

长回波时间的点解析波谱序列外标准结合 线性拟合模型定量检测脑肌酸浓度 准确性的实验研究

林艳 沈智威 肖叶玉 郑文斌 李慧 肖壮伟 吴仁华

【摘要】 目的 探讨长回波时间 (TE) 的点解析波谱序列 (PRESS) 外标准和线性拟合模型 (LCModel) 定量检测活体脑肌酸 (Cr) 浓度的准确性。方法 10 头 2 周龄猪及 1 个外标准模型用于本次实验。氢质子 MR 波谱 ($^1\text{H-MRS}$) 实验采用 GE 1.5 T MR 扫描仪及标准正交头线圈。感兴趣区大小为 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$, 分别定位于动物脑和外标准溶液。PRESS 序列按 TE 135 ms, TR 1500 ms, 128 次扫描, 获得感兴趣区 Cr 的波谱数据, 然后用 LCModel 分析活体脑 Cr 浓度。每只动物做完 MRS 检查后即刻处死, 用高效液相色谱方法 (HPLC) 分析离体脑 Cr 浓度。采用配对样本 t 检验比较活体和离体检测结果的差别。结果 $^1\text{H-MRS}$ 测定的活体脑 Cr 浓度为 $(9.37 \pm 0.14)\text{ mmol/kg}$, HPLC 测定的离体脑 Cr 浓度为 $(8.91 \pm 0.13)\text{ mmol/kg}$, 两种方法的检测结果差异无统计学意义 ($t = 9.038$, $P = 0.491$)。结论 长 TE 的 PRESS 序列外标准结合 LCModel 可以准确无创地定量检测活体脑 Cr 浓度。

【关键词】 肌酸; 磁共振波谱学; 色谱法, 高压液相

Experimental investigation of the accuracy for absolute quantification of brain creatine concentration using long time echo point resolved spectroscopy sequence with an external standard and linear combination of model spectra LIN Yan*, SHEN Zhi-wei, XIAO Ye-yu, ZHENG Wen-bin, LI Hui, XIAO Zhuang-wei, WU Ren-hua. * Department of Medical Imaging, the Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Corresponding author: WU Ren-hua, Email: rhwu@stu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the accuracy for absolute quantification of brain creatine (Cr) concentration using long time echo (TE) point resolved spectroscopy (PRESS) sequence performed with an external standard and postprocessed with the linear combination of model spectra (LCModel). Methods Ten swine ($3.1 \pm 0.6\text{ kg}$) and an external standard phantom containing detectable compounds of known concentration were investigated in this study by using 1.5 T GE Signa scanner and a standard head coil. The single-voxel proton magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-MRS}$) data were acquired from the two ROIs ($2\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) placed in swine brain and external standard solution using PRESS sequence with TE 135 ms, TR 1500 ms, and 128 scan averages. The in vivo quantification of Cr was accomplished by LCModel. After $^1\text{H-MRS}$ examination, each animal was sacrificed immediately. In vitro Cr concentration was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Results In the $^1\text{H-MRS}$ group, the Cr concentration was $(9.37 \pm 0.14)\text{ mmol/kg}$. In the HPLC group, the Cr concentration was $(8.91 \pm 0.13)\text{ mmol/kg}$. Good agreement was obtained between these two methods ($t = 9.038$, $P = 0.491$). Conclusion The long echo time PRESS sequence performed with an external standard and processed with LCModel is proven to be an accurate technique to detect the in vivo brain Cr concentration.

【Key words】 Creatine; Magnetic resonance spectroscopy; Chromatography, high pressure liquid

用氢质子 MR 波谱 ($^1\text{H-MRS}$) 技术准确无创地检测活体脑肌酸 (Cr) 含量具有重要的临床意义, 目

前从国内外数据库检索到的检测 Cr 含量的文献不多^[1-2] 更多情况下 Cr 被当作含量恒定的参照物应用于比率和内标准方法中以检测其他代谢物的水平^[3]。实际上, Cr 并不是在任何病理生理状态下都保持恒定^[1,4-7]: 脑组织的代谢状况、体素的位置、体素内灰白质比例、体素内脑脊液含量、不同发育年龄阶段和药物等均可致 Cr 含量发生变化。代谢物的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270379/C010511)

