

·论著·

高效液相色谱法检测尿中儿茶酚胺代谢产物含量 在神经母细胞瘤早期诊断中的价值

王亚柱¹, 李强², 张锦华¹, 段树德³, 郭兑山², 张海鹏⁴

(中国医科大学第二医院 1. 血液研究室; 2. 中心实验室; 3. 内科; 4. 病理生理教研室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 尿中香草扁桃酸(VMA)及高香草酸(HVA)的检测是目前早期诊断神经母细胞瘤(NB)的重要指标,以前的检测方法干扰因素多,结果不够准确。该文探讨高效液相色谱法(HPLC)检测随机尿中VMA、HVA的含量在NB诊断和早期诊断中的价值。方法 用HPLC方法(流动相pH 4.3,甲醇含量2%,正辛烷磺酸钠溶液3.0 mmol/L)检测50例正常儿童(正常对照组)、27例NB患儿(NB组)及15例急性淋巴细胞性白血病患者(ALL组)随机尿中VMA、HVA浓度。用比色法测定同一样品中肌酐浓度。以VMA、HVA与肌酐的比值表示VMA、HVA含量。结果 NB组患儿随机尿VMA/Cr及HVA/Cr的含量($51.60 \pm 4.53 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$, $58.00 \pm 3.75 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$)明显高于正常对照组($8.42 \pm 3.61 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$, $10.12 \pm 3.88 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$)及ALL组患儿($8.78 \pm 3.50 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$, $11.50 \pm 2.68 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$),其差异均有显著性($P < 0.05$)。以正常对照组儿童随机尿中VMA/Cr及HVA/Cr均值加2.5个标准差为异常判定值,分别为 17.5 、 $19.8 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$,超过此值为异常,则尿VMA/Cr或HVA/Cr异常对NB的诊断效率为96.3%。结论 HPLC同时测定随机尿中VMA、HVA含量,能为NB的早期诊断提供可靠的实验依据,并且可用于NB的诊断及鉴别诊断。

[中国当代儿科杂志, 2004, 6(1): 34 - 37]

[关键词] 神经母细胞瘤; 高效液相色谱; 香草扁桃酸; 高香草酸; 肌酐

[中图分类号] R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2004)01 - 0034 - 04

Significance of measuring urinary catecholamines metabolites levels by high performance liquid chromatography (HPLC) in the early diagnosis of neuroblastoma

Yazhu WANG, Qiang LI, Jin-Hua ZHANG, Shu-De DUAN, Dui-Shan GUO, Hai-Peng ZHANG. Department of Hematology, Second Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: wangyazhu815 @ya-hoo.com.cn)

Abstract: The detection of the levels of urinary catecholamines metabolites, vanillylmandelic acid (VMA) and homovanillic acid (HVA), is an important approach to the early diagnosis of neuroblastoma (NB). The previous measurement of chromatometry, however, was usually affected by many factors as result of an inaccurate findings. This paper aims to study the significance of measuring urinary VMA and HVA levels in children by high performance liquid chromatography (HPLC) in the early diagnosis of NB. **Methods** Fifty healthy children (Normal control group), 27 children with NB (NB group) and 15 children with ALL (ALL group) were enrolled in this study. The levels of VMA and HVA in random urine were measured by HPLC with the flow-phase of pH of 4.3, 2% methanol and IPRB8 of 3.0 mmol/L and the creatin (Cr) level in random urine was measured by chromatometry. VMA and HVA were expressed as VMA/Cr and HVA/Cr. **Results** The values of VMA/Cr and HVA/Cr in random urine of the NB group (51.60 ± 4.53 and $58.00 \pm 3.75 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$, respectively) were significantly higher than those of the Normal control group (8.42 ± 3.61 and $10.12 \pm 3.88 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$, respectively) and the ALL group (8.78 ± 3.50 and $11.50 \pm 2.68 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$, respectively) ($P < 0.05$). The values of VMA/Cr and HVA/Cr being higher than $17.5 \mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$

