

气相色谱-质谱和液相色谱-质谱联用方法 用于口腔癌代谢组学分析

和红兵^{1,2}, 石先哲^{1*}, 陈 静¹, 高 鹏¹, 雷雅燕², 许国旺¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 昆明医学院附属口腔医院, 云南 昆明 650031)

摘要: 口腔癌的发病率占全身恶性肿瘤的第 6 位, 正确区分正常状态与良性和恶性口腔肿瘤, 是恰当选择治疗方案的关键所在。本研究中, 首先利用液相色谱-质谱和气相色谱-质谱联用方法分别得到健康人、良性口腔肿瘤患者和恶性口腔肿瘤患者血浆、尿液和唾液的代谢轮廓, 然后应用正交信号校正的偏最小二乘法进行多变量统计分析。结果表明健康人、良性肿瘤患者和恶性肿瘤患者在血浆、尿液和唾液等 3 种体液代谢中都可以被区分开, 而且找到和鉴定出 19 个重要差异代谢物。相关代谢通路分析显示, 与健康人相比, 良性和恶性口腔肿瘤患者都存在能量代谢紊乱和脂类代谢失衡的现象, 但恶性口腔肿瘤患者还表现出三羧酸循环和肌醇代谢异常, 这为临床诊断及治疗提供了重要信息。

关键词: 气相色谱-质谱联用; 液相色谱-质谱联用; 代谢组学; 口腔癌

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)03-0245-07

Metabonomics study of oral cancer using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry

HE Hongbing^{1,2}, SHI Xianzhe^{1*}, CHEN Jing¹, GAO Peng¹, LEI Yayan², XU Guowang¹

(1. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;
2. The Affiliated Stomatology Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031, China)

Abstract: Oral cancer is the sixth common cancer in the world, and precisely distinguishing health control, benign and malignant oral tumors is important for the proper and timely selection of therapeutic treatment. In the current study, the metabolic profiles of the plasma, urine and saliva of three groups, consisting of malignant oral tumor patients, benign oral tumor patients and healthy controls, were analyzed using liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. Utilizing a partial least squares-discriminant analysis with orthogonal signal correction data filter, the three groups were discriminated based on their plasma, urine and saliva metabolic profiles. Nineteen differential metabolites were identified including 3 acylcarnitines and 4 lyso-phosphatidylcholines in plasma, 3 amino acids and 2 organic acids in urine, 4 organic acids and 3 other metabolites in saliva. The identified metabolites were studied in the context of the pathways in which they were involved and their biological activities. The results indicated that benign and malignant oral tumor patients have altered energy metabolism, disordered lipolysis compared with healthy controls. Furthermore malignant oral tumor patients even present a distorted Krebs cycle and inositol metabolism.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); metabonomics; oral cancer

* 通讯联系人: 石先哲, 博士, 副研究员, 主要从事色谱-质谱联用及代谢组学研究。E-mail: shixianzhe@dicp.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(81060086, 20805045)和云南省自然科学基金项目(2010CD215)。

收稿日期: 2011-12-14

口腔癌是一类发生于唇、腭、舌、口底、牙龈和颊部的上皮源性恶性肿瘤。据统计资料表明,口腔癌的发病率占全身恶性肿瘤的第 6 位,并呈逐年上升的趋势,已成为一种严重影响人类健康的疾病。目前口腔癌多采用以手术为主的综合治疗,但手术后患者 5 年生存率只有 50% 左右,仍然存在着口腔癌再次复发的风险^[1]。代谢组学能够反映机体对病理生理及基因改变引起的代谢变化,在疾病诊断、病理学、中药疗效等临床研究方面显示出明显的优势^[2-4]。基于¹H-核磁共振(NMR)的代谢组学方法已经被应用于发现口腔鳞状细胞癌(OSCC)、口腔黏膜白斑(OLK)以及健康人之间在血浆中的代谢差异^[5]。类似的代谢组学方法也被用于不同时期的口腔癌患者血清样本中代谢特征研究,早期口腔癌也能得到明显区分^[6]。

除血液外,在口腔癌代谢组学研究中唾液也是重要的生物体液。与尿液相似,唾液获得方便且不会引起患者的紧张及疼痛。高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)已应用到唾液代谢轮廓分析,可准确地区分口腔鳞状细胞癌、口腔黏膜白斑和扁平苔藓的病理特征^[7]。最近,毛细管电泳-飞行时间质谱方法也用于唾液中代谢物的分析,找到了一些可用于口腔癌、胰腺癌和乳腺癌预测的差异代谢物^[8]。然而,迄今为止还未见区分良性和恶性口腔肿瘤的代谢组学研究报道。此外,目前的口腔癌代谢组学研究仅限于单独的血浆或唾液样本,综合血浆、尿液和唾液 3 种体液的代谢组学研究还未见报道。

