

小动物高分辨扩散磁共振成像数据分析方法*

林富春 王旭霞 赵前程 雷 皓**

(中国科学院武汉物理与数学研究所, 波谱与原子分子物理国家重点实验室武汉磁共振中心, 武汉 430071)

摘要 扩散磁共振成像(dMRI)是一种非侵入性的、能提供生物体内水分子扩散运动相关信息的成像技术, 可用于检测神经纤维微观结构的变化。dMRI 的出现为大脑结构与功能研究提供了全新的检测手段。过去的 20 年中, dMRI 在实验方法和临床应用上均取得了重大进展。然而 dMRI 应用在基于动物模型的临床前脑成像研究中却并不常见。本文针对 dMRI 在临床前脑成像研究中的应用, 建立了系列针对小动物高分辨 dMRI 数据的分析方法: a. 构建了大鼠高分辨 dMRI 图像模板; b. 实现了适用于小动物研究的基于体素的统计分析(VBA)方法与基于纤维束的空间统计分析(TBSS)方法; c. 实现了小动物脑白质纤维束的确定性与概率性跟踪。这些方法的实现不仅能为小动物脑 dMRI 研究提供统一的图像模板与完善的计算方法, 还将大大促进 dMRI 技术在小动物脑成像研究中的应用。

关键词 小动物, 脑, 扩散磁共振成像, 数据分析, 纤维重建

学科分类号 Q42

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00235

扩散磁共振成像(diffusion magnetic resonance imaging, dMRI)是磁共振成像技术的一项重大进展^[1]。与传统的 MRI 技术相比, dMRI 能够提供脑组织中水分子扩散运动的信息, 从而给出关于细胞完整性和组织微观结构改变的相关信息^[2], 进而间接地反映出脑白质纤维束的物理和功能特性。dMRI 为脑白质研究提供了全新的、非侵入性的活体检测手段, 已成为脑成像研究领域常用的方法之一。

目前, 以扩散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)为代表的 dMRI 技术主要应用于临床研究, 并取得了诸多成果。在 DTI 数据分析方面: 研究人员将基于体素形态学分析方法^[3]的思想用于 DTI 图像并建立了基于体素的全脑分析方法(voxel-based analysis, VBA)^[4]。在一些疾病条件下, 脑白质可能萎缩, 这会在一定程度上影响配图像配准的精度; 此外, VBA 分析中处理的单元是像素, 没有考虑到纤维束本身的空间领域信息。为解决上述问题, 牛津大学的功能影像实验室建立了基于纤维束的空间统计方法(tract-based spatial statistics, TBSS)^[5]。利用 DTI 数据可对神经纤维束进行跟踪与重建^[6]; 利用概率跟踪^[7]或组图分析^[8]的方法, 可获得纤维束空间分布概率信息。再进一步, Mori 研究组建

立了人脑白质模板^[9-10]与神经纤维束的空间分布模板^[11-12], 利用这些模板可以精确地对脑白质结构和纤维束进行定位。这些方法的建立极大地促进了 DTI 技术在临床脑疾病研究中的应用^[13-18]。虽然 DTI 技术在应用研究中已经受到了极大关注, 但仍有一些关键性的技术问题没有得到解决。例如, DTI 技术以及相应的纤维重建算法不能很好地解决单体素内纤维交叉的问题, 因为这些算法是基于水分子的扩散服从高斯分布这一假设, 该假设只是在一束纤维存在的时候成立, 遇到两束交叉的纤维分布时就会失效。针对这种情形, 研究人员提出了高角度分辨率扩散成像方法(high angular resolution diffusion imaging, HARDI), 以期更准确地描述水分子扩散分布的属性函数。但 HARDI 方法也存在扩散加权磁场强度要求太大、扩散梯度方向要求过多、计算量太大和求解方法不稳定等主要缺点。目前

* 国家自然科学基金(30870674, 20921004)和国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB707802)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 027-87198542, E-mail: leihao@wipm.ac.cn

