

高效液相色谱法检测早期胃癌中胃液固有荧光的诊断价值

张月宁, 金新莲, 孟灵梅, 耿秋明, 彭佳柔, 周丽雅, 林三仁

■背景资料

胃癌是常见的恶性肿瘤,但目前尚缺乏有效的实验室诊断手段。近年来北京大学第三医院消化中心对胃液荧光光谱在胃癌诊断中的应用进行了一系列研究,显示该方法诊断胃癌具有较高的敏感性和特异性,但对于早期胃癌的诊断仍不十分理想。

张月宁, 金新莲, 孟灵梅, 周丽雅, 林三仁, 北京大学第三医院消化科 北京市 100083

耿秋明, 北京大学第三医院中心实验室 北京市 100083

彭佳柔, 北京大学医学部蛋白质组学国家重点实验室 北京市 100083

国家自然科学基金资助项目, No. 30371603, No.30672395

作者贡献分布: 此课题由张月宁、周丽雅及林三仁设计; 研究过程由张月宁、金新莲、孟灵梅及耿秋明操作完成; 耿秋明与彭佳柔提供技术和材料支持; 周丽雅与林三仁提供研究经费, 分析, 解释数据并控制研究动态; 本论文写作由张月宁完成; 林三仁与周丽雅审阅。

通讯作者: 林三仁, 主任医师, 100083, 北京市, 北京大学第三医院消化科, linsanren@medmail.com.cn

电话: 010-62014716 传真: 010-62014716

收稿日期: 2010-04-18 修回日期: 2010-06-13

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-28

Diagnostic value of gastric juice autofluorescence detected by high-performance liquid chromatography in early gastric cancer

Yue-Ning Zhang, Xin-Lian Jin, Ling-Mei Meng, Qiu-Ming Geng, Jia-Rou Peng, Li-Ya Zhou, San-Ren Lin

Yue-Ning Zhang, Xin-Lian Jin, Ling-Mei Meng, Li-Ya Zhou, San-Ren Lin, Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China
Qiu-Ming Geng, Centralab, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

Jia-Rou Peng, State Key Laboratory of Proteomics, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China: Nos. 30371603 and 30672395

Correspondence to: San-Ren Lin, Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China. linsanren@medmail.com.cn

Received: 2010-04-18 Revised: 2010-06-13

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-28

Abstract

AIM: To evaluate the diagnostic value of gastric juice autofluorescence detected by high-liquid performance chromatography in early gastric cancer.

METHODS: Gastric juice was collected from patients with different gastric diseases undergoing gastroscopy at our hospital from August 2004 to March 2008. Autofluorescence of gastric juice was detected by high-performance liquid chro-

matography, and different fluorescence peaks were statistically analyzed.

RESULTS: An obvious autofluorescence peak at a retention time of 30-32 min could be detected, which was significantly different between early gastric cancer and gastric benign diseases ($P < 0.001$). At a critical fluorescence intensity value of 0.12 V, the sensitivity and specificity of detection of gastric juice autofluorescence by high-performance liquid chromatography for the diagnosis of early gastric carcinoma were 91.2% and 87.8%, respectively.

CONCLUSION: Detection of gastric juice autofluorescence by high-performance liquid chromatography has a high sensitivity and specificity in the diagnosis of early gastric cancer.

Key Words: Gastric carcinoma; Gastric juice; Autofluorescence; High-performance liquid chromatography

Zhang YN, Jin XL, Meng LM, Geng QM, Peng JR, Zhou LY, Lin SR. Diagnostic value of gastric juice autofluorescence detected by high-performance liquid chromatography in early gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(21): 2262-2265

摘要

目的: 研究高效液相色谱法检测早期胃癌中胃液固有荧光光谱的诊断价值。

方法: 选择2004-08/2008-03在北京大学第三医院胃镜检查患者的胃液, 采用Mono Q离子交换高效液相色谱分析方法检测胃液固有荧光, 比较早期胃癌与胃良性疾病间的荧光峰差异并进行统计分析。

结果: 胃液在Mono Q离子交换高效液相色谱条件下于保留时间30-32 min之间规律出现一个强度最大的荧光峰, 早期胃癌组均值明显高于胃良性疾病组($P < 0.001$)。以荧光强度0.12 V为判别界值, 诊断早期胃癌的敏感度是91.2%、特异度是87.8%。

