

• 论 著 •

基于 MALDI-TOF-MS 技术建立非小细胞肺癌 诊断预测模型及其初步验证^{*}

宋御繁^{1,2}, 周亚男^{2,3}, 张 婷², 王娜娜², 陈英剑^{2▲}, 胡成进^{2△}(1. 山东第一医科大学/山东省医学科学院, 山东泰安 271016; 2. 中国人民解放军第九六〇医院
实验诊断科, 山东济南 250031; 3. 潍坊医学院医学检验学系, 山东潍坊 261053)

摘 要:目的 应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术结合 ClinProTools 系统软件筛选非小细胞肺癌(NSCLC)患者与体检健康者血清中的差异蛋白/多肽,建立 NSCLC 诊断预测模型,寻找 NSCLC 潜在血清肿瘤标志物。**方法** 收集经组织病理学活检确诊的 56 例 NSCLC 患者及 56 例体检健康者血清标本,按照 3:1 比例分为训练组(NSCLC 患者 42 例,体检健康者 42 例)和验证组(NSCLC 患者 14 例,体检健康者 14 例)。采用弱阳离子交换磁珠(WCX-MB)富集血清标本中的低丰度蛋白/多肽,应用 MALDI-TOF-MS 技术进行检测,得到相应的蛋白/多肽指纹图谱,筛选两组间差异蛋白/多肽,建立 NSCLC 诊断预测模型,并进行初步验证。**结果** 经 ClinProTools 系统软件分析,筛选出 11 个多肽峰差异有统计学意义($P < 0.000\ 001$)。与体检健康者相比,NSCLC 患者质荷比为 5 906.73 与 2 953.73 的两个峰差异最明显,其受试者工作特征曲线下面积分别为 0.96、0.86。运用遗传算法建立 NSCLC 诊断预测模型,经盲法验证,此模型灵敏度为 92.9%,特异度为 91.7%,准确度为 92.3%。**结论** NSCLC 患者与体检健康者血清中存在差异性蛋白/多肽,应用 MALDI-TOF-MS 技术建立的诊断预测模型能较好地用于 NSCLC 辅助诊断,为 NSCLC 早期诊断提供了一种新的策略。

关键词:非小细胞肺癌; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 蛋白质组学; 诊断预测模型; 肿瘤标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.16.001

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2020)16-1921-05

文献标识码:A

Establishment and preliminary validation of a diagnostic prediction model based on MALDI-TOF-MS for non-small cell lung cancer^{*}

SONG Yufan^{1,2}, ZHOU Yanan^{2,3}, ZHANG Ting², WANG Nana², CHEN Yingjian^{2▲}, HU Chengjin^{2△}(1. Shandong First Medical University/Shandong Academy of Medical Sciences,
Tai'an, Shandong 271016, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the 960th Hospital of the
PLA, Jinan, Shandong 250031, China; 3. Medical Laboratory Sciences, Weifang Medical
University, Weifang, Shandong 261053, China)

Abstract: Objective To screen the differential peptides in the serum of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and healthy controls based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) combined with ClinProTools system software, and to establish a diagnostic predictive model for finding potential tumor markers for NSCLC. **Methods** Serum samples from 56 patients with NSCLC diagnosed by pathology and 56 healthy controls were divided into training group (42 patients and 42 healthy controls) and validation group (14 patients and 14 healthy controls). The low-abundance proteins/peptides in serum samples was enriched by weak cation-exchange chromatography Magnetic Beads (WCX-MB), and the corresponding protein expression fingerprints were obtained by MALDI-TOF-MS. Differential proteins/peptides were screened and a diagnostic model for preliminary validation of NSCLC with ClinProTools system software was established. **Results** A total of 11 peptide peaks selected through ClinProTools system software had significant statistical differences ($P < 0.000\ 001$). The area under the receiver operating

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81472497)。

作者简介:宋御繁,女,在读硕士研究生,主要从事质谱蛋白质组学的研究。△ 通信作者,E-mail:hcj6289@163.com。▲ 共同通信作者,E-mail:yjqchen@126.com。

