

· 实验研究 ·

# 弥散加权磁共振扫描评价川芎嗪对局灶性脑缺血损伤保护作用的实验研究

胡 胜 陈绍洋 熊利泽 魏梦绮 刘艳红 宦 怡

**摘要 目的** 用弥散加权磁共振技术评价川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用。**方法** 采用局灶性脑缺血模型,将 16 只雄性 SD 大鼠,随机分为对照组和实验组(TMP 组),每组 8 只,分别在缺血前腹腔注射生理盐水和 TMP。行弥散加权(diffusion-weighted imaging, DWI)磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)系列扫描,观察缺血后 1、2、6、12、24 h 脑梗死灶变化,以及 24 h 三苯四氯氮唑(TTC)染色的脑梗死容积。**结果** TMP 组各时间点 DWI-MRI 扫描脑梗死容积明显小于对照组( $P < 0.01$ )。与 1 h 点相比,对照组脑梗死容积在栓塞后 2、6、12、24 h 分别扩大 13.3%、29.7%、50.3%、57.3%,TMP 组扩大 9.9%、21.3%、37.1%、40.5%。缺血 24 h TTC 测算的脑梗死容积大于 DWI-MRI 测算的脑梗死容积。**结论** 缺血前注射 TMP 对大鼠局灶性脑缺血损伤具有保护作用;采用 DWI-MRI 扫描动态观察脑梗死灶的演变过程和评价脑保护措施的作用,具有重要的意义。

**关键词** 弥散加权成像;磁共振成像;川芎嗪;脑缺血

**Experimental Study of Evaluation on Neuroprotective Effect for Tetramethylpyrazine against Focal Cerebral Ischemic Injury with Diffusion-weighted Magnetic Resonance Imaging** HU Sheng, CHEN Shao-yang, XIONG Li-ze, et al *Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an (710032)*

**Objective** To evaluate the neuroprotective effect of tetramethylpyrazine (TMP) against focal cerebral ischemic injury in rats with diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DWMRI). **Methods** Rat models of focal cerebral ischemic injury were established in 16 male SD rats. They were randomly divided into the TMP group and the control group, eight in each group, and pretreated with TMP and normal saline respectively before modeling. Change of infarcted cerebral focus was observed with DWMRI at 1, 2, 6, 12 and 24 hrs after infarction, and the infarction volume (IV) at 24 hrs after modeling was estimated by triphenyltetrazolium chloride (TTC) stain. **Results** The IV in all time points observed in the TMP group with DWMRI was significantly smaller than that in the control group ( $P < 0.01$ ). Compared with that at 1 hr after infarction, in the control group at 2, 6, 12 and 24 hrs after modeling, the IV enlarged by 13.3%, 29.7%, 50.3% and 57.3% respectively, while that in the TMP group 9.9%, 21.3%, 37.1% and 40.5% respectively. The cerebral IV estimated by TTC stain 24 hrs after modeling was larger than that estimated by DWMRI. **Conclusion** TMP pretreatment before modeling was effective in protecting brain against cerebral ischemic damage in rats. DWMRI dynamic scanning observation has important significance in observing the cerebral ischemic developing process and evaluating the effectiveness of brain protective measures.

**Key words** diffusion-weighted imaging; magnetic resonance imaging; tetramethylpyrazine; cerebral ischemia

大鼠大脑中动脉阻闭(middle cerebral artery occlusion, MCAO)实验模型,是研究缺血性脑血管疾病的病理生理及治疗效果最常用的实验模型之一。采用三苯四氯氮唑(TTC)染色法计算脑梗死容积,方法简便易行,但染色时间、温度和浓度等因素,会影响该染

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 30371763)、全军医学科研“十五”基金资助(No. 01M118)  
作者单位:第四军医大学西京医院(西安 710032)  
通讯作者:陈绍洋, Tel: 029-83373989, E-mail: chensy@fmmu.edu.cn