结论: 高效液相色谱法检测胃液固有荧光用

■同行评议者

程斌, 教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科

于诊断早期胃癌具有较高的敏感性和特异性。

关键词: 胃癌; 胃液; 固有荧光; 高效液相色谱

张月宁, 金新莲, 孟灵梅, 耿秋明, 彭佳柔, 周丽雅, 林三仁. 高效液相色谱法检测胃液固有荧光诊断早期胃癌的价值. 世界华人消化杂志 2010; 18(21): 2262-2265

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2262.asp>

0 引言

胃癌在世界范围内都是常见的恶性肿瘤, 早期诊断是改善其预后的关键因素之一^[1,2]. 1995年以来, 北京大学第三医院消化疾病研究中心对胃液荧光光谱在胃癌诊断中的应用进行了一系列临床及人群前瞻性双盲研究, 结果显示该方法诊断胃癌的敏感性为81.5%, 特异性为71.7%^[3-11], 但对于早期胃癌的诊断仍不十分理想. 本研究中, 我们采用阴离子交换高效液相色谱法(Mono Q high performance liquid chromatography, Mono Q HPLC)检测胃液固有荧光, 评价其诊断早期胃癌的价值, 以期进一步提高诊断效率.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2004-08/2008-03在北京大学第三医院进行胃镜检查的患者, 收集胃液(患者均知情同意). 被检者禁食12 h后进行常规胃镜检查, 麻醉采用咽喉部喷洒利多卡因, 检查中不使用消泡剂等. 经胃镜吸取胃液10 mL(存在出血及胆汁反流者除外), 以3 000 r/min×5 min离心加过滤(离心式微孔滤膜过滤器: 水系, Φ6.8 mm, 孔径0.45 μm, 天津色谱科学技术公司), 于-80℃冰箱保存备用.

1.2 方法 取前述上清液2 mL, 以1 mol/L Tris-HCl(pH10.4)调整pH至8.0, 超纯水、4℃、搅拌透析过夜(低分子量透析袋: Pharmacia, Sweden). 然后-80℃冷冻2 h, -50℃条件下真空干燥, 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)200 μL溶解上述样品, 10 000 r/min、4℃离心15 min, 取上清液上机检测(阴离子交换色谱柱: Mono Q 5/50 GL, GE Healthcare, USA. Thermo-quest色谱工作站: Waters 510泵, USA; Rheodyne 7125进样阀, USA; TSP Spectrasystem F13000荧光检测器, USA; Waters 490E 紫外检测器, USA).

本实验采用梯度洗脱法, 一个梯度洗脱时间为1 h, 流速为1 mL/min. 梯度条件如下: A buffer(平衡缓冲液: 20 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl)冲洗5 min,

然后逐渐提高B buffer(洗脱缓冲液: 20 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl+1 mol/L NaCl)浓度进行洗脱, 40 min时B buffer浓度达50%(即0.5 mol/L NaCl), 随后5 min内迅速将B buffer浓度升至100%(即1 mol/L NaCl), 继续洗脱5 min, 之后5 min内将B buffer浓度降至0%, 最后A buffer冲洗5 min完成一个梯度.

梯度过程中, 应用Spectrasystem F13000荧光检测器和Waters 490E紫外检测器分别检测样品通过时的荧光及紫外光强度. 荧光检测器的参数设置为: 激发光波长288 nm, 发射光波长348 nm. 紫外检测器的参数设置为: 紫外波长288 nm. 以上实验均重复3次.

统计学处理 应用SPSS11.5统计软件进行分析. 均数间的比较采用方差分析, 数据以mean±SD表示. $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 临床病理资料 共收集病例75例, 年龄23-69(平均33.8±13.6)岁, 男41例、女34例. 早期胃癌36例, 男27例、女9例, 男女比3:1; 年龄31-49(平均35.9±11.7)岁. 对照组39例, 包括胃溃疡14例, 萎缩性胃炎19例, 浅表性胃炎6例; 其中27例有不同程度的不典型增生. 均经病理切片确诊(早期胃癌定义为癌组织浸润仅限于黏膜层及黏膜下层者, 无论其面积大小和是否有局部淋巴结转移).

