

· 论 著 ·

质子磁共振波谱测定大鼠椎体脂肪含量的可行性研究

诸静其 华婷 徐子军 唐睿 汤光宇*

同济大学附属第十人民医院放射科, 上海 200072

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 10-1373-05

摘要: 目的 探讨临床商用 3.0 T 磁共振扫描仪对大鼠椎体行质子磁共振波谱 (proton magnetic resonance spectroscopy, ^1H -MRS) 检查评估骨髓脂肪含量的可行性。方法 15 只 3 月龄正常雌性 SD 大鼠以及 5 只骨质疏松模型 SD 大鼠 (去卵巢法) 行多体素点分辨波谱法检查测定腰 5 椎体脂肪分数 (fat fraction, FF), 分析两名放射科医师测量正常大鼠腰 5 椎体 FF 值的一致性, 并观察正常和骨质疏松模型大鼠的波谱以及病理特点。结果 两名放射科医师测得的正常大鼠腰 5 椎体 FF 值分别为 $(10.92 \pm 3.31)\%$ 、 $(11.10 \pm 3.20)\%$, 组内相关系数为 0.954。 ^1H -MRS 显示水峰明显高于饱和脂肪酸主峰 (长链亚甲基质子), 而不饱和脂肪酸峰烯质子和亚甲基质子 (与烯基质子相连) 未见明确显示, HE 染色显示骨髓内脂肪细胞少见, 散在分布, 体积较小; 骨质疏松模型大鼠腰 5 椎体的 FF 值为 $(20.13 \pm 4.20)\%$, ^1H -MRS 显示水峰明显高于饱和脂肪酸主峰 (长链亚甲基质子), 但饱和脂肪酸主峰有所升高, 不饱和脂肪酸峰烯质子和亚甲基质子 (与烯基质子相连) 明确显示, 信号振幅较小, HE 染色显示骨髓内脂肪细胞增多, 弥漫分布, 体积增大。结论 临床商用 3.0 T 磁共振扫描仪行 ^1H -MRS 检查测定 FF 值评估大鼠椎体骨髓脂肪含量具备可行性。

关键词: 骨髓; 质子磁共振波谱; 脂肪分数; 骨质疏松; 脂肪酸; 大鼠

The feasibility study of measuring the fat content in vertebral body by proton magnetic resonance spectroscopy in rats

ZHU Jingqi, HUA Ting, XU Zijun, TANG Rui, TANG Guangyu*

Department of Radiology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China

* Corresponding author; TANG Guangyu, Email: tgy17@126.com

Abstract: **Objective** To study the feasibility of proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) performed by clinical 3.0 T magnetic resonance imaging (MRI) scanner to measure the fat content in vertebral body of rats. **Methods** Fifteen healthy female Sprague-Dawley rats aged 3 months and 5 osteoporosis (OP) rats after bilateral ovariectomy underwent multivoxel point-resolved spectroscopy to measure the fat fraction (FF) in vertebral body of lumbar 5 (L5). The consistency of the FF values of L5 vertebral bodies in healthy rats measured by two radiologists was analysed, and the features of ^1H -MRS and pathology of the healthy and OP vertebral bodies were observed. **Results** The FF values of L5 vertebral bodies in the healthy rats measured by two radiologists were $10.92\% \pm 3.31\%$ and $11.10\% \pm 3.20\%$, respectively, and the intra-class correlation coefficient was 0.954. In the bone marrow of the healthy group, ^1H -MRS showed that water peak was significantly higher than the dominant peak of saturated lipid (bulk methylene protons). But the peaks of unsaturated lipids (olefinic protons and methylene protons) were not obvious. HE staining showed that adipocytes were rare, scattered, and small. The FF value of L5 vertebral bodies in the OP rats was $20.13\% \pm 4.20\%$. In the bone marrow of the OP group, ^1H -MRS showed that water peak was also significantly higher than the dominant peak of saturated lipid, but the latter was increased. The peaks of unsaturated lipids (olefinic protons and methylene protons) were obvious, but their amplitudes were weak, and HE staining showed that adipocytes were increased, diffuse, and large. **Conclusion** The measurement of FF using ^1H -MRS performed by clinical 3.0 T MRI scanner is a feasible way to monitor the fat content of rat vertebral body.

