

Noninvasive observation of atherosclerosis in mice with 7.0T MR and Micro-PET

WANG Zhong-juan¹, DENG Gang^{1*}, HUANG Hong-bo², LI Ai-mei³,
JU Sheng-hong¹, ZHAO Rui¹, JIN Hui¹, WEI Xiao-ying¹

1. School of Nuclear Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, the Affiliated DrumTower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective** To explore the feasibility of detecting atherosclerosis with 7.0T MR and Micro-PET. **Methods** Ten 46-week-old ApoE^{-/-} mice with high lipid diet for 6 months were selected to establish atherosclerosis models. Among them, 5 mice underwent MRI before and 12 h, 24 h, 36 h after injection of SPIO, respectively, and the other 5 mice were injected with ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) through tail vein and observed with Micro-PET after 1 h, 2 h and 3 h. The specimens of abdominal aorta were taken for pathologic examination. **Results** Atherosclerotic plaques were observed in all animals with 7.0T MRI after 6 months high lipid diet. Thirty-six hours after the injection of SPIO, the high signal rings were thinner and the lumen of blood vessels were wider than those before injection on T2WI. Radioactive concentration was observed in abdominal aorta and both sides of iliac artery 3 h after the injection of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG). Pathological examination showed the formation of atherosclerotic plaques and the aggregation of the macrophages. **Conclusion** 7.0T MRI and Micro-PET can be used to observe the macrophage-rich plaque and to judge the vulnerability of plaque, thus provide theoretical basis for early detection, diagnosis and treatment of atherosclerosis.

[Key words] Atherosclerosis; Macrophage; Magnetic resonance imaging; Micro-PET; ApoE^{-/-}mice

7.0T MRI 及 Micro-PET 无创检测 小鼠动脉粥样硬化

王中娟¹, 邓 钢^{1*}, 黄洪波², 李爱梅³, 居胜红¹, 赵 瑞¹, 金 晖¹, 魏晓莹¹

(1. 东南大学附属中大医院放射科, 江苏 南京 210009; 2. 江苏省原子能医学研究所 卫生部核医学重点实验室, 江苏 无锡 214063; 3. 南京大学医学院附属鼓楼医院 PET/CT 中心, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的** 探讨 7.0T 小动物 MRI 及 Micro-PET 检测动脉粥样硬化的可行性。 **方法** 取 10 只 46 周龄 ApoE^{-/-}小鼠建立老年 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型, 取 5 只模型于鼠尾静脉注射超顺磁性氧化铁(SPIO)前、后 12 h、24 h、36 h 行 MR 扫描(应用 7.0TMR 仪); 另 5 只模型于鼠尾静脉注射¹⁸F-氟脱氧葡萄糖(¹⁸F-FDG)1 h、2 h、3 h 后行 Micro-PET 显像; 取腹主动脉行病理检查。 **结果** 老年 ApoE^{-/-}小鼠高脂喂养 6 个月后, 7.0T MRI 证实动脉粥样硬化斑块形成; 鼠尾静脉注射 SPIO 后 36 h 发现鼠腹主动脉及两侧髂动脉血管壁 T2W 像上环形高信号较未注射 SPIO 前变薄, 血管腔较前增宽。鼠尾静脉注射¹⁸F-FDG 行 Micro-PET 检测, 发现在 3 h 左右腹主动脉及两侧髂动脉区域有放射性浓聚。病理示腹主动脉壁内有动脉粥样硬化斑块形成及巨噬细胞的聚集。 **结论** 7.0T MRI 及 Micro-PET 可成功检测巨噬细胞丰富的动脉粥样硬化斑块, 有助于判断斑块的易损性, 为早期发现、诊断及治疗动脉粥样硬化提供理论依据。

[关键词] 动脉硬化; 巨噬细胞; 磁共振; Micro-PET; ApoE^{-/-}小鼠

[中图分类号] R-332; R445.2; R817.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2010)02-0209-04

