

论 著

大鼠急性脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的MRI评估*

李淑健 程敬亮* 张勇

张赞霞

郑州大学第一附属医院磁共振科

(河南 郑州 450000)

【摘要】目的 利用动态增强磁共振成像(DCE-MRI)探究大鼠急性脑缺血再灌注后血脑屏障(BBB)通透性的变化特征,并与组织学“金标准”伊文思蓝(EB)染色对照分析。**方法** 制作SD大鼠大脑中动脉闭塞模型,分为缺血2h(再灌注0h)、再灌注1h、3h、6h、24h,共5组,每组10只,另设假手术组10只作为对照。对大鼠行T₁WI、T₂WI、弥散加权成像(DWI)、DCE-MRI、灌注加权成像(PWI)和延迟增强T₁WI检查,测量感兴趣区相对脑血流量(rCBV)、K^{trans}值、增强后相对信号强度百分比(rSI),结合脑组织中EB含量进行比较分析。**结果** 再灌注6h组K^{trans}值高于其他实验组(P<0.05),各实验组K^{trans}值与EB含量呈正相关(r=0.69, P<0.05),rSI与rCBV呈正相关(r=0.78, P<0.01)。**结论** DCE-MRI是研究急性期脑缺血再灌注后BBB通透性的理想手段,大鼠脑缺血再灌注后6h出现BBB开放高峰。常规增强MRI判断BBB开放受血流灌注影响。

【关键词】 动态增强磁共振成像; 血脑屏障; 脑缺血再灌注损伤

【中图分类号】 R445.2

【文献标识码】 A

【基金项目】 国家自然科学基金(编号: 81871327)

DOI:10.3969/j.issn.1672-5131.2023.01.001

Evaluation of Blood-Brain Barrier Permeability after Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats Using MRI*

Li Shu-jian, CHENG Jing-liang*, ZHANG Yong, ZHANG zan-xia.

Department of Magnetic Resonance, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

ABSTRACT

Objective To validate the blood-brain barrier (BBB) permeability measurements extracted from dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI) by comparing with gold standard histology in a rat model of ischemic stroke. **Methods** The middle cerebral artery occlusion models of SD rats were made and divided into five groups. Each group performed T₁WI, T₂WI, diffusion-weighted imaging (DWI), DCE-MRI, perfusion weighted imaging (PWI) and post-contrast T₁WI examinations before reperfusion, after reperfusion 1, 3, 6, and 24 h. Each experiment group and the control group has 10 rats. rCBV, K^{trans} and rSI in the region of interest (ROI) were calculated and the content of Evans blue in the brain tissue was measured. **Results** K^{trans} of reperfusion 6 h group was higher than other experiment groups (P<0.05). K^{trans} was positive correlation with the content of Evans blue (r=0.69, P<0.05). rSI was positive correlation with rCBV (r=0.78, P<0.01). **Conclusions** DCE-MRI can accurately evaluate BBB permeability. BBB opening is significantly increasing in BBB permeability at 6 h after reperfusion. Contrast-enhanced MRI for assessing BBB integrity is affected by cerebral perfusion.

Keywords: Dynamic Contrast-enhanced Magnetic Resonance Imaging; Blood-Brain Barrier; Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury

针对脑卒中的早期溶栓治疗可以恢复缺血区血供,减轻脑损伤,改善预后,但是同时引起的脑缺血再灌注损伤也对治疗方案的选择带来困扰。临床研究^[1]发现,5%~6%的溶栓治疗病人会出现伴有占位效应的严重出血,使脑卒中病人的死亡率增加11倍,而出血转化(hemorrhagic transformation, HT)的发生与血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)开放导致的脑组织继发性损伤有关。动态增强磁共振成像(dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI)可以无创、定量监测活体BBB通透性,较传统技术有了很大的进步^[2-3]。该技术利用药代动力学模型拟合对比剂透过破坏的BBB进入脑实质的过程,通过容积转运常数(Ktrans)实现了对BBB通透性改变的定量分析。

