

2D 和 3D 培养肺细胞释放 VOCs 的 质谱检测比较研究

郑香雪^{1,2,3}, 葛殿龙^{2,3}, 周吉娟², 储雅静²,
刘玥^{2,3}, 陆燕^{2,3}, 沈成银², 储焰南^{1,2,3}

(1. 安徽医科大学基础医学院, 安徽合肥 230032;

2. 中国科学院合肥物质科学研究院健康与医学技术研究所, 医学物理与技术安徽省重点实验室, 安徽合肥 230031;

3. 中国科学院合肥肿瘤医院, 安徽合肥 230031)

摘要:挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs)作为一种潜在的癌细胞标志物被广泛研究。目前,体外细胞多采用二维(two-dimensional, 2D)贴壁培养方式,这与体内肿瘤细胞呈三维结构存在差别。本实验分别以肺癌细胞 A549 和肺上皮细胞 BEAS-2B 为例,构建三维(three-dimensional, 3D)培养模型,并以 2D 模型和培养基作为对照,利用固相微萃取气相色谱-质谱(solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, SPME-GC-MS)法检测细胞释放的 VOCs。通过非靶向统计分析细胞在 2D 和 3D 培养中释放的差异性 VOCs,其中 A549 细胞有 4 种(乙酸、1-吡咯啉、4-甲基庚烷、2,4-二甲基-1-庚烯),BEAS-2B 细胞也有 4 种(乙醇、1-吡咯啉、4-甲基庚烷、2,4-二甲基-1-庚烯)。与 2D 模型相比,这些 VOCs 在 3D 模型中的释放量增加了 2.11~12.81 倍。此外,还讨论了差异性 VOCs 可能的生化来源以及在 2D/3D 模型中释放量差异的可能原因。本工作证明了 3D 培养在体外细胞 VOCs 检测方面具有广阔的应用前景,有望成为癌症标志物筛查有价值的研究平台。

关键词:气相色谱-质谱(GC-MS);挥发性有机物(VOCs);3D 细胞培养;肺癌

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2024)02-0216-10

doi:10.7538/zpxb.2023.0077

Comparative Study on the Mass Spectrometric Detection of VOCs Released by 2D and 3D Cultured Lung Cells

ZHENG Xiang-xue^{1,2,3}, GE Dian-long^{2,3}, ZHOU Ji-juan², CHU Ya-jing²,
LIU Yue^{2,3}, LU Yan^{2,3}, SHEN Cheng-yin², CHU Yan-nan^{1,2,3}

(1. School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Anhui Province Key Laboratory of Medical Physics and Technology,

Institute of Health and Medical Technology, Hefei Institutes of Physical Science,

Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

3. Hefei Cancer Hospital, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: Volatile organic compounds (VOCs) have been widely studied as potential biomarkers of cancer cells. Currently, *in vitro* cells are mostly cultured in two-dimensional (2D) adherent mode, which is different from *in vivo* tumor cells with three-dimensional structures. Tumor cell spheres cultured in three-dimensional mode have many similar characteristics to those of *in vivo* tumors, such as: 1) the structure of cell spheres is divided into proliferative, quiescent, and hypoxic zones; 2) the extracellular matrix deposited in the cell spheres not only increases the density of the spheres but also affects the tumor progression by intercellular interactions. In addition, VOCs detection is mainly accomplished by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with solid-phase microextraction (SPME), which permits both qualitative and quantitative analysis of VOCs. In this present work, lung cancer cells A549 and lung epithelial cells BEAS-2B were respectively taken as examples to construct three-dimensional (3D) culture models, and 2D models and culture media were used as controls. The VOCs released from cells were detected by SPME-GC-MS. Totally, 163 VOC chromatographic peaks were included in the statistical analyses using an untargeted strategy. Based on orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) with the combined criteria of Mann-Whitney U test ($p < 0.05$) and fold change ($FC > 2$), differential VOCs released by cells in 2D and 3D culture modes were screened out. There were four VOCs of acetic acid, 1-pyrroline, 4-methylheptane and 2,4-dimethyl-1-heptene released at differential levels from A549 cells cultured under 2D and 3D modes, and four VOCs of ethanol, 1-pyrroline, 4-methylheptane and 2,4-dimethyl-1-heptene released at various amounts from BEAS-2B cells cultured under 2D and 3D modes, respectively. In comparison to 2D models, 3D models released 2.11 to 12.81 times more of these VOCs. Afterwards, the possible biochemical sources of the differentially released VOCs and the possible mechanisms for the differences in the releases of VOCs in the 2D/3D models were discussed. These differentially released VOCs have been reported to be potential markers in lung cancer cells, liver cancer cells, and other biological samples in previous studies. In addition, compared to 2D models, 3D models can better simulate tumor growth *in vivo* as well as cellular microenvironments, including the creation of reactive oxygen species (ROS) and extracellular matrix deposition. These physiological microenvironments may promote the release of cellularly differential VOCs. In this paper, by constructing 3D cell models and analyzing differential changes in cellular VOCs, it was proved that 3D culture has a broad application prospect in the detection of cellular VOCs *in vitro*, and is expected to be a valuable research platform for cancer biomarker screening.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); volatile organic compounds (VOCs); 3D cell culture; lung cancer

自20世纪80年代以来,人体挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs)与癌症间的关联研究受到重视^[1]。癌细胞通常会引起机体内的氧化应激、炎症反应以及代谢失调,这有可能诱发患者呼气成分的改变,使呼气成为

