

· 基础医学 ·

大鼠心肌纤维化模型 MR T2WI 成像的实验研究

陆文烨, 宋梦星, 吴 芬, 夏 敏, 朱晓梅, 马占龙*

南京医科大学第一附属医院放射科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:应用心脏磁共振成像技术(cardiac magnetic resonance imaging, CMR)分析大鼠心肌纤维化模型的影像学特征,探索心肌纤维化 MR T2WI 成像表现及病理学改变的相关性。方法:选取 50 只 SD 大鼠,随机选取 40 只皮下注射 5 mg/kg 异丙肾上腺素 10 d 建立心肌纤维化模型,10 只皮下注射同剂量生理盐水 10 d 作为对照组。造模成功后,模型组分为 3 组,分别于第 5、7、9 天应用 7.0 T 磁共振设备,进行活体成像扫描,对照组于第 7 天进行扫描,并计算对比信噪比(contrast noise ratio, CNR)。扫描完成后处死大鼠进行 HE 及 Masson 染色,观察心肌组织结构变化并计算胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)。结果:模型组 36 只,对照组 10 只纳入统计学分析,磁共振显示 5 d 模型组磁共振图像 CNR(5.84±1.28),7 d 模型组 CNR(15.26±1.93),9 d 模型组 CNR(9.37±1.67),与对照组(3.56±0.93)差异具有统计学意义($P < 0.01$)。MR T2WI 成像 7 d 模型组与对照组相比,左心室腔扩大,左侧心室壁呈 T2WI 低信号改变,心室壁变薄、厚度减少,与对照组左心室壁厚度为(2.73±0.23)mm 相比,模型组(1.19±0.29)mm 显著减少($P < 0.01$),表明心室壁纤维化改变。对照组 CVF[(6.18±2.90)%]与模型组[(43.06±6.59)%]比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。模型组 CNR 和 CVF 之间的相关系数值为 0.993, $P < 0.01$,呈显著正相关。结论:大鼠心肌纤维化模型的 MR T2WI 成像具有明显的病理学相关影像学特征,可用来开展心肌纤维化的影像学及临床基础研究。

[关键词] 心肌纤维化;核磁成像;大鼠**[中图分类号]** R445.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)02-164-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20230203

Experimental study on MR T2WI imaging of the rat myocardial fibrosis model

LU Wenyue, SONG Mengxing, WU Fen, XIA Min, ZHU Xiaomei, MA Zhanlong*

Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** Cardiac magnetic resonance imaging (CMR) was used to analyze the imaging features of the rat model of myocardial fibrosis, and to explore the correlation between MR T2WI findings and pathological changes of myocardial fibrosis. **Methods:** Fifty SD rats were randomly selected, forty mice were randomly selected and subcutaneously injected with five mg/kg isoproterenol for ten days to establish the myocardial fibrosis model, and ten rats were subcutaneously injected with the same dose of normal saline for ten days as the control group. The model group was divided into three subgroups, and *in vivo* imaging scan was performed on day five, seven, and nine with 7.0 T magnetic resonance equipment, respectively. The control group was scanned on day seven and the contrast noise ratio (CNR) was calculated. The HE and Masson staining were performed to observe the structural changes of myocardial tissues and calculate the collagen volume fraction (CVF). **Results:** 36 rats in the model group and 10 rats in the control group were included in statistical analysis. The CNR of the model group (15.26±1.93) and the control group (3.56±0.93) showed statistically significant differences ($P < 0.01$). Compared with the control group, the left ventricular lumen of the model group was enlarged, the left ventricular wall showed T2WI hyposignal changes, and the thickness of the ventricular wall decreased and became thinner. The left ventricular wall thickness of the control group was (2.73±0.23) mm, which was statistically significant compared with that of the model group (1.19±0.29) mm ($P < 0.01$). These indicated fibrotic changes in the ventricular wall. The CVF of the control group (6.18%±2.90%) was significantly different from that of the model group (43.06%±6.59%) ($P < 0.01$). The value of phase relationship between CNR and CVF was 0.993, showing a significant positive correlation. **Conclusion:** The MR T2WI of the myocardial fibrosis model of rats is characterized by obvious pathological imaging characteristics, which could be used to carry out imaging and clinical research of myocardial fibrosis.

