

磁共振波谱技术无损伤定量测定新西兰兔骨骼肌组织中谷氨酰胺含量

樊跃平¹, 于健春¹, 张帆¹, 何桂珍¹, 冯逢², 李小圳², 金征宇²

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 ¹基本外科 ²放射科, 北京 100730

通信作者: 于健春 电话: 010-65296014, 电子邮件: yu-jch@vip.sohu.com

摘要: **目的** 探讨应用磁共振波谱 (MRS) 技术无损伤测定新西兰兔骨骼肌组织中谷氨酰胺 (GLN) 含量的可行性。**方法** 选择新西兰兔 22 只进行 MRS 数据收集, 得到 3.8 ppm 处 GLN + 谷氨酸 (GLx) 与 3.0 ppm 处肌酸 (Cr) 峰高及峰下面积比值。以高压液相色谱法 (HPLC) 测定相应部位活检肌肉组织内 GLx 实际含量, 检验 MRS 的可行性。**结果** MRS 测定新西兰兔肌肉 GLx 与 Cr 峰高比值平均为 0.162 ± 0.045 , GLx 与 Cr 峰下面积比值平均为 0.092 ± 0.065 。HPLC 测定相应部位活检肌肉组织中实际 GLx 含量平均为 $(4.19 \pm 2.50) \mu\text{mol/g}$, 与血 Cr 水平比值平均为 4.576 ± 0.599 。MRS 测定的 GLx/Cr 峰高比值和 GLx/Cr 峰下面积比值分别与 HPLC 测定的肌肉组织中 GLx 含量/血 Cr 比值显著相关 ($r=0.7, P=0.001$; $r=0.6, P=0.001$)。**结论** MRS 技术可用于无损伤测定兔骨骼肌组织中 GLN 含量。

关键词: 谷氨酰胺; 磁共振波谱; 高压液相色谱; 骨骼肌

中图分类号: R319 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)05-0622-04

Measurement of Glutamine Concentration in Zelanian Rabbits' Skeletal Muscle by Non-invasive Magnetic Resonance Spectroscopy

FAN Yue-ping¹, YU Jian-chun¹, ZHANG Fan¹, HE Gui-zhen¹,
FENG Feng², LI Xiao-zhen², JIN Zheng-yu²

¹Department of General Surgery, ²Department of Radiology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: YU Jian-chun Tel: 010-65296014, E-mail: yu-jch@vip.sohu.com

ABSTRACT: Objective To study the feasibility of non-invasive magnetic resonance spectroscopy (MRS) in measuring glutamine (GLN) level in Zelanian rabbits' skeletal muscle. **Methods** Non-invasive MRS was used to get the data of peak height ratio of GLN + glutamic acid (GLx) at 3.8 ppm and creatine (Cr) at 3.0 ppm, peak area ratio of GLx at 3.8 ppm and Cr at 3.0 ppm. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to examine the actual GLx levels of muscle from 22 Zelanian rabbits. The feasibility of MRS was then evaluated by HPLC method. **Results** The ratio of peak height and peak area of GLx and Cr by means of MRS were 0.162 ± 0.045 and 0.092 ± 0.065 , respectively. The average concentration of GLx in skeletal muscle by means of HPLC was $(4.19 \pm 2.50) \mu\text{mol/g}$. The ratio of GLx and plasma Cr level by means of HPLC was 4.576 ± 0.599 . The ratio of peak height and peak area of GLx and Cr by means of MRS were correlated significantly with the ratio of concentration of GLx in skeletal muscle and plasma Cr by means of HPLC ($r=0.7, P=0.001$; $r=0.6, P=0.001$). **Conclusion** Non-invasive MRS is feasible to measure GLN level in skeletal muscle of rabbit.

