

质谱分析及其在肺癌分子标志物研究中的应用

陈立如^{1,2}, 徐建军¹, 魏益平¹

Progress in Mass Spectrometry and Its Application in Lung Cancer Biomarker Research

CHEN Liru^{1,2}, XU Jianjun¹, WEI Yiping¹

1. Nanchang University Department of Cardiothoracic Surgery of Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Jiangxi Provincial People's Hospital

Corresponding Author: XU Jianjun, E-mail: jianjun6307@163.com

Abstract: Ambient mass spectrometry (AMS) and mass spectrometry imaging (MSI) are two major progresses in mass spectrometry (MS) in recent years, with a wide range of applications in research of biological samples. Lung cancer is one of the most common malignancies in the world. Early screening and diagnosis are the most important ways to change the severe situation. This paper mainly summarizes the progress of mass spectrometry and its application in lung cancer biomarker research.

Key words: Mass spectrometry; Lung cancer; Biomarker

摘 要: 常压直接质谱分析技术和质谱成像技术是近年来质谱分析的重要进展, 它们在生物样品分析中具有广泛应用价值。肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 早期筛查和诊断是改善其临床诊治现状的重要途径。本文就质谱分析及其在肺癌分子标志物研究中的应用作一综述。

关键词: 质谱; 肺癌; 分子标志物

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

0 引言

质谱 (mass spectrometry, MS) 是一种通过检测待测物离子的特异质荷比来分析被测物质的方法, 具有敏感度高、特异性好、分析方式灵活等优点, 能够实现在体、实时、在线、高通量的测试和分析; 特别是近年来迅速发展的复杂基体的常压直接质谱分析技术 (ambient mass spectrometry, AMS) 和质谱成像技术 (mass spectrometry imaging, MSI), 使质谱的应用领域更加广泛^[1]。肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均居恶性肿瘤榜首^[2], 其主要原因在于临床诊治的患者大多数处在中晚期。而已有研究表明, I A期肺癌的五年生存率 (73%) 明显高于IV期 (13%)^[3]。因此, 很多旨在提高肺癌预后的研究都集中在肺癌的早期诊断

方面。然而, 低剂量计算机断层扫描 (LDCT)、痰液细胞学检查、支气管镜检查等用于肺癌筛查的临床试验结果显示肺癌的预后并没有得到改善^[4]。因此, 专注于肺癌分子标志物的研究备受关注。本文就质谱分析及其在肺癌分子标志物研究中的应用作一综述。

1 质谱分析技术

质谱分析技术体系主要由样品处理与离子源、质量分析器、离子检测器、数据处理与显示系统等部分组成, 是基于分子及亚分子水平的检测分析技术, 依赖于被测样品中物质分子的离子化而实现物质的检测, 可以获得被分析物的分子尺度信息, 在物质鉴定中具有独特的优势。自1906年Thomson发明质谱以来, 质谱分析技术得到了飞速的发展, 并取得了四次诺贝尔奖的荣誉。近年来, AMS和MSI是质谱分析技术迅速发展的两个重要方面, 它们在生物质谱分析中具有广阔的应用前景。

1.1 常压直接质谱分析技术 (AMS)

质谱分析技术依赖于离子的形成, 中性分子在转变成离子后才能被检测; 但不同物质分子

收稿日期: 2013-07-10; 修回日期: 2013-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160293); 国家重大科学仪器设备开发专项基金资助项目 (2011YQ170067)

作者单位: 1. 330006 南昌, 南昌大学 南昌大学第二附属医院心胸外科; 2. 江西省人民医院心胸外科

通信作者: 徐建军, E-mail: jianjun6307@163.com

作者简介: 陈立如 (1986-), 男, 硕士, 医师, 主要从事心胸外科围术期处理、质谱分析在肿瘤诊断中的应用研究

具有不同的化学性质,被电离形成离子的难易程度也不一;而且有些样品成分复杂多样,电离出目标分子也就需要质谱离子化技术达到更高的要求。然而,传统的离子化技术如电喷雾电离(ESI)、大气压化学电离(APCI)等都是封闭式电离源,被测样品往往需要封闭在一定的管道或真空环境中,而且被测样品需要经过复杂的预处理过程才能用于分析,导致分析效率低下。为了适应常压下复杂基体样品的质谱分析和提高质谱分析效率,AMS应运而生。

