

弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者呼气中挥发性有机物的筛查

张英平¹, 王霖¹, 刘蝉², 韩玲玲², 夏鹰³, 张亚中², 刘虎⁴, 夏瑞祥¹

摘要 目的 筛查弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)患者呼气中的特异性挥发性有机物(VOCs),为呼气检测在 DLBCL 诊断中的应用提供实验依据。方法 收集 32 例 DLBCL 患者呼气样品,30 例健康者呼气样品作为对照。利用固相微萃取-气相色谱/质谱(SPME-GC/MS)检测两组呼气样品中的 VOCs,应用秩和检验筛选出 DLBCL 患者特征性 VOCs。结果 DLBCL 患者呼气样品中可检测到 11 种特征性 VOCs,分别为 3-己酮、丁烷、壬醛、环己醇、苯、环己烷、己烷、癸烷、4-庚酮、十二烷、十六烷。其中烷烃类、酮类、苯类有机物较对照组明显增高,醛类、醇类明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 I ~ II 期与 III ~ IV 期 DLBCL 患者呼气中,表达无显著差异。结论 3-己酮、丁烷、壬醛、环己醇、苯、环己烷、己烷、癸烷、4-庚酮、十二烷、十六烷可能作为 DLBCL 患者特异性 VOCs,但这些标志物与 DLBCL 患者的临床分期无关联。SPME-GC/MS 检测方法可应用于 DLBCL 患者的辅助筛查。

关键词 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; 呼气; 挥发性有机物; 气相色谱/质谱

中图分类号 R 551.2; R 730.4; R 733.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1204-04

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)中最常见的一种类型,在中国 DLBCL 占有所有 NHL 的 45.8%,占有所有淋巴瘤的 40.1%^[1]。目前 DLBCL 的诊断主要依靠病理,其有创、检查时程长、花费大,患者依从性差。因此,急需建立一种无创、快捷方便、相对廉价的检查方法,作为一项常规体检项目来初步筛查患者是否患有淋巴瘤。运用呼气分析诊断疾病,主要是通过检测人体呼出气中挥发性有机化合物(volatile organic com-

pounds, VOCs)成份或浓度的改变,来反映相应细胞和组织的代谢情况。研究^[2-3]证实 VOCs 与多种疾病的关系,尤其是肿瘤方面研究较多。该实验采用固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)与气相色谱-质谱(gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)技术联用对 DLBCL 患者和健康对照者呼气中的 VOCs 成分进行比较分析,筛选出 DLBCL 患者呼气中特征性 VOCs。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2014 年 11 月 ~ 2015 年 4 月入住安徽医科大学第一附属医院血液内科的初诊初治 DLBCL 患者,收集其呼气样品 32 例,其中男 19 例,女 13 例;年龄 36 ~ 79 (57.69 ± 8.74) 岁。DLBCL 患者均为病理证实,其中 I / II 期 14 例,III / IV 期 18 例。患者近期无感染,无其他肿瘤病史,无胃病、肝病、肾病、糖尿病、甲亢、自身免疫性疾病等。另选择健康对照者 30 例,其中男 18 例,女 12 例;年龄 32 ~ 68 (53.97 ± 8.54) 岁。对照组均为经体检证实健康状况良好的患者家属、医护人员等。两组患者性别、年龄差异无统计学意义。所有受试者知情同意。

1.2 主要实验仪器 Tedlar 采样袋(4 L)购自大连德霖气体包装有限公司;99.999% 氮气购自合肥众仪有限公司;57318 型 75 μm CAR/PDMS SPME 萃取头和手动进样 57330U 型 SPME 手柄购自上海安谱科学仪器有限公司;气相色谱/质谱联用仪(GC/MS-QP 2010 Puls)购自日本 Shimadzu 公司;HP-5MS 毛细管柱(30.0 m $\times$ 0.25 μm $\times$ 0.25 mm)购自美国 Agilent 公司。

