

大鼠脑缺血再灌注的磁共振扩散加权成像研究

郑莎莎, 卢洁, 邱立军, 王晓怡, 赵澄, 张营, 罗玉敏, 李坤成

【摘要】 目的:采用磁共振扩散加权成像(DWI)评价大鼠脑缺血早期再灌注的动态变化,观察缺血早期再灌注对脑梗死的保护作用。**方法:**选取 16 只 SD 雄性大鼠,采用线栓法制作右侧大脑中动脉闭塞(MCAO)脑缺血模型,随机分为缺血再灌注组(缺血 2h 后再灌注)及对照组(永久性缺血),每组 8 只。分别于制作 MCAO 模型后 30min、2h、6h、12h 及 24h 行 MRI 扫描。计算并比较缺血再灌注组与对照组大鼠每次扫描的脑梗死体积、脑梗死体积的增长率、脑梗死最大层面梗死区域的 ADC 值和 rADC 值。磁共振检查结束后处死大鼠,断头取脑行 HE 染色,并与 DWI 结果进行比较。**结果:**缺血再灌注组和对照组大鼠 MCAO 后 DWI 均显示右侧大脑中动脉供血区异常高信号,ADC 图上为低信号。MCAO 后 2h、6h、12h 及 24h 的 DWI 图上缺血再灌注组体积增长率均低于对照组,仅 12h 及 24h 时差异有统计学意义($P < 0.05$)。MCAO 后 30min 缺血再灌注组与对照组梗死区 ADC 值及 rADC 值差异均无统计学意义($P > 0.05$),但 2h、6h、12h 及 24h 时缺血再灌注组梗死区 ADC 值及 rADC 值均明显小于对照组($P < 0.05$)。缺血再灌注组与对照组大鼠 MCAO 后 HE 染色均显示脑梗死灶体积与相应 DWI 层面差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**DWI 是评价超早期脑梗死再灌注的敏感方法,为脑梗死的疗效评价提供客观依据。

【关键词】 脑缺血;再灌注;磁共振成像

【中图分类号】 R445.2; R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2012)10-1054-04

Study of reperfusion on MR diffusion-weighted imaging in rat models with cerebral ischemia ZHENG Sha-sha, LU Jie, QIU Li-jun, et al. Department of Radiology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, P. R. China

【Abstract】 Objective: Using MR diffusion-weighted imaging (DWI) to investigate the dynamic changes of cerebral ischemia after early reperfusion in rat models with acute cerebral infarct. **Methods:** Sixteen male SD rats were chosen, cerebral ischemic models were established by right middle cerebral artery occlusion (MCAO) with floss embolization. The SD rats were randomly divided into reperfusion group (reperfusion 2h following MCAO) and control group (permanent ischemia after MCAO), with 8 rats in each group. DWI was performed 30min, 2h, 6h, 12h and 24h after MCAO. The infarction volume and the increased rate of infarction of each group displayed on DWI were calculated and compared as well as the apparent diffusion coefficient (ADC) values at the level with the largest infarct area. All the rats were sacrificed after MR scanning protocols were finished and the cerebral ischemic tissues were examined by histopathology with hematoxylin and eosin (HE) staining and compared with DWI findings. **Results:** All of the two groups showed abnormal hyperintensity in the right cerebral ischemic region on DWI and reduced signal on ADC maps after MCAO. The increased rate of infarcted volume in reperfusion group was lower than that of permanent ischemia group 2h, 12h and 24h after MACO respectively, yet it showed statistical differences only at 12h and 24h after MACO ($P < 0.05$). No statistic differences were existed on ADC value and rADC value in the infarcted areas of the reperfusion group and control group at 30min after MCAO ($P > 0.05$), while the ADC values and rADC values in the reperfusion group at 2h, 6h, 12h, 24h were all obviously lower than that of control group ($P < 0.05$). The infarction volumes after MACO on HE staining were in consistent with that on DWI in the two groups with no statistical differences ($P > 0.05$). **Conclusion:** DWI could sensitively demonstrate early reperfusion after cerebral infarction, it was very helpful in evaluating the therapeutic effect.

