

# 钆塞酸二钠增强磁共振成像评估小鼠脑缺血再灌注损伤中炎症动态变化

赵依灵,阮鹏,何丽,罗世勇,周浪,杨凡  
武汉市第三医院放射科,湖北 武汉 430074

**【摘要】目的:**利用钆塞酸二钠增强磁共振成像研究小鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应的动态变化。**方法:**通过封闭缝合线阻断右侧大脑中动脉,建立C57BL/6n小鼠脑缺血再灌注模型。随后,小鼠尾静脉注射钆塞酸二钠,在相应时间点进行磁共振扫描,观察信号变化。此外,免疫组织化学技术用于测量脑组织炎症因子的水平。**结果:**在大脑中动脉闭塞(MCAO)组和MCAO+钆塞酸二钠组之间,脑组织炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )水平无显著性差异。在注射钆塞酸二钠的小鼠再灌注后负增强区的最低信号比降低。**结论:**钆塞酸二钠注射液不影响脑缺血再灌注急性期的炎症反应,钆塞酸二钠增强磁共振成像可作为监测脑缺血再灌注损伤急性期炎症反应的有效手段。

**【关键词】**脑缺血再灌注;钆塞酸二钠;炎症反应;磁共振

**【中图分类号】**R364

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2023)04-0436-04

## Dynamic assessment of inflammation in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury using gadoxetate disodium-enhanced magnetic resonance imaging

ZHAO Yiling, RUAN Peng, HE Li, LUO Shiyong, ZHOU Lang, YANG Fan

Department of Radiology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430074, China

**Abstract: Objective** To investigate the dynamic changes of inflammatory responses in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury using gadoxetate disodium-enhanced magnetic resonance imaging. **Methods** A C57BL/6n mouse model of cerebral ischemia-reperfusion was established by blocking the right middle cerebral artery with the closed suture. Subsequently, gadoxetate disodium was injected into the tail vein of the mice, and MRI scans were performed at the corresponding time points to observe the signal changes. In addition, immunohistochemical techniques were used to measure the levels of inflammatory cytokines in brain tissues. **Results** There were no significant differences in the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  between the middle cerebral artery occlusion (MCAO) group and MCAO + gadoxetate disodium group. The lowest signal ratio in the negative enhancement region was reduced after reperfusion in mice injected with disodium gadolinium. **Conclusion** Gadoxetate disodium injection does not affect the inflammatory response during acute cerebral ischemia-reperfusion. Therefore, gadoxetate disodium-enhanced magnetic resonance imaging can be used as an effective means to monitor the inflammatory response during acute cerebral ischemia-reperfusion.

**Keywords:** cerebral ischemia-reperfusion; disodium gadoxetate; inflammatory response; magnetic resonance

### 前言

缺血性卒中是威胁人类健康的常见疾病之一。经及时治疗,虽然患者的脑缺血区域血供可恢复正常,但因脑缺血导致的神经功能障碍依然是关

注的重点。继发性损伤在脑缺血再灌注神经功能损伤过程中起关键作用,而脑卒中后的炎症反应是继发性损伤的一个重要方面<sup>[1]</sup>。炎症反应是脑缺血再灌注损伤的关键成分<sup>[2]</sup>。因此,表征脑缺血再灌注损伤中炎症反应的时空变化对于治疗脑缺血再灌注损伤具有重要意义<sup>[3]</sup>。磁共振(MRI)扫描是一种无创、无辐射的技术,可用于从多个角度显示脑缺血病灶。T<sub>1</sub>加权成像(T<sub>1</sub>WI)是通过纵向弛豫时间T<sub>1</sub>加权的磁共振成像,T<sub>1</sub>WI可以突出组织T<sub>1</sub>松弛(纵向松弛)的差异。T<sub>2</sub>加权成像(T<sub>2</sub>WI)是通过横向弛豫时间T<sub>2</sub>加权的磁共振成像,T<sub>2</sub>WI可以突出组织T<sub>2</sub>松弛(横向松