本文引用格式:宋御繁,周亚男,张婷,等.基于 MALDI-TOF-MS 技术建立非小细胞肺癌诊断预测模型及其初步验证[J].国际检验医学杂志,2020,41(16):1921-1925.

characteristics curve values of the two peaks m/z 5 906.73 and m/z 2 953.73 which were most significant were 0.96 and 0.86 respectively, both of which were up-regulated in the NSCLC patients. The validation results showed that the sensitivity, specificity and accuracy of the diagnostic prediction model established by the Genetic Algorithm were 92.9%, 91.7% and 92.3% respectively. **Conclusion** There are differential proteins/peptides in the serum of NSCLC patients and healthy controls. The diagnostic model of NSCLC established by MALDI-TOF-MS could be used for NSCLC diagnosis, which provides a new strategy for early diagnosis of NSCLC.

Key words: non-small cell lung cancer; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; proteomics; diagnostic prediction model; tumor marker

肺癌是世界范围内癌症患者死亡的主要原因,全球每年新发肺癌患者约 180 万例,肺癌死亡人数占癌症死亡总人数的 18.4%^[1]。肺癌患者中约 85% 为非小细胞肺癌(NSCLC)^[2]。由于早期发病隐匿,超过 75% 的 NSCLC 患者初诊时已为中晚期,丧失最佳的手术治疗时机,5 年生存率低于 15%^[3]。为了提高 NSCLC 患者的长期生存率,必须对患者进行早期、正确的诊断及治疗。目前,支气管镜取组织活检是诊断肺癌的常用方法,但其为有创检查,可对患者造成一定损伤,不适用于所有患者。CT 的应用在一定程度上提高了肺癌的早期诊断率,但其假阳性率高,且存在辐射的危害^[4]。传统的血清肿瘤标志物作为最常用的肺癌初筛方法,灵敏度和特异度较低,缺乏足够的临床有效性,不适合用于肺癌的早期诊断。因此,临床上迫切需要更有效的检测方法辅助早期诊断 NSCLC。近年来,致力于寻找肿瘤标志物的蛋白质组学研究多采用质谱技术。然而,由于血液蛋白质水平范围较大,对蛋白质组学分析提出了挑战。低丰度蛋白在疾病早期可能具有一定特异性,但由于高丰度蛋白的优势掩盖,传统质谱技术无法对其进行准确检测^[5]。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)作为一种新兴蛋白质组学研究技术,将质谱技术与磁珠技术相结合,利用磁珠选择性纯化血清中的低丰度蛋白,通过 MALDI-TOF-MS 直接分析,具有高灵敏度、高特异度、高通量的特点,为寻找

NSCLC 早期诊断的肿瘤标志物提供了新的发展方向和技术支持。本研究旨在应用 MALDI-TOF-MS 技术结合 ClinProTools 系统分析 NSCLC 患者及体检健康者血清蛋白质指纹图谱,从中筛选差异蛋白/多肽,建立诊断预测模型,并评估其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2018 年 10 月至 2019 年 6 月中国人民解放军第九六〇医院收治的具有完整临床资料的 56 例 NSCLC 患者作为病例研究对象,其中男 33 例,女 23 例;年龄 25~72 岁,中位年龄 62 岁。病例纳入标准:(1)患者经组织病理学活检初次确诊为 NSCLC;(2)既往未经其他手术治疗及放化疗;(3)具有完整临床病理学诊断资料;(4)无其他恶性肿瘤病史。选择 56 例同期门诊体检健康者作为健康对照者,其中男 37 例,女 19 例;年龄 26~75 岁,中位年龄 61 岁。健康对照者纳入标准:(1)经体检各项检测指标均正常;(2)无肿瘤,无糖尿病、高血压等代谢性疾病,无炎症性疾病,无心、肝、肾等重要脏器疾病;(3)无手术史及输血史。按照 3:1 比例将病例与健康对照者随机分为训练组(NSCLC 患者 42 例,体检健康者 42 例)和验证组(NSCLC 患者 14 例,体检健康者 14 例)。训练组用以建立 NSCLC 诊断模型;验证组用以评估模型的诊断效能。各组中 NSCLC 患者与体检健康者一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组一般资料比较

