

# 脑脊液循环肿瘤细胞检测在非小细胞肺癌 脑膜转移诊断中的应用

姜榕 马春华 朱子龙 李金铎 王斌 孙立伟 吕远

**【摘要】** 目的 初步探讨脑脊液循环肿瘤细胞检测技术在非小细胞肺癌脑膜转移诊断中的应用价值。方法 共5例经脑脊液细胞学确诊的非小细胞肺癌脑膜转移患者,腰椎穿刺采集脑脊液后分别行肿瘤标志物免疫荧光染色-染色体荧光原位杂交(TM-iFISH)、脑脊液细胞学和肿瘤标志物检测。结果 TM-iFISH检测显示脑脊液循环肿瘤细胞数目为18~1823个/7.50 ml,而脑脊液细胞学检查仅2例发现肿瘤细胞,肿瘤标志物检测5例均高于血清正常值范围。MRI增强扫描可见脑膜转移癌之典型征象。结论 TM-iFISH技术用于检测脑脊液中恶性肿瘤细胞较传统方法具有一定优势,可能成为一种新的脑脊液肿瘤细胞检测方法,但其敏感性和特异性尚待扩大样本量进一步证实。

**【关键词】** 肿瘤循环细胞; 脑脊液; 癌,非小细胞肺; 肿瘤转移; 脑膜肿瘤; 原位杂交, 荧光

## Application of detecting cerebrospinal fluid circulating tumor cells in the diagnosis of meningeal metastasis of non-small cell lung cancer

JIANG Rong<sup>1</sup>, MA Chun-hua<sup>1</sup>, ZHU Zi-long<sup>2</sup>, LI Jin-duo<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>1</sup>, SUN Li-wei<sup>1</sup>, LÜ Yuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Intervention, <sup>2</sup>Department of Neurology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin Key Laboratory of Cerebral Vascular and Neurodegenerative Diseases, Tianjin 300060, China

Corresponding author: JIANG Rong (Email: jiangrong1989@sina.com)

**【Abstract】 Objective** To observe a new technology for the detection and enumeration of cerebrospinal fluid (CSF) circulating tumor cells (CTCs) in the diagnosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) with meningeal metastasis (MM). **Methods** Five cases of NSCLC with MM that were diagnosed by CSF cytology were selected, and 20 ml CSF samples were obtained by lumbar puncture for every patient. The tumor marker immunostaining-fluorescence in situ hybridization (TM-iFISH) technology was adapted to detect enrichment and enumeration of circulating tumor cells in 7.50 ml CSF samples; CSF cytology was checked in 10 ml CSF samples; CSF tumor markers were detected in 2.50 ml CSF samples. All of 5 cases were examined by MRI enhancement scan. **Results** TM-iFISH detection found circulating tumor cells numbers ranging 18-1823/7.50 ml. Only 2 cases of patients with CSF cytology examination showed the tumor cells. The results of CSF tumor markers in all samples were higher than normal serum tumor markers detection results. The enhanced MRI scan of 5 cases revealed typical signs of MM. **Conclusions** The TM-iFISH test showed certain advantages in the detection of malignant tumor cells in CSF. This technology may be a new method of detection and enumeration of tumor cells in CSF, but more studies are needed to prove its sensitivity and specificity.

**【Key words】** Neoplasm circulating cells; Cerebrospinal fluid; Carcinoma, non-small-cell lung; Neoplasm metastasis; Meningeal neoplasms; In situ hybridization, fluorescence

脑膜转移癌(MM)亦称脑膜癌病(MC),系指原

发灶中的肿瘤细胞在脑膜和脊髓蛛网膜下隙弥漫性播散或局灶性浸润的中枢神经系统转移癌,常继发于白血病、淋巴瘤、肺癌和乳腺癌<sup>[1]</sup>。未经治疗的脑膜转移癌患者中位生存期仅4~6周,经综合治疗后也仅可达3~5个月<sup>[2]</sup>。目前,早期诊断脑膜转移癌尚属医学难题,明确诊断主要依据中枢神经系统典型症状、脑脊液细胞学检查和MRI增强扫描。其

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2014.08.011

作者单位:300060 天津市环湖医院肿瘤介入科 天津市脑血管与神经变性重点实验室(姜榕、马春华、李金铎、王斌、孙立伟、吕远),神经内科(朱子龙)

