

# 液体活检在中枢神经系统肿瘤中的应用

丁美娟, 杨宇\*

(哈尔滨医科大学附属第二医院肿瘤内科, 黑龙江 哈尔滨 150000)

**摘要:**目前用于中枢神经系统肿瘤诊断和监测的标准临床手段具有一定的局限性。而液体活检的出现为监测中枢神经系统恶性肿瘤提供一种具有前景且侵袭性较小的手段。脑脊液中循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)及循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)的检测可用于实体肿瘤脑膜转移的辅助诊断,敏感度和特异度均高于标准临床手段。而且由于血脑屏障的存在,脑脊液循环于脑室和脊髓池,含有大量中枢神经系统代谢物质,脑脊液中非肿瘤源性 DNA 水平较低,所以脑脊液中 CTCs 与 ctDNA 的含量较血浆丰富,且携带不同于组织与血浆的基因突变,对脑脊液反复取样能够及早发现耐药基因突变,可以辅助诊断中枢系统原发肿瘤及脑实质的转移。脑脊液 CTCs 及 ctDNA 的动态监测可以反映治疗效果。

**关键词:**中枢神经系统肿瘤/诊断;中枢神经系统肿瘤/脑脊髓液;活组织检查;肿瘤细胞,循环/病理学;DNA,肿瘤/脑脊髓液;DNA,肿瘤/分析;综述

中图分类号:R739.4;R730.4 文献标志码:A 文章编号:1001-1692(2019)05-0469-05

目前用于中枢神经系统(central nervous system, CNS)肿瘤的诊断和监测的标准临床手段具有一定的局限性。虽然组织活检提供组织学和遗传学信息,但获得中枢神经系统组织具有侵入性,风险极大,而且不利于长期反复取样。最常见的非侵入性手段是神经系统影像学检查,MRI 检查可以缓慢显示肿瘤进展,但是治疗相关的 MRI 变化还有可能为假性进展<sup>[1]</sup>。液体活检作为体外诊断的一个分支,是指通过检验血液或者其他体液如尿液、唾液、胸腔积液和脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)等,对肿瘤等疾病作出诊断。包括循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)、循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、微小 RNA 和微泡(外泌体)、甚至血小板等多项技术<sup>[1-2]</sup>,是对生物体液中的肿瘤细胞或核苷酸的实时取样,为监测中枢神经系统恶性肿瘤提供一种具有前景且侵袭性较小的手段。而且 CSF 循环于脑室和脊髓池,与中枢神经系统直接接触,含有大量的中枢神经系统代谢物质,因此成为检测中枢神经系统肿瘤的理想样本<sup>[3]</sup>。本文就液体活检在原发性和继发性中枢神经系统恶性肿瘤中的作用进行综述,并探讨其应用的主要限制因素。

## 1 CTCs 和 ctDNA

### 1.1 CTCs 概念

CTCs 是从肿瘤原发部位或转移部位脱落的细胞,随后迁移到血液循环或其他体液中。CTCs 已经被证实发生在肿瘤转移的发生和发展中起至关重要的作用,但 CTCs 从肿瘤原发灶中脱落、进入血液循环和侵入靶器官以用于转移的定植过程非常复杂<sup>[2]</sup>。阐明这些机制对指导早期治疗、检测耐药甚至预防转移有重要意义。虽然对 CTCs 侵袭性的倾向和表型了解尚不完全,但目前已有大量研究证实 CTCs 在恶性实体肿瘤诊断、治疗和预后中的临床重要性<sup>[2]</sup>。

### 1.2 细胞游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 及 ctDNA 概念

cfDNA 是细胞在溶解或凋亡过程中释放到血液循环或其他体液(包括 CSF)中的单链或双链 DNA 片段。1977 年,在肿瘤患者血清中首次发现 cfDNA,但直到 1994 年才发现部分循环 DNA 片段存在与肿瘤相同的突变,这一发现证实部分 cfDNA 是由肿瘤来源的 DNA 组成的<sup>[4]</sup>。这种完全来源于肿瘤细胞的 cfDNA 称为 ctDNA,是从原发或转移的坏死、凋亡或快速增殖的细胞以及 CTCs 中脱落的 DNA 片段<sup>[5]</sup>。

ctDNA 的发现提供一种发现肿瘤的非侵袭性手段,并且能够识别可接受靶向治疗的肿瘤突变类型以及明确耐药的特殊机制。ctDNA 检测的一个挑战是血清中 ctDNA 的相对稀缺性,血清 ctDNA 在 cfDNA 中的比例为 1% ~ 10%,取决于疾病分期和肿

