

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000268

HPLC-ED检测血浆游离型甲氧基肾上腺素类物质诊断嗜铬细胞瘤及预后观察

杨香春¹, 甄乾娜², 李启富², 丁敏¹

(1. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨高效液相色谱-电化学法(high performance liquid chromatography-electrochemical detection, HPLC-ED)检测血浆游离型甲氧基肾上腺素类物质(metanephrines, MNs)在嗜铬细胞瘤中诊断应用和预后观察。**方法:**采用 HPLC-ED 检测分析血浆游离型 MNs 嗜铬细胞瘤患者 21 例、健康对照组 26 例、原发性高血压组 23 例和非嗜铬细胞瘤性肾上腺占位性疾病组 24 例。**结果:**嗜铬细胞瘤患者血浆游离型 MNs 浓度明显高于其他 3 组($P<0.05$);以甲氧基去甲肾上腺素(normetanephrine, NMN) 150 ng/L 和(或)甲氧基肾上腺素(metanephrine, MN) 120 ng/L 为切点, 诊断敏感度、特异性分别为 100%、89%。NMN、MN 浓度与肿瘤体积密切相关($\text{NMN}: r=0.952, P=0.000$; $\text{MN}: r=0.510, P=0.018$)。嗜铬细胞瘤患者在肿瘤切除后血 MNs 浓度迅速降低。**结论:**血浆游离型 MNs 是诊断嗜铬细胞瘤和预后观察的良好标志物。

【关键词】高效液相色谱-电化学法; 甲氧基肾上腺素类物质; 嗜铬细胞瘤

【中图分类号】R446.11*2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-09

Plasma free metanephrines measured by HPLC-ED in the diagnosis of pheochromocytoma and prognosis observation

Yang Xiangchun¹, Zhen Qianna², Li Qifu², Ding Min¹

(1. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University;

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the clinical significance of plasma free metanephrines (MNs) in the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma by high performance liquid chromatography-electrochemical detection (HPLC-ED). **Methods:** HPLC-ED was carried out to detect plasma free MNs, including 21 patients with pheochromocytoma, 26 healthy volunteers, 23 patients with primary hypertension and 24 patients with adrenal mass but without pheochromocytoma. **Results:** Plasma concentrations of free MNs in patients with pheochromocytoma were significantly increased compared with those of other groups ($P<0.05$). Taking normetanephrine (NMN) 150 ng/L and (or) metanephrine (MN) 120 ng/L as cut-off value, the sensitivity and specificity for diagnosis of pheochromocytoma were 100% and 89% respectively. Plasma concentrations of free MNs showed significant positive relationships with tumors size in patients with pheochromocytomas ($\text{NMN}: r=0.952, P=0.000$; $\text{MN}: r=0.510, P=0.018$). Plasma concentrations of free MNs in patients with pheochromocytoma dropped rapidly after the surgery. **Conclusion:** Plasma free MNs are good markers for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma.

【Key words】high performance liquid chromatography-electrochemical detection; metanephrines; pheochromocytoma

嗜铬细胞瘤是一种主要存在于肾上腺的罕见肿瘤,分泌大量儿茶酚胺,常引起高血压,若不及时诊断,贻误治疗,可造成严重的心、脑、肾血管损害,甚至死亡^[1]。嗜铬细胞瘤的诊断依赖高血压和“头

痛、心悸、出汗”三联征等临床表现,部分患者临床表现不典型,而影像学检查不易区分肿瘤的性质,须进行儿茶酚胺相关生化检查对其进行诊断^[2]。

儿茶酚胺及其代谢产物尿香草扁桃酸(vanillyl-mandelic acid, VMA)的检测,一定程度上提高了嗜铬细胞瘤的诊断水平,但缺乏足够的准确性。儿茶酚胺在儿茶酚-O-甲基转移酶(catechol-O-methyl-transferase, COMT)作用下转换成甲氧基肾上腺素类

