

2003年諾貝爾生醫獎介紹

文 / 李寬容



偉大的NMR科學家(左起)：Felix Bloch (1952物理獎)，Edward M. Purcell (1952物理獎)，Richard R. Ernst (1991化學獎)，Kurt Wuthrich (2002化學獎)，Paul C. Lauterbur (2003醫學獎)，Peter Mansfield (2003醫學獎)。

2003 年的諾貝爾生理或醫學獎在十月六日宣佈頒給美國的 Paul C. Lauterbur (諾貝爾獎主要工作在 State University of New York at Stony Brook 化學系完成。1985 年轉到 Biomedical Magnetic Resonance Laboratory, University of Illinois, Urbana, Illinois) 及英國的 Peter Mansfield (Magnetic Resonance Centre, School of Physics and Astronomy, University of Nottingham)，以表彰他們對磁振造影 magnetic resonance imaging (MRI) 的傑出貢獻。本文主旨在於很簡單地介紹 NMR 及 MRI 的基本原理，以及如何應用在化學、生化、及醫學三大領域。NMR 已經發展了 50 年，1D, 2D NMR 以及 MRI 的理論已經非常豐富，所牽涉到的物理和數學也非常複雜，它是人類自然科學文明中最珍貴的成就之一，因此顯然不是短時間或者短篇幅就能理解的，作者也不可能全部都瞭解。僅針對有興趣的讀者做淺入淺出的概述，與讀者分享這寶貴的知識。

科幻小說或未來太空電影裏的情節，常看到利用儀器透視人體內部的器官結構。這個情節在 MRI 似乎是做到了。MRI 所得到的人體器官構造影像圖，簡直比解剖學教科書還要清

楚。由於 MRI 的原理是利用人體內軟組織的水分子來成像，不似傳統的電腦斷層掃描 (CT scan) 須要使用 X-Ray，因此 MRI 是屬於非侵犯性的檢診工具。理論上 MRI 可以使用在孕婦身上，而病人接受 MRI 攝影時也遠比其他侵犯性的檢查(例如穿刺取樣)輕鬆愉快。現在全世界大約有 22,000 台磁振造影儀，每年提供 6,000 萬張圖片給醫師們作為診斷的主要依據之一。依據國內外使用 MRI 的經驗，70% 是用於中樞神經系統的攝影，此特性正好補足 CT scan 對軟組織較不敏感的缺點 (CT 正確全名應該是 computer assisted tomography (CAT)，但是現在放射線醫生大都稱它為 CT。CAT 是由英國的 Godfrey Newbold Hounsfield 及美國的 Allan M. Cormack 在 1960 至 1970 年代分別發展的。兩個人素昧平生，但都因為發展 CAT 而共同獲得 1979 年諾貝爾生理或醫學獎)。

磁振造影 MRI 是核磁共振 NMR 理論的延伸與直接應用。MRI 與 NMR 是不可分開的。2003 年以前，與 NMR 有關的理論及應用，已經拿了三次諾貝爾獎。我們先回顧一下 1945 年至今，大約 60 年之間的 NMR 歷史。

- (1) 1940~1946年研究NMR現象的有Stanford University 物理系 Felix Bloch 及 MIT 物理系 Edward Mills Purcell。值得一提的是 Purcell 及 Bloch 素昧平生。巧的是他們不約而同將利用 continuous wave NMR (CW-NMR) 觀察到質子 nuclear transition 的論文發表在同一期的 Physical Review (1946年, vol. 46, p. 37 及 p. 127, [1, 2])。兩人因此共同獲頒 1952 年物理獎。
- (2) 1991 年諾貝爾化學獎頒給將傳統 CW-NMR 變成 Fourier transform NMR (FT-NMR) 以及發明 2D FT-NMR 用來解化學結構及分子間相互作用的瑞士蘇黎世 Eidgenössische Technische Hochschule (簡稱 ETH, 翻譯為英文是 Swiss Federal Institute of Technology。中文似可譯為瑞士國立理工大學或學院)的 Richard R. Ernst。
- (3) 2002 年諾貝爾化學獎頒給利用上述 2D, 甚至 3D FT-NMR 研究蛋白質 3D 結構與功能關聯性的(也是)瑞士 ETH 的 Kurt Wuthrich。
- (4) 2003 年諾貝爾生理或醫學獎頒給發明磁共振造影 MRI 的美國 Paul C. Lauterbur 和英國 Peter Mansfield。

至今總共有四次諾貝爾獎, 頒給六位物理或物化教授。NMR 真可謂是自然科學界的顯學了。Ernst 及 Wuthrich 獲得諾貝爾獎的主要工作都是在瑞士蘇黎世(Zurich)的 ETH。ETH 已經被公認是世界上 NMR 最偉大的重鎮。Ernst 及 Wuthrich 兩位是同事, 也是老友, 也都來台灣演講過。Wuthrich 來台灣兩次。2002 年 10 月他離開台灣返回歐洲時, 在途中接到獲得諾貝爾獎的消息。順便提一下, 1975 年起 Wuthrich 兼國際生物物理學會 (International Union of Pure and Applied Biophysics, IUPAB) 秘書長及 1978 年起兼國

際科學聯合委員會 (International Council of Scientific Unions, ICSU)委員時, 協助大陸刻意挑起的台灣生物物理學會與北京生物物理學會的會籍爭端。

提到 NMR 與 MRI, 不能不提到產生磁場的技術。與 NMR, MRI 相關的磁鐵技術是以英國的工業技術為主。英國 Oxford 是世界上少數最早發展傳統電磁鐵及超導體磁鐵的技術重鎮之一。NMR、MRI 及 NMR 相關的磁鐵技術似乎是瑞士及英國的專利。這一點與 J. J. Thomson 發現電子以後, 英國就長期掌握了 X-Ray 的基本技術及製造機密一般。1950 年代加州理工學院 (CIT) 的化學大師 Linus Pauling (1901-1994, 1954 年諾貝爾化學獎) 不得不將兒子送到劍橋去學單晶繞射的技術。來自台南的科學家王守田博士則代表了美國在超導磁鐵製造的技術。目前似乎沒有其它國家有製造 140,000 gauss 以上的大型均勻超導磁鐵技術 (加上均磁線圈 shim coils 以後, 磁場均勻度必須遠優於 10^{-6} 才能測 high resolution proton NMR 光譜)。

自從 1952 年 Bloch 及 Purcell 獲得諾貝爾物理獎之後, NMR 的發展可以大略歸納成下列三大領域:

- (1) 在化學上決定分子的化學結構式及分子間的相互作用 (Ernst 的貢獻)。
- (2) 在生物化學決定蛋白質巨分子的 3D 結構並且闡釋其結構序列與功能的關聯性 (Wuthrich 的貢獻)。
- (3) 在醫學上利用質子來產生具有解剖功能的身體內部器官和組織的影像 (Lauterbur 及 Mansfield 的貢獻)。

