

代谢组学在食管癌早期诊断与应用中的研究进展

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: 食管癌是世界上发病率和死亡率较高的癌种, 而我国是食管癌疾病负担较重的国家。食管癌发生发展的具体分子机制尚不明确, 难以提前干预。目前食管癌的早诊及筛查手段仍为侵入式的内镜下碘染色, 成本高、实施复杂, 一定程度影响了患者主动参与筛查的意愿。代谢组学是一种新兴组学技术, 能从生物系统代谢层面入手, 通过容易取得的机体检材, 对受试者体内代谢组进行定性及定量分析, 分析代谢通路的改变及相应调控通路, 可以在食管癌发生发展的分子机制, 以及食管癌早期诊断生物标志物的研究领域提供新的思路。全文就当前食管癌代谢组学研究的最新成果进行了总结, 并对一些存在的问题进行思考与探讨。

关键词: 食管癌; 代谢组学; 发病机制; 肿瘤标志物

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2022)10-0803-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2022.10.A007

Research Progress on Metabolomics for Clinical Application of Esophageal Cancer

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: Esophageal cancer is a cancer with high incidence and mortality in the world, and China is a country with a high disease burden of esophageal cancer. The specific molecular mechanisms underlying the development of esophageal cancer are still unclear, making it difficult to intervene in advance. The main means of early diagnosis and screening for esophageal cancer is still invasive, such as endoscopic iodine staining, which affects patients' compliance to actively participate in screening. Metabolomics is a newly emerging technology that can provide information of metabolic levels of biological systems and the alterations of metabolic and related regulatory pathways through qualitative and quantitative analysis of easily accessible samples. Metabolomics studies provide new ideas of molecular mechanisms of esophageal cancer development and potential biomarkers for early diagnosis of esophageal cancer. This article reviews the latest results of metabolomics research on esophageal cancer and discusses some existing problems.

Key words: esophageal cancer; metabolomics; pathogenesis; tumor biomarkers

食管癌是危害我国居民健康的主要恶性肿瘤, 具有发病隐匿、预后较差的特点。我国食管癌的疾病负担处于世界前列, 针对高危人群开展早期筛查能有效降低群体食管癌的发病率和死亡率。目前食管癌主要的筛查手段多为侵入性内镜, 患者可能会

因担忧筛查带来的痛苦, 从而参与筛查的意愿不高, 这提示我们要去寻找更简单、可靠的肿瘤相关标志物用于食管癌筛查。代谢组学作为一种新兴的组学技术, 可以更加直接、准确地反映生物系统代谢状态, 对内源性代谢产物进行全面、定量的分析。使用代谢组学的方法在食管癌这一领域进行研究是值得开辟的新路径。本文将从食管癌的发病与早期诊断

收稿日期: 2022-03-28; 修回日期: 2022-06-28

通信作者: 范金虎, E-mail: fanjinhu@cicams.ac.cn

现状、代谢组学的概念、检测技术及其在食管癌研究中的作用和应用进展进行阐述。

1 食管癌发病与早期诊断现状

食管癌是当前世界上第七大常见的癌症,也是癌症致死的第六大原因^[1]。食管癌发病隐匿,早期症状容易被患者忽视,确诊时往往已经处于晚期,预后较差。从世界范围来看,食管癌的发病呈现出明显的地域特征,我国仍然是世界上食管癌疾病负担最为严重的几个国家之一^[2-3]。一般来说,食管腺癌在西方国家是常见的类型,食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)在我国是最常见的类型^[2]。ESCC的危险因素与食管腺癌不完全一致,可能包括吸烟、饮酒、营养素缺乏等^[4]。目前,我国食管癌的早期筛查手段多为内镜下碘染色,内镜下难以区分者还需要进行活检^[5],这种筛查方法较复杂、成本高,对患者而言更难接受。如果能使用易取得的生物检材,借助组学等方法进行食管癌肿瘤标志物的检测,在人群中进行筛查无疑更有前景。

2 代谢组学技术

Fiehn^[6]提出了代谢组学(metabolomics)的概念后,近十几年内代谢组学技术蓬勃发展。代谢组学是继基因组学、转录组学、蛋白质组学之后发展起来的一门新兴的组学技术,与其他的组学技术相比,基因组学和蛋白质组学侧重于从基因和蛋白质层面分析生命活动过程,相比于基因和蛋白,代谢产物可以直接反映细胞的功能状态,因此代谢组学能更好地反映生物系统代谢产物异常,研究生物代谢在内、外界干预或病理过程中的动态变化。

