



## 论文

# 用核磁共振波谱技术结合多维变量分析研究人体肺癌组织萃取液的代谢组特征

陈文学<sup>①②</sup>, 祖育昆<sup>③</sup>, 卢韶华<sup>④</sup>, 陈芬儿<sup>①\*</sup>, 蓝文贤<sup>⑤</sup>, 白春学<sup>④</sup>, 邓风<sup>②\*</sup>

① 复旦大学化学系复旦-DSM 联合实验室, 上海 200433;

② 中国科学院武汉物理与数学研究所, 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉 430071;

③ 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 武汉 430030;

④ 复旦大学附属中山医院, 上海 200233;

⑤ 中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032

\* 联系人, E-mail: rfchen@fudan.edu.cn; dengf@wipm.ac.cn

收稿日期: 2010-06-13; 接受日期: 2010-08-23

国家自然科学基金(批准号: 20872018)、中国博士后科研基金(批准号: 20090450065)和波谱与原子分子物理国家重点实验室开放基金(批准号: T152805)资助项目

**摘要** 肺癌严重威胁着人类的健康, 其发病率和死亡率均居世界恶性肿瘤首位. 临床上, 肺癌的诊断主要依靠组织病理切片. 清楚地了解肿瘤的生化代谢特征能为肺癌的准确诊断提供重要帮助. 当前, 生物组织萃取液的高分辨核磁共振波谱作为一个极好的调查组织生化代谢的工具已得到广泛应用, 特别是它与多维变量分析方法相结合已成为研究生物组织代谢特征的重要平台. 本研究通过 HR NMR 波谱技术结合多维变量分析方法(主要包括主成分分析和偏最小二乘法-判别分析方法)得到了 34 个肺癌病人在 3 个不同组织位点的 101 例肺癌组织萃取液的代谢组特征. PCA 研究显示, 肺癌组织在不同的位点具有不同的代谢组学特征. 与临近的非侵入肺组织相比, 肺癌组织中乳酸的含量显著升高, 而肌醇、谷氨酰胺和缬氨酸的含量显著下降. 研究表明, 用正交偏最小二乘法-判别分析方法可很好地区分临近的非侵入组织和肺癌组织, 该模型预测肺癌的准确性为 100%.

**关键词**肺癌  
核磁共振  
多维变量分析  
模式识别  
预测

目前肺癌严重威胁着人类的健康, 其发病率和死亡率均居全球癌症之首. 据估计, 仅 2008 年全球新增肺癌病例 135 万, 死亡 118 万<sup>[1]</sup>. 肺癌早期少有症状, 缺乏有效的早期发现手段, 而因症状就诊者 80% 多属于中晚期, 治疗费用高且疗效不佳, 通常患者 5 年生存率仅约 10%. 早发现、早治疗是提高肺癌治愈率、降低死亡率的关键.

目前, 对于中晚期肺癌的临床诊断并不困难, 如

X 线胸片、电子计算机 X 射线断层扫描技术(computed tomography, CT)、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)及正电子发射计算机断层显像(positron emission tomography, PET)均可准确定位诊断, 痰脱落细胞检查、经皮穿刺肺活组织检查、纤维支气管镜检查等也可用于肺癌的组织分型<sup>[2]</sup>, 但中晚期肺癌的预后极差. 将上述方法应用到肺癌早期诊断仍是一项具有挑战性的任务. 如痰细胞学检查虽是最简单

有效的方法,但它对直径小于 3 cm 的周围型肺癌(如腺癌)来说其阳性率低于 20%;胸部 X 片及 CT 尽管也是临床上最常用的诊断方法,但它们对直径小于 2 cm 肿瘤的诊断通常还需要其他侵入性细胞学或病理学检查证实,即使它们的放射损害是在人体能够忍受的范围之内;MRI 检查常会因来自肺部的呼吸造成成像困难,从而使其应用受到一定的限制;经皮穿刺肺组织活检是获得阳性细胞学和病理学标本,识别恶性病变的极好方法,但它和纤维支气管镜检查一样需要很有经验的临床医师的指导和确诊,且通常对直径大于 2 cm 的病变最理想.因此,寻求最有效的准确诊断肺癌的技术和手段已成为当今研究的热点.

活体磁共振是目前唯一可以无创研究活体器官和组织代谢变化的非侵入性技术,液体核磁共振波谱技术更是以其较高的图谱分辨率在分子水平上为肿瘤的早期诊断提供组织形态上不易被观察到的许多物质代谢信息.例如,用核磁共振技术研究肺癌组织最早是在 1986 年,Onodera 等人<sup>[3]</sup>第一次用正常肺和肺癌组织的萃取液(高氯酸方法)进行了 <sup>31</sup>P 核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)谱的检测,结果显示,与正常肺组织的 <sup>31</sup>P 谱对比,肺癌组织中出现了一个新的磷酸胆碱(phosphorylcholine,  $\delta$  3.2, pH 8.0)信号. Halliday 等人<sup>[4]</sup>几乎用同样的方法测定了天然丰度的 <sup>13</sup>C NMR 谱,结果显示,与边缘非肿瘤组织相比,肺癌组织中脂肪酸(fatty acid,  $\delta$  30.6)的信号增强,而脯氨酸(Proline,  $\delta$  46.7  $\mu$ g/mL)和其他一些氨基酸的信号下降或消失. Hanaoka 等<sup>[5]</sup>则采用氯仿和甲醇混合溶剂萃取的方法,第一次对正常肺和肺癌组织的萃取液进行了 <sup>1</sup>H NMR 谱的检测,发现在正常肺组织和肺癌组织间,有 2 个代谢物的比值(choline/alanine, glycine/alanine)均表现了显著性差别,同时还发现在不同类型的肺癌组织(如鳞癌和腺癌等)间,另 2 个代谢物的比值(creatine/glycine, creatine/choline)差别明显.最后,他们还采用判别因子分析(discriminant factor analysis, DFA)方法对这些组织进行预测分析,发现其区分正常肺组织和肺癌组织或不同类型的肺癌组织的准确率可达 81.5%~90.7%. Yokota 等人<sup>[6]</sup>用离体 <sup>1</sup>H NMR 波谱方法发现,乳酸和胆碱等物质的浓度变化可作为非小细胞癌病人预后的重要参数.在活体 MRS 方面,Leij-Halfwerk 等人<sup>[7-9]</sup>在 2000 年连续用活体 <sup>31</sup>P MRS 方法发现,与健康对照组相比,肺癌病人肺组织中葡萄糖的含量增加 19%,异生糖原增加

