

纳米传感器对卵巢癌患者呼气的分析研究

张伟^{1*}, 石大友^{1*}, 陶丽², 花庆岭¹, 杜瀛瀛¹, 张静³, 庄亚丽³, 刘虎¹

摘要 目的 探讨利用纳米传感器(亦称纳米鼻)气体识别技术筛查卵巢癌(OC)的可行性。方法 收集48例OC患者和48例健康对照者的呼气标本,利用纳米传感器对以上两组受试者呼气标本进行气体指纹图谱的分析,通过判别因子分析(DFA)模式进行鉴别区分。结果 OC患者和健康对照者之间达到良好的区分(89%的准确度);早期OC患者与健康对照者之间达到75%的准确度。结论 纳米传感器呼

气分析技术作为一种非侵入性的筛查方法,对于OC的早期诊断具有潜在的应用价值。

关键词 卵巢癌;气体指纹图谱;纳米传感器

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0669-04

2014-02-25 接收

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 肿瘤内科,² 妇产科,合肥 230022

³安徽医科大学妇幼保健临床学院(合肥市妇幼保健医院)产科,合肥 230061

作者简介:张伟,男,硕士研究生;

刘虎,男,博士,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:drliuhu@gmail.com

* 对本文具有同等贡献

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,因其发病隐匿以及缺乏有效的筛查工具,其病死率居妇科恶性肿瘤之首^[1]。目前常规的OC肿瘤指标CA12-5以及超声、CT等辅助检查往往因为缺乏特异性、价格昂贵等不适合肿瘤的早期筛查。人体呼出的气体中含有200多种挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)。呼气分析通过分析人体呼气成分及含量的改变,从而反映出人体内病理生理的改变^[2],具有安全、快捷和无创等优点,已被应用于疾病的辅助诊断。本课

Significance of TPMT gene polymorphism for individualizing 6-MP chemotherapy in adults with acute lymphoblastic leukemia

Ge Jian, Xia Ruixiang, Yang Mingzhen, et al

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

Abstract Objective To observe thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genotype and phenotype in adult patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) who had been given maintenance treatment with 6-mercaptopurine (6-MP) and to assess their clinical management for individualizing 6-MP chemotherapy. **Methods** Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique was used to determine the TPMT genotype. TPMT activity was quantitated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) assay. Clinical and hematological toxicities were detected during the first 6 months of maintenance therapy with oral 6-MP and methotrexate (MTX) in the 69 adults with ALL. **Results** The heterozygous TPMT* 1/* 3C genotype with low activity was found in 4 of the 69 adults with ALL; TPMT* 2, TPMT* 3A and TPMT* 3B were not. We found a higher TPMT activity during maintenance treatment with 6-MP than at diagnosis. The median 6-mercaptopurine dose administered during the maintenance therapy was lower among patients with heterozygous TPMT alleles versus the rest [2.17 mg/(m²·d) and 69.36 mg/(m²·d), *P* < 0.01], though the clinical toxicities were similar in both groups. **Conclusion** TPMT gene polymorphism has a substantial impact on mercaptopurine toxicity. Identification of TPMT genotype and activity appears to be important in making the ALL treatment less toxic and individualizing 6-MP chemotherapy.

Key words thiopurine methyltransferase; acute lymphocytic leukemia; 6-mercaptopurine; genetic polymorphism; maintenance treatment

题组前期利用气相色谱 - 质谱 (gas chromatography mass spectrometry ,GC-MS) 技术在肺癌、肝癌、乳腺癌、胃癌和 OC 早期筛查方面均显示出良好的应用价值^[3]。该研究拟采用纳米传感器技术对 OC 患者及健康对照者的呼气标本进行分析。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2012 年 3 月 ~ 8 月安徽医科大学第一附属医院、合肥市妇幼保健医院 OC 患者呼气样本 48 例 ,年龄 30 ~ 70 (51.38 ± 11.32) 岁 ,其中上皮来源 OC 40 例 ,恶性生殖细胞来源 OC 2 例以及交界性来源 OC 6 例 ;早期 OC 患者 25 例 [(50.54 ± 11.29) 岁] 晚期 OC 患者 22 例 [(53.18 ± 11.80) 岁] ,1 例分期不明。OC 患者均为初诊初治 ,并随术后病理证实 ,无肺部疾病以及肿瘤病史 ,无糖尿病、高血压、自身免疫性疾病 (如类风湿性关节炎以及系统性红斑狼疮) 。另选同期健康女性呼气样本 48 例 (对照组) ,年龄 36 ~ 69 (49.59 ± 9.02) 岁。对照组为患者家属和医院职工 ,均经体检证实身体健康 ,均排除烟酒不良嗜好和妊娠可能。

