

大鼠肌肉组织坏死模型磁共振评价方法的建立

高萌¹, 蒋翠花¹, 黄德健¹, 江晓¹, 汪俊瑛¹, 姚楠¹, 李玥¹, 倪以成², 张健^{1*}

(¹江苏省中医药研究院转化医学实验室, 江苏 南京 210028; ²鲁汶大学生物医学影像实验室, 比利时 鲁汶 3000)

[摘要] 目的: 探讨磁共振影像技术评价大鼠肌肉组织坏死模型的实验方法, 并用病理金标准验证磁共振扫描结果。方法: 向6只大鼠左后肢注射0.2 ml无水乙醇, 制成骨骼肌坏死模型, 分别于造模后0、2、4、8、12、14、16 h进行磁共振扫描, 分析图像并得出最佳扫描序列及最佳扫描时间。另取20只模型鼠在最佳扫描条件下行磁共振扫描, 扫描后处死行病理检查。对病变区伊文氏蓝染色大体病理图像及T2WI fs图像进行形态比较, 并对两者面积比进行分析。结果: T2WI fs时病变范围清晰且排除周围脂肪信号的干扰, 为最佳监测序列, 12 h为最佳扫描时间。坏死骨骼肌面积在磁共振影像和伊文氏蓝染色大体病理影像上无明显差异。磁共振影像上左后肢坏死骨骼肌面积占可视面积的(7.95 ± 0.18)%, 伊文氏蓝染色大体病理影像上左后肢坏死骨骼肌面积占可视面积的(7.91 ± 0.15)%。结论: 磁共振影像可作为大鼠骨骼肌坏死模型的评价方法。

[关键词] 肌肉坏死; 磁共振成像; 病理检查

[中图分类号] R445.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-702-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130531

Establishing a magnetic resonance imaging method to evaluate rat muscle tissue necrosis model

Gao Meng¹, Jiang Cuihua¹, Huang Dejian¹, Jiang Xiao¹, Wang Junying¹, Yao Nan¹, Li Yue¹, Ni Yicheng², Zhang Jian^{1*}

(¹Translational Medicine Laboratory, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; ²Department of Imaging & Pathology, University of Leuven, Leuven 3000, Belgium)

[Abstract] **Objective:** To investigate an experimental method of using magnetic resonance imaging (MRI) techniques to evaluate rat muscle tissue necrosis model. **Methods:** Firstly, 0.2 ml anhydrous ethanol was injected into the left hind limbs of 6 rats to make a skeletal muscle necrosis model. MRI scans were performed after 0, 2, 4, 8, 12, 14 h and 16 h respectively to analyze images and to find optimal scanning sequence and scanning time. **Results:** MRI scanning resulted from T2WI fs and 12 h showed clear pathological changing area and excluded the signal interference from peripheral fat, which proved T2WI fs is the optimized scanning sequence and 12 h is the optimized scanning time. Another 20 model rats were used for MRI scans with the optimal scanning sequence and time, then executed after MRI scans for pathological examination. There was no apparent size difference between Evans blue dye pathology images and MRI images of rat skeletal muscle necrosis area. The skeletal muscle necrosis area was (7.95 ± 0.18)% of the viewing area of the left hind in MRI images, and was (7.91 ± 0.15)% in the Evans blue dye pathology images. **Conclusion:** MRI scans can be used for evaluating skeletal muscle necrosis.

[Key words] muscle necrosis; magnetic resonance imaging; pathologic examination

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 702-706]

坏死亲和性化合物(necrosis avid agents, NAAs)是一类小分子化合物, 可以与生物体内坏死组织特

异性地结合, 从而表现出坏死组织靶向性。这类化合物在临床重大疾病的诊断和治疗上具有极强的应用价值, 如心肌梗死的诊断、肿瘤治疗以及疗效评价, 特别在肿瘤内照射治疗上开辟了一种全新的靶向治疗方法^[1-2]。筛选高效的 NAAs 及评价其坏死亲和效率需要简便而可靠的动物模型, 而在心、肝等脏器的

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK2010594)