1.3 呼气样品采集 受试者前 1 d 24:00 开始禁食、水,晨起后安静状态下深吸、屏气数秒后缓慢向 Tedlar 袋共呼入 3 L 气体;同时采集周围环境气体作为对照。使用采样袋之前先用 99.999% 的氮气清洗 3 次,以除去可能残留的物质。

1.4 萃取、进样及检测方法 每次使用前先将 SPME 纤维针头加热 30 min(在 250 $^{\circ}\text{C}$ 条件下)以除去残留杂质,然后插入呼气标本中,在室温下萃取

2016-04-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472750)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 血液内科, ⁴ 肿瘤内科, 合肥 230022

² 安徽省食品药品检验所, 合肥 230051

³ 安徽医科大学临床医学院, 合肥 230601

作者简介: 张英平 男 硕士研究生;

夏瑞祥 男 博士 教授 主任医师 硕士生导师 责任作者,

E-mail: xrx2041@163.com

30 min 随即在 GC/MS 进样口解析 10 min ,检测并读取数据。

1.5 气相色谱与质谱条件 气相色谱条件:载气为高纯氦气(He) 流速 1 ml/min 不分流进样;进样口温度 250 ℃;柱箱程序升温:初温 35 ℃保持 5 min ,然后以 4 ℃/min 升至 100 ℃,最后以 20 ℃/min 升至 260 ℃,保持 1 min。质谱离子源温度 200 ℃,扫描范围 35 ~350 m/z。

1.6 实验方法重复性和稳定性检测 连续 3 d 采集相同地点、相同时间段、同一受试者的呼吸气体样品,每份呼气样本重复检测 3 次,并同时检测周围空气,利用上述 SPME-GCMS 联用法检测分析。通过对比 3 例气体样品中 VOCs 表达的质谱图,显示 3 份 VOCs 各主要峰的出峰时间基本一致,且出峰面积也大致相同,说明 3 者代谢的挥发性有机物成分基本相同,实验的重复性也能达到要求。提示本实验用于检测 DLBCL 患者呼出气体中的 VOCs 重复性良好,结果尚稳定。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,

采用非参数统计方法中的 Wilcoxon 秩和检验筛选比较物质。以 $\alpha = 0.05$ 为检验标准。

2 结果

2.1 呼气中 VOCs 的分析 按上述步骤 1.4、1.5 中的实验方法对呼气样品进行检测,选取保留时间为 0 ~32 min 的总离子流程图,通过 NIST 05 数据库检索分析,在 DLBCL 患者呼气样本中至少检测出 98 种化合物。DLBCL 患者和健康对照者呼气中 VOCs 色谱图对比见图 1,可以看出 DLBCL 组 and 对照组在相同保留时间出现的峰高低明显不同,即含量上存在差别,不同峰面积代表不同物质出现的强度不同。经检测分析,结果显示 11 种有明显差异的 VOCs,分别为 3-己酮(峰 1)、丁烷(峰 2)、壬醛(峰 3)、环己醇(峰 4)、苯(峰 5)、环己烷(峰 6)、己烷(峰 7)、癸烷(峰 8)、4-庚酮(峰 9)、十二烷(峰 10)、十六烷(峰 11),其中烷烃类、酮类、苯类化合物较对照组明显增高,醛类、醇类明显减少。见表 1。

