

文章编号: 1000-4556(2009)01-0051-07

肝脏肿瘤高分辨魔角旋转质子波谱分析

董爱生¹, 田建明^{2*}, 陆建平², 左长京¹, 王 莉²,
王 飞², 汪 剑²

(1. 第二军医大学 长海医院 核医学科, 上海 200433; 2. 第二军医大学 长海医院 放射科, 上海 200433)

摘 要: 应用高分辨魔角旋转质子核磁共振波谱分析了正常肝脏(9 例)、良性肿瘤(7 例)及肝细胞癌(9 例)代谢物变化。半定量分析表明, 肝细胞癌组织的甘氨酸、牛黄酸、胆碱、谷氨酸盐、丙氨酸、缬氨酸及乳酸明显高于正常对照和良性肝脏肿瘤组织。实验结果表明肝细胞癌的代谢特征不同于正常肝脏和良性肝脏肿瘤, 不同肝脏组织的代谢改变可以通过高分辨魔角旋转质子核磁共振波谱检测。

关键词: 核磁共振(NMR); 肝细胞癌; 高分辨魔角旋转质子核磁共振波谱分析

中图分类号: O482.53 **文献标识码:** A

引言

活体质子波谱分析在临床中的应用国内外已有很多报道, 能反映一些肿瘤和代谢性病变的特征性改变。但活体质子波谱受到场强低、分辨率低和生理运动等因素制约, 所获得的代谢物信息和对疾病的诊断价值有限。离体标本适用于更高场强的波谱分析, 分辨率高, 可检测活体波谱不易检出的多种化合物。结合主成分分析的高分辨质子核磁共振波谱已经成为分析疾病或药物引起的生物体液(如尿液, 胆汁, 血浆)代谢物变化的一种成熟的分析方法^[1-4]。生物组织提取物的液体高分辨质子核磁共振波谱技术, 是把参与生化反应的化合物从生物组织细胞中分离提取出来, 以获得高分辨率的图谱^[5]。然而组织细胞内的代谢物可能会不能完全被提取出来, 或在复杂的提取过程中部分受到破坏, 且不能反映组织细胞的整体信息, 割裂了波谱结果和病变状态^[6]。这些不足可以通

收稿日期: 2008-09-16; 收修改稿日期: 2008-10-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30670590)。

作者简介: 董爱生(1978-), 男, 辽宁建平人, 博士, 主治医师, 主要从事临床磁共振及分子代谢研究。 * 通讯联系人: 田建明, 电话: 021-25070652, E-mail: dash0108@yahoo.com.cn.

过离体组织高分辨魔角旋转磁共振波谱技术(high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy, HR-MAS NMRS)弥补,并可以获得和液体状态相当的高分辨波谱而不需要复杂的提取过程^[7].其基本原理是让完整组织块以魔角(组织标本旋转轴与外源磁场方向的夹角) 54.7° 的方向快速($2.0\sim 5.0$ kHz)旋转,就可以有效的平均掉因质子之间偶极偶极相互作用,化学位移各向异性及磁化率不均造成的谱线增宽,提高分辨率^[8].高分辨魔角旋转磁共振波谱已经成功的用于鼠肝脏组织^[7],人乳腺组织^[9],哺乳动物肾脏组织^[10, 11],人前列腺组织^[12]及鼠睾丸组织研究^[13].本研究目的主要是应用 HR-MAS ^1H NMRS 分析肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),良性肝细胞性肿瘤及正常肝组织代谢物变化情况,探讨 HR-MAS ^1H NMRS 临床应用价值,并对相关文献进行了回顾,其中对良性肿瘤的研究,国内外未见相关报道.

1 材料方法

1.1 标本准备

本研究经过长海医院医学伦理委员会审批并获得患者知情同意.在肝脏肿瘤部分切除后,快速选取肿瘤剖面活性肿瘤组织约 $80\sim 150$ mg,每个标本分成两部分,一部分用于 HR-MAS ^1H NMRS 分析,另一部分用于组织病理学分析以减少组织不均质性的影响.取下的标本经过液氮快速冷冻后放在 -80°C 低温冰箱中保存.将用于病理学观察的标本用 10% 的甲醛固定、切片,苏木素-伊红(HE)染色.

