

代谢组学技术在食管癌标志物研究中的应用

蒋 振¹ 张 欣² 王含彦¹ 侯 丽¹ 魏 玲^{2*}

(¹川北医学院生物化学教研室, 南充 637000;

²四川大学华西基础医学与法医学院生物化学与分子生物学教研室, 成都 610041)

摘要 作为一门广泛应用于疾病、肿瘤、营养、药物及微生物等领域的组学技术, 代谢组学已成为近年来组学技术的研究热点之一。食管癌是严重危害我国居民健康的恶性肿瘤, 运用代谢组学技术在早期肿瘤标志物的筛选中取得了重要进展。该文对代谢组学与食管癌研究作一综述, 为食管癌防治工作提供参考依据。

关键词 代谢组学; 食管癌; 肿瘤标志物

Advance in Metabolomics Research in Biomarkers of Esophageal Cancer

Jiang Zhen¹, Zhang Xin², Wang Hanyan¹, Hou Li¹, Wei Ling^{2*}

(¹Department of Biochemistry, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Huaxi Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Metabolomics, as a biotechnology widely used in fields such as disease, cancer, nutrition, drugs and microorganism in recent years, has become one of the focuses in “-omics” technology. Esophageal cancer (EC) is a malignance which is extremely harmful to the health of national residents. Metabolomics has made great progress in the screening of biomarkers of EC. This paper reviewed the researches about metabolomics and esophageal cancer in the last two decades to provide a reference basis for treatment and prediction of esophageal cancer.

Keywords metabolomics; esophageal cancer; cancer biomarkers

食管癌是严重危害我国居民健康的主要恶性肿瘤, 每年新增病例和死亡病例居全球首位^[1-2]。食管癌病理类型主要有腺癌和鳞癌, 我国一直以食管鳞癌为主, 高发于50~80岁人群, 男女比例约为2:1, 农村高于城市。近30年来, 我国食管癌发病率及死亡率稳中有降, 但仍然是我国农村地区尤其是高发区的主要癌症。尽管早期食管癌预后良好, 经手术后10年生存率可达95%以上, 但多数患者就诊时已至中晚期, 预后极差, 5年生存率仅5%~15%^[3]。如何实现食管癌的早期诊断是当前医学界的难题, 目前已鉴定出一大类的血清食管癌标志物及放疗标志物, 如人鳞状细胞癌抗原(squamous cell carcinoma

antigen, SCC-Ag)、癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)、糖类抗原19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)、细胞质胸苷激酶-1(cytosolic thymidine kinase-1, TK-1)、基质金属蛋白酶类(ma-trix metalloproteinases, MMPs)、p53、环加氧酶-2(cyclooxygenase-2, Cox-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、细胞周期素D1(cyclin D1)和Ki-67等^[4], 在临床早期诊断中发挥了重要作用, 但灵敏度和特异度在早期诊断中仍有待提高, 进一步筛选食管癌发生及术后转归中的特异性标志物, 是食管癌研究中的重要内容。

代谢组学(metabolomics)的研究对象是分子

收稿日期: 2016-07-11 接受日期: 2016-11-10

川北医学院博士启动基金(批准号: CBY15-QD05)资助的课题

*通讯作者。Tel: 028-85501283, E-mail: weiling@scu.edu.cn

Received: July 11, 2016

Accepted: November 10, 2016

This work was supported by the Doctoral Scientific Research Foundation of North Sichuan Medical College (Grant No.CBY15-QD05)

*Corresponding author. Tel: +86-28-85501283, E-mail: weiling@scu.edu.cn

网络出版时间: 2017-02-07 12:06:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170207.1206.004.html>

