

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,入选上海市扬帆人才计划。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。近五年的研究成果已在Adv Mater、Matter、Nat Commun等 国际学术期刊上发表。



钱昆教授,上海交通大学生物医学工程学院特聘教授,入选国家重大人才工程计划(特聘教授)、上海高校特聘教授(东方学者)岗位计划。研究聚焦于分子组工程与转化医学应用,涵盖分子组界面识别、检测设备软硬件、靶向分子重编程三个主要方向。在*Cell*等期刊上发表SCI论文120余篇,影响因子总和超过1400,获多个国际学会、期刊奖项。

基于质谱的肿瘤标志物筛选研究进展

阿衣则克然木·依明1 黄琳2,3* 钱昆1*

(¹上海交通大学生物医学工程学院,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检验科, 上海 200030; ³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 随质谱技术的飞速发展,其在肿瘤标志物研究领域的应用日益扩大。该文从样品预 处理、质谱检测和临床应用这三个方面详细介绍了质谱技术在核酸、蛋白质和代谢物层面筛选肿 瘤标志物的最新研究进展,总结了不同质谱方法的优势与挑战。最后对基于质谱技术的肿瘤标志 物筛选的未来发展方向进行了系统性展望,预期为相关领域研究提供可靠依据。

关键词 质谱技术;肿瘤;生物标志物

Progress in Tumor Biomarker Screening Based on Mass Spectrometry

YIMING Ayizekeranmu¹, HUANG Lin^{2,3*}, QIAN Kun^{1*}

(¹School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; ²Department of Clinical Laboratory, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; ³Institue of Thoracic Oncology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China)

收稿日期: 2023-11-13 接受日期: 2023-12-08

- 国家重点研发计划(批准号: 2021YFF0703500)资助的课题
- *通讯作者。E-mail: linhuang@shusmu.edu.cn; k.qian@sjtu.edu.cn

Received: November 13, 2023 Accepted: December 8, 2023

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2021YFF0703500)

*Corresponding authors. E-mail: linhuang@shusmu.edu.cn; k.qian@sjtu.edu.cn

Abstract With the rapid development of mass spectrometry technology, its application in tumor biomarker research is expanding. This review details the latest research progress of mass spectrometry in tumor biomarker screening at the level of nucleic acids, proteins and metabolites from the three aspects of sample pretreatment, mass spectrometry detection, and clinical application, and then summarizes the advantages and challenges of different mass spectrometry methods. Finally, a systematic outlook on the prospects of mass spectrometry-based tumor biomarker screening is presented. It is expected to provide a valuable reference for the researches in related fields.

Keywords mass spectrometry; tumor; biomarkers

肿瘤标志物(tumor biomarker, TM)是一类在肿 瘤早期筛查、诊断、疾病进展监测和治疗反应预测 中具有潜在价值的生物分子^[1]。目前,肿瘤标志物 主要以核酸、蛋白质或代谢物的形式存在于肿瘤细 胞内或患者体液和组织中,其可通过浓度的改变反 映肿瘤存在和生长的实时状态^[2],例如临床上用于 诊断肝细胞癌的甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、 小细胞肺癌相关肿瘤标志物神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE)等。

质谱技术(mass spectrometry, MS)的高灵敏度和 高分辨率使其成为检测微量标志物的有力工具,其 通过将化合物分子离子化并分离后检测生成质谱图 谱,用于分析化合物的化学结构、分子质量以及相 对丰度[3]。目前,质谱技术已被广泛应用于生物学、 化学、医学、环境科学等领域[4-6]。质谱技术在揭示 肿瘤发生发展机制、寻找特异性生物标志物、发现 新治疗靶点等方面具有独特优势,在肿瘤标志物的 研究中得到了广泛应用。基于质谱技术的肿瘤标志 物研究的不断发展和创新为该领域的科研和临床应 用提供了深入了解分子层面信息的基础,以识别潜 在的核酸、蛋白质、代谢物等分子标志物,为肿瘤 的诊断和治疗提供新思路[7-10]。尽管这一领域取得 了巨大的进步,但仍然存在一些问题,包括生物样品 预处理的标准化、微量物质检测的精准化、临床应 用的复杂性等[11-12]。解决这些问题将有助于进一步 推动基于质谱技术的肿瘤标志物研究,为患者提供 更好的临床诊断和治疗选择。

1 样品预处理

在基于质谱技术的肿瘤标志物研究中,样品预 处理是至关重要的环节,其质量和效率将直接影响 到后续检测和分析的结果。针对不同种类的分析物, 样品预处理方法也不同,但这些方法都面临着操作 耗时、通量低、生物样本复杂等挑战。近年来涌现 出了越来越多的新方法以改善样品预处理阶段存在 的问题。

1.1 核酸样品预处理

核酸样品的预处理环节最重要的是目的片段 的扩增过程,现在的金标准是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 但是PCR依赖操作人员 和昂贵的仪器,且耗时,通常需要1~2h。为实现简单、 低成本和高灵敏度的核酸扩增,目前开发了不少等 温扩增技术,包括环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)和滚环扩 增(rolling circle amplification, RCA)等。ZHENG等^[13] 利用RPA技术,实现了20 min内对4种不同生物样本 中目标片段的快速扩增,扩增过程无需加热,灵敏度 达0.003 125 ng, 但目前基于该方法的试剂盒昂贵且 稀少。而LAMP技术在低成本的条件下, 与纳米球结 合后实现了快速拷贝(<1 h), 灵敏度高(10个拷贝)^[14], 但此过程无法避免产生非特异性扩增。RCA扩增技 术能够有效减少非特异性扩增,KUMARI等^[15]通过 设计40种探针,基于RCA等温扩增技术对通过鼻拭 子采集的RNA样本进行扩增,对带有突变的样本的 检测率为100%,完成了快速且准确的扩增。但是这 些方法不能满足复杂临床样本中痕量核酸目标片段 的扩增。近年来越来越多的研究表明,利用纳米材 料的高光热效率,可以有效地将核酸信号放大,实现 痕量目标片段的高效扩增。因为金纳米在近红外范 围内具有很强的光吸收能力,基于金纳米的PCR系 统可以实现快速热循环^[16],但是此过程需要高浓度 的纳米粒子,这可能会降低冷却速度,从而影响扩增 速率。YOU等^[17]开发了一种量化和调整金纳米局部 温度场的方法,基于此可以通过改变纳米粒子局部 温度场而实现高效的热循环(热循环速率>104 °C/s)。 QIU等^[18]在金纳米传感器上使用 532 nm激光器来构 建局域温度场,并通过调节激光器的输出功率来改

