

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.17.001

· 基础研究 ·

基于 UPLC-QTOF/MS 的胆囊癌血清非靶向代谢组学研究 *

袁道伟¹ 韩 骏^{1,2} 韩敏露¹ 刘武伟¹ 谢 璞^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200021; 2 中国人民解放军海军军医大学东方肝胆医院肝胆外科 上海 200433)

摘要 目的: 胆囊癌(Gallbladder carcinoma, GBC)是一种常见的胆道系统恶性肿瘤, 五年生存率极低, 目前临床上缺少有效的诊断标志物。故本研究探索胆囊癌患者与健康人血清的差异性小分子代谢物, 用于胆囊癌的定性诊断。方法: 本研究以超高效液相色谱联用四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF/MS)技术为平台, 以 32 例胆囊癌患者和 32 例健康人血清为研究对象, 进行非靶向代谢组学研究分析, 用 SIMCA-P 软件进行 PCA 和 OPLS-DA 建模分析, 结合 T 检验结果和代谢物在两组中的差异倍数来筛选潜在小分子代谢标志物, 并通过二元逻辑回归分析建立联合诊断模型。结果: 溶血磷脂酰胆碱(18:1)(LysoPC(18:1))和十八烷胺(Octadecylamine, ODA)两个代谢物在胆囊癌患者和健康对照组血清中具有显著性差异, 差异倍数达到 2 倍以上。经过二元逻辑回归分析建立诊断模型, 两者构建联合诊断的诊断模型为 $\text{Logit}[P=\text{GBC}]=26.090*[\text{LysoPC}(18:1)]-8.877*[\text{ODA}]-113.075$, 据此建立受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)曲线, 曲线下面积(Area under the curve, AUC)为 0.986, 灵敏度为 97.1%, 特异性为 94.6%。结论: LysoPC(18:1)和 ODA 可作为胆囊癌的潜在诊断标志物, 为胆囊癌的诊断提供参考。

关键词: 胆囊癌; 代谢组学; 标志物**中图分类号:** R-33; R735.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)17-3201-06

UPLC-QTOF/MS Based Serum Untargeted Metabolomics Study of Gallbladder Carcinoma*

YUAN Dao-yi¹, HAN Jun^{1,2}, HAN Min-lu¹, LIU Wu-wei¹, XIE Ying^{1Δ}

(1 Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200021, China;

2 Department of Hepatobiliary Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: Gallbladder carcinoma (GBC) is a common malignancy of the biliary tract system, with a poor five-year survival rate and for lack of effective diagnostic biomarkers. Thus the aim of this study is to explore the different small metabolites in serum of GBC patients and healthy subjects. **Methods:** Based on the Ultra-performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) technique, serum untargeted metabolomics studies of 32 GBC patients and 32 healthy controls were developed. Potential biomarkers were screened by PCA and OPLS-DA analysis using SIMCA-P software, followed by t-test and fold change analysis. Then a diagnostic model was established. **Results:** The levels of LysoPC (18:1) and Octadecylamine (ODA) in GBC patients serum had changed (>2-fold change). A diagnostic panel based on these two metabolites for the detection of GBC was constructed as follows: $\text{Logit}[P=\text{GBC}]=26.090*[\text{LysoPC}(18:1)]-8.877*[\text{ODA}]-113.075$. The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of a combination of LysoPC (18:1) and ODA was then conducted. Outstanding discrimination has been achieved with area under the curve (AUC) of 0.986, sensitivity of 97.1% and specificity of 94.6%. **Conclusions:** LysoPC (18:1) and ODA can be used for discrimination between GBC patients and healthy subjects.

Key words: Gallbladder Carcinoma; Metabolomics; Biomarker**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R735.8 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2020)17-3201-06

前言

胆囊癌是一种常见的胆道系统恶性肿瘤, 五年生存率不到 5%^[1]。目前, 胆囊癌的诊断方式主要包括影像学诊断超声、CT

* 基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1309701); 国家十三五科技重大专项(2017ZX09304016);

十三五新药创制重大专项(2018ZX09734005)

作者简介: 袁道伟(1995-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 药物分析与代谢组学, E-mail: yuandaoyi@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者: 谢璞(1982-), 女, 硕士生导师, 副研究员, 主要研究方向: 药物分析与代谢组学,

E-mail: xyshirley@msn.com 或 xyshirley@sjtu.edu.cn, 电话: 13916719113

(收稿日期: 2020-02-27 接受日期: 2020-03-23)