作者介绍:杨香春, Email: 344827564@qq.com,

研究方向:甲氧基肾上腺素类物质的分析研究。

通信作者:丁敏, Email: dingmin@cqmu.edu.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000268.html>

物质(metanephrines, MNs), 主要包括甲氧基去甲肾上腺素(normetanephrine, NMN)和甲氧基肾上腺素(metanephrine, MN)。研究发现与儿茶酚胺及其代谢产物尿 VMA 相比, 血 MNs 有更高的敏感度和特异性^[3-5], 对嗜铬细胞瘤诊断意义更大。血 MNs 检测方法主要有高效液相色谱-电化学法(high performance liquid chromatography-electrochemical detection, HPLC-ED)^[6], 高效液相色谱-串联质谱法^[7], 放射免疫和酶联免疫^[8]等方法。免疫法存在非特异性结合、交叉反应等问题。

本实验基于 Lenders 等^[6]方法, 建立了 HPLC-ED 法检测血浆游离型 MNs, 对正常人、嗜铬细胞瘤、高血压病和非嗜铬细胞瘤性肾上腺占位患者进行检测, 并探讨其在嗜铬细胞瘤中诊断、鉴别诊断和预后观察。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和材料

美国 Waters 公司高效液相色谱仪, 包括 Waters1525 泵、Waters2465 电化学检测器和 Waters2707 自动进样器。NMN 盐酸盐和內标 4-羟基-3-甲氧基苄胺盐酸盐(4-Hydroxy-3-methoxybenzylamine hydrochloride, HMBA)购自美国 Sigma 公司。MN 盐酸盐、甲醇、乙腈和辛烷磺酸钠购自北京百灵威公司。其它试剂为国产分析纯, 实验用水来自 Milli-Q 超纯水装置。

1.2 研究对象

嗜铬细胞瘤患者(经手术后病理证实)共计 21 例, 其中肾上腺嗜铬细胞瘤 17 例, 膀胱异位嗜铬细胞瘤 1 例, 副神经节瘤 2 例, 恶性副神经节瘤 1 例, 年龄 13~73 岁, 男性 11 例, 女性 10 例。健康对照组 26 例, 年龄 22~63 岁, 男性 11 例, 女性 15 例。原发性高血压组(高血压病)23 例, 年龄 22~77 岁, 男性 13 例, 女性 10 例。非嗜铬细胞瘤性肾上腺占位性疾病组(经术后病理证实, 简称“肾上腺占位”)24 例, 年龄 21~78 岁, 男性 10 例, 女性 14 例。

1.3 样本采集

受试者采血前 1 周禁用对乙酰氨基酚类和儿茶酚胺类药物, 采血前 1 d 禁食香蕉、茶、咖啡等, 以避免对实验结果的影响。空腹 10 h, 采血前休息 15 min, 采集 4 ml 全血置于预冷(4℃)肝素抗凝管中, 冰上保存至离心。2 h 内分离血浆, -80℃保存至分析。

1.4 样本处理

使用 Agilent SampliQ Silica SCX 固相萃取小柱(100 mg, 1 ml)对血浆标本进行预处理。用 5 ml 10% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 甲醇(体积比 1:3), 2 ml 10 g/L KOH 甲醇溶液和 2 ml 超纯水活化萃取小柱。1 ml 血浆加入 5 ml 超纯水、200 μl 0.2 mol/L 醋酸和 100 μl 10 $\mu\text{g/L}$ 內标 HMBA, 混匀上样, 控制流速 1~2 ml/min。

用 2 ml 10 mmol/L 醋酸: 甲醇(体积比 9:1)、2 ml 10 mmol/L 磷酸铵和 2 ml 超纯水淋洗萃取柱。最后 2 ml 氨水甲醇溶液洗脱收集, 真空抽干后 100 μl 0.2 mol/L 醋酸复溶, 50 μl 进样。

