

弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者尿液中挥发性标志物的筛选

花庆岭¹, 王 霖², 刘 蝉³, 韩玲玲³, 曾庆曙², 杨明珍², 夏瑞祥², 潘跃银¹, 张亚中³, 刘 虎¹

摘要 目的 筛选弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 患者尿液中有诊断价值的挥发性标志物 (VOCs)。方法 收集 35 例 DLBCL 患者尿液样本 (DLBCL 组), 30 例健康者尿液样本 (对照组)。利用顶空气体固相微萃取联用气相色谱-质谱检测分析两组尿液样本中的挥发性有机化合物。应用 Wilcoxon 非参数检验分析筛选 DLBCL 患者尿液中的特异性 VOCs。结果 筛选出正己烷、2-丁酮和 4-庚酮 3 种特异性挥发性标志物。DLBCL 组正己烷的浓度为 $(63.45 \pm 9.98) \mu\text{g/ml}$, 2-丁酮的浓度为 $(105.43 \pm 12.81) \mu\text{g/ml}$, 4-庚酮的浓度为 $(162.56 \pm 25.38) \mu\text{g/ml}$ 。3 种物质的浓度在 DLBCL 组和对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 DLBCL 患者尿液中挥发性化合物 (正己烷、2-丁酮和 4-庚酮) 可能是有诊断价值的 VOCs。

关键词 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; 尿液; 挥发性标志物; 气相色谱-质谱

中图分类号 R 730.4; R 733.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0522-04

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 是最常见的 B 细胞来源恶性淋巴瘤^[1]。目前 DLBCL 的诊断主要依靠病理, 但其存在很多不足之处。首先病理取材有创性, 不易为患者接受; 再者 DLBCL 的病理异质性极强, 诊断上主要依靠病理医师的经验判断, 极易造成误诊。该研究拟采用顶空气体的固相微萃取 (solid phase micro-extraction, SPME) 和气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 联用技术对 DLBCL 患者和健康对照者尿液中的挥发性标志物 (volatile organic compounds, VOCs) 进行定量分析比较, 检测两者之间的差异, 旨在 DLBCL 患者尿液中筛查出有诊断价值的特异性 VOCs。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2014 年 3 月~6 月入住安徽医科大学第一附属医院的 DLBCL 患者尿液样本 35 例 (DLBCL 组), 其中男 24 例, 女 11 例, 年龄 37~71 (54.3 ± 8.4) 岁。DLBCL 均以病理证实, 其中早期

2014-12-29 接收

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 肿瘤内科, ² 血液内科, 合肥 230022

³ 安徽省食品药品检验所, 合肥 230051

作者简介: 花庆岭, 男, 硕士研究生;

刘 虎, 男, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: drliuhu@gmail.com

A research on the minimal clinically important differences of chinese version of the Fugl-Meyer motor scale

Chen Ruiquan, Wu Jianxian, Shen Xianshan

(Dept of Rehabilitation Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To determine the minimal clinically important differences (MCID) of chinese version of the Fugl-Meyer (FM) motor scale for evaluating the motor function of the stroke patients (upper extremity, lower extremity and total). **Methods** The research used anchor-based methods and distribution-based methods together to determine the MCID of chinese version of the FM motor scale. **Results** The intra-rater retest reliabilities of chinese version of the FM motor scale of motor functions were 0.997, 0.989 and 0.997 for upper extremity, lower extremity, and the total. The inter-rater retest reliabilities were 0.993, 0.952 and 0.990 respectively. The MCID of chinese version of FM motor scale were 4.58, 3.31 and 6.0. **Conclusion** The MCID of chinese version of the FM motor scale which could be gained in this study can help both clinical and research staff to identify whether the improved effect of motor function, which assessed by chinese version of the FM motor scale, made sense or not in clinical trials or in clinical practice.

Key words minimal clinically important differences; Fugl-Meyer motor scale; stroke

(I/II)患者16例,中晚期(III/IV)患者19例。患者均为初诊初治,近期无泌尿系统感染、无其他肿瘤病史、无糖尿病、肾病、自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等)。另同期选择30例健康者,其中男21例,女9例,年龄40~75(57.1±11.7)岁,收集其尿液样本(对照组)。对照组为患者家属,均经体检证实身体健康。两组性别、年龄差异无统计学意义。所有受试者签署知情同意书。

1.2 主要仪器与试剂 GC-MS联用仪(GC-MS QP 2010 Plus),20 ml顶空瓶购自日本Shimadzu公司;手动进样57330U型SPME手柄及57318型75 μm CAR-PDMS SPME萃取头购自上海安谱科学仪器有限公司;HP-5MS毛细管柱(30.0 m×0.25 mm×0.25 μm)购自美国Agilent公司;正己烷、2-丁酮和4-庚酮(色标,>98%)购自国药集团化学试剂有限公司;所用水为Milli-Q纯水系统生产。