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

制造缺血性坏死模型操作复杂,成功率低^[3]。为了降低模型制作的难度,本实验选用向大鼠骨骼肌注射无水乙醇来制作坏死模型。但实验中发现肌注乙醇后,有部分模型并不成功,造成后续实验的浪费。本研究拟利用磁共振影像(magnetic resonance imaging, MRI)技术建立坏死肌肉模型的评价方法。为了优化模型的选择结果,本研究考察不同的磁共振扫描序列和扫描时间,并从中选取最佳的扫描序列和扫描时间。近年来,小动物 MRI 技术发展迅速,为药物研究提供了有力的帮助^[4-5]。但目前这种动物专用的磁共振仪价格昂贵,还不能得到普及。本研究采用常规的临床型 MRI 对以大鼠为代表的小动物坏死部位进行观察,现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动 物

雄性 SD 大鼠 26 只,SPF 级别,体重(300 ± 20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物质量合格证号:SCXK(沪)2012-0002。

1.1.2 试 剂

水合氯醛(南京国药集团化学试剂有限公司),无水乙醇(安徽安特化学有限公司),伊文斯蓝(Evan's blue, EB)(上海沪宇生物有限公司)。

1.1.3 仪 器

Echo speed Plus 1.5T 磁共振仪(美国 GE 公司),AW 4.3 后处理工作站。大体切片器(SM2400,德国 Leica 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 实 验 设 计

6 只大鼠左后肢注射 0.2 ml 无水乙醇,制成骨骼肌坏死模型,分别于造模后 0、2、4、8、12、14、16 h 进行 MRI 扫描,分析图像得出最佳扫描序列及最佳扫描时间。扫描后将其处死,做大体病理及常规病理检查。

另取 20 只上述方法所致骨骼肌坏死模型鼠在最佳扫描条件下行 MRI 扫描,扫描后注射 EB,18 h 后处死行病理检查,对坏死骨骼肌 EB 染色大体病理图像及 MRI 图像进行分析。

1.2.2 大 鼠 骨 骼 肌 坏 死 模 型 的 建 立

SD 大鼠术前用 0.3 ml/kg 水合氯醛腹腔注射麻醉,将大鼠固定在手术台上,直接于左下肢肌注 0.2 ml 无水乙醇,造成肌肉坏死。

1.2.3 磁 共 振 检 测 方 法

参考文献[6],实验大鼠使用磁共振成像设备,3 英寸表面线圈检查,常规行横断面 T1WI、T2WI、T2WI fs 和弥散成像(DWI)扫描,层厚 3 mm,间隔 0.2 mm,FOV 10 cm × 10 cm,矩阵 224 × 192,2NEX。T1WI:SE 序列,TR/TE = 550 ms/24 ms。T2WI:FSE 序列,TR/TE = 2 920 ms/88 ms。T2WI fs:STIR 序列,TR/TE = 4 000 ms/102 ms。DWI:SE/EPI 序列,TR/TE = 4 000 ms/71.6 ms,矩阵 64 × 64,8NEX,梯度因子(b)为 500。扫描后在 GE AW4.3 工作站下处理数据后,选出最佳扫描序列及最佳扫描时间。

1.2.4 磁 共 振 图 像 信 噪 比 计 算 方 法

参考文献[6],在每只大鼠磁共振 T2WI fs 图像上,选出病变图像最明显的 1 个层面,在该层面上左后肢的病变区及右后肢上分别选 3 个直径为 3 mm 的兴趣区域(ROI),自动得到信号密度,分别计算出不同时间点每只大鼠左后肢病变区、右后肢对比区及图像背景的信号强度(signal intensity, SI)的平均数,信噪比(signal to noise ratio, SNR)=S/N。

1.2.5 骨 骼 肌 面 积 比 的 测 定

参考文献[7],在每只鼠的 MRI 图像及大体病理图像上,使用图像处理软件 Image-Pro-Plus(IPP)进行处理,手工绘制梗死和可视的兴趣区,最后获得坏死骨骼肌面积及可视面积,计算坏死区面积比(=坏死骨骼肌面积/可视面积 × 100%)。

1.2.6 病 理 检 查

参考文献[8]进行病理观察。MRI 扫描后,大鼠分为 A、B 组 A 组。大鼠于尾静脉处行 EB 注射,注射后 12 h 给予过量水合氯醛,实施安乐死,并放置在冰箱(-30℃)中 18 h,固定模型鼠位置与 MRI 成像扫描时位置相同。大体切片器将大鼠按照 MRI 横向平面相似的方式切割。用数码相机拍摄所摆体位,将宏观图像与 MRI 图像对比,并计算坏死区面积比(=病变处 EB 蓝染区域/可视区域 × 100%)。