作者单位: 515041 汕头大学医学院第二附属医院放射科 (林艳、沈智威、肖叶玉、郑文斌、吴仁华); 汕头大学医学院中心实验室 (李慧); 广东省分子影像重点实验室 (肖壮伟)

通信作者: 吴仁华, Email: rhwu@stu.edu.cn

定量检测已是 MR 波谱学界公认的发展方向, 可以分为内标准和外标准两大分支。内标准方法常以 $H_2O^{[1]}$ 和 $Cr^{[8]}$ 作为参照物以检测其他代谢物的绝对浓度, 然而这种方法存在许多潜在问题致其检测结果并不准确, 因此, 1H -MRS 外标准方法得到了重视。本研究旨在通过动物实验, 比较活体和离体的检测结果, 以探讨长回波时间 (echo time, TE) 的点解析波谱 (point resolved spectroscopy, PRESS) 序列外标准结合线性拟合模型 (linear combination of model spectra, LCModel) 定量检测活体脑 Cr 浓度的准确性。

资料与方法

一、实验动物

10 头健康 2 周龄小猪, 体重 (3.1 ± 0.6) kg, 普通喂养。所有实验依动物保护方案进行, 严格遵守动物实验的各项伦理条例。

二、方法

1. 外标准模型的配制: 该模型是 1 个 125 ml 的圆形玻璃球, 装满生理盐水, 其内包含 N-乙酰天冬氨酸 (NAA) 40 mmol/L、-氨基丁酸 (GABA) 40 mmol/L、谷氨酸 (Glu) 20 mmol/L、谷氨酰胺 (Gln) 20 mmol/L、Cr 32 mmol/L、氯化胆碱 8 mmol/L 和肌醇 (mIn) 20 mmol/L (美国 Sigma 公司), 标准物质的浓度参考文献 [9], 并调整溶液 pH 值为中性。

2. 1H -MRS 外标准结合 LCModel 检测活体脑 Cr 浓度: 1H -MRS 实验采用 GE 1.5 T MR 扫描仪及标准正交头线圈。所有动物扫描前均用盐酸异丙嗪和盐酸氯丙嗪混合液以 1 ml/kg 剂量麻醉后仰卧位固定于扫描床上。将外标准模型放置于动物头旁, 对称轴平行于主磁场方向。感兴趣区从梯度回波成像中选定, 大小为 2 cm × 2 cm × 2 cm, 分别定位于动物脑和外标准球体内 (图 1)。PRESS 序列按 TE 135 ms, TR 1500 ms, 128 次扫描, 获得体素内 Cr 的波谱分析数据。每一个 PRESS 序列扫描前, 均要进行匀场, 使 1H 谱水峰的半高全宽 (FWDH) < 5 Hz。数据采集完毕后转换至 SGI/O2 工作站, 使用 LCModel 进行波谱后处理, 计算出体素内 Cr 的浓度, 所需基础集 (the basis set) 由 Provencher 博士 (48 Chancery Lane, Oakville, Ontario L6J 5P6, Canada) 提供。为校正不同机器环境的差异, 需要一个校正因子 (参考 LCModel 操作手册, <http://www.s-provencher.com/pages/lcm-manual.shtml>)。

本实验的外标准模型用于参数校正。 C_{lcm} 代表 LCModel 软件输出的 Cr 数据, C_{true} 代表 Cr 的真实浓度, 校正因子 $F_{calib} = C_{true}^s / C_{lcm}^s$, 所以活体动物脑 Cr 的浓度用下列方程表示: $C_{true}^b = F_{calib} \times C_{lcm}^b = (C_{true}^s / C_{lcm}^s) \times C_{lcm}^b$ (上标注 s 和 b 分别表示外标准液和脑组织)。上述方程所得 Cr 浓度值除以新鲜脑组织的比重 P_{brain} (由汕头大学医学院中心实验室测得), 以 mmol/kg 表示。为准确测定体素内的 Cr 浓度, 必须校正脑脊液含量^[10], 所以最后的 Cr 浓度以下列方程表示: $C_{true}^b = [(C_{true}^s / C_{lcm}^s) \times C_{lcm}^b] / [(1 - f_{csf}) \times P_{brain}]$, f_{csf} 为脊柱中脑脊液的含量。

