

网络出版时间: 2018-1-8 11:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.015.html>

USPIO 增强 MRI 在兔动脉粥样硬化斑块模型的观察研究

张 勇¹, 李小鹏¹, 徐智超¹, 朱华庆², 胡孝朋³

摘要 目的 探讨单纯高脂饮食建立兔动脉粥样硬化模型的可行性以及超小顺磁性氧化铁(USPIO)增强磁共振成像(MRI)在兔动脉粥样硬化(AS)斑块研究中的价值。方法 挑选30只健康的雄性新西兰大白兔作为研究对象,使用随机分组法分为两组,其中实验组20只,对照组10只。实验组通过单纯高脂饲料饲养的方法建立兔AS模型,对照组不作其他干预。观察USPIO增强前后动脉斑块的MRI表现,与病理结果进行比较和分析。结果 实验组成功建立兔AS模型,其中14例形成AS斑块,USPIO增强T2WI序列表现为斑块中央信号减低,血管壁信噪比值在96h降低最低,较增强前信号差异有统计学意义($P < 0.05$),而对照组在增强前后管壁信号无变化。USPIO增强PJN 2D-TOF序列表现为管壁点状充盈缺损。病理检查显示USPIO颗粒主要沉积在内膜下。结论 单纯高脂饮食可以建立兔AS模型,USPIO增强MRI能反映出兔AS斑块情况,有助于对AS病变诊断作出评估。

关键词 动脉粥样硬化; 磁共振成像; 超微超顺磁性氧化铁;

动物模型

中图分类号 R 972.6; R 814.46; R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0066-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.015

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种由动脉壁脂质沉积引起的慢性血管病,而巨噬细胞在AS的发病机制中发挥着核心作用,其积极参与动脉壁的低密度脂蛋白的摄取和脂质的积累,同时抗炎的巨噬细胞也与斑块的稳定性相关^[1]。发现和分析AS斑块的成分,评估其易损性对于心脑血管事件的诊治有重要意义。目前对易损斑块缺乏有效的、可重复性检测技术,因而限制了对于斑块特征性有价值的前瞻性研究的开展。而超小顺磁性氧化铁(ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO)是一种新的磁共振增强成像剂,本身具有被巨噬细胞吞噬的特性,使得USPIO增强磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)可用于显示AS斑块内的巨噬细胞,从而对AS早期斑块情况作出诊断及评估。该研究拟通过建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型,同时采用USPIO增强MRI检测兔AS斑块的形态和成分,评估USPIO在AS斑块检测中的可行性,旨在为动脉粥样硬化易损斑块的早期发现、诊断提供相关理

2017-09-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81570419); 2015年度安徽医科大学临床科学研究项目(编号:2015xkj096)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 老年心内科、³ 磁共振室, 合肥 230022

² 安徽医科大学生化教研室, 合肥 230032

作者简介: 张 勇,男,副教授,责任作者, E-mail: 8338740@qq.com

correlation between oxidative stress and its mechanism. **Methods** LNCaP cells were treated with 0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ Juglone. MTT assay was used to determine the growth of LNCaP cells treated with different concentrations of Juglone. Reactive oxygen species (ROS) was detected using fluorescence microplate reader with 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA) as fluorescent probe after treating LNCaP cells with Juglone and NAC. The expression levels of p-AKT, AKT and Nrf2 proteins were examined in LNCaP cells that were cultured with Juglone and LY294002 using Western blot. **Results** Compared with the control group, the concentration of Juglone in more than 12.5 $\mu\text{mol/L}$ could significantly inhibit the growth of LNCaP cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The ROS levels were increased in Juglone group compared with control group ($P < 0.01$). Compared with the Juglone group, ROS levels was inhibited ($P < 0.05$) and increased the cell proliferation rates by combination use with NAC ($P < 0.01$). Juglone inhibited expression of p-AKT and addition of NAC resorted the Juglone inhibition of p-AKT expression. Nrf2 expression were down-regulated in cell nucleus treated with Juglone and then inhibition of PI3K/AKT with LY294002 augmented Juglone-mediated function. **Conclusion** Juglone could significantly inhibit the growth of LNCaP cells and the effect may be related to promoted ROS levels through PI3K/AKT pathway and then inhibit the Nrf2 expression.