1.5 色谱条件

流动相为含 0.1 mol/L 磷酸二氢钠、0.40 mmol/L EDTA、0.50 mmol/L 辛烷磺酸钠溶液(pH 3.2): 乙腈(95.5:4.5), 用 0.22 μm 孔径滤膜过滤, 脱气备用。流速 0.6 ml/min。ZORBAX SB-C18 色谱柱(3.0 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μm , 美国 Agilent 公司), 柱温 30℃。检测器检测电压+0.85 V, 测定量程 50 nA。

1.6 统计方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 法, 相关性分析采用 Person 相关分析, 双变量分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 方法学评价

将不同浓度 MNs 标准工作液加入混合血浆中, 按“样品处理”操作, 进行测定。以待测物峰面积与內标峰面积之比减去基质中待测物峰面积与內标峰面积之比为 Y, 待测物浓度为 X, 权重因子 $W=1/X$, 作加权回归分析。线性范围 25~2 000 ng/L, $Y_{\text{NMN}}=7.57 \times 10^{-4}X-9.45 \times 10^{-3}$, $r=0.999$, $Y_{\text{MN}}=7.12 \times 10^{-4}X-1.26 \times 10^{-2}$, $r=0.999$; 检测限($S/N=3$)NMN 为 11 ng/L, MN 为 13 ng/L。

对高(NMN 925 ng/L、MN 342 ng/L)、低(NMN 60 ng/L、MN 74 ng/L)浓度的混合血浆进行精密度实验, 日内重复测定 5 次, 连续测定 5 d。NMN 高、低浓度的变异系数日内分别为 1.7%、5.3%, 日间分别为 2.1%、5.9%; MN 高、低浓度的变异系数日内分别为 3.3%、4.0%, 日间分别为 2.8%、6.6%。

在血浆中分别添加 50、500、1 000 ng/L NMN 和 MN 混合标准品时, NMN 相对回收率分别为 86.6%、97.4% 和 99.9%, MN 相对回收率分别为 116.9%、106.0% 和 107.4%。

2.2 血 MNs 浓度分析

用所建立的方法对标本进行测定, 色谱图见图 1, 结果见图 2 与表 1。

嗜铬细胞瘤患者血浆游离型 MNs 浓度升高明显, 分布范围宽, 与其他 3 组差异显著。正常人、高血压和肾上腺占位 3 组间差异则无统计学意义。

2.3 敏感度和特异性

采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析血 MNs 诊断嗜铬细胞瘤的敏感度和特异性, 结果见表 2。以 NMN 150 ng/L 和(或)MN 120 ng/L 为切点, 敏感度和特异性最佳, 分别为 100%、89%。

2.4 嗜铬细胞瘤患者血 MNs 浓度与肿瘤体积的相关性

对嗜铬细胞瘤患者血 MNs 浓度和肿瘤体积进行相关性分析, 结果见图 3。患者肿瘤体积与血浆中游离型 NMN 浓度

($r=0.952, P=0.000$) 相关性显著, 与 MN 浓度 ($r=0.510, P=0.018$) 相关性良好。

2.5 嗜铬细胞瘤术后血 MNs 水平

对 9 例嗜铬细胞瘤患者肿瘤切除后的 MNs 浓度进行了

测定, 浓度变化见图 4。3 例患者手术后连续检测血浆游离型 MNs 浓度 3 d, 其中 2 例在 3 d 内下降到正常水平, 其余患者在手术 1 个月后检测, MNs 下降至正常水平, 1 例患者手术后多次检测, 均未下降到正常。

