

卵巢癌、成熟型畸胎瘤与正常血液样本中挥发性组分的研究

王晨旭^{1,2} 王丽丽³ 杨艳芹⁴ 吴存琦^{*1} 杨卫¹ 徐经纬^{*1}

¹(中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022) ²(中国科学院大学, 北京 100039)

³(中国医科大学附属盛京医院, 沈阳 110004) ⁴(浙江中烟工业有限责任公司技术中心, 杭州 310024)

摘 要 采用顶空固相微萃取(HS-SPME)与气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术, 对 12 例卵巢癌、17 例成熟型畸胎瘤与 16 例正常血液样本的挥发性组分进行研究, 对影响提取效果的实验因素进行了优化。在最优条件下共检出 28 种挥发性组分, 以各组分峰面积为变量, 用 SIMCA-P 软件进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA), 3 组样本被明显区分。同时, 依据 PLS-DA 载荷图得到 8 种具有显著性差异的标志物, 其中己醛、蘑菇醇的变化与其在肝癌、肺癌患者血液中的变化一致, 可作为诊断卵巢癌和成熟型畸胎瘤的挥发性生物标志物。

关键词 顶空固相微萃取; 气相色谱-质谱联用法; 卵巢癌; 成熟型畸胎瘤; 挥发性生物标志物

1 引 言

卵巢肿瘤有良性和恶性两类。成熟型畸胎瘤是一种典型的卵巢良性肿瘤, 可通过手术治愈, 致死率低。卵巢癌是卵巢恶性肿瘤, 全球每年约有 12.5 万名女性死于卵巢癌, 致死率居妇科肿瘤首位^[1]。缺乏有效的生物标志物是造成卵巢癌高致死率的主要原因。近年来, 人们开始通过检测血液中挥发性化合物来寻找癌症生物标志物^[2~4]。顶空固相微萃取(HS-SPME)具有高效、对样本破坏性小等优势, 与气相色谱-质谱(GC-MS)联用可对挥发性组分进行快速分析^[5,6]。本实验将 HS-SPME 与 GC-MS 联用法应用于卵巢癌血样分析, 对影响 HS-SPME 提取效果的实验条件进行了优化, 在最优条件下对 12 例卵巢癌(Blood of ovarian cancer patients, BOC)、17 例成熟型畸胎瘤(Blood of mature teratoma patients, BMT)与 16 例正常血液样本(Blood of normal people, BN)进行挥发性组分分析, 通过偏最小二乘判别分析法(PLS-DA)和独立样本 *t* 检验比较 3 组样本的差异, 并分析了具有显著性差异的化合物作为卵巢癌、成熟型畸胎瘤生物标志物的可能性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

QP 2010-Plus 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司), DB-5 毛细管柱(30.0 m × 0.25 mm × 0.25 μm, 美国 Agilent 公司), 磁力搅拌器(德国 IKA 公司), 顶空进样针(PDMS-DVB 65 μm, 美国 Sigma 公司), 顶空瓶(20 mL, 美国 Agilent 公司), PTFE/Si 瓶盖(美国 Agilent 公司), 真空采血管(K₂EDTA, 美国 BD 公司), D-PBS (pH 7.2), 正构烷烃(C₈ ~ C₃₀, 美国 Supelco 公司)。

2.2 血样采集保存与实验方法

实验共采集 45 个血液样本(见表 1)。样本均采自肘中静脉, 样本量约为 4 mL, 储存于内涂 10.8 mg K₂EDTA 抗凝血的真空采血管, 并在 -80℃ 保存, 实验时室温下解冻。20 mL 顶空瓶中加入 1.5 cm 搅拌子, 用 PTFE/Si 瓶盖密封, 使用真空泵抽真空以排除瓶内空气, 用 2 mL 玻璃注射器加入 1 mL 血样, 用 1 mL 玻璃注射器加入 0.5 mL 缓冲溶液 D-PBS, 然后用氮气平衡到常压。将聚二甲基硅氧烷-二乙烯基苯(PDMS-DVB)涂层萃取头插入瓶中, 1200 r/min 磁力搅拌, 在设定的温度(37℃, 42℃, 47℃ 和 52℃)水浴提取一段时间(10, 15, 20 和 25 min), 退出萃取头, 插入 GC 进样口解吸 30 s 后进行 GC-MS 分析。萃取头每次使用前, 均插入 GC 进样口, 在 250℃ 解吸 5 min, 以避免萃取头可能残留的化