在本研究中,利用气相色谱-质谱(GC-MS)和 HPLC-MS 联用方法,我们对健康人、良性肿瘤患者和恶性肿瘤患者的血浆、尿液和唾液 3 种体液的代谢轮廓进行研究。应用多元统计分析对代谢产物进行模式识别,将重要的差异代谢物选出并加以鉴定,并结合代谢通路对其进行相关讨论。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ACQUITY™ 超高效液相色谱仪和 Micromass Q-TOF 质谱仪(美国 Waters 公司),QP 2010 气相色谱-质谱联用仪(日本 Shimadzu 公司)。

乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),甲醇、甲酸(色谱纯,美国 Tedia 公司),实验用水由 Milli-Q 超纯水系统制备,亮氨酸脑啡肽、嘧啶、二(三甲基硅基)三氟乙酰胺均为分析纯(Sigma 公司)。

1.2 样品采集和预处理

临床样品采自昆明医学院附属口腔医院口腔颌

面外科,包括 16 例恶性口腔癌患者(8 名男性和 8 名女性),平均年龄为(49.9 ± 9.5)岁(31 ~ 63 岁);12 名良性口腔癌患者(7 名男性和 5 名女性),平均年龄为(39.2 ± 19.2)岁(17 ~ 75 岁),对上述疾病诊断依据临床及组织病理学结果。正常对照组由 15 名健康自愿者组成(7 名男性和 8 名女性),平均年龄为(43.8 ± 10.1)岁(28 ~ 67 岁)。血浆和尿液均于空腹 12 h 后在次日清晨收集;唾液依据 Navazesh 的方法于清晨提取; -80 °C 保存^[9]。

血浆预处理方法:在 200 μL 血浆中加入 800 μL 乙腈沉淀蛋白质,旋涡 30 s,于 4 °C 下以 15 000 g 离心 10 min,取上清液冻干;残渣用 180 μL 80% 乙腈水溶液复溶。尿样预处理方法:在 100 μL 尿样中加入 300 μL 水稀释,用 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤除去悬浮颗粒物。唾液预处理方法:在 200 μL 唾液中加入 200 μL 乙腈/甲醇(1:1, v/v)溶液和 20 μL 0.30 mg/mL 癸酸,旋涡 30 s,以 10 000 g 离心 5 min,取上清液冻干;残渣溶解于 50 μL 吡啶中,超声处理后加入 60 μL 二(三甲基硅基)三氟乙酰胺在 75 °C 下衍生化反应 45 min。质量控制(QC)样品的制备:将所有待测血浆样品,取出等量部分混合均匀后,按血浆预处理方法同样处理,得到血浆 QC 样品。以类似方法得到尿液及唾液的 QC 样品。

1.3 分析血浆和尿液的 LC-MS 条件

1.3.1 超高效液相色谱(UPLC)条件 血浆分析: Waters 公司 ACQUITY C18 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,初始流动相为 10% B,保持 0.5 min,然后在 16 min 内线性增加到 98% B,保持 2 min,然后再返回 10% B 平衡 2 min;流速 0.35 mL/min;进样量 5 μL;柱温 40 °C。尿样分析: ACQUITY C18 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,初始流动相为 2% B,保持 0.5 min,然后在 20 min 内线性增加至 30% B,再在 5.5 min 内增加到 100% B 并保持 2 min,最后返回至 2% B 平衡 2 min;其他条件与血浆分析相同。

1.3.2 Q-TOF MS 条件 电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺),毛细管电压 3 100 V,锥孔电压 30 V,脱溶剂气流速 600 L/h,锥孔气流速 50 L/h,脱溶剂温度 300 °C,离子源温度 120 °C,数据采集速率 0.4 s,扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 000。亮氨酸脑啡肽用于质量数锁定,确保质谱分析的准确性和重复性。

1.4 唾液分析的 GC-MS 条件

GC 条件:采用 J&W Scientific 公司 DB5-MS 石

英毛细管柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm), 进样口温度 280 °C, 分流比 10:1。载气为氦气, 线速度 38.5 cm/s。柱温箱升温程序为起始温度 70 °C (保持 5 min), 以 5 °C/min 升至 110 °C (保持 1 min), 接着以 3 °C/min 升至 125 °C (保持 1 min), 随后以 5 °C/min 升至 280 °C (保持 5 min)。