42%( $P < 0.05$ ),而且它们含量的增加可以通过肺癌组织中升高的磷酸单脂(phosphomonoesters, PMD)来表示. Rocha 等人<sup>[10]</sup>和 Jordan 等人<sup>[11]</sup>利用高分辨魔角旋转核磁共振(HRMAS <sup>1</sup>H NMR)技术结合主成分分析和聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)方法报道了 12 例肺癌组织中代谢物的变化差异,发现与临近非侵入组织比较,肺癌组织中乳酸(lactate)、磷酸胆碱(PC)和甘油磷酸胆碱(GPC)的浓度升高,而葡萄糖(glucose)、肌醇(myo-inositol)和乙酸(acetate)的浓度下降.然而,迄今还未发现一篇关于肺癌组织在不同位点时组织中代谢物的差别的文献报道.

本研究用液体高分辨核磁共振(high resolution nuclear magnetic resonance, HR NMR)波谱技术分析和研究了 34 位肺癌病人在 3 个不同组织位点时的肺癌组织萃取液的代谢组学特征,旨在得到有关肺癌组织代谢方面的生化信息,从分子水平探寻人体肺癌组织发生病变或癌变时其组织中代谢物的变化规律,以期找到肺组织发生癌变时的生物标志物,为肺癌的临床诊断、治疗和预后提供帮助.

## 1 材料与方 法

### 1.1 肺癌组织样品的收集

本研究中的肺癌组织样品主要分 2 批.一批 48 例样品取材于华中科技大学同济医学院同济医院心胸外科的 16 个肺癌患者术后组织;另一批 53 例样品取材于复旦大学附属中山医院病理科的 18 个肺癌患者术后组织.各术后组织标本取下后依次从肿瘤边缘、肿瘤中心和肿瘤实质(介于肿瘤边缘和肿瘤中心之间的部位)3 个部位进行取材,再分别装入不同的样品管进行标记,取下的组织迅速用液氮速冻,随后置于 -80℃ 低温冰箱保存.

所有 34 位肺癌病人的肺癌组织标本的病理诊断结果均由两家医院的病理科专家根据 1997 年肺癌国际 TNM 分期标准进行病理分类和分期(表 1).其组织病理类型主要包括:14 例腺癌、16 例鳞癌、2 例小细胞癌、1 例恶性间皮瘤和 1 例肺转移癌.如表 1 所示,这些病人的发病年龄范围为 43~76 岁,平均年龄和标准偏差分别为 59.3 和 9.5 岁,发病率男性(25 例)高于女性(9 例),而且男性发病者(18 例)大多具有吸烟史.发病部位,左肺(16 例)和右肺(18 例)几乎接近 1:1,无偏向性.

## 1.2 肺癌组织萃取液的核磁共振氢谱

将在 $-80^{\circ}\text{C}$ 条件下保存的肺组织样品取出一部分(约 30 mg)称重后在液氮中研磨成粉, 随后滴加 12% 冰冷高氯酸( $\text{HClO}_4$ , 美国 Sigma-Aldrich 公司生产)溶液 5 mL 进行组织匀浆萃取, 萃取的混合液转移到离心管中, 并在低温( $4^{\circ}\text{C}$ )离心机中离心 20 min, 转速为 10000 r/min. 取出上层清液, 用 1.0 mol/L 氢氧化钾(KOH, 美国 Sigma-Aldrich 公司)溶液中和, 再次离心去除高氯酸盐( $\text{KClO}_4$ )沉淀. 离心后的上层清液用液氮冰冻后放入 $-45^{\circ}\text{C}$ 低温冻干机中真空冻干成粉末.