量小于1 kDa的机体内源性代谢物, 主要来源于物质、能量代谢的中间体或产物^[5-6], 它们不仅是生物体受刺激或扰动后体内能量、代谢途径变化的结果, 它们也具有信号转导、辅酶、细胞因子和诱变剂等作用, 在机体生理或病理过程中发挥着重要的生物学功能。因此, 开展对这些小分子代谢物的研究, 可以观察机体在生理或疾病状态下发生的代谢途径或产物的改变。当前主要的代谢组学技术有核磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)及毛细管电泳质谱联用技术(capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS)、红外光谱、电化学检测等。NMR是代谢组学研究的主要技术, 优势在于样本不需要繁琐预处理, 可对样本实现无创性、无偏向的检测, 结果具有良好的客观性、重现性^[7-8]。使用增加场强、低温探头和微探头等方法, 使NMR的灵敏度达到了纳克级水平。尤其是近年来发展的魔角旋转(magic angle spinning, MAS)技术可克服偶极耦合引起的线展宽、化学位移的各向异性问题, 使NMR谱图质量更高, 样本所需量更少^[9]。随着超高效液相色谱和超高压系统等技术的发展, 将色谱分离强、灵敏度高和应用广的特点与质谱的灵敏度高、准确性高的特点相结合, 衍生了许多重要的联用技术, 主要有GC-MS和LC-MS技术, 特别是高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)和超高效液相色谱-质谱(ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry, uPLC-MS)联用技术, 在当前代谢组学研究中十分常见^[10-15]。相对于基因组学或蛋白组学而言, 代谢物检测更接近于反映生物表型的改变, 且代谢组学样本易采集, 代谢物的研究种类更少、更能提供细胞内生化反映结果的信息^[16-18], 对于疾病的诊断、药物筛选及疗效与预后判断有着广阔的应用价值。

近年来, 运用代谢组学的方法来检测和分析早期食管癌患者组织、血液或尿液中代谢物的变化和规律已经有不少研究^[19-25, 32-41]。这些研究分别从食管癌的发病机制、早期诊断标志物筛选、诊断分期、疗效和预后判断等方面进行了代谢组分的分析。所得结果提示了在食管癌的发生和发展过程中, 存在

代谢途径和代谢物的异常, 涉及糖酵解、脂质代谢、三羧酸循环、氨基酸代谢和核苷酸代谢等多条物质与能量代谢途径^[23], 为食管癌的代谢组学分析积累了重要资料。

1 代谢组学在食管癌发生机制方面的研究

有研究报道, 食管腺癌的发病率和死亡率与内脏肥胖(visceral obesity)的程度密切相关^[24]。Lynam等^[24]运用从肥胖及非肥胖食管癌患者手术中取下的内脏脂肪制备的培养基(adipose conditioned media, ACM)培养食管癌细胞, 发现肥胖患者内脏脂肪源性的培养基可诱导线粒体功能障碍、内源性ATP水平降低, 并诱导19个线粒体基因异常表达。进一步通过NMR方法鉴定出肥胖患者源性ACM作用食管癌细胞后, 糖酵解增强、支链氨基酸(缬氨酸与异亮氨酸)降低, 提示在食管癌细胞中与物质与能量代谢途径发生了异常改变。

2 代谢组学在食管癌早期诊断及肿瘤分期中的应用

2.1 代谢组学在筛选食管癌早期标志物中的应用

同大多数肿瘤一样, 早期食管癌缺乏高特异性、高敏感性的标志物。Ikeda等^[25]报道, 在早期食管癌中, SCC-Ag灵敏度为46.7%、特异性为90.9%; p53的灵敏度20.0%、特异性为100%。运用GC-MS检测方法, 鉴定出9种在食管癌病人血清中显著差异的代谢物。相对于健康对照者, 在食管癌中上调的有乳酸、乙醇酸、丙二酸、富马酸、L-丝氨酸、天冬氨酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺, 下调的有丙酮酸。进一步分析得出, 丙二酸和L-丝氨酸水平在食管癌II期中最高, III和IV期次之, I期中最低。该方法具有较好的灵敏度(丙二酸: 80.0%; L-丝氨酸: 59.2%)和特异性(丙二酸: 81.3%; L-丝氨酸: 90.1%), 提示该方法在食管癌早期诊断及分期应用中的可能性。然而, 丙二酸和L-丝氨酸分别在乳头状甲状腺腺癌^[26]、肾癌^[27]、口腔癌^[28]、胃癌^[29]、胰腺癌^[30]和结直肠癌^[31]等肿瘤中均有异常表达, 在不同的肿瘤中其浓度相差甚远, 目前的研究对二者的结果尚不一致。二者在细胞内参与的代谢途径分别涉及糖酵解、三羧酸循环、脂质代谢、氨基酸代谢及核酸代谢等基础物质代谢, 二者在肿瘤诊断中的特异性仍需进