Key words: glutamine; magnetic resonance spectroscopy; high performance liquid chromatography; skeletal muscle

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(5): 622-625

谷氨酰胺 (glutamine, GLN) 是组织、细胞中含量最丰富的氨基酸,尤其在骨骼肌和肝脏组织中含量最高。测定骨骼肌组织中 GLN 水平可以对机体的营养状况做出实时评估,具有重要的临床意义。骨骼肌组织 GLN 的测定常需进行肌肉组织活检,是一项有创伤性检查。磁共振波谱 (magnetic resonance spectroscopy, MRS) 技术是一种功能性磁共振成像,不但可以显示机体的组织解剖结构,还可进一步对组织中代谢物质、生理活动情况进行定性、定量分析测定,为无损伤定量分析骨骼肌组织中 GLN 含量提供了一种可能。本研究探讨了应用 MRS 技术测定新西兰兔骨骼肌组织中 GLN 含量的可行性。

材料和方法

实验动物 5~6 月龄新西兰兔 22 只,雌雄各 11 只,体重 2.10~3.75 kg,由北京协和医院实验动物中心提供,均给予普通饲养。

试剂和仪器 邻苯二甲醛、巯基丙酸、甲醇 (色谱纯)、四氢呋喃 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯) 均购自北京化学试剂公司,去离子水购自中国医学科学院基础医学研究所,氨基酸标准品购自美国 sigma 公司。MRS 数据采集应用美国 GE 公司 Signa3.0T 核磁共振机,梯度场强为 40 mT/m,磁场切换率 150 mT/ms。兔骨骼肌扫描采用膝关节正交线圈。高压液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪,型号 LC-900,590 泵,420 荧光检测器,740 数据处理仪均为日本 Jasco 公司产品。色谱柱为 HiQsil C18 250×4.6 mm,5 μm;C18 防卫保护柱 10×4.6 mm,5 μm;过滤膜 (有机相,0.45 μm),过滤器 (0.2 μm) 均购自日本 KYA 公司。

MRS 数据采集 参数设定:TE = 94 ms,TR = 2 000 ms,NEX = 8,采集时间为 4 min。麻醉成功后,将动物置于正交线圈内,PRESS 序列单体素法定位于右侧后肢膝关节上 1 cm 处肌肉组织,体素大小约 1 cm×1 cm×1 cm。测定 GLN + 谷氨酸 (Glutamic Acid, GLU) (GLx) 与 Cr 峰高比值及峰下面积比值。

HPLC 测定 MRS 数据采集后,取动物右侧后肢膝关节上 1 cm 处肌肉组织活检,快速电子天平称重并记录 (重量范围为 30~50 mg);加入 0.5 ml 乙腈,匀浆处理后 15 000 r/min 离心 10 min;取上清液 50 μl,邻苯二甲醛衍生化试剂 50 μl,硼酸缓冲液 (pH8.5) 500 μl,室温下混匀,衍生化反应 10 min

后取 20 μl 进样。流速:1 ml/min;检测波长:λ^{ex} 338 nm,λ^{em} 455 nm^[1,2]。

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件,数据以均数±标准差表示,行 *t* 检验及相关性检验,*P* < 0.05 表示有统计学意义。

结 果

MRS 检测结果 Kolmogorov-Smirnov 检验示 GLx 与 Cr 峰高和 GLx 与 Cr 峰下面积比值的数据均符合正态分布 (*Z* = 0.362, *P* = 0.99; *Z* = 1.079, *P* = 0.19)。22 只新西兰兔骨骼肌组织 GLx 与 Cr 峰高的比值平均为 0.162 ± 0.045;其中,雄性比值平均为 0.157 ± 0.045,雌性为 0.167 ± 0.048,两者相比差异无显著性 (*P* = 0.63)。GLx 与 Cr 峰下面积的比值平均为 0.092 ± 0.065;其中,雄性比值平均为 0.087 ± 0.015,雌性为 0.097 ± 0.024,两者相比差异无显著性 (*P* = 0.24)。