Key words Juglone; prostate cancer; reactive oxygen species; PI3K/AKT; Nrf2; growth inhibition

论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制作 所选动物由安徽医科大学动物实验中心提供,选出 30 只健康的雄性新西兰大白兔作为研究对象,体重 1.6~2.0 kg。采用随机分组法将动物分为两组(实验组 20 只,对照组 10 只)。AS 兔模型采用高脂饲料喂养(高脂饲料成分比例为普通全营养兔饲料 79.5%、蛋黄粉 15%、猪油 5%、胆固醇 0.5%),而对照组只给予普通全营养饲料进行喂养,每天 100 g/kg,饮水不限,饲养 16 周后行血管彩超观察斑块情况,然后行磁共振检查。所选动物为 SPF 级动物,所开展实验已经过当地动物关怀机构同意,研究过程均遵守全国动物实验守则。

1.2 主要试剂 所用 USPIO(Fe_3O_4 磁性纳米颗粒)购自南京东纳生物科技有限公司,具体规格标准如下: Fe_3O_4 内核 ϕ 约 7 nm,水动力尺寸(包括 Fe_3O_4 内核+表面包覆层+表面水化层 ϕ)约 35 nm。所用普鲁士蓝铁染色试剂盒(Perls stain,伊红法)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 血生化检查及血管彩超 于实验前及第 16 周分别对模型组及对照组经耳缘静脉抽空腹血 5 ml,采用酶法测定血脂:血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG),由全自动生化仪检测。第 16 周分别对模型组及对照组行腹主动脉血管彩超,观察斑块情况。

1.4 磁共振检查

1.4.1 麻醉方法 通过兔耳缘静脉缓慢注射 3% 的戊巴比妥钠溶液(1 mg/kg)进行麻醉。

1.4.2 MRI 序列及相关参数 应用 3.0T MRI 扫描仪,膝关节线圈。USPIO 增强前、后扫描序列包括:AX 2D-TOF(回波时间 5.4 ms,重复时间 18 ms,翻转角 30° ,层厚 1 mm,矩阵 512×512);FSE T2WI(回波时间 45.4 ms,重复时间 5 058 ms,层厚 4 mm,矩阵 320×320),PJN AX 2D-TOFLoc(回波时间 5.4 ms,重复时间 18 ms,翻转角 30° ,层厚 1 mm,矩阵 512×512),扫描肾动脉上方 5 cm 及下方 3 cm 范围内的动脉管壁。其后经耳缘静脉注入 USPIO(0.1 mmol/kg),再行磁共振增强扫描,每 24 h 重复一次,连续扫描 5 d。

1.4.3 图像分析 观察斑块在不同序列上的信号情况,测量 T2WI 上管壁信噪比(signal to noise ratio, SNR),两组进行比较,连续观察 5 d,了解增强前

后 AS 斑块信号有无变化。

1.5 病理检查 实验结束后,采用静脉空气栓塞处死两组动物,解剖取出完整的腹主动脉,后通过 10% 福尔马林溶液进行固定,对腹主动脉组织标本行横断切开,大体上观察判断是否有 AS。实验组以各个斑块为中心取病理标本,对照组在相应范围上取标本作比较。对所有病理标本实行铁染色,在显微镜下观察斑块的相关特征以及铁染色情况。

染色方法:①切片脱蜡至水:二甲苯(I) 5 min、二甲苯(II) 5 min、无水乙醇 5 min、95% 乙醇 3 min、90% 乙醇 3 min、80% 乙醇 3 min、蒸馏水冲洗 3 min;②染色:切片入普鲁士蓝染色液 15 min、蒸馏水充分冲洗 5 min、伊红染色液淡染细胞核 15 s、自来水冲洗 5 s;③脱水、透明、中性树脂封固。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件对实验数据进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组在注射 USPIO 前后比较采用配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 16 周后两组血脂结果及实验组 USPIO 增强前后 SNR 值比较 实验组 TC(8.10 ± 0.12)及 TG(0.71 ± 0.15)指标较对照组 TC(1.91 ± 0.17)及 TG(0.25 ± 0.02)明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);实验组 SNR 值增强前后变化较大,差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组 SNR 值增强前后无明显变化,差异无统计学意义。实验组增强前后 SNR 变化情况见图 1。

