

L-半胱氨酸和溶血卵磷脂(16:0)作为 卵巢癌标志物的诊断价值

周 璐 吕杰强 吴 乐

摘要 目的 为克服卵巢癌(ovarian cancer, OVC)早期检测缺陷,考察 L-半胱氨酸和溶血卵磷脂(16:0)在检测 OVC 中的应用。方法 选取温州医科大学附属第一医院 2012 年 1 月~2014 年 1 月 OVC 患者(OVC 组)142 例和健康体检患者(对照组)100 例,提取患者标本,采用 MALDI-TOF-MS 检测质谱峰,主成分分析法分析获得具有较大权重的峰 m/z ,分析鉴定,考察筛选代谢物在两组之间的表达差异,与 OVC 病理分级的相关性。结果 184.05 和 496.30 m/z 在两组患者中差异最为明显,经鉴定为 LPC(16:0)与 HCA;OVC 组 HCA 检出率和平均水平显著高于对照组($P < 0.01$);对照组 183.96 m/z 和 478.33 m/z 峰面积均高于 OVC 组($P < 0.01$);HCA 与病理分离呈正相关($P < 0.05$);183.96 m/z 和 478.33 m/z 峰面积与病理分离呈负相关($P < 0.05$)。结论 L-半胱氨酸和溶血卵磷脂(16:0)在 OVC 发病中的机制尚不清楚,但其可作为 OVC 检测的血清学标志物。

关键词 L-半胱氨酸 溶血卵磷脂(16:0) 卵巢癌 诊断

中图分类号 R737

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.031

Diagnostic Value of L-homocysteic Acid and Lysophosphatidylcholine as Markers of Ovarian Cancer. Zhou Lu, Lü Jieqiang, Wu Le. The Second Clinical Medical College of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To study whether L-cysteine and lysolecithin (16:0) could be as a serum markers in the detection of OVC for overcoming the OVC defects of early detection. **Methods** Totally 142 cases of healthy check-up patients (control group) 100 cases from First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University in January 2012 to January 2014 were extracted patient specimens. These patient specimens were used to detect by MALDI-TOF-MS mass spectrometer and obtain the peak m/z by the method of principal component analysis for screening expression difference between the two groups in the metabolites and the correlation between metabolites and pathological grade. **Results** The most difference substance between two groups were 184.05 and 496.30 m/z which identified as LPC (16:0) and HCA; On HCA average level and detection rate, OVC group was significantly higher than control ($P < 0.01$); On 184.05 and 496.30 m/z peak area, control group was significantly higher than OVC group ($P < 0.01$); HCA positively was correlated with pathologic grade ($P < 0.05$); 184.05 and 496.30 m/z peak area were negative correlation with pathologic grade ($P < 0.05$). **Conclusion** L-cysteine and lysolecithin (16:0) mechanism in the pathogenesis of OVC is unclear, but it can be used for the detection of serum OVC markers.

Key words L-cysteine; Lysolecithin (16:0); Ovarian cancer; Diagnosis

卵巢癌(ovarian cancer, OVC)是最常见的妇科肿瘤之一,每年新增患者约 20 万例,70% 的卵巢癌患者发现时已处于晚期,导致 OVC 患者 5 年生存率只有 44%^[1]。虽然近年来抗癌治疗技术得到长足发展,但由于无法在 OVC 早期进行准确检测,近 20 年来的 OVC 病死率并没有得到显著改善^[2]。目前的 OVC 诊断手段包括盆腔检查、超声检查、血液检测和组织切片等,然而,这些方法均有其不足之处,无法在早期

检测 OVC^[3]。建立 OVC 早期检测方法对于增加 OVC 患者的生存率具有重要意义。本研究通过甲醇、氯仿提取 OVC 患者的血清低分子代谢物,采用基质辅助激光解析串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)比较正常和 OVC 患者的质谱差异,鉴定出两个物质溶血卵磷脂(lysophosphatidylcholine, LPC)和 L-同型半胱氨酸(L-homocysteic acid, HCA),并探讨了两者在 OVC 检测中应用的可能性。

资料与方法

1. 研究对象:选取温州医科大学附属第一医院 2012 年 1 月~2014 年 1 月收治 OVC 患者 142 例。所有病例均经手术探查切除肿瘤,术后经组织病理学检查确诊,另取健康体检患者 100 例。OVC 组患者年龄 36~68 岁,平均年龄 53.2 ± 13.3 岁。

