

2点 Dixon 技术评价鼠骨质疏松模型骨髓脂肪:与病理对照

徐铮¹ 李冠武^{2*} 顾昊¹ 周蕾² 常时新²

1. 上海市闵行区莘庄社区卫生服务中心, 上海 201199

2. 上海中医药大学附属岳阳医院放射科, 上海 200437

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 04-0399-04

摘要: **目的** 探讨2点 Dixon 技术定量鼠骨质疏松(OP)模型骨髓脂肪含量的可行性。**方法** 18只12周龄雌性SD大鼠随机分为假手术组(SHAM)及去卵巢组(OVX), 每组9只。分别在基线、6、12周行2点 Dixon 水-脂分离成像及骨密度(BMD)扫描, 获取骨髓脂肪分数(FF)及BMD。第12周末行骨髓脂肪细胞定量分析。**结果** OVX组FF呈时序性增高而BMD呈时序性降低。第6、12周时, OVX组FF较基线时分别增高40.0%、69.4% (P 均 <0.001)。第6周始组间FF有显著性差异, 而组间BMD至第12周时才有统计学差异(P 均 <0.001)。OVX组骨髓脂肪细胞密度、直径及面积百分比比较SHAM组分别增高57.3%、29.5%、163% (P 均 <0.001)。**结论** OP骨受损伤伴随骨髓脂肪组织增多, 2点 Dixon MRI 成像可动态定量骨髓脂肪含量。

关键词: 2点 Dixon; 水-脂分离; 骨质疏松; 骨密度

Evaluation of marrow adiposity using two-point Dixon method in a rat osteoporosis model: comparison with histopathology

XU Zheng¹, LI Guanwu², GU Hao¹, ZHOU Lei², CHANG Shixin²

1. Health Service Center of Xin-zhuang Community, Shanghai 201199

2. Yueyang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

Corresponding author: LI Guanwu, Email: purenyi@163.com

Abstract: Objective To explore the feasibility of two-point Dixon water-fat separation method in the assessment of marrow adiposity in estrogen-deficient rats. **Methods** Nineteen 12-week-old female Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operated (SHAM, $n=9$) and ovariectomized (OVX, $n=9$) group. Marrow fat fraction (FF) and bone mineral density (BMD) were measured at 0, 6, and 12 weeks. At the end of the experiment, marrow adipocytes were quantitatively evaluated. **Results** FF increased, but BMD decreased in OVX rats over time. FF increased in OVX group by 40.0% at week 6 and by 69.4% at week 12, respectively, compared to the baseline ($P < 0.001$). Compared with SHAM rats, FF in OVX rats was markedly elevated at week 6 but a reduction in BMD first detected at week 12 ($P < 0.001$). The OVX rats had substantially higher adipocyte density (by 57.3%), size (by 29.5%), and volume (by 163%) than SHAM rats. **Conclusion** OP is characterized by marrow adipogenesis as well as bone loss. Two-point Dixon water-fat separation may dynamically quantify marrow fat content.

Key words: Two-point Dixon; Water-fat separation; Osteoporosis; Bone mineral density

骨质疏松(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨组织显微结构退化为特征, 以致骨骼脆性增高、骨折风险性增加的一种全身性代谢性骨骼疾病^[1]。以往对OP致病机制的研究主要集中在以成骨/破骨细胞为研究对象。近来研究发现, 松质骨某些特征

与骨髓脂肪含量存在密切关系^[2-4]。雌激素缺乏状态下, 骨量、骨髓脂肪含量及骨髓脂肪细胞定量参数发生何种关系仍然是研究的热点。磁共振波谱是目前定量骨髓脂肪含量较为成熟的影像技术, 但它也有局限性, 如不适用于活体小动物(如大鼠)、扫描时间长、谱线后处理繁琐费时等问题。Dixon水-脂分离技术是利用水质子和脂肪质子拉莫尔频率差, 通过调节回波时间做多次采集, 可分别获得正相位、反相位及单独的水相和脂相。基于化学位移MRI

基金项目: 国家自然科学基金项目(81202809); 上海市闵行区卫生局资助(2013MW71)

* 通讯作者: 李冠武, Email: purenyi@163.com

水-脂分离技术可以定量组织器官的脂肪含量,如脂肪肝等,但应用该技术评价骨髓脂肪含量相对少见。故此,本项目拟利用2点 Dixon 技术动态评价大鼠 OP 模型骨髓脂肪含量的可行性,研究雌激素缺乏时骨量-骨髓脂肪变化的相关性。