通讯作者:姜榕(Email:jiangrong1989@sina.com)

中,脑脊液细胞学检查为诊断“金标准”,但存在敏感性低、仅能定性不能定量等缺点<sup>[3]</sup>。寻找一种更为灵敏的方法来检测脑膜的潜在转移是十分必要的。近年研究表明,血液中的循环肿瘤细胞(CTCs),即脱落进入血液的实体肿瘤细胞与肿瘤转移、耐药、预后和复发等存在极大的关联性<sup>[4-5]</sup>。循环肿瘤细胞属于非血源性上皮细胞,其中大多数细胞表达上皮细胞特有的标志物细胞角蛋白(CK),并可同时某一染色体(如第8号染色体)数目异常(呈非二倍体即单倍体或多倍体)。肿瘤标志物免疫荧光染色-染色体荧光原位杂交(TM-iFISH)平台能够通过富集和分析技术有效鉴别生物体液样本中的各种非血源性上皮细胞并计数,具有高敏感性、高特异性之特点。在本研究中,我们选择天津市环湖医院肿瘤介入科5例已经脑脊液细胞学明确诊断的非小细胞肺癌脑膜转移患者,采用TM-iFISH技术检测其脑脊液中的循环肿瘤细胞,探索脑膜转移癌的新型诊断方法。

## 对象与方法

### 一、研究对象

选择2014年3-5月在我院治疗的非小细胞肺癌脑膜转移患者5例,均符合以下条件:(1)经组织学或细胞学确诊为非小细胞肺癌。(2)经脑脊液细胞学确诊为脑膜转移癌。(3)实验室检查凝血时间、血小板计数于正常值范围。(4)颅内高压症状经脱水治疗得以控制。(5)可耐受腰椎穿刺术采集脑脊液。(6)排除合并脑膜瘤、室管膜瘤、脊膜瘤等脑脊膜病变患者。(7)患者及家属知情同意并签署知情同意书。

### 二、检测方法

1. 肿瘤标志物免疫荧光染色-染色体荧光原位杂交检测 患者入组后均经腰椎穿刺采集脑脊液20 ml,其中7.50 ml储存于TM-iFISH检测专用试管内,常温保存,3 d内送检。(1)富集细胞(免疫磁珠阴性选择法):以包被抗CD45抗体的免疫磁珠剔除CD45阳性白细胞,然后制备成100  $\mu$ l的细胞悬液。(2)细胞分析(细胞计数和核酸检测):固定100  $\mu$ l细胞悬液滴片,采用FISH技术以第8号染色体着丝粒探针CEP8检测染色体数目、抗CK18抗体(验证捕获的细胞为上皮细胞)和抗CD45抗体(验证捕获的细胞为非白细胞)。再行免疫荧光染色和4',6-二

脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色(验证捕获的细胞为有核细胞),于OLYMPUS-BX53型荧光显微镜(日本Olympus公司)下进行细胞计数,重复检测5次,取平均值。其余12.50 ml脑脊液中10 ml于标本采集当日行肿瘤细胞学检测,2.50 ml行肿瘤标志物检测。

2. 判断标准 循环肿瘤细胞若为非血源性上皮细胞,则不表达血源性上皮细胞表面标志物CD45。于荧光显微镜下的红色通道寻找不表达CD45的非血源性裸核细胞,即胞核周围不显示红色光环;橙色通道中出现CEP8荧光信号显示橙色亮点,亮点数目即为第8号染色体数目,大多数循环肿瘤细胞第8号染色体呈多倍体;然后转换至绿色通道下观察细胞是否表达CK18,呈绿色荧光者为阳性细胞;于蓝色通道下观察DAPI染色,呈蓝色荧光者为阳性细胞。因此,当脑脊液循环肿瘤细胞标志物呈现DAPI<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CK18<sup>+</sup>或CK18<sup>-</sup>、CEP8<sup>+</sup>时,即表示肿瘤细胞为非血源性上皮细胞,其染色体可呈单倍体、二倍体或多倍体;而呈现DAPI<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>、CK18<sup>-</sup>、CEP8<sup>+</sup>时,则表明循环肿瘤细胞为血源性白细胞,绝大多数染色体呈二倍体。

