

基于林县营养干预试验人群开展的食管鳞癌代谢组学标志物探索

王晓坤, 杨 欢, 范金虎, 乔友林

(国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院, 北京 100021)

摘 要: [目的] 开展巢式病例对照研究, 通过代谢组学的手段分析得到差异代谢物, 探索食管鳞癌发病前可能的代谢标志物。[方法] 本研究基于 1985 年开展的林县营养干预试验随访队列, 选择 2001 年及之后确诊为食管鳞癌者 30 例, 并根据年龄(± 3 岁)、性别匹配至今仍存活的健康对照 30 名。1999 年秋季至 2000 年春季的随访调查中获得了上述研究对象的血浆标本, 使用 LC-MS 的方法进行代谢组学检测, 对获得的代谢组特征进行分析。[结果] 食管鳞癌组和对照组的基线人口学信息差异无统计学意义, 但饮食偏好存在一定差异。代谢组检测数据稳定, 代谢分析发现两组在代谢物分布上有明显差异, 确定了包括谷氨酸、胆碱、溶血卵磷脂类、鸟氨酸在内的 9 种重要差异代谢物。[结论] 食管鳞癌患者体内代谢物表达存在明显改变, 某些含量波动的物质或可以成为食管鳞癌识别和诊断的潜在生物标志。

关键词: 食管鳞癌; 代谢组学; 生物标志物; 差异分析

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2023)02-0154-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2023.02.A011

Exploration of Biomarkers of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Based on Metabolomics

WANG Xiao-kun, YANG Huan, FAN Jin-hu, QIAO You-lin

(National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To explore biomarkers of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using metabolomic approach. [Methods] A nested case-control study was conducted from autumn 1999 to spring 2000. The cohort of Linxian Nutrition Intervention Trial conducted starting in 1985 was used in the study, 30 patients who developed ESCC after 2001 and age of 30 years old (± 3 years) and gender-matched healthy controls were enrolled from the cohort. The plasma specimens were obtained from all study subjects, and metabolomic assays were performed using the LC-MS method. [Results] There was no significant difference in baseline demographic information between ESCC patients and controls, but there were differences in dietary preferences between two groups. There were significant differences in metabolite distribution between the two groups, with nine differential metabolites, including glutamate, choline, lysophosphatidylcholine and ornithine. [Conclusion] Metabolite composition is significantly modified in patients with esophageal squamous cell carcinoma, and certain substances with fluctuating levels may be potential biomarkers for the identification and diagnosis of esophageal squamous carcinoma.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; metabolomics; biomarkers; differential analysis

食管癌 (esophageal cancer, EC) 是一种发病隐匿、早期症状不明显的恶性肿瘤, 一旦发现往往已进展至中晚期。我国仍然处于食管癌疾病负担最重的几个国家之列, 据估计, 我国约 90% 的食管癌病

例为食管鳞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)。2016 年中国肿瘤登记数据显示, 食管癌的年龄标化发病率为 11.5/10 万, 年龄标化死亡率为 8.28/10 万^[1], 位于全国恶性肿瘤死亡的第 5 位。值得关注的是, 近年来食管癌的发病率和死亡率均有所下降, 这得益于在食管癌高发地区进行内镜筛查

收稿日期: 2022-10-28; 修回日期: 2022-12-18

通信作者: 范金虎, E-mail: fanjh@cicams.ac.cn

等早期癌症预防手段^[2]。但内镜筛查对筛查医生要求高,对筛查对象来说可能发生黏膜损伤、疼痛等不适,多种原因导致内镜筛查的依从率不高^[3]。而在2013年和2017年分别开展的两项研究结果表明^[4-5],肿瘤标志物辅助食管新型细胞收集器可以降低筛查成本,容易被患者所接受,可能达到扩大筛查覆盖面,增加筛查受益的效果。但目前临床诊断使用的鳞状上皮细胞癌抗原、细胞角蛋白19片段、癌胚抗原和p53蛋白抗体等灵敏度和特异性不足,不能成为理想的食管癌肿瘤标志物^[6]。现有的食管癌筛查指南中指出,开发和拓展生物标志物组合在食管癌筛查中仍具有良好前景^[7],因此,寻找与ESCC发生发展密切相关的标志物具有重要意义。

代谢组学作为一种新型的组学技术,相较于基因组学、转录组学而言,能直接检测生物体内的功能分子、信号分子,更有效地反映生物表型和功能状态^[8]。肿瘤的发生发展过程中往往伴随着多种代谢紊乱,出现某些物质表达的上调或下调^[9]。因此,代谢组学提供了一种研究ESCC生物标志物的新思路。血浆作为代谢组的常用检材,具有采样方便、成本较低的优点。