色结果,且不能行自身对照研究。因此,采用大鼠 MCAO 实验模型研究药物对局灶性脑缺血损伤的保护作用,需选用能作自身对照,动态观察梗死容积变化的技术,才能更准确、科学地评价其疗效。弥散加权(diffusion-weighted imaging, DWI)磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)技术是一种新型的影像学技术,可动态观察梗死容积作自身对照研究,文献报告用于检测局灶性脑缺血非常灵敏<sup>[1-3]</sup>。中药川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)具有活血化痰作用,用于缺血性脑血管疾病治疗有较好疗效。为此,本实验采用大鼠 MCAO 模型,利用 DWI-MRI 技术并与 TTC 法比较,前瞻性动态观察缺血前腹腔注射 TMP 对脑缺血损伤的保护作用。

### 材料与方法

1 动物来源及分组 实验动物由第四军医大学实验动物中心提供。16 只雄性 SD 大鼠(280~320 g),随机分成两组,每组 8 只;对照组和 TMP 组,分别于缺血前 30 min 腹腔注射生理盐水 1 ml 和 TMP (TMP 注射液由四川成都制药一厂生产,批号:990202。)100 mg/kg(所需 TMP 量用生理盐水溶解至 1 ml)。

#### 2 方法

2.1 局灶性脑缺血模型制备 术前禁食 12 h,不禁水。腹腔注射药液后立即将动物用 4% 异氟醚(氧流量 2 L/min)面罩吸入诱导麻醉。2% 异氟醚(氧流量 1.5~2 L/min)面罩持续吸入维持麻醉深度,保留自主呼吸。大脑中动脉阻断(MCAO)模型采用右侧颈内动脉尼龙线栓法,参考 Tatlisumak 等<sup>[4]</sup>根据 Longa 等<sup>[5]</sup>的改良方法,手术时间 15~25 min,术毕 1 min 内动物基本清醒,恢复活动。实验期间,应用多功能生理监测仪(Spacelab 生产,美国)连续监测直肠温度,烤灯维持体温在 37.0~37.5 ℃。在制备模型前,所有动物在异氟醚麻醉下行右侧股动脉置管术,用于监测血压和抽取血样检测 pH、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub> 及血糖。

2.2 神经行为学评估 麻醉苏醒后将动物放回鼠笼,自由饮食。由一不了解分组情况的观察者评估记录栓塞后 1 h、2 h、6 h、12 h 及 24 h 各时间点神经行为学评分。评分方法参考 Longa 等<sup>[5]</sup>的 6 级评分法:0

级,无功能障碍;1 级,不能伸展左侧前肢;2 级,向左侧旋转;3 级,向左侧倾倒;4 级,无自主活动伴意识抑制;5 级,死亡。

2.3 DWI-MRI 扫描 TMP 组与对照组分别于栓塞后 1 h、2 h、6 h、12 h 及 24 h 行 MRI 扫描。MRI 使用 Philips Intera Master 1.5 T 超导磁共振系统,使用 C4 表面线圈,大鼠采用俯卧位,头部置于线圈中心。常规 MRI 成像序列包括冠状位、矢状位 T<sub>1</sub>WI 序列,冠状位 T<sub>2</sub>WI 序列。冠状位单次激发 DWI SE-EPI 序列(=0,500,1 000 s/mm<sup>2</sup>),弥散方向包括相位编码、频率编码、层面选择 3 个单方向及全方向。扫描技术参数为:层厚 1.5 mm,层间距 0.5 mm,TR=2 761 ms,TE=94 ms,矩阵 80×256,FOV=80 mm×80 mm,NSA=2,Flip=90°。利用图像处理软件分别测出不同时间点缺血损伤(即异常高信号)区的体积,其体积等于异常高信号区的面积乘以层厚(加上间距)的总和。