**【收稿日期】**2022-10-21

**【基金项目】**湖北省卫生健康科研基金(WX21C30)

**【作者简介】**赵依灵,研究方向:医学影像,E-mail: zyl\_888111@163.com

**【通信作者】**杨凡,主治医师,研究方向:医学影像,E-mail: 298072326@qq.com

com

弛)的差异。缺血性脑组织  $T_1WI$  呈低信号,  $T_2WI$  呈高信号<sup>[3]</sup>。钆塞酸二钠是一种新型造影剂,是动态观察体内细胞浸润过程的有效MRI分子成像方法。钆塞酸二钠不能穿过未受损的血脑屏障,但当脑缺血再灌注发生后,导致血脑屏障破坏,钆塞酸二钠即可透过血脑屏障<sup>[4]</sup>。钆塞酸二钠MRI可以检测体内巨噬细胞和炎症反应,并已用于各种疾病的研究,如主动脉壁炎症<sup>[5]</sup>。钆塞酸二钠颗粒可被巨噬细胞吞噬,因此可用于脑缺血后炎症反应的成像。脑缺血后存在于脑组织中的脑小胶质细胞被大量激活,这些激活的小胶质细胞可以吞噬特定的钆塞酸二钠。本研究拟通过钆塞酸二钠增强MRI,观察脑缺血再灌注损伤小鼠模型急性期的炎症反应的时空变化,以寻找监测脑缺血再灌注损伤急性期炎症反应的可靠方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

所有实验和程序均经武汉市第三医院伦理委员会批准。总共54只野生型、SPF级的雄性C57BL/6n小鼠(鼠龄8~10周;体质量20~25 g),购自维塔河实验动物科技有限公司[许可证号:SCXK(北京)2016-0006和SCXK(浙江)2018-0001]。小鼠饲养于武汉市第三医院动物实验中心,饲养环境为温度(22±2)℃、湿度55%±10%、12 h光暗循环控制。

### 1.2 实验设计

54只小鼠随机分为3组:假手术组(sham组)、大脑中动脉闭塞(MCAO)组和MCAO+钆塞酸二钠组,每组18只小鼠。每组进一步分为24、48和72 h亚组,每亚组6只小鼠。假手术组分离颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,但不插入封闭缝线,具体分离步骤与MCAO组相同。在MCAO组和MCAO+钆塞酸二钠组中,使用改良的Longa缝合法<sup>[6]</sup>阻断右侧大脑中动脉,以建立脑缺血再灌注模型。30 min后,将尼龙线撤回颈总动脉分叉处以引起再灌注。将小鼠圈养在单笼中,采用Longa 5级法<sup>[7]</sup>记录每只小鼠的神经功能评分。0级:无明显的神经功能缺陷症状;1级:尾巴垂直抬起时,对面的前爪不能伸直;2级:在行走时转向偏瘫一侧;3级:走路时身体倒向偏瘫一侧;4级:小鼠不能自发行走,有意识丧失;5级:死亡。神经功能评分为1~3级的小鼠被纳入实验,得分为0、4或5级的小鼠,或在观察时间点之前死亡的小鼠被排除在外。每4 h观察一次小鼠的健康状况。如果小鼠在MRI扫描前或脑组织样本采集前死亡,则将相同体质量的小鼠加入该组,以确保每个亚组的实验动物样本数量相同。

随后,给sham组和MCAO+钆塞酸二钠组的小鼠造模后尾静脉注射钆塞酸二钠(上海索非生物医药科技有限公司,批准文号:H20120281)。MCAO组小鼠造模后尾静脉注射等体积0.9% NaCl溶液。术后监测的生命体征包括小鼠的体温和活动。从缝合动物到稳定生命体征的平均时间为30~120 min。注射在手术后约2 h开始。在此期间(手术后2 h)小鼠体温稳定,待体温恢复正常,小鼠开始进食和饮水;注射剂量为0.02 mL钆塞酸二钠注射液/g小鼠。在规定的时间内先对小鼠进行MRI扫描,然后取小鼠脑组织进行免疫组织化学染色。

