

# 常压直接质谱技术在快速鉴别肺癌与癌旁组织中的应用\*

徐建军<sup>1</sup>, 陈立如<sup>1</sup>, 魏益平<sup>1</sup>, 朱腾高<sup>2</sup>, 陈焕文<sup>2</sup>, 欧阳永中<sup>2</sup>, 温华<sup>1</sup>, 赵宗盛<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南昌大学第二附属医院心胸外科(南昌 330006); <sup>2</sup>东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室(南昌 330013)

**【摘要】** 目的 研究常压直接质谱分析技术(AMS)快速鉴别肺癌与癌旁组织的效果及应用。方法 在不对肺组织进行任何预处理前提下,采用自制的甲醇萃取辅助的针尖电喷雾离子源对15例肺癌患者的肺癌和癌旁组织样品进行快速质谱分析,萃取剂甲醇的流速为4  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,设置离子源为正离子模式,质荷比( $m/z$ )750~850 Da,离子传输管温度150 $^{\circ}\text{C}$ ,喷雾电压3.5 kV,透镜电压65.0 V。应用matlab软件对谱图数据进行分析,肺癌与癌旁组织质谱峰丰度差异采用独立样本 $t$ 检验;用主成分分析(PCA)方法对肺癌与癌旁组织样品的质谱指纹谱图进行快速分类和鉴别。结果 肺癌和癌旁组织样品指纹谱图在 $m/z$ 为756.7、772.6、780.7、808.7、824.7、832.7等处的相对丰度在肺癌和癌旁组织中差异有统计学意义( $P < 0.01$ );PCA分类图中,肺癌组织和癌旁组织样品分别落在不同的区域,两类样品能有效区分。结论 AMS耦合PCA能够有效地将肺癌与癌旁组织样品的质谱指纹区分,从而快速鉴别出肺癌与癌旁组织,并获得相关样品的分子尺度信息,为快速诊断肺癌及肺癌肿瘤标志物研究提供新的思路和策略。

**【关键词】** 肺癌;常压质谱分析;诊断

DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2014.08.019

**Ambient mass spectrometry for fast identification of lung cancer.** XU Jian-jun<sup>\*</sup>, CHEN Li-ru, WEI Yi-ping, ZHU Teng-gao, CHEN Huan-wen, OUYANG Yong-zhong, WEN Hua, ZHAO Zong-sheng. <sup>\*</sup>Nanchang University, Department of Cardiothoracic Surgery of Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang 330006, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect and application of ambient mass spectrometry (AMS) for fast identification of lung cancer. **Methods** Intraoperatively collected tissue samples and adjacent normal lung tissues from 15 lung cancer patients were analyzed by home-made solvent-assisted tip electrospray ionization mass spectrometry without any pretreatment. Flow rate of solvent (methanol) was 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  with ion source mode was set as follows: positive ion mode, mass range of  $m/z$  750~850 Da, of 150 $^{\circ}\text{C}$  ion transmission tube temperature, 3.5 kV spray voltage, 65.0 V lens voltage as. Data of the spectra was analyzed using matlab software. Student's  $t$  test was performed. Principal component analysis (PCA) was used as a data processing method for the fingerprinting spectra. **Results** Significant difference was observed in fingerprint spectra at 756.7, 772.6, 780.7, 808.7, 824.7 and 832.7  $m/z$  between cancerous tissue and normal tissue ( $P < 0.01$ ). Pattern recognitions at the fingerprint spectrum level for clustering analysis of tissue samples were achieved successfully with lung cancer separated from normal tissues. **Conclusion** Coupling with PCA analysis, the cancerous tissue samples of NSCLC can be identified effectively from the adjacent normal tissue by AMS, suggesting potential application in fast diagnosis of lung cancer.