收稿日期:2018-07-31

DOI:10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.05.017

作者简介:丁美娟(1992-),女,黑龙江哈尔滨人,硕士生,从事恶性肿瘤基础与临床研究

\*通信作者 E-mail:13836125585@163.com



于 CTCs 与肿瘤预后的相关性已经得到大量证实,所以这些特殊类型的 CTCs 与 CTSCs 的关系,尤其对于肿瘤的早期诊断意义及对健康人的筛查更值得持续关注。

**2.2.2 CSF 中 ctDNA 的治疗意义** 近年来,ctDNA 作为治疗反应的标志物也得到应用。有研究对原发性或转移性脑肿瘤患者不同时间点 CSF ctDNA 进行检测,同时进行颅脑影像学的检查<sup>[15]</sup>。CSF ctDNA 水平在术后和全身治疗有效影像学缓解时减少,随着治疗进展 ctDNA 水平下降后上升。对接受手术的 EGFR 突变型胶质母细胞瘤进行 ctDNA 检测,全切除血清 ctDNA EGFR 消失,而次全切除仍可检测到 ctDNA EGFR<sup>[14]</sup>。其他研究也报道中枢神经系统肿瘤 CSF ctDNA 水平与治疗反应的一致性<sup>[24]</sup>。CSF ctDNA 可用于评估中枢神经系统肿瘤临床相关基因组改变,ctDNA 可显示临床上重要的突变,有助于指导治疗决策,并显示早期耐药机制<sup>[7]</sup>。目前基于 ctDNA 都是一些小样本的研究,仍然需要对这部分患者 ctDNA 的检测作进一步的探索。

ctDNA 也被研究者作为调整治疗方案的工具。在一项研究中,对 20 例伴有脑转移的非小细胞肺癌患者组织及 CSF 进行 EGFR 的突变检测<sup>[19]</sup>,其中 2 例患者 CSF 检测到 EGFR 突变,而组织阴性,这表明 CSF 可携带不同于组织的突变,在 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂的治疗后也取得临床缓解。在另一项评估 CNS 肿瘤的研究中,CNS 转移的患者基于既往组织基因突变的结果,进行靶向治疗,部分患者接受治疗的同时出现 CNS 疾病的进展<sup>[7]</sup>,在这部分患者中,4 例 CSF 中发现治疗开始时未出现在组织中的耐药突变。目前的证据表明,ctDNA 可用于实时识别具有重要意义的靶向突变,在转移性疾病中,这种突变可能是中枢神经系统特有的。

虽然人类基因组包含人体的全部遗传信息,但蛋白质是完成生命活动的终极执行者,也是机体各种细胞之间差异的决定因素。不同细胞活跃基因不同,合成的蛋白质也不同,这也包括肿瘤细胞。蛋白质组学作为生物过程的功能实体,表达水平直接和疾病过程和病理学相关,成为生物标志物和治疗的靶标。目前的蛋白质组学技术在单一反应中分析组织或生物液体的整个蛋白质组的能力受到限制。目前,已在多种肿瘤如肺癌、胃癌和胰腺癌中找到有差异表达的蛋白质,有望成为有效的肿瘤标志物。

血清细胞骨架相关蛋白 4 (cytoskeleton-associated protein 4, CKAP4) 水平可区分肺癌患者和健康对

照者; I 期腺癌或鳞状细胞癌患者血清 CKAP4 水平高于健康对照组 ( $P < 0.01$ ),而在 I 期非小细胞肺癌中也检测到 CKAP4 水平的升高<sup>[25]</sup>。胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor-binding protein, IGFBP)2 和 IGFBP3 蛋白在早期胰腺癌患者体内存在变化<sup>[26]</sup>。研究显示,血清蛋白质的不同表达与胃癌的分子分型相关,而且这种分子分型与生存预后和化疗敏感度密切相关,13% (25/183) 的基因虽然检测到突变,却未检测到对应的蛋白表达;其中,患者有 KRAS 和 NRAS 激活突变,癌旁组织也发现蛋白表达,但在癌组织中却检测不到 KRAS 或 NRAS 蛋白。如果基于 RAS 基因测序指导精准医疗,对于不存在治疗蛋白靶点的肿瘤患者,很可能无法受益<sup>[27]</sup>。

然而,与血清不同的是,CSF 是一种代谢活性的培养液,含有远少于血清的复杂的蛋白质补体<sup>[28]</sup>。这一特性可以使肿瘤特异度标志物更清楚地被测量,更容易被发现,而成为潜在生物标志物的良好来源。CSF 蛋白质组学分析已应用于发现中枢神经系统原发恶性肿瘤及转移瘤,如软脑膜转移、中枢神经系统淋巴瘤和胶质瘤<sup>[29]</sup>。在 CNS 淋巴瘤中,这些研究首次揭示蛋白质组分析在生物标志物识别中的应用价值,表明与标准的 CSF 细胞学方法比较,识别特定的蛋白质对检测转移瘤有更大的敏感度<sup>[30]</sup>。对原发性神经恶性肿瘤 CSF 的蛋白质组学检测在脑膜瘤和星形细胞脑肿瘤也取得一定的成功。CSF 中蛋白质含量与疾病发展相关。CSF 中蛋白标志物可用于监测治疗的疗效和疾病的复发。

