



·论著·

荧光素钠在术中判断胶质瘤边界的研究

夏鸣, 付强, 李绍山, 刘波, 周庆九

新疆医科大学第一附属医院神经外科, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘要:目的 探究不同病理类型胶质瘤在术中应用荧光素钠后判断胶质瘤边界效能的差别。方法 使用诊断试验的方法选取新疆医科大学第一附属医院神经外科2020年1月—2020年6月使用荧光素钠术中显影的胶质瘤的患者,术中取荧光显微镜下黄染区和附近非黄染区(黄染区外约5 mm)分别进行病理检查,统计并绘制ROC曲线,对比术中应用荧光素钠对不同病理来源的胶质瘤的诊断效率。结果 患者共有52例。其中,男性31例,女性21例;平均年龄(46±16)岁;肿瘤为星形胶质细胞来源34例,少突胶质细胞来源18例。荧光素钠显示高级别胶质瘤边界的可靠性和真实性优于显示肿瘤边界(灵敏度98% vs 73%,特异度89% vs 97%,Kappa值0.86(>0.80几乎完全一致) vs 0.63(>0.60高度的一致性),约登指数0.87 vs 0.71)。荧光素钠显示星形细胞瘤边界的可靠性和真实性优于显示少突胶质细胞瘤边界(灵敏度84% vs 57%,特异度78% vs 83%,Kappa值0.61(>0.60高度的一致性) vs 0.22(>0.21一致性一般),约登指数0.62 vs 0.40)。结论 术中应用荧光素钠确定肿瘤边界时,在黄染边界5 mm范围内,当肿瘤为星形胶质细胞来源时荧光所示边界可以认为是肿瘤边界;当肿瘤为少突胶质细胞来源时该边界不能认为是肿瘤边界。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(4): 354-358.]

关键词: 胶质瘤; 荧光素钠; 少突细胞瘤; 星形细胞瘤; 胶质瘤边界

中图分类号: R739.41

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.04.007

Value of sodium fluorescein in assisting intraoperative judgment of glioma boundary

XIA Ming, FU Qiang, LI Shao-Shan, LIU Bo, ZHOU Qing-Jiu

Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000 China

Corresponding author: ZHOU Qing-Jiu, Email: zhouqingjiu007@163.com

Abstract: Objective To investigate the performance of sodium fluorescein in intraoperative judgment of glioma boundary in different pathological types of glioma. **Methods** The diagnosis test was performed to select the patients with glioma who underwent intraoperative imaging with sodium fluorescein in Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, from January to June 2020. Samples of the yellow-stained area and the nearby non-yellow-stained area (about 5 mm outside the yellow-stained area) under a fluorescence microscope were collected for pathological examination, and a statistical analysis was performed and the receiver operating characteristic curve was plotted to compare the accuracy of sodium fluorescein in the diagnosis of glioma with different pathological sources. **Results** A total of 52 patients were enrolled, among whom there were 31 male patients and 21 female patients, with a mean age of 46±16 years. Among these 52 patients, 34 had tumor originating from astrocytes and 18 had tumor originating from oligodendrocytes. Sodium fluorescein showed higher reliability and authenticity in displaying the boundary of high-grade glioma than tumor boundary (sensitivity: 98% vs 73%; specificity: 89% vs 97%; Kappa value 0.86 (>0.80 almost identical) vs 0.63 (>0.60 high consistency); Youden index: 0.87 vs 0.71). Sodium fluorescein showed higher reliability and authenticity in displaying the boundary of astrocyte-derived gliomas than that of oligodendrocyte-derived gliomas (sensitivity: 84% vs 57%; specificity: 78% vs 83%; Kappa value 0.61 (>0.60 high consistency) vs 0.22 (>0.21 general consistency); Youden index: 0.62

收稿日期: 2021-02-05; 修回日期: 2021-07-09

作者简介: 夏鸣(1993—), 男, 在读硕士, 住院医师, 主要从事中枢神经系统肿瘤的研究, Email: Charlth_xia@163.com。

通信作者: 周庆九(1969—), 男, 博士, 主任医师, 主要从事中枢神经系统肿瘤的研究, Email: zhouqingjiu007@163.com。

vs 0.40). **Conclusions** When sodium fluorescein is used to determine tumor boundary during surgery within 5 mm of the yellow-stained boundary, the boundary displayed by fluorescence can be regarded as tumor boundary when the tumor is derived from astrocytes, while this boundary cannot be defined as tumor boundary when the tumor is derived from oligodendrocytes. [Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(4): 354-358.]

