

高分辨魔角旋转核磁共振技术在肿瘤代谢组研究中的应用

李 育, 赵靖霞, 杨根金, 张 薇, 娄子洋*

第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433

[摘要] 高分辨魔角旋转核磁共振技术(HRMAS)无需溶剂提取分离,能直接检测离体生物组织样品,得到较高分辨率的核磁共振图谱,在代谢组研究中得到广泛应用。应用 HRMAS 检测脑、肝、肾、肺等多种离体肿瘤组织,可以直接得到组织细胞中分子水平的代谢物结构和组成信息。基于这些优势,HRMAS 在肿瘤早期诊断研究方面展现出良好的应用前景。本文主要介绍了 HRMAS 技术在肿瘤组织代谢组研究中的应用。

[关键词] 磁共振波谱学; 高分辨魔角旋转核磁共振技术; 代谢; 肿瘤

[中图分类号] R 730.44 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)09-1024-04

Applications of high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy in tumor metabonomics research

LI Yu, ZHAO Jing-xia, YANG Gen-jin, ZHANG Wei, LOU Zi-yang*

Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] The high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy (HRMAS) can be directly used to examine *in vitro* tissues, needing no extracting and separating procedures. Moreover, it can enhance signal intensity and improve resolution of images. HRMAS can directly obtain the structural and conformational information (molecular level) of *in vitro* tumor samples of the brain, liver, kidney, and lung, which gives it a bright future in early diagnosis of tumors. The present paper mainly reviews the applications of HRMAS in tumor metabonomics research

[Key words] magnetic resonance spectroscopy; high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy; metabolism; neoplasms
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(9):1024-1027]

早期进行核磁共振光谱测定时,首先要将样品溶解在氘代试剂后再测定。这是由于固体分子不能自由运动,导致核磁共振信号受到磁各向异性的相互作用影响,图谱的分辨率差^[1]。高分辨魔角旋转核磁共振技术(high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy, HRMAS)的出现解决了固体样品磁各向异性及偶极耦合的影响,将核磁共振技术应用到固体中,扩展了核磁共振技术的应用范围。

魔角旋转(magic angle spinning, MAS)这一突破性的技术最早是在 1958 年由 Andrew 等^[2]提出并应用,是指将固体装在核磁管中,相对于外加磁场以魔角(54.7°)的方向高速(2.0~5.0 kHz)旋转,从而消除了因固体样品不能自由运动引起的磁场不均匀性所导致的谱线变宽现象。相比传统的生物组织的研究技术,HRMAS 的最大优势在于不需要溶剂提取分离,避免了溶剂对组织的损伤,而且超微量探头能有效减少样品量(40 μl 以下);其不足之处在于只能进行离体组织研究,不能完全真实地反映组织的代谢情况,在提取组织时易破坏其完整性,高速旋转有可能对组织有一定的破坏性^[3]。

利用 HRMAS 可以直接得到组织细胞中核酸、蛋白质、脂类和糖类等生物大分子的代谢物结构、含量和组成等特征

信息,从分子水平上研究肿瘤组织与正常组织之间的细微差别,能更早地发现无症状早期肿瘤的发生和发展,寻找到组织恶变的生物标志物,给肿瘤组织的早期诊断提供可靠的科学依据^[4-5]。本文主要介绍了 HRMAS 技术在脑、肝、肾、肺等多种离体肿瘤组织代谢组研究中的应用。

1 HRMAS 技术在脑肿瘤代谢组研究中的应用

脑肿瘤是神经系统常见病之一,临床上常用 CT、磁共振成像(MRI)进行诊断^[6]。与 MRI 技术相比较,HRMAS 技术运用高场强、高分辨率的波谱仪,可检测 MRI 不易检出的微量化合物^[7]。Wright 等^[8]用 HRMAS 检测成人的离体脑肿瘤组织(包括 12 例多形性成胶质细胞瘤、10 例低级别肿瘤、7 例脑膜瘤、7 例脑转移瘤),一维和二维图谱检测出 8 种大分子信号和 29 种小分子代谢物,能诊断大部分脑肿瘤,其中 20 种代谢物从统计学上能明显区分以上脑肿瘤的类型和等级;二维图谱结果显示甘氨酸、谷胱甘肽、磷酸二酯酶都有明显变化。这表明用 HRMAS 检测出的小分子代谢物作为生物标志物的方法能较好的作为早期脑肿瘤的诊断依据。

