

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.06.001

◇ 综述 ◇

呼出气分析在胃癌筛查和诊断中的研究进展

李琦,郭雷,李恩有

作者单位:哈尔滨医科大学附属第一医院麻醉科,黑龙江 哈尔滨 150000

通信作者:李恩有,男,教授,博士生导师,研究方向为癌症诊断中呼出气的应用,E-mail:enyouli@sina.com

摘要:近年来,胃癌的发病率和病死率都呈现上升趋势,已成为威胁健康的重大疾病之一,其诊断方法一直备受关注。由于呼出气诊断癌症具有无创、依从性高、易于操作、临床应用前景广等优点,目前已经成为癌症诊断的热门研究方向。现将胃癌呼出气诊断的相关研究进展进行归纳总结。介绍目前应用于胃癌呼出气研究的分析技术,并主要阐述呼出气挥发性有机化合物、呼出气冷凝液中与胃癌相关的肿瘤标志物,以期为呼出气早期筛查和诊断胃癌提供更多的参考依据。

关键词:呼出气; 胃癌; 挥发性有机化合物; 呼出气冷凝液; 生物标志物

Research progress of exhaled breath analysis in screening and diagnosis of gastric cancer

LI Qi, GUO Lei, LI Enyou

Author Affiliation: Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150000, China

Abstract: In recent years, the incidence and mortality of gastric cancer are on the rise, which has become a major disease threatening health, and its diagnostic methods have attracted much attention. Exhaled breath test for cancer has the advantages of non-invasion, high compliance, simple operation and promising prospects of clinical application, thus becoming the popular research area of cancer diagnosis. In this paper, the progress of gastric cancer diagnosis on exhaled breath is summarized. The analysis technique of exhaled breath test in gastric cancer and the biomarkers in the exhaled breath volatile organic compounds (VOCs), exhaled breath condensate (EBC) associated with gastric cancer are introduced. It is expected to provide more reference for early screening and diagnosis of gastric cancer with exhaled breath.

Key words: Exhaled breath; Gastric cancer; Volatile organic compounds; Exhaled breath condensate; Biomarker

根据中国 2015 年的癌症数据统计,胃癌的发病率和病死率在男性中均位居第二,在女性中分别位于第三位和第二位,成为仅次于肺癌的严重威胁中国人健康的重大疾病^[1]。临床上目前最常用的诊断胃癌的方法有 X 线钡餐、磁共振成像(MRI)、纤维胃镜以及血清肿瘤标志物等^[2],还没有相对操作简单且特异性高的筛查方法,因其发病也十分隐匿,在临床工作中许多病人对于侵入性内镜活检存在恐惧而拒绝接受检查,因此胃癌发现时多为中晚期,丧失了最佳治疗时机,因此寻求一种行之有效且能普遍应用的筛查技术来进行胃癌高危人群的定期普查已成为临床的迫切需求。

近年来,呼出气分析提供了一种潜在的无创性疾病诊断工具的可能,且具有易于操作、病人依从性高等优点,可提供一个窥视人体新陈代谢的“窗口”。1972 年,诺贝尔奖获得者 Teranishi 首次提出呼出气体中含有 250 余种可挥发的有机化合物^[3]。

在随后的 30 年中,由于科技进步以及各种分析仪器的发明,研究者们开始对呼出气中挥发性有机物进行定性、定量分析。

目前,被美国食品药品监督管理局批准的呼气测试如下,即(1)呼气中乙醇浓度的检测:用于法律实施。(2)呼气中的氢检测:用于分析人体中碳水化合物的代谢情况。(3)监测呼气中一氧化氮(NO)浓度:用于识别哮喘。(4)¹³C-尿素呼气试验:临床上作为诊断感染幽门螺杆菌的金标准之一,也是根除幽门螺杆菌治疗后复查的首选方法。(5)呼气中支链饱和烃类物质的种类和浓度分析:用于检测心脏移植手术中的排异反应的程度。

临床医生一直在试图建立一个能够联系呼出气与重要肿瘤疾病的诊断关系,关于癌症呼出气挥发性有机化合物(VOCs)产生的病理生理过程,目前有假说认为呼出气 VOCs 改变是基于肿瘤细胞膜上多不饱和脂肪酸影响细胞氧化,从而导致肿瘤细胞

