



孟凡渝博士, 上海交通大学医学院附属胸科医院助理研究员, 上海市扬帆人才, 致力于核酸纳米结构和电化学传感技术的开发及其在肺癌早期诊断领域的应用。近五年的主要研究成果发表在*Small*、*Journal of Nanobiotechnology*、*Journal of Materials Chemistry B*、*Analytica Chimica Acta*等国际学术期刊上。



黄琳博士, 上海交通大学医学院附属胸科医院副研究员, 上海市胸部肿瘤研究所课题组长, 质谱平台负责人, 医学院高峰高原双百人、上海市扬帆人才。研究围绕临床早期诊断的核心需求, 面向疾病表型发展材料器件调控的质谱检测方法和人工智能辅助的分子分析方法。近五年研究成果在*Advanced Materials*、*Matter*、*Nature Communications*等国际学术期刊上发表。

基于质谱技术的肺癌代谢标志物筛选研究进展

赵越薇¹ 孟凡渝^{1,2*} 黄琳^{1,2*}

(¹上海市胸科医院/上海交通大学医学院附属胸科医院检验科, 上海 200030;

²上海市胸科医院/上海交通大学医学院附属胸科医院胸部肿瘤研究所, 上海 200030)

摘要 肺癌早期诊断可显著改善患者预后, 提高患者生存率。肺癌发生发展进程伴随机体代谢物变化, 因此通过对体内代谢通路的全面检测, 进而结合生物信息学工具分析代谢应答变化, 可高效筛选肺癌相关代谢标志物, 有助肺癌早期发现。近年来已开发多种代谢检测技术用于肺癌代谢标志物筛选, 其中质谱技术在检测的灵敏度、特异性、分析速度、多指标平行检测等方面展现出显著优势, 因此在癌症诊断、疾病监测和治疗等领域有重要地位。该文概述了质谱技术方法在肺癌临床诊疗应用中的最新研究进展, 并对应用质谱方法学研究生物标志物的前景进行了系统性展望。通过对近期研究的深入了解, 预期将进一步理解肺癌代谢特征, 为肺癌早期诊断和治疗提供精准评估技术手段。

关键词 肺癌; 代谢标志物筛选; 质谱; 诊断; 预后

收稿日期: 2023-11-07

接受日期: 2023-12-06

中国自然科学基金(批准号: 82372148)和上海市青年科技英才扬帆计划(批准号: 21YF1443000)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-22200000, E-mail: fanyumeng@shsmu.edu.cn; linhuang@shsmu.edu.cn

Received: November 7, 2023

Accepted: December 6, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82372148) and the Shanghai Sailing Program (Grant No.21YF1443000)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-22200000, E-mail: fanyumeng@shsmu.edu.cn; linhuang@shsmu.edu.cn

Research Progress in Screening Metabolic Biomarkers of Lung Cancer Based on Mass Spectrometry Technology

ZHAO Yuewei¹, MENG Fanyu^{1,2*}, HUANG Lin^{1,2*}

(¹Department of Clinical Laboratory, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; ²Institute of Thoracic Oncology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China)

Abstract Early diagnosis of lung cancer can significantly improve patient prognosis and increase patient survival rate. The occurrence and development of lung cancer is accompanied by changes in metabolites in the body. Therefore, comprehensive detection of metabolic pathways in the body, combined with bioinformatics tools to analyze metabolic response changes, can efficiently screen lung cancer-related metabolic markers, which can help to detect lung cancer in its early stages. In recent years, various metabolic detection technologies have been developed for screening metabolic biomarkers in lung cancer. Among them, mass spectrometry technology has shown significant advantages in sensitivity, specificity, analysis speed, multi-index parallel detection, etc. Therefore, it plays an important role in cancer diagnosis, disease monitoring, and treatment. This article summarizes the latest research progress of mass spectrometry technology in the clinical diagnosis and treatment of lung cancer, and provides a systematic outlook on the prospects of applying mass spectrometry methodology to the discovery studies of biomarkers. Through an in-depth understanding of recent research, it is expected to further understand the metabolic characteristics of lung cancer and provide precise evaluation techniques for early diagnosis and treatment of lung cancer.

Keywords lung cancer; screening of metabolic markers; mass spectrometry; diagnosis; prognosis

肺癌是发病率和死亡率增长最快、对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一,肺癌早期诊断是提高患者生存率的重要措施之一^[1]。影像学是当前肺癌筛查主要方法,但假阳性结果易导致过度诊断,增加患者负担。血液肿瘤标志物[如循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、自身抗体、循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)、血液蛋白等]已成为液体活检的主要方法,受限于其灵敏度和特异性,目前临床应用仍较有限。因此,仍需筛选肺癌相关特异性标志物,提示临床肺癌发病及其进展风险。

小分子代谢物(分子量 $\leq 1\ 500\ \text{Da}$)是所有细胞活动的最终产物。作为机体各种反应的最终结果,对其深入研究有望揭示疾病病因和发生发展机制^[2]。目前研究已报道如恶性肿瘤进展往往伴随葡萄糖代谢、氨基酸代谢、脂质代谢等多种代谢发生异常改变^[3-4]。代谢物检测主要依赖质谱(mass spectrometry, MS)等技术。面向肿瘤临床标志物的筛选研究,质谱技术具有灵敏性高、特异性好、适用广泛等特点,但仍面临着高通量和自动化的瓶颈和挑战。

此外,纳米材料的引入、单细胞代谢等前沿技术突破也极大革新了质谱在代谢分子标志物检测中的应用边界^[5]。

本文系统性综述了质谱技术方法及其在肺癌临床诊疗应用等方面的最新研究进展。首先,综述了不同的质谱技术最新发展,强调了其在代谢标志物检测中的特点和性能。之后,我们对质谱技术在改善肺癌诊疗预后、挖掘肺癌发生发展机制等方面的应用进行了归纳和总结。我们期待本综述能为寻找理想肺癌标志物提供新见解,为肺癌精准诊断与治疗奠定理论基础。

1 质谱技术方法

生化分子研究关注肿瘤进展过程伴随发生的代谢重编程。前期研究使用多种先进质谱技术方法,探索筛选肺癌相关肿瘤标志物(图1)。近年来,质谱技术方法学已有大量发展改进,可极大提高肺癌代谢分析的覆盖范围、选择性、灵敏度和高通量。目前在用的主要质谱平台包括气相色谱-质谱联用(gas chromatography mass spectrometry, GC-

MS)、液相色谱质谱联用(liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)、基质辅助激光解吸电离质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, MALDI-MS)等。通过不同类型的质谱仪如单四极杆质谱(single quadrupole mass spectrometry, Q)、四极杆-飞行时间串联质谱(quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, Q-TOF)、三重四极杆质谱(triple quadrupole tandem mass spectrometry, QQQ)、离子阱质谱(ion trap mass spectrometry, IT)以及高分辨质谱等,实现大多数代谢物的分析和定量,这在肺癌代谢标志物筛选中发挥着不可替代的作用。

