乳腺癌患者血浆和尿液的^{1}H-NMR代谢组学

陈音[1,2],钟美佐[1],哈木拉提·吾甫尔[3],巴吐尔·买买提明[3],邓皖利[2],张洪亮[2],王锐[2]

1. 中南大学湘雅医院肿瘤科,长沙 410013
2. 新疆医科大学第四附属医院肿瘤科,乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011

摘要 为探讨乳腺癌患者血浆、尿液代谢组学变化,建立早期诊断的代谢标志物体系。选取乳腺癌患者45例,健康对照30例,获得血浆^{1}H-NMR谱图,对所得自由衰减信号进行分段积分、数据归一化后用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)进行模式识别。与健康人群相比,乳腺癌患者血浆中多种氨基酸含量下降,包括亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、丙氨酸、组氨酸、甘氨酸、脂类(LDL)、β-葡萄糖、乳酸、胆碱、肉碱、肌醇显著减少,差异具有统计学意义(P<0.05);血浆糖蛋白、丙二酸、乙酰乙酸、β-羟丁酸、丙酮显著增多,差异具有统计学意义(P<0.05)。与健康人相比,乳腺癌患者尿液中异亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸、组氨酸、二甲胺、马尿酸、甜菜碱、牛磺酸、琥珀酸、柠檬酸、肌酸、肌酸酐减少,差异具有统计学意义(P<0.05);乳酸增多,差异具有统计学意义(P<0.05)。通过乳腺癌患者的代谢组学的变化,建立可以用于乳腺癌早期诊断的血浆、尿液代谢标志物体系。

关键词 乳腺癌;代谢组学;代谢标志物体系

中图分类号 R737.9 **文献标志码** A **doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.13.010

Metabonomics Studies on Plasma and Urine of Patients with Breast Cancer Using NMR Spectroscopy

CHEN Yin[1,2], ZHONG Meizuo[1], UPUR Halmurat[3], MAMTIMIN Batur[3], DENG Wanli[2], ZHANG Hongliang[2], WANG Rui[2]

1. Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China
2. Department of Oncology, the Fourth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. School of Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract Metabonomics studies on plasma and urine of patients with breast cancer using NMR spectroscopy are to establish metabolic markers correlated with breast cancer to guide clinic diagnosis and provide the new ideas and methods. In this study, a total of 45 patients with breast cancer were enrolled and 50 healthy volunteers as controls. Meanwhile, blood and urine samples from the subjects were collected by the researchers for testing. For each sample, the ^{1}H nuclear magnetic resonance (NMR) based metabonomic analysis was performed, the subsection integral of the free attenuation signal was computed, and the obtained data were analyzed by the orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA). The results of the study show that compared with the healthy people, leucine, valine, phenylalanine, tyrosine, alanine, histidine, and glycine are significantly decreased (P<0.05); lipid (LDL), beta glucose, lactic acid, choline, inositol and creatine are significantly reduced (P<0.05); glycoprotein, malonic acid, acetoacetic acid, beta hydroxybutyric acid, and acetone are increased significantly (P<0.05) in the plasma of patients with breast cancer. Moreover, isoleucine, valine, glutamic acid, histidine, dimethylamine, hippuric acid, betaine, taurine, succinic acid, citric acid,

收稿日期:2013-10-10;修回日期:2014-03-15

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)前期研究专项(2011CB512004)

作者简介:陈音,副主任医师,研究方向为肿瘤临床治疗,电子信箱:chenyin713@163.com;哈木拉提·吾甫尔(通信作者),教授,研究方向为中维西医干预,电子信箱: halmurat@126.com

引用格式:陈音, 钟美佐, 哈木拉提·吾甫尔, 等. 乳腺癌患者血浆和尿液的^{1}H-NMR代谢组学[J]. 科技导报, 2014, 32(13): 58-63.

creatine, and creatinine are decreased (P<0.05) and Lactic acid increased (P<0.05) in urine of patients with breast cancer. Through this study, metabolic markers correlated with breast cancer using changes of metabonomics in plasma and urine have been established.