[Key words] myocardial fibrosis; MRI; rat**[基金项目]** 国家自然科学基金(81971669)

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(02): 164-168]

*通信作者(Corresponding author), E-mail: mazhanlong@126.com

心肌纤维化所致心功能不全是严重影响老年心血管病治疗及康复的重要因素^[1]。心肌纤维化在病理学上是局部及系统性疾病逐步影响到心肌的不可逆性损伤^[2]。心肌纤维化的传统诊断是通过心肌穿刺后经病理组织学观察来确定的。然而,这种穿刺检查不但对心肌有损伤,而且穿刺后并发症的发生率为0.6%~0.8%^[3-4]。所以,非侵入性心肌纤维化的诊断方法具有重要的临床应用价值。

心脏核磁共振成像(cardiac magnetic resonance imaging, CMR)检查是非侵入性心脏检查较理想的方法^[5],CMR检查不但能准确显示心脏的结构及功能,还能提供准确的心肌组织学及功能变化的特征,是临床心脏疾病诊断、治疗效果评估的理想检查方法。近年来,临床常用MR对比剂延迟强化(late gadolinium enhancement, LGE)来检测局灶性心肌纤维化。然而,LGE检测心肌纤维化的特异性及敏感性仅分别为67%及87%,LGE主要反映的是心肌梗死后的局部瘢痕组织形成、坏死及炎症。而磁共振T2加权成像(T2 weighted imaging, T2WI)的高信号可以反映心肌梗死发生时的局部心肌细胞水肿和急性损伤,而T2WI低信号则反映心肌梗死后局部心肌组织的纤维化改变,由高信号逐步向低信号的变化,反映的是心肌细胞含水量逐步减低,细胞由水肿向纤维化改变的病理学过程;因此,增加心脏T2WI成像检测对心肌纤维化的评估具有更加重要的研究价值^[6-8]。本研究建立理想的心肌纤维化实验动物模型,开展心肌纤维化MR T2WI成像表现及病理学改变的基础实验研究,进而提高MR T2WI在心肌纤维化检测中的应用基础。

1 材料和方法

1.1 材料

选择6周龄、体重(230±10)g的雄性SPF级SD大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)50只,模型组(40只),皮下注射异丙肾上腺素,每日剂量为5 mg/kg,连续注射10 d^[9]。对照组(10只),皮下注射生理盐水,连续注射10 d。两组均饲养于SPF级环境中,3只/笼,环境温度维持于20~22℃,相对湿度为55%~60%,每日光照12 h。建模过程中,模型组于打药第1天死亡2只,第2、3天分别死亡1只,合计死亡4只,剩余模型组36只,死亡率10%;对照组10只,死亡0只。

盐酸异丙肾上腺素(江苏艾康生物医药研发有限公司);多聚甲醛(国药集团化学试剂);PBS缓冲

液、氯化钠溶液(广州碧尧德生物科技有限公司);苏木素伊红染色试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司);TN-X抗体(Santa Cruz公司,美国);MMP-9抗体(Abcam公司,美国);CD68(Affinity公司,美国);石蜡切片机(RM2016, Leica公司,德国);载玻片及盖玻片(江苏世泰实验器材公司);显微镜(H550S, NIKON公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 MR T2WI成像

模型组共分为3组,每组12只,分别于建模后第5天、第7天及第9天进行心脏MR检查。对照组10只为建模后第7天行MR检查。心脏MR采用7T磁共振扫描仪(Bruker PharmaScans, 德国),大鼠线圈,接心电门控以及呼吸门控,通过气体麻药量调节心率约300次/min,呼吸频率维持约35次/min。主要参数:视角3 cm×3 cm;矩阵256×256;TE3.5 ms;TR130 ms;扫描层厚1 mm;翻转角30°。MRI图像分析为手动选择感兴趣区域(region of interest, ROI),对比信噪比(contrast noise ratio, CNR)计算:[$CNR=(S_{lvs}-S_{linf})/S_{lnoise}$], S_{linf} :心肌纤维化区域的信号强度, S_{lvs} :室间隔的信号强度, S_{lnoise} :背景噪声。扫描完,麻醉处死大鼠,取出心脏。