质谱技术的优缺点及其在肺癌代谢物分析中的应用特点见表1。GC-MS主要优点是对挥发性小

分子的分辨率好、检测灵敏度高、可定性能力强等,而对于挥发性差、分子量较大的代谢物只能采用衍生化的方法,且处理过程较为繁琐。LC-MS的优点是敏感性高、样本预处理方法相对简单、代谢物检测的覆盖面大等。缺点是对样本预处理的要求比较高、抗干扰能力差、检测仪器昂贵。MALDI-MS作为一种新型的检测技术手段,具有快速、准确、易于自动化和耗费少等优点。相较于传统检测手段,样品不需要进行复杂的前处理,即可对特定成分进行空间定位检测和实时数据分析,但可选择基质较少且会带来干扰,同时样本的高通量分析仍面临挑战。随着上述质谱技术的不断发展和提高,已经发现一些肺癌相关代谢标志物,有望用于肺癌诊断及预后评估。

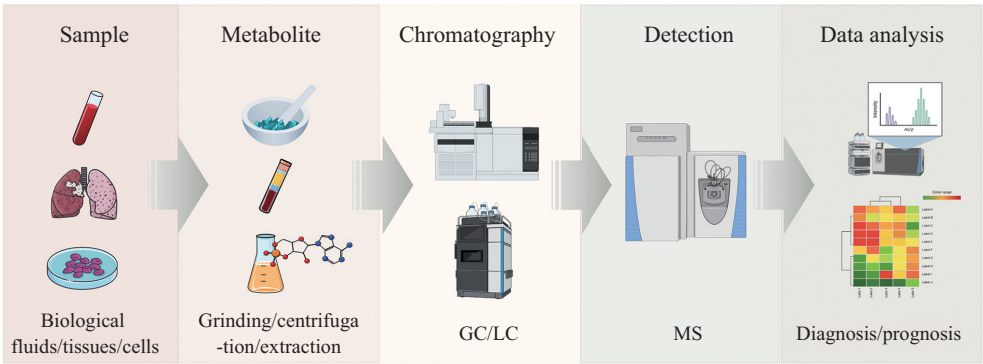


图1 基于质谱技术筛选肺癌代谢标志物的流程简图

Fig.1 Schematic diagram of screening metabolic markers of lung cancer based on mass spectrometry

表1 质谱技术之间的比较

Table 1 Comparison of mass spectrometry techniques

技术 Technology	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	应用 Applications
GC-MS	Accurately analyze low molecular weight (<500 Da) metabolites Volatile compound analysis Efficient, sensitive, and reproducible Available databases and software	Strict conditions Derivatized samples Destructive Not suitable for thermally unstable compounds Detection of single metabolite	Analysis of volatile metabolites
LC-MS	Wide metabolite coverage, ranging from molecular weight 800-2 000 Da Simple sample preparation High sensitivity, speed, and economy Flexible and diverse Available software	Batch processing and standardization Poor anti-interference ability Expensive instruments Difficult to form multi molecular ionic compounds	Comprehensive metabolite analysis including amino acids, sugars, fatty acids, etc
MALDI-MS	Simple sample preparation Flexible, diverse, and fast Wide coverage of metabolites High accuracy	Low sensitivity Quantitative restrictions Matrix interference	Analysis of metabolites including amino acids, lipids, nucleotides, etc

1.1 GC-MS技术研究进展

GC-MS是目前最常用的肺癌挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs)检测平台, 广泛应用于VOCs组分的分离与鉴定^[6-7]。考虑到呼气样品复杂性, GC-MS分析之前必须进行样品预浓缩步骤。其中, 固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)以其操作简单、萃取时间短等优点广泛应用于样品富集和分离提纯。RUDNICKA等^[8]采用固相微萃取/气相色谱-质谱联用(SPME/GC-MS)技术, 对253名受试者呼气样本中的VOCs进行定性和定量分析。该方法重复性好, 针对烃类、醇类、醛类、酮类和芳香族化合物的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在3%~10%; 但灵敏度较差, 其中烃类和芳香族化合物的检测限最低, 范围分别为1~5 ppb和2~5 ppb。为提升检测性能, 新型吸附剂的开发现已成为质谱样品前处理的重要组成部分。NASERI等^[9]将没食子酸功能化氧化锌纳米棒(ZnO@GA纳米棒)包覆玻璃光纤作为SPME吸附剂, 在最佳条件下实现了高灵敏的VOCs检测, 该方法在0.005 00~1.000 00 ppb的线性范围内检测限更低(0.000 32~0.00 480 ppb)。他们将此方法应用于水和尿液中6种VOCs(3,4-二甲基苯甲醛、丁香酚、3-庚酮、己醛、薄荷醇、2-甲基噻吩)的测定, 回收率为90%~112%。为扩大肺癌标志物的检测范围, MUHAMMAD等^[10]进一步结合热解吸(thermal desorption, TD)-GC-MS解决了复杂类型样品的分析测定难题, 并对352例受试者的呼气样本进行了C6-C30检测。该研究表明, 9~11种VOCs在组织学鉴定、肺癌分期、健康人群与肺癌区分、肺癌与良性疾病区分方面有显著相关性。CHEN等^[11]进一步基于TD-GC-MS方法, 采用Tenax TA吸收管吸附C6-C30挥发性有机物, 对352例受试者VOCs组分实现样本富集及检测, 并对观察到的537种VOCs进行分析。ZOU等^[12]同样采用TD-GC-MS, 对236个呼吸样本进行了分析, 从每个样品的呼吸图谱中提取出了308个VOCs特征峰。

除呼气样本外, 从体液等生物样本中提取的代谢物也需要衍生为挥发性衍生物, 才可经GC-MS检测分析, 而衍生化后出现的物质变性直接影响分析结果。二维气相色谱质谱联用技术, 可有效解决重叠峰、共馏峰和分离不完全等一维气相色谱所存在的问题, 在代谢标志物检测领域已取得突破性的进

展。ROCHA等^[13]首次将综合二维气相色谱-飞行时间质谱(two-dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry, GCxGC-TOFMS)结合顶空固相微萃取(headspace-solid-phase microextraction, HS-SPME)技术应用于人类尿液挥发性成分的非靶向研究。从每个样本检测到的总共约700种化合物中, 初步鉴定出294种代谢物, 分布在烃类、胺类、酰胺类、酯类、酮类、醛类等的化学家族中, 为基于尿液指纹图谱的临床研究提供了一定参考。

1.2 LC-MS技术研究进展

相较于GC-MS, LC-MS更适宜分析难挥发、热不稳定化合物, 具有较高的灵敏度和较宽的动态范围。LI等^[14]基于LC-MS研究了被用于揭示暴露于4种不同类型的MO_x NP(ZnO NP、SiO₂ NP、TiO₂ NP和CeO₂ NP)的人类支气管上皮细胞在高剂量(25 μg/mL)和低剂量(12.5 μg/mL)下代谢产物变化(图2A)。研究检测共发现8 630个代谢特征, 共鉴定出2 827个代谢物。其中, 明确MO_x NPs可显著改变的代谢物有氨基酸、核苷酸、核苷等。类似地, WANG等^[15]开发了一种基于LC-MS的多反应监测靶向测定法, 对不同类型的早期肺癌细胞进行脂质代谢失调分析, 发现甘油磷脂代谢在脂质代谢相关途径中变化最大。经样本检测和谱峰对比, 研究者在正负离子模式下分别鉴定出1 478、708种代谢物, 经分析最终确定了9种脂质(溶血磷脂酰胆碱: 16:0、18:0和20:4; 磷脂酰胆碱: 16:0/18:1、16:0/18:2、18:0/18:1、18:0/18:2和16:0/22:6; 甘油三酯: 16:0/18:0/19:1)是早期癌症检测最重要的标志物。

