



· 论 著 ·

微流控芯技术检测循环肿瘤细胞在脑胶质瘤预后预测中的价值

杨通衢¹, 韩志桐², 赵卫平², 陈云照², 张大鹏³, 张瑞剑²

1. 内蒙古医科大学附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010010;
2. 内蒙古自治区人民医院神经外科, 内蒙古 呼和浩特 010010;
3. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014040

[摘要] **背景与目的:** 脑胶质瘤患者的预后既往多通过生化指标进行预测, 临床实践中有一定难度且受多种因素影响, 导致预测效率相对较差。探讨微流控芯技术检测循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 在脑胶质瘤预后预测中的价值。**方法:** 选取2016年3月—2020年3月内蒙古自治区人民医院神经外科收治的96例脑胶质瘤患者为研究对象, 采用微流控芯技术富集患者外周血CTC, 并利用免疫荧光法对CTC进行鉴定; 采用logistic回归方程分析脑胶质瘤患者外周血CTC的检测结果与脑胶质瘤临床特征之间的关系并建立受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线; 制作并分析脑胶质瘤患者术后生存曲线。**结果:** 微流控芯技术对CTC富集联合免疫荧光结果显示, CTC检测阳性率为42.71%, 外周血检测出的CTC数目为 (66.27±6.36) /mL; 单因素分析结果显示, 外周血CTC与患者的肿瘤分期、组织学类型、淋巴结转移是否存在囊性病变、神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 密切相关 ($P<0.05$), 与年龄、性别、KPS评分、血清胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 含量等临床特征无相关性; 多因素分析结果显示肿瘤分期、组织学类型及NSE的表达与CTC密切相关; 通过ROC曲线分析得出肿瘤分期、组织学类型以及NSE的AUC分别为0.645、0.687、0.720, 预测概率AUC为0.814 ($P<0.05$); CTC阳性组和阴性组患者1年生存率差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但两组患者2年和3年生存率差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论:** 微流控芯技术可定量检测脑胶质瘤患者外周血CTC, 其水平与肿瘤分期、组织学类型、NSE密切相关, 直接影响脑胶质瘤患者远期生存率。因此, 外周血CTC可作为脑胶质瘤患者预后预测的重要指标。

[关键词] 微流控芯技术; 循环肿瘤细胞; 胶质瘤; 预后

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.10.005

中图分类号: R739.41 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)10-0905-07

The prognostic value of microfluidic core technology in detecting circulating tumor cells in brain glioma YANG Tongqu¹, HAN Zhitong², ZHAO Weiping², CHEN Yunzhao², ZHANG Dapeng³, ZHANG Ruijian² (1. Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 2. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010010, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 3. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Correspondence to: ZHANG Ruijian E-mail: zhangruijian1971@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** In the past, the prognosis of glioma was mainly predicted by biochemical indicators. In clinical practice, it is difficult to predict the prognosis of glioma due to the contamination of various factors, which leads to relatively poor prediction efficiency. This study aimed to investigate the value of circulating tumor cells (CTCs) by microfluidic core in the diagnosis and prognosis of gliomas. **Methods:** A total of 96 patients with brain glioma admitted to the Department of Neurosurgery in People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region from March 2016 to March 2020 were studied. CTCs were enriched in peripheral blood by microfluidic core technology, and identified by immunofluorescence method. The regression model was used to analyze the relationship between the detection of CTCs in peripheral blood of glioma patients and the clinical characteristics of

项目名称: 内蒙古自治区人民医院2020年度院内科研基金重点项目 (2020YN01)。

通信作者: 张瑞剑 E-mail: zhangruijian1971@163.com

glioma patients. The receiver operating characteristic (ROC) curve was established, and the survival curve was made to analyze CTCs test results and the postoperative survival time of glioma patients. **Results:** CTCs enrichment by microfluidic core technology combined with immunofluorescence showed CTCs with a positive detection rate of 42.71%, and the number of CTCs detected in peripheral blood was $(66.27 \pm 6.36)/\text{mL}$. Univariate analysis showed that CTC in peripheral blood was closely correlated to tumor stage, histological type, cystic lymph node metastasis and neuron-specific enolase (NSE) ($P < 0.05$), but had no correlation with age, gender, smoking status Cartesian functional status score, glial fibrillary acidic protein (GFAP) content and other clinical characteristics. Multivariate analysis showed that tumor stage, histological type, NSE expression and CTCs were closely related. The area under the curve (AUC) of tumor stage, histological type and NSE were 0.645, 0.687 and 0.720, respectively, and the predictive probability AUC was 0.814 ($P < 0.05$). The CTCs test results and the postoperative survival curve of glioma patients were analyzed. **Conclusion:** The microfluidic core technology established in this study can quantitatively detect peripheral blood CTCs in patients with glioma, whose CTCs level is closely related to tumor stage, histological type and NSE, and directly affects the long-term survival rate of patients with glioma. Therefore, peripheral blood CTCs can be used as an important indicator for the diagnosis and prognosis of glioma patients, providing a new idea for clinical research.