收稿日期: 2012-04-07, 接受日期: 2012-05-17

HARDI 技术在临床上的应用还不广泛。

相对于临床研究而言, dMRI 在基于小动物(大、小鼠)模型的临床前脑成像研究中的应用还不多见。Mori 研究组用 DTI 技术研究了鼠脑发育问题, 发现了鼠脑皮层中层状结构在发育过程中的演变模式^[19-21]; Song 研究组利用 DTI 技术对多发性硬化、脊髓损伤等疾病动物模型进行了研究^[22-24], 发现轴突损伤导致沿神经纤维方向上的水分子扩散速率下降, 而脱髓鞘导致垂直于神经纤维方向上的水分子扩散速率上升; 还有些研究者将 DTI 技术用于髓鞘损伤^[25]、慢性癫痫^[26]、帕金森综合症^[27]等疾病的动物模型研究。这些文献中 DTI 数据处理主要是借助感兴趣区(region of interest, ROI)分析方法。此外, 也有研究者对小动物脑中的神经纤维束进行了跟踪重建, 如 Xue 等^[28]用确定性跟踪算法在活体大鼠脑内实现了脑白质纤维束的三维重建, Harsan 等^[29]用概率跟踪的方法得到了连接边缘系统白质纤维束的连接概率分布图。

本文针对 dMRI 在临床前脑成像研究中的应用, 建立了系列针对小动物高分辨 dMRI 数据的分析方法, 具体包括: a. 构建了大鼠高分辨 dMRI 图像模板; b. 实现了适用于小动物研究的 VBA 方法与 TBSS 方法; c. 实现了小动物神经纤维束的确定性与概率性跟踪方法。这些方法的实现将促进 dMRI 技术在小动物脑成像中的应用。

1 材料与方法

1.1 动物准备与数据采集

本文使用 20 只体重为 220~340 g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠构建高分辨 DTI 图像模板。动物使用以纯氧为载气的 2%异氟烷呼吸麻醉, 成像过程中进行实时呼吸监控。活体 DTI 实验均在配备有直径为 12 cm 梯度线圈的 Biospec 7 T/20 cm 动物磁共振成像仪(Bruker, 德国)上完成。实验采用体线圈激发, 四通道的相控阵表面线圈接收以及二维梯度回波 DTI 成像序列。成像参数为: 重复时间(TR) = 5 000 ms, 回波时间(TE) = 26 ms, 视野(FOV) = 3 cm × 3 cm, 矩阵大小($Matrix$) = 128 × 128, 层厚 = 0.5 mm, 累加次数 = 4, Δ = 14 ms, δ = 3 ms, b = 800 s/mm², 30 个扩散方向。

使用一只体重为 22 g 的 C57 小鼠建立神经纤维重建方法。小鼠按 0.7 ml/100 g 体重的剂量腹腔注射 20%乌拉坦溶液麻醉后, 用 4%多聚甲醛溶液进行心脏灌注。小鼠全脑被完整剥离(包括完整视

神经)后放入直径为 1 cm 的核磁样品管中。经 4%多聚甲醛溶液浸泡 24 h 后进行成像实验。实验仪器为 Bruker 600 MHz 宽腔磁共振微成像系统。采用内径为 1 cm 的体线圈进行射频激发和信号接收。DTI 实验采用三维自旋回波序列, 参数如下: TR = 400 ms, TE = 16.9 ms, FOV = 1 cm × 1 cm × 1.02 cm, $Matrix$ = 128 × 128 × 34, 累加次数 = 2, Δ = 7.3 ms, δ = 3.6 ms, b = 5 000 s/mm², 30 个扩散方向。