1 材料与方法

1.1 OP 模型制作

18只12周龄雌性SD大鼠(上海中医药大学实验动物中心提供及饲养)随机均分为假手术组(SHAM)、去卵巢组(OVX)。腹腔注射3%戊巴比妥钠(30mg/kg)麻醉实验鼠,OVX摘除双侧卵巢,SHAM则在卵巢附近切取一块与卵巢体积大小相仿的脂肪。自由进食、饮水,分笼饲养。环境温度22℃~24℃,相对湿度45%~60%,12h光照/12h黑暗循环。于实验开始(0周)、6周及12周时行骨密度(bone mineral density, BMD)扫描及2点 Dixon MRI 成像。病理解剖证实卵巢已切除且子宫角萎缩是判断 OVX 模型制作成功的标志。

1.2 BMD 扫描

双能 X 线吸收测量法(Dual-energy X-ray absorptiometry, DXA)扫描仪(Prodigy Lunar, GE)进行大鼠 BMD 测定,配置小动物分析软件(enCORE, 13.40)。大鼠麻醉满意后,俯卧位,四肢及尾巴伸直于扫描床上,获取腰椎及股骨 BMD(g/cm^2)^[5]。

1.3 2点 Dixon 技术及图像分析

Siemens 3T MRI 扫描仪,4通道相控大鼠线圈。俯卧位,左侧股骨常规 T2WI 扫描后,采用 3D-GRE T2* 衰减校正 2 点 Dixon 水-脂分离成像技术。扫描结束后可获得正相位、反相位、脂相、水相图。扫描参数:TR/TE = 5.91/(2.45/3.675) ms,层厚 = 1.5 mm,FOV = 140 × 140 mm²,翻转角 = 9°,矩阵 = 192 × 192,带宽 = 650Hz/pixel, NEX = 2。Syngo MR 后处理工作站,选择经过股骨最正中的图像,手工绘制股骨远端 ROI,避开骨皮质。每样本测量 2 次,取

其均值作为最终分析结果。骨髓脂肪分数(fat fraction, FF) = $[M_{\text{fat}} / (M_{\text{water}} + M_{\text{fat}})] \times 100\%$,式中 M_{water} 、 M_{fat} 分别指水相、脂相 ROI 总像素信号强度值^[2, 4]。

1.4 骨髓组织学检查

左侧股骨干骺端松质骨置于 4% 多聚甲醛溶液固定 24h 后,10% EDTA 脱钙 4 周。骨组织常规脱水、石蜡包埋,Leica 冰冻切片沿冠状面切成 4 μm 厚薄片行 HE 染色。Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对骨髓脂肪细胞密度、直径、面积百分比进行定量测定,每张连续切片随机选择 5 个 200 倍光镜视野计算其平均值。

1.5 统计学处理

SPSS 17.0 统计软件包,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。二元方差分析 BMD 及 FF 时间-分组交互作用,独立样本 *t* 检验比较组间骨髓组织学参数的差异。 $P < 0.05$ 则差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重变化

实验开始时 2 组实验鼠体重无差异。OVX 术后 12 周,OVX 体重较基线时增加 51.4%,为(341 ± 19) g,而 SHAM 体重较基线时增加 21.4%,为(267 ± 16) g。实验结束,OVX 体重较对照组增高 27.7%。

2.2 BMD 变化

OVX BMD 呈时序性下降,OVX BMD 各时点比较差异有统计学意义,第 12 周,股骨及腰椎 BMD 分别降低 7%、9.6%。第 6、12 周时,SHAM BMD 也稍高于基线时 BMD 值,各时点比较差异有统计学意义。第 6 周,OVX 股骨、腰椎骨丢失分别为 5.4%、7.5%;第 12 周,OVX 股骨、腰椎骨丢失分别为 10.7%、14.1%。至第 12 周,两组间 BMD 有显著性统计学差异(P 均 < 0.001),表 1。

表 1 实验鼠术后 BMD 及 FF 时序性变化

Table 1 Sequential changes in BMD and fat fraction after operation in rats

| 类别 | | Week 0 | Week 6 | Week 12 |
|--------------------------------------|------|---------------|----------------------------|------------------------------|
| 股骨 BMD | SHAM | 0.197 ± 0.007 | 0.202 ± 0.010 ^a | 0.206 ± 0.007 ^{ab} |
| (Femur BMD, g/cm^2) | OVX | 0.198 ± 0.006 | 0.191 ± 0.007 ^a | 0.184 ± 0.007 ^{abc} |
| 腰椎 BMD | SHAM | 0.154 ± 0.009 | 0.159 ± 0.011 ^a | 0.163 ± 0.010 ^{ab} |
| (L4-L5 BMD, g/cm^2) | OVX | 0.155 ± 0.008 | 0.147 ± 0.012 ^a | 0.140 ± 0.008 ^{abc} |
| 脂肪分数 | SHAM | 13.2 ± 2.0 | 14.1 ± 1.7 ^a | 14.7 ± 2.3 ^a |
| (Fat fraction, %) | OVX | 13.9 ± 2.6 | 19.2 ± 2.0 ^{a,c} | 23.2 ± 2.5 ^{abc} |

注:^a $P < 0.05$ vs. week 0; ^b $P < 0.05$ vs. week 6; ^c $P < 0.001$ vs. SHAM.

