

用同步辐射 X 荧光测量锰在大鼠嗅球中的分布*

张智勇^{1;1)} 刘年庆^{1;2)} 李福亮¹ 黄宇营¹ 何伟¹ 雷皓² 邹珍友³

1(中国科学院高能物理研究所 北京 100039)

2(中科院武汉物理与数学研究所 武汉 430071)

3(浙江大学物理系 杭州 310027)

摘要 文中试图弥补在核磁共振成像中用二价锰离子(Mn^{2+})作为分子探针时,空间分辨率不够高(约 $100\mu m$),及难以对神经系统反应的准确定量这些不足。采用同步辐射 X 荧光($20\mu m$ 光斑,对 Mn 的探测限约为 $1 \times 10^{-11}g$)测量元素位置分布和 X 荧光分析($4mm$ 光斑)测量元素含量,与多元统计分析方法相结合,分析测量了用 $MnCl_2$ 滴入(锰组, $n=4$)和未用 $MnCl_2$ 滴(对照组, $n=3$)的 SD 大鼠鼻孔后嗅球切片。锰元素在切片上的分布是不均匀的,高低可差 50 倍,并且锰组的 Mn 和 Ca 有非常强的相关性($0.985, p=0.000$)。锰组切片中 Mn, Ca, Zn 和 Br 的含量比对照组高 55%, 82%, 42% 和 72%。

关键词 同步辐射 X 荧光 锰 元素位置分布

1 引言

以二价锰离子(Mn^{2+})为分子探针的核磁共振成像是近年来发展的一种分子影像技术,它可以用来探测钙离子(一种重要的神经传递介质)在中枢神经系统中的输运与传导。这项技术的基本原理是借助了二价锰离子的两个特殊性质:1) Mn^{2+} 在生物学上是钙离子的类似物,可通过电压门控钙离子通道进行传输;2) Mn^{2+} 又是一种核磁 T_1 造影剂,它的存在会使与其相邻的水分子中质子的 T_1 变短,而这种由 Mn^{2+} 引起的水质子 T_1 降低的效应可以通过核磁成像的方法检测到。利用以 Mn^{2+} 为分子探针的磁共振成像方法, Pautler 等研究了外源性 Mn^{2+} 在中枢神经系统中的输运路线以及正常条件下脑嗅觉神经系统的活动状况。他们发现,滴入小鼠鼻孔的 Mn^{2+} 会在嗅觉上皮,嗅球,嗅束,初级嗅觉皮层,脑垂体等部位沉积,从而首次用实验证明了用 Mn^{2+} 增强的核磁共振成像方法研究动物嗅觉功能的可行性^[1]。最近 Pautler 等人利用相同的方法研究了不同气味(小鼠尿液和戊基醋酸)刺激条件下小鼠嗅

觉上皮和嗅球的激活情况^[2]。

利用 Mn^{2+} 增强的核磁共振成像方法研究动物嗅觉功能主要有两个缺点:空间分辨率低和无法对神经系统反应的准确定量。而这些问题正好可以用同步辐射 X 荧光的方法来解决。目前嗅球的核磁共振图像所能达到的空间分辨率一般在 $100\mu m$ 左右,而同步辐射 X 荧光方法的平面内空间分辨率可达 $20\mu m$ 。其次, Mn^{2+} 增强的核磁共振成像是通过检测水质子 T_1 弛豫时间的改变来间接反应神经元细胞内 Mn^{2+} 的沉积,但 T_1 弛豫时间的改变与细胞内 Mn^{2+} 浓度之间的关系,定量非常困难。细胞内 Mn^{2+} 浓度是衡量神经元激活程度的重要参量。如果不能对其定量,就不能准确测量刺激强度与神经元激活程度之间的关系。同步辐射 X 荧光可直接得到扫描点内 Mn^{2+} 的含量,可解决定量的问题^[3,4],弥补核磁共振成像方法的不足。

在本文的实验中,用同步辐射 X 射线荧光和 X 射线荧光分别测量了用 $MnCl_2$ 滴入大鼠鼻粘膜后,锰在嗅球切片中的分布,并用多元统计分析方法分析了对其它元素分布的影响^[5]。

* 国家自然科学基金(10175077)和中国科学院重要方向性项目(KJ9X-N01)资助

1) E-mail: zhangzhy@ihep.ac.cn

2) E-mail: liunq@ihep.ac.cn

2 材料和方法

体重 200g 左右的 SD 雄性大鼠 7 只,用 20% 乌拉坦 (Urethane, 剂量 1g/kg) 溶液腹腔注射进行麻醉. 麻醉后,随机分为两组,锰组 4 只,对照组 3 只. 锰组大鼠用微量加样器向大鼠左右鼻孔各滴入 5 μ l 含有 849 mmol MnCl₂ 的生理盐水溶液. 对照组大鼠左右鼻孔各滴入 5 μ l 生理盐水. 将大鼠放回笼中等待 9—10h 后,麻醉断头取样.