B 组大鼠 MRI 扫描后直接处死,并将其坏死骨骼肌切除,用 10%福尔马林浸泡,然后进行 HE 染色后,用高倍显微镜进行观察,注意排除由上步冷冻保存程序所引起的液泡、裂缝和变形等人工假象。

1.3 统 计 学 方 法

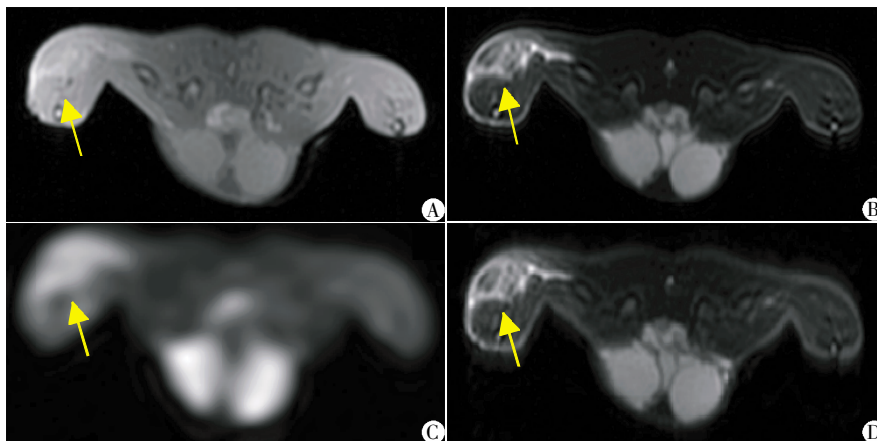
根据 MRI 图像 SNR 计算方法,计算出每只大鼠在不同时间点时左、右后肢的 SNR 值,所有数据采用 SAS8.0 统计软件的单组重复测量资料方差分析,并用 Bonferroni 法将不同时间点 SNR 值与 0 h 的 SNR 值进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 磁共振图像结果

20只SD大鼠模型MRI成像,与对侧健肢比较,T1WI成像上呈等或略高信号,T2WI、DWI和

T2WI fs上呈高信号(图1),可见T2WI fs时病变范围清晰且排除周围脂肪信号的干扰,因此选此序列为监测序列。在T2WI fs上,又进行了不同时间点的监测,进行数据处理(表1),12h时图像SNR值最大,为此选取12h为监测时间点。



A: T1WI; B: T2WI; C: DWI; D: T2WI fs.

图1 坏死骨骼肌在MR上的表现(箭头处)

Figure 1 MRI findings of pathological changes in necrosis muscle tissues (arrows)

表1 不同时间点所测的SNR值

Table 1 Quantitative data of SNR in different times

时间	SNR 值	P 值*
0 h	19.54±3.01	-
2 h	20.09±1.36	0.024
4 h	21.97±7.06	0.083
8 h	25.33±1.24	< 0.001
12 h	29.22±2.67	0.006
14 h	19.87±5.39	0.085
16 h	18.24±9.67	0.197

*:与0h比较的P值。

2.2 大体病理结果

模型大鼠骨骼肌坏死组织经EB处理后,解剖观察骨骼肌的颜色变化,与自身对照侧相比,坏死骨骼肌组织蓝染(图2)。

2.3 显微病理结果

大鼠左后肢骨骼肌切片HE染色肉眼观察,可

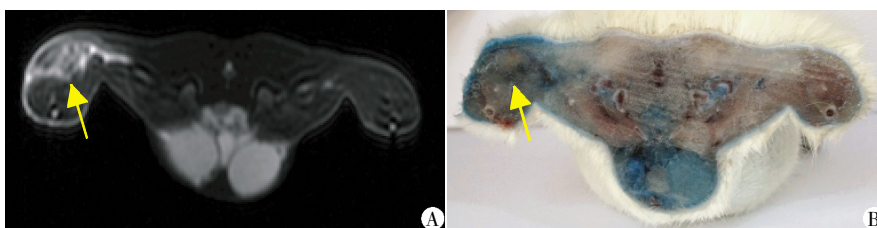
以看到,与正常对侧骨骼肌比较,坏死骨骼肌内横纹消失,细胞核消失(图3)。

2.4 MRI与大体病理观察下坏死骨骼肌面积比的相关性

20只模型大鼠中,经病理证实,14只大鼠造模成功,6只大鼠因无水乙醇注入肌肉间隙致造模失败。14只造模成功鼠中,MRI影像上坏死面积比为(7.95±0.18)%,EB染色大体病理观察下坏死面积比为(7.91±0.15)%,两者呈线性相关关系(图4)。