[Key words] Microfluidic core technology; Circulating tumor cells; Glioma; Prognosis

脑胶质瘤是常见的颅内原发性肿瘤, 主要由大脑与脊髓内癌变的胶质细胞产生。近年来, 胶质瘤的发病率明显上升, 占全部颅内恶性肿瘤发病率的81%, 5年生存率低于5%, 其流行病学特征呈“三高一低”, 即高发病率、高致死率、高复发率以及低治愈率, 进展迅速^[1-2]。脑胶质瘤的治疗方法主要为手术切除, 并辅以放疗或化疗, 但预后较差^[3], 因此早期诊断在改善患者预后方面具有重要意义。目前, 临床上即使分辨率最高的影像学设备也只能检测出5 mm以上的肿块, 病理学检查虽可以对肿瘤组织实现精准的分期分级, 但有其局限性^[4-6]。微流控芯技术是近年来发展起来的可精确操控微升、毫升级别样品的生物体液活检技术, 通过控制器件特征尺寸与细胞尺寸相匹配从而实现微量循环肿瘤细胞循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 的富集^[7-8]。多项研究表明, 由于CTC携带了肿瘤所有基因, 可及时反映肿瘤的动态信息, 因此, 可作为生物体液活检重要标志物^[9-12]。然而, CTC在脑胶质瘤中的研究较少。本研究通过微流控芯技术对外周血中的胶质瘤细胞进行富集可实时掌握肿瘤进展动态, 为肿瘤的早期诊断、个体化治疗以及预后提供重要的依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2016年3月—2020年3月内蒙古自治区

人民医院神经外科收治的96例脑胶质瘤患者, 其中男性56例, 女性40例, 年龄在19~71岁, 平均年龄 (56.25 ± 7.96) 岁, 病程1~4年, 平均病程 (10.84 ± 5.26) 个月。诊断标准: 符合《脑胶质瘤诊疗规范 (2018年版)》^[13] 规定的相关症状及影像学特征: 患者主要表现为头痛、眩晕、意识丧失、视物模糊, 甚至大脑功能区出现运动、语言以及感觉功能异常等症状, CT扫描显示不同密度灶, 可见增强的肿瘤包膜, 部分患者肿瘤周边存在水肿, 磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 显示额叶胶质瘤28例, 颞叶胶质瘤19例, 顶叶胶质瘤9例, 丘脑叶胶质瘤4例。纳入标准: 年龄大于18周岁; 肝肾功能正常; 无传染性疾病; 患者临床资料完整; 患者知情同意并自愿参加本研究。排除标准: 合并血液系统肿瘤患者; 合并精神科疾病存在认知功能障碍的患者; 研究期间死亡的患者。

1.2 实验方法

1.2.1 CTC的收集

采集所有患者手术前外周血4 mL于抗凝管内, 加入4 mL红细胞裂解液缓慢吹打后室温下静置10 min对红细胞进行充分裂解, 随后离心取下层沉淀细胞, 加入10 mL磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate-buffered saline, PBS) 对细胞进行重悬。

1.2.2 CTC的富集

将收集到的细胞悬液, 以2 mL/min的流速依次经过微流控芯分选装置和免疫磁珠纯化装置,

选用4段微柱式结构串联而成的分选芯片，注入其中的细胞根据自身的尺寸分别被不同段的微柱捕捉。本研究中4段微柱的尺寸分别为20、15、10和5 μm ，CTC在10 μm 处被捕捉后形成富集液，将富集液均匀摊至载玻片上。

