

超小超顺磁性氧化铁颗粒联合磁化传递对比成像 在实验性变态反应性脑脊髓炎的应用

王 芳¹, 陆菁菁¹, 金征宇¹, 徐 雁², 关鸿志², 蔡 炯³

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 ¹放射科 ²神经内科 ³核医学科, 北京 100730

通信作者: 陆菁菁 电话: 010-65295479, 电子邮件: cjr.lujingjing@vip.163.com

摘要: **目的** 探讨磁共振对比剂超小超顺磁性氧化铁粒子 (USPIO) 增强磁共振 (MR) 检出实验性变态反应性脑脊髓炎 (EAE) 动物模型病变的敏感性及其增强病灶的磁化传递率 (MTR) 的变化。**方法** 11 只 EAE 组大鼠及 10 只对照组大鼠行常规 T1 加权像、T2 加权像、三维 T1 磁化传递、三维 T1 非磁化传递、钆对比剂 (钆喷酸葡胺注射液) 增强 T1 加权像及 USPIO 增强 T2 加权像扫描。计算 USPIO 及钆增强检出 EAE 病变的敏感性、EAE 组大鼠第 1 次出现 USPIO 异常强化的区域及前一次扫描相应区域的 MTR。大鼠脑组织行 HE 及髓鞘染色。**结果** 钆对比剂增强扫描未发现 EAE 大鼠脑内异常对比增强灶, USPIO 增强扫描显示 11 只大鼠脑内均有异常沉积。EAE 组大鼠 USPIO 异常强化区的 MTR 值与出现强化前同一区域的 MTR 值相比差异具有显著性 ($P < 0.05$)。USPIO 强化区可见炎细胞浸润及脱髓鞘改变, 对照组大鼠 MR 平扫及增强扫描无阳性显示。**结论** USPIO 增强 MR 检出 EAE 病变的敏感性高。与 USPIO 增强扫描相结合, 磁化传递成像能够提示 EAE 病变的性质。

关键词: 磁共振; 对比剂; 多发性硬化; 实验性变态反应性脑脊髓炎

中图分类号: R445.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2009)02-0177-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2009.02.012

Application of Magnetic Resonance Contrast Agent Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Combined with Magnetic Transfer Imaging in the Animal Model of Experimental Allergic Encephalopathy

WANG Fang¹, LU Jing-jing¹, JIN Zheng-yu¹, XU Yan², GUAN Hong-zhi², CAI Jiong³

¹Department of Radiology, ²Department of Neurology, ³Department of Nuclear Medicine,
PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: LU Jing-jing Tel: 010-65295479, E-mail: cjr.lujingjing@vip.163.com

ABSTRACT: Objective To explore the sensitivity of magnetic resonance contrast agent ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) enhancement scan in detecting experimental allergic encephalopathy (EAE) lesions and the change of magnetic transfer of USPIO enhancement lesions in the animal model of EAE. **Methods** The routine T1-weighted imaging, T2-weighted imaging, three dimensional T1 magnetic transfer, three dimensional T1 no magnetic transfer, Dimeglumine Gadopentetate injection (Gd-DTPA) enhancement, and USPIO enhancement scan were performed in 11 EAE rats and 10 control rats respectively. The sensitivity of USPIO and Gd-DTPA enhancement in detecting the lesions in EAE rats was calculated. Magnetic transfer

ratio (MTR) of USPIO enhancement area for the first time in EAE rats and MTR of the same area of the last scan were calculated respectively. HE and myelin staining of brain tissues were performed. **Results** No abnormally enhanced lesions were showed in EAE rats' brain in Gd-DTPA enhancement scan, while abnormally enhanced lesions were showed in 11 EAE rats' brain in USPIO enhancement scan. The MTR value of USPIO enhancement area for the first time was significantly different from MTR of the same area of the last scan in EAE rats ($P < 0.05$). Inflammation cells and demyelination lesions were found in USPIO enhancement area histopathologically. There were no positive findings in control rats. **Conclusions** The sensitivity of USPIO enhancement scan in detecting EAE lesions was high. Magnetic transfer imaging, together with USPIO enhancement scan, was helpful to determine the features of the EAE lesions.