1.3 尿液收集方法 每位受试者夜间24:00后禁食禁水,清晨起床后留取新鲜中段尿密封在15 ml标本管中。收集完毕的尿液标本在1 h内完成检测。

1.4 尿液样品预处理及萃取方法 取10 ml尿液置入顶空瓶中,加盖密封,SPME萃取头插入顶空瓶,置入40℃恒温箱中静置萃取30 min。萃取后,将萃取头手动插入GC-MS进样口,解析5 min再读数据。同时取10 ml纯水按相同步骤处理,作为空白对照,消除空气中VOCs的干扰。

1.5 色谱与质谱条件 柱箱初温:35℃;进样口温度:250℃;柱流速:1 ml/min;进样方式:不分流进样;柱箱程序升温:35℃保持2 min,以6℃/min速度升至150℃,再以12℃/min升至250℃,保持3 min。质谱离子源温度:200℃;接口温度:220℃;溶剂切除时间:1 min;扫描范围:45~350 m/z。

1.6 标准品的配制 分别抽取4、2、1 ml、500、250 μl的色谱纯正己烷、2-丁酮和4-庚酮注入顶空瓶,加甲醇水溶液(纯水:甲醇=1:1)配制到10 ml后密封。

1.7 实验方法稳定性测定与定量方法 用标准曲线法定量,根据目标VOCs成分最大和最小色谱峰面积,首先配置相应浓度的标准品,然后配置该范围内5个浓度的标准品,检测色谱峰面积值,每个浓度对应的色谱峰面积测2次,计算其平均值;以色谱峰面积为纵坐标,以浓度为横坐标建立线性回归方程。研究对象尿液中的VOCs的浓度=尿液VOCs测量浓度-实验室环境中的VOCs浓度。

1.8 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,选用线性回归建立回归方程,筛选比较物质采用非参数检验中的Wilcoxon检验(检验水准 $\alpha=0.05$)。

2 结果

2.1 尿液中VOCs的分析 按照步骤1.5中的GC-MS条件对尿液样本进行检测,选取保留时间在0~32 min的总离子流程图,通过NIST 05数据库进行定性分析,将DLBCL患者和健康对照者尿液中VOCs色谱图相比较,筛选出正己烷、2-丁酮和4-庚酮3种有明显差异的VOCs。见图1、2。

2.2 尿液中VOCs浓度比较 通过定量检测两组尿液中正己烷、2-丁酮和4-庚酮的浓度,DLBCL组患者尿液中上述3种VOCs的浓度与对照组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 DLBCL组与对照组尿液中VOCs浓度比较(μg/ml, $\bar{x}\pm s$)

VOCs	DLBCL组	对照组	P值
正己烷	63.45±9.98	83.45±10.99	<0.05
2-丁酮	105.43±12.81	66.02±15.64	<0.05
4-庚酮	162.56±25.38	62.74±20.60	<0.05

2.3 尿液中特异性VOCs用于DLBCL诊断的价值 根据受试者工作曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)评估正己烷、2-丁酮和4-庚酮在DLBCL患者和健康对照者之间的诊断能力。正己烷曲线下面积(area under curve, AUC)为0.888,敏感度为90.6%,特异度为85.2%;2-丁酮AUC为0.973,敏感度为83.9%,特异度为96.0%;4-庚酮AUC为0.924,敏感度为93.9%,特异度为85.2%。见表2、图3。

表2 3种标志物在DLBCL和健康对照者之间的诊断价值

VOCs	截断点	敏感度	特异度	AUC	P值	AUC 95% CI
正己烷	72.370	0.906	0.852	0.888	0.000	0.793~0.982
2-丁酮	93.695	0.839	0.960	0.973	0.000	0.940~1.005
4-庚酮	83.935	0.939	0.852	0.924	0.000	0.855~0.992

2.4 重现性和线性 配制浓度为0.66 μg/ml的正己烷样品,浓度为0.81 μg/ml的2-丁酮样品和浓度为0.82 μg/ml的4-庚酮各5份,按上述方法吸附、分析,测定结果的相对标准偏差($n=5$),正己烷为4.8%,2-丁酮为3.7%,4-庚酮为0.9%。对1.6步骤中配制的不同浓度的标准品分析,以色谱峰面积为纵坐标(y),浓度为横坐标(x),进行线性回归。正己烷的回归方程为 $\hat{y}=2.64\times 10^6x-7.51\times 10^5$,

