

# 尖端电喷雾萃取电离质谱技术诊断食管癌22例

赵宗盛, 徐建军, 陈焕文, 陈立如, 温华, 朱腾高, 魏益平

## ■背景资料

食管癌(esophageal cancer, EC)在我国属高发疾病, 高死亡率的恶性肿瘤之一, 早期诊断早期治疗可以明显延长患者的生存时间, 尖端电喷雾萃取电离质谱技术(tip-spray ionization mass spectrometry, Tip-spray-MS)可能为EC的早期诊断、快速诊断提供一定技术参考。

赵宗盛, 徐建军, 陈立如, 温华, 魏益平, 南昌大学第二附属医院 江西省南昌市 330006

陈焕文, 朱腾高, 东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室 江西省南昌市 330013

赵宗盛, 在读硕士, 主要从事胸部肿瘤诊治的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81160293

国家重大科学仪器设备开发专项基金资助项目, No. 2011YQ170067-09

作者贡献分布: 本课题由徐建军、魏益平及赵宗盛设计, 研究过程主要由赵宗盛完成; 温华与陈立如参与操作; 陈焕文与朱腾高参与实验指导; 论文的数据处理与写作由赵宗盛完成。

通讯作者: 魏益平, 副主任医师, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院心胸外科。weiyip2000@hotmail.com

收稿日期: 2013-06-05 修回日期: 2013-07-08

接受日期: 2013-07-18 在线出版日期: 2013-08-18

## Tip-spray ionization mass spectrometry for diagnosis of esophageal cancer: An analysis of 22 cases

Zong-Sheng Zhao, Jian-Jun Xu, Huan-Wen Chen, Li-Ru Chen, Hua Wen, Teng-Gao Zhu, Yi-Ping Wei

Zong-Sheng Zhao, Jian-Jun Xu, Li-Ru Chen, Hua Wen, Yi-Ping Wei, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Huan-Wen Chen, Teng-Gao Zhu, Jiangxi Province Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China Institute of Technology, Nanchang 330013, Jiangxi Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81160293; the National Special Fund for Key Scientific Instrument and Equipment Development, No. 2011YQ170067-09

Correspondence to: Yi-Ping Wei, Associate Chief Physician, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. weiyip2000@hotmail.com

Received: 2013-06-05 Revised: 2013-07-08

Accepted: 2013-07-18 Published online: 2013-08-18

## Abstract

**AIM:** To discuss the application of tip-spray ionization mass spectrometry (MS) in the diagnosis of esophageal cancer.

**METHODS:** Tip-spray MS was used to analyze esophageal cancer tissue samples and matched tumor-adjacent esophageal tissue samples from 22 patients with esophageal cancer. Principal component analysis (PCA) was performed to

process data from the MS fingerprint spectra.

**RESULTS:** Peptide peaks at  $m/z$  values of 104, 154, 175, 611, 655, 699, 743, 787 and 831 showed significantly different relative abundance. Peaks at  $m/z$  values of 611, 655 and 699, which corresponded to porphyrin, had the most obvious difference. PCA could effectively distinguish esophageal cancer and tumor-adjacent normal tissue.

**CONCLUSION:** Tip-spray MS combined with PCA can effectively distinguish esophageal cancer and tumor-adjacent normal tissue and therefore may contribute to the rapid diagnosis of esophageal cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Esophageal cancer; Rapid diagnosis; Tip-spray ionization mass spectrometry; Principal component analysis

Zhao ZS, Xu JJ, Chen HW, Chen LR, Wen H, Zhu TG, Wei YP. Tip-spray ionization mass spectrometry for diagnosis of esophageal cancer: An analysis of 22 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(23): 2320-2324 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2320.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i23.2320>

## 摘要

**目的:** 探讨尖端电喷雾萃取电离质谱技术(tip-spray ionization mass spectrometry, Tip-spray-MS)对食管癌(esophageal cancer, EC)诊断的应用。

**方法:** 收集22例EC及配对的癌旁组织, 应用Tip-spray-MS技术对组织样品进行快速分析, 调节Tip-spray离子源为正离子模式, 质量范围50-1000 Da, 喷雾电压为3.5 kV, 喷雾距离为2 cm, 透镜电压为65.0 V, 离子传输管温度为150 °C。运用Matlab软件主成分分析(principal component analysis, PCA)方法对所获质谱指纹谱进行统计学分析。

**结果:** EC与癌旁组织的质谱指纹谱图中相对

## ■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

丰度有明显差异的质荷比( $m/z$ )为104、154、175、611、655、699、743、787、831等处,其中 $m/z$ 为611、655、699处丰度差异最显著,其所对应的物质为吡啶,运用PCA方法能够良好地区分EC及癌旁组织。

