

· 基础研究 ·

# 磁共振成像在大鼠脑出血模型制作中的初步应用研究

付怀栋<sup>1</sup>, 潘永进<sup>2</sup>, 王秀彬<sup>2</sup>, 林福军<sup>1</sup>, 杜守云<sup>1</sup>

(1. 江苏省灌云县人民医院神经内科 222200; 2. 江苏省南通大学附属医院神经内科 226001)

**摘要:**目的 探讨磁共振成像(MRI)在大鼠脑出血(ICH)模型制作中的应用。方法 采用自体血立体定向注入大鼠尾状核建立脑出血模型,术后 24 h 进行神经功能评分,同时应用研制的串联线圈对大鼠进行头颅 MRI,比较两种方法对判断大鼠脑出血模型制作中模型成功与否的可靠性。结果 经过神经功能评分判断为模型成功的 30 只大鼠,头颅 MRI 显示有 10 只大鼠血液反流入皮质、破入脑室或蛛网膜下腔,其余 20 只大鼠在右侧基底节区可见大小一致的血肿。结论 应用 3.0 T MRI 结合串联线圈可以获得高质量的图像,准确判断大鼠脑出血模型制作是否成功。

**关键词:**磁共振成像;脑出血;大鼠;神经功能缺损评分

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)16-1607-02

## Preliminary study of MR imaging in making intracerebral hemorrhage model of rats

Fu Huaidong<sup>1</sup>, Pan Yongjin<sup>2</sup>, Wang Xiubin<sup>2</sup>, Lin Fujun<sup>1</sup>, Du Shouyun<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, Guanyun County People's Hospital, Guanyun, Jiangsu 222200, China;

2. Department of neurology, Affiliated Hospital, nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the application of MR imaging in making the intracerebral hemorrhage (ICH) model of rats. **Methods** The ICH model was established by infusing autologous blood 50 $\mu$ L into the right caudate nucleus in rats. At 24 h after operation, the behavioral tests were tested, and then MR scanning was performed on the self-made aqueous solution phantom with the series coil. The reliability of the two methods was compared for the evaluation of the success of the rat ICH model. **Results** 30 rats showed significant neurological deficits in the behavioral tests were judged as the successful models. MR scanning showed that the blood of 10 rats was broken into the ventricles or subarachnoid, the same size of hematoma was seen in the basal ganglia of the other 20 rats. **Conclusion** The high quality MR images can be obtained by 3.0 T MR combined with series coils. MR imaging can be used as a method judging the success of the rat ICH model.

**Key words:** magnetic resonance imaging; cerebral hemorrhage; rats; neurological behavior

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是威胁人类健康及生活质量的重要事件之一。目前,对脑出血组织学和病理生理过程的研究越来越深入,但是,基础研究除了要有稳定的动物模型,而且需要有可靠的用于检测模型是否成功的方法和手段,以便得出的数据更有可比性,结果更可靠。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 选取健康成年雄性 SD 大鼠 36 只,体质量 250~280 g,由南通大学实验动物中心提供,分为假手术组 6 只大鼠[用于磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)],模型组 30 只。

**1.2 主要试剂及仪器** GE Signa Excite HD 3.0 T MR 机、鼠头立体定位仪(上海江湾 I 型 C)、微量进样器(100  $\mu$ L,上海安亭微量进样器厂)、医用骨蜡(上海强生公司)、水合氯醛(广州汕头西陇化工厂)。

**1.3 动物模型的制备** 参照 Rosenberg 等<sup>[1]</sup>报道的方法制备大鼠脑出血模型,用 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠(350 mg/kg),将其俯卧位固定在立体定位仪上,调节门齿托的高度,使大鼠前囟、后囟处于同一水平,沿头皮正中切一长约 10 mm 切口,用 30% 双氧水腐蚀颅骨上腱膜及颅骨外膜,无菌操作暴露前囟,定位于前囟前 0.2 mm,中线向右旁开 3 mm 处钻一直径为 1 mm 的小孔,进针深度为 5.5 mm(即尾壳核位置)。用 40  $^{\circ}$ C 水温浴大鼠尾巴约 5 min 后取出擦干,乙醇消毒后,在距离大鼠尾巴末端约 2~3 mm 处剪断鼠尾,断尾取血 50  $\mu$ L,用微量进样器在 3~4 min 内缓慢注入,注血结束后留针 10 min 后缓慢退针,局部用骨蜡封闭后缝合皮肤。所有操作均在无菌条件下进行,术毕将大鼠放回笼中饲养,自由活动进食进水。

