

MR-T₂WI 对脑梗死家犬 VEGF 质粒治疗效果的评价

• 实验研究 •

武柏林, 汪国石, 刘怀军, 王藏海, 王立新, 王鉴, 屈长强, 池琛, 黄勃源

【摘要】 目的: 拟用 MRI 追踪观察 VEGF 质粒对局灶性脑梗死家犬疾病模型的治疗效果。方法: 18 只健康成年家犬, 制成模型后随机分成 3 组(3、7 和 8 只), 组内分 2 个亚组, 实验组给予 pcD2/hVEGF₁₂₁ 重组质粒 600 μ g, 对照组给等量生理盐水。重复进行 MR 扫描, 序列为 T₁WI、T₂WI、3D-TOF MRA、FLAIR、CE T₁WI。处死后选择病变部位分别进行 HE 染色、CD34 和 VEGF 免疫组化染色, 光镜和电镜观察。用 SPSS 10.0 方差分析法分析不同时间组间 T₂r、MVC、VEGF 免疫阳性细胞数的差异。结果: 术后 4h 可见到病变区 T₂WI 高信号, 病变部位 T₂ 信号强度由 24h 的 4040.00 $\pm$ 468.66 升高到 2 周时的 4806.80 $\pm$ 739.52。T₂r 升高, 2 周时组间 T₂r 差异有显著性意义($P=0.006$)。T₂r 变化与 MVC 之间存在显著的相关关系($r=0.677, P<0.01$)。结论: VEGF 质粒的应用促进了梗死后侧支循环的建立。MRI 可以对基因治疗效果作出定量或半定量的评价。

【关键词】 磁共振成像; 脑梗死; 疾病模型; 动物; 血管内皮生长因子; 犬

【中图分类号】 R445.2; R743.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2003)11-0841-04

The curative effect of VEGF gene therapy of canine brain infarction: MR evaluation WU Baolin, WANG Guoshi, LIU Huaijun, et al. Department of Radiology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, P. R. China

【Abstract】 Objective: to evaluate the curative effect of VEGF plasmid in canine cerebral infarction by MR. **Methods:** 18 adult dogs of infarction model were divided into three groups randomly, and each group was divided into two subgroups as the experimental and control group. The experimental group was administrated pcD2/hVEGF₁₂₁ plasmid of 600 μ g and the control group given the same amount of saline. MR scanning with T₁WI, T₂WI, FLAIR, 3D-TOF-MRA sequences was performed repeatedly. After various survival times, dogs were sacrificed and the specimens were stained with HE, and examined with immunohistochemistry and light microscopy or electron microscopy. The microbloodvessel count (MVC), VEGF immunostained cells and T₂r were calculated and analyzed by the software SPSS 10.0 for windows. **Results:** High signal intensity of infarcted tissue was shown four hours after stroke on T₂WI. The signal intensity elevated from 4040.00 $\pm$ 468.66 at 24 hour to 4806.80 $\pm$ 739.52 at 2 week. Significant difference of T₂r between groups appeared within 1~2 weeks ($P=0.006$). There was significant positive correlation between T₂r and MVC ($r=0.677, P<0.01$). **Conclusion:** The application of pcD2/hVEGF₁₂₁ plasmid can promote the formation of collateral vessel. MRI can be used to assess the curative effect of VEGF plasmid in the brain infarction quantitatively or semiquantitatively.

【Key words】 Magnetic resonance imaging; Cerebral infarction; Disease model, Animal; Vascular endothelial growth factor (VEGF); Canine

脑梗死是一种发病率、死亡率和致残率都很高的疾病。研究证明缺血性中风发生后, 组织中血供的不足和氧分压下降通常会导致新生血管的生成, 在此过程中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)发挥了重要作用。近年来磁共振新技术的发展使脑梗死的早期诊断成为可能, 但常规扫描序列中反应组织固有特征的 T₂ 值或 T₂ 信号强度和 FLAIR 在涉及亚急性和慢性的实验中仍是不可缺少的。本课题对脑梗死家犬 VEGF 质粒局部给药后 T₂ 信号强度的变化进行观察; 并同形态学和免疫组化染色结果进行对照研究。

材料与方法

1. 动物准备

18 只 10~15kg 健康成年家犬, 雌雄不限, 随机分为 3 组, 第 1 组 3 只, 第 2 组 7 只, 第 3 组 8 只。第 1 组动物于手术次日