一步的验证。Wu等^[32]运用GC-MS分析了20例食管癌与癌旁组织中代谢物的差异,结果鉴定出20种显著差异的小分子代谢物,分别涉及食管癌细胞内的糖酵解、脂质代谢、氨基酸代谢及有机酸代谢的途径。利用进行受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析对这20种小分子的区分能力进行评价,其曲线下面积(area under the curve, AUC)为1,诊断效果较佳。Zhang等^[33]运用LC-MS对食管癌患者、Barrett食管癌患者、高级别病变组(high-grade dysplasia, HGD)和健康对照组的血清样本进行了检测,食管癌与健康对照组相比,有12种差异的小分子,其灵敏度为77.0%,特异度为86.0%,AUC值0.82。食管癌组和高危组(Barrett食管组和高级别病变组)相比,分别有7种显著差异的代谢物,其灵敏度为83.0%,特异度为80.0%,AUC值为0.87。Yakoub等^[34]采集了食管癌组织、癌旁的正常黏膜组织(proximal histologically normal mucosa from cancer patients, PHINOM)和正常人食管的黏膜,进行¹H-NMR分析。同癌旁组织相比,癌组织中上调的有磷酸胆碱、肌醇和谷氨酸,同正常的食管黏膜上皮相比,癌组织上调的有肌苷和含尿苷化合物。同时磷酸胆碱/谷氨酸(phosphocholine/glutamate, PC/Glu)比值在正常黏膜、癌旁黏膜及癌组织中呈现显著的连续上升趋势,正常黏膜最低,癌旁黏膜居中,癌组织最高。该研究认为,PC/Glu比值能较好地区分食管正常组织、癌旁组织和肿瘤组织。然而,限于食管癌的早期筛查大部分无法提取组织,该研究尚未检测PC/Glu比值在血液中的检测效能,因此,PC/Glu比值在食管癌患者的判别效能还需要进一步明确。

2.2 代谢组学在食管癌分期中的应用

肿瘤组织的病理分级分期是制定手术方案和术后放化疗方案的重要依据。由于食管癌往往浸润范围较广,早期内镜检查由于非典型增生和取材部位的影响,仍有7%~66%的漏诊率^[34]。筛选不同时期食管癌的组织、血液和尿液中特异性的代谢标志物,将作为内镜检查的重要辅助手段,提高诊断结果的可靠性。

Wang等^[35]运用¹H-NMR方法分别对89例食管癌患者和26例健康对照样本进行检测,在肿瘤组织中有45种代谢物浓度异常,有12种代谢物在不同分期显著上升或下调,有4种代谢组分只在特定分期中出现,在食管癌II期中只有多不饱和脂肪酸,III期

