



论文

用高分辨魔角旋转核磁共振氢谱技术结合模式识别方法对人类神经上皮肿瘤进行分级

陈文学^{①②}, 楼海燕^{③④}, 张红萍^⑤, 聂秀^⑥, 蓝文贤^①, 杨永霞^①, 向赞^①, 漆剑频^③, 雷皓^①, 唐惠儒^①, 陈芬儿^②, 邓风^①

① 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;

② 复旦大学化学系复旦-DSM 联合实验室, 上海 200433;

③ 华中科技大学同济医学院同济医院放射科, 武汉 430030;

④ 浙江大学医学院第一附属医院放射科, 杭州 310003;

⑤ 武汉大学医学院中南医院放射科, 武汉 430071;

⑥ 华中科技大学同济医学院协和医院病理科, 武汉 430022

E-mail: wxchen@fudan.edu.cn

收稿日期: 2010-12-17; 接受日期: 2011-06-01

国家自然科学基金(批准号: 20573132 和 20575074)、中国博士后基金(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 临床资料显示, 患有脑肿瘤病人的存活率通常与肿瘤的类型和级别有关。如通过高分辨魔角旋转核磁共振氢谱(HRMAS ¹H NMRS)技术检测得到肿瘤组织的代谢轮廓(特征), 不仅可为肿瘤的生物学和新陈代谢研究提供有价值的信息, 而且可为肿瘤的分类和分级提供重要的代谢指纹特征, 而这些特征有可能成为未来肿瘤诊断的潜在手段(工具)。本研究采用高分辨魔角旋转核磁共振氢谱技术结合多维变量分析(如主成分分析)方法研究了 30 例神经上皮肿瘤组织的代谢特征, 并与临床病理结果进行对照。这 30 例神经上皮肿瘤主要包括 2 例低级星形细胞瘤(I 级)、12 例中级星形细胞瘤(II 级)、8 例间变型星形细胞瘤(III 级)、3 例胶质母细胞瘤(IV 级)和 5 例髓母细胞瘤(IV 级)。研究发现, 神经元(NAA)、肌酸、顺式肌醇、甘氨酸和乳酸等代谢物的浓度以及一些代谢物与肌酸的浓度比值在不同级别的脑肿瘤组织间均具有显著性差别($P < 0.05$)。这些代谢物的浓度比值主要包括 NAA/肌酸、乳酸/肌酸、顺式肌醇/肌酸、甘氨酸/肌酸、反式肌醇/肌酸和丙氨酸/肌酸等。此外, 采用人为监管模式识别方法建模(SIMCA)来预测(或区分)低、高级肿瘤, 准确率基本均达 87%。如仅对预测高级(III 和 IV 级)肿瘤而言, 其灵敏性和特异性分别高达 87% 和 93%。因此, 高分辨魔角旋转核磁共振氢谱技术结合模式识别方法有可能成为未来一种潜在的、快速、准确分级人类脑肿瘤的手段(工具)。

关键词

神经上皮肿瘤
分级
高分辨魔角旋转核磁共振氢谱
代谢组学
模式识别

英文版见: Chen W X, Lou H Y, Zhang H P, et al. Grade classification of neuroepithelial tumors using high-resolution magic-angle spinning proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 606–616, doi: 10.1007/s11427-011-4193-7

脑肿瘤患者一般具有非常低的存活率和高复发率, 且被诊断出患有原发恶性脑肿瘤的成年病人其 5 年存活率不足 30%^[1~4]. 据临床统计资料显示, 在这些原发脑肿瘤中, 胶质瘤(如星形细胞瘤和胶质母细胞瘤)病例一般约占 45%, 其发病率大约在十万分之五到十万分之十^[5]. 因此, 及早发现和准确诊断肿瘤对于确定肿瘤正确的治疗方案至关重要. 迄今, 脑肿瘤的临床诊断主要是依靠肿瘤组织形态学的病理检查. 然而, 要想准确诊断一些恶性脑肿瘤, 特别是神经上皮肿瘤(如少突胶质瘤和髓母细胞瘤等), 有时对临床医师和神经病理学家仍是一项挑战^[6~8].

X-射线计算机断层成像术(CT)^[9]、磁共振成像(MRI)^[10,11]和正电子发射成像(PET)^[12,13]等一些现代诊断技术作为目前确定肿瘤病人正确治疗方案最基本的技术手段, 在脑肿瘤的临床诊断和研究中已得到越来越广泛的应用. 然而, 这些技术常仅限于提供肿瘤大小、生长方位等一些信息的确认和评价, 所以只能作为临床病理诊断技术必要的辅助手段.

由活体磁共振氢谱(*in vivo* ^1H MRS)^[14~17]和离体组织萃取液的核磁共振氢谱(*in vitro* ^1H NMRS)^[18~21]提供的许多与组织病理学相关的代谢物信息不仅能加深对肿瘤生物学的理解, 而且将为肿瘤的准确诊断提供帮助. 然而, 活体磁共振氢谱^[14~17]作为目前唯一非侵入的活体组织代谢物检测技术, 由于受其图谱分辨率和检测灵敏性的限制, 通常只能检测到少数几种代谢物(如脂类、总肌酸、总胆碱、乳酸、谷氨酸(或谷氨酰胺)和 NAA 等)的信息, 且图谱的基线和信噪比问题也不利于进行定量分析. 与之相比, 组织萃取液的核磁共振氢谱^[18~21]尽管具有较高的图谱分辨率, 但其应用目前仍颇具争议: (1) 组织萃取方法一般需要的组织样品用量较多(至少 50 mg); (2) 即使组织萃取的时间(一般超过 24 h)能够忍受, 但组织萃取的破坏性在一定程度上可能会改变原有的图谱特征; (3) 萃取方法本身通常只萃取一些亲水性(水溶性)的物质, 从而阻止了一些半移动的膜脂类物质的观察. 因此, 寻求一些能快速、直接检测肿瘤组织代谢特征的辅助手段非常必要.

最近, 新鲜组织的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱(HRMAS ^1H NMRS)技术已被证明是一项不需要经过组织处理就能直接对肿瘤进行快速分类和分级诊断的技术^[22~25]. 该技术只需较短的样品制备时间(一般不超过 5 min), 很少的样品用量(一般 10 mg 左右)

也能观察到许多组织代谢物的信息和动态变化, 而且较短的采样时间(一般小于 20 min)可相应减少组织的化学变化, 又可阻止组织代谢物的大量降解^[26]. 此技术与基于模式识别的多维变量分析(MVDA, 如主成分分析)方法结合, 作为当今唯一被人们所熟知的非侵入性研究组织的代谢组学技术, 以其半定量的研究方法即将成为离体组织代谢组学的重要研究平台. 该技术的优势已在为人类肿瘤生化研究、诊断和分类提供方便、快速和准确的辅助诊断等领域得到了很好的发展和体现^[27,28].

本研究运用高分辨魔角旋转核磁共振氢谱技术结合多维变量分析方法研究和分析了 30 例神经上皮肿瘤的代谢组特征, 旨在: (1) 进一步了解不同级别的脑肿瘤中各代谢物的代谢水平差异; (2) 进一步探索与传统诊断技术互补的新的辅助分级技术的可行性.

1 材料与方法

1.1 脑组织标本的收集和病理评价

2 例低级星形细胞瘤(I 级)、12 例中级星形细胞瘤(II 级)、8 例间变型星形细胞瘤(III 级)、3 例胶质母细胞瘤(IV 级)和 5 例髓母细胞瘤(IV 级)组织标本分别取自华中科技大学同济医学院同济医院和武汉大学医学院中南医院神经外科 30 位脑肿瘤病人. 每例肿瘤组织标本自手术取下后(标本收集时间不超过 30 min)均被分成两部分. 一部分用于临床病理诊断, 先用 10%中性甲醛缓冲液固定, 然后用石蜡包埋, 再用常规组织病理诊断方法进行评价. 5 μm 厚的组织切片用常规 H&E 法染色, 最后二家医院的病理学家根据世界卫生组织 2000 年修订的病理诊断标准对这些组织切片进行病理分类和分期; 另一部分用于魔角核磁共振(MAS NMR)研究的样品, 自手术取下后迅速放入液氮中速冻, 然后转入 -80°C 低温冰箱备用. 研究得到当地伦理道德委员会批准和病人及家属知情同意书.