2.2 不同分期的 DLBCL 患者呼气中特征性 VOCs

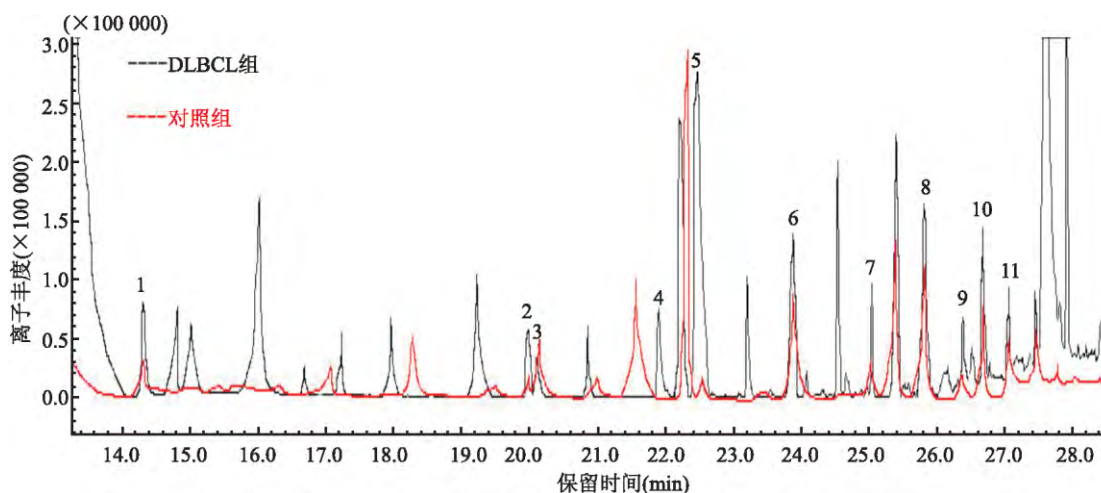


图 1 DLBCL 组和对照组呼气样品中 VOCs 典型色谱图比较

表 1 呼气中特征性 VOCs 峰面积的比较

峰	保留时间 (s)	化合物	DLBCL 组(cps)		对照组(cps)		Z 值	P 值
			中位数	四分位数间距	中位数	四分位数间距		
1	14.292	3-己酮	31 011	25 993	10 782	10 266	-2.147	0.032
2	19.985	丁烷	26 360	27 714	7 529	4 564	-3.089	0.002
3	20.022	壬醛	6 573	4 357	15 267	12 883	-2.393	0.017
4	22.428	环己醇	281 680	280 080	1 056 900	2 939 730	-2.128	0.033
5	22.557	苯	442 770	340 390	6 848	3 120	-2.121	0.034
6	23.915	环己烷	74 663	73 876	50 524	32 903	-2.192	0.028
7	24.934	己烷	58 314	21 439	7 104	25 230	-2.537	0.011
8	25.846	癸烷	81 301	56 784	55 378	40 132	-2.626	0.009
9	26.421	4-庚酮	27 607	18 699	6 029	12 044	-2.192	0.028
10	26.798	十二烷	60 643	56 697	26 009	29 651	-2.171	0.030
11	27.151	十六烷	48 893	57 264	17 228	25 982	-2.633	0.008

表2 DLBCL 组 I ~ II 期与 III ~ IV 期呼气中特征性 VOCs 峰面积的比较

峰	化合物	I ~ II (cps)		III ~ IV (cps)		Z 值	P 值
		中位数	四分位数间距	中位数	四分位数间距		
1	3-己酮	42 404	38 827	25 122	17 596	-1.066	0.286
2	丁烷	15 427	48 583	30 538	31 225	-0.898	0.369
3	壬醛	5 573	4 029	7 421	4 120	-1.061	0.289
4	环己醇	267 360	272 700	289 660	485 060	-0.387	0.699
5	苯	397 720	597 840	567 870	340 390	-1.225	0.221
6	环己烷	129 501	1 120 101	71 051	32 608	-0.707	0.480
7	己烷	42 518	38 663	59 661	57 343	-1.061	0.289
8	癸烷	81 301	68 026	81 572	55 705	-0.355	0.722
9	4-庚酮	24 093	21 197	27 792	14 116	-0.354	0.724
10	十二烷	48 626	45 412	73 634	68 159	-1.095	0.273
11	十六烷	43 662	77 413	51 515	66 382	-1.155	0.248

的表达情况 在 I ~ II 期与 III ~ IV 期 DLBCL 患者呼气中,上述 11 种标志物的峰面积差异均无统计学意义,即表达含量无明显差异。见表 2。

3 讨论

人体主要通过肺泡交换将呼气排出体外,在一定程度上反映了体内的代谢情况。人类呼气成分中这些 VOCs 质或量的变化与机体的代谢状态有关,通过检测这些变化,可以进一步了解机体的病理生理情况^[4]。呼气分析正逐渐成为一种新型的诊断方法,对于患者而言,其是一种无创、相对价廉且可接受性较高的检查。近年,呼气分析已被普遍认为有很大可能成为一种安全快捷的肿瘤诊断替代方法。