2004年Cooks教授研究组研发的电喷雾解吸电离(DESI)技术^[5],揭开了常压下无需样品预处理的AMS的序幕,促进了直接离子化技术的发展。在随后的数年间,各式各样的AMS离子源被研制出来,如电喷雾萃取电离(EESI)、表面解吸常压化学电离(DAPCI)、介质阻挡放电电离(DBDI)、低温等离子体(LTP)探针和电喷雾辅助激光解吸电离(ELDI)等^[6]。2007年Chen等^[7]首次提出中性解吸电喷雾萃取电离(ND-EESI)技术,可用于各种黏性样品(痰液、牙膏、化妆品、食用油等)以及固体表面等的直接分析。Hiraoka等^[8]采用探针电喷雾电离(PESI)技术直接分析生物样品,包括液态样品成分和湿润固体样品表面物质分析等。随着这些关键技术的发展,越来越多的复杂临床样品也可以通过质谱进行检测和研究。

然而,AMS在无需样品预处理的条件下直接分析各种复杂样品的同时也带来了复杂庞大的质谱数据。在这种情况下,很多时候无法再简单的凭观察、分析谱图来解析数据,往往需要更为复杂多元的数据处理策略,如主成分分析(PCA)、偏最小二乘(PLS)、人工神经网络(ANN)等分析方法。例如,Jia等^[9]应用PCA区分了不同肾结石样品的表面解吸化学电离质谱(DAPCI-MS)数据;Dill等^[10]采用PLS区分了11例肾癌患者的癌组织与癌旁组织的电喷雾解吸电离质谱(DESI-MS)数据,并将乳头状肾癌和透明细胞肾癌区分开。可以说,数据分析是AMS发展的重要基础之一。

1.2 质谱成像技术(MSI)

MSI是根据特定质荷比的物质在样品中的分布或浓度差别而形成影像的一种分子成像技术,可以在不对待测物进行标记的情况下对被分析物最初的形态展现出该质荷比物质在被分析物中的空间分布特征。基于MALDI、ELDI和DESI等的MSI技术已成为脂类分布、药物代谢和肿瘤标

志物等领域的重要研究工具^[11]。其中,MALDI-MSI^[12-13]已用于组织切片中的蛋白、多肽、脂类、药物以及代谢物等的成像分析,是临床蛋白质组学,尤其是肿瘤蛋白质组学研究的重要分析工具。而随着直接离子化技术的发展,DESI-MSI^[14]、PESI-MSI^[15]等直接质谱分析技术也已应用于生物组织的成像分析。可以预见,MSI在肿瘤的标志物、分类、早期诊断及预后评价等研究中都将发挥重要作用。

除了AMS和MSI的迅速发展,质谱仪器也在不断的发展和改进,传统大型质谱仪的灵敏度、分辨率、分析速度等性能在不断提高^[16]。同时,为了避免传统质谱仪结构复杂、体积庞大、价格昂贵、不便携等诸多缺点,也有研究专注于研制体积小、质量轻、功耗低、便于携带、可以在现场进行原位无损检测的便携式质谱仪^[17-18]。

2 肺癌分子标志物的质谱分析研究

肺癌发生是多因素多步骤的发展过程,在发生细胞形态学改变(如异型细胞)前,已伴随着亚细胞层次的改变(如线粒体、溶酶体等),而在细胞和亚细胞层次改变之前发生的是分子水平的改变。这些改变可以表现为呼出气体、痰液、肺组织、血液等的成分变化。质谱分析具有灵敏度高等特点,可用于检测肺癌相关样品中的代谢变化,已有不少学者将质谱分析用于肺癌的分子标记物的研究。以下就呼出气体、痰液、肺组织及血清等样品中肺癌分子标志物的质谱分析展开讨论。