【Key words】 Brain ischemia; Reperfusion; Magnetic resonance imaging

脑梗死是人类致死或致残的主要原因之一,早期的治疗能够有效降低脑梗死的致死或致残率,发生缺血性卒中后通过溶栓或者机械再通等治疗能够使血流恢复。再灌注可终止缺血引起的病理生理改变,但

也可加剧缺血性损伤,这是因为在氧运输至细胞时损伤了线粒体功能,随后产生自由基,白细胞迁移至损伤的组织,细胞因子释放增加。因此早期显示脑梗死的情况及动态变化,对临床尤为重要。磁共振扩散加权成像(diffusion weighted imaging, DWI)能够早期发现超急性期脑梗死,并且具有很高的敏感性及特异性。本研究采用大鼠大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型及再灌注模型,通过 DWI 显示脑缺血早期及其再灌注的梗死区动态改变,探讨

作者单位: 100053 北京,首都医科大学宣武医院放射科(郑莎莎、卢洁、邱立军、王晓怡、赵澄、李坤成); 100053 北京,首都医科大学宣武医院脑血管病实验室(张营、罗玉敏)

作者简介: 郑莎莎(1987-),女,四川南充人,硕士研究生,主要从事神经影像学诊断工作。

通讯作者: 卢洁, E-mail: lujie@xwh.ccmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30900365);北京市自然科学基金(7092038)。

DWI 在脑缺血早期再灌注中的应用价值。

材料与方 法

1. 建立脑缺血动物模型

选取健康雄性 SD 大鼠 16 只, 体重 280~320g, 随机分成两组: 永久性缺血组 8 只, 脑缺血 2h 再灌注组 8 只, 均参照 Zea-Longa 法制作大鼠大脑中动脉闭塞 (MCAO) 缺血模型^[1]。所有大鼠采用异氟烷吸入麻醉后, 颈正中切开皮肤, 依次电凝颈外动脉的分支甲状腺动脉和枕动脉, 并在尽量靠近远端结扎并电凝颈外动脉。将线打结后套于颈外动脉游离的残端根部, 至合适的松紧度, 分别在颈总动脉和颈内动脉上夹动脉夹。于颈外动脉处剪一小口, 将尼龙栓线栓 (北京沙东生物技术有限公司) 头部插入颈外动脉, 松开颈内动脉的动脉夹, 并沿颈内动脉走行轻柔插进线栓, 行至 (1.9±0.05) cm 时稍觉有阻力, 停止送线, 开始记录时间。缺血再灌注组在大脑中动脉阻断后 2 h, 轻轻拔出颈内动脉内的线栓, 线栓拔除后电凝颈外动脉断端进行止血后缝合切口。以 DWI 上右侧大脑中动脉供血区出现高信号作为模型制作成功的标准。

2. MRI 检查

所有 SD 大鼠 MCAO 缺血模型制作成功后行 MRI 扫描, 永久性缺血组于缺血模型制作成功后 30 min、2 h、6 h、12 h、24 h 行 MRI 扫描; 缺血再灌注组分别于相同的时间点观察右侧大脑中动脉脑缺血 2h 再灌注后 MRI 表现。

MRI 检查采用 Siemens Verio Syngo B17 3.0T 超导磁共振成像系统, 大鼠专用线圈。大鼠经水合氯醛 (3.5 ml/kg) 腹腔注射麻醉后, 取俯卧位, 头置于线圈中央, 行 T₁WI、冠状面扩散加权成像 (DWI) 扫描, 层厚 2 mm, 层间隔 0 mm, 层数 11。DWI 采用单次激发 SE-EPI 序列, b 值取 50、500 和 1000 s/mm², TR 3500 ms, TE 80 ms, 激励次数 5, 视野 94 mm×94 mm,

