

应用 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪进行事件 相关设计嗅觉功能磁共振成像

有 慧¹, 王 剑², 刘剑锋³, 冯 逢¹, 倪道凤², 金征宇¹

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 ¹放射科 ²耳鼻喉科, 北京 100730
³中日友好医院耳鼻喉科, 北京 100029

通信作者: 有 慧 电话: 010-65295471, 电子邮件: youhuimr77@yahoo.com.cn

摘要: **目的** 探讨以改进后的 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪作为嗅觉刺激器, 事件相关设计的嗅觉功能磁共振成像 (fMRI) 分析嗅觉功能的可行性。**方法** 采用改进后适应磁共振环境的 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪作为嗅觉刺激器对 6 名右利手年轻男性志愿者进行嗅觉刺激。采用事件相关设计, 每名受试者完成两段嗅觉刺激任务, 一个是单一醋酸异戊酯刺激, 另一个在醋酸异戊酯刺激前给予香草醛, 采用 fMRI 分析嗅觉皮层的活动。**结果** 两种任务均可激活梨状皮层和次级嗅觉皮层。梨状皮层的激活在两种任务间差异无显著性 ($P > 0.01$)。**结论** 以醋酸异戊酯作为嗅觉刺激剂和改进后的 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪作为嗅觉刺激器, 事件相关设计的嗅觉 fMRI 可以较好地显示初级和次级嗅觉皮层的激活。应用性质相近的另一种气体防止嗅觉注意降低, 并不能更好地显示初级嗅觉皮层的激活。

关键词: 磁共振成像; 嗅觉; 嗅觉皮层; 嗅觉诱发电位仪

中图分类号: R816.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2009)02-0134-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2009.02.004

Olfactory Functional Magnetic Resonance Imaging with Modified OEP-98C Olfactometer and Event-related Design

YOU Hui¹, WANG Jian², LIU Jian-feng³, FENG Feng¹, NI Dao-feng², JIN Zheng-yu¹

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

³Department of Otolaryngology, China Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Corresponding author: YOU Hui Tel: 010-65295471, E-mail: youhuimr77@yahoo.com.cn

ABSTRACT: Objective To explore the feasibility of functional magnetic resonance imaging (fMRI) in analysis of olfaction function with modified OEP-98C olfactometer and event-related design. **Methods** Six young right-handed men underwent olfactory fMRI with event-related design. OEP-98C olfactometer was modified to accommodate MR environment. There were 2 types of tasks in the experiment. In one task, only isoamyl acetate was used as odorant. In the other task, to avoid possible decreased olfactory attention, vanillin was given before each presentation of isoamyl acetate. **Results** In both tasks, uniform activation in piriform cortex and secondary olfactory cortexes was determined. The activation of piriform cortex was not significantly different between the two tasks ($P > 0.01$). **Conclusions** With isoamyl acetate as odorant, modified OEP-98C olfactometer, and event-related design, olfaction fMRI can depict cortex activation at primary and secondary olfactory cortex. Applying other odorant with similar quality to avoid olfactory attention decrease can not promote depiction of activation in primary olfactory cortex.

Key words: magnetic resonance imaging; smell; olfactory cortex; olfactometer

嗅觉是人体原始的感觉功能之一,不仅具有辨别气味、增进食欲、识别环境、报警等作用,还可通过中枢神经系统影响人的情绪,调节生命周期。近 10 余年来,功能磁共振成像 (functional magnetic resonance imaging, fMRI) 发展迅速,已成为研究人脑高级功能的重要手段,极大推动了人们对于嗅觉的理解。但是,由于刺激的呈递和精确控制存在困难、嗅觉皮层的适应等原因,嗅觉 fMRI 有很大难度。本研究将国产 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪进行改进以适应磁共振 (magnetic resonance, MR) 环境,探讨将其作为嗅觉刺激器,应用事件相关设计进行嗅觉 fMRI 的可行性。

对象和方法

对象 8 名右利手男性健康志愿者参与本研究,年龄 24 ~ 30 岁 (平均 25.9 岁)。受试者均为北京协和医院学习的医学生和研究生,嗅觉功能正常,无神经系统疾病病史。所有受试者检查前均签署知情同意书。其中 1 例对气味刺激的正确反应率低于 90%、1 例在研究过程中头动超过设定范围 (平动大于 1.75 mm 和/或转动大于 1°),其结果被舍弃,实际有效试验例数为 6 例。