根据肿瘤的类型和级别, 将所有的脑肿瘤组织样品分成 5 群(组), 这些病人的数据资料总结在表 1 中. 显然, 这些病人的发病年龄相当宽泛, 从 10~71 岁, 且男性(20 例)发病率稍高于女性(10 例). 然而, 除了髓母细胞瘤多好发于青少年外, 在这些有限的肿瘤病例中, 并未观察到病人的发病趋势与年龄存在

表 1 30 位脑肿瘤患者的病理资料

组群(样品数)	病理诊断	分级(I~IV)	性别		病人年龄	
			男性	女性	范围	$\bar{x} \pm SD$
组群 1($n=2$)	星形细胞瘤	I	1	1	36~63	50 $\pm$ 19.1
组群 2($n=12$)	星形细胞瘤	II	8	4	21~63	38 $\pm$ 12.6
组群 3($n=8$)	星形细胞瘤	III	3	5	36~71	49 $\pm$ 11.7
组群 4($n=3$)	胶质母细胞瘤	IV	3	0	22~41	32 $\pm$ 9.5
组群 5($n=5$)	髓母细胞瘤	IV	5	0	10~32	19 $\pm$ 9.4

明显相关。

1.2 脑肿瘤组织的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱

每个肿瘤样品(约 20~30 mg)在 4℃ 经重水漂洗后分别放入直径为 4 mm 的专为魔角实验设计使用的石英管中, 每个样品的装样总时间不超过 5 min. 所有样品的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱均是在开氏 298 K 温度下, 转速为 2 kHz, 装有标准微量探头且氢的发射功率约为 599.906 MHz 的美国瓦里安(Varian) INVOA 型波谱仪上进行采集, 仪器探头温度的调节根据文献[29]使用甲醇溶液进行校正. 每个样品的 2 个核磁共振氢谱分别用一维单脉冲和标准的 CPMG 自旋回波序列进行采集^[26,30]. 每次循环延迟(弛豫)中, 水峰信号是用弱的连续波照射并采用预饱和方法进行压制. 每个样品采集的 90°脉宽均被调节在 4.2~5.7 s. 对于所有样品, 采样参数均为: 谱宽 12 kHz, 循环延迟 2 s, 数据点数 16 k, 累架次数 128 次. 但在 CPMG 序列中, 总的自旋回波(弛豫)时间为 32 ms($2n\tau$, $\tau=240\sim 250$ s). 每个样品(2 个氢谱)总的采集时间均不超过 20 min.

对上述采集到的 FID 数据先分别用 1.0 Hz 的窗函数进行傅立叶变换(fourier transform, FT), 再利用 XWINNMR 2.0(Bruker Analytik, Germany)软件系统对整个波谱进行自动相位和基线校正处理, 最后将得到的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱(HRMAS ¹H NMRs)用乳酸甲基峰的化学位移值(δ_H 1.33)进行定标.

当更多的样品被研究时, 由于样品量的增加和波谱的复杂, 样品间简单的波谱比较不足以得到更多有用的组织代谢物变化信息. 因此, 在此情况下, 一个最有效的方法就是提供每群(组)样品的平均谱. 对于每群样品而言, 其平均谱采用如下方法得到: 首先, 用 0.001 ppm 的区间小段将整个波谱(δ 0.50~ 4.50)

分成 4000 段分段积分, 然后将每个分段积分值对整个分段积分之和(δ 0.50~4.50)进行归一化处理, 最后将每一小段分值自动变换为归一化的波谱.

1.3 数据减维和主成分分析

传统的波谱分析方法是使用峰高或峰面积进行比较, 而主成分分析(PCA)方法则是将整个波谱作为一个整体特征来进行比较. 考虑到因实验转速(约 2 kHz)限制产生的旋转边带和在脂肪区有很少的波谱信号, 本研究只选取化学位移在 δ 0.50~4.50 的区间信号进行主成分分析. 用化学位移为 0.001 ppm 区间小段将每个波谱(δ 0.50~4.50)分成均匀的 4000 等份, 然后对每一小段区间进行分段积分, 最后将每一分段积分对整个分段积分之和进行归一化处理.

为了观察不同级别的脑肿瘤的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱之间是否存在差别, 使用 SIMCA-P 10.0(Umetrics, Sweden) 软件并以中心模式对所有的波谱数据分别进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA). 这些处理后的数据分别用得分图和回归载荷因子(负载)图表示. 其中, 在得分图中的每个数据点分别代表一个样品, 而回归载荷因子(负载)图中的每个小棒(分段积分)则代表对区分起重要贡献作用的波谱区间值(即化学位移值)^[27,30~32].

1.4 模式识别

为了最大程度地区分和预测不同级别的脑肿瘤, 以不同组群信息作 Y 变量对上述波谱数据进行人为监管的模式识别方法(soft independent modeling of class analogy, SIMCA)分析. 首先, 将这些数据分成“训练”组和“测试”组, 然后对“训练”组中每一组群的主成分进行计算分析, 再根据这些群属信息在 Cooman's 图中的边界(区域)位置对它们进行归属和划分^[27]. 此外, 正交信号校正(orthogonal signal correction, OSC)被用

于最大化区分^[33]. 因此, 正交偏最小二乘法(OPLS)模型则用来预测肿瘤的级别. OPLS 是经 OSC 过滤后的人为监管的 PLS 模型方法的扩展, 其主要是为了移去一些与群组(区分)属性不相关的变量.

在当前的研究中, 首先将所有 30 例脑肿瘤样品分成二群, 即所有 14 例由 I 级和 II 级星形细胞瘤组成的低级脑肿瘤构成低级群(class1), 而所有剩下的 16 例由 III 级星形细胞、胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤组成的高级脑肿瘤构成高级群(class2); 其次, 从每个群中分别选取一半的样品作为“训练”组, 剩下的样品则作为“测试”组, 然后对所有这些 MAS 数据分别建立 OSC 过滤前后的 SIMCA 模型进行分析和预测; 此外, 在样品量较少时, 常采用“弃一法”(即逐一检测法, 将每个样品分别从“训练”组中剔除而单独作为“测试”数据所进行的分类预测方法)进行分类测试.

1.5 统计分析

对于 HRMAS NMR 波谱数据来说, 要想对代谢物的浓度进行绝对定量通常是非常困难的. 此时, 代谢物的浓度水平即可用代谢物信号峰的归一化积分值(相对浓度)来表示. 因此, 每个 NMR 波谱中信号峰的归一化积分值均将被用于统计分析.

用 SPSS 10.0(SPSS Inc, USA)软件分别对取材于 30 例脑肿瘤组织的一些代谢物的相对浓度值(归一化积分值)和它们对肌酸(δ 3.93)的浓度比值进行双尾方差分析(ANOVA). 当 $P < 0.05$ 时, 即可认为这些代谢物的浓度变化在组间存在显著性差别.

2 结果

2.1 组织标本的病理评价和形态学特征

图 1 展现了分别取材于 1 例正常脑组织、1 例低级星形细胞瘤(I 级)、1 例中级星形细胞瘤(II 级)、1 例间变型星形细胞瘤(III 级)、1 例胶质母细胞瘤(IV 级)和 1 例髓母细胞瘤(IV 级)等组织标本的经 H&E 染色的组织切片图. 很明显, 肿瘤细胞的个数随着肿瘤级别的增加而增加. 与正常脑组织相比(图 1(A)), I 和 II 级星形细胞瘤(图 1(B)和(C))中肿瘤细胞的个数有明显的增加, 但未观察到有丝分裂, III 级星形细胞瘤(图 1(D))中肿瘤细胞个数却增加较多, 且观察到入侵的血吸虫卵. IV 胶质母细胞瘤(图 1(E))也可称为 IV 星

形细胞瘤, 有明显的细胞增殖和有丝分裂出现. IV 髓母细胞瘤(图 1(F))的主要特征是有浓密的肿瘤细胞且泡浆丰富, 并有更多的有丝分裂出现.