2.3 FF 变化

OVX FF 呈时序性增高,OVX FF 各时点比较差异有统计学意义,第12周,FF 增高69.4%。第6、12周时,SHAM FF 也稍高于基线时 FF 值,差异有

统计学意义。第6、12周,OVX FF 值较 SHAM 分别增高36.2%、57.8%。第6周始,两组间 FF 有显著性统计学差异(表1)。图1为2点 Dixon 技术代表性图像。



图1 OVX 组2点 Dixon 水/脂分离图(FF 呈时序性增高)

Fig. 1 Two-point Dixon water/fat separation in OVX rat (FF increased over time)

2.4 骨髓组成成分变化

OVX 脂肪细胞密度、直径及面积百分比分别为 $(236 \pm 26)/\text{mm}^2$ 、 $(39.1 \pm 3.0) \mu\text{m}$ 、 $(32.4 \pm 1.9)\%$, 较 SHAM 分别增高 57.3% [$(150 \pm 30)/\text{mm}^2$]、29.5% [$(30.2 \pm 2.6) \mu\text{m}$]、163% [$(12.3 \pm 3.2)\%$], P 均 < 0.001 (图2)。

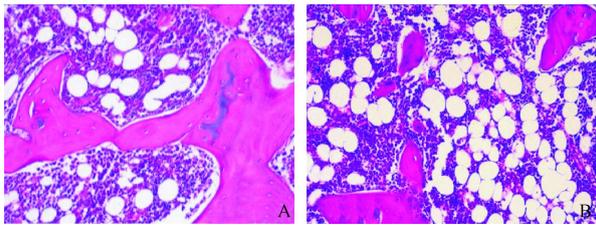


图2 骨髓病理切片(OVX 组脂肪细胞密度、直径及面积百分比均较 SHAM 大)(HE, $\times 200$)。A: SHAM; B: OVX

Fig. 2 Changes in marrow adipocytes (HE staining, $\times 200$). OVX rats had higher adipocyte density, size, and volume than SHAM rats. A: SHAM; B: OVX

3 讨论

水、脂信号成功分离,不只是考虑抑制脂肪信号的问题。有时脂肪信号在某些疾病诊断、疗效评估中具有重大作用,例如 OP、脂肪肝、Gaucher 病等都需要脂肪成分的定量信息以及水/脂比例的信息。化学位移选择性脂肪预饱和技术 CHESS、STIR 等技术无法满足这些疾病的临床或科研目的。基于上述原因 Dixon 提出了水脂分离技术,水脂分离 Dixon 技术可以得到水脂分离的图像,放弃一个就是抑制,有些应用两者都需要精确定量。应用 Dixon 技术评估骨髓脂肪组织含量的研究显得相对贫乏。前期研究^[4]及本研究表明,这种技术对评估骨髓脂肪含量

是可行的。

OVX 体重呈现时序性增高,SHAM 体重也有所增加,但前者较后者增加的程度更为明显。这是因为,OVX 术后一方面大鼠活动减少,另一方面雌激素缺乏使体脂异常积聚,两者致使体重较 SHAM 明显增高,补充雌激素可以逆转 OVX 术后体重的异常增加^[5]。

雌激素缺乏引起的骨吸收和骨重建平衡失调是绝经后 OP 发生的根本原因。绝经后女性卵巢功能减退,雌激素急剧下降,骨组织失去雌激素的保护作用,骨吸收增多,骨丢失加快,骨转化率明显升高,终致绝经后 OP 的发生。本实验发现,OVX 术后 12 周,股骨 BMD 降低 10.7% 而 L4-L5 椎体 BMD 降低 14.1%,后者较前者骨丢失率更加显著。此次归因于不同的骨骼部位其骨小梁丰富程度不同,松质骨骨小梁具有更大的面积比且骨小梁具有更高的骨转化率。椎体骨小梁数目、面积/体积比股骨高,因此,椎体较股骨 BMD 下降的程度更大。Shin 等^[6]运用显微 CT 比较去势鼠不同骨骼部位骨微构筑的变化规律,发现胫骨以骨小梁数目减少为主,而 L4 则以骨小梁变薄、消失为主。

