

· 论 著 ·

大鼠脑缺血及再灌注损伤对大小脑核磁共振成像和波谱的影响

廖维靖 杨运煌 范明 杨万同 李丽云 刘买利

【摘要】 目的 观察大鼠脑缺血及再灌注损伤对大、小脑成像和波谱的影响。**方法** 15 只雄性 SD 大鼠, 体重 150 ~ 180 g, 随机分成正常对照组 ($n=3$)、假手术组 ($n=4$) 和缺血损伤组 ($n=8$)。制作右大脑中动脉供血阻断的模型。缺血 2 h 后, 恢复灌注, 进行 T_2 加权成像和局域质子谱检测, 时间点是缺血后即刻、1 ~ 2 h 及再灌注后 1 h、2 h、3 ~ 4 h、5 ~ 6 h、7 h、8 h、9 h、10 h、24 h 和 36 h, 观察大、小脑成像和 N-乙酰天门冬氨酸 (NAA)、肌酸/磷酸肌酸 (Cr/PCr)、胆碱 (Cho) 和乳酸 (Lac) 的变化。**结果** 与假手术组比较, 缺血损伤组右大脑高信号强度区 T_2 值增加, Cr/NAA 和 Cho/NAA 比值增大; 右小脑 Cr/NAA 和 Cho/NAA 比值增大。**结论** 缺血严重影响大、小脑神经元的存活和物质代谢。

【关键词】 缺血性脑损伤; 核磁共振; 再灌注

The impact of ischemic and reperfusion brain injury on NMR and spectroscopy of the cerebrum and cerebellum in rats LIAO Weijing*, YANG Yunhuang, FAN Ming, YANG Wantong, LI Liyun, LIU Maili. * Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Objective To investigate the imaging and spectroscopy of the cerebrum and cerebellum in ischemic and reperfusion brain injury with nuclear magnetic resonance (NMR) in rats, and explore the changes of the metabolites' levels in the brain. **Methods** Fifteen male SD rats were used, and randomly divided into three groups: group A ($n=3$) underwent no operation, group B ($n=4$) underwent sham operation, group C ($n=8$) underwent an operation for ischemic brain injury. The NMR images and its related spectroscopic characteristics, as well as the changes of the metabolites levels of the brain were then evaluated retrospectively. **Results** The hyperintense signals in the right cerebrum in group C were increased compared to those of the group B, the T_2 values were increased, while the values of the neural metabolites N-acetylaspartate (NAA) decreased, and the ratio of Cr/NAA and Cho/NAA was increased. The T_2 values in the right cerebrum of the group C were larger than that in the left. The values of NAA decreased in the right cerebellum in group C, the ratio of Cr/NAA and Cho/NAA were larger than that in the control groups. **Conclusion** The results of our study demonstrated that, neuronal viability and metabolism of the brain may seriously influenced by ischemic and reperfusion brain injury.

【Key words】 Ischemic brain injury; Nuclear magnetic resonance (NMR); Reperfusion

急性脑缺血使细胞膜 Na^+/K^+ 离子泵的功能受损, 细胞内 Na^+ 和大量的自由水聚集^[1]。缺血性脑损伤的病理生理机制是血液循环障碍, 造成细胞能量代谢衰竭, 使细胞膜释放大量的谷氨酸, 启动损伤级联反应^[2]。核磁共振技术 (nuclear magnetic resonance, NMR) 是非侵入性的功能检查手段, 可界定梗死部位、范围和水肿情况。核磁共振成像 (MRI) 对梗死区水分的变化非常敏感, 可很早确定梗死病灶^[1]。脑缺血后神经组织代谢发生变化, 动态检测代谢物含量的变化,

对了解病理过程具有重要意义。阻断大脑中动脉对小脑有无影响, 未见文献报道。本文在以往工作的基础上, 研究缺血性脑损伤对大脑、小脑 T_2 加权成像 (T_2 -weighted imaging, T_2WI) 和局域质子谱 (1H MR spectroscopy, 1H MRS) 的影响, 观察成像和神经元代谢物 N-乙酰天门冬氨酸 (N-acetyl aspartate, NAA)、肌酸/磷酸肌酸 (creatine/phosphocreatine, Cr/PCr)、胆碱 (choline, Cho) 和乳酸 (lactate, Lac) 的变化, 为深入研究缺血性脑损伤后的神经可塑性奠定基础。