1.2.3 CTC的鉴定

将上述取得的含CTC载玻片用4%的多聚甲醛进行固定，5 min后PBS洗涤，采用0.5% Triton X-100通透细胞15 min，洗涤后用1% BSA进行封闭60 min，加入CD133、神经元特异性烯醇化酶（neuron-specific enolase, NSE）、CD45一抗后4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜，次日取出PBS洗涤后加入相应的荧光二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育60 min（此后均避光），洗涤后加入DAPI细胞核染色液染色10 min，洗涤后加入20 μL 水溶性封片液封片，并置于荧光显微镜下观察。

1.3 观察指标

采用免疫荧光法观察并鉴定微流控芯技术富集的CTC细胞特点（CTC为CD133⁺CD45⁻；白细胞为CD133⁻CD45⁺）。

术后随访3年，单因素分析脑胶质瘤患者外周血CTC的检测与脑胶质瘤临床特征的关系，临床指标包括年龄、性别、KPS评分、NSE、血清胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein, GFAP）、肿瘤分期、组织学类型以及是否存在囊性病变等，并对筛选出的相关性指标进行多因素logistic回归分析，制作预测的受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线和脑胶质瘤患者术后生存率曲线。脑胶质瘤分期主要为4级：I级为毛细胞型星型细胞瘤，占5%；II级为星型胶质瘤或少突胶质瘤细胞，占30%~40%；III期为间变性胶质瘤，占脑胶质瘤的15%~25%；IV级为胶质母细胞瘤，占胶质瘤细胞的1/3。参照《脑胶质瘤的分类和病理诊断》判定是否存在囊性病变，结合影像学如CT或MRI检查确定。

1.4 统计学处理

所有试验数据均采用SPSS 20.0进行处理，计量资料采用 t 检验进行统计学分析，并以 $\bar{x}\pm s$ 形式描述，计数资料采用 χ^2 进行统计学分析，并以频

数或频率 n （%）表示。以脑胶质瘤患者CTC检测情况为因变量，以危险因子为自变量，拟合多元logistic回归方程，分析各危险因素对CTC检测情况的综合影响。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑胶质瘤患者CTC检测情况

经微流控芯技术对CTC进行富集，采用免疫荧光染色对CTC进行鉴定，结果显示，本研究中96例脑胶质瘤患者中41例外周血均检测出CTC，检测阳性率为42.71%，外周血检测出的CTC数目为（4~103）/mL，平均数目为（66.27 \pm 6.36）/mL。患者外周血CTC和白细胞在免疫荧光显微镜下荧光特点见图1。

2.2 脑胶质瘤患者外周血CTC的数量与脑胶质瘤临床特征的单因素分析结果

外周血CTC的数量与脑胶质瘤临床病理学特征单因素分析结果显示，外周血CTC的数量与患者的肿瘤分期、总生存期（overall survival, OS）、是否存在囊性病变及NSE的表达情况密切相关（ $P<0.05$ ），与年龄、性别、KPS评分及GFAP等临床特征无相关性（表1）。

2.3 Logistic回归分析结果

在单因素回归分析基础上，对肿瘤分期、组织学类型、是否存在囊性病变以及NSE的表达情况进行二元logistic回归分析。结果发现，肿瘤分期（OR=4.914，95% CI：1.535~15.734）、组织学类型（OR=0.187，95% CI：0.061~0.575）以及NSE的表达情况（OR=8.390，95% CI：2.922~24.089）与CTC阳性密切相关，CTC阳性发生的最终概率预测模型为 $P=1 / [1+e^{(1.384-1.592\text{肿瘤分期}+1.676\text{OS}+2.127\text{NSE})}]$ （表2）。

2.4 ROC曲线评估脑胶质瘤预测模型的预测性

将肿瘤分期、组织学类型以及NSE作为检验变量，作ROC曲线分析。得出肿瘤分期、组织学类型以及NSE的曲线下面积（area under curve, AUC）分别为0.645、0.687、0.720，预测概率AUC为0.814，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ，表3、图2）。