[基金项目] 国家自然科学基金(30770624, 30830039)。

[作者简介] 王中娟(1984-), 女, 江苏盐城人, 在读硕士。研究方向: 心血管影像诊断。E-mail: shelleywj@yahoo.com.cn

[通讯作者] 邓钢, 东南大学附属中大医院放射科, 210009。E-mail: dmm1996@163.com

[收稿日期] 2009-08-28 **[修回日期]** 2009-11-17

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 可导致缺血性心脑血管疾病, 严重危害人类健康, 其发病率在全球范围内有明显增加趋势^[1]。预计至 2020 年, AS 将成为全球范围内主要致死原因之一^[2]。AS 是慢性进行性炎症性疾病, 具有时间依赖性^[3,4]。现有手段如血管造影、磁共振血管造影、CT 血管造影、血管内超声等对 AS 有一定的诊断价值, 但均为创伤性检查, 应用受限, 且在粥样斑块足够大、血管狭窄达到一定程度时才能发挥作用, 对早期发现以代谢紊乱为特征的 AS 有其固有的局限性^[5]。本实验对老年 ApoE^{-/-}小鼠分别行 7.0T MRI 及 Micro-PET 检测并对比观察研究, 旨在为早期发现、早期诊断、早期治疗 AS 提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 老年 ApoE^{-/-}小鼠 10 只 (品系为 C57BL/6L, 纯合子, 源自美国 Jackson 实验室, 购自北京大学医学部动物中心), 正常饲料喂养至 46 周龄, 平均体重 35 g, 均为雄性, 喂养在温度、光照控制的 SPF 级动物房。

1.1.2 设备及试剂 Bruker 7.0T 磁共振仪, Micro-PET (Sigma, 江苏原子能医学研究所), 麻醉剂为 1.5% 异氟烷-氧气/氮气 (30:70) 混合气体, 超顺磁性氧化铁 (superparamagnetic iron oxide, SPIO), ¹⁸F-氟脱氧葡萄糖 (¹⁸F-fluorodeoxyglucose, ¹⁸F-FDG)。

1.2 方法

1.2.1 动脉粥样硬化模型制作 10 只老年 ApoE^{-/-}小鼠正常饲料喂养至 46 周龄后, 予西方标准高脂饮食 (21% 脂肪、0.15% 胆固醇, 无胆盐) 6 个月。

1.2.2 5 只老年 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食 6 个月后行腹主动脉 MRI。扫描前停饲、停饮 12 h, 异氟烷气体麻醉, 俯卧位保定后扫描。采用大鼠头线圈, 成像序列及参数如下: 轴位 MSME-PDWI-T2WI 序列: TR 2400 ms, TE 16.1 ms, FOV 3.0 cm, 矩阵 512 × 256; 轴位 Flash-cine-blackblood-T1WI 序列: TR 700 ms, TE 2.7 ms, FOV 3.5 cm, 矩阵 256 × 256。经鼠尾静脉缓慢注射 SPIO 后 12 h、24 h、36 h 分别行轴位上述各序列扫

描。采用 Bruker 7.0T micro-MR 自带的 Paravision 4.0 软件测量血管壁的面积, 注射 SPIO 前后进行对比研究。

另 5 只老年 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食 6 个月后, 经尾静脉注射 ¹⁸F-FDG (1 mCi/kg) 后 1 h、2 h、3 h 行 Micro-PET 显像, 连续采集 30 min。

1.2.3 病理学检查 MR 扫描或 Micro-PET 显像后将小鼠全部处死, 4% 多聚甲醛心脏灌注后, 取相应腹主动脉标本, 以 4% 多聚甲醛溶液保存, 常规石蜡包埋, 血管横断面作连续切片, 分别进行 HE 染色和 CD68 免疫组织化学检查, 观察血管内膜、血管壁、血管腔的变化及血管壁巨噬细胞的分布。为保证 MR 扫描层面与病理切片的一致性, MR 扫描时取腹主动脉下段近两侧髂动脉分叉处为主要层面进行血管显像, 处死后分离腹主动脉及两侧髂动脉, 取腹主动脉下段近分叉处血管。

