

## 非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK 挥发性有机物的测定

储李婧, 夏海龙\*

**摘要** 目的 寻找淋巴瘤细胞特征性的气体标志物,为应用呼气监测对淋巴瘤患者的早期诊断提供实验依据,评估固相微萃取-气相色谱/质谱技术(SPME-GC/MS)应用于淋巴瘤细胞顶空气体的检测的可行性。方法 采用 SPME-GC/MS 检测非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK 细胞在培养瓶顶空气中挥发性有机物(VOCs)的成份,与人淋巴细胞株和空白对照组顶空气体中的 VOCs 比较,通过单样本秩和检验筛选出非霍奇金淋巴瘤细胞的特征性挥发性标志物。结果 在 JEOK 细胞培养瓶顶空气中可检测到二甲基硫、甲苯、邻二甲苯、1,3-二叔丁基苯、苯乙酮、十二烷,较人淋巴细胞升高;而乙醇、苯甲醛、正己醛明显减少。结论 非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK 可以引起培养瓶顶空气中 VOCs 组成的改变,芳香族化合物与烷烃类化合物增多,乙醇及醛类含量减少,上述物质可能作为淋巴瘤细胞特征性标志物;SPME-GC/

MS 作为一种衡量物质检测方法,可以用于 JEOK 细胞株培养瓶顶空气中 VOCs 的检测。

**关键词** 非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK;肿瘤;VOCs;气相色谱/质谱技术

中图分类号 R 552;R 733.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0744-05

淋巴瘤是我国常见的恶性肿瘤之一,全球发病率年增长率为 7.5%,是目前发病率增长较快的恶性肿瘤,全球每年死亡人数达 20 万<sup>[1]</sup>。大部分淋巴瘤起病较为隐秘,多数患者在就诊时已属 III 期或 IV 期,直接影响患者使用药物的疗效和远期预后。因此开发有效、便捷的早期筛查手段相当重要。呼气分析是通过检测人体呼气中挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs)的改变,间接提示机体的细胞代谢及病理生理过程的改变,从而对疾病做出判断。该课题组曾运用质子转移反应质谱(proton transfer reaction-mass spectrometry, PTR-MS)检测 NB4 细胞顶空气体的改变,但 PTR-MS 只能依靠物质的质荷比推测 VOCs 成份;因固相微萃取与气相

2015-01-26 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1308085MH159)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:储李婧,女,硕士研究生;

夏海龙,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xhl1999cn@163.com

\* 对本文具有同等贡献

## The effect of targeting inhibition of DNMT1 gene on the proliferation of human glioma cell

Li Jia, Bian Erbao, He Xiaojun, et al

(Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To transfect the human glioblastoma cells *in vitro* with the siRNA sequence targeting to DNA methyltransferase 1 (DNMT1) gene, and investigate its effect on proliferation of human glioblastoma cells. **Methods**

The experimental group was transfected by siRNA-DNMT1 sequence and the control group was given the siRNA negative sequence. The expression of DNMT1 gene was confirmed by qRT-PCR. The expression of DNMT1, PCNA and Cyclin D1, which were usually used as cell proliferation markers, was analyzed by Western blot. Cell survival and proliferation rate were determined by MTT and colony formation assay. **Results** Compared with the control group, qRT-PCR results showed that DNMT1 mRNA level was significantly decreased in DNMT1 siRNA transfected cells ( $P < 0.01$ ). The protein expression levels of DNMT1, PCNA and Cyclin D1 were dramatically reduced in the experimental group as detected by Western blot ( $P < 0.01$ ). MTT and colony formation assay results suggested that, the experimental group had a much lower cell survival ( $P < 0.05$ ) and proliferation rate ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression of DNMT1 gene of human glioblastoma cells *in vitro* is decreased by siRNA sequence targeting to DNMT1 gene, and the proliferation of human glioblastoma cells is also inhibited.