为提升LC-MS检测灵敏性, 超高效液相色谱-高分辨率质谱(ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, UPLC-HRMS)已成为代谢物分析的最佳工具之一^[16]。YAO等^[17]利用UPLC-HRMS对695份血清样本进行代谢物分析, 其中27种代谢物的平均受试者工作特征曲线下面积(area under the receiver operating characteristic curve, AUC)最大, 被确定为最佳判别模型, 可作为肺癌鉴定标志物(图2B)。进一步的定量分析显示, 相较于健康人群, 腺癌患者血清中次黄嘌呤、黄嘌呤、丙酮酸和乳酸含量显著升高, 色氨酸含量降低。研究者认为, 肺腺癌患者血清中糖酵解代谢物升高与色氨酸降低相关, 并通过实验证明了色氨酸摄取促进了肺癌细胞的糖酵解。UPLC与

HRMS技术联用,提高了分离效率和灵敏度,定量结果更加准确、特异性更高,降低了误差风险。

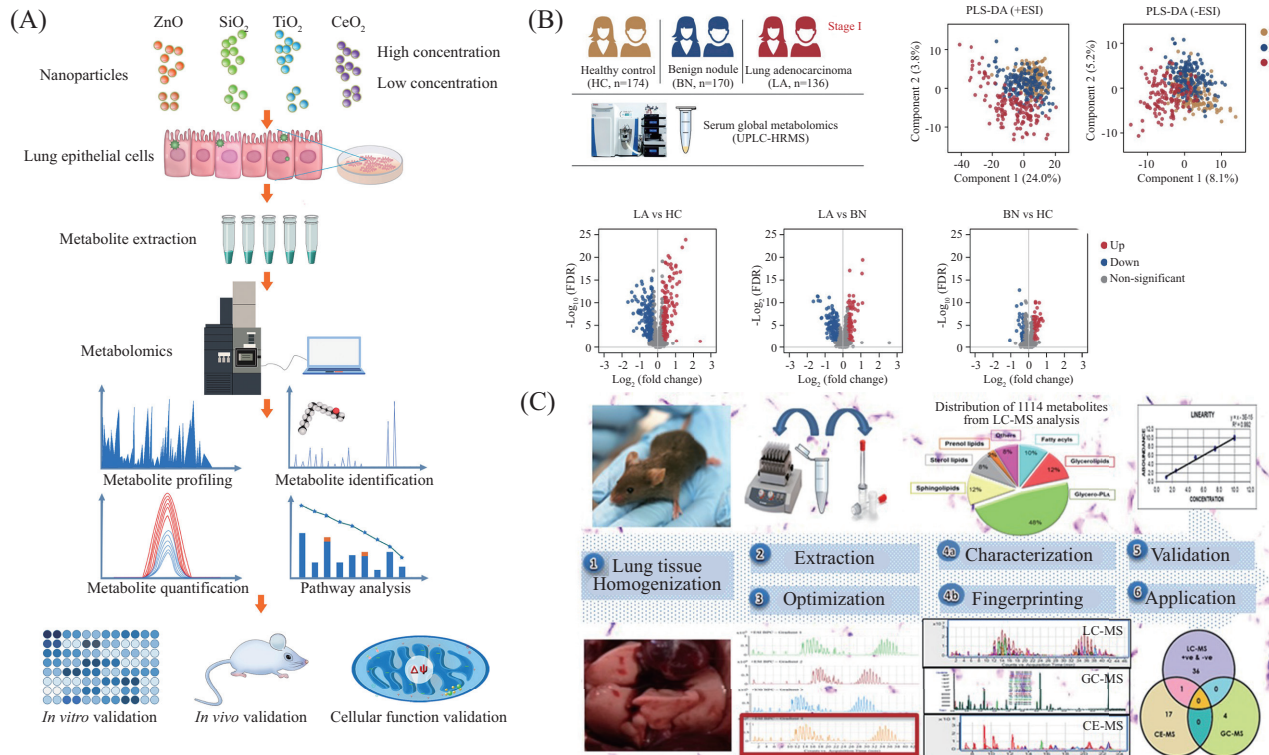
由于生物样本成分复杂,为提升代谢研究的全面覆盖性能,整合多种质谱技术开发多重互补的分析平台在生物质谱检测中受到广泛关注。NAZ等^[18]开发了一种非靶向全局指纹图谱采集方法,首次应用多种互补检测技术[LC-MS、GC-MS以及毛细管电泳质谱(capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS)]进行分析方法优化、表征和验证,以覆盖更广泛的代谢物种类(图2C)。研究者通过LC-MS在正电离模型下鉴定出954种化合物,在负电离中鉴定出292种化合物,共同鉴定出132种化合物。经方法学优化,所有检测平台具有良好的回收率和精度,采集到的代谢物线性度均大于0.99。研究者将上述整合方法应用于败血症大鼠的肺部样本检测,3种分析技术仅需消耗约20 mg的组织样本,其中只有一种共同的代谢物在LC-MS和CE-MS平台显示出了显著的统计学差异。整合使

用上述3种质谱平台可有效覆盖更广泛的代谢物种类。特别是,LC-MS与其他质谱技术的结合,可增加更多关于带电化合物和游离挥发性代谢物的信息。

1.3 MALDI-MS技术研究进展

基质辅助激光解吸电离技术(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)于1987年首次由德国科学家HILLENKAMP及KARAS提出,随后日本科学家田中耕一因激光解吸电离(laser desorption ionization, LDI)技术的开发,与电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)的发明人John FENN同时分享了2002年诺贝尔化学奖^[5]。MALDI-MS长期被用于生物大分子的质谱检测。然而,在代谢物等生物小分子的测量中,传统小分子有机酸基质面临离子化效率低下、背景噪声干扰强烈等挑战。为拓展MALDI-MS的应用边界,以用于代谢物检测,近年来已开展了大量研究聚焦于开发新型有机或无机基质。

有机基质的开发原理主要依赖于含有特定基



A: LC-MS用于评估预测肺癌细胞代谢物变化^[14]; B: 超高效液相色谱-高分辨率质谱(UPLC-HRMS)法用于肺癌血清代谢物分析^[17]; C: LC-MS与其他互补质谱平台用于肺组织代谢物分析^[18]。