资料和方法

一、动物造模

详细方法和步骤见本文作者另文介绍^[3]。雄性 Sprague Dawley 大鼠 15 只, 体重 150 ~ 180 g, 清洁级, 购自同济医科大学动物实验中心。随机分成正常对照

基金项目: 湖北省科技厅攻关项目 (No. 992P1210); 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970935); 湖北省自然科学基金资助项目 (No. 98J099)

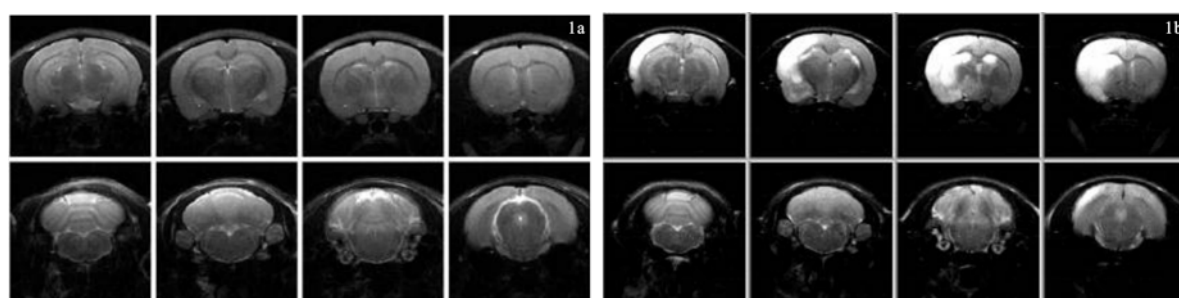
作者单位: 430071 武汉, 武汉大学中南医院康复医学科 (廖维靖、杨万同); 中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室 (杨运煌、李丽云、刘买利); 军事医学科学院基础医学研究所 (范明)

组($n=3$)、假手术组($n=4$)和缺血损伤组($n=8$)。腹腔注射乌来糖(每公斤体重注射 1 g),将 5/0 尼龙线沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至大脑中动脉起始部,造成大脑中动脉血供阻断(MCAO)。栓线的头端加热成球形,直径 0.21~0.27 mm。缺血 2 h 后,退拔栓线,恢复大脑中动脉的血供。假手术组线栓插入的深度为 1 cm,2 h 后退拔。缺血损伤组进行 T_2 WI 和 ^1H MRS 检测的时间点是缺血后即刻、1 h、2 h 及再灌注后 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h、9 h、10 h、24 h 和 36 h。该组 6 只大鼠均完成缺血后即刻、缺血 1~2 h 及再灌注后 3~4 h、5~6 h 时间点的检测,有 2

只在再灌注后 7~8 h、9~10 h、24 h 和 36 h 进行检测。正常对照组不做任何处理。

二、 T_2 WI 检测

T_2 WI 检测方法见本文作者另文介绍^[3]。Bruker Biospec 47/30 核磁共振成像仪,质子共振频率为 200 MHz,体线圈发射,表面线圈接收,最大梯度强度为 100 mT/m。多片多回波自旋回波脉冲序列,1 次完成 8 片成像,视场范围 4 cm×4 cm,包括大、小脑及其左、右侧对应的部位,成像时间 11 min。如图 1 所示。TR=2 500 ms,TE=30 ms。图像数据矩阵为 256×256。



1a 正常对照组,大、小脑结构对称,密度均匀;1b 缺血损伤组,缺血 2 h,再灌注 24 h,大脑见梗死灶,小脑无梗死灶和高信号强度区

图 1 正常对照组与缺血损伤组大鼠大、小脑的 8 片成像

三、 ^1H MRS 检测

^1H MRS 扫描前自动匀场,化学位移抑制(chemical shift suppression, CHESS)压水峰、受激回波采样定域技术(stimulated echo acquisition mode, STEAM)选体元。在 T_2 加权像上,对大脑顶、颞叶新皮质的高信号强度区,选取 2.1 mm×2.1 mm×2.1 mm 大小的正方体进行 ^1H MRS 的检测。测试时间 15 min,重复时间 2 500 ms。在小脑选取同样大小的正方体进行 ^1H MRS 的检测。 ^1H MRS 的处理是将采集的原始信号经傅立叶变换成谱图,进行相位和基线校正,将 NAA 峰定标在 2.02 ppm。计算出各峰的积分面积。以 NAA 峰作为标准,将各峰线下面积的积分值与之比较,得到 Cr/NAA、Cho/NAA 比值。以 1e-5 作为内参标准,得到 Cr、Cho 的相对定量值。

