

# 初诊初治肺癌患者 20 例呼吸特征标志物研究

李 静<sup>1</sup>, 李青原<sup>1</sup>, 魏 鑫<sup>1</sup>, 任 凯<sup>2</sup>, 孙美秀<sup>1</sup>, 李迎新<sup>1</sup>, 赵路军<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院生物医学工程研究所, 天津 300192; 2. 天津医科大学肿瘤医院, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

**摘要:** [目的] 对排除自身影响因素条件下(饮食、药物和吸烟)肺癌患者呼吸标志物进行了研究, 探讨呼出气中特征性挥发性化合物对肺癌无创诊断的价值。[方法] 本实验通过气相色谱-质谱联用仪对 20 例初诊初治肺癌患者和 11 例健康志愿者空腹状态时呼出气体中挥发性化合物进行定性定量分析。[结果] 通过曼-惠特尼 U 检验对肺癌患者以及健康对照组的成分均值比较, 筛选出二硫化碳(对照组 24.21±19.94ppb, 肺癌组 1.28±3.95ppb)、正己烷(对照组 16.75±16.93ppb, 肺癌组 0.46±1.18ppb) 和乙苯(对照组 6.30±2.27ppb, 肺癌组 1.46±2.12ppb)。3 种挥发性化合物浓度差异具有统计意义(P 值均<0.05)。二硫化碳、正己烷和乙苯三种物质联合指标的受试者工作特征曲线下的面积为 0.932, 灵敏度为 95%, 特异性为 90.9%, P<0.01。[结论] 本研究初步探讨了在排除自身影响因素条件下(饮食、药物和吸烟)的肺癌呼吸特征标志物, 为肺癌呼吸标志物研究的进一步发展提供了参考依据。

**关键词:** 肺肿瘤; 初诊初治; 呼吸分析; 挥发性化合物; 气相色谱-质谱法  
**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)01-0042-05  
**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.01.B009

## Study on Tumor Markers in Exhaled Air of 20 Patients with Lung Cancer

LI Jing<sup>1</sup>, LI Qing-yuan<sup>1</sup>, WEI Xin<sup>1</sup>, REN Kai<sup>2</sup>, SUN Mei-xiu<sup>1</sup>, LI Ying-xin<sup>1</sup>, ZHAO Lu-jun<sup>2</sup>

(1. Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China; 2. Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the value of volatile compounds in exhaled air of patients with lung cancer in the non-invasive diagnosis. [Methods] The volatile compounds in the exhaled air of 20 newly diagnosed patients with lung cancer and 11 healthy volunteers in the fasting state were qualitatively and quantitatively analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Results] There were significant differences in the concentrations of three volatile compounds of carbon disulfide, hexane and ethylbenzene between healthy control group and lung cancer patients as shown by Mann-Whitney U test (carbon disulfide: 24.21±19.94ppb vs 1.28±3.95ppb, hexane: 16.75±16.93ppb vs 0.46±1.18ppb, ethylbenzene: 6.30±2.27ppb vs 1.46±2.12ppb; all P<0.05). The area under the receiver operating characteristic curve (AUC) of the combination of three volatile compounds for diagnosis of lung cancer was 0.932, the sensitivity was 95% and the specificity was 90.9% (P<0.01). [Conclusion] This study preliminarily explored the lung cancer breath markers under the condition of excluding their own influencing factors (diet, medicine and smoking), to provide a reference for the further development of lung cancer breath markers research.

**Subject words:** lung cancer; primary diagnosis and treatment; breath analysis; volatile compounds; gas chromatography-mass spectrometry

肿瘤细胞具有高代谢的特点, 自身可持续异常

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(81471701); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2018-I2M-AI-012)

**通信作者:** 孙美秀, 副研究员, 博士; 中国医学科学院 & 北京协和医学院生物医学工程研究所激光医学实验室, 天津市南开区白堤路 236 号生物医学工程研究所(300192); E-mail: meixiu\_sun@126.com

**收稿日期:** 2020-03-05; **修回日期:** 2020-07-30

合成分泌各种特殊物质, 可以较早的在人体呼吸气体中检测到。呼吸分析技术由于其无创、简便和快速的特点, 为肺癌早期筛查与诊断提供了一种具有高应用前景的方法<sup>[1]</sup>。