MS 条件: 电子轰击离子(EI)源温度 200 °C, 接口温度 280 °C, 扫描范围 m/z 33 ~ 500, 扫描速度 1 000 u/s, 检测电压 1.0 kV。

1.5 数据处理

UPLC-Q-TOF MS 得到的血浆和尿样数据采用 Micromass MarkerLynx Applications Manager version 4.0 软件进行峰提取和峰匹配。所得数据矩阵经过 80% 规则^[10]和面积归一化处理。GC-MS 得到的唾液数据输入自编的 GC image 软件进行峰匹配, 内标癸酸用于保留时间校正。由此得到的数据矩阵进行 80% 规则^[10]和面积归一化处理。

经过预处理的血浆、尿样和唾液数据分别导入 SIMCA-P version 11.0 软件进行正交信号校正的偏最小二乘分析(OSC-PLSDA)。根据变量投影重要性(variable importance in the projection, VIP)结合 S-plot 图筛选差异代谢物。血浆和尿液的差异代谢物依据精确质量数、二级质谱(MS^2)信息及 HMDB、METLIN、KEGG 等数据库信息进行结构鉴定。唾液的差异代谢物通过 NIST 数据库进行结构鉴定, 最后用标准品对鉴定结果进行验证。

2 结果与讨论

2.1 唾液样品预处理条件优化

血浆和尿样的预处理方法已有报道^[11], 但唾液样品的预处理方法还未见详细的报道。首先考察了不同溶剂对唾液样品预处理的影响。如图 1 所示, 相对于单独使用乙腈或甲醇, 使用乙腈和甲醇(1:1, v/v)混合液可明显增加提取的内源性代谢物的总峰数目和总峰面积。其次研究了有机溶剂与唾液混合比例的影响, 结果表明等比例混合时提取的内源性代谢物的总峰数目和总峰面积最大(见图 1)。

2.2 血浆、尿液和唾液的代谢谱分析

为了获得尽量多的代谢物信息, 通过优化, 采用两个不同的流动相梯度对血浆和尿液进行 LC-MS 分析。对于唾液来说, GC-MS 分析结果要优于 LC-MS, 因此本文只用 GC-MS 对其进行分析。图 2 给出了 LC-MS 分析血浆、尿液和 GC-MS 分析唾液的典型总离子流色谱图。通过在分析实际样品中间插入 QC 样品, 考察了这些方法的稳定性。结果显示 3

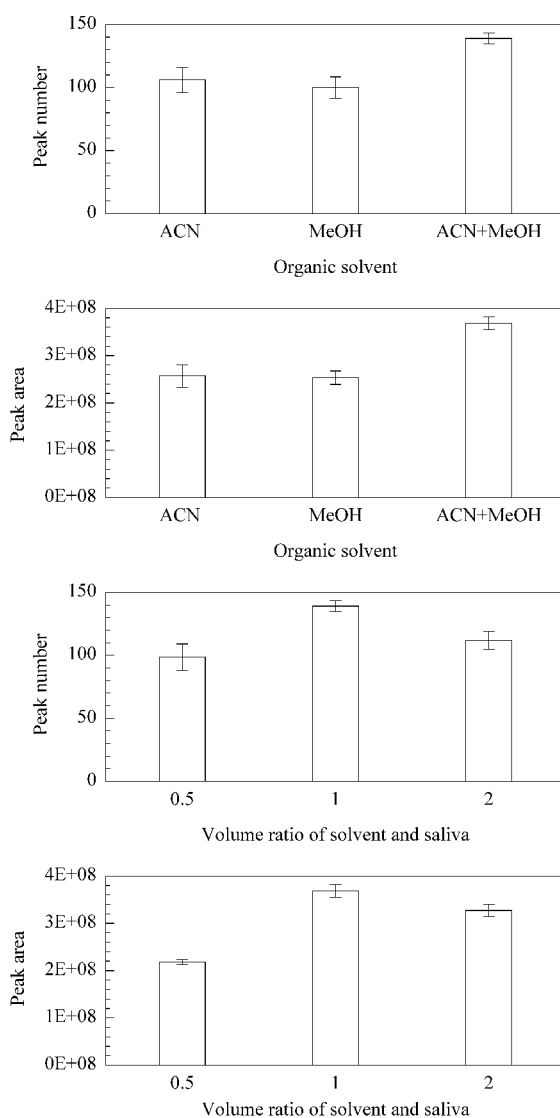


图 1 不同溶剂以及溶剂与唾液比例对唾液分析总峰数目和总峰面积的影响

Fig. 1 Total number of peaks and peak areas of saliva samples with different solvents and solvent-to-saliva ratios

ACN: acetonitrile; MeOH: methanol; ACN + MeOH: a mixture of acetonitrile and methanol (1:1, v/v).