1.2.2 心脏病理学检查分析

新鲜组织固定于4%多聚甲醛24 h以上。将组织从固定液取出在通风橱内用手术刀将目的部位组织修平整,将修切好的组织和对应的标签放于脱水盒内。脱水后将浸好蜡的组织于包埋机内进行包埋。将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片,片厚4 μm。光学显微镜下观察心脏组织结构变化。石蜡切片进行Masson三色染色,Image-pro plus图像处理软件分析并计算Masson染色阳性(胶原呈蓝色)面积百分比,即左室心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)。每张切片随机选取高倍镜(×400)下5个视野作图像分析,以CVF均值作为该样本的测量值。CVF越大,表示胶原含量越多。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件,使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示计量资料,组间MR信号及左室心肌胶原容积分数改变行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MR检查

MR成像T2WI显示:与对照组(图1A)相比,建

模7 d模型组(图1B),左心室腔扩大,左侧心室壁呈T2WI低信号改变,心室壁变薄、厚度减少,7 d模型组左心室壁厚度为(1.19±0.29)mm,与对照组(2.73±0.23)mm比较差异有统计学意义($P < 0.01$,图2),表明建模7 d后心室壁纤维化改变。7 d模型组CNR为(15.26±1.93),与对照组(3.56±0.93)比较差异有统计学意义($P < 0.01$,表1)。

2.2 心脏病理学检查

大鼠左心室HE和Masson染色结果如图3所示。对照组心肌细胞排列整齐,形状基本一致;模型组心肌细胞间可见有较多的纤维组织,左心室CVF计算结果显示,7 d模型组CVF[(43.06±6.59)%]与对照组[(6.18±2.90)%]比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 MR及病理相关性分析

利用相关分析研究模型组CNR及CVF的相关性,使用Pearson相关系数表示相关关系的强弱情况,CNR和CVF之间的相关系数值为0.993, $P < 0.01$,呈明显正相关趋势(图4)。

3 讨论

心肌纤维化是指心肌组织中胶原纤维过量沉积、各型胶原比例失调、胶原纤维排列紊乱以及最终导致心脏结构重塑(包括心腔扩大、室壁变薄、心肌细胞肥厚及凋亡),它是多种急慢性心肌疾病的终末期病理表现,已成为全球性的心脏疾病终末期

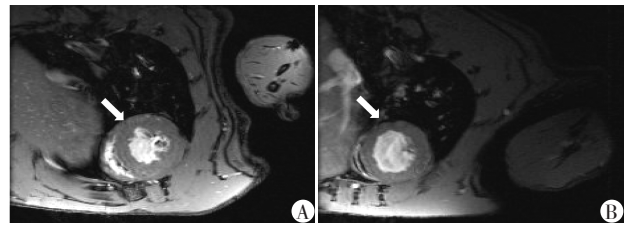
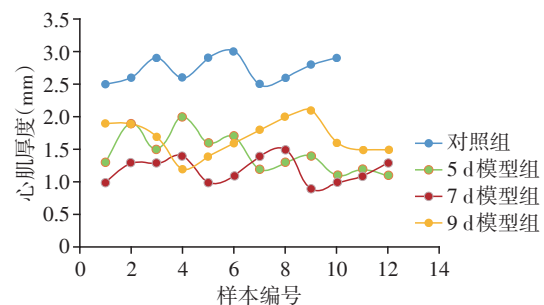


图1 对照组及建模7 d模型组MR成像
A:活体磁共振成像,对照组心脏轴位图;B:活体磁共振成像,模型组建模7 d后心脏轴位图,白色箭头显示左室壁厚度变薄,心肌信号减低。