以往研究主要通过常规增强半定量判断脑卒中后BBB是否破坏^[4],应用DCE-MRI技术定量评估脑卒中后BBB变化规律的研究较少,且在脑卒中急性期的监测时间点有限。本研究利用DCE-MRI探究大鼠急性脑缺血再灌注后BBB通透性的变化情况,通过与组织学“金标准”伊文思蓝(Evans blue, EB)染色对照分析,评价Ktrans定量测定在大鼠脑缺血再灌注后BBB破坏中的检测价值。

1 资料与方法

1.1 动物分组 随机选取体重250~300 g健康雄性SD大鼠60只,平均体重(270.3±7.5)g。所有实验动物由河南省动物实验中心提供。采用随机数字表法将大鼠分为实验组和假手术组,实验组分为拔栓前缺血2h(再灌注0h)、再灌注1h、3h、6h、24h,共5组,每组10只,假手术组10只。

1.2 脑缺血模型制备 采用改良的Zea-Longa线栓法^[5]建立大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。实验组大鼠出现左侧肢体瘫痪或肌力减低,右侧Homer征阳性以及MRI弥散加权成像(diffusion weighted imaging, DWI)上右侧大脑中动脉供血区出现弥散受限视为MCAO模型制作成功,线栓退出后行PWI检查出现右侧大脑中动脉供血区血供恢复视为MCAO模型再灌注成功。假手术组操作过程除线栓插入深度约5mm,其余步骤与实验组相同,以保证线栓位于颈内动脉颅内的以远处。MCAO模型制作成功后,根据Garcia JH建立的神经功能评分法对大鼠相应时间点神经功能进行评分,最高18分,代表功能正常;最低3分,代表严重的功能损伤(见表1)。

1.3 MRI检查与图像分析 使用3.0 T GE 750超导MRI检查仪和大鼠专用4通道表面线圈行MRI扫描。实验组和假手术组大鼠分别行冠状位T₁WI、T₂WI、DWI、DCE-MRI、灌注加权成像(perfusion weighted imaging, PWI)和延迟增强T₁WI检查。扫描参数如下:快速自旋回波(fast spin echo, FSE)序列T₁WI: TR=1813ms, TE=24ms, 层厚=1.8 mm, 层间距=0.2mm, FOV=50mm×50mm, 矩阵=192×192, 激励次数(number of excitation, NEX)=2;快速自旋回波(fast spin echo, FSE)序列T₂WI: TR=3547ms, TE=85ms, FOV、层厚、层间距、激励次数、矩阵同T₁WI;自旋回波-平面回波(SE-EPI)序列DWI: TR=3340ms, TE=110ms, 矩阵=96×96, FOV、层厚、层间距、激励次数同T₁WI, b=0、800s/mm²; DCE-MRI: 采用GE LAVA序列, TR=8.8ms, TE=2.4ms, FOV=80 mm×80mm, 矩阵=126×126, NEX=1.00, 翻转角=12°, 层厚、层间距同T₁WI, 动态增强扫描前采用3°、6°、9°、12°、15°共5个翻转角行T₁-Mapping扫描。DCE-MRI共包括60次重复采集, 单次采集时间7 s, 总时间为420 s; PWI: TR=600 ms, TE=21ms, 翻转角=90°, FOV、层厚、层间距同T₁WI; 为了定量测量脑血流灌注

【第一作者】 李淑健, 女, 主治医师, 主要研究方向: 中枢神经系统。E-mail: zzhj2008@163.com

【通讯作者】 程敬亮, 男, 主任医师, 主要研究方向: 中枢神经系统。E-mail: cjr.chjl@vip.163.com

和微血管通透性,需两次经股静脉团注对比剂钆喷替酸葡甲胺(1mL/kg,注射时间<3s),第一次团注用于测量微血管通透性并作为第二次团注测脑血流灌注的预负荷量,以往研究^[6]发现,预负荷量可以减少对比剂渗漏对灌注图像的影响。注射对比剂30min后作冠状位T₁WI延迟增强扫描,扫描参数同T₁WI。