四、统计学分析

用 SAS 软件进行统计学处理。各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各时间点的显著性差异采用方差分析。

结 果

一、 T_2 WI 检测

图 1 为动物大、小脑的 8 片成像。正常对照组大、小脑组织双侧对称,密度均匀,无结构改变(图 1a 和图

2a), T_2 值分别为 55.82 ± 3.84 和 57.45 ± 2.56 。假手术组的成像与正常对照组相似(图 2b)。缺血损伤组在缺血后 2 h、4 h 和 6 h,右侧大脑顶叶、颞叶和外侧尾壳核出现高信号强度区,3~4 h 和 5~6 h 的 T_2 值分别为 65.64 ± 3.11 和 72.71 ± 3.09 ,提示存在缺血损伤病灶(图 2c)。8 h 和 10 h 大脑结构明显不对称,右脑肿胀,在 24 h 见到界限分明的梗死灶,而小脑未见高信号强度区(图 1b)。3 组动物小脑 T_2 值未见显著性差异。大、小脑 T_2 值见表 1。左、右侧对照及其他时间点的结果将另文报告。

二、 ^1H MRS 分析

NAA、Cr/PCr 和 Cho 的化学位移分别是 2.02、3.0 和 3.2 ppm,呈正向峰。乳酸的化学位移是 1.33 ppm,呈负向峰。正常对照组右大脑 NAA、Cr/NAA 和 Cho/NAA 值分别为 1.070 ± 0.07 和 0.43 ± 0.08 ,假手术组与之差异无显著性。缺血损伤 0.5 h,右大脑观察到乳酸峰(图 3b)。再灌注 3~4 h、5~6 h 时,Cr/NAA 和 Cho/NAA 比值大于假手术组($P < 0.05$),提示大脑神经元的物质代谢受损(图 3c 和表 2)。

正常对照组和假手术组右侧小脑的波谱变化与大脑相似。与假手术组比较,缺血损伤组右小脑的 NAA 值减小,Cr/NAA 和 Cho/NAA 比值趋于增大,提示小脑神经元的物质代谢因 MCAO 而受到影响(图 4)。

