

· 实验研究 ·

新生猪缺氧缺血性脑病模型可逆缺血区的 ADC 值与 HSP 70 对照研究

郭岳霖, 刘国瑞, 程英, 饶海冰, 郑文斌, 关计添

【摘要】 目的: 利用磁共振 ADC 值测量与 HSP 70 免疫组化检测技术, 研究新生猪急性期重度缺氧缺血性脑病 (HIE) 模型脑部可逆缺血区的存在与否及其演变规律。方法: 7 日龄健康新生约克猪 45 只随机分为正常对照组 (5 只) 和 HIE 组 (40 只)。HIE 组于缺氧缺血后 24h 内不同时间点采集 ADC 值与 HSP 70 资料。ADC 值测量与 HSP 70 阳性细胞计数采用 ADC 值最低的区域至 ADC 值正常区域等距 4 分区法。结果: HIE 组 区 ADC 值下降的幅度最大, 随时间呈先降后升的变化规律, HSP 70 阳性细胞计数随时间未见明显变化, 病变趋向坏死; 区、区 ADC 值下降的幅度依次递减并随时间逐渐上升; 区 ADC 值保持正常水平; ~ 区 HSP 70 阳性细胞计数均随时间明显增加, 病变趋向可逆。结论: HIE 病理演变过程中的 ADC 值与 HSP 70 表达之间具有很好的 consistency, ADC 值变化具有鉴别 HIE 过程中脑组织坏死和可逆脑缺血损伤的能力。

【关键词】 缺氧缺血, 脑; 模型, 动物; 磁共振成像; 表观扩散系数; 热休克蛋白 70

【中图分类号】 R445.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2005)11-0941-04

Experimental Study on Reversible Acute Severe Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Piglet Model: Comparison of ADC Values with HSP 70 GUO Yue-Lin, LIU Guo-rui, CHENG Ying, et al. Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Guangdong 515041, P. R. China

【Abstract】 Objective: To study reversible cerebral ischemia regions of acute severe hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) in piglet model by MRI ADC values and HSP 70. **Methods:** Seven days old piglets ($n=45$) were divided into 2 groups at random: group A (normal control group, $n=5$) and group B (HIE group, $n=40$, produced by bilateral common carotid artery occlusion and then inspiration of 4% oxygen about 1 hour). On ADC maps, 4 regions of interest (ROI) were set from the minimum ADC values point to the normal ADC values area, and named ROI₁, ROI₂, ROI₃, ROI₄ in order. The data of ADC values and HSP 70 positive cells were acquired at the time point of 0, 1, 3, 6, 12, 18 and 24h after formation of hypoxic ischemia. **Results:** In HIE group, the ADC values of ROI₁ dropped first and then rose, and it dropped most seriously at 12~18h after formation of hypoxic ischemia. The one of ROI₂ and ROI₃ dropped less seriously when compared with ROI₁ and rose gradually just after formation of hypoxic ischemia. The one of ROI₄ was normal. The amount of HSP 70 positive cells in ROI₁ was small and it did not increase with the time passing on. The amount of HSP 70 positive cells in ROI₂~ROI₄ was large and it increased obviously with the time passing on. **Conclusion:** Consistent with the HSP 70, the ADC values can make differentiation between reversible and irreversible cerebral ischemia regions in HIE.

【key words】 Hypoxia-ischemia, brain; Models, animal; Magnetic resonance imaging; Apparent diffusion coefficient; Heat shock protein 70

围产期窒息导致的新生儿缺氧缺血性脑病 (hypoxic ischemic encephalopathy, HIE) 是新生儿期最常见的病变之一, 其早期诊断和治疗与患儿预后密切相关。目前 CT 和常规 MRI 均难以满足临床诊疗需求, 而 MRI 扩散加权成像 (diffusion-weighted imaging, DWI) 和表观扩散系数的值 (apparent diffusion coefficient values, ADC values) 的出现为 HIE 的早期甚至超早期诊断提供了一种新手段^[1-3]。