2.2 脑肿瘤组织的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱

图 2 描述了与上述切片对应的组织在转速为 2 kHz, 通过 CPMG 脉冲序列采集到的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱(HRMAS ^1H NMRS). 从图中可观察到许多代谢物信号峰. 这些谱图中代谢物的归属主要根据先前的文献报道^[18,20,25,34-36]和本实验采集到的 2D ^1H - ^1H 全相关谱(TOCSY, 谱图未显示)确定的. 对于星形细胞瘤来说(图 2(B)~(D)), 随着肿瘤级别的增加, 肿瘤组织中未被完全压制的剩余脂类(Lip, δ 0.92)、乳酸(Lac, δ 1.33)、丙氨酸(Ala, δ 1.48)和反式肌醇(sI, δ 3.35)等代谢物的浓度增加, 而 NAA(δ 2.03)、顺式肌醇(mI, δ 3.62)和肌酸(Cre, δ 3.04)等代谢物的浓度则下降. 较高水平的甘氨酸(δ 3.56)和剩余脂类(Lip, δ 0.92)以及较低水平的 NAA、磷酸胆碱(PC, δ 3.22)和甘油磷酸胆碱(GPC, δ 3.23)是胶质母细胞瘤的基本特征(图 2(E)), 而较高水平的牛磺酸(Tau, δ 3.43)、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱以及较低水平的乳酸则是髓母细胞瘤的主要特征(图 2(F)).

图 3 展现了取材于不同级别群组的脑肿瘤组织通过 CPMG 脉冲序列采集到的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱的平均谱($\bar{x} \pm \text{SD}$). 除了较强的脂类信号由于在 CPMG 脉冲序列中使用较短的回波时间(32 ms)而未能被完全压制外, 在这些不同级别群组间的 NMR 谱图中仍能观察到许多代谢物信号峰的变化. 与 I 级星形细胞瘤相比(图 3(A)), 在 II 级和 III 级星形细胞瘤中剩余脂类和丙氨酸的浓度水平较高, 而 NAA、顺式肌醇、肌酸、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱的浓度水平较低(图 3(B)和(C)), 但在 IV 级胶质母细胞瘤中剩余脂类和牛磺酸的浓度水平较高, 乳酸和肌酸的浓度水平较低(图 3(D)). 然而, 与 II 级和 III 级星形细胞瘤以及 IV 胶质母细胞瘤相比, 在 IV 髓母细胞瘤中顺式肌醇、牛磺酸、甘氨酸、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱和天门冬氨酸的浓度相对较高, 乳酸和肌酸的浓度相对较低(图 3(E)).

2.3 高分辨魔角旋转核磁共振氢谱数据的主成分分析

图 4 描述了不同级别肿瘤群组的高分辨魔角旋转

核磁共振氢谱数据的偏最小二乘判别分析的得分图(scores plots)和回归载荷因子图(regression coefficients plots). 首先, 占 MAS 数据所有变量 24.4% 的第一主成分(图 4(A))在 I 级和 II 级星形细胞瘤群组(第一、二群)和 III 级星形细胞瘤群组(第三群)之间展现了很好的区分. 相应地, 其回归载荷因子图(图 4(B))显示, 与 III 级星形细胞瘤群组(第三群)相比, 在 I 级和 II 级星形细胞瘤群组(第一、二群)中, NAA、肌酸、甘油磷酸胆碱和肌醇等代谢物的浓度相对较高, 而乳酸和磷酸胆碱的浓度相对较低; 其次, 占 MAS 数据所有变量 27.8% 的第一主成分(图 4(C))在 I 级和 II 级星形细胞瘤群组(第一、二群)和 IV 级星形细胞瘤群组(第四、五

群)之间也展现了很好的区分. 与 IV 级肿瘤群组相比, 在回归载荷因子图(图 4(D))中, 正值表示在 I 级和 II 级星形细胞瘤中乳酸、肌酸、胆碱和甘油磷酸胆碱的浓度较高, 而负值则表示在 I 级和 II 级星形细胞瘤中甘氨酸和磷酸胆碱的浓度较低. 同样地, 第一主成分(图 4(E), 占变量的 29.8%)在 III 级星形细胞瘤群组(第三群)和 IV 级肿瘤群组(第四、五群)之间展现了很好的区分. 与 IV 级肿瘤群组(第四、五群)相比, 其回归载荷因子图(图 4(F))则显示, 在 III 级星形细胞瘤群组(第三群)中, 乳酸、肌酸、胆碱和甘油磷酸胆碱代谢物的浓度较高, 而顺式肌醇和磷酸胆碱的浓度较低. 最后, 第一主成分(图 4(G), 占变量的 23.2%)在胶质母细胞瘤

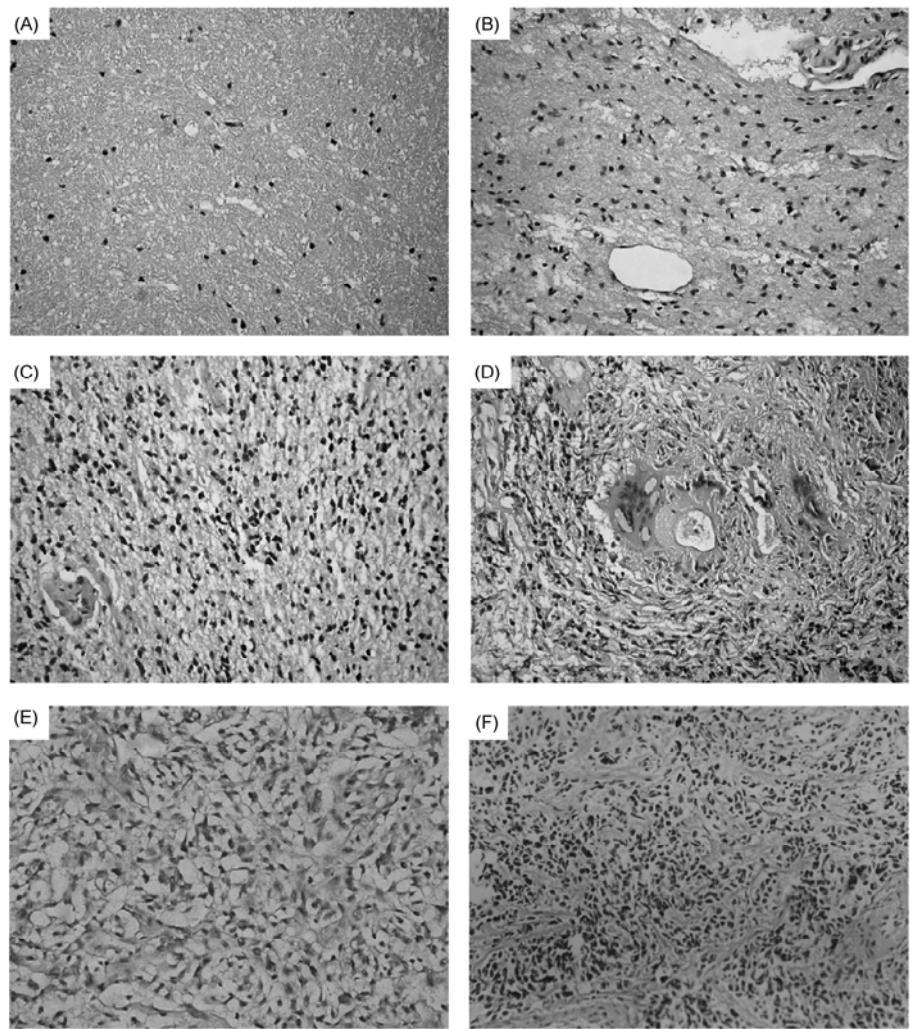


图 1 正常脑组织和脑肿瘤组织标本病理切片

(A) 正常脑组织(1 例, $\times 200$); (B) 星形细胞瘤(I 级, 1 例, $\times 200$); (C) 星形细胞瘤(II 级, 1 例, $\times 200$); (D) 星形细胞瘤(III 级, 1 例, $\times 200$); (E) 胶质母细胞瘤(IV 级, 1 例, $\times 200$); (F) 髓母细胞瘤(IV 级, 1 例, $\times 200$)