DCE-MRI序列后处理运用CINETOOL 2.0软件(GE Healthcare, China),通过对多翻转角图像处理计算出T₁ Mapping,动脉输入函数(vascular input function, VIF)选择上矢状窦,将动态增强图像的时间-信号强度曲线转换为时间-对比剂浓度曲线,利用药代动力学两室模型Modified Tofts计算出Ktrans图。PWI序列后处理使用GE后处理工作站的Functool软件,计算出反应脑血流灌注的脑血流量(cerebral blood volume, CBV)图。参照DWI、增强T₁WI图,于Ktrans图上选择梗死区内异常信号画划取感兴趣区(regions of interest, ROI),避开血管,测量三次取平均Ktrans值。在平扫与增强T₁WI图像测量缺血侧强化区域的信号强度(signal intensity, SI),根据以下公式求出增强后相对信号强度百分比rSI=缺血侧增强后SI/增强前SI×100%。增强后局部SI增加10%以上者认为有强化。CBV及假手术组、无肉眼观察强化者ROI选取均为视交叉水平层面(前凶后0.5mm)的皮层和基底节区直径2mm的圆形范围。为降低个体差异所引起的血流误差,计算CBV的相对值(缺血侧/健侧),得到rCBV。

1.4 伊文思蓝染色 假手术组和实验组大鼠完成各时间点(再灌注0h、1h、3h、6h、24h)扫描后,行EB染色。于股静脉插管注入2%EB(4mL/kg),30 min后经心脏灌注100mL生理盐水直至右心耳流出清亮液体。断头取脑,按照MR扫描的层面切成2mm厚的脑片,拍照观察缺血灶蓝染情况。分别取两侧大脑半球,称重后置入10%的三氯乙酸溶液中。匀浆、离心,取上清液用乙醇稀释后,分光光度仪在波长为620nm处比色,依据绘制的标准曲线定量分析EB含量。

1.5 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析。计量资料首先进行Kolmogorov-Smirnov正态分布检验,使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述。两组数据比较运用独立样本或配对样本t检验,多组比较使用单因素方差分析。计数资料采用卡方检验。Ktrans值、rSI和EB含量用相关性分析,满足双变量正态分布用

Pearson相关,否则用Spearman等级相关。以P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 MACO模型建立 实验组和假手术组共60只大鼠于术前行MRI头颅平扫,均未发现异常。实验组8只大鼠分别因DWI上发现缺血区未累积皮层区、PWI上未出现再灌注及未到观察点死亡而被排除实验。再灌注0h、1h、3h、6h、24h组纳入实验的大鼠数量分别为9、9、8、8、8。实验组和假手术组大鼠术后的神经功能评分,见表2。

2.2 再灌注评估 再灌注前(再灌注0 h组)CBV伪彩图出现明显灌注缺损,再灌注1 h、3 h、6 h、24 h组rCBV均高于再灌注0 h组(P<0.05),除再灌注24 h组(P>0.05),余实验组与假手术组rCBV具有显著差异(P<0.05)(见表3)。

2.3 大鼠BBB通透性MRI分析 再灌注1h、3h、6h、24h组大鼠缺血区Ktrans图均出现异常,缺血侧Ktrans值与假手术组、再灌注0 h组相比,差异均有统计学意义(P<0.001),其中再灌注6h组Ktrans值高于其他实验组(P<0.05)(见表3)(图1)。再灌注1h、3h、6h、24h组分别有3例、5例、5例、7例出现强化,除0h、24h组(P>0.05),余实验组延迟增强T₁WI强化率与Ktrans图异常率相比,差异均有统计学意义(P<0.05)。计算各实验组强化rSI,于再灌注24 h出现强化高峰(P<0.05)(见表3)(图2)。

2.4 EB染色结果 再灌注1h、3h、6h、24h组分别有5例、5例、8例、8例出现EB渗漏蓝染区。分光光度仪比色测量各个时间点实验组缺血侧EB含量与假手术组相比,除再灌注0h组外(P>0.05),差异均有统计学意义(P<0.01),实验组各个时间点缺血侧EB含量与对侧相比,差异均有统计学意义(P<0.05)(见表4)。

2.5 MRI与EB染色相关性分析 分析K^{trans}值、rSI与EB染色定量相关性,Ktrans值与EB含量呈正相关(r=0.69, P<0.05),rSI与EB含量无明显线性相关(r=0.31, P>0.05)。分析K^{trans}值、rSI与rCBV相关性,rSI与rCBV呈正相关(r=0.78, P<0.01),K^{trans}值与rCBV无明显线性相关(r=0.25, P>0.05)。