变局部温度达到高效热循环,在30 min内实现了对待 测物的快速检测。利用纳米材料的等离子共振现象 构建核酸扩增的光热源,实现核酸的原位扩增,是既 高效又简便的核酸预处理方法。进一步地,具有等 离激元效应的纳米材料有望作为后续质谱检测的增 强基质,二者结合,或能实现核酸标志物的扩增、检 测一站式处理,简化检测流程。

1.2 蛋白样品预处理

在蛋白样品的预处理环节中最关键的是蛋白的 酶解,传统的蛋白酶解的方法是将从不同样本中提取 的蛋白质用胰蛋白酶等蛋白质水解酶酶切成肽段,再 进行快速分离,但其效率较低,造成分析物损失,而基 于胰蛋白酶的固定化酶反应器(immobilized enzyme reactor, IMER)可有效提高蛋白质的酶解效率^[19], WEI 等^[20]开发了一种固定化酶反应器,其基于微流控技 术有效降低了分析物的损失,并且在17 min内完成了 蛋白质样品的预处理过程,但依然不能满足对样品 处理的通量、可重复性和灵敏度的高要求。基于多 孔纳米材料进行蛋白酶解不仅快速,而且灵敏度高, 通过改变多孔材料孔径大小来实现对不同分子量的 蛋白高效酶解,快速分离目标肽是机遇也是挑战^[21]。 QIAN等^[22]设计了一种"大孔+小孔"的组合孔纳米材 料,该材料结合了大孔二氧化硅泡沫(macroporous silica foams, MOSF)对蛋白质的强吸附性能, 以及小孔 材料周期性介孔有机硅(periodic mesoporous organosilica, PMO)对肽E7的强吸附性能以分离和纯化肽的 优势,将目标肽E7从复杂的生物样品中高效分离。除 了可以通过调节纳米材料孔径大小来实现蛋白质高 效酶解外,还可以通过功能化修饰其表面来达到这一 目的^[23]。ZHU等^[24]通过使用被介孔二氧化硅外壳包 裹的核Zr-MOF(UiO-66-NH₂),以此提高蛋白水解稳定 性,外壳用于分离大尺寸的蛋白,同时在金属有机框 架(metal organic framework, MOF)核中修饰富有亲水 性氨基的精氨酸,提高材料的亲水性,有利于糖肽的 快速分离,该材料实现了在人血清和小鼠睾丸中蛋 白的高效酶解和肽分离。基于纳米材料的这些优势, 制备具有可控孔径和表面化学性质的多孔纳米反应 器成为了趋势。YAN等^[25]将装有胰蛋白酶的MOSF 装入微量移液管中,通过静电作用,在低底物浓度下 对于生物样品的蛋白水解耗时仅6 min, 最低检测限 达(0.204±0.008) ng/µL。为实现更高通量的样本的预 处理,WOO等^[26]基于一种嵌套纳米POTS(nanodroplet processing in one-pot for trace samples) N2芯片,将反应 体积减小到30 nL,单个芯片上的单细胞容量提高到 243个,可稳健地量化约1 500个蛋白质,实现了高通量 且快速的蛋白质样品处理。为提高样本预处理的通 量、可重复性和灵敏度,可加大对尖端纳米器件集成 化、自动化的研究。

1.3 代谢物样品预处理

最常见的代谢物样品预处理方法有液液萃取 (liquid-liquid extraction, LLE)和固相萃取(solid phase extraction, SPE)。液液萃取因萃取过程需要使用大 量与水不相溶的有毒有机萃取剂(如氯仿、乙酸乙 酯、乙醚等),既不环保又费时费力。为提高处理速 率, HEYDARZADEH等^[27]采用微通道盐辅助液液萃 取法,将样品溶液、萃取溶剂和盐混合,增强了分析 物与萃取剂的结合性能,成功测定了2,4-二氯苯氧 乙酸。SONG等^[28]利用电增强单滴微萃取法(electroenhanced single-drop microextraction, EE-SDME) 进行尿液样品处理,凭借电场加速目标分析物从样 品溶液向有机液滴的移动的优点,在4 min内实现了 对苯丙胺和甲基苯丙胺的萃取,从而大大提高了萃 取效率。但由于水不溶性有机溶剂的疏水性,其不 适用于高极性或非极性物质的萃取,且对痕量代谢 物分离能力欠佳[29]。而固相萃取可实现痕量化合物 的富集,有效减少复杂基质影响^[30]。WADA等^[30]通 过固相萃取完成了对样品中微量活性肽的提取。但 传统的SPE方法对复杂样本中特定物质的分离效果 欠佳。LUCZYKOWSKI等^[31]基于固相微萃取方法 (solid-phase microextraction, SPME)对共48例人体 尿液样本进行预处理,用于后续代谢物的检测和分 析,最终筛选出膀胱癌患者与健康对照组之间的差 异代谢物,该方法在复杂样品的前处理中表现出比 传统SPE更好的选择性,虽然这些方法在一定程度 上改善了传统萃取法的不足,但过程不仅耗时还会 造成人为误差,不能满足大样本量临床研究对样品 制备的快速、高通量和准确性的要求。近年来,纳 米材料因其大的比表面积、尺寸选择性等优点,为 提高样品预处理的速度、通量和准确性提供了解 决方案^[32]。特别是一些磁性纳米颗粒, QIU等^[33]通 过制备的聚硫酯功能化磁性纳米探针(polythioesterfunctionalized magnetic nanoprobes, PMPs), 选择性捕 获酰胺,实现了对6例小鼠组织样本、3例肺腺癌细 胞系及103例人血清中一百多种胺类化合物进行快 速、高通量检测,发现表面PMPs可作为纳米探针捕 获胺类化合物。GONZALEZ-SALAMO等^[34]合成了 Fe₃O₄@pDA m-NPs,将其用作SPE过程的吸附剂从 复杂样品中提取玉米赤霉烯酮及其代谢物,回收率 高于70%。YU等^[35]将磁性氧化石墨烯(GO/Fe₃O₄)纳 米复合材料用于磁性固相萃取(magnetic solid phase extraction, MSPE),对10种代谢物的平均回收率为 66.0%~90.8%,制备和萃取过程方便快捷。为实现 代谢物的高通量快速检测,ZHAO等^[36]基于微流控 技术实现了对单细胞代谢物的提取,后续可考虑将 纳米材料与微流控技术结合,实现高通量且精准的 代谢物样品预处理。