第二次 MR 扫描后处死, 该组全部为对照组; 第 2 组动物于术后 1 周处死, 其中 3 只为生理盐水对照组, 4 只为实验组; 第 3 组动物于术后 2 周处死, 其中 3 只属于对照组, 5 只属于实验组。实验前 12h 禁食, 戊巴比妥钠 60mg/kg 静脉注射麻醉, 股动脉插管, 导管送栓子入大脑中动脉制作成家犬动物模型^[1]。

2. MR 检查

采用东芝 1.5T MR 系统, Oxford 自屏蔽磁体, 主动匀场, 梯度场强为 23mT/m, 膝关节正交发射接收线圈, 配 SGI 图像后处理工作站。分别于手术当日、2、3、7 和 14d 进行重复扫描。扫描序列包括 SE-T₁、FSE-T₂、FLAIR、3D-TOF-MRA 和对比增强 T₁WI。T₁WI 的参数为 TR 500, TE 15, NAQ 2.0, 矩阵 256 $\times$ 320, FOV 16cm $\times$ 16cm, 层厚 6mm, 层面设置为平行于岩骨和小脑幕的类似冠状位。T₂WI 的参数为 TR 4000, TE 108, 矩阵 256 $\times$ 400, FOV 16cm $\times$ 16cm。FLAIR 序列参数为, TR 9000, TE 120, TI 300ms, 回波链 17, 采集矩阵 192 $\times$ 256, NAQ 2.0。

3. pcD2/hVEGF₁₂₁ 真核表达质粒的导入

作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二附属医院放射科
作者简介: 武柏林(1973~), 女, 河北省承德市人, 硕士, 住院医师, 主要从事中枢神经系统放射学诊断工作。

pcD₂/hVEGF₁₂₁真核表达质粒购自北京医科大学心血管基础研究所。首次 MR 检查结束后,依据 T₂WI 图像显示的病变部位,参考定位图及体表定位标志确定给药的部位及方向。表面麻醉后头皮切口,钝性分离肌肉等软组织到颅骨,用装有直径 2mm 钻头的充电便携式骨钻轻轻打一小孔,微量注射器注入含 pcD₂/hVEGF₁₂₁质粒的溶液 0.5ml(500~600μg)。对照组给予等量生理盐水,其余操作步骤与实验组相同。

4. 形态学观察

经心脏灌注固定后,开颅以 MR 图像为参照,取动物的梗死区、梗死边缘区及对侧相应区域进行 HE 染色,光镜观察。抽实验动物 2 只,对照动物 1 只,另取 1~2mm³ 大小的标本,常规处理后用日本电子公司 JEM-1230 型透射电镜进行观察。

5. 免疫组化染色及微血管计数(MVC)

CD34 免疫组化染色进行微血管计数,同时进行 VEGF 免疫组化染色观察内源性和外源性 VEGF 的表达情况。采用常规的 ABC 法,兔抗人 VEGF 单克隆抗体和鼠抗人 CD34 多克隆抗体购自武汉博士德公司,其它所用常规试剂购自北京中山生物技术有限公司。

每只动物挑选较为理想的 10 张片子,低倍镜下寻找毛细血管密集区,换 400 倍镜下随机挑选 4 个视野进行毛细血管计数。镜下见到 CD34 染成棕色的血管内皮细胞或内皮细胞簇,只要它们和邻近的微血管、神经细胞或其它结缔组织分开就视为一个微血管。计数以切面计,以 4 个视野平均值为该切片的 MVC。同样方法计数胞浆染为棕黄色的 VEGF 免疫阳性细胞数。以上两组切片的观察计数者应不了解动物分组情况和切片来源。

6. MR 图像后处理

①兴趣区选择:因为不同结构(皮层、下丘脑、基底节等)的 T₂ 信号强度有所不同,故无法确定单一的域值划分健康脑组织和缺血梗死区。在明显的高信号区选择 1mm² 兴趣区,复制到 T₂WI 像和其它 MR 图像上。兴趣区选择以皮层为主,适当避开缺血中心区。为了减少动物个体差异对实验结果的影响,测量兴趣区的信号强度,计算 T_{2r}(lesion to normal tissue signal intensity ratio)对各组图像进行比较。要求神经放射学医生按次序分析每只动物的多次 MR 检查结果,使兴趣区的选择前后一致。②梗死体积的计算:以 24h 时的 T₂ 像为基础,参照 FLAIR 表现,根据 Kothari 的方法计算梗死体积^[2]。因模型的限制,为减少实验动物用量,计算每只动物梗死体积变化率用于统计分析,以中和个体间的差异。计算如下

$$\frac{(\text{本次梗死体积} - 24\text{h 梗死体积}) \times 100\%}{24\text{h 梗死体积}}$$

7. 统计分析

采用 SPSS10.0 for windows 统计分析软件方差分析法比较不同取材时间、组间 VEGF 免疫阳性细胞数、MVC、梗死体积变化率和 T_{2r} 的差异;分析 MR 信号改变同免疫组化染色结果之间是否存在相关关系。