共获取 16 例肿瘤组织(HCC 9 例,良性肿瘤 7 例)和 9 例正常肝脏组织组织块.9 例 HCC 患者均为单发肿瘤,肿瘤平均直径 8.5 cm(范围 $3.8\sim 13.6$ cm),乙型肝炎表面抗原(HBV_{sag})均为阳性,6 例甲胎蛋白(AFP)升高,其中 4 例 $\text{AFP}>500$.根据世界卫生组织(WHO)分类标准,所有 HCC 病理分级均为 III 级.

7 例良性肝细胞性肿瘤均为单发肿瘤,肿瘤平均直径 6.2 cm(范围 $2.6\sim 14$ cm)包括 4 例局灶性结节增生和 3 例肝细胞腺体瘤.所有良性肿瘤患者实验室化验均正常,无肝炎,无肝硬化及其它代谢疾病,无脂肪肝及其它系统疾病.

9 例正常肝组织中有 7 例取自上述良性肝细胞性肿瘤患者肿瘤周围肝脏组织,另外 2 例取自血管瘤切除患者的肝脏组织,这两例患者实验室化验正常,无肝炎,无肝硬化,无脂肪肝及肝脏代谢疾病,且无其它系统疾病.所有手术患者术前未接受任何治疗.

1.2 HR-MAS ^1H NMRS 实验参数

用 Bruker DRX500 型核磁共振波谱仪器的微量魔角旋转探头,对组织块标本进行高分辨魔角旋转质子核磁共振波谱分析.当组织标本还没有解冻时,将其放入容积为 $25\ \mu\text{L}$ 氧化锆魔角旋转转子中,并加入 $10\ \mu\text{L}$ 重水(D_2O)溶剂,化学位移定标以重水峰定位 $\delta\ 4.8$.组织标本以 5 kHz 的频率旋转.每个标本共获得两种不同的一维质子核磁共振波谱:经 2 s 弛豫延迟的预饱和单脉冲序列和经 2 s 弛豫延迟的 Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)脉冲序列,均进行了水峰抑制.CPMG 脉冲序列[RD-90-(τ -180- τ)_{*n*}-ACQ]为 T_2 滤波序列, T_2 滤波采用自旋-自旋弛豫延迟($2n\tau$ 为 240 ms)抑制大分子物质和其他短 T_2 物质(如脂质)的信号强度.每个波谱采样次数 256,采样数据点 64 k,谱宽 10 kHz,采样温度 300 K,并进行水峰抑制.谱峰经过 2D ^1H - ^1H total correlation spectroscopy (TOCSY) 和 ^1H - ^1H correlation spectroscopy (COSY) 确认,并查阅参考相关文献^[14],

15]及 Bruker 化合物数据库. 在完成数据采集后, 通过重复 1D NMR 实验进行组织标本的波谱稳定性评估.

1.3 半定量分析

选择正常对照, 良性肝脏肿瘤及 HCC 谱图中相对恒定的位于 δ 3.03 区的肌酸(Creatine, Cr)作为内参照, 计算代谢物相对浓度, 并对半定量结果进行方差分析及两样本间进行 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 HR-MAS ^1H NMRS

图 1 为 HCC 的 HR-MAS ^1H NMR CPMG 全谱图及单脉冲 HR-MAS ^1H NMR 全谱图, 图谱显示的代谢物主要集中在 δ 0.5~5.5 范围内, 因为 CPMG 抑制了脂类等大分子的信号, 氨基酸等小分子代谢物显示更清晰. 如图 2, 脂肪族化合物区主要包括 δ 2.9~3.3 范围内的三甲胺、牛黄酸、胆碱、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱、肌酸及位于 δ 3.3~4.0 范围内葡萄糖和糖原. 此外位于 δ 0.8~1.5 范围内的丙氨酸、乳酸及缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸等也可以比较清楚的显示. 芳香族化合物主要包括三磷酸核苷(NTP)、苯丙氨酸及酪氨酸等, 这些物质在 HCC 出现几率较多, 在正常肝脏及良性肝脏肿瘤很少见到.

