

急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1 挥发性有机物的测定

王娟 夏海龙

摘要 目的 检测急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1 培养瓶顶空气体中挥发性有机物 (VOCs) ,分析该细胞对其组分的影响,并筛选出白血病细胞株 SHI-1 代谢产物中具有特征性的 VOCs,探讨 VOCs 在白血病患者缓解后随访或与其他肿瘤鉴别诊断中的价值。方法 收集急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1、人巨噬细胞株和空白培养液培养瓶顶空气体中的 VOCs,采用固相微萃取 - 气相色谱/质谱技术 (SPME-GC/MS) 对其进行检测,应用双边 Mann-Whitney U 检验分析两两之间的差异性,筛选出与 SHI-1 细胞有关的特征性 VOCs。结果 SHI-1 细胞培养瓶顶空气体中可检测出 8 种特征性挥发性有机物,分别为 2-甲基庚烷、苯、4-甲基辛烷、氯仿、3,7-二甲基十二烷、己醇、环己醇、十六烷,其中烷烃类、苯类物质可检测量较对照组中明显增高,醇类明显减少。结论 SHI-1 细胞可引起培养瓶顶空气体中 VOCs 组分的改变,其中多种烷烃类物质、苯含量增多,醇类含量减少,提示上述物质有可能作为白血病细胞特征性标志物。

关键词 急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1; 肿瘤; VOCs; 固相微萃取 - 气相色谱/质谱技术

中图分类号 R 557.2;R 733.713

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1409-05

呼气分析是通过检测人体呼气中挥发性有机物 (volatile organic compounds, VOCs) 成分及含量的变化来间接反映机体新陈代谢及生理病理过程的改变,从而判断其疾病情况;随着微量检测技术的改进,呼气分析有望成为新的疾病诊断技术,并且为疾病发生发展和疗效评价提供有效的信息。VOCs 是指在常温下,沸点在 50~260 °C 的各种有机化合物;按其化学结构,可进一步分为:烷类、芳烃类、醇类、醛类等,普遍存在于室内外空气、人及动物呼吸气体中。人体呼气中 VOCs 组成成分及数量的改变与不同疾病有关^[1],并且已有诸多学者^[2-6]证实了 VOCs 与各种疾病的关系,如肺部疾病、肝癌、乳腺癌、感染性疾病等,尤其是肺部疾病及肿瘤方面研究甚多。该课题采用固相微萃取 - 气相色谱/质谱技术 (solid

phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry, SPME-GC/MS) 对急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1、人巨噬细胞株及空白培养液培养瓶顶空气体中 VOCs 进行检测分析,了解 SHI-1 代谢过程中 VOCs 组分的改变,筛选出与 SHI-1 代谢有关的特征性 VOCs。

1 材料与方法

1.1 细胞系 急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1 由苏州大学医学院第一附属医院血液科实验室惠赠;人巨噬细胞株由安徽医科大学药理实验室惠赠。

1.2 试剂与器材

1.2.1 主要试剂 小牛血清购自四季青生物工程材料有限公司; RPMI1640 培养液购自美国 Hyclone 公司。

1.2.2 主要器材 HEPA class100 CO₂ 培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司; Olympus IX70 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司; DK-8D 型电热恒温水槽购自上海精宏实验设备公司; SCW-CJ-IFD 垂直流洁净工作台购自苏州宏瑞净化科技有限公司; 50 ml 培养瓶购自美国 Corning 公司; 固相微萃取针购自美国 Supelco 公司; GC/MS 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将急性单核白血病细胞株 SHI-1 以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的浓度接种于含 15% 小牛血清 RPMI1640 培养液中,置于 37 °C、饱和湿度条件下,体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养; 实验所用细胞均处于对数生长期。

1.3.2 对照组的设立 人巨噬细胞其培养条件同

1.3.1 实验所用细胞均处于对数生长期; 空白培养瓶不加入任何细胞株,其中仅为含 15% 小牛血清的 RPMI1640 培养液。对照组所有操作要求与实验组完全相同且同时进行,以保证对照的有效性。

1.3.3 VOCs 萃取与检测 检测前 24 h 换入新鲜的含 15% 小牛血清的 RPMI1640 培养液 10 ml,拧紧瓶盖,利用涂覆有 100 μm PDMS 的 SPME 萃取培养液培养瓶顶空气体中的 VOCs,在室温下 40 min,见图 1。

