

- [31] Fisher RS, Afra P, Macken M, et al. Automatic Vagus Nerve Stimulation Triggered by Ictal Tachycardia: Clinical Outcomes and Device Performance--The U. S. E-37 Trial. *Neuromodulation*, 2016, 19(2): 188-195.
- [32] Heck CN, King-Stephens D, Massey AD, et al. Two-year

seizure reduction in adults with medically intractable partial onset epilepsy treated with responsive neurostimulation: Final results of the RNS System Pivotal trial. *Epilepsia*. 2014, 55(3): 432-441.

## 液体活检在胶质瘤中的应用

张学文 综述 黄煜伦 审校

苏州大学附属第一医院神经外科, 江苏 苏州 215000

**摘要:**液体活检是指一种非侵入性检测方法,用来检测患者的血液、脑脊液或尿液等体液中的某些生物活性分子,通过对检测结果分析进而对肿瘤做出早期诊断。近年来研究结果显示外泌体、ctDNA、CTC 及自身抗体在胶质瘤早期诊断中发挥着潜在的优势,而且这些指标对预后判断以及肿瘤复发监测有一定的指导意义。深入研究这些方法,将为我们提供新的胶质瘤早期诊断思路并有助于提高临床治疗的效果,延长患者生存时间。

**关键词:**液体活检;胶质瘤;诊断

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2017.03.019

目前肿瘤的确诊是以肿瘤组织的病理学诊断结果作为金标准,但其具有一定的局限性:①肿瘤具有异质性,②由于患者自身条件差或受到当前医学技术条件的限制导致不能得到病理诊断所需要的肿瘤组织,③在得出肿瘤组织病理诊断之前,只能给予患者经验性的治疗。鉴于以上的局限性,人们希望找到一种能对肿瘤进行早期诊断的检测技术从而使患者得到早期治疗,而液体活检技术有望解决病理诊断的局限性。

### 1 液体活检

具有非侵入性、敏感性高和检测速度快等优点,从而降低了病理诊断的潜在危害性,并能使临床医生尽早发现肿瘤。再者,我们通过分析利用液体活检技术重复提取肿瘤样本的定期检查结果进而调整治疗方案。目前液体活检技术主要包括细胞外泌体的检测、ctDNA 检测、CTC 检测、抗原检测及自身抗体检测等<sup>[1]</sup>。现将胶质瘤液体活检的技术和最新进展总结如下:

#### 1.1 外泌体检测

外泌体是起源于活细胞内吞途径的多泡体,直径约 30~100 nm,通透能力较强,易达到体液中,这就为外泌体的检测提供了可能<sup>[2]</sup>。不同的外泌体所携带的分子不同,也就具有了不同的生物学功能,外泌体中含有 DNA、mRNA 或 microRNA,通过对这些物质的分析,可以得出原发肿瘤的性质,进而形成了对肿瘤的早期诊断<sup>[3]</sup>。胶质瘤细胞的外泌体更易通过被破坏了的血脑屏障进入血液,但即使是一些血脑屏障保持完好的胶质瘤患者血液中,也能检测出胶质瘤细胞的外泌体,相关研究已经分别从这两种胶质瘤患者的外泌体中检测到胶质瘤细胞的一个重要生物标志:IDH1G395A<sup>[4]</sup>。利用全基因组测序法检测外泌体中的 DNA 发现:外泌体中 DNA 的全基因组与肿瘤细胞的全基因组具有高度的一致性<sup>[5]</sup>。大部分外泌体中的 mRNA 具有稳定性差和容易降解的特征,而外泌体中的 microRNA 却具有含量高和较稳定的特征,因此,外泌体中的

收稿日期:2017-03-15;修回日期:2017-05-17

作者简介:张学文(1987-),男,在读硕士研究生,主要从事脑胶质瘤疾病发病及诊断机制研究。

通讯作者:黄煜伦(1973-),男,主任医师,副教授,硕士生导师,博士后,主要进行脑肿瘤特别是胶质瘤的手术及综合治疗以及神经内镜微创手术。

microRNA 更具有诊断价值,这已经在胶质瘤、乳腺癌等多种肿瘤的诊断中得到证实<sup>[6]</sup>。鉴于外泌体的种类较多,这就需要我们寻找可靠的方法来分离出所需的外泌体,由于目前还不清楚外泌体保留遗传信息的具体过程以及仍不能精确知道胶质瘤细胞分泌哪种外泌体对其具有较高的早期诊断价值,因此需要我们继续深入研究。多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 肿瘤细胞的外泌体中 miRNA 特征部分能反映其来源肿瘤的表型,且该 miRNA 具有判断和评估患者预后的作用。研究发现,亚型特异性的 miRNA 图谱可用于生存期的预测,一项基于 TCGA 数据库的回顾性分析显示,miR-130a 和 TMZ 的疗效呈正相关,且不受 MGMT 甲基化状态的影响<sup>[7]</sup>,但其检出准确率有待提高,目前有研究发现外泌体经血液循环到达腹水和胸膜积液等恶性病变体液时,检测标本更容易获得,使得检测的灵敏性和特异性得以提高<sup>[8]</sup>。