1.1 胶质瘤 胶质瘤是原发性脑肿瘤中最常见的肿瘤。Opstad 等^[9]比较了 HRMAS 和 MRI 检测人体神经细胞胶质

[收稿日期] 2012-03-20 **[接受日期]** 2012-06-15

[作者简介] 李 育, 硕士, 实验师. E-mail: liyu@smmu.edu.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871335, E-mail: louziyang@126.com

瘤的精密度差异。研究者们采用 HRMAS 一维氢谱 ($^1\text{HHRMAS}$)和氢质子磁共振波谱 ($^1\text{HMRS}$)检测 17 例不同等级的人体恶性星形细胞瘤, HRMAS 检测离体活检标本, $^1\text{HMRS}$ 检测体内肿瘤。结果表明 $^1\text{HHRMAS}$ 比 $^1\text{HMRS}$ 有更高分辨率, 能更精确地检测神经胶质瘤和相关的原发肿瘤。Chen 等^[10]用 HRMAS 研究了 30 例神经上皮肿瘤, 发现不同级别的脑肿瘤组织间的代谢物的浓度差别较大。

1.2 脑膜瘤 脑膜瘤发病率在脑肿瘤中仅次于胶质瘤。Righi 等^[11]用 HRMAS 检测 36 例患者的脑部肿瘤组织切片后发现, 甘氨酸可作为区分脑膜瘤的生物标志物。说明 HRMAS 能提供对诊断脑膜瘤有用的生化信息, 在脑膜瘤的病理分级诊断中有一定的应用价值。陈文学等^[12]用 HRMAS 检测了 39 例人体脑肿瘤组织, 发现脑肿瘤组织的代谢组中主要含有脂肪酸、乳酸和胆碱等代谢物; 低级别星形细胞瘤中的甘油磷酸胆碱、磷酸胆碱等含量比脑膜瘤高, 而丙氨酸、谷氨酸和牛磺酸等含量则比脑膜瘤低; N-乙酰天冬氨酸的含量在低级别星形细胞瘤中含量较低但能观察到, 而脑膜瘤中却未发现其信号。上述结果表明脑膜瘤与低级别星形细胞瘤的代谢组之间具有明显的差异。

2 HRMAS 技术在泌尿系统肿瘤代谢组研究中的应用

2.1 肾脏肿瘤 Huhn 等^[13]用 HRMAS 研究肾脏肿瘤组织和正常肾脏组织, 从氢谱中能发现到肾乳头与皮质、髓质外层及髓质内层的小分子代谢物有明显差异, 能明确皮质及肾细胞瘤的代谢特征, 且结合 PCA 分析能有效区分肾肿瘤组织和正常组织。Tate 等^[14]用 HRMAS 检测人肾上腺组织和肾细胞肿瘤组织, 结合 PCA 分析发现正常肾组织和肾癌组织样品的 $^1\text{HHRMAS}$ 有显著的区别。在国内研究中, 杨永霞等^[15]用 HRMAS 研究肾脏肿瘤组织的代谢变化, 选取肾癌肿瘤组织和癌旁组织分别作病理分析和 HRMAS 检测, 发现肾癌肿瘤组织中的乳酸、胆碱、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱及肌醇的含量比癌旁组织中的含量高。表明肾脏肿瘤的代谢特征不同于癌旁对比组织, 可以为肾脏肿瘤诊断提供科学依据。

2.2 前列腺肿瘤 Swanson 等^[16]研究发现前列腺肿瘤组织与正常前列腺组织的 $^1\text{HHRMAS}$ 有明显区别, 前列腺肿瘤组织的胆碱、牛磺酸和肌醇峰高于正常前列腺组织, 而柠檬酸盐和多胺含量低于正常前列腺组织和间质组织。Kumar 等^[17]发现前列腺癌患者的柠檬酸盐、肌酸与胆碱的含量不同于健康人, 随着肿瘤恶性程度的增加, 这些代谢物浓度改变更加明显。说明 HRMAS 能够较好地地区分前列腺病变的良恶性, 为前列腺癌的诊断提供依据。