代谢组学的主要研究对象为相对分子质量在1 500 Da以内的内源性小分子代谢产物。目前,主流的代谢组学分析手段是核磁共振技术(nuclear magnetic resonance,NMR)和基于质谱(mass spectrometry,MS)的联用技术^[7-8]。NMR应用于代谢组学的分析主要优点在于预处理简单,检测的无偏倚性、无损伤性,不需要改变待测物质的结构和性质,并能做到实时动态检测,因此可以在接近生理的条件下进行试验^[9]。但是NMR也有相应的缺点,即检测的灵敏

度较差,可以检测到的代谢物数目有限^[10]。质谱技术可以很好地弥补NMR的缺点,质谱技术相对于NMR而言有更高的灵敏度和选择性,结合色谱能同时分离更多的代谢物,并且能通过图像提示代谢物在组织内的空间分布信息^[11-12]。不同种类的质谱仪在灵敏度、分辨率及选择性上有很大的区别,研究使用四极杆串联-飞行时间质谱仪(time of flight mass spectrometer,TOFMS)或静息轨道式离子阱质谱仪(quadrupole mass spectrometer,QMS)能获得更高分辨的代谢物谱图^[13]、更准确的代谢物结构信息^[14]。但是,质谱对于同分异构体区分效果差,在实际操作中,直接进样会导致严重的离子抑制。因此在分析未知的复杂样品时,质谱技术需要串联使用色谱技术以增加化合物的分离度,提高检测效果。目前,以液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry,LC-MS)、气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry,GC-MS)、毛细管电泳-质谱(capillary electrophoresis-mass spectrometry,CE-MS)为代表的色谱-质谱联用技术成为代谢组学样本分析的主流方法。

在医学领域,代谢组学在疾病的诊断、药物研发、环境与疾病间的关系等领域具有独有的优势表现^[15-18],近年来被越来越多地应用于疾病诊断和机制探索。通过受试者生物样本中代谢轮廓的系统表征,可以对疾病发生发展过程中的关键代谢通路及相关酶进行筛选,进而获得上游相关蛋白及基因层面的调控信息。因此,对个体进行代谢组学分析,可以见微知著地了解病理过程中整个生物分子网络一系列生物事件。

进行代谢组学检测的检材丰富且容易获取,过往研究中使用的检材包括血浆、血清、尿液、唾液、细胞和组织的提取液,甚至是粪便或肠道内容物提取液^[7,19]。研究要谨慎选择代谢组学的研究策略,常见的研究策略中,非靶向代谢组学的特点是广泛而普适,可以获得海量的高分辨化合物结构信息,靶向代谢组学则是针对特定的代谢产物,利用特定的前处理及分析方法对其含量变化进行精确表征^[20]。基于三重四极杆质谱仪的多反应监测扫描及选择离子扫描是靶向代谢组学研究中的常用方法。代谢组学应用于食管癌的相关研究尚处于初级阶段,为了广泛的探索食管癌发生过程中的代谢物,大多数研究使

用非靶向代谢组学。

细胞及机体发生物质和能量代谢紊乱已被证明是肿瘤发生发展的一个特征。代谢组学已经被广泛用于肥胖、肿瘤及其他疾病的机制和生物标志物研究等方面。代谢组学检测是研究食管癌发生发展机制的理想方法,可为食管癌研究开辟一条新途径。在当前食管癌的代谢组学研究中,研究者主要关注的问题包括食管癌发生发展机制的研究、食管癌早诊早治的肿瘤标志物探索及食管癌诊断中的应用。

3 代谢组学在食管癌研究中的作用及诊断应用

3.1 食管癌发生的分子机制

目前在食管癌发病危险因素方面有很多研究,主要的假说包括几种,其一是环境因素作用:如外界理化刺激,如喜食热烫食物、粗糙食物反复刺激食管发生局部炎症后癌变;吸烟、饮酒是已经确定的食管癌危险因素^[3]。其二是遗传因素作用:具有食管癌家族史的人患食管癌的风险显著增高^[21]。其三是营养因素作用:基于河南省林县开展的一项营养干预试验,在进行多年随访后,发现在一般人群中,多种营养素和矿物质干预可以有效降低食管癌所致的发病和死亡^[22]。