3 讨论

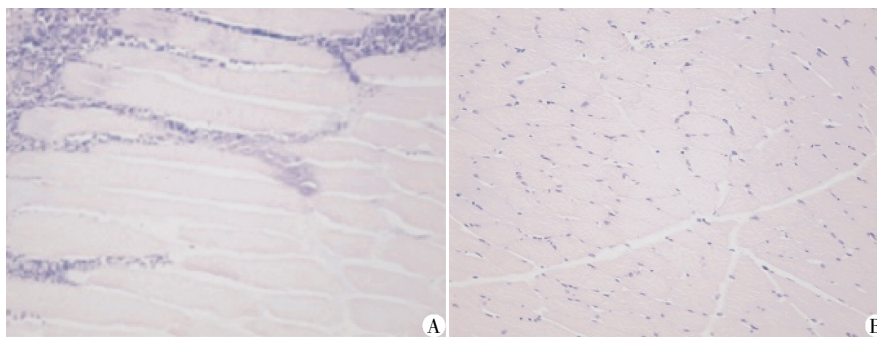
无水乙醇所致肌肉坏死模型操作简单,成功率高。本研究选用MRI作为模型评判方法,具有很多的优点。首先,MRI以图像的方式直接反映模型制备成功与否,减少后续实验的浪费;再次,在实验研究中这种无创的在体动物模型检测方法比尸检更



A: MRI表现, B: 大体病理表现。

图2 坏死骨骼肌MRI表现与大体病理表现(箭头处)

Figure 2 Macroscopic necrosis features and MRI findings (arrows)



A: 坏死骨骼肌; B: 正常骨骼肌。

图 3 骨骼肌的显微病理表现(HE, ×200)

Figure 3 Photomicrograph of muscle tissues(HE, ×200)

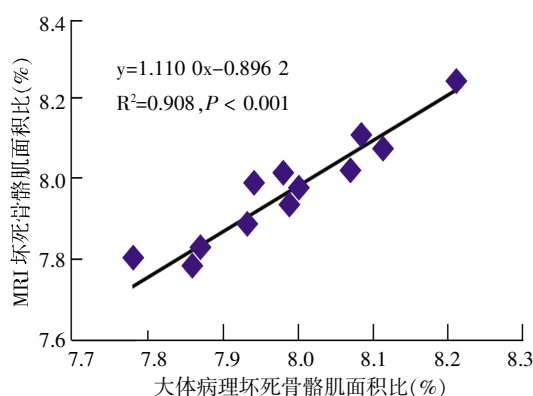


图 4 MRI 上坏死骨骼肌面积比与大体病理上坏死骨骼肌面积比的相关性

Figure 4 Correlation of necrotic size between MRI- and EB-staining

具有实际应用价值。

EB 因为自身的无毒性被广泛用于研究血管和细胞膜的通透性,在血循环中与白蛋白结合形成 EB 白蛋白复合物,正常血管内膜面有内皮细胞屏障,该复合物不能透过。内皮损伤后,EB 随血管内蛋白成分进入组织间隙,使其染成蓝色。细胞膜不完整的细胞,胞膜的通透性增加,也可被染成蓝色^[9-11]。本研究用此原理使坏死骨骼肌蓝染,以便大体切片观察时方便识别病变区。

通过 MRI 多序列扫描后,本研究发现肌肉坏死处在 T1WI 上呈等或略高信号,在 T2WI、DWI、T2WI fs 上呈明显高信号,T2WI 及 T2WI fs 上坏死边界较 DWI 清晰。然而,T2WI fs 序列可排除周围脂肪信号的干扰,为此选定 T2WI fs 序列为最佳扫描序列。然而,随着肌注无水乙醇时间的改变,肌肉内部发生微妙的病理改变,导致肌注后不同时间点 MRI 上的病变范围及清晰度有所改变,为了使实验图像质量最优化,通过监测不同时间点的 MRI 扫描,确定

最佳扫描时间为 12 h。结合图 2,可以看出大体病理的病变区与 MRI 图像的相对应区域相符。因此, MRI 作为评价大鼠骨骼肌坏死模型活体检测方法是可行的,该方法可以保证实验中动物模型的成功建立。