Figure 1 MR imagings of the control and 7 d model groups



对照组与7 d模型组比较, $P < 0.001$ 。

图2 左心室壁厚度比较

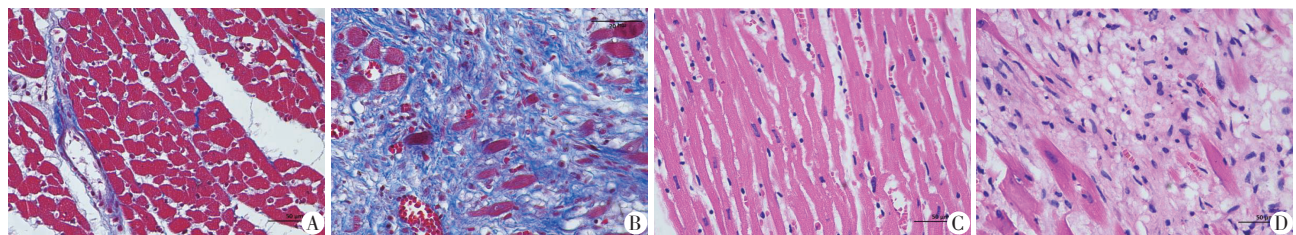
Figure 2 Comparison of the left ventricular wall thickness

的治疗难题^[8,10-11]。大量研究表明心肌纤维化是多种心血管疾病诱发及进展的重要的病理生理学机制,早期发现并确定心肌纤维化的形成及分布,对于心肌纤维化的准确诊治具有重要的临床防治指

表1 MR图像左室前壁信号比较

Table 1 MR image signal comparison of the left ventricular anterior wall

项目	对照组(n=10)	5 d模型组(n=12)	7 d模型组(n=12)	9 d模型组(n=12)	P值
SI _{inf}	64.51 ± 6.38	18.62 ± 7.45	32.66 ± 5.85	37.64 ± 7.07	< 0.001
SI _{lys}	75.11 ± 4.88	34.80 ± 9.14	84.18 ± 7.78	70.62 ± 6.90	0.092
SI _{noise}	3.02 ± 0.42	2.77 ± 0.33	3.41 ± 0.36	3.57 ± 0.50	0.154
CNR	3.56 ± 0.93	5.84 ± 1.28	15.26 ± 1.93	9.37 ± 1.67	< 0.001



A:未出现明显纤维化病变(对照组Masson染色);B:胶原纤维大量增生(7 d模型组Masson染色);C:肌肉细胞形态完整,界限分明,细胞浆中横纹清晰可见(对照组HE染色);D:肌肉细胞浆呈现明显嗜伊红性,横纹消失,组织中有广泛的炎性细胞浸润(7 d模型组HE染色)。

图3 对照组及建模7 d模型组HE和Masson染色图像(×400)

Figure 3 HE and Masson staining images of the control and 7 d model groups(×400)

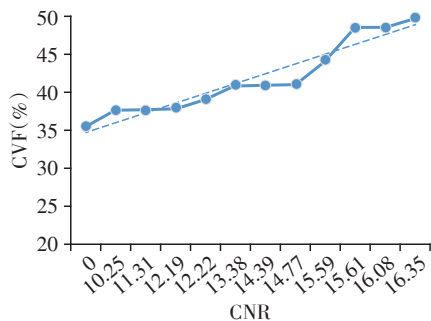


图4 7 d模型组 CNR和CVF相关性分析

Figure 4 Correlation analysis of CNR and CVF in 7 d model group

导价值^[12-13]。因此,探索心肌纤维化的早期诊断方法,一直是近年来临床心血管疾病防治的重要研究领域和研究热点。

传统的间接判断心肌纤维化的心肌标志物主要是心脏收缩/舒张功能及能量代谢相关的酶类,包括肌钙蛋白、肌酸激酶同工酶等。心肌标志物主要分布于细胞内,细胞膜破坏后释放入血,它的升高是心肌损伤不可逆的重要标志,其与心肌损伤的程度有一定的相关性,但不能准确评估心肌纤维化的程度及进展。目前,直观检测心肌纤维化的技术方法主要有心内膜活检、CMR、心肌声学密度、核素显像等。其中,CMR作为一种高分辨率、无创、无辐射的影像学技术对心肌纤维化的检测有重要价值。目前,已有大量临床研究表明:LGE可以观测心肌梗死后的局部瘢痕组织形成、坏死及炎症,反映心肌疾病时心肌损伤组织在病理学上的变化,是检测及预测患者心脏猝死、心力衰竭等心脏事件发生的重要影像学技术^[14-15]。多年研究发现,LGE检测心肌纤维化的特异性及敏感性仅分别为67%及87%。而磁共振T2WI成像高信号可以反映心肌梗死发生时的局部心肌细胞水肿和急性损伤,而T2WI低信号则反映心肌梗死后局部心肌组织的纤维化改变,由高信号逐步向低信号的变化,则反映出心肌细胞由水肿向纤维化改变的病理学过程,对于研究心肌纤维化的发生及发展具有重要的价值^[8,16]。