假手术组只刺针,不向脑内注血。

**1.4 神经功能检测** 术后 24 h,参照 Longa 评分标准<sup>[2]</sup>对所有大鼠进行神经功能评分:无神经功能缺损为 0 分;左侧前爪不能完全伸展为 1 分;行走时,大鼠身体向左侧转圈记为 2 分;行走时,大鼠身体向左侧(瘫痪侧)倾倒入为 3 分;不能自发行走,有意识丧失记为 4 分。神经功能评分大于 1 分者说明模型制备成功纳入实验,不满足要求者排除本实验。得分越高说明神经功能受损越严重。

**1.5 头颅磁共振扫描** 对神经功能检测发现有功能缺损的大鼠,在脑出血模型制备 24 h 后,进行头颅 MRI,观察有无形成大小一致血肿,血肿有无破入脑室及蛛网膜下腔。线圈设计:采用 4 个表面线圈串联,线圈应用串联 RLC 谐振电路,根据<sup>1</sup>H 在外加均匀磁场中进动拉莫尔定理,在 3.0 T 磁共振机<sup>1</sup>H 的进动频率为 127.74 MHz,应用网络分析仪测量反射系数 S11 为 -21 dB, f<sub>0</sub> 为 127.74 MHz,  $\Delta f$  为反射系数 S11 在 -3 dB 时的带宽,测量其空载和负载时的品质因素 Q 分别为 98 和 94。扫描序列为,轴位 T2WI:FRFSE-XL/90, TR 5000 ms, TE 85 ms, FOV 9.0 cm  $\times$  5.4 cm, 层厚 1 mm, 间隔 0.1 mm, NEX 320/224/2。冠状位 T2WI:FRFSE-XL/90, TR 2000 ms, TE 85 ms, FOV 8.0 cm  $\times$  8.0 cm, 层厚 1 mm, 间隔 0.1 mm, NEX 320/192/2。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用独立样本 *t* 检验进行组间比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。图像处理采用 efilm 图像处理软件。

### 2 结 果

**2.1 神经行为学检测** 术前所有大鼠神经功能评分正常,术后

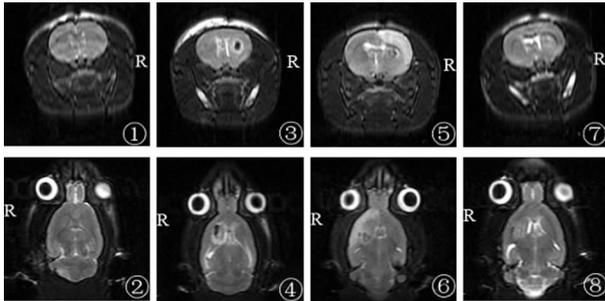
24 h, 模型组所有大鼠神经行为学评分明显增高, 均达到 Longa 评分方法判断大鼠脑出血模型制作成功的标准, 见表 1。

表 1 神经功能评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Longa 评分方法
模型组术前	30	0
模型组术后	30	1.97 ± 0.67*

\*:  $P < 0.01$ , 与术前比较。

2.2 头颅 MRI 对经过神经功能评分, 达到入选标准的 30 只大鼠以及假手术组大鼠进行头颅 MRI 显示, 头颅 MRI 机结合串联线圈可清楚地分辨灰质及白质结构, 显示脑室的结构及颅内水肿的大小。假手术组大鼠颅内无异常信号, 模型组发现有 20 只大鼠在右侧基底节区形成大小一致的血肿, 另外 10 只大鼠血液反流入皮质、破入脑室或蛛网膜下腔, 没有形成大小一致血肿。见图 1。