Key words: bone marrow; proton magnetic resonance spectroscopy; fat fraction; osteoporosis; fatty acid; rat

基金项目: 国家自然科学基金 (81871325); 上海市卫生和计划生育委员会面上项目 (201640092); 上海申康医院发展中心项目 (SHDC22015026, 16CR4029A); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (22120180380); 上海市科委医学引导类 (中、西医) 科技支撑项目 (19411965300)

* 通信作者: 汤光宇, Email: tgy17@126.com

骨髓微环境主要由骨髓基质、微血管、成骨细胞、破骨细胞、脂肪细胞、造血细胞及相关细胞因子等组成,骨髓中脂肪细胞的变化与年龄的增长、退行性骨病以及血液疾病等关系密切^[1-4]。因此,定量检测骨髓中脂肪含量对于评估骨骼生理和病理动态变化以及疗效随访具有重要临床价值。

质子磁共振波谱 (proton magnetic resonance spectroscopy, ¹H-MRS) 是日前被广泛接受的无创量化骨髓脂肪酸的影像学检查方法,人类和动物骨髓包括红骨髓和黄骨髓,骨髓 ¹H-MRS 谱线中水峰峰值信号强度主要来源于红骨髓,而脂峰峰值信号强度主要来源于黄骨髓,这是骨髓 ¹H-MRS 的成像基础。通过文献检索发现,国内外活体骨髓 ¹H-MRS 的研究主要用于人类及大中型动物^[5-6],尚未见该技术用于测定小型动物(如大鼠、小鼠)骨髓脂肪含量的研究报道。

本研究的目的旨在探讨利用临床商用 3.0 T 磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 扫描仪对大鼠椎体进行骨髓 ¹H-MRS 扫描的可行性,为小鼠疾病模型骨髓脂肪研究提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

随机选取健康清洁级 3 月龄雌性 SD 大鼠 20 只,未曾交配,体质量为 250~290 g,由同济大学实验动物科学部提供,所有动物购入后分笼饲养(≤5 只/笼)于同济大学附属第十人民医院动物房(室温为 20℃~25℃,湿度 60%~80%,环境清洁,通风良好,12 h 光和 12 h 黑暗交替),自由饮食,适应性饲养 1 周后 15 只大鼠进行影像学及病理学检查,另 5 只大鼠经腹腔注射 4% 水合氯醛(剂量:10 mL/kg)麻醉后行双侧卵巢切除术制作骨质疏松模型(尸解发现子宫萎缩、变细判为模型制作成功),术后 9 周进行影像学及病理学检查,手术完毕后所有大鼠送回动物房自由饮食。本实验获得同济大学附属第十人民医院动物伦理委员会批准,并依据 2006 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》对动物进行实验处理。

1.2 腰椎 ¹H-MRI 检查

1.2.1 扫描设备及线圈:采用德国进口西门子 3.0 T MRI 扫描仪 (Magnetom Verio),梯度场强 40 mT/m,磁场切换率 200 mT/ms,16 通道。小动物线圈采用上海晨光医疗科技股份有限公司生产的配套大鼠线圈(型号:CG-MUC18-H300-AS,4 通道,孔径 5

cm)。

1.2.2 扫描方法:MRI 检查前,4%水合氯醛(剂量:10 mL/kg)经腹腔注射麻醉大鼠,将大鼠俯卧位放入线圈,注意线圈应包裹整个腰部,腰 5 椎体位于表面线圈中心,先行腰椎轴位、冠状位、矢状位 TSE 序列 T2 加权成像(T2-weighted imaging, T2WI)常规扫描用于 ¹H-MRS 检查感兴趣区(region of interest, ROI)的定位,具体扫描参数:TR 2 500 ms,TE 74 ms,视野(FOV)80 mm×80 mm,层厚 1.2 mm,矩阵 256×256,扫描层数 11 层,扫描时间为 114 s。

常规 MRI 扫描结束后采用多体素点分辨波谱法(point-resolved spectroscopy, PRESS)进行信号采集,ROI 根据常规扫描的 T2WI 图像定位,大小为 30 mm×30 mm×30 mm,一小格体素块大小为 2.5 mm×2.5 mm×5 mm,放置于腰 5 椎体松质骨,避开皮质骨和基底血管,同时通过手动方法在 ROI 周围放置上下、前后、左右共 6 个方向的饱和带以消除 ROI 以外的信号对波谱扫描的干扰,饱和带宽度为 55 mm。波谱采集前采用机器自动预扫描程序完成匀场,但不进行水抑制,然后进行不抑水的 ¹H-MRS 扫描,具体扫描参数:TR 750 ms,TE 145 ms,均数 12,扫描时间 284 s。