身体癌变的“镜子”^[2]。因此,呼气检测VOCs有望实现对癌症的无创筛查^[3]。

目前,大多使用二维(two-dimensional, 2D)贴壁培养方式^[4]开展体外细胞培养并分析癌细胞释放的特征VOCs研究。然而,2D培养

存在一定的局限性,例如,难以模拟肿瘤细胞在人体内的生理条件和肿瘤微环境^[5]。三维(three-dimensional, 3D)培养的肿瘤细胞球可以更准确地重现癌细胞在体内的生长状态^[6]: 1) 与实体瘤类似,细胞球的外层为增殖区,中层为静止区,内层为缺氧区^[7]; 2) 细胞球内沉积的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)(如,Ⅳ型胶原、层粘连蛋白等^[8])不仅增加了球体密度,而且通过与细胞相互作用影响肿瘤的进展^[9]。

关于肺细胞系 VOCs 研究,Furuhashi 等^[10]对 2D/3D 培养条件下癌细胞 A549 释放的 VOCs 进行气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)分析,结果表明,以空白培养基为对照,A549 释放的特征 VOC 反式-2-己烯醇在 3D 条件下($p=0.008$)比 2D 条件下($p=0.04$)的差异性更显著。此外,Smith 等^[11]对癌细胞 CALU-1 进行 2D 和 3D 培养,并使用选择离子流动管质谱(selected ion flow tube-mass spectrometry, SIFT-MS)对细胞顶空 VOCs 进行在线定量分析,结果表明,与空白培养基相比,3D 培养条件下 CALU-1 的乙醛释放量比 2D 多 2 倍^[12]。由此可见,3D 培养有利于获得细胞的特征性 VOCs。

本研究将基于固相微萃取-气相色谱-质谱(solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, SPME-GC-MS)实验平台,以肺癌细胞系 A549 和肺正常细胞系 BEAS-2B 作为研究对象,分别构建 2 种细胞的 2D 和 3D 培养模型。通过检测 A549 与 BEAS-2B 在不同培养条件下的顶空 VOCs 并进行非靶向统计分析,以获得每种细胞在 2D 和 3D 培养条件下的差异 VOCs,实验流程示于图 1。期望寻找更有价值的体外细胞培养方式,为癌症标志物检测研究提供新思路。

1 实验部分

1.1 细胞培养

将 A549 和 BEAS-2B 细胞接种于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清及 1% 双抗)中,并在培养箱(37 °C, 5% CO₂)中培养增殖,每隔 1 天更换 1 次新鲜的培养基。

1.1.1 2D 细胞培养 当培养的细胞处于对数生长期时,使用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗皿底,去除细胞碎片和废弃物,然后加入 1 mL 胰酶细胞消化液覆盖皿底,并将培养皿置于 CO₂ 培养箱中进行细胞消化。当在显微镜下发现细胞相互分离时,

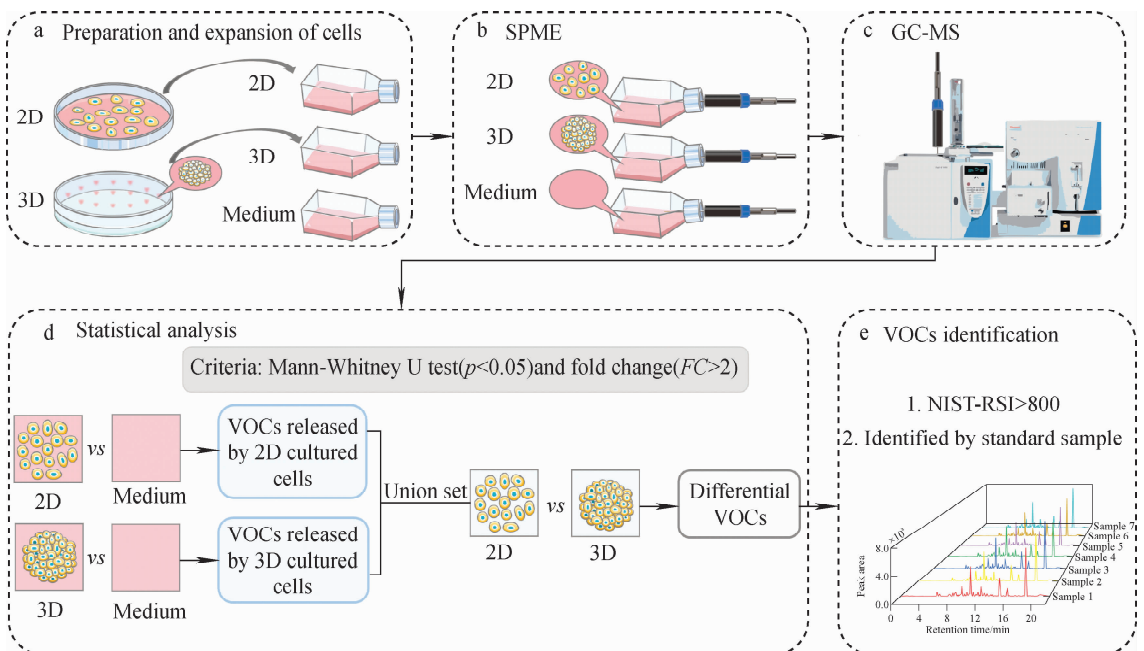


图 1 实验和统计分析流程

Fig. 1 Experimental and statistical analysis process

立即加入 1 mL 培养基终止消化。随后将细胞悬液从培养皿转移到离心管中,以 800 r/min 离心 5 min,去除上清液,细胞重悬在适量的培养基中,利用细胞计数板进行手动计数。将细胞悬液转移至 5 个相同的 T-25 cm² 玻璃培养瓶中,每瓶接种 2×10^5 个细胞,培养 24 h 使细胞呈 2D 贴壁状态生长。更换 5 mL 新鲜培养基后,立即用封口膜密封培养瓶内 VOCs,继续培养 12 h 后进行 SPME-GC-MS 检测。