2.2 Mono Q HPLC胃液固有荧光的一般表现 胃液在Mono Q HPLC条件下表现为锯齿状的荧光峰群, 位于保留时间20-35 min, 其中在30-32 min处规律出现一个强度最大的荧光峰(图1), 本实验中我们即将此主峰作为研究对象(定义为PFI).

2.3 胃良恶性病变荧光峰值的比较 各种胃疾病患者Mono Q HPLC胃液荧光峰值的比较结果见表1. 单因素方差分析显示, 胃癌组PFI均值明显高于胃良性病变组($P<0.001$), 胃良性病变组之间PFI均值差异无显著性($P>0.05$).

2.4 Mono Q HPLC胃液固有荧光诊断早期胃癌的界值 应用SPSS11.5软件, 将不同PFI诊断早期胃癌的敏感度和特异度制作受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC). 结果显示(表2), PFI 0.12 V为最佳临界点, 以此作为判别界值, 诊断早期胃癌的敏感度是91.2%(31/34)、特异度87.8%(36/41)、准确度89.3%(36+31/75).

3 讨论

荧光是物质的一种光致发光现象, 荧光光谱对

■研发前沿

恶性肿瘤的早期诊断是相关领域科学工作者孜孜不倦的追求目标, 将高效液相色谱法引入到肿瘤的诊断中在近年来日益引起人们的兴趣.

■相关报道

郭慧兰等采用高效液相色谱分析法, 检测了251例各种胃良、恶性病变患者(其中进展期胃癌39例, 重度异型增生1例)的胃液荧光, 发现其用于诊断进展期胃癌先验概率的敏感度为92.5%, 特异度为92.4%; 后验概率的敏感度为85.0%, 特异度为89.1%.

■应用要点

本研究表明胃液经Mono Q HPLC分离后,胃良恶性疾病间的荧光峰差异增大.在保留时间30-32 min处有一个强度最大的荧光峰,胃癌组该荧光峰的均值明显高于胃良性疾病变组($P<0.001$).建立ROC曲线,取0.12 V为界值,诊断胃癌的敏感度为91.2%、特异度为87.8%,准确度可达89.3%,显示高效液相色谱分析法对早期胃癌具有较高的诊断价值.

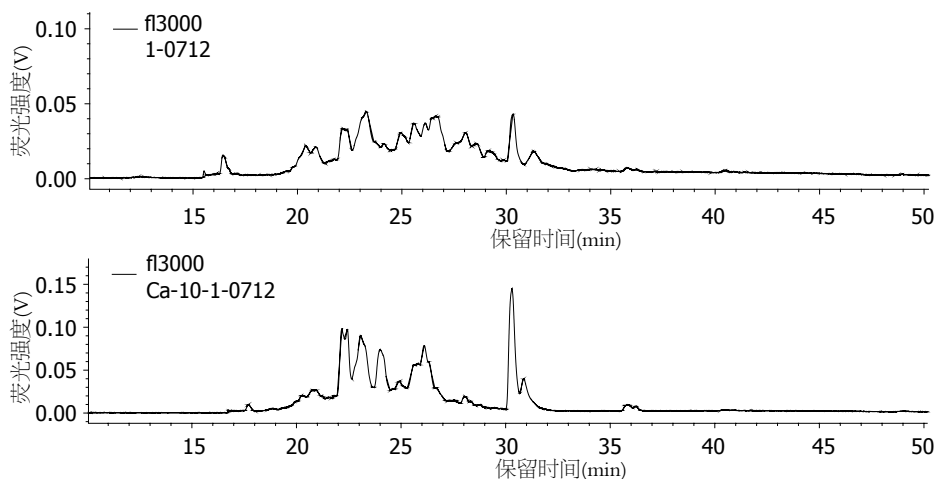


图1 Mono Q HPLC胃液固有荧光. A: 胃良性疾病; B: 早期胃癌.