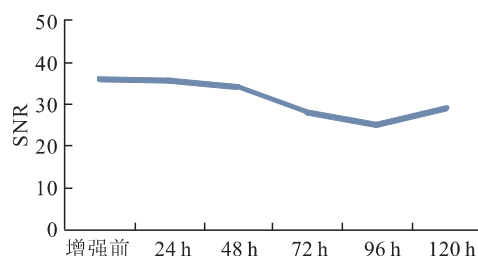


图1 实验组 USPIO 增强前后 SNR 变化情况

2.2 彩超结果 16 周时,血管彩超提示对照组管腔光滑,动脉中膜连续呈高回声影,而实验组彩超提示管腔局部狭窄,动脉中膜增厚,局部有软斑块形成(图 2)。

2.3 动物模型病理检查及 MRI 结果 实验组 20 例中,共建模成功 14 例,血管彩超显示模型组斑块大部分位于腹主动脉,对照组无明显斑块形成。通

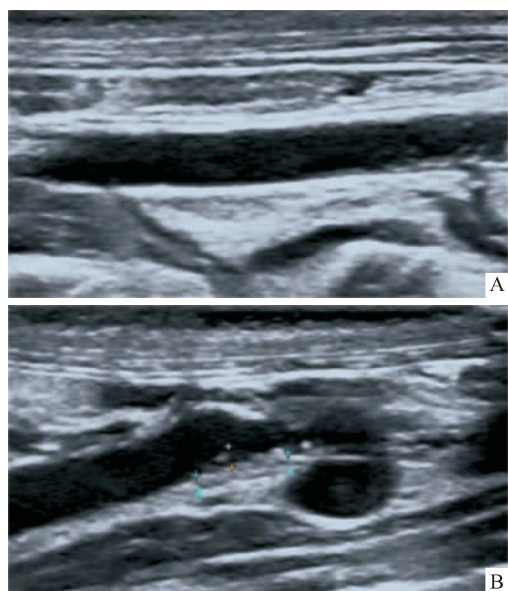


图2 实验组及对照组血管彩超表现

A: 对照组兔血管壁光滑; B: 实验组兔向管腔内突出的粥样斑块影, 管腔局部狭窄, 标记处为斑块所在

过病理标本显示对照组腹主动脉管壁光滑完整, 未见 AS 斑块形成, 镜下可见动脉内膜薄厚基本一致, 内膜下未见泡沫细胞。铁染色后显示对照组兔腹主动脉内膜下无铁颗粒存在。实验组标本上显示腹主动脉管壁较粗糙, 内膜凹凸不平, 管腔表面可见多个斑块(图3)。镜下显示动脉内膜薄厚不一, 局部增

厚明显, 铁染色后显示斑块内有数量不等的蓝紫色铁颗粒沉积。在 USPIO 增强前、后, 对照组在 2D-TOF 序列上显示腹主动脉管壁光滑完整, 未见明显管腔狭窄。实验组腹主动脉管腔粗糙, 2D-TOF 序列上可见血管腔内边缘部的充盈缺损影, PJN-2D-TOF 序列上实验组可见管壁点状充盈缺损, 对照组血管壁光滑(图4)。T2WI 上可见局部管腔不同程度偏