Keywords　breast cancer; metabonomic; metabolic markers system

伴随生命活动所发生的生物化学变化统称为代谢,代谢活动是生物体生命活动的本质特征和物质基础。物质代谢、能量代谢同生物体细胞内的生命活动密不可分,对生物体所有影响的因素均可反应在代谢组中,代谢组的变化可以直接反应特定时刻生物体的生理状态以及病理变化。基因组及蛋白组对于生命活动的调控,过程复杂而繁复,至今未被全面了解,但是复杂调控过程的最终表达为整体代谢层面的变化。代谢组跳过复杂的变化是基因和蛋白表达的微小变化的最直接的放大,体现基因及蛋白的最本质的一面。组学研究的最终方向一致被认为是代谢组学[1],它是揭示机体生命活动代谢本质的科学。代谢组学以独特视角解释生命现象,为寻找肿瘤早期诊断的生物标志物提供重要技术支持[2]。本研究通过NMR手段对女性发病率、死亡率第一的乳腺癌、血浆及尿液这两种体液进行代谢组学的研究,力图建立早期诊断的代谢标志物体系。

1　材料与方法

1.1　标本采集

筛选2012年5月至2012年12月就诊于新疆医科大学第四附属医院肿瘤治疗中心住院部病理诊断明确的乳腺癌患者45例,平均年龄59.42±7.34,入组患者I~II期16例,III~IV期29例;健康对照组来源于该院体检中心健康志愿者30例,平均年龄56.0±6.23。两组之间的各项基本情况均衡可比,通过本院伦理委员会审批,均签知情同意书。用枸橼酸钠抗凝管采集入组人员清晨空腹血液5 mL,静置30 min后,3000 r/min离心10 min,吸取上清液500 μL,放入-80℃冰箱保存待用。采集入组人员的晨尿10 mL,放入-80℃冰箱保存待用。

1.2　^{1}H-NMR谱图测定方法

将冻存的血浆样品在室温中解冻,取200 μL血浆加400 μL用含20%磷酸盐缓冲液的重水配制的生理盐水,室温放置10 min,10000 r/min离心10 min。然后抽取550 μL上清液,加到5 mm的核磁管内,^{1}H-NMR谱的测定在INOVA600 MHz核磁共振波谱仪(美国Varian公司)上采用CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill)脉冲序列进行,以α-葡萄糖化学位移5.233的质子信号为内标(internal standard)。测试温度25℃,扫描次数nt=128,采样点数np=32768,对^{1}H核共振频率=599.95 MHz,谱宽sw=10000 Hz,每次信号采集时间at=1.64 s,采用预饱和方法压制水峰。

将冻存的尿液样品在室温中解冻,将200 μL磷酸盐缓冲液与取出的400 μL尿液混合于EP管,4℃、10000 r/min将EP管中的混合液离心10 min,然后吸取550 μL混合液,放置于5 mm的核磁管中,待核磁共振检测。混合^{1}H-NMR谱的测定在INOVA600 MHz核磁共振波谱仪上采用NOESYPRESAT-ID脉冲序列进行氢谱测定,3-(甲基硅基)氘代丙酸钠(TSP)作为内标,测试温度25℃,扫描次数=128,采样点数为32 K,饱和时间为2 s,谱宽为10000 Hz,采用预饱和方式抑制水峰。

1.3　^{1}H-NMR谱图处理方法及分析

血浆定标以α-葡萄糖化学位移5.233的质子信号为标准进行定标。对^{1}H-NMR用Topspin 2.0软件进行基线和相位的校正。在化学位移8.5~0.5范围以每段为0.003将谱图进行自动积分,积分值进行归一化处理。去掉5.20~4.66水峰的信号范围和2.72~2.47抗凝剂(枸橼酸钠)的信号范围。所得数据被导入SIMCA-P+11软件进行正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。

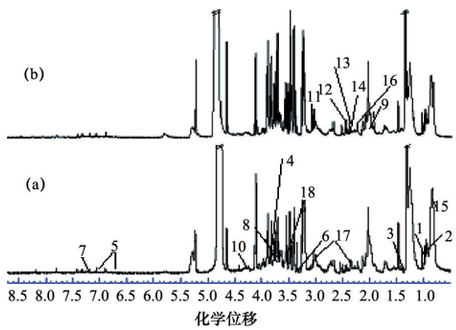
尿液的定标以3-(甲基硅基)氘代丙酸钠(TSP)化学位移0.00的质子信号为标准。对^{1}H-NMR用Topspin 2.0软件进行基线和相位的校正。在化学位移10.0~0.5范围以每段为0.003将谱图进行自动积分,将每一段积分值用归一化的方法处理,并去掉水峰5.20~4.66的信号范围后进行自动积分。对积分值进行处理并用SIMCA-P+11软件进行正交偏最小二乘判别(OPLS-DA)进行统计分析。