2015-01-15 收稿; 2015-03-26 接受

* E-mail: jwxu@ciac.ac.cn

合物带来的干扰。

表 1 样本详情

Table 1 Characteristics of samples

	卵巢癌患者血样 Blood of ovarian cancer patients (BOC)	成熟型畸胎瘤患者血样 Blood of mature teratoma patients (BMT)	正常人血样 Blood of normal people (BN)
数量 Number	12	17	16
年龄范围 Age range	28 ~ 65	24 ~ 59	27 ~ 51
平均年龄 Mean age	50	35	39

2.3 色谱-质谱条件

色谱: DB-5 色谱柱(30.0 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 升温程序: 初始温度 40℃, 保持 5 min, 以 5℃/min 升至 170℃, 保持 2 min, 16℃/min 升至 250℃, 保持 2 min; 进样口温度: 250℃; 载气: 高纯氮, 纯度 > 99.999%; 流速: 0.75 mL/min; 采用不分流进样 0.5 min。

质谱: 电离方式: EI; 电子能量: 70 eV; 离子源温度: 230℃; 接口温度: 280℃; 检测器电压: 0.9 kV; 全扫描模式: m/z 40 ~ 400。

2.4 数据处理

定性: 所得化合物谱图与标准谱库(NIST05)谱图对比, 相似度大于 85%; 在相同色谱条件下分析正构烷烃(C8 ~ C30)标样, 计算化合物保留指数(RI)^[7]。采用软件 SIMCA-P 11.5、SPSS 17, 以化合物峰面积为变量进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA)与显著性分析。

3 结果与讨论

3.1 HS-SPME 提取条件的优化

实验对影响 HS-SPME 萃取效果的两个主要因素: 提取时间与提取温度进行了优化。实验样本为成熟型畸胎瘤血样。优化过程中选取相对含量较高的己醛、蘑菇醇、2-壬烯-1-醇三种组分的峰面积与总峰面积作为评价标准。温度优化时, 提取时间均为 25 min。为便于比较, 温度优化时设 37℃ 所得峰面积为 1, 时间优化时设 10 min 时所得峰面积为 1, 以相对峰面积作图。结果如图 1a 所示, 己醛提取量在实验温度范围内随温度升高稍有下降, 而蘑菇醇、2-壬烯-1-醇与总化合物提取量均随温度升高而升高, 但是 42℃ 之后蘑菇醇提取量开始下降, 2-壬烯-1-醇与总化合物提取量仍呈上升趋势, 47℃ 之后化合物提取量趋于平衡。综合考虑 3 种化合物与总化合物提取量的变化, 选择 47℃ 进行后续实验。提取时间的影响见图 1b, 2-壬烯-1-醇在 10 ~ 15 min 提取量有明显上升, 20 min 后己醛提取量仍有缓慢升高; 但蘑菇醇、2-壬烯-1-醇与总化合物提取量在 20 min 时达到最大值, 为了防止血液样品变质, 应尽量缩短实验时间, 提取时间选取 20 min。最终优化实验条件为: 1 mL 血样中加入 0.5 mL 缓冲液 D-PBS, 插入