在进行 NMR 实验时, 可将冻干的粉末直接溶解在 0.5 mL 99.5%的  $\text{D}_2\text{O}$  中, 实验的温度由温控器控制在  $25^{\circ}\text{C}$  左右. 样品的 NMR 检测主要分 2 批进行: 第

一批样品(约 15 个)是在中国科学院武汉物理与数学所波谱与原子分子物理国家重点实验室检测, 使用 Varian INVOA 600 MHz 谱仪, 采用的脉冲序列为 NOESYPR1D: ( $\text{D1-}90^{\circ}\text{-}t_1\text{-}90^{\circ}\text{-}t_m\text{-}90^{\circ}\text{-ACQ}$ ),  $90^{\circ}$ 脉冲宽度一般调节在 7.7~8.3  $\mu\text{s}$ , 同时用预饱和方法压制水峰<sup>[12]</sup>, 采样数据点为 32 k, 谱宽为 12 kHz, 采样延迟为 3 s, 采样累加次数为 128 次, 混合时间  $t_1=3 \mu\text{s}$ ,  $t_m=90 \text{ ms}$ . 同时, 为了谱图的归属, 分别选取几个腺癌和鳞癌组织萃取后的样品进行二维全相关谱(2D  $^1\text{H-}^1\text{H}$  TOCSY)测定, TOCSY 实验采样数据点为 2 k, 谱宽均为 9 kHz, 采样延迟为 0.5 s, 采样累加次数为  $nt=32$ ,  $ni=256$  次, 自旋锁定时间  $\text{mix}=90 \text{ ms}$ . 总采样时间约为 5.2 h. 其余批样品在复旦大学复旦-DSM

表 1 肺癌组织标本病理资料

组织编号	性别	年龄/岁	病理诊断	部位	TNM 分期	分期	分级	转移	吸烟史
1	女	43	腺癌	右下肺	T1N0M0	Ia	II	无	无
2	男	76	鳞癌	右下肺	T1N0M0	Ia	I	无	有
3	男	61	鳞癌	右下肺	T1N0M0	Ia	I	无	有
4	女	43	腺癌	左上肺	T2N0M0	Ib	II	无	无
5	男	72	鳞癌	右上肺	T2N0M0	Ib	I	无	无
6	男	71	腺癌	右上肺	T2N0M0	Ib	II	无	有
7	男	51	鳞癌	右上肺	T2N0M0	Ib	II-III	无	有
8	男	55	鳞癌	右上肺	T2N0M0	Ib	II-III	无	有
9	男	53	鳞癌	左下肺	T2N0M0	Ib	II-III	无	有
10	男	60	腺癌	左下肺	T2N0M0	Ib	II-III	无	有
11	男	45	鳞癌	左上肺	T2N0M0	Ib	III	无	有
12	男	71	鳞癌	左下肺	T2N0M0	Ib	II-III	无	有
13	女	66	鳞癌	右下肺	T2N0M0	Ib	II-III	无	无
14	男	58	鳞癌	右下肺	T2N0M0	Ib	II	无	无
15	男	56	肺转移	右下肺	T2N0M0	Ib	II	无	有
16	女	49	腺癌	左下肺	T1N1M0	IIa	II	转移	无
17	男	54	鳞癌	左下肺	T1N1M0	IIa	III	转移	有
18	男	70	小细胞癌	右下肺	T1N1M0	IIa	II	转移	无
19	男	70	腺癌	左上肺	T2N1M0	IIb	II-III	转移	无
20	女	70	腺癌	右上肺	T2N1M0	IIb	II	转移	无
21	女	65	腺癌	右下肺	T2N1M0	IIb	II-III	转移	无
22	男	53	鳞癌	左下肺	T2N1M0	IIb	II-III	转移	有
23	男	75	鳞癌	右下肺	T2N1M0	IIb	II-III	转移	无
24	男	56	鳞癌	左上肺	T2N1M0	IIb	II-III	转移	有
25	男	70	鳞癌	左上肺	T3N0M0	IIb	I	无	有
26	男	51	腺癌	左下肺	T2N2M0	IIIa	II-III	转移	无
27	男	62	腺癌	左上肺	T3N2M0	IIIa	III	转移	无
28	男	56	恶性间皮瘤	右上肺	T3N2M0	IIIa	III	转移	有
29	男	56	鳞癌	右中肺	T2N2M0	IIIa	III	转移	有
30	女	52	腺癌	左上肺	T3N1M0	IIIa	III	转移	无
31	男	68	小细胞癌	右上肺	T3N2M0	IIIa	III	转移	有
32	男	61	腺癌	左上肺	T4N2M0	IIIb	II-III	转移	有
33	女	49	腺癌	右下肺	T4N1M0	IIIb	II-III	转移	无
34	女	49	腺癌	左上肺	T2N0M1	IV	II	转移	无

联合实验室 Bruker AVANCE 400 MHz 谱仪上检测, 使用的脉冲序列是预饱和和方法压水的 NOESYPR1D. 采样参数为: 数据点为 32 k, 谱宽为 8 kHz, 采样延迟为 3 s, 采样累加次数为 128 次, 混合时间  $t_1=3 \mu\text{s}$ ,  $t_m=90 \text{ ms}$ .

对上述采集到的 FID 数据分别用 0.3 Hz 的窗函数进行付里叶变换(fourier transform, FT), 用 Topspin 1.3b(Bruker, Germany)软件系统对所有的波谱进行自动相位和基线校正处理, 得到组织萃取液的高分辨核磁共振氢谱(HR  $^1\text{H}$  NMR), 最后用乳酸甲基峰的化学位移值( $\delta_{\text{H}}$  1.33)进行定标.