Keywords: glioma; fluorescein sodium; oligodendroglioma; astrocytoma; boundary of glioma

脑胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤,年发病率为5~8/10万,约占颅脑恶性肿瘤的80%^[1]。2018年《胶质瘤专家共识》指出胶质瘤治疗的主要方法是最大限度的安全切除加辅助化疗^[2]。大量研究指出胶质瘤的预后与肿瘤级别,肿瘤切除程度(包括肿瘤切除范围,功能区保护)和术后辅助治疗密切相关^[3-5]。目前最大范围的安全切除仍是胶质瘤治疗的主要手段。胶质瘤具有异质性,肿瘤内部不同区域,随着疾病的进展会出现的不同亚型的细胞^[6-7]。除肿瘤中心坏死组织外在肉眼和普通手术显微镜下很难区分。在传统神经外科手术中,多需要凭借医生的主观经验进行判断,不仅给手术者带来较大挑战,还使手术同质化差,导致患者预后差异大,影响后续治疗。

随着手术设备的发展,多模态的肿瘤切除术(包括术中磁共振成像、肿瘤荧光显影,术中超声,术中脑功能区定位等)可以更好的达到肿瘤全切(gross total resection, GTR)^[2]。术中磁共振成像和术中皮层功能区定位购置成本过高,绝大部分医院无法购置上述设施。术中超声和术中荧光显影因设备便宜、操作简单、诊断准确率较高、设备运营维护成本低,目前已基本普及。常用的术中荧光显影剂有5-氨基酮戊酸、吲哚菁绿和荧光素钠。荧光素钠以其易用性和安全性,广泛应用于胶质瘤和颅内转移瘤的术中显影,有文献指出应用荧光素钠可显著提高肿瘤的全切率^[7]。

本研究为探究不同病理类型的胶质瘤在术中应用荧光素钠后胶质瘤边界判断效能的差别。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2020年1月—2020年6月于新疆医科大学第一附属医院神经外科住院治疗的患者,术前影像诊断考虑高级别胶质瘤,接受手术治疗后病理证实为高级别胶质瘤的患者。采集标本时在荧光显微镜下对肿瘤标本进行区分,取显微镜下黄染部分和黄染部分外约5 mm不黄染区域,分别定义为黄染区和非黄染区。

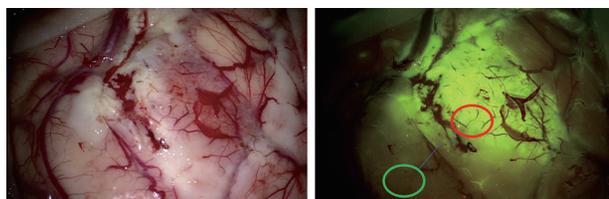
1.2 研究方法

本研究采用诊断试验的方法对黄染区和非黄染区的肿瘤标本进行病理学检查。使用灵敏度,特异度,似然比和约登指数对荧光素钠辅助下对于不同来源的胶质瘤进行术中诊断的真实性进行评价;使用一致性检验(Kappa分析)对荧光素钠辅助下对于不同来源的胶质瘤进行术

中判断肿瘤边界的可靠性进行评价。

1.2.1 手术设备与试剂 手术显微镜为 Carl Zeiss PENTERO 900;荧光素钠注射液(历设得,5 mL:500 mg,美国 Alcon Puerto Rico 公司)。

1.2.2 手术方法及标本取材 患者于术前1天行荧光素钠过敏试验(荧光素钠1 mL,皮下注射),观察有无荨麻疹、呼吸困难、哮喘发作、血压下降等过敏反应。手术当日于开颅术前约45 min 静脉注射荧光素钠(2 mg/kg)^[8]。按常规手术方法定位肿瘤、开颅,剪开硬脑膜并暴露肿瘤后,分别在普通光源和荧光模式光源下,观察肿瘤并初步确定肿瘤边界,直至肿瘤切除。分装标本,术中主刀和一助在荧光显微镜下判断黄染肿瘤组织取一致意见,收集并标记为黄染区标本。肿瘤切除过程中在黄染区边缘约5 mm 靠近皮层区域采集少量组织(图1),标记为非黄染区标本。常规关颅。