**【Key words】** lung cancer; ambient mass spectrometry; diagnosis

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其临床诊治现状呈现“三高一低”(发病率高、中晚期患者比例高、病死率高、5年生生存率低)的特点<sup>[1]</sup>。外科手术被认为是目前治疗肺癌最有效的方法之一<sup>[2-3]</sup>。对于术前未确诊的肺肿瘤患者和术中要进一步确定手术切除范围的肺癌患者,往往需要术中快速冰冻检查<sup>[4]</sup>。然而,现行术中冰冻切片要对标本进行冷冻、切片、染色等预处

理,增加了麻醉时间和手术风险,且存在一定的误诊率<sup>[4-5]</sup>。因此,研发一种准确、快速鉴别肺癌与癌旁组织的诊断方法具有重要意义。常压直接质谱分析(ambient mass spectrometry, AMS)是近年来迅速发展的基于样品中分子组成或含量的不同而实现样品检测的一种快速分析测试方法,可在无需样品预处理的情况下对各种临床样品进行分析<sup>[6]</sup>。本研究采用自制的甲醇萃取辅助的针尖电喷雾离子源,在无需复杂样品预处理的情况下检测肺癌及肺癌旁组织,采用主成分分析(PCA)方法对两组组织样品进行区分,研究AMS对快

\* 国家重大科学仪器设备开发专项基金资助项目(编号:2011YQ170067),国家自然科学基金资助项目(编号:81160293)

速鉴别肺癌与肺癌旁组织的效果。

1 资料与方法

1.1 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:2012 年 1—10 月入院的肺癌患者;术前未经化疗等药物干预,术中留取肺癌组织及癌旁组织(距离癌组织边缘 5 cm 以上,视为正常肺组织)标本,所留取样品置于 -80℃ 保存。入选患者 15 例,手术后病理诊断均为非小细胞肺癌,其中男 10 例,女 5 例,年龄 46~69 岁,中位年龄 58 岁;其中鳞癌 9 例,腺癌 5 例,腺鳞癌 1 例。

1.2 器械 质谱分析:甲醇萃取辅助的针尖电喷雾离子源(自制);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);实验用水为 2 次去离子水。

1.3 方法 离子源(自制)(图 1)由两部分构成,即尖端刺有微量组织样品的针灸针(0.35 mm × 75 mm)和样品上方的萃取剂甲醇,电喷雾电压连接于针灸针针柄上,样品与萃取剂及质谱入口均约 5 mm;组织样品未经任何处理,解冻后取大小约 1 mm<sup>3</sup> 的肺组织用于质谱分析,每例样品在同一次实验中重复有效进样次数 5 次以上。设置离子源为正离子模式,质量范围 750~850 Da;离子传输管温度 150℃;喷雾电压 3.5 kV;透镜电压 65.0 V;其他条件系统自动优化;萃取剂为纯甲醇,流速 4 μL/min。采用 AMS 技术,在正离子模式下,萃取剂滴下后接触到组织样品的瞬间可获得组织样品的指纹谱图。采用 PCA 对组织样品的质谱

指纹谱图进行数据分析,每例取样 5 次,总计 150 份肺组织样品的质谱数据用于 PCA 分析。



图 1 针尖电喷雾电离离子源

1.4 统计学方法 将组织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。采用 Matlab 7.11 编程软件,采用独立样本 t 检验比较肺癌组织与肺癌旁组织质谱峰的差异,以 P < 0.01 为检验水准;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。

2 结果

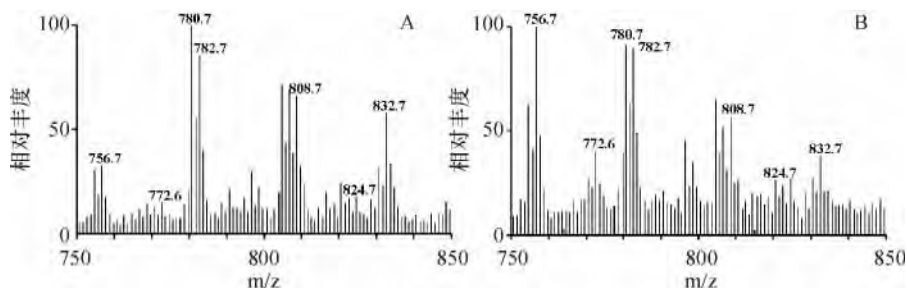
2.1 组织样指纹谱图 获得单个进样峰的时间在 1 min 以内。从谱图可以发现两组样品指纹谱图在 m/z 为 756.7、772.6、780.7、782.7、808.7、824.7、832.7 等处的质谱峰较明显,其中 m/z 782.7 在肺癌组织与癌旁组织的相对丰度差异无统计学意义(P > 0.01),m/z 为 808.7、824.7、832.7 的相对丰度在肺癌组织中更为明显(P < 0.01,比值 > 1),而 m/z 为 756.7、772.6、780.7 的相对丰度在癌旁组织中明显高于肺癌组织(P < 0.01,比值 > 1),见表 1、图 2。