1.2.4 统计方法 应用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。如各组血管壁面积的均值方差齐, 则行单因素方差分析, 否则行 Kruskal-Wallis H 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 老年 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食 6 个月后, MRI 通过测量血管壁面积发现注射 SPIO 后的血管壁面积明显小于注射前 (图 1, $P = 0.036$)。T2WI 示小鼠腹主动脉及两侧髂动脉血管壁增厚, 呈环形高信号影, 血管腔呈不规则狭窄 (图 2); 鼠尾静脉注射 SPIO 后 36 h 扫描发现 5 只模型鼠中有 4 只腹主动脉及两侧髂动脉血管壁于 T2WI 示环形高信号较注射 SPIO 前变薄, 血管腔较前增宽, 但仍不规则 (图 3), 另外 1 只模型鼠血管壁信号下降不明显。

2.2 老年 ApoE^{-/-}小鼠尾静脉注射 ¹⁸F-FDG 后 1 h、2 h、3 h 行 Micro-PET 扫描, 5 只模型小鼠均在 3 h 左右发现腹主动脉及两侧髂动脉区域放射性浓聚 (图 4)。

2.3 病理结果 老年鼠腹主动脉壁内有动脉粥样硬化斑块形成 (图 5), 斑块内以泡沫细胞成分居多, 斑块基底部平滑肌细胞增生, 同时部分脂质崩解成为坏死核心, 其上覆盖较薄纤维帽。CD68 免疫组化检查显示斑块内有少许 CD68 阳性的巨噬细胞源性泡沫细胞 (图 6), 普鲁士蓝染色显示在巨噬细胞阳性表达周围见铁颗粒 (图 7)。

3 讨论

AS 是慢性炎症过程, 单核/巨噬细胞系统参与的炎症反应在 AS 斑块的发生、演变及破裂过程中充当着至关重要的角色。对人 AS 斑块进行的免疫组织化学研究已证明斑块内存在巨噬细胞、激活的 T 淋巴细胞和少量的肥大细胞, 诸多组织学资料表明斑块内的炎症细胞 (主要是巨噬细胞) 数量是决定宏观上斑块不稳定性程度的重要因素之一。因此, 现有的影像学检查方法着重于检测斑块内炎症浸