按图 1 位置冷冻切片,每个嗅球切 8 个 100—200 μ m 厚的切片,直接放在聚碳酸酯薄膜上,在空气中晾干. 测量前对样品不再做任何处理.

嗅球切片中的元素分布分别利用同步辐射 X 射线荧光分析和 X 射线荧光分析测定. 同步辐射 X 射线荧光分析在 BSFL 的 4W1BX 荧光站,80—

120mA 的白光由一个 K-B 镜聚焦到 20 μ m,对样品做逐点扫描,扫描的位置见图 3. 在锰组扫描了 70 个点,对照组 49 点. 每收集一个 X 荧光谱约 300s. 用 AXIL 程序解谱. 并用 SPSS/PC 统计软件作统计分析.

X 射线荧光分析的光源是 PW1830/40 型 X 光发生器. 光斑的直径约 4mm. 在每只鼠的嗅球切片的不同位置上测量 8—13 个谱. 取与切片质量相当的国际标样 (NIST1566 a 牛肝) 做标准,牛肝粉末直接放在两片聚碳酸酯薄膜中间. X 射线荧光分析定量主要利用样品对康普顿散射强度与它的质量成正比,根据 Mo 的 K α 线康普顿散射强度定出被辐照样品的质量. 图 2 是 X 射线荧光分析中的已知样品厚度 (单位代表膜的层数) 和康普顿散射强度的关系,他们有非常好的线性关系 $R^2 = 0.9995$. 一层膜的厚度 0.63mg/cm²,在 8 张不同的膜上测量,不均匀性为