本研究采用巢式病例对照研究的设计,纳入林县营养干预试验队列人群作为研究对象,使用受试者血浆进行非靶向的代谢组学分析,探索ESCC患者血液中的小分子代谢物含量特征,比较ESCC患者发病前与健康对照组的代谢轮廓差异,并筛选出标志性差异代谢物,可以为ESCC肿瘤标志物的发现提供线索。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1985年中美学者在河南省林县开展了一项大规模的一般人群营养干预试验(Nutrition Intervention Trial, NIT),该研究共纳入研究对象29 584名,对队列中研究对象的随访持续至今。研究开始时,研究者通过问卷调查的方式对所有研究对象的人口学信息、生活方式、疾病史等进行调查,在1999年秋季至2000年春季,对队列人群中所有存活的研究对象进行神经、体格检查,并采集研究对象外周静脉血供后续研究使用。该研究的所有研究对象均已被完整

告知参与研究的风险和受益,并签署了知情同意书。该研究同时得到了美国国家癌症研究所和中国医学科学院肿瘤医院伦理委员会的批准。

本研究是在河南省林县营养干预试验队列基础上开展的一项巢式病例对照研究。从NIT队列随访过程中新发ESCC的受试者中选择。因血标本收集时间为1999年至2000年,故随机选取2001年及之后确诊为ESCC且有足够血标本供检测的研究对象30例作为病例组(ESCC组)。对照组(normal control, NC)人群为NIT队列中截至2021年1月未患ESCC且存活的健康受试者(30名),病例与对照按照基线年龄(± 3 岁)、性别1:1的原则进行匹配。

1.2 样本收集及保存

本研究使用1999—2000年收集的研究对象的血浆样本进行检测分析。血浆样本采集及保存条件如下:研究对象通宵禁食后于清晨采血,采集的静脉血加肝素抗凝,并于6~8 h内尽快离心,经离心后,在无菌条件下小心分装上层血浆至0.5 mL冻存管。所有血浆样本需在24 h内进行冷冻,若有特殊情形导致24 h内未能冷冻处理的血浆样本,暂存于4℃冰箱内的时间不得超过7 d。经冷链运输至中国医学科学院肿瘤医院的NIT队列生物样本库,存放于-80℃冰箱内至今。

1.3 色谱-质谱条件

本研究的代谢组学检测使用液相色谱串联高分辨质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)用于非靶向分析。色谱柱温度为60℃;流速为0.4 mL/min;进样室温度为6℃;进样体积为5 μ L。质谱为Q Enactive mass spectrometry (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)。

血浆样本室温融化后,取100 μ L至1.5 mL的Eppendorf管中,加入400 μ L含内标的乙腈-甲醇(1:1)混合液。涡旋1 min后,在14 000 r/min、4℃条件下离心10 min以去除蛋白等不溶物,移取200 μ L上清冷冻干燥(分2份)。分析前,用50 μ L 20%乙腈复溶,14 000 r/min离心15 min后,取上清进样分析。

1.4 质量控制

质控样品通过汇集所有血清样品的等份试样进行制备,用于方法评估。使用与样品相同的预处理程序平行处理10个质检(quality control, QC)样品,以评估其可重复性。每10个样品后将QC样品插入运

行序列,以监测数据采集的稳定性。

1.5 数据预处理

代谢组学的峰提取、峰校正由 TraceFinder 工作站(Thermo Fisher Scientific,USA)进行,使用 SCI-EXOS(AB SCIEX,USA) 根据峰数据得到内源代谢物质数据,在统计分析前,使用 UV 缩放及对数变换进行代谢组学数据的归一化。

1.6 统计学处理

对研究对象的人口统计学信息采用 χ^2 检验比较组间差异,采用 t 检验比较组间连续性变量的差异。经归一化的代谢组学数据近似正态分布,使用 t 检验进行两组间代谢物的比较, t 检验是最常用的筛选差异代谢物的方法之一,为了规避代谢组学的高维数据进行单变量分析时可能出现的 I 类错误增加的问题,我们使用 FDR 进行校正。构建主成分分析(PCA)模型并绘制 PCA 得分图进行数据稳定性分析,构建正交偏最小二乘方判别分析(OPLS-DA)模型并计算各代谢产物在模型变量重要性投影(variable importance in projection,VIP),VIP 值越大,可以表明该物质在区分两组过程中的贡献越大。因此,VIP 值可以用作筛选 ESCC 组与 NC 组间差异代谢物的重要参考。为了保证 OPLS-DA 模型的可靠性,避免过拟合,采用置换检验的方法(次数 $n=200$)进行分析。使用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,所有统计分析为双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 基线信息分析