## 结 果

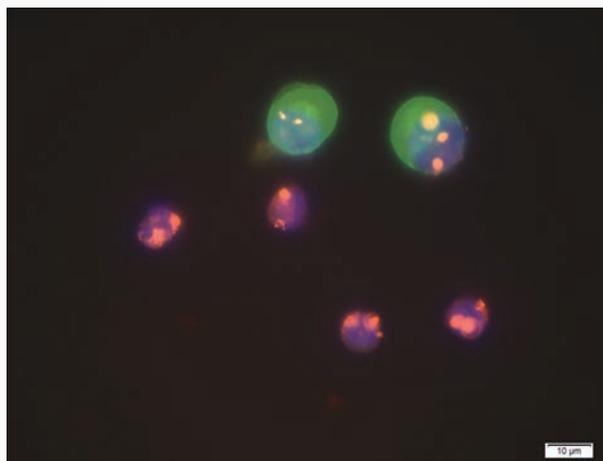
本组共计5例非小细胞肺癌脑膜转移患者,男性2例,女性3例;年龄52~64岁,中位年龄52岁。原发肿瘤病理类型均为腺癌,合并脑实质转移3例、脑膜转移5例;表现为持续性头痛(5例)、颅内高压症状(3例)、脑膜刺激征(2例)、马尾综合征(2例,表1),入院时头部MRI增强扫描均显示脑膜转移征象。所有患者脑脊液标本均顺利通过TM-iFISH检测,共发现18~1823个/7.50 ml肿瘤细胞(图1);脑脊液细胞学检查仅2例发现肿瘤细胞但未能计数,脑脊液肿瘤标志物均高于血清正常值范围(表2)。

## 讨 论

脑膜转移癌是指原发灶的肿瘤细胞转移并弥漫浸润软脑膜、蛛网膜下隙引起的脑组织、脑神经和脊髓损害<sup>[1]</sup>。早期诊断、早期治疗可有效延缓因病情进展而导致的神经功能缺损<sup>[2]</sup>。目前,国内诊断脑膜转移癌主要采取以下标准:(1)具有明确的肿瘤病史。(2)新发神经系统症状与体征。(3)具有典型的MRI表现。(4)脑脊液细胞学发现肿瘤细胞。凡具备前两项及第3或4项中任意一项者即可

**表1** 5例非小细胞肺癌脑膜转移患者的临床特点**Table 1.** The clinical characteristics of 5 patients of NSCLC with MM

Case	Sex	Age (year)	Pathologic type	Metastasis	Clinical symptom
1	Female	52	Adenocarcinoma	Brain, leptomeningeal	Headache, symptom of high intracranial pressure, meningeal irritation symptoms
2	Male	52	Adenocarcinoma	Brain, leptomeningeal	Headache, cauda equina syndrome
3	Female	52	Adenocarcinoma	Leptomeningeal	Headache, symptom of high intracranial pressure, meningeal irritation symptoms
4	Male	62	Adenocarcinoma	Brain, leptomeningeal	Headache
5	Female	64	Adenocarcinoma	Leptomeningeal	Headache, symptom of high intracranial pressure, cauda equina syndrome



**图1** 荧光显微镜观察显示,肿瘤细胞核DAPI染色阳性(蓝色),白细胞CD45表达阳性(环绕细胞核的红圈);肿瘤细胞CK18呈高表达(绿色),染色体数目为二倍体或三倍体 ×400

**Figure 1** Fluorescence microscope showed tumor cells contained DAPI staining positive nuclei (blue); white blood cells (WBCs) were positive for CD45 (red circles around the nuclei). Tumor cells were found high expression of CK18 (green), as well as visible diploid or triploid of chromosomes. ×400

**表2** 5例非小细胞肺癌脑膜转移患者的各项检测结果**Table 2.** The results of different testing methods of 5 patients of NSCLC with MM

Case	MRI enhancement scan	CSF TM-iFISH analysis (/7.50 ml)	Cytological CSF analysis	CSF tumor marker analysis		
				CEA (ng/ml)	NSE (μg/L)	CYFRA21-1 (μg/L)
1	Leptomeningeal metastasis	246	-	13.16	10.21	2.65
2	Leptomeningeal metastasis	29	-	0.20	18.81	5.31
3	Leptomeningeal metastasis	1823	+	10.53	9.18	1.91
4	Leptomeningeal metastasis	18	-	6.11	8.70	2.15
5	Leptomeningeal metastasis	720	+	68.49	17.32	110.40

