

质谱技术在头颈癌分子标志物探究中的应用

孙宏洋

内蒙古医科大学第一临床医学院, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2023年10月1日; 录用日期: 2023年10月27日; 发布日日期: 2023年11月3日

摘要

头颈癌(HNC)是世界上第六大常见癌症, 包括发生在几个部位的肿瘤(口腔和鼻腔、鼻窦、唾液腺、咽和喉)。但疗效和预后不能令人满意。早诊断、早治疗是提高生存率、改善患者生活质量、降低病死率的关键。质谱技术的飞速发展为疾病的诊断提供了新方法, 该技术被广泛应用于头颈癌分子标志物的探究中。主要介绍质谱技术在头颈癌患者的各种类型标本(如血液、唾液、尿液)中探究标志物的进展, 对质谱技术在头颈癌诊断, 治疗, 预后等方面的应用进行综述。

关键词

质谱技术, 头颈癌, 分子标志物

Application of Mass Spectrometry Technology in Exploring Molecular Markers of Head and Neck Cancer

Hongyang Sun

First Clinical Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia

Received: Oct. 1st, 2023; accepted: Oct. 27th, 2023; published: Nov. 3rd, 2023

Abstract

Head and neck carcinoma (HNC) is the sixth most common cancer in the world and includes tumours that occur in several sites (oral and nasal cavities, sinuses, salivary glands, pharynx and larynx). However, the outcome and prognosis are unsatisfactory. Early diagnosis and treatment are key to increasing survival rates, improving patients' quality of life and reducing mortality rates. The rapid development of mass spectrometry has provided new methods for the diagnosis of the disease, and the technique is widely used in the exploration of molecular markers for head and

neck cancer. This article introduces the progress of mass spectrometry in the detection of markers in various types of specimens (blood, saliva, urine) from head and neck cancer patients, and provides a review of the application of mass spectrometry in the diagnosis, treatment and prognosis of head and neck cancer.

Keywords

Mass Spectrometry, Head and Neck Cancer, Molecular Markers

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

头颈癌(HNC)是癌症导致死亡的第七大常见原因, 约占全球所有癌症病例的 6% [1]。每年有 80 多万新病例和 40 多万死亡病例[2]。其疗效和预后不能令人满意, 治疗也尚欠规范, 仍严重危害着人类健康[3] [4]。因此, 早诊断、早治疗是提高生存率、改善患者生活质量、降低病死率的关键。肿瘤标志物的发现可提高头颈癌的早期诊断率[5]。此外, 现在随着质谱技术的飞速发展, 利用质谱技术对肿瘤标志物进行研究是目前热点之一[6]。

2. 质谱技术概述

质谱仪简介

质谱仪简单定义就是它是一台可以电离分子样品并测量所得离子的质荷比的仪器。质谱仪由离子源、质量分析仪和检测器组成[7]。分子需要转化为气相离子, 因此需要一种将分子从溶液或固相作为离子转移到气相的方法。然后在质量分析仪中根据质荷比分离离子。质量分析仪中的离子运动可以通过电场或磁场来控制, 以 m/z 依赖的方式将离子引导到检测器[8]。目前, 主要的生物质谱技术包括电喷雾离子化(electro spray ionization, ESI)和基质辅助激光解吸离子化质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDITOF-MS) [9]。ESI 将分析物从溶液中电离出来, 因此很容易与基于液体的分离工具耦合。MALDI 通过激光脉冲将样品从干燥的晶体基质中升华和电离。MALDI-MS 通常用于分析相对简单的多肽混合物, 而集成液相色谱 ESI-MS 系统(LC-MS)更适合分析复杂样品。目前用于蛋白质组学研究的质谱分析仪有四种基本类型。这些是离子阱, 飞行时间(TOF), 四极杆, 轨道陷阱(orbitrap)和傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(FT-ICR)分析仪。它们的设计和性能各不相同, 各有优缺点。这些分析器可以单独使用, 也可以在某些情况下串联在一起, 以利用每个分析器的优势[7]。