表1 Mono Q HPLC胃液荧光光谱峰值(PFI)的比较

疾病	n	PFI(V)
慢性浅表性胃炎	6	0.05 ± 0.01
慢性萎缩性胃炎	19	0.09 ± 0.04
胃溃疡	14	0.07 ± 0.03
早期胃癌(GC)	36	0.21 ± 0.08 ^a

^a $P<0.05$ vs 各对照组.

表2 Mono Q HPLC胃液固有荧光诊断结果(n)

	病理诊断		合计
	良性病变	恶性病变	
良性(PFI<0.12 V)	36	3	39
恶性(PFI≥0.12 V)	5	31	36
合计	41	34	75

应物质的能级结构.利用分子荧光作为信息载体进行物质分析和检测的研究方法称为荧光分析法(荧光诊断法).20世纪初,人们已经发现人体正常组织和恶性肿瘤组织的荧光光谱存在很大差异,此后生物组织固有荧光在肿瘤诊断中的应用价值逐渐受到重视^[3-15].

胃液各种成分的改变可直接反映胃癌患者胃内环境的变化,因此检测胃液荧光光谱,有可能获得胃癌患者胃液中组织细胞代谢产物分子结构和含量变化的信息.1995年以来,北京大学第三医院消化疾病研究中心对胃液荧光光谱在胃癌诊断中的应用进行了一系列临床及人群前瞻性双盲研究,结果显示该方法诊断胃癌的敏感性为81.5%,特异性为71.7%^[3-11],但对于早期胃癌的诊断仍不十分理想.

高效液相色谱分析方法(high performance liquid chromatography, HPLC)是20世纪70年代迅速发展起来的一种物理化学分离分析技术,具有分离分析效能高、速度快、检测灵敏度高等特点,是目前各种色谱模式中应用最广、国际分析化学界发展最快的一个领域.液相色谱-质谱联用技术,使得液相色谱的高分析能力和质谱高鉴定能力相结合,对复杂样品体系,特别是生物医学领域的研究提供了更进一步的有效方

法.近年来许多学者尝试用高效液相紫外光谱来分析核酸代谢产物的性质及含量,从而找到肿瘤特征性的变化,作为肿瘤标志物^[16-19].

由于胃液中产生荧光的物质成分相当复杂,利用高效液相的分离功能及其连接的检测器的检测功能,就有可能将胃液中各种荧光物质分离开来,避免胃液中各种物质的相互干扰,分别显示每一种物质的含量及荧光特性,并进一步评估其对胃癌的诊断价值.本课题组中郭慧兰等^[3]最早采用C18反相高效液相色谱法测定了251例各种胃良、恶性病变患者的胃液固有荧光,结果表明其诊断胃癌的敏感度为92.5%,特异度92.4%,显示胃液高效液相荧光检测可明显提高诊断效率.本试验中,胃液经Mono Q HPLC分离后,胃良恶性疾病间的荧光峰差异增大.在保留时间30-32 min处有一个强度最大的荧光峰,胃癌组该荧光峰的均值明显高于胃良性疾病变组($P<0.001$).建立ROC曲线,取0.12 V为界值,诊断胃癌的敏感度为91.2%、特异度为87.8%,准确度可达89.3%,显示高效液相色谱分析法对早期胃癌具有较高的诊断价值.

目前,胃液固有荧光光谱中肿瘤“特征峰”的组织基础及生化来源仍未能明确,特征峰的出现究竟是表征疾病的前期症状,还是由疾病最终结果所导致,尚待进一步的研究.揭示荧光光谱形成的机制,从分子水平上阐明病变

■名词解释

高效液相色谱分析方法(HPLC):是20世纪70年代迅速发展起来的一种物理化学分离分析技术,具有分离分析效能高、速度快、检测灵敏度高等特点,是目前各种色谱模式中应用最广、国际分析化学界发展最快的一个领域.