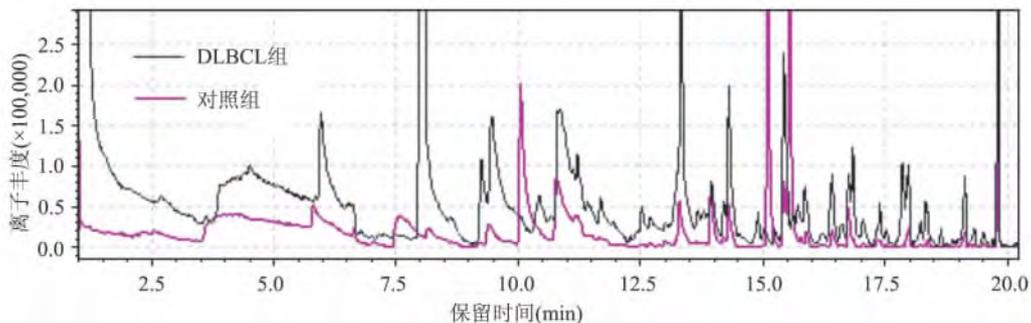


图1 尿液中 VOCs 典型色谱图比较

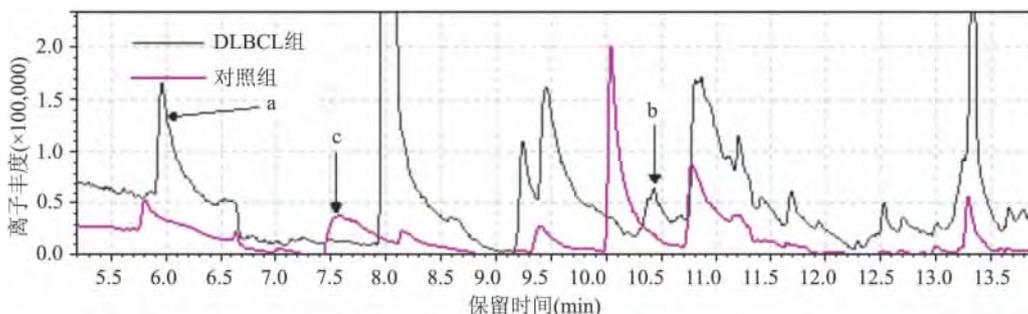


图2 DLBCL 组和对照组局部放大色谱图

a:4-庚酮; b:2-丁酮;c:正己烷

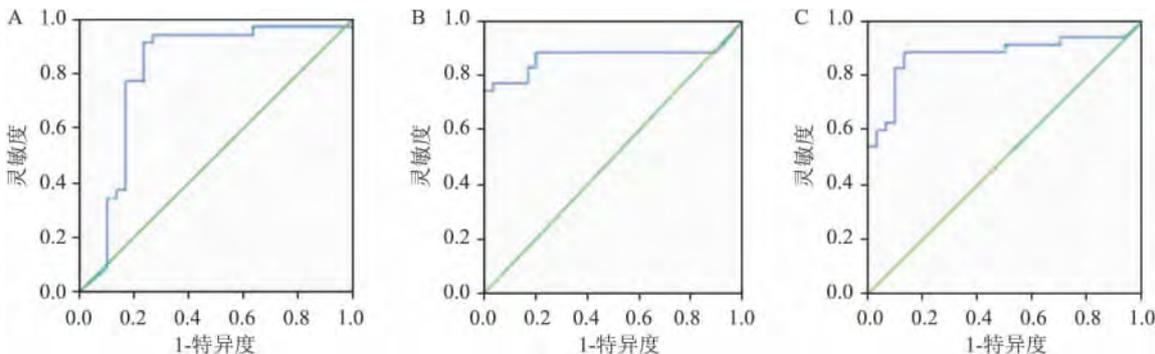


图3 3 种标志物的 ROC 曲线

A:正己烷;B:2-丁酮;C:4-庚酮

$R^2 = 0.930$; 2-丁酮的回归方程为 $\hat{y} = 2.92 \times 10^7 x - 1.15 \times 10^6$, $R^2 = 0.991$; 4-庚酮的回归方程为 $\hat{y} = 3.98 \times 10^7 x - 6.36 \times 10^6$, $R^2 = 0.998$ 。

3 讨论

人尿液中含有 280 余种 VOCs, 通过检测其组分的改变可以诊断疾病^[2]。尿液 VOCs 分析具有简单无创、快捷方便的优点, 正逐渐成为肿瘤的一项新兴筛查方法。随着检测技术的发展, 已经筛查出部分与肿瘤相关的挥发性标记物作为疾病的参考诊断指标^[3-4]。

本研究使用 SPME 联合 GC-MS 法检测 DLBCL 患者尿液及健康对照者尿液中 VOCs。经定量分析筛选出 3 种 VOCs: 正己烷、2-丁酮和 4-庚酮。3 者相对标准偏差分别为 4.8%、3.7% 和 0.9%。相关系数 R^2 分别为 0.930、0.991 和 0.998, 表明该检测方法有良好的重现性和线性。2-丁酮和 4-庚酮在 DLBCL 患者尿液中浓度均显著高于健康对照者, 诊断灵敏度可达 83.9% 和 93.9%, 特异度为 96.0% 和 85.2%; 正己烷在患者尿液中浓度低于健康对照者, 诊断灵敏度可达 90.6%, 特异度为 85.2%, 可能作为 DLBCL 初筛的理想标志物。