由于肿瘤的异质性, 取材于不同类型或同一类型不同位点的组织样品的核磁共振波谱也会不尽相同. 因此, 为了比较不同位点组织波谱的差别, 本研究采用求平均谱的方法, 对每一例组织萃取液样品的波谱来说, 首先可任选取一段区间化学位移值(如  $\delta_{\text{H}}=0.50\sim 4.50$ ), 并对这段区间进行分段(如 0.001 ppm)积分, 使每一分段积分值均为一定值, 将这段区间谱分成 4000 段积分棒, 然后将每个谱的所有分段积分棒进行归一化, 最后将这些经归一化的波谱进行平均化.

### 1.3 多维变量分析

由于组织萃取液的波谱在芳香区( $\delta_{\text{H}}=5.0\sim 10.0$ )的信号较少、较弱, 所以, 只选取化学位移值在 0.50~4.50( $\delta_{\text{H}}=0.52\sim 4.52$ )的那段区间进行主成分分析. 首先将整个谱分成 4000 段, 而每一分段积分区间均为 0.001 ppm, 然后将每个谱的所有积分值进行归一化. 利用 SICMA-P 10.5 软件进行主成分分析(PCA)<sup>[13]</sup>, 其结果分别用主成分的得分图(scores plot)和负载图(loadings plot)来表示, 其中得分图中的每个点代表一个组织萃取液样品的代谢信息, 而负载图中的每个点则代表在区分中起作用的代谢物的积分区间值(或化学位移值)<sup>[14]</sup>. 另将不同部位的样品分别定义为不同的群组, 以不同群组数作为变量 Y, 对所有组织萃取液的 NMR 波谱数据进行偏最小二乘法-判别分析<sup>[15,16]</sup>和正交校正后再行偏最小二乘法-判别分析<sup>[17]</sup>, 其结果分别用主成分的得分图和权重影响因子图(weight coefficients)或回归影响因子图(regression coefficients)来表示, 其中得分图中的每个点代表一个组织萃取液样品的代谢信息, 而权重影响因子图中的每个棒则代表对区分贡献较大的代谢物.

## 2 结果

### 2.1 肺组织萃取液核磁共振氢谱的平均谱

图 1 展现了 101 例处于 3 个不同部位的肺组织萃取液的高分辨核磁共振氢谱的平均谱. 根据先前文献报道<sup>[3-5,10,11]</sup>和本研究中组织萃取液的 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY 谱(数据未显示), 结果表明, 在不同位点(如临近非侵入组织、癌变组织和癌中心组织)的平均谱中, 有一些代谢物的含量表现了明显的差别. 这些代谢物主要包括胆碱类化合物(如胆碱(Cho)、磷酸胆碱(PC)和甘油磷酸胆碱(GPC))、氨基酸(如缬氨酸(Val)、谷氨酰胺(Gln)等)、肌酸(Cre)、葡萄糖( $\alpha$ -Glc,  $\beta$ -Glc)、肌醇(mI)和乳酸(Lac)等. 如图 1 所示, 乳酸、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱的含量从肿瘤的边缘到中心几乎是逐渐升高的. 与此相反, 缬氨酸、谷氨酰胺和肌醇的含量从边缘到中心则逐渐降低, 而葡萄糖的含量在癌组织部位却是最高的.

### 2.2 主成分分析

图 2 给出 101 例处于 3 个不同部位的肺组织萃取

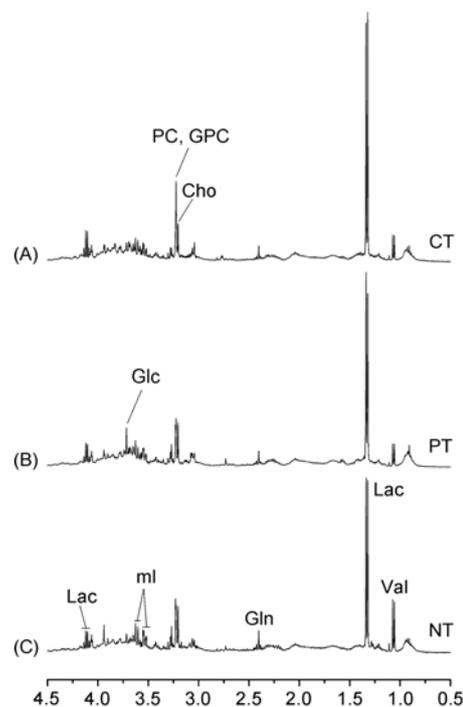


图 1 101 例不同位点肺组织萃取液的 HR  $^1\text{H}$  NMR 平均谱  
(A) 临近非侵入组织(NT); (B) 癌组织(PT); (C) 癌中心组织(CT)

液的高分辨核磁共振氢谱的偏最小二乘法-判别分析结果. 如图 2 所示, 尽管在得分图上各组间均存在一定程度的重叠, 但第一主成分仍可体现一些区分. 与临近非侵入(边缘)组织相比, 在肺癌组织中乳酸(Lac)和 $\beta$ 位葡萄糖( $\beta$ -Glc)的含量较高(图 2(B))而缬氨酸(Val)的含量较低.