通过OPLS-DA获得的每一个积分段所代表的代谢物相关系数r确定各组间尿液中有差异性的代谢成分,将0.05作为检验标准P。根据皮尔森相关系数显著性差异检测,血浆代谢组学研究中确定$|r|>0.349$(样品数n为30),尿液研究中由于乳腺癌标本41例、健康人25例,故$|r|>0.381$(样品数n为25)所代表的代谢物是有统计学意义($P<0.05$)的代谢物,临界值$|r|$越大表示差异性越大,反之越小。

2　结果与分析

2.1　血浆标本的^{1}H-NMR代谢组学

对入组的健康人与乳腺癌患者血浆标本进行检测,获取^{1}H-NMR谱图(图1)。

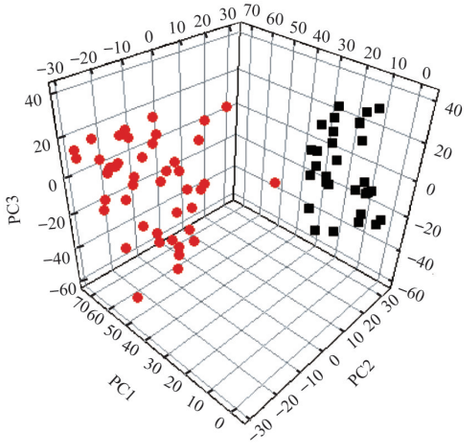


图中标注的数字对应健康人与乳腺癌患者之间血浆主要差异性代谢物的序号

图1　健康人(a)与乳腺癌患者(b)血浆^{1}H-NMR谱图

Fig. 1　^{1}H-NMR spectra of plasma samples from healthy volunteers (a) and patients with breast cancer (b)

进一步对两组 ^{1}H-NMR 谱图进行 OPLS-DA 分析，得到3D空间分布图（图2）。



■为健康人群，◆为乳腺癌患者，PC1为新 X 轴，PC2为新 Y 轴，PC3为新 Z 轴，下同。R^2X=0.42，R^2Y=0.85，Q^2=0.81

图2 健康人与乳腺癌患者血浆 ^{1}H-NMR谱图OPLS-DA分析空间分布

Fig. 2 OPLS-DA 3D plots of ^{1}H-NMR spectra of plasma samples from healthy volunteers and patients with breast cancer

空间分布图显示乳癌患者与健康人群存在明显的空间区分。图2所建立模型的质量评价指标 R^2X=0.42，R^2Y=0.85，Q^2=0.81，$Q^2>0.5$，R^2X 描述分析模型的优化程度、表示 X 的总变异，R^2Y 描述的是反应变量 Y 的变异百分比，Q^2 描述模型的累积预测程度、表示预测结果的真实性。$Q^2>0.5$ 被认为模型的预测结果“好”，二者在血浆代谢物组分中存在明显的差异，其中每个点代表一个谱峰段。通常，在样本分组方向上如果谱峰段偏离零点越远，表明这个谱峰段对分类的贡献越大，越有可能是潜在的特征代谢物。

利用代谢组学技术进一步行 ^{1}H-^{1}H 同核相关谱（COSY谱）、质子全相关谱（TOCSY 谱）、J-分解谱（J-Resolved 谱）测定，确定了乳腺癌患者与健康人群血浆差异性代谢成分18种，乳腺癌患者血浆亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、络氨酸、丙氨酸、组氨酸、甘氨酸、脂类（LDL）、β-葡萄糖、乳酸、胆碱、肌醇显著减少，与健康人比较，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；糖蛋白、丙二酸、乙酰乙酸、β-羟丁酸、肉碱、丙酮显著增多，与健康人比较，差异具有统计学意义（$P<0.05$）（表1）。