和核磁^[2,3]等,以及血清肿瘤标志物 CEA 和 CA199^[4,5]等。由于胆囊的位置在肝脏的后面^[6],影像学诊断效果不佳,而已知的肿瘤标志物也缺乏特异性,故急需探索新的胆囊癌血清诊断标志物。代谢组学通过对细胞、组织和体液等中的小分子代谢物做全面的分析,从而探究生物体的代谢扰动以及研究生物标志物^[7,8]。目前,利用代谢组学进行肿瘤标志物的探索已经有了较多的研究。Jun Zeng^[9]等利用 CE-MS 平台发现色氨酸,谷氨酰胺和 2-羟基丁酸在肝癌和健康人群中有显著差异。许国旺^[10]等利用 LC-MS 在肝癌血清中发现苯丙氨酰色氨酸和胆酸可作为潜在的诊断标志物区分肝癌和肝癌高危人群(肝硬化、肝炎等)。胡雪芳^[11]等利用 ¹H-NMR 技术发现 α -葡萄糖、 β -葡萄糖和肌酸酐可以作为区分健康对照人群与肝癌患者的潜在标志代谢物。但是,对于肝胆系统而言,研究多集中于肝癌,而对于胆囊癌的潜在标志代谢物却少有研究。故本研究以胆囊癌患者的和健康志愿者的血清为样本,以 LC-MS 为技术手段,探究胆囊癌的潜在的代谢标志物,为胆囊癌的诊断以及治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

四级杆高分辨飞行时间质谱仪 (Triple TOF 5600+, Sciex, USA);配有电喷雾离子化(Electron Spray Ionization, ESI)和大气压化学离子化(Atmospheric-pressure Chemical Ionization, AP-Cl)离子源;超高效液相色谱仪(Nexera X2 UPLC System, Shimadzu, Japan);

同位素内标 Cholic-2,2,4,4-d₄ acid (CHO-d₄)、Acetyl-d₃-L-carnitine Hydrochloride (ACE-d₃)、1-nonadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine, chloroform (LPC19:0)、L-Tryptophan-d₅ (Trp-d₅) 和 L-Phenylalanine-d₂ (Phe-d₂)均购自美国 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 公司;色谱级甲酸(formic acid, FA)购自美国 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 公司,甲醇(Methanol, MeOH)和乙腈(Acetonitrile, ACN)购自 MERCK (Darmstadt, Germany)公司,超纯水产自 Milli-Q 纯水系统(Millipore, Bedford, MA, USA)

1.2 临床样本

临床样本来自于上海市东方肝胆医院,所有患者均签署过知情同意书,整个血清样本采集过程均符合伦理学规定。一共 64 例样本,包括 32 例胆囊癌患者和 32 例健康人。

1.3 实验方法

1.3.1 样本处理 血清样本置于冰上融化后,取 100 μ L 血清于 Ep 管中,加入 20 μ L 内标(100 nM CHO-d₄、50 nM LPC19:0 和 200 μ M Phe-d₂ 等量混合),加入 400 μ L 乙腈沉淀蛋白。涡旋 10 分钟,在冰上孵育 10 分钟然后离心。离心条件为 13000 rpm,4 $^{\circ}$ C,10 min。取出上清液真空挥干后用 50%甲醇复溶,同样条件离心取上清液进样,进样量为 5 μ L。质控(quality control, QC)样本为所有血清样本混合后取 100 μ L,按照上述方法同样处理。

1.3.2 数据采集 以 Triple TOF 5600+ 配合 ESI 源, Waters ACQUITY HSS T3 column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m)为色谱柱在正离子模式下进行数据采集。A 相为水相(0.1%甲酸),B 相为甲醇。色谱梯度如下所示:0-2 min, 0.1%B; 2-12 min, 0.1%

B-75% B; 12-24 min, 75% B-100% B; 24-30 min, 100% B; 30-30.5, 100%B-0.1%; 34 min, 停止。柱温箱温度为 40 $^{\circ}$ C, 流速 0.35 mL/min。质谱参数为雾化气 (GS1): 45 psi; 辅助加热气 (GS2): 45 psi; 气帘气 (CUR): 35 psi; 温度 (TEM): 550 $^{\circ}$ C; 毛细管电压 (IS): 4500 V; 分布电位 (DP): 70 V; 碰撞能量 (CE): 10 V。采用信息依赖性扫描 (IDA) 采集二级质谱。每 10 个样本采集一个 QC 样本用来评价数据稳定性。