呼气成分中内源性 VOCs 主要由氧化应激产生,为人体的代谢产物^[5]。生理情况下,机体里的抗氧化剂可以清除人体内的氧自由基。但是在病理情况下,过多的氧自由基则可以造成生物膜系统损伤以及细胞内氧化磷酸化障碍,其中对 DNA 的损伤可导致基因突变^[6],是一种常见的致癌机制;作用于细胞膜脂肪酸的氧化损伤则会导致机体呼气中 VOCs 成份或浓度的增多^[7]。研究^[8]表明多种疾病存在与其相关的特征性 VOCs,人体呼气中 VOCs 的组成与不同疾病相关。氧化路径不同,产生的物质也就不同,但氧化产物大部分属于易挥发的有机物,如烷烃类、醛类、酮类、苯环类及其衍生物等。

呼出气体中与 DLBCL 相关的 VOCs,理论上是由 DLBCL 细胞代谢产生的,经过血液循环到达肺部,通过气体交换,呼出体外。本研究采用 SPME-GC/MS 法对 DLBCL 患者及健康对照者呼气样本中 VOCs 进行定量分析,结果显示 11 种特征性 VOCs,分别为 3-己酮、丁烷、壬醛、环己醇、苯、环己烷、己

烷、癸烷、4-庚酮、十二烷、十六烷,其中烷烃类、酮类、苯类化合物较对照组明显增高,醛类、醇类明显减少。一般认为这些 VOCs 并不仅仅由肿瘤组织所产生,而是肿瘤在发生、发展过程中引起机体相应代谢紊乱而产生的^[9]。

烷烃或烷烃的衍生物为人体中挥发性标志物的主要成分,本研究筛选出来的丁烷、环己烷、己烷、癸烷、十二烷、十六烷与其相符,这些物质在血液中溶解度极低,很快经过气-血交换,直接由呼吸系统排出体外。其机制可能为肿瘤细胞中氧自由基活动增强,诱导氧化应激进一步引起细胞脂质过氧化,导致细胞膜中的多不饱和脂肪酸降解增加,故烷烃类物质生成增多。芳香族化合物,如苯也可作用于细胞膜导致脂质过氧化使 VOCs 产生增多;另外,芳香族化合物被普遍认为与饮酒、吸烟、环境污染和辐射等因素有关,推测其可能与淋巴瘤的病因有一定关系。

3-己酮和 4-庚酮属于酮类,通常认为与脂肪酸的过氧化有关,DLBCL 患者体内氧化应激增强,进而产生更多的 3-己酮和 4-庚酮等酮类。花庆龄等^[10]运用 SPME-GC/MS 检测 DLBCL 患者尿液及健康对照组尿液中 VOCs,发现 4-庚酮浓度明显升高,本实验结果与之一致。在 DLBCL 患者呼气中,壬醛的峰面积较对照组低。研究^[11]表明,醛类物质的浓度在癌细胞代谢产物中往往低于非癌变细胞。癌细胞消耗醛类物质多与癌细胞中醛脱氢酶活性增高有一定关系。本研究实验组中醇类物质减低,其代谢机制目前尚不明确,推测其产生可能还受到细胞色素 P450 混合酶系的调控^[12],有待进一步研究。

在肿瘤细胞生长过程中,绝大部分肿瘤细胞都存在着氧化应激增强的现象^[13]。本研究中,在 I ~ II 期与 III ~ IV 期 DLBCL 患者呼气中,特异性 VOCs 的表达无显著差异。推测 DLBCL 患者呼气中 VOCs