中只有二甲基甘氨酸出现,而双甲硫氨酸和组氨酸只在IV期中出现。Hasim等^[36]运用¹H-NMR对108例食管鳞癌患者的血液及尿液进行了代谢组学分析,结果在食管鳞癌患者的血液和尿液中上调的代谢物有13种,下调的有16种。进一步分析在不同分化的肿瘤中,低分化组有谷氨酸上调、肌酸和肌醇显著上调,高分化肿瘤中有极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、丙酮和非饱和脂肪酸上调。同时,在寻找不同分期的食管癌特异性代谢物时,非饱和脂肪酸可将低或高于IB2期的病人显著分开。Yang等^[37]运用高分辨率魔角旋转(high-resolution magic angle spinning, HRMAS)核磁共振方法检测了17例食管癌和癌旁组织中的代谢物,结果发现,在癌旁组织中,有3种上调、3种下调;在中分化的食管癌中,谷氨酸和丙氨酸显著上升,牛磺酸下降。同时,有3个代谢组分比值即总胆碱/肌醇(totalcholine/myo-inositol, tCho/MI)、总胆碱/肌苷(totalcholine/carnine, tCho/Cr)和甘氨酸/肌醇(glycine/myo-inositol, Gly/MI)可以区分高分化、低分化和癌旁组织,尤其以Gly/MI效果最佳,在3种组织中呈现显著的由低到高的变化趋势。Ma等^[3]运用HPLC对51例食管癌患者和60例正常人血浆游离氨基酸(plasma free amino acid, PFAA)进行了检测,在不同分化的食管癌中,有11种在低分化肿瘤中显著下调。在有淋巴结转移的患者中,有10种显著下调。运用这些差异代谢物对肿瘤进行分期,在食管癌≤IB2期中有谷氨酸、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和亮/异亮氨酸升高,在>IB2期中显著下降。上述研究均仅检测了正常和患者之间的代谢物差异,未考虑不同TNM分期本身可能存在代谢物差异。为此,陈星等^[3]采集了20例不同TNM(tumor node metastasis)分期(II期~IV期)的食管癌患者血浆样本,应用核磁共振波谱技术绘制了不同TNM分期患者的血浆代谢物指纹图谱。结果显示,相比于IIB、IIIA和IV期患者,IB和IIA期患者血浆中丁酮、乙醇胺、同型半胱氨酸、羟基丙酸、雌三醇水平升高,糖蛋白、肌酸、胆碱、异丁酸、丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸水平降低。进一步通过代谢型-酶学网络和基因本体通路回溯分析方法,筛选出4个差异代谢标志物(乙醇胺、羟基丙酸、同型半胱氨酸、雌三醇),以此建立的预测模型能较好地术前对食管癌患者进行快速临床分期,为精准化治疗提供量化指标^[38]。

2.3 代谢组学联合检测可显著提高阳性检出率

生物体内的因果关系往往是多重非线性的,任何机体内外环境的改变、疾病或药物作用都会对机体的代谢物产生影响,运用单一分子标志物不如联合检测多个标志物分子结果可靠^[39]。进而有研究者力求寻找一组或多个联合诊断标志物,以期获得可靠的早期诊断效果。

Xu等^[39]运用基于LC-MS/MS的多反应监测(multiple reaction monitor, MRM)靶向代谢组学方法鉴定到食管癌病人与正常人的血清中18种有差异的小分子代谢物,进行诊断试验分析,AUC值界于0.66~0.93之间,7个代谢组分的AUC值>0.85,分别是2个脂酰肉碱(octanoylcarnitine)、3个溶血磷脂酰胆碱[lysoPC(18:0)、lysoPC(16:1)、lysoPC(16:0)]、亚油酸和尿酸。若进一步把7个代谢物作为1个代谢物组进行分析,其灵敏度为90.2%,特异度为96.0%,AUC值为0.96,提示联合检测一组代谢物不仅灵敏度和特异度都有提高,结果也更加具有判断价值。Jin等^[40]运用GC-MS方法对已有淋巴结转移的食管癌患者血浆进行了代谢组学分析,结果提示,联合检测3种小分子代谢产物[缬氨酸、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、吡咯-2-羧酸],则可有效区分有无淋巴结转移的食管癌病人,得到了测试集(test set)灵敏度为90.0%,特异度为90.0%,AUC值为0.91,运用该模型得到的阈值,可以从测试集中区分出85%的病人。运用多种代谢组学方法的联合检测,也可以增加结果可信度。Zhang等^[33]用LC-MS鉴定出在食管癌和正常组织中的12种差异的代谢物,其灵敏度为77.0%,特异度为86.0%,AUC值为0.82,用NMR鉴定出8种差异代谢物,其灵敏度为82.0%,特异度为88.0%,AUC值为0.86。如果联合运用LC-MS和NMR的检测结果,则灵敏度为91.0%,特异度为91.0%,AUC值0.95,提示代谢组方法学的联合运用也可以提高灵敏度和特异性,从而增加结果的可靠性。

2.4 代谢组学在食管癌的疗效及预后判断中的应用

食管癌患者经手术治疗后常需辅助化疗或放疗,由于患者对化疗药物的反应不一,有的效果良好,有的则难以奏效。因此,筛选与药物疗效相关的基因型或代谢物分子,将对制定肿瘤的个体化治疗方案提供研究依据。Xu等^[39]运用血浆整体轮廓代