内基因/蛋白突变以及细胞内活性氧的增加,进而产生了新的挥发性有机物或引起正常挥发性有机物含量改变^[4-6]。目前已经成功的在乳腺癌、结直肠癌、肺癌、胃癌等^[7-9]疾病中发现了特异的呼出气 VOCs 肿瘤标志物,以色列的科学家最近发现呼出气可以诊断 17 种癌症^[10],这一研究成果已经引起国际科技领域广泛关注,这其中也包括胃癌,现于 2017 年 7 月将胃癌呼出气诊断的国内外研究进展做一综述,以期对呼出气早期筛查和诊断胃癌提供更多的参考依据。

1 在胃癌病人呼出气中检测 VOCs

由于 VOCs 分析技术、采样方式、不同临床环境下样品的差异、混杂因素、生理因素等诸多因素的影响^[11],目前还没有可以用于标准化临床诊断或筛查癌症的呼出气检测。现就不同分析方法分组介绍胃癌呼出气 VOCs 的研究。

1.1 气相色谱-质谱联用仪分析胃癌呼出气 VOCs

气相色谱-质谱联用仪即 GC-MS,呼出气中的挥发性有机物经过色谱高效分离后进入质谱后可以识别和量化。GC-MS 可以全面、准确地分析呼出气包括其中未知的 VOCs,广泛应用于呼出气研究中,但有昂贵、费时、操作繁琐、便携性差等缺点,这可能在临床应用中产生困难。

Ligor 等^[12]使用固相微萃取 (SPME) GC-MS 法对 3 例胃癌组织细胞的顶空 VOCs、3 例胃癌病人和 7 例正常健康人的呼出气 VOCs 进行分析,检测到丙酮、二硫化碳、异丙醇、乙醇和乙酸乙酯这几种 VOCs,认为这些化合物是人体内源性产物。

丁露等^[13]使用 SPME GC-MS 法对 37 例胃癌病人、32 例正常健康人进行呼出气分析,发现丙烯腈 (浓度范围 14.72 ~ 594.29 ng/L) 和甲基环己烷 (浓度范围 9.20 ~ 970.89 ng/L) 可以作为胃癌潜在的呼出气挥发性标志物。

还有研究者使用 SPME GC-MS 法对 30 例胃癌病人、20 例健康人进行呼出气分析,发现己醛、5-乙基-5 甲基-癸烷、壬烷仅在胃癌病人呼出气中可检测。同时,胃癌病人呼出气中乙醇、丙酮、己醇、薄荷醇的相对含量明显高于健康对照组,且呼出气异戊二烯的浓度低于健康对照组,而在 Xu 等^[14]使用纳米传感器分析,呼出气异戊二烯在胃癌病人组中明显升高,两组研究者得出了不同结论,值得进一步研究。

1.2 传感器阵列分析胃癌呼出气 VOCs

传感器阵列是将纳米材料或各种不同金属、化学物质和传

感器相结合形成一个气体探测器来实现呼出气分析,它通过识别特定呼出气 VOCs 组合来进行疾病诊断^[16]。传感器阵列易于操作、方便快捷、临床应用前景大,但其缺点是不能分析未知呼出气挥发性有机物,且不能定量^[15-16]。

Xu 等^[14]研究了基于纳米材料的呼吸试验来鉴别胃癌和胃良性病变,他们使用 GC-MS 法以及纳米传感器法对 130 例胃部疾病病人的呼出气样本进行检测并采用判别因子分析 (DFA) 模式识别建立预测模型。结果显示呼出气可以区分各组亚群:胃癌与胃部良性病变灵敏度 89%、特异性 90%、准确性 90%,早期 (I 期和 II 期) 与晚期 (III 期和 IV 期) 胃癌灵敏度 89%、特异性 94%、准确性 91%,且混杂因素不敏感。呼出气化学分析发现了 5 种挥发性有机物 (2-丙烯腈、2-丁氧基乙醇、糠醛、甲基庚烯酮和异戊二烯) 在胃癌以及消化性溃疡病人中明显升高,可以作为胃癌呼出气的生物标志物。之后 Amal 等^[17]进行了进一步研究,收集来自 484 例病人的 968 个呼出气样本进行检测,使用 2 种分析方法:GC-MS 和与模式识别相结合的交叉反应纳米阵列。研究结果发现使用 GC-MS 可以在胃癌组和高危胃癌组 (OLGIM III~IV) 找到独特的呼出气 VOCs 组合,在各组间检测到 8 种呼出气 VOCs (2-丙烯腈、糠醛、乙二醇丁醚、十六烷、4-甲基辛烷、1,2,3-三甲苯、 α -甲基苯乙烯、2-丁酮)。基于纳米材料的呼出气检测则可以区分胃癌与胃黏膜肠上皮化生 (OLGIM 0~IV),其灵敏度 73%、特异性 98%、准确性 92%,区分胃癌与 OLGIM 0~II 的灵敏度为 97%、特异性 84%、准确性 87%,区分胃癌与 OLGIM III~IV 的灵敏度 93%、特异性 80%、准确性 90%,区分 OLGIM I~II 与 OLGIM III~IV 的灵敏度 83%、特异性 60%、准确度 61%。