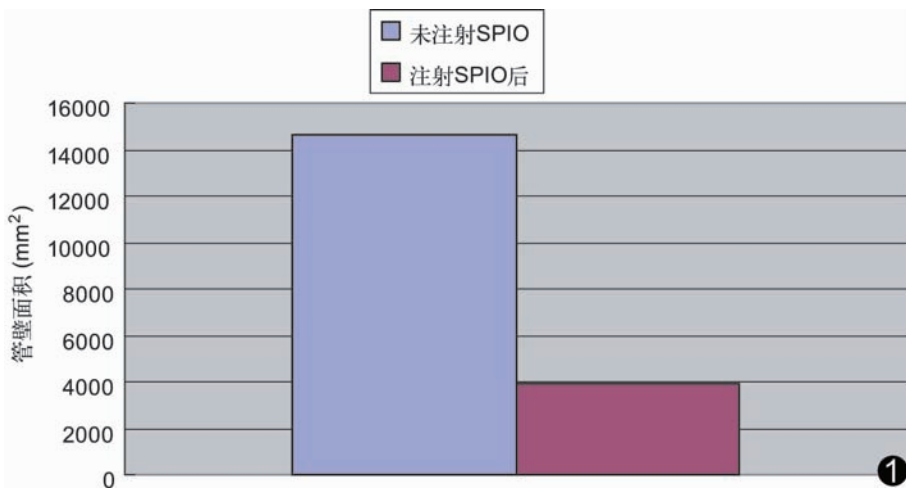


图 1 小鼠 AS 模型注射 SPIO 前后血管壁面积对比

程度及辨别斑块内不同成分以帮助判

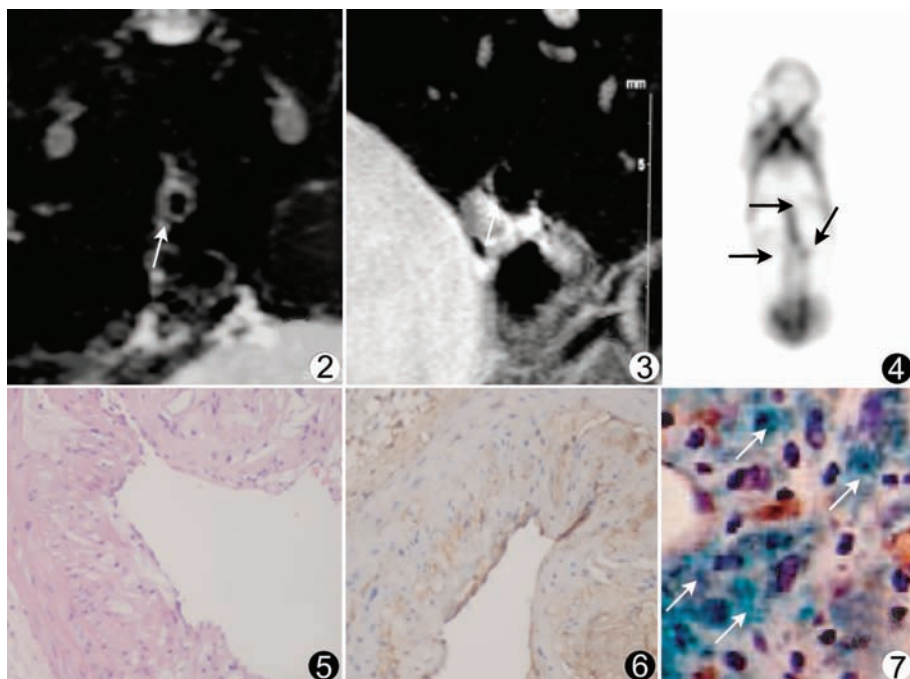


图 2 腹主动脉 T2WI 图 腹主动脉(髂动脉分叉处)血管壁增厚,呈环形高信号影,血管腔呈不规则狭窄(箭) **图 3** 注射 SPIO 后 36 h 腹主动脉 T2WI 图 腹主动脉(髂动脉分叉处)血管壁环形高信号较未注射 SPIO 前变薄,血管腔较前增宽(箭) **图 4** 注射 ^{18}F -FDG 3 h 后 Micro-PET 显像图,腹主动脉及两侧髂动脉区见放射性浓聚(箭) **图 5** 腹主动脉病理图 血管内粥样斑块形成,斑块内以泡沫细胞成分居多,斑块基底部平滑肌细胞增生,部分脂质崩解成为坏死核心,其上覆盖较薄纤维帽(HE, $\times 200$) **图 6** CD68 免疫组化示斑块内新生血管附近阳性表达的巨噬细胞源性泡沫细胞(anti-CD68, $\times 200$) **图 7** 普鲁士蓝染色显示在巨噬细胞阳性表达周围铁颗粒着色(箭)

断斑块的易损性,以期早期发现、早期诊断、早期治疗 AS。

MRI 及 PET 具有高分辨力、无创和重复性好的优点,且能在活体上无侵入性地对病变的发展过程进行监测及示踪,通过建立适合临床研究的 AS 模型,从而评估 AS 的发生及发展程度,对于促进临床心血管疾病的早期诊断、早期治疗有着重要的临床意义。目前血管性疾病的影像学诊断已经成为新的研究领域^[6]。一般临床用 MR 及 PET 设备对小鼠及大鼠等体积较小的动物分辨力差,不能清晰地分析病变。本实验所采用的 7.0T MRI 是专门针对小鼠及大鼠进行病变检测的设备,具有超高强磁场和梯度场强,最高空间分辨力达 10 微米, Micro-PET 分辨力可达 1.4 mm,能清晰显示小鼠血管壁组织学病变。

