中华实验外科杂志 2011 年 3 月第 28 卷第 3 期 Chin J Exp Surg, March 2011, Vol. 28, No. 3

· 实验研究 ·

痰液直接电喷雾萃取电离质谱分析在非小细胞肺癌诊断中的应用

魏益平 鄢飞燕 贾滨 丁健桦 彭金华 陈焕文 徐建军

【摘要】 **目的** 探讨中性解吸电喷雾萃取电离质谱(ND-EESI-MS)痰液分析在非小细胞肺癌(NSCLC)诊断中的应用。**方法** 在不对痰液进行任何预处理前提下,采用自主研发的 ND-EESI-MS 技术对 NSCLC 患者和非肺癌患者的痰液样品进行快速质谱分析,设置 ND-EESI 离子源为正离子模式,质量范围 50 ~ 1000 Da,离子传输管温度 150 ℃,喷雾电压 3.5 kV,透镜电压 60.0 V,解吸气 N_2 压力 3.2 MPa。采用主成分分析(PCA)方法对这两组患者痰液的质谱指纹图谱进行分析。**结果** NSCLC 和非肺癌患者的痰液样品指纹谱图在 78、87、99、118、362、367、539 m/z 等处的质谱峰的相对丰度均有较明显差异,其中 362 m/z 与 367 m/z 之间的相对丰度差异最为明显。利用主成分分析法(PCA)能够较好地将 NSCLC 组和对照组区分。**结论** ND-EESI-MS 耦合 PCA 痰液分析能有效区分 NSCLC 和非肺癌患者痰液样本,有助于快速、无创诊断 NSCLC。

【关键词】 非小细胞肺癌; 痰液; 电喷雾萃取电离质谱

Diagnosis of NSCLC on sputum by neutral desorption extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry

*WEI Yi-ping**, *YAN Fei-yan*, *JIA Bin*, *DING Jian-hua*, *PENG Jin-hua*, *CHEN Huan-wen*, *XU Jian-jun*. * *Department of Cardiothoracic Surgery, the second affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China*

Corresponding author: XU Jian-jun, Email: xujianjun3526@163.com

【**Abstract**】 **Objective** To study the diagnosis of non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) on sputum analysis by neutral desorption extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry (ND-EESI-MS). **Methods** The sputum samples from 6 NSCLC patients and 6 patients without NSCLC were prepared for this approach. Without any preconditioning, home-made neutral desorption extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry (ND-EESI-MS) was used for sputum samples analysis. The ND-EESI ion source mode was set to positive ion mode, mass rang 50-1000 Da, Ion transmission tube temperature was set to 150 ℃, atomization voltage was set to 3.5 kV, lens voltage was set to 60.0 V, sample injection tube N_2 gas pressure was 3.2 Mpa. The data processing method of principal component analysis (PCA) was performed for the metabolic fingerprinting spectrum. **Results** Specific sputum sample fingerprint spectrum differences can be observed between the patients with and without NSCLC, such as, 78, 87, 99, 118, 362, 367, 539 m/z, the most obviously difference of relative abundance were 362 m/z and 367 m/z. Pattern recognitions at the fingerprint spectrum level for clustering analysis of sputum samples are achieved successfully. **Conclusion** The patients sputum samples with and without NSCLC can be distinguish effectively by ND-EESI-MS coupling with PCA analysis, the ND-EESI-MS can be a novel methods for rapid and noninvasive diagnosis of NSCLC.