Chen 等^[18]研制了一种基于表面增强拉曼散射 (SERS) 传感器来检测胃癌呼出气中的生物标志物。在 SERS 传感器中,还原性氧化石墨烯 (RGO) 可以选择性地吸附和富集呼出气中的生物标志物,SPME 纤维和金纳米粒子分散在 RGO 上使 SERS 传感器有效地检测被吸附的生物标志物。14 个与生物标志物相关的拉曼光谱被选为生物标志物模式指纹来区分不同国家的人的呼出气 VOCs。他们应用该方法分析了不同的呼出气标本和 200 例临床呼出气样本:灵敏度 83%、特异性 92%,也发现该方法的使用不仅可以进行胃癌诊断,更可以对早期胃癌和晚期胃癌进行区分。

学者们^[19]使用金属氧化物半导体气体传感器

阵列分析了 161 例志愿者的呼出气,其中包括 49 例胃癌和 30 例胃溃疡病人,发现胃癌病人呼出气以及胃组织顶空 VOCs 中的丙酮、二硫化碳、异丙醇、乙醇、乙酸乙酯可以用来诊断胃癌,并采用反向传播神经网络算法统计出准确性 93.00%、灵敏度 94.38% 和特异性 89.93%。

1.3 选择性离子流管质谱分析胃癌呼出气 VOCs
选择性离子流管质谱即 SIFT-MS,它结合了流动管技术、化学电离技术以及质谱来对呼出气中的 VOCs 进行定性定量分析。SIFT-MS 可快速实时在线分析^[20],且无须对样品进行吸附解吸。

Kumar 等^[21]利用 SIFT-MS 对三组受试者进行呼出气分析:18 例胃-食管癌、18 例非癌上消化道疾病、17 例健康受试者。他们在呼出气中检测到 17 种 VOCs,使用曼-惠特尼 U 检验发现 4 种 VOCs (己酸、苯酚、甲基酚和乙基苯酚)在癌症组与其他组差异有统计学意义。使用受试者工作特征曲线 (ROC 曲线)分析 4 种 VOCs 组合来区分食管-胃癌组和对照组,结果显示 ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.91,更加说明了这些 VOCs 可以作为食管-胃癌潜在的非侵入性生物标志物。

该团队进行进一步研究^[22],同样使用 SIFT-MS 方法对 81 例食管胃癌病人(食管癌 48 例,胃腺癌 33 例)、129 例对照病人 (Barrett 化生 16 例,良性上消化道疾病 62 例,正常健康人 51 例)进行呼出气分析,发现了 12 种 VOCs,并认为脂肪酸、苯酚和醛类化合物可以作为食管和胃腺癌潜在的生物标志物。

2 胃癌呼出气中检测冷凝液 (EBC)

受试者平静呼吸,其呼出气体通过特殊的装置冷凝后形成液态,即 EBC。据研究报道,在 EBC 中可以检测到的物质高达数千种^[23-24],且不断有新的物质被检测出来,它们主要源于下呼吸道的内衬液^[25]。通过研究发源于 EBC 中寻找肺癌的特异性肿瘤标志物,或是多种标志物联合应用来诊断肺癌,对其筛查、早期诊断、监测病情及判断预后情况均有着重大的临床实用价值^[26-28]。而相比传统检测手段,EBC 的采集是一个完全无创的过程,不会对支气管黏膜产生伤害,且 EBC 直接来源于下呼吸道^[29],没有被稀释的可能,故而其结果可信度高,检测结果的可重复性好,瞬时可实现动态监测,且 EBC 采集技术适用于任何年龄、任何身体状况的病人,在临床上有很好的应用前景。

