

糖尿病肾病兔模型的建立及功能磁共振成像的可行性研究

王蕊, 杨学东, 赵凯, 林志勇, 隋雪晴, 张晓东, 王霄英

【摘要】 目的:建立糖尿病肾病(DN)兔模型,并评价功能磁共振成像(fMRI)在早期DN兔模型中应用的可行性。**方法:**12只(7只实验组,5只对照组)新西兰大白兔禁食6~8h后行基线肾脏MRI扫描,成像技术包括T₂WI、血氧水平依赖(BOLD)成像、扩散加权成像(DWI)、氧摄取分数(OEF)成像、T₁-map及动脉自旋标记(ASL)成像,均采集左肾轴面。随后实验组兔经耳缘静脉注射四氧嘧啶(100 mg/kg),72 h后检测静脉血糖水平,血糖浓度>16.0 mmol/L认为糖尿病模型建立成功;对照组经耳缘静脉注射相同剂量0.9%生理盐水。建模成功后3 d,所有兔再次行肾脏MRI扫描,并处死取左肾病理,行HE、PAS、Masson染色。两名医师分别独立评价各序列图像质量。**结果:**实验组5只兔糖尿病模型建立成功,2只未成功,最终实验组5只、对照组5只完成实验。T₂WI及各fMRI图像(BOLD、DWI、OEF、T₁-map及ASL)均具有良好的图像信噪比(SNR)及空间分辨力,皮髓质分界清楚。造模成功后3 d病理显示实验组兔肾小管细胞空泡样变性,管腔轻度扩张,肾间质局灶淋巴单核细胞浸润,符合DN模型。**结论:**耳缘静脉注射四氧嘧啶(100 mg/kg)可成功建立DN兔模型,且无创性fMRI可应用于该模型的评估。

【关键词】 糖尿病;糖尿病肾病;磁共振成像;疾病模型,动物

【中图分类号】 R587.24; R445.2; R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2016)02-0113-05

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2016.02.004

Establishment of rabbit model of diabetic nephropathy and study on feasibility of renal functional MR imaging WANG Rui, YANG Xue-dong, ZHAO Kai, et al. Department of Radiology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, P. R. China

【Abstract】 Objective: To establish the rabbit model of diabetic nephropathy (DN) and evaluate the feasibility of functional MR imaging in studying the kidney of DN rabbits. **Methods:** Twelve New Zealand rabbits were enrolled and divided into 2 groups: 7 rabbits in the experiment group and 5 rabbits in the control group. Rabbits in experiment group were intravenously injected with alloxan in the dosage of 100mg/kg and rabbits in control group were intravenously injected with the same dosage of 0.9% saline. Blood glucose levels were checked 72 hours after the alloxan injection and rabbits with blood glucose levels of 16.0mmol/L or higher were identified as successful diabetes mellitus model. MR imaging was performed before alloxan injection (baseline) and 3 days after the model established successfully, respectively. Then, the rabbits were sacrificed and the left kidneys were taken for pathological examination. MR imaging included T₂WI, blood oxygen level dependent (BOLD), diffusion weighted image (DWI), oxygen extraction fraction (OEF), T₁-map and arterial spin labeling (ASL). The image quality was evaluated by two radiologists independently. **Results:** For DN group, 5 rabbits were detected with blood glucose level >16.0mmol/L after 72 hours of alloxan injection and 2 rabbits were detected with blood glucose level <16.0mmol/L. Finally, 5 rabbits in control group and 5 in DN group finished the study. Renal damages of DN group included swelling and mild vacuolation of renal tubular cell and lymphocytes infiltration. The image quality of each MR sequence all reached the standard of "good". **Conclusion:** DN model can be induced in rabbits with 100mg/kg alloxan injection. Also, satisfactory functional MR imaging can be obtained in rabbit kidney of DN model.