【**Key words**】 Non-small cell lung cancer; Sputum samples; Extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry

非小细胞肺癌(NSCLC)的发病率和病死率在恶性肿瘤中均居首位[1],早期 NSCLC 和中、晚期 NSCLC 的预后有着本质的区别,但临床确诊的 NSCLC 患者 70% 左右为中、晚期[2-3],探讨 NSCLC 的快速诊断方法、用于 NSCLC 的筛查以提高临床确诊 NSCLC 病例中的早期患者比例对改善其预后具有重要意义[2,4]。理想的 NSCLC 筛查方法应具有检查速度快、无创、灵敏度高、适应性好等特点[5-6]。痰液细胞学检查是唯一可以无创确诊 NSCLC 的方法,但是传统痰液检查因样本处理繁琐、敏感性低,不是理想的 NSCLC 筛查方法[6-9]。电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)技术最早是为了实时、在线、连续地监测液体样品而发明的一种快速质谱分析技术,本小组前期研究表明,中性解吸电喷雾萃取电离质谱(ND-EESI-MS)技术,可在无需样品预处理的条件下,用于蜂蜜、橄榄油和牙膏等复杂基质黏稠样品的快速直接分析[10-11]。我们应用 ND-EESI-MS 技术分析 NSCLC 患

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2011.03.034

基金项目:江西省自然科学基金资助项目(2010GQY0249)

作者单位:330006 南昌大学第二附属医院心胸外科(魏益平、彭金华、徐建军);东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点(鄢飞燕、贾滨、丁健桦、陈焕文)

通信作者:徐建军,Email:xujianjun3526@163.com

者痰液，观察该技术区分NSCLC患者和非肺癌患者的痰液样品的效果。

资料和方法

1. 一般资料：本研究经南昌大学第二附属医院临床委员会批准，所有患者知情同意。病例入选标准：2010年1月至2010年11月入院的肺部疾病患者；留痰液标本前未使用任何药物；每例患者留取痰样前空腹8 h以上；取样时先用生理盐水漱口2次；留取患者晨起第一口深部痰，所留取痰样置于 -80 ℃保存。入选患者根据手术后病理结果分为NSCLC组和对照组，其中NSCLC组6例，其中男4例，女2例，年龄45～65岁，中位年龄52岁，其中鳞癌4例、腺癌2例。对照组（非肺癌组）6例，其中男4例，女2例，年龄40～57岁，中位年龄50岁，其中肺炎2例、肺结核1例、支气管扩张2例、膈疝1例。ND-EESI离子源（东华理工大学研制）[11]；LTQ-XL增强型线性离子阱质谱仪，配有Xcalibur数据处理系统（美国Finnigan公司）；KQ3200型超声清洗仪（昆山超声仪器有限公司）。甲醇（色谱纯，美国Fisher Scientific公司）；醋酸（分析纯，上海试剂化学有限公司）；实验用水为2次去离子水。

2. 痰液的ND-EESI-MS分析方法：痰液样品未经任何处理，解冻后直接置于样品管中进行分析。设置ND-EESI离子源为正离子模式，质量范围50～1000 Da；离子传输管温度150 ℃；喷雾电压3.5 kV；透镜电压60.0 V；N_2 压力3.2 Mpa，其他条件系统自动优化，具体参数细节示意图。

3. ND-EESI-MS指纹谱图的主成分分析法（PCA）分析：将ND-EESI-MS所记录的痰液样品的质谱指纹谱图的相对丰度数据导出，并将数据整理为每行代表1个样本，每列代表1个质荷比（m/z）值的矩阵X。用Matlab Toolbox软件中的Princomp函数对矩阵X进行处理，得到PCA分析结果。上述数据处理方法均在Matlab 7.8中编程实现。

结　果

1. 痰样指纹图谱：采用ND-EESI-MS技术，在正离子模式下，通过实验得到两组患者痰液样品的指纹谱图。通过比较两组痰液样品的指纹图谱，可见两组样本指纹谱图在78、87、99、118、362、367、539 m/z等处的质谱峰的相对丰度均有较明显差异，其中362 m/z与367 m/z之间的相对丰度差异最为明显。

2. 指纹图谱PCA分析：采用PCA对痰液样品的质谱指纹谱图进行数据分析，其中NSCLC组6例，对照组6例，并且每例取样5次，总计60份痰液样品的质谱数据用于PCA分析。在PCA得分结果中样品质谱指纹图谱中数据信息得以充分展示，PC1、PC2和PC3分别提供了数据量的60.46%、30.69%和4.79%。NSCLC组和对照组患者的痰液样品分别落在不同的区域，两类样品可有效区分，表明PCA方法处理痰液样品的ND-EESI-MS数据，能够得到较好分类结果。