本实验建立了老年 ApoE^{-/-}小鼠腹主动脉 AS 模型。ApoE(载脂蛋白 E)可运载内源性和外源性的胆固醇,在 AS 中起重要的保护作用。与野生型小鼠相比, ApoE^{-/-}小鼠由于富含胆固醇的脂蛋白清除障碍,使血浆胆固醇水平较高,这些脂蛋白在体内蓄积,直接导致 ApoE 基因敲除小鼠复杂的 AS 斑块的形成。ApoE 小鼠被认为是 AS 模型的最佳动物模型^[7],因为其在普通饮食情况下就具有形成高脂血症及能自发形成斑块的特性,其斑块形成过程与人类十分相似,且 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的产生及发展具有时间依赖性。由于高脂饮

食进一步促进粥样斑块的形成,高脂饮食 5 周 ApoE^{-/-}小鼠动脉壁内膜即有变化,巨噬细胞、泡沫细胞聚集,20~40 周后即有纤维斑块形成,纤维帽破裂,继而不稳定性斑块形成^[7]。本实验采用 46 周龄老年 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食 6 个月后进行 7.0T MR 检测,腹主动脉及两侧髂动脉血管壁不均匀增厚,并于 T2W 像上呈环形高信号影,病理证实 AS 斑块形成。

SPIO 是一种新型的磁性 MRI 对比剂,具有能被网状内皮系统识别并为巨噬细胞所摄取的特点。Smith 等^[8]研究证明, SPIO 主要被粥样病变组织中的巨噬细胞摄取,而很少被内皮细胞和平滑肌细胞摄取,故可用来检测 AS 病变的生物学变化过程。

SPIO 颗粒具有超顺磁性,按外加磁场磁极方向排列,产生强烈的磁化效应,而当外加磁场撤除后,微粒的磁极重新分布,表现为净磁力的消失。SPIO 进入体内后可使组织中局部磁场不均匀,而水分子弥散穿过不均匀磁场时,加速质子的失相位,使组织的横向弛豫时间(T_2)明显缩短,因此 T2WI 上组织信号降低^[9]。本研究中,老年 ApoE^{-/-}小鼠注射 SPIO 之前,

MRI 示腹主动脉及两侧髂动脉血管壁于 T2WI 上呈环形高信号影,管腔不规则且狭小,鼠尾静脉注射 SPIO 之后 36 h^[10],腹主动脉斑块内的巨噬细胞吞噬 SPIO 后,产生强烈的顺磁效应,从而使得组织信号于 T2WI 上降低,显示管壁高信号影较前薄,管腔较前略大;病理显示腹主动脉 AS 斑块形成,免疫组化显示斑块内含有巨噬细胞源性泡沫细胞,普鲁士蓝染色显示在巨噬细胞阳性表达的斑块周围见铁颗粒着色。

AS 中,炎症反应及巨噬细胞聚集使得 ^{18}F -FDG 在局部聚集,巨噬细胞在斑块破裂中起着重要作用,因此 FDG-PET 显像可有效检测到不稳定易损斑块^[11]。动物实验已经证实, FDG 聚集在 AS 斑块中富含巨噬细胞的区域,且与巨噬细胞的含量有着很大的相关性^[12]。近年来研究还证实 FDG 浓聚亦与年龄有关^[13]。本实验中,老年 ApoE^{-/-}小鼠鼠尾静脉注射 ^{18}F -FDG 后 2~3 h 检测最佳,小鼠的腹主动脉及两侧髂动脉局部有放射性浓聚,病理显示腹主动脉 AS 斑块形成,免疫组化有巨噬细胞相应抗原表达。

AS 斑块的破裂是由于巨噬细胞浸润纤维帽后被激活而发生细胞凋亡所致,粥样斑块内的炎症增加了斑块破裂的不稳定性及后继发生的血栓栓塞,从而发生一系列临床紧急事件。AS 疾病的发生、发展都与单核巨噬细胞存在密切关系。SPIO 与 ^{18}F -FDG 对于巨噬细胞浸润的炎症反应的特异性显示