2 肿瘤标志物质谱检测

质谱技术因其具有高选择性和灵敏度的优势, 目前已被应用于肿瘤标志物筛选研究领域。但质谱 技术是否能快速、全面地进行痕量靶标物的检测仍 具有挑战。目前,电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)、激光解吸电离质 谱(laser desorption/ionization mass spectrometry, LDI-MS)和质谱成像(mass spectrometry imaging, MSI)等 技术的发展为解决这些难点带来了可能性。

不同质谱技术的优缺点汇总见表1。ESI-MS的 优点是其具备全面且精确的数据库,可与多种色谱 技术结合,样品分离方式灵活多样,可提供多维度 的分子信息,但检测通量受限且存在样品的损耗。 LDI-MS对样品需求量低,样品预处理简单,可实现 准确且快速的检测,而其灵敏度较低,会受所用基质 的干扰。MSI基于两种技术的结合能提供空间分布 上的动态分子信息,直观呈现结果,但仪器复杂且成 本较高,检测水平会受空间分辨率的影响。这些技 术的完善将促进不同肿瘤疾病的标志物筛选及验证研究。

2.1 电喷雾电离质谱技术

ESI能够对靶标物质进行实时、快速的检测和 分析(图1)。对生物大分子温和离子化的能力, 使ESI 成为了蛋白质研究中最常用的电离方式^[3]。MALCIC 等^[37]基于ESI-MS对牙源性角化囊肿患者的组织进行 蛋白质检测筛选了43种肿瘤标志物。JIANG等^[38]基 于ESI-MS检测了人体细胞和多种哺乳动物组织中的 DNA和RNA,检测灵敏度提高了307~884倍,筛选出了 甲状腺癌相关的标志物。在代谢物检测方面为提高 检测的可重复性, KIM等^[39]采用了加热电喷雾离子化 (heated electrospray ionization, HESI)探针, 该探针有利 于保持稳定的ESI-MS进样速率,可实现稳定的质谱检 测,成功应用于肝细胞癌血浆样本中25种脂质标志物 的靶向定量分析。与传统的ESI-MS相比,纳升电喷雾 电离(nano-ESI, nESI)质谱能够利用直径低至几微米 的喷雾毛细管和较低的溶剂流速来获得较小的初始 液滴,从而更快地产生气相离子,提高了分析物的电 离效率, ZHONG等^[40]基于nESI-MS从微量的人血清样 本中检测到了肺癌生物标志蛋白NSE, 最低检测限为 12 pmol/L。为实现对靶标物质的全面检测, WEI等[41] 引入了脉冲直流ESI-MS技术,该技术无需对现有仪器 进行额外改动,就能在不影响质谱灵敏度的情况下从 样品中获取数分钟的稳定质谱信号,在10 min内检测 出1690种代谢物。因此,一些将分离技术与质谱检测 相结合的综合策略受到了广泛关注。SONG等^[42]通过 液相色谱-电喷雾电离串联质谱法(liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS)检测基因组DNA甲基化水平,该方法 只需要4 ng DNA就能够完成对 DNA甲基化水平的检

Table 1 Comparison of different mass spectrometry techniques				
技术	优点	缺点		
Technology	Advantages	Disadvantages		
ESI-MS	Comprehensive database	Limited quantitative analysis		
	Multi-dimensional information	Limited throughput		
	Flexible sample separation and detection	High sample consumption		
LDI-MS	Low sample consumption	Low sensitivity		
	Easy sample preparation	Matrix interference		
	Fast analysis speed	Limited quantitative analysis		
MSI	Dynamic real-time detection	High costs		
	Multi-dimensional information	High time consuming		
	Visualized information	Complex data processing		



A: 通过使用加热的电喷雾电离探针作为电离源,使质谱仪获得稳定的进样速率^[39]; B: 基于循环酶法扩增与微流控电压辅助液相解吸电喷雾串 联质谱相结合的简便灵敏的靶标miRNA检测方法^[43]; C: 通过在微通道顶部设计直径为10~12 μm的微孔,将微流控芯片与MS连接起来,在芯片 上集成内部电极,实现更高的灵敏度和更好的喷雾性能^[40]。HPLC: 高效液相色谱; ACN: 乙腈; DSN: 双链特异性核酸酶; VAL-DESI-MS/MS: 电 压辅助液体解吸电喷雾电离串联质谱; HV: 高压; LIT-MS: 线性离子阱质谱。

A: a consistent feed rate is obtained for stable MS detection by employing the heated electrospray ionization probe as an ionization source ^[39]; B: a facile and sensitive assay of targeted miRNAs based on the combination of cyclic enzymatic amplification with microfluidic voltage-assisted liquid desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry ^[43]; C: the microfluidic chip is connected to MS by drilling a microhole with a diameter of 10-12 µm directly on the top of the microchannel, and an internal electrode was integrated on the chip to achieve higher sensitivity and better spray performance ^[40]. HPLC: high-performance liquid chromatography; ACN: acetonitrile; DSN: duplex-specific nuclease; VAL-DESI-MS/MS: voltage-assisted liquid desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry; HV: high voltage; LIT-MS: linear ion trap mass spectrometry.