NMR 能夠做的事情還真不少, 表面上看起來各領域似乎不太相關。其實所有的應用都是根源於唯一的共同事實, 那就是利用氫原子

核的 nuclear spin (以 I 表示)。Nuclear spin I 所容許的值以 nuclear spin quantum number m_I 來表示。根據量子力學的推算， I 的範圍是

$$-I \leq m_I \leq +I, \text{ 或者直接寫成}$$

$$m_I = I, I-1, I-2, \dots, -I$$

原子核構造最簡單的是質子 (proton)，其 nuclear spin quantum number， $I = 1/2$ ；因此容許的 m_I 值是 $+1/2$ 或 $-1/2$ 。其他常見 $I = 1/2$ 的核種有氚 (tritium, H-3)、氦 (helium, He-3)、C-13、N-15、F-19、Si-29、P-31 等。至於 $I = 1$ 的核種有重氫 (deuterium, H-2)、Li-6、N-14。至於 $I = 3/2$ 的核種有 Li-7、Be-9、B-11 等。一般而言，原子序愈大的元素其原子核構造愈複雜，例如 Ge-73、Kr-83、Sr-87、In-113、In-115、Hf-179、Bi-209，這些同位素 $I = 9/2$ 。

Nuclear spin I 的大小 (magnitude)， $|I|$ 以下式表示 (絕對值符號)：

$$|I| = \hbar [I(I+1)]^{1/2}$$

上式中 \hbar 是 Planck constant 除以 2π 。一共有 118 個元素及其同位素具有 nuclear spin。所有具有 nuclear spin 的原子核在磁場 B_0 之下都有核磁矩 (nuclear magnetic moment μ)，其大小與 $|I|$ 成正比，定義如下：

$$|\mu| = \gamma \hbar |I|$$

其中 γ 是 $|\mu|$ 與 $|I|$ 的比例常數，稱為磁旋比常數 (gyromagnetic ratio)，這個名稱顧名思義，而且顯而易見。在物理上大家比較熟悉的式子是 $\gamma = (g_n \beta_n / \hbar)$ ；其中 g_n 是 nuclear g factor， β_n 是 Bohr nuclear magneton。質子的 γ 值是 $26,753 \text{ rad} \cdot \text{gauss}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ ，C-13 的 γ 值是 $6,728 \text{ rad} \cdot \text{gauss}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ 。

將具有 magnetic moment μ 的氫原子核置於磁場 B_0 下，則 magnetic moment μ 與磁場 B_0 的作用能量 E 是

$$E = -\mu \cdot B_0$$

若設定磁場 B_0 是沿著 $+Z$ 方向，則上式向量內積化成純量式 (scalar product)

$$E = -\mu_z B_0$$

根據量子力學， $\mu_z = -m_I \hbar \gamma$ ，而氫原子核 m_I 有 $\pm 1/2$ ，代入能量公式：

當 $m_I = +1/2$ ， $E = -1/2 \hbar \gamma B_0$ ；lower energy state，或稱為 $|\alpha\rangle$ state

當 $m_I = -1/2$ ， $E = +1/2 \hbar \gamma B_0$ ；higher energy state，或稱為 $|\beta\rangle$ state

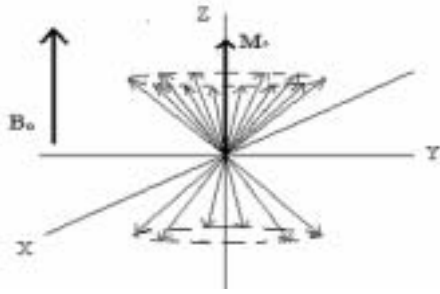
暫時總結一下：以質子 proton $I = 1/2$ ， $m_I = \pm 1/2$ 為例，當磁場 B_0 存在時，氫原子核產生 $|\alpha\rangle$ 及 $|\beta\rangle$ 兩個能階。這個現象叫做 nuclear Zeeman effect，以區別於電子的 Zeeman effect。

上述 $|\alpha\rangle$ 及 $|\beta\rangle$ 兩個能階的能量差異是：

$$\Delta E_{\text{Zeeman}} = 1/2 \hbar \gamma B_0 - [-1/2 \hbar \gamma B_0] = \hbar \gamma B_0$$

假使施以能量相當於 $h\nu = \Delta E = \hbar \gamma B_0$ 的外加電磁場能量到這些原子核時 (外加電磁場以 B_1 表示)，nuclear spin 就會吸收能量而產生由 $m_I = +1/2$ 的 $|\alpha\rangle$ 能階狀態躍遷至 $m_I = -1/2$ 的 $|\beta\rangle$ 能階狀態。這就是典型的 two level nuclear single quantum transition，注意必須與量子力學的 electronic transition 區分。

當系統裏的質子數量夠多時。多數的 nuclear spin 處在 $|\alpha\rangle$ 能階狀態，較少數處在 $|\beta\rangle$ 能階狀態，其數目比是根據 Boltzmann distribution law。事實上 $|\alpha\rangle$ 及 $|\beta\rangle$ 兩個能階的能量差異非常小，所以這兩個能階的質子數目比幾乎趨近於 1.00000。整個系統 total magnetic moment $\sum \mu$ 的合向量 M_0 最後是指向 $+Z$ 軸，與磁場 B_0 平行。 M_0 叫做系統平衡狀態時的總磁矩 (bulk magnetization)。為了簡化 NMR 的理論計算，全部以 bulk magnetization M_0 來闡述整個 nuclear spin system，如下圖所示。



系統在平衡狀態時如果從 X 軸施以一個小的電磁脈衝 B_1 。且使其 $h\nu = \Delta E = \gamma \hbar B_0$ ，則 M_0 會因為 magnetic torque ($\tau_0 = M_0 \times B_0$) 以及 $\tau_1 = M_0 \times B_1$ 的影響，一面以 ω_0 的 Larmor frequency 頻率作繞著 Z 軸的 precession motion ($\omega_0 = \gamma B_0$)，而同時又以 ω_1 的 Larmor frequency 頻率作繞著 X 軸的 precession motion 逐漸轉到 XY 平面上。由上述 B_1 的 $h\nu_1 = \Delta E = \gamma \hbar B_0$ 可以得知此 B_1 外加電磁場的能量 $h\nu$ 的大小與磁場 B_0 的強度成正比，而且 B_1 外加電磁場的 angular velocity ω_1 必須與 M_0 繞著 Z 軸 precession motion 的 Larmor frequency ω_0 相等 (即 $\omega_1 = \omega_0$)，這就是為什麼整個 nuclear transition 的現象叫做 nuclear magnetic resonance (核磁共振) 的由來。