虽然存在众多对食管癌危险因素的研究,食管癌确切的发病机制不完全明确。由于代谢组学可以反映生物体内部的代谢状态,因此应用代谢组学可以为食管癌的发病机制研究提供一定的思路。Moodi等^[23]的研究表明,肥胖会通过影响体内脂肪因子、促炎细胞因子等影响他们在调节细胞增殖、凋亡等过程中发挥的独特作用,并带来消化道胰岛素抵抗等作用,影响人体代谢,可能导致食管癌发生。魏梦珂^[24]基于山东省肥城市食管癌筛查平台进行了吸烟和饮酒导致食管上皮病变的研究,该研究纳入533名受试者,使用四极杆飞行时间色谱-质谱平台进行代谢组学分析,包括健康对照组、鳞状上皮病变组以及胃癌组。结果发现L-组氨酸、N1-甲基-2-羟基吡啶-5-酰胺和L-谷氨酰胺、Y-谷酰基-苯丙氨酸、花生四烯酸、肉碱(2:0)和L-组氨酸是与食管鳞状上皮病变相关的代谢产物。经中介效应分析后,发现L-组氨酸、N1-甲基-2-羟基吡啶-5-酰胺和L-谷氨酰胺是与吸烟

相关的代谢物,而Y-谷酰基-苯丙氨酸、花生四烯酸、脂酰肉碱(2:0)和L-组氨酸与酒精暴露相关。闫茂慧等^[25]的研究报道,肝细胞生长因子受体(hepatocyte growth factor receptor, HGFR)作为一种具有自主磷酸化活性的蛋白,可以调节酪氨酸激酶活性,可以激活下游信号转导及转录激活因子,并继续激活一系列信号转导通路,促进食管恶性肿瘤的发生、发展。相关实验表明, HGFR在食管癌组织和癌旁组织中的阳性表达率相差超过50%, HGFR在食管上皮组织中的过表达可能是食管上皮恶性增生的潜在分子机制,在后续研究中,也可以利用靶向代谢组学对HGFR进行深入研究。Zang等^[26]使用LC-MS和CE-MS技术,在ESCC患者及配对癌旁组织中检测到112种差异代谢产物,这些代谢产物主要富集在磷脂酰胆碱生物合成、脂肪酸代谢和氨基酸代谢途径。并发现白细胞介素增强因子结合因子2(interleukin enhancer binding factor 2, ILF2)和ILF3在癌变组织中存在高表达。而ILF2、ILF3与细胞中支链氨基酸代谢途径密切相关,在ILF2高表达的ESCC组织中,与BACC代谢途径相关的几种肉碱明显上调。

3.2 代谢组学在食管癌的诊断应用

食管肿瘤可分为食管良性肿瘤和恶性肿瘤,两者症状相似,患者难以进行区别,但食管良性肿瘤多为平滑肌瘤,预后良好^[27];而食管恶性肿瘤5年生存率仅15%左右。两者治疗方式存在很大差异,误将食管良性肿瘤诊断为食管恶性肿瘤将给患者带来身体和经济的双重负担。代谢组学可以通过检测良性肿瘤与恶性肿瘤患者体内代谢物的变化为区分两者提供辅助作用。一项研究^[28]纳入35例食管腺癌患者和52名经过年龄匹配的良好对照,利用¹H-NMR平台检测得到肿瘤组织、肿瘤患者正常组织学标本和对照组织学标本的代谢谱,结果显示从良好对照到癌症患者,磷酸胆碱(Phosphorylcholine, PC)、谷氨酸(L-glutamic acid, Glu)、肌醇、含腺苷的化合物、含尿苷的化合物和肌苷的表达逐渐增高,且癌症患者的正常组织标本,PC/Glu比值也具有提示意义。表明组织代谢谱可以在癌症的监测和食管良恶性病变判别上发挥一定作用。