受试者类型	n	年龄	性别[n(%)]		吸烟[n(%)]		组织学类型[n(%)]			临床分期[n(%)]			
		[岁, $M(\text{Min} \sim \text{Max})$]	男	女	是	否	腺癌	鳞癌	其他类型	I期	II期	III期	IV期
训练组													
NSCLC 患者	42	63(25~72)	24(57.1)	18(42.9)	26(61.9)	16(38.1)	29(69.0)	12(28.6)	1(2.4)	7(16.7)	2(4.8)	12(28.6)	21(50.0)
体检健康者	42	61(26~75)	27(64.2)	15(35.7)	24(57.1)	18(42.9)	—	—	—	—	—	—	—
P		0.409	0.503		0.657		—	—	—	—	—	—	—
验证组													
NSCLC 患者	14	61(49~69)	9(64.3)	5(35.7)	9(64.3)	5(35.7)	11(78.6)	3(21.4)	0(0.0)	3(21.4)	1(7.1)	4(28.6)	6(42.9)
体检健康者	14	59(46~75)	10(71.4)	4(28.6)	8(57.1)	6(42.9)	—	—	—	—	—	—	—
P		0.625	0.686		0.699		—	—	—	—	—	—	—

注:—为无数据。

1.2 仪器与试剂 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(Autoflex Speed MALDI-TOF /TOF MS)购自德国 Bruker Daltonics 公司;2114 型号磁珠分离器

购自美国 Life Technologies 公司;低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;弱阳离子交换磁珠(WCX-MB)试剂盒、MTP AnchorChip 384 BC 靶板购自德国

Bruker Daltonics 公司; FlexControl、ClinProTools 系统软件; 蛋白/多肽标准品购自德国 Bruker Daltonics 公司; α -氰基-4 羟基肉桂酸(HCCA)、色谱级无水乙醇(HPLC)、色谱级乙腈(CAN)、三氟乙酸(TFA)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 双蒸水购自捷世康生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集所有受试者清晨空腹静脉血 5 mL 于真空采血管中, 室温下静置 30 min, 3 000 r/min 离心 5 min。将离心后的标本取上层血清分装至 0.5 mL EP 管中, 每管 100 μ L, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

1.3.2 磁珠提取血清蛋白/多肽 将冻存血清标本从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出, 分别在 -20 $^{\circ}$ C 和 4 $^{\circ}$ C 冰箱逐步复融 8 h 和 6 h, 复融后 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 3 min。以下操作步骤均于冰上进行: (1) 取 10 μ L WCX-MB 试剂和 10 μ L 结合缓冲液(BB)于 0.5 mL EP 管中, 加样枪上下吸打混匀; (2) 向 EP 管中加入 5 μ L 血清, 混匀后静置 5 min, 避免产生气泡; (3) 磁珠分离器分离磁珠 1 min, 弃去上清; (4) 向 EP 管中加入 100 μ L 洗涤缓冲液(WB), 于磁珠分离器上将两样品管交换移动 10 次, 静置 1 min, 弃去上清; (5) 重复步骤(4)两次; (6) 加入 5 μ L 洗脱缓冲液(EB), 充分混匀, 避免产生气泡, 于磁珠分离器上贴壁静置 2 min, 将上清液移入新 EP 管中; (7) 向 EP 管中加入 5 μ L 稳定缓冲液(SB), 混匀后进行 MALDI-TOF-MS 分析。

1.3.3 仪器校准与质量控制 检测前使用蛋白/多肽混合标准品对仪器进行校正。随机选取 30 例体检健康者血清标本各 5 μ L 混合成质量控制样品, 以评估质谱仪的稳定性。将质量控制样品经磁珠提取蛋白/多肽后, 每 15 个标本点一次靶。经质谱上样检测后将获得的质谱峰进行比较, 评估质谱仪的重复稳定性。