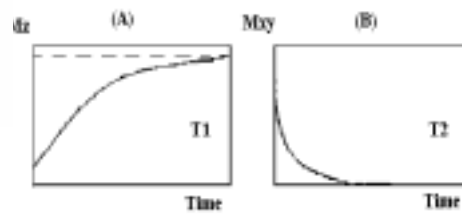
必須提非常重要的一點，在 NMR 的實驗，當 M_0 旋轉到 XY 平面時 (即 M_0 從 +Z 軸正好轉 90 度到 XY 平面時)，將 B_1 外加電磁場關閉，這時 M_0 便開始一面作繞 Z 軸的 Larmor precession motion，一面準備回復到 M_0 的平衡值。此時 $M_0(t)$ 在 Z 軸與 XY 平面的運動方式分別如以下圖(A)與(B)所示。 $M_z(t)$ 代表 $M_0(t)$ 在 Z 軸回復的時間曲線，其曲線的時間常數是 T_1 。 $M_{xy}(t)$ 代表 $M_0(t)$ 在 XY 平面消失的時間曲線，其曲線的時間常數是 T_2 。解 boundary condition，則 $M_z(t)$ 與 $M_{xy}(t)$ 的數學式分別為 [3]：

$$M_z(t) = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$$

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-t/T_2}$$

T_1 主要是觀測 +Z 軸上的 magnetization 回復速率，因此稱為縱向核弛緩 (longitudinal

relaxation)，而 T_2 主要是觀測 XY 平面上的 magnetization 消失速率，因此稱為橫向核弛緩 (transverse relaxation)。



T_1 、 T_2 與共振頻率 ω_0 及質子的 rotational correlation time τ_c 有關，根據 Bloembergen Purcell Pound theory， T_1 、 T_2 與 ω_0 及 τ_c 的關係如下 [4]

$$\frac{1}{T_1} = K \left[\frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right]$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{K}{2} \left[3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right]$$

其中 $K = \frac{3\mu^2}{160\pi^2} \frac{\hbar^2 \gamma^4}{\gamma^6}$ ，是該核種的常數。

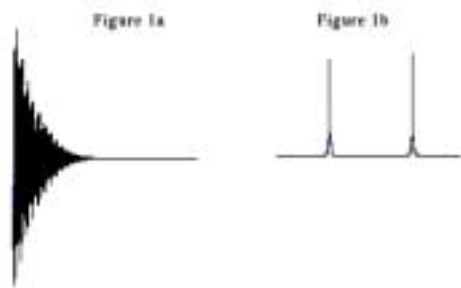
純水的 $\tau_c \cong 10^{-12}$ s，蛋白質上的質子 $\tau_c \cong 10^{-5} - 10^{-8}$ s。

儀器上使用偵測線圈測量 XY 平面上的 magnetization $M_{xy}(t)$ ，由射頻線圈(transmitter)暫時充當接受線圈(receiver)。所以 NMR 的訊號在示波器上看起來是衰減的訊號(B 圖)，稱之為自由衰減 (free induction decay, 簡稱 FID)。Ernst 的貢獻之一就是 1966 年發明了利用 Fourier transform 將 FID 從 time domain $s(t)$ 變成 frequency domain $S(\omega)$ 的 Fourier transform NMR：

$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t) e^{-i\omega t} dt$$

$$s(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} S(\omega) e^{i\omega t} d\omega$$

FID 經過 FT 的轉換如下圖所示：



(取材自瑞典 Nobel Assembly Richard Ernst 的官方檔案)

上述介紹了 NMR 的基本理論和 T_1 、 T_2 的核弛緩現象。以下將依序簡單敘述 NMR (1) 如何決定化合物的構造，(2) 如何決定蛋白質等生物巨分子的 3D 結構，以及 (3) 醫學上如何利用 NMR 來形成身體內部組織器官影像的磁振造影(MRI)技術。

(1) 化學上如何利用 NMR 決定分子結構

每個分子的化學鍵以及每個原子核外圍的平均電子雲密度都不一樣，這些電子雲密度會改變有效 B_0 值 (effective magnetic field)，其改變的尺度 ($\Delta B/B_0$) 大約是 $(1\sim 10) \times 10^{-6}$ 。這意味著每個質子因為感受到不同的有效 B 值，也因而有不同的 ω 值。NMR 在化學上被廣泛使用來決定分子的結構，就是利用每個質子有不同的 angular velocity ω 及 frequency ν ($\omega = 2\pi\nu$)。化學上把每一質子在磁場 B_0 之下有不同的 ω (及 ν) 的現象，稱為 "chemical shift"，中文叫做化學位移。事實上，chemical shift 這個名稱並不恰當。許多人誤以為 "shift" 這個字是動詞，說成 "質子會到處走動"，認為這是 "Brownian motion" 的結果，或是 "測不準原理" 的例證，這是不正確的。

另外一個決定分子結構的重要參數是源於每個氫原子核吸收頻率 ν 都會因為該質子與鄰近 $I \neq 0$ 的原子核產生 (nuclear) hyperfine coupling。這個耦合是量子力學上的 interaction

Hamiltonian, $H = J_{12} I_1 \cdot I_2$ ，其中 J_{12} 是第一個原子核 I_1 與第二個原子核 I_2 的 coupling constant (耦合常數)，單位是 Hz (ν 的單位)。

另外， I_1 、 I_2 coupling 的結果會使 I_1 、 I_2 的吸收頻率 ν_1 、 ν_2 也跟著產生 splitting (multiplicity)。Splitting pattern (multiplicity) 類似於物理上的 L-S coupling 的 spectral term symbol。Multiplicity 等於 $(2nI + 1)$ ，其中 I 是鄰近產生 coupling 原子核的 nuclear spin， n 是產生該 coupling 的鄰近原子核數目。舉例來說一個 CH- 會使相鄰一個化學鍵的 CH- 產生 2 個 splitting 訊號 ($2nI + 1 = 2 \times 1 \times 1/2 + 1 = 2$, a doublet signal, multiplicity = 2)；CH₂- 會使鄰近一個化學鍵的 CH- 產生 3 個 splitting ($2nI + 1 = 2 \times 2 \times 1/2 + 1 = 3$, a triplet signal, multiplicity = 3)；甲基 (methyl) CH₃- 會使鄰近的 CH- 產生 4 個 splitting ($2nI + 1 = 2 \times 3 \times 1/2 + 1 = 4$, a quartet signal, multiplicity = 4)。假設一個質子鄰近有多於一個含質子的原子團，例如 n_1 個 I_1 、 n_2 個 I_2 ，則此原子的 multiplicity 等於 $(2n_1I_1 + 1)(2n_2I_2 + 1)$ 。在正常情況下，比較明顯而能夠偵測的質子與鄰近質子的 hyperfine coupling，都只發生在一至三個化學鍵之間，不會伸展太遠。因為原子核距離愈遠，耦合常數愈小，現代 NMR 儀器的靈敏度以及解析度都不夠來偵測原子核之間距離無限遠而 order 又無限小的耦合常數 (< 0.1 Hz 或更小)。將來儀器的電子放大電路大幅改善，超導體磁場大幅增強，應該可以增加偵測原子核之間遠程耦合的能力。