2.1 呼出气体

人呼出气体含有水、二氧化碳、氮气、氧气、惰性气体及痕量的挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)等;其中VOCs的种类多达200多种,可由体内细胞生化反应产生,也可自外界环境经肺和皮肤吸收入体内^[19]。呼出气体中有多种VOCs可被检测,包括饱和和不饱和的碳氢化合物、含氧、含硫和含氮的有机化合物等,而且在不同生理、病理状态下可有特征性的VOCs^[19]。因此,检测VOCs可为追踪体内的代谢变化提供一个窗口,肺癌呼出气体标志物研究或可为肺癌无创、快速诊断及发病机制等研究提供新的思路。

气相色谱质谱联用法(GCMS)是目前用于呼出气体研究的主要质谱分析方法,可以检测分析呼出气体中痕量的VOCs。1985年Gordon等^[20]

采用一套特制的气体收集装置收集呼出气体,利用GCMS检测12例肺癌患者和17例健康者的呼出气体,确定了28种肺癌患者呼吸气体中的特征性VOCs,首次提出将呼出气体中VOCs的检测用于肺癌诊断。Wang等^[21]利用固相微萃取与GCMS联用分析了88例肺癌患者的呼出气体,同时采用线性判别建立肺癌诊断模型,最后发现利用23种VOCs建立的肺癌诊断模型可以达到96.47%的敏感度和97.47%的特异性,但该诊断模型不能明显区分早期和晚期肺癌。Montuschi等^[22]利用GCMS结合模式识别算法设计出一种手持便携式的“电子鼻”,用于快速检测哮喘、慢性阻塞性肺疾病和肺癌等呼吸系统疾病的“呼气纹”(breathprints)。但由于这些研究样本量过小,GCMS还没有成为肺癌的临床诊断方法。除了GCMS外,其他质谱方法也可用于呼出气体的分析,Rutter等^[23]报道采用选择离子流动管质谱(SIFT-MS)检测到肺癌患者的呼出气体中乙醛含量升高,Ding等^[24]利用EESI-MS对人体呼出气体进行了实时活体分析。但这些方法均没有深入探讨VOCs的产生机制,它们的效果仍需要更多的研究来证实。

2.2 痰液

痰液是气管、支气管、肺泡所产生的分泌物,含有中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸细胞等炎性细胞,坏死上皮碎片以及白蛋白、Na⁺等分子或离子成分。不同疾病状态下痰液可发生相应的变化,在细胞种类、代谢成分以及黏稠度等方面均发生改变,如肺炎患者痰液可变黄浓而黏稠,肺癌患者痰液中可在显微镜下观察到异型细胞等。因此,痰液含有丰富的病理生理信息,可作为肺癌和其他肺病患者特有的样品。然而,正常情况下,痰液的分泌量很少,而且容易受唾液的污染或口咽疾病的影响。因而痰液标本的收集是影响肺癌痰液标志物研究的关键技术之一。目前普遍应用的是诱导痰技术^[25],该技术的患者依从性好、无创、安全、可靠、具可重复性,能够保证在痰液量较少的情况下仍能获得足量、合格的痰液样本。

目前痰液的质谱检测分析报道较少,且主要是GCMS用于检测分析肺结核患者痰液的,肺癌患者痰液的质谱研究则报道更少。Xiao等^[26]利用二维凝胶电泳与质谱联用分析了72例肺癌患者和16例正常人的痰液,发现肺癌患者痰液中存在特异性的蛋白质表达。本课题组前期研究^[27]对常压直接质谱分析技术在肺癌患者痰液分析中的应用