及巨噬细胞的含量密切相关,有助于反映斑块炎症浸润的程度,并为斑块稳定量化指标的确定提供了可能性。本实验成功建立了老年 ApoE^{-/-}小鼠 AS 模型,并通过 7.0T MR SPIO 增强及¹⁸F-FDG Micro-PET 显像成功检测出巨噬细胞含量丰富的 AS 斑块,有助于判断斑块的易损性,从而早期发现、早期诊断、早期治疗 AS。

[参考文献]

[1] 宋琼,夏黎明,王承缘,等. 兔早期动脉粥样硬化斑块的 MRI 表现与组织病理学对照研究. 中华放射学杂志, 2006, 40(4): 431-433.

[2] Scott J. The pathogenesis of atherosclerosis and new opportunities for treatment and prevention. J Neural Transm Suppl, 2002, 63: 1-17.

[3] Rabkin SW. Epicardial fat: Properties, function and relationship to obesity. Obes Rev, 2007, 8(3): 253-261.

[4] Daniels SR. Cardiovascular disease risk factors and atherosclerosis in children and adolescents. Curr Atheroscler Rep, 2001, 3(6): 479-485.

[5] Gottsegen JM, Coplan NL. The atherosclerotic aortic arch: Considerations in diagnostic imaging. Prev Cardiol, 2008, 11(3): 162-167.

[6] 马占龙,滕皋军,麦筱莉,等. 兔颈动脉粥样硬化模型的建立及 MR 成像的实验研究. 中国医学影像技术, 2007, 23(1): 9-11.

[7] Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. J Physiol Pharmacol, 2004, 55(3): 503-517.

[8] Smith BR, Heverhagen J, Knopp M, et al. Localization to atherosclerotic plaque and biodistribution of biochemically derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) contrast particles for magnetic resonance imaging. Biomed Microdevices, 2007, 9(5): 719-727.

[9] Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. NMR Biomed, 2004, 17(7): 484-499.

[10] Howarth S, Li ZY, Trivedi RA, et al. Correlation of macrophage location and plaque stress distribution using USPIO-enhanced MRI in a patient with symptomatic severe carotid stenosis: a new insight into risk stratification. Br J Neurosurg, 2007, 21(4): 396-398.

[11] Ogawa M, Ishino S, Mukai T, et al. (18)F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study. J Nucl Med, 2004, 45(7): 1245-1250.

[12] Tawakol A, Migrino RQ, Hoffmann U, et al. Noninvasive in vivo measurement of vascular inflammation with F-18 fluorodeoxyglucose positronemission tomography. J Nucl Cardiol, 2005, 12(3): 294-301.

[13] Bural GG, Torigian DA, Chamroonrat W, et al. FDG-PET is an effective imaging modality to detect and quantify age-related atherosclerosis in large arteries. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008, 35(3): 562-569.

《超声心动图手册》已出版

由北京协和医学院方理刚、朱文玲教授推荐并翻译的 Mayo Clinic 的最新版《超声心动图手册》已经由科学出版社出版,本书是一本简明而实用的超声心动图学。简要介绍了超声心动图基本物理学、技术和获得良好检查效果的注意点,详细介绍了多种超声心动图的基础内容,系统阐述了一些新技术和特殊检查的应用;并着重评价心脏收缩功能和舒张功能。最后对各种疾病的超声表现做了详尽论述。其内容全面,可读性强,又富有启发性。其特点之一是密切结合临床实践,包含了 Mayo Clinic 丰富的临床病例和超声心动图资料,既有据可查又融合了作者的观点和经验。相信读者阅读后会受益良多。Mayo Clinic 在心血管领域的领先地位举世公认;这也在一定程度赋予了本书在专业上的先进性。

当当网、卓越网、新华书店及医学专业店有销售。定价 368.00 元。

联系人 温晓萍

电话 010-64034601, 64019031

E-mail med-prof@mail.sciencep.com

地址 北京市东黄城根北街 16 号 科学出版社

邮编 100717

(免邮寄费,请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)