肺癌呼吸分析诊断方法主要依据患者呼出的气

体中是否包含肺癌的特征气体成分,因此肺癌特征气体成分的确成为肺癌呼吸气体诊断方法的关键所在。根据近十年关于肺癌呼吸标志物的文献<sup>[2-20]</sup>,虽然不同研究表明呼吸气体分析技术诊断肺癌的可行性,但由于不同研究之间的呼吸标志物缺乏重复性,而无法确定统一,从而阻碍了临床应用的发展。据文献报道药物以及吸烟习惯可影响呼吸气体成分,同时年龄以及性别也可以影响呼吸气体的性质,然而与药物以及吸烟习惯因素相比,影响程度要小很多。为了进一步研究在排除人体自身影响因素对呼吸气体成分影响条件下的肺癌呼吸标志物,本文采用了目前肺癌呼吸标志物研究中使用最多的气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer,GC-MS)技术,对20例肺癌患者在严格的控制条件下(空腹、没有使用过任何肺癌相关药物、不吸烟或已戒烟一个月以上)条件下的呼吸气体进行了定量检测,利用曼-惠特尼U检验分析方法对肺癌呼吸标志物的确定进行了研究比较,探讨在排除自身影响因素条件下(饮食、药物和吸烟)的肺癌呼吸特征标志物,为肺癌呼吸标志物研究提供了参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 呼吸分析志愿者

收集2016年8月6日至2018年10月30日在天津医科大学肿瘤医院放疗科初诊初治的20例不吸烟或已戒烟1个月以上的肺癌患者的呼出气体,并记录临床资料(包括性别、年龄、身高、体重、病理类型和临床分期等信息),11例不吸烟健康志愿者来自于中国医学科学院生物医学工程研究所,表征健康、没有可能影响结果的呼吸系统或其他疾病史。本研究获得天津医科大学肿瘤医院医学伦理委员会批准以及中国临床试验注册(中心试验注册号ChiCTR1900023659),研究对象均签署知情同意书。

20例肺癌患者,男性13例,女性7例;平均年龄为50岁(年龄范围:32~69岁);小细胞肺癌1例,鳞癌5例,腺癌14例,13例肺癌患者有临床分期(Ⅲ期3例,Ⅳ期10例);11例健康对照组中,男性6例,女性5例;平均年龄为29.22岁(年龄范围:24~38)(Table 1)。

### 1.2 呼吸气体样本收集

收集气体前1天,受试者被要求禁止食用具有强烈气味的食物,如洋葱、韭菜、大蒜等。测试前空腹时间长达12h,可饮水。早上八点左右在天津医科大学肿瘤医院放疗科收集呼吸样本。收集呼吸样本时,受试者深吸一口气后将单次呼吸的潮气末量通过一次性吹嘴以正常呼吸速度呼入体积为1L的聚全氟乙烯材质的呼吸采样袋(北京浩辰天诚环保科技有限公司)中。每个受试者采集2袋气体样本(一口气1袋),将采样袋放置于保温箱(避光,恒温)中,1h内送至天津市环境保护科学研究院,采用GC-MS技术检测受试者呼出气体中的挥发性化合物。每个采样袋在使用前后均用高纯度氮气(>99.999%,天津市安兴工业气体销售有限公司)反复冲洗3次以上,并抽真空待使用。

### 1.3 GC-MS检测

样品气体经过ENTECH7100冷阱预浓缩系统浓缩,脱水蒸气、CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>后,进入GC-MS系统(美国Agilent7890-5975C)进行分析测定,使用的色谱柱为DB-5MS毛细管(60mm×0.32mm×1μm)。GC检测条件:起始温度为35℃,维持5min,以5℃/min的速度上升至150℃,最后以15℃/min的速度上升至270℃,维持7min。进样口温度为100℃,载气流速为1.5ml/min;MS检测条件:离子源温度为230℃,接口温度为280℃。扫描速度为0.2s/scan。扫描方式设为全扫描和选择离子检测方式。每次分析之前,使用混合标准气体(美国Spectra Gases公司)对标准曲线进行校准。样品定性通过各化合物的保留时间和谱库中标准质谱图检索来进行,定量则使用内标法。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析。肺癌