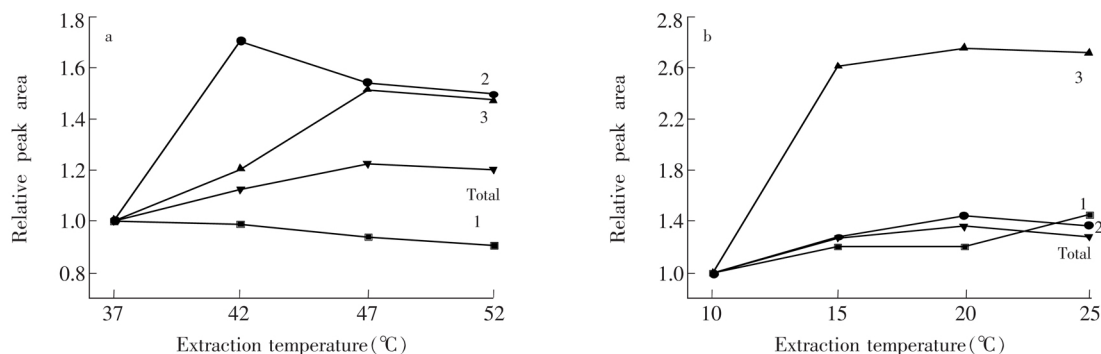


图 1 总峰面积(Total)以及己醛(1)、蘑菇醇(2)、2-壬烯-1-醇(3)峰面积随提取温度(a)、提取时间(b)的变化

Fig. 1 Peak areas of the total and three components-hexanal (1), amyl vinyl carbinol (2), and 2-non-en-1-ol (3) changed with the extracting temperature (a) and extracting time (b)

PDMS-DVB 萃取头, 1200 r/min 搅拌下在 47℃ 水浴提取 20 min 后, 将萃取头插入 GC 进样口, 在 250℃ 解吸 30 s 后进行 GC-MS 分析。

3.2 成分分析

图 2 为在优化条件下得到的 BN、BMT 与 BOC 中挥发性组分的总离子流图, 45 个血样中共检出 28 种化合物, 其中 18 种化合物在人体代谢物中被检出过^[8], 详见表 2。采用软件 SIMCA-P 11.5, 以各化合物的峰面积为变量做最小二乘法判别分析(PLS-DA), 得到三维得分图(图 3a)与载荷图(图 3b)。

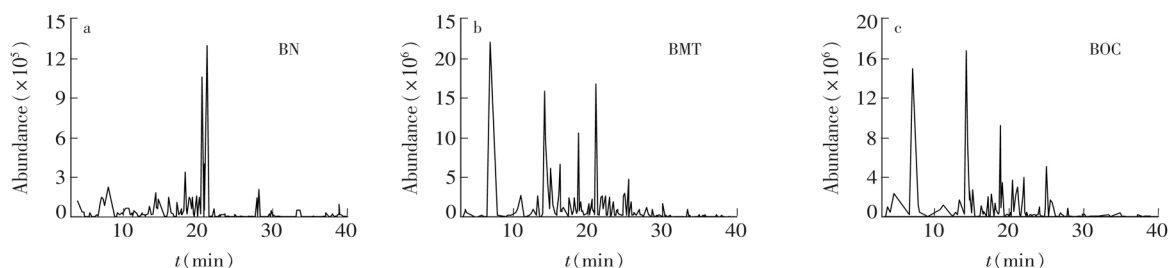


图 2 正常血样(a)、成熟型畸胎瘤血样(b)与卵巢癌血样(c)挥发性组分的总离子流图

Fig.2 Total ion chromatograms of volatile compounds in BN (a), BMT (b) and BOC(c)

表 2 在卵巢癌、成熟型畸胎瘤与正常血液样本中检出的挥发性化合物

Table 2 Volatile compounds in the blood of ovarian cancer patients, mature teratoma patients and normal people