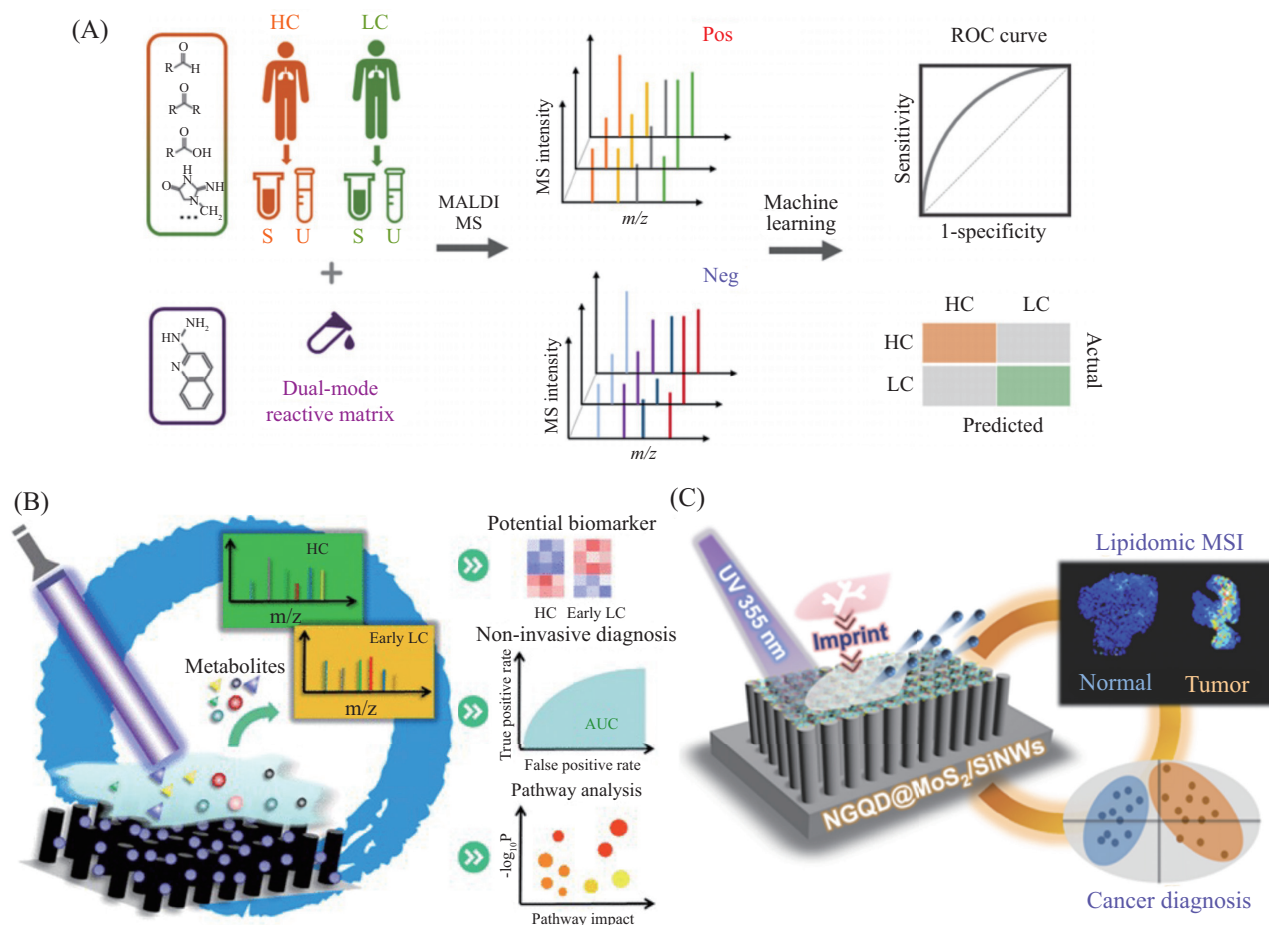
A: LC-MS used to evaluate and predict changes in metabolites in lung cancer cells ^[14]; B: UPLC-HRMS (ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry) for the analysis of serum metabolites in lung cancer ^[17]; C: LC-MS and other complementary mass spectrometry platforms for the analysis of lung tissue metabolites ^[18].

图2 LC-MS技术的研究进展
Fig.2 Research progress of LC-MS technology

团分子在紫外波段的强激光吸收,可有效将光能转化,用于辅助待测物的解吸脱附及离子化过程。LI等^[19]利用2-胍喹啉(2-HQ)作为双模反应基质,通过MALDI-MS进行代谢指纹分析(图3A)。2-HQ在紫外激光辐照下显示出较高反应效率,可同时实现醛类和酮类化合物及其衍生物的精准分析。基于2-HQ基质,研究者检测到正离子模式下的5种碳基分子(包括乙醛、戊二醛、苯甲醛、丙酮和己酮)和阴性模式下的7种氨基酸分子(包括脯氨酸、缬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、苯丙氨酸和蛋氨酸等),检测限最低可小于100 nmol/L。NEUMANN等^[20]使用N-(1-萘)乙二胺盐酸盐(NEDC)作为基质,检测了肺癌中差异调控的多种代谢物,如磷脂、草酸、抗氧化牛磺酸、谷氨酰胺氯加合物、磷脂酰丝氨酸等。他

们进一步通过质谱空间成像,观察到了上述物质在腺癌、鳞癌肿瘤区中的分布差异。SUN等^[21]使用1,1'-联萘-2,2'-二胺(1,1'-naphthalene-2,2'-diamine, BNDM)作为MALDI基质,用于分析异质组织中内源性代谢物的检测和成像。他们成功在大鼠脑内观察到301个代谢物负离子和175个代谢物正离子。基于原位组织代谢指纹的数据驱动分割分析清晰显示了肺癌潜在的代谢异质性,或为肿瘤微环境分析提供新的见解。

无机基质(通常为硅基、贵金属等纳米材料)具有独特光电/热特性,有望解决在低质量范围内的基质自解离及离子抑制,具有数据重现性高、背景干扰小等优点。JIANG等^[22]使用氟化乙烯丙烯聚合物(fluorinated ethylene propylene polymer, FEP)涂层



A: 基于有机基质辅助激光解吸电离质谱用于生物流体代谢谱研究^[19]; B: 基于垂直硅纳米线(VSiNW)阵列的超低噪声尖端增强激光解吸电离质谱平台对代谢物分析^[22]; C: 基于NGQD@MoS₂/SiNWs二维纳米结构的激光解吸电离质谱成像技术用于代谢物空间分布研究^[23]。

A: organic matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry for the study of biofluid metabolism spectra^[19]; B: VSiNW (vertical silicon nanowire) array based ultralow noise tip-enhanced laser desorption ionization mass spectrometry platform for metabolite analysis^[22]; C: NGQD@MoS₂/SiNWs 2D nanostructures based laser desorption ionization mass spectrometry imaging for studying the spatial distribution of metabolites^[23].