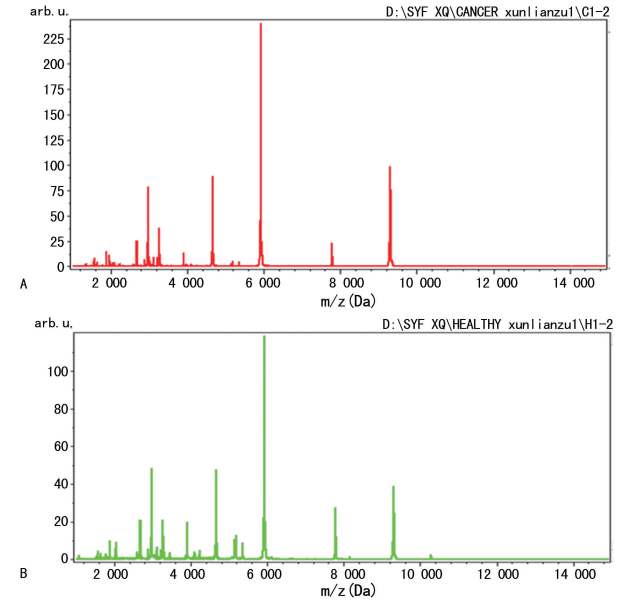
1.3.4 MALDI-TOF-MS 技术检测标本 取 1 μ L 蛋白/多肽标本点到 MTP AnchorChip 384 BC 靶板上, 每份标本点靶 3 次。取 1 μ L 现配制的 6 mg/mL 基质(50% CAN, 2% TFA, 6 mg HCCA)点于干燥后的样品点上, 自然放置干燥后将靶板放入质谱仪中检测。应用 FlexControl 软件采集标本质谱图, 参数设置: 正离子线行模式(LP)下, 采用 75% 的激光强度, 在相对分子质量范围为 $(1\sim10)\times10^3$ 内采集数据, 每个样品点累计轰击 100×20 次。

1.4 统计学处理 应用 ClinProTools 系统软件对质谱图进行数据分析与处理, 包括基线消减、校正和归一化, 选取信噪比(S/N) ≥ 5 的峰进行分析。分别采用遗传(GA)算法、快速分类(QC)算法和监督神经网络(SNN)算法建立模型, 使用验证组验证模型的准确度、特异度和灵敏度, 结合三者选择最佳诊断预测模型。

2 结果

2.1 质量控制标本结果分析 试验过程中每 15 个标本点进行一次质量控制靶点, 经质谱检测后得到 7 个质量控制标本血清蛋白/多肽质谱图, 选取相对分子质量为 $(1\sim10)\times10^3$ 的 7 个峰, 计算同批次内重复性变异系数(CV)均值为 19.01% (范围为 12.57%~25.81%), 仪器在整个试验过程中重复稳定性良好。

2.2 血清蛋白/多肽指纹图谱分析 采用 ClinProTools 系统软件对 NSCLC 患者及体检健康者原始图谱进行分析, 得到 NSCLC 患者与体检健康者的血清蛋白质/多肽指纹图谱, 见图 1。在质荷比(m/z)为 $(1\sim10)\times10^3$ 时, 筛选出差异有统计学意义 [$P<0.000\,001$, 受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC) >0.80] 的多肽峰 11 个, 具体结果见表 2。除 m/z 为 5 906.73、3 242.63、2 953.73 的峰在 NSCLC 患者中表达上调以外, 其余 8 个峰均表达下调。其中 m/z 为 5 906.73 与 2 953.73 的两个峰差异最明显, 其 AUC 分别为 0.96 与 0.86, NSCLC 患者多肽峰 m/z 5 906.73 与 m/z 2 953.73 的峰强度明显高于健康对照者, 其平均谱峰图及 ROC 曲线见图 2。



