

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.35.010

尖端放电喷雾电离质谱技术鉴定肺癌的差异性磷脂研究*

温 华¹,魏益平¹,张兴磊²,朱腾高²,陈立如¹,徐建军^{1△}

(1.南昌大学第二附属医院心胸外科,南昌 330006;2.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** 运用尖端放电喷雾电离质谱技术鉴定肺癌差异性磷脂。**方法** 在不对肺组织进行任何预处理的前提下,采用自制的甲醇萃取辅助的尖端放电喷雾离子源对 14 例肺癌患者的肺癌组织和癌旁组织的差异性磷脂[质荷比(m/z)756.7]及标准品[二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)+ Na^+]进行多级质谱检测,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,一级质谱扫描范围为 m/z 750~850,多级谱图扫描范围为 m/z 200~800,离子传输管温度 150°C ,喷雾电压 3.5 kV,透镜电压 65.0 V,选定离子的隔离宽度为 1.6 Da,碰撞能量为 13%。**结果** m/z 756.7 的多级质谱图与标准品[DPPC+ Na^+]完全相符,即肺癌的差异性物质为 DPPC。**结论** 尖端放电喷雾电离质谱技术利用多级质谱分析可以很好地对肺癌和癌旁组织的差异性磷脂进行定性,DPPC 可能成为新的肺癌分子标志物,为肺癌的诊断提供新的方法。

[关键词] 肺肿瘤;二棕榈酰磷脂酰胆碱;尖端放电质谱分析;鉴定**[中图分类号]** R319**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)35-4929-03

Identification of differential phospholipids in lung cancer by tip-spray ionization mass spectrometry*

Wen Hua¹,Wei Yiping¹,Zhang Xinglei²,Zhu Tenggao²,Chen Liru¹,Xu Jianjun^{1△}

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Jiangxi Key Laboratory of Mass Spectrometry, Donghua University of Science & Technology, Nanchang, Jiangxi 330013, China)

[Abstract] **Objective** To identify the differential phospholipid in lung cancer by using tip-spray ionization mass spectrometry (TSI-MS). **Methods** Under the premise of no pretreatment of lung tissues, the differential phospholipid m/z 756.7 in lung carcinoma tissues and adjacent normal tissues of 14 cases of patients with lung cancer and the standard [DPPC+ Na^+] were detected by multistage mass spectrometry using a self-made methanol extraction assisted tip discharge ionization source. The flow rate of methanol was $4 \mu\text{L}/\text{min}$, the ion source was positive ion mode, the scanning range of single-stage mass spectrometry was m/z 750—850, the scanning range of multistage mass spectrometry was m/z 200—800, the ion transport tube temperature was 150°C , the spray voltage was 3.5 kV, the lens voltage was 65 V, the selected ion isolation width was 1.6 Da, and the collision energy was 13%. **Results** The mass spectrum of m/z 756.7 detected by multistage mass spectrometry was consistent with the standard [DPPC+ Na^+], that was, DPPC was the differential material of lung cancer. **Conclusion** TSI-MS can be used to characterize the differential phospholipids in lung cancer tissues and adjacent tissues, DPPC may become a new molecular marker of lung cancer, providing a new method for the diagnosis of lung cancer.

[Key words] lung neoplasms; DPPC; tip-spray mass spectrometry; identification

肺癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一^[1],极大地危害了人们的生命健康。由于对肺癌的发病机制尚不清楚,因而缺乏针对性治疗手段,外科手术仍是目前治疗肺癌最直接、有效的方法,临床研究表明,早期诊断是改善肺癌预后的关键^[2-4]。目前仍以影像学检查为诊断肺癌的主要手段,患者确诊时往往已发展为肺癌中晚期;同时影像学检查无法反映肺癌的发病机制,不能为治疗及药物开发提供靶点。因此,对肺癌患者发病机制及生物标志物的研究有利于其早期诊断,具有非常重要的临床价值。

质谱分析是通过检测待测物离子的特异质荷比来分析被测物质的分析方法,具有灵敏度高、特异性好、检测方式灵活多样等优点^[5]。2004 年有学者提出了在无需样品预处理条件下直接分析固体表面痕量待测物的电喷雾解吸电离技术^[6],随即掀起了直接离子化技术的研究热潮。近几年来,质谱技术不