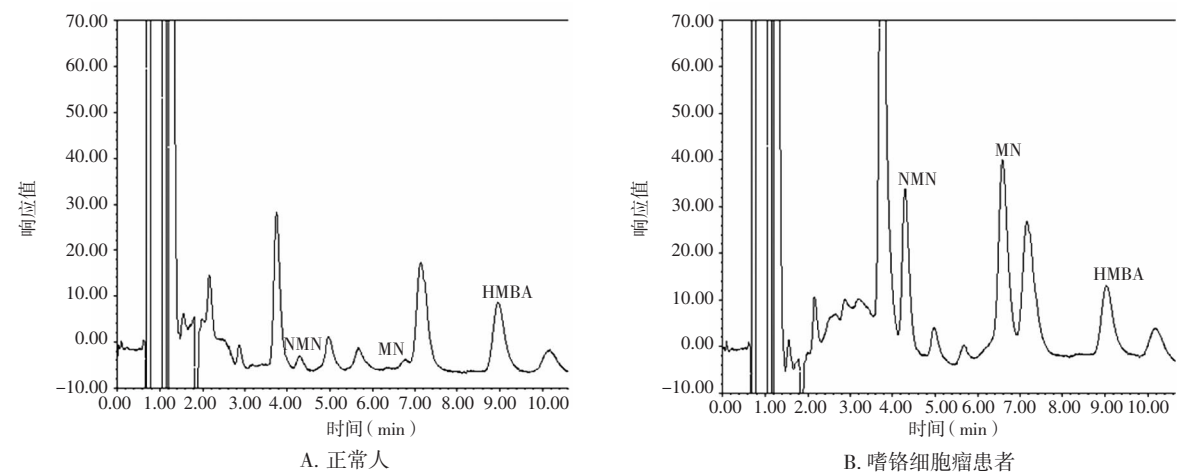


图 1 色谱图

Fig.1 Chromatograms obtained from a normal volunteer (A) and a patient with pheochromocytoma (B)

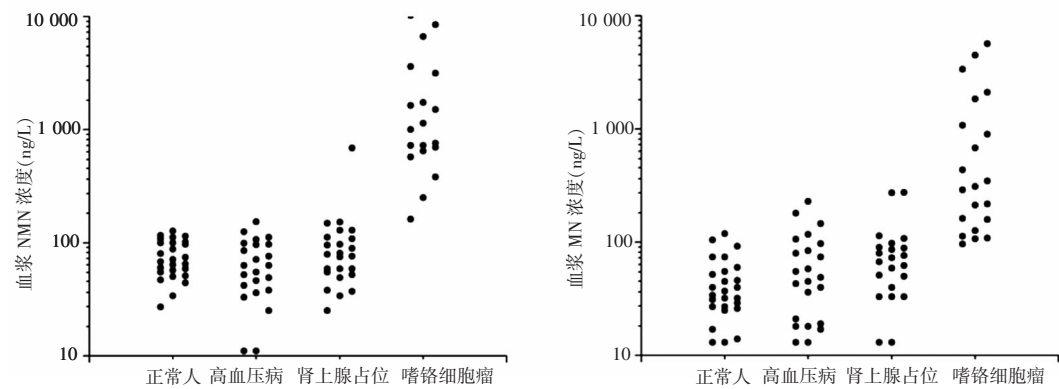


图 2 不同组别血浆游离型 MNs 浓度水平

Fig.2 Concentrations of plasma free MNs in each group

表 1 不同组别血浆游离型 MNs 浓度 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

	正常人 ($n=26$)	高血压病 ($n=23$)	肾上腺占位 ($n=24$)	嗜铬细胞瘤 ($n=21$)	F 值	P 值	P_1 值	P_2 值	P_3 值	P_4 值	P_5 值	P_6 值
NMN	76 ± 28	67 ± 37	105 ± 129	$5\,601 \pm 11\,414$	5.717	0.001	0.001	0.001	0.001	0.996	0.985	0.981
MN	45 ± 28	68 ± 57	68 ± 67	$1\,088 \pm 1\,580$	10.251	0.000	0.000	0.000	<0.001	0.914	0.873	0.961

