

基于气相色谱-质谱技术的结直肠癌组织和血清的代谢组学研究

尚芳¹, 裴斌², 樊志敏^{2*}

1. 蚌埠市中医医院 肛肠科, 安徽 蚌埠 233300

2. 南京市中医院 肛肠科, 江苏 南京 210000

【摘要】 目的 运用气相色谱-质谱(GS-MS)技术对结直肠癌(CRC)患者的组织和血清进行检测分析,为揭示CRC的发病机制和早期诊断提供基础依据。**方法** 选取南京市中医院肛肠科2020年5月至11月收治的CRC住院患者48例,采集术前和术后1周的血清以及癌组织和正常组织,运用GC-MS技术对样本进行检测分析,分别对照术前和术后血清、癌组织和正常组织的分析结果,找出每组两者之间的差异代谢产物,将差异代谢物导入MetaboAnalyst在线系统进行代谢通路的分析。**结果** 癌组织和正常组织的代谢谱区分度良好,术前和术后血清的区分度欠佳。利用NIST数据库鉴定出与CRC病变相关的血清潜在生物标志物13种,组织生物标志物18种。经过KEGG通路分析,CRC患者体内存在不饱和脂肪酸、半乳糖等代谢异常。**结论** CRC患者体内存在不饱和脂肪酸、半乳糖等代谢异常,血清和组织中鉴定的代谢物有望成为CRC早期诊断的潜在生物标志物。

【关键词】 气相色谱-质谱; 结直肠癌; 代谢组学

Metabolomics study of tissue and blood of CRC based on GC-MS

Shang Fang¹, Pei Bin², Fan Zhimin^{2*}

1. Anorectal Department, Bengbu Traditional Chinese Medicine Hospital, Bengbu 233300, Anhui, China

2. Anorectal Department, Nanjing Chinese Medicine Hospital, Nanjing 210000, Jiangsu, China

*Corresponding author: Fan Zhimin, E-mail: 2303830694@qq.com

[Abstract] Objective In this study, the serum and tissues of CRC patients were detected and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GS-MS), so as to provide a theoretical basis for revealing the pathogenesis and early diagnosis of CRC. **Method** A total of 48 CRC patients were selected which admitted to the Anorectal Department of Nanjing Chinese Medicine Hospital from May to November 2020, and their serum, cancer tissue and normal colorectal tissue were collected before treatment and 1 week after surgical treatment (hereinafter referred to as preoperative and postoperative). **Result** The metabolic spectrum of cancer tissue and normal tissue was good, but the serum differentiation between pre-operation and post-operation was poor. We got 13 potential serum biomarkers and 18 tissue biomarkers related to CRC from the NIST database. According to KEGG pathway analysis, there are metabolic abnormalities such as unsaturated fatty acids and galactose in CRC patients. **Conclusion** The occurrence of CRC is related to metabolic abnormalities such as unsaturated fatty acids and galactose. The metabolites identified in serum and tissue are expected to be potential biomarkers for the early diagnosis of CRC.

[Key words] Gas chromatography-mass spectrometry; Colorectal cancer; Metabolomics

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病率位居全球第三,由于我国人口基数大,CRC的患病人数

众多,且呈逐年递增趋势^[1]。手术治疗是目前治疗CRC的首选方法,但面临创伤大、风险高等问题,对患者而言恢复周期长,经济压力大。同时,与早期患者相比中晚期患者预后较差^[2]。因此,CRC的早发现、早治疗尤为重要。

基金项目:江苏省重点研究发展计划(社会发展)专项资金(BE2021611)

*通信作者:樊志敏, E-mail: 2303830694@qq.com

恶性肿瘤是由多种因素共同作用造成机体功能紊乱的复杂疾病,其组织与人体正常组织在代谢方面有着显著差异^[3-4]。代谢组学从微观视角检测生物体变化情况,能够尽早准确找出诱发疾病发生的代谢标志物。同时可以从分子层面明确揭示发病机制,从而实现疾病的早期诊断和治疗。本研究收集CRC患者的血清和组织,采用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)技术检测血清和组织中代谢物,找出术前、术后血清以及癌组织和正常组织之间差异代谢物,为CRC的早期诊断提供新方法。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 选取南京市中医院肛肠科2020年5月至11月收治的CRC住院患者48例。其中女性20例,男性28例,患者平均年龄(65.23±12.21)岁。本研究已通过南京市中医院伦理委员会伦理审查(伦理批号KY2020081),研究对象均自愿签署知情同意书。