### 3 结 语

CSF 存在于脑室及蛛网膜下腔,包围并支持着整个脑及脊髓,由于其独特的解剖位置及血-脑脊液屏障,使得 CSF 中 CTCs 及 ctDNA 的存在对中枢神经系统肿瘤的诊断具有更高的敏感度和特异度。与血清比较,CSF ctDNA 更能反映颅内的基因谱,不易受背景 DNA 的干扰,在颅内肿瘤的诊断和治疗中更具优势。血浆 CTCs 单细胞全基因组测序与组织一致性接近 90%,血浆 ctDNA 可检测出不同来源的特征性突变,可以确定不明原发部位肿瘤 (carcinoma of unknown primary, CUP)<sup>[31]</sup>。这提示 CSF CTCs 单细胞测序及 ctDNA 的检测能够寻找肿瘤脑转移的原发部位。CSF 中 CTCs 与 ctDNA 的含量较血浆丰富,且携带不同于组织与血浆的基因突变,所以对 CSF 反复取样能够及早发现耐药基因突变,调整治疗方案。

蛋白质具有行使功能,蛋白质组学的分析对肿瘤治疗更具指导意义。CSF 中的特殊蛋白质可用于中枢神经系统肿瘤的诊断,而且 CSF 中蛋白质含量与疾病发展相关,可监测治疗的疗效和疾病的复发。

综上所述,CSF 与血清比较,受背景标志物干扰更小,所以 CSF 中 CTCs、ctDNA 及蛋白质的检测在中枢神经系统肿瘤的诊断、治疗和预后更具优势。在颅内肿瘤中,CSF CTCs 数量、ctDNA 全基因组的突变基因种类与蛋白质的类型区别于血清,因此在中枢神经系统肿瘤中,检测 CSF 中的特殊生物标志物应在诊治的全程充分发挥作用。目前仍需要大样本的前瞻性研究来证实 CSF 的检测是中枢神经系统肿瘤诊治的必要手段。

#### 参考文献:

- [1] Cohen JV, Alomari AK, Vortmeyer AO, et al. Melanoma brain metastasis pseudoprogression after pembrolizumab treatment[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(3): 179 - 182.
- [2] Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 298 - 306.
- [3] 黄秀, 关明. 基于脑脊液的液体活检在中枢神经系统肿瘤诊治中的作用[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(7): 554 - 558.
- [4] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. *Cancer Res*, 1977, 37(3): 646 - 650.
- [5] Crowley E, di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(8): 472 - 484.
- [6] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985 - 990.
- [7] Pentsova EI, Shah RH, Tang J, et al. Evaluating cancer of the central nervous system through next-generation sequencing of cerebrospinal fluid[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(20): 2404 - 2415.
- [8] Wang Y, Springer S, Zhang M, et al. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(31): 9704 - 9709.
- [9] Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224.
- [10] Nevel KS, Wilcox JA, Robell LJ, et al. The utility of liquid biopsy in central nervous system malignancies[J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20(8): 60.
- [11] Nayak L, Fleisher M, Gonzalez-Espinoza R, et al. Rare cell capture technology for the diagnosis of leptomeningeal metastasis in solid tumors[J]. *Neurology*, 2013, 80(17): 1598 - 1605.
- [12] Lee JS, Melisko ME, Magbanua MJM, et al. Detection of cerebrospinal fluid tumor cells and its clinical relevance in leptomeningeal metastasis of breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 154(2): 339 - 349.
- [13] Lin X, Fleisher M, Rosenblum M, et al. Cerebrospinal fluid circulating tumor cells: a novel tool to diagnose leptomeningeal metastases from epithelial tumors[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(9): 1248 - 1254.
- [14] Salkeni MA, Zarzour A, Ansay TY, et al. Detection of EGFR<sup>III</sup> mutant DNA in the peripheral blood of brain tumor patients[J]. *J Neurooncol*, 2013, 115(1): 27 - 35.
- [15] De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CK, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8839.
- [16] Pan W, Gu W, Nagpal S, et al. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(3): 514 - 522.
- [17] Liu BL, Cheng JX, Zhang W, et al. Quantitative detection of multiple gene promoter hypermethylation in tumor tissue, serum, and cerebrospinal fluid predicts prognosis of malignant gliomas[J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(6): 540 - 548.
- [18] Li YS, Jiang BY, Yang JJ, et al. Unique genetic profiles from cerebrospinal fluid cell-free DNA in leptomeningeal metastases of EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a new medium of liquid biopsy[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(4): 945 - 952.
- [19] Yang H, Cai L, Zhang Y, et al. Sensitive detection of EGFR mutations in cerebrospinal fluid from lung adenocarcinoma patients with brain metastases[J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(5): 558 - 563.
- [20] Patel AS, Allen JE, Dicker DT, et al. Identification and enumeration of circulating tumor cells in the cerebrospinal fluid of breast cancer patients with central nervous system metastases[J]. *Oncotarget*, 2011, 2(10): 752 - 760.
- [21] Malani R. Cerebrospinal fluid circulating tumor cells (CSF CTC) for real-time patient monitoring and response to treatment[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(suppl): abstr 11549.