注: P_4 组间比较; P_1 , 正常人与嗜铬细胞瘤比较; P_2 , 高血压病与嗜铬细胞瘤比较; P_3 , 肾上腺占位与嗜铬细胞瘤比较; P_4 , 正常人与高血压病比较; P_5 , 正常人与肾上腺占位比较; P_6 , 高血压病与肾上腺占位比较

表 2 血 MNs 诊断嗜铬细胞瘤的敏感度和特异性

	截断值	敏感度 (n/N)	特异性 (n/N)	ROC 曲线下面积 ($95\%CI$)	P 值 ^a
NMN	150 ng/L	100% (21/21)	96% (70/73)	0.997 (0.000~1.000)	0.000
MN	120 ng/L	81% (17/21)	93% (68/73)	0.963 (0.930~0.996)	0.000
NMN 和 (或) MN	150 ng/L 和 (或) 120 ng/L	100% (28/28)	89% (65/73)		

注: a, 无效假设: 真实面积 = 0.5。

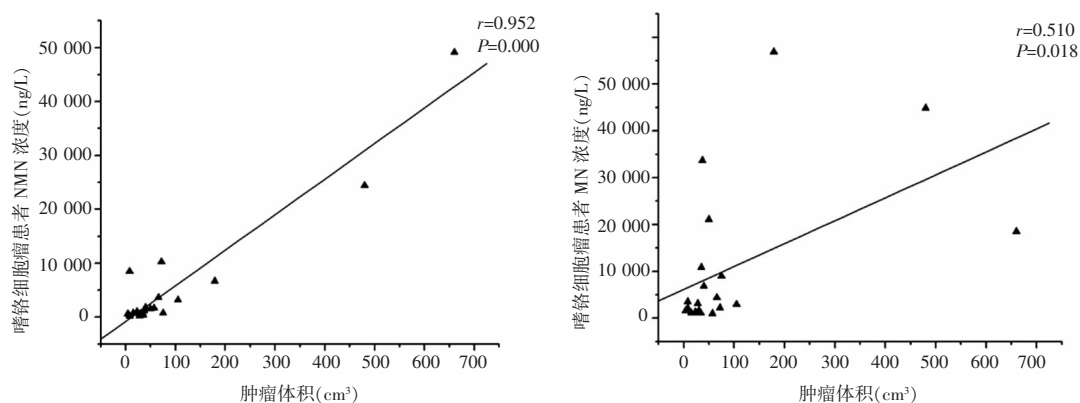


图3 嗜铬细胞瘤患者血 MNs 浓度和肿瘤体积相关性

Fig.3 Correlations of plasma free MNs with tumor size in patients with pheochromocytoma

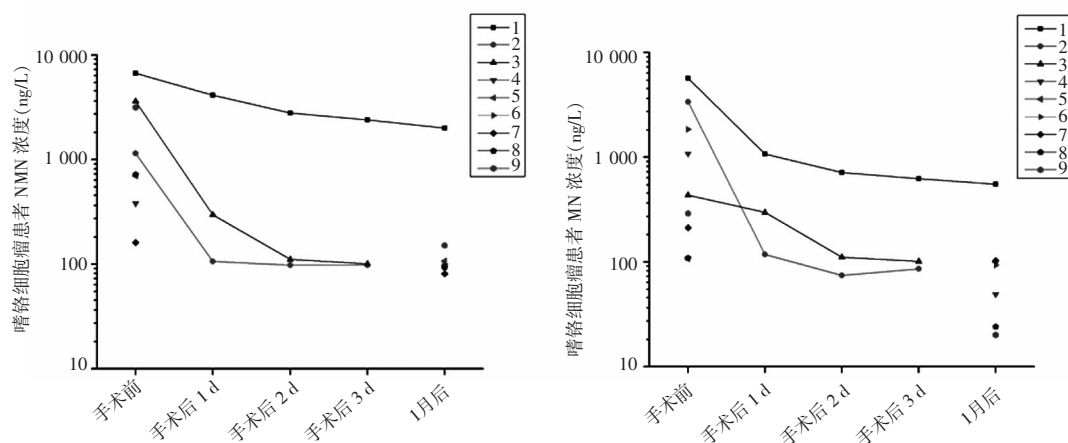


图4 嗜铬细胞瘤患者手术前后血 MNs 浓度变化

Fig.4 Concentrations of plasma free MNs in pheochromocytoma before and after the surgery