所有磁共振数据采集均在中国科学院武汉物理与数学研究所进行, 其实验程序符合湖北省动物伦理委员会的要求。

1.2 高分辨 DTI 图像模板

在实际工作中, 个体水平的研究比较少见, 更多的是组水平上(组间或组内)的研究。这是因为组水平的研究可以克服个体差异, 得到组间(内)的共性, 从而为下一步的统计推断提供重要信息。在组水平的研究中, 一个重要的需求是将个体数据映射到统一空间, 也就是将个体数据配准到同一个模板, 这样不同个体的信息才能进行平均和对比。因此, 图像模板的构建是进行 DTI 数据分析的前提。在本文中, 我们构建大鼠 DTI 参数图像的平均模板。模板构建的步骤是: a. 对 DTI 原始数据进行预处理。我们使用了 FMRIB's Diffusion Toolbox (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/>) 软件包去除由涡流引起的变形和简单的头动。b. 计算矫正后的 DTI 原始数据以获得各种 DTI 参数图像, 如分数各向异性指数(fractional anisotropy, FA)、平均扩散系数(mean diffusivity, MD)、径向扩散系数(axial diffusivity, Da ; 扩散张量的主特征值)与轴向扩散系数(radial diffusivity, Dr ; 扩散张量的次特征值与最小特征值的平均)图像等。c. 将个体 DWI 图像配准至标准空间, 并将获得的配准参数用于 FA 、 MD 、 Da 、 Dr 等 DTI 参数图像的配准。d. 将配准至标准空间的 FA 、 MD 、 Da 、 Dr 等 DTI 参数图像进行平均, 得到相关参数图像模板。在得到相应的图像模板之后, 我们就可以将个体数据配准到该图像模板, 然后利用广义线性模型对数据做组水平的统计分析, 如 VBA 分析等。

1.3 TBSS 分析

在得到 FA 模板之后, 可以对 DTI 数据进行 TBSS 分析: a. 利用非线性配准方法将所有个体 FA 图像配准到上述所构建的 FA 图像模板上; b. 获取平均 FA 图像和纤维骨架图, 并将 FA 图像投射到纤维骨架图上, 将上述配准参数应用于 MD 、

Da 、 Dr 等扩散指标图像; c. 运用随机置换方法比较纤维骨架上每一点的扩散指标, 如 FA 、 MD 、 Da 、 Dr 等扩散指标. 如此就可得到组间(内)白质纤维扩散属性的空间分布信息.

1.4 纤维束重建

利用纤维跟踪算法可从 DTI 数据重建出白质纤维束, 从而提供不同灰质结构之间的解剖连接信息. 这是目前唯一的活体、非侵入式的神经纤维束显像技术. 到目前为止, 基于 DTI 信息的神经纤维束重建可分为两大类: 确定性跟踪和概率性跟踪. 确定性跟踪的大致思路是: 首先, 选取初始种子点, 在满足一定的曲线平滑的约束条件下, 按照大脑每点的脑白质纤维方向进行传播, 当纤维到达灰质区域时, 整个跟踪过程结束. 跟踪过程主要是利用张量场的主扩散方向信息, 该类方法的一个重要假设是认为张量场的主扩散方向就是纤维的传播方向. 概率性跟踪的大致思路是: a. 选取初始种子点, 估计该点的扩散属性函数; b. 从该分布函数中进行取样, 按照采样方向进行传播, 到达下一点后再次估计其扩散属性函数, 再进行取样, 重复该过程, 直到边界终止条件; c. 对初始种子点重复上述过程上千次. 这样就可以得到初始种子点与全

脑其他点的概率连接. 该类方法侧重考察灰质结构之间存在某种纤维连接的可能性, 而并不关心这种纤维连接的走向. 它不能确定初始点与全脑其他点的真实纤维走向, 只能得到存在纤维连接的可能性. 这两类方法最主要的区别是对纤维传播方向的处理上, 确定性跟踪方法是假设纤维方向就是张量场的主方向, 而概率性跟踪方法则是从扩散属性分布函数去采样, 得到其纤维的传播方向, 也就是说纤维传播方向不是确定的, 是与该点的扩散属性分布函数具有很大的关系. 在本文中, 我们利用 DTIstudio 软件包(<https://www.mristudio.org/>)实现了小动物神经纤维的确定性跟踪, 利用 MRtrix 软件包(<http://www.nitrc.org/projects/mrtrix>)实现了小动物神经纤维的概率性跟踪.