2013-12-31 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1308085MH159)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:王娟,女,硕士研究生;

夏海龙,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xhl1999cn@163.com

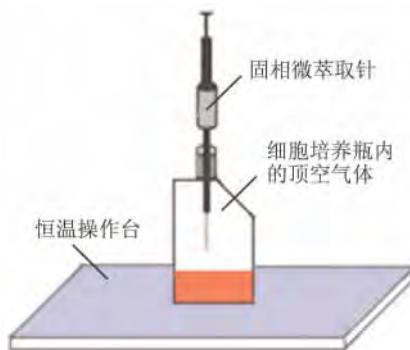


图 1 利用 SPME 萃取培养液培养瓶顶空气体中的 VOCs

SPME 每次使用前在 280 °C 条件下加热 30 min 以去除残留物质。萃取结束后随即进入 GC/MS , 在进样口解析 10 min 后再进行检测并读取数据。GC 工作条件:载气为高纯氦气 (He) , 流速为 1.0 ml/min , 分流进样 , 进样时间为 2 min , 进样口温度为 280 °C ; 柱箱程序升温:50 °C 保持 5 min , 再以 10 °C / min 升至 230 °C , 最后以 25 °C 升至 260 °C 保持 1 min 。 MS 离子源温度为 250 °C , 扫描范围为 33 ~ 200 m/z 。

1.4 统计学处理

1.4.1 质谱所得的峰面积即离子强度标准化处理

为提高不同样本之间数据的可比性及减少离子反应波动等对其结果的影响 , 需对其质谱相关数据进行标准化。其具体方法如下:统一将 CO₂ 设为基数 , 其他物质的峰面积按公式 ($I'_{\text{m}} = I_{\text{m}} / I_{\text{CO}_2} \times 100\,000\,000$) 计算 , 其中 I_{m} 为某物质的峰面积 , I'_{m} 为标准化后的数据。

1.4.2 数据分析 实验所得数据为非正态分布 , 故采用双边 Mann-Whitney U 检验对其数据进行分析。

2 结果

2.1 实验组和对照组培养瓶顶空气体 VOCs 检测总离子流图的比较 依上述方法对培养瓶顶空气体进行采样及检测 , 并对其检测数据进行标准化后获得如下数据 , 见图 2 。

3 者培养瓶顶空气中的 VOCs 质谱总离子流图对比见图 2 , 可以看出 3 组数据出现的峰高低不同 , 即代表所检测的物质离子强度的不同。通过质谱检索库搜索 , 共检测出 20 种 VOCs (不同峰面积代表不同物质出现的强度不同 , 即含量上存在差异) , 见表 1 。结合图 2 可得出 :2 *A*-二甲基庚烷、4-甲基辛烷、氯仿、3 , 7-二甲基十二烷、十六烷的峰较实验组

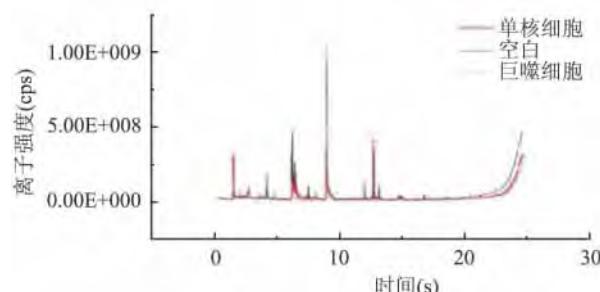


图 2 细胞株 SHI-1 、巨噬细胞株及培养液培养瓶顶空气体检测的总离子流图比较

明显增高 , 己醇、环己醇的峰明显降低 ; 经检测分析发现 8 种特征性 VOCs 如表 2 所示 (Z 值大于 1.96 或小于 -1.96 分别表明相应物质的峰面积即离子强度在 SHI-1 细胞株顶空气体中较巨噬细胞株增多或减少) 。

2.2 3 组中不同物质峰面积的比较 结合上述分析结果 , 所测 8 种具有特征性 VOCs 峰面积分别在细胞株 SHI-1 、巨噬细胞株、培养液培养瓶顶中的分布及其比较如下所示 , 见图 3 。