NAA 在生物体内具有高效的靶向性,靶向效率高,在靶区停留时间长,因此在临床重大疾病的诊断和治疗上具有极强的应用价值,如心肌梗死的诊断、肿瘤治疗以及疗效评价,特别是在肿瘤内照射治疗上,NAA 开辟了一种全新的靶向治疗新方法,为实体瘤的治疗提供了一种有效手段^[12-15]。靶向治疗和诊断的关键是选择优良的靶向载体,目前筛选坏死组织靶向载体的动物模型是大鼠部分肝脏缺血再灌注坏死模型,该模型制作过程复杂,死亡率高。因此建立一种简单、成功率高的模型,并利用影像技术对模型的成功进行检测,将有效提高筛选效率。本研究大鼠肌肉坏死模型和 MRI 监测方法的成功建立将为 NAA 的筛选研究提供便利。

[参考文献]

- [1] Ni Y. Met alloporphyrins and functional analogues as MRI contrast agents[J]. *Curr Med Imaging Rev*, 2008, 4 (2): 96-112
- [2] Fonge H, Vunckx K, Wang H, et al. Noninvasive detection and quantification of acute myocardial infarction in rabbits using mono [¹²³I]iodohypericin SPECT[J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(2): 260-269
- [3] Wu X, Ni Y. Rat model of reperfused partial liver in infarction; characterization with multiparametric magnetic resonance imaging, microangiography, and histomorphology[J]. *Acta Radiol*, 2009, 50(3): 276-287
- [4] Kim YB, Kalthoff D, Po C, et al. Connectivity of thalamocortical pathway in rat brain: Combined diffusion spectrum imaging and functional MRI at 11.7T[J]. *NMR*

Biomed, 2012, 25(7):9543-9552

[5] Li Y, Weber E, Liu F, et al. The optimization of an 8-channel transceiver volume array for small animal MRI at 9.4T[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2011, 2011: 2833-2836

[6] 姚楠, 张健, 黄德建, 等. 磁共振成像技术评价考布他汀 A4 磷酸酯对大鼠移植性肝脏肿瘤的治疗作用[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(6):558-562

[7] Wang H, Chen F, Ni Y, et al. Hypericin as a marker for determination of tissue viability after intratumoral ethanol injection in a murine liver tumor model[J]. Acad Radiol, 2008, 15(1):107-113

[8] Ni Y, Adzamlı K, Miao Y, et al. MRI contrast enhancement of necrosis by MP-2269 and gadophrin-2 in a rat [J]. Invest Radiol, 2001, 36(2):97-103

[9] Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(3):789-794

[10] Harmer PW, McGeachie JM, Davies MJ, et al. Evans blue dye as an *in vivo* marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability[J]. J Anat, 2002, 200 (Pt1):69-79

[11] Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(1): 3710-3714

[12] Ni Y, Bormans G, Chen F, et al. Necrosis avid contrast agents: functional similarity versus structural diversity [J]. Invest Radiol, 2005, 40(8):526-535

[13] Wang H, Miranda Cona M, Chen F, et al. Comparison between nonspecific and necrosis-avid gadolinium contrast agents in vascular disrupting agent-induced necrosis of rodent tumors at 3.0T[J]. Invest Radiol, 2011, 46(9):531-538

[14] MarChal G, Ni Y, Herijgers P, et al. Paramagnetic metalloporphyrins: infarct avid contrast agents for diagnosis of acute myocardial infarction by MRI[J]. Eur Radio, 1996, 6(1):2-8

[15] Ni Y, Cresens E, Adriaens P, et al. Necrosis-avid contrast agents; introducing nonporphyrin species[J]. Acad Radiol, 2002, 9(1):98-101

[收稿日期] 2012-12-10

(上接第 701 页)

stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 1983, 32 (2):64-78

[5] 牛俊, 皮子凤, 越皓, 等. 格列美脲治疗的 2 型糖尿病大鼠的尿液代谢组学研究[J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(10):2169-2172

[6] Zhang X, Leung SM, Morris CR, et al. Evaluation of a novel, integrated approach using functionalized magnetic beads, bench-top MALDI-TOF-MS with prestructured sample supports, and pattern recognition software for profiling potential biomarkers in human plasma[J]. J Biomol Tech, 2004, 15(3):167-75

[7] Fiedler GM, Baumann S, Leichte A, et al. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Clin Chem, 2007, 53 (3):421-428

[8] Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, et al. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots[J]. Proteomics, 2004, 4(4):1159-1174

[收稿日期] 2012-12-14