作者单位:325000 温州医科大学第二临床医学院(周璐、吕杰强);温州医科大学附属第一医院妇产科(吴乐)

通讯作者:吕杰强,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱: jieqianglu@126.com

岁,对照组患者年龄 36 ~ 69 岁,平均年龄 51.4 ± 15.3 岁。OVC 组手术病理分期按 2000 年国际妇产科联盟 (FIGO) 标准^[4]: I 期 25 例, II 期 27 例, III 期 78 例, IV 期 12 例;低分化 24 例,中分化 35 例,高分化 83 例;卵巢浆液性囊腺瘤 90 例,卵巢黏液性囊腺瘤 23 例,子宫内膜样腺癌 8 例,透明细胞肉腺癌 11 例,移行细胞癌 7 例,混合类型 3 例。

2. 材料和仪器: 5415D 离心机 (德国 Eppendorf 公司); Bruker Reflex III 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 (德国 Bruker 公司); 电热恒温水浴箱 (上海跃进医疗器械厂); 超低温冰箱 (海尔公司); CASTEAX2100 酶标仪 (美国 Beckman 公司); Nanoflow - HPLC (美国 Thermo Scientific 公司), LTQ - 质谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); 乙腈 (上海化学试剂公司); 甲醇 (上海化学试剂公司); 氯仿 (上海化学试剂公司); α - 氰基 - 4 - 2 羟基肉桂酸 (Fisher 公司)。

3. 方法: 所有患者均于清晨空腹静脉取血 5ml, 放置于 4℃ 冰箱 1h 后, 4000r/min 离心 10min 获得血清, 分装后置于 -80℃ 冰箱保存待测。(1) MALDI - TOF 检测^[5]: 25 μ l 血清加入 100 μ l 甲醇/氯仿 (2:1) 在室温下共孵育 10min。4℃ 6000 \times g 离心 10min, 收集上清液挥干, 重溶于 30 μ l 50% 乙腈 (含 1% TFA), 涡旋 30min。将提取物按 1:12 和 α - 氰基 - 4 - 2 羟基肉桂酸溶液 (含有 0.1% TFA 和 50% 乙腈) 混匀。取 1 μ l 样品进行 MALDI 检测。每个样品重复检测 6 次, 数据采用 MarkerView™ 1.2 软件分析。(2) HCA 和 LPC (16:0) 的检测: HCA 检测采用 Elisa 检测试剂盒 (武汉 Cusabio Biotech 公司); 血清 LPC (16:0) 采用 HPLC - MS 检测, Nanoflow - HPLC (美国 Thermo Scientific 公司), LTQ - 质谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司), RSLC, C18, 2 μ m, 100 Å 分析柱, 双缓冲液体系, 0.1% 甲酸 (buffer A) 和 0.1% 甲酸的乙腈 (buffer

B), 样品分离采用 3% ~ 50% buffer B 线性洗脱, 流速 300 nl/min, 梯度时间 90min, 总运行时间为 120min^[6]。

4. 统计学方法: 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 计量资料比较采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行 t 检验, 双变量相关分析采用 Spearman (秩和检验) 相关分析, 相关系数用 r 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. OVC 患者血清甲醇/氯仿提取物 LMI 差异: 采用主成分分析法 (PCA - DA) 处理数据, 判断两组患者的质谱图差异。每组数据重复 4 次, 如图 1 所示, 对照组和 OVC 组质谱图之间存在差异性。不同峰 m/z 权重因子采用 PCA - DA 计算, 其中 5 个峰 m/z 表现出更高的权重 (86.08、104.10、172.09、184.05、496.28、524.31), 184.05 和 496.30 m/z 在两组患者中差异最为明显。通过查阅人类代谢组数据库 (Human Metabolome Database, HMDB), 184.05 \pm 0.05 m/z 可能的代谢物具有 10 个, 分别为 4 - pyridoxic acid、HCA、2,6 - diamino - 4 - hydroxy - 5 - N - ethylformamidopyrimidine、2 - amino - α - carboline、saccharin、methylnoradrenaline、levonordefrin、normetanephrine、ginkgotoxin、epinephrine。496.30 \pm 0.05 m/z 可能的代谢物只有 1 个, 即 LPC (16:0), 如图 2 所示。通过查阅文献, HCA 和 LPC (16:0) 最有可能与 OVC 相关, 故选择该 HCA 和 LPC (16:0) 指标进行进一步研究。