2.2 尿液标本的 ^{1}H-NMR 代谢组学研究

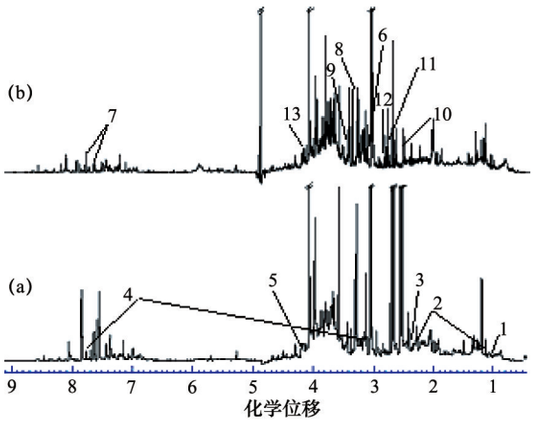
对入组的健康人与乳腺癌患者尿液标本进行检测，获取 ^{1}H-NMR 谱图（图3）。

表1 健康人与乳腺癌患者之间血浆主要差异性代谢物及相关系数

Table 1 Otherness metabolites of plasma samples from healthy volunteers and patients with breast cancer and their correlation coefficients

序号	代谢物	归属	化学位移	相关系数（乳癌/健康）
1	亮氨酸	δ-CH_3 δ-CH_3	0.95(d)，0.96(d)，0.97(d)	0.65
2	缬氨酸	CH_3 CH_3	0.99(d)，1.04(d)，1.03(d)	0.82
3	丙氨酸	CH_3	1.47(d)，1.48(d)	0.85
4	组氨酸	Half β-CH_2	3.27(d)，3.98(dd)	0.78
5	酪氨酸	Half β-CH_2，α-CH，CH_2，H_3/H_5，H_2/H_6	3.2(dd)，6.89(dd)，7.18(d)	0.74
6	甘氨酸	CH_2	3.55(s)，3.56(s)	0.69
7	苯丙氨酸	H_2/H_6，H_3/H_5	7.32(d)，7.38(t)，7.42(dd)	0.81
8	β-葡萄糖	C—H_2，C—H_4，C—H_3，C—H_1	3.24(dd)，3.4(t)，3.49(t)，3.72(dd) 3.9(dd)，4.64(d)	0.84
9	糖蛋白	NHCO—CH_3	2.03(s)，2.10(m)	−0.44
10	脂类（LDL）	$CH_3CH_2(CH_2)_n$ CH_2OCOR	4.24(m)	0.56
11	丙二酸		3.12(s)	−0.49
12	乙酰乙酸	CH_3	2.27(s)	−0.45
13	丙酮	CH_3	2.22(s)，2.23(s)，2.24(s)，2.25(s)	−0.47
14	β-羟丁酸	CH_3	2.43	−0.54
15	乳酸	CH_3 CH	1.33(d)，4.11(q)	0.86
16	肉碱	CH_2(COO)	2.45(dd)，2.46(dd)	−0.46
17	胆碱	NCH_2 OCH	3.23(s)，3.27(s)	0.63
18	肌醇	H_4/H_6	3.65(dd)	0.42

注：s代表单峰，d代表双重峰，t代表三重峰，q代表四重峰，m代表多重峰，dd代表双重双重峰。下同。

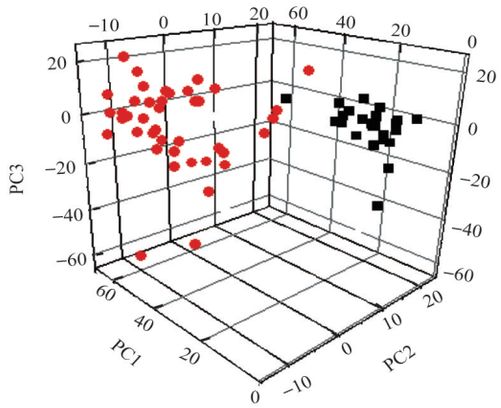


a代表健康人群尿液^{1}H-NMR谱,b代表乳腺癌患者尿液^{1}H-NMR谱。数字对应健康人与乳腺癌患者之间尿液主要差异性代谢物的序号

图3　健康人(a)与乳腺癌患者(b)尿液^{1}H-NMR谱图

Fig. 3　^{1}H-NMR spectra of plasma samples from healthy volunteers (a) and patients with breast cancer (b)