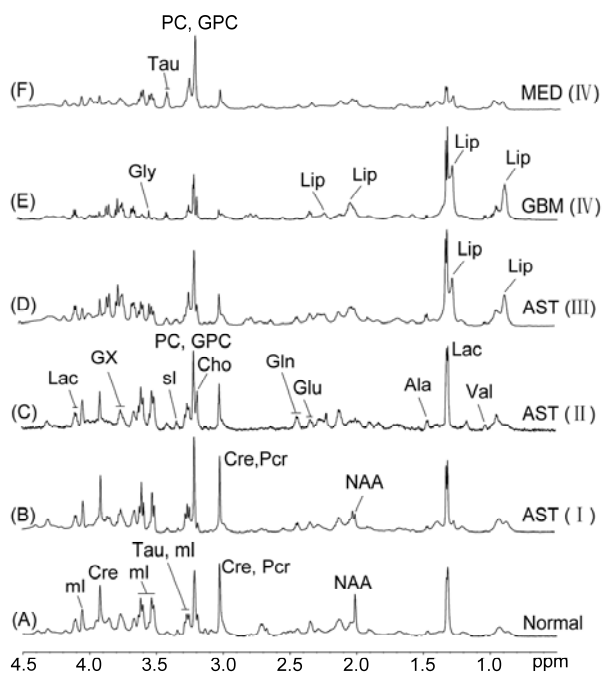


图 2 脑组织标本在转速为 2 kHz 通过 CPMG 脉冲序列采集到的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱

(A) 正常脑组织(1 例); (B) 星形细胞瘤(I 级, 1 例); (C) 星形细胞瘤(II 级, 1 例); (D) 星形细胞瘤(III 级, 1 例); (E) 胶质母细胞瘤(IV 级, 1 例); (F) 髓母细胞瘤(IV 级, 1 例)

群组(第四群)和髓母细胞瘤群组(第五群)之间也展现了很好的区分. 而在 I 级星形细胞瘤群组(第一群)和 II 级星形细胞瘤群组(第二群)之间, 第一主成分(图 4(I)), 占变量的 33.3%仍展现了很好的区分. 它们的回归载荷因子图(图 4(H)和(J))分别展现了在两群组间对区分起重要贡献作用的一些代谢物的信息.

2.4 高分辨魔角旋转核磁共振氢谱数据的 SIMCA 模型分析

图 5 显示用于预测群组信息的正交偏最小二乘法(OPLS)模型. 占有所有变量 66%的第一主成分在二群组间展现了很好的区分. OPLS 得分图的特征为: 累计变量 $R^2Y=0.96$, 模型变量 $Q^2=0.95$, 其中较高的 Q^2 值表示模型具有较好的预测能力.

图 6 为低级群组一(class 1)和高级群组二(class 2)之间的 Cooman 残差图. 根据 95%可信区间, Cooman 残差图将被分成 4 个区域. 其中, 在左上角区域, 7 个样品中有 6 个样品被正确地划分为低级(I~II)群组, 而在右下角区域 8 个样品中有 7 个样品被正确划分为

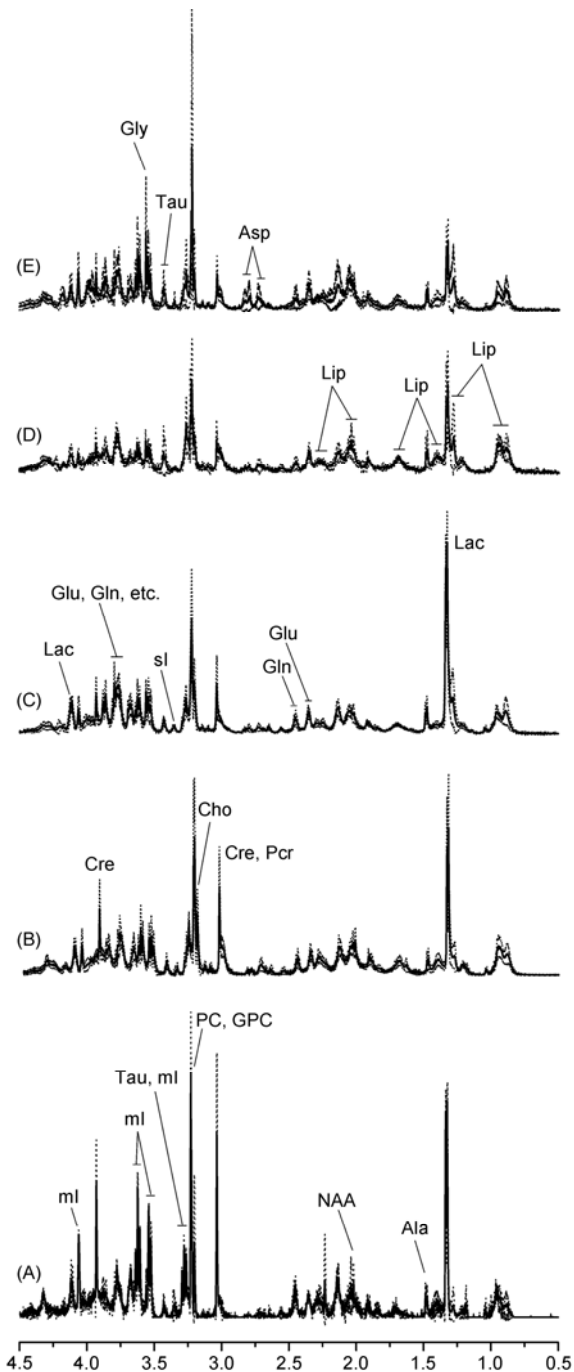


图 3 30 例脑肿瘤组织样品在转速为 2 kHz 通过 CPMG 脉冲序列采集到的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱的平均谱

(A) 星形细胞瘤(I 级); (B) 星形细胞瘤(II 级); (C) 星形细胞瘤(III 级); (D) 胶质母细胞瘤(IV 级); (E) 髓母细胞瘤(IV 级). 实线和虚线分别代表每一组肿瘤样品平均谱的 $\bar{x} \pm SD$