将 $\alpha = 0.05$ 定为显著性水准实验中如果因动物死亡,MR 扫描过程中中途苏醒,机械故障等原因造成的原始数据缺失,取同水平其它观测量的均值取代。

结 果

1. 一般症状

术后第二天,动物苏醒后表现出肢体无力、抽搐、走路倾斜等梗死表现。存活动物症状恢复很快,1 周时大部分动物已经恢复表现上的正常状态,另有 1 只动物病情恶化死亡。

2. 形态学检查结果

HE 染色 24h 神经细胞胞浆肿胀,尼氏体减少或消失,表明神经元处于缺血的早期反应阶段。1 周时病变神经元数量明显增多,病灶周围中性多形核细胞浸润,可见“格子细胞”。病灶周围毛细血管增多。2 周时可见满布视野的“格子细胞”,周围大量的新生毛细血管。

电镜观察病变组织水肿,轴索膨胀变性。神经元核周围可见肿胀的线粒体,扩张的内质网形成的微空泡以及大量脂褐素颗粒,坏死的神经元核固缩,周围可见外溢的各种散在细胞器(图 1、2)。

3. MVC 及 VEGF 免疫阳性细胞计数

CD34 免疫组化染色后,切片背景清晰,因灌注固定,血管形态饱满,腔内少见红细胞及其它血液细胞。内皮细胞染成棕黄色,部分血管无明显管腔,呈条索状,有时可见单个或成团的内皮细胞。VEGF 免疫组化染色发现梗死周边区的内皮细胞和血管基底膜大多表现为强阳性,部分神经细胞和胶质细胞也呈现不同程度的免疫阳性。免疫阳性细胞表现为胞浆着色,呈棕黄色(图 1)。

表 1 为根据 CD34 染色得到的 MVC 结果。2 周时患侧实验组和对照组之间 MVC 差异有显著性意义($P < 0.01$)。在 MVC 变化的同时,该部位 VEGF 免疫阳性细胞的数目也显著增加。相关分析结果显示 MVC 的变化与 VEGF 阳性细胞数之间存在显著的相关关系, Pearson 相关系数为 0.668($P < 0.01$),表明处理因素的不同及侧别不同都对 MVC 的结果产生了影响,内源性和外源性 VEGF 引起了不同处理组及侧别 MVC 的差异。

4. 磁共振成像检查结果

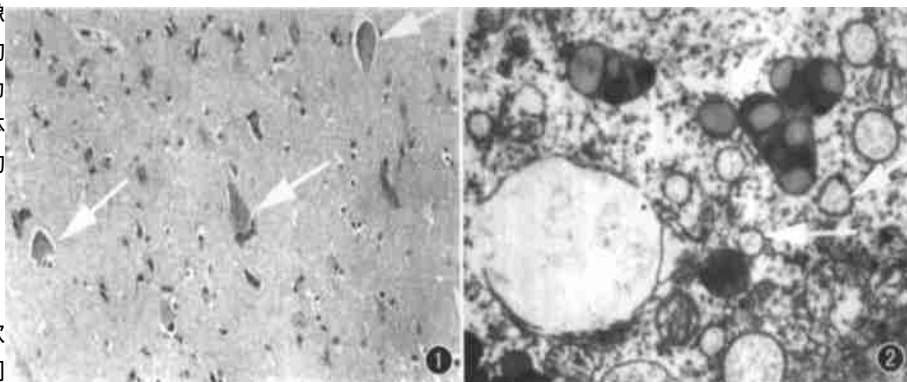


图 1 组织水肿,多个病变神经原(HE×200)(箭)。

图 2 核溶解固缩,细胞器结构难以辨认,胞浆中微空泡(箭)形成(EM×10K)。

表 1 各时间组间 MVC 方差分析结果 (个 × 400)