[收稿日期] 2003 - 10 - 27; [修回日期] 2003 - 12 - 11

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(NO. 39470739)。

[作者简介] 王亚柱(1963 -),男,在读博士。主攻方向:小儿血液专业。

[通讯作者] 王亚柱,中国医科大学附属第二医院,沈阳市和平区三好街36号,邮编:110004。

and 19.8 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ Cr respectively, the levels of those of the Normal control group plus 2 standard deviations, were considered as abnormal. As a result, the diagnosis rate of abnormal VMA or HVA for NB was 96.3 %. **Conclusions** The detection of VMA and HVA levels in random urine by HPLC can provide reliable experimental evidence for early diagnosis and differential diagnosis of NB.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(1) : 34 - 37]

Key words: Neuroblastoma; High performance liquid chromatography; Vanillylmandelic acid; Homovanillic acid; Creatin

小儿神经母细胞瘤(Neuroblastoma, NB)是目前威胁儿童生命的主要肿瘤之一,发病率约占全部恶性肿瘤患儿的7%,而病死率却占其15%,仅次于白血病^[1,2]。目前NB诊断方法有B超定位、香草扁桃酸(vanillylmandelic acid, VMA)层析法、骨髓细胞形态学、病理及单克隆抗体检测等。B超定位能发现肿瘤的部位、大小,但肿瘤小于2 cm时不易发现^[3]。骨髓细胞形态学检查只能对有骨髓转移的NB患儿作出诊断^[4],单克隆抗体是检测患儿血液、骨髓或病理活体组织的一种免疫方法,难以早期诊断NB。NB产生儿茶酚胺,其终末代谢产物为VMA和高香草酸(homovanillic acid, HVA),在NB早期,患儿尿中VMA及HVA浓度即可升高,因而VMA、HVA的检测仍是目前早期诊断NB的重要指标^[5,6]。以往检测VMA、HVA的比色法干扰因素多、特异性差,结果不够准确。本研究参考HPLC(high performance liquid chromatography, HPLC)测定VMA、HVA的原理^[7],利用HPLC法测定随机尿中VMA、HVA的含量,以尿中肌酐(creatin, Cr)量标化标本中的VMA、HVA浓度,表示VMA、HVA的含量,探讨其在NB早期诊断及筛查中的意义。

1 资料与方法

1.1 实验分组

1.1.1 NB组 中国医科大学第二附属医院1998年10月~1999年4月在儿科血液门诊及小儿外科住院的NB患儿27例,男18例,女9例;年龄8月~16岁,平均年龄6岁。NBⅠ期25例,Ⅱ期2例。诊断符合NB国际诊断分期标准^[8]。

1.1.2 ALL组 急性淋巴细胞性白血病(ALL)患儿15例,男9例,女6例;年龄1~11岁,平均6岁;诊断符合1985年FAB诊断标准。

1.1.3 正常对照组 体格检查正常儿童50例,男35例,女15例;年龄1.5~13岁,平均年龄4.2岁。

1.2 标本收集

随机留取中段尿2 ml,贮存于-20℃。贮存日期1个月~24个月。

1.3 HPLC的装置和条件

HPLC采用Resolve C18柱,464电化学检测器。日立7100全自动生化分析仪。

选择流动相pH 4.3,流速为0.9 ml/min。电化学检测器设定电压为0.75 V(Ag/AgCl),灵敏度为100 nA/V。在此条件下VMA、HVA和DHBA(3,4-二羟基苯胺)三种化合物与杂峰有很好的分离,且最后一个出峰的HVA保留时间能缩短到满意的效果。

1.4 测定方法

取被测尿液离心(3 000 r/min, 5 min),其上清经孔径0.22 μm 滤膜加压过滤。滤液用0.01 mol/L盐酸10倍稀释,并加入DHBA至4.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。尿稀释液20 μl 注入HPLC分析仪中,用流动相洗脱,电化学检测器检测。取尿样100 μl ,用比色法在日立7100全自动生化分析仪上测定尿Cr量($\mu\text{mol}/\text{L}$)。