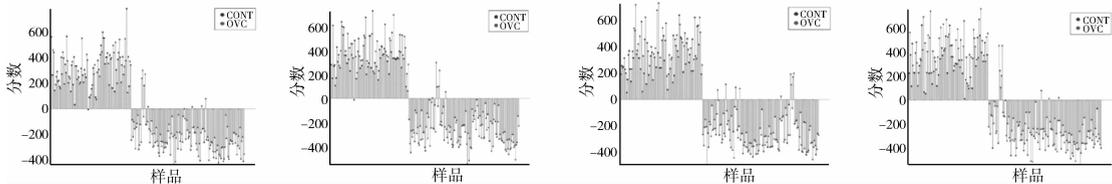


图 1 两组患者的 PCA - DA 分析

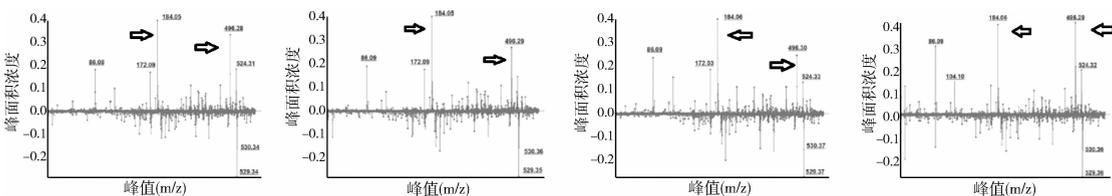


图 2 高权重峰 m/z 选择

CONT 为对照组, OVC 为 OVC 组

2. 两组患者 HCA 和 LPC (16:0) 表达水平比较: 100 例对照组患者中检测到 HCA 6 例, 142 例 OVC 组患者检测到 HCA 91 例, OVC 组检出率显著高于对照

组 ($\chi^2 = 82.43, P < 0.01$); 对照组 HCA 平均水平 0.16 ± 0.05 nmol/L, OVC 组 HCA 平均水平 0.61 ± 0.17 nM, OVC 组 HCA 显著高于对照组 ($t = 25.68,$

$P < 0.01$), 详见表 1。

表 1 两组患者 HCA 比较

组别	n	检出率[n(%)]	HCA(nmol/L)
对照组	100	6(6.0)	0.16 ± 0.05
OVC 组	142	91(64.1)*	0.61 ± 0.17*

与对照组比较, * $P < 0.05$

183.96m/z 和 478.33m/z 的大小峰面积可表示 LPC(16:0) 的浓度的大小。对照组 183.96m/z 和 478.33m/z 峰面积均高于 OVC 组, 两组比较差异具有统计学意义 ($t = 5.38, P < 0.01, t = 5.12, P < 0.01$), 详见表 2。

表 2 两组患者 LPC(16:0) 比较

组别	n	183.96m/z	478.33m/z
对照组	100	10234 ± 2312	7682 ± 2316
HCA 组	142	8435 ± 2722*	6422 ± 1511

与对照组比较, * $P < 0.05$

3. OVC 病理分级与 HCA 和 LPC(16:0) 相关性分析: HCA 与病理分离呈正相关 ($r = 0.645, P < 0.05$); 183.96m/z 和 478.33m/z 峰面积与病理分离呈负相关 ($r = -0.721, P < 0.05, r = -0.682, P < 0.05$)。结果见表 3。

表 3 OVC 病理分级与 HCA 和 LPC(16:0) 相关性分析

不同分级	n	HCA(nmol/L)	183.96m/z	478.33m/z
I 期	25	0.43 ± 0.17	9025 ± 2231	6031 ± 1820
II 期	27	0.52 ± 0.15	8419 ± 1982	6278 ± 2068
III 期	78	0.57 ± 0.19	8071 ± 2016	5976 ± 1829
IV 期	12	0.72 ± 0.25	7026 ± 1772	5038 ± 1725