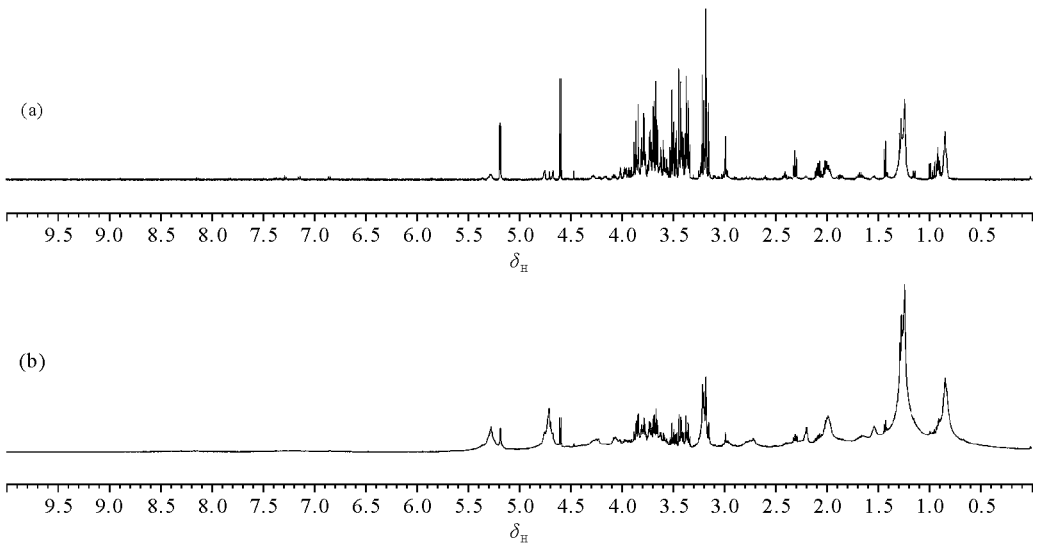


图 1 HCC 组织 HR-MAS ^1H NMR CPMG 全谱图(a)及单脉冲 HR-MAS ^1H NMR 全谱图(b)

Fig. 1 HR-MAS ^1H NMR CPMG spectrum (a) and single-pulse HR-MAS ^1H NMR spectrum (b) of HCC

2.2 代谢物变化半定量分析

因为部分代谢物很弱或谱峰重叠明显, 不能进行独立积分计算, 所以只对可以计算的甘氨酸、牛黄酸、胆碱、谷氨酸盐、丙氨酸、乳酸及缬氨酸进行了相对浓度比较分析. HCC、良性肝脏肿瘤及正常肝脏部分代谢物变化见表 1 所示. 与正常对照及良性肝脏肿瘤相比, HCC 的甘氨酸、牛黄酸、胆碱、谷氨酸盐、丙氨酸、缬氨酸及乳酸都显著升高,

$P < 0.05$. 正常对照与良性肝脏肿瘤之间各代谢物之间则无明显差异, $P > 0.05$.