1.2 主要仪器 3L-Tedlar[®] 采样袋购自大连德霖气体包装有限公司 ;99.999% 氮气购自合肥众仪有限公司 ;标准空气玻璃转子流量计购自常州双环热工仪表有限公司 ;包含 9 个传感器 (6 个金纳米传感器和 3 个碳纳米管传感器) 的纳米传感器为以色列理工学院研制 ;ORBO[™] 420 Tenax[®] TA 吸附管以及 tube cutter 购自美国 Sigma 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 气体采集 3L-Tedlar[®] 采样袋使用前用 99.999% 的氮气清洗 3 次 ,以除去袋中的残留吸附物。嘱受试者夜间禁食 ,晨起在通风良好环境下深吸后向采样袋中呼气 ,直至袋子吹满为止 ,同时采集患者周围的空气作为对照。

1.3.2 气体的吸附 利用 tube cutter 将 Tenax[®] TA 吸附管两端打开 ,再利用铁氟龙套管将吸附管两端分别与采样袋及标准空气玻璃转子流量计连接 ,将采样袋中的气体标本按照 200 ml/min 的流速浓缩到吸附管中 ,盖好两端密封盖。

1.3.3 气体分析 进行标本分析前 ,将纳米传感器的进样口真空处理 5 min ,再进行 5 min 的气体分析 ,再次进行真空处理 ,重复 3 ~ 5 次 ,以测试仪器的重复性。分析过程通过数据记录装置 (2701 型数字多用表) 记录整个过程中传感器电阻的变化。记录

的范围至少持续 2 个循环。整个系统操作过程由自定义的 LabVIEW 电脑程序控制。

1.4 统计学处理 本研究采用判别因子分析 (discriminant factor analysis ,DFA) 作为统计模式识别算法。DFA 的输出变量 (即典型变量) 通过在相互正交的维度得到第一典型变量 (the first canonical variable ,CV1) ,通过 CV1 值的统计处理从而有效地降低了多维的实验数据 ,最终将各组间的样本区分开来。本研究取各组 70% 的样本作为训练集建立 DFA 诊断模型 ,30% 样本作为随机盲法测试集 ,验证 DFA 诊断模型。通过刀切法 (亦称留一法) 交叉验证真阳性 (true positive ,TP) 、真阴性 (true negative ,TN) 、假阳性 (false positive ,FP) 和假阴性 (false negative ,FN) 的预测数来评价分类是否成功。由于早期 OC 患者例数较少 ,因此对于早期 OC 与健康对照者之间 DFA 模型的验证采用 K 折交叉验证法。本研究使用 MATLAB[®] (The MathWorks 公司) 软件进行模式识别和数据分类。

2 结果

2.1 OC 与健康对照者间的鉴别 通过对 48 例 OC 患者与 48 例健康对照者的标本进行分析 ,取其中 68 份 OC 和健康对照者的呼气标本 (各组 70% 的样本) 建立 DFA 模型 ,结果表明其准确度达到 90% ,敏感性、特异性分别为 88% 、91% ,再对余下 28 例呼气标本 (各组 30% 的样本) 作为验证集 ,通过留一法交叉验证 ,结果显示对 OC 诊断的准确度达 89% ,敏感性和特异性分别为 79% 、100% 。见图 1、2 和表 1。