本研究采用皮下注射异丙肾上腺素法,建立了比较理想的心肌纤维化大鼠模型^[9]。这种实验模型的病理学机制是:注射异丙肾上腺素激活RAAS系统,增加血浆中肾素、醛固酮和血管紧张素转化酶活性,增加血浆中血管紧张素II,而醛固酮通过盐皮质激素受体增加心肌AT1受体,降低心肌成纤维细胞中胶原酶的活性^[17-18],最终,增加心肌间质胶原的合

成,促进心肌纤维化的发生及发展。本研究发现,异丙肾上腺素注射剂量是决定模型成功与否的关键,剂量过大时,激动心脏 β_1 受体,使得心肌收缩力增强、心率加快,增加心肌耗氧量,易导致心源性猝死。而注射剂量不足,又难以形成心肌纤维化大鼠模型。本研究发现5 mg/kg是保障大鼠在1周后形成心肌纤维化的较合适的异丙肾上腺素注射剂量。7 d模型组心肌细胞有较多的纤维化改变,表明使用异丙肾上腺素注射法建立心肌纤维化模型是可行的。

MR检查是比较理想的非侵入性的心脏检查方法,它不但能准确显示心脏的结构及功能,还能提供准确的心肌组织学及功能变化的特征,是临床心脏疾病诊断、治疗效果评估的理想检查方法^[6,19]。因此,本研究开展大鼠心肌纤维化模型的MR T2WI成像研究,探索心肌细胞由水肿向纤维化改变时T2WI信号变化与病理学心肌纤维化的相关性。本实验MR成像T2WI显示:心肌纤维化模型组与对照组相比,左心室腔扩大,左侧心室壁呈T2WI低信号改变,心室壁变薄、厚度减少,表明心室壁纤维化改变。7 d模型组心肌T2WI CNR较对照组增加,模型组CNR和CVF呈正相关性。再次证实用异丙肾上腺素注射法建立心肌纤维化模型MR成像T2WI信号改变较明显,可以用来开展MR T2WI成像的相关性研究,具有重要的研究价值。

本研究存在一定局限性:模型死亡率较高,因初期打药技术欠佳,后期提高熟练度,可降低模型死亡率;MR成像图像效果未达预期,因大鼠心率较快,难以控制,难达到理想的MR图像,提高图像扫描质量成为下一步研究的重点。

总之,本研究证实采用7T MR T2WI可研究大鼠心肌纤维化的形成,为下一步MR T2WI靶向成像提供实验基础,具有重要的临床及基础研究应用价值。

[参考文献]

- [1] TALMAN V, RUSKOAHO H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 365(3):563-581
- [2] 张艳,吴昆华,李清,等.肥厚型心肌病患者心肌纤维化范围的相关因素分析[J]. *中华心血管病杂志*, 2021, 49(1):31-36
- [3] LÓPEZ B, RAVASSA S, MORENO M U, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(7):479-498
- [4] PRABHU S D, FRANGOIANNIS N G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from in-