2 结 果

2.1 高分辨 DTI 图像模板

图 1 显示单只大鼠高分辨的 DTI 参数图像.

图 2 显示的是 20 例正常大鼠 DTI 数据经配准、平均后得到的高分辨 FA 图像模板. 神经纤维束在此模板中清晰可见.



Fig. 1 DTI parameters for one rat

From left to right: diffusion-weighted image, FA image and FA image weighted by principal direction. Color corresponds to directions of fiber tract. Red: medial-lateral; Blue: anterior-posterior; Green: superior-inferior.

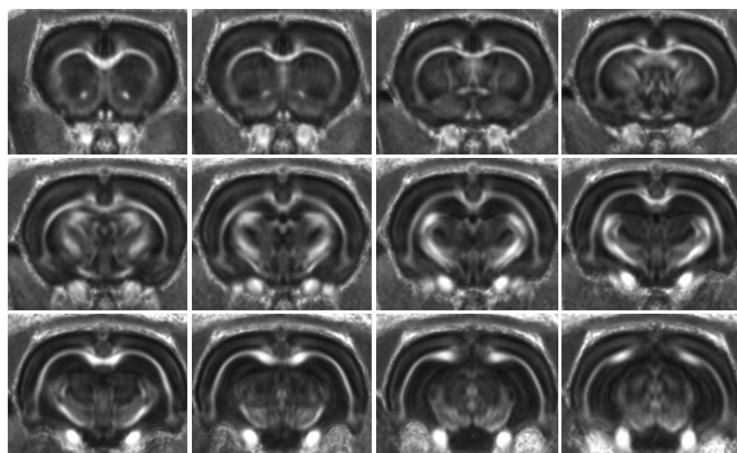


Fig. 2 FA template obtained from twenty rat

The white matter fiber tracts can be seen clearly.

2.2 TBSS 分析

图 3 显示的是基于图 2 中的 FA 图像模板得到的大鼠纤维束骨架的空间分布。

2.3 纤维束重建

图 4 显示利用确定性纤维跟踪方法重建的大鼠脑中主要神经纤维束，包括视束、穹隆、扣带与前

联合等。

利用概率性纤维跟踪方法重建了小鼠的视觉通路(图 5)。跟踪以左侧视神经为种子区域。跟踪结果显示，大部分纤维经过视交叉到达对侧视束，少部分到达同侧视束。DTI 神经纤维跟踪的结果与已知的视觉通路的解剖结构吻合较好。

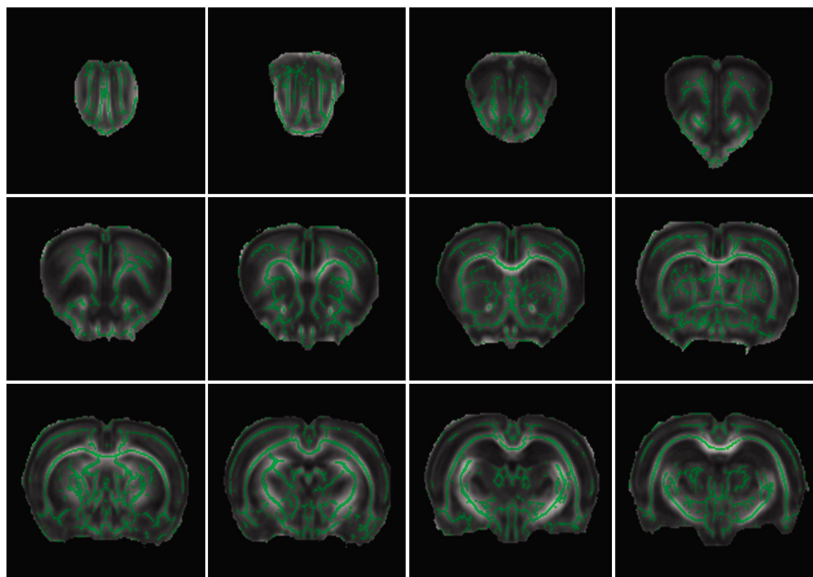


Fig. 3 Distribution of FA skeleton of rat brain white matter fiber tracts
Results are overlaid on the FA template and green corresponds to the mean FA skeleton.