1.2 诊断标准 符合《结直肠癌诊疗规范(2015版)》^[5]中的诊断标准:①有支持的临床症状、相关体征、肿瘤标志物阳性等指征;②肠镜、计算机断层扫描等物理检查显示有CRC征象;③通过病理学检查明确诊断为CRC。

1.3 纳入和排除标准 纳入标准:①符合以上诊断标准,且明确选择手术治疗的患者;②年龄在18~85岁之间;③能够积极配合后续随访的患者;④能够正确理解并自愿签署知情同意书。排除标准:①有其他器官严重的器质性病变和免疫、代谢、血液等基础疾病者;②妊娠期及哺乳期女性;③并发其他部位原发肿瘤的患者;④过敏体质者;⑤患有精神疾病或意识障碍不能配合者。

1.4 研究方法

1.4.1 样本采集 血液:在研究对象入院时抽取空腹血5 ml存入抗凝管中,摇匀。离心后,吸取上清液存入-80℃冰箱保存。研究对象手术治疗后1周再次抽取血液,同法处理。组织:手术中切除标本癌组织和正常组织,存入冻存管,液氮冷冻。

1.4.2 仪器与试剂 仪器:离心机(力辰 LX-H85C)、涡旋混合器(vortex-2500mt)、真空离心干燥机(DZF-6210AB)、气相色谱-质谱联用仪(Agilent 7890B-5977B)

试剂:十七烷酸(伊卡)、甲醇(大茂)、氯仿(析

标)、甲氧胺盐酸盐(罗恩)、吡啶(罗恩)、双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)

1.4.3 GC-MS 条件 (1)气相色谱条件:色谱柱为0.25 μm×0.25 mm×30 m的DB-5石英毛细管柱(Agilent),进样口温度250℃,进样体积1 μl,不分流,载气为高纯度氦气,流速为0.87 ml/min,程序升温条件为:柱温60℃保留1 min,后以10℃/min升温至325℃,保留10 min。

(2)质谱条件:质谱离子源温度250℃,采用全扫描模式采集数据,m/z范围50~650,电子轰击能量70 eV。为避免因仪器信号波动造成的误差,本研究选择随机顺序进行连续样本分析。

1.4.4 样本前处理 (1)血清样品前处理:将保存在-80℃的样本取出在室温下解冻,取200 μl解冻的血清于1.5 ml离心管中,加入10 μl十七烷酸的甲醇溶液(1 mg/ml)作为内标;加入600 μl甲醇:氯仿=3:1(v/v)混合液,涡旋30 s至悬浊液,室温静置10 min;13200转/min、4℃离心10 min,吸取约600 μl等量上清液至新离心管,使用真空离心干燥机干燥,离心机温度保持室温(28℃)。

(2)组织样品前处理:精密称取组织100 mg于离心管中,加入十七烷酸的甲醇溶液(1 mg/ml)作为内标;加入甲醇:氯仿=3:1(v/v)混合液,冰上均浆后,涡旋2 min至悬浊液;13200转/min、4℃离心10 min,吸取等量上清液至新离心管,使用真空离心干燥机干燥,离心机温度保持室温(28℃)。

(3)衍生化反应:干燥结束后将40%甲氧胺的吡啶溶液(15 mg)加入离心管中,涡旋30 s,超声5 min,使管底部固体尽量溶出,30℃反应1.5 h;将液体转移至螺口瓶中,加入BSTFA(含1%三甲基氯硅烷),涡旋,70℃反应1 h;取出样品,放置过夜,将样品转移至离心管中,离心,13200转/min、25℃10 min,吸取上清转移至液相小瓶的内衬管中,拧紧瓶盖,用于GC-MS进样分析。采用Agilent 7890B-5977B气质联用仪对样品进行分析。