Table 1 Clinical data of subjects( $\bar{x}\pm s$ )

Factor	Healthy control (n=11)	Lung cancer (n=20)
Gender		
Male	6(54.55%)	13(65%)
Female	5(45.45%)	7(35%)
Age(years)	29.21±7.10	50.00±5.10
Small-cell lung cancer	-	1(5%)
Aquamous carcinoma	-	5(25%)
Adenocarcinoma	-	14(70%)
Weight(kg)	63.99±7.30	65.35±12.15
Height(cm)	165.66±8.91	164.44±9.61

患者与对照组呼出气中挥发性化合物含量的比较采用曼-惠特尼 *U* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 筛选肺癌相关的挥发性化合物

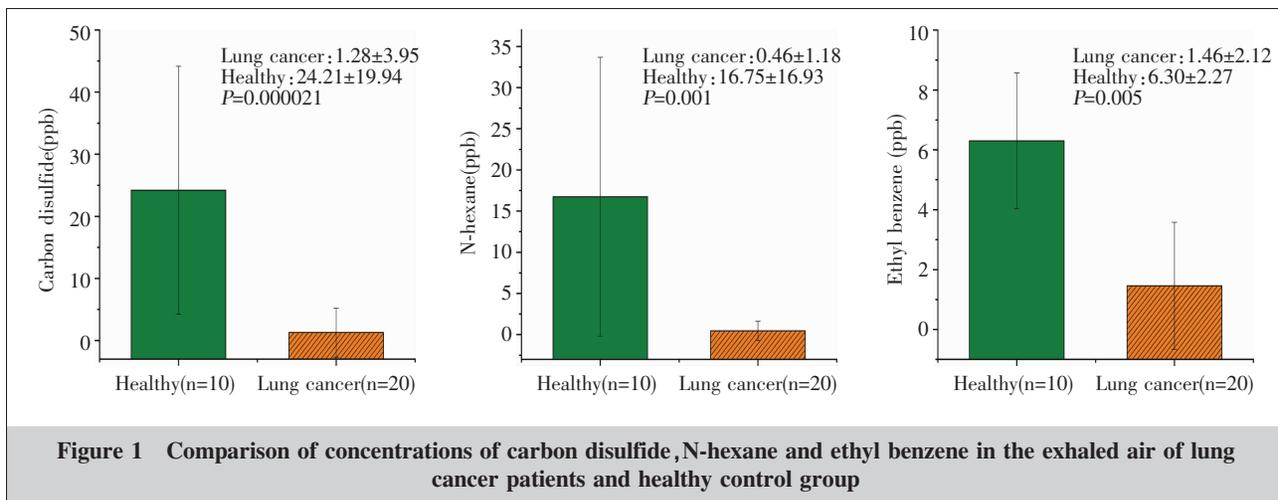
本文针对受试者呼吸气体中出现频率在 30% 以上的挥发性化合物进行了筛选, 鉴定出同时出现在健康志愿者组和肺癌患者组呼吸气体中的 17 种挥发性成分 (Table 2), 肺癌组二硫化碳、正己烷与乙苯的浓度显著性低于健康对照组 (Figure 1)。对受试者呼出气体中的二硫化碳、正己烷和乙苯数据进

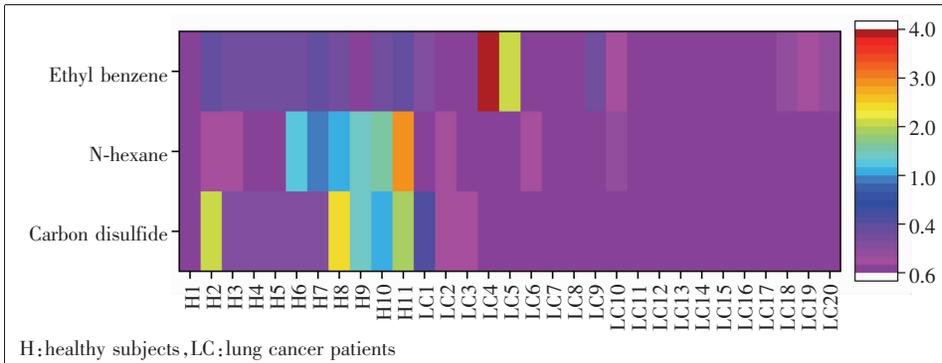
行 *Z*-score 标准化, 绘制浓度热图 (Figure 2), 表明除了 LC4 和 LC5 的乙苯高于健康受试者之外, 其余肺癌患者中每种气体的浓度均低于健康受试者。