3 讨论

血浆游离型 MNs 敏感度、特异性高,是国际上诊断嗜铬细胞瘤的推荐生化指标^[9]。目前国内临床上诊断嗜铬细胞瘤主要采用尿液儿茶酚胺及其代谢产物尿 VMA,少数采用尿液 MNs,仅 1 篇文献采用 HPLC-ED 检测血浆 MNs^[10]。本方法检测时间缩短为 18 min,精密度、准确度均优于已报道方法^[6,10]。本实验嗜铬细胞瘤患者血浆游离型 MNs 浓度升高明显,用 ROC 曲线对诊断效率进行分析,NMN 和 MN 敏感度分别为 100%、81%,与文献报道相似^[6,10]。不同来源的嗜铬细胞瘤分泌去甲肾上腺素和肾上腺素比例不同^[11],导致血浆游离型 NMN 和 MN 浓度升高有所差异。血浆游离型 NMN 和 MN 联合检测可以提高嗜铬细胞瘤诊断的准确性。

本实验血浆游离型 MNs 特异性为 89%,23 例高血压病人中 NMN 异常 1 例,浓度 153 ng/L,MN 异常 3 例,浓度 146~229 ng/L;24 例非嗜铬细胞瘤性肾上腺占位病人中 NMN 异常 2 例,浓度分别为 152、685 ng/L,MN 异常 2 例,浓度分别为 273、275 ng/L。上述患者由于个体差异、临床病理生理复杂等导致血 MNs 升高,但也不能排除这些肿瘤具有一定分泌儿茶酚胺的功能;1 例 NMN 升高明显的患者为肾上腺明显增生性病变,可能由于肾上腺髓质增生活跃引起儿茶酚胺分泌增加、COMT 酶活性升高造成;5 例 MN 浓度升高的患者中 2 例肾功能异常,与文献报道^[12-13]相符。肾功能异常患者血浆游离型 MNs 升高的具体原因目前尚不明确,血浆游离型 MNs 受肾脏清除影响小,可能是交感神经兴奋引起。对于存在肾功能异常的患者,血 MNs 诊断嗜铬细胞瘤时可能出现假阳性。

嗜铬细胞瘤患者血浆游离型 MNs 浓度与肿瘤体积相关性良好^[14]。血 MNs 浓度受肿瘤体积影响,肿瘤体积越大,分泌儿茶酚胺能力越强,转换生成的血浆游离型 MNs 越多。文献报道^[15-16],嗜铬细胞瘤肿瘤体积越大转移风险越高,对于肿瘤体积大、血 MNs 浓度高的患者应高度重视。本实验结果显示 1 例恶性副神经节瘤患者肿瘤体积(7.5 cm³)小,血 MNM 浓度(8 469 ng/L)是相似体积嗜铬细胞瘤患者 52 倍,这是由于恶性嗜铬细胞瘤肿瘤分泌儿茶酚胺的能力较良性嗜铬细胞瘤强^[17]。患者若血浆游离型 MNs 浓度与肿瘤体积相关性差,可能提示肿瘤恶性。