3. 高效液相色谱方法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测脑匀浆液的 Cr 浓度 (此方法在文献 [11] 的基础上稍做改动): (1) 取样: 每只动物做完 MRS 检查后即刻处死, 快速取出大脑, 用 -70 液态氮固定后, 切除脑组织各个面的边缘 (根据活体扫描时体素的空间位置, 预先计算好需切除的各个面的边缘到体素边缘的垂直距离), 获取与 MRS 扫描体素一致的脑组织样本; 迅速用塑料薄膜包裹样本并放入液态氮中, -70 冰箱保存。(2) 样本预处理: 速取冻干脑组织样品, 在冻结状态下破碎, 加入 0.42 mol/L 高氯酸 20 ml 置离心管中, 旋涡震荡混匀。提取 400 μ l 原始匀浆液, 震荡 1 min, 10 下 4000 r/min 离心 10 min。取上述上清液 200 μ l, 加入 1 mol/L 的氢氧化钾 85 μ l, 旋涡震荡 1 min, 再以 10 下 4000 r/min 离心 10 min, 最后取 20 μ l 已过滤上清液进样。(3) 色谱条件固定相: Luna-2C18 分析柱 [250 mm × 4.6 mm, 色谱柱内径 (id) = 5 μ m]; 流动相: 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 缓冲液 (330 mmol/L) 和 硫代巴比妥酸 (TBA) (45 mmol/L) 的混合液 (容积比为 940 : 5, pH = 6.27); 流率: 1 ml/min; 检测波长为 210 nm。为使 Cr 色谱峰基线平滑、分离度好, 本实验使用梯度洗脱方法, 洗脱液为 25% 乙腈。

三 统计学方法

检测结果应用 SPSS 11.5 统计软件进行处理。采用配对样本 t 检验比较活体和离体检测的结果, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

正常活体动物脑及外标准模型的代谢物波谱图见图 2, 3, 频率轴上均可清楚地看到 NAA、胆碱化合物 (Cho)、Cr、mIn、Glu 和谷氨酰胺复合物 (Glx) 诸峰, 各峰分离好, 基线平稳。动物脑原始波谱数据经

LCModel 自动拟合后谱线平滑, 与原始波谱线相一致, 并自动进行基线校正(图 4)。动物脑匀浆液经 HPLC 检测的 Cr 色谱图基线平稳, Cr 峰分离好, 未见杂峰干扰(图 5)。活体长 TE 的 PRESS 序列外标准结合 LCModel 检测 10 头动物脑 Cr 为 9.16 ~ 9.62 mmol/kg, 平均浓度值为 (9.37 ± 0.14) mmol/kg, 离体 HPLC 方法检测的浓度为 8.74 ~ 9.12 mmol/kg, 平均浓度值为 (8.91 ± 0.13) mmol/kg, 2 种方法检测结果差异无统计学意义($t=9.038, P=0.491$)。

讨 论

一、 ^1H -MRS 检测代谢物的方法

^1H -MRS 的检测结果通常以代谢物之间的比率来表达, 其中以 NAA/Cr、NAA/Cho 和 Cho/Cr 的应用最为广泛。比率的应用在临床上有很大的优势, 有效地修正了 MRS 数值因受部分容积效应、化学位移、生物体本身因素及场强不均一等因素带来的影响, 而且后处理简单。但比率最主要的缺点是结果缺乏客观性和准确性。仅仅凭比值的升高或降低, 不能准确地判断代谢物具体的变化水平^[12]; 而且比值与离体组织切片及动物实验的定量检测结果无法