1.4 数据分析

利用 MarkerView (AB SCIEX, USA) 进行一级质谱的提取,经数据校正和归一化后导入 SIMCA-P (14.0) 进行多维统计分析。建立非监督性的 PCA 模型和监督性的 OPLS-DA 模型,以 VIP (Variable importance in projection)>1 和 |Pcorr| (Pearson correlation)>0.52 为标准,筛选差异代谢物^[12]。VIP 越大,对模型的贡献率越高,一般以 VIP>1 为标准^[13]。|Pcorr| 越大,表明其作为差异代谢物的可能性越高,一般以 |Pcorr|>0.52 为标准。然后利用 SPSS (20.0) 进行 T 检验,筛选 $P<0.05$ 的代谢物。利用 PeakView (AB SCIEX, USA) 提取差异代谢物的二级碎片质谱并借助 HMDB (Human Metabolome Database) 和 METLIN (metlin.scripps.edu) 进行鉴定并验证。鉴定到的代谢物进行受试者工作特征曲线 (ROC) 分析,评价潜在差异代谢物的诊断可能性。

2 结果

2.1 胆囊癌患者和健康人血清的 TIC 图

基于 UPLC-QTOF-MS 平台所采集的总离子流 (TIC) 图如下所示,胆囊癌患者血清图谱和健康人明显不同。利用 MarkerView 一共提取到 711 个代谢物进行建模分析。

2.2 差异代谢物筛选

首先,通过非监督性的 PCA 分析评价仪器和方法的稳定性。在 PCA 图 (Fig. 2A) 中, $R^2X=0.623>0.4$, QC 聚集在一起,表明样本采集期间仪器稳定,方法稳定性和数据重现性较好,可进行下一步分析^[14]。同时,在 PCA 图中,胆囊癌患者血清组合健康人组已经呈现分开的趋势,表明两组的代谢轮廓存在差异,胆囊癌患者有区别于健康人组的代谢差异。随后,采用监督性的 OPLS-DA 分析,寻找这些潜在的差异代谢物。在 OPLS-DA 图 (Fig. 2B-C) 中,胆囊癌患者组和健康人组分离明显,且该模型的 $R^2X=0.464$, $R^2Y=0.975$, $Q^2=0.964$ 。表明该模型的预测概率高达 96.4%。同时,对该模型进行置换检验,200 次检验结果如图 (Fig. 2D) 所示, R^2 在 Y 轴的截距为 0.194, 其值小于 0.4; Q^2 在 Y 轴的截距为 -0.361, 其值小于 0, 表明该模型没有过拟合,可以据此进行差异代谢物的筛选。基于 VIP>1 和 |Pcorr|>0.52, 结合 T 检验 $P<0.05$, 筛选差异代谢物并进行鉴定。最终,一共筛选并鉴定到 13 个潜在的诊断代谢物,如表 1 所示。通过热图分析可视化各代谢物在胆囊癌血清和健康人血清中的相对水平,如图 3 所示。

2.3 ROC 诊断模型的建立

最终结合 VIP>1, |P (corr)|>0.52 和两组中差异倍数大于 2 的代谢物,筛选到油酸 (Oleic Acid), 溶血磷脂酰胆碱 (18:1) (LPC (18:1)) 和十八烷胺 (Octadecylamine, ODA) 三个差异代谢物可作为潜在的诊断标志物。对三个潜在的诊断标志物以三个

联合诊断或两个联合诊断进行二元逻辑回归分析,建立逻辑回归方程($P<0.05$),同时,建立 ROC 曲线,以曲线下面积(AUC)评价其诊断效能。结果表明 LysoPC(18:1)和 ODA 联合诊断时,具有最大的诊断效能且 $P<0.05$ 。LysoPC(18:1)和 ODA 建立的诊断模型为: $\text{Logit}[P=\text{GBC}]=26.090*[\text{LysoPC}(18:1)]-8.877*[\text{ODA}]-113.075$, $[P=\text{GBC}]$ 的分界值(cutoff)为 -0.33。在这个诊

断模型中, $[P=\text{GBC}]$ 为 GBC 诊断预测可能性, $[\text{LysoPC}(18:1)]$ 和 $[\text{ODA}]$ 为两个代谢物在血清中的水平。据此建立的联合诊断 ROC 曲线,如图 4 所示,曲线下面积 AUC 为 0.986,灵敏度为 97.1%,特异性为 94.6%。说明此代谢物组合具有良好的诊断效能, LysoPC(18:1)和 ODA 可作为 GBC 的潜在诊断标志物。