注: A 为 NSCLC 患者血清蛋白/多肽指纹图谱; B 为体检健康者血清蛋白/多肽指纹图谱。

图 1 NSCLC 患者与体检健康者的血清蛋白/多肽指纹图谱

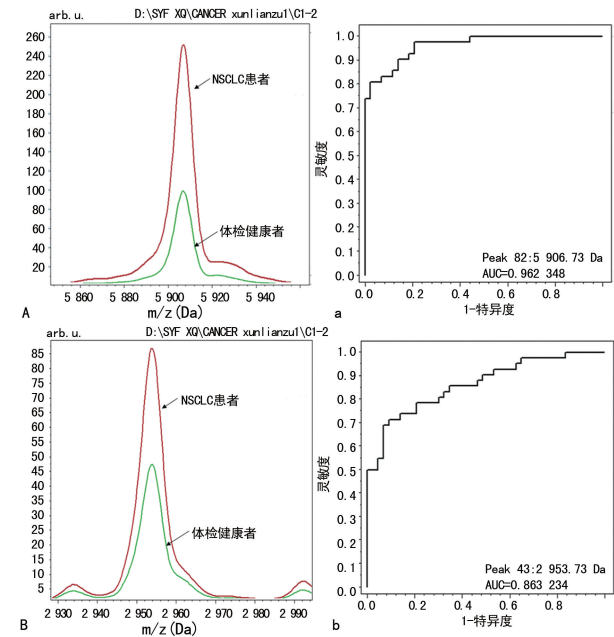
表 2 NSCLC 患者与体检健康者差异蛋白/多肽峰($\bar{x}\pm s$)

m/z	NSCLC 患者	体检健康者	在 NSCLC 患者表达变化	P
5 906.73	230.83 $\pm$ 43.71	140.54 $\pm$ 32.00	↑	<0.000 001
3 242.63	28.31 $\pm$ 12.39	17.24 $\pm$ 8.52	↑	<0.000 001
2 953.73	87.7 $\pm$ 18.41	62.07 $\pm$ 13.36	↑	<0.000 001
2 588.76	2.59 $\pm$ 0.84	3.91 $\pm$ 1.19	↓	<0.000 001
2 105.66	1.56 $\pm$ 0.80	2.68 $\pm$ 1.53	↓	<0.000 001

续表 2 NSCLC 患者与体检健康者差异蛋白/多肽峰($\bar{x} \pm s$)

m/z	NSCLC 患者	体检健康者	在 NSCLC 患者 表达变化	P
1 066.65	0.99±0.69	1.97±1.12	↓	<0.000 001
2 322.86	1.49±0.40	2.2±0.58	↓	<0.000 001
1 042.69	1.03±0.49	1.74±0.70	↓	<0.000 001
4 055.47	1.10±0.30	1.61±0.49	↓	<0.000 001
7 470.31	0.44±0.14	0.66±0.18	↓	<0.000 001
9 433.09	0.27±0.10	0.38±0.12	↓	<0.000 001

注: ↑ 为表达上调; ↓ 为表达下调。



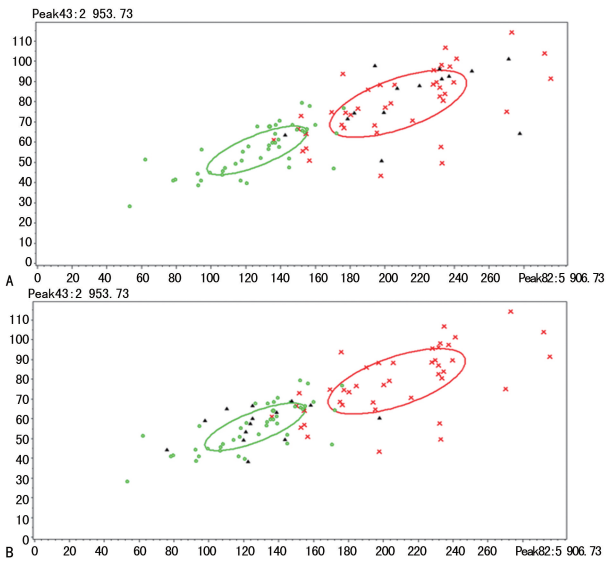
注: A、B 分别为 m/z 5 906.73 与 m/z 2 953.73 的平均谱峰图; a、b 分别为 m/z 5 906.73 与 m/z 2 953.73 的 ROC 曲线。