1.5 数据处理 通过GC-MS联用仪检测获得的原始数据,由安捷伦MassHunter工作站进行导出。导出的数据包括代谢物编码、相对分子质量、保留时间、峰强度和面积等,同时通过MassHunter导出样本的总离子流图。通过工作站自带的(B.07.00)定性分析软件将原始数据转换成mzData格式,转换后的数据在R软件平台下采用XCMS程序代码(<http://xcmsonline.scripps.sdu>)进行基线过滤、峰对

齐、峰匹配和识别、保留时间校正及质谱碎片归属等预处理,峰强度校正后,使用“50%规则”筛选数据,最后输出由化合物的样本信息(m/z ,即质荷比)、保留时间及峰强度组成的三维矩阵数据。由于复杂生物样品中各种代谢物的浓度差异巨大,导致某些浓度过高或过低的代谢物的信号被掩盖,无法被质谱检测器识别,因此用内标归一法对预处理后的数据进行标准化处理,以消除或减少标本制备过程中的差异导致的代谢物浓度的差异,使所变量的尺度在同一等级上^[6]。

先采用主成分分析法(principal component analysis, PCA)来观察CRC术前及术后样本间的总体的分布情况,然后用有监督的正交偏最小二乘-判别分析法(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)建立区分术前、术后血清及癌组织、正常组织的判别模型。

1.6 统计学方法 本研究数据均用SPSS 22.0进行统计分析,采用 U 检验,所有计量数值用($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 代谢谱分析 通过对术前、术后血清以及癌和正常组织的总离子流图的对比分析,可明显观察到两组代谢图谱的峰强度存在差异,结果如图1所示。

2.2 术前与术后血清比较

2.2.1 代谢谱分析 采用PCA分析,发现术前和术后存在大部分交集,说明术前和术后样本中大部分代谢产物相同。结果如图2(A)所示。为了找出术前和术后的差异性代谢产物,需进一步对预处理后的数据进行OPLS-DA分析。本研究中的模型解释率($R^2Y=0.279$)判别率($Q^2=0.126$)均良好。其得分图和空间分布图如图2(B、C),两组样本整体分离趋势明显,且组内聚集性良好。

2.2.2 代谢产物的筛选 为了找出与CRC术前和术后高度相关的差异代谢产物,利用R语言脚本筛选差异代谢物,修改相关参数,结合 U 检验下 $P<0.05$ 且 $VIP>1$ 对RT- m/z 进行可视化和筛选。