谢组学和靶向代谢组学相结合的方法,鉴定出5种在食管癌化疗效果较好组中的小分子代谢物,分别是2个脂酰肉碱,1个溶血磷脂酰胆碱[lysoPC(16:1)]、1个乳酸和1个柠檬酸,分别涉及糖酵解与脂肪酸的氧化等代谢途径。进一步通过基于靶向代谢组学验证,确定其中3种疗效候选标志物[octanoylcarnitine、decanoylcarnitine和lysoPC(16:1)]经过治疗后有显著回升,表明在化疗后肿瘤细胞的能量代谢途径得到部分恢复,有望成为评价临床疗效的代谢标志物。Beatriz等^[41]运用病例-对照(case-control)研究方法,从食管癌病人血浆中成功鉴定出3种代谢产物:L-脯氨酸(L-proline, LP)、酮体3-羟基丁酸酯(3-hydroxybutyrate, BHBA)和D-甘露糖(D-mannose, DM)。相比于健康对照组,前者在食管癌病人中浓度降低,后两者浓度升高,且DM在晚期食管癌病人(III、IVA、IVB)中显著高于早期病人(I、IIA、IIB)。通过3个代谢物建立的风险预测模型可将食管癌病人分为高危组和低危组,高危组具有较高的代谢物风险评分(metabolite risk score, MRS),且预后更差。研究认为,这3个代谢物可能作为食管癌预后判断的标志物^[41]。