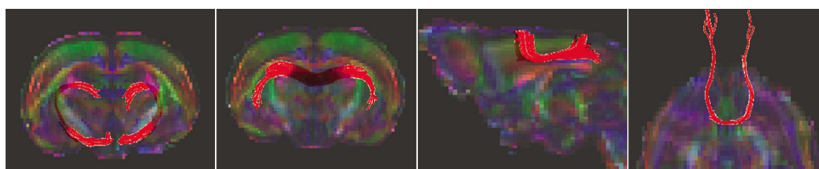


Fig. 4 White matter fiber tracts for rat

From left to right: optic tract, fornix, cingulum and anterior commissure (The overlay image is FA image weighted by principal direction).

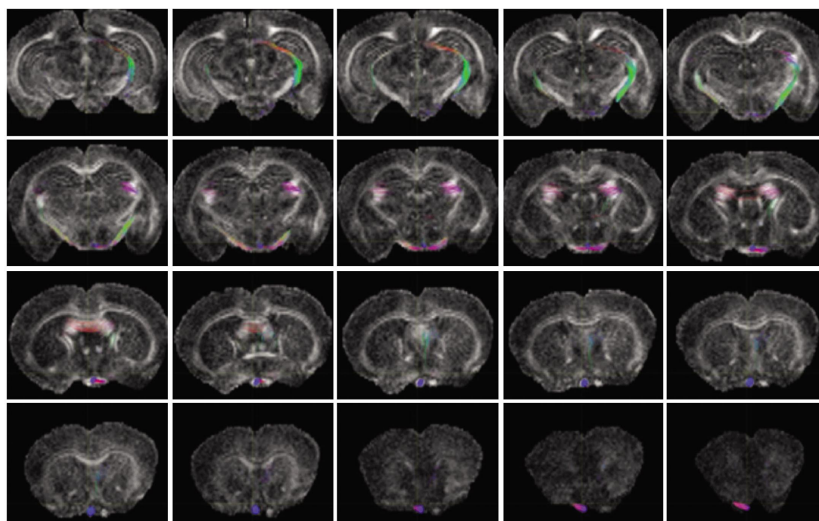


Fig. 5 The reconstruction of the left visual pathway (optic nerve and optic tract) for mouse

The overlay image is FA image. Color corresponds to directions of fiber tract and the meaning can be seen in Figure 1.

3 讨 论

小动物影像学研究是转化医学的重要组成部分。首先,临床研究往往受限于伦理、经济及个体差异等诸多因素,而使用动物模型则可以精确控制许多可能影响实验结果的因素;其次,利用影像学技术进行检测是目前国际上各类临床前动物模型研究、转化型研究和药物筛选研究的一个重要发展趋势。经典的生命科学研究方法(如电生理、组织化学等)一般都是有侵入性的或是有创的,其相关结果很难直接被借鉴或移植到临床实践中。而动物模型的影像学研究则可以架起从经典的有创性研究到临床实际应用之间的桥梁。使用动物模型,我们一方面可将影像学方法得到的结果与利用经典的生物学研究方法得到的“金标准”进行对照;另一方面由于影像学方法的无创性,其研究结果可以直接推广到临床。因此,动物模型的转化型影像学研究正越来越受到研究者的重视。

dMRI 是目前唯一的一种可对脑白质纤维进行活体、非侵入性显像的技术。虽然 dMRI 技术在临床应用和研究中取得了巨大成功。但在小动物脑成像研究中,dMRI 的应用并不像在人脑中那么常见。其中一个重要原因是:目前还没有公认的、标准的适合小动物 dMRI 影像学研究的分析方法。在本文工作中,我们首先构建了高空间分辨率的 dMRI 参数图像模板,并在此基础上建立了相应的基于体素的 dMRI 数据分析方法。我们还实现了小动物脑的白质纤维束的确定性和概率性跟踪。本文工作的意义在于建立了完善的小动物 dMRI 实验方法和数据处理平台。它不仅能为小动物脑的 dMRI 研究提供统一的图像模板与完善的计算方法,还将促进 dMRI 技术在小动物脑成像中的应用。