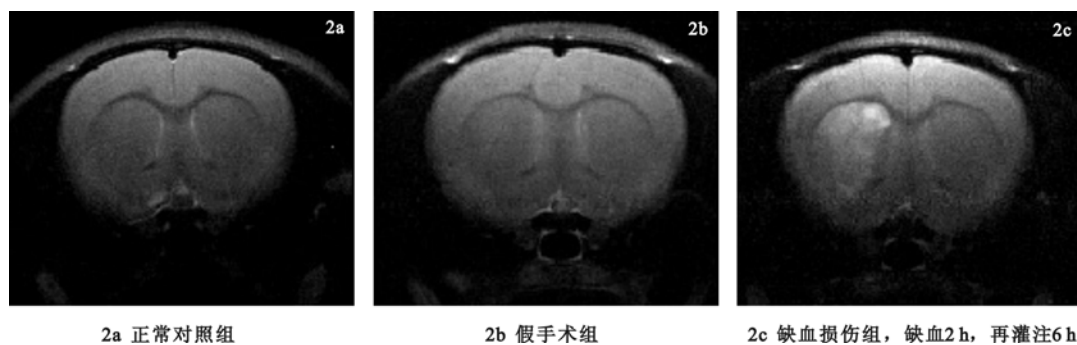


图2 正常对照组、假手术组和缺血损伤组的成像

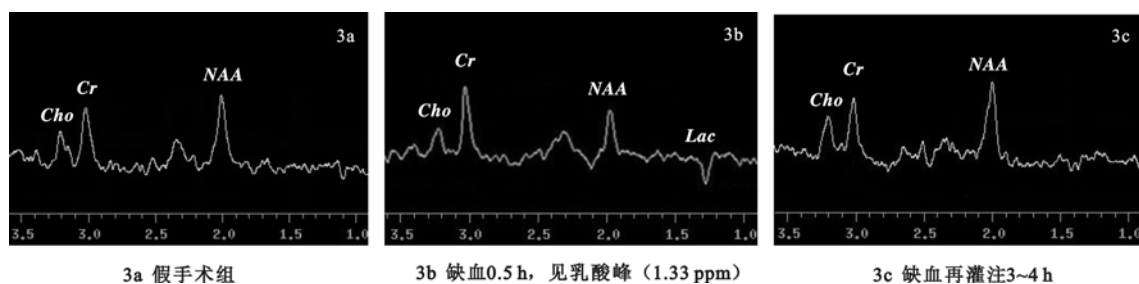


图3 缺血损伤组与假手术组大脑的波谱分析

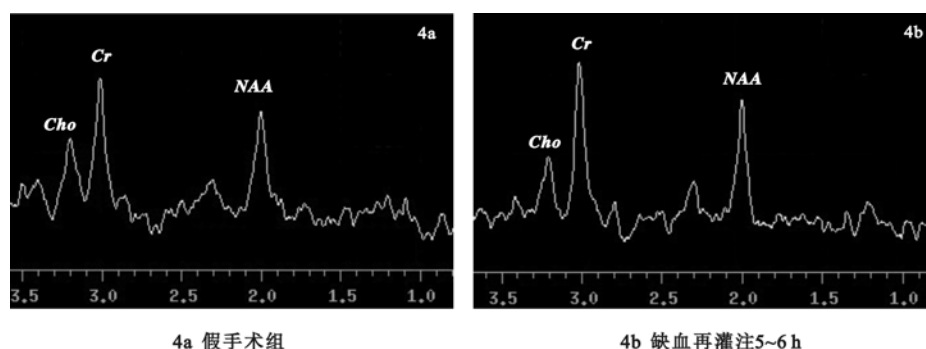


图4 缺血损伤组与假手术组小脑的波谱分析

表1 3组右侧大、小脑各时间点的 T_2 值($ms, \bar{x} \pm s$)

组 别	大 脑			小 脑		
	正常	再灌注 3~4 h	再灌注 5~6 h	正常	再灌注 3~4 h	再灌注 5~6 h
正常对照组	55.82 ± 3.84	—	—	57.45 ± 2.56	—	—
假手术组	—	56.51 ± 3.82	59.87 ± 2.01	—	57.27 ± 3.21	58.72 ± 3.51
缺血损伤组	—	65.64 ± 3.11 *	72.71 ± 3.09 *	—	58.34 ± 3.38	61.17 ± 2.39

注: * 缺血损伤组与假手术组比较, $P < 0.05$

表2 假手术组和缺血损伤组右侧大脑、小脑 NAA、Cr/NAA 和 Cho/NAA 比值

组 别	再灌注 3~4 h			再灌注 5~6 h		
	NAA(ppm)	Cr/NAA	Cho/NAA	NAA(ppm)	Cr/NAA	Cho/NAA
大脑						
假手术组	1	0.69 ± 0.07	0.43 ± 0.06	1	0.67 ± 0.07	0.41 ± 0.05
缺血损伤组	1	0.99 ± 0.06 *	0.77 ± 0.12 *	1	0.97 ± 0.12 *	0.73 ± 0.15 *
小脑						
假手术组	1	0.79 ± 0.10	0.38 ± 0.07	1	0.94 ± 0.08	0.48 ± 0.07
缺血损伤组	1	1.10 ± 0.13 *	0.70 ± 0.10 *	1	1.50 ± 0.09 *	0.73 ± 0.10 *

注: * 缺血损伤组与假手术组在相同时间点比较, $P < 0.05$

讨 论

动态评定脑损伤程度的准确性是 NMR 技术最显著的优点,其它仪器无法比拟。 T_2 WI 反映移动状态的水,可敏感显示脑梗死^[1]。连续观察这一变化能评价缺血性脑损伤组织损害的程度。缺血后病灶组织产生水肿,短时间内有大量的自由水聚集,使组织的弛豫时间 T_2 增加,在 T_2 WI 上呈现高信号强度区。缺血早期膜离子泵功能障碍,钠离子和水分子移入细胞内。进入细胞内的水,由于细胞膜和细胞器的限制,其分子弥散活动受到限制,加上细胞间隙的游离水减少,导致 T_2 WI 出现明显高信号。高信号反映了细胞水肿的程度。MRS 检测是通过分析代谢物质的波谱改变,了解神经组织代谢物质的含量,以判断神经元的存活状况和功能。因此,MRI 和 MRS 成为评定缺血性脑损伤神经可塑性的有效工具。以往国内的 NMR 研究多观察缺血对大脑成像的影响,而对反映物质代谢变化的波谱研究较少,未见 MCAO 对小脑成像和波谱变化的影响。本文观察大、小脑成像及 NAA、Cr、Cho 和 Lac 的变化,旨在从多方面揭示 MCAO 对大、小脑的影响。