1.2.3 腰椎 ¹H-MRS 后处理:将 ¹H-MRS 采集的原始数据导入后处理工作站,所有图像均由两名具有 10 年以上骨关节疾病诊断经验的放射科医师采用双盲法阅片及后处理分析。根据腰 5 椎体轴位、冠状位、矢状位的 T2WI 选取位于椎体骨松质区域的小格体素块,应用机器自带的 (Syngo MR, version B17_43.1_1.0) 软件,通过对图像滤过重建、实数充填、相位调整、基线校正及化学位移确定完成波谱分析,得到骨髓水、脂 ¹H-MRS 谱线,水峰位于 4.65 ppm (ppm 为共振频率,即主磁场共振频率的百万分之几)左右,脂肪酸主峰—长链亚甲基质子 [bulk methylene protons, -(CH₂)_n-] 位于 1.30 ppm 左右,代表饱和脂肪酸(不含双键),计算脂肪分数 (fat fraction, FF),即脂肪酸主峰相对信号强度振幅与总信号振幅(水和脂肪)的百分比,公式为 $FF = \frac{I_{fat}}{I_{fat} + I_{wat}} \times 100\%$,其中 I_{fat} 、 I_{wat} 分别为脂肪酸主峰和水峰的峰值,同时观察不饱和脂肪酸峰(含双键)的显示情况,包括烯质质子 (olefinic protons, -CH=CH-),位于 5.3 ppm 左右以及亚甲基质子(与烯质质子相连) (methylene protons, -CH=CHCH₂-),位于 2.06 ppm 左右^[7]。

如基线明显不稳或者水、脂峰出现切迹、反向倒置、过宽以及无法辨认则认为不合格,需重新进行¹H-MRS 扫描直至达到合格标准。每个腰 5 椎体的 FF 值均测量两次,取平均值。

1.3 腰椎病理检查

¹H-MRS 检查结束后 24 h 内腹腔注射过量 4% 水合氯醛(剂量:20 mL/kg)处死,取出腰 5 后取椎体中部骨质放入 10% 甲醛固定 24 h,将固定后的骨组织放入 4% EDTA 脱钙 2 周后常规脱水、石蜡包埋、切片,每个石蜡标本制成 4 μm 厚切片,进行苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,光镜下大致观察脂肪细胞的数量和分布。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件包进行数据统计、分析,正常和骨质疏松模型大鼠腰 5 椎体 FF 值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计算两名放射科医师测量正常大鼠腰 5 椎体 FF 值的 95% 置信区间(confidence interval, CI),两名放射科医师测量的 FF 值的一致性采用组内相关系数(intraclass correlation coefficient, ICC)评价,0.01~0.20 为一致性弱,0.21~0.40 为轻度一致,0.41~0.60 为中度一致,0.61~0.80 为一致性较好,0.81~0.99 为几乎一致,1.00 为完全一致。

2 结果

2.1 腰 5 椎体¹H-MRS 分析

15 只正常大鼠腰 5 椎体¹H-MRS 显示水峰明显高于饱和脂肪酸主峰(长链亚甲基质子),而不饱和脂肪酸峰烯烃质子和亚甲基质子(与烯烃质子相连)未见明确显示(见图 1)。两名放射科医师测得的腰 5 椎体 FF 值分别为(10.92±3.31)%、(11.10±3.20)%,95% CI 分别为(9.09~12.76)%、(9.33~12.87)%,ICC 值为 0.954,说明测量骨髓 FF 值结果几乎一致。

5 只骨质疏松大鼠模型术后 9 周腰 5 椎体¹H-MRS 显示水峰明显高于饱和脂肪酸主峰(长链亚甲基质子),但饱和脂肪酸主峰有所升高,腰 5 椎体的 FF 值为(20.13±4.20)%,而且不饱和脂肪酸峰烯烃质子和亚甲基质子(与烯烃质子相连)明确显示,信号振幅较小(见图 2)。