【Key words】 Diabetes mellitus; Diabetic nephropathies; Magnetic resonance imaging; Disease models, animal

糖尿病肾病(diabetes nephropathy, DN)是糖尿病患者最主要的并发症之一,但其发病机制等仍有许多未解决的问题^[1-2]。目前,多采用动物实验的方法进行DN相关的基础研究,所用实验动物包括大鼠、小鼠等^[3-4]。兔肾较大,较适合进行功能磁共振成像(func-

tional magnetic resonance imaging, fMRI)扫描。本研究将探讨DN兔模型的建立以及fMRI应用于DN模型的可行性。

材料与方法

1. 实验动物

本研究经伦理委员会批准。12只健康雄性新西兰大白兔(购自北京大学第一医院实验动物中心),体重2.5~4.0 kg,自由采食法饲养。分为实验组7只、对照组5只。

作者单位: 100034 北京,北京大学第一医院医学影像科(王蕊、杨学东、赵凯、林志勇、隋雪晴、张晓东、王霄英);100053 北京,中国中医科学院广安门医院放射科(杨学东)

作者简介: 王蕊(1999-),女,河南南阳人,博士研究生,主要从事MR新技术工作。

通讯作者: 杨学东, E-mail: yangxuedong1@163.com

基金项目: 教育部博士点新教师基金(20110001120053)及首都卫生发展科研专项项目(首发2011-4021-02)

2. DN 兔模型制备

将四氧嘧啶(Sigma 公司)用 0.9%生理盐水配制为 2.5%溶液,实验组兔经耳缘静脉按 100 mg/kg 剂量于 1 min 内注入,对照组兔注射相同剂量 0.9%生理盐水。打药后 72 h 用血糖分析仪(美国 Freestyle)测量末梢血糖,浓度 >16.0 mmol/L 则糖尿病模型建立成功^[5-6]。

3. MRI 检查

使用 3.0T MR 扫描仪(Signa ExciteTM, GE Medical System, Milwaukee, Wis)。因兔右肾容易受到运动及肠气等伪影影响而导致图像质量欠佳,故本实验仅扫描左肾。于造模前(基线)和造模成功后第 3d 分别对实验组及对照组兔行 MRI 扫描,扫描前实验组及对照组兔均禁食 6~8 h,自由进水。扫描前 5 min 固定兔,经面罩给予吸入式麻醉剂异氟烷,并观察兔反应,肌力消失、瞳孔散大、角膜反射减弱或消失可认为麻醉成功。采用 8 通道膝关节表面线圈,兔呈仰卧位,足先进,为防止腹部呼吸运动对图像的干扰,在兔腹部与膝线圈间填充垫子。成像技术包括:左肾轴面 T₂WI、血氧水平依赖(blood oxygen level dependent, BOLD)成像、扩散加权成像(diffusion weighted imaging, DWI)、氧摄取分数(oxygen extraction fraction, OEF)成像、T₁-map 及流动敏感交互反转恢复-动脉自旋标记(flow-sensitive alternating inversion recovery-arterial spin labeling, FAIR-ASL)成像,扫描参数详见表 1。

4. 扫描方法

T₂WI 扫描范围覆盖左侧全肾,采用快速自旋回波(fast spin echo, FSE)序列。BOLD 成像采用 2D 多回波梯度回波(multiple gradient echo, mGRE)序列,回波链为 12 个,回波间隔为 2 ms,扫描 1 层,层面为左肾门水平。DWI 采用自旋回波-回波平面成像(spin echo-echo planar imaging)序列, b 值取 0 和 800 s/mm²,为提高空间分辨力,采用轴面小 FOV 扫描,层数 3 层,中间层面位于左肾门水平,同时在左肾外缘设置预饱和带,以消除腹腔肠管磁敏感伪影的干

扰。OEF 成像、T₁-map 技术、ASL 成像均采集左肾门水平,层数为 1 层。OEF 成像采用多回波梯度自旋回波(multi echo gradient and spin echo, MEGSE)技术,在一个 TR 间期内获得 32 个回波,其中第 7 个回波是 SE,前后为不对称分布的 GRE,因此可同时获得 T₂和 T₂* 信号,并利用 Yablonskiy 等^[7-10]提出的 MRI 信号衰减模型而最终计算出 OEF。T₁-map 采用 3D 扰相梯度回波(spoiled gradient recalled, SPGR)序列,分 3 个循环,每次循环只改变翻转角,其他参数不变。ASL 成像采用单激发快速自旋回波(single-shot fast spin echo, SSFSE)序列,分 2 次循环,第 1 循环采集对照相及标记相图像,第 2 循环关闭血管标记,以获得 M₀ 图像。