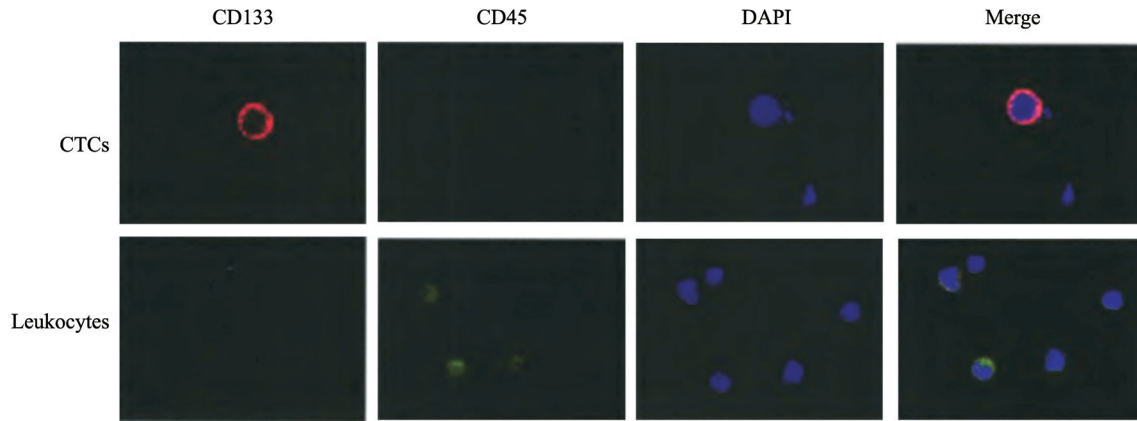


图 1 脑胶质瘤患者外周血CTC与白细胞鉴定

Fig. 1 Identification of CTCs and leukocytes in the peripheral blood of patients with glioma

CTCs were CD133⁺CD45⁻; The white blood cells were CD133⁻CD45⁺

表 1 脑胶质瘤患者外周血CTC与脑胶质瘤临床特征的关系

Tab. 1 Relationship between CTCs in peripheral blood of patients with glioma and clinical features of glioma

Risk factor	Peripheral blood CTCs		χ^2	P value	n (%)
	Positive (n=41)	Negative (n=55)			
Gender			0.760	0.383	
Male	26 (63.41)	31 (56.36)			
Female	15 (36.59)	24 (43.64)			
Age/year			0.939	0.350	
≥ 60	32 (78.05)	42 (76.36)			
< 60	9 (21.95)	13 (23.64)			
KPS			2.314	0.128	
≥ 80	32 (78.05)	35 (63.64)			
< 80	9 (21.95)	20 (36.36)			
Tumor staging			9.196	0.002	
III+IV	35 (85.37)	31 (56.36)			
I + II	6 (14.63)	24 (43.64)			
NSE			18.288	0.000	
Abnormal	30 (73.17)	16 (29.09)			
Normal	11 (26.83)	39 (70.91)			
GFAP			0.023	0.879	
Positive	30 (73.17)	41 (74.55)			
Negative	11 (26.83)	14 (25.45)			
Histological type			11.726	0.001	
Adenocarcinoma	20 (48.78)	45 (49.91)			
Non-adenocarcinoma	21 (51.22)	10 (18.18)			
Cystic lesion			12.055	0.001	
Yes	33 (80.49)	25 (45.45)			
No	8 (19.51)	30 (45.55)			

表 2 多因素回归分析结果

Tab. 2 Multivariate regression analysis results

Factors	Regression coefficient	Standard error	Wald	P value	OR	95% confidence interval	
						Ceiling	The lower limit
Tumor staging	1.592	0.594	7.191	0.007	4.914	1.535	15.734
Histological type	-1.676	0.573	8.567	0.003	0.187	0.061	0.575
NSE	2.127	0.538	15.623	0.000	8.390	2.922	24.089
Constant	-1.384	0.686	4.074	0.044	0.251		

2.5 脑胶质瘤患者外周血CTC与预后的关系

本研究中96例患者随访结果显示，自随访开始，CTC阳性组患者的生存率均明显高于CTC阴性组患者，经log-rank检验，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中CTC阳性组患者生存中位数为699 d，阴性组患者生存中位数为1 131 d (图3)。

表 3 肿瘤类型、肿瘤分期、组织学类型以及NSE的AUC

Tab. 3 AUC of tumor type, tumor stage, histological type and NSE

Factor	AUC	SD	P value	95% confidence interval	
				Ceiling	The lower limit
Tumor staging	0.645	0.056	0.015	0.535	0.755
Histological type	0.687	0.056	0.002	0.578	0.796
NSE	0.720	0.054	0.000	0.615	0.826
Predicted probability	0.814	0.044	0.000	0.728	0.900