**Key words** glioblastoma; DNMT1; transfection; cell proliferation

色谱/质谱技术(solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry, SPME-GC/MS)具有预富集、高分离效能,又有质谱鉴定化合物的功能。因此,在前期实验的基础上,引入 SPME-GC/MS 使用联合技术对非霍奇金淋巴瘤 JEOK 细胞、人淋巴细胞及空白培养瓶顶空气体进行检测分析,通过比较 JEOK 细胞与对照组呼出的 VOCs 改变,筛选出 JEOK 细胞的 VOCs,并探讨呼气分析用于淋巴瘤患者诊断的临床可行性。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞来源** 非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK 细胞由安徽医科大学药理实验室惠赠;人淋巴细胞由安徽医科大学第一附属医院中心实验室惠赠。

### 1.2 试剂与仪器

**1.2.1 主要试剂** 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;RPMI 1640 培养液购自美国 HyClone 公司。

**1.2.2 主要仪器设备** 超净工作台购自苏州宏瑞净化科技有限公司;CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司;低速离心机购自德国 Eppendorf 公司;50 ml 培养瓶购自美国 Corning 公司;Olympus IX 倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司;DK-8D 型电热水槽购自上海精宏实验设备公司;固相微萃取针购自美国 Supelco 公司;气相色谱/质谱仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** 将 JEOK 细胞、淋巴细胞分别置入含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液中,均培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,隔天换液,始终保持细胞良好的生长状态,并且用于实验的细胞要处于生长对数期。

**1.3.2 对照组的设立** 空白对照培养瓶不加入任何细胞株,只需加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液;对照组培养瓶加入人淋巴细胞,培养条件同上述 JEOK 细胞;对照组所有的操作步骤与实验组完全相同并同时进行(除加入细胞株的操作),以保证对照的有效性。

**1.3.3 顶空气体 VOCs 的萃取与检测** 萃取前 24 h 换入新鲜的含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 15 ml,拧紧瓶盖,后利用涂覆有 100 μm PDMS 的 SPME 插入细胞培养瓶顶空,即萃取顶空中的 VOCs,温度为 37 °C,保持 40 min。见图 1。

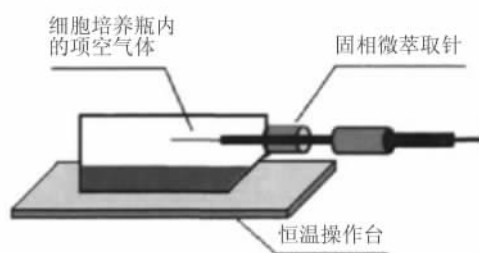


图1 利用萃取针萃取培养瓶顶空气体中的 VOCs

萃取针每次使用前在 260 °C 条件下加热 30 min,去除残留物质。萃取结束后立即进行 GC/MS 分析;在进样口解析 2 min 再进行检测。GC 设置条件:载气为氦气(He),流速为 1 ml/min,不分流进样,进样口温度为 260 °C;柱箱程序升温:40 °C 保持 8 min,再以 5 °C/min 升至 200 °C,最后以 20 °C 升至 260 °C 保持 5 min,MS 离子源温度为 220 °C,扫描范围为 30 ~ 250 m/z。

### 1.4 数据分析

**1.4.1 VOCs 峰面积归一化处理** 为了使样品之间的数据更有可比性及减少反应离子的波动对所测结果的影响,本研究对质谱所得峰面积进行归一化处理。具体是统一将 CO<sub>2</sub> 的峰面积作为基数,其他有机物的峰面积按( $I'_m = I_m / I_{CO_2} \times 100\ 000\ 000$ ),其中  $I_m$  为某 VOCs 的峰面积, $I'_m$  为标准化后的数据。  
**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。整个实验重复 12 次,由于所得很多数据为非正态分布,故采用非参数统计方法中的单样本秩和检验对数据进行比较。

## 2 结果

**2.1 实验组和对照组顶空气体 VOCs 检测总离子流图的比较** 依上述方法对培养瓶顶空气体进行萃取及检测,对其数据标准化后获得数据见图 2。从图中可以看到 3 种培养瓶顶空 VOCs 质谱离子图的峰高低不同,即代表所检测的 VOCs 离子强度不同;峰值越高,考虑细胞生长过程中产生,峰值越低考虑过程中的消耗,变化不大则考虑与细胞生长代谢无关。分离出来的每个组分通过 NIST 谱库检索,共鉴定出 19 种化合物(表 1),经过统一化处理后,二甲基硫、2,4-二甲基庚烷、甲苯、邻二甲苯、1,3-二叔丁基苯、十二烷的峰较对照组明显升高;乙醇、苯甲醛、正己醛的峰明显降低。经检测分析 9 种特征性有机物。 $Z > 1.96$  或  $< -1.96$  分别表明相应物质的峰面