尿液中 VOCs 来源有 2 种:外源性和内源性。外源性多为大气污染、食物饮食中有机物,内源性 VOCs 一般认为由细胞膜中多不饱和脂肪酸与氧自由基发生脂质过氧化反应产生^[5]。肿瘤细胞中氧自由基活性增加^[6],脂质过氧化反应增强,导致 VOCs 生成较正常细胞明显增多。此外,肿瘤细胞中细胞色素 P450 混合酶系统也可能改变某些 VOCs 的代谢过程,导致特异性 VOCs 的产生^[7]。在肿瘤的发生发展过程中大多肿瘤细胞存在氧化应激增强的现象,即使微小的病灶也可能存在较强的氧化应激,表明 VOCs 在早期诊断肿瘤上可能更有优势^[8]。

本研究筛查出的正己烷属于直链饱和脂肪烃类,主要用于丙烯等烯烃聚合时的溶剂、食用植物油的提取剂、橡胶和涂料的溶剂以及颜料的稀释剂。Cozzolino et al^[9]发现自闭症儿童尿液中的正己烷浓度明显高于正常儿童,其可能由脂质过氧化产生。本研究显示 DLBCL 患者尿液中的正己烷浓度明显低于健康对照者,推测其产生除氧化应激外另受到细胞色素 P450 混合酶调控,其可能被进一步氧化而降低浓度^[10]。2-丁酮和 4-庚酮皆属于酮类,一般认为由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 2-丁酮和 4-庚酮等酮类。

参考文献

- [1] Carbone A ,Gloghini A ,Kwong Y L ,et al. Diffuse large B cell lymphoma:using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy[J]. *Ann Hematol* 2014 93(8):1263 - 77.
- [2] Pauling L ,Robinson A B ,Teranishi R ,et al. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971 68(10):2374 - 6.
- [3] Silva C L ,Passos M ,Câmara J S. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Br J Cancer* 2011 105(12):1894 - 904.
- [4] Guadagni R ,Miraglia N ,Simonelli A ,et al. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method validation for the determination of endogenous substances: urinary hexanal and heptanal as lung tumor bio-markers [J]. *Anal Chim Acta* , 2011 701(1):29 - 36.
- [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] Hietanen E ,Bartsch H ,Béreziat J C ,et al. Diet and oxidative stress in breast , colon and prostate cancer patients: a case - control study [J]. *Eur J Clin Nutr* 1994 48(8):575 - 86.
- [7] McDonnell A M ,Dang C H. Basic review of the cytochrome p450 system [J]. *J Adv Pract Oncol* 2013 4(4):263 - 8.
- [8] 宋耕,秦涛,刘虎,等.早期肺癌患者呼气中痕量挥发性有机化合物的定量检测 [J]. *安徽医科大学学报* 2008 43(3):323 - 5.
- [9] Cozzolino R ,De Magistris L ,Saggese P ,et al. Use of solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for determination of urinary volatile organic compounds in autistic children compared with healthy controls [J]. *Anal Bioanal Chem* , 2014 406(19):4649 - 62.
- [10] Hakim M ,Broza Y Y ,Barash O ,et al. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways [J]. *Chem Rev* , 2012 112(11):5949 - 66.

The screening of urinary volatile markers for diffuse large B-cell lymphoma

Hua Qingling¹ ,Wang Lin² ,Liu Chan³ , et al

(¹Dept of Oncology ,²Dept of Hematology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022 ;
³Anhui Institute for Food and Drug Control Hefei 230051)

Abstract Objective To screen urinary volatile organic compounds (VOCs) in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients . **Methods** The urine samples were collected from 35 DLBCL patients and 30 healthy controls. VOCs were extracted with head space solid phase micro-extract (SPME) combined with the gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS). The non-parametric Wilcoxon test was used for discriminating the VOCs and assessing the statistical significance. **Results** Hexane ,2-butanone and 4-heptanone were found as the specific VOCs for DLBCL. The concentration range of the hexane was (63.45 ± 9.98) μg/ml ,and the concentration range of 2-butanone was (105.43 ± 12.81) μg/ml. As for the concentration range of 4-heptanone , it was (162.56 ± 25.38) μg/ml. The concentration of the three VOCs was significantly different between DLBCL patients and healthy controls (*P* < 0.05). **Conclusion** Hexane ,2-butanone and 4-heptanone may be the latent volatile biomarkers for the diagnosis of patients with DLBCL.

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