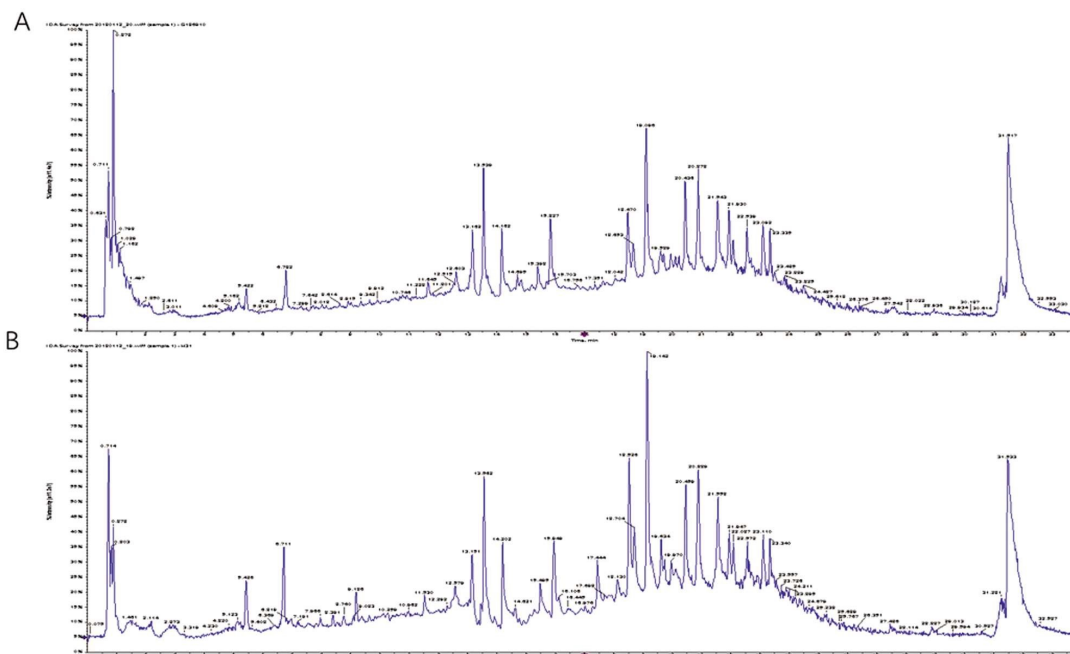


图1 A.胆囊癌患者(GBC)的总离子流图和 B.健康志愿者(H)的总离子流图

Fig.1 LC-MS total ion chromatography (TIC) of intracellular metabolites in GBC patients (A) and healthy controls (B)

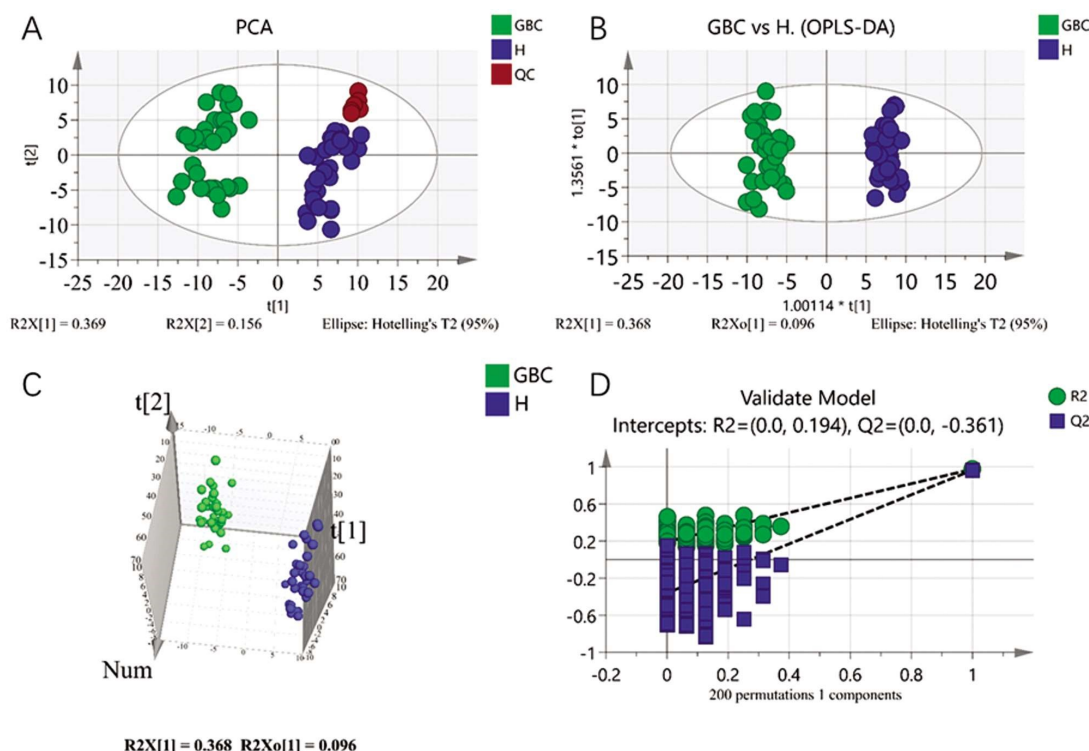


图2 胆囊癌患者(GBC)和健康志愿者(H)多维统计分析结果:A.GBC 和 H 的 PCA 图;B.GBC 和 H 的 OPLS-DA 平面散点图;C. GBC 和 H 的 OPLS-DA 模型 3D 图;D.OPLS-DA 模型置换检验结果图