本实验通过重度新生猪 HIE 模型^[4], 利用 DWI 技术和 ADC 值测定, 对照同期的脑组织中热休克蛋白 (Heat Shock Protein 70, HSP 70) 的表达情况, 深入研究急性重度 HIE 过程中脑神经细胞的演变规律, 旨在提高对 HIE 发生发展过程的认识。

材料与方法

1. 实验动物分组

7 日龄健康新生约克猪 45 只, 体重 700~800g, 雌雄不限。利用随机数字表抽样法将 45 只动物分为正常对照组 (5 只) 和 HIE 组 (40 只)。HIE 组再按缺氧

作者单位: 515041 广东, 汕头大学医学院第二附属医院 CT、MRI 室

作者简介: 郭岳霖 (1976-), 男, 广东潮州人, 硕士, 住院医师, 主要从事神经系统影像学诊断工作。

缺血后处死取病理样本时间点分为 7 小组: 0 h 组 (HIE₁ 组) 5 只、1 h 组 (HIE₂ 组) 5 只、3 h 组 (HIE₃ 组) 5 只、6 h 组 (HIE₄ 组) 5 只、12 h 组 (HIE₅ 组) 5 只、18 h 组 (HIE₆ 组) 5 只、24 h 组 (HIE₇ 组) 10 只。

2. 各组动物的处理

对 HIE 组动物进行固定、消毒、局麻、结扎、离断两侧颈总动脉, 待基础状态平稳 15 min 后置缺氧箱内, 予 4% 氧气和 96% 氮气混合气体 2 l/min 持续通气 60 min 后将动物移出缺氧箱即完成缺氧缺血模型的复制。正常对照组动物不作任何处理。

3. MRI 扫描

动物麻醉后, 取仰卧位固定, 利用超导磁共振扫描仪 (GE Signa 1.5T), 头线圈进行 DWI (单次激发, 全方向扩散梯度, SE-EPI 序列 TR 7000 ms, TE 101.5 ms, b 值 0、1000 s/mm²) 扫描。扫描方向平行前颅窝底, 层厚 4 mm, 层间距 0.8 mm, 视野 16 cm, 由颅顶向下扫描。正常对照组 24 h 内行 MRI 扫描; HIE₁~HIE₇ 组在处死前行 MRI 扫描得到 7 组非连续性 MRI 资料 (用于缺血灶影像学病理学对照研究), HIE₇ 组分别在缺血缺血后 0、1、3、6、12、18、24 h 行 MRI 扫描得到

7 组连续性 MRI 资料 (用于缺血灶影像学动态变化研究)。配对 DWI 数据 (包括 b 值 = 0、1000 s/mm² 的两组数据) 传送到 GE MRI 数据处理工作站, 利用 fune-tool 软件进行数据处理后得到相应的 ADC 图。

4. 病理学检查

正常对照组在行 MRI 扫描后 30 min 内处死动物取脑; HIE₁~HIE₇ 组均在行最后一次 MRI 扫描后 30 min 内立即处死动物取脑。2 组动物均根据 ADC 图的兴趣区 (region of interest, ROI) 取样, 样本经脱水、固定、切片后进行 HSP 70 免疫组化染色 (HSP 70 单克隆抗体 IgG2a 由北京中山试剂公司提供)。

5. 数据采集与分析

HIE 组样本的数据采集: 对照缺血缺血后 0 h 和 24 h ADC 图, 每只动物均随机选取 1 个 ADC 值最低的区域及与其相邻的 1 个 ADC 值正常区域, 通过两个区域中心作一连线, 在该线段上由病变区到正常区等距取 4 个 ROI, 依次定义为 I 区、II 区、III 区和 IV 区 (图 1), 动态记录该 4 个区域在缺血缺血后 0、1、3、6、12、18、24 h 的 ADC 值及其相应的 HSP 70 阳性细胞计数 (单位: 个/20×10 倍视野)。