+, positive, 阳性; -, negative, 阴性; CSF, cerebrospinal fluid, 脑脊液; TM-iFISH, tumor marker immunostaining-fluorescence in situ hybridization, 肿瘤标志物免疫荧光染色-染色体荧光原位杂交; CEA, carcinoembryonic antigen, 癌胚抗原; NSE, neuron-specific enolase, 神经元特异性烯醇化酶; CYFRA21-1, cytokeratin 19 fragment, 细胞角蛋白19片段

明确诊断。然而,首次脑脊液细胞学检查阴性率高达45%,再次检查灵敏度可达80%,3次及以上检查并不能增加阳性检出率<sup>[6]</sup>。MRI增强扫描的特异性几乎达100%,其典型表现为脑膜增厚或伴结节、脑膜线形或条索状强化、脑膜弥漫性强化,有时可见“脑膜尾征”等直接征象,并伴脑实质容量减小、脑水肿、脑室周围水肿等继发性改变,但存在65%的假阴性率和10%的假阳性率<sup>[7]</sup>。肿瘤标志物系指在肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞生物合成、释

放或宿主对肿瘤类反应的一类物质,是重要检查指标。目前,临床用于检测肺癌的肿瘤标志物有癌胚抗原(CEA)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)和细胞角蛋白19片段(CYFRA21-1)。王鹏等<sup>[8]</sup>对35例肺癌脑膜转移患者进行血清和脑脊液肿瘤标志物检测,认为肿瘤标志物可以用于诊断脑膜转移癌,尤其对脑脊液细胞学和MRI难以明确诊断的患者具有重要临床意义。但脑脊液肿瘤标志物检测仍存在诸多问题,例如敏感性高而特异性低,无统一的

正常参考值范围,对原发肿瘤不能定性,以及脑转移、脑损伤、脑炎等对血-脑屏障的破坏等。我们认为,脑脊液细胞学检查及 MRI 增强扫描早期诊断脑膜转移癌的敏感性均较差,脑脊液肿瘤标志物检测敏感性高而特异性差。因此,寻找更灵敏的检测方法是十分必要的。在本研究中,5 例脑膜转移癌患者既往经脑脊液细胞学明确诊断,仅 2 例脑脊液细胞学发现肿瘤细胞,提示该项检查方法具有相当大的随机性,且不能对肿瘤细胞计数;MRI 增强扫描提示脑膜转移癌的典型征象,具有较高的特异性,但存在 10% 的假阳性率,因此 MRI 增强扫描亦非诊断脑膜转移癌的可靠方法;脑脊液肿瘤标志物表达水平不同程度升高,提示该方法具有较高的敏感性。由于目前尚未确定脑脊液肿瘤标志物之正常参考值范围,故本研究仅以血清正常参考值作为标准,其中 3 例患者存在脑实质转移,可能系血-脑屏障破坏所致,因此单纯以脑脊液肿瘤标志物检测来诊断脑膜转移癌也是不可靠的。

TM-iFISH 平台通过富集和分析技术在生物体液样本中有效鉴别各种非血源性上皮细胞,对鉴别循环中的肿瘤细胞具有较高的敏感性和特异性。有研究显示,该类技术可用于检测脑脊液循环肿瘤细胞,其诊断乳腺癌、恶性黑色素瘤脑膜转移敏感性和特异性良好<sup>[6,9]</sup>。本组 5 例患者均经 TM-iFISH 检测发现特异性肿瘤细胞,即 DAPI<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CK18<sup>+</sup> 或 CK18<sup>-</sup>、CEP8<sup>+</sup> 细胞,而且肿瘤细胞计数为 18 ~ 1823 个/7.50 ml。表明 TM-iFISH 平台对脑脊液循环肿瘤细胞具有较高的敏感性和特异性,并可对肿瘤细胞计数,在脑膜转移癌的诊断中较脑脊液细胞学、脑脊液肿瘤标志物和 MRI 增强扫描更具优势。本研究脑脊液细胞学检查呈阳性反应的 2 例患者, TM-iFISH 检测肿瘤细胞计数高于其余 3 例患者,脑脊液细胞学检查阳性是否与 TM-iFISH 检测肿瘤细胞计数相关,尚待进一步探讨。由于本研究样本量小,未设立非脑膜转移癌对照组,目前仅能作为今