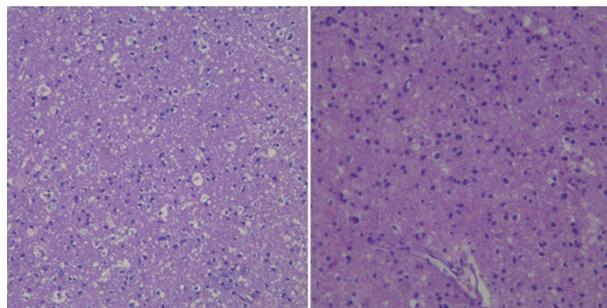


左侧图为正常光下显微镜下所见;可见肿瘤较周边脑组织透明,具有明显异型性,与正常脑组织边界不清。右侧图为荧光显微镜下所见;可见肿瘤组织明显黄染,红色标记部位为取材荧光阳性部位,绿色标记部位为荧光阴性部位。深蓝色曲线为荧光素钠所示肿瘤边界;橘色连线为取材部分到肿瘤边界距离。

图1 显微镜下术中所见及取材部位

1.3 标本判读

以病理诊断为金标准,具体参照《中枢神经系统肿瘤分类2016年修订版》标准执行^[9]。具体方法如下:①肿瘤的判断以形态学为主;②肿瘤来源的判断主要以IDH-1是否突变结合1p/19q染色体是否共缺失作为主要依据;③端粒酶逆转录酶(TERT)和 α -地中海贫血/X连锁智力低下综合征(ATRX)基因突变情况作为肿瘤来源的参考指标。请2名神经病理专业副高级及以上医师分别独立判读病理切片并出具报告,如意见不一致则请另外一名神经肿瘤专业副高级及以上病理医师阅片后共同讨论得出金标准诊断。



左侧图可见细胞核密度增加,细胞分布不均匀,有典型的栅栏样坏死,诊断为胶质母细胞瘤。右侧图可见细胞排列整齐,核仁完整,诊断为正常脑组织。

图2 典型病理所见(HE×10)

1.4 统计方法

统计学方法采用SPSS 26.0统计软件。符合正态分布的定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以例表示。使用灵敏度、特异度、约登等指数和Kappa值描述诊断实验的真实性和可靠性。使用计算机绘制ROC曲线并对比曲线下面积(AUC)判断诊断效率的高低。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

符合纳入标准的患者共有52例。其中,男性31例,女性21例;年龄最小12岁,最大82岁,平均(46±16)岁;星形胶质细胞来源34例,少突胶质细胞来源18例。星形胶质细胞来源的肿瘤中荧光显微镜下非黄染区存在肿瘤者5例,少突胶质细胞来源的肿瘤中荧光显微镜下非黄染区存在肿瘤者13例。

2.2 标本判读结果

黄染区域的标本中有肿瘤47例,无肿瘤5例;其中星形细胞来源肿瘤30例,少突胶质细胞来源肿瘤17例;非黄染区域的标本中,有肿瘤18例,无肿瘤34例,其中星形细胞来源肿瘤5例,少突胶质细胞来源肿瘤13例。见表1。

表1 病理检测结果 例

		高级别	低级别	无肿瘤	合计
黄染区	星形细胞来源	30	0	4	34
	少突细胞来源	16	1	1	18
合计		46	1	5	52
非黄染区	星形细胞来源	1	4	29	34
	少突细胞来源	0	13	5	18
合计		1	17	34	52

2.3 诊断试验结果

以病理诊断有无肿瘤作为金标准,所获得边界为肿瘤边界;以及病理高级别胶质瘤为金标准+,低级别胶质瘤或无肿瘤作为金标准-,所获得边界为高级别胶质瘤所

在边界。荧光素钠显示高级别胶质瘤边界的可靠性和真实性优于显示肿瘤边界(可靠性:灵敏度98% vs 73%,特异度89% vs 97%;真实性:Kappa值0.86(>0.80几乎完全一致) vs 0.63(>0.60高度的一致性),约登指数0.87 vs 0.71)。见表2。

表2 不同金标准对荧光素钠所示肿瘤边界的诊断试验 例

	金标准+	金标准-	合计	可靠性	真实性
以病理有无肿瘤作为金标准					
黄染区	51	1	52		
非黄染区	18	34	52		
合计	69	35	104		
				灵敏度:73%	Kappa值:0.63
				特异度:97%	约登指数:0.71
以病理高低级别作为金标准					
黄染区	46	6	52		
非黄染区	1	51	52		
合计	47	57	104		
				灵敏度:98%	Kappa值:0.86
				特异度:89%	约登指数:0.87