比较^[3]。

代谢物定量检测的外标准就是装有已知标准溶液的球形装置^[13], 溶液浓度模拟正常人脑, 包括 NAA、氯化胆碱、Cr、mIn、Glu 和 Gln, 实验时将外标准球体置于受试对象脑旁边。目前已有多篇 ^1H -MRS 外标准方法定量检测脑代谢物绝对浓度的文献报道^[6, 13-15]。另外, 波谱后处理分析软件如 LCModel 和 MRUI(MR user interface) 也用于定量分析。本实验所用 LCModel 在国外已得到了较广泛的应用, 其处理过程中不需要输入很多参数, 所以结果更具有客观性。

离体 HPLC 方法是对多组分混合物进行分离分析的重要研究手段, 国外文献报道其对代谢物 Cr、NAA、GABA 等定量分析的准确性与离体高分辨 MRS 方法一致^[16]。用 HPLC 方法验证活体 ^1H -MRS 方法检测结果的准确性, 可以解决活体和离体检测结果难以比较的困惑。本实验行 HPLC 检测, 脑匀浆液的 Cr 色谱图基线平稳, Cr 峰分离好, 未见杂峰干扰(图 5)。 ^1H -MRS 和 HPLC 测定的活体脑 Cr 浓度为结果差异无统计学意义, 这证明了长 TE 的 PRESS 序列外标准方法结合 LCModel 定量检测脑 Cr 浓度的准确性。