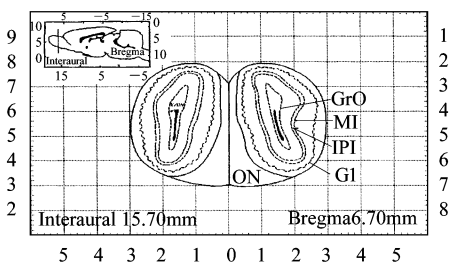


图 1 切片在嗅球中的位置

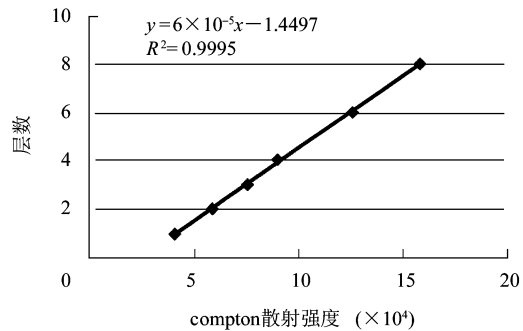


图 2 膜 (轻元素组成的样品) 的层数与 Compton 散射强度的关系

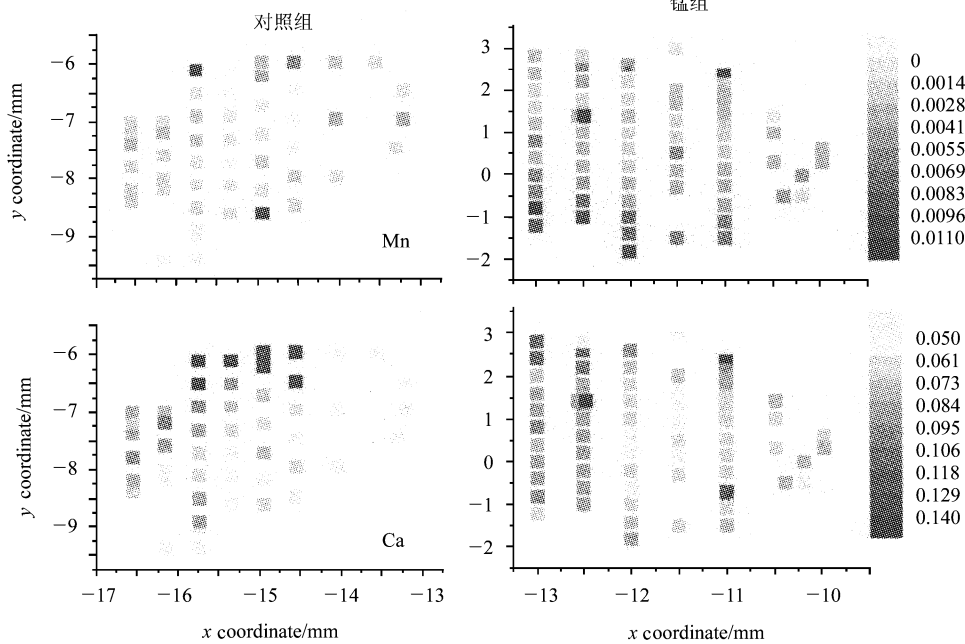


图 3 嗅球切片中锰和钙的位置分布图

1.2%, 因此,用康普顿散射强度定量引入的相对误差在百分之几. 以此可推算出,所测量的切片的质量在 $0.8-1.2\text{mg}/\text{cm}^2$;在同步辐射 X 荧光微区测量时每一测量点约为 $3-5\mu\text{g}$ 样品量,对 Mn 的探测极限约为 $1 \times 10^{-11}\text{g}$.

所有的同步辐射 X 荧光谱都用束流强度和测量时间归一,并扣除支撑样品的膜的贡献,获得净的样品 X 射线荧光谱. 然后,元素的峰面积用康普顿散射强度归一,相当于用质量归一^[3]. 对所有的点归一后的值求平均,如果测量的点足够多,该平均值与 X 荧光分析的元素含量相等. 如果仅仅进行点间或组间元素含量的比较,用康普顿散射强度归一后的值即可.

3 结果和讨论

3.1 X 射线荧光测量的结果

表 1 是锰组与对照组大鼠嗅球中部切片中所测量元素的含量和比值. 从表中可见,在锰组,大鼠鼻腔滴入 MnCl_2 后,嗅球中部元素的含量发生变化,其中锰、钙、锌和溴的含量有较大的变化,分别增加 55%, 82%, 42% 和 72%. 其中 Mn 和 Ca 的分布有较大的差别. 这是由于滴入时的操作,还是个体差异,需增加样本进一步证实.

表 1 锰组与对照组大鼠嗅球中部切片中所测量元素的含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$) 和比值

元素	对照组 ($n=3$)	Mn^{2+} 组 ($n=4$)	Mn^{2+} 组/对照组
P	5500 ± 500	5000 ± 400	0.91
S	19900 ± 1200	18000 ± 2000	0.90
Cl	19300 ± 2900	17400 ± 3800	0.90
K	30200 ± 3200	29200 ± 2300	0.97
Ca	408 ± 131	743 ± 431	1.82
Mn	4.2 ± 0.2	6.5 ± 2.5	1.55
Fe	139 ± 28	127 ± 15	0.91
Cu	17.5 ± 0.5	17.8 ± 0.6	1.02
Zn	79 ± 6	112 ± 14	1.42
Br	5.4 ± 1.4	9.3 ± 1.1	1.72
Rb	52 ± 10	51 ± 7	0.98

3.2 同步辐射的结果

图 3 是锰和钙在嗅球切片上的分布. 锰和钙在嗅球切片上的分布是不均匀的,在锰组点间的浓度

分别可达 50 和 30 倍. 总体上,锰组切片上的锰和钙均高于对照组. 与 X 射线荧光测量的结果一致. 如果增加测量的点数,可获得浓度的位置分布图.

通过元素的二变量相关性分析表明,在位置分布上锰组中 Mn 和 Ca 有非常强的相关性 (0.985 , $p=0.000$). 这就从另一角度证明了 Gavin 等对线粒体中锰和钙的转运研究的结果:锰离子在细胞内的沉积会减小钙离子从细胞内到细胞外的输运^[6]. 对照组 K 与 Cl, Fe, Ca, Cu, Zn 有相关性 ($p < 0.000$),而在锰组 K 与这些元素没有相关性.

用聚类分析(最近邻法, cosine 相似性尺度)对元素进行聚类,图 4 是锰组和对照组的聚类分析的树形图. 在正常组中锰和钙不聚在一类,而锰组在一类,说明锰和钙的相似性最大. 锰对钙的影响最大.