HPLC 检测结果 22 只新西兰兔肌活检组织中 GLx 含量平均为 (4.19 ± 2.50) μmol/g;其中,雄性平均为 (3.44 ± 2.30) μmol/g,雌性为 (4.95 ± 2.60) μmol/g,两者相比差异无显著性 (*P* = 0.17)。GLx 含量与血 Cr 水平比值平均为 4.576 ± 0.599;其中,雄性平均为 4.034 ± 0.869,雌性为 5.118 ± 0.690,两者相比差异无显著性 (*P* = 0.34)。

MRS 与 HPLC 检测结果的相关性 相关性分析结果显示,MRS 测定的 GLx/Cr 峰高比值和 GLx/Cr 峰下面积比值分别与 HPLC 测定的肌肉组织中 GLx 含量/血 Cr 比值显著相关 (*R*² = 0.5, *r* = 0.7, *P* = 0.001; *R*² = 0.4, *r* = 0.6, *P* = 0.001) (图 1, 2)。

讨 论

MRS 是近年发展起来的影像学新技术,能够提供机体组织生理、病理状态下的物质代谢生化信息,为疾病早期诊断提供依据^[3]。已知机体正常的组织代谢物通常处于一种动态平衡状态,当组织功能发生紊乱或在疾病情况下可引起代谢物平衡变化,利用 MRS 可检测到这种变化^[4]。MRS 的临床研究目前尚处于起步阶段,其应用多集中在脑组织和中枢神经系统疾病的诊断方面^[5,6]。MRS 测定机体组织中代谢物质含量有 3 种定量方法:绝对定量、半定量

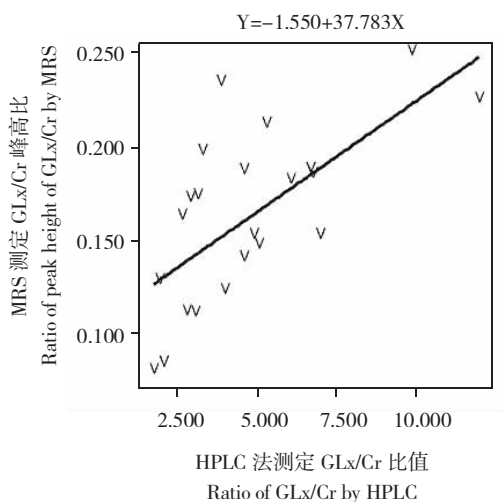


图1 MRS与HPLC两种方法测定GLx与Cr峰高比值结果相关性散点图

Fig 1 Correlate Scatterplot of peak height ratio of GLx/Cr by means MRS and HPLC

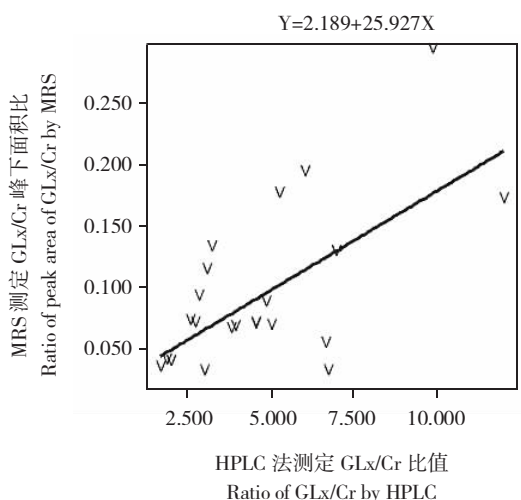


图2 MRS与HPLC两种方法测定GLx与Cr峰下面积比值结果相关性散点图

Fig 2 Correlate Scatterplot of peak area ratio of GLx/Cr by means MRS and HPLC

和相对定量。绝对定量法是将已知含量的化合物作为外标准，内标准多用内生水来计算代谢产物的浓度，用其峰下面积校正代谢产物的峰下面积计算出代谢产物含量的绝对值，该方法可受多种与磁共振设备和生物体本身有关因素的影响，准确绝对定量分析非常困难，故实际应用此法不多。实际工作中常采用相对含量来计算代谢物水平，即某一化合物与另一相对不变的化合物含量之比。本研究即采用相对含量来表示新西兰兔骨骼肌组织中GLN水平，具体为GLN的峰高（面积）与物质浓度水平比较稳