分类 Class	编号 No.	保留时间 Retention time (min)	保留指数 RI	化合物 Compounds	相似度 Similarity (%)	出现概率 Occurrence (%)		
						卵巢癌 Ovarian cancer	成熟型畸胎瘤 Mature teratoma	正常 Normal
醛类 Aldehydes	1	6.911	789	己醛 Hexanal ^a	94	100	100	19
	4	11.103	896	庚醛 Heptanal ^a	95	100	100	12
	11	15.125	1000	辛醛 Octanal ^a	94	75	100	6
	16	18.779	1102	壬醛 Nonanal ^a	87	100	100	62
	22	22.096	1204	癸醛 Decanal ^a	92	50	76	31
	23	22.344	1212	2-癸二烯醛 2- <i>Δ</i> -Decadienal	95	42	76	—
	27	25.451	1315	2-十一碳二烯醛 2- <i>Δ</i> -Undecadienal	91	83	82	—
烃类 Hydro- carbons	2	7.183	798	1-辛烯 1-Octene ^a	89	33	47	81
	9	14.617	987	1-9-癸二烯 1-9-Decadiene	88	58	—	13
	13	17.126	1056	8-甲基-2-癸烯 8-Methyl-2-decene	88	83	100	63
	15	18.659	1099	十一烷 Undecane ^a	95	50	82	6
	19	20.835	1165	己基环戊烷 Hexylcyclopentane	88	67	—	44
	21	21.936	1199	十二烷 Dodecane ^a	95	75	100	6
	25	24.784	1292	1-十三炔 1-Tridecyne	85	58	—	—
	26	24.971	1298	十三烷 Tridecane ^a	96	75	100	19
	28	27.806	1398	十四烷 Tetradeceane ^a	93	67	88	50
醇类 Alcohols	6	14.005	971	2-庚烯-1-醇 2-Hepten-1-ol	86	—	76	—
	7	14.275	978	蘑菇醇 Amyl vinyl carbinol ^a	97	100	100	100
	12	16.269	1032	2- <i>Δ</i> -二甲基环己醇 2- <i>Δ</i> -Dimethylcyclohexanol	85	67	6	13
	14	17.519	1067	2-辛烯-1-醇 2-Octen-1-ol ^a	95	100	94	63
	20	21.133	1174	2-壬烯-1-醇 2-Nonen-1-ol	86	100	100	94
	24	23.805	1260	正癸醇 1-Decanol ^a	88	—	53	—
酮类 Ketones	3	10.679	886	4-甲基-2-庚酮 4-Methyl-2-heptanone	85	25	41	31
	5	13.289	952	甲基己基甲酮 2-Octanone ^a	85	67	82	31
	17	20.188	1145	樟脑 Camphor ^a	86	42	—	81
	18	20.488	1155	薄荷脑 Menthone ^a	91	92	53	81
酯类 Esters	8	14.438	982	己酸乙酯 Hexanoic acid, ethenyl ester ^a	87	67	88	100
其他 Others	10	14.721	988	2-戊基呋喃 2-Amylfuran ^a	87	67	100	63

a 已报道过的化合物(Compounds previously reported)。

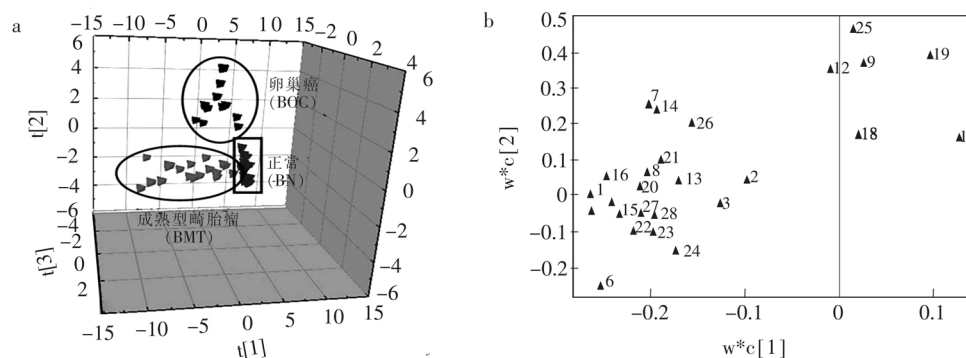


图3 PLS-DA 得分图 (a) 和载荷图 (b)