图1 基于ESI-MS技术的研究进展(根据参考文献[39-40,43]修改)

Fig.1 Research progress of ESI-MS technology (modified from the references [39-40,43])

测。LI等^[43]通过将3'端的双碱基核苷酸片段作为质谱 信号报告基因,进行微流控电压辅助液体解吸电喷雾 电离串联质谱(voltage-assisted liquid desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry, VAL-DESI-MS/MS)检测。ZHANG等^[44]将螺旋惯性微流控技术 与离子迁移质谱(ion mobility mass spectrometry, IM-MS)相结合,进行单细胞代谢物的检测和鉴定,成功筛 选了3种癌细胞的代谢图谱,并鉴定出了19种不同的 脂类。

因此, ESI-MS技术可以与LC等不同的分离方法 联用, 实现待测物的高效分离, 对待测物进行灵敏检 测, 从更多维度获得待测物的信息。同时其具备全面 且精确的数据库,可实现对待测物的精准分析,因此 被广泛应用于不同样本的肿瘤标志物筛选研究中。

2.2 激光解吸电离质谱技术

与ESI-MS类似,LDI-MS也是一种"软电离"质 谱技术,其通过脉冲激光照射加热待测物来解吸和 电离物质,同时具有准分子离子峰强且碎片离子少 的优点。但低激光吸收、存在热降解等原因,限制 了其在物质检测方面的应用。基质辅助激光解吸电 离(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 质谱的出现,为实现分析物的高效离子化带来了 福音。在1985年KARAS等^[45]基于基质有机物烟酸 进行激光解吸电离过程,烟酸将激光能量吸收后转 移到分析物中,防止分析物直接吸收能量而发生碎 裂,以此提高分析物的电离效率。后续也涌现出很 多有机基质,如2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)、α-氰基-4-羟基肉桂酸(α-cyano-4hydroxycinnamic acid, CHCA)等, 是MALDI-MS中用 于蛋白质等大生物分子的优选基质, NACHTIGALL 等[46]利用CHCA基质,对人体鼻拭子样本进行蛋白检 测, MALDI-MS与机器学习相结合, 准确率达93.9%。 但是MALDI与液相分离方法不兼容,限制了该方法 对蛋白质的检测。在核酸检测方面,越来越多的研究 利用基质辅助激光解吸/电离飞行时间(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 质谱进行检测。ZHU等^[47]对患者外周血中的DNA甲 基化水平进行 MALDI-TOF-MS检测,即使对很小的 肿瘤(直径≤1 cm)其检测结果也非常理想。然而,基 质本身也会碎裂,从而导致一些低分子量的代谢物 分析效果不好,同时传统基质和分析物的结晶不均 匀可能导致样品的分布不均匀,因此降低了检测结 果的重现性[48]。纳米材料具有大的比表面积,能够产 生更均匀的共结晶,因此开发新型纳米基质,提高分 析物的电离效果,降低背景干扰,以此来实现更高通 量的激光解吸电离质谱的低分子量标志物检测,是 现在研究的一大趋势^[49-52]。SU等^[51]设计了具有可控 结构的多孔PdPtAu,在优化了其表面结构后, PdPtAu 光热转换效率增加了50倍,电磁场强度高出了7倍,在 几秒内即可对没有经过富集和纯化的500 nL血浆完 成代谢分析。HUANG等^[52]设计的铂核壳磁性纳米 颗粒能够得到更明确的谱峰,基于此对未处理的血 清样本进行MALDI-MS检测,筛选并鉴定出了胰腺 癌的5种生物标志物。

LDI-MS具有样品预处理简单、检测速率快、 通量高等特点,并可快速对生物样品进行电离分析, 实现对大队列临床样本的快速检测分析,因此通过 LDI-MS技术可达到对复杂临床样本进行肿瘤标志 物筛选的目的。

质谱成像技术将质谱技术和影像可视化技术结合,对来自复杂样本的核酸、蛋白质和代谢产物的空间分布进行成像分析。1997年CAPRIOLI等^[53]第一次用基质辅助激光解吸电离质谱成像(matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging, MALDI-MSI)技术检测了蛋白质、多肽等大分子。 在蛋白质检测领域,为能敏感而准确地检测蛋白质 生物标志物, WANG等^[54]通过集成质谱成像技术与金 纳米的信号放大特质,对外泌体的蛋白质进行了检 测分析。为能实现更快、更高分辨率的蛋白质成像, SPRAGGINS等^[55]结合了超高速的MALDI-TOF和高 质量分辨率的傅里叶变换离子回旋共振(fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) MSI, 该方法对 组织样品中蛋白质图像采集率提高了约10倍,空间分 辨率达到了10 μm。而代谢物分子量小,可通过使用 适合的基质达到提高成像质量的目的。例如, 与9-氨 基吖啶(9-aminoacridine, 9-AA)和1,5-二氨基萘(1,5-diaminonaphthalene, 1,5-DAN)相比, N-(1-萘基)乙二胺二 盐酸盐[N-(1-naphthyl) ethylene dihydrochloride, NEDC] 基质因其低信号干扰和高代谢物覆盖率而被选择用 于负离子模式MALDI-MSI^[56-57],除此之外氧化石墨烯 也有此性能, ZHOU等^[58]用氧化石墨烯作为MALDI的 基质,在负离子模式下对癌症组织样品中的小分子进 行成像,鉴定了212种低分子量的代谢物。

通过质谱成像技术可以实现对临床样本的原 位及动态检测,同时通过提高分辨率等方法,可更加 直观地获取较全面的分子信息。因此质谱成像技术 可为各类肿瘤相关疾病的标志物筛选和验证提供有 力支持和技术保障。

3 基于质谱的肿瘤标志物筛选的临床应用

随着高通量质谱技术的日益发展,以及各组学研究的进一步深入,越来越多高灵敏度和特异性的肿瘤标志物被发现对肿瘤的早期诊断和预后监测有重要意义(表2)^[59]。

3.1 肿瘤标志物在临床诊断领域的应用

质谱技术在寻找肿瘤早期高灵敏度和特异性的潜在生物标志物的研究中得到了广泛应用^[60-61](图2)。作为生命的最基本物质,DNA、mRNA和微小RNA(microRNA,miRNA)等核酸在分子水平的变化与肿瘤的发生发展密切相关^[62]。ZHENG等^[63]基于质谱对单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点进行检测,发现*IRS1*(rs10205233 C>T)的多态性变化与胃癌的发病风险密切相关。SI等^[64]对100例人体细胞的DNA甲基化水平进行nESI-MS检测,以此区分正常乳腺细胞系MCF10A和乳腺瘤细胞系MCF7。QIAO等^[65]基于MALDI-TOF-MS对361份人体血液样本进行检测,发现基因*SH3BP5*的甲基化水平改变与早期肺腺癌之间有显著相关