王兵等^[30]应用 EcoScreen 冷凝器采集了 66 例胃癌病人及 60 例健康受试者的呼出气冷凝液,并使

用免疫酶法对胃癌呼出气 EBC 中的 P₅₃蛋白水平进行检测。结果显示:胃癌病人组的呼出气 EBC 中 P₅₃蛋白水平高于正常对照组 ($P < 0.01$),较之 I 期,II + III + IV 期的胃癌病人 EBC 中 P₅₃蛋白浓度较高 ($P < 0.05$),胃鳞癌和胃腺癌病人 EBC 中的 P₅₃蛋白水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$),EBC 中 P₅₃蛋白检测的灵敏度和特异性分别为 42.4% 和 93.4%,由此得出结论:检测胃癌病人 EBC 中 P₅₃蛋白可用于胃癌的辅助诊断及病情监测。他们还发现免疫组化 (SP) 法检测胃癌组织 P₅₃蛋白与免疫酶法检测 EBC 中 P₅₃蛋白这两种检测途径差异无统计学意义。

3 胃癌呼出气 VOCs 的地域差异

Amal 等^[31]使用 GC-MS 方法对中国和拉脱维亚共 260 位病人呼出气进行分析,观察到中国和拉脱维亚的胃癌病人呼出气是不同的。在两个国家中,受试者呼出气 6-甲基-5-庚烯-2-酮可以区分胃癌组和健康对照组,呼出气中芳香族化合物和醇类可以区分消化性溃疡组和健康对照组,胃癌组与消化性溃疡组没有被区分开。研究中发现挥发性有机物的组成可能受到地理、环境和生活方式的影响,这可能是由于不同种族之间遗传和营养差异引起个体之间细胞氧化速度不同,从而造成 VOCs 差异,因此建立一个该地区人群适用的呼出气诊断模型是必要的。

4 肠道微生物环境对胃癌 VOCs 影响

Leja 等^[32]使用 GC-MS 和纳米传感器分析了 10 例同一个胃癌病人连续 3 d 呼出气、17 例胃癌病人幽门螺杆菌治疗前后的呼出气、61 例胃癌病人肠道清洗前后的呼出气,发现同一个病人 3 d 内呼出气 VOCs 是稳定的,证明了 VOCs 分析的可复性和重现性, α -蒎烯 ($P = 0.028 0$)、乙酸乙酯 ($P = 0.030 0$) 在抗生素应用后增加,丙酮在结肠镜检查前肠道准备后增加 ($P = 0.000 1$),说明抗生素和肠道准备重建的肠道微生物环境影响了呼出气 VOCs 的结果。所以需要进行更多研究来验证 VOCs 分析的准确性。在这些标志物成功转化为临床实践之前仍需要克服许多挑战,样品采集和处理的标准化也是临床研究的关键因素^[33]。

综上所述,目前胃癌呼出气的研究主要是在 GC-MS、传感器阵列、SIFT-MS、EBC 这几个方面,国内外相关研究还相对甚少。因此,更多关于胃癌呼出气诊断方面的研究需要探索,未来的研究领域包括胃癌呼出气 VOCs 可能的生化通路研究,标准化