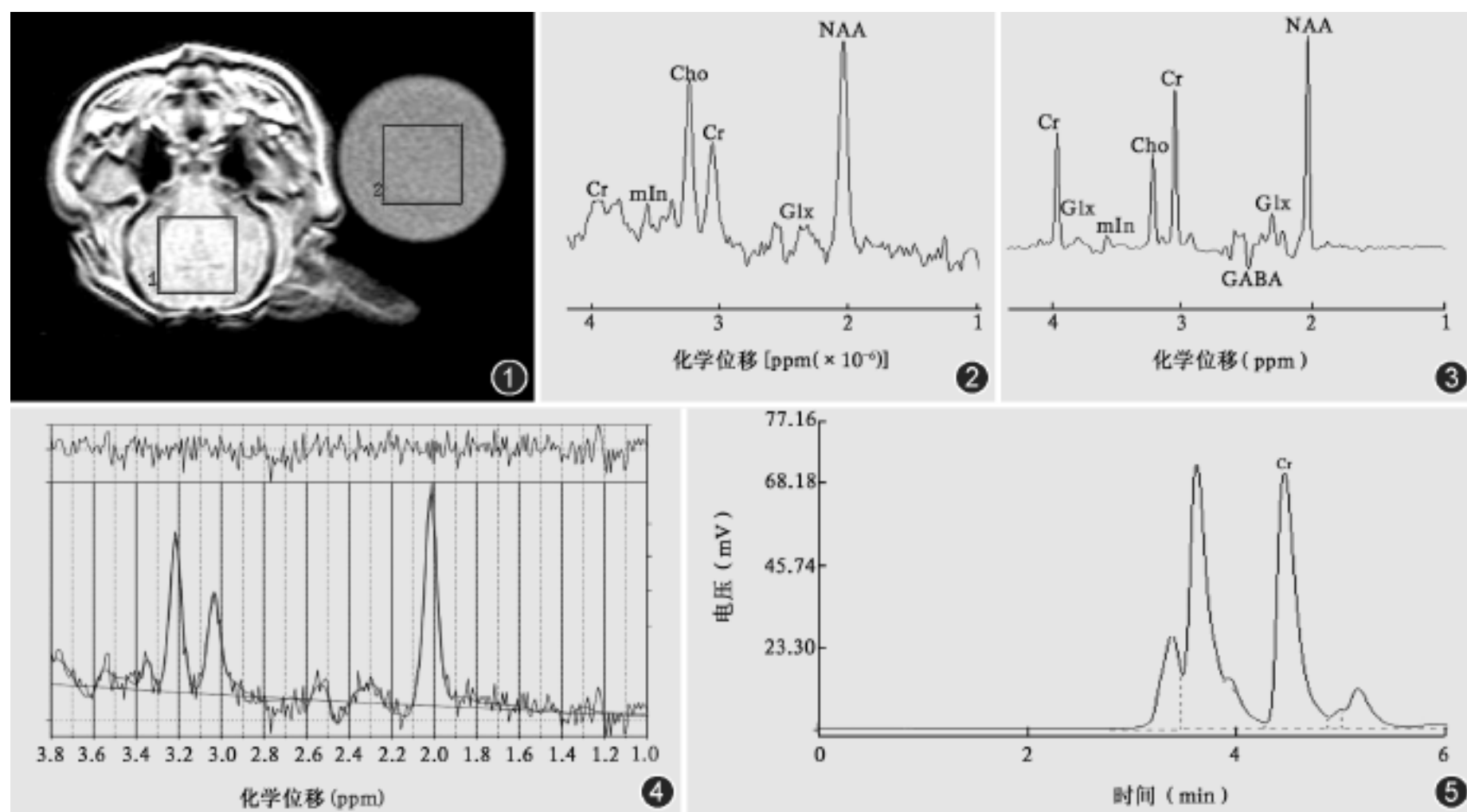


图 1 MR 波谱感兴趣区(2 cm×2 cm×2 cm)分别放置于动物脑组织(1)及外标准(2) 图 2,3 正常猪质子波谱图(图 2)和外标准模型波谱图(图 3), 频率轴上可清楚地看见各个代谢物的谱峰, Cr 为肌酸, mIn 为肌醇, Cho 为胆碱, NAA 为 N-乙酰天冬氨酸, Glx 为谷氨酸复合峰, GABA 为 γ -氨基丁酸 图 4 LCModel 软件自动对原始波谱图进行线性拟合和基线校正, 拟合后的峰形与原始谱线一致; 图形的上部曲线表示拟合后的噪声 图 5 脑匀浆液色谱图, 基线平稳, Cr 峰分离良好, 未见杂峰干扰

二、¹H-MRS 定量检测的局限性

国外不少学者认为外标准置于受试对象的脑旁边,球体本身及球内标准物质所带的电荷会引起 B1 磁场和净磁场的均匀、驻波效应,致代谢物信号变异很大。而且受试对象和外标准球体都处于线圈的边缘,射频敏感性大大降低。针对上述情况,本实验采取以下措施:(1)使用 PRESS 序列获得波谱分析数据,因为其序列设计中 2 个重聚 180 脉冲可以矫正方向固定的磁场不均匀;而且信噪比高于受激回波成像序列(STEAM),成像时间短,对运动不敏感。(2)使用尽可能小的外标准球体(125 ml),可以减少涡流和驻波效应。(3)调整外标准模型溶液的 pH 值为中性,使得球内物质的相对电容率尽可能小。另外,外标准模型本身还能起到参数校正的作用。

¹H-MRS 外标准方法检测脑代谢物虽然取得了一些进展,但由于受到 MR 设备和生物体本身因素的影响,准确定量分析仍是比较困难。比如本研究¹H-MRS 检测的总 Cr 峰还包括了较低水平的 GABA、赖氨酸、谷胱甘肽峰,虽然 LCModel 处理数据时考虑到了这些重叠峰对 Cr 的影响,定量检测的结果是从上述物质中分离出来的 Cr,但是否进行了十分准确的分离还存在争议。在今后的深入研究中,期望尝试多量子滤波等波谱编辑技术将 Cr 背景中低水平的 GABA、赖氨酸、谷胱甘肽等干扰峰分离出来,以提高活体检测结果的精确性。另外,TE 和 TR 值也可以影响定量检测结果。如在 1.5 T MR 扫描情况下,Cr 是长 T₂ 物质,其经典 T₂ 弛豫时间为 (214 ±23) ms,所以选择长 TE、长 TR 可以更好地“权重”T₂,能最大程度提高 Cr 的检测信号,使得检测结果更准确。而且,在实际 PRESS 序列研究中,TE(135 ~270 ms) 避免了脂肪峰和大分子物质的干扰,使波谱图简化,获得理想的波谱。