恶性食管肿瘤的病理学分级是临床进行诊断并制定后续治疗方案的重要依据,但病理诊断的准确性依赖于采样部位以及专业的病理医师,在医疗资

源不发达的偏远地区,病理诊断存在准确性偏低的情况。可以利用代谢组学鉴别患者在食管鳞癌各阶段的代谢变化,通过寻找有意义的差异代谢物,对患者进行体外检测,结果可用于指导食管癌分期,估计患者的预后情况,为临床确定适宜的治疗方案提供参考。有报道^[29]运用病例对照研究方法,从食管癌患者血浆中成功鉴定出3种代谢标志物 L-脯氨酸降低、酮体 3-羟基丁酸酯和 D-甘露糖浓度升高。通过3个代谢物建立的风险预测模型可将食管癌患者分为高危组和低危组,高危组具有较高的代谢物风险评分(metabolite risk score, MRS),且预后更差。该研究认为,这3个代谢物可能作为食管癌预后判断的标志物。Tokunaga 等^[30]的研究使用了 CE-TOFMS 对35对食管癌肿瘤组织和非肿瘤食管组织进行分析,并比较了不同食管癌分级间组织代谢物浓度的差异,发现高级别分期苹果酸和柠檬酸的浓度显著低于低级别,推测高级别食管癌患者三羧酸循环活性可能下调。除了使用血液及组织学样本,受试者尿液样本也可以用作食管癌分期鉴别诊断的取材。Liang 等^[31]利用40对食管癌患者与健康对照的尿液样本进行配对研究,发现尿液中生物标志物的变化与食管癌变组织中相关标志物的变化呈相关性。这些标志物在食管癌不同分期患者的尿液含量存在显著差异。

3.3 食管癌早期肿瘤标志物的探索

食管癌的早期筛查和诊断困难,寻找准确可靠的生物标志物是推进食管癌早期筛查和诊断的关键。科学研究表明,癌症在发生早期就伴随着能量代谢紊乱和代谢重编程,在肿瘤发生和进展过程中,肿瘤细胞对三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、碳骨架和其他分子有大量需求,并且肿瘤细胞中一般存在破坏葡萄糖氧化供能途径,转而利用糖酵解供能的现象,称为肿瘤细胞的 Warburg 效应^[32]。这些代谢过程已被发现与食管癌发生发展相关,这为使用代谢组学技术进行早期筛查肿瘤标志物的研究提供了理论依据。Huang 等^[28]基于气相色谱-飞行时间质谱(GC/TOF-MS)技术,对24例食管癌患者及21名健康对照的血清进行分析,并在19例食管癌患者的癌组织和配对正常组织中进行验证,发现患者血清41种化合物和组织中36种化合物与食管癌患者预后不良相关,这些代谢

物表达的上调或下调影响了食管鳞癌患者体内葡萄糖、谷氨酸、乳酸和胆固醇代谢通路,厌氧糖酵解和谷氨酰胺降解,抑制三羧酸(TCA)循环,改变脂质代谢和氨基酸周转。Liu 等^[33]纳入了25例早期 ESCC 患者和40名正常对照,利用 ¹H-NMR 技术和多变量统计分析方法,得到31种具有组间差异的血清代谢物,以 ROC 曲线下面积为依据,进一步筛选了6种血清代谢物,认为这6种血清代谢物可以作为 ESCC 的潜在生物标志。在该研究中,二氢胸腺嘧啶被筛选为一种新的与食管癌发生相关的肿瘤标志物。Zhang 等^[34]的研究纳入74例 ESCC 患者、72例食管重度增生患者和75名正常对照,利用 GS-MS 平台,获取了这些受试者的血清代谢谱以分析潜在的早期诊断标志物,这项研究的优点在于所有被纳入研究的受试者事先进行了性别、年龄的匹配,并且纳入了足够数量的食管重度增生患者,可以很好地观察食管癌前病变者的代谢情况。该研究结果表明,ESCC、食管重度增生、正常对照组的代谢谱逐渐改变,其中氨基酸整体增加,而脂肪酸整体减少,构建次黄嘌呤、2-酮异丙酸、L-谷氨酸和 L-天冬氨酸的区分模型,灵敏度和特异度均表现良好。王家林课题组依托山东省肥城市食管癌筛查项目,对1104名受试者的血清进行 QTOF-MS 代谢组检测,其中662名受试者为测试集,另外442名受试者为验证集,该研究是目前为止最大型的食管癌代谢组学研究^[35]。该研究中得到食管病变者(包括食管炎、食管增生、食管癌患者)与健康对照之间共有56种代谢物可能是食管病变的潜在标志物。从中筛选出8种代谢物,与食管疾病危险因素一起建立了随机森林模型,模型的净再分类指数为1.18(95%CI:0.97~1.37, $P<0.001$),ROC 曲线下面积达到0.986,具有成为食管癌的早诊标志物的潜力。

4 代谢组学在食管癌早期诊断研究中面临的问题

近些年,国内外就代谢组学应用于食管癌方面做出许多研究,通过代谢组学检测技术在食管癌患者的生物标本中检测出了数量可观的差异性代谢物,其中有相当一部分研究还对检出的差异代谢物进行评估,并使用可能成为潜在生物标志物的代谢