### 1.3 MRI采集和处理

所有扫描均在Siemens Skyra 3.0T机器上进行,该机器带有用于小动物的8通道横向线圈(仪器编号:5000049101/001006;上海晨光医疗科技有限公司)。通过腹腔注射(1%戊巴比妥钠,35~40 mg/kg;国药化学试剂有限公司)麻醉小鼠。将小鼠以俯卧位固定在线圈的中心,并进行快速自旋回波序列扫描。MRI检查后观察小鼠脑组织MRI信号的变化,由具有5年临床经验的临床医师独立测量 $T_2WI$ 图像上右侧负增强区域和左侧对应区域的信号值。sham组测量与MCAO组相同区域左右两侧的信号值。计算如下:sham组 $T_2WI$ 信号比=右信号值/左信号值。 $T_2WI$ 中MCAO+钆塞酸二钠组的信号比=右侧负增强区信号值/左侧对应区域信号值。

### 1.4 免疫组织化学染色

小鼠脑组织石蜡切片采用兔抗肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )单克隆抗体(1:100; Enzo Life Sciences Cat# PAB0242, RRID: AB\_1532684)和白细胞介素1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (1:100; ab克隆 Cat# A19714, RRID: AB\_2862749)。生物素化山羊抗兔二抗(1:5 000; Signalway Cat# L3012, RRID: AB\_895483)4℃孵育。最后,切片与DAB底物孵育5 min。根据阳性细胞数(<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,76%~100%为4分)和阳性着色强度(无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分)进行评分。

### 1.5 统计学方法

使用SPSS 25.0软件进行统计学描述和分析。小鼠的神经功能评分、MRI信号比和脑组织炎症因子水平以均值±标准差表示。使用单因素方差分析进行多组间比较,两两分析采用最小显著差异法。Pearson相关性检验用于检查MCAO+钆塞酸二钠组 $T_2WI$ 最小信号比与阳性小胶质细胞比之间的相关性。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 神经功能评分

sham组小鼠在不同的再灌注时间点均未出现神经功能缺损(均分=0分)。MCAO组和MCAO+钆塞酸二钠组小鼠出现不同程度的神经功能缺损。MCAO组24、48、72 h神经功能评分均为2分,MCAO+钆塞酸二钠组24、48、72 h神经功能评分分别为3、2、2分。

### 2.2 脑组织炎症因子TNF-α和IL-1β检测

为了研究钆塞酸二钠注射液对小鼠脑组织炎症因子的影响,应用免疫组化技术在MCAO和MCAO+钆塞酸二钠组中检测脑组织炎症因子TNF-α和IL-1β的水平(表1)。再灌注后24、48和72 h,MCAO组和MCAO+钆塞酸二钠组脑组织中炎症因子TNF-α和IL-1β水平显著高于sham组( $P<0.05$ ),而MCAO组和MCAO+钆塞酸二钠组间的TNF-α和IL-1β水平无统计学差异。

表1 小鼠脑组织炎症因子TNF-α和IL-1β水平  
Table 1 Levels of inflammatory cytokines TNF-α and IL-1β in mouse brain tissues

分组	TNF-α/pg·mL <sup>-1</sup>			IL-1β/pg·mL <sup>-1</sup>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
sham组	2.3±1.6	4.1±0.9	4.8±1.5	4.5±1.9	5.0±1.9	5.8±2.4
MCAO+钆塞酸二钠组	9.0±2.4 <sup>a</sup>	9.8±2.3 <sup>a</sup>	11.5±1.8 <sup>a</sup>	10.8±2.1 <sup>a</sup>	11.4±2.3 <sup>a</sup>	11.6±1.3 <sup>a</sup>
MCAO组	9.4±2.4 <sup>a</sup>	11.6±3.2 <sup>a</sup>	11.8±7.2 <sup>a</sup>	10.3±1.1 <sup>a</sup>	11.4±3.0 <sup>a</sup>	11.2±2.3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:与同一时间点的sham组相比, $P<0.05$