种样品中峰面积相对标准偏差(RSD)小于 30% 的色谱峰的峰面积总和占该样品总峰面积的比例都在 88% 以上, 说明这些方法的重复性较好, 满足代谢组学方法的要求^[12]。经过峰提取和峰匹配后, 在血浆、尿液和唾液中分别识别出 409、448 和 107 个代谢物离子信息。

2.3 血浆、尿液和唾液的代谢组学分析

为了区分健康人、良性口腔肿瘤患者和恶性口腔肿瘤患者, 分别对血浆、尿液和唾液的代谢数据进行了 OSC-PLSDA 分析, 结果见图 3。以血浆模型为例, 表示模型解释能力的参数 $R^2 Y = 0.81$ 和表示模型预测能力的参数 $Q^2 = 0.43$, 而且 $R^2 Y$ -intercept =

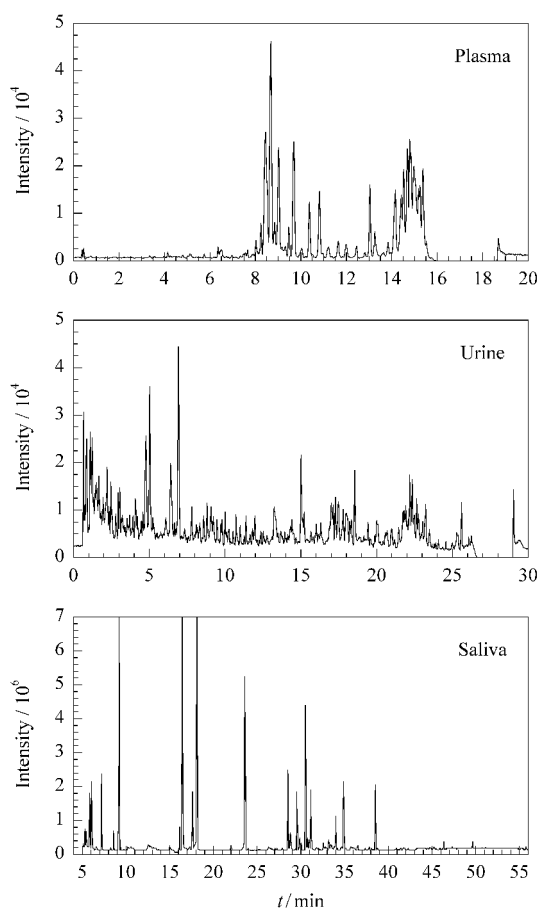


图 2 LC-MS 分析血浆、尿液和 GC-MS 分析唾液的典型总离子流色谱图
 Fig. 2 Typical TIC chromatograms of plasma and urine analysis using LC-MS and saliva analysis using GC-MS

0.29 和 Q^2 -intercept = -0.26, 这些参数说明该模型可靠, 不存在过拟合现象^[13]。尿液和唾液模型也得到类似血浆模型的结果。从图 3 的三维得分图可以看出健康人、良性口腔肿瘤患者和恶性口腔肿瘤患者可以被区分开, 表明 3 组人群的血浆、尿液和唾液代谢谱存在明显差异。

进一步比较恶性口腔肿瘤组与健康对照组两者之间在血浆、尿液和唾液中的代谢差异, 结果见图 4。根据变量的重要性 ($VIP \geq 1$) 结合模型的 S -plot 图, 分别从血浆、尿液和唾液中筛选出 9、14 和 11 个差异代谢物。同样的方法应用于恶性口腔肿瘤组与良性口腔肿瘤组以及健康对照组与良性口腔肿瘤组之间的差异代谢物的筛选。结果从血浆、尿液和唾液中分别筛选出对恶性口腔肿瘤组与良性口腔肿瘤组分类相关的 8、12 和 5 个差异代谢物, 以及健康对照组与良性口腔肿瘤组分类相关的 10、6 和 9 个差异代谢物。

表 1 中列出了经过鉴定的 19 个差异代谢物, 包

括血浆中的 3 个酰基肉碱(acylcarnitines) 和 4 个溶血磷脂酰胆碱(lyso-phosphatidylcholine, lyso-PC), 尿液中的 3 个氨基酸和 2 个有机酸, 唾液中的 4 个有机酸及肌醇、葡萄糖等代谢物。