Fig.2 Multivariate statistical analysis of GBC patients (GBC) and healthy controls (H). A. Score plot for PCA model of GBC and H. B. Score plot for OPLS-DA model of GBC and H. C. 3D Score plot for OPLS-DA model of GBC and H. D. Validation plot of PLS-DA model

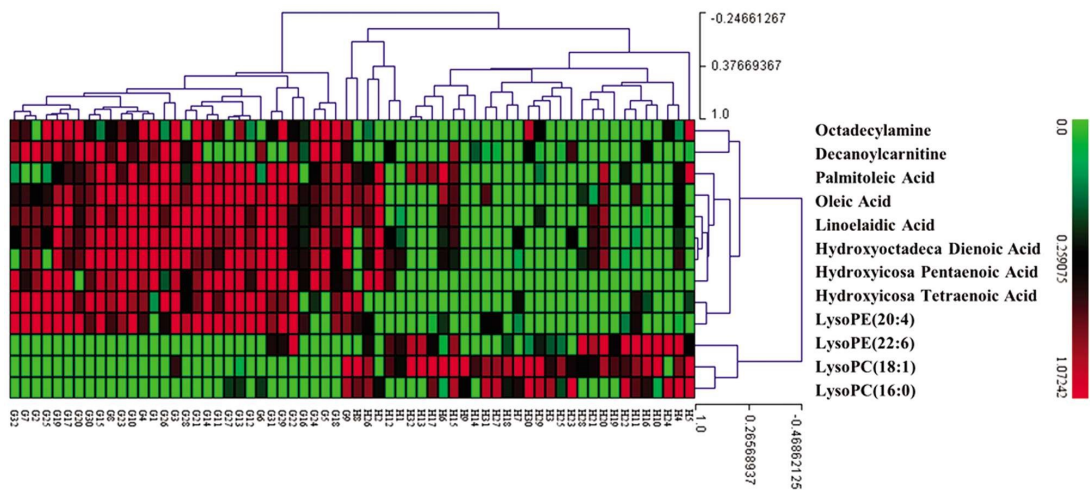


图3 胆囊癌患者(GBC)和健康志愿者(H)的差异代谢物的热图

Fig.3 Heat map of difference metabolites of GBC patients (GBC) and healthy controls(H)

表 1 区分胆囊癌(GBC)和健康人(H)的潜在的诊断标志物

Table 1 Potential diagnostic biomarkers between GBC patients (GBC) and healthy controls (H)

Metabolites	RT (time)	Fold Change (GBC/H)	VIP	P(corr)
Oleic Acid	22.1	2.33	1.46	0.73
LysoPC(18:1)	18.1	0.50	1.39	-0.84
Hydroxyicosa Tetraenoic Acid	21.9	1.88	1.27	0.74
Hydroxyicosa Pentaenoic Acid	21.4	1.65	1.26	0.66
Linoelaidic Acid	20.8	1.76	1.23	0.69
Hydroxyoctadeca Dienoic Acid	20.1	1.89	1.22	0.65
Octadecylamine	21.5	2.18	1.21	0.60
LysoPE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	18.6	1.66	1.1	0.74
Decanoylcarnitine	18.4	1.99	1.08	0.58
LysoPE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	18.6	1.71	1.05	0.65
LysoPC(16:0)	19.1	0.73	1.04	-0.76
Palmitoleic Acid	20.2	1.67	1.035	0.56
L-Phenylalanine	5.4	0.67	1.004	-0.77

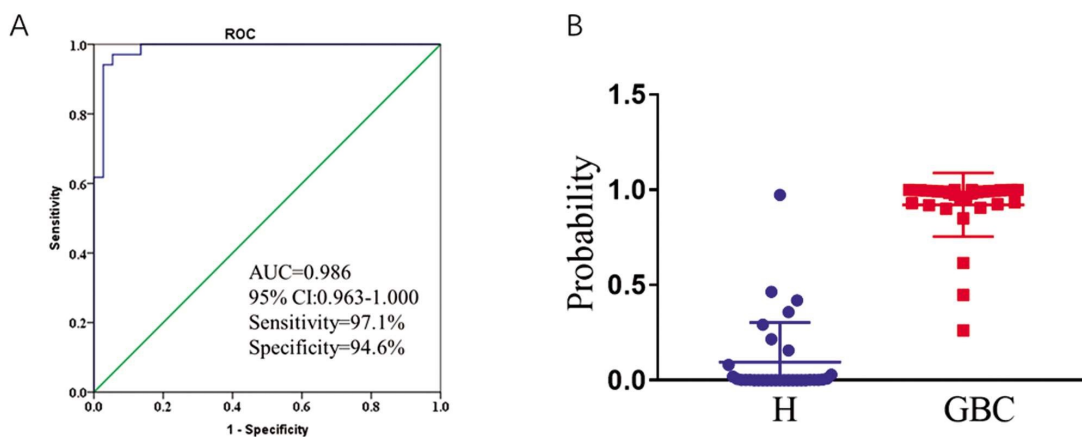


图4 LysoPC(18:1)和 Octadecylamine 联合诊断胆囊癌患者(GBC)和健康志愿者(H)的 ROC 曲线(A)以及基于该模型的诊断可能性图(B)