高级(III~IV)群组. 该 SIMCA 模型预测(区分)每一个群组的正确率几乎均在 87%. 而且, 该模型预测高级

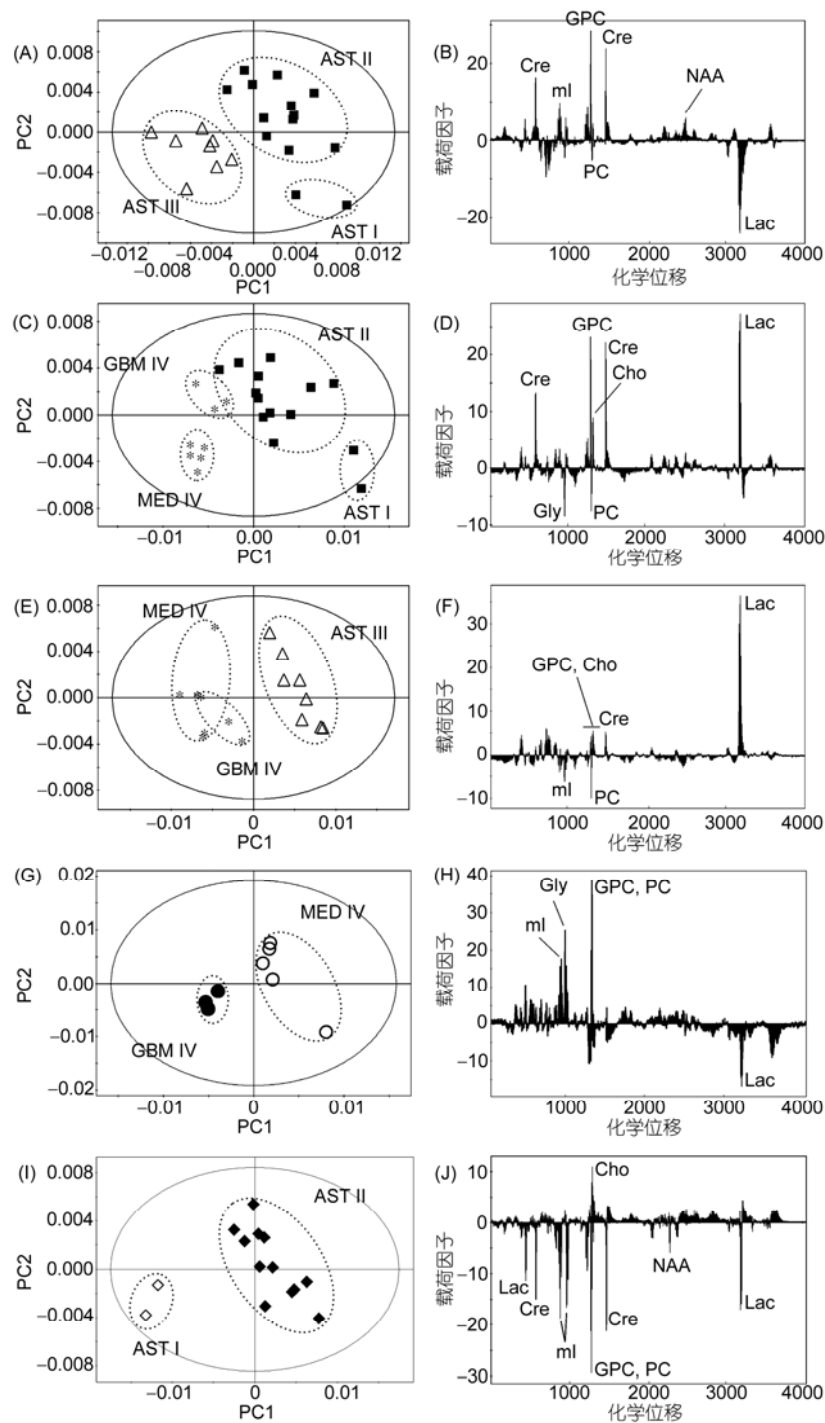


图 4 在不同级别群组间, 30 例肿瘤样品的高分辨魔角旋转核磁共振谱数据的偏最小二乘判别分析(PLS-DA)得分图和回归载荷因子图比较

(A) 第一、二和三群间的 PLS-DA 得分图; (B) 第一、二和三群间的第一主成分的载荷因子图; (C) 第一、二和四、五群间的 PLS-DA 得分图; (D) 第一、二和四、五群间的第一主成分载荷因子图; (E) 第三和四、五群间的 PLS-DA 得分图; (F) 第三和四、五群间的第一主成分载荷因子图; (G) 第四(GBM)和五群(MED)间的 PLS-DA 得分图; (H) 第四(GBM)和五群(MED)间的第一主成分的载荷因子图; (I) 第一(AST I)和二群(AST II)间的 PLS-DA 得分图; (J) 第一(AST I)和二群(AST II)间的第一主成分的载荷因子图。■: 一和二群; △: 三群; *: 四和五群; ●: 胶质母细胞瘤(GBM); ○: 髓母细胞瘤(MED); ◇: I 级星形细胞瘤(AST I); ◆: II 级星形细胞瘤(AST II)

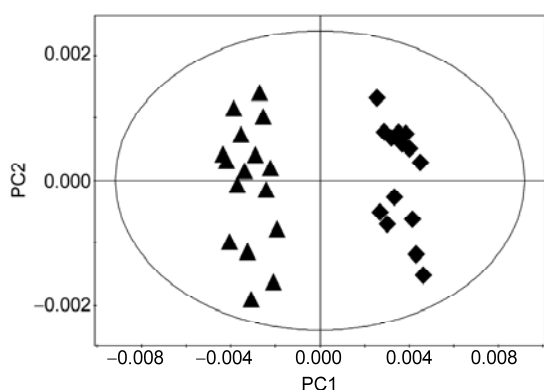


图 5 30 例脑肿瘤样品的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱数据的 OPLS 模型的第一和第二主成分得分图

◆: 低级(I~II)脑肿瘤; ▲: 高级(III~IV)脑肿瘤

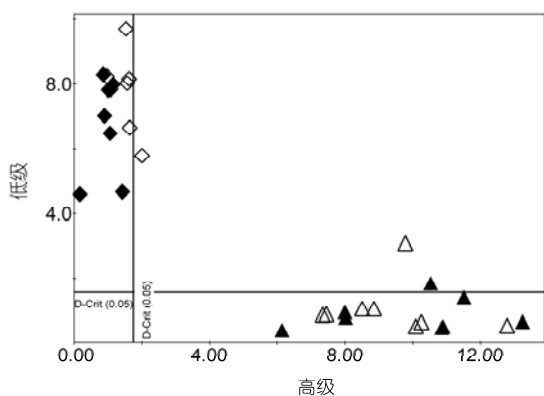


图 6 取材于低级和高级的 30 例脑肿瘤样品的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱数据用于 SIMCA 建模分析时, 其“训练”组和“测试”组的 Cooman 图

◆: 低级肿瘤“训练”组; ◇: 低级肿瘤“测试”组; ▲: 高级肿瘤“训练”组; △: 高级肿瘤“测试”组

(III~IV)群组的灵敏性和特异性分别高达 87%和 93%。“弃一法”和正交化(OSC)用于该模型预测的结果总结在表 2 中。如使用正交的 OPLS 模型进行预测, 其预测结果的正确率将高达 100%。

2.5 统计分析

对于 5 个不同级别的群组样品来说, 肿瘤组织中一些代谢物的浓度和它们与肌酸的浓度比值(图 3 和 4)分别用双尾方差分析(ANOVA)进行统计, 结果总结在表 3 和 4 中。如表 3 所示, 一些代谢物的浓度水平随着肿瘤级别的上升(从第 I~IV 级)逐渐增加。这些代谢物主要包括: 顺式肌醇、肌酸、磷酸胆碱、甘油磷酸

胆碱、甘氨酸、牛磺酸和天门冬氨酸等。同时, 观察到 NAA、肌酸、顺式肌醇、甘氨酸和乳酸等代谢物的浓度在不同级别的肿瘤群之间有显著差别(表 3)。但牛磺酸、反式肌醇、天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸、剩余脂肪酸以及胆碱化合物(胆碱、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱)等代谢物的浓度在组间未发现显著性差别。另一方面, 发现一些代谢物与肌酸的浓度比值在组间存在显著差异(表 4), 这些代谢物的比值主要包括: NAA/肌酸、乳酸/肌酸、顺式肌醇/肌酸、甘氨酸/肌酸、反式肌醇/肌酸和丙氨酸/肌酸。

3 讨论

众所周知, 由于恶性脑肿瘤病人存活率较低, 使得肿瘤的早发现 and 正确分级对于确定肿瘤最佳治疗方案和预后有着极其重要的作用。本研究观察到有限的肿瘤样品的高分辨魔角旋转核磁共振氢谱(图 2)间的差别, 并与组织病理结果(图 1)进行对照。然而, 由于谱图的复杂性和样品数量增加使得想单纯依靠肉眼观察样品波谱间细微差别变得极其困难, 特别是由于组织样品的异质性^[37]。有时即使是同一类型的组织样品或是同一样品由于取材位点的不同, 常可能会导致其 NMR 波谱存在极小的差别。因此, 需要寻找一种能快速观察更多肿瘤组织样品 NMR 波谱间差别的有效方法。