### 2.3 各组小鼠MRI信号变化

MCAO组T<sub>1</sub>WI和T<sub>2</sub>WI信号无明显变化(图1)。MCAO+钆塞酸二钠组再灌注后右脑组织T<sub>2</sub>WI可见高信号区,周围有负性增强的斑点和条纹。此外,这

些负强化区在T<sub>1</sub>WI上呈高信号。MCAO组T<sub>1</sub>WI未见明显信号改变,T<sub>2</sub>WI见右脑组织大面积高信号区,但周边未见明显负性强化(图1)。MCAO+钆塞酸二钠组梗死周围的信号较MCAO组强(图1)。

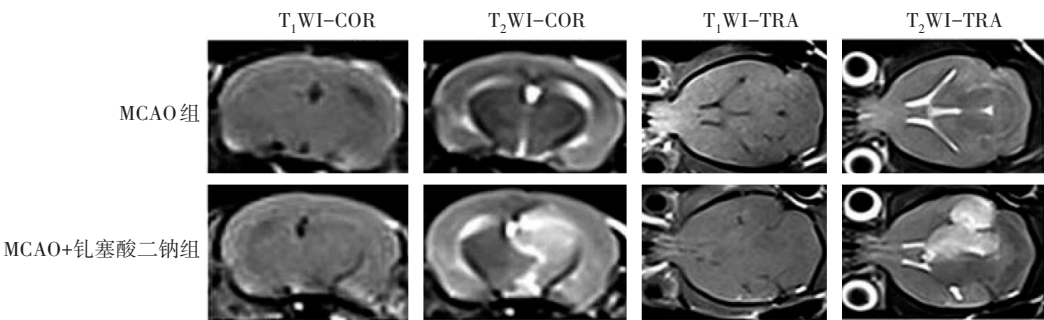


图1 MRI纹理参数特征

Figure 1 Characteristics of MRI texture parameters

### 2.4 MRI信号比与炎症因子水平的相关性

对MCAO+钆塞酸二钠组的每个时间点测试了T<sub>2</sub>WI信号比率与脑组织炎症因子TNF-α和IL-1β之间的相关性。发现再灌注后24、48、72 h的相关系数均无显著性差异。

### 2.5 钆塞酸二钠的安全性分析

与sham组和MCAO组相比,MCAO+钆塞酸二钠组小鼠在经尾静脉注射钆塞酸二钠后均未发生死亡,3组间差异无统计学差异( $F=0.000$ , $P=1.000$ )。3组小鼠生命体征良好,提示钆塞酸二钠注射具有良好的安全性。

## 3 讨论

钆塞酸二钠是一种新型的MRI造影剂,具有纳米级、特异性靶向、生物相容性好、更长的血液半衰期和无长期毒性等优点。钆塞酸二钠能够改变纵向和横向弛豫时间,还可以改变MRI信号<sup>[8]</sup>。因此,该成像技术可在体内检测炎症反应所涉及的病理变化。目前,钆塞酸二钠已用于细胞示踪相关研究,包括终末肾衰竭、肝癌等<sup>[9-10]</sup>。对于中枢神经系统炎症性疾病,钆塞酸二钠既可以作为细胞浸润的标志物,也可以作为血脑屏障破坏的标志物,是中枢神经系