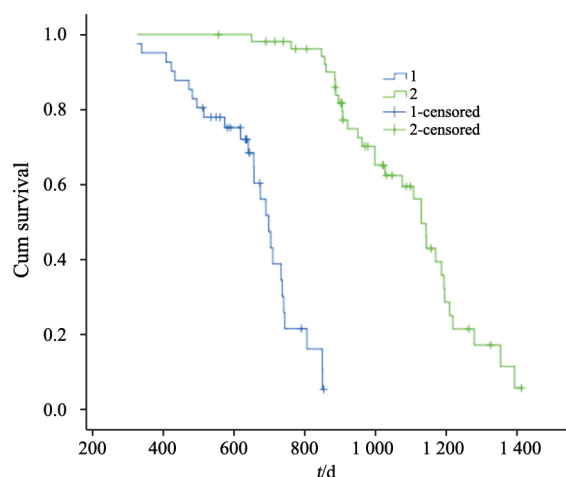


图 3 患者生存率曲线

Fig. 3 Survival curves of patients

1: CTCs positive; 2: CTCs negative

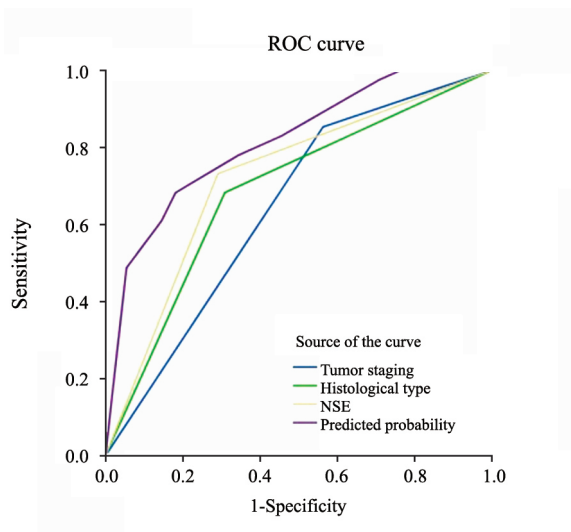


图 2 脑胶质瘤患者肿瘤分期、组织学类型以及NSE预后评估的ROC曲线

Fig. 2 ROC curves of tumor stage, histological type and prognostic value of NSE in patients with glioma

3 讨论

目前已知的液体活检技术主要包括CTC、循环肿瘤DNA和细胞外囊泡，细胞外囊泡包括凋亡小体、微泡和外泌体^[14]。研究表明，循环肿瘤DNA在人体内含量丰富，在脑胶质瘤患者的血浆中可以监测到循环肿瘤DNA，且与肿瘤组织样本的基因图谱具有同等追踪突变以及突变模式的能力^[15-16]。另有研究证实，虽然循环肿瘤DNA具有高度特异性，利于检测，但是由于其半衰期较短，在人体内1~2 h即可降解^[17]。CTC的检测难点在于其数量极少，通常临床研究的样本包含了大量的细胞信息，其中CTC仅占据其中的1/10⁹，因此对于CTC的分选要求较高。微流控芯技术利用不同细胞在大小、形状上的差异，设计出可控的微结构进行过滤，分离出所需的CTC，从而达到分选富集的目的。微流控芯技术通过富集并检测血液中的CTC可直接反映肿瘤的类型和大小，

进而辅助判断患者存活时间。该项技术已经在肺癌脑转移患者中进行了科学研究和临床探索, 具有精准、微创、简单、快速的优点, 在肿瘤的早期诊断与预测方面具有较强的价值^[18]。然而由于CTC在人体外周血中数量极少, 在 10^9 数量级细胞内才可能发现少数的CTC, 此外, 人体存在血脑屏障的作用, CTC在胶质瘤方面的研究目前较少^[19-20]。