①、②分别为假手术组冠状面与轴面 T2WI 图像, 图上无异常信号; ③、④为脑出血模型制作成功图像, 右侧基底节区形成圆形或卵圆形血肿, 图上显示为低信号; ⑤、⑥为血液反流入大脑皮质, 在图上显示为高信号, 形成的血肿较小, 显示为低信号; ⑦、⑧为血液破入脑室及皮质与白质交界处, 图上显示右侧脑室内异常高信号, 皮质与白质交界处可见低信号, 基底节区未见血肿形成。

图 1 大鼠脑出血模型 MRI 结果(冠状面与轴面 T2WI 图像, 俯卧位扫描)

### 3 讨论

出血性中风是临床常见的神经系统疾病, 其较高的致死率和致残率仍是神经科学亟待攻克的难题。有关脑出血组织学和病理生理学的研究越来越深入, 目前, 用于研究脑出血组织学和病理生理学过程时的实验动物以大鼠最为常用, 常用的实验性脑出血模型有以下 4 种: (1) 自发性脑出血模型; (2) 微球囊膨胀脑出血模型; (3) 胶原酶诱导法; (4) 自体血立体定向注入的血肿制备方法。其中, 自体血注入法应用了非肝素化自体血, 较接近人类脑出血, 适合研究脑出血的自然过程和病理形态学特点, 更好地观察凝固过程中各种因子对脑组织代谢和血流的影响, 从而为临床治疗提供依据。但自体血注入方法用于大鼠时的重复性差, 并且注血量、血肿大小与部位难以掌握, 其原因主要是注血速度稍快, 血流往往顺针道溢出, 进入蛛网膜下腔和硬脑膜下腔, 且易破入脑室<sup>[3]</sup>。在本研究中, 本组发现自体血注入方法制作模型时, 30 只经神经行为学检测判断为模型制作成功的大鼠, 经头颅 MRI 显示只有 20 只大鼠在右侧基底节区形成大小一致的血肿, 其余 10 只大鼠血液破入脑室、蛛网膜下腔和硬脑膜下腔, 形成的血肿大小不等。这与操作者的熟练程度, 采血、注血的时间, 注血的部位、大鼠个体差异、仪器设备等有关, 任何一个环节的问题均可导致模型制作的失败, 有些是可以克服的, 有些是无法避免的, 因此, 要判断制作的大鼠脑出血模型是否成功(即形成的血肿大小是否一致、部位是否相同、有没有破入脑室及蛛网膜下腔), 就必须要有可靠的检测方法。

以往, 用神经行为学检测来判断大鼠脑出血后神经功能缺损, 同时用于判断大鼠脑出血模型是否成功, 如 Longa<sup>[2]</sup> 评分方法、Corner Turnt 试验<sup>[4]</sup>、Narrow-Alley Corner 试验<sup>[5]</sup> 等方法。本研究中, 用 Longa 评分方法进行检测, 发现所有模型组大鼠均有神经功能缺损表现, 按照评分标准, 说明脑出血模型是成功的, 可以进行下一步相关研究, 如测定脑含水量、免疫学检测、酶学方面、组织学方面等实验。但是, 经过 MRI 发现, 30 只大鼠中, 只有 20 只大鼠(占 66.67%) 在右侧基底节区形成了大小一致的血肿, 这说明神经功能评分虽能判断有无神经功能缺损, 但是用来判断脑出血模型是否成功具有不确定性, 利用这些大鼠得到的实验结果可靠性差, 这就需要一种稳定、可靠的检测方法来帮助判断脑出血模型是否成功。