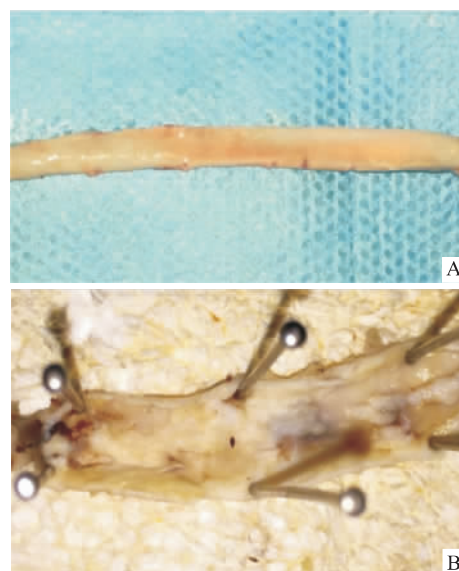


图3 实验组及对照组大体标本图

A: 对照组; B: 实验组

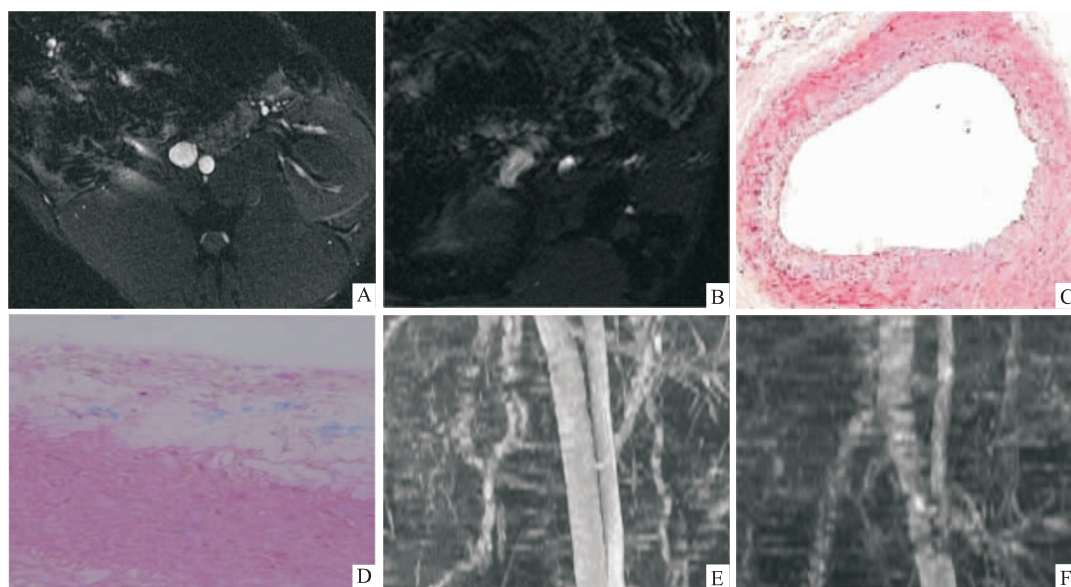


图4 实验组及对照组 MRI 序列及病理表现

A: 对照组兔 AX 2D-TOF 序列; B: 实验组兔 AX 2D-TOF 序列; C: 对照组兔病理图, 铁染色 $\times 40$; D: 实验组兔病理图, 铁染色 $\times 100$; E: 对照组 PJN 2D-TOF 序列; F: 实验组 PJN 2D-TOF 序列