2.2 指纹谱图 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

表 1 肺癌与癌旁组织质谱指纹谱中质谱峰的相对丰度

$\bar{x} \pm s$

项目	例数	m/z						
		756.7	772.6	780.7	782.7	808.7	824.7	832.7
肺癌组织	15	2.47 ± 0.98	1.69 ± 0.72	5.63 ± 2.54	7.37 ± 3.01	4.71 ± 2.06	2.68 ± 1.21	3.27 ± 1.30
癌旁组织	15	7.85 ± 2.13	3.04 ± 1.07	7.12 ± 2.21	7.36 ± 1.76	3.65 ± 1.02	1.47 ± 0.44	2.41 ± 0.78
比值		0.31	0.56	0.79	1.00	1.29	1.82	1.36
P 值		0.00	0.00	0.00	0.90	0.00	0.00	0.00



A: 肺癌组织质谱图; B: 癌旁组织质谱图

图 2 肺组织质谱图

PC3 分别提供了数据量的 45.8%、16.7% 和 10.8%。肺癌组织和癌旁组织样品分别落在不同的区域,见图 3。其中,1 例癌组织样品的 5 次进样数据点均落在正常肺组织数据集中。通过回顾该患者临床资料,发现该患者病理报告提示为 T<sub>1</sub> 期肺癌,癌组织偏小,未取样到典型的癌变肺组织。总的来说,两类样品可有效区分,PCA 方法处理肺癌组织样品的 AMS 数据,能够达到较好的分类效果。

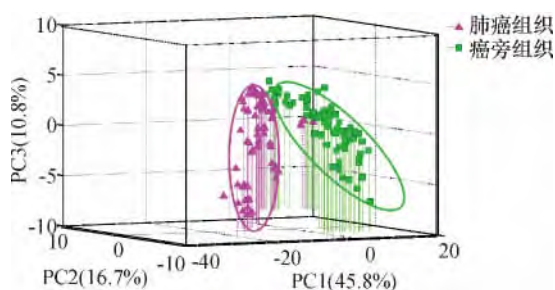


图3 15例肺癌及癌旁组织的MS数据PCA结果

### 3 讨论

外科手术是目前治疗肺癌最有效的方法之一,然而,对于术前未确诊的肺肿物患者和术中要进一步确定手术切除范围的肺癌患者,往往需要术中冰冻切片来协助快速诊断或确定切除范围<sup>[5,7]</sup>。但冰冻切片存在诸多缺点,如对本标本进行冷冻、切片、染色等预处理,增加了麻醉时间和手术风险;且对病理科医生的经验依赖性较强,存在一定的误诊率,而作为金标准的常规病理检查往往需要数小时甚至数天才能得到结果<sup>[5,8]</sup>。因此,研发一种准确、快速鉴别肺癌与肺癌旁组织的诊断方法对确定病变边界、缩短手术时间、降低手术风险、提高手术准确性和效果等均有重要的意义。AMS 是近年来迅速发展的质谱分析方法,可在无需复杂样品预处理的情况下对临床组织、体液等机体复杂的样品进行快速分析,一般在数秒内即可获得组织样品的质谱信息。目前,肿瘤组织的质谱研究主要是成像研究和模式识别研究,其中成像研究主要采用解析萃取喷雾电离质谱(DESI-MS)、基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)、二次离子质谱(SIMS)、快速蒸发离子质谱(REIMS)等,模式识别主要为PCA、线性判别(PDA)、偏最小二乘(PLS)等方法<sup>[9-11]</sup>。SCHAFER等<sup>[12]</sup>应用REIMS检测猪肾皮质和髓质的组织样品,利用PCA进行数据分析,在PCA图中皮质和髓质落在了不同的区域内,达到明显的区分效果。由此可见,AMS耦合PCA可用于不同组织样品的快速区分,在肿瘤组织的快速诊断中有重要参考价值。