因此綜合上述，chemical shift、hyperfine coupling constant J_{12} 與 splitting pattern (multiplicity) 三者是決定分子化學結構的重要依據，是鑑定分子的充分且必要指紋 (molecular fingerprint)。這種顯示 hyperfine

coupling constant J_{12} 的 high resolution NMR spectrum 要求 B_0 磁場的強度超級均勻(ultra homogeneous, variation $\sim 10^{-6}$ 甚至 $\sim 10^{-8}$, 或 $\sim 10^{-9}$)，儀器設計上這個磁場均勻度 (magnetic homogeneity) 必須靠外加 9 至 12 條均磁線圈 (shim coils)，分別通過適當的電流來矯正磁鐵製造時的內在天然缺陷 (inherent defect)。

傳統的 CW-NMR 是連續且逐段掃瞄頻率範圍，耗時長，大約須數十分鐘，最致命的是 CW-NMR 靈敏度很低，只能偵測質子 NMR 光譜。1960 年代 Ernst 發明了將 $10^4 \sim 10^5$ Hz 的光譜頻譜範圍 (spectral width) 一次送進測試的原子核，然後使用 Fourier transform (FT) 將 time domain 的訊號轉換成 frequency domain 的訊號，此種技術使得偵測時間變成 ~ 2 秒鐘 (pulsing time $\sim 10 \mu s$, data acquisition time ~ 2 s)。此 FT-NMR 可以連續掃瞄，累積訊號，以增加訊號雜訊比 (signal-to-noise ratio)，從此諸如 C-13, P-31 等較不靈敏的核種 (即 γ 值很小的核種，或者自然界存量 natural abundance 很少的同位素) 都能夠測量 NMR 光譜。

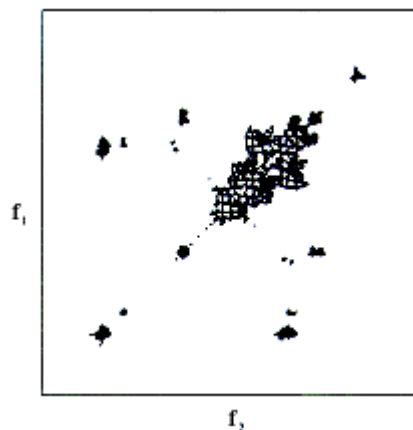
Ernst 另一個貢獻是發明(或發展)2D FT NMR [5, 6]。在 2D 的實驗，要連續從 B_1 送兩個脈衝 (pulses)，使有耦合的原子核 I_1, I_2, I_3, \dots 等，在 XY 平面上產生 cross talk。2D FT 是直接由 1D FT 衍生出來的。2D FT NMR 圖形有兩個頻率的軸， f_1, f_2 分別對應 t_1, t_2 兩個時間序列的 spin perturbation：

$$S(\omega_1, \omega_2) = \int_{-\infty}^{\infty} dt_1 \exp(-i\omega_1 t_1) \int_{-\infty}^{\infty} dt_2 \exp(-i\omega_2 t_2) s(t_1, t_2)$$

$$s(t_1, t_2) = \frac{1}{4\pi^2} \int_{-\infty}^{\infty} d\omega_1 \exp(i\omega_1 t_1) \int_{-\infty}^{\infty} d\omega_2 \exp(i\omega_2 t_2) S(\omega_1, \omega_2)$$

如下圖所示。對角線的訊號是傳統 1D FT NMR 的訊號，叫做 diagonal peak，是傳統 1D FT NMR 的 single quantum transition 訊號；而不在對角線的訊號叫做 off-diagonal peak，是 I_1, I_2, I_3, \dots 等訊號的 cross talk，也代表這些質

子經由化學鍵(through chemical bond)產生 nuclear spin-spin coupling 的 correlation 2D spectroscopy (COSY)。下圖是蔗糖分子的 2D COSY NMR 光譜。經由判讀可以知道那兩個質子相鄰(觀察 off-diagonal peaks)，進而 assign 這些吸收訊號是屬於那一個原子核，這叫做 signal assignment，是解光譜與分子結構的犀利武器。



(2) 生物化學如何決定蛋白質巨分子的結構

Kurt Wuthrich 自從 1976 年開始研究利用 NMR 來決定蛋白質的 3D 結構。蛋白質分子是由 20 種氨基酸(amino acid)作為構造單元 (building blocks)，由細胞質的核糖體(ribosome)以縮合反應(condensation)合成的。簡言之，蛋白質就是一長串氨基酸。這一串氨基酸越長，該蛋白質的分子量就越大。氨基酸的平均分子量是 110，它含有許多質子，因此可以觀察質子的 NMR 吸收訊號。氨基酸上有一些質子是穩定的(例如 CH_3 甲基的質子)，但也有一些質子是不穩定的(例如 NH, NH_2 等含氮氫的醯氨基質子，amide protons)。此處氫原子核穩定與不穩定，指的是質子會不會進行化學交換 (chemical exchange) 為基準，不是核子化學所謂的穩定與不穩定同位素(即 stable and non-stable isotopes)。會進行化學交換的質子，例如氨基 NH, NH_2 (即化學上的 amide protons)，NMR 訊號非常寬，甚至消失。蛋白質的大約分子量是 110 乘以其所含氨基酸的數

目。例如蛇毒蛋白含有 62~64 個氨基酸，因此分子量大約是 7,000。構成結締組織的膠原蛋白(collagen)，是由 3 串約 1,000~3,000 個氨基酸的蛋白質互相纏繞而形成的，因此分子量是 $110 \times (1,000 \text{ 至 } 3,000) \times 3 = 330,000$ 至 990,000，非常巨大（所以市售膠原蛋白不會經皮膚吸收）。即使分子量小於 10,000 的蛋白質，其質子 NMR 光譜包含數千個吸收峰，互相重疊，難以分辨。Wuthrich 利用 nuclear Overhauser enhancement (NOE) 的強弱做為參數，來估算氫原子核之間的距離。NOE 的現象是當兩個鄰近的氫原子核 I_1 及 I_2 有 dipole-dipole 作用時，在傳統 1D NMR 的 double irradiation 實驗，給予其中一個氫原子核(I_1)獲得 $h\nu_1$ 的能量，則可以觀察到第二個氫原子核(I_2)的 $h\nu_2$ 訊號增強。 I_2 訊號增強的程度一般在 10%至 30%，上限是 50%。兩個在空間靠近而互相作用的 magnetic moment $\mu_1 (= \gamma_1 \hbar I_1)$ 和 $\mu_2 (= \gamma_2 \hbar I_2)$ dipole-dipole 的 coupling energy 是 [7]

$$\Delta E_{NOE} = \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar^2}{r_{12}^3} \left\{ I_1 I_2 - \frac{3(I_1 \cdot r_{12})(I_2 \cdot r_{12})}{r_{12}^3} \right\}$$