3 结语与展望

目前,代谢组学在肿瘤中的应用已引起广泛关注,研究者分别从分子机制、早期诊断、分级分期和疗效判断等角度揭示了其在临床诊疗中的应用价值。然而,当前代谢组学的研究方法还存在一些难点。例如,目前代谢组学检测成本偏高;机体代谢受多种生理、病理因素影响,如何消除影响结果判断的干扰因素;对于浓度差异较大的代谢物或代谢物的大小及理化性质差异过大时,还没有一种技术可以涵盖所有小分子代谢物而不管其浓度和理化性质的差异;常用的数据分析方法如最小二乘法(partial least squares, PLS)和主成分分析法(principal component analysis, PCA)等大多适用于线性数据集,如何处理非线性数据集也是需改进的问题。值得肯定的是,代谢组学高通量、定性及定量的特点,使它成为继基因组学、转录组学、蛋白组学之后又一个重要的组学平台^[42]。相比较前三者,更接近于反映机体在内外环境改变或疾病状态下的表型的改变,使得它在肿瘤的早期诊断、术后监测及预后判断上具有广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- 1 陈万青, 张思维, 曾红梅, 郑荣寿, 邹小农, 赵平, 等. 中国2010年恶性肿瘤发病与死亡. 中国肿瘤(Chen Wanqing, Zhang Siwei, Zeng Hongmei, Zheng Shourong, Zhou Xiaonong, Zhao Ping, *et al.* Report of cancer incidence and mortality in China. *China Cancer*) 2014; 23(1): 1-10.
- 2 宋杰, 吴庆琛, 张诚, 王德林. 干扰YAP1对食管癌Eca-109细胞生物学功能的影响. 中国细胞生物学学报(Song Jie, Wu Qingchen, Zhang Cheng, Wang Delin. The impact of interfering YAP1 on the biological function of Eca-109 cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(6): 787-92.
- 3 Ma H, Hasim A, Mamtimin B, Kong B, Zhang HP, Sheyhidin I. Plasma free amino acid profiling of esophageal cancer using high-performance liquid chromatography spectroscopy. *World J Gastroenterol* 2014; 20(26): 8653-59.
- 4 Okumura H, Uchikado Y, Setoyama T, Matsumoto M, Owaki T, Ishigami S, *et al.* Biomarkers for predicting the response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemoradiation therapy. *Surg Today* 2014; 44(3): 421-8.
- 5 Lima AR, Bastos Mde L, Carvalho M, Guedes de Pinho P. Biomarker discovery in human prostate cancer: An update in metabolomics studies. *Transl Oncol* 2016; 9(4): 357-70.
- 6 许国旺. 代谢组学—方法与应用. 北京: 科学出版社(Xu Guowang. Beijing: Science Press) 2008.
- 7 Nagana Gowda GA, Raftery D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *J Magn Reson* 2015; 260: 144-60.
- 8 Wishart DS, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. Cancer metabolomics and the human metabolome database. *Metabolites* 2016; 6(1): 1-17.
- 9 Fuss TL, Cheng LL. Evaluation of cancer metabolomics using *ex vivo* high resolution magic angle spinning (HRMAS) magnetic resonance spectroscopy (MRS). *Metabolites* 2016; 6(1): 1-22.
- 10 Blum F. High performance liquid chromatography. *Br J Hosp Med (Lond)* 2014; 75(2): C18-21.
- 11 Zhao YY, Cheng XL, Vaziri ND, Liu S, Lin RC. UPLC-based metabolomic applications for discovering biomarkers of diseases in clinical chemistry. *Clin Biochem* 2014; 47(15): 16-26.
- 12 Yang G, Zhang H, Chen T, Zhu W, Ding S, Xu K, *et al.* Metabolic analysis of osteoarthritis subchondral bone based on UPLC/Q-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408(16): 4275-86.
- 13 Willmann L, Schlimpert M, Hirschfeld M, Erbes T, Neubauer H, Stickeler E, *et al.* Alterations of the exo- and endometabolite profiles in breast cancer cell lines: A mass spectrometry-based metabolomics approach. *Anal Chim Acta* 2016; 925: 34-42.
- 14 Wang J, Qiu S, Chen S, Xiong C, Liu H, Wang J, *et al.* MALDI-TOF MS imaging of metabolites with a N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride matrix and its application to colorectal cancer liver metastasis. *Anal Chem* 2015; 87(1): 422-30.
- 15 Bonner R, Hopfgartner G. SWATH acquisition mode for drug metabolism and metabolomics investigations. *Bioanalysis* 2016; 8(16): 1735-50.
- 16 Pitt JM, Vétizou M, Waldschmitt N, Kroemer G, Chamaillard M, Boneca IG, *et al.* Fine-tuning cancer immunotherapy: Optimizing the gut microbiome. *Cancer Res* 2016; 76(16): 4602-7.
- 17 Poornima P, Kumar JD, Zhao Q, Blunder M, Efferth T. Network pharmacology of cancer: From understanding of complex interactomes to the design of multi-target specific therapeutics from nature. *Pharmacol Res* 2016; 111: 290-302.
- 18 Vacchelli E, Enot DP, Pietrocola F, Zitvogel L, Kroemer G. Impact of pattern recognition receptors on the prognosis of breast cancer patients undergoing adjuvant chemotherapy. *Cancer Res* 2016; 76(11): 3122-6.
- 19 Zhang J, Liu L, Wei S, Nagana Gowda GA, Hammoud Z, Kesler KA, *et al.* Metabolomics study of esophageal adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 141(2): 469-75.
- 20 Liu R, Peng Y, Li X, Wang Y, Pan E, Guo W, *et al.* Identification of plasma metabolomic profiling for diagnosis of esophageal squamous-cell carcinoma using an UPLC/TOF/MS platform. *Int J Mol Sci* 2013; 14(5): 8899-911.
- 21 Zhang X, Xu L, Shen J, Cao B, Cheng T, Zhao T, *et al.* Metabolic signatures of esophageal cancer: NMR-based metabolomics and UHPLC-based focused metabolomics of blood serum. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(8): 1207-16.
- 22 Mir SA, Rajagopalan P, Jain AP, Khan AA, Datta KK, Mohan SV, *et al.* LC-MS-based serum metabolomic analysis reveals dysregulation of phosphatidylcholines in esophageal squamous cell carcinoma. *J Proteomics* 2015; 127(Pt A): 96-102.
- 23 Abbassi-Ghadi N, Kumar S, Huang J, Goldin R, Takats Z, Hanna GB. Metabolomic profiling of oesophago-gastric cancer: A systematic review. *Eur J Cancer* 2013; 49(17): 3625-37.
- 24 Lynam-Lennon N, Connaughton R, Carr E, Mongan AM, O'Farrell NJ, Porter RK, *et al.* Excess visceral adiposity induces alterations in mitochondrial function and energy metabolism in esophageal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2014; 14: 907.
- 25 Ikeda A, Nishiumi S, Shinohara M, Yoshie T, Hatano N, Okuno T, *et al.* Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. *Biomed Chromatogr* 2012; 26(5): 548-58.
- 26 Chen M, Shen M, Li Y, Liu C, Zhou K, Hu W, *et al.* GC-MS-based metabolomic analysis of human papillary thyroid carcinoma tissue. *Int J Mol Med* 2015; 36(6): 1607-14.
- 27 张琳, 李玲, 孔海瑞, 曾方银. 基于气相色谱质谱技术的肾细胞癌患者尿液代谢组学分析. 南方医科大学学报(Zhang Lin, Li Ling, Kong Hairui, Zeng Fangyin. Urinary metabolomics study of renal cell carcinoma based on gas chromatography-mass spectrometry. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*) 2015; 35(5): 1607-14.
- 28 Kimoto A, Nishiumi S, Kobayashi T, Terashima Y, Suzuki H, Takeuchi J, *et al.* A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum screening method for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol* 2013; 5(4): 1-34.
- 29 Chen JL, Fan J, Tang HQ, Hu JD, Gu JZ. Urinary metabolomic analysis of human gastric cancer mouse models and patients using gas chromatography/mass spectrometry. *J Mol Biomark Diagn* 2011; 1(S2): 1-8.
- 30 Chen JL, Fan J, Yan LS, Guo HQ, Xiong JJ, Ren Y, *et al.* Urine metabolite profiling of human colorectal cancer by capillary electrophoresis mass spectrometry based on MRB. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012(6): 1-8.
- 31 Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010; 6(1): 78-95.
- 32 Wu H, Xue R, Lu C, Deng C, Liu T, Zeng H, *et al.* Metabolomic

