

呼出气体挥发性有机化合物分析在肺癌诊疗中的研究进展

陈 赛,陈亚南,毛琦善

(青岛大学附属烟台毓璜顶医院,山东 烟台 264000)

摘 要:大多数肺癌患者发现时已属晚期,失去了临床最佳治疗时机,该病的早发现、早诊断、早治疗是现今临床工作中的重点。随着临床肺癌检测手段的不断更新发展,呼出气体检测以快速、风险小、无创伤、可重复、可操作性成为一种有广泛前景的检测手段。本综述主要就肺癌患者呼出气体中的特征性呼出气体挥发性有机化合物进行归纳比较,阐述可能的机制,探讨呼出气体研究目前所存在的问题及研究前景。

关键词:呼出气体;肺肿瘤;呼出气体挥发性有机化合物

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2019)02-0132-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.02.A011

Advances on Exhaled Volatile Organic Compounds in Diagnosis of Lung Cancer

CHEN Sai, CHEN Ya-nan, MAO Qi-shan

(Yantai Yuhuangding Hospital, Affiliated to Qingdao University Medical College, Yantai 264000, China)

Abstract: Most of lung cancer are discovered late and the optimal time for clinical treatment is lost. The early detection, early diagnosis and early treatment of lung cancer are the focus of clinical research. In recent years, the measurement of cancer-related volatile organic compounds in exhaled gas has become a promising clinical means for early detection of lung cancer, with advantages of rapid speed, low risk, non-invasiveness, repeatability and maneuverability. This review summarizes the characteristics of volatile organic compounds in exhaled gas of lung cancer, elaborates the possible mechanism, discusses the existing problems and the prospects of future application.

Key words: exhaled gas detection; lung neoplasms; volatile organic compounds

迄今为止,肺癌是全世界范围内癌症死亡的主要原因之一,也是我国死亡率最高的恶性肿瘤。据三次全国死因调查统计显示,肺癌在我国癌症死因排名从第5位上升至第1位,居男性及女性癌症死亡第1位^[1]。针对肺癌的分型,腺癌已经取代鳞癌成为最多的类型,肺癌人群中不吸烟女性腺癌比例也较前明显升高^[2],治疗及预后较差。临床工作中因早期肺癌影像学形态各异、患者症状隐匿或不典型,早期诊断仍然是临床诊疗工作中的重点及难点。

呼出气体分析应用于疾病的诊断迄今已有40多年的历史,Williams等^[3]研究发现经训练的狗可嗅

出黑色素瘤患者,证实恶性肿瘤个体可挥发出有诊断意义的特殊气体,Buszewski等^[4]则利用嗅探犬分辨出肺癌患者和正常人,从侧面验证呼出气中存在可被嗅出的物质。近年来,呼出气检测日渐成熟,对肺癌诊断的精确性及灵敏度不断提高。

1 呼出气体挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)的产生及检测

VOCs是熔点低于室温,沸点在50~260℃之间的挥发性有机化合物,人体多种体液均可检出VOCs,包括血液、尿液、唾液、胸腔积液等^[5]。其中,血液VOCs可由血培养顶空微萃取获得,现应用于

收稿日期:2018-10-07;修回日期:2018-10-28

通信作者:毛琦善, E-mail: dcmqs@163.com

临床药理学、微生物学及肿瘤学等研究领域^[6];尿液 VOCs 多应用于泌尿系统肿瘤及其他系统腺癌的早期诊断、药物代谢动力学及毒理学研究,有研究表明,尿液 VOCs 中 2-戊酮可能有利于肺癌患者中腺癌与鳞癌的鉴别^[7];唾液 VOCs 分析因受外界环境(包括饮食、工作等)及口腔定植菌影响的特点,多应用于毒理学、微生物学及职业伤害学等领域^[8]。呼出气 VOCs 研究多侧重于炎性病变及肿瘤方向,对肺癌、直肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤研究较为多见^[9]。