呼吸试验和特定胃部疾病大型多中心人群呼出气诊断研究。

参考文献

- [1] CHEN WQ, ZHENG RS, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2):115-132.
- [2] BUSZEWSKI B, ULANOWSKA A, LIGOR T, et al. Identification of volatile organic compounds secreted from cancer tissues and bacterial cultures [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 868(1/2):88-94.
- [3] TERANISHI R, MON TR, ROBINSON AB, et al. Gas chromatography of volatiles from breath and urine [J]. Anal Chem, 1972, 44(1):18-20.
- [4] KNEEPKENS CM, LEPAGE G, ROY CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation [J]. Free Radic Biol Med, 1994, 17(2):127-160.
- [5] TOYOKUNI S. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: from epidemiology to oxygenomics [J]. IUBMB Life, 2008, 60(7):441-447.
- [6] HAKIM M, BROZA YY, BARASH O, et al. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways [J]. Chem Rev, 2012, 112(11):5949-5966.
- [7] WANG CS, SUN B, GUO L, et al. Volatile organic metabolites identify patients with breast cancer, cyclomastopathy, and mammary gland fibroma [J]. Sci Rep, 2014, 4:5383.
- [8] WANG CS, KE CF, WANG XY, et al. Noninvasive detection of colorectal cancer by analysis of exhaled breath [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(19):4757-4763.
- [9] PHILLIPS M, ALTORKI N, AUSTIN JH, et al. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath [J]. Cancer Biomark, 2007, 3(2):95-109.
- [10] NAKHLEH MK, AMAL H, JERIES R, et al. Diagnosis and classification of 17 diseases from 1404 subjects via pattern analysis of exhaled molecules [J]. ACS Nano, 2017, 11(1):112-125.
- [11] MARKAR SR, WIGGINS T, KUMAR S, et al. Exhaled breath analysis for the diagnosis and assessment of endoluminal gastrointestinal diseases [J]. J Clin Gastroenterol, 2015, 49(1):1-8.
- [12] LIGOR T, SZELIGA J, JACKOWSKI M, et al. Preliminary study of volatile organic compounds from breath and stomach tissue by means of solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Breath Res, 2007, 1(1):016001.
- [13] 丁露, 徐珍琴, 石大友, 等. 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, 47(4):465-467.
- [14] XU ZQ, BROZA YY, IONSECU R, et al. A nanomaterial-based breath test for distinguishing gastric cancer from benign gastric conditions [J]. Br J Cancer, 2013, 108(4):941-950.
- [15] KRILAVICIUTE A, HEISS JA, LEJA M, et al. Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review [J]. Oncotarget, 2015, 6(36):38643-38657.
- [16] BROZA YY, HAICK H. Nanomaterial-based sensors for detection of disease by volatile organic compounds [J]. Nanomedicine, 2013, 8(5):785-806.
- [17] AMAL H, LEJA M, FUNKA K, et al. Detection of precancerous gastric lesions and gastric cancer through exhaled breath [J]. Gut, 2016, 65(3):400-407.
- [18] CHEN YS, ZHANG YX, PAN F, et al. Breath analysis based on surface-enhanced raman scattering sensors distinguishes early and advanced gastric cancer patients from healthy persons [J]. ACS Nano, 2016, 10(9):8169-8179.
- [19] DANIEL DA, TANGAVEL K. Breathomics for gastric cancer classification using back-propagation neural network [J]. J Med Signals Sens, 2016, 6(3):172-182.
- [20] SPANĚL P, SMITH D. Progress in SIFT-MS: breath analysis and other applications [J]. Mass Spectrom Rev, 2011, 30(2):236-267.
- [21] KUMAR S, HUANG JZ, ABBASSI-GHADI N, et al. Selected ion flow tube mass spectrometry analysis of exhaled breath for volatile organic compound profiling of esophago-gastric cancer [J]. Anal Chem, 2013, 85(12):6121-6128.
- [22] KUMAR S, HUANG JZ, ABBASSI-GHADI N, et al. Mass spectrometric analysis of exhaled breath for the identification of volatile organic compound biomarkers in esophageal and gastric adenocarcinoma [J]. Ann Surg, 2015, 262(6):981-990.
- [23] HUNT J. Exhaled breath condensate: an overview [J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2007, 27(4):587-596, v.
- [24] KHARITONOV SA, BARNES PJ. Exhaled biomarkers [J]. Chest, 2006, 130(5):1541-1546.
- [25] KONSTANTINIDI EM, LAPPAS AS, TZORTZI AS, et al. Exhaled breath condensate: technical and diagnostic aspects [J]. Scientific World Journal, 2015, 2015:435160.
- [26] HAYES SA, HAEFLIGER S, HARRIS B, et al. Exhaled breath condensate for lung cancer protein analysis: a review of methods and biomarkers [J]. J Breath Res, 2016, 10(3):034001.
- [27] GESSNER C. Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients [J]. Lung Cancer, 2004, 43(2):215-222.
- [28] 陈金亮, 陈建荣, 钱春花, 等. 非小细胞肺癌患者呼出气冷凝液中 p53 基因突变检测的研究 [J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(10):736-739.
- [29] HORVÁTH I, HUNT J, BARNES PJ, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions [J]. Eur Respir J, 2005, 26(3):523-548.
- [30] 王兵, 黄灵, 倪海滨. 胃癌患者呼出气冷凝液及肿瘤组织中 P₅₃ 蛋白的检测 [J]. 中国现代医生, 2016, 54(18):9-11, 15.
- [31] AMAL H, LEJA M, BROZA YY, et al. Geographical variation in the exhaled volatile organic compounds [J]. J Breath Res, 2013, 7(4):047102.
- [32] LEJA M, AMAL H, LASINA I, et al. Analysis of the effects of microbiome-related confounding factors on the reproducibility of the volatolomic test [J]. J Breath Res, 2016, 10(3):037101.
- [33] SCHMIDT K, PODMORE I. Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer [J]. Journal of Biomarkers, 2015, 2015:1-16.

(收稿日期:2017-10-21, 修回日期:2017-12-08)