1.1.2 3D 细胞培养 参考 Skowron 等^[13] 的 3D 细胞模型实验方法,采用悬滴法进行培养。培养过程中不添加细胞支架和基质胶,以免引入额外的 VOCs。细胞悬液准备工作与 2D 培养相同,先将对数生长期的细胞消化离心,再加入培养基重悬并进行细胞计数,将细胞浓度调整为 3.3×10^4 cells/mL。首先,使用移液枪在培养皿盖的内壁上制备 120 个液滴,每个液滴大约 30 μ L(包含 1×10^3 个细胞),然后将带有液滴的皿盖反扣在培养皿上以形成悬滴,使得在随后 6 天的培养过程中,悬滴中的细胞在重力作用下自发聚集并呈 3D 状态,同时,在培养皿中加入 10 mL PBS 以防止悬滴中培养基蒸发。待 3D 细胞球体形成后,用移液枪将细胞球移至 T-25 cm² 玻璃培养瓶中,PBS 冲洗后加入 5 mL 培养基,立即用封口膜封口,每组设置 5 个平行样品。为防止细胞球体贴壁,将培养瓶置于气浴摇床中进行细胞培养,12 h 后 SPME-GC-MS 检测。

1.2 SPME 过程及 GC-MS 条件

1.2.1 SPME 过程 每次 SPME 前,PDMS/DVB 萃取纤维(65 μ m, Supelco, USA)均在 GC-MS 的 200 $^{\circ}$ C 进样口热解吸 30 min,并通过质谱确认纤维上不存在可检测到的残余有机物,防止对后续的 VOCs 分析产生干扰。热解吸结束后,在 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中对待测样品顶空进行 20 min 的 SPME。实验期间,除操作人员外,没有其他人员出入实验室,尽量维持实验室内空气成分的稳定。

1.2.2 色谱条件 在气相色谱-三重四极杆质谱仪(TSQ quantum XLS, Thermo, USA)上进行 SPME-GC-MS 分析。TG-624SILMS 色谱柱(30 m \times 0.32 mm \times 1.8 μ m);固定相材料由 6% 氰丙苯基-94% 二甲基聚硅氧烷组成;用

1.5 mL/min 的高纯氦气(99.999%)作为载气,不分流进样;进样口温度 200 $^{\circ}$ C;SPME 解吸时间 1 min;升温程序:50 $^{\circ}$ C 保持 0.5 min,以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 180 $^{\circ}$ C 并保持 2 min,然后以 15 $^{\circ}$ C/min 升至 200 $^{\circ}$ C 并保持 5 min。

1.2.3 质谱条件 电子轰击能量 70 eV,传输线温度 200 $^{\circ}$ C,离子源温度 200 $^{\circ}$ C,质量扫描范围 m/z 45~200。

1.3 细胞数量及细胞活率检测

在 SPME-GC-MS 检测结束后,使用 PBS 清洗和胰酶消化每个样品中的 2D/3D 细胞,随后将细胞悬液分别收集至离心管中,以 800 r/min 离心 5 min,然后去除上清液,将细胞重悬在适量的培养基中。取适量的细胞悬液与 0.4% 台盼蓝染液按体积比 9:1 混匀,吸取 10 μ L 混合液加入到细胞计数板中,在显微镜下计数总细胞数和死细胞数,并根据公式(活细胞比值(%))=(总细胞数-死细胞数)/总细胞数)计算细胞活率。每个样品计数 3 次,取平均值。

1.4 VOCs 的非靶向统计分析

培养基及细胞样本检测完成后,首先利用 Xcalibur 2.2(Thermo, USA)软件导出所有样品的色谱峰面积,选择峰面积大于 10^5 的色谱峰,并根据保留时间在 ± 0.01 min 范围内进行校正。同时,考虑到细胞增殖速度不同而导致的细胞数量差异,在统计分析前对所有的色谱峰数据进行归一化处理,然后利用 SIMCA 14.1 软件将 2D 和 3D 培养条件下的细胞全部色谱峰面积进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),随后利用 IBM SPSS Statistics 22 软件对其进行 Mann-Whitney U test 和差异倍数(fold change, FC)分析,将同时满足 $p < 0.05$ 和 $FC > 2$ 的色谱峰所对应的物质认为具有差异性。对获得的差异性色谱峰进行 NIST 谱库检索,并依据反向搜索指数(reverse search index, RSI)大于 800 进一步确认候选物质名称,然后计算保留指数(retention index, RI),最终利用化学标准品进行定性。每次检测实验前均检查 GC-MS 灵敏度,并维持仪器的长期稳定性以减少信号波动带来的影响。