物建立了食管癌风险的预测模型,大多数模型的ROC曲线下面积>0.8。比较这些研究时,可以发现几个问题:(1)代谢组学作为一种新兴的研究方法,在食管癌的相关研究中是可行的,目前已发表的研究中,我们几乎都能发现食管癌患者和健康对照之间代谢物存在差异,但不同研究中存在的差异与患者病情的关联程度难以直接比较。(2)可以发现不同研究检出的生物标志物各自表现出的灵敏度和特异度差异较大,由于研究者关心的问题不同,某些研究获得的差异代谢物在另外的研究中可能未被重点关注到。(3)目前代谢组学应用于食管癌的研究多集中于代谢产物的检测,通过差异代谢产物推测得到代谢通路,导致难以验证这个推测得到的结果。

在当前的食管癌代谢组学研究中,我们在看到代谢组学这一方法的可行性的同时,也需要克服新方法带来的问题。对这些问题,笔者有以下分析:(1)由于不同的样品制备方法、分离仪器、分析技术,甚至是不同的结构鉴别数据库都可能对代谢组学的结果造成影响,不同研究的检测通量、操作标准不同,这些问题对研究结果的影响都会导致不同研究结果缺乏可比性。因此建立一套公认的标准或许可以对解决这一问题有所帮助。(2)比较不同的食管癌代谢组学研究时,要关注不同的研究者主要研究的代谢通路是否有差异。(3)在当前的食管癌代谢组学研究中,存在检出的各种差异代谢物数目庞杂,这可能是由于肿瘤患者体内发生多个代谢紊乱,而某种物质又同时存在于不止一个代谢通路中,单一物质的定量改变往往会影响到其上游、下游物质代谢情况,造成其上游、下游物质与疾病发生虚假关联。这提示我们还需要更深入地研究来选择更有意义的代谢标志物。(4)在当前研究中,往往使用食管癌患者与健康对照进行代谢组学研究,缺少食管癌前病变这一组别,这可能导致当前检出的差异代谢物难以作为早诊指标,也缺少用来提示食管癌疾病分期的能力,或许我们可以考虑,依托某一大型前瞻性队列研究,增加研究中纳入的样本量,这样检出的差异代谢物被当作食管癌早期诊断或筛查的肿瘤标志物才更有说服力。

从理论出发,代谢组学与其他组学技术相比,直接关注肿瘤导致体内物质代谢紊乱,高通量、丰富的检测分析方法、能得到较多的代谢物信息,这些特点

都指向了代谢组学在食管癌的疾病机制和肿瘤标志物方面广阔的研究前景,代谢组学可能会为食管癌的筛查、诊断甚至治疗方面带来巨大的技术革新。在未来的研究中,我们仍需通过数量巨大、化学结构复杂的代谢物检测结果,进一步研究如何将代谢组学检测结果与生命代谢和肿瘤生物学联系起来。整合多组学的研究成果,建立合理的多组学评价体系可能会逐渐帮助我们更加了解和明确食管恶性肿瘤患者体内生命活动和代谢通路的改变过程。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [2] Thrift AP. Global burden and epidemiology of Barrett oesophagus and oesophageal cancer [J]. *Nat Rev Gastroenterol*, 2021, 18(6):432-443.
- [3] Uhlenhopp DJ, Then EO, Sunkara T, et al. Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors[J]. *Clin J Gastroenterol*, 2020, 13(6):1010-1021.
- [4] Wu Y, Li Y, Giovannucci E. Potential impact of time trend of lifestyle risk factors on burden of major gastrointestinal cancers in China[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(6):1830-1841.
- [5] 中国早期食管癌及癌前病变筛查专家共识意见(2019年,新乡)[J]. *中华消化内镜杂志*, 2019, 36(11):793-801. China experts consensus on the protocol of early esophageal cancer and pre-cancerous lesion screening(2019, Xinxiang)[J]. *Chinese Journal of Digestive Endoscopy*, 2019, 36(11):793-801.
- [6] Fiehn O. Metabolomics by gas chromatography mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling[J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2016, 114(30):1-2.
- [7] Roca M, Alcoriza MI, Garcia-Cañaveras JC, et al. Reviewing the metabolome coverage provided by LC-MS: focus on sample preparation and chromatography—a tutorial[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1147:38-55.
- [8] Edison AS, Colonna M, Gouveia GJ, et al. NMR: unique strengths that enhance modern metabolomics research[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(1):478-499.
- [9] Nagana Gowda GA, Raftery D. NMR-based metabolomics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1280:19-37.
- [10] Crook AA, Powers R. Quantitative NMR-based biomedical metabolomics: current status and applications[J]. *Molecules*, 2020, 25(21):5128.
- [11] Zeki ÖC, Eylem CC, Reçber T, et al. Integration of GC-MS