### 2.3 统计分析

根据前面的 101 例肺组织萃取液波谱的均谱和主成分分析结果, 只选取在组间差别较大或在区分中起

重要贡献作用的一些代谢物(如葡萄糖、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱、乳酸等)进行统计分析. 即将这些代谢物的浓度(归一化分段积分棒值)分别用社会统计软件(SPSS 11.0)进行方差分析(ANOVA). 如图 3 所示, 在这些代谢物中只有乳酸(Lac)、肌醇(mI)、谷氨酰胺(Gln)和缬氨酸(Val)等在组间观察到显著性差别( $P < 0.05$ ), 其中乳酸的浓度从肿瘤边缘到肿瘤中心逐渐升高, 而肌醇、谷氨酰胺和缬氨酸的浓度变化则恰好相反. 此外, 葡萄糖的含量在癌组织中最高, 而磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱的含量在癌组织中心最高. 总

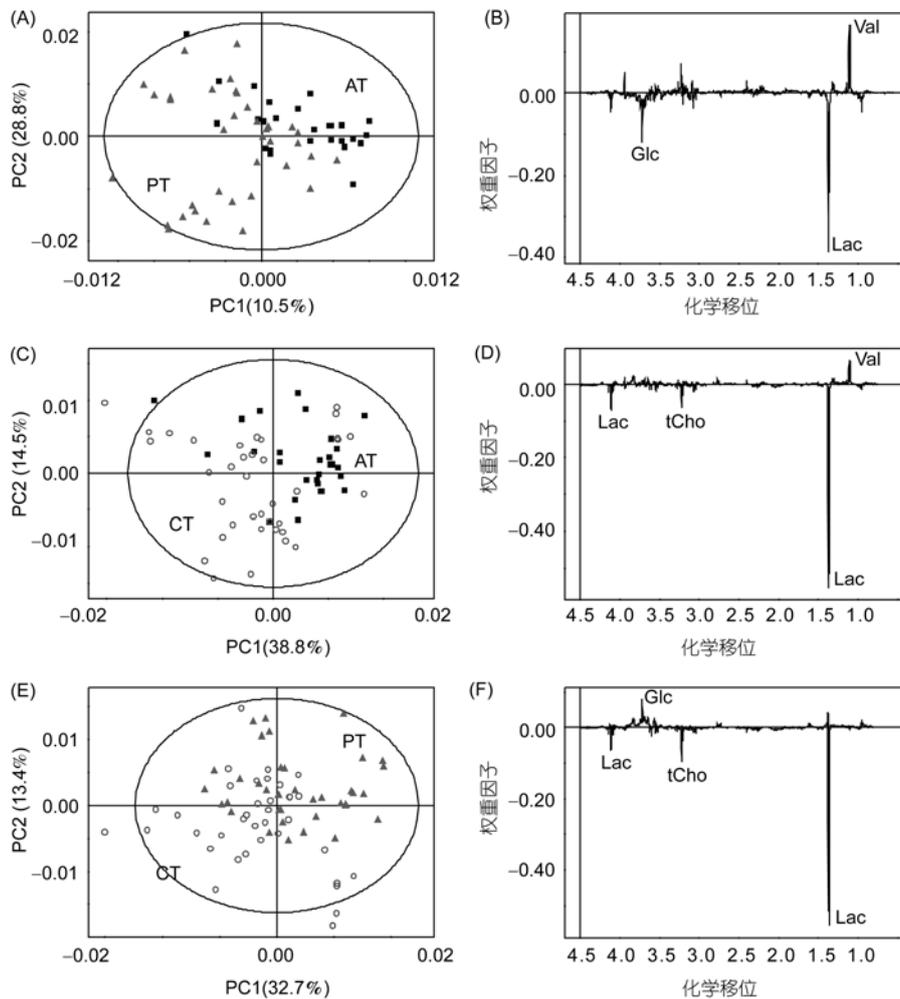


图 2 101 例肺癌组织萃取液 HR  $^1\text{H}$  NMR 谱 PLS-DA 得分图和负载图

(A) 边缘组织和癌组织的 PLS-DA, PC1 和 PC2 分别解释变量的 10.5% 和 28.8%; (B) PC1 的权重因子图; (C) 边缘组织和癌中心组织的 PLS-DA, PC1 和 PC2 分别解释变量的 38.83% 和 14.5%; (D) PC1 的权重因子图; (E) 癌组织和癌中心组织的 PLS-DA, PC1 和 PC2 分别解释变量的 32.7% 和 13.4%; (F) PC1 的权重因子图. ■: AT 边缘组织; ▲: PT 癌组织, ○: CT 癌中心组织

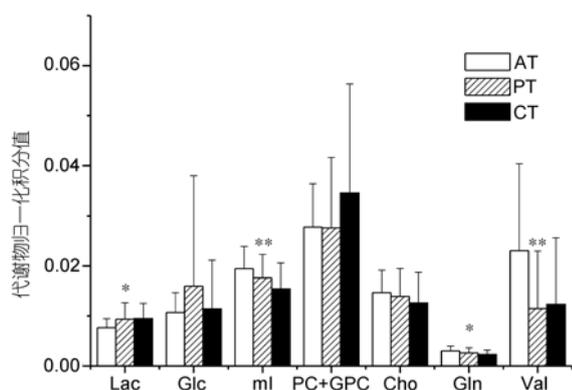


图3 101例处于3个不同部位的肺组织萃取液中代谢物浓度的均值(mean)和标准偏差(SD)

AT: 临近非侵入组织; PT: 癌变组织; CT: 癌中心组织. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.005$

之, 这些代谢物的分析结果与前面波谱的均谱观察结果基本上一致.