2.2 腰 5 椎体病理观察

15 只正常大鼠腰 5 椎体 HE 染色显示骨髓内脂肪细胞少见,散在分布,体积较小(见图 3)。

5 只骨质疏松大鼠模型术后腰 5 椎体 HE 染色

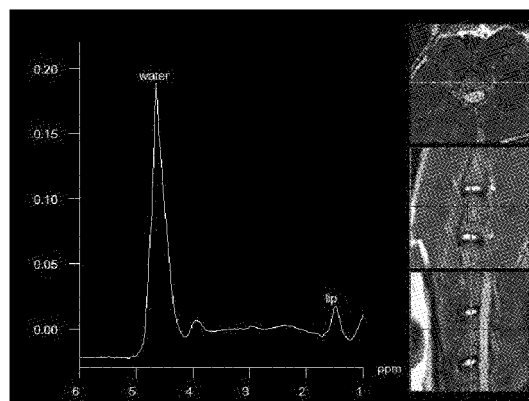


图 1 正常 3 月龄雌性大鼠腰 5 椎体¹H-MRS,水峰(4.65 ppm)明显高于饱和脂肪酸主峰(长链亚甲基质子,1.30 ppm),而不饱和脂肪酸峰烯烃质子(5.3 ppm)和亚甲基质子(与烯烃质子相连)(2.06 ppm)未见明确显示

Fig.1 In a healthy rat aged 3 months, ¹H-MRS of the L5 vertebral body showed that water peak (4.65 ppm) was significantly higher than the dominant peak of saturated lipid (bulk methylene protons, 1.30 ppm), but the peaks of unsaturated lipids [olefinic protons (5.3 ppm) and methylene protons (2.06 ppm)] were not obvious.

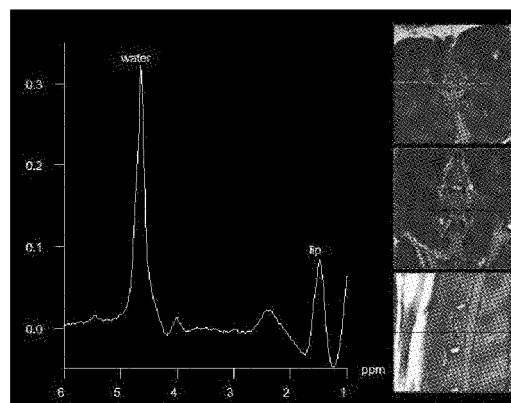


图 2 骨质疏松雌性大鼠腰 5 椎体¹H-MRS,水峰(4.65 ppm)明显高于饱和脂肪酸主峰(长链亚甲基质子,1.30 ppm),但饱和脂肪酸主峰有所升高,不饱和脂肪酸峰烯烃质子(5.3 ppm)和亚甲基质子(与烯烃质子相连)(2.06 ppm)明确显示,信号振幅较小

Fig.2 In an OP rat, ¹H-MRS of the L5 vertebral body showed that water peak (4.65 ppm) was also significantly higher than the dominant peak of saturated lipid (bulk methylene protons, 1.30 ppm), but the latter was increased, and the peaks of unsaturated lipids [olefinic protons (5.3 ppm) and methylene protons (2.06 ppm)] were obvious, but the amplitudes were weak.

显示骨髓内脂肪细胞增多,弥漫分布,体积增大(见图 4)。

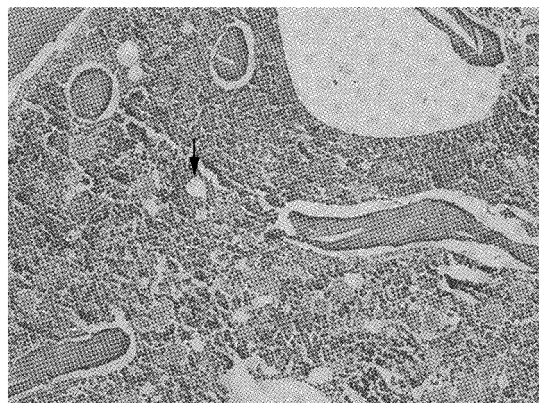


图 3 正常 3 月龄雌性大鼠腰 5 椎体 HE 染色显示骨髓内脂肪细胞(箭)少见,散在分布,体积较小($\times 200$)

Fig.3 In a healthy rat aged 3 months, HE staining of the L5 vertebral body showed that adipocytes (arrow) were rare, scattered, and small ($\times 200$).