人呼出气 VOCs 是呼出气体中的痕量有机化合物,占呼出气体总容积比重不足 1%,主要包括烷烃类、烯醇类、醛酮类、醇类、芳香族类等,从来源上而言,可分为内源性及外源性两部分:外源性成分是经人体吸收后又再次排出的有机化合物;内源性成分被认为是机体(包括肿瘤细胞、微生物)代谢产生的痕量有机化合物,其成分与含量变化反应内环境稳态系统的变化,是目前针对肺癌无创检查研究的主要内容。

大量基础及临床实验证实,肺癌患者呼出气体中内源性 VOCs 种类及含量同非肺癌个体之间有差别,但特征性 VOCs 生物化学产生或演变机制尚未明确,现主要有以下三种推论:①氧化损伤学说^[10]:细胞线粒体中产生的氧自由基对 DNA、蛋白质等造成氧化损伤,癌变过程中氧化损伤级联放大,内源性 VOCs 成分及浓度因此发生改变,肺泡细胞的氧化损伤可将内源性 VOCs 直接经呼吸道排出而易于检测。②细胞色素 P450(CYP450)学说^[11]:肺癌个体 CYP450 系统过度激活,代谢产物因水溶性低经循环系统随呼出气体、尿液排出体外。③代谢紊乱理论^[12]:癌症患者体内癌基因激活,细胞代谢紊乱影响机体代谢,经复杂的代谢紊乱机制产生具有差异性或非特征性的代谢产物由代谢系统排出体外。

通过技术应用肺癌呼出气体检测得以实现,早期研究中,样品采集、富集等气体处理方式及分析手段繁杂不一,基础研究及临床应用接受度不高,一定程度上限制了该类技术的推广。近些年来,随着线性分析及各类传感器研究不断更新,呼出气 VOCs 检测在肺癌研究领域得到快速发展。该领域分析技术各有侧重,色谱分析技术可对已知 VOCs 比较分析,但依赖收集、富集、脱附等预处理方法,对仪器和技术要求稍高^[13],以固相微萃取(solid phase micro ex-

traction,SPME)为代表的富集技术联合色谱分析对样本分析敏感性及稳定性较高,结果可靠,临床应用较多^[14]。质谱分析技术则仅需简单预处理即可直接对未知混合 VOCs 定量分析,具有灵敏度高、特异性高、样品用量少、分析速度快、分离和鉴定同时进行等优点,该类技术中气相色谱—质谱联用技术结果可靠、应用较广,电喷雾萃取电离质谱法可对复杂样品快速分析、临床应用前景较好^[15]。电子鼻是新型基于传感器装置的气体分析仪器,可直接对已知肺癌 VOCs 进行定性及半定量分析^[16],易于操作、便于携带、重复性好、不需富集,为肺癌预后及家庭监测提供可能^[17]。另有研究证实电子鼻技术可对肺癌进行分型,可为临床肺癌分型诊断提供思路,应用前景广阔^[18]。光谱检测技术可使检测结果交叉敏感最小化,但对光谱相近气体分析能力较差^[19],现对肺癌混合 VOCs 分析检测应用较为少见。

2 肺癌呼出气 VOCs 的分类

2.1 烷烃类

自 1985 年,Gordon 等^[20]在呼出气体中发现特征性苯的衍生物,该研究不断延伸逐渐形成特征性 VOCs 诊断肺癌的思路。O'Neill 等^[21]随后提出呼出气联合检测应用于肺癌诊断的早期设想,并筛选出 28 种特征性 VOCs,主要成分是烷烃类以及苯的衍生物。Phillips 等^[22]对胸片表现异常的 108 例患者进行呼出气体研究,选取了 22 种以烷烃为主的 VOCs 肺癌模型,该模型对肺癌诊断灵敏度达到 89.6%,特异性为 82.9%,并通过不断反复试验、标准化试验数据结果,发现肺癌肿瘤标志物主要为碳链长度为 C4 到 C20 的烷烃以及单甲基化烷烃。