### 2.4 多维变量分析

为了更好地观察肺组织发生癌变时其组织波谱中代谢组的差别和特征, 将癌组织和癌中心组织样品合并为一组(如疾病组), 临近非侵入组织样品则作为另一组(对照组), 运用有人监督管理的模式识别方法(如 PLS-DA, OPLS-DA)对上述数据重新进行多维变量分析. 对于 OPLS-DA 模型来说, 首先根据分组信息定义一个  $Y$  变量作为反应变量, 再将所有的自变量  $X$  进行正交信号校正(OSC), 滤去与  $Y$  变量不相关(即正交)的  $X$  变量, 再行偏最小二乘法-判别分析(PLS-D(A)) (图4). 从图4的得分图(图4(A))中可见对照组与疾病组能很好地区分. 该模型的权重影响因子图(图4(B))表明, 对组间区分起重要作用的代

谢物主要为缬氨酸(Val)、乳酸(Lac)、肌醇(ml)、葡萄糖(Glc)和胆碱类化合物(如胆碱(Cho)、磷酸胆碱(PC)和甘油磷酸胆碱(GPC))等, 其影响因子为负值意味着与临近非侵入组织相比; 在癌组织中, 乳酸(Lac)、葡萄糖(Glc)、磷酸胆碱(PC)和甘油磷酸胆碱(GPC)等代谢物含量较高, 正值则说明与临近非侵入组织相比, 在癌组织中, 缬氨酸(Val)、谷氨酰胺(Gln)、肌醇(ml)和胆碱(Cho)等代谢物含量较低.

由于有人监督管理的模式识别方法(OPLS-DA)具有预测功能, 因此, 将在每组样品中分别任取 80% 的样品作为“训练样本”, 将剩下 20% 的样品作为“测试样品”建立新的 OPLS-DA 模型, 该模型  $Q^2 > 0.9$  ( $Q^2$  值为模型预测变量  $X$  和  $Y$  变异的累计百分比,  $Q^2$  值越接近 1.0 说明模型越好). 如图 5 所示, 该 OPLS-DA 模型预测每一组的灵敏度和特异性均为 100%.

### 3 讨论

本研究表明, 高分辨核磁共振波谱技术结合多维变量分析不仅能快速识别大量肺癌组织萃取液样本的波谱特征和不同位点样本组别间的代谢组差别, 而且能对肺组织发生癌变进行很好地预测. 因此, 本研究揭示的肺组织中代谢物浓度的变化规律, 进一步阐明肿瘤组织的异质(或不均匀性)是肿瘤最主要的生化特征. 在肺组织中观察到的代谢物浓度的变化和相关代谢途径如下所述.

乳酸是无氧糖酵解的最终代谢产物, 通常在组织缺血或过氧时其浓度会快速上升. 胆碱类化合物(主要包括胆碱、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱)是构成细胞膜的主要物质, 它们的增加可反映细胞的死亡(炎

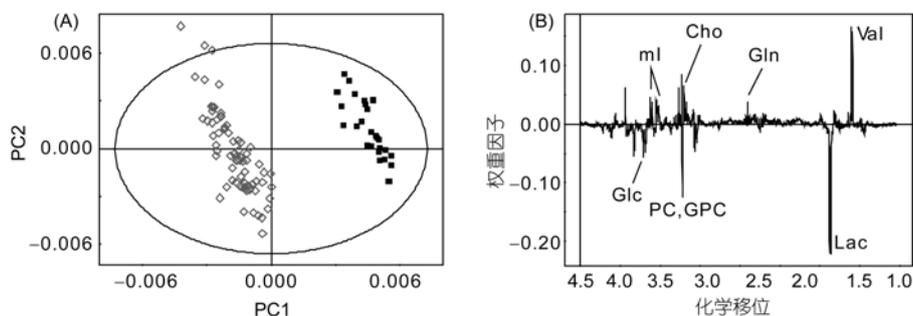


图4 101例处于不同部位的肺组织萃取液 HR  $^1\text{H}$  NMR 谱 OPLS-DA 得分图(A)和 OPLS-DA 权重因子图(B)  
■: 边缘组织; ◇: 癌及癌中心组织

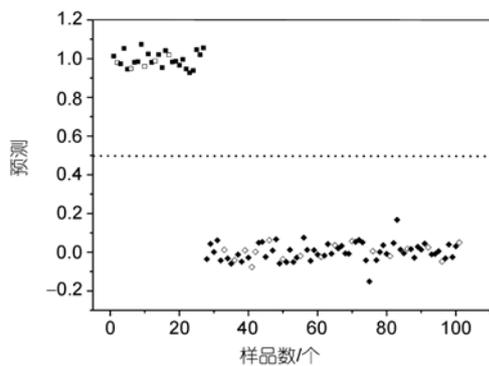


图5 101例边缘组织与肺癌组织萃取液的HR  $^1\text{H}$  NMR谱的OPLS-DA模型预测结果

■: 边缘组织训练样品; □: 边缘组织待测样品; ◆: 肺癌组织训练样品; ◇: 肺癌组织待测样品

症或坏死)。Podo<sup>[18]</sup>曾报道磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱的增加可能与肿瘤中细胞膜的磷脂代谢有关或与肿瘤细胞的增殖有关。Guo等人<sup>[19]</sup>用液体 $^1\text{H}$  NMR波谱方法观察到,在肺癌中胆碱和乳酸的浓度较高(与正常肺组织比较),但未发现显著性差别。Yokota等人<sup>[6]</sup>用离体 $^1\text{H}$  NMR波谱方法发现,乳酸和胆碱的浓度变化可作为非小细胞癌病人预后的重要参数。最近,Rocha等人<sup>[10]</sup>和Jordan等人<sup>[11]</sup>利用高分辨魔角旋转核磁共振(HRMAS  $^1\text{H}$  NMR)波谱发现,与临近非侵入组织相比,肺癌组织中乳酸、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱的浓度升高。在当前的研究中,肺癌组织萃取液中乳酸( $P < 0.05$ )、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱浓度的升高与先前的文献报道基本一致<sup>[4,6,10]</sup>,即离癌组织中心越近,乳酸、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱的浓度就越高,而胆碱的浓度则略有下降。