断地被应用于肾结石、前列腺癌等疾病的检测及诊断^[7-8]。尖端放电喷雾电离质谱分析是基于纸喷雾电离质谱技术原理发展的一种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对复杂样品中不同类型化合物的快速分析检测方法^[9],可在无需样品预处理的情况下对各种临床组织样品进行分析^[10]。多级质谱分析是对目标母离子进行多级碰撞诱导解离实验,通过施加能量使其运动加剧,并按照分子结构的本质规律进行裂解,从而获得具有分子结构特征的碎片离子,获得相关的串联质谱谱图,总结其裂解规律、推导出其分子结构式^[11-13]。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组织及癌旁组织,运用多级质谱分析方法鉴定肺癌差异性磷脂的效果及应用。

1 资料与方法

1.1 组织来源 本研究经南昌大学第二附属医院临床委员会

* 基金项目:国家重大科学仪器设备开发专项基金资助项目(2011YQ170067);国家自然科学基金资助项目(81160293,21365001);2013 年江西省研究生创新专项资金项目(YC2013-S005)。 作者简介:温华(1989—),住院医师,硕士,主要从事肺癌的临床基础研究。 △ 通讯作者, Tel:13907913526;E-mail:942091371@qq.com。

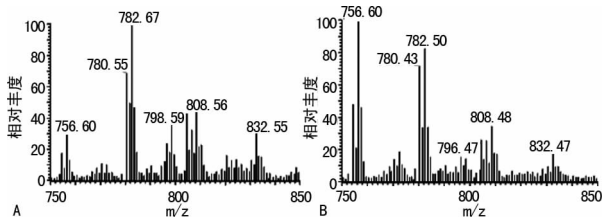
批准,所有患者知情同意。病例入选标准:2013 年 1~10 月入院的肺癌患者;术前未经化学治疗等药物干预,术中留取肺癌组织及癌旁组织(距离癌组织边缘 5 cm 以上,视为正常肺组织)标本,所留取样品置于 -80°C 保存。入选患者 14 例,手术后病理诊断均为非小细胞肺癌,其中男 10 例,女 4 例,年龄 40~71 岁,腺癌 7 例,鳞癌 7 例。

1.2 仪器与试剂 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)。标准品二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);5% 碳酸氢钠注射液(罗欣医药集团有限公司);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)由两部分构成,即尖端刺有微量组织样品的针尖针(0.35 mm \times 75 mm)和样品上方的萃取剂甲醇,电喷雾电压连接于针尖针柄上,样品与萃取剂及质谱入口的距离均约 5 mm;组织样品未经任何处理,解冻后取大小约 1 mm³ 的组织用于质谱分析。设置离子源为正离子模式,一级谱图扫描范围为质荷比(m/z)750~850,多级谱图扫描范围 m/z 200~800,离子传输管温度 150°C ,喷雾电压 3.5 kV,透镜电压 65.0 V,选定离子的隔离宽度为 1.6 Da,碰撞能量为 13%,其他条件系统自动优化。根据前期得到的主成分分析(PCA)结果^[14]及此次的 PCA 结果,选定具有差异性的物质 m/z 756.7 为母离子进行多级质谱分析,通过对比该物质的标准品的多级质谱图,从而达到定性。

2 结果

2.1 m/z 757 的多级质谱图 按拟定实验方法对 14 例肺癌患者的癌组织和癌旁组织共计 28 份组织样品进行质谱检测,在一级谱图发现了质子化的卵磷脂(m/z 756.7),见图 1;其二级质谱中存在特征离子 m/z 698、 m/z 574 等,见图 2,符合文献^[15]上卵磷脂的裂解规律,表明该物质为卵磷脂;其三级质谱中存在特征离子 m/z 574、 m/z 552 等。依据其丢失的相对分子质量、碎裂规律及相关文献^[16]上报道的 DPPC 是肺表面活性物质最主要的脂质成分,在维持肺组织正常结构及功能起着重要作用,作者推导 m/z 756.7 为 DPPC 与一个钠离子的结合物。



A: 肺癌组织一级质谱图; B: 癌旁组织一级质谱图。

图 1 肺组织一级质谱图

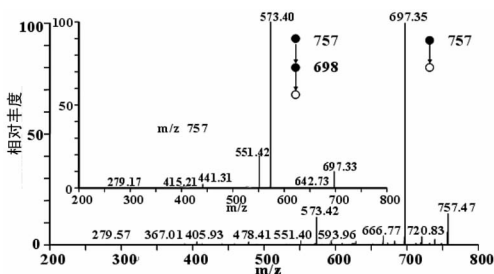


图 2 m/z 756.7 的多级质谱图

2.2 m/z 757 的定性鉴定 与标准品 DPPC 配置的钠盐溶液的多级质谱谱图(图 3)比较, m/z 756.7 的二级谱图、三级谱图与标准品[DPPC+Na⁺]完全符合,表明 m/z 756.7 为物质[DPPC+Na⁺];质谱分析能够较好地对未知物质进行定性分析。