3 HRMAS 技术在肝肿瘤代谢组研究中的应用

Yang 等^[18]用 HRMAS 研究肝癌组织, 发现肝癌早期和肝癌晚期组织的代谢模式明显不同, 肝癌组织的谷氨酸、谷氨酰胺等含量较正常组织增加, 而三磷酸甘油、糖原和葡萄糖的含量降低; 肝癌晚期的肿瘤组织与早期肿瘤组织相比, 谷氨酸、胆碱、谷氨酰胺和亮氨酸等含量增加, 而三酰甘油酯、糖原和葡萄糖的含量降低, 这为病理学诊断提供了新

的依据。董爱生等^[19]应用 HRMAS 比较了正常肝脏、肝细胞癌和良性肿瘤的代谢物变化, 结果表明肝细胞癌组织的乳酸、胆碱、甘氨酸、丙氨酸、牛磺酸、缬氨酸及谷氨酸盐明显高于正常肝组织和良性肿瘤组织。说明肝脏恶性肿瘤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变化可通过 HRMAS 检测来区分。

4 HRMAS 技术在肺肿瘤代谢组研究中的应用

Jordan 等^[20]用 $^1\text{HMRS}$ 和 $^1\text{HHRMAS}$ 检测肺癌患者的组织和血清, 并结合病理学分析发现 HRMAS 能明显区分肺鳞癌和肺腺癌。

5 HRMAS 技术在直肠肿瘤代谢组研究中的应用

高秀香等^[21]用 HRMAS 检测直肠癌组织和正常直肠组织, 根据 $^1\text{HHRMAS}$ 图谱中的氨基酸、乳酸、胆碱、牛磺酸的特征谱峰与脂肪酸甲基比值等鉴别直肠癌变和正常组织, 研究结果显示直肠癌变和正常组织的核磁共振氢谱存在明显特征峰差异。

6 HRMAS 技术在妇科肿瘤代谢组研究中的应用

近年来肿瘤代谢组学在妇科肿瘤研究中的应用越来越多, 主要集中在发现生物标志物、抗肿瘤药物的代谢研究上, 对卵巢癌、宫颈癌和子宫内膜癌等肿瘤的早期诊断研究取得了一定的成果。这类肿瘤的特征是在组织早期病变时缺乏预警的生物标志物, 并且与激素和脂质类小分子物质的代谢明显相关, 这些特点给代谢组学的研究提供了条件。

6.1 宫颈癌 宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 由于其具有独特的预侵蚀过程, 适合作为癌变研究的对象。Lyng 等^[22]研究了宫颈癌和良性宫颈病变, 结果表明恶性宫颈肿瘤与良性宫颈病变的主要区别在于葡萄糖及尿嘧啶的含量, 并且恶性组织的胆碱、牛磺酸及氨基乙酸的相对浓度也高于良性病变组织, 这表明恶性组织和正常组织的代谢产物存在生物化学上的差异。Mahon 等^[23]用 HRMAS 检测离体宫颈鳞状上皮癌组织, 发现宫颈鳞状上皮癌组织的脂质、胆碱及肌酐的含量明显高于宫颈原位癌和正常宫颈组织, 宫颈鳞状上皮癌患者的正常宫颈上皮的脂质含量高于良性宫颈病变患者。

6.2 子宫内膜癌 Griffin 等^[24]用 HRMAS 检测子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株暴露于不同浓度的他莫昔芬 (tamoxifen) 中的细胞代谢物变化。用 $^1\text{HHRMAS}$ 技术进行细胞代谢物检测, 发现随着药物浓度的升高, 乙醇胺、葡萄糖、谷氨酸、酪氨酸、尿苷、腺苷及肌醇的浓度也随之升高, 其中核苷的变化表示他莫昔芬可能影响了 RNA 的转录, 推测这可能成为子宫内膜癌的早期诊断指标之一。