图3 MALDI-MS技术的研究进展

Fig.3 Research progress of MALDI-MS technology

的垂直硅纳米线(vertical silicon nanowires, VSiNW)阵列,开发了具有尖端增强激光解吸/电离效果的质谱平台分析唾液代谢物,用于肺癌早期诊断(图3B)。VSiNW阵列具有低背景噪声的优势,且可通过尖端有效增强局部电磁场形成局域热点,放大质谱信号。经非靶代谢分析,可检测到264个代谢物相关质谱谱峰,并证实与肺癌早期氨基酸和核苷酸代谢功能障碍有关。LIU等^[23]通过二硫化钼(MoS₂)与氮掺杂石墨烯量子点(nitrogen doped graphene quantum dots, NGQDs)的液体剥离方法制备了二维纳米片,后在垂直SiNWs尖端装饰纳米片,形成NGQD@MoS₂/SiNWs杂化纳米结构基板(图3C)。质谱检测结果显示出优异脂质提取能力和分离效率,不同脂质种类的峰值数量和总离子强度比SiNWs基底大4~5倍。此基板可兼容印迹采样和成像的功能,对30例样本分析发现了7个脂质分子可作为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的生物标志物。相应质谱成像图像清晰呈现上述7个特征脂质分子在肿瘤组织和相邻正常组织中的空间分布差异。

2 肺癌相关生物学应用

2.1 肺癌诊断预后

与正常细胞相比,癌细胞代谢活动发生改变。因此,代谢指纹图谱可区分健康和癌细胞代谢过程,有望早期诊断肺癌、预估预后结局,从而实现肺癌精准分型^[24]。液体活检已成为当前肺癌研究的热点之一,如何基于临床易得体液样本实现组织活检同等鉴别诊断精度已成为一个重要问题。此外,基于外泌体的分子也已成为早期癌症检测的有效分子标志物及早期癌症治疗的有效治疗靶点。经液体活检鉴定的潜在代谢分子标志物,通常还需进一步在组织层面进行准确验证。

2.1.1 体液样本潜在肿瘤标志物的筛选 外周血涵盖大量疾病相关分子标志物,是临床最易得的检验样本来源。QI等^[25]在研究中使用高分辨率LC-MS,对98例肺癌患者及75例健康对照者血浆样本进行代谢分析。研究发现5种代谢物(棕榈酸、十七烷酸、4-氧脯氨酸、十三烷酸、鸟氨酸)可组成标志物组合,鉴别癌症组和健康组的准确度和AUC性能分别高达0.829和0.869。NIE等^[26]对92例患者血浆样本进行LC-MS代谢分析,发现其中包括良性

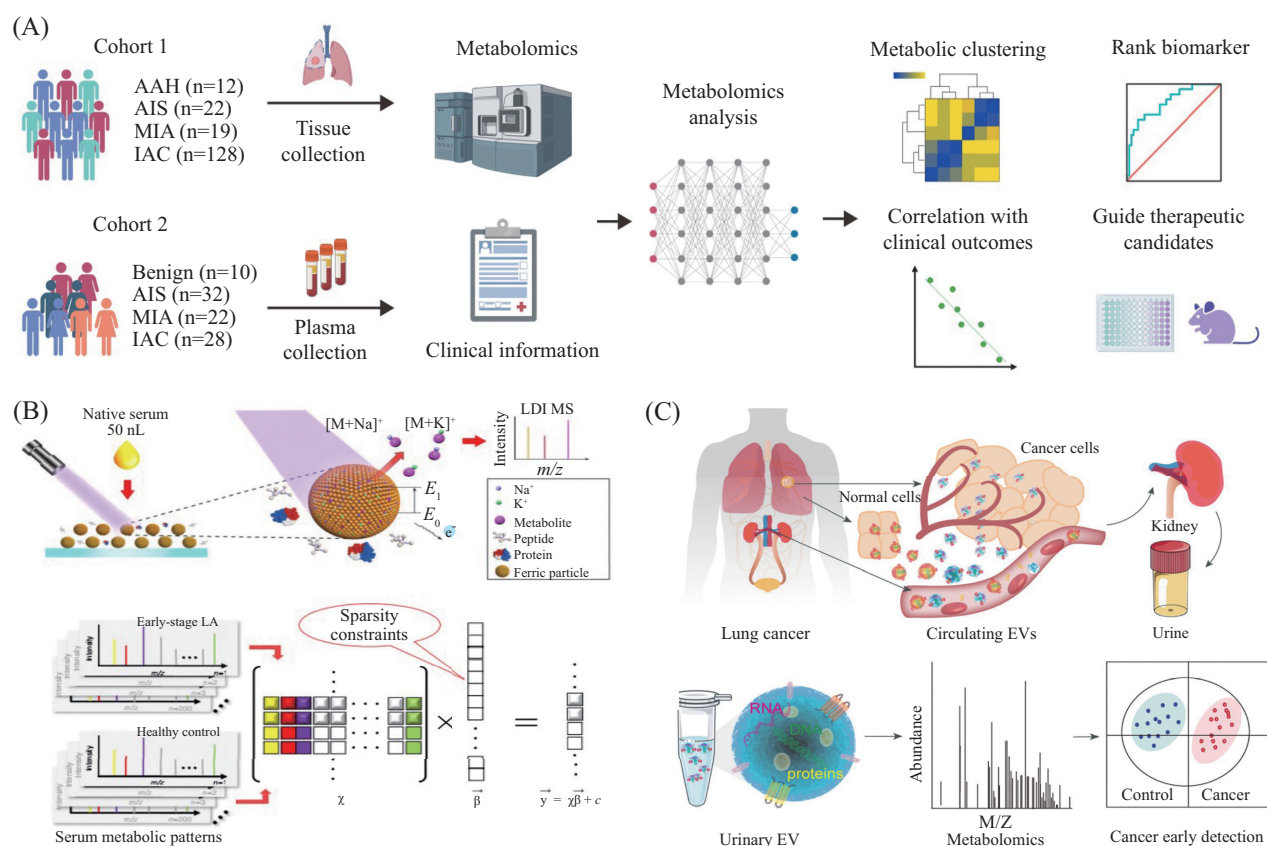
疾病10例,原位腺癌(adenocarcinoma *in situ*, AIS) 32例,微浸润腺癌(microinvasive adenocarcinoma, MIA) 22例,浸润性腺癌(invasive adenocarcinoma, IAC) 28例(图4A)。研究确定了一个由4种代谢物[3-氯酪氨酸、肉碱(12:0)、谷氨酸和磷酸胆碱]组成的生物标志物组合,区分良性疾病和肺腺癌组(AIS/MIA/IAC)的诊断AUC为0.894。近年来,本课题组也基于代谢分析进行了肺癌的诊断研究^[27]。工作纳入了481例研究对象,包括200例早期肺腺癌患者、200例性别年龄匹配的健康对照人群、36例鳞癌患者以及45例肺部良性疾病患者,使用纳米增强质谱技术采集其血清代谢指纹图谱,通过机器学习确定了由尿嘧啶、组胺、半胱氨酸、3-羟基吡啶甲酸、尿酸、吡咯丙烯酸和脂肪酸(18:2)等7个代谢物组成的生物标志物组合,鉴别早期肺癌和健康对照时的AUC达到了0.894(图4B)。基于纳米增强质谱技术构建的代谢生物标志物组合推进了早期癌症检测代谢分析的设计进程,并因其较低检测成本有望推广至临床大规模应用。尿液也是临床易得的生物体液样本之一。ZHAO等^[28]使用UPLC-Q-TOF/MS技术对72例肺癌患者和68例健康对照者的尿液代谢物进行代谢物分析,在发现集和验证集中鉴定出11个候选的肺癌患者尿液共同差异代谢物。5种代谢标志物如1-甲基组氨酸、黄嘌呤核苷、8-羟基奈韦拉平、酪氨酸基酪氨酸以及吡咯酚的AUC在0.70~0.95,其中前4种肺癌生物标志物均具有较高的敏感性和特异性(AUC>0.8)。