讨　论

NSCLC的发病率和病死率在恶性肿瘤中均居首位[1]，同时NSCLC患者总体5年生存率小于12%也使其成为预后最差的恶性肿瘤之一，这与临床确诊的NSCLC患者70%左右为中晚期有着必然的联系，因为Ⅰ期NSCLC的5年生存率可达73%，而Ⅲb期和Ⅳ期仅为9%和13%[2-3]，所以探讨NSCLC的快速诊断方法对改善NSCLC的预后具有重要意义[2,4]。目前NSCLC诊断方法较多，除了传统痰液细胞检查、X线检查外，低剂量CT（LDCT）、动态增强CT、计算机辅助诊断（CAD）和正电子发射体层扫描（PET）等技术的发明和应用，也为NSCLC诊断提供了更多的选择[12]，但上述方法均不能实现快速、无创、灵敏度高、适应性好等筛查要求[5-6]。痰液是NSCLC和其他肺病患者特有的样品，含有丰富的病理生理信息，痰液细胞学检查是唯一可以无创确诊NSCLC的方法，也是除了肿物活检和手术探查以外唯一可以确诊NSCLC的方法。但是传统痰液细胞学检查标本必需经固定、染色等处理，检测周期长、过程繁琐而不能实现快速诊断，且敏感性相对较低（47.82%～69.40%）[6-9]，不是理想的NSCLC筛查方法。

质谱（MS）技术是现代众多分析测试技术中同时具备了灵敏度高、特异性好、响应速度快的普适性方法，也是目前测定物质分子式的唯一方法。电喷雾萃取电离（EESI）技术最早是为了实时在线连续监测液体样品而发明的一种快速质谱分析技术，后来逐渐拓展到气溶胶、固体、胶体和黏稠物的分析。为了将一些难以雾化的样品（如黏稠物）进行EESI-MS分析，可用合适的中性气流解吸出少量样品，并通过一个密闭的管道输送到EESI源中进行萃取电离，这种与中性解吸（ND）联用的ND-EESI技术结合了样品解吸方法与三维空间内萃取电离的优点[11]，而且该方法将采样与电离过程从时间和空间上截然分开，此外中性气体解吸采样技术在取样过程中可以根据分析对象的需要采用氩气等惰性气体，对样品尤其是生物体无任何化学污染，对动植物生理或病理状态无明显干扰，特别适合进行生物样品的活体和实时在线分析。我们在EESI-MS

基础上，研发了一种新型中性解吸电喷雾萃取电离质谱（ND-EESI-MS）技术，可在无需样品预处理的条件下，用于蜂蜜、橄榄油和牙膏等复杂基质黏稠样品的快速直接分析[10-11]，使 EESI-MS 的应用范围得到了进一步拓展。痰液也是属于黏稠物，采用 ND-EESI-MS 技术，在正离子模式下得到两组患者的痰液样品的指纹谱图，由于人体细胞代谢过程基本一致，所检测到的两组痰样本质谱指纹图谱大部分相似；但由于肺癌细胞与正常细胞之间的代谢差异，使两者痰液中的一些氨基酸、糖类和多肽等小分子浓度存在特定的差异。本研究结果显示，NSCLC 组和对照组患者痰液样品的指纹图谱在 78、87、99、118、362、367、539 m/z 等处的质谱峰的相对丰度均有较明显的差异，尤其是 362 m/z 与 367 m/z 之间的相对丰度差异最为明显，说明 ND-EESI-MS 对于检测痰样这种黏稠性物质能较好地解吸出样品中的各种小分子物质、获得丰富的样品信息、并能反映出肺癌患者和非肺癌患者之间的微小差异，为进一步的主成分分析提供了可靠的数据。