标志物	诊断/预后能力	参考文献
Biomarkers	Performance	Reference
Nicotinamide N-methyltransferase, galactokinase	AUC=0.763-0.801	[60]
AFP-L3	AUC=0.854	[68]
Lysine, etc.	AUC=0.855-0.918	[71]
Nicotinamide, etc.	AUC=0.865	[72]
Serum HER2	AUC=0.910	[80]
Serum amyloid protein A, transthyretin	Accuracy=85%	[81]
GSN	AUC=0.779	[82]
Lactic acid, etc.	AUC=0.925	[83]





A: 基于质谱的组织蛋白分析用于膀胱癌诊断^[60], B: 基于质谱的细胞外泌体蛋白分析用于肺癌诊断^[74], C: 基于质谱的血清代谢物分析用于髓母 细胞瘤诊断^[50]。BCa: 膀胱癌; LC-MS/MS: 液相色谱–质谱联用; MB: 髓母细胞瘤; RT: 放射治疗; HC: 健康对照。

A: mass spectrometry-based tissue protein analysis for bladder cancer diagnosis ^[60]; B: mass spectrometry-based analysis of cellular exosomal proteins for lung cancer diagnosis ^[74]; C: mass spectrometry-based serum metabolite analysis for medulloblastoma diagnosis ^[50]. BCa: bladder cancer; LC-MS/MS: liq-uid chromatography tandem mass spectrometry; MB: medulloblastoma; RT: radiotherapy; HC: healthy control.

图2 基于质谱技术筛选具有诊断价值的潜在肿瘤标志物(根据参考文献[50,60,74]修改)

Fig.2 Screening potential tumor biomarkers with diagnostic value using MS (modified from the references [50,60,74])

性,表明外周血DNA甲基化水平的变化可能是评估 癌症风险的潜在生物标志物。YANG等^[66]建立了 基于人体血液样本的纸质喷雾质谱检测法,检测到 miR-141,其可用于前列腺癌的前期诊断。蛋白质 作为生命活动的主要承担者,能够精准反映相关细 胞的生理状态,提供诸多功能信息,因而成为研究 肿瘤标志物的重要载体^[67]。SPRAGGINS等^[55]结合 MALDI-TOF-MS等质谱技术,对组织样品进行检测 后确定了位于健康组织区域以及肿瘤区域的特异性 蛋白质。KIM等^[68]通过多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)质谱方法检测了400例人血清 样本,证明了AFP和甲胎蛋白异质体AFP-L3可作为 肝癌的早期检测。代谢组能直接反映上游基因组、 转录组和蛋白组的调控结果,作为肿瘤标志物可灵 敏且准确地反映生物体状态,并能直接反映整个系 者预后不良。 统的动态变化^[69-73]。HUANG等^[73]通过对481例人体 清中的蛋白质 血清样本进行LDI-MS检测,筛选出半胱氨酸、脂肪 间质谱(surfac 酸等7个可用于早期肺腺癌诊断的代谢标志物,曲线 time of flight

下面积(area under the curve, AUC)可达0.9。CAO等^[50] 对人体血清样本进行高通量质谱检测,并结合机器 学习找出了4个髓母细胞瘤患者与健康对照组的差 异代谢物,诊断准确率达89.9%。HUANG等^[72]基于 纳米颗粒增强激光解吸电离(nanoparticle-enhanced laser desorption/ionization, NPELDI)质谱,对人体血 清样本进行质谱检测分析,筛选到尿嘧啶、胸腺嘧 啶、甘油酸等7个差异代谢物可用于乳腺癌的诊断, 准确率达88.8%。

3.2 肿瘤标志物在预后监测领域的应用

对人体组织样本和不同体液样本进行质谱检 测,筛选潜在的核酸类、蛋白类和代谢类肿瘤标志 物,能为患者的术后治疗提供依据,从而提高患者的 生存率。SNPs和DNA甲基化水平等被发现与肿瘤 发生发展密切相关[75]。FU等[76]基于MALDI-MS对 245名乳腺癌患者样本中基因 MMP9的 SNPs 位点进 行了检测,发现了MMP9中与乳腺癌预后水平相关 的SNPs位点。MACCONAILL等^[77]对不同类型癌症 患者的组织进行核酸质谱检测,对患者临床肿瘤样 本中的关键癌基因突变进行剖析,分析了33个癌症 基因的396个突变位点,基于此有效预测了患者的预 后并告知了治疗方案。WANG等^[78]设计了连有与靶 miRNA互补的单链DNA探针的金纳米颗粒,基于质 谱技术对尿液中痕量RNA进行了检测,此方法可用 于疾病预后预测。对蛋白质进行大规模、高通量 的分析,寻找特异性蛋白标志物,能为肿瘤的治疗 和干预提供新思路。WANG等^[79]对16例非小细胞肺 癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和癌旁的组织 样本进行质谱检测分析,发现91个蛋白表达水平具 有差异,其中钙网蛋白(calreticulin, CALR)和蛋白二 硫键异构酶家族A成员3(protein disulfide isomerase family A member 3, PDIA3)这2种蛋白的低表达与肺 癌患者较差的预后呈正相关,可作为NSCLC预后水 平预测的蛋白标志物。ZHANG等^[80]对626名患者的 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族蛋白进行质谱检测,发现血清人表皮生 长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, sHER2)水平高、sEGFR水平低的转移乳腺癌患

者预后不良。LI等^[81]对27位患者治疗前和治疗后血 清中的蛋白质组进行表面增强激光解吸电离飞行时 间质谱(surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)检 测,鉴定了血清淀粉样蛋白A和转甲状腺素,发现了 依据血浆蛋白质图谱可以准确预测骨肉瘤患者治疗 前后的化疗反应效果。KIM等^[82]对20例高级别浆液 性卵巢癌患者血浆样本进行蛋白质检测,将凝溶胶 蛋白(gelsolin, GSN)确定为不良预后的生物标志物。 同时一些低分子量代谢物标志物的发现,为各类癌 症患者预后监测提供了依据。LIU等^[83]对患者房水 样本进行 NPELDI-MS检测, 筛选到 7种代谢标志物 用于区分早期和晚期视网膜母细胞瘤患者,AUC为 0.925, 准确率达84.8%。XU等^[71]基于NPELDI-MS对 共2 208例血浆样本进行检测,结合机器学习,在回 顾性队列中构建了胃癌的预后评分系统,该方法有 助于预测胃癌患者的预后效果。