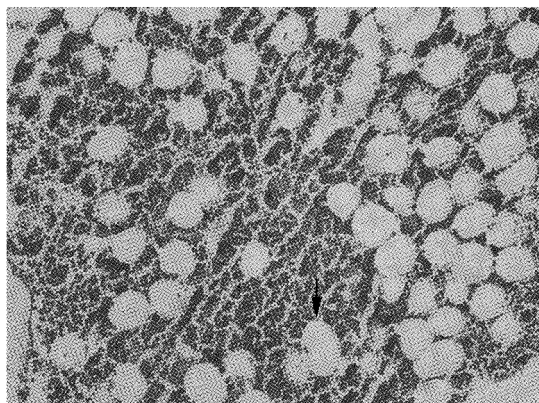


图 4 骨质疏松雌性大鼠腰 5 椎体 HE 染色显示骨髓内脂肪细胞(箭)增多,弥漫分布,体积增大($\times 200$)

Fig.4 In a OP rat, HE staining of the L5 vertebral body showed that adipocytes (arrow) were increased, diffuse, and large ($\times 200$).

3 讨论

大鼠体型较小,购买、饲养成本低,对各种造模方法耐受性较好,是比较理想的用于制作各种骨髓疾病模型的小动物。正常大鼠 3 个月时性腺和内分泌系统发育成熟,肌肉、骨骼基本成型,骨代谢活跃,3~6 个月时骨骼增长缓慢,6~12 个月时骨密度变化最小。因此,理论上 3~6 个月龄大鼠骨髓对各种造模方法最敏感,虽然文献报道大鼠骨皮质缺乏

Haversian 系统且重建率低^[8],但这不会对骨松质中骨髓研究产生影响。

骨髓按其是否具有造血功能分为红骨髓和黄骨髓,人体红骨髓中脂肪组织:水:蛋白质约为 4:4:2,而黄骨髓中脂肪组织:水:蛋白质约为 8:1.5:0.5,骨髓脂肪酸包括饱和脂肪酸(29%~33%)、单不饱和脂肪酸(48%~58%)以及多不饱和脂肪酸(9%~20%)^[9]。随着年龄的增长,红骨髓逐渐被黄骨髓取代,红/黄骨髓比例呈下降趋势,导致骨髓内脂肪组织含量逐渐增加,尤其对于老年人群中绝经后妇女,这种趋势更加明显,常常伴随骨质疏松^[9-10]。随着研究的进一步深入,学者们还发现不同的脂肪酸成分对骨骼代谢发挥着抗炎和毒性两种截然不同的作用^[11-12]。大鼠属于哺乳动物,骨髓脂肪变化特点与人类相似,能很好地模拟人类骨代谢特征。因此,骨髓脂肪酸是评价骨髓疾病非常重要的生物学标志物,临床及动物研究急需影像学检查手段解决活体无创评估骨髓脂肪含量以监测骨髓疾病的发生、发展以及疗效的问题。¹H-MRS 是一种无创性研究活体器官组织代谢、生化变化及化合物定量分析的一项技术,常用的包括 PRESS 和激励回波探测法(stimulated-echo acquisition method, STEAM),PRESS 信噪比较高,对运动不太敏感,易于发现长 T₂ 的代谢物,而 STEAM 信噪比较低,对运动较敏感,易于发现短 T₂ 的代谢物。¹H-MRS 的空间定位技术分为单体素和多体素技术,以前者应用最多。日前¹H-MRS 被广泛接受用于量化骨髓脂肪酸,可以通过测定活体骨髓中水、脂两峰的高度、峰底宽度以及半峰值的宽度等参数对脂肪酸进行半定量分析,常用的指标包括 FF、脂水峰比(lipid water ratio, LWR)以及脂水峰线宽(line width, LW),其中以 FF 最常用^[5-7,13]。

目前国内外利用单体素¹H-MRS 活体测定人类以及大中型动物骨髓脂肪含量的文献较多,但尚未见利用临床商用 MRI 仪对大鼠骨髓进行¹H-MRS 研究的报道,主要原因是大鼠骨骼较小,无法采用单体素¹H-MRS 检查^[14]。通过本研究发现,利用 Siemens 3.0 T MRI 仪对大鼠进行¹H-MRS 检查有一定的要求,即体重与骨骼的选择,主要原因是所选骨骼的大小、形状需满足多体素 PRESS 扫描技术对最小体素块(2.5 mm $\times$ 2.5 mm $\times$ 5 mm)的要求,经过多次摸索,本研究最终确定选用体重不低于 250 g 的 3 月龄雌性 SD 大鼠的腰 5 椎体作为¹H-MRS 扫描对象,不仅所选大鼠月龄与最早的最佳造模时间(3~6 个