3. 基于质谱技术的液体及气体活检探索头颈癌分子标志物

在临床环境中使用生物标志物可能有助于早期诊断, 预测肿瘤反应, 指导治疗选择, 并有助于患者随访, 从而提高患者的生存率和改善生活质量[10]。液体活检是一种对血浆、血清、唾液、漱口水和尿液等物质进行生物流体检测的方法, 与组织活检相比, 体液在可获得性、低侵入性、低成本和可多次采样监测疾病发展等方面的优势, 仍然是疾病筛查、诊断和监测的最佳选择[11] [12] [13]。

迄今为止,已有数百项关于体液中发现的 HNC 生物标志物的研究。最常见的含有可靠生物标记物的体液包括外周血和唾液[14]。

3.1. 血浆/血清

血浆/血清是辅助检查最常用的样本,在头颈癌分子标志物的质谱分析研究中应用广泛。早在 20 年前 Christine 等[14]对 78 例 HNSCC 患者和 68 名健康对照志愿者的血清用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱法(SELDI-TOF-MS),鉴定 0~100 kDa 范围内的蛋白峰,经过背景减除、质量校准和归一化,鉴定出 545 个蛋白峰。基于峰值表达的分类树分析正确地对 HNSCC 患者进行分类,敏感性为 82%,特异性为 76%。假设生物分子及其在血清中的表达量反映了个体的特定生理/疾病状态,那么该实验最早证明了蛋白质生物标志物并可开发出新的辅助手段以筛查 HNSCC 高风险患者。Christine 等[15]又对 46 例 HNSCC 复发患者和 91 名对照志愿者的血清,使用 2D DIGE/MALDI-TOF-MS 进行蛋白谱分析,鉴定出治疗后 6 个月或更长时间采集的治疗前和治疗后样品中有 181 种蛋白表达差异。根据疾病状态确定 HNSCC 中具有显著差异表达的蛋白。复发性 HNSCC 与几种蛋白酶抑制剂和具有抗血管生成特性的激肽原的低表达、TSA 的过表达以及几种载脂蛋白 A1 (可能作为载体分子,但也可能通过激酶激活间接促进肿瘤存活)有关。可见蛋白质组学在质谱技术上的应用,不仅可在疾病的诊断还可在其预后效果的评估有着很大帮助。

此外近年来,质谱技术在血清代谢组学方面对头颈肿瘤分子标志物的探索也存在巨大的研究前景,Zhang 等[16]采用液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术对 22 名喉癌患者和 26 名健康对照志愿者的血清代谢组学进行了研究。采用单因素和多因素统计方法对喉癌患者和健康人进行区分。1-棕榈酰-n-甘油-3 磷酸胆碱(LysoPC 16:0)、1-o-十六烷基-2-乙酰基-n-甘油-3-磷酸胆碱(PAF)、1,2-二棕榈酰-n-甘油-3-磷酸胆碱在喉癌组与健康组之间存在显著差异。两种代谢物(LysoPC 16:0 和 PAF)联合的生物标志物曲线下面积为 0.935,敏感性为 0.962,特异性为 0.825。LysoPC 16:0 和 PAF 它们可能被用作喉癌诊断的潜在生物标志物。