心狭窄,斑块成圆形或弧形突向管腔,其内稍高信号,USPIO 增强后 72 h 显示斑块区管壁信号较前明显减低,96 h 后负性强化达峰值(图 5)。

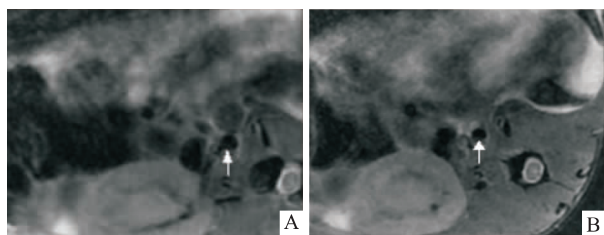


图 5 实验组 T2WI 序列上信号变化

A: 实验前可见白箭头所示向管腔内突出的纤维斑块; B: USPIO 增强 96 h 后白箭头所示斑块信号较前下降

3 讨论

现有研究^[2]显示兔 AS 斑块与人类 AS 斑块在病理特征上具有相似性,故多选用兔来建立 AS 模型,而新西兰大白兔目前应用最为广泛。而实验性兔 AS 模型建立的方法较多,最常用的为高脂饮食饲养结合球囊拉伤方法,也有单纯高脂饮食饲养法,其中通过高脂饮食所建立的 AS 斑块模型与人类血管疾病的发展特征相类似,但高脂饮食建模耗费周期一般较长,同时斑块好发部分通常位于颈动脉分叉,主动脉弓或胸主动脉等处,另外高脂饮食不同研究中的饲料配方也有不同,例如单纯高胆固醇饮食或高胆固醇添加玉米油或高胆固醇添加猪油饲料等^[2-4]。而本实验中,采用配方高脂饲料进行喂养,旨在探究单纯高脂饮食建模的可行性,并估算所需周期,指导类似研究的开展。实验中生化检验提示两组血脂存在显著差异,实验组共有 14 例兔形成斑块,后结合病理可见腹主动脉的中下段可见较多斑块,呈点状或片状分布,表明单纯高脂饮食建立腹主动脉 AS 模型是可行的,但仍有 6 例兔未能形成斑块,同时这 6 例兔中有 5 例均出现体重较前减轻,可能系每天饲料进食量不足或饲养周期不足所致建模失败,综合考虑单纯高脂饮食 16 周左右可以成功建立兔 AS 斑块模型。

AS 在其病理进展中,大量免疫细胞通过分泌促炎及抗炎等因子,影响其病理过程,而持续的炎症又可加剧斑块的不稳定性,最终导致了 AS 斑块的破裂和临床症状的发生,而巨噬细胞作为炎症因子的主要来源和主要免疫细胞,在 AS 发生及进展中有着关键的作用^[5-6]。AS 的早期病变中,由于多种细

胞和趋化因子的引导作用,单核细胞逐渐向巨噬细胞转化,同时巨噬细胞参与调节模式识别受体,从而激活相关炎症反应,促使泡沫细胞的形成与沉积,而随着 AS 病变的发展,巨噬细胞产生的炎症因子也能够刺激内皮黏附分子、蛋白酶和其他调节分子的生成,促进斑块的形成、纤维帽的稀释和坏死核心成分的稀释,从而致使血栓的形成,斑块的溶解,增加了斑块不稳定性,进一步诱导 AS 的发生发展^[7-8]。因此,通过巨噬细胞可开展 AS 斑块的早期研究。

USPIO 本身存在两个特性,第一,其在血液中保留时间长达数小时;第二,组织中的巨噬细胞能特异性吞噬 USPIO 颗粒,前者在一定时间内使血管保持较高的信号强度,后者使巨噬细胞成像成为可能^[9]。而 MRI 血管壁成像结合相关技术,可以较直观地反映 AS 斑块成分、大小等重要特征,同时在评估易损斑块的稳定性方面,有着独特的优势,多序列成像也可以帮助识别特定的斑块的形态,如纤维帽,富含脂质坏死核心,斑块出血以及血管壁炎症的迹象。而纤维组织在 TOF 序列上显示为低信号,在 T2WI 上显示为等或高信号,同时在纤维斑块脂质核心逐渐形成后,由于其主要中心成分是胆固醇及胆固醇酯,与脂类相比较,两者的 T2 值明显有所缩短,信号强度也衰减明显,故在 T2WI 序列上显示为低信号^[10-12]。在本研究中,静脉注入 USPIO 后, MRI 上 TOF 序列的图像信号在前 2 天内未见明显变化,在第 4 天 AS 管壁上信号明显降低,同时信号变化区发生在斑块形成处,AS 斑块中央高信号的脂质核心区信号变化趋势是先逐渐降低,其后又开始回升,实验显示巨噬细胞吞噬 USPIO 遵循一定时间规律,刚开始需要一个缓慢的吞噬过程,同时巨噬细胞有一定的清除功能,能逐渐将 USPIO 颗粒清除。另外通过对比病理结果显示,USPIO 颗粒主要聚集分布在巨噬细胞内,但在巨噬细胞间也有少量分布,而巨噬细胞主要位于内膜下,考虑 USPIO 颗粒摄入过程中是首先通过内膜,后大部分又被内膜下巨噬细胞所吞噬,主要沉积在内膜下。综上,通过 USPIO 增强 MRI 能反映出巨噬细胞的聚集情况,可用于斑块的检测。

在本实验过程中,本研究也存在一些问题:①由于实验操作技术的影响,本实验图像分辨率及图片质量有待提高;②本实验 MRI 所得信号变化不如其他实验明显,其可能原因是单纯高脂饮食饲养周期仍不足或者造影剂剂量不足,延长饲养周期或提高每日进食量,增加造影剂剂量可能有助于实验改