随着研究方法不断创新,肺癌呼出气烷烃研究延伸至不饱和支链、直链烯烃方面也有新的进展,Chen 等^[23]介绍了一种肺癌病理分析和细胞水平早期诊断肺癌的方法,通过 SPME-GC/MS 得到各种细胞的气味色谱,发现 4 种气体被认为是肺癌细胞所特异,其中 2 种成分与异戊二烯与正十一烷相似。在对异戊二烯的单物质研究中,Poli 等^[24]曾发现肺癌患者术后异戊二烯含量明显下降,提示异戊二烯可能有助于肺癌诊断及预后随诊。目前,异戊二烯可作为联合检测 VOCs 应用于肺癌的辅助诊断。靶向药

物治疗也是肺癌治疗的热点,肺癌 VOCs 检测被证实可能有利于区分肺癌种类及分型。Handa 等^[25]进行了一项前瞻性研究,使用决策树算法分析 115 种 VOCs,发现正十二烷针对肺癌诊断可达到 76% 的灵敏度和 100% 的特异性,并通过比较腺癌和健康受试者的 VOCs 峰值,发现正十二烷具有 81.3% 的灵敏度和 89.7% 的特异性,且有助于临床区分 EGFR 突变,为肺癌的早期检测提供新的思路。细胞体外实验方面,Filipiak 等^[26]比较了肺癌患者、手术切除肺癌组织及肺癌细胞 3 种来源的肺癌细胞 VOCs,发现 2-甲基-1 戊烯、4-甲基辛烷和 2,4-二甲基庚烷实验结果有统计学差异。Oguma 等^[27]发现环己烷浓度在肺癌组明显高于对照组,值得提出的是,该试验给予受试者以净化空气,并于密闭空间收集气体,最大程度避免了外源性 VOCs 的干扰。

2.2 醛酮类(羰基化合物)

早于 2004 年 Deng 等^[28]通过比较 10 例肺癌患者与 10 名正常人血液顶空挥发醛发现己醛和庚醛起源于血液,提示可能是肺癌的肿瘤标志物。Smith 等^[6]分析肺癌细胞株代谢产物,发现乙醛的浓度高于对照且随肿瘤细胞数量增多而递增,再次证明乙醛可能是早期肺癌检测的标志性物质。Fuchs 等^[29]发现吸烟者中呼出气甲醛浓度显著降低,乙醛、丙醛、丁醛、庚醛和癸醛浓度对癌症患者、吸烟者和志愿者无显著差异,肺癌患者呼出气中戊醛、己醛、辛醛和壬醛浓度明显高于吸烟者和健康对照组,从侧面证实 Deng 试验结论的可信性。Jouyban 等^[30]通过丙酮共液化联合质谱分析发现,肺癌患者呼出气辛醛浓度明显高于健康志愿者和肺癌术后患者。上述研究提示长直链醛类可能有利于肺癌的诊断。

在肺癌分型及治疗预后方面,羰基化合物联合检测有利于肺癌诊断模型的建立。Xiao-An 等^[31]通过傅立叶变换离子回旋共振质谱分析确定 2-甲基丁酮、3-羟基-2-丁酮、2-羟基乙醛和 4-羟基-2-乙醛 4 种与肺癌相关羰基 VOCs,其中 2-甲基丁酮的浓度可用于区分 I 期肺癌与 II~IV 期,4-羟基-2-乙醛的浓度可用于区分腺癌和鳞状细胞癌,4-羟基-2-乙醛和 2-甲基丁酮可用于区分小细胞肺癌与非小细胞肺癌患者。Li 等^[32]同样利用上述质谱分析方法确定了 6 种羰基化合物为代表的肺癌诊断模型,特异性诊断肺癌患者病例灵敏度可达到 96% 或更