矩阵 80×80。

3. 图像后处理

DWI 图像数据处理采用 AFNI 软件进行分析。首先对每只大鼠 5 次扫描的 DWI 及表观扩散系数 (ADC) 图去头皮处理, 然后进行图像的空间配准; 对 DWI 及 ADC 图进行全脑对称性分析, 半自动测量每只大鼠的全脑容积及每次扫描的脑梗死体积, 并在此基础上计算每次扫描的相对脑梗死体积及脑梗死体积增长率。

$$\text{相对脑梗死体积} = \frac{\text{脑梗死病灶体积}}{\text{全脑容积}} \times 100\%$$

$$\text{脑梗死体积增长率} = \frac{\text{第 } n \text{ 次体积} - \text{第 } 1 \text{ 次体积}}{\text{第 } 1 \text{ 次体积}} \times 100\%$$

在脑梗死最大层面的 ADC 图上将兴趣区 (以病灶中心点为球心, 两个体素长度为半球的兴趣区) 置于脑梗死中心区, 测量兴趣区 ADC 值及对侧相应部位脑组织的 ADC 值, 并计算相对 ADC 值 (rADC 值)。

$$\text{rADC} = \frac{\text{病变侧脑梗死中心区 ADC 值}}{\text{对侧相应部位脑组织 ADC 值}} \times 100\%$$

4. 组织学检查

最后一次 MRI 扫描后处死大鼠, 用 1.5% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉, 立即剪开胸廓, 暴露心脏, 将灌注针头刺入左心室至主动脉, 用止血钳固定, 剪开右心房, 先用生理盐水 100 ml 快速灌注冲洗至肝脏变白, 随后加 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 (pH=7.4, 0.1 mmol/l) 300~400 ml 灌注固定, 灌注 40 min 后断头取脑, 置于 4% 多聚甲醛中固定。常规制备石蜡切片, 片厚 5 μm, 行 HE 染色, 光镜下观察脑梗死灶, 并测量脑梗死体积。

5. 统计学分析

数据均采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理, 结果均以均数±标准差表示, 采用独立样本 t 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

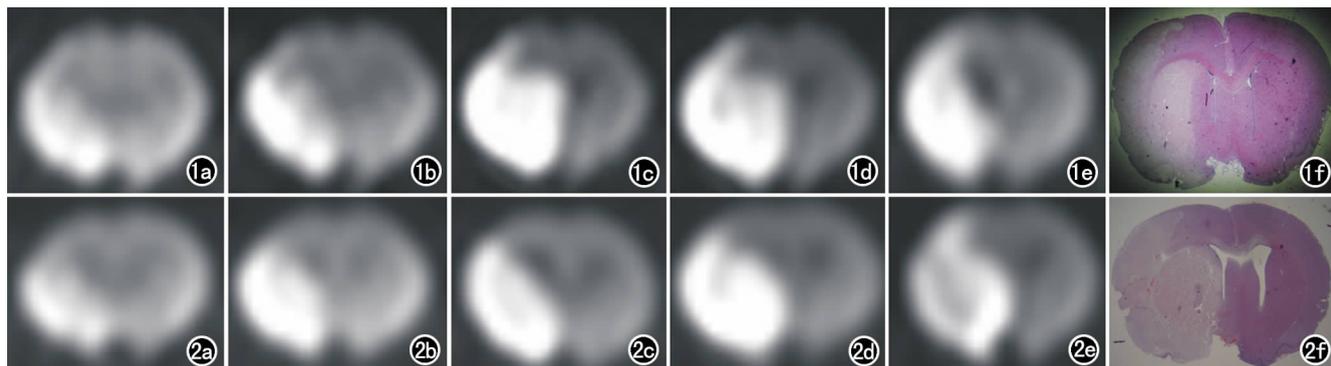


图 1 缺血再灌注组大鼠 MCAO 后 DWI 显示右侧大脑中动脉供血区异常高信号随时间逐渐增高。a) MACO 后 30min; b) MACO 后 2h; c) MACO 后 6h; d) MACO 后 12h; e) MACO 后 24h; f) HE 染色显示脑梗死区域与 DWI 一致。图 2 永久性缺血组大鼠 MCAO 后 DWI 显示右侧大脑中动脉供血区异常高信号随时间逐渐增高。a) MACO 后 30min; b) MACO 后 24h; c) MACO 后 6h; d) MACO 后 12h; e) MACO 后 24h; f) HE 染色显示脑梗死区域与 DWI 一致。