统炎症成像的新方法<sup>[11]</sup>。钆塞酸二钠作为一种超小型、超顺磁性材料,常用于研究中枢神经系统疾病,包括脑卒中后灌注成像或细胞整合<sup>[7]</sup>。炎症反应和细胞凋亡是脑卒中后最重要的病理变化。以前的研究发现钆塞酸二钠可以发挥抗炎和促炎作用,或者对炎症没有影响<sup>[9]</sup>。Doyle等<sup>[12]</sup>发现钆塞酸二钠不影响小鼠的脑梗塞体积和炎症反应,该结果与本研究不一致。本研究与Doyle等<sup>[12]</sup>的研究之间存在几个主要差异:注射浓度和注射时间不同;本研究使用C57BL/6n小鼠,而之前的研究使用BALB/CJ小鼠。目前尚无可靠数据显示钆塞酸二钠对C57BL/6n小鼠脑缺血后炎症反应的影响。

本研究结果表明在脑缺血再灌注后24、48、72 h, MCAO组和MCAO+钆塞酸二钠组脑组织炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 水平无显著差异,提示用于评估炎症反应的钆塞酸二钠不影响TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的释放。因此,注射钆塞酸二钠在体内研究脑缺血后炎症反应的MRI是可行的。先前的一项临床研究表明,钆塞酸二钠增强的MRI可能有助于更具体地治疗脑卒中患者的炎症<sup>[13]</sup>。小胶质细胞是大脑中的巨噬细胞,可以对大脑微环境的变化做出快速反应<sup>[14-17]</sup>。小胶质细胞是研究脑卒中后炎症反应的重要成像目标。钆塞酸二钠聚集导致MRI信号变化的区域代表激活的小胶质细胞聚集区域<sup>[4,18-20]</sup>。虽然钆塞酸二钠在血液中的半衰期很长,但其在小鼠中的半衰期仅为45 min,而先前的研究表明注射后24 h脑血管中几乎没有钆塞酸二钠存在<sup>[8]</sup>。此外,脑缺血后的炎症反应是一个动态过程<sup>[2,21-23]</sup>。脑缺血再灌注后24~72 h内脑组织中的炎症细胞主要是脑中固有的小胶质细胞<sup>[24-25]</sup>。然而脑缺血再灌注后24~72 h内小胶质细胞的动态变化尚未完全阐明。本研究观察了脑缺血再灌注后24~72 h内小胶质细胞的活化情况,并对MRI信号的变化与脑组织病理学进行了比较,使用T<sub>2</sub>WI的最低信号比反映吞噬钆塞酸二钠的小胶质细胞的活化程度,该比率越低,小胶质细胞的活化程度越高。本研究结果表明钆塞酸二钠注射液不影响脑缺血再灌注急性期的炎症反应,钆塞酸二钠增强MRI可作为监测脑缺血再灌注损伤急性期炎症反应的有效手段。

## 【参考文献】

[1] Duris K, Jurajda M. Evolutionary concept of inflammatory response and stroke[J]. J Neurosci Res, 2020, 98: 98-104.  
[2] Radak D, Katsiki N, Resanovic I, et al. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2017, 15: 115-122.  
[3] Chauveau F, Cho TH, Berthezene Y, et al. Imaging inflammation in stroke using magnetic resonance imaging[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2010, 48: 718-728.  
[4] Spiranak JP, Nieves N, Hollsten DA, et al. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging assessment of hydroxyapatite orbital implants[J]. Am J Ophthalmol, 1995, 119(4): 431-440.