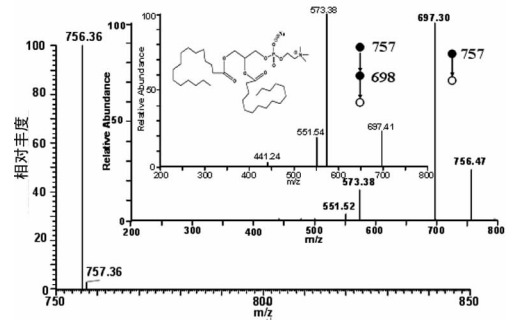


图 3 标准品[DPPC+Na⁺]的多级质谱图

3 讨论

肺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率及病死率高居榜首,其肺部表现可出现呼吸困难、咳嗽、肺不张、喘鸣、肺部炎症等。目前对肺癌的发病机制仍不清楚,缺乏针对性的药物。尖端放电喷雾电离质谱技术是近年来发展起来的直接质谱分析方法,可在无需复杂样品预处理的情况下对临床组织、血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样品的质谱信息。碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)在质谱中用来证明带电物质[M+H]⁺的特定分子式和检测其碎片离子^[17];有研究应用多级质谱分析方法对烟草中的烟碱进行多级碰撞诱导解离实验,得到了烟碱的特征碎片离子^[11]。由此可见,尖端放电喷雾电离质谱技术多级质谱分析可用于物质的定性分析,在发现肺癌生物标记物的定性中具有重要价值。

本研究结果显示:在正离子模式下,通过多级质谱检测能对癌旁组织中高于肺癌组织的差异性磷脂 m/z 756.7 定性分析,确定其为[DPPC+Na⁺]。DPPC 是肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)最主要的脂质成分,PS 的主要成分为磷脂含量高达 90%,在肺泡 II 型上皮细胞的粗面内质网合成,通过高尔基体运送到泡体,最后在分泌前被板层小体包裹,板层小体通过细胞外分泌作用,使 PS 分泌到肺泡表面,形成复杂的格子样排列,叫管状囊磷脂(管鞘),使肺泡表面气液间形成单分子层。PS 具有参与宿主防御及免疫调节等功能,维持肺的稳定及抗炎作用^[16]。肺癌患者中的肿瘤坏死因子显著增多^[18],肿瘤坏死因子可能使表面活性物质的合成酶降解,导致表面活性物质合成降低,引起肺不张、肺部炎症等;即肺癌组织中的 DPPC 含量低于癌旁组织。有研究报导,肺泡干细胞可以分化成肺泡 I 型上皮细胞和肺泡 II 型上皮细胞,均与肺癌的发生有重要的关系^[19];损伤的肺泡 I 型上皮细胞产生信号 1 替代 EGFR-KRAS 激活肺泡 II 型上皮细胞自我修复的功能,而另一种重组的肺泡 I 型上皮细胞产生信号 2 活化 EGFR-KRAS 激活肺泡 II 型上皮细胞的癌变,形成类似肺泡 II 型上皮细胞的肿瘤;与本研究的结果相符。

综上所述,本研究利用了尖端放电喷雾电离质谱技术实现了对肺癌差异性磷脂的鉴定,可能成为新的肺癌分子标志物。但本研究中的 DPPC 还需要进一步确定其在肺癌的发生、发展过程中不同时期及癌旁组织中的含量,这可为肺癌的诊断及临床分期提供新的方法。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1):11-30.
- [2] 黄国俊, 方德康, 程贵余, 等. 非小细胞肺癌纵隔淋巴结转移(N2)的外科治疗选择[J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 28(1): 62-64.
- [3] Hillinger S, Weder W. Extended surgical resection in stage III non-small cell lung cancer[J]. *Front Radiat Ther Oncol*, 2010, 42:115-121.
- [4] Bakir M, Fraser S, Routledge T, et al. Is surgery indicated in patients with stage III a lung cancer and mediastinal nodal involvement? [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2011, 13(3):303-310.
- [5] Vogiatzis CG, Zachariadis GA. Tandem mass spectrometry in metallomics and the involving role of ICP-MS detection: a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 819:1-14.
- [6] Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization[J]. *Science*, 2004, 306(5695):471-473.
- [7] Jia B, Ouyang Y, Sodhi RN, et al. Differentiation of human kidney stones induced by melamine and uric acid using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2011, 46(3):313-319.
- [8] Nakayama K, Inoue T, Sekiya S, et al. The C-terminal fragment of prostate-specific antigen, a 2331 da Peptide, as a new urinary pathognomonic biomarker candidate for diagnosing prostate cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e107234.
- [9] Yang Q, Wang H, Maas JD, et al. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry[J]. *Int J Mass Spectrom*, 2012, 312:201-207.
- [10] Liu J, Cooks RG, Ouyang Z. Biological tissue diagnostics using needle biopsy and spray ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(24):9221-9225.