参 考 文 献

- [1] Basser P J, Mattiello J, LeBihan D. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. *J Magn Reson B*, 1994, **103**(3): 247-254
- [2] Le Bihan D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4**(6): 469-480
- [3] Ashburner J, Friston K. Voxel-based morphometry-The methods. *Neuroimage*, 2000, **11**(6 Pt 1): 805-821
- [4] Jones D K, Symms M R, Cercignani M, *et al.* The effect of filter size on VBM analyses of DT-MRI data. *Neuroimage*, 2005, **26**(2): 546-554
- [5] Smith S M, Jenkinson M, Johansen-Berg H, *et al.* Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage*, 2006, **31**(4): 1487-1505
- [6] Conturo T E, Lori N F, Cull T S, *et al.* Tracking neuronal fiber pathways in the living human brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(18): 10422-10427
- [7] Behrens T E, Woolrich M W, Jenkinson M, *et al.* Characterization and propagation of uncertainty in diffusion-weighted MR imaging. *Magn Reson Med*, 2003, **50**(5): 1077-1088
- [8] Lin F, Yu C, Jiang T, *et al.* Diffusion tensor tractography-based group mapping of the pyramidal tract in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2007, **28**(2): 278-282
- [9] Mori S, Oishi K, Jiang H, *et al.* Stereotaxic white matter atlas based on diffusion tensor imaging in an ICBM template. *Neuroimage*, 2008, **40**(2): 570-582
- [10] Oishi K, Zilles K, Amunts K, *et al.* Human brain white matter atlas: identification and assignment of common anatomical structures in superficial white matter. *Neuroimage*, 2008, **43**(3): 447-457
- [11] Wakana S, Jiang H, Nagae-Poetscher L M, *et al.* Fiber tract-based atlas of human white matter anatomy. *Radiology*, 2004, **230**(1): 77-87
- [12] Hua K, Zhang J, Wakana S, *et al.* Tract probability maps in stereotaxic spaces: analyses of white matter anatomy and tract-specific quantification. *Neuroimage*, 2008, **39**(1): 336-347
- [13] Pérez-Iglesias R, Tordesillas-Gutiérrez D, Barker G J, *et al.* White matter defects in first episode psychosis patients: a voxel-wise analysis of diffusion tensor imaging. *Neuroimage*, 2010, **49**(1): 199-204
- [14] Wessa M, Houenou J, Leboyer M, *et al.* Microstructural white matter changes in euthymic bipolar patients: a whole-brain diffusion tensor imaging study. *Bipolar Disord*, 2009, **11**(5): 504-514
- [15] Govindan R M, Behen M E, Helder E, *et al.* Altered water diffusivity in cortical association tracts in children with early deprivation identified with Tract-Based Spatial Statistics (TBSS). *Cereb Cortex*, 2010, **20**(3): 561-569
- [16] Dineen R A, Vilisaar J, Hlinka J, *et al.* Disconnection as a mechanism for cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Brain*, 2009, **132**(Pt 1): 239-249
- [17] Kubicki M, Westin C F, Maier S E, *et al.* Diffusion tensor imaging and its application to neuropsychiatric disorders. *Harv Rev Psychiatry*, 2002, **10**(6): 324-336
- [18] 花蓓蓓, 张雪林. 磁共振扩散张量成像在中枢神经系统的应用研究进展. *中华神经医学杂志*, 2007, **6**(12): 1286-1289
- [19] Hua Q Q, Zhang X L. *Chin J Neuromedicine*, 2007, **6**(12): 1286-1289
- [20] Mori S, Itoh R, Zhang J, *et al.* Diffusion tensor imaging of the developing mouse brain. *Magn Reson Med*, 2001, **46**(1): 18-23
- [21] Zhang J, Richards L J, Yarowsky P, *et al.* Three-dimensional anatomical characterization of the developing mouse brain by diffusion tensor microimaging. *Neuroimage*, 2003, **20**(3): 1639-1648
- [22] Verma R, Mori S, Shen D, *et al.* Spatiotemporal maturation patterns