组织的本质是未来该领域的研究方向。

4 参考文献

- 1 Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, Kim JJ, Yeoh KG, Goh KL, Wu KC, Wu DC, Sollano J, Kachintorn U, Gotoda T, Lin JT, You WC, Ng EK, Sung JJ. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice. *Lancet Oncol* 2008; 9: 279-287
- 2 周丽雅, 薛艳, 林三仁, 孟灵梅, 李传凤, 闫秀娥, 高娜, 王琨, 段卓洋. 北京地区25年来消化性溃疡及胃癌发病情况的演变. *中华内科杂志* 2005; 44: 431-433
- 3 郭慧兰, 周丽雅, 林三仁, 丁士刚, 王立新, 金珠, 耿秋明, 赵一鸣. 胃液高效液相荧光光谱对胃癌诊断的价值. *中华消化杂志* 2001; 21: 417-419
- 4 林三仁. 荧光光谱检测对胃癌的诊断价值. *中华消化杂志* 2003; 23: 44-45
- 5 郭慧兰, 周丽雅, 林三仁, 丁士刚, 王立新, 金珠, 耿秋明, 赵一鸣. 稀释胃液固有荧光光谱对胃癌诊断价值的研究. *北京大学学报(医学版)* 2003; 35: 540-543
- 6 李渊, 林三仁, 周丽雅, 郭慧兰, 叶嗣懋, 金珠, 耿秋明, 赵一鸣. 胃液固有荧光光谱对胃癌诊断价值的初步研究. *中华内科杂志* 2003; 42: 31-33
- 7 李渊, 林三仁, 周丽雅, 彭嘉柔, 郭慧兰. 胃癌患者胃液中特异性荧光物质的初步确定. *中华消化杂志* 2003; 23: 15-18
- 8 徐志洁, 林三仁, 周丽雅, 丁士刚, 李渊, 耿秋明. 胃液固有荧光光谱、pH值和潜血检测对胃癌诊断价值的研究. *胃肠病学* 2004; 9: 213-216
- 9 孙晓宁, 周丽雅, 林三仁, 赵一鸣, 吕旌乔. 胃液固有荧光光谱对胃癌筛查应用价值的研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 266-269
- 10 闫秀娥, 周丽雅, 林三仁. DNA甲基化和胃液固有荧光光谱联合检测在胃癌诊断中的意义. *中华消化杂志* 2006; 26: 726-730
- 11 孟灵梅, 周丽雅, 林三仁, 王爱英, 郭长吉. 胃液固有荧光光谱诊断胃部恶性病变检测条件的比较. *胃肠病学* 2006; 11: 590-593
- 12 陈颖, 吴云林, 吴巍, 蔚青, 胡伟国, 郭强苏. 人胃癌与癌前病变组织的固有荧光特征. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3055-3059
- 13 何博华, 魏华江, 陈雪梅, 王娟. 人胃腺癌组织的自体荧光及其吸收、散射特性. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1692-1695
- 14 肖寒, 朱焯炜. 激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术在肿瘤诊断中的应用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3208-3210
- 15 van den Broek FJ, Fockens P, van Eeden S, Reitsma JB, Hardwick JC, Stokkers PC, Dekker E. Endoscopic tri-modal imaging for surveillance in ulcerative colitis: randomised comparison of high-resolution endoscopy and autofluorescence imaging for neoplasia detection; and evaluation of narrow-band imaging for classification of lesions. *Gut* 2008; 57: 1083-1089
- 16 Vandenbogaert M, Li-Thiao-Té S, Kaltenbach HM, Zhang R, Aittokallio T, Schwikowski B. Alignment of LC-MS images, with applications to biomarker discovery and protein identification. *Proteomics* 2008; 8: 650-672
- 17 Wang X, Szabo C, Qian C, Amadio PG, Thibodeau SN, Cerhan JR, Petersen GM, Liu W, Couch FJ. Mutational analysis of thirty-two double-strand DNA break repair genes in breast and pancreatic cancers. *Cancer Res* 2008; 68: 971-975
- 18 赵轶男. 高效液相色谱技术(HPLC)影响因素的选择. *分析实验室* 2007; 26: 340-341
- 19 Cohen V, Agulnik JS, Jarry J, Batist G, Small D, Kreisman H, Tejada NA, Miller WH Jr, Chong G. Evaluation of denaturing high-performance liquid chromatography as a rapid detection method for identification of epidermal growth factor receptor mutations in nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2006; 107: 2858-2865

■同行评价

本文具有一定的创新思维, 研究手段先进, 数据统计可靠, 有一定样本量, 结果可喜, 具有一定的临床推广价值。

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)