讨 论

目前多种研究中通过血清标志物来准确检测 OVC, 这些标志物包括: 癌抗原(CA)125, 人附睾蛋白(epididymis protein-4, HE-4) 和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 等^[7,8]。CA125 和 HE-4 作为 OVC 标志物可通过放射免疫测定, 然而这些标志物缺乏准确性, 无法检测早期癌症, 例如 CA125 自 20 年前发现至今已被广泛使用, 但其对于早期 OVC 仍缺乏特异性和敏感度^[9]。目前尚无一个合适的 OVC 早期检测标志物, 目前采用的 CA125 和 HE4 只用于 OVC 晚期检测。

目前对于 OVC 血液中代谢化合物的研究尚不多

见, 血液中代谢化合物可反映机体的疾病状态。血清标志物不仅可以用于癌症研究, 亦可以用于生物鉴定。此外, 最近质谱技术(包括 MALDI-TOF 和气相色谱法-MS/MS) 在 LMIs 筛选中表现出足够的精密度和准确性^[10]。本研究的目的在于从血清提取物中筛选可用于检测 OVC 的 LMIs 成分。PCA-DA 结果显示 OVC 患者和正常人质谱图存在差异, 184.05 和 496.30m/z 在两组患者中差异最为明显。通过查阅人类代谢组数据库(human metabolome database, HM-DB), HCA 和 LPC(16:0) 最有可能与 OVC 相关。

在以往对 HCA 的研究中报道其可在软骨影响高半胱氨酸硫内酯氧化成硫酸化的葡糖氨基葡聚糖。在大鼠模型中发现高半胱氨酸硫内酯具有致癌作用, 异常的同型半胱氨酸代谢可能与致癌作用有关^[11]。虽然有研究报道淋巴瘤患者采用甲氨蝶呤治疗后, 在其脑脊液中发现 HCA 的大量表达, 但目前尚未见研究报道 HCA 在癌症中的异常表达^[12]。在本研究中, LMIs 筛选显示 OVA 患者的 HCA 表达水平不同于正常对照组, 在大多对照组中无法检测到 HCA 的表达, OVC 患者检出率高达 64.1%。HCA 表达水平的提高对人体产生的作用尚不明了, HCA 在其他癌症中的水平也未见报道。然而, 本研究结果证实 HCA 是一种潜在的 OVC 检测标志物。

癌症患者 LPC(16:0) 的水平依据癌症的不同而不同, 在乳腺癌中 LPC 表达水平下降, 而在肝细胞性肝癌中表达升高^[13]。在本研究中, LPC(16:0) 在 OVC 患者中表达下降。LPC 被认为是伤口愈合和炎症中的生物活性介质, 此外 OVC 在肺癌的发展中发挥一定作用。LPC 具有多种亚型, 而不同亚型具有不同的碳链长度。虽然不同的 LPC 亚型的作用尚不清楚, 在本研究中, LPC(16:0) 和 OVC 的病理程度呈负相关。

总之, 本研究发现 MALDI-TOF 是筛选癌症生物标志物的重要工具。尽管缺少对 OVC 患者血清 LPC(16:0) 和 HCA 病理学改变的合理解释, 本研究显示 HCA 和 LPC(16:0) 对于 OVA 的检测具有重要的意义。在未来随着更多的候选代谢物被分离鉴定, HCA 和 LPC(16:0) 可能用于 OVC 的多种生物学标志物的共同诊断。

参考文献

- 1 Toss A, De Matteis E, Rossi E, et al. Ovarian cancer: can proteomics give new insights for therapy and diagnosis[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(45): 8271-8290

(下转第 119 页)

颅骨缺损患者不仅表现患侧血流异常,也可导致健侧血流异常,虽然多数主要表现为血流减慢,但部分患者可表现为血流增快,而且发现颅骨缺损面积的大小对患者神经功能的影响与以往的研究有不同。邓景阳等^[3]提出:3个月以内早期颅骨修补可更好地改善患者的神经功能及生活质量。唐运涛等^[4]更认为去骨瓣术后6周修补最有利于神经功能的恢复。周厚杰等^[5]认为颅骨修补术有利于患者临床症状、局部血流动力学和脑灌注的改善。早期颅骨修补术还能使静脉回流加快,使脑脊液循环速度增加^[6],可改善体位变化时血流量的调节功能,提高脑血管储备容量及改善伤侧半球脑糖代谢^[7]。