MCAO 2 h 后,MCA 供应区域有高信号强度区,随缺血时间延长,范围逐渐扩大,最后形成界限分明的梗死灶。缺血损伤组右大脑顶叶、颞叶和外侧尾壳核散在分布于孤立的小片状的高信号区,可能是组织学术语所描述的缺血核心区,而低信号区可能是半暗带 (penumbra)^[3]。随缺血时间延长,核心区扩大到半暗带。Palmer^[4]报道皮质梗死的核心区相对面积是 0 ~ 56.12%,整个皮质损伤的相对区域是 0 ~ 64.5%,成像显示纹状体有大面积的梗死区。本文结果与 Palmer 的研究相符。就目前技术而言,跟组织学不能从形态结构上完全区分缺血核心区和半暗带一样,MRI 暂不能明确区分缺血核心区和半暗带。尽管如此, ^1H MRS 却对判断神经元的功能却非常有帮助。 ^1H MRS 可以检测的物质约 20 种,每种物质的波谱有特定的峰,根据其峰值大小可判断该物质在体内的含量。NAA、Cr 和 Cho 是最容易被检测的物质。NAA 仅存在于神经组织,是神经元代谢的标志物,其强度或积分值(含量)可灵敏地反映神经元死亡和功能受损的状况,可视为神经可塑性的标志物。Cr 是能量代谢分子,其值的大小反映细胞的能量平衡。Cho 是细胞膜脂质的组成成分,

反映细胞膜的合成与髓鞘的降解。脑组织出现乳酸峰时,提示缺血、缺氧,有氧呼吸受到抑制,能量代谢紊乱,无氧酵解加重。

小脑的血液供应来自基底动脉发出的小脑上动脉、小脑前下动脉和椎动脉发出的小脑后下动脉,与颈内动脉无直接联系。MCAO 后,小脑神经元代谢物水平发生变化,是什么原因使然? 新近研究显示大脑缺血时其远隔部位(如小脑)会出现相应的变化^[5],表现为远隔功能抑制或神经机能联系不能(diaschisis)。这一功能变化的基础是否有物质代谢的变化,过去一直不清。本文显示小脑的成像没有变化,但神经元代谢物质 NAA 值、Cr/NAA 和 Cho/NAA 比值出现变化,提示小脑的功能因 MCAO 而有部分受损^[5],这对临床治疗缺血性脑损伤应同时关注大、小脑具有重要意义。Rubin^[6]的研究显示,MCAO 后的患者,与缺血损伤大脑同侧的小脑,血流量下降,为重视小脑的代谢改变提供重要证据。限于条件,本研究观察的时间在 36 h 以内,对神经可塑性而言,理应将观察时间延长。实验研究中,麻醉药必须准确足量,使动物呈深麻醉状态,否则生理性的呼吸活动都将使结果发生变化,而不得不重新采样。因仪器及检测费用昂贵,限制了 NMR 技术作为常规手段的使用。

参 考 文 献

- 1 丁广良,胡红兵,王新兵,等. 用核磁共振成像研究大白鼠的光化学反应脑缺血模型. 波谱学杂志, 1999, 16: 1-4.
- 2 廖维靖, Frank Wiegand, Ulrich Dirnagl. 脑缺血损伤的病理生理机制-损伤级联反应(综述). 国外医学脑血管疾病分册, 1998, 6: 197-202.
- 3 廖维靖,刘淑红,范明,等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良及讨论. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 345-348.
- 4 Palmer GC, Peeling J, Corbett D, et al. T_2 -weighted MRI correlates with long-term histopathology, neurology scores, and skilled motor behavior in a rat stroke model. Ann N Y Acad Sci, 2001, 939: 283-296.
- 5 Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, et al. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20: 1149-1165.
- 6 Rubin G, Levy EI, Scarrow AM, et al. Remote effects of acute ischemic stroke: A xenon CT cerebral blood flow study. Cerebrvasc Dis, 2000, 10: 221-228.

(收稿日期:2002-05-17)

(本文编辑:阮仕衡)