4 展望

随着高灵敏度和高分辨率质谱技术的出现,以 及各组学的飞速发展,近年来肿瘤标志物研究取得 了重大进展,使对患者体液及组织中生物分子的快 速和无标记测量得以实现,让大规模临床样本的检 测和分析成为可能。因此,我们从样品制备,不同种 类质谱的检测和应用等方面回顾了基于质谱的不同 种类肿瘤标志物研究的进展和挑战。

尽管目前这一领域已经取得了一些成就,但仍 需进一步实现以下目标。(1) 样品预处理: 开发更多 用于样品预处理的纳米器件,并一步将其集成化、 自动化,简化预处理环节,减少该环节的样品损失。 (2) 质谱检测:加大对纳米材料性能的研究,开发更 多的新型基质,以实现对复杂临床样本的高通量检 测。(3)多种质谱技术的结合,用于更高效、更高通 量的临床研究:例如感应纳升电喷雾质谱可对代谢 物进行全面分析,但样品通量并不理想;而MALDI-MS能够高通量快速检测代谢物,但空间分辨率有 限。因此,在样本预处理、质谱检测等环节加大研 究力度,将加快对该领域质谱检测性能的改进,对样 本进行更全面的分析,找出更多有临床应用价值的 肿瘤标志物。基于质谱的肿瘤标志物的筛选研究必 将向着高通量、微量化和高精度的方向全方位前进。 总之,基于这些年取得的多项进展和突破,我们相信 质谱技术的合理设计和发展将对肿瘤标志物的发现 起到关键作用。

参考文献 (References)

- ETZIONI R, URBAN N, RAMSEY S, et al. The case for early detection [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(4): 243-52.
- [2] LI J, ZHAO W, AKBANI R, et al. Characterization of human cancer cell lines by reverse-phase protein arrays [J]. Cancer Cell, 2017, 31(2): 225-39.
- [3] MANN M. The ever expanding scope of electrospray mass spectrometry: a 30 year journey [J]. Nat Commun, 2019, 10: 3744.
- [4] SEGER C, SALZMANN L. After another decade: LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics [J]. Clin Biochem, 2020, 82: 2-11.
- [5] DOERR A. Mass spectrometry-based targeted proteomics [J]. Nat Methods, 2013, 10(1): 23.
- [6] SPITZER M H, NOLAN G P. Mass cytometry: single cells, many features [J]. Cell, 2016, 165(4): 780-91.
- [7] GARABEDIAN A, BENIGNI P, RAMIREZ C E, et al. Towards discovery and targeted peptide biomarker detection using nano-ESI-TIMS-TOF MS [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2018, 29(5): 817-26.
- [8] PAN Y, LIU G, ZHOU F, et al. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics [J]. Clin Exp Med, 2018, 18(1): 1-14.
- [9] ZHANG B, WHITEAKER J R, HOOFNAGLE A N, et al. Clinical potential of mass spectrometry-based proteogenomics [J]. Nat Rev Clini Oncol, 2019, 16(4): 256-68.
- [10] NAKAYASU E S, GRITSENKO M, PIEHOWSKI P D, et al. Tutorial: best practices and considerations for mass-spectrometrybased protein biomarker discovery and validation [J]. Nat Protoc, 2021, 16(8): 3737-60.
- PAUWELS J, GEVAERT K. Mass spectrometry-based clinical proteomics: a revival [J]. Expert Rev Proteomics, 2021, 18(6): 411-4.
- [12] PONZINI E, SANTAMBROGIO C, DE PALMA A, et al. Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery [J]. Mass Spectrom Rev, 2022, 41(5): 842-60.
- [13] ZHENG Y Z, LIU G H, WU Q S, et al. Development of specific and rapid detection of human DNA by recombinase polymerase amplification assay for forensic analysis [J]. Forensic Sci Int Genet, 2023, 66: 102903.
- [14] TAYYAB M, BARRETT D, VAN RIEL G, et al. Digital assay for rapid electronic quantification of clinical pathogens using DNA nanoballs [J]. Sci Adv, 2023, 9(36): eadi4997.
- [15] KUMARI R, LIM J W, SULLIVAN M R, et al. A novel rolling circle amplification-based detection of SARS-CoV-2 with multiregion padlock hybridization [J]. Diagnostics, 2022, 12(9): 2252.
- [16] LEE J H, CHEGLAKOV Z, YI J, et al. Plasmonic photothermal gold bipyramid nanoreactors for ultrafast real-time bioassays [J]. J Am Chem Soc, 2017, 139(24): 8054-7.
- [17] YOU M, JIA P, HE X, et al. Quantifying and adjusting plasmondriven nano-localized temperature field around gold nanorods for nucleic acids amplification [J]. Small Methods, 2021, 5(5): e2001254.
- [18] QIU G, GAI Z, SALEH L, et al. Thermoplasmonic-assisted

cyclic cleavage amplification for self-validating plasmonic detection of SARS-CoV-2 [J]. ACS Nano, 2021, 15(4): 7536-46.