以病理诊断有无肿瘤作为金标准,所获星形细胞瘤边界,所获少突胶质细胞瘤边界。荧光素钠显示星形细胞瘤边界的可靠性和真实性优于显示少突胶质细胞瘤边界(可靠性:灵敏度84% vs 57%,特异度78% vs 83%;真实性:Kappa值0.61(>0.60高度的一致性) vs 0.22(>0.21一致性一般),约登指数0.62 vs 0.40)。见表3。

表3 不同病理来源胶质瘤所示肿瘤边界的诊断试验(以病理有无肿瘤作为金标准) 例

	金标准+	金标准-	合计	可靠性	真实性
星形细胞来源胶质瘤					
黄染区	26	8	34		
非黄染区	5	29	34		
合计	31	37	68		
				灵敏度:84%	Kappa值:0.61
				特异度:78%	约登指数:0.62
少突细胞来源胶质瘤					
黄染区	17	1	18		
非黄染区	13	5	18		
合计	30	6	36		
				灵敏度:57%	Kappa值:0.22
				特异度:83%	约登指数:0.40

2.4 ROC曲线

应用荧光素钠判断胶质瘤高低级别,判断胶质瘤是否存在,AUC值为0.871 vs 0.937(如图3)。星形细胞来源肿瘤和少突细胞来源肿瘤的AUC值为0.811 vs 0.700

(如图4)。

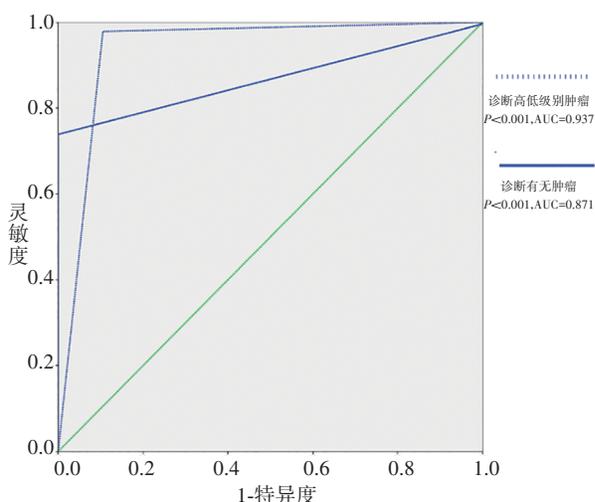


图3 应用荧光素钠在不同场景下判断肿瘤的ROC曲线

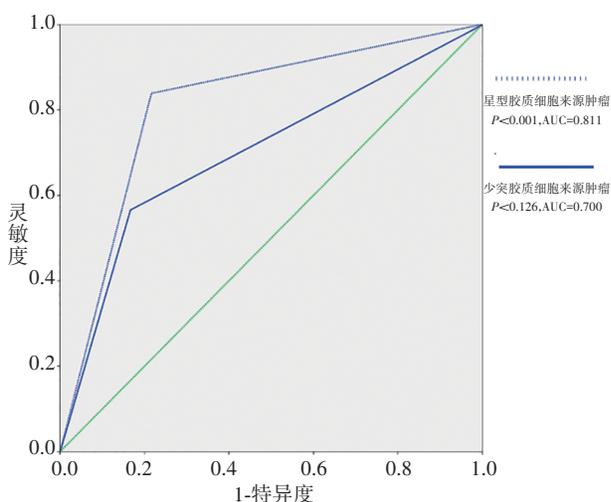


图4 荧光素钠对不同来源的肿瘤诊断的ROC曲线对比

3 讨论

星形胶质细胞体积最大,胞体呈星形,核圆或卵圆形,胞体染色较浅。其作用是填充神经元胞体及突起之间,起支持和绝缘作用,星形胶质细胞参与构成血脑屏障^[10-11]。星形细胞瘤变时,肿瘤细胞分布相对稀疏,大小不一,有多个长短不一的突起^[10-11]。星形胶质细胞因参与构成血脑屏障,当其瘤变后,细胞功能异常导致组织通透性改变,更容易使荧光素钠从血管中溢出,因此该种类型肿瘤在荧光下显影较好^[12]。

少突胶质细胞分布于神经元细胞附近及轴突周围。胞体较小,胞核呈卵圆形,染色质致密。因其在镀银染色中突起较少故得名,主要功能是参与构成髓鞘^[10]。少突星形细胞瘤变时,细胞核形态不规则,核仁大而明显,少突区内大部分胞浆空化,异染色质呈小块状散在分布,电镜下少突胶质细胞膜表面可见短小突起,部分瘤胞浆内