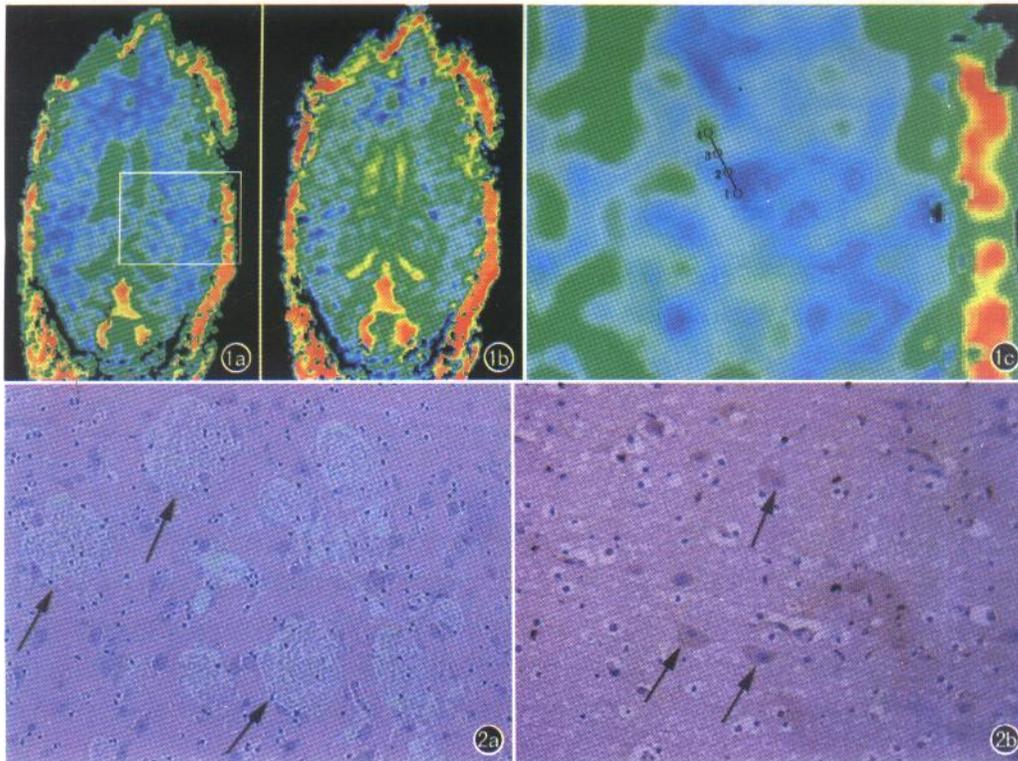


图 1 ADC 值的测量方法示意图。a) 缺血缺血组动物于缺血缺血后 0 h 脑部 ADC 图; b) 缺血缺血组动物于缺血缺血后 24 h 脑部 ADC 图; c) a 中“□”的放大区域, 图中标记 1~4 的 4 个“○”分别示 I、II、III、IV 区。图 2 缺血缺血后 24 h HSP 70 免疫组化染色结果。a) I 区见大量筛状坏死区 (箭), 其间未见 HSP 70 阳性表达细胞; b) III 区细胞轻度肿胀, 其间见大量黄褐色 HSP 70 阳性表达细胞 (箭)。

正常对照组的
数据采集: 在每侧大脑白质区与基底节区各随机选定 5 个 ROI 记录 ADC 值及其相应的 HSP 70 阳性细胞计数。

数据分析: 2 组 ROI 的 ADC 值与 HSP 70 阳性细胞计数录入 SPSS10.0 软件作组间及组内分析。

结果

1. 正常对照组动物
脑部 ADC 值与 HSP 70 阳性细胞计数

大脑 ADC 值平均为 $(9.29 \pm 1.16) \times 10^{-4}$ mm²/s; HSP 70 阳性细胞计数为 0 个/视野。

2. HIE 组动物脑
部 ADC 值与 HSP 70 阳性细胞计数

区 HSP 70 阳性

细胞计数于缺氧缺血后 3 h 开始少量表达, 随着时间的延长并未见明显变化; 而 ~ 区 HSP 70 阳性细胞计数同样于缺氧缺血后 3 h 开始少量表达, 但均随着时间的延长明显增加(图 2、3)。