1.5 细胞株与试剂

人肺癌细胞系 A549: 来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; 人肺正常上皮细胞 BEAS-2B: 来源于美国典型培养物保藏中心。DMEM 培养基、PBS、胎牛血清: 上海达特希尔生物科技有限公司产品; 胰酶细胞消化液、双抗(青-链霉素): 上海碧云天生物技术有限公司产品; 台盼蓝染液: Biosharp 公司产品; 乙醇、乙酸、4-甲基庚烷、2,4-二甲基-1-庚烯、脯氨酸、高碘酸钠等标准化学试剂: 合肥拜尔迪公司产品, 其中, 脯氨酸和高碘酸钠用于实验室合成 1-吡咯啉^[14]。

2 结果与讨论

2.1 细胞 2D 及 3D 模型的构建

A549 和 BEAS-2B 的 2D/3D 模型构建过程示于图 2。在 2D 模型中, 细胞培养 24 h 后逐渐从悬浮状态转变为贴壁生长, 并达到 80%~90% 汇合度; 3D 模型中的细胞在悬滴中培养 6 天后逐渐聚集成球状。在 GC-MS 检测结束

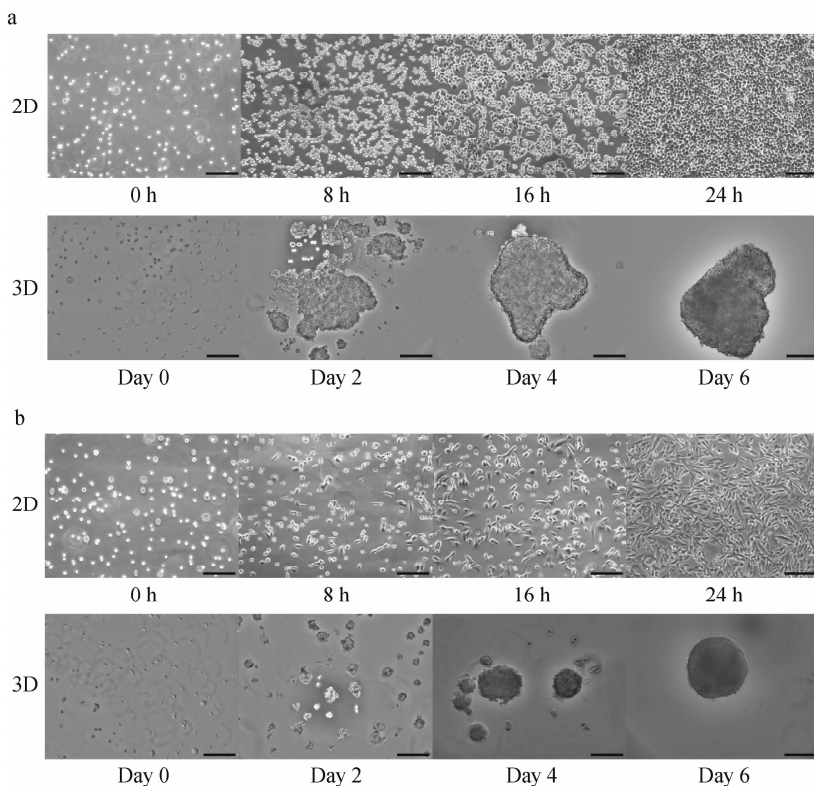
后检测细胞数量和细胞活率, 2D 和 3D 模型 A549 细胞的平均数量分别为 1.35×10^6 和 1.36×10^6 , BEAS-2B 细胞的平均数量分别为 6.66×10^5 和 6.70×10^5 , 细胞活率均在 90% 以上, 示于附图 1(请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载, 以下同)。

2.2 细胞 2D/3D 条件下顶空 VOCs 的 OPLS-DA

在 A549 和 BEAS-2B 细胞及培养基的顶空 GC-MS 检测数据中, 存在 163 个色谱峰符合峰面积大于 10^5 的条件。利用全部色谱峰数据进行 OPLS-DA, 得分图示于图 3a、3b。A549 在 2D、3D 培养条件下的 VOCs 以及空白培养基的 VOCs 三者之间显示良好的分离度, BEAS-2B 中的 3 组数据也被清晰地区分, 2 项 OPLS-DA 模型均具有较高的拟合优度(R^2Y)和预测优度(Q^2)。相应模型 200 次置换检验结果示于图 3c、3d, R^2 和 Q^2 的模拟值分别大于它们所有的原始值, 表明原 OPLS-DA 模型的有效性。