进行了探索。在研究中我们利用自主研制的ND-EESI-MS对8例非小细胞肺癌患者和8例非肺癌患者的痰液样品进行了快速质谱分析,质谱数据采用主成分分析(PCA)方法分析,发现非小细胞肺癌组与非肺癌患者组的痰液质谱数据能够将两组患者较好地地区分开,并且两组样品的质谱指纹图在质荷比为78、87、99、118、362、367、539等峰的相对丰度均有明显差异。由此可见,质谱分析技术对痰液快速、无创诊断肺癌具有潜在的应用价值。但该研究纳入的样品数过小,而且没有深入研究这些差异的质谱峰的具体物质及产生机制,质谱分析技术用于痰液肺癌标志物研究仍需要更多的探索。

2.3 肺组织

肺癌组织是病理生理信息最为丰富的肺癌研究材料,理论上肺癌引起的分子、细胞及组织的改变最早见于肺组织内,各种肺癌标志物在体内的分布也以肺癌组织中含量最高。关于肺癌组织中的肺癌标志物的研究报道也相对较多,如肺癌组织中微小核糖核酸(Micro-RNA)、蛋白表达、启动子甲基化等^[4]。自从生物质谱发展以来,质谱分析技术就已用于肺癌组织的标志物研究,并随着质谱方法的改进而不断发展。早期的组织标志物质谱研究多需要其他样品处理技术与质谱分析技术联用,如色谱、电泳、萃取等样品分离和提纯技术。Oh等^[28]报道他们利用二维凝胶电泳-质谱联用技术建立了1 000余例肺癌组织蛋白表达数据库,并尝试用这种方式建立全新的肺癌分类方式及早期诊断方法。Rahman等^[29]采用MALDI-TOF MS分析了来自53名肺癌患者的25例正常肺组织、29例支气管上皮组织、20例癌前病变组织和36例侵袭性肺癌组织,发现这些病变有特定的蛋白表达模式,并且该模式能够以90%准确度区分正常肺、癌前病变肺和侵袭性肺癌组织。

近年来,随着质谱分析技术及其联用技术如电泳、色谱、萃取等技术的发展,肺癌组织标志物的质谱研究也在不断地改进,有研究者将这些技术与分子生物学技术如免疫蛋白印记(Western blot)、PCR分析等联用。Li等^[30]将二维聚丙烯酰胺凝胶电泳、Image Master 2D Platinum软件与MALDI-TOF MS联用于分析肺癌组织和癌旁组织的膜蛋白表达差异,发现12种蛋白质在癌组织中表达上调,7种蛋白在癌组织中表达下调;其中,各有一种上调和下调的蛋白质通过Western blot和PCR技术得到了印证。除了蛋白表达谱的差

异外,也有质谱研究发现脂质代谢也在肺癌组织中表现出明显的差异。Lee等^[31]采用MALDI-MS技术分析了21例非小细胞肺癌患者的肺癌组织和癌旁正常肺组织,发现卵磷脂(PC34:1)在肺癌组织中过表达,而且肺鳞癌和肺腺癌存在不同的磷脂质表达谱;他们还将这些研究结果与病理切片进行对比,发现磷脂质表达谱能够达到92.9%准确度。

2.4 血清

肿瘤细胞分泌的特异性物质可以通过各种方式进入血液循环,进而通过血液分析可达到指导肿瘤诊断的目的,这种血液中的特异物质便是肿瘤的血液标志物,如甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)等。肺癌已有多项血液标志物得到了广泛的研究,包括CEA、糖类抗原-125(CA125)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)等^[32]。这些肺癌标志物对肺癌的临床诊断、病情进展、治疗方案、疗效及预后判定等方面均有重要的指导意义。然而,这些标志物在特异度和灵敏度方面仍然不能让人满意,且它们往往在晚期肺癌患者的血液才得以检出,故并不适于肺癌的早期诊断和筛查。