为了全面和准确地评价呼出气中二硫化碳、正己烷与乙苯浓度联合用于肺癌的诊断价值, 采用了受试者工作特征 (receiver operating characteristic curve, ROC) 曲线分析法 (Figure 3)。图 3 绘制了二硫化碳、正己烷、乙苯以及三种物质联合用于肺癌的 ROC 曲线, 二硫化碳、正己烷和乙苯的 AUC 分别为 0.925、0.816 和 0.800, 结果表明呼出气中二硫化碳、正己烷与乙苯浓度联合对肺癌的诊断更有意义, AUC=0.932, 敏感度为 90.9%, 特异性为 95%, *P*<0.001。

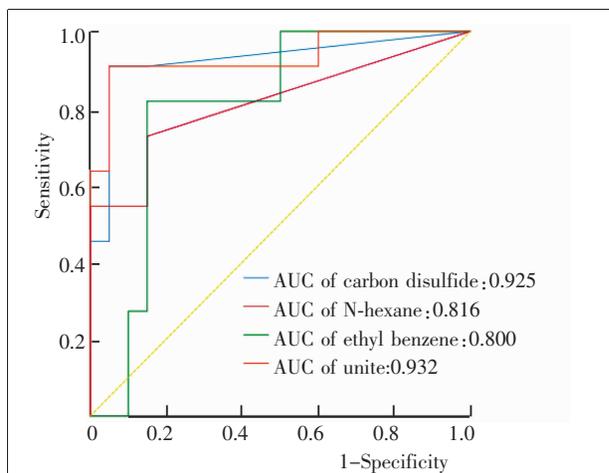
**Table 2 Comparison of mean values of volatile compounds on the breath of lung cancer patients and the healthy control group**

No.	Compounds	Chemical structure	CAS	Concentration (ppb)		<i>P</i>
				Healthy control	Lung cancer	
1	Methyl sulfide	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S	75-18-3	6.91~64.97	0~41.08	0.225
2	Carbon disulfide	CS <sub>2</sub>	75-15-0	0~45.25	0~14.25	<0.001
3	Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	5989-27-5	8.17~70.17	0~60.04	0.482
4	Ethyl acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	5.71~14.83	0~15.08	0.109
5	Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	64-17-5	103.94~379.75	0~1517.92	0.342
6	Acetone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	67-64-1	746.67~4194.67	2.79~10157.83	0.927
7	Methylene chloride	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	75-09-2	0.83~9.75	0~5.81	0.095
8	N-hexane	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	110-54-3	0~40.17	0~3.60	0.001
9	Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	67-66-3	0.67~8.83	0~7.94	0.575
10	1, 2-Dichloroethane,	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	107-06-2	0~5.04	0~7.17	0.060
11	Benzene	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	71-43-2	0~1.58	0~25.42	0.067
12	Toluene	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	108-88-3	0.67~5.60	0~44.75	0.575
13	Ethyl benzene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	100-41-4	0.67~6.58	0~36.83	0.005
14	Meta-xylene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	108-38-3	0~3.92	0~98.69	0.451
15	Paraxylene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106-42-3	0~3.90	0~7.73	0.164
16	O-xylene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	95-47-6	0~1.92	0~37.67	0.076
17	2-Methyl-1, 3-butadiene	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>	78-79-5	0~1440.33	0~2101.33	0.322





**Figure 2** Heat map of exhalation concentrations of carbon disulfide, N-hexane and ethyl benzene in lung cancer patients and healthy controls