ESCC 组平均年龄为 (74.03±6.48)岁,其中男性 12 例,女性 18 例。NC 组的平均年龄为 (73.73±6.44)岁,性别与 ESCC 组严格匹配。经检验,两组人群的其他人口统计学特征如身体质量指数、吸烟状态、饮酒状态、肿瘤家族史差异无统计学意义($P>0.05$)。生活方式方面,ESCC 组和 NC 组在新鲜蔬菜摄入量、新鲜水果摄入量之间差异有统计学意义($P<0.05$),肉蛋类摄入量间尚未观察到统计学差

异(Table 1)。

2.2 代谢图谱分析

ESCC 组、NC 典型样本的离子流色谱图所示,可以看出 ESCC 组和 NC 组的组间代谢物在峰的数量和强度上存在明显差异(Figure 1)。

2.3 组间代谢差异的多元统计分析

2.3.1 数据稳定性分析

将采集的全部数据进行 PCA 分析,可以看到本研究的 QC 样品在 PCA 得分图上,具有较好的组内聚类趋势,未出现异常离群值。QC 样品的位置靠近图像正中,表示本研究的检测过程和分析方法综合稳定性较强。此外,ESCC 和 NC 两组存在一定的分离趋势(Figure 2)。

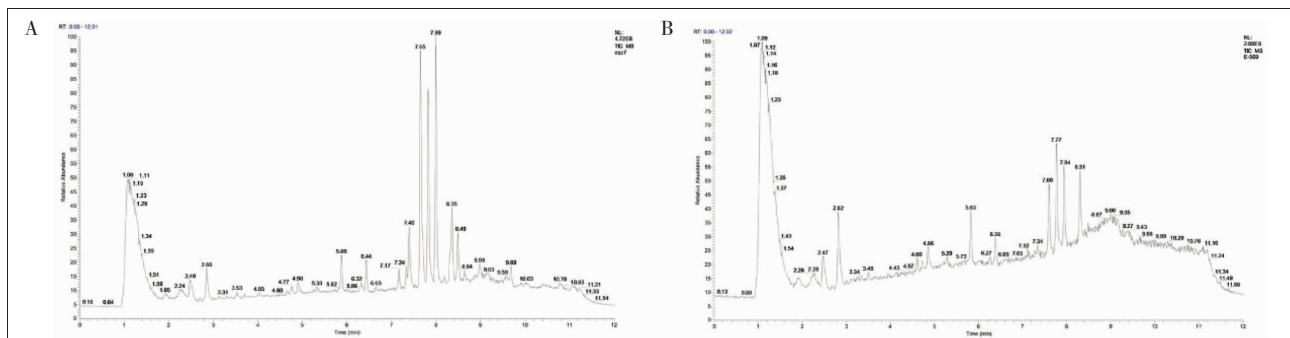
2.3.2 ESCC 组-NC 组 OPLS-DA 分析

为了进一步发现两组间的差异,对 ESCC 组和 NC 组检出的代谢物进行 OPLS-DA 分析,模型的 $R^2X=0.403$, $R^2Y=0.691$, $Q^2=0.213$, R^2X 、 R^2Y 均大于 0.4,说明本研究的模型解释对 X 和 Y 的解释率较好, $Q^2>0.2$,表明该模型拟合能力也可被接受(Figure 3A)。故该模型得到的结果是较为稳定、可靠的,由图可观察到两组间区分程度较好。模型的置换检验得出该模型的 $R^2=0.58$, $Q^2=-0.41$,其中 Q^2 值远小于原模型的 Q^2 值, Q^2 的回归线与纵轴交点小于零,同样

Table 1 Demographic characteristics and risk factors in the Linxian Nutrition Intervention Trial[n(%)]

Characteristic	ESCC group	NC group	P
Age(mean±SD)(years old)	74.03±6.48	73.73±6.44	0.86
Gender			
Male	12(40.0)	12(40.0)	
Female	18(60.0)	18(60.0)	
Body mass index (kg/m ²)			
≤24	26(86.7)	24(80.0)	0.49
>24	4(13.3)	6(20.0)	
Smoking			
No	22(73.3)	24(80.0)	0.54
Yes	8(26.7)	6(20.0)	
Alcohol consumption			
No	26(86.7)	27(90.0)	0.69
Yes	4(13.3)	3(10.0)	
Family history of cancer			
No	19(63.3)	18(60.0)	0.79
Yes	11(36.7)	12(40.0)	
Fresh vegetables consumption(times/week, mean±SD)	14.97±4.12	11.18±4.74	0.04
Fresh fruits consumption(times/week, mean±SD)	0.08±0.12	0.22±0.32	0.01
Meat and eggs consumption(times/week, mean±SD)	0.45±0.45	0.57±0.88	0.49