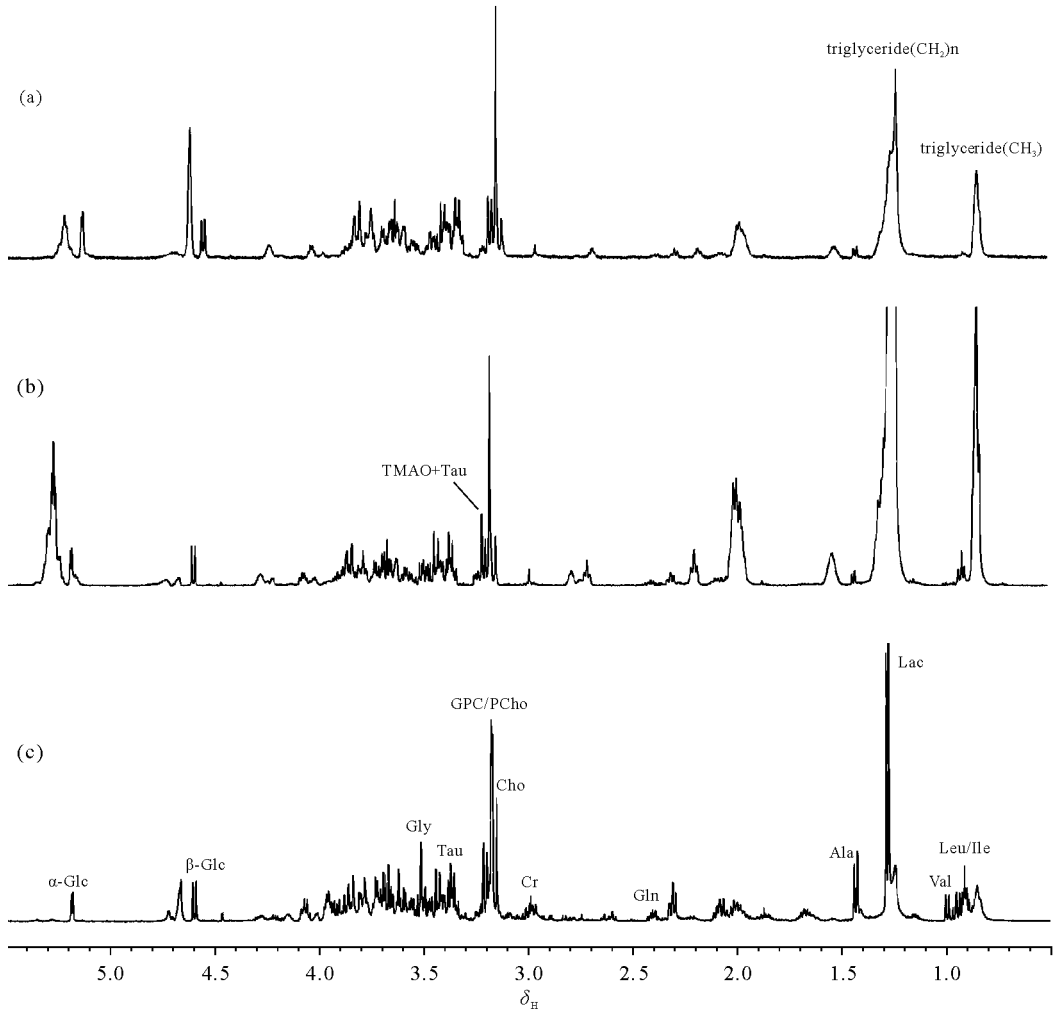


图 2 HR-MAS ^1H NMR CPMG 谱图, (a) 正常肝脏组织、(b) 良性肝脏肿瘤组织及 (c) HCC 组织. α -Glc, α -葡萄糖; β -Glc, β -葡萄糖; Gly, 甘氨酸; Tau, 牛磺酸; TMAO, 三甲胺; GPC/PCho, 甘油磷酸胆碱/磷酸胆碱; Cho, 胆碱; Cr, 肌酸; Gln, 谷氨酸盐; Ala, 丙氨酸; Lac, 乳酸; Val, 缬氨酸; Leu/Ile, 亮氨酸/异亮氨酸

Fig. 2 HR-MAS ^1H NMR CPMG spectra of liver tissues, (a) normal; (b) benign tumor; (c) malignant tumor

表 1 HCC、良性肝脏肿瘤及正常对照代谢物相对浓度比较

Table 1 Comparison of the relative metabolic concentration among HCCs, benign liver tumors and controls