血液作为一种相对易于获得的样品,较早用于肺癌标志物的质谱分析研究中。Huang等^[33]利用液相色谱-串联质谱联用技术对比分析37例非小细胞肺癌患者放化疗前后的血清蛋白表达情况,并根据放化疗敏感性将患者分为两组,发现 α -抗胰蛋白酶等蛋白在放化疗敏感组和抵抗组间的表达存在明显差异($P<0.05$),说明通过质谱蛋白组学方法或可找到判定放化疗预后的肺癌标志物。Guo等^[34]采用傅立叶离子回旋共振质谱分析技术分析58例肺癌患者和495例健康人的血清,质谱数据采用单因素和偏最小二乘分析,发现有多达141种血液代谢物在肺癌患者和正常人间存在显著差别,并且得到的结果显示鞘磷脂、溶血卵磷脂等脂质衍生物与肺癌的进展有关联。由此可见,肺癌患者血清中存在与肺癌发生、发展相关的代谢改变,通过质谱方法可检测和分析这些代谢改变,对血液中肺癌分子标志物研究及肺癌发病机制、早期诊断等研究具有重要意义。

3 小结与展望

质谱分析技术是发展非常迅速的现代分析测试方法,具有高的敏感度和特异性,可与不同的样品分离纯化技术联用,也可利用各种直接离子化源进行测试分析,还可在线、离体或原位、高通量检测分析各种状态的样品。肺癌是最常见的

恶性肿瘤之一,其临床诊治现状不容乐观,可通过早期诊断、早期治疗和提高临床治疗手段等改善这一现状。多个临床试验研究显示低剂量CT、痰液细胞学检查等没有提高肺癌的预后,因而探索肺癌的分子标志物具有非常重要的意义。质谱分析在肺癌分子标志物研究方面具有广泛应用,可分析包括肺组织、痰液、呼出气体、血清等不同状态的样品,其研究成果可为改善肺癌的诊治现状提供重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Chen HW, Hu B, Zhang X. Fundamental principles and practical applications of ambient ionization mass spectrometry for direct analysis of complex samples[J]. Fen Xi Hua Xue, 2010, 38(8): 1069-88. [陈焕文, 胡斌, 张曼. 复杂样品质谱分析技术的原理与应用[J]. 分析化学, 2010, 38(8): 1069-88.]
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [3] Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system[J]. Chest J, 2009, 136(1): 260-71.
- [4] Van't Westeinde SC, van Klaveren RJ. Screening and early detection of lung cancer[J]. Cancer J, 2011, 17(1): 3-10.
- [5] Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization[J]. Science, 2004, 306(5695): 471-3.
- [6] Jia B, Zhang XL, Ding JH, et al. Principle and applications of extractive electrospray ionization mass spectrometry [J]. Ke Xue Tong Bao, 2012, 57(20): 1918-27. [贾滨, 张兴磊, 丁健桦, 等. 电喷雾萃取电离质谱技术及其应用进展[J]. 科学通报, 2012, 57(20): 1918-27.]
- [7] Chen H, Yang S, Wortmann A, et al. Neutral desorption sampling of living objects for rapid analysis by extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46(40): 7591-4.
- [8] Hiraoka K, Nishidate K, Mori K, et al. Development of probe electrospray using a solid needle[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(18): 3139-44.
- [9] Jia B, Ouyang Y, Sodhi RN, et al. Differentiation of human kidney stones induced by melamine and uric acid using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2011, 46(3): 313-9.
- [10] Dill AL, Eberlin LS, Zheng C, et al. Multivariate statistical differentiation of renal cell carcinomas based on lipidomic analysis by ambient ionization imaging mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 398(7-8): 2969-78.
- [11] Xiong XC, Fang X, Ouyang Z, et al. A new software for reconstituting mass spectra imaging data[J]. Zhi Pu Xue Bao, 2011, 32(3): 181-4. [熊行创, 方向, 欧阳证, 等. 质谱成像数据图像重构软件[J]. 质谱学报, 2011, 32(3): 181-4.]
- [12] Lagarrigue M, Lavigne R, Guével B, et al. Matrix-assisted laser