## 1.2 循环肿瘤细胞 (CTC) 检测

循环肿瘤细胞是指从实体瘤的原发灶或转移灶脱落后进入外周循环系统的肿瘤细胞,近年研究发现 CTC 是侵袭的基础,它扮演着诱导胶质瘤复发的角色,并保留原发肿瘤的特性,据此特性,进行 CTC 检测有助于尽早发现胶质瘤发生侵袭现象和评判患者的预后,因此备受关注<sup>[9]</sup>。Engell 在 1955 年就证实了循环血液中 CTC 的存在<sup>[10]</sup>,现研究表明在循环血液中的 CTC 有着生存能力强和侵袭力高的特点,它们往往通过聚集而对微环境产生侵袭作用,因此通过分析循环血液中 CTC 的检测结果可对肿瘤进行早期诊断以及对治疗效果进行评估<sup>[11]</sup>,目前端粒酶测定技术已经被用于该检测,端粒酶测定法在 11 例胶质瘤患者血液中检测到 8 例含有 CTC,约占 73%,其中 5 例患者 CTC 数量较高,检测 CTC 也可反映放疗的效果,通过对其预后评估追踪发现,对放疗敏感的患者接受治疗后 CTC 明显下降<sup>[12]</sup>。目前这项技术的不足之处在于人体的循环体液量多且处于不断更新的状态,从而导致循环体液中含有 CTC 的量很少,有研究表明要检测  $10^5 \sim 10^7$  个单核细胞才能检测到 1 个 CTC<sup>[13]</sup>;另一不足之处是目前对 CTC 的研究只局限于小样本的研究,要使其应用于临床,还需要进行大规模、多样本的深入研究。过去认为由于血脑屏障的存在,胶质瘤患者体内是不存在 CTC 的,但近几年通过对脑脊液 (CSF) 进行 CTC 检测发现,脑脊液

(CSF) 检测 CTC 具有得天独厚的优势,因为 CSF 来源局限于中枢神经系统,与其他器官、体液无交叉,检测背景干净,“噪声”低,从而使得通过脑脊液检测 CTC 进行胶质瘤早期诊断具有特异性强的特点<sup>[14]</sup>。

## 1.3 ctDNA 检测

血液循环中存在一种 DNA,称之为血浆游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 它处于无细胞结构和游离状态。循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 是指肿瘤细胞释放到周围微环境的一种遗传物质,由于 ctDNA 是 cfDNA 中的一种,所以提取 ctDNA 目前多从血浆中进行。在胶质瘤早期,  $5 \times 10^7$  个胶质瘤细胞在血液中所产生的 ctDNA 数量就能达到对胶质瘤进行早期诊断的检测要求,但这个数量级的胶质瘤细胞团却不易在影像学上被发现<sup>[15]</sup>,因此通过不断检测血液中的 ctDNA 数量就能对胶质瘤进行早期诊断。由于胶质瘤具有时间和空间上的异质性特征,这就使得我们必须通过定期检测 ctDNA 并对其结果进行分析,才能不断对患者实施不同的治疗,从而避免延误更改治疗方案的时机。预后方面,通过对 ctDNA 的定性、定量分析可发现耐药基因,有利于胶质瘤患者后续的治疗<sup>[16]</sup>。但 ctDNA 检测仍有它的局限性:一方面由于 ctDNA 在循环血液中数量少,且易被 cfDNA 遮盖;其次不能通过 ctDNA 的结果分析实现肿瘤的定位,也不能通过结果分析在细胞功能方面对其进行研究;再次临床上 ctDNA 的检测结果还没有一个统一的标准。

## 1.4 自身抗体检测

自身抗体是指由自身免疫系统所产生的针对自身的蛋白、细胞、组织、甚至器官的一类抗体,研究发现,体内抗原能使免疫应答产生生物信号放大作用,从而诱导出针对肿瘤的自身抗体,这样就能使抗肿瘤血清抗体在肿瘤抗原还没被发现之前就被检测出来<sup>[17]</sup>,且更早于影像学诊断,在不同的肿瘤患者血清中已经找到了具有诊断价值的相应抗体,从而表明自身抗体可作为肿瘤早期诊断的标志物。例如抗 p53 抗体在 30% ~ 40% 的肿瘤患者体内被检测到<sup>[18]</sup>; AnnexinI 和 II 的自身抗体在 60% 肺腺癌及 33% 肺鳞癌患者中被检测到<sup>[19]</sup>;抗 Mucin1 (MUC1)、Rad51 的自身抗体在胰腺癌患者体内被检测到<sup>[20]</sup>。由于恶性肿瘤具有复杂性和异质性的特征,仅仅通过检测体内一个相关抗体就对肿