Key words: magnetic resonance; contrast agent; multiple sclerosis; experimental allergic encephalopathy

Acta Acad Med Sin, 2009, 31(2):177-181

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是人类神经系统的自身免疫性脱髓鞘性疾病, 巨噬细胞是 MS 的重要效应细胞, 在疾病的发生、发展中起着重要作用, 参与病程的各个阶段。由于其神经组织学标本较难获得, 实验性变态反应性脑脊髓炎 (experimental allergic encephalopathy, EAE) 是研究人类 MS 的理想动物模型^[1], 目前 EAE 模型的诱导比较成熟。近年磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 技术不断进展, 但对 EAE 模型进行 MRI 方面的研究较少。本研究从新型磁共振对比剂超小超顺磁性氧化铁粒子 (ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO) 及磁共振 (magnetic resonance, MR) 新技术磁化传递 (magnetic transfer, MT) 入手 (前者能被单核吞噬系统细胞吞噬, 后者能够增加组织对比和提供组织特征^[2]), 比较 EAE 模型中 USPIO 与常规钆对比剂 (钆喷酸葡胺注射液) 检出病变的敏感性及其探索 MT 成像的价值。

材料和方法

EAE 模型制备 Lewis 大鼠 21 只, 随机分为 2 组, EAE 组 11 只, 对照组 10 只; 豚鼠 1 只, 均为雌性。所有实验动物均由北京协和医院实验动物中心提供。将豚鼠麻醉, 无菌状态下迅速取其脊髓, 剥离脊膜后, 按 1 g 脊髓: 1 ml 生理盐水比例, 加入生理盐水, 使用匀浆器匀浆, 再与等体积完全福氏佐剂 (sigma 公司) 充分混合, 制成完全抗原。在 EAE 组大鼠臀部皮内多点注射完全抗原, 对照组大鼠臀部多点注射生理盐水及完全福氏佐剂。免疫当日为 0 d, 第 7~8 天加强注射。免疫后每天称重, 并依据 KONO 标准^[3] 进行临床症状评分。0 分: 正

常; 0.5 分: 尾巴失去张力; 1 分: 尾巴完全麻痹; 2 分: 后肢无力; 3 分: 后肢完全麻痹、尿便失禁; 4 分: 全身麻痹。

MR 成像 使用 GE 1.5T MR 仪, 3 英寸通用环形线圈。固定大鼠脑部, 取仰卧位扫描。自免疫后第 12 天 EAE 组大鼠出现症状前, 开始行全脑 MR 扫描。初次扫描未出现 USPIO 异常强化的大鼠, 随后每 3 天扫描 1 次, 至初次出现 USPIO 异常强化, 上述扫描持续至观察期结束。成像序列为平扫: 斜轴位 T2 快速弛豫快速自旋回波序列: 翻转角 90°, 回波时间 (echo time, TE) 104 ms, 反转时间 (inversion time, TI) 0 ms, 重复时间 (repetition time, TR) 3 000 ms; 轴位 T1: 翻转角 90°, TE 23.6 ms, TI 740 ms, TR 2 500 ms; 层厚 3.0 mm, 层间距 0 mm, 视野 8 cm × 6 cm, 矩阵 288 × 256, 激励次数 4.0。三维 T1 磁化传递 (施加饱和脉冲) 和三维 T1 非磁化传递 MT 手动配对轴位 T1 加权像 (T1-weighted imaging, T1WI) 扫描: 翻转角 30°, TE 12 ms, TI 0 ms, TR 33 ms, 层厚 1.4 mm, 层间距 0 mm, 视野 8 cm × 6 cm, 矩阵 288 × 256, 激励次数 1.0。经尾静脉注入 Gd 对比剂 (钆喷酸葡胺注射液, 北陆药业股份有限公司, 浓度 0.5 mol/L, 注射剂量为 1 ml/kg) 10 min 后, 行轴位 T1 扫描; 注入 USPIO (Sinerem Laboratory Guerbet, Aulnay, France, 浓度为 2 mgFe/ml, 注射剂量为 7.98 ml/kg) 24 h 后, 行轴位 T2 快速弛豫快速自旋回波序列扫描。