嗅觉刺激器和嗅素 将国产 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪 (北京为尔福电子公司及北京中科医疗设备有限公司) 进行改进,将其面罩部分所有金属元件用塑料制品替代,以适应 MR 环境。

OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪有 4 个气腔,可容纳 4 种嗅素,本研究应用其中两个。嗅觉诱发电位仪可将嗅素蒸发冷凝后制成室温的饱和气体,每个气腔有 1 个单独的塑料管与其相通,气腔出口及塑料管末端各有一单向阀,以保证含有嗅素的气体单向流动。在试验前从气腔内释放含嗅素的饱和气体使其充满塑料管,试验中只要触动释放气体按钮,单向阀开放,塑料管末端就会有气体释放,从触发至有气体释放的延迟时间约 3 ms,气体释放结束后单向阀立即关闭。OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪气体释放控制简单,气体释放与停止之间切换迅速,切换时间小于 10 ms,而且单向阀开放、关闭无明显声音。

嗅觉诱发电位仪的气体过滤器、喷射器、蒸发

冷凝器、系统控制器放置在操作间,与气腔相连的两根塑料管经磁体间墙壁上的波导孔进入磁体间,末端固定在面罩尖端,面罩是开放式的。塑料管末端距受试者鼻孔 3 ~ 5 cm。试验时,先给予受试者几次嗅觉刺激,根据情况调整塑料管末端的位置及方向,使受试者既能敏感地察觉气味,又无气流感。给予受试者嗅觉刺激时,含有嗅素的饱和气体从塑料管中释放。刺激停止时,由于面罩是开放的,受试者可以自由呼吸室内空气。MRI 扫描仪磁体内风扇开放,加速受试者头部周围空气流动,使释放出的嗅素快速消散。

本研究选择的嗅觉刺激剂是醋酸异戊酯和香草醛 (北京化学试剂公司),均为特异性的嗅觉刺激剂。

试验设计 试验开始前,将面罩固定于受试者面部,腹部放置呼吸监测带,受试者平卧,试验性地给受试者两种嗅素刺激各两次,以确保设备正常工作,同时使受试者相对熟悉这两种气味。要求受试者在试验过程中平稳呼吸,不要有意深吸气。只要受试者察觉有气味,就挤压左手中的挤压球 (只要求受试者判断是否有气味,不要求判断其熟悉程度、是否好闻、气味性质等)。对醋酸异戊酯的正确反应率 90% 以上者入组。试验结束后,记录受试者对两种嗅素性质、强度及差别的评价。

本研究采用事件相关设计。每名受试者完成两段嗅觉刺激任务。在一个任务中,受试者只接受醋酸异戊酯作为嗅觉刺激,每隔约 1 min,根据呼吸监测的显示,在吸气时相中手动触发给予醋酸异戊酯 10 ml,气体释放速度平均 7 ml/s,重复 10 次。在另一个任务中,为了防止重复给一种气味可能造成的嗅觉注意减低,除第 1 次给醋酸异戊酯嗅觉刺激外,在每 1 次刺激前约 15 s 的吸气时相中给予香草醛 10 ml,气体释放速度平均 7 ml/s,重复 10 次。每一受试者的两个任务的扫描顺序在研究前已随机化决定。

数据采集 使用 GE Signa HD 1.5T 磁共振仪进行扫描。试验中,受试者两耳填塞棉球,头部固定,闭目,平静仰卧。使用正交头线圈。成像序列包括结构成像轴位 T1 加权图像 (T1-weighted image, T1WI) [反转恢复 (inversion recovery, IR) 序列,重复时间 (repetition time, TR) 1 800 ms,回波时间 (echo time, TE) 24 ms,反转时间 (inversion time,

TI) 740 ms, 层厚 4 mm, 无间隔, 矩阵 320×256], 三维快速扰相梯度回波序列 (three dimensional-fast spoiled gradient echo, 3D-FSPGR) [TR 7.6 ms, TE 1.6 ms, 翻转角 (flip angle, FA) 20, 层厚 1.6 mm, 矩阵 256×256] 和 fMRI 序列 [单次激发梯度回波-平面回波成像 (gradient echo-echo planar imaging, GRE-EPI) 序列, 正轴位, TR 2 000 ms, TE 25 ms, FA 90, 矩阵 64×64 , 层厚 4 mm, 无间隔, 扫描时间 624 s]。两个 fMRI 序列之间间隔 3D-FSPGR T1WI 序列, 采集时间为 276 s, 以减少两个任务之间的互相影响。