PCA 是一种对多变量表示数据点集合寻找尽可能少的正交矢量表征数据信息特征的一种统计方法，它是将分散在一组变量上的信息集中到某几个综合指标（主成分）上，以便利用主成分描述数据集内部结构，它可以从多元事物中解吸出主要影响因素，揭示事物的本质，简化复杂的问题。本研究采用 PCA 从指纹图谱中提取与 NSCLC 有关的信息，建立 NSCLC 患者与非肺癌患者的识别模式。结果表明 PCA 方法处理痰液样品的 ND-EESI-MS 数据，NSCLC 患者和非肺癌患者指纹谱图的差异能够很客观地通过该方法体现出来，得到较好的分类结果。

本研究结果表明，ND-EESI-MS 技术痰液分析是一种直接（无需标本预处理）、快速（实时）、无创（可重复检查）、灵敏度高的 NSCLC 诊断方法，可为 NSCLC 的快速诊断、早期筛查和监测临床肿瘤复发提供参考。

参 考 文 献

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin, 2009, 59: 225-249.

[2] Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. Chest, 2009, 136: 260-271.

[3] 张惠忠，魏益平，华平，等. 非小细胞肺癌淋巴结转移和预后与 CD133 和 CD147 表达的关系. 中华实验外科杂志，2007，24：873-874.

[4] Chan HP, Lewis C, Thomas PS. Exhaled breath analysis: novel approach for early detection of lung cancer. Lung Cancer, 2009, 63: 164-168.

[5] Warner E, Jotkowitz A, Maimon N. Lung cancer screening -are we there yet? Eur J Intern Med, 2010, 21: 6-11.

[6] Jiang F, Todd NW, Qiu Q, et al. Combined genetic analysis of sputum and computed tomography for noninvasive diagnosis of non-small-cell lung cancer. Lung Cancer, 2009, 66: 58-63.

[7] 敖翔，吴澄，王梅，等. 肺腺癌 A549 细胞 CDl 33$^+$ CD44$^+$ 表型在裸鼠体内成瘤能力的研究. 中华实验外科杂志，2010，27：234-236.

[8] Xie Y, Todd NW, Liu Z, et al. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. Lung Cancer, 2010, 67: 170-176.

[9] Neumann T, Meyer M, Patten FW, et al. Premalignant and malignant cells in sputum from lung cancer patients. Cancer Cytopathol, 2009, 117: 473-481.

[10] Law WS, Chen H, Ding J, et al. Rapid characterization of complex viscous liquids at the molecular level. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48: 8277-8280.

[11] Ding J, Gu H, Yang S, et al. Selective detection of diethylene glycol in toothpaste products using neutral desorption reactive extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal Chem, 2009, 81: 8632-8638.

[12] Toyoda Y, Nakayama T, Kusunoki Y, et al. Sensitivity and specificity of lung cancer screening using chest low-dose computed tomography. Br J Cancer, 2008, 98: 1602-1607.

（收稿日期：2010-12-12）

欢迎订阅《中华实验外科杂志》

《中华实验外科杂志》是中华医学会主办的中华医学会系列杂志之一，是外科学类核心期刊，国家科学技术部中国科技论文统计源期刊，中国生物医学核心期刊，中华医学会外科学分会两本会刊之一，以“探讨理论，更新知识，指导科研，服务临床”为办刊宗旨，其内容包括外科各个专业，是紧密结合临床实践的全国实验外科专业刊物。

本刊设有“论坛”、“述评”、“实验研究”、“临床研究”、“新技术与新方法”、“动物模型”、“简报”、“综述”等栏目。创刊 27 年来，本刊立足外科前沿，评论医学资讯，报道实验外科最新科技成果，回答外科工作者关心的问题，内容新颖，信息量大，杂志被引频次与影响因子逐年增加，已成为我国中高级外科医师学术交流的重要园地。

《中华实验外科杂志》为月刊，大 16 开本，每月 8 号出版，自 2011 年起每期 160 页，每期定价 15.00 元，全年 180.00 元。国际标准刊号：1001-9030，国内统一刊号：42-1213/R，邮发代号：38-85。

编辑部地址：武汉市丁字桥路 60 号；邮政编码：430064；联系电话：(027)87893475；Email：cjes@cma.org.cn

欢迎投稿！欢迎订阅！

本刊编辑部