NOE(單位為%)是隨著 r_{12}^{-6} 成反比 (r_{12} 是 I_1 及 I_2 兩個氫原子核的距離)。Ernst 在 1976 年完成 through chemical bond interaction 的 COSY 2D NMR 以後，在 1981 年也完成了以測量 through space interaction 的 NOE 2D NMR spectroscopy，簡稱 NOESY。Wuthrich 利用 NMR 來解蛋白質 3D 結構的過程其實是很辛苦的。以下是典型的大概過程 [8]。

首先必須知道上千個 NMR 訊號中，那一個吸收訊號是屬於那個原子核。這個過程是以 COSY 2D NMR 為主，叫做 signal assignments。將純化的蛋白質溶於重水(D₂O)中，濃度大約 1~50 mM。讓不穩定的醯氨基上的氫(amide protons)與 D₂O 溶液中的重氫(deuterium)置換，而得到簡化的 COSY 2D 及

NOESY 2D NMR 光譜。因為蛋白質分子可以與重氫交換的 NH、NH₂ amide protons 全部被重氫取代成 ND、ND₂，所以 NMR 光譜只呈現不能置換的質子訊號。記得上節曾提及 Ernst 設計 COSY 2D NMR，利用 spin-spin coupling 決定化學上那兩個質子相鄰。這個步驟是標準的 proton NMR “signal assignment”。Ernst 又利用 NOESY 2D NMR dipole-dipole interaction 的 NOE enhancement (%) [9, 10] 來尋找空間上那兩個質子相近，並依此估算該兩個質子間的距離。這個步驟是標準的 proton “distance geometry”。Wuthrich 將兩種方法 (COSY 和 NOESY 2D NMR) 廣泛使用來記錄小蛋白質的 2DNMR 光譜。Wuthrich 還用到質子的相互耦合常數 J 的 empirical formula 來計算 torsional angle ($J = 6.4 \cos \theta^2 - 1.4 \cos \theta + 1.9$)。一個小小蛋白質分子大概有 300 - 500 組 NOE 2D NMR 數據。Wuthrich 將 NOE 分成 strong NOE (距離 2.00~2.49 Å)，medium NOE (距離 2.50~2.99 Å)，和 weak NOE (距離 3.00~4.00 Å)。然後推演每一對有 NOE 訊號的質子在空間的距離，以求與所這測得的 NOE 數據符合。

其次，將上述蛋白質溶解在一般的 H₂O 中，全部實驗重新再做一次，並且改變一些足以改變 NOE 的電磁脈衝參數，例如 NOESY 兩個 90 度脈衝的 duration (NMR 術語是 mixing time，非本文範圍，從略)，記錄 COSY 及 NOESY 2D NMR 光譜。這時候含 NH, NH₂ 的 amide proton through space 的 NOE 2D NMR 訊號全都呈現出來，光譜非常複雜。這是資本密集，勞力密集，與腦力密集的工作。1970 至 1980 年間沒有好電腦，很難想像 Wuthrich 是用什麼電腦去完成這些複雜繁重的工作。為了簡化，Wuthrich 後來先把 medium 和 weak NOE 的訊號全部暫時忽略，只計算 strong NOE (2.00~2.49Å) 的部份。最後再將 medium 及 weak

NOE 列入，作為修正項(有一點類似量子力學的 perturbation theory)。許多化學家及生化學家因此對這樣的方法與結果半信半疑。據 Wuthrich 說，他感受到的心理壓力確實不小。Wuthrich 的毅力真令人佩服。下面圖 a 是引起植物病變的 P14A 蛋白質的局部 2D NOESY (ω_1 0-4.3 ppm ; ω_2 6.3-9.5 ppm，此蛋白質分子量約為 15,000)。下面圖 b 是 Wuthrich 利用 NMR 解出來的瘋牛病病毒蛋白 prion 靠近 C 端比較規則的第 126-230 號氨基酸的局部蛋白質 3D 結構 [11]。靠近 N 端第 23-125 號氨基酸則顯得鬆散而較不規則(淺線條部份)。下面圖 c 顯示同一個 prion 蛋白質在 1 ns (10^{-9} 秒) 20 張瞬間運動圖 (snapshot) 的重疊 (superposition)。許多物種的 prion 與受體 (receptor) 之間的作用模式與結合位置 (binding mode and site) 之立體構型非常相似，所以瘋牛病病毒蛋白 prion 遲早會發現是人畜共通，應該是可以預料的。

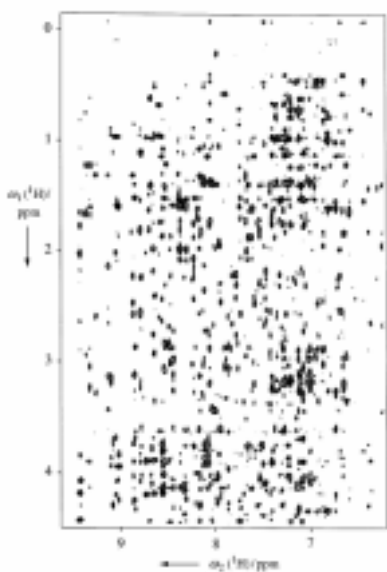


圖 a

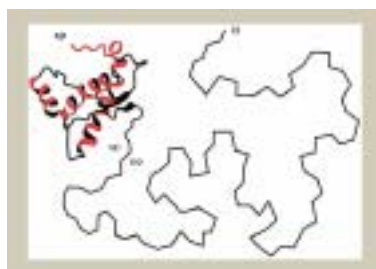


圖 b



圖 c

上面的 NOESY 2D NMR 及 prion 的 3D 圖形取材自介紹 Wuthrich 的專輯 [11]。Wuthrich 前後大約 20 年都在利用 NMR 研究蛋白質的 3D 結構。物理上另外有一位大科學家 Max Perutz (在劍橋)也是花了 23 年的毅力，再加上絕頂的天資，在沒有電腦的情況下(利用心算及手算 Fourier transform)，把分子量 70,000 的血紅素蛋白(hemoglobin)利用 X-Ray 單晶繞射解出來。Wuthrich 利用 NMR 解沒有辦法長單晶的蛋白質在水溶液的 3D 結構，Perutz 利用 X-Ray 解能夠長單晶的蛋白質 3D 結構，兩人前後輝映。就像 Hounsfield 發明電腦斷層掃描 CAT 測骨骼硬組織，以及 Lauterbur 及 Mansfield 發明磁共振造影 MRI 測軟組織，前後輝映 (見下節)。