2.4 TTC 染色 动物在缺血再灌注 24 h MRI 扫描结束及神经行为学评分完成后,用异氟醚深麻醉后处死,迅速取出鼠脑,置入冰盐水中浸泡 10 min,随后沿 MRI 扫描方向切成连续 2 mm 厚冠状切片,迅速放入 2% TTC 恒温溶液(37 ℃)中,染色 30 min,染色的脑片用 4% 甲醛缓冲液固定 24 h 后,用数码相机(Kodak, DC240,美国)拍照,输入计算机,用图像处理软件(ADOBE, PHOTO SHOP 5.0)计算梗死面积(粉红色区为正常脑组织,白色区为梗死区),各脑片梗死面积和乘以厚度(2 mm)为总的梗死容积。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件包处理数据。梗死容积及神经行为学评分分析采用重复测量方差分析,生理参数组间差异比较采用 Student's t 检验。

### 结 果

1 两组大鼠脑缺血前生理参数比较 见表 1。在制备模型前,两组大鼠所有生理参数(如 pH、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、血压、血糖、直肠温度)无显著性差异(P>0.05)。

2 两组 DWI-MRI 扫描脑梗死容积比较 见表 2。两组大鼠 MCAO 后,脑梗死容积随时间延长逐渐扩大。TMP 组各时间点脑梗死容积明显小于对照组,

表 1 两组大鼠脑缺血前生理参数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	pH	PaO <sub>2</sub> (kPa)	PaCO <sub>2</sub> (kPa)	血糖 (mmol/L)	平均动脉压 (kPa)	直肠温度 (℃)
对照	8	7.43±0.03	44.96±2.91	5.92±0.25	6.31±0.74	15.92±1.05	37.26±0.34
TMP	8	7.42±0.04	45.75±2.86	5.00±0.56	6.94±0.40	16.66±0.60	37.30±0.41

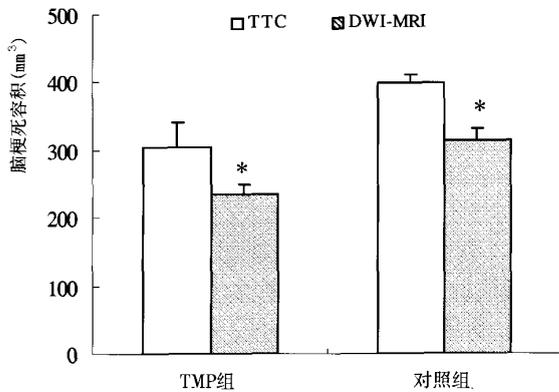
表 2 两组各时间点 DWI-MRI 扫描脑梗死容积比较 (mm<sup>3</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	梗死容积				
		缺血 1h	2h	6h	12h	24h
对照	8	193.59 ± 12.15	219.25 ± 14.27 <sup>△</sup>	251.15 ± 11.90 <sup>△▲</sup>	290.86 ± 15.24 <sup>△▲</sup>	304.43 ± 36.09 <sup>△▲◇</sup>
TMP	8	167.44 ± 9.60*	184.13 ± 9.26* <sup>△</sup>	202.98 ± 8.68* <sup>△▲</sup>	229.48 ± 6.63* <sup>△▲</sup>	235.19 ± 13.92* <sup>△▲</sup>

注:与对照组同期比较,\*P<0.01;与本组缺血 1 h 比较,<sup>△</sup>P<0.05;与本组缺血 2 h 比较,<sup>▲</sup>P<0.05;与本组缺血 6 h 比较,<sup>◇</sup>P<0.05

两组比较差异均有显著性(P<0.01)。与 MCAO 后 1 h 点相比,对照组栓塞后 2、6、12、24 h 脑梗死容积分别扩大了 13.3%、29.7%、50.3%、57.3%;TMP 组栓塞后 2、6、12、24h 脑梗死容积,分别扩大了 9.9%、21.3%、37.1%、40.5%。对照组栓塞后 24 h 脑梗死容积与 12 h 比较,差异无显著性(P>0.05);TMP 组 MCAO 后 6h、12 h 和 24 h 时间点,脑梗死容积差异无显著性(P>0.05)。