Notes:ESCC:esophageal squamous cell carcinoma;NC:normal control



Notes: A: esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) group; B: normal control (NC) group

Figure 1 Total ion chromatogram of typical samples

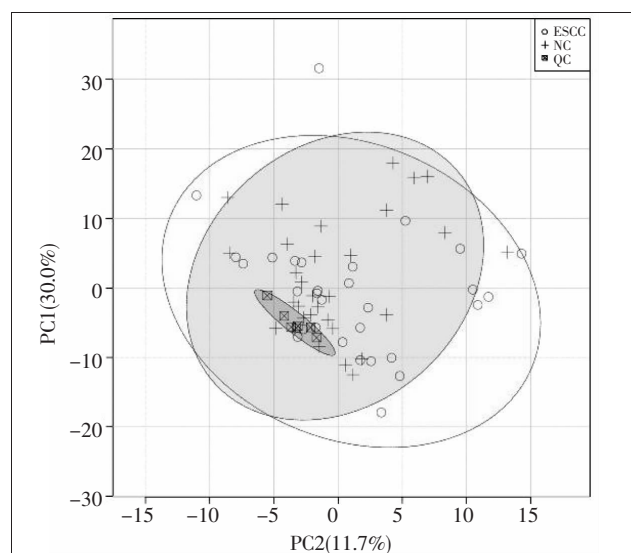
表明原模型的稳健性良好,无过拟合现象(Figure 3B)。

2.4 差异代谢物筛选

结合以上两种方法,本研究以 t 检验有统计学差异 ($P < 0.05$)、 $FDR < 0.5$ 且 $VIP > 1$ 为标准,筛选出 9 个差异性代谢物 (Table 2), 包括谷氨酸 (glutamic acid, Glu)、溶血卵磷脂类 (lysophosphatidylcholine, LPC)、胆碱 (choline)、鸟氨酸 (ornithine) 等。ESCC 组与 NC 组相比,脂蛋白 LPC O-18_0、谷氨酸等的含量显著上调。结合所有筛选出的差异代谢物在各样本中的含量绘制热图,可见 ESCC 组和 NC 组基本可以聚成两类 (Figure 4)。

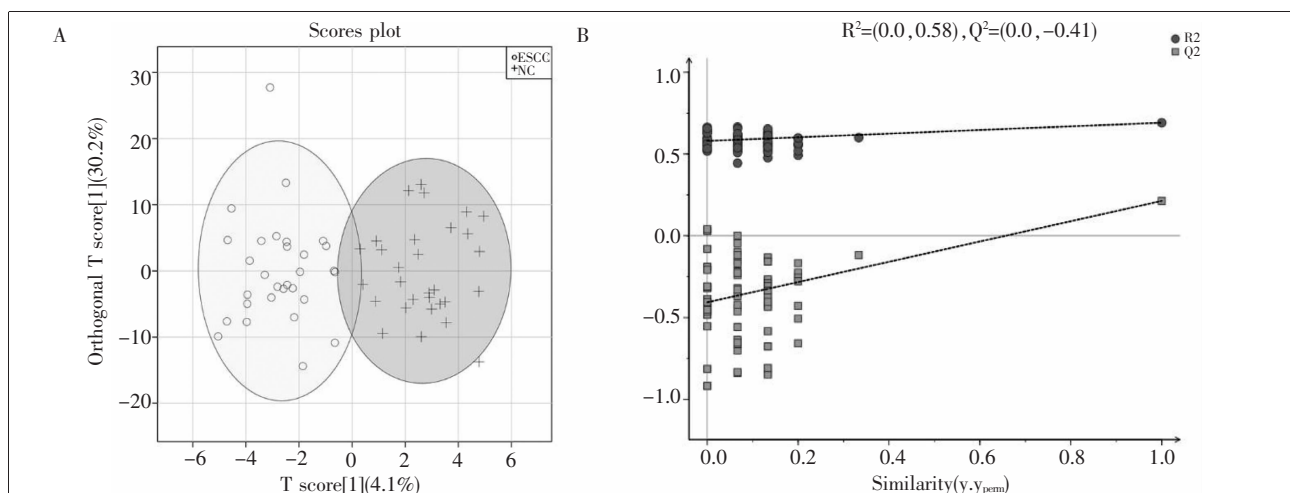
3 讨论

代谢组学越来越多地被用于肿瘤诊断、疗效评估及早期筛查标志物方面的研究,在多种肿瘤生物标志



Notes: ESCC: esophageal squamous cell carcinoma; NC: normal control; PCA: principal component analysis; QC: quality control