后临床研究设计的参考。

综上所述, TM-iFISH 技术可能成为一种诊断脑膜转移癌的新方法,但其诊断敏感性和特异性尚待进一步扩大样本量加以证实。

#### 参 考 文 献

- [1] Leal T, Chang JE, Mehta M, Robins HI. Leptomeningeal metastasis: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Cancer Ther Rev*, 2011, 7:319-327.
- [2] Nagpal S, Riess J, Wakelee H. Treatment of leptomeningeal spread of NSCLC: a continuing challenge. *Curr Treat Options Oncol*, 2012, 13:491-504.
- [3] Ge RL, Ma WB, Feng B, Ma H, Wang Y, Wang XZ. Clinical and cytological features of cerebrospinal fluid in 27 cases with meningeal carcinomatosis. *Shen Jing Sun Shang Yu Gong Neng Chong Jian*, 2013, 8:360-363. [葛汝丽, 马文彬, 冯波, 马贺, 王媛, 王雪贞. 脑脊液细胞学在脑膜癌病中的诊断意义. *神经损伤与功能重建*, 2013, 8:360-363.]
- [4] Igawa S, Gohda K, Fukui T, Ryuge S, Otani S, Masago A, Sato J, Murakami K, Maki S, Katono K, Takakura A, Sasaki J, Satoh Y, Masuda N. Circulating tumor cells as a prognostic factor in patients with small cell lung cancer. *Oncol Lett*, 2014, 7:1469-1473.
- [5] Chen P, Li L. Advances in detection of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer. *Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang*, 2013, 40:862-865. [陈鹏, 李雷. 非小细胞肺癌循环肿瘤细胞检测进展. *中国肿瘤临床*, 2013, 40:862-865.]
- [6] Le Rhun E, Massin F, Tu Q, Bonnetterre J, Bittencourt Mde C, Faure GC. Development of a new method for identification and quantification in cerebrospinal fluid of malignant cells from breast carcinoma leptomeningeal metastasis. *BMC Clin Pathol*, 2012, 12:21.
- [7] Clarke JL, Perez HR, Jacks LM, Panageas KS, Deangelis LM. Leptomeningeal metastases in the MRI era. *Neurology*, 2010, 74:1449-1454.
- [8] Wang P, She CH, Li P, Piao YZ, Wang XG, Li WL. Significance of tumor markers in the diagnosis of lung cancer meningeal metastasis. *Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang*, 2008, 35:61-64. [王鹏, 余春华, 李鹏, 朴颖哲, 王晓光, 李文良. 肿瘤标志物在肺癌脑膜转移辅助诊断中的应用. *中国肿瘤临床*, 2008, 35:61-64.]
- [9] Le Rhun E, Tu Q, De Carvalho Bittencourt M, Farre I, Mortier L, Cai H, Kohler C, Faure GC. Detection and quantification of CSF malignant cells by the Cell Search technology in patients with melanoma leptomeningeal metastasis. *Med Oncol*, 2013, 30:538.

(收稿日期:2014-06-06)

**下期内容预告** 本刊 2014 年第 9 和 10 期报道专题为神经免疫性疾病,重点内容包括:神经免疫学发展史;自身抗体测定及意义;糖皮质激素在神经免疫性疾病中的临床应用;神经精神狼疮自身免疫发病机制;系统性红斑狼疮神经系统损害诊断与治疗;多发性硬化生物学标志物;干扰素- $\beta$  治疗复发-缓解型多发硬化的系统评价;抗水通道蛋白 4 抗体阳性的多发性硬化临床特征;脂肪间充质干细胞免疫调节作用及其对实验性自身免疫性脑脊髓炎和多发性硬化的影响;视神经脊髓炎 IgG 检测及临床意义;视神经脊髓炎临床及机制探讨;视神经脊髓炎性脱髓鞘疾病;神经眼科与神经免疫;一氧化碳中毒迟发性脑病临床与免疫;颈髓炎性假瘤诊断与治疗;吉兰-巴雷综合征病例报告并文献复习;伴其他自身免疫性疾病的重症肌无力临床分析;重症肌无力危象;环磷酰胺治疗伴胸腺瘤的重症肌无力;急性脊髓炎转归;糖皮质激素受体基因 rs61757411 与重症肌无力发病相关性分析;重症肌无力合并多发性硬化一例报告并文献复习