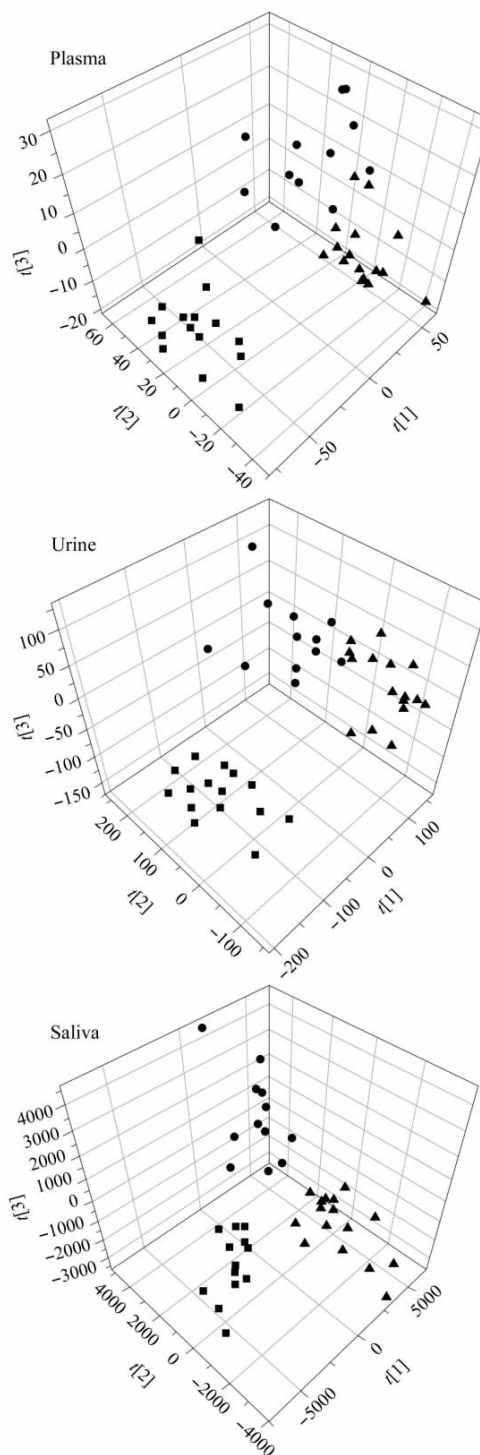


图 3 3 组人群基于血浆、尿液、唾液代谢谱的 OSC-PLSDA 三维得分图

Fig. 3 Three dimensional score plots of OSC-PLSDA based on plasma, urine and saliva metabolic profiling of three groups

■ healthy controls; ● benign oral tumor patients; ▲ malignant oral tumor patients.