6.3 卵巢癌 Ben Sellem 等^[25]研究发现 HRMAS 能准确区分卵巢肿瘤组织和正常卵巢组织, 还能区分肿瘤的等级和预测肿瘤的发展。目前除血液和组织标本外, 还有学者对卵巢肿瘤的囊液进行了 NMR 分析, 以寻找卵巢癌的其他诊断依据^[26]。

7 HRMAS 技术在乳腺肿瘤代谢组研究中的应用

Sitter 等^[27]利用 HRMAS 研究了 85 例乳腺癌患者的肿瘤组织和其中 18 例患者的癌旁组织,比较含 5% 肿瘤组织的样品和含 15% 脂肪组织的样品的¹HHRMAS,发现肿瘤组织的氨基酸、牛磺酸和乳酸含量较高,而在脂肪组织中氨基酸、牛磺酸和乳酸没有信号。该研究表明 HRMAS 是研究乳腺肿瘤组织样品的一种有效的方法。

8 HRMAS 技术在其他肿瘤代谢组研究中的应用

HRMAS 除应用于以上常见肿瘤诊断之外,在黑素瘤、脂肪肉瘤等肿瘤诊断上也逐步得到应用。

8.1 黑素瘤 Li 等^[28]研究了黑素瘤经黑素诱导后的代谢变化,用 HRMAS 检测无黑素和有黑素沉着黑素细胞的代谢变化。结果发现 HRMAS 能明显区分无黑素和有黑素沉

着黑素瘤细胞的代谢中间物,证明黑素瘤能明显引起葡萄糖、乙酸钠的代谢变化。

8.2 脂肪肉瘤 Millis 等^[29]研究比较了 30 例脂肪肉瘤和 5 例脂肪瘤患者的 HRMAS¹HNMR 谱,结果表明根据胆碱和三酰甘油酯的含量可以区分肿瘤的良好性及脂肪肉瘤的类型和级别。

9 小结

综上所述,用 HRMAS 检测脑、肝、肾、肺等多种离体肿瘤组织,可以得到组织代谢物的特征信息(表 1),在肿瘤早期诊断研究方面展现出良好的应用前景。HRMAS 的缺点在于只能检测离体组织,不能完全真实地反映组织的代谢情况。但随着核磁共振波谱技术的发展,HRMAS 与 MRI 技术的结合将使核磁共振技术在医学领域有更广阔的应用空间。

表 1 HRMAS 在肿瘤代谢组研究中的应用

Tab 1 Application of high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy in tumor metabolomics researches