3 讨论

白血病临床诊断、病情分析及疗效评价是血液病学主要的工作内容 ; 骨髓穿刺等创伤性检查以及相关器官功能检查等 , 是白血病诊疗工作的基本工具 , 由于这些检查手段的检查结果易受多种因素的影响、检查时程较长 , 尤其是创伤性操作给患者带来不便和痛苦 , 开发一种简单有效、经济方便、令患者满意的诊断技术成为临床医学的研究热点之一。呼气分析是采用微量检测设备对机体代谢过程中产生或消耗的气体进行检测 , 间接反应机体生理病理过程的改变 ; 该技术在临床医学 , 尤其是肿瘤早期筛查或鉴别诊断中越来越受人们的关注。研究^[1] 表明多种疾病存在与疾病相关的特征性 VOCs , 人体呼气中 VOCs 组成成分及数量与不同疾病有关。胡燕婕等^[7] 应用 SPME-GC/MS 系统对肺癌细胞及正常细胞进行检测 , 发现肺癌细胞代谢产物中烷烃类物质较正常细胞有所升高 ; 有学者^[8~9] 应用 GC-MS 检测 NCI-H2087 、 NCI-H1666 等肺癌细胞株也发现不同烷烃类物质含量升高 ; Peng et al^[4] 将一种金纳米颗粒传感器阵列电子鼻应用到肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌及正常对照 5 组对象呼气的鉴别中 , 发现这种电子鼻不仅可以区分癌与非癌 , 还可以将不同种癌症很好的区分开来。

表1 3组培养液培养瓶顶空气体中所检测的 VOCs 比较

保留时间 (s)	化合物	峰面积(SHI-1) (cps)	峰面积(巨噬) (cps)	峰面积(空白) (cps)
1.99	2-甲基庚烷	18 733 104.26	4 233 104.26	0
2.21	4-甲基辛烷	659 189.37	783 833.81	5 136 529.08
2.69	乙醇	63 828 745.63	16 539 958.03	17 651 408.46
2.79	苯	32 576 590.56	7 130 653.85	6 661 986.81
3.55	癸烷	21 431 664.15	16 470 278.31	14 852 158.83
3.73	4-甲基癸烷	1 743 809.01	0	0
3.79	氯仿	4 497 152.58	596 487.53	0
4.14	甲苯	244 411 253.00	103 218 280.21	152 035 643.80
4.25	3,7-二甲基十二烷	1 306 792.00	282 086.25	0
5.14	己醇	0	1 482 983.15	2 261 436.24
6.16	乙苯	56 255 482.90	212 438 267.34	244 952 733.50
6.35	间二甲基苯	171 895 058.60	69 984 419.13	71 736 653.31
6.49	邻二甲基苯	100 528 620.80	52 682 808.24	50 545 192.83
8.01	十二烷	9 429 659.33	476 916 371.83	25 594 668.31
8.96	苯乙烯	1 314 567 015.00	1 012 758 147.47	1 048 381 557.00
11.43	环己醇	0	286 823.38	4 001 823.38
11.57	十四烷	10 056 732.28	5 896 004.27	6 330 478.17
12.73	2-乙基己醇	174 202 553.90	603 381 421.44	626 584 389.80
13.33	十六烷	1 761 749.20	1 483 181.698	0
14.30	2,6,10-三甲基十二烷	4 358 263.12	1 981 421.44	1 720 779.57