数据处理 使用 AFNI 软件对数据进行分析^[1]。首先对功能像进行预处理, 包括头动校正, 对齐, 去基线漂移, 以半高宽 (full width at half maximum, FWHM) 为 4 mm 对图像进行平滑处理, 把功能像与三维全脑结构像对齐和空间标准化, 图像按照 Talairach 图谱标准进行配准, 然后进行功能定位和空间分布分析。对经过预处理的数据进行去卷积分析, 分别获得每个受试者两种任务中醋酸异戊酯嗅觉刺激引起的激活的统计参数图, 阈值设为 $P < 0.005$ 。用 t 检验进行组分析, 阈值设为 $P < 0.01$, 得到受试者对两种任务中醋酸异戊酯嗅觉刺激引起的激活的统计参数图。使用配对 t 检验比较两种任务中醋酸异戊酯嗅觉刺激产生的激活的差异, 阈值设为 $P < 0.01$ 。

结 果

行为学结果 所有入组受试者对醋酸异戊酯的

正确反应率均为 100%。所有受试者对醋酸异戊酯和香草醛的评价均是好闻气体, 性质相近, 但醋酸异戊酯强度要强于香草醛。

fMRI 结果 组分析显示在单一嗅素刺激任务中, 醋酸异戊酯嗅觉刺激引起的皮层激活区位于双侧梨状皮层、右前眶额回、左内眶额回、双侧岛叶、岛盖、丘脑、扣带回、尾状核、额中下回、小脑 (图 1 A ~ 1C)。激活区广泛分布于初级及次级嗅觉皮层。在两种气味刺激任务中, 醋酸异戊酯嗅觉刺激时皮层激活区位于双侧梨状皮层、双侧杏仁体、左侧海马、右前眶额回、左内眶额回、双侧岛叶、丘脑、扣带回、尾状核、额中下回、小脑 (图 1 D、1E)。激活区广泛分布于初级及次级嗅觉皮层。

在两种任务中, 醋酸异戊酯均引起双侧梨状皮层和眶额回的激活 (表 1)。配对 t 检验显示, 醋酸异戊酯嗅觉刺激激活的左内眶额回、右侧杏仁体、双侧海马、前扣带回部位在两种任务间差异具有显著性 ($P < 0.01$), 而在梨状皮层差异无显著性 ($P > 0.01$) (图 2)。

个体分析显示, 所有入组受试者梨状皮层的激活比较一致, 除 1 名受试者在单一嗅素刺激任务中未见明显左侧梨状皮层激活外, 其余所有受试者在两个任务中均可见双侧梨状皮层明显激活。对双侧眶额回的激活也较一致, 除 1 名受试者在单一嗅素刺激任务中仅见左侧眶额回激活外, 其余所有受试者在所有任务中均见双侧眶额回激活。但各受试者在两种任务中杏仁体、海马、内嗅皮层激活程度不一致。

表 1 两种嗅觉刺激任务中醋酸异戊酯激活的嗅觉皮层

Table 1 Olfactory cortexes activated by isoamyl acetate in two tasks

任务 Task	位置 Brain region	体积 Volume (mm^3)	坐标 Talairach coordinate		
			X	Y	Z
单一嗅素 Single odorant	RA OFL	10	-23.8	-49.1	-13.0
	LM OFL	14	16.1	-41.3	-13.2
	RPC	229	-13.3	6.7	-6.1
	LPC	189	14.7	0.5	-10.3
两种嗅素 Two odorants	RA OFL	18	-24.3	-36.8	-13.9
	LM OFL	20	18.3	-38.9	-13.6
	RPC	73	-14.5	0	-11.0
	LPC	49	10.6	-3.7	-10.7

RA OFL: 右前眶额回; LM OFL: 左内眶额回; RPC: 右梨状皮层; LPC: 左梨状皮层

RA OFL: right anterior orbitofrontal lobe; LM OFL: left medial orbitofrontal lobe; RPC: right piriform cortex; LPC: left piriform cortex