# 弥漫大 B 细胞淋巴瘤预后影响因素的研究进展

张林艳<sup>1</sup>, 苏丽萍<sup>2\*</sup>

(1. 山西医科大学研究生院, 山西 太原 030000; 2. 山西医科大学附属肿瘤医院血液科, 山西 太原 030000)

**摘要:**弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 是非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma, NHL) 中最常见的亚型, 在临床表现、组织形态学及预后方面具有很大异质性。利妥昔单抗的出现, 使得 DLBCL 的治愈率达到 60% ~ 80%, 但仍然有三分之一的患者, 预后较差。早期发现预后较差的患者, 临床医师及时调整治疗方案以延长患者生存期具有十分重要的意义。随着精准医疗时代的到来, 分子生物学及遗传因素对患者的预后意义不断被发现, 并进一步完善和改进现有的预后评分系统。本文就 DLBCL 临床预后系统的演进及分子和遗传预后因素的研究进展进行综述。

**关键词:**淋巴瘤, 大 B 细胞, 弥漫性/病理学; 淋巴瘤, 大 B 细胞, 弥漫性/代谢; 原癌基因蛋白质 c-bcl-2/代谢; 原癌基因蛋白质 c-myc/代谢; 基因; 突变; 预后; 影响因素分析; 综述

中图分类号: R733.4; R730.23 文献标志码: A 文章编号: 1001-1692(2019)05-0473-05

收稿日期: 2018-12-12

DOI: 10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.05.018

作者简介: 张林艳 (1992-), 女, 山西吕梁人, 硕士, 从事恶性血液病的诊断及治疗研究

\* 通信作者 E-mail: sulp2005@sohu.com

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 是非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma, NHL) 中发病率最高的亚型, 占有 NHL 病例数的 30% ~ 35%<sup>[1]</sup>。DLBCL 是一组异质性肿瘤<sup>[2]</sup>, 早期发现预后较差的患者, 临床上及时调整治疗策略延长生存期十分重要。分子病理及靶向治

- ation of antibody-based and LC-MS/MS-based proteomics [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161009.
- [22] Mirza S, Jain N, Rawal R. Evidence for circulating cancer stem-like cells and epithelial-mesenchymal transition phenotype in the pleurospheres derived from lung adenocarcinoma using liquid biopsy [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 101-110.
- [23] Chiba T, Kanai F, Iwama A, et al. Circulating cancer stem cells: a novel prognostic predictor of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2013, 2(1): 4-6.
- [24] Li Y, Pan W, Connolly ID, et al. Tumor DNA in cerebral spinal fluid reflects clinical course in a patient with melanoma leptomeningeal brain metastases [J]. *J Neuro Oncol*, 2016, 128(1): 93-100.
- [25] Yanagita K, Nagashio R, Jiang SX, et al. Cytoskeleton-associated protein 4 is a novel serodiagnostic marker for lung cancer [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(6): 1328-1333.
- [26] Yoneyama T, Ohtsuki S, Honda K, et al. Identification of IGFBP2 and IGFBP3 as compensatory biomarkers for CA19-9 in early-stage pancreatic cancer using a combination of antibody-based and LC-MS/MS-based proteomics [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161009.
- [27] Ge S, Xia X, Shen L, et al. A proteomic landscape of diffuse-type gastric cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1012.
- [28] Khwaja FW, Nolen JD, Mendrinis SE, et al. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid discriminates malignant and nonmalignant disease of the central nervous system and identifies specific protein markers [J]. *Proteomics*, 2006, 6(23): 6277-6287.
- [29] Niclousa SP, Faacka F, Rajcevic U. Glioma proteomics: Status and perspectives [J]. *J Proteomics*, 2010, 73(10): 1823-1838.
- [30] Roy S, Josephson SA, Fridlyand J, et al. Protein biomarker identification in the CSF of patients with CNS lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(1): 96-105.
- [31] Kato S, Krishnamurthy N, Banks KC, et al. Utility of genomic analysis in circulating tumor DNA from patients with carcinoma of unknown primary [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(16): 4238-4246.