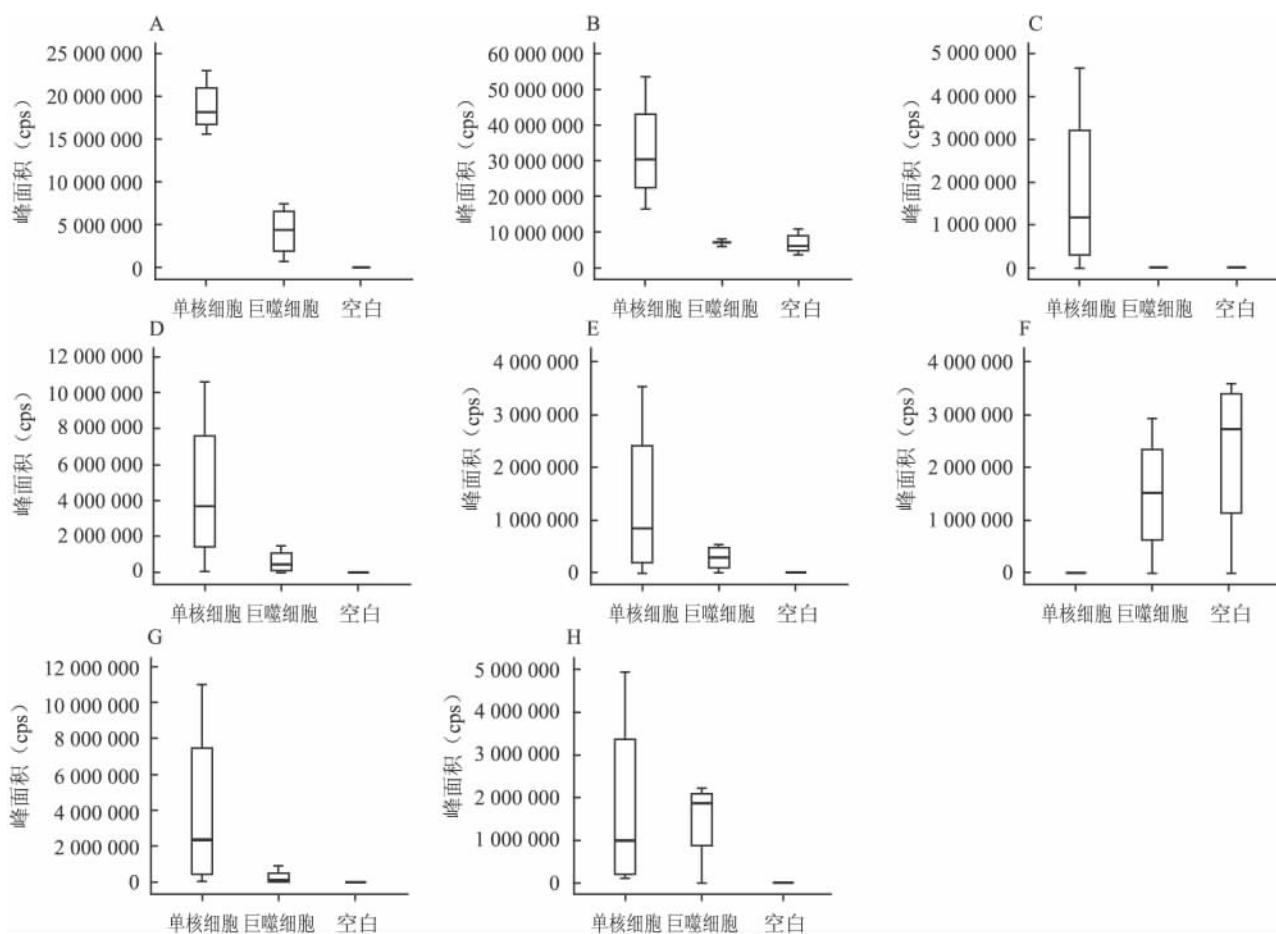


图3 3组有意义物质峰面积的分布

A:2-甲基庚烷; B:苯; C:4-甲基癸烷; D:氯仿; E:3,7-二甲基十二烷; F:己醇; G:环己醇; H:十六烷

表2 细胞株 SHI-1、巨噬细胞株和培养瓶顶空气体中 VOCs 峰面积的比较

化合物	中位数	Z 值	P 值
2 <i>Α</i> -二甲基庚烷	11 571 731.66	2.460	0.014
苯	12 292 798.03	2.309	0.021
4-甲基辛烷	0.00	1.984	0.047
氯仿	1 092 264.57	1.984	0.047
3,7-二甲基十二烷	397 832.01	1.984	0.047
己醇	0.00	-1.984	0.047
环己醇	464 995.86	-2.460	0.014
十六烷	1 761 749.19	2.460	0.014

