simmons RM, Smith SM, Osborne MP. Methylene blue dye as an alternative to isosulfan blue dye for sentinel lymph node localization. *Breast J* 2001;7:181-183
- 5 Sanchez W, Lana-Perez P, Alvarado I, Labastida S, Herrera L. Modified clearing technique to identify lymph node metases in post-irradiated surgical specimens from rectal adenocarcinoma. *Arch Med Res* 1996;27:31-36
- 6 Kobayashi O, Motohashi H. A study of lymph node metastasis in gastric cancer—a new method for fixing resected specimens with methylene blue formalin. *Gan No Rinsho* 1987;33:1783-1788
- 7 Jan YJ, Huang PC, Chen JT, Ho WL. Lymph node revealing solution and traditional 10 % buffered formaldehyde for detecting lymph nodes in colorectal carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 2000;63:131-137
- 8 Koren R, Shvero J, Yaniv E, Veltman V, Konichesky M, Groushko I, Sadov R, Feinmesser R, Gal R. Neck-dissection surgical specimens treated by lymph node revealing solution. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124:72-75
- 9 Andreola S, Leo E, Belli F, Bufalino R, Tomasic G, Lavarino C, Baldini NT, Meroni E. Manual dissection of adenocarcinoma of the lower third of the rectum specimens for detection of lymph node metastase smaller than 5mm. *Cancer* 1996;77:607-612
- 10 Pworak O. Number and size of lymph node and node metastases in rectal carcinomas. *Surg Endosc* 1989;3:96-99
- 11 Koren R, Paz A, Lask D, Kyzer S, Klein B, Schwartz A, Gal R. Lymph-node revealing solution: a new method for detecting minute lymph node in cystectomy specimens. *Br J Urol* 1997;80:40-43
- 12 Ustun MO, Onal B, Tugyan N, Rezanko T. Lymph node revealing solution: is it effective on detecting minute lymph node? *Adv Clin Path* 1999;3:135-138

《临床肝胆系病学》出版发行

本刊讯 由WJG编委、著名肝病专家巫协宁教授主编,曾民德、邱德凯教授副主编的新版《临床肝胆系病学》于2002年9月由上海科学技术文献出版社出版.

全书105万字,16开,精装,定价85元.全书分12篇72章,详尽介绍了肝胆系的实用解剖、肝脏的凝血与代谢功能、组织学、病理学、免疫学、肝再生、细胞凋亡、肝脏与细胞因子以及各种检查方法、各种疾病的诊断和治疗等.肝胆系疾病包括感染,病毒性肝炎,肝纤维化、肝硬化及其并发症,肝肿瘤,胆汁郁积,遗传性、先天性、小儿、妊娠期肝胆系疾病,最后还介绍了人工肝、肝移植、肝干细胞移植治疗.全书在各个方面都反映了肝胆系疾病诊断和治疗的国内外最新研究进展,执笔者都是国内著名的专家、院士、教授.

本书重点突出、深入浅出,可作为肝病科、消化内科、外科、儿科、传染科各级临床医师的实用高级参考书.欲购买者请汇款至:200030,上海市武康路2号上海科学技术文献出版社发行科.联系电话:021-64313128 (2002-11-08)