图 2 差异最明显两个峰的平均谱峰图及 ROC 曲线

2.3 NSCLC 诊断预测模型建立及验证 应用 Clin-ProTools 系统软件分别基于 GA、SNN、QC 这 3 种不同算法建立诊断模型,并使用验证组验证模型诊断效能,结果见表 3。经验证比较发现,GA 算法模型效能最佳;选取差异最明显的 2 个峰 m/z 5 906.73 和 m/z 2 953.73 分别作为 X、Y 轴做聚类分析,结果见图 3, NSCLC 患者与体检健康者两组间区分明显。在 GA 算法模型下进行验证组验证:14 例 NSCLC 患者中正确判断 13 例,错误判断 1 例;14 例体检健康者中正确判断 11 例,错误判断 1 例,另 2 例未识别。得到 GA 模型灵敏度为 92.9%,特异度为 91.7%,准确度为 92.3%。

表 3 3 种诊断预测模型的诊断效能(%)

算法	识别能力	交叉验证	灵敏度	特异度	准确度
GA	98.84	89.21	92.9	91.7	92.3
SNN	100.00	93.84	85.7	91.7	88.5
QC	96.43	91.8	92.9	83.3	88.5



注: A 为验证组 NSCLC 患者血清标本聚类分析结果; B 为验证组体检健康者血清标本聚类分析结果; × 为训练组 NSCLC 患者, 圆形为训练组体检健康者, ▲ 为验证组体检健康者。

图 3 基于质谱峰 m/z 5 906.73 和 m/z 2 953.73 的聚类分析结果

3 讨论

近年来,蛋白质组学的不断发展为肿瘤特异性生物标志物的发现打开了新的思路。目前,质谱分析是肿瘤蛋白质组学检测的核心技术,主要包括表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)^[6]、MALDI-TOF-MS 等,其中 SELDI-TOF-MS 所使用的蛋白芯片有效表面积较小,对于低丰度蛋白富集不完全^[7],不能完整反映低丰度蛋白所含有生物标志物信息。此外,由于自身技术可重复性较差,易受多种因素影响,对于相同疾病的研究,两个不同实验室获得的结果较难达到一致^[8]。传统蛋白质组学研究工具二维凝胶电泳(2D-PAGE)技术费时费力,操作复杂,技术本身存在有限的动态覆盖范围,对低丰度蛋白分离效果不佳^[9]。而基于磁珠分离技术的 MALDI-TOF-MS 与 ClinProTools 生物信息学分析相结合是近年来新开发的一种高重现性、高分辨率的新型蛋白质组学技术,其优点在于不仅可以利用多种磁珠从复杂样品中筛选生物标志物及其特异性指纹图谱,还可利用串联质谱(MS/MS)技术同时识别潜在的特异性蛋白。本研究中采用 WCX-MB 富集血清中的低丰度蛋白/多肽,能够排除大分子蛋白的干扰,只需 5 μL 血清即可快速获得患者的蛋白/多肽指纹图谱,此技术操作简便、准确度高,将高通量的样品处理系统与高效能的生物信息学分析工具相结合,使试验结果更加可靠,适用于大量标本检测。

肺癌的发生和发展是一个多步骤的过程^[10],其特征是异常基因改变和蛋白表达导致细胞表型的转化及肿瘤加速进展,这个过程涉及复杂的分子信号通路和多种细胞蛋白^[11]。除肺癌的遗传学特征外,还需解

决其对蛋白质生物标志物的需求,以便能够对肺癌进行准确的早期诊断,监测疾病进展^[12]。LIN 等^[13]同样采用 WCX-MB 提取肺腺癌患者与体检健康者血清标本中的低丰度蛋白,通过 ClinProTools 系统软件建立诊断预测模型,灵敏度为 94%,特异度为 95%,此研究与本试验获得的峰大多不同,只有 m/z 2 104. 83 与 m/z 4 054. 06 的峰与本试验中 m/z 2 105. 66 及 m/z 4 055. 47 的峰结果相近,有待于对其进行 Mascot 蛋白数据库搜索验证及二级质谱鉴定。