3.2. 唾液

唾液是一种独特的体液,用于分子诊断的发展,它有潜在的几个优势,因为它可能包含口腔、喉部和咽部的任何基因组、表观基因组、蛋白质组学和生理/病理改变不同蛋白质组基因组的讯号;是一种非侵入性、廉价、更容易获得病变资讯的筛查工具;更提供了实时监测 HNC 患者的机会。因为它具有重复采样的灵活性和更大的检查量,而不需要训练有素的医务人员进行采集[17] [18];所以它可以在更大程度上更好的辅助疾病的早期诊断,监测疾病进展和评估疾病的预后。目前质谱技术充分的发展使唾液作为检查成分筛查头颈肿瘤生物标志物成为可能。Sridharan 等[19]使用 q-tof-液相色谱-质谱法对口腔白斑(21 例)和口腔鳞状细胞癌(22 例)患者的唾液代谢组学特征与表面正常对照(18 例)进行比较。使用 MassHunter 分析软件和 Metlin 数据库进行代谢物鉴定。1-甲基组氨酸、肌醇 1,3,4-三磷酸、4-硝基喹啉-1-氧化物、精氨酸、去甲可卡因硝基氧化物、鞘氨酸-1-磷酸和假尿嘧啶在口腔白斑和 OSCC 中显著上调。在患病组中下调的化合物包括 1-同型半胱氨酸、泛醌、神经氨酸和雌二醇。揭示了唾液代谢组学在鉴别肿瘤特异性生物标志物、早期诊断和预测 OSCC 和口腔白斑方面具有重要的应用前景。Song 等[20]使用导电聚合物喷雾电离质谱(CPSI-MS)对 373 名志愿者的唾液样本(其中 124 人健康,124 人有癌前病变,125 人是 OSCC 患者)验证其代谢异常,并确定代谢途径的改变。代谢物标志物通过解吸电喷雾电离 MS 成像(DESI-MSI)在初级组织水平上再次确认,证明了基于唾液代谢组学诊断的可靠性。在机器学习(ML)的帮助下,可以实时区分 OSCC 和癌前病变与正常身体状况,准确率为 86.7%。这些结果提示 CPSI-MS 和 ML 联合应用是临床准确、自动诊断 OSCC 的一种可行工具。

3.3. 尿液

尿液作为人体排除体外重要的代谢物，它含有代谢物、蛋白质、多肽和无机元素，并可能含有癌细胞衍生的分子[21]，因此具有作为生物标志物来源的巨大潜力。另外，它样品取样价格低廉，易于收集和處理，并且可以大量使用。尽管尿液特别适用于泌尿系统肿瘤，但它也可能通过肾小球滤过获得的血浆提供来自其他器官的信息[22]。Taware 等[23]使用采用顶空固相微萃取 - 气相色谱 - 质谱联用(GC-MS)对 29 例 HNC 患者和 31 例健康对照者的尿液进行了挥发性分析。单变量和多变量统计方法均用于研究 HNC 特异性挥发性改变。结果鉴定出 2,6-二甲基-7-辛烯-2-醇、1-丁醇、对二甲苯和 4-甲基-2-庚酮 4 种代谢物具有最高的灵敏度和特异性，可用于区分 HNC 患者和健康对照。Chen 等[24]人采用反相液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱(RPLC-QTOF/MS)分析了 37 例喉癌患者和 29 例健康对照志愿者的尿液代谢物。通过文库检索和标准验证，鉴定并确认了 6 种代谢物(d-泛酸、棕榈酸、肉豆蔻酸、油酰胺、鞘氨酸和植鞘氨酸)。它们主要与鞘脂代谢、脂肪酸生物合成、线粒体脂肪酸延伸、泛酸和辅酶 a 生物合成、 β -丙氨酸代谢和脂肪酸代谢有关。ROC 曲线的 AUC、灵敏度和特异性分别为 0.97、95%和 97%，6 个生物标志物组对喉癌的诊断具有满意的鉴别效果。这些结果为头颈癌患者的挥发性特征的研究提供了很有价值的信息，支持了该方法在头颈肿瘤的分子标志物研究中可以进一步验证、开发和应用。促进了尿液作为非侵入性方法诊断头颈癌的发展。

3.4. 呼吸气体

如上所述，如果尿液是人体排除半挥发性有机代谢物到体外的主要途径；那么呼吸气体则是人体排除挥发性有机代谢物到体外的主要途径[25]。因此，与尿液，唾液同时进行分析工作，可以提供挥发性代谢物的额外信息。也具有作为生物标志物来源的巨大潜力[26]。

4. 利用蛋白组学及代谢组学来确认已知蛋白和分子标志物

综上所述，头颈癌作为我国常见的恶性肿瘤之一，早诊断、早治疗是降低其病死率的关键[27]。

近年来，质谱技术发展迅速且渐趋成熟，各种技术与质谱结合寻找喉癌生物标志物的研究更是层出不穷。目前，基于质谱分析使用液体以及呼吸气体活检筛选癌症代谢分子标志物的研究具有巨大潜力，其易获得性、低侵入性、低成本和可多次采样监测疾病发展等方面的优势，以及可分析多种类型的标本，如血液、尿液、唾液等，其研究成果为改善喉癌的诊疗现状具有重要意义，分子标志物液体活检的质谱应用于喉癌临床诊断、治疗以及预后的时代已经来临[28] [29]。