**结论:** Tip-spray-MS联合PCA能有效鉴别EC及癌旁正常组织,有助于EC的早期、快速诊断。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 食管癌; 快速诊断; 尖端电喷雾萃取电离质谱; 主成分分析

**核心提示:** 尖端电喷雾萃取电离质谱技术(tip-spray ionization mass spectrometry)技术可以良好地区分食管癌(esophageal cancer, EC)及癌旁组织,并发现带不同羧基的吡啶分子是其区分的重要物质基础,这不仅为EC的早期诊断提供了技术参考,也为EC的发病机制提供了一定的分子生物学佐证。

赵宗盛, 徐建军, 陈煥文, 陈立如, 温华, 朱腾高, 魏益平. 尖端电喷雾萃取电离质谱技术诊断食管癌22例. 世界华人消化杂志 2013; 21(23): 2320-2324 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2320.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i23.2320>

## 0 引言

食管癌(esophageal cancer, EC)是我国常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年上升,死亡率一直在高位徘徊<sup>[1]</sup>,早期EC患者手术治疗后其5年生存率在90%以上,而中晚期患者通过以手术为主的综合治疗,其5年生存率仍在10%以下<sup>[2,3]</sup>。目前,尽管针对EC的诊疗技术有很大提高,但首次就诊的EC患者仍有半数以上属中晚期,故为提高患者的生存率,早期明确诊断是关键,现有的相关检查对EC的早期诊断或多或少都有一定不足。尖端电喷雾萃取电离质谱(tip-spray ionization mass spectrometry, Tip-spray-MS)技术是衍生于电喷雾电离(electro-spray ionization, ESI)技术的一个前沿质谱技术<sup>[4]</sup>,其突出特征就是灵敏度高、特异性强、普适性广、速度快。在无需样品预处理的情况下,应用此技术已经快速分析了动物或人体内脏、血液、牛奶以及尿液等复杂样品的化学成分<sup>[5-8]</sup>。本研究运用Tip-spray-MS对EC患者组织样品进行分析,以期发现用于EC早期诊断的快速新方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本项目研究得到南昌大学第二附属医院伦理委员会认证,所有纳入病例均知情同意标本采集及相关检查。本组22例EC及各配对的癌旁正常组织取自南昌大学第二附属医院心胸外科的EC手术切除标本,其中男14例,女8例,年龄40-72岁,中位年龄55岁,术后病理检查全部确诊为食管鳞状细胞癌,标本在离体后短时间(5 min)内-80 °C冰箱冻存备用,样品的运输载体为干冰。LTQ-XL增强型线性离子阱质谱仪(美国Finnigan公司,配Xcalibur数据软件);甲醇(色谱纯,美国Fisher Scientific公司);实验用水为自制二次去离子水;针灸针(天津华鸿医材有限公司,直径为0.30 mm);KQ3200号超声清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 Tip-spray离子源的参数设置:** 设置Tip-spray离子源为正离子模式,喷雾电压3.5 kV;离子传输管温度150 °C;透镜电压65.0 V;萃取剂滴加速度5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;质量扫描范围50-1000 Da;样品与质谱入口距离为2 cm,针灸针延长线与质谱入口延长线在同一直线,其他条件质谱系统自动优化。

**1.2.2 组织样品的Tip-spray-MS分析:** 将冷冻的食管组织常温下解冻后,无需任何预处理,直接将体积约为1  $\text{mm}^3$ 的样品置于针灸针尖进行检测,设置离子源为正离子模式,扫描范围为50-1000 Da。

**1.2.3 Tip-spray-MS指纹谱图的主成分分析:** 导出Tip-spray-MS记录的食管组织样品质谱指纹谱的相对丰度数据,整理数据,每行代表一个样品,每列代表一个质荷比( $m/z$ )的矩阵X。运用Matlab Toolbox软件的Princomp函数对该矩阵进行分析处理,并得到主成分分析(principal component analysis, PCA)分析结果。以上相关数据均在Matlab 2010b(7.11)编程中处理实现。

## 2 结果

**2.1 EC及癌旁组织指纹图谱分析** 通过Tip-spray-MS技术,在正离子模式下,调节好各相关参数,扫描范围为50-1000 Da,得到了EC以及癌旁组织的质谱指纹谱图(图1),谱图提示Tip-spray-MS技术能够检测出组织样品中丰富的化学成分。比较EC及癌旁组织指纹图谱发现,EC组织与癌