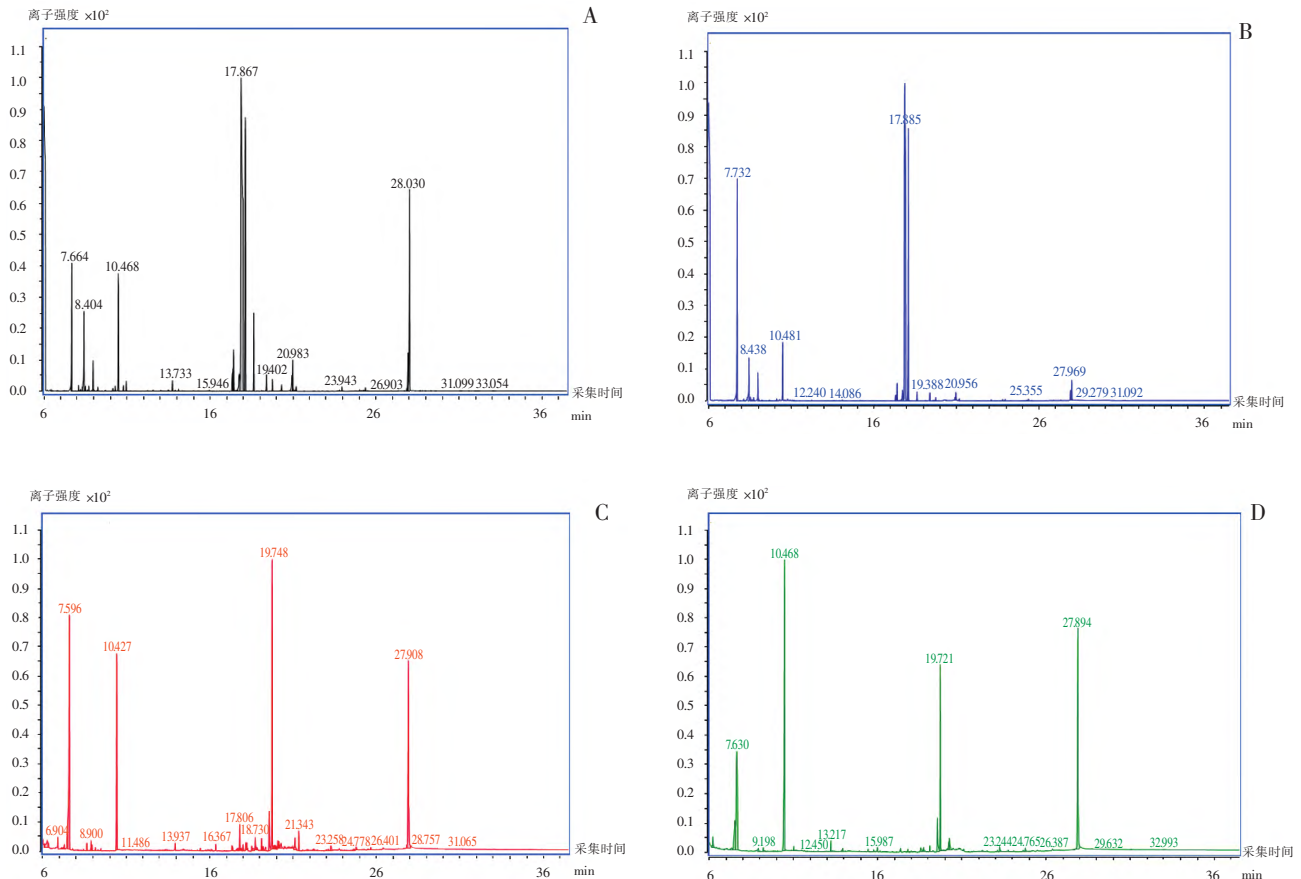


图1 术前(A)与术后(B)血清和癌组织(C)与正常组织(D)的总离子流图

运行 R 语言最终共找出 13 个差异代谢物,且在术后血清中含量均呈下降趋势。结果如表 1 所示。

2.3 癌组织与正常组织比较

2.3.1 代谢谱分析 首先进行 PCA,发现癌组织与正常组织的组内离散程度良好,证明癌组织和正常组织的代谢产物差异较大,结果如图 2(D)所示。我们对癌组织和正常组织进一步采用 OPLS-DA 分析,其得分图和空间分布图如图 2(E、F)所示。

2.3.2 代谢产物的筛选 利用 R 语言脚本筛选差异代谢物,修改相关参数,结合 U 检验下 $P < 0.05$, $FDR-P$ 值(P 值的校正值) < 0.05 且 $VIP > 1$ 对 RT- m/z 进行可视化筛选。运行 R 语言最终共找出 18 个 CRC 与正常组织差异代谢产物,具体结果如表 2 所示。其中乳酸、3-羟基丁酸、阿洛糖、甘露糖、肌肉肌醇、五硅氧烷在结直肠癌组织中呈上升趋势,其他均为下降趋势。

表 1 术前和术后血清的差异性代谢产物

代谢物	相对分子质量	保留时间(min)	P 值	VIP 值	倍数改变(术前/术后)
硬脂酸	298.265 49	21.19	0.013 451 3	1.381 591 6	1.910 359
3-羟基丁酸	86.074 41	8.93	0.029 002 6	2.126 832 8	5.991 895
9,12-十八碳二烯酸	264.263 16	20.98	0.006 278 9	2.235 735 4	3.632 947
3,5-胆甾烷二醇	329.358 56	28.00	0.014 001 6	1.348 144 6	2.578 676
胆固醇	340.302 35	20.98	0.000 400 8	2.156 837 0	3.499 708
葡萄糖	96.085 71	20.96	0.014 918 9	2.119 066 6	3.309 096
反油酸	339.299 84	20.97	0.008 598 6	2.159 038 0	3.169 246
γ 生育酚	504.424 52	27.86	0.008 404 5	1.576 515 7	2.351 732
L-5-羟脯氨酸	258.036 99	13.73	0.002 109 1	1.917 190 1	4.675 778
油酸	138.127 56	20.96	0.013 133 9	2.190 809 2	3.505 895
棕榈酸	285.238 08	19.40	0.016 037 9	1.442 570 5	2.036 707
反式 13 十八烯酸	84.074 79	20.97	0.016 912 0	2.111 282 4	3.101 719
花椒毒素	356.337 25	21.18	0.013 316 8	1.058 975 7	1.778 780