Figure 2 PCA score chart for QC samples



Notes: ESCC: esophageal squamous cell carcinoma; NC: normal control; A: the graph of orthogonal analysis scores for two groups of samples; B: the results after 200 permutation tests

Figure 3 OPLS-DA analysis in ESCC group and NC group

Table 2 Differential metabolites between ESCC group and NC group

Type of compound	VIP	P	FDR	Trend
1 Glutamic acid	3.16	<0.001	0.001222	↑
2 LPC O-18:0	2.67	<0.001	0.001832	↑
3 LPC O-16:0	2.47	<0.001	0.006683	↑
4 Choline	2.44	<0.001	0.048795	↑
5 LPC O-18:1	2.42	<0.001	0.014339	↑
6 LPC 18:3 sn-2	2.42	<0.001	0.020587	↑
7 Ornithine	2.42	<0.001	0.030419	↑
8 LPC 18:0 sn-2	2.40	<0.001	0.021577	↑
9 LPC 18:0 sn-1	2.18	<0.001	0.03297	↑

Notes: Trend represented the relative expression of a compound in the esophageal squamous carcinoma group compared to the normal control group, with ↑ being up-regulated expression and ↓ being down-regulated expression; ESCC: esophageal squamous cell carcinoma; NC: normal control; LPC: lysophosphatidylcholine

物的研究中发挥着重要作用^[10-12]。LC-MS 是当前最常用的代谢组学检测技术之一,具有灵敏、快速、高通量的特点,样本预处理简单,结果稳定,这一点在本研究的结果中也得到了很好的体现。在基线信息分析中,我们发现两组人群在新鲜蔬菜、水果的摄入量方面表现出统计学差异,但由于本研究中发现的代谢组学差异物主要为氨基酸、脂质类物质,因此我们暂不考虑新鲜蔬菜水果摄入量的差异对代谢物的影响作用,在此仅讨论疾病与代谢物含量差异的相关性。

3.1 ESCC 组和 NC 组间差异代谢物的相关研究

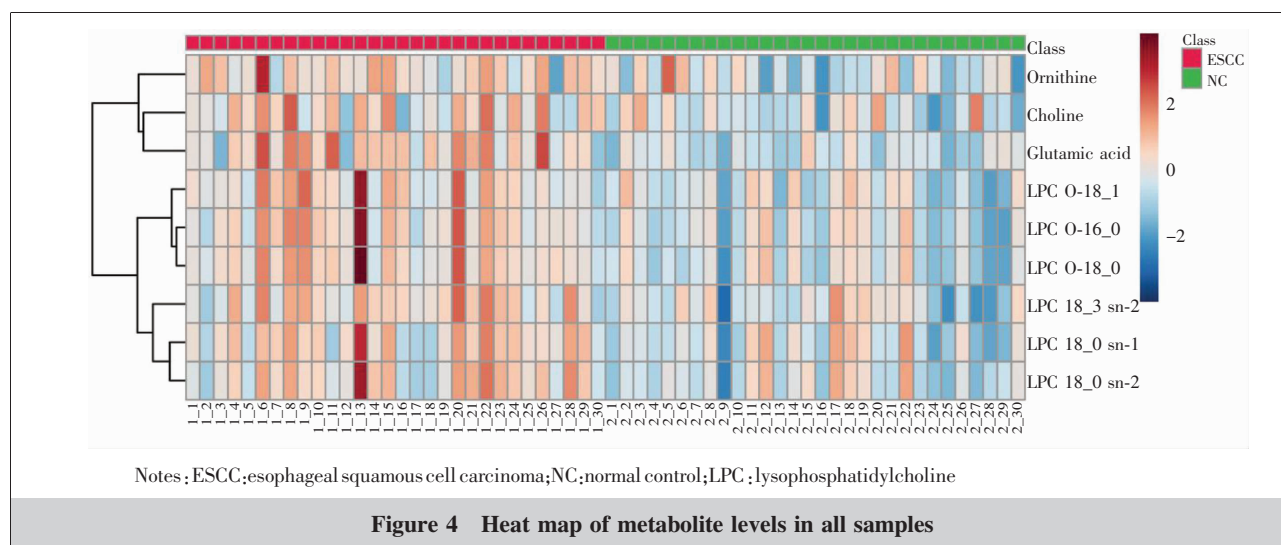
本研究结果显示,多种氨基酸以及脂质在 ESCC 组和 NC 组间存在含量差异,这可能提示 ESCC 患者发病前期即存在氨基酸代谢异常和脂质代谢异常。