图像分析 Gd 增强病变指静脉注射 Gd 后 10 min 扫描, T1WI 上病变信号强度增加; USPIO 增强病变指静脉注射 USPIO 后 24 h 扫描, T2WI 上病变信号强度减低^[4]。计算 EAE 组大鼠磁化传递率 (magnetization transfer ratio, MTR) 时, 用 USPIO 异常强化区指

导感兴趣区的选择,使用工作站提供的软件,根据公式 $MTR = (M_0 - M_s) / M_0 \times 100\%$ (M_0 、 M_s 分别为关闭和打开饱和脉冲时的信号强度),计算大鼠第 1 次出现 USPIO 异常强化区域的 MTR 值及上一次扫描相应区域的 MTR 值,为减小部分容积效应影响,感兴趣区尽量位于病变中央部,大小为 1 mm^2 。2 位放射科医师分别对所得图像及数据进行分析,意见不同时,通过讨论取得一致。

组织病理学检查 观察期结束时,处死所有动物,取其脑组织行 HE 及髓鞘染色。

统计学处理 应用 SPSS11.5 统计软件包,EAE 组大鼠第 1 次出现异常强化前后 MTR 值的比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

结 果

临床表现 EAE 组大鼠自第 12 天体重开始下降,然后逐渐出现症状,表现为不同程度食欲下降、体重减轻、皮毛不光滑;尾部无力、前后肢轻瘫或完全瘫痪;呼吸困难、大小便失禁等。其中 1 只大鼠发病 5 d 后症状自行缓解,6 只大鼠观察期内未出现症状。EAE 组大鼠平均体重 (177 ± 14.35) g 明显下降,对照组大鼠观察期内未出现症状,平均体重 (215.87 ± 8.10) g 逐渐上升,2 组体重比较差异

具有显著性 ($P < 0.05$) (图 1)。

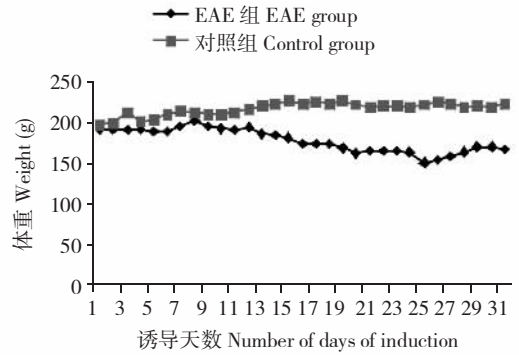


图 1 EAE 组及对照组大鼠体重变化

Fig 1 Changes of body weights of the EAE and control groups
EAE: 实验性变态反应性脑脊髓炎
EAE: experimental allergic encephalopathy

MR 表现 EAE 组大鼠 MR 平扫未见异常信号 (图 2A、2B), Gd 对比剂增强 T1WI 除脑膜呈线状强化外 (图 2D), 余未见异常强化。首次 USPIO 增强后扫描显示 8 只大鼠脑组织中见颗粒状低信号, 其中 2 只低信号弥漫分布于大脑、小脑、脑干及延髓等部位 (图 2C), 6 只低信号较局限; 另外 3 只大鼠在后续的 USPIO 增强扫描时出现异常强化, 2 只强化范围广泛。对照组大鼠平扫、Gd 增强及 USPIO 增强均未见异常信号及异常强化。