侧别	分组	24h	1 周	2 周	F 值	P 值
患侧	实验组		16.50 ± 4.22	28.80 ± 3.29*	52.755	0.0000
	对照组	9.50 ± 2.78	15.20 ± 2.78	20.70 ± 4.47	23.019	0.0000
对侧	实验组		11.80 ± 2.77	16.10 ± 2.77	12.015	0.003
	对照组	9.38 ± 2.92	10.50 ± 2.07	15.10 ± 2.88	12.468	0.002
F、P 值	实验组		8.64(0.009)	87.184(0.000)		
	对照组	0.008(0.931)	18.39(0.000)	11.068(0.004)		

注: * 按 0.05 的水准组间差异具显著性意义 ** 按 0.01 的水准组差异具显著性意义。

大部分实验动物在术后 4h 首次 MR 扫描结束时已经表现出病变区 T₂WI 的高信号。肉眼观察改变的明显程度同病变范围的大小十分有关。如果梗死体积小, 比如小到同侧半球体积的 10% 左右, 那么, 往往要到 24h 时才可以观察到 T₂ 信号升高改变。24h T₂WI 显示, 家犬对侧半球灰质 T₂ 信号强度为 3232.57 ± 457.88。在整个实验过程中, 病变部位 T₂ 信号升高由 24h 的 4040.00 ± 468.66 到 2 周时的 4806.80 ± 739.52。

根据 18 只狗, 60 次 MR 扫描结果得出的 T_{2r} 随时间变化箱式(图 7)。如图显示不同处理组, 不同扫描时间 T₂ 信号强度的变化不尽相同, 虽然两组动物病变区的 T_{2r} 都呈上升趋势, 但生理盐水对照组 T₂ 信号强度的上升更快。这个变化在 1~2 周时表现最为明显。具体的方差分析结果见表 2。

表 2 各组不同时间 T_{2r} 的方差分析结果

时间	实验组 T _{2r}	对照组 T _{2r}	F	P
4h	1.1700 ± 0.0925	1.2367 ± 0.1030	2.089	0.168
24h	1.3444 ± 0.1107	1.2933 ± 0.1352	0.770	0.393
3 天	1.3311 ± 0.0629	1.3867 ± 0.0997	1.774	0.206
1 周	1.3978 ± 0.1077	1.5183 ± 0.0691	5.831	0.031
2 周	1.4280 ± 0.1099	1.7367 ± 0.0777	17.761	0.006
F 值	16.549	8.510		
P 值	0.000	0.000		

FLAIR 对显示皮层水肿十分敏感, 早期即可表现为患侧皮层肿胀, 灰白质分界不清, 结构模糊。MRA 可很好地显示基底动脉环及其次级分支, 但无法显示更小的分支血管(图 3~6)。

5. 梗死体积的变化

根据 T₂WI 参考 FLAIR 像测得术后 24h 梗死体积平均为同侧半球的 (31.57 ± 11.24) %。随后 3d 内对照组梗死体积增加了约 26%, 达同侧半球的 36% ~ 40%。实验组梗死体积增加了约 21%, 略低于对照组, 统计学检验此时二者之间差异有显著性意义 (P = 0.013)。此后几天实验组梗死体积无显著变化, 但对照组体积变化仍然在进展。组间在 2 周时再次表现出显著性差异 (P = 0.018)。

讨 论

基因治疗可定义为通过向人体组织内转移基因达到治疗人类疾病的目的。对于心脏和中枢神经系统无法反复操作的部位, 尝试基因治疗是有意义的。与以往的化学疗法相比, 基因治疗的优势在于它可以持续表达细胞趋化或生长因子, 对靶细胞产生较为持久的作用; 但基因载体的免疫源性可能会带来一些远期的不利影响。因此, 转染基因的方法必须是绝对安