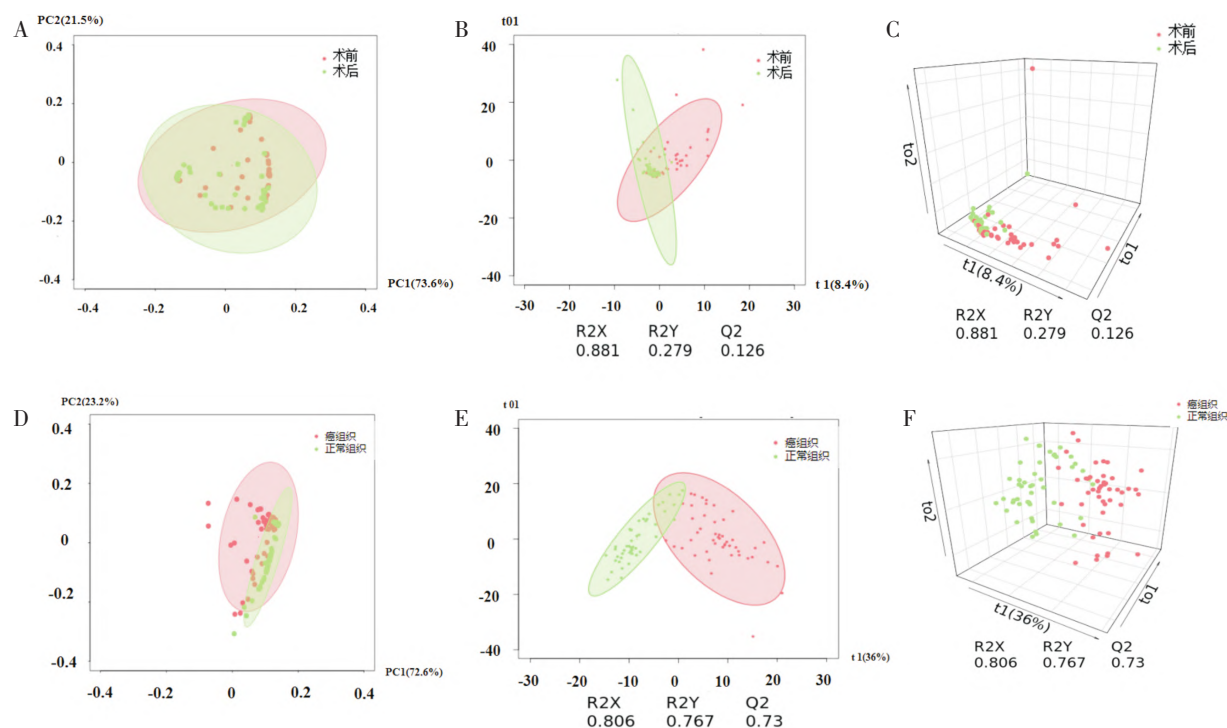


图 2 代谢谱分析结果

注:A~C,术前与术后血清的 PCA 分析图、正交偏最小二乘分析的得分图、空间分布图;D~F,癌组织与正常组织的 PCA 分析图、正交偏最小二乘分析的得分图、空间分布图。