定的Cr峰高（面积）比值。

在MRS数据收集集中，理想情况下，单一共振谱线可以对应某一种代谢物，但实际上很多代谢物的谱线存在重叠，甚至完全重合。本研究中由于尚无法将显示GLN的谱线与GLU的谱线分开，故3.8 ppm处的峰显示为GLN与GLU含量的总和（GLx）。在这些峰值谱线中，由于位于3.0 ppm处的峰值所代表的总肌酸（包括肌酸和磷酸肌酸）含量相对稳定，所以最后得到的GLN含量数据是以GLN、GLU峰高与肌酸的峰高比值来表示的，即相对含量。

本研究采用MRS测定了22只新西兰兔骨骼肌组织GLx与Cr峰高和GLx与Cr峰下面积比值，得到其平均值分别为 0.162 ± 0.045 和 0.092 ± 0.065 ，均近似正态分布。同时采用HPLC技术测定了相应部位骨骼肌活检组织中的GLN及GLU含量（GLx）和血中Cr水平，得到了GLx含量与血Cr的比值平均为 4.576 ± 0.599 。相关回归分析结果显示，MRS测定的GLx/Cr峰高比值和GLx/Cr峰下面积比值分别与HPLC测定的肌肉组织中GLx含量/血Cr比值显著相关，说明通过这两种不同测定方法得到的数据间具有较好的正向直线相关性，其中峰高比值的相关性较峰下面积比值的相关性更好。

用MRS技术测定肌肉组织GLx相对含量与通过HPLC测定的实际肌肉组织内GLx水平具有较好的正向相关性，可在一定程度上表示出肌肉中GLN的含量，从而表明应用无损伤MRS技术测定骨骼肌组织内GLN水平具有一定的可行性，为无创检查机体骨骼肌组织GLN水平，了解机体GLN代谢状态，评估机体营养情况提供了一种可能。然而，虽然这两种测定方法间具有较好的正向相关性，但其确定系数 R^2 最高只有0.5，也就是说，本研究通过MRS无损伤技术测定的数值最多只有50%可以反映骨骼肌组织中实际GLN含量，而峰下面积比值的确定系数 R^2 更低，只有0.4。说明用MRS测定骨骼肌组织GLN虽具有一定可行性，但还存在局限性。此外，MRS测定还存在尚不能将表示GLN与表示GLU的谱线完全分离的缺陷，其3.8 ppm处的峰高、峰下面积代表的是GLN及GLU两者之和，在峰值特异性方面还有待于进一步提高。

参 考 文 献

[1] Terlink T, van Leeuwen PA, Houdijk A. Plasma amino

acids determined by liquid chromatography within 17 minutes
[J] Clin Chem , 1994 , 40(2) 245-249.

- [2] 付桂香,赵世萍,郑旭,等. 反相高压液相色谱法测定血清中部分氨基酸 [J]. 中日友好医院学报, 1998 , 12(2) :127-130.
- [3] 徐凯,钱勇先,林家瑞,等. 快速磁共振波谱成像的研究进展 [J]. 生物医学工程学杂志, 2004 , 21(4) : 681-685.
- [4] 赵海涛,陆军,张卓立,等. 临床磁共振波谱分析定

位技术现状 [J]. 第四军医大学学报, 2003 , 24(15) : 1435-1437.

- [5] 王志康,孙建忠. 1H 磁共振波谱的影响因素 [J]. 实用放射学杂志, 2003 , 19(7) 669-670.
- [6] 李克,于同刚. 磁共振波谱技术在肌骨疾病中的应用 [J]. 中国医学计算机成像杂志, 2003 , 9(5) 332-337.

(2006-11-08 收稿)