采用标准品保留时间及样品加标准品相结合的方法做为定性指标。标准品测得的保留时间范围 $\bar{x} \pm 2s$,VMA为1.50 $\pm$ 0.05 min;每日试验时,分别取不同浓度的标准液(VMA为2.50、1.25、0.625 $\mu\text{mol}/\text{L}$,HVA为5.00、2.50、1.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$,DHBA为4.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$)20 μl 进行HPLC分析。用内标法,以峰面积计算被检尿液中VMA、HVA浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$),再用尿Cr含量予以标化尿中VMA、HVA浓度($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ Cr)。

1.5 回收试验

取正常人10倍稀释的尿液,加入已知量的标准品,使其浓度在测定线性范围内,并加入DHBA,使其浓度为4.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$,取20 μl 进行HPLC分析测定,不同浓度的VMA及HVA的平均回收率分别为104%及94%,见表1,2。

表1 VMA回收试验结果					
Table 1 Results of VMA collection test					
标本号	尿中含量 ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	加入量 ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	测得值 ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	回收值 ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	回收率 (%)
1	0.83	1.25	2.25	1.42	114
2	0.69	2.50	3.01	2.32	93

表2 HVA 回收试验结果

Table 2 Results of HVA collection test

标本号	尿中含量 ($\mu\text{mol/L}$)	加入量 ($\mu\text{mol/L}$)	测得值 ($\mu\text{mol/L}$)	回收值 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 (%)
1	1.95	2.50	4.37	2.42	97
2	0.97	5.00	5.57	4.60	92

1.6 线性关系

取标准品(VMA 50 $\mu\text{mol/L}$,HVA 100 $\mu\text{mol/L}$)用0.01 mol/L盐酸进行5 $\times$ 、10 $\times$ 、20 $\times$ 、40 $\times$ 、80 $\times$ 稀释后,取20 μl 进行HPLC色谱分析。分别以浓度(C, $\mu\text{mol/L}$)为纵座标,以峰面积($A_s \cdot f_s$)为横座标作线性回归,标准曲线在所作浓度范围内呈良好线性关系。见图1。VMA、HVA回归方程分别为:

$$C_{\text{VMA}} = 93825.77 \times 10^{-6} + 2.538 \times 10^{-6} A_i \cdot f_i$$
$$R_{\text{VMA}} = 0.9970$$
$$C_{\text{HVA}} = 46200.755 \times 10^{-6} + 1.275 \times 10^{-6} A_i \cdot f_i$$
$$R_{\text{HVA}} = 0.9985$$

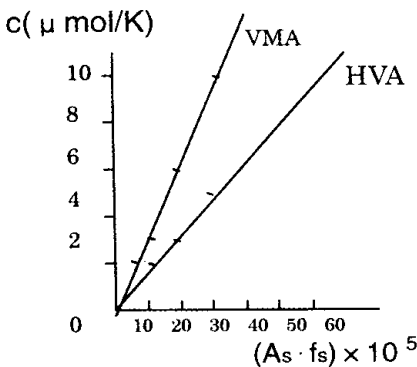


图1 VMA、HVA 的标准曲线
Figure 1 Standard curve of VMA、HVA
(A_s 标准品峰面积, f_s 标准品校正因子)

2 实验结果

2.1 VMA/ Cr 和 HVA/ Cr 测定结果

NB 组患儿尿 VMA/ Cr 和 HVA/ Cr 值分别高于正常对照组及 ALL 组,其差异均有显著性($P < 0.05$);ALL 组患儿尿 VMA/ Cr、HVA/ Cr 与正常对照组无差别($P > 0.05$)。见表3。2 例 NB 早期患儿 VMA/ Cr 分别为 32.6、18.9 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$; HVA/ Cr 分别为30.3 ,21.4 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$ 。

表3 三组随机尿 VMA/ Cr、HVA/ Cr 结果比较

Table 3 Comparison of the levels of VMA/ Cr and HVA/ Cr in the 3 groups

($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$)

组别	n	VMA/ Cr	HVA/ Cr
正常对照组	50	8.42 $\pm$ 3.61	10.12 $\pm$ 3.88
ALL 组	15	8.78 $\pm$ 3.50	11.50 $\pm$ 2.68
NB 组	27	51.60 $\pm$ 4.53 ^{a,b}	58.00 $\pm$ 3.75 ^{a,b}