表1 培养液培养瓶顶空气体中所检测的 VOCs 比较

项目	保留时间(s)	峰面积(cps)		
		(实验组)	(对照组)	(空白对照)
二甲基硫	1.72	93 691 179.08	-	-
乙醇	2.52	10 558 960.41	189 400 000.00	114 530 000.00
2,4-二甲基庚烷	3.30	227 860 000.00	155 700 000.00	-
氯仿	3.52	5 748 472.56	49 286 462.39	4 693 722.18
甲苯	3.85	248 700 000.00	165 190 000.00	98 780 520.81
正己醛	4.80	4 245 769.57	8 773 033.21	8 620 823.02
乙苯	5.87	46 302 276.17	37 904 693.46	42 085 719.24
邻二甲苯	6.20	79 444 771.52	27 423 114.00	19 677 121.49
丁醇	6.32	2 837 154.25	27 429 936.28	2 498 386.81
异丙基苯	6.98	13 542 011.08	9 503 579.23	12 587 633.38
对二甲苯	7.18	5 254 725.45	6 433 587.63	7 339 595.59
十二烷	7.77	192 090 000.00	2 742 311 400.00	136 790 000.00
苯乙烯	8.69	1 595 726 001.00	1 486 338 641.00	1 585 297 421.00
十四烷	11.32	9 173 454.92	9 583 261.68	8 085 830.95
1,3-二叔丁基苯	11.68	219 620 000.00	163 140 000.00	222 490 000.00
苯甲醛	12.90	39 886 438.55	154 480 000.00	73 170 133.16
二甲亚砜	13.46	3 756 883.21	3 690 426.25	-
正十九烷	14.05	1 029 253.49	1 548 951.64	1 799 008.43
苯乙酮	14.55	3 855 790.21	3 725 688.41	3 580 311.80

积即物质含量在 JEOK 细胞株顶空气中较淋巴细胞株/空白培养液增多或减少  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。见表 2、3。