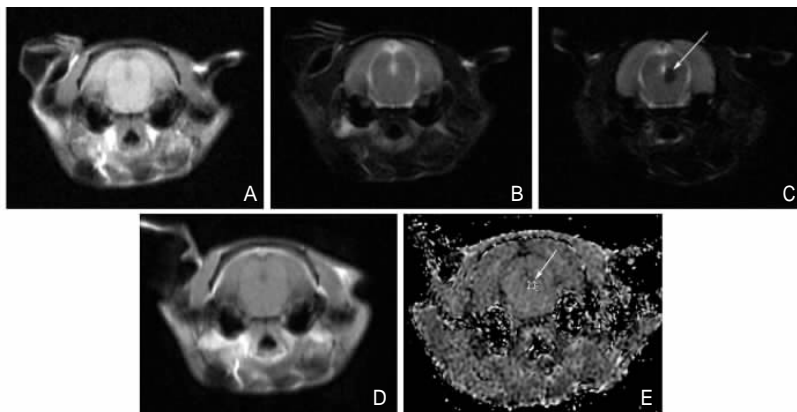


图 2 EAE 组同一只大鼠同层面的不同磁共振序列图像

Fig 2 Different magnetic resonance sequence images of the same slice of the same rat of EAE group

A. 平扫 T1 加权像未见明显异常信号; B. 平扫 T2 加权像未见明显异常信号; C. 超小超顺磁性氧化铁粒子增强 T2 加权像扫描左侧脑干见片状强化 (箭头); D. 钆对比剂 (钆喷酸葡胺注射液) 增强 T1 加权像扫描脑膜呈线状明显强化, 余未见明显异常强化; E. 磁化传递率图, 根据 C 图确定感兴趣区 (箭头)

A. No remarkably abnormal signal in plain T1-weighted imaging is found; B. No remarkably abnormal signal in plain T2-weighted imaging is found; C. Patchy enhancement in left brain stem in ultrasmall superparamagnetic iron oxide enhancement T2-weighted images (arrow) is found; D. The linear enhancement of meninges is showed and no other remarkably abnormal enhancement in Dimeglumine Gadopentetate injection contrast enhancement T1-weighted imaging is found; E. The figure of magnetic transfer ratio, the region of interest is determined by figure C (arrow)

MTR 11只EAE组大鼠出现USPIO异常强化,其中3只因异常强化区域较小,部分容积效应致所得MTR误差较大,故将其排除,计算符合要求的8只大鼠48个异常强化病变的MTR值为 25.3 ± 2.2 ,前1次扫描未出现异常强化时相应部位MTR值为 27.5 ± 1.6 ,两者比较差异具有显著性($P < 0.05$)。

病理学检查结果 病理学检查显示USPIO强化区见炎症细胞在小静脉周围浸润,形成“袖套样”改变(图3)。

讨 论

Gd对比剂是一种小分子细胞外间隙MR对比剂,在中枢神经系统主要反映血脑屏障的破坏。本研究EAE组大鼠Gd对比剂增强MR扫描未见异常强化病变,分析原因可能为:扫描时点大鼠血脑屏障未被破坏或破坏程度较轻,加之大鼠脑体积较小,常规Gd对比剂增强扫描不能够探测到异常强化,敏感性低。另外,在急性炎症的早期阶段及反映轻微的炎症,无血脑屏障的破坏,但病灶有活动性,血脑屏障破坏与疾病活动性及进程不一定一致,单纯依靠血脑屏障破坏与否判断病变的活动性、监测疾病进程不够精确。可见,Gd对比剂在EAE模型中的应用价值有限。

USPIO是由右旋糖苷包裹的氧化铁纳米颗粒,在血中停留时间较长,经静脉注射后,可能通过两种途径被巨噬细胞吞噬。第一,通过内皮细胞被释放入间质间隙,然后被巨噬细胞捕获。第二,到达炎症位置之前,已经进入血行中的单核或巨噬细胞内^[5];通过磁敏感性效应缩短T₂,使吞噬USPIO的巨噬细胞呈低信号^[6],实现巨噬细胞的活体成像。USPIO主要反映巨噬细胞的浸润,反映炎症的过程,在EAE模型中巨噬细胞浸润和血脑屏障的破坏是疾病的不同阶段,两者相关但又不完全一致,因此,USPIO与Gd对比剂反映EAE病变的角度不同。USPIO对病变有放大作用,对小的病变也能清楚显示^[7],并且与组织病理学检查显示的炎症细胞浸润范围一致。另外,USPIO异常强化的范围反映巨噬细胞的浸润程度,可作为将来脱髓鞘病变定位或严重程度参考^[8]。亚临床病灶指脑组织中有病变,但未出现相关的临床症状,是可逆性病变,但早期发现困难。本研究EAE组USPIO强化先于症状出现,并且6只大鼠出现体重下降但临床症状不明显,