大鼠模型 MRI 的研究常应用检查人体的各种线圈进行扫描, 这些线圈均得不到很清晰的图像<sup>[6-7]</sup>, 因大鼠的各器官组织体积小, 用扫描人体线圈扫描大鼠, 成像的难度大, 无法清楚显示内部结构, 图像模糊。张海琴等<sup>[8]</sup> 应用 3.0 T 临床 MRI 设备及正交腕关节线圈可以获得大鼠脑和脊髓高质量 MRI 图像, 但扫描时间长, 并需要用工作站进行图像后处理。MRI 的质量主要看图像信噪比(signal to noise ratio, SNR), 在 MR 机不变的情况下, 主要影响因素为射频线圈的性能。王秀彬等<sup>[9]</sup> 研究结果显示, 串联线圈的 SNR 比 SNR 最好的膝关节线圈高出 6 倍以上。本研究用 3.0 T MR 机, 结合研制的串联线圈对大鼠脑组织进行扫描发现, 大鼠脑出血模型的 T2WI 能清楚地分辨灰质和白质, 很好地显示脑室的结构和血肿的位置及大小, 准确判断大鼠脑出血模型制作是否成功, 得出的结果直观、可靠, 克服了以往神经行为学检测方法的不确定性、人为干扰因素大等缺点。

应用临床型 MRI 机结合研制的串联线圈能够得到清晰、分辨率高和对比度好的图像, 能直观地判断制作的大鼠脑出血模型是否成功, 而且, 还可以进一步进行大鼠脑出血药物治疗后血肿和水肿的演变等方面的研究。

### 参考文献:

- [1] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1990, 21(5): 801-807.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] 李俐涛, 杨懿, 尹静, 等. 脑出血模型[J]. 河北医科大学学报, 2006, 27(5): 496-498.
- [4] Hua Y, Schallert T, Keep RF, et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat[J]. Stroke, 2002, 33(10): 2478-2484.
- [5] 陈绍春, 潘伟生, 李明, 等. 神经行为学实验 Narrow-Alley Test 及 Corner Test 改良: Narrow-Alley Corner Test [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(6): 406-409.
- [6] Broekmann MA, Ulmer S, Leppert J, et al. Analysis of mouse brain using a clinical 1.5 T scanner and a standard small loop surface coil[J]. Brain Res, 2006, 1068(1): 138-142.
- [7] Ulmer S, Reeh M, Krause J, et al. Dynamic contrast-enhanced susceptibility-weighted perfusion MRI(DSC-MRI) in a glioma model of the rat brain using a conventional receive-only surface coil with an inner diameter(下转第 1611 页)

经被证实<sup>[6]</sup>。目前已经有研究表明姜黄素具有抗细胞增殖的作用,但是具体机制还不甚清楚<sup>[7-8]</sup>。根据其众多药理作用与 HO-1 保护作用相似,姜黄素的相关保护作用是否经过 HO-1 介导值得研究。

本研究结果显示,Ox-LDL 在一定浓度范围内浓度依赖性地诱导血管平滑肌细胞增殖,当超过一定浓度,具备细胞毒性。此实验发现与 Chang 等<sup>[9]</sup>的研究结果相类似,说明了 Ox-LDL 对血管平滑肌细胞增殖影响的特点,其机制可能是通过激活 Ras/Raf/MEK/MAPK 通路促进细胞有丝分裂<sup>[10]</sup>。与之类似,Schwer 等<sup>[11]</sup>也发现姜黄素 HO-1 介导抑制胰腺星状细胞的增殖由阻遏 ERK1/2 磷酸化的机制实现。同时,本组也发现姜黄素可有效抑制 Ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞增殖,并且此抑制效应可被 HO-1 的抑制剂 ZnPPIX 部分阻断。这提示 HO-1 很可能参与了姜黄素抑制 Ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞增殖的保护效应。同样,有学者发现在球囊损伤的大鼠模型中,HO-1 介导 NO 抑制大鼠血管平滑肌增殖,从而显著地抑制了内膜增生<sup>[12]</sup>。为了进一步证实此发现,本组观察了姜黄素对血管平滑肌细胞 HO-1 mRNA 和蛋白表达的影响,发现姜黄素可显著地上调血管平滑肌细胞 HO-1 mRNA 和蛋白表达。综上所述,提示姜黄素抗 Ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞增殖的作用经过 HO-1 介导。