~ 区 ADC 值下降的幅度与时间变化规律均不一样: 区 ADC 值下降的幅度最大, 并随着缺氧缺血后时间呈先降后升的变化规律, 于缺氧缺血后 12~18 h 达到最低值; 区 ADC 值下降的幅度小于 区, 其 ADC 值随着缺氧缺血后时间逐渐上升; 区 ADC 值下降的幅度小于 区, 其 ADC 值随着缺氧缺血后时间亦逐渐上升并接近正常水平; 区 ADC 值保持正常水平(图 4)。

3 统计学分析

正常对照组与 HIE 组 区的 ADC 值两两之间做独立样本 t 检验, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

HIE 组的 4 组样本的 ADC 值于各时间点分别做两两之间独立样本 t 检验: 缺氧缺血后 0 h, 区和区 ADC 值差异无显著性意义($P > 0.05$), 其余各区两两之间比较差异均有极显著性意义($P < 0.01$); 缺氧缺血后 1~24 h, ~ 区两两之间的 ADC 值差异均有极显著性意义($P < 0.01$)。

HIE 组的 4 组样本的 HSP 70 阳性细胞数于各时间点分别做两两之间独立样本 t 检验: HIE 组 ~ 区在缺氧缺血后 0、1 h 均未见 HSP 70 阳性细胞表达; 缺氧缺血后 3 h ~ 区均见少量 HSP 70 阳性细胞表达, 4 区 HSP 70 阳性细胞数差异无显著性意义($P > 0.05$); 在缺氧缺血后 6、12、18 和 24 h, ~ 区的 HSP 70 阳性细胞数差异无显著性意义($P > 0.05$), 而 区和 ~ 区的 HSP 70 阳性细胞数在每个时间

点差异均有显著性意义($P < 0.01$)。

讨论

关于 HIE“治疗时间窗”的存在与否是目前缺血性脑病研究领域的重要课题之一, 而 HIE 脑部可逆缺血区存在与否及其演变规律是该研究的第一步^[1,2,5]。基础研究^[6,7]表明新生动物脑部缺氧缺血 6~24 h 基底节区与脑皮层组织的神经元一氧化氮合成酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)急剧上升并导致细胞坏死, 从而认为 HIE 缺氧缺血时间超过 6 h 后脑部病变趋向不可逆。而 HIE 可逆缺血区的影像学研究尚未见文献报道。

缺血半暗带是存在于脑梗死周边的可逆性脑缺血区, 其理论早在 1977 年就被提出, 限于当时的影像学水平, 其活体研究一直停滞不前^[8]。直到 1992 年 Van Bruggen 首先将 DWI 用于脑缺血性疾病诊断的研究之后, 缺血半暗带的活体研究终于翻开新的一页; ADC 值是 DWI 的量化形式, 能更客观地反映脑组织中水分子的扩散能力^[1,9]。目前研究^[2,3]表明, 可逆性脑缺血 ADC 值变化幅度及时间变化规律均不同于不可逆性脑缺血, 故认为 ADC 值具有鉴别可逆性和不可逆性脑缺血的能力。而 HSP 70 是脑细胞对缺血缺氧等应激反应的一个标志物, 在脑缺血缺氧过程中, HSP 70 开始表达并分布于存活的缺血缺氧脑组织内的神经元、胶质细胞和血管内皮细胞中; 当缺血缺氧脑组织发展到完全梗死时, HSP 70 就停止表达; 也就是说, HSP 70 是可逆性脑缺血区的特异性标记物^[10,12]。但 HSP 70 表达与缺血性脑损伤程度是否存在线性关系, 文献尚未见报道。