两组之间的空间分布显示乳腺癌患者与健康人群存在明显的空间区分。图4所示R^2X=0.15,R^2Y=0.84,Q^2=0.44,二者在血浆代谢物组分中存在明显的差异。其中,每个点代表一个谱峰段。通常在样本分组方向上如果谱峰段偏离零点越远,表明这个谱峰段对分类的贡献越大,越有可能是潜在的特征代谢物。



R^2X=0.15,R^2Y=0.84,Q^2=0.44

图4　健康人与乳腺癌患者尿液^{1}H-NMR谱图OPLS-DA分析空间分布

Fig. 4　OPLS-DA 3D plots of ^{1}H-NMR spectra of plasma samples from healthy volunteers and patients with breast cancer

利用代谢组学的技术行^{1}H-^{1}H,同核相关谱(COSY谱)、质子全相关谱(TOCSY谱)、J-分解谱(J-Resolved谱)等检测确定了乳腺癌患者与健康人群尿液差异性代谢成分13种,异亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸、组氨酸、二甲胺、马尿酸、甜菜碱、牛磺酸、琥珀酸、柠檬酸、肌酸、肌酸酐减少,与健康人比较,差异具有统计学意义(P<0.05),乳酸增多,与健康人比较,差异具有统计学意义(P<0.05)(表2)。

表2　健康人与乳腺癌患者之间尿液主要差异性代谢物及相关系数

Table 2　Otherness metabolites of urine samples from healthy volunteers and patients with breast cancer and their correlation coefficients

序号	代谢物	归属	化学位移	相关系数(乳癌/健康)
1	异亮氨酸	β-CH_3	1.00(d)	0.45
2	缬氨酸	CH_3,CH_3,β-CH_2,α-CH_2	0.98(d),1.04(d),2.27(d),3.60(d)	0.47
3	谷氨酸	γ-CH_2	2.36(m)	0.45
4	组氨酸	Half β-CH_2,H_2	3.14(dd),7.73(s)	0.53
5	乳酸	CH_3,CH	1.33(d),4.11(q)	−0.44
6	肌酸	CH_3	3.03(s)	0.54
7	马尿酸	H_3/H_5,H_4,H_2/H_6	7.56(t),7.65(t),7.84(d)	0.41
8	甜菜碱	$N(CH_3)_3$	3.28(s)	0.5
9	牛磺酸	CH_2	3.44(t)	0.43
10	柠檬酸	half CH_2,CH_2	2.54(d),2.68(d)	0.61
11	二甲胺	CH_3	2.72(s)	0.72
12	琥珀酸	CH_2,CH_2	2.41(s)	0.71
13	肌酸酐	CH_2	4.05(s)	0.65

3 讨论

肿瘤作为一种异质性的疾病,每一种肿瘤都有自己的代谢特点[3],与健康人群相比,乳腺癌血浆中多种氨基酸的含量下降,包括亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、络氨酸、丙氨酸、组氨酸、甘氨酸显著减少;尿液中异亮氨基酸、缬氨酸、谷氨酸、组氨酸显著减少;依靠外源性食物摄取的必须氨基酸,及由组织蛋白降解或体内合成的多种非必须氨基酸的减少,显示乳腺癌患者的氨基酸代谢异常。推测可能的机制是由于肿瘤对氨基酸的大量需求及掠夺,使乳腺癌患者处于持续的耗能状态,蛋白质转化增加。研究表明,谷氨酸可以促进肿瘤细胞的增殖,可能是通过促进细胞的分裂、减少其死亡而实现的[4,5]。异亮氨酸参与胸腺、脾脏及脑下腺的调节及代谢;脑下腺属总司令部作用于甲状腺、性腺。缬氨酸作用于黄体、乳腺及卵巢,这表明显著减少的氨基酸就是肿瘤生长必须的氨基酸。研究发现,与健康人群比较,乳腺癌患者血浆中脂类(LDL)、β-葡萄糖含量显著减少。三大能源物质的减少表明,耗能增加,葡萄糖、蛋白质及脂肪转化增加。