- study for diagnostic model of oesophageal cancer using gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(27): 3111-7.
- 33 Zhang J, Bowers J, Liu L, Wei S, Gowda GA, Hammoud Z, *et al.* Esophageal cancer metabolite biomarkers detected by LC-MS and NMR methods. *PLoS One* 2012; 7(1): e30181.
- 34 Yakoub D, Keun HC, Goldin R, Hanna GB. Metabolic profiling detects field effects in nondysplastic tissue from esophageal cancer patients. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9129-36.
- 35 Wang L, Chen J, Chen L, Deng P, Bu Q, Xiang P, *et al.* ¹H-NMR based metabonomic profiling of human esophageal cancer tissue. *Mol Cancer* 2013; 12: 25.
- 36 Hasim A, Ma H, Mamtimin B, Abudula A, Niyaz M, Zhang LW, *et al.* Revealing the metabonomic variation of EC using ¹H-NMR spectroscopy and its association with the clinicopathological characteristics. *Mol Biol Rep* 2012; 39(9): 8955-64.
- 37 Yang Y, Wang L, Wang S, Liang S, Chen A, Tang H, *et al.* Study of metabonomic profiles of human esophageal carcinoma by use of high-resolution magic-angle spinning ¹H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(10): 3381-9.
- 38 陈 星, 王 凯, 陈 伟, 江 华, 邓鹏翅, 李子建, 等. 应用磁共振波谱代谢组学和基因本体论建立食管癌患者病理分期预测模型的研究. *中华外科杂志*(Chen Xing, Wang Kai, Chen Wei, Jiang Hua, Deng Pengchi, Li Zijian, *et al.* Using ¹H-nuclear magnetic resonance metabolomics and gene ontology to establish pathological staging model for esophageal cancer patients. *Chin J Surg*) 2016; 54(7): 540-5.
- 39 Xu J, Chen Y, Zhang R, Song Y, Cao J, Bi N, *et al.* Global and targeted metabolomics of esophageal squamous cell carcinoma discovers potential diagnostic and therapeutic biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12(5): 1306-18.
- 40 Jin H, Qiao F, Chen L, Lu C, Xu L, Gao X. Serum metabolomic signatures of lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *J Proteome Res* 2014; 13(9): 4091-103.
- 41 Sanchez-Espiridion B, Liang D, Ajani JA, Liang S, Ye Y, Hildebrandt MA, *et al.* *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13(10): 1730-7.
- 42 Wishart DS, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. Cancer metabolomics and the human metabolome database. *Metabolites* 2016; 6(1): 1-17.