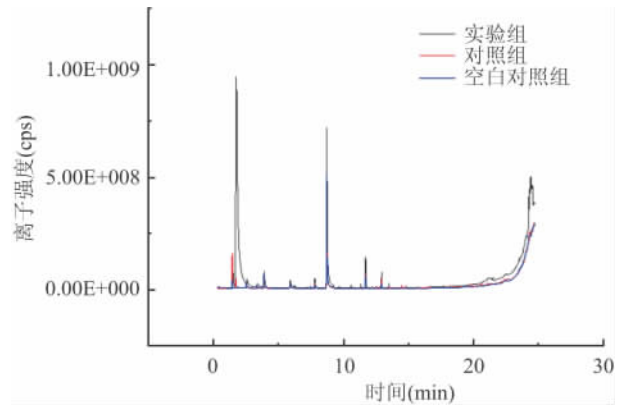


图2 上层气体检测的总离子流图比较

2.2 3 组中 VOCs 的峰面积比较 结合实验所得结果,各种 VOCs 的峰面积在实验组、对照组、空白对照组中的分布见图 3。

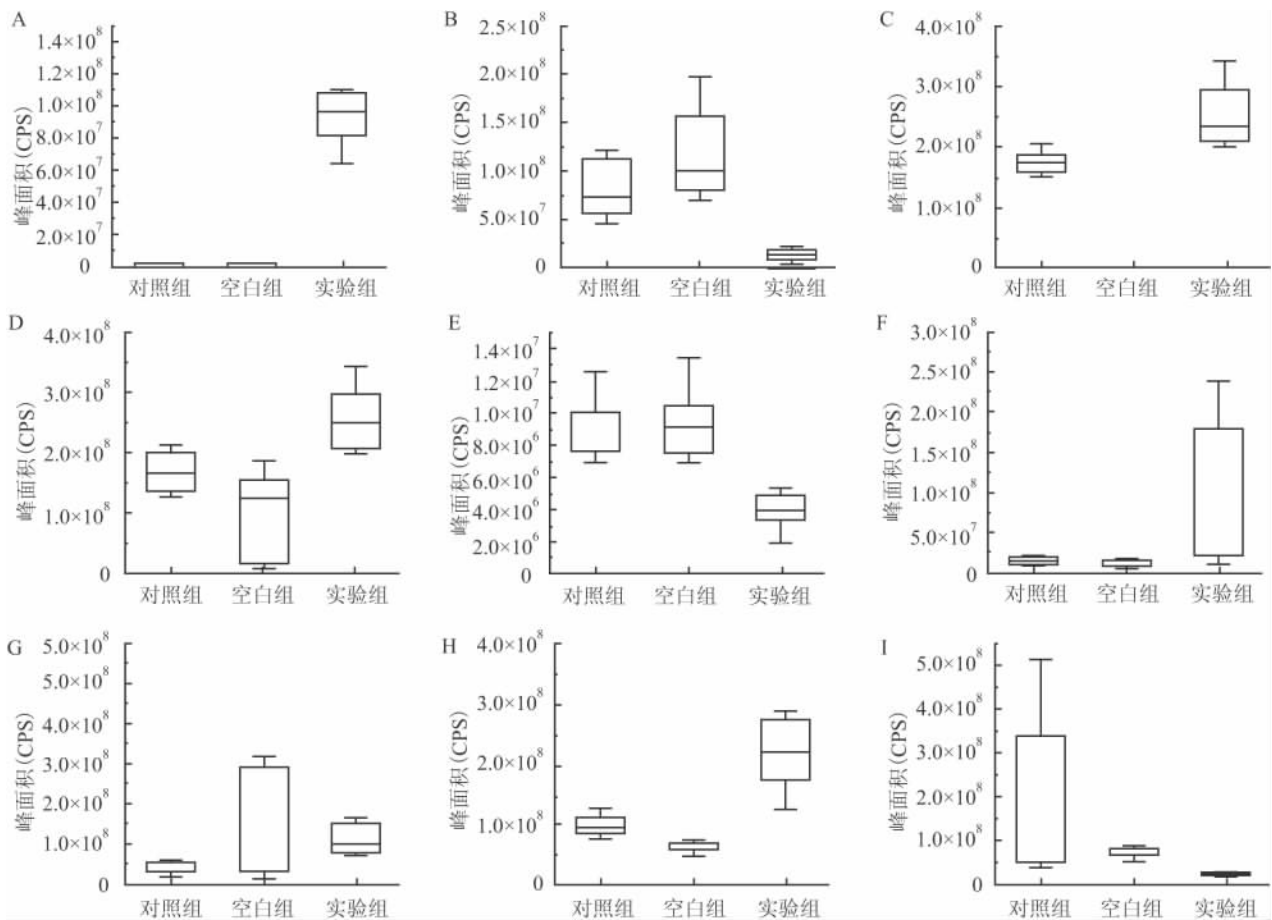


图3 VOCs 的峰面积分布

A: 二甲基硫; B: 乙醇; C: 2,4-二甲基庚烷; D: 甲苯; E: 正己醛; F: 邻二甲苯; G: 十二烷; H: 1,3-二叔丁基苯; I: 苯甲醛

表2 顶空气中特征性 VOCs 峰面积的比较

项目	峰面积中位数(cps)		Z 值	P 值
	实验组	对照组		
二甲基硫	96 298 555.48	0	-3.59	0.000
乙醇	10 724 706.77	71 508 760.95	3.34	0.001
2,4-二甲基庚烷	233 890 000.00	174 390 000.00	-2.54	0.010
甲苯	248 700 000.00	165 190 000.00	-2.42	0.015
正己醛	4 245 769.57	8 773 033.22	3.41	0.001
邻二甲苯	22 064 318.78	15 036 470.14	-2.25	0.040
十二烷	192 090 000.00	79 810 186.79	-2.87	0.003
1,3-二叔丁基苯	219 620 000.00	163 140 000.00	-2.32	0.020
苯甲醛	25 046 590.10	51 184 998.83	2.73	0.005

表3 顶空气中特征性 VOCs 峰面积的比较

化合物	峰面积中位数(cps)		Z 值	P 值
	实验组	空白对照组		
二甲基硫	96 298 555.48	0	-3.59	0.000
乙醇	10 724 706.77	105 000 000.00	3.36	0.001
2,4-二甲基庚烷	233 890 000.00	0	-3.62	0.000
甲苯	248 700 000.00	129 900 000.00	-2.84	0.003
正己醛	4 245 769.57	9 225 785.45	2.69	0.006
邻二甲苯	22 064 318.78	10 594 242.65	-2.78	0.004
十二烷	192 090 000.00	32 687 456.26	-2.87	0.003
1,3-二叔丁基苯	219 620 000.00	124 230 000.00	-2.78	0.004
苯甲醛	25 046 590.10	136 110 000.00	2.52	0.010