高,非肺癌病变诊断灵敏度分别为良性结节 64%、吸烟者 86% 以及非吸烟者 100%。

酮类中萜烯酮或许有单物质诊疗价值,2015 年首次发现肺癌个体呼出气 VOCs 中该成分低于正常人且有统计学差异,但机制尚不明确。Song 等^[33]收集了非小细胞肺癌和正常对照组患者的呼吸样本,发现肺癌患者呼出气 VOCs 1-丁酮和 3-羟基-2-丁酮浓度明显高于对照组,但早期与晚期肺癌患者 VOCs 水平无显著差异。对丙酮的研究因不同学者研究方法不同,结论相反,诊断价值存在争议。

2.3 芳香族类

自 1985 年,Gordon 等人就在呼出气体中发现特征性苯及苯的衍生物,Poli 等^[34]研究发现芳香族 VOCs 浓度肺癌组明显高于非肺癌组,肺癌患者术后一个月呼出气中癸烷较术前明显下降,但其他气体成分没有明显改变,可以为肺癌患者手术后或放化疗治疗评效提供诊断依据。Oguma 等^[27]分析 116 例病理确诊肺癌患者及 37 名健康志愿者呼出气中的 14 种 VOCs,发现环己烷和二甲苯的浓度在肺癌患者中显著高于对照组,且随着癌症临床分期的进展显著增加,有 6 例小细胞肺癌患者治疗后显著降低,上述研究结论可能为临床肺癌分期及术后监测提供更加方便可行的依据。

另外,醇类的相关研究中,目前认为乙醇、侧柏醇、正丁醇等可能是早期肺癌气态标志物,但醇类大部分来自于胃和肠管中的食物,呼出气体易受受试者饮食与肠道稳态影响,参考价值有待商榷。

现今国内外呼出气肺癌相关 VOCs 研究中,单一 VOCs 检测以基础研究多见,灵敏度及特异性不高,诊断价值尚不能替代联合检测,而传统联合检测以同类型多气体联合多见,现与数字化系统联合后,通过对受试气体结果组合计算,筛查精度,从而得到最佳联合检测模型^[35]。这些发现最终可能使肺癌的无创早期发现和肺癌亚型的鉴别诊断成为可能,从而彻底改变肺癌的治疗方法。

3 研究前景及优缺点

肺癌的早期各种临床诊断方法均存在不同程度的局限性,目前临床工作中普遍认为,组织活检作为唯一可确诊方法,对于病变小且近纵膈处肺小结节

活检难度大,存在不同程度漏诊;胸部X线作为筛查方法分辨率较低,普及率相对较高,准确率相对较低;胸部CT难以分辨出较小或近纵膈、血管处占位病变,难以区别炎性病变及不典型结核病变;胸部MRI可清晰区别肿块、淋巴结、肺门、血管等结构,但肺部含气较多,普及率低;PET-CT费用较贵,临床可疑肺癌患者接受率不高;染色体及基因检测费用较贵,技术要求高;支气管镜对中心型肺癌检出率高,5~8级以下细支气管及肺组织检出受限,有创检查接受度不高;血清学检查方法特异性较低,且早期微小癌灶释放的炎性介质尚未释放入血,检测可能存在偏差。

现阶段国内肺癌的呼出气体研究仍以联合检测及辅助诊疗为主,技术应用方面尚有以下几点不足:①检测方法 & 操作采样方法各有特点及不足,缺乏统一的标准化量化依据,国内外尚未形成该类技术的临床诊疗规范共识;②除电子鼻外,呼出气体分析仪器比较复杂,缺少专业的操作人员及维护人员;③呼出气体研究尚不能完全排除外源性VOCs包括生理死腔的影响,大多研究中试图以最大程度减少以上干扰,但并不能完全消除,结果产生的偏倚不能评估;已有相关研究证实标准化后的潮汐式呼吸有助于呼出气体检测,该类技术有待继续推广;④对非癌性肺部良性病变有响应,已有研究表明,呼出气体VOCs对特异性肺纤维化、囊性纤维化有诊疗意义^[36,37]。因此,对肺癌的临床实践中需排除该类干扰所致检查结果不确定性。