### ■ 研发前沿

EC早期诊断及质谱技术在恶性肿瘤诊断中的应用时目前研究的热点,但Tip-spray-MS在EC早期诊断、快速诊断中的应用国内外文报道罕见。

### ■ 相关报道

据国内外文献报道,质谱技术在肿瘤诊断中的应用广泛,质谱技术与蛋白质组学结合对各类恶性肿瘤的诊断都有一定的实用价值,尤其是近年直接电离质谱技术的应用,对肿瘤的快速分析有了长足的发展。

### ■ 创新盘点

本研究小组首次采用Tip-spray-MS技术对EC及癌旁正常组织样品进行研究,通过分析发现EC及正常食管组织的化学成分有一定的差异,并且应用主成分分析(principal component analysis)可以良好区分两组组织。

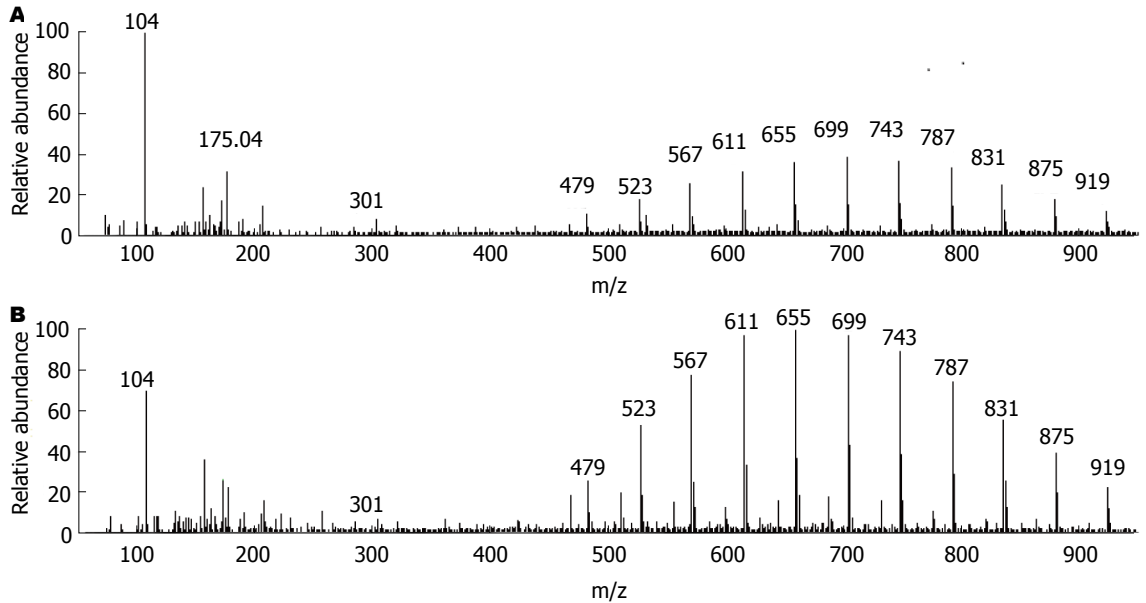


图1 正离子模式下Tip-spray-MS获得食管组织质谱指纹谱图. A: 食管癌旁组织; B: 食管癌组织. Tip-spray-MS: 尖端电喷雾萃取电离质谱技术。

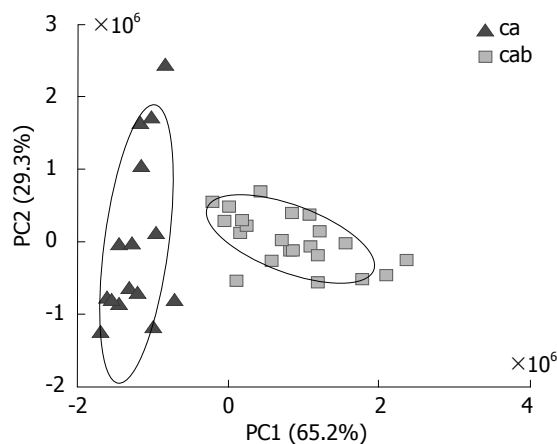


图2 22例食管癌PCA分析二维结果图. ca: 食管癌组织, cab: 食管癌旁组织; PCA: 主成分分析; Tip-spray-MS: 尖端电喷雾萃取电离质谱技术。

旁组织在质荷比(m/z)为104、154、175、611、655、699、743、787、831等处具有明显的相对丰度差异,其中m/z 611、655、699相对丰度差异最为显著.通过分析其二级质谱及碎片离子发现m/z 611、655、699全部为吡啶,其中m/z 611为3-羧酸吡啶, m/z 655为粪吡啶, m/z 699为5-羧酸吡啶。