由于胶质瘤细胞表面主要表达特异性的CD133分子, 且CD133也是脑胶质瘤术后复发的关键指标, CD133阳性的胶质瘤细胞可促进血管内皮生长因子的表达, 进而促进脑内肿瘤血管的形成^[21-22]。本研究通过微流控芯技术检测并利用免疫荧光法进行鉴定, 得出96例脑胶质瘤患者中CTC阳性检出率为42.71%, 平均数目为 (66.27 ± 6.36) /mL, 表明微流控芯技术可有效地富集脑胶质瘤患者的外周血CTC, 但稍低于其他肿瘤的检出率^[20], 可能与人体存在血脑屏障有关, 这也是脑胶质瘤外周血检测CTC面临的突出问题, 同时推测可能也与本研究收集的样本量较小有关。多因素回归分析及ROC曲线分析^[23]结果显示, 外周血CTC的检测与患者的肿瘤分期、OS、NSE的表达密切相关 ($P < 0.05$), 提示神经元细胞内NSE异常可能参与了脑胶质瘤患者外周血CTC释放过程。NSE是神经元或神经内分泌细胞分泌的一种特异性蛋白质, 当神经元或血脑屏障受损时, 大量的NSE释放入血, 产生脑部症状, 且脑部症状严重程度与NSE浓度呈正比, NSE现主要作为神经母细胞瘤与肺癌脑转移的重要标志物^[24-25]。本研究中NSE作为脑胶质瘤预后的一项重要指标, 可能通过影响脑胶质瘤的临床分期, 进而影响胶质瘤细胞释放入血的水平。

基于以上临床特征的多因素回归分析结果, 对患者的预后进行分析, 结果显示, 两组患者2和3年生存率差异有统计学意义, 推测CTC可能与脑胶质瘤患者病程尤其是肿瘤恶化程度相关, 患者确诊时间越久, 肿瘤的恶化程度就越严重, 释放入血的CTC可聚集成灶, 进而发生转移, 因此, 脑胶质瘤患者外周血CTC可作为远期预后的一项重要指标, 临床医师可根据患者外周血CTC水平采取相应的干预措施, 改善脑胶质瘤患者的

预后。脑胶质瘤患者肿瘤组织中GFAP检出结果对其外周血CTC数量影响相对有限, 不同GFAP检出情况患者外周血CTC数量差异无统计学意义。原因在于中间丝蛋白GFAP虽然特异表达于正常胶质细胞、肿瘤性星形胶质细胞、室管膜细胞中, 但主要作用是维持星形细胞形态和结构功能, 继而影响细胞分化。GFAP与脑肿瘤分化密切相关, 病情轻微的患者 [世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 分级 II~IV 级] 中枢神经系统低氧损伤程度较轻, GFAP检出结果本身就无显著差异, 亦不会显著影响外周血CTC数量。

综上所述, 本研究建立的微流控芯技术可定量检测脑胶质瘤患者外周血CTC, 其水平与肿瘤分期、OS、NSE的表达密切相关, 且直接影响脑胶质瘤患者远期生存率。因此, 外周血CTC可作为脑胶质瘤患者诊断、预后尤其是转移的重要指标。

[参 考 文 献]

- [1] RASMUSSEN B K, HANSEN S, LAURSEN R J, et al. Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I-IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry [J]. *J Neurooncol*, 2017, 135(3): 571-579.
- [2] LIU Z Y, FENG S S, LI J, et al. The epidemiological characteristics and prognostic factors of low-grade brainstem glioma: a real-world study of pediatric and adult patients [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 391.
- [3] ADEBERG S, HARRABI S B, VERMA V, et al. Treatment of meningioma and glioma with protons and carbon ions [J]. *Radiat Oncol*, 2017, 12(1): 193.
- [4] GENG L L, WANG Z H, JIA X Q, et al. HER2 targeting peptides screening and applications in tumor imaging and drug delivery [J]. *Theranostics*, 2016, 6(8): 1261-1273.
- [5] WESTPHAL M, LAMSZUS K. Circulating biomarkers for gliomas [J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(10): 556-566.
- [6] JACKSON C, WESTPHAL M, QUIÑONES-HINOJOSA A. Complications of glioma surgery [J]. *Handb Clin Neurol*, 2016, 134: 201-218.
- [7] LEBOFISKY R, DECRAENE C, BERNARD V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(4): 783-790.
- [8] 包建民, 王丹丹, 李优鑫. 微流控芯片分选临床样品中循环肿瘤细胞的研究进展 [J]. *色谱*, 2017, 35(1): 129-137.