基于上述原因, 本研究分别采用求平均谱和主成分分析两种方法对这些肿瘤样品进行最大程度地区分和分类。研究结果显示, 平均谱能非常清楚地展现在不同级别肿瘤样品之间一些代谢物的浓度变化(图 3)。这些代谢物主要包括乳酸、顺式肌醇、肌酸、甘氨酸和胆碱化合物(胆碱、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱)等。与平均谱相比, PLS-DA 的回归载荷因子图(图 4)也展现了在不同级别的肿瘤组织群间对区分起重要作用的一些代谢物的信息。换句话说, 当前的 HRMAS ¹H NMR 谱提供了更多与组织病理相关的代谢物信息, 为加深肿瘤生物学的理解以及确认最关键的肿瘤分子代谢途径提供了帮助, 将有助于脑肿瘤的正确分类和分级。

对于脑肿瘤的代谢物而言, 在不同级别脑肿瘤组织间, 先前的活体磁共振波谱(*in vivo* MRS)、离体组织萃取液的 NMR 波谱(*in vitro* NMRS)和离体魔角 NMR 波谱(*ex vivo* MAS NMRS)均有一些报道(表 5)。首先,

表 2 经正交处理前后 SIMCA 模型的分类结果^{a)}

级别群	样品总数	PLS 模型正确分组的样品数 [*]		OPLS 模型正确分组的样品数 [#]	
		群 1	群 2	群 1	群 2
群 1	14	12	2	14	0
群 2	16	0	16	0	16

a) *: 群组分类正确的百分数: 93%(28/30); #: 群组分类正确的百分数: 100%(30/30)

表 3 在不同级别肿瘤间由高分辨魔角旋转核磁共振氢谱计算得到的一些代谢物浓度(即归一化积分值的百分数, $\bar{x} \pm SD$)^{a)}

代谢物(化学位移)	AST I(n=2)	AST II(n=12)	AST III(n=8)	GBM(n=3)	MED(n=5)	<i>P</i> [*]
NAA(δ 4.38)	1.26 $\pm$ 0.25	0.90 $\pm$ 0.24	0.56 $\pm$ 0.21	0.88 $\pm$ 0.31	0.91 $\pm$ 0.22	<0.01
lactate(δ 4.12)	1.90 $\pm$ 0.22	1.46 $\pm$ 0.26	1.74 $\pm$ 0.28	1.16 $\pm$ 0.44	1.26 $\pm$ 0.40	<0.05
creatine(δ 3.93)	2.76 $\pm$ 0.59	1.64 $\pm$ 0.55	1.10 $\pm$ 0.44	0.90 $\pm$ 0.38	1.04 $\pm$ 0.38	<0.001
myo-inositol(δ 3.62)	5.75 $\pm$ 0.50	2.94 $\pm$ 0.86	2.64 $\pm$ 0.80	2.17 $\pm$ 0.45	3.62 $\pm$ 1.20	<0.001
glycine(δ 3.56)	0.67 $\pm$ 0.32	0.77 $\pm$ 0.18	0.93 $\pm$ 0.23	0.69 $\pm$ 0.06	1.37 $\pm$ 0.74	<0.05
taurine(δ 3.43)	0.41 $\pm$ 0.18	0.47 $\pm$ 0.19	0.51 $\pm$ 0.15	0.76 $\pm$ 0.82	0.81 $\pm$ 0.47	0.20~0.30
scyllo-inositol(δ 3.35)	0.52 $\pm$ 0.47	0.33 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.11	0.31 $\pm$ 0.08	0.43 $\pm$ 0.21	0.40~0.50
PC+GPC(δ 3.22)	5.61 $\pm$ 0.12	4.88 $\pm$ 1.64	4.18 $\pm$ 1.13	3.59 $\pm$ 0.37	4.63 $\pm$ 2.82	0.60~0.70
choline(δ 3.20)	1.53 $\pm$ 1.36	1.82 $\pm$ 0.71	1.71 $\pm$ 0.63	1.33 $\pm$ 0.26	1.07 $\pm$ 0.68	0.30~0.40
tCho(δ 3.21)	7.14 $\pm$ 1.25	6.69 $\pm$ 2.06	5.89 $\pm$ 1.45	4.92 $\pm$ 0.50	5.70 $\pm$ 3.39	0.60~0.70
aspartate(δ 2.82)	0.06 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.11	0.26 $\pm$ 0.12	0.48 $\pm$ 0.47	<0.08
glutamine(δ 2.46)	1.34 $\pm$ 0.49	0.87 $\pm$ 0.37	0.91 $\pm$ 0.35	0.66 $\pm$ 0.37	0.75 $\pm$ 0.54	0.40~0.50
glutamate(δ 2.35)	1.09 $\pm$ 0.08	1.24 $\pm$ 0.34	1.21 $\pm$ 0.25	1.19 $\pm$ 0.30	1.40 $\pm$ 0.57	0.80~0.90
alanine(δ 1.48)	0.69 $\pm$ 0.33	0.55 $\pm$ 0.29	0.89 $\pm$ 0.33	0.85 $\pm$ 0.46	0.70 $\pm$ 0.16	0.10~0.20
valine(δ 1.05)	0.19 $\pm$ 0.21	0.21 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.10	0.19 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.11	0.60~0.70
lipid(δ 0.92)	3.18 $\pm$ 1.32	4.52 $\pm$ 1.48	3.90 $\pm$ 1.02	5.28 $\pm$ 1.52	3.29 $\pm$ 1.44	0.20~0.30

a) NAA: 神经元; PC: 磷酸胆碱; GPC: 甘油磷酸胆碱; 总胆碱: 包括胆碱、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱; AST: 星形细胞瘤; GBM: 胶质母细胞瘤; MED: 髓母细胞瘤。黑体示 $P<0.05$, 双尾 ANOVA