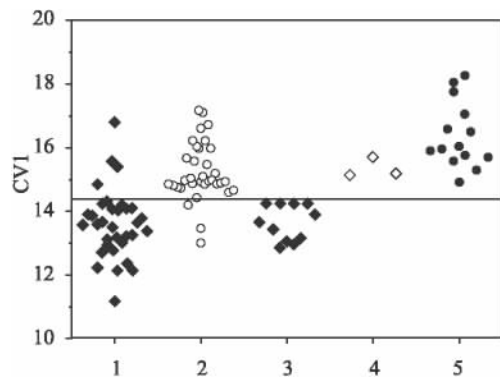


图 1 DFA 模型用于卵巢癌和健康对照训练集样本和盲法验证集样本的分类

1: OC 患者 ;2: 健康对照者 ;3: TP ;4: FN ;5: TN ;横线上方区域代表健康者样本数集合 ;下方区域为 OC 患者样本数集合

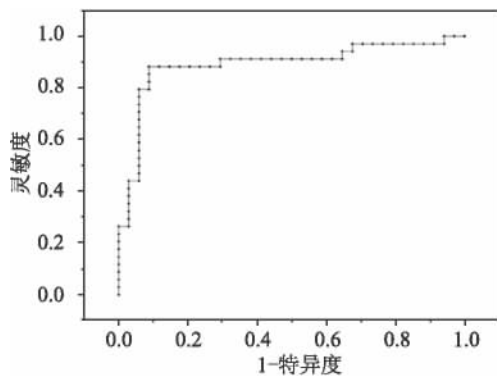


图2 训练集样本的受试者工作特征曲线
(receiver operator characteristic, ROC)
用于区分 OC 患者和健康对照者

2.2 早期 OC 与健康对照者间的鉴别 对于 25 例早期 OC 和 48 例健康对照者间的鉴别中,通过采用 DFA 模型分析,鉴别的准确度达到 82%,敏感性、特异性均为 82%,由于早期 OC 例数较少,因此通过 K 折交叉进行验证,验证后结果显示,其准确性、灵敏度和特异性分别为 75%、76% 和 75%。见图 3、4 和表 1。

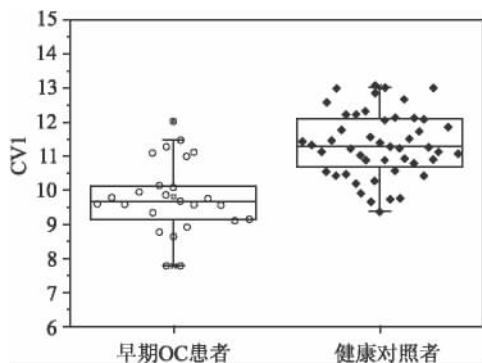


图3 DFA 模型用于区分早期 OC 患者和健康对照者

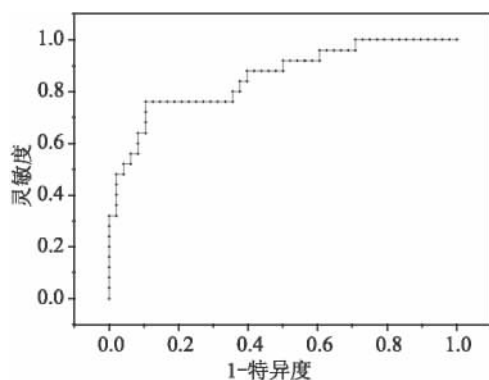


图4 ROC 用于区分早期 OC 患者和健康对照者

3 讨论

OC 的 5 年生存率与分期密切相关, I 期 OC 5 年

表 1 基于纳米传感器鉴别的 DFA 模型分类统计结果 (%)

统计结果	统计学参数	OC vs 健康对照	早期 OC vs 健康对照
训练集结果	准确度	90	82
	灵敏度	88	82
	特异度	91	82
验证集结果	准确度	89	75
	灵敏度	79	76
	特异度	100	75

生存率约 85%, 而 IV 期仅为 4%。故早期诊断是减少 OC 病死率和预后的关键所在。然而对于早期 OC, 往往无特异性症状, 常规的 OC 肿瘤指标 CA12-5 特异性差, 部分良性肿瘤及子宫内膜异位症等疾病均可出现阳性^[4], 超声、CT 等辅助检查往往因为缺乏特异性、价格昂贵等, 不适合早期筛查。随着分子代谢组学的研究进展, 新兴的代谢组学开辟了肿瘤早期诊断、疗效评价及预后判断的新思路。代谢组学是一种将图像识别方法和生物信息学结合起来的分析技术, 用于检测体液或组织中的代谢产物并分析其变化规律。肿瘤的发生、发展伴随着机体代谢产物的变化, 代谢组学能对肿瘤引起的机体代谢变化做出整体评价, 筛选出有价值的生物标志物, 用于肿瘤的早期诊断^[5]。

目前认为癌变过程常伴随有氧化应激的增强, 产生过多的氧自由基, 其作用于细胞膜上的饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸导致 VOCs 的产生。呼气分析作为一种简便、快捷、无创的检测方法, 通过对肿瘤异常代谢所产生的 VOCs 的含量和成分进行分析, 从而达到对肿瘤的早期鉴别和诊断^[6]。然而由于呼气中的 VOCs 浓度较低且成分复杂, 因此对呼气检测的仪器要求很高。本课题组前期利用固相微萃取联合 GC-MS 技术, 在肺癌、肝癌、乳腺癌、胃癌以及 OC 中均筛查出特异性肿瘤标志物^[3]。本研究采用纳米传感器对 OC 患者及健康对照者呼气进行分析, 相对于 GC-MS, 纳米传感器具有以下优势: 不需要对样本进行除湿以及预富集处理; 分析快速; 检测的灵敏度高; 分析数据前不必对数据进行选择就可以将各测试组区分开; 并且不受性别、年龄及吸烟等因素影响^[7]。其核心部分是金纳米颗粒的碳基感应器, 当气体通过纳米颗粒传感器时, 呼气中的颗粒就会积聚在碳层中, 感应器膨胀推动金纳米颗粒相互接近, 引起传感器电阻变化。而每种颗粒均具有独特的阻抗效应, 每一个金纳米颗粒都可以反映一系列的 VOCs, 所有传感器的电阻变化均被同时记录下来,