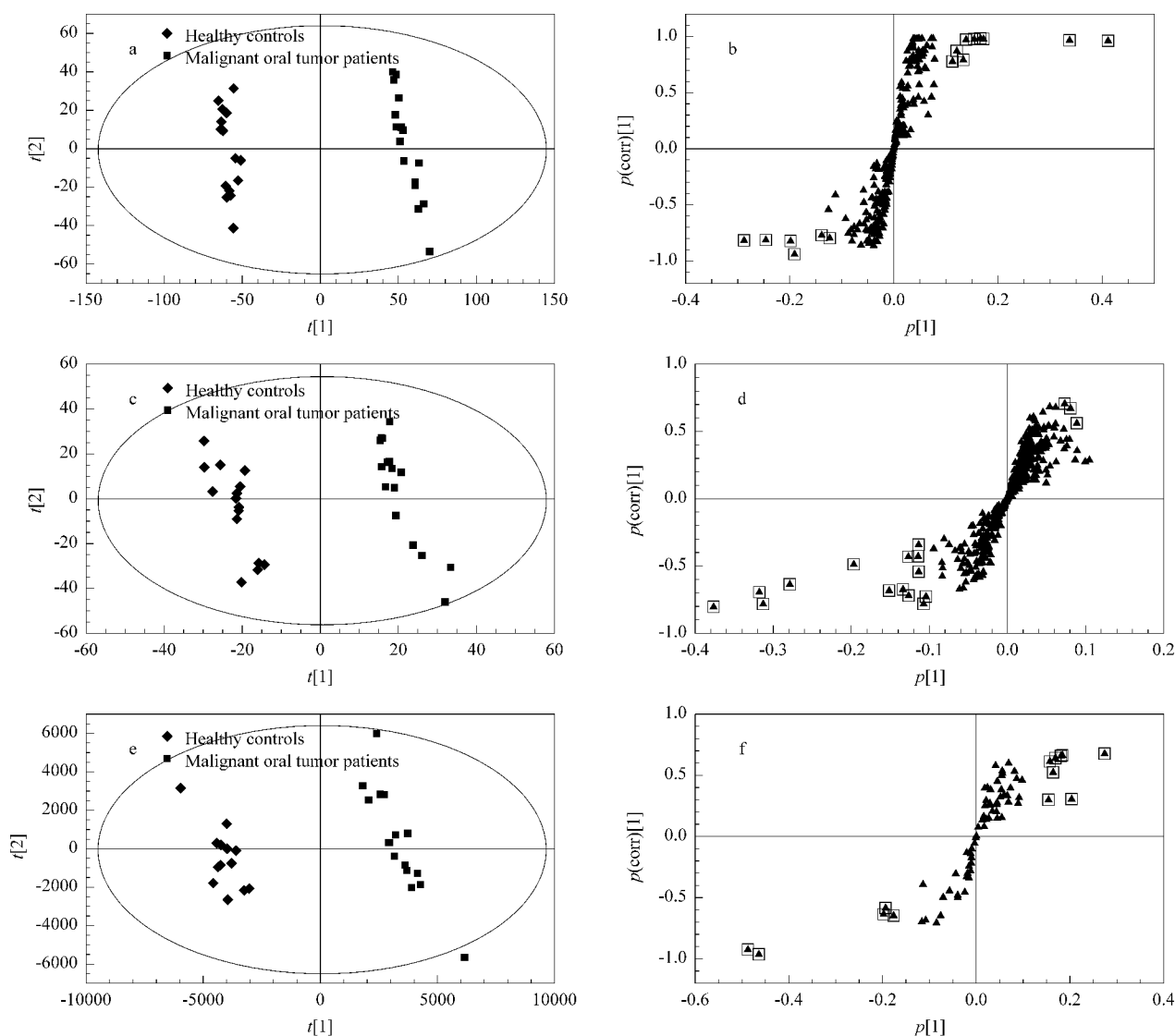


图 4 恶性口腔肿瘤组与健康对照组的 OSC-PLSDA 分析结果

Fig. 4 OSC-PLSDA results of malignant oral tumor and healthy control groups

a and b: OSC-PLSDA score and S-plot of plasma ($R^2X=0.539, R^2Y=0.996, Q^2(\text{cum})=0.991$); c and d: OSC-PLSDA score and S-plot of urine ($R^2X=0.297, R^2Y=0.986, Q^2(\text{cum})=0.95$); e and f: OSC-PLSDA score and S-plot of saliva ($R^2X=0.407, R^2Y=0.985, Q^2(\text{cum})=0.966$).

表 1 鉴定的血浆、尿液、唾液中区分 3 组人群的差异代谢物

Table 1 Summary of the identified differential metabolites among malignant oral tumor, benign oral tumor and healthy control groups

Sample	Metabolite identified	Malignant-control		Malignant-benign		Malignant-benign	
		p Value	Content ratio	p Value	Content ratio	p Value	Content ratio
Plasma	carnitine C8:1	4.13×10^{-2}	0.65	9.70×10^{-1}	1.01	2.34×10^{-2}	0.65
Plasma	carnitine C10:0	1.78×10^{-4}	0.51	2.98×10^{-1}	0.83	6.48×10^{-3}	0.61
Plasma	carnitine C12:0*	8.87×10^{-5}	6.56	5.38×10^{-1}	1.29	7.49×10^{-3}	5.10
Plasma	lyso-PC C18:3	1.47×10^{-2}	0.68	9.55×10^{-1}	0.99	5.31×10^{-2}	0.69
Plasma	lyso-PC C16:0*	1.44×10^{-2}	0.81	5.26×10^{-1}	0.95	1.25×10^{-1}	0.86
Plasma	lyso-PC C18:1	1.15×10^{-2}	0.86	8.90×10^{-1}	1.01	3.56×10^{-2}	0.85
Plasma	lyso-PC C18:0*	8.73×10^{-7}	0.68	6.69×10^{-1}	0.97	8.69×10^{-6}	0.70
Urine	proline*	8.51×10^{-1}	1.03	1.50×10^{-2}	0.66	8.19×10^{-3}	1.56
Urine	imidazole-4-acetic acid	1.06×10^{-1}	1.50	4.98×10^{-2}	1.72	6.18×10^{-1}	0.88
Urine	glucuronate	1.69×10^{-2}	2.07	4.95×10^{-1}	1.20	1.38×10^{-1}	1.73
Urine	phenylalanine*	1.85×10^{-2}	1.25	4.66×10^{-2}	1.26	9.13×10^{-1}	0.99