表 4 在不同级别肿瘤间由高分辨魔角旋转核磁共振氢谱计算得到的一些代谢物与肌酸(δ 3.93)的浓度比值($\bar{x} \pm SD$)^{a)}

代谢物浓度比值(化学位移)	AST I(n=2)	AST II(n=12)	AST III(n=8)	GBM(n=3)	MED(n=5)	<i>P</i> [*]
NAA/Cre(δ 4.38)	0.46 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.28	0.56 $\pm$ 0.19	1.11 $\pm$ 0.54	0.94 $\pm$ 0.29	<0.05
lactate/Cre(δ 4.12)	0.71 $\pm$ 0.23	0.97 $\pm$ 0.34	1.76 $\pm$ 0.59	1.55 $\pm$ 1.20	1.33 $\pm$ 0.58	<0.05
myo-inositol/Cre(δ 3.62)	2.15 $\pm$ 0.64	1.88 $\pm$ 0.51	2.61 $\pm$ 0.90	2.63 $\pm$ 1.04	3.85 $\pm$ 1.95	<0.05
glycine/Cre(δ 3.56)	0.26 $\pm$ 0.17	0.53 $\pm$ 0.26	0.96 $\pm$ 0.41	0.88 $\pm$ 0.41	1.65 $\pm$ 1.54	<0.05
taurine/Cre(δ 3.43)	0.16 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.33	0.50 $\pm$ 0.18	1.22 $\pm$ 1.65	0.82 $\pm$ 0.41	0.10~0.20
scyllo-inositol/Cre(δ 3.35)	0.21 $\pm$ 0.22	0.21 $\pm$ 0.10	0.44 $\pm$ 0.18	0.41 $\pm$ 0.28	0.49 $\pm$ 0.34	<0.05
(PC+GPC)/Cre(δ 3.22)	2.08 $\pm$ 0.40	3.17 $\pm$ 1.19	4.07 $\pm$ 1.13	4.62 $\pm$ 2.47	5.49 $\pm$ 5.02	0.30~0.40
choline/Cre(δ 3.20)	0.62 $\pm$ 0.63	1.20 $\pm$ 0.53	1.79 $\pm$ 1.00	1.65 $\pm$ 0.81	1.35 $\pm$ 1.40	0.40~0.50
tCho/Cre(δ 3.21)	2.70 $\pm$ 1.03	4.38 $\pm$ 1.53	5.85 $\pm$ 2.01	6.27 $\pm$ 3.26	6.83 $\pm$ 6.37	0.30~0.40
aspartate/Cre(δ 2.82)	0.02 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.16	0.34 $\pm$ 0.21	0.66 $\pm$ 0.87	0.10~0.20
glutamine/Cre(δ 2.46)	0.52 $\pm$ 0.29	0.59 $\pm$ 0.39	0.87 $\pm$ 0.26	0.79 $\pm$ 0.44	0.69 $\pm$ 0.26	0.40~0.50
glutamate/Cre(δ 2.35)	0.41 $\pm$ 0.12	0.88 $\pm$ 0.62	1.25 $\pm$ 0.52	1.47 $\pm$ 0.60	1.53 $\pm$ 0.88	0.10~0.20
alanine/Cre(δ 1.48)	0.27 $\pm$ 0.18	0.42 $\pm$ 0.39	0.96 $\pm$ 0.55	1.15 $\pm$ 0.77	0.75 $\pm$ 0.32	<0.05
valine/Cre(δ 1.05)	0.08 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.10	0.28 $\pm$ 0.19	0.24 $\pm$ 0.11	0.19 $\pm$ 0.15	0.20~0.30
lipid/Cre(δ 0.92)	0.22 $\pm$ 0.28	1.33 $\pm$ 0.89	3.59 $\pm$ 2.98	3.35 $\pm$ 2.19	2.82 $\pm$ 3.30	0.10~0.20

a) Cre: 肌酸; NAA: 神经元; PC: 磷酸胆碱; GPC: 甘油磷酸胆碱; 总胆碱: 包括胆碱、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱; AST: 星形细胞瘤; GBM: 胶质母细胞瘤; MED: 髓母细胞瘤。黑体示 $P<0.05$, 双尾 ANOVA

表 5 在不同级别的脑肿瘤间具有显著性差别的一些代谢物浓度水平和浓度比值比较

NMR 方法	具有显著性差别的代谢物浓度水平和浓度比值($P<0.05$)	文献
<i>in vivo</i> MRS	NAA, Ala, Cre, tCho, mI (δ 3.56), Lac, Glu (or Gln, δ 3.7), Lip (δ 1.3), NAA/Cre, tCho/Cre, Lac/Cre, Gly/Cre, mI/tCho, mI/cre, Ala/Cre	[34,14~17,38]
<i>in vitro</i> NMR	Ala, tCho, Tau, mI, Gly, Glu, Gly/Cre, Ala/Cre, tCho/Cre, Glu/Gln	[36,41,42]
<i>ex vivo</i> MAS	Cre, Gln, Tau, PC, PE, Cho, mI(δ 4.06)/Cre	[43,44]
<i>ex vivo</i> MAS	NAA, Lac, Cre, mI, Gly, NAA/Cre, Lac/Cre, mI/Cre, Gly/Cre, sI/Cre, Ala/Cre	本研究

对于活体磁共振氢谱^[14-17,34,38]来说, 由于其波谱分辨率和探测灵敏性均较低, 胆碱、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱的信号经常被合在一起报道为总胆碱, 谷氨酸和谷氨酰胺的信号也经常被报道为谷氨类化合物(GLX, δ 2.4, 3.7). 甘氨酸(Gly, δ 3.56)有时也被错误地当作顺式肌醇来报道. 然而, 在当前的 MAS NMR 研究中, 谷氨酸(Glu, δ 2.35)和谷氨酰胺(Gln, δ 2.46)的信号是可以完全分辨的, 因而可以单独分开考虑. 同时磷酸胆碱(PC, δ 3.22)和甘油磷酸胆碱(GPC, δ 3.23)的信号也可以通过曲线拟合方法分开. 本研究中, NAA、肌酸、顺式肌醇、甘氨酸和乳酸等代谢物在不同级别间的显著性变化与前人活体磁共振(*in vivo* MRS)报道一致, 除了反式肌醇外, 本研究观察到一些具有显著性差异的代谢物与肌酸的浓度比值和前人活体磁共振研究报道也基本一致(表 4 和 5). 与前人研究不同的是, 总胆碱、丙氨酸和脂类的浓度在组间未观察到显著性差别(表 3). 原因可能是因为在某些如胶质母细胞瘤类的高级脑肿瘤组织中存在部分坏死^[14,39,40], 从而导致磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱和剩余脂类的浓度下降(或增加)(表 3 和图 3).

其次, 在离体组织萃取液的 NMR 研究中^[36,41,42], NAA 和肌酸的浓度在低级脑肿瘤中尽管比在高级中要高^[36,41], 但它们的浓度在不同级别肿瘤组间未发现显著性差别. 脂类由于亲脂性几乎被传统组织萃取方法(只萃取亲水性物质)剔除, 因而在液体 NMR 中未观察到其信号. 因此, 与先前的液体 NMR 研究相比, 本研究观察到更多代谢物的浓度和浓度比值在组间具有显著性差别(表 5)^[36,42].

最后, 在离体 MAS NMR 研究中, Cheng 等人^[43]只在 3 个星形细胞瘤和 8 个胶质母细胞瘤之间观察到胆碱的浓度(δ 3.20)和肌醇(δ 4.05)与肌酸的比值存在显著性差别. 而且在他发表的文章中, 将化学位移在 δ 4.05 处的信号峰简单归属于肌醇, 可事实上该信

号峰主要来自顺式肌醇和胆碱. 最近, Wilson 等人^[44]在 12 例胶质瘤(10 例毛细胞型星形细胞瘤和 2 例室管膜瘤)和 17 例原始神经外胚层肿瘤(9 例髓母细胞瘤、7 例神经母细胞瘤和 1 例幕上原始神经外胚层肿瘤)中观察到, 肌酸、谷氨酰胺、牛磺酸、磷酸乙醇胺(PE, δ 3.98)和磷酸胆碱的浓度具有显著性差别. 但在文献^[44]中, 肿瘤样品主要来自 29 个儿童病人, 而在本研究中的样品主要来自成年病人. 因此, 与前面的 MAS 研究^[43,44]相比, 本研究观察到有更多的代谢物的浓度和浓度比值在不同级别的组群间具有显著性差别(表 5). 这些发现更意味着高分辨魔角旋转核磁共振氢谱技术对当前的神经诊断技术具有潜在的补充价值, 从而可进一步增加未来脑肿瘤诊断的准确性.

至于脑肿瘤的分级, 先前有人曾利用 NMRS 结合线性判别分析(LDA)^[16,17,41,44,45]或神经网络(NN)^[18]等一些模式识别方法报道过在不同级别的脑肿瘤间有较高的预测率. 与先前的活体 MRS^[16,17,45]、离体组织萃取液 NMRS^[18,41]和离体魔角 NMRS^[44]等方法相比, 本研究采用的 HRMAS NMRS 结合模式识别方法对神经上皮肿瘤能提供更准确的分级和诊断, 特别是“弃一法”(表 4). 当然, 为了验证目前这些结果, 除先前已有的文献报道外, 今后还需要对更多的病例样本进行研究.

4 结论

高分辨魔角旋转核磁共振氢谱技术结合模式识别方法不仅能提供有价值且能帮助人们理解肿瘤生物学和病理学的相关代谢组学信息, 而且将成为可以快速、准确分级脑肿瘤的潜在工具, 将有可能帮助组织病理学家更准确地分类脑肿瘤, 从而最终加速自动诊断技术的发展.