酮体(aceone bodies)是脂肪酸在肝细胞线粒体内分解代谢过程中经β-氧化所生成的特殊的中间产物。丙酮、β-羟丁酸和乙酰乙酸的统称为酮体。正常情况下血液中的酮体含量极少,饥饿或糖的供给不足时,脂肪动员加速导致酮体的生成增加。肝外许多组织具有活性很高的利用酮体的酶,可以将酮体裂解为乙酰CoA,并通过三羧酸循环彻底氧化供能。如果肝中生成酮体的量远远大于肝外利用的量,二者之间的平衡被打破,那么就会出现血浆中酮体的增加[6]。肉碱浓度迅速上升可以加强脂肪代谢,加速脂肪的动员和分解[7]。乳腺癌患者血浆丙酮、β-羟丁酸和乙酰乙酸增多,以及肉碱的增加显示乳腺癌患者的脂肪动员加速。

1920年,德国科学家Warburg首次观察到肿瘤细胞特殊的能量代谢方式,命名为Warburg效应,是指肿瘤细胞在有氧的情况下也进行糖酵解,有氧糖酵解的最终产物是乳酸。本研究发现,与健康人群相比,乳腺癌患者血浆中乳酸减少不符合这个理论。但近期有人提出反向Warburg效应的概念,就是说肿瘤周围的癌相关成纤维细胞(carcinoma-associated fibroblasts,CAFs)在癌细胞作用下,能量代谢的方式转变为有氧糖酵解,这就是所谓反向Warburg效应。反向Warburg效应支持肿瘤具有氧化磷酸化功能[6]。这些被成　纤维细胞释放出来的乳酸、酮体或丙酮酸可作能源物质,　通过TCA循环及氧化磷酸化产生ATP,被上皮性癌细胞所利用[8~10]。推测研究中乳腺癌患者血浆中乳酸减少的机制与此有关。另有研究显示,不同肿瘤内血浆中乳酸的含量差异很大,但即使同样体积、同样等级和同一实体肿瘤内乳酸的含量差异也很大。人体内的不同的组织乳酸含量也有不同,有研究显示胃癌组织内葡萄糖明显减少而乳酸大量堆积,血浆内的乳酸同时也减少[11]。推测是否本研究中乳腺癌患者存在血浆中乳酸减少,但瘤体内乳酸呈高浓度,同健康人群比较,乳腺癌患者尿液中乳酸增多,这同血浆代谢组学的表现不一致,均有待进一步研究。

本研究中,与健康人群相比,乳腺癌患者血浆中糖蛋白显著增加。推测可能的机制是糖蛋白作为生物体内细胞的重要组分,发挥着各种生物活性,细胞间糖蛋白结构和功能的改变致使细胞接触和连接,细胞间的识别、细胞间的信息传递、细胞表面的调变装置等机制发生障碍,从而使细胞不再按正常方式对环境信号发生正常的反应,使细胞有丝分裂机制失去控制。研究显示肿瘤表面的糖蛋白与肿瘤免疫相关[12,13]。这使癌细胞不仅可以避开最初的免疫进攻,还使癌细胞逃逸免疫监视获得发展为癌的可能。

本研究中乳腺癌患者血浆中胆碱减少,推测可能由于恶性肿瘤细胞具有快速分裂增生、生长旺盛的特点,因此细胞膜合成也非常活跃,胆碱是细胞膜构成的重要组分,肿瘤生物学行为相关的肿瘤组织细胞的分裂、增生情况可由胆碱在体内的代谢情况来反映[14]。目前利用肿瘤的这一特性发现^{11}C-胆碱反映肿瘤细胞细胞膜的合成情况,在肺癌[15,16]、前列腺癌的诊断中具有一定的价值。推测血浆中胆碱的减少同肿瘤细胞对胆碱的大量摄取,导致血浆中的含量急剧下降。

肌酸由人体自行合成,也可以由食物中摄取,作为能量储备和利用的重要的化合物,由甘氨酸提供骨架、S-腺苷甲硫氨酸提供甲基、精氨酸提供脒基3种氨基酸所合成。研究中乳腺癌血浆肌酸的下降,以及尿液中作为肌酸代谢物的肌酸酐均减少。推测可能与合成肌酸的相关氨基酸的供给不足相关。肌酸是能量储备和利用的重要的化合物,肌酸接受ATP的高能磷酸基形成磷酸肌酸,在心肌、骨骼肌、脑组织中含量丰富,在肌细胞里磷酸肌酸的作用是能将线粒体有氧代谢所产生的能量输送到所需要的部位[17,18],这种能量代谢异常,导致收缩功能储备减少。肌醇是一种"生物活素",参与体内的新陈代谢活动,降低胆固醇,帮助体内脂肪再分布,高等动物若缺乏肌醇,将会出现生长停滞和毛发脱落等现象。目前研究证明,磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3 kinase,PI3K)信号传导通路的异常改变,常出现在人类的一些恶性肿瘤组织中,且与肿瘤的进展密切相关[19],推测本研究中肌醇的减少与乳腺癌的进展具有相关性。