表1 大鼠MCAO模型神经功能评分

试验	分数			
	0	1	2	3
自主运动(大鼠放入笼中5min)	无自主运动	很少运动	运动并接触1侧或2侧笼壁	运动并接触≥3侧笼壁
体态平衡(提尾观察四肢运动)	患侧无运动	患侧稍运动	患侧运动迟缓	两次对称运动
前肢伸展运动(提尾前肢)	患侧前肢无伸展	患侧前肢稍伸展	患侧前肢伸展不如对侧	两前肢伸展一致
爬壁实验		无法爬上	患侧爬壁较差	正常爬上
躯干触觉反应		患侧无反应	患侧弱于对侧	反应相同
胡须触觉反应		患侧无反应	患侧弱于对侧	反应相同

表2 假手术组与实验组大鼠术后神经功能评分

组别	0h	1h	3h	6h	24h
假手术组	17.16±0.75	17.00±0.45	17.32±0.83	17.09±0.68	17.20±0.79
实验组	7.75 [▲] ±2.05	7.39 [▲] ±1.78	6.54 [▲] ±1.26	6.03 [▲] ±0.74	5.47 [▲] ±0.60

注: ▲表示实验组某一时间点神经功能评分与假手术组相比, P<0.05

表3 假手术组与实验组rCBV、K^{trans}值和rSI

MRI参数	假手术组	实验组				
		0h	1h	3h	6h	24h
rCBV(%)	97.4±7.0	37.2±9.8*	60.8±8.7*	62.4±9.3*	77.5±8.4*	95.3±9.1
K ^{trans} (×10 ⁻² min ⁻¹)	0.7±0.32	1.1±0.43	4.5±0.66*	6.8±1.02*	8.2±1.85*	6.1±0.94*
rSI(%)	101±9.5	105±8.2	132±11.7*	155±13.5*	160±12.9*	188±15.4*

注: *与假手术组比较, P<0.05

表4 假手术组与实验组脑组织EB含量(单位: μg/g)

部位	假手术组	实验组				
		0h	1h	3h	6h	24h
右	7.7±1.9	8.2±1.8	14.5±2.9*▼	18.9±2.6*▼	23.5±3.1*▼	19.7±4.0*▼
左	7.4±2.1	7.9±2.3	7.6±1.4	7.8±1.9	7.6±2.2	7.9±2.7