参考文献

- 1 Mertens A C, Yasui Y, Neglia J P, et al. Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol*, 2001, 19: 3163–3172
- 2 Mainio A, Hakko H, Timonen M, et al. Depression in relation to survival among neurosurgical patients with a primary brain tumor: a 5-year follow-up study. *Neurosurgery*, 2005, 56: 1234–1241
- 3 Sant M, Van der Sanden G, Capocaccia R. Survival rates for primary malignant brain tumours in Europe. EURO CARE working group. *Eur J Cancer*, 1998, 34: 2241–2247
- 4 Barnholtz-Sloan J S, Sloan A E, Schwartz A G. Relative survival rates and patterns of diagnosis analyzed by time period for individuals

- with primary malignant brain tumor, 1973-1997. *J Neurosurg*, 2003, 99: 458-466
- 5 Iwadata Y, Sakaida T, Hiwasa T, et al. Molecular classification and survival prediction in human gliomas based on proteome analysis. *Cancer Res*, 2004, 64: 2496-2501
 - 6 Engelhard H H, Stelea A, Cochran E J. Oligodendroglioma: pathology and molecular biology. *Surg Neurol*, 2002, 58: 111-117
 - 7 Rickert C H, Paulus W. Prognosis-related histomorphological and immunohistochemical markers in central nervous system tumors of childhood and adolescence. *Acta Neuropathol*, 2005, 109: 69-92
 - 8 Zarbo R J, Meier F A, Raab S S. Error detection in anatomic pathology. *Arch Pathol Lab Med*, 2005, 129: 1237-1245
 - 9 Salpietro F M, Alafaci C, Lucerna S, et al. Peritumoral edema in meningiomas microsurgical observations of different brain tumor interfaces related to computed tomography. *Neurosurgery*, 1994, 35: 638-641
 - 10 Simonetti A W, Melssen W J, Szabo de Edelenyi F, et al. Combination of feature-reduced MR spectroscopic and MR imaging data for improved brain tumor classification. *NMR Biomed*, 2005, 18: 34-43
 - 11 Devos A, Simonetti A W, Van der Graaf M, et al. The use of multivariate MR imaging intensities versus metabolic data from MR spectroscopic imaging for brain tumour classification. *J Magn Reson*, 2005, 173: 218-228
 - 12 Henze M, Mohammed A, Schlemmer H P, et al. PET and SPECT for detection of tumor progression in irradiated low-grade astrocytoma: a receiver-operating-characteristic analysis. *J Nucl Med*, 2004, 45: 579-586
 - 13 Roelcke U, Leenders K L. PET in neuro-oncology. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127: 2-8
 - 14 Tong Z, Yamaki T, Harada K, et al. *In vivo* quantification of the metabolites in normal brain and brain tumors by proton MR spectroscopy using water as an internal standard. *Magn Reson Imaging*, 2004, 22: 1017-1024
 - 15 Fayed N, Morales H, Modrego P J, et al. Contrast/Noise ratio on conventional MRI and choline/creatine ratio on proton MRI spectroscopy accurately discriminate low-grade from high-grade cerebral gliomas. *Acad Radiol*, 2006, 13: 728-737
 - 16 Majos C, Alonso J, Aguilera C, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS) of human brain tumours: assessment of differences between tumour types and its applicability in brain tumour categorization. *Eur Radiol*, 2003, 13: 582-591
 - 17 Majos C, Julia-Sape M, Alonso J, et al. Brain tumor classification by proton MR spectroscopy: comparison of diagnostic accuracy at short and long TE. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2004, 25: 1696-1704
 - 18 Maxwell R J, Martinez-Perez I, Cerdan S, et al. Pattern recognition analysis of ^1H NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumor biopsies. *Magn Reson Med*, 1998, 39: 869-877
 - 19 Lehnhardt F G, Bock C, Rohn G, et al. Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a ^1H NMR spectroscopic investigation. *NMR Biomed*, 2005, 18: 371-382
 - 20 Tugnoli V T M, Bertoluzza A, Barbarella G, et al. *In vitro* magnetic resonance spectroscopy of health and neoplastic brain tissues. *J Mol Struct*, 1999, 482: 365-369
 - 21 Peeling J, Sutherland G. High-resolution ^1H NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. *Magn Reson Med*, 1992, 24: 123-136
 - 22 Wilson M, Davies N P, Grundy R G, et al. A quantitative comparison of metabolite signals as detected by *in vivo* MRS with *ex vivo* ^1H HR-MAS for childhood brain tumours. *NMR Biomed*, 2009, 22: 213-219
 - 23 Yang Y, Li C, Nie X, et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning ^1H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2605-2614
 - 24 Righi V, Roda J M, Paz J, et al. ^1H HR-MAS and genomic analysis of human tumor biopsies discriminate between high and low grade astrocytomas. *NMR Biomed*, 2009, 22: 629-637
 - 25 Chen W X, Lou H Y, Zhang H P, et al. Metabonomic characterization of the low-grade human astrocytomas and meningiomas using magic-angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy and principal component analysis. *Prog Biochem Biophys*, 2008, 35: 1142-1153
 - 26 Waters N J, Garrod S, Farrant R D, et al. High-resolution magic angle spinning ^1H 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
 - 27 Wang Y, Holmes E, Nicholson J K, et al. Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12676-12681
 - 28 Cheng L L, Burns M A, Taylor J L, et al. Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res*, 2005, 65: 3030-3034
 - 29 Nicholls A W, Mortishire-Smith R J. Temperature calibration of a high-resolution magic-angle spinning NMR probe for analysis of tissue samples. *Magn Reson Chem*, 2001, 39: 773-776

- 30 Wang Y, Bollard M E, Keun H, et al. Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues. *Anal Biochem*, 2003, 323: 26–32
- 31 Eriksson L J E, Kettanah-Wold N. Introduction to multi and megavariate data analysis using projection methods (PCA and PLS-DA) 1992–2002. Sweden: Umetrics AB, 2002
- 32 Brindle J T, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^1H -NMR-based metabonomics. *Nat Med*, 2002, 8: 1439–1444
- 33 Wold S, Antti H, Lindgren F, et al. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometr Intell Lab*, 1998, 44: 175–185
- 34 Howe F A, Barton S J, Cudlip S A, et al. Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative *in vivo* ^1H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med*, 2003, 49: 223–232
- 35 Govindaraju V, Young K, Maudsley A A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed*, 2000, 13: 129–153
- 36 Kinoshita Y, Yokota A. Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using *in vitro* proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed*, 1997, 10: 2–12
- 37 Cheng L L, Anthony D C, Comite A R, et al. Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with *ex vivo* high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro Oncology*, 2000, 2: 87–95
- 38 Meyerand M E, Pipas J M, Mamourian A, et al. Classification of biopsy-confirmed brain tumors using single-voxel MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1999, 20: 117–123
- 39 Koljenovic S, Choo-Smith L P, Bakker Schut T C, et al. Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy. *Lab Invest*, 2002, 82: 1265–1277
- 40 Fayed N, Davila J, Medrano J, et al. Malignancy assessment of brain tumours with magnetic resonance spectroscopy and dynamic susceptibility contrast MRI. *Eur J Radiol*, 2008, 67: 427–433
- 41 Roda J M, Pascual J M, Carceller F, et al. Nonhistological diagnosis of human cerebral tumors by ^1H magnetic resonance spectroscopy and amino acid analysis. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 3983–3993
- 42 Lehnhardt F G, Rohn G, Ernestus R I, et al. ^1H - and ^{31}P -MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors *in vitro*: malignancy-characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. *NMR Biomed*, 2001, 14: 307–317
- 43 Cheng L L, Chang I W, Louis D N, et al. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res*, 1998, 58: 1825–1832
- 44 Wilson M, Davies N P, Brundler M A, et al. High resolution magic angle spinning ^1H NMR of childhood brain and nervous system tumours. *Mol Cancer*, 2009, 8: 6–16
- 45 Lukas L, Devos A, Suykens J A, et al. Brain tumor classification based on long echo proton MRS signals. *Artif Intell Med*, 2004, 31: 73–89