[5] Hedgire S, Krebill C, Wojtkiewicz GR, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticle uptake as noninvasive marker of aortic wall inflammation on MRI: Proof of concept study[J]. Br J Radiol, 2018, 91: 20180461.  
[6] Belayev L, Alonso OF, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture[J]. Stroke, 1996, 27: 1616-1623.  
[7] Liu W, Wang X, Zheng Y, et al. Electroacupuncture inhibits inflammatory injury by targeting the miR-9-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway following ischemic stroke[J]. Mol Med Rep, 2016, 13: 1618-1626.  
[8] Kang HJ, Kim H, Lee DH, et al. Gadoxetate-enhanced MRI features of proliferative hepatocellular carcinoma are prognostic after surgery[J]. Radiology, 2021, 300(3): 572-582.  
[9] Sattarova V, Gencturk M, Lee MS, et al. Gadoxetate disodium-enhanced imaging of gradenigo syndrome in end-stage renal disease[J]. J Neuroophthalmol, 2021, 41(3): e375-e377.  
[10] Ichikawa S, Motosugi U, Morisaka H, et al. Optimal combination of features on gadoxetate disodium-enhanced MR imaging for non-invasive differential diagnosis of hepatocellular carcinoma: the JAMP-HCC study[J]. Magn Reson Med Sci, 2021, 20(1): 47-59.  
[11] Chen Y, Xia Y, Tolat PP, et al. Comparison of conventional gadoxetate disodium-enhanced MRI features and radiomics signatures with machine learning for diagnosing microvascular invasion[J]. AJR Am J Roentgenol, 2021, 216(6): 1510-1520.  
[12] Doyle KP, Quach LN, Arceuil HE, et al. Ferumoxytol administration does not alter infarct volume or the inflammatory response to stroke in mice[J]. Neurosci Lett, 2015, 584: 236-240.  
[13] Saleh A, Schroeter M, Ringelstein A, et al. Iron oxide particle-enhanced MRI suggests variability of brain inflammation at early stages after ischemic stroke[J]. Stroke, 2007, 38: 2733-2737.  
[14] Wang Y, Wang B, Zhu MT, et al. Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure[J]. Toxicol Lett, 2011, 205: 26-37.  
[15] Cui Y, Zhang ZL, Zhou X, et al. Microglia and macrophage exhibit attenuated inflammatory response and ferroptosis resistance after RSL3 stimulation via increasing Nrf2 expression[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 249-264.  
[16] Sailor KA, Agoranos G, López-Manzaneda S, et al. Hematopoietic stem cell transplantation chemotherapy causes microglia senescence and peripheral macrophage engraftment in the brain[J]. Nat Med, 2022, 28(3): 517-527.  
[17] Ran YY, Su W, Gao FH, et al. Curcumin ameliorates white matter injury after ischemic stroke by inhibiting microglia/macrophage pyroptosis through NF- $\kappa$ B suppression and NLRP3 inflammasome inhibition[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 1552127.  
[18] Var SR, Shetty AV, Grande AW, et al. Microglia and macrophages in neuroprotection, neurogenesis, and emerging therapies for stroke[J]. Cells, 2021, 10(12): 3555.  
[19] Amato S, Arnold A. Modeling microglia activation and inflammation-based neuroprotectant strategies during ischemic stroke[J]. Bull Math Biol, 2021, 83(6): 72.  
[20] Rayasam A, Fukuzaki Y, Vexler ZS. Microglia-leucocyte axis in cerebral ischaemia and inflammation in the developing brain[J]. Acta Physiol (Oxf), 2021, 233(1): e13674.  
[21] Endres M, Moro MA, Nolte CH, et al. Immune pathways in etiology, acute phase, and chronic sequelae of ischemic stroke[J]. Circ Res, 2022, 130(8): 1167-1186.  
[22] Bakreen A, Juntunen M, Dunlop Y, et al. Additive behavioral improvement after combined cell therapy and rehabilitation despite long-term microglia presence in stroke rats[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1512.  
[23] Yan YH, Liu Y, Yang YJ, et al. Carnosol suppresses microglia cell inflammation and apoptosis through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(5): 656-662.  
[24] Beuker C, Schafflick D, Strecker JK, et al. Stroke induces disease-specific myeloid cells in the brain parenchyma and pia[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 945.  
[25] Kim SR, Seong KJ, Kim WJ, et al. Epigallocatechin gallate protects against hypoxia-induced inflammation in microglia via NF- $\kappa$ B suppression and Nrf-2/HO-1 activation[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 4004.

(编辑:黄开颜)