前期,本课题组对中医"证"的代谢组学进行了研究并建立了维医异常黑胆质证的特征性的代谢标记物体系[20,21]。本研究通过乳腺癌患者的血、尿代谢组学的变化,可以推究该病理变化中发生的生物化学变化,通过这些变化寻找诊断及治疗的靶点,为乳腺癌的诊断和治疗提供依据。

4 结论

乳腺癌患者存在能量代谢的异常,表现为氨基酸代谢异常,糖、脂类代谢的紊乱。能量需求增加,供给不足,导致葡萄糖和蛋白质转化增加,脂解作用增强,机体的营养不断被掠夺,机体的营养状况不断恶化。

本研究显示,乳腺癌患者血浆亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、络氨酸、丙氨酸、组氨酸、甘氨酸、脂类(LDL)、β-葡萄糖、

乳酸、胆碱、肌醇显著减少，糖蛋白、丙二酸、乙酰乙酸、β-羟丁酸、肉碱、丙酮显著增多；乳腺癌患者尿液中异亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸、组氨酸、二甲胺、马尿酸、甜菜碱、牛磺酸、琥珀酸、柠檬酸、肌酸、肌酸酐减少，乳酸增多可作为诊断的代谢标志物体系。

参考文献(References)

[1] 陈海彬, 周红光, 俞晓忆, 等. 代谢组学在中药现代化研究中的应用[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(6): 831-835.
Chen Haibin, Zhou Hongguang, Yu Xiaoyi, et al. The application of metabonomics in modern studies of chinese materia medica[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2012, 32(6): 831-835.

[2] 朱嘉, 方祝元. 代谢组学与中医"证"的相关性[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(8): 938-941.
Zhu Xi, Fang Zhuyuan. The correlation between metabonomics and TCM syndrome[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2009, 18(8): 938-941.

[3] 郑杰. 肿瘤生长的能量代谢特点及临床应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(10): 1158-1165.
Zheng Jie. Energy metabolism and clinical application of tumor growth [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(10): 1158-1165.

[4] 陆敬华, 刘世育. 谷氨酸对SW1990 胰腺癌细胞系体外增殖的影响[J]. 实用医学杂志2009, 25(7): 1025-1027.
Lu Jinghua, Liu Shiyu. Effects of glutamate on the in vitro proliferation of pancreatic carcinoma cell line SW1990[J]. The Journal of Practical Medicine, 2009, 25(7): 1025-1027.

[5] 袁忠民, 徐利民, 王建刚, 等. 谷氨酸促脑胶质瘤细胞侵袭的机制研究[J]. 岭南现代临床外科, 2009, 9(6): 456-458.
Yuan Zhongmin, Xu Limin, Wang Jiangang, et al. Study on the mechanism of invasion evoked by glu tamine in cerebral glioma cells [J]. Lingnan Morden Clinics in Surgery, 2009, 9(6): 456-458.

[6] 查锡良, 周春燕. 生物化学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
Zha Xiliang, Zhou Chunyan. Biochemistry[M]. 7th ed. Beijing: People´s Medical Publishing House, 2008.

[7] 王勇, 李中峰, 陈建新, 等. 基于冠心病心肌缺血血瘀证小型猪血清NMR 代谢组学的研究分析[J]. 化学研究简报, 2011, 39(8): 1274 - 1278.
Wang Yong, Li Zhongfeng, Chen Jianxin, et al. Study of mini- pigs serum of coronary heart disease (chronic myocardial ischemia) with syndrome of blood stasis based on nuclear magnetic resonance metabolomics[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(8): 1274-1278.

[8] Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker- Menezes D, et al. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis:Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism[J]. Cell Cycle, 2010, 9(17): 3506-3514.

[9] Lim H Y, Ho Q, Low J, et al. Respiratory competent mitochondria in human ovarian and peritoneal cancer[J]. Mitochondrion, 2011, 11(3): 437-443.