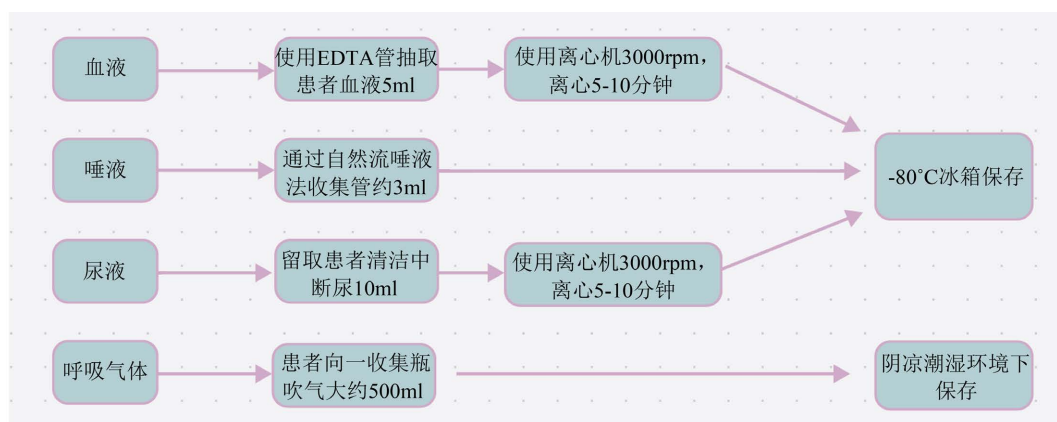


Figure 1. Shows our sampling plan flowchart for these four different samples

图 1. 显示了我们在这四种不同样品的取样计划流程图

Table 1. Shows all possible metabolites we mentioned above, including name, molecular formula, molecular weight, CAS number, and English name**表 1.** 显示了我们在上面提到的所有可能代谢物, 包括名称, 分子式, 分子量, CAS 号, 以及英语名称

名称	分子式	分子量	CAS 号	英语名称
1-甲基组氨酸	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	169.000	332-80-9	1-Methyl-L-histidine
肌醇 1,3,4-三磷酸	C ₆ H ₁₂ O ₁₅ P ₃	420.100	85166-31-0	Inositol 1,4,5-trisphosphate
4-硝基喹啉-1-氧化物	C ₉ H ₆ N ₂ O ₃	190.156	56-57-5	4-Nitroquinoline 1-oxide
精氨酸	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175.186	157-07-3	Argininic acid
去甲可卡因硝基氧化物	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289.33	18717-72-1	NORCOCAINE
鞘氨酸-1-磷酸	C ₁₈ H ₃₈ NO ₅ P	379.472	26993-30-6	sphinganine-1-phosphate
假尿嘧啶	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.201	1445-07-4	Pseudouridine
1-同型半胱氨酸	C ₄ H ₉ NO ₅ S	183.183	14857-77-3	L-Homocysteic acid
泛醌	C ₅₉ H ₉₀ O ₄	863.343	60684-33-5	ubiquinone
神经氨酸	C ₉ H ₁₇ NO ₈	267.233	114-04-5	neuraminic acid
雌二醇	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	356.498	979-32-8	estradiol valerate
2,6-二甲基-7-辛烯-2-醇	C ₁₀ H ₂₀ O	156.265	18479-58-8	Dihydromyrcenol
1-丁醇	C ₄ H ₁₀ O	74.122	71-36-3	Butanol
对二甲苯	C ₈ H ₁₀	106.165	106-42-3	p-Xylene
4-甲基-2-庚酮	C ₈ H ₁₆ O	128.212	6137-06-0	4-METHYL-2-HEPTANONE
d-泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.235	79-83-4	D-Pantothenic acid
棕榈酸	C ₁₅ H ₃₁ CH ₂ O ₂	257.417	287100-87-2	Palmitic acid-13C
肉豆蔻酸	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	299.492	43016-78-0	2-dimethylaminoethyl tetradecanoate
油酰胺	C ₁₈ H ₃₅ NO	281.477	301-02-0	Oleamide
鞘氨酸	C ₁₄ H ₃₁ NO ₆ S	341.464	56607-20-6	d-erythro-sphingosine
植鞘氨酸	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	317.507	13552-11-9	2-Amino-1,3,4-octadecanetriol