表2 结直肠癌组织和正常组织的差异性代谢产物

代谢物	相对分子质量	保留时间	P值	FDR-P	VIP	倍数改变(癌/正常)
乳酸	318.036	7.31	1.15E-10	6.12E-10	1.15	2.8658
肌肉肌醇	333.144	19.73	1.01E-10	5.52E-10	1.28	0.2824
2,3-丁二醇	116.022	7.01	9.97E-06	1.21E-05	1.16	0.1884
3-羟基丁酸	373.087	8.94	2.43E-16	4.06E-15	1.26	3.0703
异肌醇	405.194	19.73	9.11E-09	3.52E-08	1.07	0.4896
胆固醇	75.018	27.94	1.12E-08	4.15E-08	1.06	0.3910
阿洛糖	97.068	17.98	7.61E-15	7.64E-14	1.21	4.0194
手性肌醇	381.167	19.73	5.93E-08	1.19E-07	1.05	0.5126
甘露糖	138.089	17.98	6.43E-16	9.49E-15	1.23	5.8832
十七酸	146.038	20.24	3.63E-08	9.48E-08	1.01	0.4034
肌醇	391.187	19.73	1.25E-08	4.41E-08	1.12	0.4794
苹果酸	233.090	13.20	1.4E-09	6.74E-09	1.05	0.0933
粘质肌醇	407.189	19.73	6.86E-08	1.27E-07	1.01	0.5319
油酸	117.008	20.24	6.86E-08	1.27E-07	1.02	0.3924
五硅氧烷	354.049	8.94	1.05E-11	7.30E-11	1.26	2.9443
鲨肌醇	365.155	19.73	1.01E-08	3.85E-08	1.08	0.4795
硬脂酸	116.008	20.24	1.11E-07	1.78E-07	1.01	0.4047

注: Fold change 值为结直肠癌组织均值/正常组织组均值得到的倍数, 倍数大于1代表癌组织均值较正常组织均值为高, 代谢物含量在癌组织中表达上调; 小于1代表癌组织均值较正常组织均值为低, 代谢物含量在癌组织中表达下调。E表示10的n次方, 如1.15E-10即 1.15×10^{-10} 。

2.4 代谢通路分析 将经过筛选和鉴别后的代谢产物名称导入在线网络工具 MetaboAnalyst3.0 进行代谢通路分析。

2.4.1 术前和术后血清组 将筛选出的13种代谢产物导入 MetaboAnalyst3.0 进行代谢通路分析, 结果表明重要的通路包括: 不饱和脂肪酸合成通路、亚油酸代谢通路。如图3A所示。进一步将代谢物进行KEGG通路富集分析, 结果如图3B。代谢通路分析显示, 在血清组中有12种代谢途径影响CRC, 包括亚油酸代谢和不饱和脂肪酸合成。

2.4.2 癌组织和正常组织 将癌组织和正常组织筛选出的代谢产物导入 MetaboAnalyst 3.0 进行代谢通路分析。结果表明重要的通路包括: 半乳糖代谢通路、不饱和脂肪酸合成通路, 结果如图3C所示。将代谢物进一步进行KEGG通路富集分析, 结果如图3(D)所示。在组织水平上有12个通路参与了CRC, 包括肌醇磷脂代谢、初级胆汁酸生物合成和磷脂酰肌醇信号系统。

3 讨论

代谢组学作为一种新兴的研究方法, 具有准确、无创、便捷等特点, 广泛用于心脏病、内分泌、肿瘤等疾病研究^[7-9]。本研究利用GC-MS和多变

量统计分析的研究方法, 揭示了CRC患者血液和组织中代谢产物的变化特点, 筛选并鉴定出8种生物标志物(乳酸、2,3-丁二醇、胆固醇、阿洛糖、苹果酸、粘质肌醇、油酸、硬脂酸)可以很好地区分癌组织和癌旁组织; 6种生物标志物(胆固醇、油酸、硬脂酸、3,5-胆甾烷二醇、葡萄糖、3-羟基丁酸)可以很好地区分术前和术后1周的血清。CRC与磷酸肌醇代谢、初级胆汁酸生物合成、类固醇生物合成、磷脂酰肌醇信号系统和亚油酸代谢途径中的代谢功能障碍密切相关。