瘤进行早期诊断往往会出现诊断的灵敏度和特异性都不高的现象,因此目前通常采用组合多种自身抗体的方式对肿瘤进行早期诊断,这在前列腺癌的早期诊断中已得到了应用,Bouwman 等<sup>[21]</sup>利用蛋白芯片技术,检测出并组合了前列腺癌的自身抗体组,从而使前列腺癌诊断的敏感性提高到 81.6%,特异性提高到 88.2%。在中枢神经系统中,胶质瘤是最常见的恶性肿瘤,如能得到早期诊断,可通过提高手术全切率改善患者的预后。目前胶质瘤的诊断多依赖于影像学,但其价格昂贵且难以做到早期诊断,因此开发出针对脑胶质瘤的简便血清学早期诊断的方法就显得十分必要了,但在脑胶质瘤患者的血清中相应的自身抗体并不多见,这可能是由于血脑屏障阻止了胶质瘤细胞与免疫细胞接触而引起的。p53 基因具有野生型和突变型两种,野生型 p53 基因产生的蛋白稳定性极差,不易被检测出,而突变型 p53 基因产生蛋白的稳定性要有所增加,从而通过免疫组化将突变型 p53 检测出来,研究发现在脑胶质瘤发生中 p53 基因突变也起着重要作用<sup>[22]</sup>。在检测抗胶质瘤的自身抗体实验中,Pallasch 等<sup>[23]</sup>首先确定了三个抗原自身抗体,包括 GLEA1、GLEA2 和 PHF3,在 62 例胶质瘤病人中:约 24.2% 的患者对 GLEA1 血清抗原起反应,约 48.4% 对 GLEA2 血清抗原起反应,约 56.5% 对 PHF3 血清抗原起反应。通过对患者生存期随访发现:未检测到 GLEA2 血清抗体和 PHF3 血清抗体的患者,其中位生存期为 7.2 个月,血清中检测到 GLEA2 血清抗体的患者,其中位生存期增加到 17.4 个月,检测到 PHF3 血清抗体的患者,其中位生存期增加到 14.7 个月。同时研究还发现含有 GLEA1 血清抗体与患者的中位生存期无相关性。Survivin 属于凋亡抑制蛋白(IAP)中的一种,常在癌组织中表达。Soling 等<sup>[24]</sup>通过 Elisa 和免疫印迹法对脑膜瘤及高级别胶质瘤患者进行 Survivin 自身抗体分析显示:在 42 例脑膜瘤患者体内有 5 例产生 Survivin 自身抗体,35 例高级别胶质瘤患者体内有 3 例产生 Survivin 自身抗体;通过分析还发现 Survivin 自身抗体至少可在脑肿瘤患者的血清中产生,且脑肿瘤病人当中至少有 20% 的血清中含有 Survivin 自身抗体,这一数据与肿瘤细胞免疫组化的结果是一致的,说明利用 Survivin 自身抗体作为脑胶质瘤的一种新的诊断方法和随访工具是具有可行性的。细丝蛋白(FLNC)是存在于平滑肌等组织中且含有肌

动蛋白结合结构域的一种蛋白质,它往往被限制在肌肉组织当中,近期研究发现在神经胶质瘤患者血清中也存在抗 FLNC 的自身抗体,并证实了低级别的神经胶质瘤患者血清中的抗 FLNC 自身抗体的量明显高于高级别的神经胶质瘤患者血清中抗 FLNC 自身抗体的量,利用这一特点可以鉴别低级别与高级别胶质瘤<sup>[25]</sup>。

胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是一种具有细胞骨架成分的酸性蛋白,相对分子量约为 50000 ~ 52000,具有稳定细胞结构、支持和保护胶质细胞的作用,研究发现 GFAP 可作为脑胶质母细胞瘤的血清检测指标<sup>[26]</sup>,并且脑胶质瘤患者血清内含有的 GFAP 水平和肿瘤大小在高级别脑胶质瘤中呈正相关性<sup>[27]</sup>。同时,研究发现非脑胶质瘤的脑瘤患者血清或者非脑瘤的志愿者血清中的 GFAP 自身抗体的量明显低于脑胶质瘤患者血清中 GFAP 自身抗体的量,说明 GFAP 自身抗体水平的升高对胶质瘤的诊断具有一定的特异性<sup>[28]</sup>。