2.3 差异 VOCs 的鉴定

筛选出与培养基相比 2D 和 3D 培养模型



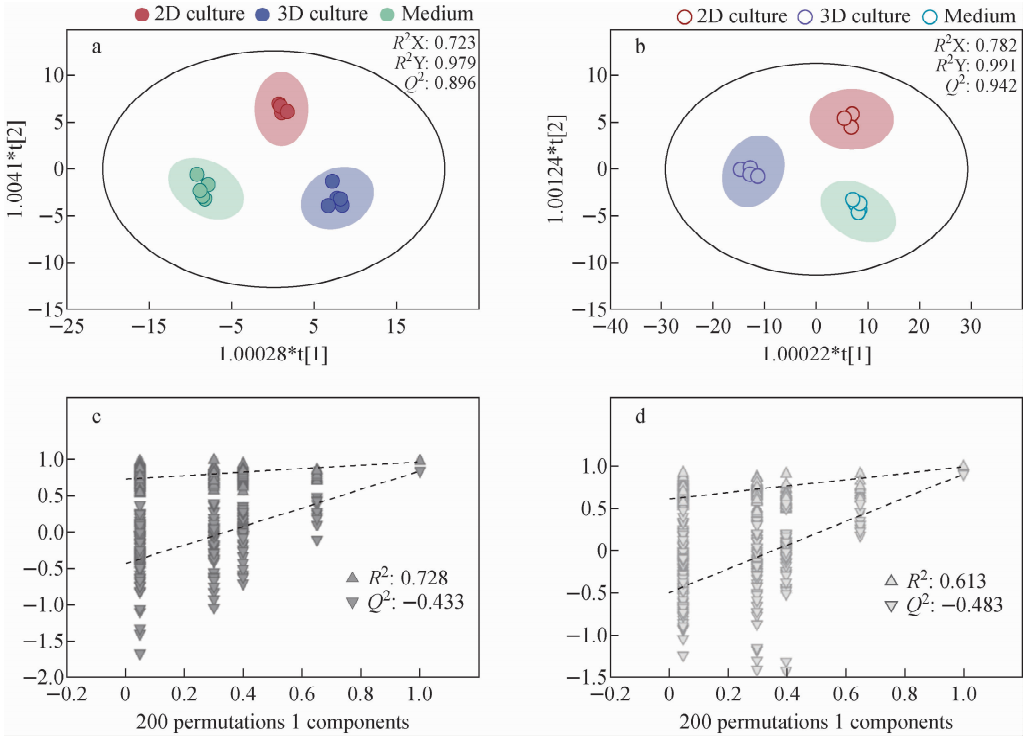
注: a. A549; b. BEAS-2B; 标尺长度 100 μm

图 2 细胞的 2D/3D 模型构建

Fig. 2 Construction of 2D/3D cell models

细胞释放的 VOCs ($p < 0.05, FC > 2$), 结果示于图 4。其中, A549 的 2D 和 3D 培养模型释放的 VOCs 分别有 10 种(二氯甲烷、溴二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸、1-吡咯啉、4-甲基庚烷、3-甲基庚烷、3-甲基丁醇、2-甲基丁醇、反式-4-辛烯)和 11 种(三氯甲烷、乙酸、1-吡咯啉、4-甲基庚烷、

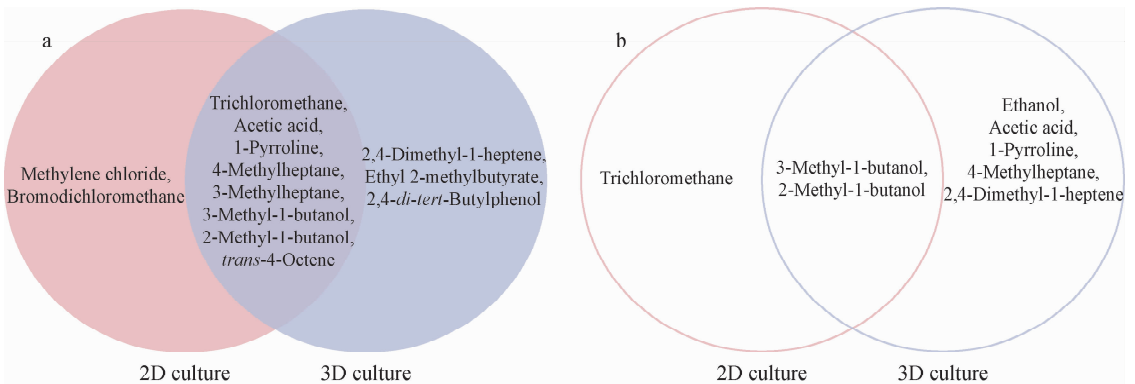
3-甲基庚烷、3-甲基丁醇、2-甲基丁醇、反式-4-辛烯、2,4-二甲基-1-庚烯、2-甲基丁酸乙酯、2,4-二叔丁基苯酚), 共同释放的 VOCs 有 8 种(三氯甲烷、乙酸、1-吡咯啉、4-甲基庚烷、3-甲基庚烷、3-甲基丁醇、2-甲基丁醇、反式-4-辛烯), 示于图 4a。



注: a, c. A549; b, d. BEAS-2B

图 3 A549 和 BEAS-2B 细胞模型与培养基顶空 VOCs 的 OPLS-DA 得分图(a,b), 以及对应的 200 次置换检验结果(c,d)

Fig. 3 OPLS-DA scores (a, b) of A549 and BEAS-2B cell models and media overhead VOCs, and the results of their corresponding 200 permutation tests (c, d)



注: a. A549; b. BEAS-2B

图 4 细胞 2D/3D 培养条件下释放 VOCs 的韦恩图

Fig. 4 Venn diagrams of released VOCs in 2D/3D cell cultures

BEAS-2B 的 2D 和 3D 培养模型释放的 VOCs 分别有 3 种(三氯甲烷、3-甲基丁醇、2-甲基丁醇)和 7 种(3-甲基丁醇、2-甲基丁醇、乙醇、乙酸、1-吡咯啉、4-甲基庚烷、2,4-二甲基-1-庚烯),其中共同释放的 VOCs 有 2 种,即 3-甲基丁醇和 2-甲基丁醇,示于图 4b。上述提及的 VOCs 均通过 NIST 谱库检索($RSI > 800$)进行初步鉴定,其详细信息列于附表 1。