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

Sample	Metabolite identified	Malignant-control		Malignant-benign		Malignant-benign	
		<i>p</i> Value	Content ratio	<i>p</i> Value	Content ratio	<i>p</i> Value	Content ratio
Urine	hippuric acid	4.34×10^{-2}	1.24	3.83×10^{-1}	1.11	3.02×10^{-1}	1.12
Saliva	butanoic acid	1.94×10^{-3}	4.58	8.07×10^{-1}	0.91	3.34×10^{-2}	5.06
Saliva	2,3-butanediol*	9.46×10^{-3}	2.36	5.30×10^{-1}	1.23	1.30×10^{-1}	1.92
Saliva	lactic acid*	2.59×10^{-2}	0.61	2.95×10^{-1}	1.26	3.90×10^{-3}	0.49
Saliva	succinic acid*	7.37×10^{-3}	2.26	3.33×10^{-2}	1.88	6.48×10^{-1}	1.20
Saliva	4-hydroxyphenylacetic acid*	2.91×10^{-2}	2.53	7.00×10^{-1}	1.13	1.87×10^{-2}	2.23
Saliva	glucose*	4.14×10^{-4}	0.49	9.72×10^{-1}	1.01	9.38×10^{-4}	0.49
Saliva	inositol*	1.02×10^{-2}	2.09	3.29×10^{-2}	1.85	6.10×10^{-1}	1.13

The *p* values were calculated based on the Student's *t*-test. * verified by commercial standards.

图 5 显示了几个重要差异代谢物在健康对照、良性口腔肿瘤和恶性口腔肿瘤相关代谢途径中的代谢变化情况。葡萄糖 (glucose) 和乳酸 (lactic acid) 是能量代谢糖酵解的中间代谢产物; 与健康对照组相比, 良性和恶性口腔肿瘤患者唾液中的葡萄糖水平显著降低, 这说明口腔肿瘤组织中糖酵解作用增强, 导致葡萄糖大量消耗, 与“Warburg 效应”相关^[14]。而乳酸水平的降低与基于核磁共振的代谢组学对口腔癌血浆的研究结果相似^[6]。琥珀酸 (succinic acid) 是三羧酸循环的中间代谢产物, 其在恶性口腔癌患者中显著升高, 可能是因为在口腔肿瘤细胞中三羧酸循环被上调的结果。糖代谢和能量代谢异常是口腔肿瘤患者的典型特征。lyso-PC 是膜磷脂酰胆碱的代谢产物。恶性肿瘤患者血浆中 4 种 lyso-PC (lyso-PC C16:0, lyso-PC C18:0, lyso-PC

C18:1, lyso-PC C18:3) 的水平均明显下降。究其原因可能是口腔肿瘤细胞中磷脂酶的快速转化引起血浆中 lyso-PC 消耗加快, 这与肿瘤增殖和转移相关^[15]。此外, 与健康对照人群和良性肿瘤患者相比, 恶性肿瘤患者唾液中肌醇 (inositol) 也明显增加。肌醇是真核细胞中第二信使的重要组成成分, 如磷酸盐肌醇、磷酸酰肌醇、磷脂酰肌醇磷酸盐等。以前的研究显示口腔癌早期磷脂酰肌醇酶呈高表达状态^[16], 从而导致肌醇升高。其次, 肌醇还是一种组织渗透剂, 常与细胞内钙离子浓度的调节、胰岛素信号转导和脂肪酸的氧化相关。所以肌醇的升高可能会加剧肿瘤细胞的能量代谢和脂代谢异常。以上结果初步提示, 唾液中的肌醇和琥珀酸可能对区分良性和恶性口腔肿瘤以及口腔癌的诊断有指导意义。