注: *实验组缺血侧EB含量与假手术组比较, P<0.05, ▼实验组缺血侧EB含量与对侧比较, P<0.05

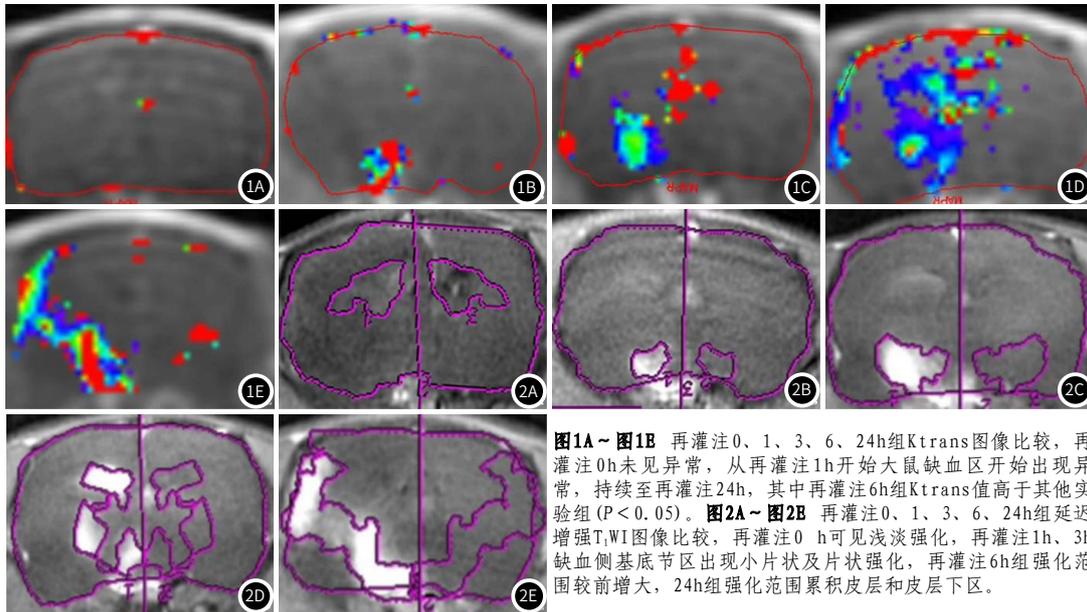


图1A~图1B 再灌注0、1、3、6、24h组Ktrans图像比较,再灌注0h未见异常,从再灌注1h开始大鼠缺血区开始出现异常,持续至再灌注24h,其中再灌注6h组Ktrans值高于其他实验组($P < 0.05$)。图2A~图2B 再灌注0、1、3、6、24h组延迟增强T₁WI图像比较,再灌注0 h可见浅淡强化,再灌注1h、3h缺血侧基底节区出现小片状及片状强化,再灌注6h组强化范围较前增大,24h组强化范围累积皮层和皮层下区。

3 讨论

以往对BBB的研究局限于组织学方法,不能用于在体研究和动态观察。近年来有国外研究^[7-8]利用专用动物MRI扫描仪完成了大鼠BBB通透性的定量分析,但是由于专用动物MRI扫描仪不普及,该技术仍很少应用于基础研究。本研究利用临床3.0 T扫描仪对大鼠BBB通透性进行定量及半定量分析,与组织学“金标准”对照,探究MRI新技术在脑缺血再灌注基础研究中的应用。

DCE-MRI应用动态成像跟踪对比剂随时间透过破坏的BBB扩散到组织中的情况,获得BBB通透性改变的信息。Ktrans代表对比剂从血管内向血管外细胞外空间的单向通透程度,单位是 min^{-1} 。BBB通透性增高、存在血流灌注是保证对比剂渗漏到血管外间隙、Ktrans值能够测量的前提。本实验发现再灌注0 h组Ktrans图未见异常,从再灌注1 h开始大鼠缺血区Ktrans图出现异常,持续至再灌注24h,其中再灌注6h组Ktrans值高于其他实验组($P < 0.05$)。上述研究结果说明从再灌注1 h起BBB通透性就开始升高,到达再灌注6h时BBB通透性达到最高,至再灌注24h时BBB通透性较前有所下降,但仍处于异常状态。脑缺血BBB开放的时间比较复杂,一般认为短暂性脑缺血后BBB呈双相性开放,永久脑缺血只存在单相变化。短暂性脑缺血再灌注后由于能量障碍、炎症反应、细胞内钙失稳态、自由基生成、蛋白酶的激活、凋亡基因激活等多个环节相互影响,恶性循环,导致内皮细胞凋亡或坏死,脑血管结构改变,BBB功能破坏,血管再通后较短时间内BBB通透性明显增加,经过短暂下降后于24-48 h再次升高,但不同的研究结果有一定的差异^[9-11]。Ramadan等^[9]发现再灌注直到4周BBB持续开放,并且渗漏程度是随着时间减小的,该实验并未得出双相开放的结果,考虑可能与研究时间有关,仅观察24 h之内的Ktrans值变化规律,与本实验结果一致。Kim等^[10]运用DCE-MRI定量测量BBB通透性,发现Ktrans在脑缺血再灌注后2-3 h即可出现明显升高。Hoffmann等^[11]研究结果表明Ktrans在再灌注后4 h对HT具有较高的预测价值。

常规增强中BBB开放区域可表现为缺血区脑实质的异常强化,通过计算rSI对BBB开放程度进行半定量分析。该技术计算简单,但不能精确评估组织内对比剂浓度,半定量参数与病变组织生理、对比剂动力学的关系尚不明确^[12]。本实验中延迟增强T₁WI强化率低于Ktrans图异常率($P < 0.05$),说明DCE-MRI可以发现增强图像上未出现强化的BBB异常区。Pillai等^[13]利用常规增强发现大鼠脑缺血再灌注后4 h和48 h为BBB双相开放时间,与本研究再灌注24 h出现强化高峰($P < 0.05$)的结果不一致。本研究还发现rSI与灌注参数rCBV呈正相关,说明rSI不仅取决于BBB通透性,还受血流灌注影响。因此,利用常规增强判断BBB破坏程度时需结合反映微循环的灌注加权成像来全面分析。