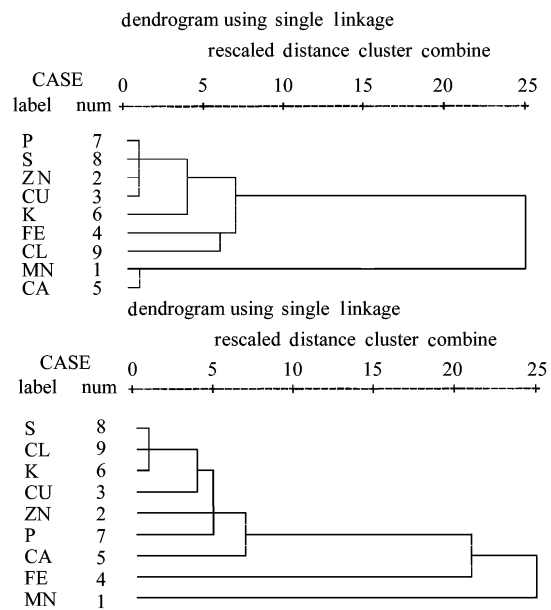


图 4 锰组(上)和对照组(下)的元素聚类树形图

4 结论

在缺乏微区微量(微克级)国际标样的情况下,实现了对嗅球切片的微量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 级) 元素微区 ($20\mu\text{m}$) 分布的定量分析. 大鼠鼻孔滴入的 Mn^{2+} 在嗅球中分布不均匀,高低差 50 倍. Mn 对 Ca 的影响最大, Mn 和 Ca 作为变量有最大的相似性,在位置分布上有非常强的相关性. 该工作说明同步辐射 X 荧光分析与统计分析结合,可为嗅球的核磁共振图像研究提供量化的信息.

参考文献 (References)

- 1 Pautler R G, Silva A C, Koretsky A P. Magn Reson Med., 1998, **40** (5): 740—748
- 2 Pautler R G, Koretsky A P. Neuroimage, 2002, **16** (2): 441—448
- 3 LIU N Q, LIU P, WANG K et al. Biol Trace Elem Res, 2000, **76** (3): 279—284
- 4 XU Q, SHAO H R, LIU P et al. International Journal of PIXE, 1996, **6** (1): 405—408
- 5 LIU N Q, SHAO H R, MA D X et al. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 1996, **109/110**: 368—371
- 6 Gavin C E, Gunter K K, Gunter T E. Neurotoxicology, 1999, **20** (2-3): 445—453

Manganese Distribution in Olfactory Bulbs of Rat Measured by Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence *

ZHANG Zhi-Yong^{1:1)} LIU Nian-Qing^{1:2)} LI Fu-Liang¹ HUANG Yu-Ying¹
HE Wei¹ LEI Hao² ZHOU Zhen-You³

1 (Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100039, China)

2 (Wuhan Institutes of Physics and Mathematics, CAS, Wuhan 430071, China)

3 (Department of Physics, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Mn^{2+} -enhanced magnetic resonance imaging is very useful for mapping the olfactory bulb, but has poor positional resolution ($\sim 100 \mu m$) and difficulty with the quantitative analysis of Mn. Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence (beam size $\sim 20 \mu m$, detect on limit of Mn $\sim 10^{-11} g$) and Energy Disperse X-ray Fluorescence combined with multi-variable statistics were employed to investigate the positional distribution of manganese and other elements in slices of the olfactory bulb of SD rats. The naris of rats were pipetted with $MnCl_2$ (Mn group $n = 4$) compared with the control group ($n = 3$). Our results show that the manganese distributions in the slices of both groups were non-homogeneous. The difference in the contents of Mn of rats treated with $MnCl_2$ is as high as 50 times. Rats treated with $MnCl_2$ exhibited a strong correlation (0.985 , $p = 0.000$) between the positional distribution of Mn and Ca, and the contents of Mn, Ca, Zn and Br of the Mn group were 55%, 82%, 42% and 72% higher than the control group.

Key words synchrotron radiation X-ray fluorescence, manganese, positional distribution of elements

* Supported by NSFC (10175077) and Major Direction Project of Chinese Academy of Sciences (KJ CX-N01)

1) E-mail: zhangzhy@ihep.ac.cn

2) E-mail: liunq@ihep.ac.cn