PCNA 又称周期蛋白,是一种与细胞增殖周期有关的核内糖蛋白,是 DNA 复制的必需成分,其表达与细胞增殖活性有关,是使细胞由静息期进入 S 期的关键蛋白<sup>[13]</sup>,已成为评价细胞增殖状态的一项客观指标。本组研究发现 HO-1 抑制剂上调姜黄素抑制 Ox-LDL 诱导 VSMCs 增殖细胞核抗原高表达,提示 HO-1 介导的抑制增殖的效应可能部分通过抑制 PCNA 表达实现。另外研究发现 HO-1 的抗增殖效应通过上调细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 P21<sup>[14]</sup>,P21 是细胞周期素蛋白 cdk-2 抑制蛋白,cdk-2 亦是细胞周期 G<sub>1</sub> 和 S 期调节关键。Liu 等<sup>[15]</sup>以含 HO-1 基因的重组腺病毒转染大鼠主动脉平滑肌细胞,被转染的大鼠主动脉平滑肌细胞以剂量依赖方式表达 HO-1 mRNA、HO-1 蛋白和提高酶的活性,刺激促凋亡基因 p53 表达,促进 VSMCs 凋亡而抑制血清刺激的 VSMCs 增殖。

综上所述,姜黄素显著地抑制 Ox-LDL 诱导的大鼠 VSMC 增殖,其机制是由 HO-1 介导的 PCNA 表达下调实现的。这为进一步研究姜黄素防治 AS 提供了一定的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407(6801): 233-241.
- [2] Li Q, Guo Y, Ou Q, et al. Gene transfer of inducible nitric oxide synthase affords cardioprotection by upregulating heme oxygenase-1 via a nuclear factor- $\kappa$ B-dependent pathway[J]. Circulation, 2009, 120(13): 1222-1230.
- [3] Owens GK, Loeb A, Gordon D, et al. Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentia-

tion[J]. J Cell Biol, 1986, 102(2): 343-352.

- [4] Durante W. Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis[J]. Front Biosci, 2011, 17: 2372-2388.
- [5] Durante W. Targeting heme oxygenase-1 in vascular disease[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(12): 1504-1516.
- [6] Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(4): 787-809.
- [7] Huang HC, Jan TR, Yeh SF. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Eur J Pharmacol, 1992, 221(2/3): 381-384.
- [8] Qin L, Yang YB, Tuo QH, et al. Effects and underlying mechanisms of curcumin on the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by Chol; MbetaCD[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(2): 277-282.
- [9] Chang WC, Yu YM, Chiang SY, et al. Ellagic acid suppresses oxidized low-density lipoprotein-induced aortic smooth muscle cell proliferation; studies on the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and proliferating cell nuclear antigen expression[J]. Br J Nutr, 2008, 99(4): 709-714.
- [10] Yang CM, Chien CS, Hsiao LD, et al. Mitogenic effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway[J]. Br J Pharmacol, 2001, 132(7): 1531-1541.
- [11] Schwer CI, Guerrero AM, Humar M, et al. Heme oxygenase-1 inhibits the proliferation of pancreatic stellate cells by repression of the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 327(3): 863-871.
- [12] Cerrito MG, Scagliarini A, Froio A, et al. Heme oxygenase-1 inhibition prevents intimal hyperplasia enhancing nitric oxide-dependent apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(8): 1204-1214.
- [13] Morris GF, Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle[J]. J Biol Chem, 1989, 264(23): 13856-13864.
- [14] Notoya M, Nishimura H, Woo JT, et al. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 534(1-3): 55-62.
- [15] Liu XM, Chapman GB, Wang H, et al. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells[J]. Circulation, 2002, 105(1): 79-84.

(收稿日期: 2011-09-11 修回日期: 2011-12-22)

(上接第 1608 页)

- of 47 mm at a clinical 1.5 T scanner[J]. J Neurosci Methods, 2008, 172(2): 168-172.
- [8] 张海琴, 李坤成, 于春水, 等. 临床应用型 MR 大鼠中枢神经系统成像的初步研究[J]. 中国医学影像学技术, 2008, 24

(9): 1352-1355.

- [9] 王秀彬, 曹和涛, 李敏, 等. 串联线圈大鼠 MR 成像的初步应用研究[J]. 中华放射学杂志, 2010, 44(9): 991-994.

(收稿日期: 2011-11-08 修回日期: 2011-12-27)