本研究通过 MALDI-TOF-MS 技术与 ClinProTools 系统软件相结合,运用 GA 算法建立 NSCLC 诊断预测模型,具有较高的灵敏度和特异度,适合用于 NSCLC 高危人群的筛查及辅助诊断。筛选出的 m/z 5 906. 73 与 m/z 2 953. 73 差异蛋白/多肽有望成为 NSCLC 潜在的肿瘤标志物,但由于标本量较少,研究结果存在偏倚的可能性。此次试验中使用 WCX-MB 提取差异性蛋白/多肽,不能代表血清中的全部蛋白/多肽谱,可能导致试验结果不全面,在后续的试验中需结合其他多种类型的磁珠或方法对血清标本进行前处理。此外,研究中使用的标本主要来源于肺腺癌患者,且患者多为晚期,在后续研究中会进一步扩大标本量,纳入更多早期患者及肺鳞癌等其他组织学类型患者的血清标本,丰富试验内容,细化分组,进一步验证该诊断预测模型的诊断效能。对于本试验所获得的差异蛋白/多肽,后续会通过高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)法对其进行鉴定,以进一步研究候选血清肿瘤标志物在 NSCLC 发病机制中的生物学作用。

4 结 论

本试验基于高通量 MALDI-TOF-MS 技术联合 ClinProTools 系统软件建立 NSCLC 诊断预测模型,能够以较高的灵敏度和特异度鉴别 NSCLC 患者和体检健康者,具有较好的诊断效能。同时,研究发现两个具有诊断价值的差异蛋白/多肽有望成为新的 NSCLC 血清肿瘤标志物,为后续鉴定及体内生物学效应研究奠定了基础,具有重大临床意义。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] BRAHMER J R, GOVINDAN R, ANDERS R A, et al. The society for immunotherapy of cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of non-small

cell lung cancer (NSCLC) [J]. J Immunother Cancer, 2018, 6(1): 75-80.

[3] VERDECCHIA A, FRANCISCI S, BRENNER H, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCARE-4 data[J]. Lancet Oncol, 2007, 8(9): 784-796.

[4] ABERLE D R, ADAMS A M, BERG C D, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening[J]. N Engl J Med, 2011, 365(5): 395-409.

[5] SHEN Q, POLOM K, WILLIAMS C, et al. A targeted proteomics approach reveals a serum protein signature as diagnostic biomarker for resectable gastric cancer [J]. EBio Med, 2019, 44: 322-333.

[6] SIMSEK C, SONMEZ O, KEYF A I, et al. Importance of serum SELDI-TOF-MS analysis in the diagnosis of early lung cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(3): 2037-2042.

[7] 王娜娜, 张婷, 宋御繁, 等. 基于蛋白质谱技术建立胃癌诊断预测模型及其初步验证[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(22): 2741-2745.

[8] FREED G L, CAZARES L H, FICHANDLER C E, et al. Differential capture of serum proteins for expression profiling and biomarker discovery in pre- and posttreatment head and neck cancer samples[J]. Laryngoscope, 2008, 118(1): 61-68.

[9] DENG F, ZHOU K, LI Q, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016, 37(2): 1909-1918.

[10] ZUPA A, IMPROTA G, SILVESTRI A, et al. A pilot characterization of human lung NSCLC by protein pathway activation mapping [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(12): 1755-1766.

[11] HAJDUK J, MATYSIAK J, KOKOT Z J. Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS [J]. Clin Chim Acta, 2016, 458: 84-98.

[12] OSMANI L, ASKIN F, GABRIELSON E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): moving from targeted therapy to immunotherapy[J]. Semin Cancer Biol, 2018, 52(Pt 1): 103-109.

[13] LIN X L, YANG S Y, DU J, et al. Detection of lung adenocarcinoma using magnetic beads based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry serum protein profiling [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(1): 34-39.