以图 1 及表 1 为主, 我们将执行下列不同的步骤, 寻求并且确认最好的, 临床上使用的头颈癌标志物:

- 1) 利用这些已知的标志物, 进行质谱, 已知物的靶向分析, 从临床早期筛查, 疗效和预后上开始着手, 认证这些已知标志物的成效。
- 2) 应用这些相同的样品来进行质谱, 未知物的非靶向分析; 利用大数据寻找高表达的标志物, 并与靶向分析得到的结果结合, 以便寻求在临床早期筛查, 疗效和预后做了一个可以达成我们需要预定的目标。
- 3) 对这些取得的标志物进行最后的临床实验, 验证工作; 进行三个月转换, 申请专利并发表所得结果。

参考文献

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- [2] Ragin, C.C.R., Modugno, F. and Gollin, S.M. (2007) The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: A Focus on Human Papillomavirus. *Journal of Dental Research*, **86**, 104-114. <https://doi.org/10.1177/154405910708600202>
- [3] Svajdova, M., Dubinsky, P. and Kazda, T. (2021) Radical External Beam Re-Irradiation in the Treatment of Recurrent Head and Neck Cancer: Critical Review. *Head & Neck*, **43**, 354-366. <https://doi.org/10.1002/hed.26485>
- [4] Toneatti, D.J., Graf, R.R., Burkhard, J.P., et al. (2021) Survival of Dental Implants and Occurrence of Osteoradionecrosis in Irradiated Head and Neck Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Oral Investigations*, **25**, 5579-5593. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04065-6>
- [5] Basheeth, N. and Patil, N. (2019) Biomarkers in Head and Neck Cancer an Update. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, **71**, 1002-1011. <https://doi.org/10.1007/s12070-019-01683-1>
- [6] Ding, Z., Wang, N., Ji, N., et al. (2022) Proteomics Technologies for Cancer Liquid Biopsies. *Molecular Cancer*, **21**, Article No. 53. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01526-8>
- [7] Aebersold, R. and Mann, M. (2003) Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Nature*, **422**, 198-207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- [8] Zubarev, R.A. and Makarov, A. (2013) Orbitrap Mass Spectrometry. Glish, G.L. and Vachet, R.W. (2003) The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-First Century. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**, 140-150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>
- [9] Wu, J.Y., Yi, C., Chung, H.R., et al. (2010) Potential Biomarkers in Saliva for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncology*, **46**, 226-231. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.01.007>
- [10] Frangogiannis, N.G. (2012) Biomarkers: Hopes and Challenges in the Path from Discovery to Clinical Practice. *Translational Research*, **159**, 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.023>
- [11] Nikanjam, M., Kato, S. and Kurzrock, R. (2022) Liquid Biopsy: Current Technology and Clinical Applications. *Journal of Hematology & Oncology*, **15**, Article No. 131. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
- [12] Lianidou, E. and Pantel, K. (2019) Liquid Biopsies. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **58**, 219-232. <https://doi.org/10.1002/gcc.22695>
- [13] Wang, J., Chang, S., Li, G., et al. (2017) Application of Liquid Biopsy in Precision Medicine: Opportunities and Challenges. *Frontiers of Medicine*, **11**, 522-527. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0526-7>
- [14] Gourin, C.G., Xia, Z.S., Han, Y., et al. (2006) Serum Protein Profile Analysis in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, **132**, 390-397. <https://doi.org/10.1001/archotol.132.4.390>
- [15] Gourin, C.G., Zhi, W. and Adam, B.L. (2009) Proteomic Identification of Serum Biomarkers for Head and Neck Cancer Surveillance. *Laryngoscope*, **119**, 1291-1302. <https://doi.org/10.1002/lary.20279>
- [16] Zhang, X., Hou, H., Chen, H., et al. (2018) Serum Metabolomics of Laryngeal Cancer Based on Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Biomedical Chromatography*, **32**, e4181. <https://doi.org/10.1002/bmc.4181>
- [17] Patel, A., Patel, S., Patel, P. and Tanavde, V. (2022) Saliva Based Liquid Biopsies in Head and Neck Cancer: How Far Are We from the Clinic? *Frontiers in Oncology*, **12**, Article ID: 828434. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.828434>
- [18] Ribeiro, I.P., de Melo, J.B. and Carreira, I.M. (2019) Head and Neck Cancer: Searching for Genomic and Epigenetic Biomarkers in Body Fluids—The State of Art. *Molecular Cytogenetics*, **12**, Article No. 33. <https://doi.org/10.1186/s13039-019-0447-z>
- [19] Sridharan, G., Ramani, P., Patankar, S. and Vijayaraghavan, R. (2019) Evaluation of Salivary Metabolomics in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **48**, 299-306. <https://doi.org/10.1111/jop.12835>
- [20] Song, X., Yang, X., Narayanan, R., Shankar, V., Ethiraj, S., Wang, X., Duan, N., Ni, Y.H., Hu, Q. and Zare, R.N. (2020) Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosed from Saliva Metabolic Profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **117**, 16167-16173. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001395117>
- [21] Vago, R., Ravelli, A., Bettiga, A., Casati, S., Lavorgna, G., Benigni, F., Salonia, A., Montorsi, F., Orioli, M., Ciuffreda, P. and Ottria, R. (2020) Urine Endocannabinoids as Novel Non-Invasive Biomarkers for Bladder Cancer at Early Stage. *Cancers (Basel)*, **12**, Article No. 870. <https://doi.org/10.3390/cancers12040870>
- [22] Bax, C., Taverna, G., Eusebio, L., Sironi, S., Grizzi, F., Guazzoni, G. and Capelli, L. (2018) Innovative Diagnostic Methods for Early Prostate Cancer Detection through Urine Analysis: A Review. *Cancers (Basel)*, **10**, Article No. 123. <https://doi.org/10.3390/cancers10040123>
- [23] Taware, R., Taunk, K., Pereira, J.A.M., et al. (2017) Investigation of Urinary Volatonic Alterations in Head and Neck