注: a 与正常对照组比较 $P < 0.05$; b 与 ALL 组比较 $P < 0.05$

2.2 VMA/ Cr、HVA/ Cr 异常判定值的确定

考虑使用 HPLC 一次性筛查,再检率不能过高,同时 NB 的早期患儿又不漏掉,参考逆井悦子等^[9,10]筛查经验,以正常对照组儿童 VMA/ Cr 及 HVA/ Cr 均值加2.5个标准差作为异常判定值,分别为17.5、19.8 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$,大于此值为异常。

2.3 异常 VMA/ Cr、HVA/ Cr 及其对 NB 诊断性能的比较

NB 组患儿中 VMA/ Cr 异常者占85.2 % (23/27), HVA/ Cr 异常者占70.4 % (19/27), VMA/ Cr 异常和(或) HVA/ Cr 异常者占88.9 % (24/27)。两例早期 NB 患儿 VMA/ Cr 及 HVA/ Cr 均异常,其它两组患儿随机尿中 VMA/ Cr 及 HVA/ Cr 无一例异常。VMA/ Cr 及 HVA/ Cr 异常对 NB 诊断性能的比较见表4。

表4 VMA/ Cr、HVA/ Cr 异常对 NB 诊断性能比较

Table 4 Comparison of diagnostic value of the abnormal VMA/ Cr and HVA/ Cr levels in urine for NB

(%)

	诊断 敏感性	诊断 特异性	阳性 预期率	阴性 预期率	诊断 效率
VMA/ Cr 异常	85.2	100	100	93.2	95.1
HVA/ Cr 异常	70.4	100	100	87.3	90.2
VMA/ Cr 和 HVA/ Cr 异常	88.9	100	100	94.8	96.3

3 讨论

NB 是一种源于肾上腺髓质或交感神经节的恶性肿瘤,大多数含有低分化的原始神经母细胞,能分泌多巴、多巴胺、肾上腺素。VMA、HVA 分别为肾上腺素及多巴胺的代谢产物,通过肾脏排泄。尿中

VMA、HVA 的含量受尿液的浓缩、稀释影响变化很大,以单位容积中的浓度来表示结果不准确。故以往不同的方法都是测定 24 小时尿中含量表示其浓度,但准确留取小儿的 24 小时尿液极其困难。Cr 是肌酸的代谢终产物,由肾脏排泄。人体内源性 Cr 含量极为恒定,故一般情况下 24 小时尿中 Cr 排泄量也是恒定的,不受 24 小时尿量的影响,故常常用来校正尿中物质的浓度,避免尿量对物质浓度的影响。本研究采用这个原理,留取随机尿测定 VMA、HVA、Cr,以 VMA/Cr、HVA/Cr 表示 VMA 及 HVA 的含量,从而避免了尿量对测定结果的影响,避免了留取 24 小时尿的麻烦和误差。佐藤泰昌等^[10]利用 HPLC 筛查 5 000 名婴幼儿随机尿中 VMA、HVA 与 Cr 的相关性,研究结果显示:婴幼儿随机尿中 VMA、HVA 与 Cr 具有良好的相关性,且 Cr 校正的 VMA、HVA 值呈正态分布,设定均值加 2.5 个标准差为 VMA/Cr、HVA/Cr 异常判定值的标准,则 NB 筛查具有较高的灵敏度和较低的复查率。本组实验结果如用 $\mu\text{mol/L}$ 作单位计算 VMA、HVA,则正常儿童测定值波动范围很大,和 NB 患儿测定值重叠较多,2 例早期患儿均在正常值范围内。而以 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol Cr}$ 作单位计算 VMA、HVA,则正常儿童波动范围较小,NB 患儿测定值与正常值范围区别明显,2 例 NB 早期患儿测定结果均高于异常判定值。