2.2 PCA 将上述通过Tip-spray-MS得到的EC及癌旁组织的质谱指纹谱图数据进行PCA分析, EC组织及其癌旁组织各22例,从图2可知, EC与食管癌旁组织落在不同区域,由PC1(65.2%), PC2(29.3%)约数据的94%的变量可以区分EC及癌旁组织,两组样品主要在PC1上得到较明显区

分,这是各组组织的内部差异所决定的,说明EC与癌旁组织中的中小分子含量的差异还是比较显著的。

### 3 讨论

我国是世界上EC发病率及死亡率最高的国家<sup>[1]</sup>,其病理分型主要为鳞状细胞癌,约占EC总数的90%<sup>[9]</sup>, EC的发病有明显地域差异,华北太行山区为高发区之一,各省的发病率也有一定的地区差异<sup>[10]</sup>.尽管以外科手术为主的综合治疗措施挽救了大批EC患者的生命,但是由于早期EC症状并不明显,大部分EC患者确诊时已属中晚期,而中晚期与早期EC患者相比,手术后的5年生存率差异显著<sup>[3]</sup>,早期明确诊断能明显提高EC患者的生存率.现阶段EC的诊断方法较多,比如传统的X线及普通内镜检查,还有增强CT扫描,正电子发射体层扫描<sup>[11]</sup>以及新内镜技术的应用如:荧光内镜、超声内镜、色素内镜等,对EC的诊断都有一定的现实价值,在临床上是不可或缺的技术手段,但是以上方法对早期EC的诊断都有一定的局限性,不能兼有快速、在线诊断EC同时又具备高灵敏度、高特异性等特征。

质谱(mass spectrometry, MS)技术是现代检测技术中兼有了高特异性、高灵敏度、高响应速度的普适技术,其对物质分子式的测定有高度准确性,质谱技术在医疗卫生领域的应用普遍,尤其在肿瘤诊断中的应用突出. Tip-spray-MS是随着近年来直接电离质谱技术的发展而被

### ■ 应用要点

通过探讨Tip-spray-MS技术在EC诊断中的应用,有助于EC早期快速诊断的研究进展,并为进一步阐明EC发生发展的分子机制提供一定的参考价值。

发明的一种新技术, 其方法的主要特征是无需样品预处理的情况下快速、在线、准确分析其中的化学成分, 降低了成本, 并大大提高了检测速度, 故其在分析化学领域应用广泛<sup>[12,13]</sup>. 普渡大学Liu等<sup>[14]</sup>通过穿刺活检针取得的内脏组织, 应用Tip-spray-MS技术直接对其实时在线分析, 检测各组织对不同药物敏感性差异并分析了不同药物代谢情况, 组织被活检针取出后, 检测及分析过程在一分钟内可以完成, 其快速在线的特征可见一斑. 本研究就是在前人的技术基础上, 应用Tip-spray-MS技术对食管组织样品进行检测, 企图寻找到一种适用于EC早期诊断的快速方法, 以期提高EC的早诊率并缩短EC诊断的耗时. 通过应用Tip-spray-MS技术, 在正离子模式下, 我们得到了EC及癌旁组织的质谱指纹谱图, 两组谱图的构成基本相似, 其原因是EC与正常食管组织的代谢过程基本相同, 代谢产物的含量及浓度并没有太大的差异, 但是, 恶性肿瘤组织生长迅速, 具有异型性, 并能诱导血管新生, 故EC组织与癌旁正常组织的代谢过程并不完全相同, 两者之间的代谢产物存在一定的差异. 本研究结果显示, EC组织与癌旁组织的指纹谱图在m/z为104、154、175、611、655、699、743、787、831等处有明显差异, 其中m/z 611、655、699最为显著, 这说明Tip-spray-MS技术可检测出组织样品中的各中小分子物质, 对生物碱、氨基酸、糖类、磷脂、多肽及其衍生物等人体常见的代谢物进行分析, 并能反映EC及非癌组织之间的代谢差异. 卟啉作为人体血红素合成的重要中间产物, 广泛参与机体的血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素及过氧化物酶等物质的合成代谢, 而恶性肿瘤组织特殊的生长方式, 对以上各物质都有特别强的亲和力, 并比正常组织的合成所需要的量显著增多<sup>[15]</sup>, 本研究结果提示EC组织中卟啉的含量较正常食管组织明显增多.