- flammation to fibrosis [J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112
- [5] 郑育聪, 陆敏杰, 陈秀玉, 等. 主动脉瓣关闭不全患者心肌纤维化的磁共振成像特征及其影响因素分析[J]. *中华心血管病杂志*, 2019, 47(8): 622-627
- [6] LIANG K, BARITUSSIO A, PALAZZUOLI A, et al. Cardiovascular magnetic resonance of myocardial fibrosis, edema, and infiltrates in heart failure [J]. *Heart Fail Clin*, 2021, 17(1): 77-84
- [7] 杨钰粒, 赵铭哲, 于瀛, 等. 肥厚型心肌病患者左心室纤维化特点及延迟钆增强心脏磁共振的临床应用现状[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(11): 1676-1680
- [8] RAMAN B, ARIGA R, SPARTERA M, et al. Progression of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and clinical implications [J]. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2019, 20(2): 157-167
- [9] 邓晓娟, 夏成, 周红梅. 安立生坦对异丙肾肾上腺素诱导大鼠心肌纤维化保护作用及机制研究[J]. *解放军预防医学杂志*, 2020, 38(2): 47-50
- [10] FRANGOGIANNIS N G. Cardiac fibrosis: cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 70-99
- [11] KHALIL H, KANISICAK O, PRASAD V, et al. Fibroblast-specific TGF-beta-Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3770-3783
- [12] KONG P, CHRISTIA P, FRANGOGIANNIS N G. The pathogenesis of cardiac fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(4): 549-574
- [13] 严晓靖, 阳军. 心肌纤维化的发病机制及诊疗进展[J]. *中国医师杂志*, 2021, 23(6): 954-957
- [14] KHOLMOVSKI E G, MORRIS A K, CHELU M G. Cardiac MRI and fibrosis quantification [J]. *Card Electrophysiol Clin*, 2019, 11(3): 537-549
- [15] KARAMITSOS T D, ARVANITAKI A, KARVOUNIS H, et al. Myocardial tissue characterization and fibrosis by imaging [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2020, 13(5): 1221-1234
- [16] GUPTA S, GE Y, SINGH A, et al. Multimodality imaging assessment of myocardial fibrosis [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2021, 11: S1936- 878X(21)00151-0
- [17] 潘建衡, 曹占鸿, 李娜, 等. 常见心肌纤维化模型的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(1): 84-88
- [18] RAI V, SHARMA P, AGRAWAL S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 424(1-2): 123-145
- [19] ALLAWADHI P, KHURANA A, SAYED N, et al. Isoproterenol - induced cardiac ischemia and fibrosis: Plant - based approaches for intervention [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(10): 1908-1932
- [收稿日期] 2022-03-19
(本文编辑:唐震)

(上接第163页)

- [16] RUST M B. ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(18): 3521-3529
- [17] LEE M H, KUNDU J K, CHAE J I, et al. Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(6): 481-491
- [18] PRUNIER C, PRUDENT R, KAPUR R, et al. LIM kinases: cofilin and beyond [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 41749-41763
- [19] WHITEMAN I T, GERVASIO O L, CULLEN K M, et al. Activated actin - depolymerizing factor/cofilin sequesters phosphorylated microtubule-associated protein during the assembly of alzheimer-like neuritic cytoskeletal striations [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(41): 12994-13005
- [20] ZHAO N, LIU C C, QIAO W, et al. Apolipoprotein e, receptors, and modulation of Alzheimer's disease [J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83(4): 347-357
- [21] DLUGOSZ P, NIMPF J. The reelin receptors apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) and VLDL receptor [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3090
- [22] LANE - DONOVAN C, HERZ J. ApoE, ApoE receptors, and the synapse in Alzheimer's disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(4): 273-284
- [23] GABBOUJ S, RYHÄNEN S, MARTTINEN M, et al. Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain - special emphasis on PI3K-Akt pathway [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 629
- [24] CARONI P, CHOWDHURY A, LAHR M. Synapse rearrangements upon learning: from divergent-sparse connectivity to dedicated sub - circuits [J]. *Trends Neurosci*, 2014, 37(10): 604-614
- [25] SHARMA A, MEHAN S. Targeting PI3K-AKT/mTOR signaling in the prevention of autism [J]. *Neurochem Int*, 2021, 147: 105067
- [26] 刘淑梅, 李丽华, 鲁俊华, 等. PI3k/Akt信号通路在维生素D促进神经递质分泌中的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(11): 1597-1602
- [收稿日期] 2022-07-19
(本文编辑:唐震)