可见微丝分布^[12]。少突胶质细胞发生肿瘤早期发生肿瘤性改变时上述结构尚能维持与神经元之间的紧密连接未破坏,此可为应用荧光素钠后显影较差的原因^[12]。

上述两种类型的肿瘤级别较低时,少突胶质细胞来源的肿瘤对血脑屏障破坏不明显,血脑屏障的毛细血管内皮尚能维持完整的紧密连接,应用荧光素钠后肿瘤部分几乎不显影;而星形细胞来源的肿瘤由于自身构成血脑屏障的原因,在病变初期就可以使血脑屏障的毛细血管内皮出现孔隙,应用荧光素钠后肿瘤部分可达到显影条件^[13-15]。在肿瘤级别较高时,肿瘤中心细胞排列紊乱甚至出现坏死,血脑屏障的正常结构完全丧失,应用荧光素钠后荧光物质完全漏出,因此肿瘤高级别部分染色均非常充分,不同类型肿瘤的差异不明显^[15-17]。但是由于胶质瘤的异质性,不同来源的肿瘤可在周边存在级别较低的肿瘤,因此即使最终病理诊断都是胶质母细胞瘤,不同来源的肿瘤在边界处仍具备该种肿瘤来源的特征。在荧光素钠辅助下,术者对肿瘤边界的判断仍可遵循本文结论。

目前对胶质瘤浸润深度的研究文献非常少。主要问题有:①对于胶质瘤的起始位置无法确定,因胶质瘤本身为浸润性生长,无法判断其起始界限;②有研究指出^[18-20],大部分胶质瘤复发位置在原手术边缘深处0.5~2.0 cm。因此有学者认为胶质瘤的平均浸润深度可能在0.5~2.0 cm;③胶质瘤具有嗜神经生长的特性,低级别胶质瘤浸润生长时往往能沿神经纤维播散至较远处,在现有病理检查条件下无法确定肿瘤病灶是否为原发。荧光素钠技术可以通过染色界限为肿瘤提供客观的标记。本次研究所取材部分为应用荧光素钠技术所示染色界限的外侧约5 mm便是基于上述原因。从而可以认为在应用荧光素钠染色界限的技术下,综合上述研究结果,当以荧光素钠黄染界限作为客观标志时,则绝大部分88%(30/34)星形细胞来源的肿瘤在荧光素钠黄染界限内,多数72%(13/18)少突胶质细胞瘤的浸润深度则在荧光素钠黄染界限的5 mm处仍有残留。

本次研究的总体结果(灵敏度98%与特异度89%)与REY-DIOS等^[21]诊断胶质瘤(灵敏度79%与特异度100%)、ACERBI等^[22]诊断高级别胶质瘤和脑转移性癌(灵敏度94%与特异度89.5%)、DIAZ等^[8]诊断高级别胶质瘤和脑转移性癌(灵敏度82.2%与特异度90.9%)、毛承亮等^[23]诊断高级别胶质瘤(灵敏度89.2%与特异度90.7%)结果类似,甚至较之前研究灵敏度更高。原因可能与手术设备的更新与荧光素钠应用技术的成熟相关。上述同类研究仅对高级别胶质瘤和脑转移瘤在术中荧光素钠显影进行诊断效能的对比。本次研究特别强调了荧光素钠在术中对于星形胶质细胞来源的肿瘤边界判别的意义。在星形胶质细胞来源肿瘤中,以病理有肿瘤作为

金标准+以病理无肿瘤作为金标准这一诊断试验中, Kappa 值为 $0.61 > 0.60$, 说明该方法对于肿瘤的判断肿瘤边界的判断与事实具有高度的一致性。因此, 星形细胞来源的胶质瘤的边界在应用荧光素钠术中显影时可以被确定。而在少突胶质细胞来源肿瘤中, 以病理有肿瘤作为金标准+以病理无肿瘤作为金标准这一诊断试验中, 有 Kappa 值为 $0.22 < 0.40$, 说明该方法对于肿瘤的边界判断与事实一致性一般。因此, 少突胶质细胞来源的胶质瘤的边界在应用荧光素钠术中显影时不能够被确定。

综上所述, 术中使用荧光素钠确定肿瘤边界时, 在黄染边界 5 mm 精度范围内, 当肿瘤为星形胶质细胞来源时黄染区边界可以认为是肿瘤边界; 当肿瘤为少突胶质细胞来源时黄染区边界不能作为肿瘤边界。