2.1.2 外泌体样本潜在肿瘤标志物的筛选 外泌体(extracellular vesicles, EVs)富含各类生物活性物质,对肺癌早期诊断很有帮助。本课题组引入了等离子体金芯片作为激光解吸电离质谱(LDI-MS)的增强基底检测外泌体中代谢物组分^[29],研究纳入了10名早期NSCLC患者和10名健康对照者,基于外泌体代谢指纹图谱,实现了用于NSCLC早期诊断的芯片代谢分析,并预计这些关键的代谢物可作为潜在的分子标志物。YANG等^[30]的研究纳入了75例肺癌患者和27例健康对照者,通过液相色谱-串联质谱(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术分析其尿液外泌体代谢谱,结合使用机器学习和随机森林模型,筛选出由黄嘌呤核苷、神经酰基肉碱和3,4-二羟基苯甲醛等代谢物组成的标志物组合,能够以较高的AUC值(AUC>0.84)区分

和预测早期肺癌患者, 具有精准诊断早期肺癌的潜力(图4C)。LUO等^[31]通过差异超速离心法从40例结核性胸腔积液(tuberculous pleural effusion, TPE)和40例恶性胸腔积液(malignant pleural effusion, MPE)中获得了两个外泌体亚群, 即大型外泌体(20 000 ×g离心沉淀)和小型外泌体(110 000 ×g离心沉淀), 并通过LC-MS/MS技术进行了代谢物和脂质组学分析, 发现大型外泌体在结核组和恶性肿瘤组之间表现出更显著和更大的代谢变化, 并确定了包括苯丙氨酸、亮氨酸、磷脂酰胆碱(35:0)和鞘磷脂(44:3)在内的4个候选生物标志物。该组合在区分TPE和MPE方面展现出较高的性能, 尤其是在诊断延迟或漏诊的患者中, 两组受试者工作特征曲线下面积(AUC)均>0.95。

2.1.3 组织样本潜在肿瘤标志物的筛选 将通过体液获得的差异血清学代谢标志物在肿瘤组织上

进行进一步研究和验证, 可更全面地了解肺癌引起的代谢变化。QIAN等^[32]对70个血清样本(包括55例NSCLC患者及15例健康对照)和40例肺腺癌患者癌组织和癌旁组织分别进行了代谢分析, 筛选了基于血清和组织的6种重叠代谢物作为诊断生物标志物, 包括9(*S*)-羟基十二碳五烯酸酯、L-谷氨酸、黄嘌呤、L-谷氨酰胺、全反式维甲酸和 γ -谷氨酰半胱氨酸。前5种代谢物的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC) AUC值均达到0.85以上。NEUMANN等^[20]探索了基质辅助激光解吸电离质谱成像(MALDI-MSI)技术的组织微环境区分能力。该研究队列包括35例NSCLC、24例腺癌和11例鳞状细胞癌的组织样本。MALDI分类器区分肿瘤和间质的置信度为96%, 区分两种亚型的置信度为95%。利用MALDI-MSI收集的空间代谢谱, 不仅能够对肿瘤微环境中的组织进行分类, 还



A: 侵袭性肺腺癌的进化代谢标志物分析^[26]; B: 肺腺癌血清代谢分析用于早期癌症诊断^[27]; C: 尿细胞外囊泡代谢物分析研究用于癌症的早期检测和筛查^[30]。

A: evolutionary metabolic landscape of invasive lung adenocarcinoma^[26]; B: serum metabolism analysis of lung adenocarcinoma for early cancer diagnosis^[27]; C: metabolomic investigation of urinary extracellular vesicles for early detection and screening of lung cancer^[30]。

图4 质谱技术在肺癌诊断与预后治疗中的应用

Fig.4 Application of mass spectrometry in diagnosis and prognosis of lung cancer

可对高度相似的癌症亚型进行分类。预期预后和治疗反应也是影响治疗决策的关键因素之一,根据患者对治疗的反应进行分层处理,可对改善最终治疗效果有一定贡献。SHEN等^[33]通过MALDI-MSI对接受化疗治疗($n=88$)和未接受化疗治疗($n=85$) NSCLC患者的组织代谢物进行分析,开发了分别含有100个代谢物的代谢分类器,将患者分为不同预后组的准确性高达81.6%,远高于常规根据主要病理缓解(main pathological relief, MPR)和国际抗癌联盟及美国癌症联合会(Union for International Cancer Control and American Joint Committee on Cancer, UICC/AJCC)第八版TNM分期(tumor node metastasis classification)的分层准确率62.5%及54.1%,为评估NSCLC患者的组织病理学反应提供了另一种方法。

上述代谢物检测分析研究已经发现了一些可靠的生物标志物,以用于肺癌诊断及预后评估。另外,研究人员通过测量癌症过程中不同阶段代谢变化,以确定肺癌分期。因此,代谢分析可用于评估肺癌的预后和治疗。然而,这些方法尚未在临床实践中应用,并且需要进一步的临床研究来证明它们的准确性和可靠性。

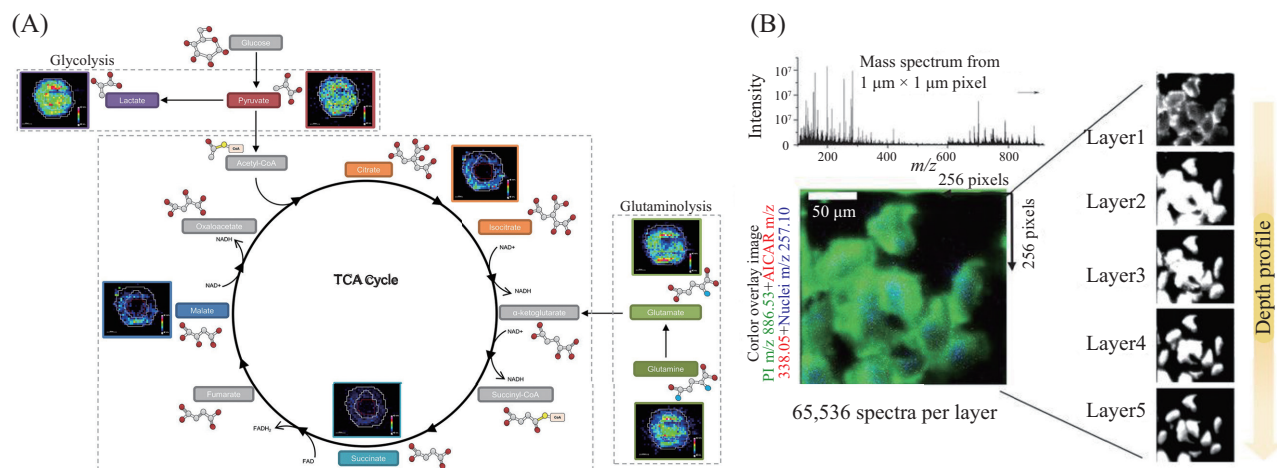
2.2 肺癌机制挖掘

在研究肺癌进展过程中的代谢重编程机制时,需要深入挖掘不同层面的信息,包括模式细胞、组织等。这些信息的综合分析将有助于揭示肺癌发展与代谢重编程之间的关联,以及代谢途径在不同层面上的调控机制。对模式细胞的研究有助于更加详细地了解代谢变化和转录调控之间的相互作用。同时,研究不同组织特异性代谢特征,可以揭示肺癌与周围环境之间的相互作用机制。综合利用这些多层次的信息,可以更好地理解肺癌的代谢重编程过程,为肺癌治疗和预防提供新的思路和策略。