葡萄糖(glucose)代谢的增加是肿瘤显著的生化特征。在癌组织形成过程中,无氧糖酵解的增加会导致乳酸浓度的增加,从而需要增加葡萄糖的供应<sup>[20]</sup>。在当前的研究中,与临近组织相比,在肺癌组织中葡萄糖浓度的升高趋势与前面的文献一致<sup>[7,10]</sup>,即葡萄糖浓度和无氧糖酵解的增加会导致乳酸的快速增加。然而在某些肺癌组织的中心部位葡萄糖的浓度也偶尔出现下降,这可能与肿瘤的部分坏死有关。

肌醇(myo-inositol)作为调节细胞功能的重要代谢物,是细胞生长所必需的。在先前的研究中<sup>[10,11,21]</sup>,无论是组织还是细胞(或萃取液)样品,在肺肿瘤中肌醇的含量通常是降低的(与临近对照组织比较)<sup>[10,21]</sup>。然而,对于血液样品,在肺癌患者血液中肌醇的含量却

出现升高(与健康对照血液样品比较)<sup>[11]</sup>。与先前研究相比,本研究观察到的肌醇的变化与Rocha等人<sup>[10]</sup>的结果一致。

谷氨酰胺(Gln, glutamine),一方面通过氨解作用可快速转化为乳酸以产生足够的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)用来支持脂肪酸的合成;另一方面,它可回补因丙酮酸羧化作用被压制时减少的草酰乙酸(oxaloacetate)。此外,谷氨酰胺分解代谢通常会产生丙氨酸和氨,因此,大多源自谷氨酰胺的氨基酸会从细胞中失去而未能合成其他小分子物质<sup>[22]</sup>。有研究发现,如果组织发生癌变,组织中的谷氨酰胺的浓度均出现升高<sup>[23,24]</sup>。也有研究发现,与正常组织相比在肿瘤组织中谷氨酰胺的浓度会降低<sup>[25]</sup>。本研究在肺癌组织中却首次观察到谷氨酰胺的浓度与临近肺组织相比出现显著下降(图3)。尽管其下降的原因目前还不清楚,但可以推测在肿瘤组织中谷氨酰胺浓度的下降很可能与谷氨酰合酶的活性和谷氨酰胺自身氨解代谢有关。

支链氨基酸(Branched-chain amino acids, BCAA)如缬氨酸(valine)、亮氨酸(leucine)、异亮氨酸(isoleucine)等虽不是蛋白质的结构单元,但也有药理特性,它们能被氧化成为其他氨基酸的氮源,调节蛋白质的合成和降解;调节神经递质的代谢<sup>[26]</sup>。在肿瘤恶疾<sup>[27]</sup>中支链氨基酸的减少能被经常观察到。本研究发现,在肺癌组织中缬氨酸的浓度与临近肺组织相比出现显著下降(图3)仍为首次报道。尽管缬氨酸下降的原因目前还不清楚,或许它的下降与肿瘤生长过程中所发生的一系列合成酶的活性有关。

## 4 结论

本研究主要运用液体HR  $^1\text{H}$  NMR技术结合多维变量分析方法研究了101例肺组织萃取液的代谢组特征。结果表明,肺组织中乳酸、葡萄糖和胆碱类化合物浓度的升高以及肌醇、谷氨酰胺和缬氨酸等代谢物浓度的降低是肺组织发生癌变最明显的特征;它们的浓度变化在不同部位的组别间均具有显著性差别;其相关OPLS-DA模型对预测组织癌变均具有100%灵敏性和100%特异性。因此,当前的研究可能为肺癌标志物研究以及未来临床诊断、治疗或预后提供帮助。