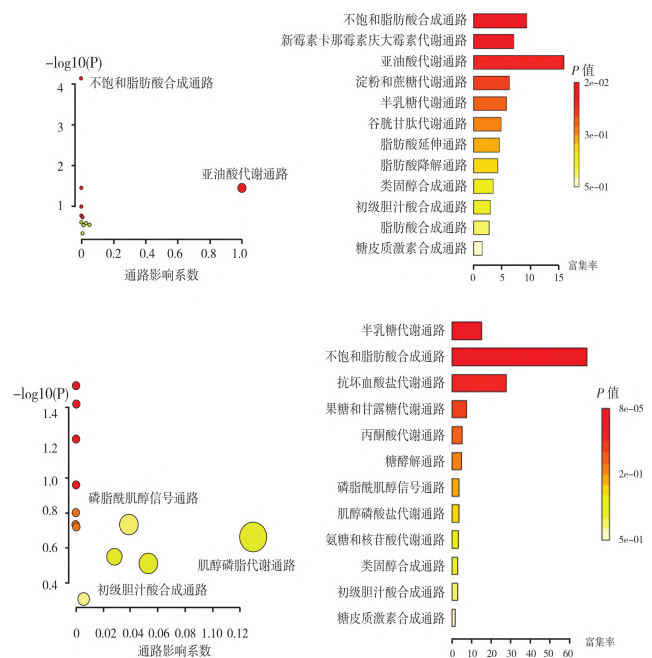


图3 血清组代谢通路分析图(A)与KEGG富集分析图(B)、组织组代谢通路分析图(C)与KEGG富集分析图(D)

与正常细胞不同, 癌细胞主要依赖于有氧糖酵解供能, 因此所有癌症都会表现出能量代谢异常^[10]。瓦尔堡(Warburg)效应证实了癌细胞将丙酮酸降解为乳酸后进入三羧酸循环, 进而产生ATP提供能量。但是在此过程中肝脏需要消耗大量能量来转化乳酸, 这正是造成癌症患者恶病质的最直接因素^[11]。本研究发现CRC患者术后血清中的葡萄糖含量比术前血清中的葡萄糖含量明显下降, 这也再一次证实了瓦尔堡效应。基于这种理论, 诱导癌细胞处于“饥饿”状态, 减少癌细胞能量供给可能是减缓疾病进程或者治疗CRC的有效方法^[12-13]。

除了葡萄糖代谢, 脂质代谢异常也是恶性肿瘤的潜在标志。脂质的摄取、储存和合成上调促进了肿瘤的快速生长^[14]。脂肪酸代谢对许多生物活动

至关重要,如细胞膜形成、能量储存和肿瘤发生中的信号分子生成^[15-18]。胆固醇水平的升高将会增加CRC的患病风险。这是因为胆固醇积累导致限制胆固醇合成的角鲨烯环氧酶减少,这一过程激活了 β -连环蛋白致癌途径同时使p53肿瘤抑制途径失活^[19]。Weir等^[20]在对CRC患者粪便进行代谢组学研究后发现CRC患者粪便样本中的氨基酸浓度较高,而健康成人粪便样本中的多不饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和熊去氧胆酸(一种结合胆汁酸)浓度较高。

同时,也有研究表明高密度脂蛋白胆固醇降低与糖尿病发病相关,使用他汀类药物可显著降低CRC的风险,这对血脂异常和糖尿病人群具有重大意义,为CRC的一级预防提供了明确的理论依据^[21]。

肌醇是存在于大多数哺乳动物和植物中的天然碳水化合物,可在体外和体内抑制多种癌症的生长。有研究证实肌醇六磷酸和肌醇联合应用抑制了小鼠CRC的肝转移^[22]。本研究结果显示,与正常组织相比,肿瘤组织中肌醇含量降低约50%,因此肌醇可能是抑制CRC进展的有效物质。