从上述得到的 VOCs 中继续筛选出 2 种

细胞 2D 与 3D 模型之间的差异 VOCs ($p < 0.05, FC > 2$)。根据 NIST 数据库索引、保留指数计算以及标准化学试剂实验(附图 2),对差异性 VOCs 进行定性分析,结果列于表 1。在 2 种培养条件下,A549 有 4 种差异性 VOCs,分别为乙酸、1-吡咯啉、4-甲基庚烷和 2,4-二甲基-1-庚烯;BEAS-2B 有 4 种差异性 VOCs,分别为乙醇、1-吡咯啉、4-甲基庚烷和 2,4-二甲基-1-庚烯。

表 1 A549 和 BEAS-2B 的 2D/3D 模型的差异 VOCs

Table 1 Differential VOCs of A549 and BEAS-2B in 2D/3D models

细胞系 Cell line	挥发性 有机物 VOCs	保留 时间 Retention time/min	计算 保留 指数 RI ^a	理论 保留 指数 RI ^b	色谱峰面积		<i>p</i> 值 <i>p</i> Value	差异 倍数 FC
					Chromatographic peak area			
					2D 模型 2D model	3D 模型 3D model		
A549	乙酸	3.57	669	677 ^[15]	1.41×10^5	1.16×10^6	0.008	8.24
	1-吡咯啉	4.20	713	656 ^[16]	3.86×10^5	1.62×10^6	0.008	4.21
	4-甲基庚烷	4.96	761	761 ^[16]	1.27×10^6	2.70×10^6	0.008	2.11
	2,4-二甲基-1-庚烯	6.36	841	846 ^[17]	1.40×10^6	6.54×10^6	0.008	4.65
BEAS-2B	乙醇	1.79	—	481 ^[15]	1.31×10^7	3.65×10^7	0.008	2.76
	1-吡咯啉	4.20	713	656 ^[16]	3.72×10^4	4.77×10^5	0.008	12.81
	4-甲基庚烷	4.96	761	761 ^[16]	3.74×10^5	2.60×10^6	0.008	6.96
	2,4-二甲基-1-庚烯	6.36	841	846 ^[17]	9.95×10^5	1.09×10^7	0.008	10.96

注:1) RI^a 为实验中计算的保留指数,RI^b 取自参考文献^[15,17](通过 DB-624UI 色谱柱)或来自 PubChem 数据库^[16]的最接近 RI 值(采用半标准非极性列);

2) 色谱峰面积为各组内 5 个平行样本的平均值;

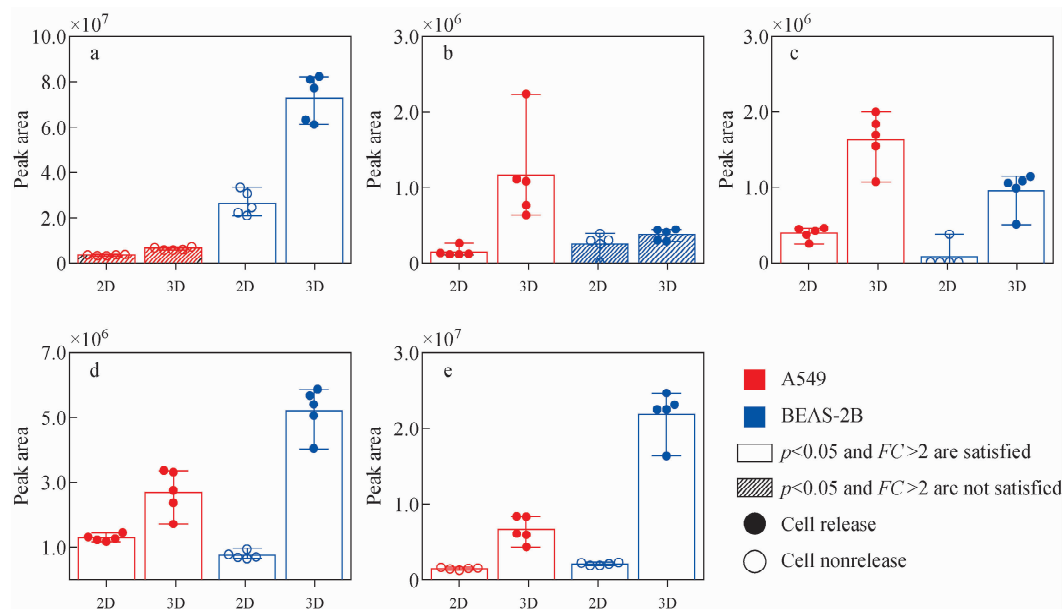
3) $FC = 3D$ 模型色谱峰面积/ $2D$ 模型色谱峰面积

2.4 2D/3D 培养条件下细胞顶空 VOCs 的差异变化

在 2D/3D 培养条件下,A549 和 BEAS-2B 顶空 VOCs 的差异示于图 5。与培养基相比,在 A549 的 4 种差异 VOCs 中,乙酸、1-吡咯啉和 4-甲基庚烷在 2D 和 3D 培养条件下均满足细胞释放 VOCs 的条件,且在 3D 模型中的平均水平分别是 2D 模型的 8.24、4.21 和 2.11 倍,而 2,4-二甲基-1-庚烯仅在 3D 模型中释放;在 BEAS-2B 中,所得到的乙醇、1-吡咯啉、4-甲基庚烷和 2,4-二甲基-1-庚烯 4 种差异 VOCs 只在 3D 模型中满足细胞释放 VOCs 的条件,平均水平分别是 2D 模型的 2.76、12.81、6.96 和 10.96 倍。