本研究采用 SPME-GC/MS 系统对 SHI-1 细胞、巨噬细胞株和培养瓶顶端空气体中的 VOCs 进行定性分析,发现 8 种特征性 VOCs,分别为 2 *Α*-二甲基庚烷、苯、4-甲基辛烷、氯仿、3,7-二甲基十二烷、己醇、环己醇、十六烷,其中烷烃类、苯类物质可检测量较对照组中明显增高,醇类明显减少,所得结果与文献^[1~9]结果类似。其中检测量增高的物质是细胞在新陈代谢过程中所产生,而减少的则是细胞生长所需要的;由此表明,细胞代谢和其生存微环境中一些有机物之间的相对关系,从而提出白血病细胞代谢过程中存在细胞水平的特征性标志物。

人体呼气中 VOCs 产生机制复杂,有文献^[10~11]提出通过对人体白细胞、HL60 培养瓶顶空气体进行检测,发现其成分有所改变,其机制与氧化应激及过氧化酶活性有关。白血病细胞中氧自由基活动增强,诱导氧化应激引起细胞脂质过氧化反应,导致细胞膜中多不饱和脂肪酸降解增加,故烷烃类物质生成明显增多;此外,肿瘤患者中 VOCs 代谢的细胞色素 P450 混合酶系发生改变^[12~13],也可能是白血病细胞 VOCs 发生的机制之一。Huang et al^[14]应用 SIFT-MS 检测胃食管癌患者尿液培养瓶顶空 VOCs 气体发现乙醇、丙醇等醇类物质及苯酚,但与健康对照者无明显差异;但其产生机制尚不明确。本研究实验组中醇类及芳香族物质的代谢机制尚不明确,有待进一步研究。

该研究检测了白血病细胞代谢产物中 VOCs 组成成分,并对其进行分析,初步筛选出与对照组差异有统计学意义的 VOCs,提示这些物质可能为白血病细胞潜在的标志物,但本研究样本量相对较小而不能有效排除个体差异,在检测分析及疾病诊断方面尚缺乏统一的标准以及各种仪器应用时的局限性等。本研究结果为呼吸分析用于临床提供了实验依

据,但在白血病患者缓解后随访或与其他肿瘤鉴别诊断中的应用仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 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]. Chromatogr A ,2009 ,1216(14):2749~56.
- [2] Shuster G ,Gallimidi Z ,Reiss A H ,et al. Classification of breast cancer precursors through exhaled breath [J]. Breast Cancer Res Treat ,2011 ,126(3):791~6.
- [3] Chen X ,Xu F ,Wang Y ,et al. A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells *in vitro* for breath diagnosis [J]. Cancer ,2007 ,110(4):835~44.
- [4] 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.
- [5] Thekedar B ,Oeh U ,Szymczak W ,et al. Influences of mixed expiratory sampling parameters on exhaled volatile organic compound concentrations [J]. J Breath Res ,2011 ,5(1):016001.
- [6] Wong R P ,Flematti G R ,Davis T M. Investigation of volatile organic biomarkers derived from Plasmodium falciparum *in vitro* [J]. Malar J ,2012 ,11:314.
- [7] 胡燕婕,邱园华,陈恩国,等.有机性挥发物在肺癌组织和癌细胞株中的检测和分析[J].浙江大学学报(医学版),2010,39(3):278~84.
- [8] Sponring A ,Filipiak W ,Ager C ,et al. Analysis of volatile organic compounds(VOCs) in the headspace of NC-H1666 lungcancer cells [J]. Cancer Biomark ,2010 ,7(3):153~61.
- [9] Filipiak W ,Sponring A ,Filipiak S ,et al. TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells *in vitro* [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev ,2010 ,19(1): 182~95.
- [10] 宋琪,刘虎高,署,等.乳腺癌患者呼气中挥发性标志物的筛选与定量分析[J].安徽医科大学学报,2010,45(1):76~9.
- [11] Shin H W ,Umber B J ,Meinardi S ,et al. Acetaldehyde and hexanaldehyde from cultured white cells [J]. J Transl Med ,2009 ,7:31.
- [12] Belda-Iniesta C ,de Castro Carpeño 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] Phillips M ,Cataneo R N ,Cummin A R ,et al. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath [J]. Chest ,2003 ,123(6):2115~23.
- [14] Huang J ,Kumar S ,Abbassi-Ghadi N ,et al. Selected ion flow tube mass spectrometry analysis of volatile metabolites in urine headspace for the profiling of gastro-esophageal cancer [J]. Anal Chem ,2013 ,85(6):3409~16.