Fig. 3 Score plot (a) and Loading plot (b) of partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA)

在得分图(图3a)中,BOC、BMT与BN可以明显区分,说明三者的挥发性组分存在明显差异;载荷图(图3b)为确定产生差异的标志物提供帮助,各化合物均对应一个VIP值,VIP>1表示该化合物对分类贡献大。在检出的28种化合物中有8种化合物VIP>1,分别为己醛(No. 1)、2-庚烯-1-醇(No. 6)、蘑菇醇(No. 7)、1,9-癸二烯(No. 9)、2,4-二甲基环己醇(No. 12)、2-辛烯-1-醇(No. 14)、己基环戊烷(No. 19)、1-十三炔(No. 25)。结合表2中8种化合物出现的概率进行分析,1,9-癸二烯与己基环戊烷在BMT中都没有检出,在BOC与BN中检出概率分别为:1,9-癸二烯(58%,13%),己基环戊烷(67%,44%);1-十三炔只在BOC中检出,对卵巢癌检测灵敏度为58%,特异性为100%;2-庚烯-1-醇只在BMT中检出,对成熟型畸胎瘤检测灵敏度为76%,特异性为100%,可为疾病类型诊断与癌症代谢变化提供参考。己醛、蘑菇醇、2,4-二甲基环己醇、2-辛烯-1-醇在3类血液样本中均被检出,但是峰面积有较大差异,4种化合物在BOC、BMT与BN中平均峰面积的比较见图4,采用SPSS 17对4种化合物峰面积进行独立样本t检验,结果见表3。

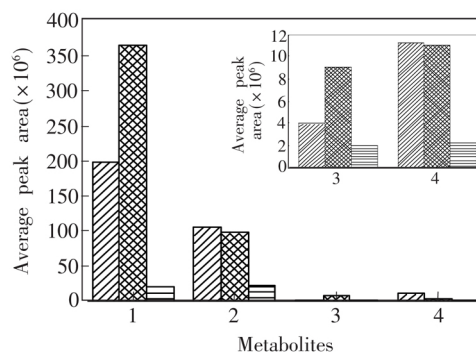


图4 己醛(1)、蘑菇醇(2)、2,4-二甲基环己醇(3)和2-辛烯-1-醇(4)在卵巢癌(BOC)成熟型畸胎瘤(BMT)与正常血液中的(BN)平均峰面积比较

Fig. 4 Comparison of average peak areas for the four metabolites-hexanal (1), amyl vinyl carbinol (2), 2,4-dimethylcyclohexanol (3) and 2-octen-1-ol (4) in BOC (BOC), BMT (BMT) and BN (BN)

表3 4种差异显著的化合物

Table 3 Four volatile compounds with significant difference

化合物 Compound	平均峰面积 Average peak area(×10 ⁶)			倍数 Fold change			p 值 p Value		
	BOC	BMT	BN	BOC	BMT	BN	BOC	BMT	BN
己醛 Hexanal	199.1±131.6	364.2±200.5	21.7±30.3	9.2	16.8	0.5	0.001	<0.000	0.013
蘑菇醇 Amyl vinyl carbinol	106.8±60.9	97.6±35.1	23.1±27.4	4.6	4.2	1.1	0.001	<0.000	0.643
2,4-二甲基环己醇 2,4-Dimethylcyclohexanol	4.0±1.3	9.1±2.2	2.0±0.1	2.0	4.6	0.4	0.003	0.012	0.007
2-辛烯-1-醇 2-Octen-1-ol	11.3±7.3	11.0±5.8	2.2±1.6	5.1	5.0	1.0	0.001	<0.000	0.918

BOC: blood of ovarian cancer potents; BMT: blood of mature teratoma patients; BN: blood of normal people.