AMS的离子源主要分为以下3类:喷雾解析离子源、激光解析离子源和热解析离子源<sup>[9]</sup>。各类AMS离

子源又有不同的形式,如DESI是喷雾解析离子源中最经典的离子源。已有研究表明,带电的针尖和组织尖端均可作为良好的AMS喷雾解析离子源<sup>[13-14]</sup>。然而,生物组织由于本身的柔软性而不易定形,不易做成尖端样形状。本研究借鉴相关方法,将约1mm<sup>3</sup>大小的组织样品直接置于带电针尖上,在针柄上连接电喷雾电压,同时采用萃取剂甲醇辅助组织样品成分的解析,获得了组织样品的特异质谱信息,避免制作含有尖端的组织样品,使得快速分析组织样品更为便利。

本研究结果初步显示:采用AMS技术,在正离子模式下,通过实验得到两组肺组织样品的指纹谱图数据能在PCA中得到有效的区分;两组样品指纹谱图中m/z为808.7、824.7、832.7的相对丰度在肺癌组织中更为明显,而m/z为756.7、772.6、780.7的相对丰度在癌旁组织中明显高于肺癌组织。由于本研究目的是快速检测并鉴定肺癌组织,故未对这些差异质谱峰进行高分辨质谱实验和二级质谱实验,没有对差异质谱峰进行结构分析。但已有相关肺癌组织样品的MALDI-MS研究<sup>[15]</sup>发现,m/z为824.6是卵磷脂[PC(36:2),M+K<sup>+</sup>]的质谱峰,其在肺癌组织中丰度高于正常肺组织,这与本研究观察到的结果一致。另有分子生物学研究<sup>[16]</sup>发现,胆碱激酶在多种肿瘤组织中过表达,使肿瘤组织中卵磷脂、鞘磷脂等合成增多。由此可见,这些差异质谱峰很可能来自磷脂类物质。

综上所述,本研究利用一种AMS方法实现了快速获取肺癌质谱指纹,结合PCA数据分析,可将肺癌与肺癌旁组织有效分开。该方法具有直接(无需样品预处理)、分析速度快、耗费样品少、可避免污染等特点,可为肿瘤快速诊断提供参考。但本研究中的差异质谱指纹需要进一步采用高分辨质谱或二级质谱研究其结构信息,明确其来源物质及产生机制,这可为肺癌分子标志物及早期诊断等研究提供新的思路和策略。

### 参考文献

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] LIM E, BALDWIN D, BECKLES M, et al. Guidelines on the radical management of patients with lung cancer[J]. Thorax, 2010, 65 Suppl 3: iii1-iii27.
- [3] 张小龙, 刘伦旭. 电视胸腔镜肺段切除术治疗早期非小细胞肺癌的研究进展[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2012, 19(2): 177-180.
- [4] XU X, CHUNG J H, JHEON S, et al. The accuracy of frozen section diagnosis of pulmonary nodules: evaluation of inflation method during intraoperative pathology consultation with cryosection[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(1): 39-44.
- [5] WINTHER C, GRAEM N. Accuracy of frozen section diagnosis: a retrospective analysis of 4785 cases[J]. APMIS, 2011, 119(4/5): 259-262.

[6] WU C, DILL A L, EBERLIN L S, et al. Mass spectrometry imaging under ambient conditions[J]. Mass Spectrom Rev, 2013, 32(3): 218-243.

[7] STEU S, BAUCAMP M, VON DACH G, et al. A procedure for tissue freezing and processing applicable to both intra-operative frozen section diagnosis and tissue banking in surgical pathology[J]. Virchows Arch, 2008, 452(3): 305-312.

[8] NAKHLEH R E. Quality in surgical pathology communication and reporting[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(11): 1394-1397.

[9] GERBIG S, GOLF O, BALOG J, et al. Analysis of colorectal adenocarcinoma tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometric imaging[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 403(8): 2315-2325.

[10] RÖMPP A, GUENTHER S, SCHÖBER Y, et al. Histology by mass spectrometry: label-free tissue characterization obtained from high-accuracy bioanalytical imaging[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, 49(22): 3834-3838.