5. 图像后处理

BOLD 成像及 DWI 图使用 AW 4.2 中的 Functool 软件进行处理。OEF 成像、T₁-map 技术、ASL 成像图使用 Matlab 软件进行分析。

6. 图像质量评估

所有图像均上传至 AW 4.2 工作站,由两名有经验的影像学医师采用盲法分别对各 fMRI 图进行质量评价。根据图像有无伪影及变形,是否能分辨肾内结构等将图像质量分为优、好、差 3 个等级。优:无伪影、变形,肾内结构清晰可辨;好:轻度伪影或变形,肾内结构可辨;差:明显伪影或变形,肾内结构无法辨认。

7. 组织学检查

实验结束后处死所有动物,取左肾,在肾门水平取 3~5 mm 切片,用 10%福尔马林固定 24 h 取材,用石蜡包埋、切片,行 HE 染色、碘酸雪夫反应(PAS)染色、马松(Masson)染色和封固。光镜下观察肾组织形态学变化。

8. 统计学分析

使用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析。两名观察者之间图像质量评分采取 Kappa 分析判断其一致性,其中 Kappa 值 >0.75 为一致性良好, $0.4 \leq$ Kappa 值 ≤ 0.75 为一致性较好, Kappa 值 <0.4 为一致性差。

表 1 各成像技术的扫描参数

	T ₂ WI	BOLD	DWI	OEF	T ₁ -map	FAIR-ASL
序列类型	FSE	mGRE	SE-EPI	MEGSE	3D-SPGR	SSFSE
层数	12	1	3	1	1	1
视野(cm ²)	15×15	15×15	8×8	15×15	15×15	15×15
矩阵	256×256	128×128	128×128	128×128	128×128	128×128
层厚(mm)	3	5	5	5	5	5
带宽(kHz)	41.67	31.25	125	62.5	31.25	31.25
采集次数	4	4	8	1	4	12
TR(ms)	4500	100	2300	1500	4.8	3500/6000
TE(ms)	102	2-27	87.3	56	2.1	33.6
翻转角(°)	90	30	90	90	7/15/33	90

结果

1. DN 模型的建立情况

实验组 7 只兔中 5 只糖尿病模型制备成功, 2 只打药后 72 h 血糖浓度 $< 16 \text{ mmol/L}$, 最终, 实验组及对照组各 5 只完成实验, 故最终评估实验组 5 只和对照组 5 只的基线及造模成功后 3d 扫描的 MRI 图像。

实验结束后处死动物并取左肾, 对照组兔形态及色泽正常, 表面光滑, 光镜下皮质肾小球结构清晰, 未见肥大, 肾小球基膜未见增厚, 肾小管形态正常, 未见空泡样变性及坏死, 集合管未见管型。实验组兔均可见光镜下肾小球系膜细胞增生, 肾小管细胞空泡样变性, 管腔轻度扩张, 肾间质局灶淋巴单核细胞浸润, 故认为实验组 5 只均成功建立 DN 模型。

2. MRI 图像质量评价

左肾 MRI 图像中, $T_2\text{WI}$ 可清楚显示左肾皮质 (cortex, CO)、外髓外带 (outer stripes of the outer medulla, OS)、外髓内带 (inner stripes of the outer medulla, IS) 及内髓 (inner medulla, IM) (图 1), 并与左肾大体病理横轴面对应 (图 2)。图 3~7 分别为 BOLD 成像、DWI、OEF 成像、 $T_1\text{-map}$ 技术、ASL 成像图像, 均可清楚显示 CO、外髓 (outer medullar, OM) 和 IM。10 只兔子均于基线、造模成功后 3 d 进行 MRI 扫描, 其结果均参与评价。两名观察者一致性显示: $T_2\text{WI}$ 图像质量均为“优”(“优”均为 20), Kappa 值 1.00; BOLD 成像图像质量均达到“好”(其中“优”均为 12), Kappa 值 0.79; DWI 图像质量均达到“好”(其中“优”分别为 10 和 11), Kappa 值 0.70; OEF 成像图像质量均达到“好”(其中“优”分别为 14 和 15), Kappa 值 0.88; $T_1\text{-map}$ 图像质量均达到“好”(其中“优”分别为 8 和 9), Kappa 值 0.69; ASL 成像图像质量均为“优”(“优”均为 20), Kappa 值 1.00。