## 2 小结

肿瘤的发病机制是复杂的,具有早期难发现、晚期患者预后不良等特点,能发现可靠的血清学生物标志物从而对肿瘤进行早期诊断并给予患者及时治疗就显得十分必要了。目前肿瘤诊断的金标准仍然是肿瘤病理学诊断,但它的缺点是具有有创性及患者对多次活检依从性差,而液体活检却有着无创性和连续检测的优势。但是目前液体活检的方法、检测结果的可信度低以及可分析的标志物较少的状况,限制了其在临床上的应用。相信随着科学技术的发展,液体活检将会成为胶质瘤早期诊断的一种新趋势。

## 参 考 文 献

- [1] 黄依瑶,郑磊.重视外泌体的实验诊断价值.中华检验医学杂志. 2015. 38(11): 724-726.
- [2] Boukouris S, Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. Proteomics Clin Appl. 2015. 9(3-4): 358-367.
- [3] Royo F, Zuñiga-Garcia P, Sanchez-Mosquera P, et al. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. J Extracell Vesicles. 2016. 5: 29497.
- [4] García-Romero N, Carrión-Navarro J, Esteban-Rubio S, et al. DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in pe-

- ripheral blood of patients. *Oncotarget*. 2017. 8 (1): 1416-1428.
- [5] Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*. 2014. 24(6): 766-769.
- [6] Thind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles*. 2016. 5: 31292.
- [7] Chen H, Li X, Li W, et al. miR-130a can predict response to temozolomide in patients with glioblastoma multiforme, independently of O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *J Transl Med*. 2015. 13: 69.
- [8] Putz U, Howitt J, Doan A, et al. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci Signal*. 2012. 5(243): ra70.
- [9] Coumans FA, Ligthart ST, Uhr JW, et al. Challenges in the enumeration and phenotyping of CTC. *Clin Cancer Res*. 2012. 18(20): 5711-5718.
- [10] ENGELL HC. [Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation]. *Ugeskr Laeger*. 1955. 117(25): 822-823.
- [11] Gao F, Cui Y, Jiang H, et al. Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. *Oncotarget*. 2016. 7(44): 71330-71340.
- [12] Macarthur KM, Kao GD, Chandrasekaran S, et al. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Res*. 2014. 74(8): 2152-2159.
- [13] Sleijfer S, Gratama JW, Sieuwerts AM, et al. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation. *Eur J Cancer*. 2007. 43(18): 2645-2650.
- [14] Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R, et al. MiR-21 in the extracellular vesicles (EVs) of cerebrospinal fluid (CSF): a platform for glioblastoma biomarker development. *PLoS One*. 2013. 8(10): e78115.
- [15] Diaz LA, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012. 486(7404): 537-540.
- [16] Touat M, Duran-Peña A, Alentorn A, et al. Emerging circulating biomarkers in glioblastoma: promises and challenges. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015. 15(10): 1311-1323.
- [17] Tan EM, Zhang J. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunol Rev*. 2008. 222: 328-340.
- [18] Soussi T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res*. 2000. 60(7): 1777-1788.
- [19] Brichory FM, Misek DE, Yim AM, et al. An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98(17): 9824-9829.
- [20] Hamanaka Y, Suehiro Y, Fukui M, et al. Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2003. 103(1): 97-100.
- [21] Bouwman K, Qiu J, Zhou H, et al. Microarrays of tumor cell derived proteins uncover a distinct pattern of prostate cancer serum immunoreactivity. *Proteomics*. 2003. 3(11): 2200-2207.
- [22] Weller M, Bornemann A, Ständer M, et al. Humoral immune response to p53 in malignant glioma. *J Neurol*. 1998. 245(3): 169-172.
- [23] Pallasch CP, Struss AK, Munnia A, et al. Autoantibodies against GLEA2 and PHF3 in glioblastoma: tumor-associated autoantibodies correlated with prolonged survival. *Int J Cancer*. 2005. 117(3): 456-459.
- [24] Söling A, Plugge EM, Schmitz M, et al. Autoantibodies to the inhibitor of apoptosis protein survivin in patients with brain tumors. *Int J Oncol*. 2007. 30(1): 123-128.
- [25] Adachi-Hayama M, Adachi A, Shinozaki N, et al. Circulating anti-filamin C autoantibody as a potential serum biomarker for low-grade gliomas. *BMC Cancer*. 2014. 14: 452.
- [26] Jung CS, Foerch C, Schänzer A, et al. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*. 2007. 130(Pt 12): 3336-3341.
- [27] Bommeland T, Rosengren L, Fridlund S, et al. Serum levels of glial fibrillary acidic protein correlate to tumour volume of high-grade gliomas. *Acta Neurol Scand*. 2007. 116(6): 380-384.
- [28] Wei P, Zhang W, Yang LS, et al. Serum GFAP autoantibody as an ELISA-detectable glioma marker. *Tumour Biol*. 2013. 34(4): 2283-2292.