胆碱可能是一种食管鳞癌的早期代谢标志物,

Zhu 等^[13]通过非靶向代谢组学发现,胆碱是与 ESCC 相关的代谢物,并使用验证集对这一结果进行了验证。Liu 等^[14]采用 ¹H-NMR 方法对 25 例早期 ESCC 患者和 40 名健康对照的血清分析,发现 ESCC 组较对照组胆碱含量上调。Ye 等^[15]使用食管癌患者和健康对照的食管组织进行 ¹H-NMR 代谢组学研究,也得到了相似的结果,他们进一步进行代谢网络的相关分析显示,食管癌患者体内血清乙酸水平的变化与 EC 组织中胆碱水平的变化呈正相关。乙酸盐可以作为合成乙酰辅 A 的前体,用于生物的脂质合成,某些脂质的合成可能和肿瘤细胞的细胞膜生成相关^[16]。

谷氨酸作为人体必需氨基酸,一方面通过产生 α-酮戊二酸进入三羧酸循环,为细胞提供能量;另一方面,参与柠檬酸合成、生成乙酰辅酶 A,促进脂质代谢,谷氨酸还能影响体内谷胱甘肽的合成,间接影响细胞氧化还原水平^[17]。一项研究表明,食管腺癌患者的食管组织较健康对照食管组织中谷氨酸含量升高^[18],这与本研究的研究结果一致。Yang 等^[19]的研究发现,食管癌患者体内与氨基酸代谢相关的通路异常活跃,并提示谷氨酸可能是一种与食管癌进展敏感的代谢标志。除食管病变外,胃癌患者的代谢谱也会显示谷氨酸表达增高^[20],推测谷氨酸表达上调与上消化道肿瘤均可能存在相关性。

鸟氨酸作为本研究中发现的一个差异代谢物,在 ESCC 组与 NC 组间比较时明显升高,在相关研究中,同样可以作为一种评估食管癌疗效和预后的标志代谢物^[19]。基于空间信息表征分析的食管癌代



谢组学研究提示我们,鸟氨酸水平升高的原因可能与鸟氨酸脱羧酶的表达相关^[21],其他研究也发现,对鸟氨酸脱羧酶的靶向抑制也可以局限 ESCC 的发展^[22-23]。此外,在多种癌症中都发现鸟氨酸脱羧酶的活性增强^[24-26]。

磷脂代谢是细胞中的一个重要的代谢通路,磷脂类物质与肿瘤细胞的细胞膜生成相关。溶血卵磷脂类物质是一个庞大的物质家族,以往研究中,对个别物质的报道较为局限,在某些脂质代谢组学的研究中^[27],食管癌患者体内 LPC16:0、LPC18:1 能特异性地区分食管癌组和正常对照组,研究人员将这一结果归因为溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶在磷脂代谢中发挥的作用。关于这类物质仍需要更多的研究。

近年来,我国学者也陆续开展了一些小型食管癌血标本代谢组学的横断面研究/病例对照研究。黄伟钊等^[28]基于 LC-MS 方法分析了 20 例 ESCC 患者与 20 名健康对照间的代谢差异,共筛选出包括肌苷、苯丙氨酸二肽在内的 6 种差异代谢标志物,经通路分析,推测嘌呤代谢途径异常是导致 ESCC 患者体内多种代谢物异常最可能的因素,该研究进一步分析认为,ESCC 患者体内存在能量过度消耗的情况。Zhang 等^[29]将新发 ESCC 患者,新发中、重度食管鳞状上皮异型增生患者和正常对照作为研究对象,采用基于 GC-MS 的代谢组学分析了血清代谢物,结果表明,与对照组相比,食管癌组的氨基酸总量增加,其中,丙酸、亚油酸、甘油-3-磷酸和谷氨酰胺这 4 种代谢物,可作为区分食管癌/增生组和对照组的联合标志物;次黄嘌呤、谷氨酸、天冬氨酸和 2-酮异己酸 4 种代谢物,可作为区分食管癌组和增生组的联合标志物。我们的研究结果表明,ESCC 组与 NC 组相比,脂蛋白 LPC O-18_0、谷氨酸等的含量显著上调。结合以上证据可以看出,食管癌患者的氨基酸代谢、糖代谢、脂质代谢等均发生了相应的异常改变,其中谷氨酸-谷氨酰胺代谢对于食管癌发生和进展尤为重要,可作为常见的食管癌代谢标志物之一。此外,谷氨酸-谷氨酰胺代谢不仅可以被视为食管癌发生的代谢标志物,还有研究证据表明其与食管癌的局部浸润、转移等术后生存情况有关^[30]。应进行进一步研究,来明确谷氨酸-谷氨酰胺代谢在食管癌发生发展中的作用。