讨论

DN 是糖尿病常见的重要并发症。我国 DN 发病

率逐年增多, 在终末期肾病的病因中已位列第二, 仅次于各种肾小球肾炎^[11]。如果 DN 诊治不及时, 发展到肾病末期, 则只能透析甚至进行肾移植^[12]。在 DN 发病过程中伴随着复杂的病理生理改变, 由于以糖尿病患者作为研究对象的局限性, 多以实验动物为研究对象, 本文以早期 DN 兔模型为研究对象, 探讨无创性 fMRI 用于兔模型实验的可行性。

DN 模型制备方法有: 化学药物诱导、自发性 DN 动物模型、手术切除胰腺、转基因动物等^[3,13]。自发性 DN 动物模型虽在一定程度上减少了人为因素, 更接近自然状态下的人类疾病进程, 但动物饲养条件要求高、发病率低、且病程长、耗费大。手术切除易形成恶性糖尿病, 死亡率高。而转基因动物技术要求高, 价格昂贵。故目前多采用化学药物诱导法进行模型制备, 本研究采用四氧嘧啶, 通过破坏兔胰岛 β 细胞从而导致胰岛素缺乏, 形成不可逆的胰岛素依赖性糖尿病, 随病程进展形成 DN。目前常用的 DN 动物模型为大鼠和兔, 因大鼠肾脏体积小, 不利于 fMRI 检查及反复采血^[4], 故本文采用新西兰兔行模型制备。

文献报道^[14]实验动物注射四氧嘧啶前应禁食、水 24 h。本研究的预实验发现兔禁食 24 h 后, 肠腔内容物较少, 但积气明显增多, 肾脏位于肠管后方, 易受磁敏感伪影的影响; 而禁食 6~8 h 既可减少肠腔内容物, 又无过多肠道积气。本研究采用四氧嘧啶 (100 mg/kg) 耳缘静脉注射, 给药后 72 h 模型成功率达 71%, 略低于文献报道^[6], 可能与实验动物数量少有关。

由于腹部肠道气体及呼吸运动等影响, 目前, fMRI 在腹部脏器中的应用尚存在一定挑战性。本研究在实验过程中发现, 由于兔双肾在腹腔内的相对距离较大, 且右肾多随肝脏移位至胸腔 (图像受胸腔呼吸及气体伪影干扰重), 因此仅采集左肾图像。使用麻醉机以保证实验过程中动物麻醉深度一致。在摆位过程中, 先将兔腹部倾向右侧, 将肠管推移至右侧, 以减少左肾周围肠管, 从而减少扫描过程中磁敏感伪影。并将兔与线圈之间的空间用垫子填充, 以减少呼吸运动伪影。

肾脏的 fMRI 研究中, DWI 和 BOLD 成像的相关研究较多^[15-18]。DWI 作为目前唯一能无创性检测活体组织中水分子扩散运动的方法, 已广泛应用于临床及科研。本研究为提高空间分辨力, 采用小 FOV 扫描, 病灶 FOV 外围设置预饱和带, 以消除肠管造成的磁敏感