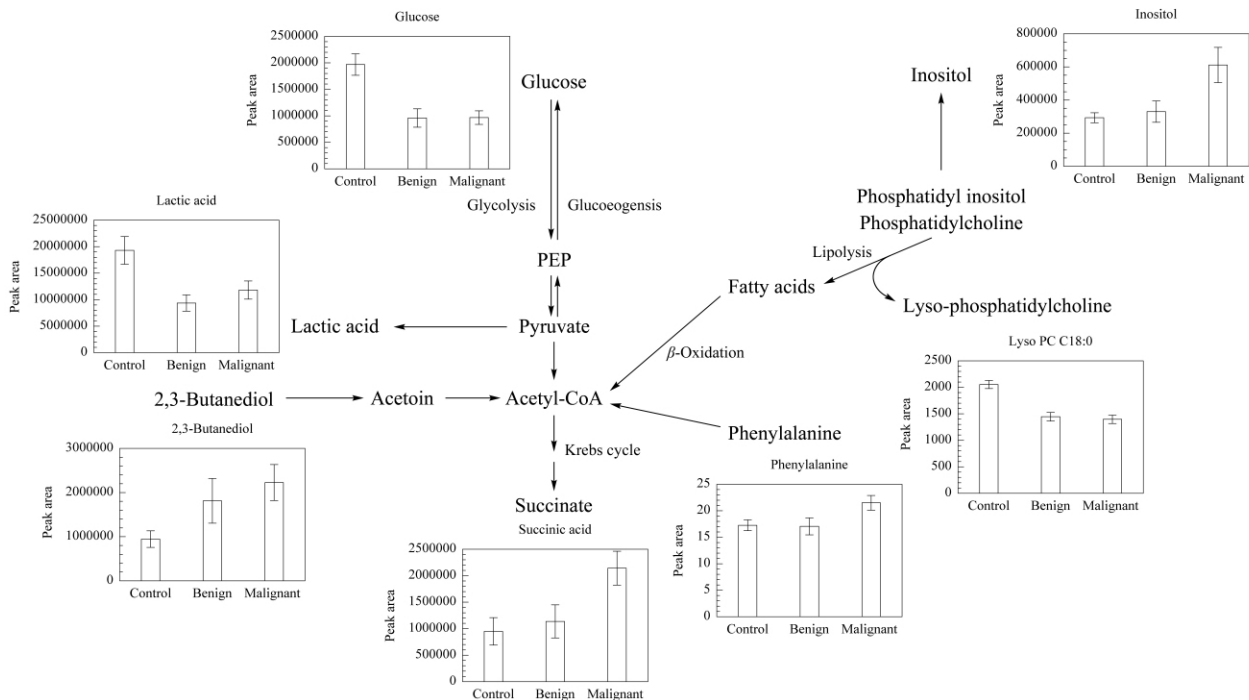


图 5 重要差异代谢物在相关代谢通路中的代谢变化
Fig. 5 Changes of differential metabolites in the relevant metabolic pathways

3 结论

本研究利用 LC-MS 和 GC-MS 对健康人、良性口腔肿瘤患者以及恶性口腔肿瘤患者的血浆、尿液和唾液进行代谢轮廓分析,并应用多元统计分析方法对 3 组人群进行区分,找到并鉴定出 19 个差异代谢物。通过相关代谢通路分析,与健康人相比,良性和恶性口腔肿瘤患者都存在能量代谢紊乱,脂类代谢失衡,但恶性口腔肿瘤患者还表现出三羧酸循环和肌醇代谢异常,这些结果还需要大批量样品和进一步的细胞水平实验验证。此外,结合血浆、尿液和唾液的代谢组学分析,可以获得更加完整的代谢图谱,以期全面地对患者进行评估,为临床的诊断、治疗提供准确全面的信息。

参考文献:

- [1] Brandwein-Gensler M, Teixeira M S, Lewis C M, et al. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(2): 167
- [2] Chen J, Wang W Z, Lv S, et al. *Anal Chim Acta*, 2009, 650(1): 3
- [3] Gao P, Lu C, Zhang F X, et al. *Analyst*, 2008, 133(9): 1214
- [4] Dai W D, Zhang F X, Jia Z H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (戴伟东, 张凤霞, 贾振华, 等. 色谱), 2011, 29(11): 1049
- [5] Zhou J L, Xu B, Huang J, et al. *Clin Chim Acta*, 2009, 401(1/2): 8
- [6] Tiziani S, Lopes V, Günther U L. *Neoplasia*, 2009, 11(3): 269
- [7] Yan S K, Wei B J, Lin Z Y, et al. *Oral Oncol*, 2008, 44(5): 477
- [8] Sugimoto M, Wong D T, Hirayama A, et al. *Metabolomics*, 2010, 6(1): 78
- [9] Navazesh M. *Ann NY Acad Sci*, 1993, 694(1): 72
- [10] Smilde A K, van der Werf M J, Bijlsma S, et al. *Anal Chem*, 2005, 77(20): 6729
- [11] Bruce S J, Tavazzi I, Parisod V, et al. *Anal Chem*, 2009, 81(9): 3285
- [12] Gika H G, Theodoridis G A, Wingate J E, et al. *J Proteome Res*, 2007, 6(8): 3291
- [13] Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, et al. *Multi- and Megavariate Data Analysis Principals and Applications*. Umea, Sweden: Umetrics, 2001
- [14] Garber K. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(24): 1805
- [15] Taylor L A, Arends J, Hodina A K, et al. *Lipids Health Dis*, 2007, 6(1): 17
- [16] Kaur J, Sawhney M, DattaGupta S, et al. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 168