- [11] Hu AF, Jiang J, Zhou GJ, et al. Characteristic fragmentation behavior of tobacco-specific N-nitrosamines using electrospray ionization multistage tandem mass spectrometry incorporating deuterium labeling[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2014, 28(15):1658-1664.
- [12] Gana I, Dugay A, Henriot T, et al. Degradation pathways study of the natriuretic and beta-adrenoceptor antagonist tienoxolol using liquid chromatography-electrospray ionization multistage mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 96:58-67.
- [13] Wang Z, Hop CE, Kim MS, et al. The unanticipated loss of SO₂ from sulfonamides in collision-induced dissociation [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(1):81-86.
- [14] 徐建军, 陈立如, 魏益平, 等. 常压直接质谱技术在快速鉴别肺癌与癌旁组织中的应用[J]. *广东医学*, 2014, 32(8): 1179-1182.
- [15] Pulfer M, Murphy RC. Electrospray mass spectrometry of phospholipids[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2003, 22(5):332-364.
- [16] Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection[J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(1):17-25.
- [17] Musah RA, Cody RB, Domin MA, et al. DART-MS in-source collision induced dissociation and high mass accuracy for new psychoactive substance determinations[J]. *Forensic Sci Int*, 2014, 244:42-49.
- [18] Colakogullari M, Ulukaya E, Yilmaztepe OA, et al. The involvement of IL-10, IL-6, IFN-gamma, TNF-alpha and TGF-beta gene polymorphisms among Turkish lung cancer patients[J]. *Cell Biochem Funct*, 2008, 26(3):283-290.
- [19] Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer[J]. *Nature*, 2014, 507(7491):190-194.

(收稿日期:2016-07-22 修回日期:2016-09-17)

(上接第 4928 页)

- 院非终末期晚期肿瘤病人营养风险, 营养不足及营养支持情况前瞻性描述性研究[J]. *中华临床营养杂志*, 2014, 22(1):28-33.
- [2] 潘宏铭, 陈薇. 2008 年非手术恶性肿瘤患者营养支持治疗指南的解读[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(9):844-851.
- [3] Fearon KC, Voss AC, Hustead DS, et al. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(6):1345-1350.
- [4] Lundholm K, Daneryd P, Bosaeus I, et al. Palliative nutritional intervention in addition to cyclooxygenase and erythropoietin treatment for patients with malignant disease: effects on survival, metabolism, and function [J]. *Cancer*, 2004, 100(9):1967-1977.
- [5] CSCO 肿瘤营养治疗专家委员会. 恶性肿瘤患者的营养治疗专家共识[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(1):59-73.

- [6] 保红平, 杨浩雷, 高瑞岗, 等. 腹部外科手术后肠内营养支持的临床研究[J]. *中华消化外科杂志*, 2007, 6(1):32-34.
- [7] Dwolatzky T, Berezovski S, Friedmann R, et al. A prospective comparison of the use of nasogastric and percutaneous endoscopic gastrostomy tubes for long-term enteral feeding in older People[J]. *Clin Nutr*, 2001, 20(6):535-540.
- [8] Wan B, Fu H, Yin J. Early jejunal feeding by bedside placement of a nasointestinal tube significantly improves nutritional status and reduces complications in critically ill patients versus enteral nutrition by a nasogastric tube [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2015, 24(1):51-57.
- [9] 吴莉, 姜芸. 肠内营养支持治疗在结直肠癌根治术后的应用价值[J]. *中华消化外科杂志*, 2015, 14(10):852-857.

(收稿日期:2016-07-22 修回日期:2016-09-28)