呼出气体检测作为一种新兴的研究方法,同以往检查方法比较具有无创伤、费用低、依从性高、可家用等优点。针对老年人群,因其反复重复、依从性较高可被临床广泛应用,实用性较高。随着小型便携式呼出气体分析仪器推广,呼出气体检测希望为肺癌治疗及预后提供长期家用监测服务,而单一或联合VOCs检测被证实可能对肺癌诊断、分型诊断、基因检测、治疗预后评价有意义,尤其是基因检测及术后随访方面可能使临床工作获益,有待进一步研究及推广。另外,随着传感器技术及数字化分析模式的发展及推广,医学与工学有效结合,肺癌呼出气体诊断模型灵敏度及精确度不断提高,肺癌患者临床早期筛查有望成为可能。

参考文献:

- [1] Chen WQ,Zhang SW,Zou XN. Estimation and projection of lung cancer incidence and mortality in China [J]. China Cancer,2014,23(1):1-10.[陈万青,张思维,邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肿瘤,2014,23(1):1-10.]
- [2] Jemal A,Siegel R,Ward E,et al. Cancer statistics,2009 [J]. CA Cancer J Clin,2010,59(4):225-249.
- [3] Williams H,Pembroke A. Sniffer dogs in the melanoma clinic?[J]. Lancet,1989,333(8640):734.
- [4] Buszewski B,Ligor T,Rudnicka J,et al. Chapter 10-analysis of cancer biomarkers in exhaled breath and comparison with sensory indications by dogs[J]. Volatile Biomark,2013,12(1):177-192.
- [5] Amann A,Costello BL,Miekisch W,et al. The human volatilome:volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath,skin emanations,urine,feces and saliva[J]. J Breath Res,2014,8(3):034001.
- [6] Smith D,Wang T,Sul -Suso J,et al. Quantification of acetaldehyde released by lung cancer cells in vitro using selected ion flow tube mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2003,17(8):845-850.
- [7] Hanai Y,Shimono K,Matsumura K,et al. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2012,76(4):679-684.
- [8] Alkateb H,De LCB,Ratcliffe N. An investigation of volatile organic compounds from the saliva of healthy individuals using headspace-trap/GC-MS [J]. J Breath Res,2013,7(3):036004.
- [9] Oakley-Girvan I,Davis SW. Breath based volatile organic compounds in the detection of breast,lung,and colorectal cancers:a systematic review[J]. Cancer Biomark,2017,21(1):29-39.
- [10] Zhang HY,Wu XW,Xiao Y,et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1,and evaluation of oxidative stress in patients with non-small cell lung cancer [J]. Journal of China Medical University,2014,43(5):432-436.[张红艳,吴绪伟,肖谊,等. 谷胱甘肽 S-转移酶 M1、T1 基因多态性及氧化应激与非小细胞肺癌易感性[J]. 中国医科大学学报,2014,43(5):432-436.]
- [11] Xu X,Kelsey KT,Wiencke JK,et al. Cytochrome P450 CYP1A1 MspI polymorphism and lung cancer susceptibility[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,1996,5(9):687-692.
- [12] Boots AW,van Berkel JJ,Dallinga JW,et al. The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease[J]. J Breath Res,2012,6(2):027108.