2.2.1 细胞层面的肿瘤标志物分析 在模式细胞领域,目前单细胞代谢研究逐渐成为热点。专注于单个细胞及其相互作用可以更深入地了解其基本的生物和生理现象,因此用于分析细胞内小分子代谢物的单细胞质谱技术,在生命科学、临床诊断和药物开发等领域受到越来越多的关注。利用质谱进行单细胞代谢分析,可揭示单个细胞水平上的代谢异质性,对灵敏度有更高的要求。FLINT等^[34]成功地应用了多种技术,包括解吸电喷雾电离质谱成像(de-

sorption electrospray ionization mass spectrometry imaging, DESI-MSI)、成像海量细胞仪和激光消融诱导耦合等离子体MSI,在三维肺腺癌细胞培养模型中生成了单细胞水平内源性代谢物分布图(图5A)。他们定位到了乳酸、谷氨酰胺和柠檬酸盐等代谢物在糖酵解途径和TCA循环中的位置。将离子密度图像映射到中央代谢通路上,可以更清楚地了解肿瘤微环境中代谢物的行为。然而,高能一次离子束对生物样品的破坏不利于原位分析代谢物。因此,气体簇离子束(gas cluster ion beam, GCIB)的应用允许较少的化学损伤和碎片产生。PAREEK等^[35]使用气体团簇离子束二次离子质谱(gas cluster ion beam secondary ion mass spectrometry, GCIB-SIMS)对单细胞进行原位三维亚微米化学成像,以直接可视化多酶复合物嘌呤体的从头嘌呤生物合成(图5B)。发现嘌呤体由9种酶组成,这些酶协同作用,引导通路中间产物合成嘌呤核苷酸,增加通路通量,并影响单磷酸腺苷/单磷酸鸟苷的比例。近年来,随着高灵敏度和高分辨率质谱技术的出现,已经取得了重大进展。这些进展使得对生物重要代谢物进行快速和无标记测量成为可能。合理的设计和发展单细胞质谱技术对于回答与生命科学、人类健康和疾病相关的重要问题具有重大意义。

2.2.2 组织层面的肿瘤标志物分析 面向组织层面研究,科研人员通常会引入质谱成像技术实现具有空间分辨率的代谢分析。MALDI-MSI以细胞空间分辨率实现直接从生物组织切片定位数百至数千种不同的代谢物。SHEN等^[33]通过空间代谢物质谱成像技术,以及肿瘤和正常组织之间的代谢物比较揭示了19个在肿瘤细胞中上调的分子,包括磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油磷酸、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺和鞘磷脂等,其中大部分与肿瘤组织特异性脂质代谢有关。通路富集分析显示肿瘤组织和癌旁组织之间存在不同的代谢通路谱。在肿瘤代谢分类器中包含的通路中,果糖和甘露糖代谢通路在9个已确定的通路中影响得分最高,癌细胞可以利用果糖和甘露糖作为替代能源来促进生长。最重要的上调功能代谢产物(如甘油磷脂代谢)与参与能量代谢和细胞增殖的代谢途径有关。甘油磷脂代谢的改变越来越被认为是与肿瘤进展相关的普遍代谢标志。最近的一项研究中,BENSUSSAN等^[36]对肺腺癌和鳞状细胞癌进行



A: 肺癌糖酵解途径和TCA循环中的代谢物研究^[34]; B: 代谢组学和质谱成像显示细胞内通道从头嘌呤合成^[35]。

A: research on the glycolytic pathway and metabolites in the TCA cycle of lung cancer^[34]; B: metabolomics and mass spectrometry imaging reveal channelled de novo purine synthesis in cells^[35].

图5 质谱技术在肺癌机制挖掘中的应用

Fig.5 Application of mass spectrometry technology in mechanism exploration of lung cancer

了分类,并将肿瘤与癌旁区域进行了比较,同样观察并确定了甘油磷脂在不同区域的丰度差异。具体而言,甘油磷酸甘油(glycerophosphoglycerols, PG)(36:2)、PG(34:1)、脂肪酸(fatty acids, FA)(20:4)在正常肺组织中含量较高,而甘油磷酸肌醇(glycerophosphoinositols, PI)(38:4)、PI(34:1)、甘油磷酸丝氨酸(glycerophosphoserines, PS)(36:1)在肿瘤组织中含量较高。

上述肺癌代谢物研究表明,癌症患者和对照组之间的代谢图景确实存在差异。细胞代谢是一个复杂且相互依赖的交错网络,局部变化影响肿瘤整体代谢。然而,在面向肺癌分子机制挖掘的过程中仍凸显出挑战。首先,质谱代谢分析产生的原始数据庞大而复杂,需进行有效数据解释。正确解析和解释质谱数据以发现与肺癌相关的代谢指标需要革新数据分析方法。此外,质谱代谢分析受样本收集和标准化程度影响。不同实验室和研究者之间的标准化程度可能存在差异,这可能导致数据之间的不可比性和结果的不一致性,影响分子机制的阐明和机理解释。

3 总结与展望

目前,基于质谱技术的肺癌代谢标志物研究已经成为肿瘤研究的一个新方向。尽管与其他方法相比,代谢标志物的使用较少,但有可能显著影响包括筛查、诊断和治疗在内的肿瘤学核心领域。值得注

意的是,早期肺癌细胞数量很少时,其代谢产物在局部微环境中会存在差异,但在内环境中,可能是其他细胞的代谢产物导致的差异。此外,肿瘤细胞的代谢物异常,那是相比于正常细胞而言,而代谢产物,对于人体而言,并无异常,仅为量的改变。背后的原因可能在于代谢标志物往往仅能提供关于疾病整体调控变化、代谢过程涉及到的许多生物化学反应和物质代谢途径在疾病发生发展过程中发生的系列变化。然而,代谢变化往往非特异,不同类型疾病或导致相似的代谢物变化,因此单一的代谢标志物难于用来特异性地诊断某种特定的疾病。此外,代谢标志物水平通常还受其他因素,如个体间差异、饮食、环境等影响。

上述问题有望通过以下途径解决。(1) 构建代谢标志物组合用于疾病诊断。结合多个代谢标志物,可全面反映疾病导致的代谢网络变化,克服单一标志物的非特异性和受影响因素多的问题,提高诊断特异性和灵敏性。(2) 优化代谢标志物临床应用路径。科研人员通过提取相关的代谢标志物或标志物组合,在此基础上分析所受影响的相关代谢途径,确立代谢网络的调控机制,发现细胞内的途径和网络联系,并确定与细胞代谢相关的关键酶、蛋白、基因表达产物等作为临床疾病诊断的分子标志物。将直接检测代谢标志物的临床应用路径,转变为根据代谢标志物阐明疾病发生发展的分子作用机理,并验证筛选代谢通路上游特异性分子标志物用于临床