- and LC-MS for untargeted metabolomics profiling [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 190: 113509.
- [12] Jaochico A, Sangaraju D, Shahidi-Latham SK. A rapid derivatization based LC-MS/MS method for quantitation of short chain fatty acids in human plasma and urine[J]. *Bioanalysis*, 2019, 11(8): 741–753.
 - [13] Gröger TM, Käfer U, Zimmermann R. Gas chromatography in combination with fast high-resolution time-of-flight mass spectrometry: technical overview and perspectives for data visualization[J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2020, 122: 115677.
 - [14] Yang Z, Ren Z, Cheng Y, et al. Review and prospect on portable mass spectrometer for recent applications [J]. *Vacuum*, 2022, 199: 110889.
 - [15] Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, et al. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(4): 333–358.
 - [16] Schulze B, Jeon Y, Kaserzon S, et al. An assessment of quality assurance/quality control efforts in high resolution mass spectrometry non-target workflows for analysis of environmental samples[J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2020, 133: 116063.
 - [17] Lacalle-Bergeron L, Izquierdo-Sandoval D, Sancho JV, et al. Chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry in untargeted metabolomics for investigation of food(bio) markers[J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2021, 135: 116161.
 - [18] Alarcon-Barrera JC, Kostidis S, Ondo-Mendez A, et al. Recent advances in metabolomics analysis for early drug development[J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(6): 1763–1773.
 - [19] González-Domínguez R, González-Domínguez Á, Sayago A, et al. Recommendations and best practices for standardizing the pre-analytical processing of blood and urine samples in metabolomics[J]. *Metabolites*, 2020, 10(6): 229.
 - [20] Ulmer CZ, Maus A, Hines J, et al. Challenges in translating clinical metabolomics data sets from the bench to the bedside[J]. *Clin Chem*, 2021, 67(12): 1581–1583.
 - [21] Yang H, Wang JB, Zhang JY, et al. Family history and risk of upper gastrointestinal cancer in the Linxian general population[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 605106.
 - [22] Wang SM, Taylor PR, Fan JH, et al. Effects of nutrition intervention on total and cancer mortality: 25-year post-trial follow-up of the 5.25-year Linxian Nutrition Intervention Trial[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110(11): 1229–1238.
 - [23] Moodi M, Tavakoli T, Tahergorabi Z. Crossroad between obesity and gastrointestinal cancers: a review of molecular mechanisms and interventions[J]. *Int J Prev Med*, 2021, 12: 18.
 - [24] 魏梦珂. 吸烟饮酒所致食管鳞状上皮病变的中介代谢物分析[D]. 济南: 山东大学, 2021.
 - Wei MK. The mediation analysis of serum metabolites on the relationship between smoking or drinking and esophageal squamous epithelial lesion[D]. Jinan: Shandong University, 2021.
 - [25] 闫茂慧, 陈静, 俞伟, 等. 肝细胞生长因子受体在食管癌中的研究进展[J]. *癌症进展*, 2019, 17(12): 1368–1370.
 - Yan MH, Chen J, Yu W, et al. Advances in the study of hepatocyte growth factor receptors in esophageal cancer[J]. *Oncology Progress*, 2019, 17(12): 1368–1370.
 - [26] Zang B, Wang W, Wang Y, et al. Metabolomic characterization reveals ILF2 and ILF3 affected metabolic adaptations in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 721990.
 - [27] Lam AK. Updates on World Health Organization classification and staging of esophageal tumors: implications for future clinical practice[J]. *Hum Pathol*, 2021, 108: 100–112.
 - [28] 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.
 - [29] Yu J, Zhao J, Zhang M, et al. Metabolomics studies in gastrointestinal cancer: a systematic review [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 14(1): 9–25.
 - [30] Tokunaga M, Kami K, Ozawa S, et al. Metabolome analysis of esophageal cancer tissues using capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(6): 1947–1958.
 - [31] 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.
 - [32] Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: Historical dogma versus current understanding [J]. *J Physiol*, 2021, 599(6): 1745–1757.
 - [33] 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.
 - [34] Zhang X, 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.
 - [35] Lyu J, Wang J, Shen X, et al. A serum metabolomics analysis reveals a panel of screening metabolic biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(5): e419.