3 两组 TTC 染色与 DWI-MRI 扫描脑梗死容积比较 见图 1。两组大鼠脑缺血 24 h 采用 TTC 法染色和 DWI-MRI 扫描测算的脑梗死容积,对照组分别为(398.76 ± 12.89)mm<sup>3</sup> 和(304.43 ± 36.09)mm<sup>3</sup>,相差 17.3%~30.5%;TMP 组分别为(315.26 ± 15.95)mm<sup>3</sup> 和(235.19 ± 13.92)mm<sup>3</sup>,相差 24.8%~26.1%。两组大鼠缺血 24 h 采用 TTC 染色测算的脑梗死容积明显大于 DWI-MRI 扫描测算的容积(P<0.05)。两组大鼠处死后,大体病理检查均未见明显的出血征象;TTC 染色显示的脑梗死区域与 DWI-MRI 显示的非常相似。



注:与本组 TTC 法比较,\*P<0.05

图 1 两种方法测算大鼠 MCAO 后 24 h 脑梗死容积比较

4 两组大鼠神经行为学评分比较 见图 2。两组大鼠 MCAO 后各时间点神经行为学评分差异无显著性(P>0.05)。

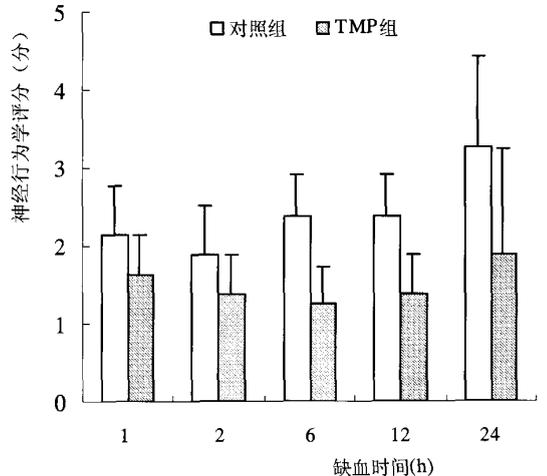


图 2 两组大鼠 MCAO 后各时间点神经行为学评分比较

### 讨 论

本研究采用大鼠 MCAO 模型,首次应用 DWI-MRI 技术,前瞻性地动态观察腹腔注射 TMP 对缺血后不同时间点脑梗死容积的影响。结果显示,缺血前 30 min 腹腔注射 TMP 100 mg/kg,缺血后各时间点脑梗死容积均明显小于对照组;MCAO 后 24 h DWI-MRI 扫描测算脑梗死容积明显小于 TTC 染色测算的梗死容积,对照组和 TMP 组脑梗死容积均随缺血时间延长而逐渐扩大,证实了“半影区”的存在,但 TMP 组缺血后 6h“半影区”已渐趋稳定,变化无统计学差异,扩大的程度小于对照组。

研究缺血性脑血管病的病理生理学及治疗学,需要建立可靠、有效及重复性好的动物模型。自 1975 年 Gill R 等<sup>(1)</sup>应用大鼠 MCAO 模型以来,人们对脑保护进行了大量的研究。本研究采用的是 Longa 等的改良 MCAO 模型制作方法。该模型的优点<sup>(6,7)</sup>在于操作简单、创伤小、毋需开颅,且不影响颅内压、脑温及血脑屏障通透性。

DWI 是一种较新的影像学技术,它基于对水分子自由移动或弥散的敏感,能快速检测水分子的质子的自我弥散运动,可在动物中风数分钟内和人类中风 2 h 内发现缺血病灶,提示 DWI-MRI 用于检测局灶性脑

缺血非常灵敏<sup>[2,3]</sup>。因此采用 DWI-MRI 技术,可早期准确测定 MCAO 所致最初缺血梗死容积,并可动态观察药物治疗后梗死容积的变化及作自身对照研究,避免因 MCAO 模型所致最初缺血梗死容积个体差异而影响评估脑保护作用的可靠性。采用 TTC 染色法计算脑梗死容积,操作简便易行,不需大型昂贵的设备,但影响该染色法的因素较多,如染色的时间、温度、浓度等,且不能行自身对照研究。神经行为学评分,方法简便,可直观评估脑保护作用的效果;但易受主观因素的干扰,科学性不强。由此可见,采用 DWI-MRI 技术,动态观察大鼠 MCAO 所致脑梗死容积变化来评价川芎嗪的脑保护作用更具有科学价值。