Fig.4 (A) ROC curve for combination of LysoPC(18:1) and Octadecylamine to diagnose GBC patients (GBC) from healthy controls (H). (B) The probability of discrimination between GBC patients (GBC) and healthy controls (H)

3 讨论

目前,对于胆囊癌诊断标志物的探究仍然是迫在眉睫的。我们急需利用新的技术手段寻找诊断标志物。代谢组学是系统生物学的分支,是继基因组学、转录组学和蛋白组学后的又一新的学科,是最接近表型的组学^[15]。代谢组学的一个研究重点就是发现与疾病和环境暴露相关的代谢物,从而为疾病的诊断和机制研究提供参考^[16,17]。代谢物的数量远远小于基因和蛋白的数量,这使得代谢组学的研究相对更为方便^[18]。目前代谢组学的技术手段包括气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[19]、液相色谱-质谱联用(LC-MS)^[20]、毛细管电泳-质谱联用(CE-MS)和核磁(NMR)^[21]等。其中,由于LC-MS具有高灵敏度、高选择性和良好的代谢物覆盖率高^[22]等特点,应用较为广泛,也是本研究的主要技术手段。近年来,肝胆系统中基于代谢组学研究的生物标志物的分析主要集中在肝癌的早期诊断,包括肝癌与肝硬化^[23]的区分以及肝癌与胆管癌的区分^[24]等等,胆囊癌的诊断标志物研究尚在空白阶段。所以,本研究首次通过对64例胆囊癌患者和健康对照组的血清的非靶向代谢组学分析,一共成功筛选并鉴定到13种差异代谢物。其中LysoPC(18:1)、油酸和ODA在GBC患者血清中变化最为显著。经过二元逻辑回归分析建立联合诊断模型,认为LysoPC(18:1)和ODA可作为胆囊癌的潜在诊断标志物。

由于胆囊癌起病隐匿,恶性程度高,目前,胆囊癌的诊断和治疗仍然存在极大困难。在2018年的癌症报告^[25]中,胆囊癌和胰腺癌是仅有的两个五年生存率没有升高的癌症,表明胆囊癌的诊断和治疗急需研究。临床上常用的GBC诊断标志物为CA199和CEA,在诊断胆囊癌时,CA199的准确率在70%左右,而CA199和CEA联合诊断时准确率也仅在80%左右^[4]。在本研究中,我们基于GBC患者血清和健康对照组的血清代谢组学分析,筛选得到多种差异代谢物后,利用二元逻辑回归分析建立诊断模型,得到LysoPC(18:1)和ODA的代谢物组合,该组合在联合诊断GBC时,ROC曲线的AUC达到0.986,表明其具有良好的诊断效能,诊断准确率远高于CA199和CEA,可为胆囊癌的诊断和治疗提供参考。

目前筛选到的13种差异代谢物主要与脂质代谢和氨基酸代谢有关。最终筛选到的两种潜在的诊断标志物与脂质代谢有关。脂质代谢与能量代谢、细胞信号传导和炎症有关^[26]。肿瘤细胞中通常伴随着脂质代谢紊乱。ODA属于脂肪胺类,主要存在于生物膜中,可能与信号传导有关。一些研究表明,烷基胺能阻断K⁺离子通道,且与烷基的长度有关^[27]。K⁺离子通道与肿瘤的生长和增殖关系密切^[28]。LysoPC属于溶血磷脂类,作用于溶血磷脂受体(LPL-R),在脂质代谢中具有重要作用,LPL-R是膜蛋白G蛋白偶联受体的一员^[29]。肿瘤细胞通常会提高从头合成脂肪酸的合成速率,以产生细胞膜磷脂和信号分子。在哺乳动物细胞中,磷脂酰胆碱(PC)是细胞膜的重要组成部分,而LysoPC具有膜溶解作用^[30]。在血液中,LysoPC的形成与卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT)的激活有关,在LCAT的作用下,血液中PC将脂肪酸给胆固醇,形成胆固醇酯和LysoPC^[31]。肿瘤细胞的快速增殖使得PC和LysoPC的消耗增加,血液中的LysoPC含量降低。先前也有许多研究表明LysoPC与癌症进程