	甘氨酸 glycine	牛磺酸 taurine	胆碱 choline	谷氨酸盐 glutamate	丙氨酸 alanine	乳酸 lactate	缬氨酸 valine
δ	3.55	3.41	3.16	2.41	1.45	4.1	1.05
肝细胞癌 ($n=9$)	1.85 ± 1.05	2.79 ± 0.97	2.72 ± 1.60	3.90 ± 2.52	3.17 ± 1.95	7.17 ± 2.15	1.17 ± 0.70
良性 ($n=7$)	0.64 ± 0.25	1.5 ± 0.22	0.89 ± 0.42	0.43 ± 0.32	0.38 ± 0.16	3.1 ± 0.95	0.2 ± 0.07
正常 ($n=9$)	0.61 ± 0.24	1.51 ± 0.42	0.68 ± 0.26	0.73 ± 0.74	0.54 ± 0.34	2.39 ± 0.61	0.19 ± 0.14

3 讨论

δ 3.20~3.24 段的游离胆碱, 磷酸胆碱, 甘油磷酸胆碱一直是恶性肿瘤研究的重要代谢物质, 也是 HCC 有别于正常肝脏和良性肝脏肿瘤的主要代谢物质. Bell 等^[16, 17]通过比较病理正常的肝脏组织、肝脏原发和继发恶性肿瘤组织萃取物的离体¹H 和³¹P NMR 波谱, 发现恶性肿瘤组织磷酸乙醇胺, 磷酸胆碱, 牛黄酸和乳酸明显升高, 而甘油磷酸乙醇胺和甘油磷酸胆碱下降. 对正常肝, 肝硬化结节及肝癌进行对照分析发现, 根据脂质成分和胆碱复合物的变化, HR-MAS ¹H MRS 区别正常肝及肝癌的准确度达到 100%, 区别正常肝组织及肝硬化组织准确度达 92%, 区别肝硬化组织与肝癌准确度达 98%, 这为病理学诊断提供了一种全新而准确的补充方法^[18].

因为波峰的重叠, 我们没有对 PCho 和 GPC 进行定量分析, HCC 的 Cho 相对浓度比正常对照及良性肝脏肿瘤都有显著升高, 这与以往的很多研究一致. HCC 细胞增殖活跃, 磷脂合成增加以补充和更新细胞器膜, 这需要更多的合成原料, 可能会促使 Cho 合成增加. 良性肝脏肿瘤 Cho 的相对浓度虽然比正常对照升高, 但二者间无显著变化, 说明良性肝脏肿瘤生长缓慢.

同 Bell 等的研究^[16], 本研究也发现 HCC 的乳酸峰明显升高, 但良性及正常肝脏间无明显差异. HCC 组织的乳酸峰明显高于正常肝脏组织, 可能是无氧酵解增加的原因. 正常肝脏细胞含有丰富的线粒体, 又富含全套酶系, 使氧化磷酸化得以充分进行, 正常肝脏中 95% 以上的葡萄糖被彻底氧化, 糖酵解比例不足 5%. 恶性肿瘤生长速度超过血供水平会导致肿瘤缺血和坏死. 当肿瘤直径增加最长达 1~2 mm 时, 需要生成更多的血管来增加血供维持生长需要, 2 mm 代表氧气和营养物质从血管扩散的最大距离^[19]. 为了维持肿瘤细胞的快速生长所需要的大量能量, 恶性肿瘤除通过生成大量新生血管外, 加速了葡萄糖的转运能力, 并通过上调己糖激酶活性, 增加了对葡萄糖的利用^[20]. 被转运到细胞内的葡萄糖在有氧情况下, 经过糖酵解合成丙酮酸盐. 然而快速生长及缺血坏死的肿瘤处于乏氧环境, 此时糖酵解合成乳酸增加. 线粒体氧化磷酸化降低是一切恶性肿瘤的特征, 癌细胞通过能量代谢改变(包括无氧酵解增加, 巴斯德效应下降, 逆巴斯德效应增加)来补偿线粒体的缺乏, 电子传递链的不足及有氧氧化能力的减弱^[21, 22]. HCC 细胞中线粒体明显减少, 相应的酶系均少于正常, 因此氧化代谢下降, 无氧酵解增强, 甚至出现其抑制有氧氧化的逆巴斯德效应.