PCA就是将所有变量重新组合成新几个综合变量来代替原始变量, 同时根据实际需要从中取几个较少的综合变量尽可能多地反映原来变量信息的一种统计学方法, 其旨在利用降维的思想, 把多指标转化为少数几个综合指标, 将原有的复杂数据降维, 揭示隐藏在复杂数据背后的简单结构, 简化复杂问题. 本研究从Tip-spray-MS获得的EC及癌旁组织两组指纹谱图中提取的相关生物信息, 通过PCA方法的处理, 建

立了EC与癌旁组织的识别模式. 结果说明, PCA方法可以良好区分两组指纹谱提供的数据差异.

总之, Tip-spray-MS技术在无需样品预处理的情况下, 能直接、快速、准确地分析食管组织样品, 并具有高度灵敏性, 可为EC的早期筛查、快速诊断提供技术参考, 卟啉作为机体生物代谢的重要分子, 可能参与EC的发生发展过程, 但其具体机制有待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 雷正龙, 李光琳, 邹小农, 赵平. 中国肿瘤登记地区2007年肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤 2011; 20: 162-169
- 2 Law S, Wong J. The current management of esophageal cancer. *Adv Surg* 2007; 41: 93-119 [PMID: 17972559 DOI: 10.1016/j.gassur.2004.06.007]
- 3 王国清. 食管癌高发地区早诊早治30年临床研究经验. 中国医学科学院学报 2001; 23: 69-72
- 4 魏益平, 鄢飞燕, 贾滨, 丁健桦, 彭金华, 陈焕文, 徐建军. 痰液直接电喷雾萃取电离质谱分析在非小细胞癌诊断中的应用. 中华实验外科杂志 2011; 3: 422-424
- 5 Wong MY, Tang HW, Man SH, Lam CW, Che CM, Ng KM. Electrospray ionization on porous spraying tips for direct sample analysis by mass spectrometry: enhanced detection sensitivity and selectivity using hydrophobic/hydrophilic materials as spraying tips. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013; 27: 713-721 [PMID: 23418151 DOI: 10.1002/rcm.6497]
- 6 Yang Q, Wang H, Maas JD, Chappell WJ, Manicke NE, Cooks RG, Ouyang Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* 2012; 312: 201-207 [PMID: 22350566 DOI: 10.1002/ange.200906314]
- 7 Hu B, So PK, Chen H, Yao ZP. Electrospray ionization using wooden tips. *Anal Chem* 2011; 83: 8201-8207 [PMID: 21923155 DOI: 10.1021/ac2017713]
- 8 Hu B, Lai YH, So PK, Chen HW, Yao ZP. Direct ionization of biological tissue for mass spectrometric analysis. *Analytical Chemistry* 2012; 137: 3613-3619 [DOI: 10.1039/c2an16223g]
- 9 Li LW, Li YY, Li XY, Zhang CP, Zhou Y, Lu SH. A novel tumor suppressor gene ECRG4 interacts directly with TMPRSS11A (ECRG1) to inhibit cancer cell growth in esophageal carcinoma. *BMC Cancer* 2011; 11: 52 [PMID: 21288367 DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2010.38.014]
- 10 邹小农, 陈万青, 张思维, 李连弟, 鲁凤珠, 陈永红, 赵平. 中国部分市县1998-2002年食管癌发病与死亡. 中国肿瘤 2007; 16: 142-146
- 11 Toyoda Y, Nakayama T, Kusunoki Y, Iso H, Suzuki T. Sensitivity and specificity of lung cancer screening using chest low-dose computed tomography. *Br J Cancer* 2008; 98: 1602-1607 [PMID: 18475292 DOI: 10.1038/sj.bjc.6604351]
- 12 Huang MZ, Yuan CH, Cheng SC, Cho YT, Shiea J. Ambient ionization mass spectrometry. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2010; 3: 43-65 [PMID: 20636033 DOI: 10.1146/annurev.anchem.111808.073702]
- 13 Alberici RM, Simas RC, Sanvido GB, Romão W, Lalli PM, Benassi M, Cunha IB, Eberlin MN. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real

#### ■同行评价

本文采用Tip-spray-MS技术对EC及癌旁组织的谱图进行分析, 得出两者间的显著差异质荷比(m/z)区间, 为EC诊断提供一种新的手段, 并发现卟啉含量可能为区分两组组织的物质技术, 具有一定临床价值及学术价值.

- world". *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 265-294 [PMID: 20521143 DOI: 0.1007/s00216-010-3808-3]
- 14 Liu J, Cooks RG, Ouyang Z. Biological tissue diagnostics using needle biopsy and spray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2011; 83: 9221-9225 [PMID: 22103750 DOI: 10.1021/ac202626f]
- 15 Danton M, Lim CK. Porphyrin profiles in blood, urine and faeces by HPLC/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2006; 20: 612-621 [PMID: 16779779 DOI: 10.1002/bmc]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.