可能有关^[32,33]。在本研究中,研究发现在胆囊癌中LysoPC(18:1)的水平降低和ODA的水平升高,可能与胆囊癌的进程相关,表明LysoPC(18:1)和ODA可以作为潜在标志物诊断胆囊癌。

本研究基于UPLC-QTOF-MS技术,以胆囊癌患者血清和健康对照组的血清为研究对象,探究胆囊癌的诊断标志物。结果表明LysoPC(18:1)和Octadecylamine联合诊断GBC时具有较好的诊断效果,其ROC曲线的AUC为0.986,灵敏度为97.1%,特异性为94.6%,诊断准确率高于CA199和CEA,可作为GBC的潜在诊断标志物,为胆囊癌的诊断和治疗提供参考。当然,本研究也存在一些局限性,该诊断标志物组合还需要多中心大样本的临床验证。

参考文献(References)

- [1] Rani Kanthan, Jenna-Lynn Senger, S hahid Ahmed, et al. Gallbladder Cancer in the 21st Century [J]. Journal of Oncology, 2015, 2015: 967472
- [2] Wernberg JA, Lucarelli DD. Gallbladder cancer [J]. The Surgical clinics of North America, 2014, 94(2): 343-360
- [3] Min su, You JKR, Young Hoon Choi, et al. Therapeutic outcomes and prognostic factors in unresectable gallbladder cancer treated with gemcitabine plus cisplatin[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 10
- [4] Wen ZJ, Si AF, Yang J, et al. Elevation of CA19-9 and CEA is associated with a poor prognosis in patients with resectable gallbladder carcinoma[J]. Hpb, 2017, 19(11): 951-956
- [5] Xu WY, Zhang HH, Yang XB, et al. Prognostic significance of combined preoperative fibrinogen and CA199 in gallbladder cancer patients[J]. World journal of gastroenterology, 2018, 24(13): 1451-1463
- [6] Baiu I, Visser B. Gallbladder Cancer[J]. JAMA, 2018, 320(12): 1294
- [7] Zhang A, Sun H, Yan G, et al. Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic [J]. BioMed research international, 2015, 2015: 354671
- [8] Kennedy AD, Wittmann BM, Evans AM, et al. Metabolomics in the clinic: A review of the shared and unique features of untargeted metabolomics for clinical research and clinical testing [J]. Mass Spectrom, 2018, 53(11): 1143-1154
- [9] Zeng J, Yin PY, Tan YX, et al. Metabolomics Study of Hepatocellular Carcinoma: Discovery and Validation of Serum Potential Biomarkers by Using Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry [J]. Journal of proteome research, 2014, 13(7): 3420-3431
- [10] Luo P, Yin PY, Hua R, et al. A Large-scale, multicenter serum metabolite biomarker identification study for the early detection of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2018, 67(2): 662-675
- [11] 胡雪芳, 王彦, 贾孟琪, 等. 基于¹H-NMR技术的肝癌尿液样品代谢组学研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(24): 4647-51
- [12] Souihi N, Lindegren A, Eriksson L, et al. OPLS in batch monitoring Opens up new opportunities [J]. Analytica chimica acta, 2015, 857: 28-38
- [13] Liu LL, Lin Y, Chen W, et al. Metabolite Profiles of the Cerebrospinal Fluid in Neurosyphilis Patients Determined by Untargeted Metabolomics Analysis[J]. Front Neurosci-Switz, 2019, 26(13): 150
- [14] Worley B, Powers R. PCA as a Practical Indicator of OPLS-DA Model Reliability[J]. Current Metabolomics, 2016, 4(2): 97-103
- [15] Guijas C, Montenegro-Burke JR, Warth B, et al. Metabolomics ac-