- [19] NALDI M, TRAMARIN A, BARTOLINI M. Immobilized enzyme-based analytical tools in the -omics era: recent advances [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 160: 222-37.
- [20] WEI Z H, FAN P R, JIAO Y J, et al. Integrated microfluidic chip for on-line proteome analysis with combination of denaturing and rapid digestion of protein [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1102: 1-10.
- [21] QIAN K, LIU F, YANG J, et al. Pore size-optimized periodic mesoporous organosilicas for the enrichment of peptides and polymers [J]. Rsc Advances, 2013, 3(34): 14466-72.
- [22] QIAN K, ZHOU L, ZHANG J, et al. A combo-pore approach for the programmable extraction of peptides/proteins [J]. Nanoscale, 2014, 6(10): 5121-5.
- [23] LI Y, ZHANG X, DENG C. Functionalized magnetic nanoparticles for sample preparation in proteomics and peptidomics analysis [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(21): 8517-39.
- [24] ZHU T, GU Q, LIU Q, et al. Nanostructure stable hydrophilic hierarchical porous metal-organic frameworks for highly efficient enrichment of glycopeptides [J]. Talanta, 2022, 240: 123193.
- [25] YAN L, QIAO L, JI J, et al. In-tip nanoreactors for cancer cells proteome profiling [J]. Anal Chim Acta, 2017, 949: 43-52.
- [26] WOO J, WILLIAMS S M, MARKILLIE L M, et al. Highthroughput and high-efficiency sample preparation for single-cell proteomics using a nested nanowell chip [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6246.
- [27] HEYDARZADEH M, HEYDARI R. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in environmental and food samples using salt-assisted liquid-liquid extraction coupled with microchannel and high-performance liquid chromatography [J]. Sep Sci Plus, 2022, 5(7): 305-13.
- [28] SONG A Y, YANG J. Efficient determination of amphetamine and methylamphetamine in human urine using electro-enhanced single-drop microextraction with in-drop derivatization and gas chromatography [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1045: 162-8.
- [29] DA SILVA BURATO J S, VARGAS MEDINA D A, DE TOFFO-LI A L, et al. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques [J]. J Sep Sci, 2020, 43(1): 202-25.
- [30] WADA Y, LOENNERDAL B. Bioactive peptides released by *in vitro* digestion of standard and hydrolyzed infant formulas [J]. Peptides, 2015, 73: 101-5.
- [31] ŁUCZYKOWSKI K, WARMUZIŃSKA N, OPERACZ S, et al. Metabolic evaluation of urine from patients diagnosed with high grade (HG) bladder cancer by SPME-LC-MS method [J]. Molecules, 2021, 26(8): 2194.
- [32] WEI X, LIU Z H, JIN X L, et al. Plasmonic nanoshells enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry for detection of serum metabolites [J]. Anal Chim Acta, 2017, 950: 147-55.
- [33] QIU Y, ZHANG M, LAI Z, et al. Profiling of amines in biological samples using polythioester-functionalized magnetic nanoprobe [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 10: 1103995.
- [34] GONZÁLEZ-SÁLAMO J, SOCAS-RODRÍGUEZ B, HERNÁN-DEZ-BORGES J, et al. Core-shell poly(dopamine) magnetic nanoparticles for the extraction of estrogenic mycotoxins from milk and yogurt prior to LC-MS analysis [J]. Food Chem, 2017, 215: 362-8.

- [35] YU W Q, JIA J W, SHI J M, et al. Magnetic solid-phase extraction based on GO/Fe₃O₄ coupled with UPLC-MS/MS for determining nitroimidazoles and their metabolites in honey [J]. Talanta, 2023, 254: 124181.
- [36] ZHAO P, FENG Y X, WU J H, et al. Efficient sample preparation system for multi-omics analysis via single cell mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2023, 95(18): 7212-9.
- [37] MALCIC A I, BREEN L, JOSIC D, et al. Proteomics profiling of keratocystic odontogenic tumours reveals AIDA as novel biomarker candidate [J]. J Oral Pathol Med, 2015, 44(5): 367-77.
- [38] JIANG H P, LIU T, GUO N, et al. Determination of formylated DNA and RNA by chemical labeling combined with mass spectrometry analysis [J]. Anal Chim Acta, 2017, 981: 1-10.
- [39] KIM J Y, LEE G B, LEE J C, et al. High-speed screening of lipoprotein components using online miniaturized asymmetrical flow field-flow fractionation and electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to hepatocellular carcinoma plasma samples [J]. Anal Chem, 2021, 93(11): 4867-75.
- [40] ZHONG X, QIAO L, STAUFFER G, et al. On-chip spyhole nanoelectrospray ionization mass spectrometry for sensitive biomarker detection in small volumes [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2018, 29(7): 1538-45.
- [41] WEI Z, XIONG X, GUO C, et al. Pulsed direct current electrospray: enabling systematic analysis of small volume sample by boosting sample economy [J]. Anal Chem, 2015, 87(22): 11242-8.
- [42] SONG L G, JAMES S R, KAZIM L, et al. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2005, 77(2): 504-10.
- [43] LI X, ROUT P, XU R, et al. Quantification of micrornas by coupling cyclic enzymatic amplification with microfluidic voltageassisted liquid desorption electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2018, 90(22): 13663-9.
- [44] ZHANG L, XU T, ZHANG J, et al. Single cell metabolite detection using inertial microfluidics-assisted ion mobility mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2021, 93(30): 10462-8.
- [45] KARAS M, BACHMANN D, HILLENKAMP F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet-laser desorption mass-spectrometry of organic-molecules [J]. Anal Chem, 1985, 57(14): 2935-9.
- [46] NACHTIGALL F M, PEREIRA A, TROFYMCHUK O S, et al. Detection of SARS-CoV-2 in nasal swabs using MALDI-MS [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(10): 1168-73.
- [47] ZHU Q, QIAO R, DI F F, et al. Hypomethylation of *RPTOR* in peripheral blood is associated with very early-stage lung cancer [J]. Clin Chim Acta, 2022, 537: 173-80.
- [48] KULKARNI A S, HUANG L, QIAN K. Material-assisted mass spectrometric analysis of low molecular weight compounds for biomedical applications [J]. J Mater Chem B, 2021, 9(17): 3622-39.
- [49] VEDARETHINAM V, HUANG L, ZHANG M C, et al. Vanadium core-shell nanorods inspect metabolic changes of diabetic retinopathy [J]. Adv Funct Mater, 2020, 30(35): 2002791.
- [50] CAO J, SHI X J, GURAV D D, et al. Metabolic fingerprinting on synthetic alloys for medulloblastoma diagnosis and radiotherapy evaluation [J]. Adv Mater, 2020, 32(23): 2000906.