中药川芎嗪来源广,价格低,具有较强的活血化瘀作用。有人用紫外分光光度法观察大鼠静脉注射 TMP 30 mg/kg 后,靶器官药物浓度的变化,结果发现其主要分布在心、脑等血流丰富的器官,表明 TMP 易透过血脑屏障,对中枢神经系统有作用<sup>[8]</sup>。本实验室首次采用 DWI-MRI 动态观察缺血前预注川芎嗪对大鼠缺血后脑实质的系列变化,结果发现对照组和 TMP 组在 MCAO 1 h 脑梗死容积随缺血时间延长而逐渐扩大,但两组的扩大程度不同。TMP 组 MCAO 6 h 梗死容积已渐趋稳定,对照组 MCAO 6 h 后梗死容积仍继续明显扩大,且 TMP 组 MCAO 各时间点脑梗死容积明显小于对照组。结果提示大脑 MCAO 前 30 min 腹腔注射 TMP 100 mg/kg,对局灶性脑缺血损伤具有保护作用。本实验两组大鼠缺血后各时间点神经行为学评分差异无显著性。沈思钰等<sup>[9]</sup>认为神经行为学评分尚不能准确及时地反映脑缺血后的病理生理变化,似乎也说明神经行为学评分难以可靠的估计脑保护作用。由此可见,采用 DWI-MRI 技术,可无创动态观察脑梗死容积变化,不仅具有可比性,而且能较准确判断病情变化和疗效,符合临床研究。

该动物实验结果提示,临床上对于那些潜在有卒中诱因的高危患者,可以预防性地使用 TMP 注射液;采用 DWI-MRI 扫描动态观察脑缺血灶的演变过程,可准确、客观的评价各种脑保护措施的作用,具有重要的意义。

#### 参 考 文 献

1 Gill R, Sibson NR, Hatfield RH, et al. A comparison of the

early development of ischemic damage following permanent middle cerebral artery occlusion in rats as assessed using magnetic resonance imaging and histology. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15(1):1—11.

2 肖小华,黄如训,吕衍春,等.磁共振弥散/灌注加权成像确认局灶脑缺血半暗带的实验研究. *中国神经精神疾病杂志* 2000;26(3):148—151.

Xiao XH, Huang RX, Lu YC, et al. Experimental studies on the identification of focal brain ischemic penumbra with diffusion/perfusion weighted magnetic imaging. *Chin J Nerv Ment Dis* 2000;26(3):148—151.

3 肖学宏,孔祥泉,江利,等.急性脑缺血及再灌注磁共振扩散加权成像的特点. *中华放射学杂志* 1999;33(10):662—666.

Xiao XH, Kong XQ, Jiang L, et al. An experimental study on acute cerebral ischemia and reperfusion with magnetic resonance diffusion weighted imaging. *Chin J Radiol* 1999;33(10):662—666.

4 Tatlisumak T, Takano K, Carano RA, et al. Delayed treatment with an adenosine kinase inhibitor, GP683, attenuates infarct size in rats with temporary middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1998;29(9):1952—1958.

5 Longa ZE, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20(1):84—91.

6 Olessen SP. Leakiness of rat microvessels to fluorescent probes following craniotomy. *Acta Physiol Scand* 1987;130:63—68.

7 Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 1986;8:1—8.

8 徐睿,李源,黄熙.川芎嗪药物代谢动力学研究进展. *安徽中医学院学报* 2002;21(1):58—61.

Xu R, Li Y, Huang X. Research progress on pharmacokinetics of tetramethylpyrazine. *J Anhui TCM Coll* 2002;21(1):58—61.

9 沈思钰,蔡定芳,刘静,等.局灶性脑缺血神经行为及其相关性分析. *中国行为医学科学* 2002;11(1):44—45.

Shen SY, Cai DF, Liu J, et al. Neurological behaviour study of focal cerebral ischemia in rats. *Chin J Behav Med Sci* 2002;11(1):44—45.

(收稿:2004-09-22 修回:2004-11-08)