本研究只探讨单纯颅骨修补手术对患者脑血流的影响,分析脑血流改变对神经功能的影响。通过分组分析不同缺损时间、不同缺损面积对患者神经功能、颅内血流动力学的影响,通过颅骨修补手术前后患者神经功能及血流动力学的变化,进行对照研究和统计学分析,发现颅骨修补术可使患者局部脑血流趋于正常,表现为血流减慢患者局部血流加快,血流加快者局部血流正常或趋于正常,局部脑灌注均有改善。说明颅骨修补术不仅改善患侧大脑半球的血流量,而且改善对侧大脑半球的血流量。同时发现颅骨缺损时间长短对患者术前脑血流有不同影响;缺损时间较短患者术前脑血流影响较小,颅骨修补术后在脑血流改善,神经功能恢复上更好,说明颅骨修补术后患者神经功能恢复情况与患者术前颅骨缺损时间长

短有一定相关性。也发现颅骨缺损面积的大小对患者神经功能的恢复无明显影响,这与以往的研究有差异,可能与选择分组面积的大小有关,需进一步扩大统计例数证明。通过本研究说明只要患者一般情况良好,应尽早行颅骨缺损修补,可以更好地改善患者局部血流、脑灌注和脑功能代谢,促进患者神经功能恢复,有利于患者早期康复,节约经费,但对患者远期脑血流及神经功能的影响仍需进一步开展研究。

参考文献

- 1 安桂华. TCD的临床应用价值[J]. 中国医药指南,2009,7(6):45-46
- 2 王忠诚. 神经外科学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1998:376-377
- 3 邓景阳,曹国彬,陆永建,等. 外伤性颅骨缺损早期修补对神经功能恢复的影响[J]. 广东医学,2006,27(5):732-733
- 4 唐运涛,刘伦波,陈宏刚,等. 提早修补巨大颅骨缺损的临床效果评估[J]. 中华神经医学杂志,2004,3(2):135-136
- 5 周厚杰,刘宏斌,郭强等. 颅骨缺损修补术患者脑经颅多普勒超声及单光子发射计算机体层摄影的分析[J]. 广东医学,2011,7:37-38
- 6 Dujiorny M, Fernandez P, Alperin N, et al. Post—cranioplasty cerebrospinal fluid hydrodynamic changes: magnetic resonance imaging quantitative analysis[J]. Neurol Res, 1997,19:311-316
- 7 Winkler PA, Stummer W, Linke R, et al. The influence of cranioplasty on postural blood flow regulation, cerebrovascular reserve capacity, and cerebral glucose metabolism[J]. J Neurosurg,2000,93(1):53-61

(收稿日期:2014-07-07)
(修回日期:2014-10-13)

(上接第116页)

- 2 Xu YZ, Xi QH, Ge WLE, et al. Identification of serum microRNA - 21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2013,14(11):1057-1060
- 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 蔡徐山,朱晴晖. 一个有希望的卵巢癌新标志物——人附睾上皮分泌蛋白4[J]. 检验医学,2011,26(12):876-882
- 5 石大友. 卵巢癌患者呼气中挥发性标志物的筛查与定量分析[D]. 合肥:安徽医科大学,2013
- 6 Anderson GL, McIntosh M, Wu L, et al. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case - control study[J]. J Natl Cancer Inst,2010,102(24):26-38
- 7 Yoo BC, Kong SY, Jang SG, et al. Identification of hypoxanthine as a urine marker for non - Hodgkin lymphoma by low - mass - ion profiling[J]. BMC Cancer,2010,10(2):55

- 8 赵静. 12种肿瘤标志物检测在卵巢癌诊断中的应用[J]. 山东医药,2011,51(30):52-53
- 9 杨彬. HE4 - 卵巢癌和子宫内膜癌的标志物[J]. 医学综述,2011,17(20):3087-3089
- 10 Qiu Y, Zhou B, Su M, et al. Mass spectrometry - based quantitative metabolomics revealed a distinct lipid profile in breast cancer patients[J]. Int J Mol Sci,2013,14(11):8047-8061
- 11 Resson HW, Xiao JF, Tuli L, et al. Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis[J]. Anal Chim Acta,2012,743(2):90-100
- 12 李笠. 肿瘤干细胞标志物巢蛋白和CD133在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 中国医师进修杂志,2014,37(9):60-62
- 13 Guo Y, Wang X, Qiu L, et al. Probing gender - specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry[J]. Clin Chim Acta,2012,414(4):135-141

(收稿日期:2014-09-03)
(修回日期:2014-10-16)