**Figure 3** ROC curves of carbon disulfide, N-hexane and ethyl benzene combined with three gas concentrations

### 3 讨论

根据目前能检索到关于肺癌患者与健康志愿者对比筛选出的肺癌呼吸标志物的文献<sup>[2-20]</sup>,肺癌患者和健康人对照分类的敏感度为 32%~100%、特异性为 48%~100%和准确率为 69.2%~100%以及生物标志物的统计信息。虽然不同研究表明呼吸气体分析技术诊断肺癌的可行性,但由于不同研究之间的呼吸标志物缺乏重复性,而无法确定统一,从而阻碍了临床应用的发展。通过对从 1985—2018 年所发表的肺癌呼吸标志物研究文献中所使用的分析技术来看,作为痕量气体检测的金标准,气相色谱质谱技术(GC-MS)的使用占所用技术使用的 52.6%,其他技术包括电子鼻、PTR-MS 和其他技术。各研究采样时对影响因素的控制条件来看,仅有 2 篇文章<sup>[4-5]</sup>同时控制由于人体自身影响因素(饮食、药物和吸烟)条

件下的肺癌呼吸标志物进行研究,2016 年 Gasparri 等<sup>[15]</sup>记录了受试者的人口统计信息、共病情况(高血压、心脏病、代谢性疾病,如糖尿病、肥胖、血脂异常、哮喘和肝炎)、癌症的治疗和特征(组织学、结节分期和结节大小)。要求受试者在测试前 8 小时内切勿进食(水除外),采样前 1 天禁止食用

大蒜、洋葱等有香味的食物;采样前一晚起不得吸烟;受试者在前一天晚上吃完最后一餐后刷牙;最后,在呼吸测试前 24 小时内避免使用香水或香皂。手术前未接受过放疗或化疗进行采样。本研究采用了更为严格的限制条件,没有使用过任何肺癌相关药物的初诊初治患者,在不吸烟或戒烟一个月以上和空腹条件以探讨肺癌诱导的呼出气体成分及浓度的变化。目前报道的肺癌特征性化合物在机体内的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<sup>[21]</sup>:挥发性有机化合物是氧化应激的产物,可以对细胞中的蛋白质、多不饱和脂肪酸和 DNA 造成过氧化损伤。在肺癌中,氧化应激似乎有所增加,内源性挥发性有机物成分及浓度因此发生改变,肺泡细胞可将内源性挥发性有机物直接经呼吸道排出,可以在较早的在呼出气体中检测到<sup>[22]</sup>;(2)细胞色素 P450(CYP450)学说<sup>[23]</sup>:肺癌个体 P450 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<sup>[24]</sup>:肺癌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特征性的代谢产物由代谢系统排出体外。本研究的志愿者呼出气中的化合物烷类、酮类是人体代谢过程的产物<sup>[4]</sup>;苯类与吸烟有关<sup>[25]</sup>。本实验未统计不吸烟受试者是否被动吸烟;二硫化碳可能是细菌在体内活动产生的<sup>[26]</sup>。丙酮是在乙酰乙酸和乙酰辅酶 A 的脱羧反应中形成的,其他物质是外源性物质<sup>[4]</sup>。

本研究收集 20 例初诊初治肺癌患者空腹状态下的呼吸气体,避免人体自身影响因素(饮食、药物和吸烟)对呼吸气体成分影响,采用 GC-MS 技术对

受试者呼出气体中的挥发性化合物进行定性定量检测,结果表明,在饮食、药物和吸烟控制的条件下,筛选出呼出气体中的二硫化碳、正己烷和乙苯可用于肺癌诊断的特征性化合物(二硫化碳、正己烷和乙苯三种物质联合指标的 AUC=0.932,敏感度为 90.9%,特异性为 95%)。与发表文献进行了对比分析,2012 年 Wang 等<sup>[17]</sup>筛选出正己烷作为肺癌的呼吸标志物之一,2011 年 Ulanowska 等<sup>[15]</sup>研究筛选出了乙苯作为肺癌的呼吸标志物之一,2019 年 Rudnicka 等<sup>[19]</sup>筛选出二硫化碳作为肺癌的呼吸标志物之一。本研究对 20 例肺癌患者在严格的控制条件下(空腹、没有使用过任何肺癌相关药物、不吸烟或已戒烟一个月以上)的呼吸气体标志物进行了初步研究,为肺癌呼吸标志物研究的进一步发展提供了参考。检测呼吸挥发性化合物具有非侵入性、无痛苦、不昂贵等优点,结合影像学等检查方法,检测呼出气体中的化合物对诊断肺癌具有一定的临床价值;但由于此次试验中样本量较小,不足以排除个体差异影响,应进一步扩大样本量,进行多中心、前瞻性研究。