我们研究表明 HCC 的甘氨酸和牛黄酸都比正常对照和良性肝脏肿瘤有显著升高, 这也与 Bell 等的研究结果一致^[16]. 甘氨酸和牛黄酸是合成结合胆汁酸的物质, 可能因为 HCC 合成胆汁酸酶类的缺乏导致甘氨酸和牛黄酸的利用减少, 而且我们所研究的 HCC 均为分化程度差的 III 级 HCC, 因为分化程度决定了其功能, 因此其合成胆汁酸的能力可能更差, 最终造成甘氨酸和牛黄酸升高. 也有研究表明牛黄酸是一些肿瘤细胞的生长所必须的物质^[23]. 另外, 在新生儿的肝脏和脑组织有很高的浓度, 牛黄酸也可能是快速增殖活动的必须物质.

HCC 中谷氨酸盐及丙氨酸的增加可能与 HCC 氨基酸分解代谢下降有关. 多种氨基酸的分解代谢在 HCC 中均有降低, 如芳香族氨基酸、谷氨酸及丙氨酸等, 这是因为这些氨基酸分解代谢的酶类活力在 HCC 中均有所降低所致. 另外氧化磷酸化下降可能也是丙氨酸聚集的原因.

缬氨酸在 HCC 中明显高于正常对照及良性肝脏肿瘤。亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸为支链氨基酸,支链氨基酸主要参与糖异生。糖异生是肝脏的特殊代谢途径,仅在正常成年人肝脏中进行,胎肝和肝癌中由于糖异生关键酶活力下降,糖异生的活力极低,这可能是造成缬氨酸不能利用而升高的原因之一。

总之,离体标本组织块 HR-MAS ^1H NMRS 分析,可以提供肝脏肿瘤的多种代谢物变化信息,并可以提供有鉴别诊断价值的代谢物变化情况,如氨基乙酸、牛黄酸、胆碱、谷氨酸盐、丙氨酸、乳酸及缬氨酸等,为肝脏疾病研究提供了可靠手段。

参考文献:

- [1] Nicholson J K, Wilson I D. High-resolution proton magnetic resonancespectroscopy of biological fluids[J]. Prog Nucl Mag Res Spe, 1989, 21: 444—501.
- [2] Bollard M E, Holmes E, Lindon J C, *et al.* Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high-resolution H-1 NMR spectroscopy of urine and pattern recognition[J]. Anal Biochem, 2001, 295(2): 194—202.
- [3] Lindon J C, Nicholson J K, Holmes E, *et al.* Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids[J]. Concept Magnetic Res, 2000, 12: 289—320.
- [4] Chen Wen-xue(陈文学), Deng Feng(邓风), Yue Yong(岳勇). Applications of NMR techniques to biological tissues(核磁共振技术在生物组织中的应用)[J]. Chinese J Magn Reson(波谱学杂志), 2004, 21(1): 127—139.
- [5] Gu Xing-hua(顾兴华), Wang Li-min(王利民), Yu Yi-hua(余亦华), *et al.* Study of ^{31}P nuclearmagnetic resonance spectroscopy in acute hypoxic brain of rat(急性低氧大鼠脑 ^{31}P 核磁共振谱研究)[J]. Chinese J Magn Reson(波谱学杂志), 2001, 18: 105—112.
- [6] Cheng L L, Chang I W, Louis D A, *et al.* Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumour specimens[J]. Cancer Res, 1998, 58(9): 1 825—1 832.
- [7] Bollard M E, Garrod S, Holmes E, *et al.* High-resolution H-1 and H-1-C-13 magic angle spinning NMR spectroscopy of rat liver[J]. Magn Reson Med, 2000, 44(2): 201—207.
- [8] Lowe I J. Free induction decays of rotating solids[J]. Phys Rev Lett, 1959, 2: 285—287.
- [9] Cheng L L, Chang I W, Smith B L, *et al.* Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy[J]. J Magn Reson, 1998, 135(1): 194—202.
- [10] Garrod S, Humphreys E, Connor S C, *et al.* Holmes, High-resolution H-1 NMR and magic angle spinning NMR spectroscopic investigation of the biochemical effects of 2-bromoethanamine in intact renal and hepatic tissue [J]. Magn Reson Med, 2001, 45(5): 781—790.
- [11] Griffin J L, Walker L A, Shore R F, *et al.* High resolution magic angle spinning H-1-NMR spectroscopy studies on the renal biochemistry in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the effects of arsenic (As^{3+}) toxicity[J]. Xenobiotica, 2001, 31(6): 377—385.
- [12] Cheng L L, Wu C L, Smith M R, *et al.* Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS H-1 NMR spectroscopy at 9.4 T[J]. FEBS Lett, 2001, 494(1—2): 112—116.
- [13] Griffin J K, Troke J, Walker L A, *et al.* The biochemical profile of rat testicular tissue as measured by magic angle spinning H-1 NMR spectroscopy[J]. FEBS Lett, 2000, 486(3): 224—229.
- [14] 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[J]. Anal Biochem, 2000, 282(1): 16—23.
- [15] Garrod S, Humpfer E, Spraul M, *et al.* High-resolution magic angle spinning ^1H NMR spectroscopic studies