### 3 讨论

VOCs 是指沸点在 50 ~ 260 °C, 室温下以蒸汽形式存在于空气中的有机物, 主要为烷类、烯类、酮类、芳香烃类等。呼气检测的应用已有 30 余年<sup>[2]</sup>, 从人体呼气中发现 200 多种 VOCs, 有些 VOCs 与患者的病理状态相关。近年来, 很多学者<sup>[3-5]</sup> 尝试将其用于肿瘤的诊断, 发现患不同疾病的人们所呼出的 VOCs 不尽相同, 尤其在肺癌方面的研究较多; 但血液系统恶性疾病的呼气分析目前尚有文献报道。

人体呼气的 VOCs 来自于外源性和内源性的 VOCs, 外源性 VOCs 是指自然界气体通过呼吸进入人体或经皮肤吸收而经肺泡排除体外; 内源性 VOCs, 诸多研究认为, 经体内氧化应激产生<sup>[6]</sup>, VOCs 性质比较稳定, 在血液中溶解度小, 并且与机体病变相关, 故成为呼气分析中研究最多的化合物。由于 VOCs 在呼气中的浓度极低, 需应用特殊的样本前处理技术及敏感度极高的仪器进行检测, 目前比较常用的仪器有 SPME-GC/MS 仪、PTR-MS 仪及电子鼻传感器等。因恶性淋巴瘤是具有相当异质性肿瘤, 一般确诊, 需行淋巴结活检、骨髓穿刺等相关检查, 其为创伤性操作、花费大, 给患者带来很大的负担; 因好发于淋巴结及淋巴细胞的分布特点, 其几

乎可以侵犯到全身任何器官和组织, 并且肿瘤细胞的高代谢会使内源性 VOCs 出现改变; 而呼气分析是能对人体疾病所产生的微量 VOCs 进行预富集和定性; 同时因其无创、便捷、快速等优点, 迅速成为肿瘤疾病研究一大热点。

在前期研究基础上, 本实验引入了 SPME-GC/MS 设备检测实验组、对照组、空白对照组, 发现二甲基硫、2,4-二甲基庚烷、甲苯、邻二甲苯、1,3-二叔丁基苯、十二烷 6 种 VOCs 在实验组中的峰面积明显高于对照组; 乙醇、苯甲醛、正己醛的峰面积下降。应用 SPME-GC/MS 检测, 发现非小细胞肺癌患者戊烷、甲苯及乙苯的浓度上升; 并在肺癌组织 VOCs 分析中发现, 除了二甲苯以外, 癌组织释放的其他芳香烃浓度皆高于正常组织<sup>[7]</sup>。而在本研究中淋巴瘤细胞中 VOCs 芳香烃化合物、烷烃类也显著升高; 提示癌症细胞中氧自由基活性增强, 脂质过氧化反应导致细胞膜损伤, 不饱和脂肪酸降解增加, 故 VOCs 较正常细胞增多; 而在人体内细胞膜的损伤又提高了肺泡通透性, 所以它们通过呼吸产生。Sponring et al<sup>[8]</sup> 通过培养肺癌细胞与正常细胞, 运用 SPME-GC/MS 检测发现不同醛类物质含量的下降, 与本实验结果类似。醛脱氢酶是人体关键催化酶, 是将细胞内醛类化合物氧化为相应羧酸类物质, 羧酸类物质参与细胞内脂质合成反应, 这对细胞生物膜的生成及细胞复制十分重要。在癌症细胞中, 因细胞的高代谢, 醛脱氢酶活性增强。据此推测, 实验组与其他肺癌细胞株培养瓶上层气体中 VOCs 含量减少, 可能与癌症细胞内醛脱氢酶活性增高有关。但是不同细胞株中含量减少的醛类物质稍不同, 考虑是与不同的醛脱氢酶同工酶活性增高有关, 最终机制还需更多的研究。但可以肯定醛类物质在肿瘤细胞株产生的 VOCs 的减少有普遍性。

研究<sup>[9-11]</sup> 表明, 存在在肿瘤患者体内的细胞色素 450 混合酶系, 其基因的改变引起氧化应激所降解包括烷烃、单甲基烷烃的代谢物的增加, 最终导致 VOCs 组分的改变, 可能是恶性淋巴瘤 VOCs 的产生机制之一。Wang et al<sup>[12-13]</sup> 对肺癌患者呼气、肺癌细胞和肺癌组织进行检测, 发现后两者有许多相似化合物, 如十九烷、二十烷; 而肺癌患者产生的 VOCs 则相对不同, 这也提示体内的 VOCs 产生机制比体外复杂的多, 但是仍存在联系。目前本课题组仅在体外细胞水平上对血液系统疾病产生的 VOCs 进行分析, 并且初步发现与对照组差异有统计学意义的 VOCs, 提示也可能作为恶性淋巴瘤细胞的特异性标