Tumor	¹ HHRMAS results
Brain tumor	
Glioma	(1) Vs MRI; ①HRMAS only can examine <i>in vitro</i> tissue; ②HRMAS has higher magnetic intensity and resolution ^[9] (2) The concentrations of the metabolites, including lactate, creatine, inositol, are significantly different among different levels of neural epithelial tumors ^[10]
Meningeoma	(1) ①Glycine can serve as a biomarker for brain tumors; ②Inosite can effectively classify tumors ^[11] (2) Compared with low-level astrocytomas: ①Has lower contents of glycerin phosphoric acid, phosphoric acid, choline choline, and creatine; ②Meningeoma has no N-acetyl aspartic acid signal; ③The contents of choline, inositol, alanine, taurine, and glycine are decreased with malignant degree ^[12]
Renal tumor	(1) The ¹ HHRMAS spectra are obviously different among renal papillae, renal cortex, niouter and inner of the medulla ^[13] (2) The ¹ HHRMAS spectra are significantly different between normal kidney and renal tumor tissues ^[14] (3) The contents of lactate, choline and inositol are higher in tumor tissues than those in adjacent tissues ^[15]
Prostatic tumor	(1) The contents of choline, bezoar acid and inositol are higher than normal prostate tissue; (2) The contents of citric acid salt and polyamine are lower than the normal and amine interstitial tissues ^[16]
Liver tumor	(1) ①Distinguish the degrees of liver tumor; ②Compared with normal tissue, the glutamic and gluta-mine are increased, and glycerol, glycogen and glucose levels are decreased in liver tumor; ③Compared with early stage cancer, the glutamic, choline, glu-tamine and leucine are increased, and the triglycerides, g-lycogen and glucose levels are decreased ^[18] (2) Compared with normal liver and benign tumor tissue, the contents of lactate choline, glycine, alanine, bezoar acid, valine and glutamic are increased ^[19]
Gynecologic tumor	
Cervical carcinoma	The contents of choline, taurine and amino acid are higher than those in benign carcinoma tissue ^[22]
Cervical squamous carcinoma	(1) The contents of creatinine, choline and lipid are higher than those in normal tissue; (2) The lipid content in normal cervical epithelium is higher in tumor patients than that in healthy subjects ^[23]
Endometrial tumor	The contents of ethanol amine, glucose, glutamic acid, tyrosine, urine glucoside, adenosine and inositol can distinguish tumor tissues ^[24]
Ovarian tumor	(1) Can distinguish ovarian tumor tissues and their degree; (2) Can predict cancer progression ^[25]
Lung tumor	Can distinguish between lung cancer types ^[20]
Rectal carcinoma	Amino acid, lactic acid, choline, taurine features and fatty acid methyl ratio are significantly different ^[21]
Breast tumor	(1) Has higher contents of amino acid, taurine and lactic acid; (2) Normal tissue has no signal of amino acid, taurine or lactic acid ^[27]
Melanoma	Glucose, acetic acid sodium content can distinguish tumor types ^[28]
Liposarcoma	The contents of choline and triglycerides can distinguish the types and degrees of cancers ^[29]