- [51] SU H Y, LI X X, HUANG L, et al. Plasmonic alloys reveal a distinct metabolic phenotype of early gastric cancer [J]. Adv Mater, 2021, 33(17): 2007978.
- [52] HUANG L, GURAV D D, WU S, et al. A multifunctional platinum nanoreactor for point-of-care metabolic analysis [J]. Matter, 2019, 1(6): 1669-80.
- [53] CAPRIOLI R M, FARMER T B, GILE J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS [J]. Anal Chem, 1997, 69(23): 4751-60.
- [54] WANG Y, ZHANG K, HUANG X, et al. Mass spectrometry imaging of mass tag immunoassay enables the quantitative profiling of biomarkers from dozens of exosomes [J]. Anal Chem, 2021, 93(2): 709-14.
- [55] SPRAGGINS J M, RIZZO D G, MOORE J L, et al. Next-generation technologies for spatial proteomics: integrating ultra-high speed MALDI-TOF and high mass resolution MALDI FTICR imaging mass spectrometry for protein analysis [J]. Proteomics, 2016, 16(11/12): 1678-89.
- [56] PLANQUE M, IGELMANN S, CAMPOS A M F, et al. Spatial metabolomics principles and application to cancer research [J]. Curr Opin Chem Biol, 2023, 76: 102362.
- [57] WANG L, XING X, ZENGL X F, et al. Spatially resolved isotope tracing reveals tissue metabolic activity [J]. Nat Methods, 2022, 19(2): 223-30.
- [58] ZHOU D, GUO S, ZHANG M, et al. Mass spectrometry imaging of small molecules in biological tissues using graphene oxide as a matrix [J]. Anal Chim Acta, 2017, 962: 52-9.
- [59] HUANG Y, YANG H, LI J, et al. Diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma by high-performance serum metabolic fingerprints: a retrospective study [J]. Small Methods, 2023, 2301046.
- [60] DAVALIEVA K, KIPRIJANOVSKA S, IVANOVSKI O, et al. Proteomics profiling of bladder cancer tissues from early to advanced stages reveals NNMT and GALK1 as biomarkers for early detection and prognosis of BCa [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14938.
- [61] YU Z T, ZHAO C, HU S, et al. MALDI-MS-based biomarker analysis of extracellular vesicles from human lung carcinoma cells [J]. Rsc Advances, 2021, 11(41): 25375-80.
- [62] SCHWARZENBACH H, HOON D S B, PANTEL K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6): 426-37.
- [63] ZHENG W W, WU C C, WU X L, et al. Genetic variants of autophagy-related genes in the PI3K/Akt/mTOR pathway and risk of gastric cancer in the Chinese population [J]. Gene, 2021, 769: 145190.
- [64] SI X Y, ZHAO Y Y, YANG C D, et al. DNA methylation as a potential diagnosis indicator for rapid discrimination of rare ca neer cells and normal cells [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11882.
- [65] QIAO R, ZHONG R, LIU C, et al. Novel blood-based hypomethylation of *SH3BP5* is associated with very early-stage lung adenocarcinoma [J]. Genes Genomics, 2022, 44(4): 445-53.
- [66] YANG Y, WANG W, LIU H, et al. Sensitive quantification of microRNA in blood through multi-amplification toehold-mediated DNA-strand-displacement paper-spray mass spectrometry (TSD-PS MS) [J]. Angew Chem-Int Edit, 2022, 61(9): e202113051.
- [67] LUDWIG J A, WEINSTEIN J N. Biomarkers in cancer staging,

prognosis and treatment selection [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(11): 845-56.

- [68] KIM H, SOHN A, YEO I, et al. Clinical assay for AFP-L3 by using multiple reaction monitoring-mass spectrometry for diagnosing hepatocellular carcinoma [J]. Clin Chem, 2018, 64(8): 1230-38.
- [69] FIEHN O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes [J]. Plant Mol Biol, 2002, 48(1/2): 155-71.
- [70] WANG Y N, HUANG X D, QIAN K. Multi-omics research as biomedical interfaces with the engineering and informatics for healthcare [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1281462.
- [71] XU Z, HUANG Y, HU C, et al. Efficient plasma metabolic fingerprinting as a novel tool for diagnosis and prognosis of gastric cancer: a large-scale, multicentre study [J]. Gut, 2023, 72(11): 2051-67.
- [72] HUANG Y D, DU S Q, LIU J, et al. Diagnosis and prognosis of breast cancer by high-performance serum metabolic fingerprints
 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(12): e2122245119.
- [73] HUANG L, WANG L, HU X M, et al. Machine learning of serum metabolic patterns encodes early-stage lung adenocarcinoma [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3556.
- [74] YU Z, ZHAO C, HU S, et al. MALDI-MS-based biomarker analysis of extracellular vesicles from human lung carcinoma cells [J]. Rsc Advances, 2021, 11(41): 25375-80.
- [75] YAN T, SHEN C, JIANG P, et al. Risk SNP-induced lncRNA-SLCC1 drives colorectal cancer through activating glycolysis signaling [J]. Signal Transduct Targeted Ther, 2021, 6(1): 70.

- [76] FU F, WANG C, CHEN L M, et al. The influence of functional polymorphisms in matrix metalloproteinase 9 on survival of breast cancer patients in a Chinese population [J]. DNA Cell Biol, 2013, 32(5): 274-82.
- [77] MACCONAILL L E, CAMPBELL C D, KEHOE S M, et al. Profiling critical cancer gene mutations in clinical tumor samples [J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7887.
- [78] WANG Q L, LIU L C, CHEN X Y, et al. Noninvasive prognosis of postmyocardial infarction using urinary miRNA ultratrace detection based on single-target DNA-functionalized AuNPs [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(3): 3633-42.
- [79] WANG K, LI H, CHEN R, et al. Combination of CALR and PDIA3 is a potential prognostic biomarker for non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(57): 96945-57.
- [80] ZHANG Y Y, ZHU M C, ZHU J H, et al. Nanoproteomics deciphers the prognostic value of EGFR family proteins-based liquid biopsy [J]. Anal Biochem, 2023, 671: 115133.
- [81] LI Y T, DANG T A, SHEN J H, et al. Plasma proteome predicts chemotherapy response in osteosarcoma patients [J]. Oncol Rep, 2011, 25(2): 303-14.
- [82] KIM S I, HWANGBO S, DAN K S, et al. Proteomic discovery of plasma protein biomarkers and development of models predicting prognosis of high-grade serous ovarian carcinoma [J]. Mol Cell Proteomics, 2023, 22(3): 100502.
- [83] LIU W S, LUO Y X, DAI J J, et al. Monitoring retinoblastoma by machine learning of aqueous humor metabolic fingerprinting [J]. Small Methods, 2022, 6(1): 2101220.