-
- Cancer: A Non-Invasive Approach towards Diagnosis and Prognosis. *Metabolomics*, **13**, Article No. 111. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1251-6>
- [24] Chen, J., Hou, H., Chen, H., *et al.* (2019) Urinary Metabolomics for Discovering Metabolic Biomarkers of Laryngeal Cancer Using UPLC-QTOF/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **167**, 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.035>
- [25] Ibrahim, W., Carr, L., Cordell, R., *et al.* (2021) Breathomics for the Clinician: The Use of Volatile Organic Compounds in Respiratory Diseases. *Thorax*, **76**, 514-521. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215667>
- [26] Sisco, E. and Forbes, T.P. (2021) Forensic Applications of DART-MS: A Review of Recent Literature. *Forensic Chemistry*, **22**, Article ID: 100294. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100294>
- [27] Qin, Y., Zheng, X., Gao, W., *et al.* (2021) Tumor Microenvironment and Immune-Related Therapies of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Molecular Therapy-Oncolytics*, **20**, 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.01.011>
- [28] Amalric, A., Bastide, A., Attina, A., *et al.* (2022) Quantifying RNA Modifications by Mass Spectrometry: A Novel Source of Biomarkers in Oncology. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **59**, 1-18. <https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1958743>
- [29] Gasparri, R., Sedda, G., Noberini, R., *et al.* (2020) Clinical Application of Mass Spectrometry-Based Proteomics in Lung Cancer Early Diagnosis. *Proteomics-Clinical Applications*, **14**, Article ID: 1900138. <https://doi.org/10.1002/prca.201900138>