- of murine brain quantified by diffusion tensor MRI and deformation-based morphometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(19): 6978–6983
- [22] Sun S W, Liang H F, Trinkaus K, *et al.* Noninvasive detection of cuprizone induced axonal damage and demyelination in the mouse corpus callosum. *Magn Reson Med*, 2006, **55**(2): 302–308
- [23] Kim J H, Loy D N, Liang H F, *et al.* Noninvasive diffusion tensor imaging of evolving white matter pathology in a mouse model of acute spinal cord injury. *Magn Reson Med*, 2007, **58**(2): 253–260
- [24] Budde M D, Kim J H, Liang H F, *et al.* Axonal injury detected by *in vivo* diffusion tensor imaging correlates with neurological disability in a mouse model of multiple sclerosis. *NMR Biomed*, 2008, **21**(6): 589–597
- [25] Bar-Shir A, Duncan I D, Cohen Y. QSI and DTI of excised brains of the myelin-deficient rat. *Neuroimage*, 2009, **48**(1): 109–116
- [26] Chahboune H, Mishra A M, DeSalvo M N, *et al.* DTI abnormalities in anterior corpus callosum of rats with spike-wave epilepsy. *Neuroimage*, 2009, **47**(2): 459–466
- [27] Van Camp N, Blockx I, Verhoye M, *et al.* Diffusion tensor imaging in a rat model of Parkinson's disease after lesioning of the nigrostriatal tract. *NMR Biomed*, 2009, **22**(7): 697–706
- [28] Xue R, van Zijl P C, Crain B J, *et al.* *In vivo* three-dimensional reconstruction of rat brain axonal projections by diffusion tensor imaging. *Magn Reson Med*, 1999, **42**(6): 1123–1127
- [29] Harsan L A, Paul D, Schnell S, *et al.* *In vivo* diffusion tensor magnetic resonance imaging and fiber tracking of the mouse brain. *NMR Biomed*, 2010, **23**(7): 884–896

Templates and Analysis Methods for Small Animal High-resolution Diffusion Magnetic Resonance Imaging*

LIN Fu-Chun, WANG Xu-Xia, ZHAO Qian-Cheng, LEI Hao**

(Wuhan Center for Magnetic Resonance, State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics,
Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

Abstract Diffusion magnetic resonance imaging (dMRI) is a non-invasive imaging technique capable of characterizing the diffusion properties of water molecules *in vivo* and detecting microstructural changes in brain tissue. It provides new tools to investigate the integrity of brain white matter. Although dMRI is widely used in clinical studies, and has become a common method in clinical radiology, it is infrequently used in preclinical brain imaging studies on small animal models. In this paper, we implemented computational methods for small animal dMRI. First, a high-resolution dMRI template for rat was constructed. Secondly, voxel-based analysis and tract-based spatial statistics methods for small animal dMRI were implemented. Last but not least, the deterministic and probabilistic tractography methods for small animal imaging were implemented. The implementation of these methods will facilitate the applications of dMRI in preclinical small animal imaging.

Key words small animal, brain, diffusion magnetic resonance imaging, data analysis, tractography

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00235

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30870674, 20921004) and National Basic Research Program of China (2011CB707802).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87198542, E-mail: leihao@wipm.ac.cn

Received: April 7, 2012 Accepted: May 17, 2012