讨 论

目前嗅觉功能成像的主要方法包括正电子发射计算机断层成像 (positron emission tomography, PET) 和 fMRI。PET 的优点是能够较好地观察颞叶和额叶腹侧结构, 不足之处是空间分辨率较低, 基本上只能作组分析, 不适于个体分析。血氧水平依赖 (blood oxygen dependent, BOLD) 对比的 fMRI 在近 10 余年得到快速发展, 极大推动了对嗅觉感觉的了解。但进行嗅觉 fMRI, 仍存在许多困难需克服。

首先是选择纯嗅觉刺激剂, 刺激剂不能对鼻内三叉神经产生化学刺激。醋酸异戊酯^[2-3] 和香草醛^[4-5] 经证实是纯嗅觉刺激剂, 被许多 fMRI 研究采用。

不同的 fMRI 研究采用的嗅觉刺激途径不同, 主要分为鼻前和鼻后途径。后者是将溶有嗅素的溶液经导管滴入口中^[6], 嗅素从溶液释放后, 吞咽时从口腔后方上升经鼻咽至嗅上皮引起嗅觉。受试者需要掌握水平吞咽方法, 以防 fMRI 扫描时产生运动伪影; 另外有研究显示鼻后途径与鼻前途径引起激活的脑区略有不同^[7]。相对于鼻后途径, 鼻前途径更符合生理特点, 但是, 嗅觉刺激时需要严格控制化学刺激剂释放的周期、持续时间和强度, 刺激呈现与结束需快速切换, 嗅觉刺激时不能有视觉、听觉、触觉或温度变化, 嗅觉刺激需与呼吸同步。如此精确的控制嗅觉刺激, 需要有专门的嗅觉刺激器^[8-12]。本研究将国产 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪改进, 以适应 MR 环境, 结果显示 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪能够提供接近自然生理嗅觉过程的嗅觉刺激, 可以满足嗅觉 fMRI 研究的需要。国内目前尚未有专门应用于 fMRI 的嗅觉刺激仪的报道。但是由于 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪放置在前鼻孔前方的呼吸传感器有金属元件, 不能应用于 MR 环境, 而 MR 扫描仪本身的呼吸门控信息又无法接入诱发电位仪, 所以目前在嗅觉诱发电位检查中呼吸与嗅觉刺激的良好同步性 (毫秒级) 在 MR 环境下尚不能实现, 仍需进一步完善。

虽然动物的神经解剖研究证实梨状皮层是初级嗅觉皮层^[9-11], 但目前 fMRI 研究显示嗅觉刺激后并无梨状皮层的激活^[7, 11, 13-14], 这可能与两个因素有关。首先, fMRI 时应用的 EPI 序列易受磁敏感效应的影响, 梨状皮层等初级和次级嗅觉皮层多位于气-

骨-脑组织界面, 这些部位易产生磁敏感效应, 造成 fMRI 图的变形及信号丢失, 不能正确反映局部脑区的激活。其次, 嗅觉皮层在暴露于某种气味数秒钟即会产生明显的嗅觉适应, 尤其是初级嗅觉皮层, 这在动物实验^[15] 和人类 fMRI 研究^[12, 16] 中均得到证实。以往嗅觉 fMRI 研究采用了组块设计^[7, 11, 13-14, 16], 在 30 ~ 60 s 内持续进行嗅觉刺激, 因此在这些研究中嗅觉适应是不可避免的混淆因素。

有研究显示, 缩短 TE 可以降低磁敏感效应所致的信号丢失, 可以更好地显示颞叶区域皮层的激活^[17]。本研究选择了较短的 TE 时间 (25 ms), 同时减小了层厚 (4 mm) 以减小像素体积, 以期提高局部图像质量。

组块设计的特点是以组块的形式呈现刺激, 在每一个组块内同一类型的刺激连续、重复呈现, 可以提高信号强度变化, 探测效率高。相对于以往研究中采用的组块设计, 事件相关设计的一个重要优点是减少了总的刺激时间, 降低了嗅觉适应; 但是 BOLD 信号变化较弱, 而且事件相关设计对嗅觉刺激器的要求更高。本研究应用事件相关设计, 可以较一致显示初级和次级嗅觉皮层的激活。