本实验对其中 9 例嗜铬细胞瘤患者在手术切除肿瘤后,复查血 MNs。随着肿瘤的切除,血 MNs 浓度明显下降,其中 8 例在术后第 3 天血 MNs 恢复至正常,1 例肿瘤体积巨大的患者,手术后 1 个月血 MNs 仍高于正常范围,目前正对患者进行追踪,以明确是否存在残余的肿瘤。嗜铬细胞瘤患者在肿瘤切除后,由大量儿茶酚胺引起的高血压及伴随症状逐渐消失,获得治愈,体内的 MNs 在短期内下降至正常水平。嗜铬细胞瘤患者手术后可能出现复发和转移,年轻、肿瘤体积大、家族遗传和肾上腺外的患者复发率较高,对患者进行规律的回访,复查血 MNs 十分必要。

综上所述,血浆游离型 MNs 可用于嗜铬细胞瘤诊断、鉴别诊断以及预后观察。

(致谢:本实验在重庆医科大学附属第一医院内分泌科实验室完成,所用设备及材料等均来自该实验室,在此表示由衷的感谢。)

参 考 文 献

- [1] D'Errico S, Pomara C, Riezzo I, et al. Cardiac failure due to epinephrine-secreting pheochromocytoma: clinical, laboratory and pathological findings in a sudden death[J]. Forensic Sci Int, 2009, 187(1-3): e13-17.
- [2] Vora KS, Shah VR. Diagnosis of pheochromocytoma[J]. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2012, 28(2): 274-276.
- [3] Grouzmann E, Drouard-Troalen L, Baudin E, et al. Diagnostic accuracy of free and total metanephrines in plasma and fractionated metanephrines in urine of patients with pheochromocytoma[J]. Eur J Endocrinol, 2010, 162(5): 951-960.
- [4] Eisenhofer G, Siegert G, Kotzerke J, et al. Current progress and future challenges in the biochemical diagnosis and treatment of pheochromocytoma and paragangliomas[J]. Horm Metab Res, 2008, 40(5): 329-337.
- [5] Lenders JW, Pacak K, Walther MM, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? [J]. JAMA, 2002, 287(11): 1427-1434.
- [6] Lenders JW, Eisenhofer G, Armando I, et al. Determination of metanephrines in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Clin Chem, 1993, 39(1): 97-103.
- [7] He X, Kozak M. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for plasma-free metanephrines with ion-pairing turbulent flow online extraction[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(9): 3003-3010.
- [8] Mullins F, O'Shea P, FitzGerald R, et al. Enzyme-linked immunoassay for plasma-free metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma in adults is not ideal[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 50(1): 105-110.
- [9] Eisenhofer G, Keiser HR, Friberg P, et al. Plasma metanephrines are makers of pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumors[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(6): 2175-2185.
- [10] 姜 蕾, 王卫庆, 张军妮, 等. 高效液相色谱电化学法测定血间甲肾上腺素类物质的方法的建立及临床应用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, 20(6): 561-563.
- [11] Roden M. How to detect pheochromocytomas?—the diagnostic relevance of plasma free metanephrines[J]. Wien Klin Wochenschr, 2002, 114(7): 246-251.
- [12] Niculescu DA, Ismail G, Poiana C. Plasma free metanephrine and normetanephrine levels are increased in patients with chronic kidney disease[J]. Endocr Pract, 2013. [Epub ahead of time] doi: 10.4158/EP13251. OR.
- [13] Eisenhofer G, Huysmans F, Pacak K, et al. Plasma metanephrines in renal failure[J]. Kidney Int, 2005, 67(2): 668-677.
- [14] Eisenhofer G, Lenders JW, Siegert G, et al. Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(11): 1739-1749.
- [15] Feng F, Zhu Y, Wang X, et al. Predictive factors for malignant pheochromocytoma: analysis of 136 patients[J]. J Urol, 2011, 185(5): 1583-1590.
- [16] Park J, Song C, Park M, et al. Predictive characteristics of malignant pheochromocytoma[J]. Korean J Urol, 2011, 52(4): 241-246.
- [17] Eisenhofer G, Lenders JW, Siegert G, et al. Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(11): 1739-1749.

(责任编辑: 关蕴良)