本研究利用GC-MS技术对CRC血清和组织进行研究,结合保留时间、P值、VIP值等数据分析后,分别在血清组找到13个差异代谢物、组织组找到17个差异代谢物,将这些代谢物进行通路分析,最终在组织组发现包括磷酸肌醇代谢、初级胆汁酸生物合成、类固醇生物合成和磷脂酰肌醇信号系统在内的十余条通路;在血清组发现包括亚油酸代谢、初级胆汁酸生物合成和类固醇生物合成在内的十余条通路。在这些通路中对CRC影响最大的通路有磷酸肌醇代谢、初级胆汁酸生物合成、磷脂酰肌醇信号系统和亚油酸代谢。接下来我们需要进一步研究这些通路在CRC发病过程中的特异性,这也为CRC的研究提供了新的方向。

参考文献

- [1] 田传鑫, 赵磊. 结直肠癌及结直肠癌肝转移流行病学特点[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(13): 1033-1038.
- [2] 克拉热·阿合买提, 郑超, 马乐, 等. 结直肠癌前病变及肿瘤患者血清代谢物的差异分析[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(9): 1421-1426.
- [3] 路丽娟. 氨基酸代谢失衡在结直肠腺瘤及结直肠腺癌的研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2018.
- [4] 夏平钊. 结直肠癌合并糖尿病中葡萄糖和氨基酸代谢变化及作用探讨[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [5] 中华医学会肿瘤学分会. 结直肠癌诊疗规范(2015版)[J]. 中华外科杂志, 2015, 53(12): 881-894.
- [6] 尚芳. 基于气相色谱-质谱联用技术的气滞血瘀型结直肠癌血液代谢组学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [7] 杨阳, 王志鹏, 高守红, 等. 代谢组学在结直肠癌肿瘤标志物发现中的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(6): 915-926.
- [8] 冯娜, 于波. 代谢组学在心力衰竭中的应用及研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(8): 879-881.
- [9] 姚晓丹, 万紫苏, 郑红梅, 等. 2型糖尿病中代谢标志物的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(13): 3309-3311.
- [10] VLADIMIROV YA, SARISOZEN C, VLADIMIROV GK, et al. The Cytotoxic Action of Cytochrome C/Cardiolipin Nanocomplex (Cyt-CL) on Cancer Cells in Culture[J]. Pharm Res, 2017, 34(6): 1264-1275.
- [11] 孙子茹. 肿瘤沃伯格效应靶向型金属铂类抗癌药物的合成、选择性药物传递及构效关系研究[D]. 天津: 天津大学, 2020.
- [12] GENG HW, YIN FY, ZHANG ZF, et al. Butyrate Suppresses Glucose Metabolism of Colorectal Cancer Cells via GPR109a - AKT Signaling Pathway and Enhances Chemotherapy [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 634874.
- [13] NING W, LI H, MENG F, et al. Identification of differential metabolic characteristics between tumor and normal tissue from colorectal cancer patients by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(11).
- [14] ZHU G, WANG Y, WANG W, et al. Untargeted GC-MS-Based Metabolomics for Early Detection of Colorectal Cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 729512.
- [15] CHUNMING C, FENG G, XIANG C, et al. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer [J]. Cancer Communications, 2018, 38(1): 1-14.
- [16] CARRACEDO A, CANTLEY LC, PANDOLFI PP. Cancer metabolism; fatty acid oxidation in the limelight [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(4): 227-232.
- [17] CURRIE E, SCHULZE A, ZECHNER R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer[J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 153-161.
- [18] DING C, SHAN Z, LI M, et al. Characterization of the fatty acid metabolism in colorectal cancer to guide clinical therapy [J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 20: 532-544.
- [19] JUN SY, BROWN AJ, CHUA NK, et al. Reduction of Squalene Epoxidase by Cholesterol Accumulation Accelerates Colorectal Cancer Progression and Metastasis [J]. Gastroenterology, 2021, 160(4): 1194-1207.
- [20] WEIR TL, MANTER DK, SHEFLIN AM, et al. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70803.
- [21] HAN KT, KIM S. Do cholesterol levels and continuity of statin use affect colorectal cancer incidence in older adults under 75 years of age? [J]. PLoS One, 2021, 16(4): e250716.
- [22] MIN F, YANG S, ZHAOXIA W, et al. Inositol Hexaphosphate and Inositol Inhibit Colorectal Cancer Metastasis to the Liver in BALB/c Mice [J]. Nutrients, 2016, 8(5): 286.