表1 缺血再灌注组与永久性缺血组脑梗死体积增长率

(%)

分组	2h	6h	12h	24h
缺血再灌注组	18.21±14.34*	46.83±19.37*	79.25±34.79*	130.64±50.14*
永久性缺血组	114.88±108.39	142.59±128.73	221.66±153.77	354.46±208.64

注:* 缺血再灌注组与永久性缺血组比较, $P < 0.05$ 。

结果

1. 缺血再灌注组与永久性缺血组的 DWI 结果

缺血再灌注组与永久性缺血组 MCAO 大鼠的 DWI 均显示右侧大脑中动脉供血区异常高信号(图 1、2), ADC 图上为低信号, 随时间延长, DWI 图上病变信号逐渐增高, ADC 图上病变信号逐渐降低, 异常信号的范围逐渐增大。缺血再灌注组与永久性缺血组大鼠比较, MCAO 后 2、6、12 及 24 h 的 DWI 图上缺血再灌注组脑梗死体积增长率均低于永久性缺血组, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。

永久性缺血组大鼠 MCAO 后随时间进展梗死区的 ADC 值减低, 在 MCAO 后 2h 时 ADC 值下降到最低, 随后(6、12 及 24 h)逐渐缓慢上升; 且均较对侧相应部位脑组织均明显减低($P < 0.05$)。缺血再灌注组梗死区 ADC 值在 MCAO 后 2 h 时 ADC 值下降到最低, 但随时间变化逐渐上升, 24 h 时接近 MCAO 30 min 梗死区 ADC 值。缺血再灌注组与永久性缺血组大鼠比较, MCAO 30 min 后梗死区 rADC 值差异无统计学意义($P > 0.05$), 但 2、6、12 及 24 h 时 rADC 值明显高于永久性缺血组且差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图 3)。

2. 缺血再灌注组与永久性缺血组的 DWI 与组织学结果对照

缺血再灌注组与永久性缺血组大鼠 MCAO 后 HE 染色均显示明显的梗死灶。8 只缺血再灌注组大

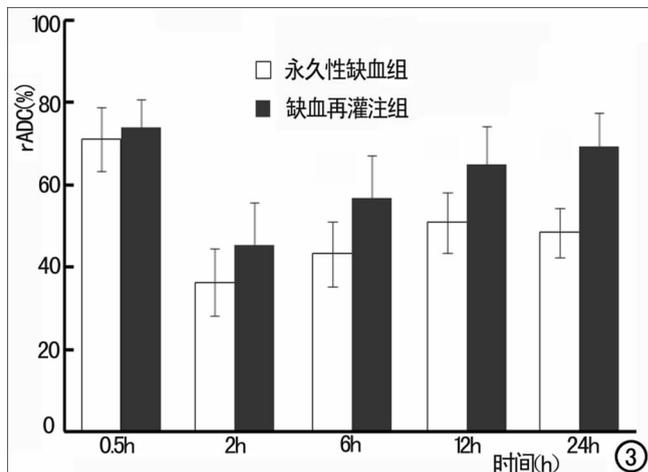


图3 缺血再灌注组与永久性缺血组大鼠脑梗死灶的 rADC 值变化情况, 两组的 rADC 值在 2、6、12 及 24h 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

鼠 MCAO 后 24 h, HE 染色(23.57%±4.54%)与 DWI 相应层面(23.31%±4.33%)的相对脑梗死体积差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 1); 8 只永久性缺血组大鼠 MCAO 后 24h, HE 染色(22.28%±8.98%)与 DWI 相应层面(22.71%±8.79%)的相对脑梗死体积差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 2)。

讨论

MR 扩散加权成像(DWI)是 20 世纪 90 年代初中期发展起来的 MRI 新技术, 建立在平面回波技术(EPI)基础之上, 是目前唯一能够检测活体组织内水分子扩散运动的无创性检查方法。DWI 对脑梗死的早期诊断具有非常重要的临床应用价值, 可在缺血发作数分钟内显示缺血区域, 其扫描时间短, 无需对比剂, 是检查超急性及急性脑梗死的首选方法。