由表3可知,4种化合物在BOC与BMT中均显著高于正常血液,其中2-辛烯-1-醇在BOC与BMT

中的平均峰面积分别为正常血液的 5.1 和 5.0 倍, 2- β -二甲基环己醇分别为 2.0 和 4.6 倍, 其中 2-辛烯-1-醇在人体血液、乳汁以及皮肤表面的挥发性组分中曾被检出^[8]。己醛差别最大, 在 BOC 与 BMT 中的平均峰面积分别是 BN 中的 9.2 和 16.8 倍。己醛是体内氧自由基引起的脂质过氧化产物, 被证实有细胞毒性, 并可能导致细胞损伤与修复失衡, 多篇文献报道在肝癌、肺癌等癌症中己醛显著升高^[3, 9]。BOC 与 BMT 中蘑菇醇平均峰面积分别是 BN 中的 4.6 和 4.2 倍。作为棕榈酸、油酸及亚油酸的代谢产物, 蘑菇醇具有降低血液中醛类含量的抗氧化作用^[10], 有研究者认为, 血液中蘑菇醇含量的升高是人体增强抗氧化活性, 以降低体内致癌物的一种自我保护方式^[4], 在肝癌患者的血液中, 蘑菇醇含量也有明显升高, 并被建议作为肝癌诊断的挥发性生物标志物^[4]。

References

- 1 Rauh-Hain J A, Krivak T C, Carmen M G, Olawaiye A B. *Rev. Obstet. Gynecol.*, **2011**, 4(1): 15–21
- 2 Shirasu M, Touhara K. *J. Biochem.*, **2011**, 150(3): 257–266
- 3 Deng C H, Zhang X M, Li N. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 808(2): 269–277
- 4 Xue R Y, Dong L, Zhang S, Deng C H, Liu T T, Wang J Y, Shen X Z. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, **2008**, 22(8): 1181–1186
- 5 Miekisch W, Schubert J K, Vagts D A, Geiger K. *Clin. Chem.*, **2001**, 47(6): 1053–1060
- 6 Liu H J, Wang H, Li C X, Wang L C, Pan Z F, Wang L L. *J. Chromatogr. B*, **2014**, 945(3): 53–59
- 7 ZHAO Chen-Xi, LIANG Yi-Zeng, HU Qian-Nan, ZHANG Tai-Ming. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2005**, 33(5): 715–721
赵晨曦, 梁逸曾, 胡黔楠, 张泰铭. *分析化学*, **2005**, 33(5): 715–721
- 8 de Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, Osborne D, Ratcliffe N M. *J. Breath Res.*, **2014**, 8(1): 1–29
- 9 Phillips M, Gleeson K, Hughes J M B, Greenberg J, Cataneo R N, Baker L, McVay W P. *Lancet*, **1999**, 353(9168): 1930–1933
- 10 Lee S J, Lee K G. *Food. Chem. Toxicol.*, **2005**, 43(4): 515–520

Investigation of Volatile Components in Blood of Ovarian Cancer, Mature Teratoma and Normal Blood

WANG Chen-Xu^{1, 2}, WANG Li-Li³, YANG Yan-Qin⁴, WU Cun-Qi^{*1}, YANG Wei¹, XU Jing-Wei^{*1}

¹(Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China)

²(University of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

³(Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

⁴(Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial CO., LTD., Hangzhou 310024, China)

Abstract Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) coupling with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to investigate the volatile compositions in the blood of ovarian cancer patients ($n=12$), mature teratoma patients ($n=17$) and normal people ($n=16$). The extraction conditions were optimized and 28 compounds were obtained in total. The three groups were further analysed by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) with SIMCA-P software and obviously distinguished by the score plots. With the loading plot, eight relevant markers were obtained. It's worth mentioning that the variations of hexanal and amyl vinyl carbinol were consistent with those in the blood of liver and lung cancers, suggesting that hexanal and amyl vinyl carbinol could be used as the biomarkers for ovarian cancer and mature teratoma.

Keywords Headspace solid phase microextraction; Gas chromatography-mass spectrometry; Ovarian cancer; Mature teratoma; Volatile biomarker

(Received 15 January 2015; accepted 26 March 2015)