用化学检测器检测尿中 VMA、HVA 时,杂峰很多,内标 DHBA 的色谱峰在杂峰之间,HVA 的保留时间约 40 分钟。为缩短 HVA 保留时间,并将 DHBA 色谱峰与杂峰分开,本研究对流动相 pH 值、甲醇浓度、正辛烷磺酸钠 IPRB8 浓度进行了优选,最后选定流动相 pH 4.3,甲醇含量为 2%,IPRB8 为 3.0 mmol/L,此时 DHBA 与尿样杂峰分离清晰,HVA 保留时间缩短至 18.54 min,取得了良好的分离效果,并使每份标本的测定时间由原来的 1 小时缩短到 40 分钟。分析方法的日内变异 VMA 为 4.00%,HVA 为 1.02%。平均回收率 VMA 为 104%,HVA 为 94%。线性测定范围 VMA 为 0.32 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$,HVA 为 0.64 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 。方法学性能良好,可供科研和常规应用。而且此方法灵敏度高,VMA 最低检出限为 0.16 $\mu\text{mol/L}$,HVA 为 0.32 $\mu\text{mol/L}$,并可同时检测 VMA、HVA 含量,从而可以检测出 VMA 非分泌型的 NB 患儿,弥补了 Spot 法的不足。本文 27 例 NB 患儿结果显示 VMA/Cr 升高者占 23/27 (85.2%),HVA/Cr 升高者占 19/27 (70.4%),同时检测 VMA、HVA 诊断敏感性可达 88.9%,与诸福棠等报道的 90% NB 患儿

尿中儿茶酚胺代谢产物增高相近。因此同时检测 VMA、HVA 可提高诊断率。对早期诊断有重要意义。

关于 NB 患儿的鉴别诊断,只对 ALL 患儿的 VMA、HVA 进行了检测,结果显示 ALL 患儿随机尿中 VMA 及 HVA 含量明显低于 NB 患儿,至于神经节细胞瘤、嗜铬细胞瘤等其它肿瘤患儿尿中 VMA 及 HVA 结果如何,有待以后探讨。

HPLC 法检测小儿随机尿中儿茶酚胺终末代谢产物 VMA 及 HVA,标本采集简便可行,检测前处理简单,并且能定量检测,方法可靠,具有良好的灵敏度和特异性,能对 NB 患儿进行早期诊断及鉴别,而且可用于 NB 筛查。

[参 考 文 献]

- [1] Young JL Jr, Ries LG, Silverberg Horn JW, Miller RW. Cancer incidence, survival and mortality for children younger than 15 years [J]. Cancer, 1986, 58(2Suppl): 598-602.
- [2] Smith EI, Castleberry RP. Neuroblastoma [J]. Curr Probl Surg, 1990, 27(9): 573-620.
- [3] 张锦华,耿文清,杨学忠,李新娜,张瑞英,王善伯,等. 小儿神经母细胞瘤超声与磁共振检查对比分析 [J]. 中国医科大学学报, 1997, 26(5): 508-510.
- [4] 王亚柱,张锦华,陈世洁. 小儿神经母细胞瘤髓内转移骨髓动力学变化规律的探讨 [J]. 中国医科大学学报, 1998, 27(2): 149-151.
- [5] Gitlow SE, Bertani LM, Rausen A, Gribetz D, Dziedzie SW. Diagnosis of neuroblastoma by qualitative and quantitative determination of catecholamine metabolites in urine [J]. Cancer, 1970, 25(6): 1377.
- [6] 沢田淳はか. 神経芽細胞種の生化学的懐断 [J]. 小兒外科. 内科, 1973, 5(7): 655.
- [7] 望月孝一,逆井悦子,西田俊朗. 埼玉具における神経芽細胞種マスキリ ニング [J]. 埼玉技會志, 1998, 45(4): 241-244.
- [8] Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castleberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment [J]. 1993, 11(8): 1466-1477.
- [9] 逆井悦子,望月孝一,高橋典子,真田正美,西田俊朗,山本圭子. 埼玉具傍における神経芽細胞種マスキリ ニング——次スクリ ニングの現状と今後 [J]. 埼玉小兒醫療センタ醫學志, 2000, 17(2): 89-92.
- [10] 佐藤泰昌,福士勝,高杉信男,武田武夫. 神経芽細胞種スクリ ニングにおける尿中 VMA、HVA 測定値とその判断 [J]. 日本小兒科學會雜誌, 1985, 89(12): 2665-2671.

(本文编辑:谢岷)