## 参考文献

---

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA-Cancer J Clin*, 2008, 58: 71—96
- 2 Devita V T, Lawrence T S, Rosenberg S A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 8th ed. Hamburg: Wolters Kluwer Health, 2001. 1
- 3 Onodera K, Okubo A, Yasumoto K, et al.  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance analysis of lung cancer: the perchloric acid extract spectrum. *J Cancer Res*, 1986, 77: 1201—1206
- 4 Halliday K R, Fenoglio-Preiser C, Sillerud L O. Differentiation of human tumors from nonmalignant tissue by natural-abundance  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*, 1988, 7: 384—411
- 5 Hanaoka H, Yoshioka Y, Ito I, et al. *In vitro* characterization of lung cancers by the use of  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of tissue extracts and discriminant factor analysis. *Magn Reson Med*, 1993, 29: 436—440
- 6 Yokota H, Guo J F, Matoba M, et al. Lactate, choline, and creatine levels measured by *in vitro*  $^1\text{H}$ -MRS as prognostic parameters in patients with non-small-cell lung cancer. *J Magn Reson Imaging*, 2007, 25: 992—999
- 7 Leij-Halfwerk S, Dagnelie P C, Van Den Berg J W, et al. Hepatic sugar phosphate levels reflect gluconeogenesis in lung cancer: simultaneous turnover measurements and  $^{31}\text{P}$  magnetic resonance spectroscopy *in vivo*. *Clin Sci*, 2000, 98: 167—174
- 8 Leij-Halfwerk S, van den Berg J W, Sijens P E, et al. Altered hepatic gluconeogenesis during L-alanine infusion in weight-losing lung cancer patients as observed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy and turnover measurements. *Cancer Res*, 2000, 60: 618—623
- 9 Leij-Halfwerk S, Dagnelie P C, Kappert P, et al. Decreased energy and phosphorylation status in the liver of lung cancer patients with weight loss. *J Hepatol*, 2000, 32: 887—892
- 10 Rocha C M, Barros A S, Gil A M, et al. Metabolic profiling of human lung cancer tissue by  $^1\text{H}$  high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *J Proteome Res*, 2010, 9: 319—332
- 11 Jordan K W, Adkins C B, Su L, et al. Comparison of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung by metabolomic analysis of tissue-serum pairs. *Lung Cancer*, 2010, 68: 44—50
- 12 Waters N J, Garrod S, Farrant R D, et al. High-resolution magic angle spinning  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of intact liver and kidney: optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition. *Anal Biochem*, 2000, 282: 16—23
- 13 Lindon J C, Holmes E, Nicholson J K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog NMR Spectrosc*, 2001, 39: 1—40
- 14 Wang Y, Bollard M E, Keun H, et al. Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues. *Anal Biochem*, 2003, 323: 26—32
- 15 Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*, 2007, 6: 469—479
- 16 Bylesjo M, Rantalainen M, Cloarec O, et al. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemometrics*, 2006, 20: 341—351
- 17 Trygg M, Wold S. O2-PLS, a two-block (X-Y) latent variable regression (LVR) method with an integral OSC filter. *J Chemometrics*, 2003, 17: 53—64
- 18 Podo F. Tumour phospholipid metabolism. *NMR Biomed*, 1999, 12: 413—439
- 19 Guo J, Higashi K, Yokota H, et al. *In vitro* proton magnetic resonance spectroscopic lactate and choline measurements,  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake, and prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *J Nucl Med*, 2004, 45: 1334—1339
- 20 Tayek J A. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. *J Am Coll Nutr*, 1992, 11: 445—456
- 21 Gottschalk M, Ivanova G, Collins D M, et al. Metabolomic studies of human lung carcinoma cell lines using *in vitro*  $^1\text{H}$  NMR of whole cells and cellular extracts. *NMR Biomed*, 2008, 21: 809—819
- 22 DeBerardinis R J, Mancuso A, Daikhin E, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19345—19350
- 23 Wilson M, Davies N P, Brundler M A, et al. High resolution magic angle spinning  $^1\text{H}$  NMR of childhood brain and nervous system tumours. *Mol Cancer*, 2009, 8: 6—12
- 24 Davies N P, Wilson M, Harris L M, et al. Identification and characterization of childhood cerebellar tumours by *in vivo* proton MRS. *NMR Biomed*, 2008, 21: 908—918
- 25 Yang Y, Li C, Nie X, et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2605—2614
- 26 Chiarla C, Giovannini I, Boldrini G, et al. The branched-chain amino acids. *Minerva Gastroent Diet*, 1997, 43: 189—196
- 27 Eley H L, Russell S T, Tisdale M J. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem J*, 2007, 407: 113—120

# Metabonomic Characteristics of Human Lung Cancer Using High Resolution $^1\text{H}$ NMR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis

CHEN WenXue<sup>1,2</sup>, ZU YuKun<sup>3</sup>, LU ShaoHua<sup>4</sup>, CHEN FenEr<sup>1</sup>, LAN WenXian<sup>5</sup>,  
BAI ChunXue<sup>4</sup> & DENG Feng<sup>2</sup>

*1 Fudan-DSM Joint Lab, Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China;*

*2 State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular and Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;*

*3 Tongji hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;*

*4 Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200233, China;*

*5 Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*

Lung cancer is a serious and leading disease imperiling people's health with the highest morbidity and mortality among all malignant tumors. Clinical diagnosis of lung cancer mainly relies on histopathological evaluation of tissue specimen. Extensive knowledge of the metabolic biochemistry of tumors can potentially provide important information for accurate diagnosis of lung cancer. High resolution  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of biological tissues extracts has emerged and been widely acknowledged as an excellent tool in investigating tissue metabolism. Particularly, the combination of HRMAS NMR technique and multivariate data analysis (MVDA) has become an important metabonomics platform for studying the intact biological tissues. In this paper, the metabonomic characteristics of 101 lung tissue extracts from 34 patients with lung cancer have been obtained using the HR  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and the MVDA methods including principal component analysis (PCA) and/or orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). The present study suggests clear differences among the metabonomic characteristics of lung tissues at various sites. Compared with the adjacent non-involved tissues, the lung cancer tissues had significantly higher levels of lactate but significantly lower levels of *myo*-inositol, glutamine and valine. Furthermore, OPLS-DA not only showed a good difference between the adjacent non-involved tissues and lung cancer tissues, but also produced 100% of predication for lung cancer.

**lung cancer, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, multivariate data analysis (MVDA), pattern recognition, predication**

doi: 10.1360/052010-414