目前笔者不可能做到一次 MRS 扫描同时准确检测多个代谢物的浓度。因为不同的代谢物有不同的 T₁、T₂ 值,需要根据实验目的选择最佳的 TE 和 TR 值。另外,需要修正弛豫效应对活体脑代谢物定量检测的影响,目前 LCModel 在弛豫校正方面还有待改善。笔者正在尝试将 LCModel、SAGE(spectrum analyse) 和 MRUI 软件相互结合起来,取长补短,提高 MRS 定量检测结果的准确性。

MR 波谱的定量检测相对复杂但是可行,综合考虑 MR 软硬件、扫描参数及数据的有效处理是获得可靠结果的关键。

志谢 本研究在离体高效液相色谱实验中得到了汕头大学医学院中心实验室罗文鸿教授等多名专家的悉心指导和帮助,在此表示衷心的感谢

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 安维民, 蔡幼铨, 邱本胜, 等. 健康成人脑代谢物浓度以及比值的¹H-MRS 研究. *中国医学影像学杂志*, 2001, 9: 414-416.
- [3] Li BS, Wang H, Gonen O. Metabolite ratios to assumed stable creatine level may confound the quantification of proton brain MR spectroscopy. *Magn Reson Imaging*, 2003, 21: 923-928.
- [4] Tkáč I, Keene CD, Pfeuffer J, et al. Metabolic changes in quinolinic acid-lesioned rat striatum detected non-invasively by in vivo (1) H NMR spectroscopy. *J Neurosci Res*, 2001, 66: 891-898.
- [5] Silverstone PH, Donnell T, Ulrich M, et al. Dextro-amphetamine increases phosphoinositol cycle activity in volunteers: an MRS study. *Hum Psychopharmacol*, 2002, 17: 425-429.
- [6] Wu RH, O Donnell T, Ulrich M, et al. Brain choline concentrations may not be altered in euthymic bipolar disorder patients chronically treated with either lithium or sodium valproate. *Ann Gen Hosp Psychiatry*, 2004, 3: 13.
- [7] Shen J, Rothman DL, Brown P. In vivo GABA editing using a novel doubly selective multiple quantum filter. *Magn Reson Med*, 2002, 47: 447-454.
- [8] Wilken B, Ramirez JM, Probst I, et al. Creatine protects the central respiratory network of mammals under anoxic conditions. *Pediatr Res*, 1998, 43: 8-14.
- [9] Woermann FG, Mclean MA, Bartlett PA, et al. Quantitative short echo time proton magnetic resonance spectroscopic imaging study of malformations of cortical development causing epilepsy. *Brain*, 2001, 124 (Par 2): 427-436.
- [10] Huang W, Alexander GE, Daly EM, et al. High brain myo-inositol levels in the predementia phase of Alzheimer's disease in adults with Down's syndrome: a ¹H MRS study. *Am J Psychiatry*, 1999, 156: 1879-1886.
- [11] Sun AM, Wang ER, Mao BY, et al. Determination of creatine phosphocreatine and adenosine phosphates in experimental hydrocephalus tissue by reversed-Phase high performance liquid chromatography. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2004, 35: 113-116.
- [12] 林艳, 饶海冰, 吴仁华. ¹H-MRS 定量测定脑代谢物的研究. *国外医学 放射医学核医学分册*, 2005, 29: 85-88.
- [13] Wu RH, Silverstone P, Rao HB, et al. Quantitative measurement of brain metabolite concentrations using PRESS sequence at 3 T. *Radiology*, 2002, 22: 667.
- [14] 饶海冰, 孔抗美, 吴仁华. 磁共振波谱检测乳酸的脉冲序列优化研究. *中华放射学杂志*, 2004, 38: 1108-1111.
- [15] Wu RH, Lin R, Li H, et al. Accuracy of noninvasive quantification of brain NAA concentrations using PRESS sequence: verification in a swine model with external standard. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2005, 2: 1396-1399.
- [16] Alessandri B, al-Samsam R, Corwin F, et al. Acute and late changes in N-acetyl-aspartate following diffuse axonal injury in rats: an MRI spectroscopy and microdialysis study. *Neurol Res*, 2000, 22: 705-712.

(收稿日期: 2007-04-05)

(本文编辑: 高宏)