(3)醫學上如何利用質子來產生具有解剖功能的身體內部器官和組織的影像

這是 NMR 應用的第三大領域，也是 2003 年諾貝爾生理或醫學獎的主題。本來 NMR 所要求的都是極端均勻(ultra-high homogeneous)的磁場 B_0 (注意磁場 B_0 是沿著 +Z 方向)。因為假使磁場 B_0 不均勻，則會使質子的 bulk magnetic moment M_0 吸收 $h\Delta\nu$ 的能量而旋轉至 XY 平面以後消失很快 (MRI 的術語是 dephasing)。消失很快的 fast decaying time

domain signal $s(t)$ 經過 Fourier transform，變成 frequency domain $S(\omega)$ 的 broad absorption signal。Broad signal 對 Ernst 及 Wuthrich 所發展的 high resolution proton NMR 是致命的。但是 Lauterbur 卻發展了均勻磁場 B_0 再加上 $\Delta B_z(x,y)$ [12]。這是什麼意思？我們首先以 1D 的 X 軸做為最簡單的入門例子。主要磁場 B_0 仍然沿著+Z 軸。

$$B = B_0 + \left(\frac{\partial B}{\partial x} \right)_x; \text{ for } 0 \leq x \leq a$$

這是指沿著 X 軸方向前進，X 軸上每一個點所感受到的沿著+Z 方向的磁場強度 B 都不一樣， $(\partial B / \partial x)$ 稱為在 X 軸方向的磁梯度 (magnetic field gradient)。在 X 軸方向上的每一個質子的吸收頻率 $h\nu = \Delta E = \hbar \gamma B$ 因而都不相同。假設我們在 $x = 1, 3, 5 \text{ cm}$ 處各放一杯水，則由左向右依序可以記錄到 ν_1, ν_2, ν_3 三個吸收訊號，分別對應到 $x = 1, 3, 5 \text{ cm}$ 位置上裝了水的杯子。如此我們便能夠以均勻磁場外加磁梯度的方式鑑別出 X 軸方向的水的位置。如果同樣將 Y 軸作類似的處理，

$$B = B_0 + \left(\frac{\partial B}{\partial y} \right)_y; \text{ for } 0 \leq y \leq b$$

我們便能夠以同樣外加磁梯度的方式鑑別出 Y 軸方向的水的位置。最後，當同時外加 $(\partial B / \partial x)$ 和 $(\partial B / \partial y)$ ，我們就能夠利用 ω_{xy} NMR 的吸收訊號鑑別 XY 平面上那一個座標位置 (x,y) 有水分子。這麼重要的理論與觀念，當年(1970 初) 仍然沒有讓大部份的物理學家及化學家產生警覺性的共鳴。據說當初 Lauterbur 的研究計劃及論文發表(Nature)的審查人還嫌他的研究不具意義。

我們必須先介紹一下幾個醫學名詞。物理上 $\Delta x \Delta y$ 叫做 area element，醫學上在 X-Ray 或 MRI 洗出來的片子(放射線底片)上叫做 pixel (picture element)。物理上 $\Delta x \Delta y \Delta z$ 叫做 volume element，醫學上叫做 voxel (volume

element)。Gradient $G_x G_y$ 的含蓋的面積範圍(a b)叫做 Field of View (FOV)。

Lauterbur 在早期 1973 年使用的磁場梯度 G_x, G_y 是採取 $(G_x \cos \theta + G_y \sin \theta)$ 的空間編碼型式然後利用類似 CAT 的 filtered back-projection 來重組影像。此法現在已經不用而改為 Ernst 的 2D Fourier transform 方式 [13]。在 Ernst 2D FT MRI 的理論，X 軸方向磁場仍然是 spatial encoding (空間編碼)：

$$B = B_0 + \left(\frac{\partial B}{\partial x} \right)_x$$

Y 軸方向的磁梯度 $(\partial B / \partial y)_x$ 則改成使 nuclear spin 在 XY 平面的相位 ϕ 不同的 phase encoding (相位編碼)。

$$\phi = \gamma y \int_0^t G_y(t) dt$$

這就是說當 G_y 打開 τ 秒之後，Y 軸上位於 y_1 的 magnetic moment 相位是 $\gamma y_1 G_y \tau$ ，而位於 y_2 的 magnetic moment 相位是 $\gamma y_2 G_y \tau$ ； y_1 與 y_2 的相位差是 $\gamma \Delta y G_y \tau$ ，因此相位差是磁梯度 G_y 與位置 y 的函數。如此頻率與相位兩種參數合起來就能夠鑑別 XY 平面上的兩個 area element 的質子 NMR 性質了(請參閱以下敘述)。

醫學影像所要求的是組織對比 (tissue contrast)。一張全部是白色(代表訊號極強)或全部是黑色的影像(代表訊號極弱)在臨床上是沒有辦法幫助診斷的。MRI 有三個方式可以達到好的組織對比：(1) 質子密度 (proton density)；(2) T_1 -weighted image；(3) T_2 -weighted image。質子密度愈大，訊號愈強，在底片上灰白階 (gray scale, 0~256 or 512) 的設定愈趨向白色。所以腦室裏的腦脊髓液呈現白色區域，大腦髓質部稍暗，頭蓋骨幾乎沒有水份，則呈現黑色。 T_1 -及 T_2 -weighted image 利用各個組織裏的水分子 T_1, T_2 relaxation time 不同，而使偵測的

M_{xy} 訊號強弱不同，以顯出組織對比。例如當 NMR 訊號消失很快(T_1 及 T_2 relaxation time constant 都很短)，則 XY 平面上的 $M_{xy}(t)$ 訊號消失快；相反的，+Z 軸上的 $M_z(t)$ 訊號恢復快。如果在 B_1 pulse 之後，特意等一段時間 (1~2 s)，讓 $M_z(t)$ 回復到+Z 軸，設法觀測 $M_z(t)$ 以比較各組織部位的 T_1 長短分別，我們稱此種特意的選擇為“ T_1 -weighted image”。如果 B_1 pulse 之後，不等一段時間，而只等 10~50 ms，則 $M_{xy}(t)$ 大多尚未消失，此種特意選擇測 $M_{xy}(t)$ 以比較各組織部位的 T_2 長短分別，我們稱此種 bias 的選擇為“ T_2 -weighted image”。以上僅是最簡易的定義。