1. 缺血再灌注的病理生理学基础

超早期缺血性脑梗死的再通能够恢复梗死区的血流灌注, 减轻神经元的损伤, 挽救可逆缺血组织。缺血再灌注能导致以下结果: 通过有效的侧支循环, 缺血区血流得到不同程度的恢复, 从而减轻缺血损伤; 然而同时伴随的有氧自由基的产生、炎症反应和白细胞的聚集等导致再灌注损伤, 通过启动凋亡程序而引起细胞凋亡, 另外血脑屏障开放致使毛细血管床通透性增高, 甚至发生出血性转化。一旦组织发生缺血, 白细胞浸润则会出现于相应区域, 且与脑缺血的程度及梗死体积等关系密切。若能在超早期通过药物溶栓或机械再通等各种不同的方式实现缺血区域血流再灌注, 白细胞浸润相应较少, 能够减轻组织损伤。但如果白细胞聚集到一定程度, 那么即使恢复了血流也不能有效改善局部灌注情况, 反而通过释放氧自由基、炎症介质等参与再灌注损伤的病理过程。

2. 缺血再灌注对脑梗死体积的影响

脑梗死发生后, DWI 显示梗死体积为高信号, 在超急性期及急性期内, 随着时间的延长, 梗死范围逐渐增大。多数研究认为由于缺血后损伤程度不同, 仍残留部分可恢复的脑组织, 即缺血半暗带(ischemic penumbra, IP)。Rohl 等和 Schaefer 等^[2-3] 研究认为 DWI 与磁共振灌注加权成像(perfusion weighted imaging, PWI)不匹配的区域即为 IP, 说明梗死灶内仍有部分可恢复灌注的区域。缺血早期再灌注由于血流灌注的恢复, 能减轻缺血灶的损伤, 甚至部分恢复。刘国

红等^[4]对大鼠 MCAO 模型分别于缺血 2 h 和 6 h 再灌注发现缺血 2 h 再灌注 2 h 及 24 h 相对梗死灶未见明显变化,但缺血 6 h 再灌注 24 h 较再灌注 2 h 时梗死灶体积增大,认为缺血 2 h 再灌注仍可部分挽救缺血组织,但缺血 6 h 则超过了再灌注时间窗,难以挽救缺血损伤的脑组织。Bratane 等^[5]将大鼠 MCAO 模型分为三组:永久性缺血组,缺血 90 min 再灌注组以及缺血 180 min 再灌注组,DWI 检查发现缺血 90 min 再灌注组以及缺血 180 min 再灌注组梗死体积均有不同程度的减小,认为缺血 180 min 后再灌注也能使缺血组织部分恢复,并且将可逆性缺血组织的再灌注时间窗从 95 min 延长至 180 min,且最终梗死体积与早期再灌注的时间密切相关。在本研究中,缺血 120 min 后再灌注梗死体积虽然仍逐渐增大,但是较对照组来说梗死体积的增加率明显减小,说明血流灌注的恢复仍然是有效的,符合 Bratane 等的结论。