进; ③ 本实验样本量较少, 总体代表性有所不足, 扩大样本量有助于实验改进; ④ 实验过程中, 只在第 16 周行血管彩超及血脂检查, 不能精确评估斑块形成最早时间, 动态观察血管彩超及血脂变化将有助于估算单纯高脂饮食所需建模周期; 总之, 进一步的改进实验, 有望更精确地评估病变内巨噬细胞的分布及聚集程度。

综上所述, 单纯高脂饮食可以建立兔 AS 斑块模型, 静脉注入 USPIO 能被兔 AS 斑块中巨噬细胞吞噬并导致斑块 MRI 信号发生明显变化, USPIO 增强 MRI 可用于 AS 诊断及斑块稳定性评估。

参考文献

- [1] Bobryshev Y V, Ivanova E A, Chistiakov D A, et al. mlALYSIS [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 9582430.
- [2] 赵 欣, 赵全明. 动脉粥样硬化动物模型研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(10): 15–8.
- [3] Fan J, Kitajima S, Watanabe T, et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146: 104–19.
- [4] Matsumoto S, Gotoh N, Hishinuma S, et al. The role of hypertriglyceridemia in the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction [J]. *Nutrients*, 2014, 6(3): 1236–50.
- [5] Legein B, Temmerman L, Biessen E A, et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20): 3847–69.
- [6] Tabas I, Bornfeldt K E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 653–67.
- [7] Randolph G J. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. [J]. *Circ Res*, 2014, 114(11): 1757–71.
- [8] Siasos G, Tousoulis D, Kioufis S, et al. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases [J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(10): 1132–48.
- [9] 王 芳, 陆菁菁, 金征宇. 新型磁共振对比剂 USPIO 及应用研究现状 [J]. *国际医学放射学杂志*, 2008, 31(5): 372–5.
- [10] Degan A J, Young V E, Gillard J H. Advances in noninvasive imaging for evaluating clinical risk and guiding therapy in carotid atherosclerosis [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2012, 10(1): 37–53.
- [11] Goel S, Miller A, Agarwal C, et al. Imaging modalities to identify inflammation in an atherosclerotic plaque [J]. *Radiol Res Pract*, 2015, 2015: 410967.
- [12] Gargiulo S, Gramanzini M, Mancini M. Molecular imaging of vulnerable atherosclerotic plaques in animal models [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): E1511.

Study on USPIO enhanced MRI in the detection of atherosclerotic plaques in rabbit models

Zhang Yong, Li Xiaopeng, Xu Zhichao, et al

(Dept of Geriatric Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To evaluate the value of ultrasmall superparamagnetic iron oxide(USPIO) enhanced magnetic resonance imaging(MRI) in the detection of atherosclerotic plaques in rabbits. **Methods** Thirty male New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups: experimental group ($n=20$) and control group ($n=10$). The experimental group rabbits were given high-fat diet in order to establish rabbit atherosclerosis models while the control group were given normal diet and without extra intervention. To observe the manifestation of arterial wall under MRI with and without USPIO enhancement to see if there were plaques. Then a pathological section study was made to confirm the existence of arterial plaques. To make a comparison between these two types of examinations. **Results** Rabbit atherosclerosis models were established successfully. Fourteen rabbits were proved to suffer from atherosclerosis. The central area of the plaques demonstrated a decreased signal with USPIO enhancement. T2WI and the signal-noise ratio value of the vascular wall reach its lowest point after 96 hours, significantly different compared to that before USPIO($P<0.05$), while control group negative. The plaques showed a dot-like filling defect on USPIO enhanced PJN 2D-TOF image. Pathological results showed that USPIO particles were mainly deposited under the arterial wall. **Conclusion** Atherosclerosis models can be established by simple high-fat diet on rabbits. USPIO enhanced MRI can display atherosclerotic plaques in rabbit arterial walls, which could be contribute to the diagnosis and evaluation of atherosclerosis.

Key words atherosclerosis; magnetic resonance imaging; ultrasmall superparamagnetic iron oxide; animal model