- tivity screening for identifying metabolites that modulate phenotype [J]. *Nature biotechnology*, 2018, 36(4): 316-320
- [16] Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives[J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2014, 87: 1-11
- [17] Rattray NJW, Deziel NC, Wallach JD, et al. Beyond genomics: understanding exposotypes through metabolomics [J]. *Hum Genomics*, 2018, 12(1): 4
- [18] Zhou B, Xiao JF, Tuli L, et al. LC-MS-based metabolomics [J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(2): 470-481
- [19] Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research [J]. *Metabolomics*, 2018, 14(11): 152
- [20] Yu M, Olkowitz M, Pawliszyn J. Structure/reaction directed analysis for LC-MS based untargeted analysis [J]. *Analytica chimica acta*, 2019, 1050: 16-24
- [21] Armitage EG, Ciborowski M. Applications of Metabolomics in Cancer Studies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 965: 209-234
- [22] Zeng Z, Liu X, Dai W, et al. Ion fusion of high-resolution LC-MS-based metabolomics data to discover more reliable biomarkers[J]. *Analytical chemistry*, 2014, 86(8): 3793-800
- [23] Wang W, Lv J, Chen N, et al. Dysregulated serum metabolites in staging of hepatocellular carcinoma [J]. *Clinical biochemistry*, 2018, 61: 7-11
- [24] Banales JM, Inarrairaegui M, Arbelaiz A, et al. Serum Metabolites as Diagnostic Biomarkers for Cholangiocarcinoma, Hepatocellular Carcinoma, and Primary Sclerosing Cholangitis[J]. *Hepatology*, 2019, 70(2): 547-562
- [25] Hongmei Zeng WC, Rongshou Zheng, Siwei Zhang, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15 a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6: e555-67
- [26] DeBose-Boyd RA. Significance and regulation of lipid metabolism [J]. *Seminars in cell & developmental biology*, 2018, 81: 97
- [27] Guo D, Ramu Y, Klem AM, et al. Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels [J]. *The Journal of general physiology*, 2003, 121(4): 261-275
- [28] Pardo LA, Stuhmer W. The roles of K(+) channels in cancer[J]. *Nature reviews Cancer*, 2014, 14(1): 39-48
- [29] Xu Y. Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1582(1-3): 81-88
- [30] Taylor LA, Arends J, Hodina AK, et al. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status [J]. *Lipids in health and disease*, 2007, 6: 17
- [31] Sekas G, Patton GM, Lincoln EC, et al. Origin of plasma lysophosphatidylcholine: evidence for direct hepatic secretion in the rat[J]. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 1985, 105(2): 190-194
- [32] Law SH, Chan ML, Marathe GK, et al. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases[J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(5): 1149
- [33] Del Boccio P, Perrotti F, Rossi C, et al. Serum lipidomic study reveals potential early biomarkers for predicting response to chemoradiation therapy in advanced rectal cancer: A pilot study[J]. *Advances in radiation oncology*, 2017, 2(2): 118-124

(上接第 3242 页)

- [18] 熊挺淋, 张丽莎, 刘涛, 等. 曲美他嗪对缺血性心脏病伴心力衰竭患者心功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(18): 4382-4384
- [19] 谭淑娜, 冯津萍, 冯超, 等. 曲美他嗪对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌自噬水平的影响[J]. *天津医药*, 2018, 46(2): 152-156, 108
- [20] 李琪琳, 胡元会, 霍艳明, 等. 曲美他嗪干预气虚血瘀证心衰大鼠心肌线粒体蛋白质组学研究 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2018, 20(11): 2001-2007
- [21] 张斌, 陈赛勇, 曲环, 等. 曲美他嗪对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(1): 43-44
- [22] Michels da Silva D, Langer H, Graf T. Inflammatory and Molecular Pathways in Heart Failure-Ischemia, HFpEF and Transthyretin Cardiac Amyloidosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 29(9): 2322-2324
- [23] Riehle C, Bauersachs J. Key inflammatory mechanisms underlying heart failure[J]. *Herz*, 2019, 44(2): 96-106
- [24] Wu Z, Zhao X, Miyamoto A, et al. Effects of steroidal saponins extract from *Ophiopogon japonicus* root ameliorates doxorubicin-induced chronic heart failure by inhibiting oxidative stress and inflammatory response[J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 176-183
- [25] Ayoub KF, Pothineni NVK, Rutland J, et al. Immunity, Inflammation, and Oxidative Stress in Heart Failure: Emerging Molecular Targets[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2017, 31(5): 593-608
- [26] Sties SW, Andreata LV, de Carvalho T, et al. Influence of exercise on oxidative stress in patients with heart failure[J]. *Heart Fail Rev*, 2018, 23(2): 225-235
- [27] 蔡娟, 高想, 张锋莉, 等. 曲美他嗪对心力衰竭大鼠的抗炎、抗氧化应激作用[J]. *交通医学*, 2013, 22(5): 454-456
- [28] 柴松波, 王振涛, 张淑娟, 等. 心衰康抑制慢性心衰大鼠心肌自噬及 MAPK/ERK1/2 信号通路 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(6): 981-987
- [29] Wang XT, Wu XD, Lu YX, et al. Egr-1 is involved in coronary microembolization-induced myocardial injury via Bim/Bcl-1 pathway-mediated autophagy inhibition and apoptosis activation [J]. *Ag-ing (Albany NY)*, 2018, 10(11): 3136-3147
- [30] Zhang J, He JF. LncRNA-MALAT1 influences myocardial infarction by regulating miR-30a/bcl-1 pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(2): 885-892