有文献^[18]报道,乙醇可能来源于细胞中烷

烃的代谢,并且在乙醇脱氢酶的作用下生成乙醛,进而通过乙醛脱氢酶被氧化为乙酸。乙醇、乙酸均属于碳氢化合物,而影响细胞内碳氢化合物排放的主要机制是氧化应激,即活性氧(reactive oxygen species, ROS)和自由基的形成与清除^[18-19]。Liu 等^[20]通过纳米腔电极检测到结肠癌 CT26 细胞的 3D 模型中 ROS 含量明显高于 2D 模型,推测乙醇和乙酸在 3D 模型中释放量增加这一现象可能与氧化应激增强相关。Filipiak 等^[21]在肺癌细胞 A549 和肺正常细胞顶空中检测到乙醇的释放;Amal 等^[22]发现与正常细胞相比,肝癌细胞 HCC-HMP 顶空中的乙醇水平降低,而乙酸水平升高。此外,有报道^[23]认为,与健康人血液样本相比,健康人鼻腔呼气中的乙酸升高。



注:a.乙醇;b.乙酸;c.1-吡咯啉;d.4-甲基庚烷;e.2,4-二甲基-1-庚烯

图5 细胞2D/3D培养条件下VOCs的差异变化

Fig. 5 Difference of VOCs in 2D/3D cell cultures

1-吡咯啉在细菌和酵母中来源于脯氨酸降解^[24],细胞中也存在类似的脯氨酸代谢途径。Cui等^[25]发现在A549细胞中,细胞外基质相关成分(PNICH-1)的高表达会促进脯氨酸合成。同时,Elia等^[26]报道,脯氨酸在乳腺癌细胞中主要被分解为1-吡咯啉-5-羧酸(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate, P5C),且乳腺癌细胞在3D培养条件下的脯氨酸分解能力明显高于2D。可以推测,1-吡咯啉可能作为细胞中P5C的下游代谢产物,而本研究中1-吡咯啉在3D模型中的释放量比2D高,可能是由于3D模型中细胞外基质的积累促进了脯氨酸代谢,进而导致1-吡咯啉释放量增加。目前,暂未见1-吡咯啉作为人体或细胞VOC的报道。

4-甲基庚烷和2,4-二甲基-1-庚烯属于细胞代谢的支链碳氢化合物^[18],与乙醇和乙酸类似,可能是氧化应激过程中的产物。可以推测,由于3D模型中ROS含量更高,进而导致这2种VOCs释放量增加。此外,有研究^[27]报道,与培养基相比,4-甲基庚烷和2,4-二甲基-1-庚烯在肺正常细胞HBEpC顶空中升高^[27]。

综上所述,A549和BEAS-2B细胞在3D培养中释放的差异VOCs含量比2D中高,3D培养在体外细胞VOCs检测中展现了获取差异

VOCs的优势。同时还发现,这些差异VOCs释放量的增加可能与3D模型ROS含量升高或细胞外基质的积累有关。

3 结论

本实验建立了2D和3D细胞模型,利用气相色谱-质谱技术分析比较2种细胞模型中VOCs差异。结果表明,A549细胞有4种差异性VOCs(乙酸、1-吡咯啉、4-甲基庚烷、2,4-二甲基-1-庚烯),BEAS-2B细胞也有4种差异性VOCs(乙醇、1-吡咯啉、4-甲基庚烷、2,4-二甲基-1-庚烯),且这些差异性VOCs在3D培养条件下的平均水平比2D升高了2.11~12.81倍。对这些差异性VOCs的可能来源和生化机制进行讨论,发现与2D模型相比,3D模型更接近肿瘤在体内的生长状态和生理机制(如,ROS产生增多和细胞外基质沉积),从而促进细胞差异性VOCs的释放。但本研究也存在一定的局限性,例如,仅构建了2种细胞的3D模型,且仅对差异VOCs的来源和生理机制进行了探讨。未来,有必要尝试构建多种细胞系的3D模型和类器官,开展差异VOCs在细胞中的生化来源研究,为癌症标志物研究提供新思路。

参考文献:

- [1] GOUZERH F, BESSIERE J M, UJVARI B, THOMAS F, DUJON A M, DORMONT L. Odors and cancer: current status and future directions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 2022, 1 877(1): 188-644.
- [2] JANSSENS E, van MEERBEECK J P, LAM-OTE K. Volatile organic compounds in human matrices as lung cancer biomarkers: a systematic review[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2020, 153(8): 103-037.
- [3] SHARMA A, KUMAR R, VARADWAJ P. Smelling the disease: diagnostic potential of breath analysis[J]. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2023, 27(3): 321-347.
- [4] JIA Z, PATRA A, KUTTY V K, VENKATESAN T. Critical review of volatile organic compound analysis in breath and *in vitro* cell culture for detection of lung cancer[J]. *Metabolites*, 2019, 9(3): 52-68.
- [5] HABANJAR O, DIAB-ASSAF M, CALDEFIE-CHEZET F, DELORT L. 3D Cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22): 12 200.
- [6] 李丽美, 臧清策, 张瑞萍, 再帕尔·阿不力孜. 基于质谱技术的代谢组学在体外药物肝毒性评价中的研究进展[J]. *质谱学报*, 2021, 42(5): 772-786.
- LI Limei, ZANG Qingce, ZHANG Ruiping, ABLIZ Zeper. Mass spectrometry-based metabolomics in the study of *in vitro* drug hepatotoxicity evaluation[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2021, 42(5): 772-786(in Chinese).
- [7] MEHTA G, HSIAO A Y, INGRAM M, LUKER G D, TAKAYAMA S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 164(2): 192-204.
- [8] YEON S E, NO DA Y, LEE S H, NAM S W, OH I H, LEE J, KUH H J. Application of concave microwells to pancreatic tumor spheroids enabling anticancer drug evaluation in a clinically relevant drug resistance model[J]. *Plos One*, 2013, 8(9): e73345.
- [9] van DIJK M, GORANSSON S A, STROM-BLAD S. Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer[J]. *Experimental Cell Research*, 2013, 319(11): 1 663-1 670.
- [10] FURUHASHI T, ISHII R, ONISHI H, OTA S. Elucidation of biochemical pathways underlying VOCs production in A549 cells[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 7(1): 00 116.
- [11] RUTTER A V, CHIPPENDALE T W, YANG Y, SPANEL P, SMITH D, SULE-SUSO J. Quantification by SIFT-MS of acetaldehyde released by lung cells in a 3D model[J]. *Analyst*, 2013, 138(1): 91-95.
- [12] SMITH D, WANG T, SULE-SUSO J, SPANEL P, EL HAJ A. Quantification of acetaldehyde released by lung cancer cells *in vitro* using selected ion flow tube mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, 17(8): 845-850.
- [13] SKOWRON M A, WATOLLA M M, NETTERSHRIM D. Testicular germ cell tumors [M]. New York: Humana Press, 2021: 77-83.
- [14] YOSHIKAWA K, LIBBEY L M, COBB W Y, DAY E A. 1-Pyrroline: the odor component of strecker-degraded proline and ornithine[J]. *Journal of Food Science*, 1965, 30(6): 991-994.
- [15] DOSSIN E, MARTIN E, DIANA P, CASTEL-LON A, MONGE A, POSPISIL P, BENTLEY M, GUY P A. Prediction models of retention indices for increased confidence in structural elucidation during complex matrix analysis: application to gas chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(15): 7 539-7 547.
- [16] PubChem database[DB/OL]. (2023-10-25). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [17] O'CALLAGHAN T F, MANNION D, APOPEI D, MCCARTHY N A, HOGAN S A, KILCAWLEY K N, EGAN M. Influence of supplemental feed choice for pasture-based cows on the fatty acid and volatile profile of milk[J]. *Foods*, 2019, 8(4): 137-153.
- [18] HAKIM M, BROZA Y Y, BARASH O, PELED N, PHILLIPS M, AMANN A, HAICK H. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways[J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(11): 5 949-5 966.

- [19] WANG C S, DONG R, WANG X Y, LIAN A L, CHI C J, KE C F, GUO L, LIU S S, ZHAO W, XU G W, LI E Y. Exhaled volatile organic compounds as lung cancer biomarkers during one-lung ventilation[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(1): 7 312-7 319.
- [20] LIU K, LIU R, WANG D, PAN R, CHEN H Y, JIANG D. Spatial analysis of reactive oxygen species in a 3D cell model using a sensitive nanocavity electrode[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(38): 13 287-13 292.
- [21] FILIPIAK W, SPONRING A, FILIPIAK A, AGER C, SCHUBERT J, MIEKISCH W, AMANN A, TROPPEMAYER J. TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells *in vitro* [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2010, 19(1): 182-195.
- [22] AMAL H, DING L, LIU B B, TISCH U, XU Z Q, SHI D Y, ZHAO Y, CHEN J, SUN R X, LIU H, YE S L, TANG Z Y, HAICK H. The scent fingerprint of hepatocarcinoma; *in vitro* metastasis prediction with volatile organic compounds (VOCs)[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7: 4 135-4 146.
- [23] ROSS B M, BABGI R. Volatile compounds in blood headspace and nasal breath[J]. *Journal of Breath Research*, 2017, 11(4): 046 001.
- [24] SCHIEBERLE P, HOFMANN T. The maillard reaction in foods and medicine[M]. UK: Woodhead Publishing, 2005: 209-215.
- [25] CUI C, WANG J, GUO L, WU C. PINCH-1 promotes delta (1)-pyrroline-5-carboxylate synthase expression and contributes to proline metabolic reprogramming in lung adenocarcinoma[J]. *Amino Acids*, 2021, 53(12): 1 875-1 890.
- [26] ELIA I, BROEKAERT D, CHRISTEN S, BOON R, RADAELLI E, ORTH M F, VERFAILLIE C, GRUNEWALD T G P, FENDT S M. Proline metabolism supports metastasis formation and could be inhibited to selectively target metastasizing cancer cells[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15 267.
- [27] FILIPIAK W, SPONRING A, FILIPIAK A, AGER C, SCHUBERT J, MIEKISCH W, AMANN A, TROPPEMAYER J. TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells *in vitro* [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2010, 19(1): 182-195.

(收稿日期:2023-07-05;修回日期:2023-08-30)