3. 脑梗死缺血再灌注 ADC 值的变化

ADC 是 MR 扩散加权成像最常用的指标之一,能反映脑梗死区的扩散运动且能去除“ T_2 透过效应”(T_2 shine through effects)对 DWI 图像的影响,因此更能反映水分子的弥散情况^[6-7]。ADC 值可以反应脑梗死程度,ADC 值越低组织损伤越重,ADC 值的下降程度和组织损伤程度呈相关性。ADC 值受细胞内、外水的粘滞度、比例、膜通透性、温度及涡电流的影响,rADC 可部分消除绝对 ADC 值的个体差异^[8]。随脑缺血时间的延长,ADC 可出现一过性降低、双向式改变(下降经短暂的恢复后再次下降)及持续降低 3 种模式。ADC 一过性降低区域的组织学检查仅见到选择性神经元坏死,可能与一过性细胞水肿、扩散抑制、侧支循环的快速建立有关,组织可恢复。而后两种模式的区域则不可避免地发展为梗死^[9]。Harris 等^[10]认为如果组织再灌注后能恢复正常,则 ADC 值也会改善。van Dorsten 等^[11]分别对大鼠缺血 60 min 以及 90 min 后再灌注 ADC 值变化情况进行研究,发现再灌注后血流的恢复呈三个阶段即快速上升期、继发性下降期和终末期恢复正常;不论缺血时间的长短缺血后再灌注均使得 ADC 值升高,但恢复的程度则随缺血严重的程度而逐渐下降,特别是长时间缺血所致 ADC 下降,再通后恢复的可能性也随之降低。Lu 等^[12]将 rADC 值与 AQP4(aquaporin-4)联系起来,发现发生再灌注后由于细胞膜上的水通道关闭,消除了细胞内水肿,AQP4 下降,而 rADC 值即快速上升,因而认为 DWI 可能成为一种很有前景的检测早期脑梗死及再灌注损伤的无创性影像学检查手段。本次研究发现缺血早期再灌注时,ADC 值及 rADC 值均呈现先下降后逐渐上升的趋势,较对照组均明显升高,亦说明

早期缺血再灌注是有效的。

总之,缺血早期再灌注能导致再灌注损伤以及恢复梗死区的血氧供应从而减轻缺血造成的脑组织损伤的双重结果,从梗死体积的变化以及组织弥散特征等方面来说,即使在恢复血流灌注后产生了再灌注损伤仍不能掩盖缺血早期再灌注对缺血缺氧脑组织的有利的一面,此时再灌注时间窗的把握就尤为重要。DWI 有助于早期发现脑梗死的发生,反映脑梗死的变化,可以成为临床疗效评价的手段。

参考文献:

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [2] Rohl L, Ostergaard L, Simonsen CZ, et al. Viability thresholds of ischemic penumbra of hyperacute stroke defined by perfusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient[J]. *Stroke*, 2001, 32(5):1140-1146.
- [3] Schaefer PW, Ozsunar Y, He J, et al. Assessing tissue viability with MR diffusion and perfusion imaging[J]. *AJNR*, 2003, 24(3):436-443.
- [4] 刘国红, 李良顺, 周强, 等. 急性脑缺血再灌注 DWI 及 PWI 的实验研究[J]. *中国医学影像学杂志*, 2007, 15(6):428-432.
- [5] Bratane BT, Bastan B, Fisher M, et al. Ischemic lesion volume determination on diffusion weighted images vs apparent diffusion coefficient maps[J]. *Brain Research*, 2009, 1279(7):182-188.
- [6] Hu XY, Hu CH, Fang XM, et al. Intraparenchymal epidermoid cysts in the brain: diagnostic value of MR diffusion-weighted imaging[J]. *Clin Radiol*, 2008, 63(7):813-818.
- [7] Colagrande S, Belli G, Politi LS, et al. The influence of diffusion- and relaxation- related factors on signal intensity: an introductory guide to magnetic resonance diffusion-weighted imaging studies [J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2008, 32(3):463-474.
- [8] 谢敬霞, 王建利, 韩鸿宾, 等. 核磁共振新技术研究与临床应用 [M]. 北京:北京医科大学出版社, 2001:78-93.
- [9] Miyasaka N, Nagaoka T, Kuroiwa T, et al. Histopathologic correlates of temporal diffusion changes in a rat model of cerebral hypoxia/ischemia[J]. *AJNR*, 2000, 21(11):60-66.
- [10] Harris NG, Zilkha E, Houseman J, et al. The relationship between the apparent diffusion coefficient measured by magnetic resonance imaging, anoxic depolarization, and glutamate efflux during experimental cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(1):28-36.
- [11] van Dorsten FA, Olah L, Schwandt W, et al. Dynamic changes of ADC, perfusion, and NMR relaxation parameters in transient focal ischemia of rat brain[J]. *Magn Reson Med*, 2002, 47(1):97-104.
- [12] Lu H, Hu H, He ZP. Reperfusion of the rat brain tissues following acute ischemia: the correlation among diffusion-weighted imaging, histopathology, and aquaporin-4 expression [J]. *Chin Med J*, 2011, 124(19):3148-3153.