动物电生理实验^[15] 及人类 fMRI 研究^[12] 均显示多次暴露于同一种气味也可引起适应。为了防止反复给予同样的刺激引起嗅觉注意的降低, 本研究设置了另一种嗅觉刺激任务, 即在嗅觉刺激前给予另一种气味刺激。结果显示, 两种任务的嗅觉刺激均引起初级和次级嗅觉皮层的激活, 包括梨状皮层、眶额回、丘脑、尾状核、岛叶、额下回、扣带回、小脑。配对 *t* 检验显示两种任务对梨状皮层的激活差异无显著性, 而且数值上, 单一嗅素任务中梨状皮层激活的像素数多于两种嗅素任务。表明另一种性质相近气味并不能因提高嗅觉注意而更好地显示初级嗅觉皮层激活。

综上, 以醋酸异戊酯作为嗅觉刺激剂, 用改进后的适应 MR 环境的 OEP-98C 型嗅觉诱发电位仪, 事件相关设计的嗅觉 fMRI, 可以较好地显示初级和次级嗅觉皮层的激活, 满足嗅觉 fMRI 的需要, 可以作为进一步嗅觉 fMRI 研究的基础。

(本文图 1, 2 见插图第 2 页)

参 考 文 献

[1] Cox RW. AFNI: software for analysis and visualization of

- functional magnetic resonance neuroimages [J]. *Comput Biomed Res*, 1996, 29(3):162-173.
- [2] Henkin RI, Levy LM. Functional MRI of congenital hyposmia: brain activation to odors and imagination of odors and tastes [J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2002, 26(1):39-61.
- [3] Henkin RI, Levy LM, Lin CS. Taste and smell phantoms revealed by brain functional MRI (fMRI) [J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2000, 24(1):106-123.
- [4] Smejkal V, Druga R, Tintera J. Olfactory activity in the human brain identified by fMRI [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2003, 104(6):184-188.
- [5] Gottfried JA, Deichmann R, Winston JS, *et al.* Functional heterogeneity in human olfactory cortex: an event-related functional magnetic resonance imaging study [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(24):10819-10828.
- [6] Cerf-Ducastel B, Murphy C. fMRI activation in response to odorants orally delivered in aqueous solutions [J]. *Chem Senses*, 2001, 26(6):625-637.
- [7] Small DM, Gerber JC, Mak YE, *et al.* Differential neural responses evoked by orthonasal versus retronasal odorant perception in humans [J]. *Neuron*, 2005, 47(4):593-605.
- [8] Grabenhorst F, Rolls ET, Margot C, *et al.* How pleasant and unpleasant stimuli combine in different brain regions: odor mixtures [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(49):13532-13540.
- [9] Carmichael ST, Clugnet MC, Price JL. Central olfactory connections in the macaque monkey [J]. *J Comp Neurol*, 1994, 346(3):403-434.
- [10] Vigouroux M, Bertrand B, Farget V, *et al.* A stimulation method using odors suitable for PET and fMRI studies with recording of physiological and behavioral signals [J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 142(1):35-44.
- [11] Yousem DM, Maldjian JA, Siddiqi F, *et al.* Gender effects on odor-stimulated functional magnetic resonance imaging [J]. *Brain Res*, 1999, 818(2):480-487.
- [12] Poellinger A, Thomas R, Lio P, *et al.* Activation and habituation in olfaction-an fMRI study [J]. *Neuroimage*, 2001, 13(4):547-560.
- [13] Yousem DM, Maldjian JA, Hummel T, *et al.* The effect of age on odor-stimulated functional MR imaging [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1999, 20(4):600-608.
- [14] Fulbright RK, Skudlarski P, Lacadie CM, *et al.* Functional MR imaging of regional brain responses to pleasant and unpleasant odors [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1998, 19(9):1721-1726.
- [15] Wilson DA. Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex [J]. *J Neurophysiol*, 1998, 79(3):1425-1440.
- [16] Sobel N, Prabhakaran V, Zhao Z, *et al.* Time course of odorant-induced activation in the human primary olfactory cortex [J]. *J Neurophysiol*, 2000, 83(1):537-551.
- [17] Gorno-Tempini ML, Hutton C, Josephs O, *et al.* Echo time dependence of BOLD contrast and susceptibility artifacts [J]. *Neuroimage*, 2002, 15(1):136-142.

(2008-11-03 收稿)