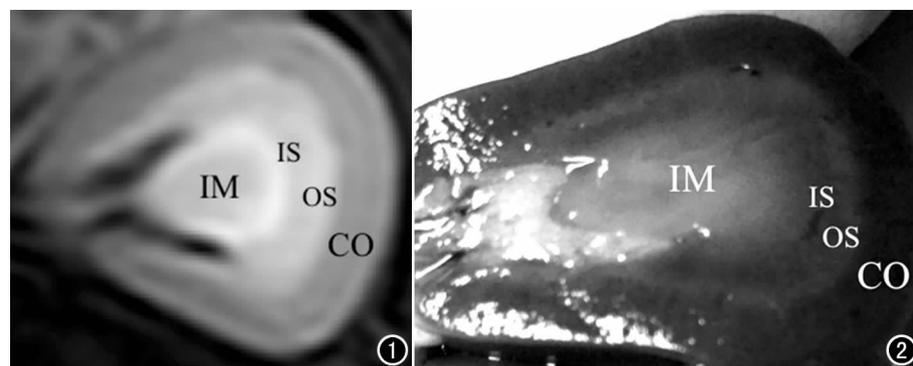


图 1 对照组基线左肾轴面 $T_2\text{WI}$ 。图 2 对照组兔处死后左肾大体横切面图。肾脏解剖显示清晰。

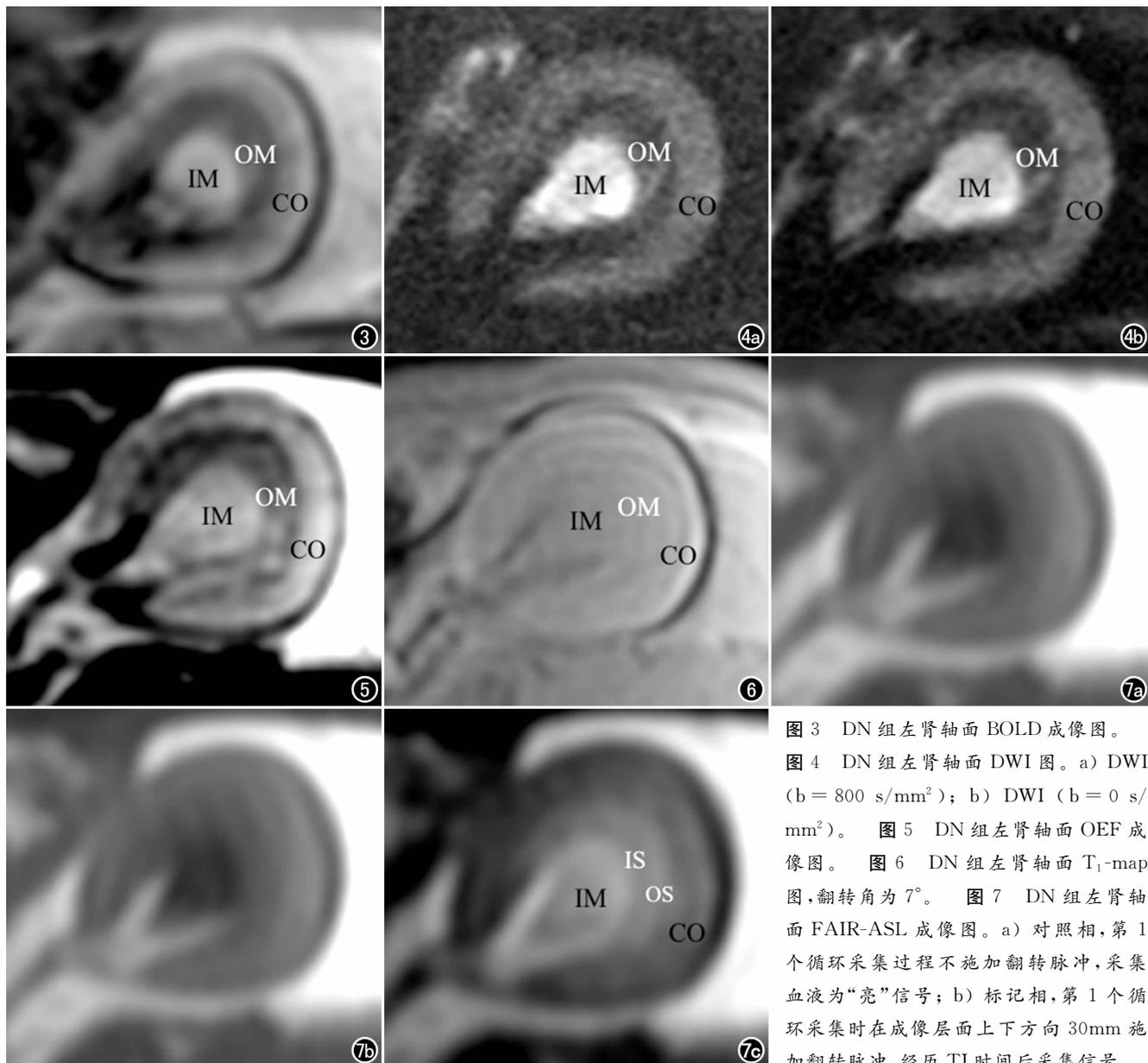


图3 DN组左肾轴面BOLD成像图。

图4 DN组左肾轴面DWI图。a) DWI ($b = 800 \text{ s/mm}^2$); b) DWI ($b = 0 \text{ s/mm}^2$)。图5 DN组左肾轴面OEF成像图。图6 DN组左肾轴面 T_1 -map图,翻转角为 7° 。图7 DN组左肾轴面FAIR-ASL成像图。a) 对照相,第1个循环采集过程不施加翻转脉冲,采集血液为“亮”信号; b) 标记相,第1个循环采集时在成像层面上下方向30mm施加翻转脉冲,经历TI时间后采集信号,

采集血液为“暗”信号; c) M_0 图,第2个循环关闭血管标记,延长TR至6000ms,以获得标准的 M_0 图。

伪影及卷褶伪影干扰。BOLD成像技术依赖于组织血氧水平变化。1936年Pauling等首次发现去氧血红蛋白具有顺磁性,从而推测血液的磁性有赖于其氧合水平。1990年,Ogawa等^[19]发现血液中顺磁性的脱氧血红蛋白使血管和周围组织间产生较大的磁敏感差异,从而产生血氧水平依赖增强效应。但仅靠BOLD成像技术,无法解释肾脏氧合水平低下是由肾脏血供减少和/或氧化代谢增加造成的^[20]。因此,不少研究探讨了ASL成像及OEF成像的可行性,并已验证ASL在肾脏、OEF成像在脑部应用中的可行性^[21,22]。