参 考 文 献

- [1] COHEN N, WELLER RO. WHO classification of tumours of the central nervous system (4th edition)[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007, 33(6): 710-711.
- [2] 《中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南》编写组. 中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南(2015)[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(7): 485-509.
- [3] LI YM, SUKI D, HESS K, et al. The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: can we do better than gross-total resection?[J]. *J Neurosurg*, 2016, 124(4): 977-988.
- [4] MOTOMURA K, CHALISE L, OHKA F, et al. Supratotal resection of diffuse frontal lower grade gliomas with awake brain mapping, preserving motor, language, and neurocognitive functions [J]. *World Neurosurg*, 2018, 119: 30-39.
- [5] ZHANG NN, SHANG ZD, WANG ZG, et al. Molecular pathological expression in malignant gliomas resected by fluorescein sodium-guiding under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter[J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1): 195.
- [6] MARTINEZ-LAGE M, LYNCH TM, BI YT, et al. Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7(1): 203.
- [7] YANO H, NAKAYAMA N, OHE N, et al. Pathological analysis of the surgical margins of resected glioblastomas excised using photodynamic visualization with both 5-aminolevulinic acid and fluorescein Sodium[J]. *J Neurooncol*, 2017, 133(2): 389-397.
- [8] DIAZ RJ, DIOS RR, HATTAB EM, et al. Study of the biodistribution of fluorescein in glioma-infiltrated mouse brain and histopathological correlation of intraoperative findings in high-grade gliomas resected under fluorescein fluorescence guidance[J]. *J Neurosurg*, 2015, 122(6): 1360-1369.
- [9] BARNARD RO. The classification of tumours of the central nervous system[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1982, 8(1): 1-10.
- [10] 邹仲之, 李继承. 组织学与胚胎学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [11] 曲宝清, 米蕊芳, 杜江, 等. 脑胶质瘤超微结构及组织形态观察 39 例[J]. *中国临床医生杂志*, 2019, 47(5): 561-563.
- [12] 王育胜, 陈伟招, 柯以铨, 等. 脑胶质瘤动物模型中血脑屏障紧密连接的变化[J]. *中华神经医学杂志*, 2008, 7(11): 1101-1105.
- [13] SCHEBESCH KM, BRAWANSKI A, HOHENBERGER C, et al. Fluorescein sodium-guided surgery of malignant brain tumors: history, current concepts, and future project[J]. *Turk Neurosurg*, 2016, 26(2): 185-194.
- [14] LEE J, BAIRD A, ELICEIRI BP. In vivo measurement of glioma-induced vascular permeability[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 763: 417-422.
- [15] HENDRICKS BK, COHEN-GADOL AA, MILLER JC. Novel delivery methods bypassing the blood-brain and blood-tumor barriers[J]. *Neurosurg Focus*, 2015, 38(3): E10.
- [16] ABBOTT NJ, RÖNNBÄCK L, HANSSON E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(1): 41-53.
- [17] 陈伟招, 徐如祥, 杨志林, 等. 胶质瘤对血脑屏障内皮细胞间连接的影响[J]. *解剖学杂志*, 2003, 26(5): 415-419.
- [18] 田海龙, 祖玉良, 何伟, 等. 磁共振波谱联合荧光素钠导航显微手术切除幕上高级别胶质瘤的随访结果和临床意义[J]. *中国医学科学院学报*, 2017, 39(5): 643-648.
- [19] 王超超, 田海龙, 姜慧峰, 等. 荧光素钠“黄荧光”导航辅助高级别胶质瘤手术治疗的临床意义[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2017, 55(11): 32-37.
- [20] 金鑫, 杜彬, 闫学强, 等. 术中 B 超联合荧光素钠在神经胶质瘤切除术的应用[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2017, 22(2): 70-73.
- [21] LI YP, REY-DIOS R, ROBERTS DW, et al. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade gliomas: a comparison of the present techniques and evolution of future strategies [J]. *World Neurosurg*, 2014, 82(1-2): 175-185.
- [22] ACERBI F, BROGGI M, EOLI M, et al. Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade gliomas? [J]. *Neurosurg Focus*, 2014, 36(2): E5.
- [23] 毛承亮, 唐凯, 郑聪颖, 等. 荧光素钠引导下高级别胶质瘤的手术治疗[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2017, 22(2): 68-70.

责任编辑: 王荣兵