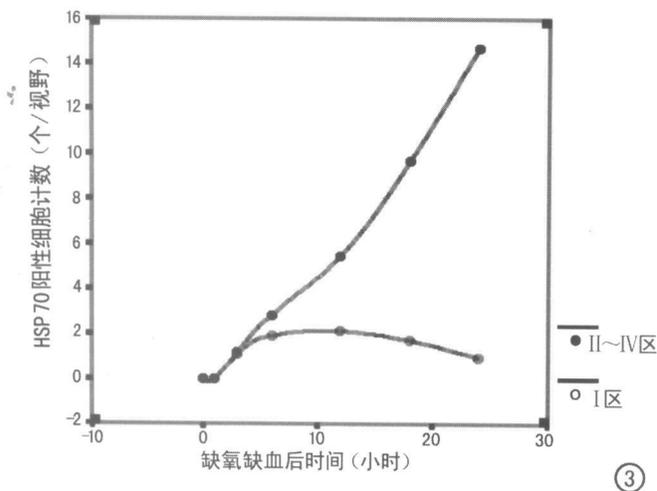


图 3 缺氧缺血组 I~IV 区 HSP 70 表达和时间的关系。

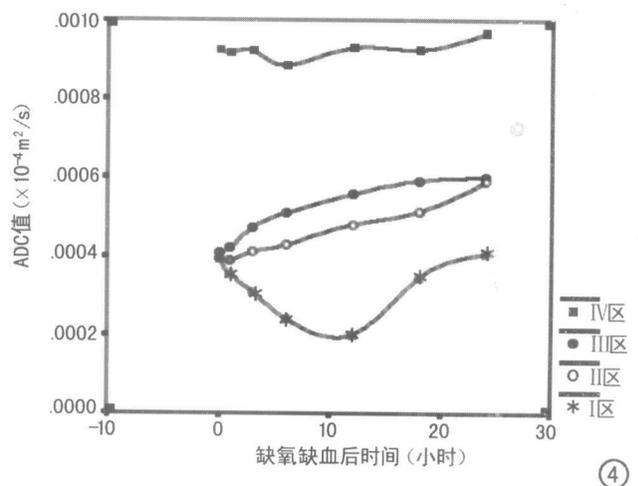


图 4 缺氧缺血组中 I~IV 区的 ADC 值和时间的对应关系。

HIE 过程中脑细胞的大量死亡是其重要的病理特征。HIE 是一种动态变化的全脑弥漫性病变,影响因素较多,病变的不均一性使得 HIE 的研究复杂化。笔者推断 HIE 的脑组织中的 ADC 值的最低区是可疑脑细胞坏死区域,ADC 值正常区域代表脑细胞功能相对正常区,在两者之间的区域是可能的可逆性脑细胞损伤的过渡带。为了验证推断的正确性,我们采用化整为零的方法进行研究:把可逆性损伤过渡带人为的等距划分为 4 个亚区(~ 区)并进行 24 h DWI、ADC 值和 HSP 70 阳性细胞数的动态观察,研究 HIE 过程中脑组织可逆性损伤区存在的证据及其演变规律。

通过对 HSP 70 表达的观测结果表明, ~ 区病变由重到轻逐渐过渡并在 24 h 内呈双向动态变化。

区病变最重,其 ADC 值下降的幅度最大并随着缺氧缺血后时间呈典型脑组织死亡的先降后升的变化规律(于缺氧缺血后 12~ 18 h 达到最低值),其 HSP 70 阳性细胞表达稀少且随着时间的延长无明显变化,表明该区病变趋向不可逆; ~ 区病变相对较轻,其 ADC 值下降的幅度较小且恢复快,24 h 内恢复至接近正常范围的下限($6 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$),其 HSP 70 阳性细胞表达随着时间的延长明显增加,表明该区的脑细胞处于存活状态,病变趋向可逆; 区为基本正常区域,其 ADC 值一直保持正常水平,但其 HSP 70 阳性细胞表达亦随着时间的延长明显增加,表明该区只是相对正常而已,其神经细胞同样存在轻度缺氧缺血损伤改变。而 ~ 区的 HSP 70 阳性细胞数无显著性统计学差异,表明 HSP 70 表达与缺血性脑损伤程度并不存在线性关系,即 HSP 70 阳性细胞数对缺血性脑损伤具有很好的定性诊断价值但不具备定量研究价值。