志物之一。但 VOCs 不是由单一因素所产生,整个机体的新陈代谢可能受肿瘤细胞的影响,这都有待进一步研究。

本实验样本量较小,易出现误差;需多样本的研究对现有数据进行验证,更深层探讨内源性 VOCs 产生和与不同疾病相关的机制。VOCs 作为早期筛查诊断操作,有应用前景;而本实验对于恶性淋巴瘤患者呼气,也提供了实验依据,但应用于临床,仍需更多学者、基础、检验与临床等多学科联合研究。

### 参考文献

- [1] 汪祥辉,毛伟敏,李辉章,等. 2000~2009年浙江省肿瘤登记地区淋巴瘤发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(3):122-7.
- [2] Buszewski B, Ulanowska A, Kowalkowski T, et al. Investigation of lung cancer biomarkers by hyphenated separation techniques and chemometrics[J]. Clin Chem Lab Med 2011, 50(3):573-81.
- [3] Peng G, Hakim M, Broza Y Y, et al. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors[J]. Br J Cancer, 2010, 103(4):542-51.
- [4] Wong R P, Flematti G R, Davis T M. Investigation of volatile organic biomarkers derived from Plasmodium falciparum *in vitro* [J]. Malar J 2012, 11:314.
- [5] 丁 霞,刘 虎. 胃癌患者呼气中挥发性标志物的筛选分析[J]. 安徽医科大学学报 2012, 45(1):465-7.
- [6] Phillips M, Cataneo R N, Cummin A R, et al. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath [J]. Chest, 2003, 123(6):2115-23.
- [7] Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, et al. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors [J]. Biosens Bioelectron, 2003, 18(10):1209-18.
- [8] Sponring A, Filipiak W, Mikoviny T, et al. Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 *in vitro* [J]. Anticancer Res 2009, 29(1):419-26.
- [9] Shah P P, Singh A P, Singh M, et al. Association of functionally important polymorphisms in cytochrome P4501B1 with lung cancer [J]. Mutat Res 2008, 643(1-2):4-10.
- [10] Hassanein M, Callison J C, Callaway-Lane C, et al. The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer [J]. Cancer Prev Res (Phila) 2012, 5(8):992-1006.
- [11] Wang C, Ke C, Wang X, et al. Noninvasive detection of colorectal cancer by analysis of exhaled breath [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(19):4757-63.
- [12] Wang Y, Hu Y, Wang D, et al. The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines [J]. Cancer Biomark 2012, 11(4):129-37.
- [13] 胡燕婕,邱园华,陈恩国,等. 有机性挥发物在肺癌组织和癌细胞株中的检测和分析 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2010, 39(3):278-84.

## Analysis of VOCs in the headspace of JEOK non-Hodgkin lymphoma cells

Chu LiJing, Xia Hailong

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To find lymphoma cell markers characteristic of gas for breath monitoring application and provide experimental evidence for the early diagnosis of lymphoma patients, assessing solid phase micro extraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) is applied to the lymphatic the feasibility of detecting tumor cells in the headspace. To investigate the value of VOCs in the diagnosis of hematologic malignancies. **Methods** The air samples from the headspace of non-Hodgkin lymphoma cell JEOK, the human lymphoid cell lines and culture medium were collected by syringes and then determined by means of SPME-GC/MS in order to have a better understanding of the concentration distributions and changes of VOCs in JEOK cells headspace. Using Mann-Whitney U test, we found the characteristic volatile markers of non-Hodgkin's lymphoma cells. **Results** SPME-GC/MS for JEOK cell lines, human lymphocyte cell line and a blank incubation were detected headspace analysis, found JEOK cell culture headspace can be detected dimethyl sulfide, toluene, o-xylene, 1,3-Di-tert-butylbenzene, acetophenone, dodecane, representing human lymphocytes increased; and alcohol, benzaldehyde, hexanal is significantly reduced. **Conclusion** Non-Hodgkin's lymphoma cell lines can cause flasks JEOK headspace change in the composition of VOCs, increased alkanes and aromatic compounds, aldehydes and reducing alcohol content, these substances may be used as a characteristic of lymphoma cells markers; SPME-GC/MS as a trace substance detection method can be used to JEOK cell lines VOCs bottle headspace detection training.

**Key words** non Hodgkin lymphoma cells JEOK; tumors; VOCs; SPME-GC/MS