10 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Avni R, Mangoubi O, Bhattacharyya R, Degani H, Frydman L. Magnetization transfer magic-angle-spinning z -spectroscopy of excised tissues[J]. *J Magn Reson*, 2009, 199: 1-9.
- [2] Andrew E R, Bradbury A, Geads R. Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed[J]. *Nature*, 1958, 182: 1659-1659.
- [3] 林 顿. 代谢组学手册[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 113-125.
- [4] 高秀香, 徐怡庄, 赵梅仙, 齐 剑, 李慧珍, 吴瑾光. 核磁共振波谱在肿瘤诊疗中的应用研究进展[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28: 1942-1950.
- [5] Shet K, Liang F, Alliston T, Yoshihara H, Kurhanewicz J, Ries M, et al. 150 quantitative and histopathological analysis of osteo-arthritic cartilage using MRI, HRMAS spectroscopy and immuno-histochemistry[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011, 19: 76-85.
- [6] Detour J, Elbayed K, Piotto M, Moussallieh F M, Nehlig A, Namer I J. Ultra fast *in vivo* microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis[J]. *J Neurosci Methods*, 2011, 201: 89-97.
- [7] Tran T, Ross B, Lin A. Magnetic resonance spectroscopy in neurological diagnosis [J]. *Neurol Clin*, 2009, 27: 21-60.
- [8] Wright A J, Fellows G A, Griffiths J R, Wilson M, Bell B A, Howe F A. *Ex-vivo* HRMAS of adult brain tumors: metabolite quantification and assignment of tumor biomarkers [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 66.
- [9] Opstad K S, Wright A J, Bell B A, Griffiths J R, Howe F A. Correlations between *in vivo* ^1H -MRS and *ex vivo* ^1H -HRMAS metabolite measurements in adult human gliomas [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2010, 31: 289-297.
- [10] Chen W, Lou H, Zhang H, Nie X, Lan W, Yang Y, et al. Grade classification of neuroepithelial tumors using high-resolution magic-angle spinning proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition [J]. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 606-616.
- [11] Righi V, Andronesi O C, Mintzopoulos D, Black P M, Tzika A A. High-resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy detects glycine as a biomarker in brain tumors [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36: 301-306.
- [12] 陈文学, 楼海燕, 张红萍, 聂 秀, 向 云, 杨永霞, 等. 高分辨魔角旋转核磁共振和主成分分析研究人类低级别星形细胞瘤和脑膜瘤的代谢组特征 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35: 1142-1154.
- [13] Huhn S D, Szabo C M, Gass J H, Manzi A E. Metabolic profiling of normal and hypertensive rat kidney tissues by HRMAS-NMR spectroscopy [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 1511-1519.
- [14] Tate A R, Foxall P J, Holmes E, Moka D, Spraul M, Nicholson J K, et al. Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of ^1H magic angle spinning (MAS) NMR spectra [J]. *NMR Biomed*, 2000, 13: 64-71.
- [15] 杨永霞, 梁华庚, 李承龙. 肾脏肿瘤组织的高分辨魔角旋转核磁共振 ^1H 谱研究 [J]. *江苏医药*, 2010, 36: 446-448.
- [16] Swanson M G, Vigneron D B, Tabatabai Z L, Males R G, Schmitt L, Carroll P R, et al. Proton HRMAS spectroscopy and quantitative pathologic analysis of MRI/3D-MRSI-targeted postsurgical prostate tissues [J]. *Magn Reson Med*, 2003, 50: 944-954.
- [17] Kumar R, Kumar M, Jagannathan N R, Gupta N P, Hemal A K. Proton magnetic resonance spectroscopy with a body coil in the diagnosis of carcinoma prostate [J]. *Urol Res*, 2004, 32: 36-43.
- [18] Yang Y, Li C, Nie X, Feng X, Chen W, Yue Y, et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning ^1H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2605-2611.
- [19] 董爱生, 田建明, 陆建平, 左长京, 王 莉, 王 飞, 等. 肝脏肿瘤高分辨魔角旋转质子波谱分析 [J]. *波谱学杂志*, 2009, 26: 51-57.
- [20] Jordan K W, Adkins C B, Su L, Halpern E F, Mark E J, Christiani D C, et al. Comparison of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung by metabolomic analysis of tissue-serum pairs [J]. *Lung Cancer*, 2010, 68: 44-50.
- [21] 高秀香, 贺文义, 姚宏伟, 杜俊凯, 赵梅仙, 齐 剑, 等. 直肠组织的高分辨魔角旋转核磁共振波谱研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28: 2201-2206.
- [22] Lyng H, Sitter B, Bathen T F, Jensen L R, Sundfjor K, Kristensen G B, et al. Metabolic mapping by use of high-resolution magic angle spinning ^1H MR spectroscopy for assessment of apoptosis in cervical carcinomas [J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 11.
- [23] Mahon M M, de Souza N M, Dina R, Soutter W P, McIndoe G A, Williams A D, et al. Preinvasive and invasive cervical cancer: an *ex vivo* proton magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy study [J]. *NMR Biomed*, 2004, 17: 144-151.
- [24] Griffin J L, Pole J C, Nicholson J K, Carmichael P L. Cellular environment of metabolites and a metabonomic study of tamoxifen in endometrial cells using gradient high resolution magic angle spinning ^1H NMR spectroscopy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1619: 151-158.
- [25] Ben Sellem D, Elbayed K, Neuville A, Moussallieh F M, Lang-Averous G, Piotto M, et al. Metabolomic characterization of ovarian epithelial carcinomas by HRMAS-NMR spectroscopy [J]. *J Oncol*, 2011, 2001: 174019.
- [26] Boss E A, Moolenaar S H, Massuger L F, Boonstra H, Engelke U F, de Jong J G, et al. High-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of ovarian cyst fluid [J]. *NMR Biomed*, 2000, 13: 297-305.
- [27] Sitter B, Lundgren S, Bathen T F, Halgunset J, Fjosne H E, Gribbestad I S. Comparison of HRMAS spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters [J]. *NMR Biomed*, 2006, 19: 30-40.
- [28] Li W, Slominski R, Slominski A T. High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance analysis of metabolic changes in melanoma cells after induction of melanogenesis [J]. *Anal Biochem*, 2009, 386: 282-284.
- [29] Millis K, Weybright P, Campbell N, Fletcher J A, Fletcher C D, Cory D G, et al. Classification of human liposarcoma and lipoma using *ex vivo* proton NMR spectroscopy [J]. *Magn Reson Med*, 1999, 41: 257-267.