本研究结果表明,在 HIE 的病理演变过程中,脑组织存在可逆性缺血区,而且在一定的时间段内呈一定规律的动态变化,缺氧条件去除之后可向正常区转变;HIE 病理演变过程中的 ADC 值与 HSP 70 表达之间具有很好的一致性,ADC 值变化具有反映 HIE 过程中脑组织坏死和可逆脑缺血损伤的能力,其临床价

值不容忽视。但 HIE 的病理和病理生理过程较成人脑梗死复杂得多,不同程度的低氧、缺氧发生的缓急、缺氧持续时间的不同均会导致不同的 HIE 病理和病理生理改变,从而导致 HIE 脑部可逆缺血区研究的复杂性。ADC 值在 HIE 过程的意义有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Roberts TP, Rowley HA. Diffusion Weighted Magnetic Resonance Imaging in Stroke[J]. Eur J Radiol, 2003, 45(3): 185-194.
- [2] Oppenheim C, Grandin C, Samson V, et al. Is There an Apparent Diffusion Coefficient Threshold in Predicting Tissue Viability in Hyperacute Stroke[J]. Stroke, 2001, 32(11): 2486-2491.
- [3] Copen WA, Schwamm LH, Gonzalez RG, et al. Ischemic Stroke: Effects of Etiology and Patient Age on the Core Apparent Diffusion Coefficient[J]. Radiology, 2001, 221(1): 27-34.
- [4] 刘国瑞,李仰康,郭岳霖,等. 8% 和 4% 低氧通气状态对新生猪缺氧缺血性脑损伤模型制备的影响[J]. 实用医技杂志, 2004, 11(11B): 2354-2357.
- [5] Pestalozza IF, Di Legge S, Calabresi M, et al. Ischaemic Penumbra: Highlights[J]. Clin Exp Hypertens, 2002, 24(7-8): 517-529.
- [6] Johnston MV. Hypoxic and Ischemic Disorders of Infants and Children[J]. Brain Dev, 1997, 19(4): 235-239.
- [7] Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, et al. Novel Treatments after Experimental Brain Injury[J]. Sem in Neonatol, 2000, 5(1): 75-86.
- [8] Barkovich AJ. Pediatric Neuroimaging [M]. Lippincott Raven, Philadelphia. New York, 1996. 128-138.
- [9] 郭岳霖,刘国瑞,郑文斌. MRI 弥散加权对急性期腔隙性脑梗死的诊断价值[J]. 放射学实践, 2004, 19(6): 395-397.
- [10] Hu MJ, Liu Y, Deng CG, et al. Heat Shock Protein 70 Expression in the Brain of Rats with Cerebral Infarction after Receiving Vascular Endothelial Growth Factor 165 Gene Therapy[J]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 720-722.
- [11] Kokubo Y, Liu J, Rajdev S, et al. Differential Cerebral Protein Synthesis and Heat Shock Protein 70 Expression in the Core and Penumbra of Rat Brain after Transient Focal Ischemia[J]. Neurosurgery, 2003, 53(1): 186-191.
- [12] Lee SH, Kim M, Yoon BW, et al. Targeted HSP 70. 1 Disruption Increases Infarction Volume after Focal Cerebral Ischemia in Mice[J]. Stroke, 2001, 32(12): 2905-2912.

(收稿日期: 2005-04-27 修回日期: 2005-08-05)