ASL成像在不引入对比剂的前提下,通过磁化标记内源性血液来量化评估肾脏血流量。研究表明,与动态增强相比,ASL技术具有无创、安全的特性,尤其适用于肾功能不全的患者。目前已有部分研究使用

BOLD成像及ASL成像来评价正常肾脏及肾脏干预前后氧合水平及肾血流量的变化^[20,21,23-25],但动物模型以大鼠为多,而本研究以兔为实验对象,图像信噪比高,皮髓质分界清晰。氧化代谢是维持机体正常新陈代谢的重要生理活动,因此组织氧代谢指标的定量测定对相关疾病的病理认识及诊断具有非常重要的指导作用。OEF成像可以无创性地获得组织氧摄取分数,最初被用于脑组织的相关研究中,关于肾脏方面的研究报道较少^[26]。MEGSE序列通过连续激励非对称性偏倚 180° 重聚脉冲,同时保持TE时间不变,从而使采集的MR图像信号只与磁场的均匀性变化有关,以消除 T_2 效应的影响。从Yablonskiy等^[7]的模型可知,如果将组织局部磁敏感效应的总强度用 R_2' 来表示,那么在稳态条件下, R_2' 与组织毛细血管静脉血容量 λ

及血管内 dHbO₂ 含量(即 OEF)呈正相关。本研究首次应用 OEF 成像来评估 DN 兔肾组织的氧摄取分数,所有图像质量均达到“好”,伪影小,肾脏皮髓质分解清晰,可用于评估。

本研究仍有很多不足之处:第一,实验组样本量小,两观察者对图像质量评估的一致性 Kappa 值可能缺乏稳健性,在后续研究中仍需进一步扩充样本量;第二,本研究模型成功率略低于文献报道,仍需进一步优化。

综上,经耳缘静脉注射四氧嘧啶可以成功建立 DN 兔模型,无创性 fMRI 可成功应用于 DN 兔模型的评估。

参考文献:

- [1] 李泽宇,刘栋,袁文明,等. 糖尿病肾病危险因素及血压控制临界值研究[J]. 中国全科医学,2014,17(20):2325-2328.
- [2] 林子桐,张超,沈雪梅,等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2014,8(5):765-773.
- [3] 李志杰,张悦. 糖尿病肾病动物模型的研究进展[J]. 生命科学,2011,23(1):90-95.
- [4] 刘毅,王宗保. 糖尿病肾病动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报,2006,14(1):67-70.
- [5] Chang S, Hypolite JA, DiSanto ME, et al. Increased basal phosphorylation of detrusor smooth muscle myosin in alloxan-induced diabetic rabbit is mediated by upregulation of Rho-kinase β and CPI-17[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290(3): F650-F656.
- [6] 朱昆,潘洪涛,罗萍,等. 四氧嘧啶诱发兔糖尿病模型的胰岛素管理及糖尿病肾病模型建立[J]. 吉林医学,2006,27(9):1010-1011.
- [7] Yablonskiy DA, Haacke EM. Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime [J]. Magn Reson Med, 1994, 32(6): 749-763.
- [8] An H, Lin W. Quantitative measurements of cerebral blood oxygen saturation using magnetic resonance imaging [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(8): 1225-1236.
- [9] An H, Liu Q, Chen Y, et al. Evaluation of MR-derived cerebral oxygen metabolic index in experimental hyperoxic hypercapnia, hypoxia, and ischemia[J]. Stroke, 2009, 40(6): 2165-2172.
- [10] An H, Lin W, Celik A, et al. Quantitative measurements of cerebral metabolic rate of oxygen utilization using MRI: a volunteer study[J]. NMR Biomed, 2001, 14(7-8): 441-447.
- [11] 郭道群. 中医药治疗糖尿病肾病临床研究进展[J]. 临床医学工程, 2014, 21(2): 258-259.
- [12] 刘俊伏,赵勇军,李军伟,等. 早期糖尿病肾病预防及治疗研究进展[J]. 医学研究与教育, 2010, 27(2): 83-85.
- [13] Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(6): F1138-F1144.
- [14] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000: 1516-1528.
- [15] 杨学东,王霄英. 肾脏 MR 扩散加权成像研究进展[J]. 放射学实践, 2008, 23(3): 341-343.
- [16] 许玉峰,王霄英,蒋学祥. 磁共振扩散加权成像对肾脏应用价值的初步研究[J]. 中国医学影像技术, 2005, 21(12): 1848-1851.
- [17] 邢金子,刘爱连,宋清伟,等. 3.0T BOLD MR 技术对大鼠急性单侧输尿管梗阻肾损害的研究[J]. 磁共振成像, 2011, 2(6): 439-445.
- [18] 陈容凤,伍筱梅,陈小燕,等. 正常大鼠肾脏 MR 弥散成像与大体解剖的对照研究[J]. 影像诊断与介入放射学, 2011, 20(3): 163-166.
- [19] Ogawa S, Lee TM, Kay AR, et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(24): 9868-9872.
- [20] 杨学东,王霄英. 肾脏 MR 血氧水平依赖成像的研究进展[J]. 国外医学(临床放射学分册), 2007, 30(6): 426-430.
- [21] 董健,杨莉,苏涛,等. 动脉自旋标记法磁共振量化分析急性肾损伤[J]. 中国科学:生命科学, 2013, 43(6): 519-524.
- [22] 刘茜玮,黄勇,肖江喜,等. 线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作氧摄取分数和脑血流的 MRI 随访研究[J]. 中华放射学杂志, 2012, 46(10): 943-946.
- [23] Zhang Y, Wang J, Yang X, et al. The serial effect of iodinated contrast media on renal hemodynamics and oxygenation as evaluated by ASL and BOLD MRI[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2012, 7(4): 418-425.
- [24] 杨学东,曹菊,王霄英,等. 3.0T 磁共振大鼠肾脏血氧水平依赖成像的初步研究[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(6): 809-811.
- [25] Yang X, Cao J, Wang X, et al. Evaluation of renal oxygenation in rat by using R2' at 3T magnetic resonance: initial observation [J]. Acad Radiol, 2008, 15(7): 912-918.
- [26] 张晓东,米悦,王晶,等. 基于 MRI 技术定量测量单侧肾动脉狭窄动物模型肾脏氧摄取分数的初步研究[J]. 放射学实践, 2015, 30(5): 519-524.

(收稿日期:2015-12-20 修回日期:2016-01-10)