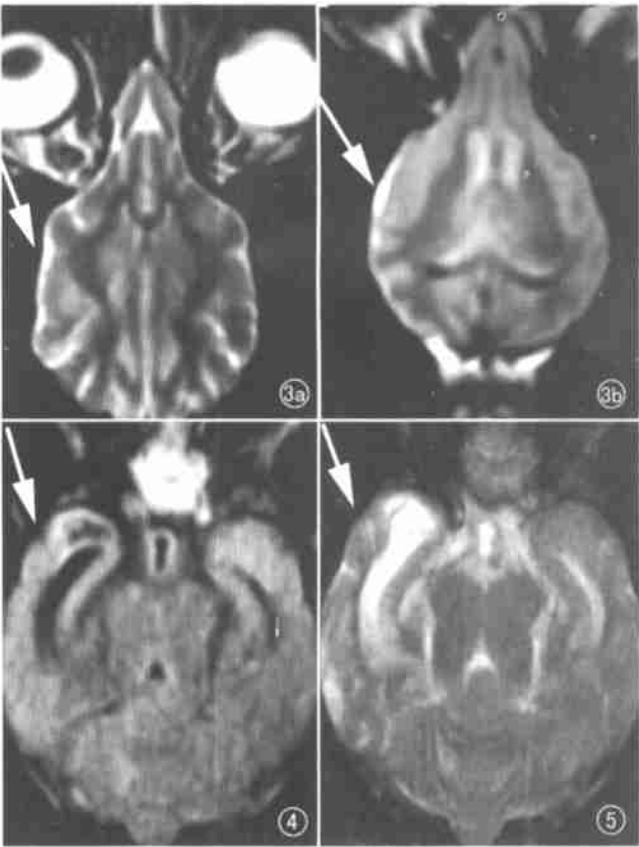


图 3 a) 4h 的 T₂WI 示梗死区信号增高(箭); b) 4h FLAIR 像, 患侧皮层信号增高, 肿胀, 皮髓质分界模糊(箭)。图 4、5 2 周后的 T₁WI 和 T₂WI 像, 示软化灶形成(箭)。

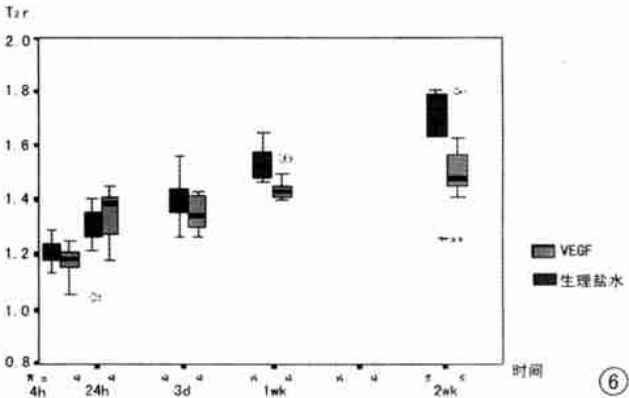


图 6 不同处理组 T_{2r} 随时间变化箱式图。

全的。最近,人们倾向于选择质粒作为转染 VEGF 等治疗基因的方式,与病毒载体相比通常认为它是无毒的,可以被许多细胞低剂量摄取,同时往往不被细胞监视系统识别^[3]。在可引起新生血管生长的众多生物因子中,VEGF 占有重要地位,它可以在令人吃惊的低浓度下起作用($< 1 \text{ nmol/l}$),其增加血管通透性的作用是组织胺的 50000 倍。当前的研究结果倾向于认为 VEGF 具有神经保护作用和刺激侧支循环建立的双重作用,适用于中风急性期的治疗^[4]。本实验选择局部给药可保证感兴趣区附近的较高浓度,有利于影像学观察。

T_2 值的升高代表血管源性水肿的发生,因此对 T_2 WI 高信号进行定量地分析可以评价梗死进展过程中血管源性水肿的进展^[5,6]。梗死进展过程中,随着血管源性水肿的发生,脑组织局部含水量上升导致 T_2 值上升,这种变化可以由 T_2 WI 信号强度直接反应,故选择 T_2 信号强度作为追踪观察的指标。形态学观察和免疫组化证实采用 VEGF 质粒基因治疗后,随时间进展,1~2 周时局部微血管明显增生超过对侧和对照组,伴 VEGF 蛋白含量上升。实验组梗死部位 T_2 信号强度升高速度慢于对照组,反应实验组坏死液化的进程减慢;同样,实验组在最初几天内梗死体积进展比较慢,似乎病情恶化的程度也有所控制,这从另一个侧面支持了我们的推测。

综上所述,MR 传统扫描序列 T_2 WI、FLAIR 及 MRA 相结

合,在亚急性、慢性实验研究中仍是十分重要的。但受到大动物的限制,研究的样本量还不够大,还缺乏 7~14d 更为细致的观察或更长期的观察,针对强化表现进行更为细致的研究也许能提供更多更有用的信息。

参考文献:

- [1] 武柏林,刘怀军,汪国石,等.一种不开颅微创的家犬局灶性脑缺血疾病模型制作方法[J].中国医学影像学杂志,2003,10(1):51-55.
- [2] Kothari RU, Brott T, Broderick JP, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes[J]. Stroke, 1996, 27(8): 1304-1305.
- [3] Patterson C, Runge MS. Therapeutic myocardial angiogenesis via vascular endothelial growth factor gene therapy moving on down the road[J]. Circulation, 2000, 102(8): 940-942.
- [4] Taub PJ, Silver L, Weinberg H. Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factors as gene therapy for angiogenesis[J]. Plastic and reconstructive surgery, 2000, 105(3): 1034-1042.
- [5] Loubinoux I, Volk A, Borredon J, et al. Spreading of vasogenic edema and cytotoxic edema assessed by quantitative diffusion and T_2 magnetic resonance imaging[J]. Stroke, 1997, 28(2): 419-426.
- [6] Mueller D, Yuh W, Fisher D, et al. Arterial enhancement in acute cerebral ischemic: clinical and angiographic correlation[J]. AJNR, 1993, 14(3): 661-668. (2003-01-13 收稿 2003-06-27 修回)

两肺马尔尼菲青霉菌感染一例

• 病例报道 •

张万强, 牛倩, 苏仲生

【中图分类号】R563; R814.42 【文献标识码】D 【文章编号】1000-0313(2003)11-0844-01

病例资料 患者,男,30岁,反复咳嗽、咳痰、低热1年余,反复口腔溃疡2年余。曾在云南省中越边界野外工作3年。胸部CT片示:两肺上中野大片状实变影,边缘模糊,伴有多个较大囊状影,直径1~10cm,其壁较薄,厚度0.2~0.5cm,内壁光滑,支气管通畅,未见液平(图1)。CT诊断:两肺真菌感染。曾多次口腔溃疡病理活检诊断为马尔尼菲青霉菌病(病理检查由

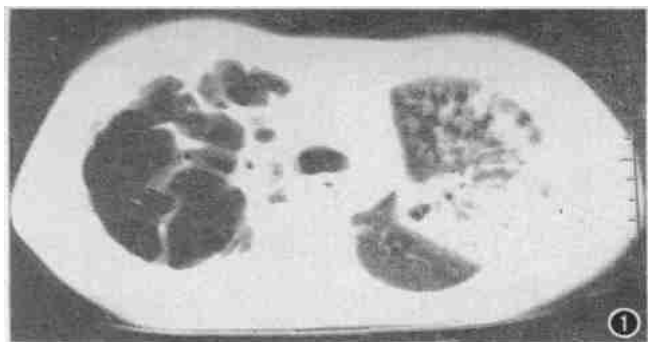


图1 左肺上叶实变,边缘模糊,其中可见大小不等囊状影,右肺上叶见多发性较大囊状影,壁较薄。

甘肃省人民医院完成)。经临床抗真菌和增强免疫治疗后,两肺感染和口腔溃疡痊愈。

讨论 本病亦称组织胞浆菌病,是一种罕见的真菌感染性疾病,是真菌中唯一的温度呈双相型的致病菌。该病好发于东南亚地区,其它地区发病者亦有该地区旅行史。本病可发生于健康者,但多见于免疫缺陷或免疫功能受抑制者。本病常累及肺、肝脏、脑、骨骼、肠道、皮肤等器官,该病是侵犯网状内皮系统为主的深部真菌病,病菌随飞沫经呼吸道吸入肺内,播散至局部淋巴结,形成原发性肺组织胞浆菌病。主要病理变化为弥漫性组织细胞增生、中心坏死和白细胞反应而形成脓肿^[1]。CT表现多为两肺弥漫性网状结节影、弥漫性或局限性蜂窝状病变(图1),常伴有间质性浸润等。CT诊断本病无特异性,临床诊断较为困难,本病的最后确诊需结合临床资料、真菌培养或组织病理检查^[2]。本例曾多次患口腔溃疡,CT呈多形态性、多灶性,临床抗真菌和增强免疫治疗后痊愈。

本病应与肺脓肿、肺结核空洞形成和肺囊肿合并感染、结节病、白血病、霍奇金病等鉴别。

参考文献:

- [1] 冯亮. CT读片指南[M]. 南京:江苏科技出版社,2000. 226.
- [2] 周康荣. 胸部颈部CT[M]. 上海:上海医科大学出版社,1996. 91. (2003-03-04 收稿 2003-05-29 修回)

作者单位:744600 甘肃,庄浪县人民医院CT室
作者简介:张万强(1970~),男,甘肃庄浪人,主治医师,主要从事CT诊断工作。