- desorption/ionization imaging mass spectrometry: a promising technique for reproductive research[J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(3):74.
- [13] Yang F, Yuan J, Zheng JJ, *et al.* Advances of imaging mass spectrometry based on MALDI-TOF[J]. *Fen Xi Yi Qi*, 2010, 3:1-7. [杨帆, 原剑, 郑俊杰, 等. MALDI-TOF 生物质谱成像技术的进展[J]. *分析仪器*, 2010, 3:1-7.]
- [14] Masterson TA, Dill AL, Eberlin LS, *et al.* Distinctive glycerophospholipid profiles of human seminoma and adjacent normal tissues by desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, 22(8):1326-33.
- [15] Chen LC, Yoshimura K, Yu Z, *et al.* Ambient imaging mass spectrometry by electrospray ionization using solid needle as sampling probe[J]. *Mass Spectrom*, 2009, 44(10):1469-77.
- [16] Harris GA, Galhena AS, Fernández FM. Ambient sampling/ionization mass spectrometry: applications and current trends[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(12):4508-38.
- [17] Xu W, Manicke NE, Cooks GR, *et al.* Miniaturization of mass spectrometry analysis systems[J]. *JALA Charlottesville Va*, 2010, 15(6):433-9.
- [18] Riedo A, Bieler A, Neuland M, *et al.* Performance evaluation of a miniature laser ablation time-of-flight mass spectrometer designed for in situ investigations in planetary space research[J]. *J Mass Spectrom*, 2013, 48(1):1-15.
- [19] Mazzone PJ. Analysis of volatile organic compounds in the exhaled breath for the diagnosis of lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(7):774-80.
- [20] Gordon SM, Szidon JP, Krotoszynski BK, *et al.* Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer[J]. *Clin Chem*, 1985, 31(8):1278-82.
- [21] Wang Y, Hu Y, Wang D, *et al.* The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines[J]. *Cancer Biomark*, 2012, 11(4):129-37.
- [22] Montuschi P, Mores N, Trové A, *et al.* The electronic nose in respiratory medicine[J]. *Respiration*, 2013, 85(1):72-84.
- [23] Rutter AV, Chippendale TW, Yang Y, *et al.* Quantification by SIFT-MS of acetaldehyde released by lung cells in a 3D model[J]. *Analyst*, 2013, 138(1):91-5.
- [24] Ding J, Yang S, Liang D, *et al.* Development of extractive electrospray ionization ion trap mass spectrometry for *in vivo* breath analysis[J]. *Analyst*, 2009, 134(10):2040-50.
- [25] Brightling CE. Clinical applications of induced sputum[J]. *Chest J*, 2006, 129(5):1344-8.
- [26] Xiao H, Zhang L, Zhou H, *et al.* Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(2):M111.012112.
- [27] Wei YP, Yan FY, Jia B, *et al.* Diagnosis of NSCLC on sputum by neutral desorption extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Zhong Hua Shi Yan Wai Ke Za Zhi*, 2011, 28(3):422-4. [魏益平, 鄢飞燕, 贾滨, 等. 痰液直接电喷雾萃取电离质谱分析在非小细胞肺癌诊断中的应用[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(3):422-4.]
- [28] Oh JM, Brichory F, Puravs E, *et al.* A database of protein expression in lung cancer[J]. *Proteomics*, 2001, 1(10):1303-19.
- [29] Rahman SM, Shyr Y, Yildiz PB, *et al.* Proteomic patterns of preinvasive bronchial lesions[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(12):1556-62.
- [30] Li B, Chang J, Chu Y, *et al.* Membrane proteomic analysis comparing squamous cell lung cancer tissue and tumor-adjacent normal tissue[J]. *Cancer Lett*, 2012, 319(1):118-24.
- [31] Lee GK, Lee HS, Park YS, *et al.* Lipid MALDI profile classifies non-small cell lung cancers according to the histologic type[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(2):197-203.
- [32] Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, *et al.* Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11):3974-86.
- [33] Huang W, Ding X, Li B, *et al.* Serum biomarkers analyzed by LC-MS/MS as predictors for short outcome of non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(1):11-8.
- [34] Guo Y, Wang X, Qiu L, *et al.* Probing gender-specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry[J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 414:135-41.

[编辑: 周永红; 校对: 安 凤]