每种 VOCs 对应一个金纳米颗粒的电阻变化,最低检测范围为 1~5 ppb,通过主成分分析对金纳米颗粒记录的电阻变化进行筛查,从而筛选出最能概括出检测标本最具特征的因素作为主成分,建立诊断模型,从而与其他研究对象鉴别区分开来。国内外有研究^[8-10]报道利用纳米传感器技术对不同肿瘤之间的鉴别、胃良恶性溃疡的鉴别诊断以及不同转移潜能的肝癌细胞株的鉴别均取得了重要的结果。

本课题组前期利用 GC-MS 技术对 OC 患者进行呼气分析,最终筛查出苯乙烯和壬醛两种特异性标志物^[3],其两种物质的浓度在 OC 患者和健康对照组间差异有统计学意义,表明 OC 患者同健康对照组相比,其机体异常代谢后的呼气中存在有特异性的挥发性标志物,即两者呼出气体的主成分存在差异。因此,在前期的研究基础上,本研究采用纳米传感器技术,通过对受试者呼出气体的主成分进行分析,结果表明可以将 OC 患者与健康对照组区分开来,通过交叉验证后,其诊断的准确度达到 89%,特异性达到 100%。另外本研究还进一步对早期 OC 患者与健康志愿者的呼气进行分析,显示纳米传感器同样能够将二者很好的区分鉴别出来。本研究结果的意义在于:利用纳米传感器技术能够将早期 OC 患者从健康对照组中筛查出来,通过早期诊断,能够提高 OC 患者的生存率,降低其死亡率。因此对于有 BRCA1 和 BRCA2 基因突变、肥胖及肿瘤家族史的高危人群进行筛查,可能从中受益。然而,需要指出的是,本研究仅仅是小样本的探索性研究,对于 OC 患者尤其是早期患者的呼气分析,仍然需要

大样本、多中心的实验研究进行验证。

(致谢:感谢以色列理工学院 Hossam Haick 教授和 Haitham Amal 博士的技术支持与帮助。)

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] Schnmutzhard J, Rieder J, Deibl M, et al. Pilot study: Volatile organic compounds as a diagnostic marker for head and neck tumors [J]. *Head Neck*, 2008, 30(6):743-9.
- [3] 石大友,刘虎,陶丽,等. 卵巢癌患者呼气中挥发性标志物的筛查[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(5):499-501.
- [4] 万德森. 临床肿瘤学[M]. 北京:科学出版社, 2010:466.
- [5] 熊杰,赵维莅. 代谢组学:肿瘤研究的新思路[J]. *诊断学理论与实践*, 2012, 11(6):633-6.
- [6] Miekisch W, Schubert J K, Noeldge-Schomburg G F. Diagnostic potential of breath analysis-focus on volatile organic compounds [J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 347(1-2):25-39.
- [7] Peng G, Tisch U, Adams O, et al. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles [J]. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4(10):669-73.
- [8] Peng G, Hakim M, Haick H, 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.
- [9] Xu Z Q, Broza Y Y, Jonsecu R, et al. A nanomaterial-based breath test for distinguishing gastric cancer from benign gastric conditions [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(4):941-50.
- [10] Amal H, Ding L, Liu B B, et al. The scent fingerprint of hepatocarcinoma: *in-vitro* metastasis prediction with volatile organic compounds [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7:4135-46.

Analysis of ovarian cancer patients breath with nano-sensor technology

Zhang Wei¹, Shi Dayou¹, Tao Li², et al

(¹Dept of Oncology, ²Dept of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the feasibility of odor prints for discriminating the ovarian cancer patients with nanomaterial-based sensors. **Methods** Alveolar exhaled breath samples were collected from 96 volunteers, a nose were used to discriminate the odor prints from 48 patients with ovarian cancer (OC) and 48 healthy controls by loading discriminant factor analysis (DFA) pattern recognition. **Results** The blind DFA models showed: An excellent discrimination between the ovarian cancer patients and the healthy controls (89% accuracy); early stage versus healthy controls showed 75% accuracy. **Conclusion** The primary results can lead for a new non-invasive promising screening method for diagnoses early of OC of early stages and thus lowering the mortality of OC.

Key words ovarian cancer; odor prints; nano-sensor