疾病的早期诊断、监控和治疗等。

此外,为了广泛推广代谢标志物在临床肿瘤检测中的应用,还需要进一步完善和发展相关技术方法学。例如,结合肿瘤生物学扩大和更新不同肿瘤特征表型与相关代谢数据相联的公用数据库,进一步降低检测成本等。此外,还需要进行更大规模的前瞻性临床研究验证所筛选出的代谢标志物在肿瘤的诊断、治疗和疗效评估方面的敏感度和特异度,从而最终将其作为肿瘤标志物应用于临床。另外,伴随“精准医疗”概念在临床诊断和治疗中的推广,未来会将个体的代谢数据与基因组学和蛋白质组学分析相结合,交叉比较癌症不同阶段的代谢物分布,以揭示癌症进展的代谢和生理特征,从而更好地指导个体化治疗。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA. Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] PAVLOVA N N, ZHU J, THOMPSON C B. The hallmarks of cancer metabolism: still emerging [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(3): 355-77.
- [3] MARTÍNEZ-REYES I, CHANDEL N S. Cancer metabolism: looking forward [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(10): 669-80.
- [4] LI H, NING S, GHANDI M, et al. The landscape of cancer cell line metabolism [J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 850-60.
- [5] ALSEEKH S, AHARONI A, BROTMAN Y, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(7): 747-56.
- [6] HAWORTH J J, PITCHER C K, FERRANDINO G, et al. Breathing new life into clinical testing and diagnostics: perspectives on volatile biomarkers from breath [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2022, 59(5): 353-72.
- [7] HU W, WU W, JIAN Y, et al. Volatolomics in healthcare and its advanced detection technology [J]. *Nano Res*, 2022, 15(9): 8185-213.
- [8] 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: 615-21.
- [9] NASERI N, KHARRAZI S, ABDI K, et al. Fabrication of an SPME fiber based on ZnO@GA nanorods coated onto fused silica as a highly efficient absorbent for the analysis of cancer VOCs in water and urine [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1183: 338983.
- [10] MUHAMMAD K G, MADEEHA C, WEI F, et al. Abstract 744: volatile organic compounds (VOCs) from exhaled breath for lung cancer staging using TD-GC-MS [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(16_Supplement): 744.
- [11] CHEN X, MUHAMMAD K G, MADEEHA C, et al. Calculated indices of volatile organic compounds (VOCs) in exhalation for lung cancer screening and early detection [J]. *Lung Cancer Amst* [J]. *Lung Cancer Amst*, 2021, 154: 197-205.
- [12] ZOU Y, WANG Y, JIANG Z, et al. Breath profile as composite biomarkers for lung cancer diagnosis [J]. *Lung Cancer Amst* [J]. *Lung Cancer Amst*, 2021, 154: 206-13.
- [13] ROCHA S M, CALDEIRA M, CARROLA J, et al. Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1252: 155-63.
- [14] CUI L, WANG X, SUN B, et al. Predictive metabolomic signatures for safety assessment of metal oxide nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 13065-82.
- [15] WANG G, QIU M, XING X, et al. Lung cancer scRNA-seq and lipidomics reveal aberrant lipid metabolism for early-stage diagnosis [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(630): eabk2756.
- [16] PEREZ DE SOUZA L, ALSEEKH S, SCOSSA F, et al. Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(7): 733-46.
- [17] YAO Y, WANG X, GUAN J, et al. Metabolomic differentiation of benign vs malignant pulmonary nodules with high specificity via high-resolution mass spectrometry analysis of patient sera [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2339.
- [18] NAZ S, GARCÍA A, BARBAS C. Multiplatform analytical methodology for metabolic fingerprinting of lung tissue [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(22): 10941-8.
- [19] LI Z, SUN C, JIA K, et al. Biofluid metabolic profiling for lung cancer screening via reactive matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2023, 95(32): 12062-70.
- [20] NEUMANN J M, FREITAG H, HARTMANN J S, et al. Subtyping non-small cell lung cancer by histology-guided spatial metabolomics [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(2): 351-60.
- [21] SUN C, LIU W, MU Y, et al. 1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine as a novel MALDI matrix to enhance the in situ imaging of metabolic heterogeneity in lung cancer [J]. *Talanta*, 2020, 209: 120557.
- [22] JIANG X, CHEN X, CHEN Z, et al. High-throughput salivary metabolite profiling on an ultralow noise tip-enhanced laser desorption ionization mass spectrometry platform for noninvasive diagnosis of early lung cancer [J]. *J Proteome Res*, 2021, 20(9): 4346-56.
- [23] LIU X, CHEN Z, WANG T, et al. Tissue imprinting on 2D nano-flakes-capped silicon nanowires for lipidomic mass spectrometry imaging and cancer diagnosis [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(4): 6916-28.
- [24] HAINCE J F, JOUBERT P, BACH H, et al. Metabolomic fingerprinting for the detection of early-stage lung cancer: from the genome to the metabolome [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1215.
- [25] QI S A, WU Q, CHEN Z, et al. High-resolution metabolomic biomarkers for lung cancer diagnosis and prognosis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11805.
- [26] NIE M, YAO K, ZHU X, et al. Evolutionary metabolic landscape from preneoplasia to invasive lung adenocarcinoma [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6479.
- [27] HUANG L, WANG L, HU X, et al. Machine learning of serum metabolic patterns encodes early-stage lung adenocarcinoma [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3556.

- [28] ZHAO C, KONG X, HAN S, et al. Analysis of differential metabolites in lung cancer patients based on metabolomics and bioinformatics [J]. *Future Oncol Lond Engl*, 2020, 16(18): 1269-87.
- [29] SUN X, HUANG L, ZHANG R, et al. Metabolic fingerprinting on a plasmonic gold chip for mass spectrometry based *in vitro* diagnostics [J]. *ACS Cent Sci*, 2018, 4(2): 223-9.
- [30] YANG Q, LUO J, XU H, et al. Metabolomic investigation of urinary extracellular vesicles for early detection and screening of lung cancer [J]. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21(1): 153.
- [31] LUO P, MAO K, XU J, et al. Metabolic characteristics of large and small extracellular vesicles from pleural effusion reveal biomarker candidates for the diagnosis of tuberculosis and malignancy [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1790158.
- [32] QIAN X, ZHANG H, LI Q, et al. Integrated microbiome, metabolome, and proteome analysis identifies a novel interplay among commensal bacteria, metabolites and candidate targets in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(6): e947.
- [33] SHEN J, SUN N, ZENS P, et al. Spatial metabolomics for evaluating response to neoadjuvant therapy in non-small cell lung cancer patients [J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(6): 517-35.
- [34] FLINT L E, HAMM G, READY J D, et al. Characterization of an aggregated three-dimensional cell culture model by multimodal mass spectrometry imaging [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(18): 12538-47.
- [35] PAREEK V, TIAN H, WINOGRAD N, et al. Metabolomics and mass spectrometry imaging reveal channeled *de novo* purine synthesis in cells [J]. *Science*, 2020, 368(6488): 283-90.
- [36] BENSUSSAN A V, LIN J, GUO C, et al. Distinguishing non-small cell lung cancer subtypes in fine needle aspiration biopsies by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging [J]. *Clin Chem*, 2020, 66(11): 1424-33.