- on intact rat renal cortex and medulla[J]. *Magn Reson Med*, 1999, 41(6): 1 108–1 118.
- [16] Bell J D, Cox I J, Sargentoni J, *et al.* A ^{31}P and ^1H NMR investigation *in vitro* of normal and abnormal human liver[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1225(1): 71–77.
- [17] Cox I J, Bell J D, Peden C J, *et al.* *In vivo* and *in vitro* ^{31}P magnetic resonance spectroscopy of focal hepatic malignancies[J]. *NMR Biomed*, 1992, 5(3): 114–120.
- [18] Soper R, Himmelreich U, Painter D, *et al.* Pathology of hepatocellular carcinoma and its precursors using proton magnetic resonance spectroscopy and a statistical classification strategy[J]. *Pathology*, 2002, 34(5): 417–422.
- [19] Cotran R S, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*[M]. Philadelphia; WB Saunders, 1999: 260–327.
- [20] Smith T A. FDG uptake, tumor characteristics and response to therapy: a review[J]. *Nucl Med Commun*, 1998, 19(2): 97–105.
- [21] Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. *Science*, 1956, 123(3 191): 309–314.
- [22] Pedersen P L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells[J]. *Prog Exp Tumor Res*, 1978, 22: 190–274.
- [23] Haubrich D R, Gerber N H. Choline dehydrogenase: assay, properties and inhibitors[J]. *Biochem Pharmacol*, 1981, 30(21): 2 993–3 000.

Metabolic Profiles in Human Hepatic Tumors Analyzed by *In Vitro* High-resolution Magic-angle-spinning ^1H NMR Spectroscopy

DONG Ai-sheng¹, TIAN Jian-ming^{2*}, LU Jian-ping², ZUO Chang-jing¹,
WANG Li², WANG Fei², WANG Jian²

(1. Department of Nuclear Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University,
Shanghai 200433, China;

2. Department of Radiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The metabolic profiles in normal human liver tissues ($n=9$), benign hepatic tumor tissues ($n=7$) and hepatocellular carcinoma (HCC, $n=9$) tissues were measured by high-resolution magic angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance (HR-MAS ^1H NMR) spectroscopy. Semi-quantitative analyses showed that the HCC tissues contained significantly higher levels of glycine, taurine, choline, glutamate, alanine, valine and lactate, as compared to the normal and benign liver tissues. The results of this study suggest that the metabolic profiles in the HCC tissues were significantly different from normal liver tissues and benign hepatic tumor tissues, and such differences may be used as references for the diagnosis of HCC.

Key words: NMR, hepatocellular carcinoma, HR-MAS ^1H NMRS