3.2 本研究的优势及不足

本研究存在以下优势:(1)使用巢式病例对照研

究设计,研究对象同质性好,具有可比性,且很好地控制了研究成本。(2)研究基于 NIT 队列,队列人群稳定,依从性好,生活环境和生活方式在研究开展过程中未发生较大变异,因此本研究可以结合 NIT 队列研究开始时收集的生活方式信息对差异代谢物结果进行分析,避免了信息偏倚,同时减少了结果假阳性的可能。(3)本研究的血浆样本使用的抗凝剂为肝素而非柠檬酸钠等,避免了外源物质的污染。样本保存的血清库温度条件严格,保证了研究使用的冷冻血浆未出现较大的物质损失。与此同时,本研究具有一定的局限性,主要体现在纳入的样本数有限,这主要是因为本研究的性质为使用代谢组学对 ESCC 肿瘤标志物的一项探索性研究,研究者将在后续研究中加以补充。为了保证研究结果的稳健性,本研究在差异代谢物筛选时的标准比较严格,且由于样本数量的限制,故筛选出的差异代谢物较少。

综上所述,ESCC 患者发病前期和健康对照组间存在一定的代谢差异,ESCC 患者发病前期代谢即发生紊乱,导致某些物质含量异常,这些含量异常的物质可能帮助病变的食管上皮细胞逃避免疫清除,或者营造了有利于肿瘤细胞微环境,导致食管早期病变向 ESCC 方向的不可逆的发展。本研究筛选出的差异代谢物为 ESCC 肿瘤标志物的探索提供了一定线索,还需要相关生物学研究证实这些物质的稳健性。

参考文献:

- [1] Zheng R,Zhang S,Zeng H,et al. Cancer incidence and mortality in China,2016 [J]. J Natl Cancer Cent,2022,2(1):1-9.
- [2] 陈茹,郑荣寿,张思维,等. 2015 年中国食管癌发病和死亡情况分析[J]. 中华预防医学杂志,2019,53(11):1094-1097.
Chen R,Zheng RS,Zhang SW,et al. Analysis of incidence and mortality of esophageal cancer in China,2015[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine,2019,53(11):1094-1097.
- [3] 李贺,曹毛毛,孙殿钦,等. 中国 2 个城市和 2 个农村地区上消化道肿瘤高危人群分布及内镜筛查依从情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,2022,44(6):531-539.
Li H,Cao MM,Sun DQ,et al. A comparative analysis of the distribution of the high-risk population of upper gastrointestinal cancer and endoscopic screening compliance in two urban areas and two rural areas in China[J]. Chinese Journal of Oncology,2022,44(6):531-539.
- [4] Benaglia T,Sharples LD,Fitzgerald RC,et al. Health benefits and cost effectiveness of endoscopic and nonendoscopic cytosponge screening for Barrett's esophagus [J].