[10] Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancerassociated fibroblasts and the tumor stroma[J]. Cell Cycle, 2009, 8(23): 3984-4001.

[11] 孙敏, 王海洋, 徐瑾. 基于代谢组学的胃癌组织和血浆的糖代谢研究[J]. 胃肠病学, 2011, 16(10): 610-612.
Sun Min, Wang Haiyang, Xu Jin, et al. Study on saccharometabolism of gastric cancer tissues and plasma based upon metabolomics[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2011, 16(10): 610-612.

[12] 杜芳, 王立东, 齐义军, 等. 利用肿瘤相关抗原微阵列检测食管和贲门癌及癌前病变患者血清中多个自身抗体的变化特征[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(17): 1289-1292.
Du Fang, Wang Lidong, Qi Yijun, et al. Detection of multiple serum autoantibody in patients with esophageal and gastric cardia pre-cancerous and cancerous lesion using tumor-associated antigens min-i array[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2006, 13 (17): 1289-1292.

[13] 刘保池, 王立东, 杜芳, 等. 肿瘤相关 抗原与自身抗体检测对食管癌早期发现和高危人群预警的意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14 (9): 645-649.
Liu Baochi, Wang Lidong, Du Fang, et al. Clinical significance of tumor-associated antigens and autoantibody measurement in high-risk subject screening and early detection of esophageal cancer[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2007, 14(9): 645-649.

[14] 陈辑. 前列腺癌组织胆碱摄取值与其肿瘤生物学行为相关性的初步研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
Chen Ji. Study on the relationship between choline uptake of prostate cancer and its biological behavior[D]. Jinan: Shandong University, 2012.

[15] 常林凤, 卢光明, 朱虹, 等. ^{11}C-胆碱与^{18}氟去氧葡萄糖PET/CT 显像在肺癌诊断中的对比研究[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(8): 27-28.
Chang Linfeng, Lu Guangming, Zhu Hong, et al. Comparison of ^{11}C-choline and ^{18}FDG PET/CT imaging in the diagnosis of pulmonary carc inoma[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2008, 21(8): 27-28.

[16] 李昕. ^{11}C-胆碱PET/CT 显像在前列腺癌及肺癌中的应用价值[D]. 济南: 山东大学, 2010.
Li Xin. The value of ^{11}C- choline PET/CT imagingon prostate cancer and lung caner[D]. Jinan: Shandong University, 2010.

[17] 魏源. 补充肌酸对运动能力和健康的影响[J]. 沈阳体育学院学报, 2005, 24(2): 11-14.
Wei Yuan. Influences of supplying creatine on sports ability and health [J]. Journal of Shenyang Physical Education Institute, 2005, 24(2): 11-14.

[18] Meyer R A, Sweeney H L, Kushmerick M J. A simple analysis of the phosphocreatine[J]. American Journal of Physiology, 1984, 246(5Pt1): C365-C377.

[19] 郭瑞霞, 乔玉环. 磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号传导与妇科恶性肿瘤关系研究[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(5): 358-360.
Guo Ruixia, Qiao Yuhuan. Study the relationship between phosphatidylinositol 3 kinase/Protein kinase B signal pathway and gynecologic malignant tumor[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005, 40(5): 358-360.

[20] 徐卫芳, 哈木拉提·吾甫尔, 李凤森. 基于代谢组学分析COPD 肾虚痰瘀证与异常黑胆质证共性特征[J]. 科技导报, 2013, 31(23): 5-11.
Xu Weifang, Upur Halmurat, Li Fengsen. Metabonomics common characteristics of COPD about traditional Chinese medicine kidney depletion- phlegm- stasis syndrome and uygur medicine abnormal savda syndrome[J]. Science & Technology Review, 2013, 31(23): 5-11.

[21] 巴吐尔·买买提明, 哈木拉提·吾甫尔, 豪富华, 等. 异常黑胆质型与非异常黑胆质型肿瘤患者血浆代谢组学差异分析[J]. 科技导报, 2009, 27(20): 39-43.
Mamtimin Batur, Upur Halmurat, Hao Fuhua, et al. Metabonomic differences of plasma between abnormal savda and unsavda syndrome neoplasm patients[J]. Science & Technology Review, 2009, 27(20): 39-43.

（责任编辑　吴晓丽）