本研究应用EB染色离体评价BBB通透性,利用组织学方法再次表明脑缺血再灌注后BBB通透性增加, K^{trans}值与EB含量呈正相关($P < 0.05$),该结果进一步支持DCE-MRI对脑缺血再灌注后BBB

通透性的定量评估价值。但是, K^{trans}异常区域与EB蓝染区并不是完全一致,考虑由于对比剂与EB的分子量及外渗机制不同,造成两者在组织间的分布差异^[13]。Hoffmann等^[14]在研究自发性高血压大鼠和Wistar大鼠脑缺血再灌注后BBB通透性改变时发现,所有在EB染色上确认有BBB破坏的区域,测量其K^{trans}值均高于非梗死组织, K^{trans}值与EB渗漏程度相关。

本研究利用临床3.0 T扫描仪对大鼠急性脑缺血再灌注后BBB通透性进行定量及半定量分析,由于观察时间为24h以内,本文没有进一步探讨BBB通透性与再灌注损伤的关系,下一步将延长再灌注时间,结合T₂ mapping和ESWAN序列,更全面地分析BBB通透性在脑水肿演变和HT发生中的作用。

参考文献

- [1] Suh C H, Jung S C, Cho S J, et al. MRI for prediction of hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis[J]. *Acta Radiol*, 2020, 61 (7): 964-972.
- [2] Thrippleton M J, Backes W H, Sourbron S, et al. Quantifying blood-brain barrier leakage in small vessel disease: Review and consensus recommendations[J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 15 (6): 840-858.
- [3] O'Keefe E, Kelly E, Liu Y, et al. Dynamic blood-brain barrier regulation in mild traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2020, 37 (2): 347-356.
- [4] 黄海东, 徐凯, 孔凡彬. 增强MRI在大鼠急性脑缺血再灌注血脑屏障损伤中的研究[J]. *中国CT和MRI杂志*, 2006, 4 (2): 43-45.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [6] Wintermark M, Sesay M, Barbier E, et al. Comparative overview of brain perfusion imaging techniques[J]. *Stroke*, 2005, 36 (9): e83-e99.
- [7] Yu M, Wang M, Yang D, et al. Dynamics of blood brain barrier permeability and tissue microstructure following controlled cortical impact injury in rat: A dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and diffusion kurtosis imaging study[J]. *Magn Reson Imaging*, 2019, 62 (10): 1-9.
- [8] Yang Y, Yang L Y, Orban L, et al. Non-invasive vagus nerve stimulation reduces blood-brain barrier disruption in a rat model of ischemic stroke[J]. *Brain Stimul*, 2018, 11 (4): 689-698.
- [9] Abo-Ramadan U, Durukan A, Pitkonen M, et al. Post-ischemic leakiness of the blood-brain barrier: a quantitative and systematic assessment by Patlak plots[J]. *Exp Neurol*, 2009, 219 (1): 328-333.
- [10] Kim E S, Lee S K, Kwon M J, et al. Assessment of blood-brain barrier permeability by dynamic contrast-enhanced MRI in transient middle cerebral artery occlusion model after localized brain cooling in rats[J]. *Korean J Radiol*, 2016, 17 (5): 715-724.
- [11] Hoffmann A, Bredno L, Wendland M F, et al. MRI blood-brain barrier permeability measurements to predict hemorrhagic transformation in a rat model of ischemic stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2012, 3 (4): 508-516.
- [12] 谢录玲, 谢春, 涂文彬, 等. 动态增强磁共振成像鉴别诊断胶质瘤复发和放射性脑损伤的临床价值分析[J]. *中国CT和MRI杂志*, 2020, 17 (11): 13-41.
- [13] Pillai D R, Dittmar M S, Baldraranov D, et al. Cerebral ischemia-reperfusion injury in rats—a 3 T MRI study on biphasic blood-brain barrier opening and the dynamics of edema formation[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29 (11): 1846-1855.
- [14] Hoffmann A, Bredno L, Wendland M F, et al. Validation of in vivo magnetic resonance imaging blood-brain barrier permeability measurements by comparison with gold standard histology[J]. *Stroke*, 2011, 42 (7): 2054-2060.