下表列出在 10,000 gauss B_0 之下，組織的 T_1 T_2 值 [14]

	T_1 (ms)	T_2 (ms)
純水	~3,000	~3,000
大腦白質	390	90
大腦灰質	520	100
腦脊髓液	2,000	300
骨骼肌	600	40
脂肪組織	180	90
肝臟	270	50
腎臟髓質部	680	140
腎臟皮質部	360	70
血液	800	180

下面三張圖是腦部及脊椎的 proton density, T_1 -weighted image T_2 -weighted image MRI 圖，以示範三種方式 MRI 成像的對比異同。注意各方法所表現的明暗度分別。

圖 a: Signa Excite 3T MRI Proton density image (30,000 gauss)。取材自 www.gemedicalsystems.com/rad/mri/images/med/ex_3t_image7.jpg

圖 b: weighted image 取材自 www.medschool.lsumc.edu/Nsurgery

圖 c: weighted image 取材自 www.med.harvard.edu/AANLIB/cases/caseM/mr1_t/024.html

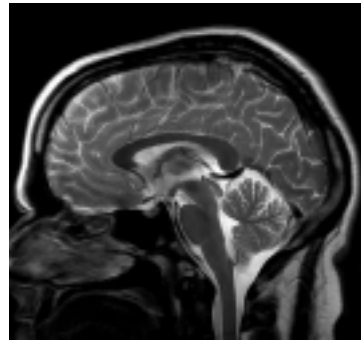


圖 a



圖 b

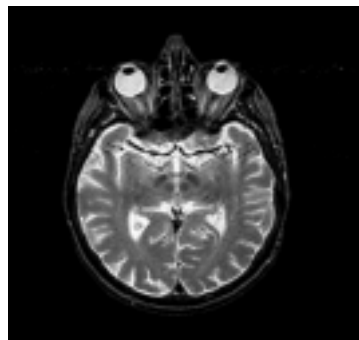


圖 c

下面三張影像是脊椎 MRI 矢狀切面。圖 a 是 Proton density；圖 b 是 T_1 -weighted image；圖 c 是 T_2 -weighted image。都取材自 www.xray.ufl.edu/~rball/teach/927.html



圖 a



圖 b



圖 c

要以 MRI 取得如上圖片所示的影像，必須決定所要的切面(slice selection)。方式如下：(1) 定義一個所要求的平面，可以是 XY, YZ, ZX 平面，也可以是斜角的切面(oblique cut)，(2) 定義一個平面，就自動定義出一個與此平面的中心垂直的單位向量 \mathbf{n} ，(3) 利用線圈(gradient coil)施以沿著 \mathbf{n} 方向的磁梯度 G_n ，則 G_n 使沿著 \mathbf{n} 方向的每個平面所在的位置都有不同的 B field，也因而使得每個平面有不同 Larmor frequency。至於斜切的磁梯度可以利用三個互相垂直正交的磁梯度(orthogonal gradient)的組合 $[G_x, G_y, G_z]$ 來達成，即 $G_r = a G_x + b G_y + c G_z$ ；與物理數學上任何一個空間向量 \mathbf{r} 能夠以單位向量 $\mathbf{r} = x\mathbf{i} + y\mathbf{j} + z\mathbf{k}$ ，或 $[x, y, z]$ 展開的道理一樣。選擇適合該平面的共振頻率 ω_0 ，就會激發該特定平面上的質子從 $|\alpha\rangle$ state 躍遷至 $|\beta\rangle$ state。還有一個問題要解決，那就是如何定義切面厚度(slice thickness) Δl 。 Δl 與磁梯度的 amplitude G_n ，以及 B_1 RF 電磁波的 bandwidth $\Delta\omega$ 有關： $\Delta\omega = 2\pi\Delta v = \gamma G_n \Delta l$ 。假

設 1.5 T (= 15,000 gauss) 的 MRI, RF 電磁波的 bandwidth $\Delta v = 2000.0$ Hz, $G_n = 0.5$ gauss/cm 則 $\Delta l = 2\pi \times 2000.0 / (26753 \times 0.5) = 0.94$ cm。因此，改變磁梯度強度 G_n 或 RF bandwidth $\Delta\omega$ ，就可以決定切面厚度 Δl 。在 MRI 檢查，必須掃描不同的切面，這時候靠著改變 ω_0 就可以激發不同平面上的質子。醫院常採用的 Δl 是 0.5 或 1.0 cm。如果切面要愈薄，則 Δv 要愈小， G_n 要愈大 ($\Delta l = 2\pi\Delta v / (\gamma G_n)$)。假設切面位置位移 5 cm，bandwidth 2000.0 Hz，slice thickness 仍然是 0.94 cm，則 RF center frequency 必須改變 $(5.0 \text{ cm} \times 2000.0 \text{ Hz}) / 0.94 \text{ cm} = 10638.3$ (Hz)。這些計算都是 MRI 儀器自動來執行，是非常例行的工作。

將目標物，例如腦部，平均分成 16~32 個切面連續掃描，再將影像連續重疊，就構成了 3D 實體影像，這個過程叫做 3D image reconstruction (3D 影像重組)。神經外科醫生在手術前，可以由電腦畫面很清楚地透視病人腦部病變的 3D 實際位置。這是很神奇的現代醫療科技。

下圖 a 取材自 brighamrad.harvard.edu/Cases/jpnm/images/1100/Coronal_3D.gif

下圖 b 取材自 www.mediacy.com/images/animation/ss_spinning_head1.gif 檔案圖片

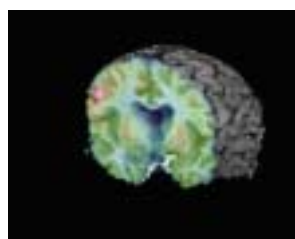


圖 a

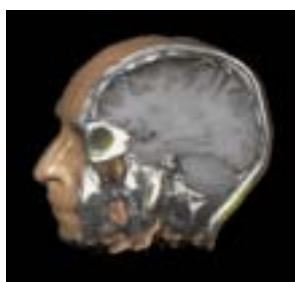


圖 b

Mansfield 1976 年前後，發明了極端快速成像的 Echo planar MR imaging(EPI)技術 [15]。他使用了很強的 switched phase-encoding magnetic field gradient $G\phi$ ，同時施與較弱的 space encoding gradient G_x 。事實上，在 slice selection 之後，只要在 slice 平面上任何 independent orthogonal coordinate q_1 、 q_2 的方向施予任何方式的磁梯度 $G(q_1, t)$ 、 $G(q_2, t)$ 都可以達到 space encoding 的效果，類似於理論力學的 generalized coordinates。利用 EPI 技術，一幅 MRI 圖片取像的時間在 10~100 ms 之間。