◇药学研究◇

橙皮苷衍生物 Y-12 对免疫低下小鼠免疫功能的影响

李小枫, 李俊, 黄成, 田远耀, 石静波, 王欠欠, 胡婷婷

摘要 目的 研究橙皮苷衍生物 Y-12 (HY-12) 对免疫低下小鼠的免疫功能的影响。方法 以连续 2 d 腹腔注射给药环磷酰胺 (50 mg/kg), 建立小鼠免疫低下模型, 同时分别用 IgG 和 IgM 测量试验、巨噬细胞吞噬碳试验和迟发性超敏反应观测 HY-12 不同浓度对免疫低下小鼠免疫系统的影响。结果 巨噬细胞吞噬碳试验中环磷酰胺诱免疫低下模型小鼠的廓清指数 (K) 和巨噬细胞的吞噬指数 (α) 能被 HY-12 (100、200、400 mg/kg) 组增加; 溶血素试验中, HY-12 (200、400 mg/kg) 组不仅能增多免疫低下模型小鼠血清中 IgG 和 IgM, 同时脾细胞溶血素也被增多; HY-12 (200、400 mg/kg) 组可明显有助于免疫低下模型小鼠 DTH 反应; 并能提高脾

淋巴细胞 IL-22 含量; HY-12 (100、200、400 mg/kg) 能提高 CD4⁺、CD8⁺ 细胞数以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值。结论 HY-12 能普遍增强模型小鼠的免疫系统反应, 对免疫低下模型小鼠的免疫功能有很好的提高作用。

关键词 5'-硝基乙酰化橙皮苷; 体液免疫; 非特异性免疫; 细胞免疫; 环磷酰胺

中图分类号 R 285.5; R 392.5; R 965; R 967; R 979.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1413-05

橙皮苷 (hesperidin, HDN) 是黄酮类化合物的一种, 来源广泛, 特别是柑桔属植物中含量较多。已经证实 HDN 对炎症和病痛^[1-2] 和肿瘤生长^[3] 都有很好的抑制作用。李荣等^[4] 还发现其对继发性炎症有良好的治疗作用。但是, 影响其在医药领域应用狭小的主要原因是 HDN 水溶性和生物利用度较低^[4-6]。为此, 通过化学修饰的方法改变 HDN 的水溶性和生物利用度, 从而为 HDN 的应用提供依据。该课题组前期从陈皮中纯化出 HDN, 并做了一系列不同的基团修饰来提高水溶性和生物利用度并得到

2014-05-30 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (编号: 1206C0805026)

作者单位: 安徽医科大学药学院 安徽省天然药物活性研究重点实验室 安徽省天然药物活性成分工程技术研究中心, 合肥 230032

作者简介: 李小枫, 男, 硕士研究生;
李俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lijun@ahmu.edu.cn

Analysis of VOCs in the headspace of SHI-1 acute mononuclear leukemia cell

Wang Juan, Xia Hailong

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

Abstract Objective To find out the impact of SHI-1 cells on VOCs in the headspace, and to assess the feasibility of VOCs analysis in leukemia patients or with other tumors in the differential diagnosis by determining VOCs in the headspace of acute mononuclear leukemia cells (SHI-1). **Methods** The air samples from the headspace of SHI-1, Human macrophages cells and medium control were collected by syringes, and then determined by means of solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) in order to have a better understanding of the concentration distributions and changes of VOCs in SHI-1 cells' headspace. **Results** Using Mann-Whitney U test, we found that eight kinds of VOCs were different among them. They were 2 α -dimethyl heptanes, 4-methyl octane, chloroform, benzene, 3,7-dimethyl dodecanes, hexanol, cyclohexanol, cetane. And alkane, benzene were significantly higher than the control group ($P < 0.05$), alcohol decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** SHI-1 cells have an impact on the concentration distributions of VOCs in their headspace. The most outstanding VOCs are alkanes, alcohol and benzene compared with the blank control group. They may be potential markers characteristic of leukemia cells.

Key words acute mononuclear leukemia cells SHI-1; tumors; VOCs; SPME-GC/MS