- BAO J M, WANG D D, LI Y X. Application advances of microfluidic chips for sorting circulating tumor cells in clinical samples [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(1): 129-137.
- [9] SAENZ-ANTOÑANZAS A, AUZMENDI-IRIARTE J, CARRASCO-GARCIA E, et al. Liquid biopsy in glioblastoma: opportunities, applications and challenges [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7): E950.
- [10] BECK T N, BOUMBER Y A, AGGARWAL C, et al. Circulating tumor cell and cell-free RNA capture and expression analysis identify platelet-associated genes in metastatic lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 603.
- [11] 杜 萌, 郑国侠, 王云华. 微流控芯片技术在血脑屏障模型构建中的应用进展 [J]. *山东医药*, 2018, 58(27): 94-96.
- DU M, ZHENG G X, WANG Y H. Application progress of microfluidic chip technology in blood brain barrier model construction [J]. *Shandong Med J*, 2018, 58(27): 94-96.
- [12] SHARMA S, ZHUANG R, LONG M, et al. Circulating tumor cell isolation, culture, and downstream molecular analysis [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1063-1078.
- [13] 国家卫生健康委员会医政医管局. 脑胶质瘤诊疗规范(2018年版) [J]. *中华神经外科杂志*, 2019, 35(3): 217-239.
- Medical Administration and Hospital Administration of National Health Commission. Norms for the diagnosis and treatment of glioma (2018 Edition) [J]. *Chin J Neurosurg*, 2019, 35 (3): 217-239.
- [14] RUFINO-RAMOS D, ALBUQUERQUE P R, CARMONA V, et al. Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases [J]. *J Control Release*, 2017, 262: 247-258.
- [15] LEBOFISKY R, DECRAENE C, BERNARD V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(4): 783-790.
- [16] 朱彦辉, 姚广裕, 陈路嘉, 等. 循环肿瘤DNA检测及其在乳腺癌中的临床应用 [J]. *肿瘤*, 2018, 38(1): 73-77.
- ZHU Y H, YAO G Y, CHEN L J, et al. Detection of circulating tumor DNAs and its application in breast cancer [J]. *Tumor*, 2018, 38(1): 73-77.
- [17] BOISSELIER B, GÁLLEGO PÉREZ-LARRAYA J, ROSSETTO M, et al. Detection of *IDH1* mutation in the plasma of patients with glioma [J]. *Neurology*, 2012, 79(16): 1693-1698.
- [18] KLOTEN V, LAMPIGNANO R, KRAHN T, et al. Circulating tumor cell PD-L1 expression as biomarker for therapeutic efficacy of immune checkpoint inhibition in NSCLC [J]. *Cells*, 2019, 8(8): E809.
- [19] 刘 侃, 张俊哲. 基于微流控芯片的循环肿瘤细胞的分离、检测技术 [J]. *电脑知识与技术*, 2014, 10(9): 2093-2094.
- LIU K, ZHANG J Z. The separation, detection of circulating tumor cells based on microfluidic chip [J]. *Comput Knowl Technol*, 2014, 10(9): 2093-2094.
- [20] VONA G, ESTEPA L, BÉROUD C, et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer [J]. *Hepatology*, 2004, 39(3): 792-797.
- [21] GAO R, SUN T T. Effects of CD133 on the biological features and *in vivo* oncogenicity of glioma cells [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2019, 33(2): 355-364.
- [22] GUERRA-REBOLLO M, GARRIDO C, SÁNCHEZ-CID L, et al. Targeting of replicating CD133 and OCT4/SOX2 expressing glioma stem cells selects a cell population that reinitiates tumors upon release of therapeutic pressure [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9549.
- [23] 胡道军, 郁 淼, 张洪磊, 等. 基于logistic回归和ROC曲线综合评价IMA, NLR, hs-CRP和CK-MB联合检测对早期急性心肌梗死的诊断价值 [J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(5): 76-80.
- HU D J, YU M, ZHANG H L, et al. Comprehensive evaluation of the diagnostic value of the combined detection of IMA, NLR, hs-CRP and CK-MB for acute myocardial infarction based on ROC curve and logistic regression analysis [J]. *J Mod Lab Med*, 2016, 31(5): 76-80.
- [24] SHAIK A J, REDDY K, MOHAMMED N, et al. Neuron specific enolase as a marker of seizure related neuronal injury [J]. *Neurochem Int*, 2019, 131: 104509.
- [25] YAN T, SKAFTNESMO K O, LEISS L, et al. Neuronal markers are expressed in human gliomas and NSE knockdown sensitizes glioblastoma cells to radiotherapy and temozolomide [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 524.

(收稿日期: 2021-03-19 修回日期: 2021-07-19)