## 参考文献:

- [1] Li Z, Shu J, Yang B, et al. Emerging non-invasive detection methodologies for lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(5):3389–3399.
- [2] D'Amico A, Pennazza G, Santonico M, et al. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(2):170–176.
- [3] Poli D, Goldoni M, Corradi M, et al. Determination of aldehydes in exhaled in breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME-GC/MS[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(27):2643–2651.
- [4] Rudnicka J, Kowalkowski T, Ligor T, et al. Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(30):3360–3366.
- [5] Ulanowska A, Kowalkowski T, Trawińska E, et al. The application of statistical methods using VOCs to identify patients with lung cancer[J]. *J Breath Res*, 2011, 5(4):046008.
- [6] Santonico M, Lucantoni G, Pennazza G, et al. In situ detection of lung cancer volatile fingerprints using bronchoscopic air-sampling[J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(1):46–50.
- [7] Wang D, Yu K, Wang Y, et al. A hybrid electronic noses' system based on mos-saw detection units intended for lung cancer diagnosis [J]. *J Inno Opt Health Sci*, 2012, 5(1):1150006.
- [8] Wang Y, Hu Y, Wang D, et al. The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines[J]. *Cancer Biomark*, 2012, 11(4):129–137.
- [9] Bousamra M 2nd, Schumer E, Li M, et al. Quantitative analysis of exhaled carbonyl compounds distinguishes benign from malignant pulmonary disease [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 148(3):1074–1081.
- [10] Fu XA, Li M, Knipp RJ, et al. Noninvasive detection of lung cancer using exhaled breath[J]. *Cancer Med*, 2014, 3(1):174–181.
- [11] 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.
- [12] Hubers AJ, Brinkman P, Boksem RJ, et al. Combined sputum hypermethylation and eNose analysis for lung cancer diagnosis[J]. *J Clin Pathol*, 2014, 67(8):707–711.
- [13] Rudnicka J, Walczak M, Kowalkowski T, et al. Determination of volatile organic compounds as potential markers of lung cancer by gas chromatography-mass spectrometry versus trained dogs[J]. *Sens Actuators B. Chem*, 2014, 202(31):615–621.
- [14] Ligor T, Pater L, Buszewski B. Application of an artificial neural network model for selection of potential lung cancer biomarkers[J]. *J Breath Res*, 2015, 9(2):027106.
- [15] Gasparri R, Santonico M, Valentini C, et al. Volatile signature for the early diagnosis of lung cancer[J]. *J Breath Res*, 2016, 10(1):016007.
- [16] Nisreen S, Cancilla JC, Torrecilla JS, et al. Silicon nanowire sensors enable diagnosis of patients via exhaled breath[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(7):7047–7057.
- [17] Callol-Sanchez L, Munoz-Lucas MA, Gomez-Martin O, et al. Observation of nonanoic acid and aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer[J]. *J Breath Res*, 2017, 11(2):026004.
- [18] Wang M, Sheng J, Wu Q, et al. Confounding effect of benign pulmonary diseases in selecting volatile organic compounds as markers of lung cancer[J]. *J Breath Res*, 2018, 12(4):046013.
- [19] Rudnicka J, Kowalkowski T, Buszewski B. Searching for selected VOCs in human breath samples as potential markers of lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2019, 135:123–129.
- [20] Gashimova E, Temerdashev A, Porkhanov V, et al. Investigation of different approaches for exhaled breath and tumor tissue analyses to identify lung cancer biomarkers[J]. *Heliyon*, 2020, 6(6):e04224.
- [21] Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, et al. Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress[J]. *Eur Respir J*, 2003, 21(1):48–51.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Yu H, Xu L, Wang P. Solid phase microextraction for analysis of alkanes and aromatic hydrocarbons in human breath [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 826(1–2):69–74.
- [26] Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, et al. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171(11):1286–1291.