月)吻合,以此时间点为基线有助于更加全面观察各种模型骨髓脂肪酸含量时序变化规律,而且所选椎体刚好满足多体素 PRESS 最小体素块对骨骼大小、形状的要求,同时选用 5 cm 孔径的大鼠专用线圈确保采集图像的质量。本研究测得的正常 3 月龄雌性大鼠腰 5 椎体的 FF 值较低,而骨质疏松大鼠模型腰 5 椎体的 FF 值明显增高,且与相应病理观察相符,初步说明了多体素 PRESS 技术测定大鼠椎体 FF 值的可行性,同时也为今后相关研究提供 FF 值参考。而且大鼠全身骨骼仅腰 5、腰 6 椎体符合多体素波谱分析对形状、大小的苛刻要求,但符合条件的体素块在椎体内移动的空间非常有限,因此测得的 FF 值非常稳定,重复性理想,所获取的¹H-MRS 图像基线较平稳,水峰与饱和脂肪酸主峰清晰可辨,形态正常,同时还能清晰显示不饱和脂肪酸峰的变化,对今后进行各种动物模型骨髓不同脂肪酸成分的¹H-MRS 分析提供了坚实的技术支持。

本研究的主要不足是大鼠数量较少以及未将雄性大鼠纳入研究,统计结果可能受上述因素影响。另外,本研究仅观察 5 只骨质疏松模型大鼠的椎体¹H-MRS 的波谱特点,目的是与正常大鼠作大致比较,今后有待大样本研究。

总之,本研究显示,临床商用 3.0 T MRI 扫描仪行¹H-MRS 检查测定 FF 值评估大鼠椎体脂肪含量具备可行性,将为今后开展大鼠骨髓脂肪研究提供可靠的无创影像学检测手段。

【参 考 文 献】

- [1] Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, et al. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways[J]. Aging Cell, 2004, 3(6): 379-389.
- [2] Gimble JM, Nuttall ME. The relationship between adipose tissue and bone metabolism[J]. Clin Biochem, 2012, 45(12): 874-879.
- [3] Bermeo S, Gunaratnam K, Duque G. Fat and bone interactions [J]. Curr Osteoporos Rep, 2014, 12(2): 235-242.
- [4] Scheller EL, Rosen CJ. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health[J]. Ann N Y Acad Sci, 2014, 1311: 14-30.
- [5] Griffith JF, Yeung DK, Antonio GE, et al. Vertebral marrow fat content and diffusion and perfusion indexes in women with varying bone density: MR evaluation[J]. Radiology, 2006, 241(3): 831-838.
- [6] Qiu Y, Yao J, Wu X, et al. Longitudinal assessment of oxytocin efficacy on bone and bone marrow fat masses in a rabbit osteoporosis model through 3.0 T magnetic resonance spectroscopy and micro-CT[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(3): 1081-1092.
- [7] Yeung DK, Griffith JF, Antonio GE, et al. Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study[J]. J Magn Reson Imaging, 2005, 22(2): 279-285.
- [8] Castañeda S, Calvo E, Largo R, et al. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits[J]. J Bone Miner Metab, 2008, 26(1): 53-59.
- [9] Fazeli PK, Horowitz MC, MacDougald OA, et al. Marrow fat and bone-new perspectives[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(3): 935-945.
- [10] Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, et al. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009, 19(2): 109-124.
- [11] Li X, Shet K, Xu K, et al. Unsaturation level decreased in bone marrow fat of postmenopausal women with low bone density using high resolution magic angle spinning (HRMAS) ¹H-NMR spectroscopy[J]. Bone, 2017, 105: 87-92.
- [12] Miranda M, Pino AM, Fuenzalida K, et al. Characterization of fatty acid composition in bone marrow fluid from postmenopausal women: modification after hip fracture[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(10): 2370-2376.
- [13] Li GW, Tang GY, Liu Y, et al. MR spectroscopy and micro-CT in evaluation of osteoporosis model in rabbits: comparison with histopathology[J]. Eur Radiol, 2012, 22(4): 923-929.
- [14] Griffith JF, Wang YX, Zhou H, et al. Reduced bone perfusion in osteoporosis: likely causes in an ovariectomy rat model[J]. Radiology, 2010, 254(3): 739-746.

(收稿日期: 2018-11-20;修回日期: 2019-03-03)