- Gastroenterology, 2013, 144(1):62–73.
- [5] Heberle CR, Omidvari AH, Ali A, et al. Cost effectiveness of screening patients with gastroesophageal reflux disease for Barrett's esophagus with a minimally invasive cell sampling device[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2017, 15(9): 1397–1404.
 - [6] 王华光, 刘心娟, 雷圆圆, 等. 食管癌相关生物标志物的代谢组学研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, 29(14): 1080–1086.
Wang HG, Liu XJ, Lei YY, et al. Research progress in metabonomics of biomarkers related to esophageal cancer [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2022, 29(14): 1080–1086.
 - [7] 赫捷, 陈万青, 李兆申, 等. 中国食管癌筛查与早诊早治指南(2022, 北京)[J]. 中国肿瘤, 2022, 31(6):401–436.
He J, Chen WQ, Li ZS, et al. China guideline for the screening, early detection and early treatment of esophageal cancer(2022, Beijing)[J]. China Cancer, 2022, 31(6):401–436.
 - [8] 王晓坤, 杨欢, 范金虎, 等. 代谢组学在食管癌早期诊断与应用中的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2022, 31(10):803–808.
Wang XK, Yang H, Fan JH, et al. Progress of metabolomics in the early diagnosis and application of esophageal cancer[J]. China Cancer, 2022, 31(10):803–808.
 - [9] Hosios AM, Manning BD. Cancer signaling drives cancer metabolism: AKT and the Warburg effect [J]. Cancer Res, 2021, 81(19):4896–4898.
 - [10] Bonifácio VDB. Ovarian cancer biomarkers: moving forward in early detection [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1219: 355–363.
 - [11] De Matteis S, Bonafè M, Giudetti AM. Urinary metabolic biomarkers in cancer patients: an overview [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2292:203–212.
 - [12] Gashimova E, Osipova A, Temerdashev A, et al. Exhaled breath analysis using GC-MS and an electronic nose for lung cancer diagnostics [J]. Anal Methods, 2021, 13(40): 4793–4804.
 - [13] Zhu ZJ, Qi Z, Zhang J, et al. Untargeted metabolomics analysis of esophageal squamous cell carcinoma discovers dysregulated metabolic pathways and potential diagnostic biomarkers[J]. J Cancer, 2020, 11(13):3944–3954.
 - [14] Liu YY, Yang ZX, Ma LM, et al. ¹H-NMR spectroscopy identifies potential biomarkers in serum metabolomic signatures for early stage esophageal squamous cell carcinoma[J]. Peer J, 2019, 7:e8151.
 - [15] Ye W, Lin Y, Bezabeh T, et al. ¹H NMR-based metabolomics of paired esophageal tumor tissues and serum samples identifies specific serum biomarkers for esophageal cancer [J]. NMR Biomed, 2021, 34(6):e4505.
 - [16] Schuster DM, Nanni C, Fanti S. PET tracers beyond FDG in prostate cancer[J]. Semin Nucl Med, 2016, 46(6):507–521.
 - [17] 张自辉, 洪莉. 谷氨酰胺代谢与卵巢癌相关研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2022, 31(9):704–707.
Zhang ZH, Hong L. Advances in glutamine metabolism and ovarian cancer-related research [J]. Prog Obstet Gynecol, 2022, 31(9):704–707.
 - [18] Huang S, Guo Y, Li Z, et al. A systematic review of metabolomic profiling of gastric cancer and esophageal cancer[J]. Cancer Biol Med, 2020, 17(1):181–198.
 - [19] Yang XL, Wang P, Ye H, et al. Untargeted serum metabolomics reveals potential biomarkers and metabolic pathways associated with esophageal cancer[J]. Front Oncol, 2022, 12:938234.
 - [20] Liang JH, Lin Y, Ouyang T, et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics and metabolic pathway networks from patient-matched esophageal carcinoma, adjacent noncancerous tissues and urine[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(25):3218–3230.
 - [21] Sun C, Li T, Song X, et al. Spatially resolved metabolomics to discover tumor-associated metabolic alterations [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(1):52–57.
 - [22] He W, Roh E, Yao K, et al. Targeting ornithine decarboxylase(ODC) inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression[J]. NPJ Precis Oncol, 2017, 1(1):13.
 - [23] Xie Y, Dong CD, Wu Q, et al. Ornithine decarboxylase inhibition downregulates multiple pathways involved in the formation of precancerous lesions of esophageal squamous cell cancer[J]. Mol Carcinog, 2020, 59(2):215–226.
 - [24] Samoylenko O, Stakhovsky EO, Vitruk YV, et al. Ornithine decarboxylase activity in prostate cancer [J]. Exp Oncol, 2021, 43(1):46–51.
 - [25] Miller AK, Tavera G, Dominguez RL, et al. Ornithine decarboxylase(ODC1) gene variant(rs2302615) is associated with gastric cancer independently of helicobacter pylori CagA serostatus[J]. Oncogene, 2021, 40(40):5963–5969.
 - [26] Ma H, Li Q, Wang J, et al. Dual inhibition of ornithine decarboxylase and adenosine receptor efficiently suppresses breast tumor cells[J]. Front Oncol, 2021, 11:636373.
 - [27] Yang T, Hui R, Nouws J, et al. Untargeted metabolomics analysis of esophageal squamous cell cancer progression [J]. J Transl Med, 2022, 20(1):127.
 - [28] 黄伟钊, 张晶晶, 杨弘, 等. 基于代谢组学的食管鳞癌代谢特征与临床意义研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2021, 42(3):468–474.
Huang WZ, Zhang JJ, Yang H, et al. Metabonomics-based study of metabolic characteristics and clinical significance for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Sun Yat-Sen University(Medical Sciences), 2021, 42(3):468–474.
 - [29] Zhang S, Lu X, Hu C, et al. Serum metabolomics for biomarker screening of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal squamous dysplasia using gas chromatography-mass spectrometry [J]. ACS Omega, 2020, 5(41):26402–26412.
 - [30] Zhang H, Wang L, Hou Z, et al. Metabolomic profiling reveals potential biomarkers in esophageal cancer progression using liquid chromatography-mass spectrometry platform[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(1): 119–125.