[11] BALOG J, SZANISZLO T, SCHAEFER K C, et al. Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2010, 82(17): 7343-7350.

[12] SCHAEFER K C, DENES J, ALBRECHT K, et al. In vivo, in situ tissue analysis using rapid evaporative ionization mass spectrometry[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48(44): 8240-8242.

[13] HIRAOKA K, NISHIDATE K, MORI K, et al. Development of probe electrospray using a solid needle[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(18): 3139-3144.

[14] HU B, LAI Y H, SO P K, et al. Direct ionization of biological tissue for mass spectrometric analysis[J]. Analyst, 2012, 137(16): 3613-3619.

[15] LEE G K, LEE H S, PARK Y S, et al. Lipid MALDI profile classifies non-small cell lung cancers according to the histologic type[J]. Lung Cancer, 2012, 76(2): 197-203.

[16] GALLEGÓ ORTEGA D, RAMÍREZ DE MOLINA A, RAMOS M A, et al. Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipid metabolism: implications in cancer onset and treatment[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7819.

(收稿日期: 2013-10-16 编辑: 罗劲娜)

## 阿尔茨海默病和轻度认知功能障碍患者 认知损害的特点\*

罗姝琦<sup>1</sup>, 杨帆<sup>2</sup>, 王宝萍<sup>3</sup>, 徐书雯<sup>2</sup>

<sup>1</sup>南方医科大学(广州 510515); <sup>2</sup>广东省人民医院(广东省医学科学院)、广东省老年医学研究所神经科、广东省神经科学研究所(广州 510080); <sup>3</sup>中国人民解放军第四五八医院神经内科(广州 510602)

**【摘要】** 目的 通过分析阿尔茨海默病(AD)及轻度认知功能障碍患者的简易智能精神状态检查量表(MMSE)得分,探讨其认知损害特点。方法 收集337例患者的MMSE评分数据,分为对照组、轻度认知功能障碍(MCI)组、轻度AD、中度AD及重度AD组,对各组的MMSE评分数据(总分及10项子项目得分)进行统计分析。结果 MCI及轻、中、重AD组定向力、计算力、延迟记忆、执行能力、书写、结构性练习的得分进行性下降,各组间两两比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。中、重度AD组重复、阅读项低于其他各组;重度AD组瞬间记忆及命名项低于其他各组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 定向力、计算力、延迟记忆、执行能力、书写、结构性练习能力在AD病程早期即出现受损,并随着AD病程的进展呈进行性下降,重复、阅读在中、重度AD时出现受损,瞬间记忆及命名在重度AD时受损明显。

**【关键词】** 阿尔茨海默病; 轻度认知功能障碍; 简易智能精神状态检查量表  
DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2014.08.020

阿尔茨海默病(Alzheimer Disease, AD)是获得性的进行性认知功能减退、精神及行为异常的临床综合征,是痴呆最常见的类型,常为不可逆转。轻度认知功能损害(mild cognitive impairment, MCI)是介于正常衰老和痴呆之间的一种认知功能损害状态。AD病程中肯定存在认知功能损害,但其认知功能损害的特点如何,相关报道鲜见。简易智能精神状态检查量表(mini-mental state examination, MMSE)是目前国内外最具影响的认知缺损筛选工具之一。其最早用于辨别老年患者在病程早期是否存在神经精神障碍,随后较为广泛

地用于认知功能损害患者的随访以评估疾病的进程,也可用于药物改善认知功能的疗效评估。近20年来,一些研究致力于MMSE各子项目的研究从而探讨AD认知损害特点,研究结果显示MMSE的各子项目有不同的难度系数,对认知损害的评估有不同的灵敏度<sup>[1]</sup>。在86例AD患者中,早期最敏感的子项目是延迟记忆、时间定向力和计算力/注意力,而其他子项目在中晚期才出现较明显的受损<sup>[2]</sup>。但是上述研究国外有少数大样本量研究,国内仅限于小样本量研究,且存在不同结果,所以本研究收集较大样本量分析患者MMSE总分及子项目得分情况,探讨AD进程中认知损害特点。

\* 广州市科技计划项目(编号:2010Y1-C101)