可能与肿瘤的分期无关,呼气分析在 DLBCL 的早期诊断上可能更具优势。Phillips et al^[14] 在肺癌检测中,也得到相似的结果。

参考文献

- [1] 李小秋,李甘地,高子芬,等. 中国淋巴瘤亚型分布: 国内多中心性病例 10 002 例分析[J]. 诊断学理论与实践, 2012, 11(2): 111-5.
- [2] Peng G, Hakim M, Broza Y Y, et al. Detection of lung, breast, colorectal and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors[J]. Br J Cancer, 2010, 103(4): 542-51.
- [3] 刘虎,宋耕,秦涛,等. 非小细胞肺癌患者呼出气中挥发性有机化合物的定量分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(23): 1857-59.
- [4] Schmutzhard J, Rieder J, Deibl M, et al. Pilot study: volatile organic compounds as a diagnostic marker for head and neck tumors[J]. Head Neck, 2008, 30(6): 743-9.
- [5] Birben E, Sahiner U M, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense[J]. World Allergy Organ J, 2012, 5(1): 9-19.
- [6] Klaunig J E, Wang Z, Pu X, et al. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 254(2): 86-99.
- [7] Kneepkens C M, Lepage G, Roy C C. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation[J]. Free Radic Biol Med, 1994, 17(2): 127-60.
- [8] Gaspar E M, Lucena A F, Duro da Costa J, et al. Organic metabolites in exhaled human breath—a multivariate approach for identification of biomarkers in lung disorders[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(14): 2749-56.
- [9] Amann A, Corradi M, Mazzone P, et al. Lung cancer biomarkers in exhaled breath[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2011, 11(2): 207-17.
- [10] 花庆龄,王霖,刘蝉,等. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者尿液中挥发性标志物的筛选[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(4): 522-5.
- [11] Brunner C, Szymczak W, Holtriegl V, et al. Discrimination of cancerous and non-cancerous cell lines by headspace-analysis with PTR-MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(6): 2315-24.
- [12] Belda-Iniesta C, de Castro Carpeo J, Carrasco J A, et al. New screening method for lung cancer by detecting volatile organic compounds in breath[J]. Clin Transl Oncol, 2007, 9(6): 364-8.
- [13] Martinez-Outschoorn U E, Balliet R M, Lin Z, et al. Hereditary ovarian cancer and two-compartment tumor metabolism: epithelial loss of BRCA1 induces hydrogen peroxide production, driving oxidative stress and NFκB activation in the tumor stroma[J]. Cell Cycle, 2012, 11(22): 4152-66.
- [14] Phillips M, Altorki N, Austin J H, et al. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath[J]. Cancer Biomark, 2007, 3(2): 95-109.

The screening of VOCs in the breath of diffuse large B-cell lymphoma patients

Zhang Yingping¹, Wang Lin¹, Liu Chan², et al

(¹Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051)

Abstract Objective To screen volatile organic compounds (VOCs) in the breath of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients, and provide the experimental evidence for the diagnosis of DLBCL. **Methods** Collected the breath samples from 32 patients with DLBCL and 30 healthy people as controls. The VOCs were extracted with solid phase microextraction (SPME) and analyzed with gas chromatography (GC)/mass spectrometry (MS). The Wilcoxon test was used for discriminating the VOCs. **Results** 11 different kinds of VOCs were detected among the patients with DLBCL breath samples: 3-hexanone, butane, nonanal, cyclohexanol, benzene, cyclohexane, hexane, decane, 4-heptanone, dodecane and hexadecane. The alkane, ketone, benzene compounds were significantly higher than the controls ($P < 0.05$), the aldehydes, alcohol decreased significantly ($P < 0.05$). There was no difference between the difference markers in the breath of DLBCL patients at stage I ~ II and stage III ~ IV. **Conclusion** These substances 3-hexanone, butane, nonanal, cyclohexanol, benzene, cyclohexane, hexane, decane, 4-heptanone, dodecane and hexadecane may be used as a characteristic VOCs in patients with DLBCL. There is no association between the VOCs and clinical stages of DLBCL patients. SPME-GC/MS detection method can be used among the DLBCL patients with secondary screening.

Key words diffuse large B-cell lymphoma; breath; volatile organic compounds; gas chromatography/mass spectrometry