- [13] Kwak J, Fan M, Harshman SW, et al. Evaluation of Bio-VOC sampler for analysis of volatile organic compounds in exhaled breath[J]. *Metabolites*, 2014, 4(4): 879–888.
- [14] Larroque V, Desauziers V, Mocho P. Comparison of two solid-phase microextraction methods for the quantitative analysis of VOCs in indoor air[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(5): 1457–1464.
- [15] Chen H, Hu B, Hu Y, et al. Neutral desorption using a sealed enclosure to sample explosives on human skin for rapid detection by EESI-MS[J]. *J Am Soc Spectrom*, 2009, 20(4): 719–722.
- [16] Capuano R, Santonico M, Pennazza G, et al. The lung cancer breath signature: a comparative analysis of exhaled breath and air sampled from inside the lungs[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16491.
- [17] Rocco G, Pennazza G, Santonico M, et al. Breathprinting and early diagnosis of lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(7): 883–894.
- [18] Barash O, Peled N, Tisch U, et al. Classification of lung cancer histology by gold nanoparticle sensors[J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(5): 580–589.
- [19] Saalberg Y, Bruhns H, Wolff M. Photoacoustic spectroscopy for the determination of lung cancer biomarkers—a preliminary investigation[J]. *Sensors*, 2017, 17(1): 210.
- [20] Gordon SM, Szidon JP, Krotoszynski BK, et al. Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer[J]. *Clin Chem*, 1985, 31(8): 1278–1282.
- [21] O'Neill HJ, Gordon SM, O'Neill MH, et al. A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer[J]. *Clin Chem*, 1988, 34(8): 1613.
- [22] Phillips M, Gleeson K, Hughes JMB, et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study[J]. *Lancet*, 1999, 353(9168): 1930–1933.
- [23] Chen X, Wang F, Lin L, et al. Association of smoking with metabolic volatile organic compounds in exhaled breath[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): E2235.
- [24] Poli D, Carbognani P, Corradi M, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study[J]. *Respir Res*, 2005, 6(1): 1–10.
- [25] Handa H, Usuba A, Maddula S, et al. Exhaled breath analysis for lung cancer detection using ion mobility spectrometry[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114555.
- [26] Filipiak W, Sponring A, Filipiak A, et al. Chapter 23- Volatile organic compounds (vocs) released by pathogenic microorganisms in vitro :potential breath biomarkers for early-stage diagnosis of disease[J]. *Volatile Biomark*, 2013, 12(2): 463–512.
- [27] Oguma T, Nagaoka T, Kurahashi M, et al. Clinical contributions of exhaled volatile organic compounds in the diagnosis of lung cancer[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0174802.
- [28] Deng C, Li N, Zhang X. Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood[J]. *J Chromatography B*, 2004, 813(1): 47–52.
- [29] Fuchs P, Loeseken C, Schubert JK, et al. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(11): 2663–2670.
- [30] Jouyban A, Djozan D, Mohammadandashti P, et al. Co-liquefaction with acetone and GC analysis of volatile compounds in exhaled breath as lung cancer biomarkers[J]. *Bioimpacts Bi*, 2017, 7(2): 99–108.
- [31] Xiao-An F, Mingxiao L, Jianjun R, et al. Noninvasive detection of lung cancer using exhaled breath [J]. *Cancer Med*, 2014, 3(1): 174–181.
- [32] Li M, Yang D, Brock G, et al. Breath carbonyl compounds as biomarkers of lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(1): 92–97.
- [33] Song G, Qin T, Liu H, et al. Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients [J]. *Lung Cancer*, 2010, 67(2): 227–231.
- [34] Poli D, Carbognani P, Corradi M, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study[J]. *Respir Res*, 2005, 6(1): 1–10.
- [35] Sakumura Y, Koyama Y, Tokutake H, et al. Diagnosis by volatile organic compounds in exhaled breath from lung cancer patients using support vector machine algorithm[J]. *Sensors*, 2017, 17(2): 287.
- [36] Yamada YI, Yamada G, Otsuka M, et al. Volatile organic compounds in exhaled breath of idiopathic pulmonary fibrosis for discrimination from healthy subjects [J]. *Lung*, 2017, 195(2): 247–254.
- [37] Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, et al. A rapid method for breath analysis in cystic fibrosis patients[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, 34(4): 745–751.