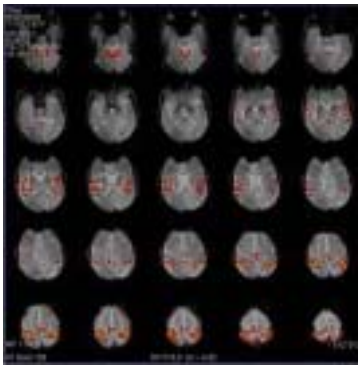


圖 a

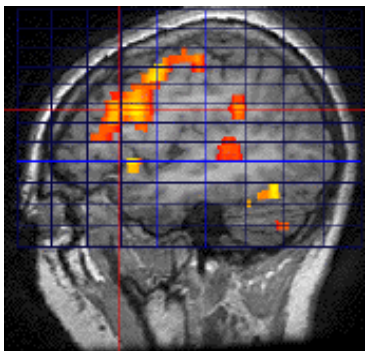
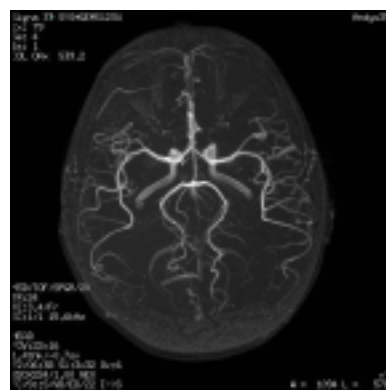
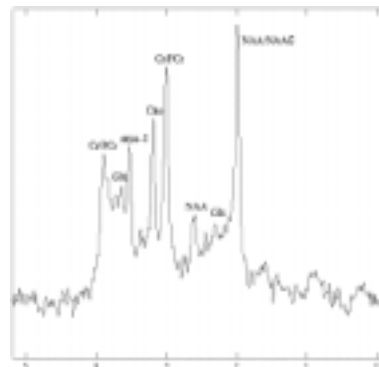


圖 b

上圖 a 是利用德國 Bruker 4.0T MRI 儀器，Echo planar image 脈衝序列，快速取得影像。紅色顯示大腦皮質活動的區域，這種特別的技術及脈衝序列，叫做 functional MRI (fMRI，功能性 MRI)。上圖 b 是人在講話，用力思考該用什麼字彙時，腦部皮質的影像變化。因為思考，所以腦部的活動會加速消耗氧分子。影像圖中紅色部份是去氧血紅素 (deoxyhemoglobin) 濃度升高 2~5% 之處。因為

是極快速成像，所以也採用 Echo planar image 脈衝序列 (取自 www.mariarc.liv.ac.uk/fmri_speech.gif，Liverpool University 醫學院 Dr. Jon Brooks 檔案圖片)。

NMR 和 MRI 還有很多有趣的應用，除了上面顯示的 functional MRI 以外，尚有下面左圖的 magnetic resonance spectroscopy (MRS 磁振頻譜)，它可以顯示組織細胞內的代謝物組成及其濃度，類似化學上的 1D proton NMR 光譜。下面右圖顯示腦部血管攝影 magnetic resonance angiography (MRA)。MRA 可以不必注射顯影劑。(www.mrprofessor.dk/mr_3t.html 檔案照片)。MRS、fMRI 及 MRA 都要使用特殊的 MRI 脈衝序列的組合。由於病人不能動，所以成像講求快速，Mansfield 的 EPI [15] 被廣泛運用到各種特殊的成像技術。



MRI 配合 MRS 或 fMRI，使現代的醫學影像技術發揮到很高的境界。擴展了醫學對人體各種生理，病理，代謝的知識。想想看，fMRI

能夠偵測你的那一部份大腦在思考，MRA 能夠偵測腦部何處血管阻塞。一個昏迷不醒的車禍病人 30 分鐘之內，MRI，MRA 腦部影像便能夠顯示出血或破裂位置，或檢查任何腦神經是否受到傷害。這些都沒有使用侵犯性的檢查工具。除了腦部與脊椎以外，身體各部位也可以測 MRI、MRS。

致謝

感謝我的碩士生楊國銘同學盡心幫忙協助圖片編輯。

參考資料：

- [1] E. M. Purcell, H. C. Torrey, and R. V. Pound, "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solid," *Phys. Rev.* **46**, 37-38 (1946).
- [2] F. Bloch, W. W. Hansen, and M. Packard, "Nuclear induction," *Phys. Rev.* **46**, 127 (1946).
- [3] 李寬容, "磁振造影診斷學", 華榮出版社, 1-166 (1990).
- [4] A. Abragam, "The Principles of nuclear magnetism," Oxford University Press (1977).
- [5] W. P. Aue, E. Bartholdi, and R. R. Ernst, "Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance," *J. Chem. Phys.* **64**, 2229-2246 (1976).
- [6] H. Kessler, M. Gehrke, and C. Griesinger, "Two-dimensional NMR spectroscopy: Background and overview of the experiments," *Angewandte Chemie, Int'l English ed.* **27**, 490-536 (1988).
- [7] F. W. Wehrli, D. Shaw, J. B. Kneeland, "Biomedical magnetic resonance imaging-principles, methodology, and applications," VCH Verlagsgesellschaft mbH (1988).
- [8] K. Wuthrich, "NMR of proteins and nucleic acids," John Wiley & Sons (1986).
- [9] S. Macura, Y. Huang, D. Suter, and R. R. Ernst, "Two-dimensional chemical exchange and cross-relaxation spectroscopy of coupled nuclear spins," *J. Magnetic Resonance* **43**, 259-281 (1981).

- [10] S. Macura, K. Wuthrich, and R. R. Ernst, "Separation and suppression of coherent transfer effects in two-dimensional NOE and chemical exchange spectroscopy," *J. Magnetic Resonance* **46**, 269-282 (1982).
- [11] K. Wuthrich, "NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel lecture)," *Angewandte Chemie, Int'l ed.* **42**, 3340-3363 (2003).
- [12] P. C. Lauterbur, "Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance," *Nature* **242**, 190-191 (1973).
- [13] A. Kumar, D. Welti, and R. R. Ernst, "NMR Fourier Zeugmatography," *J. Magnetic Resonance* **18**, 69-83 (1975).
- [14] F. W. Wehrli, "Basic principle of MR imaging," GE medical systems Signa application guide (1988).
- [15] P. Mansfield and A.A. Maudsley, "Planar spin imaging by NMR," *J. Phys. C: Solid State Phys.* **9**, L409-L412 (1976).

作者簡介

李寬容，美國羅契斯特大學博士，現任職國清華大學分子醫學研究所暨生命科學系教授。

E-mail: krlee@mx.nthu.edu.tw