分析原因有亚临床病变存在,组织病理学证实脑组织内有炎细胞浸润。EAE中炎症反应先于临床症状出现,炎症细胞中的巨噬细胞可以吞噬USPIO,出现异常对比,从而提供了一种检出亚临床病变的方法,指导临床早期干预。Rausch等^[5]研究表明,有USPIO相关MRI信号改变的EAE大鼠随后均出现严重症状,可用于监测疾病的进程及预测病情变化。

MT技术是利用磁化传递饱和脉冲,选择性饱和大分子质子池,使结合池质子纵向磁化接近零,通过两池相互作用,由结合池传递到自由池的磁化量很少,造成水质子池磁化降低,成像组织信号强度降低;MT可反映组织内结合水质子与自由水质子之间的交换,进而反映脑组织结构的微观变化。MTR值的大小反映了给定组织中大分子的密度,降低提示组织内大分子含量的减少,反映了髓鞘的丢失或轴索密度的减少。常规MR的“看似正常白质”在用MT量化时发现异常MTR。MTR能够将“看似异常白质”、斑块及“看似正常白质”区别开来,是反映组织结构破坏程度的敏感指标^[9]。本研究EAE组大鼠出现USPIO异常强化的区域MTR值较强化前相应部位MTR值减低($P < 0.05$),与Rausch等^[5]的研究结果一致,表明出现异常强化后该部位脑组织可能存在髓鞘的脱失,提供了病变组织的特征信息。

尽管MT成像可以增加组织对比,但鼠脑体积小,病变体积更小,单纯依靠MT成像发现病变有一定困难,由于USPIO发现病变的敏感性高,本研究将USPIO增强扫描与MT成像相结合,前者指导后者选择感兴趣区,充分发挥了两者的优势。本研究MTR的计算方法尚有不足之处,如有操作者依赖性和易受部分容积效应影响等,有待于以后的研究中不断完善。

综上,USPIO可被炎症中的巨噬细胞摄取,其增强MR扫描能够活体显示常规增强扫描不能显示的病变,并可检出亚临床病变。USPIO增强病灶的MTR发生变化,可反映局部微观结构的变化。

(本文图3见插图第5页)

参 考 文 献

- [1] Mancardi G, Hart BA, Capello E, *et al.* Restricted immune responses lead to CNS demyelination and axonal damage [J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 107(2):178-183.
- [2] Wolff SD, Balaban RS. Magnetization transfer imaging:

- practical aspects and clinical applications [J]. *Radiology*, 1994, 192(3):593-599.
- [3] Kono DH, Urban JL, Horvath SJ, *et al.* Two minor determinants of myelin basic protein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice [J]. *J Exp Med*, 1988, 168(1):213-227.
- [4] Schroeter M, Saleh A, Wiedermann D, *et al.* Histochemical detection of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) contrast medium uptake in experimental brain ischemia [J]. *Magn Reson Med*, 2004, 52(2):403-406.
- [5] Rausch M, Hiestand P, Baumann D, *et al.* MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE [J]. *Magn Reson Med*, 2003, 50(2):309-314.
- [6] Bourrinet P, Bengele HH, Bonnemain B, *et al.* Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent [J]. *Invest Radiol*, 2006, 41(3):313-324.
- [7] Floris S, Blezer EL, Schreibelt G, *et al.* Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study [J]. *Brain*, 2004, 127(3):616-627.
- [8] Brochet B, Deloire MS, Touil T, *et al.* Early macrophage MRI of inflammatory lesions predicts lesion severity and disease development in relapsing EAE [J]. *Neuroimage*, 2006, 32(1):266-274.
- [9] 王芳, 陆菁菁, 金征宇. 实验性变态反应性脑脊髓炎动物模型的制备及其磁共振成像 [J]. *中华放射学杂志*, 2008, 42(12):1340-1342.

(2008-12-31 收稿)