本研究的优点是采用纵向研究方法,一方面可减少实验动物使用量,符合动物使用“3R”原则,是维护实验动物福利的一个重要原则;另一方面,纵向研究方法可提高统计效能,将每只动物作为自身对照,可最大限度降低实验动物个体差异,使结果更具科学性。本实验发现,2 点 Dixon 技术探测 OVX 骨髓脂肪含量呈时序性增高,且其变化的程度较骨量变化更为显著,MRI 影像技术所得结论在骨髓组织学定量参数骨髓脂肪细胞密度及大小得到证实。成骨细胞、骨细胞和破骨细胞的功能决定了骨组织的

结构与生理骨量维持在正常水平。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的多向分化潜能具有重要意义。因此人们开始关注 MSCs 参与的成骨减少和成脂肪增多所引起的 OP。雌激素一方面通过雌激素受体 α 增强其成骨活性;另一方面可通过作用于 MSCs, 抑制其成脂分化、促进其成骨分化^[7]。OVX 术后, 雌激素急剧下降, 增强 MSCs 成脂分化。因此, 骨髓 FF 值呈现出时序性增高。雌激素替代治疗可通过下调脂肪细胞分化特异性基因 PPAR γ 发挥其抑脂作用^[8]。这些结果表明, OP 至少是部分由于骨髓脂肪组织增多所致。

骨髓脂肪组织包含饱和脂质、不饱和脂质, OP 时发现骨衰败的同时伴随着骨髓饱和脂质增高而不饱和脂质降低, 且不饱和脂质对骨质表现出正性作用。但是, 骨髓饱和脂质异常积聚, 一方面可通过脂毒性作用抑制成骨细胞的分化及增殖, 最终导致骨量减少; 另一方面骨髓脂肪细胞增多可释放脂肪因子及炎性细胞因子, 通过自分泌、胞分泌及旁分泌作用影响机体的能量代谢及骨代谢^[9-10]。

综上所述, 雌激素缺乏一方面影响骨细胞的功能使骨吸收增加、骨形成受损; 另一方面影响骨髓脂肪组织, 共同导致骨质量下降。3 月龄雌性 SD 大鼠, 经 OVX 术后 12 周可建立原发性 OP 模型。2 点 Dixon 水-脂分离技术是快速、无创性评价骨髓脂肪含量的有效方法之一。

【参 考 文 献】

[1] LI Guanwu, CHANG Shixin, FAN Jingzheng, et al. Relationship between body composition and bone strength in postmenopausal

women. Chin J Osteoporosis, 2013, 19(7):681-685.

- [2] Roldan-Valadez E, Pina-Jimenez C, Favila R, et al. Gender and age groups interactions in the quantification of bone marrow fat content in lumbar spine using 3T MR spectroscopy: A multivariate analysis of covariance (Mancova). Eur J Radiol, 2013, 82 (11): e697-702.
- [3] Devlin MJ. Bone marrow composition, diabetes, and fracture risk: more bad news for saturated fat. J Bone Miner Res, 2013, 28 (8):1718-1720.
- [4] Li GW, Xu Z, Chen QW, et al. Quantitative evaluation of vertebral marrow adipose tissue in postmenopausal female using MRI chemical shift-based water-fat separation. Clin Radiol, 2014, 69(3):254-262.
- [5] Heiss C, Govindarajan P, Schlewitz G, et al. Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. Med Sci Monit, 2012, 18(6):BR199-207.
- [6] Shin YH, Cho DC, Yu SH, et al. Histomorphometric analysis of the spine and femur in ovariectomized rats using micro-computed tomographic scan. J Korean Neurosurg Soc, 2012, 52(1):1-6.
- [7] Chen FP, Hu CH, Wang KC. Estrogen modulates osteogenic activity and estrogen receptor mRNA in mesenchymal stem cells of women. Climacteric, 2013, 16(1):154-160.
- [8] Jeong S, Yoon M. 17beta-Estradiol inhibition of PPAR γ -induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(2):230-238.
- [9] Li J, Zhang N, Huang X, et al. Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBP α promoter methylation. Cell Death Dis, 2013(4):e832.
- [10] Elbaz A, Wu X, Rivas D, et al. Inhibition of fatty acid biosynthesis prevents adipocyte lipotoxicity on human osteoblasts in vitro. J Cell Mol Med, 2010, 14(4):982-991.

(收稿日期: 2014-02-06)