

脑缺血再灌注大鼠不同时刻乳酸和磷酸肌酸/肌酸的波谱变化^{*}

闻万顺^{1,2} 廖维靖^{1,4} 叶祥明² 杨万同¹ 毕博¹ 魏妮³ 张国栋¹ 江城¹

摘要

目的:研究大鼠脑缺血再灌注后不同时刻乳酸(Lac)和磷酸肌酸/肌酸(PCr/Cr)的波谱变化规律。

方法:雄性 Wistar 大鼠 32 只,体重 160—200g,随机分为正常对照组和实验组。实验组包括大脑中动脉阻塞(MCAO)模型组、假手术组、单纯梗死组,每组 8 只。采用 ¹H 质子波谱分析,各组均作磁共振波谱(MRS)的连续观测,观察 Lac 和 PCr/Cr 波峰的改变,以积分面积表示峰域并进行比较。

结果:与正常对照组和假手术组比较,MCAO 模型组缺血后出现 Lac,再灌注后短暂下降继而呈上升趋势;单纯梗死组缺血后出现 Lac,一段时间维持后再次呈上升趋势。MCAO 模型组缺血后 PCr/Cr 显著下降,再灌注后再次显著下降,低水平维持;单纯梗死组缺血后 PCr/Cr 显著下降,并在此低水平一直维持。

结论:脑缺血再灌注大鼠不同时刻 Lac 和 PCr/Cr 的波谱变化可较好地反映缺血后脑组织的能量代谢变化,有无再灌注均不能改变能量缺失变化。

关键词 脑缺血再灌注;乳酸;磷酸肌酸/肌酸;磁共振波谱

中图分类号:R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-02-0119-04

The variation of magnetic resonance spectrum of lactate and phosphocreatine/creatine after cerebral ischemia/reperfusion in rats at different times/WEN Wanshun, LIAO Weijing, YE Xiangming, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(2): 119—122

Abstract

Objective: To study the regulation of magnetic resonance spectrum (MRS) of lactate (Lac) and phosphocreatine/creatine(PCr/Cr) after cerebral ischemia/reperfusion in rats at different times.

Method: Thirty-two male Wistar rats, weighting 160—200g, were randomly divided into normal control group and operation group, operation group included middle cerebral artery obstruction (MCAO) group, sham-operation group, and simple-infarction group, 8 rats in each every group. Proton magnetic resonance spectroscopy was used to analysis areas under the waves of Lac and PCr/Cr and compared the data of integral areas under the waves. All the groups were under continuous observation of MRS.

Result: Compared with normal control group and sham-operation group, in MCAO group the wave of Lac appeared after ischemia, descended temporarily after reperfusion and then kept the trend of rising; in simple-infarction group the wave of Lac appeared after ischemia, maintain the level at sometime and then changed the trend of rising. In MCAO group the wave of PCr/Cr descended significantly after ischemia, then descended significantly again after reperfusion, maintain the low level. In simple-infarction group the wave of PCr/Cr descended significantly after ischemia, and maintain the low level all the time.

Conclusion: The variation of MRS of Lac and PCr/Cr after cerebral ischemia/reperfusion in rats can reflect the energy metabolism in brain tissue well. Whether reperfusion or not can not change the deficiency of energy.

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370357); 1 武汉大学中南医院康复医学科,武汉大学脑血管病研究中心,湖北武汉,430071;

2 浙江省人民医院康复医学科; 3 中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室; 4 通讯作者

作者简介:闻万顺,男,住院医师; 收稿日期:2009-04-29

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 430071

Key words cerebral ischemia/reperfusion; lactate; phosphocreatine/creatine; magnetic resonance spectrum

脑血管意外后的功能恢复是神经科学研究的热点之一。缺血及缺血再灌注后的大脑物质有无变化及变化规律,资料明显欠缺。本研究借助大鼠脑缺血再灌注模型检测不同缺血时段大鼠脑内代谢物质的变化,从另一侧面反映损伤后功能恢复的物质基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠(清洁级)32 只(湖北省实验动物研究中心提供,合格证号:0038994),体重 $180 \pm 18.6\text{g}$,鼠龄 3 个月。

1.2 分组与时段选择

按随机数字法,将 32 只大鼠分为对照组和实验组,其中实验组包括假手术组、MCAO 模型组、单纯梗死组,每组均为 8 只。MCAO 模型组按照缺血前 30min,缺血后 15min、30min、1h、2h,再灌注 30min、1h、2h、3h、4h、5h、6h 连续检测;单纯梗死组和假手术组按术前 30min,术后 15min、30min、1h、2h、2.5h、3h、4h、5h、6h、7h、8h 连续检测;正常对照组按麻醉前 30min,麻醉后 15min、30min、1h、2h、2.5h、3h、4h、5h、6h、7h、8h 连续检测。

1.3 造模方法

MCAO 模型组参照廖维靖等的造模方法^[1],适当加以调整。正常对照组除麻醉外不采取另外措施;假手术组,按 MCAO 方法,仅将线栓送入颈内动脉即可,不推至 MCA 起始部,进线深度约为 1.2cm;单纯梗死组,按 MCAO 方法,缺血 2h 后,不必拔出线栓,从而造成永久性脑缺血梗死。

1.4 磁共振检测

检测均在配备直径为 20cm 梯度线圈的 Biospec 4.7T/30cm 动物成像仪(Bruker, 德国)上完成。实验用直径为 12cm 的 Helmholtz 体线圈激发,直径为 2.5cm 的表面线圈接受,激发线圈与接受线圈采用翻转恢复序列。多片 T2 加权成像参数为:视野 FOV (field of view) $3\text{cm} \times 3\text{cm}$, 矩阵 128×128 , 片厚 0.8mm, 重复时间 TR 2500ms, 回波时间 TE 75ms, 激发角度 90° 。

磁共振 T2WI(T2 weighted imaging)检测,质子

共振频率为 200MHz, 最大梯度强度为 100 mT/m。成像方法采用多片多回波自旋回波脉冲序列(30、60、90、120、150、180、210、240ms),1 次完成 8 片成像,视场范围 FOV 为 $4\text{cm} \times 4\text{cm}$, 成像时间 40min, 片厚 1.5mm, 2 片图像之间的中心距离为 1.8mm, TR=250ms, TE=30ms。图像数据矩阵为 256×256 , 应用 Xwin-NMR1.0 版处理软件处理。

扫描前自动匀场,化学位移抑制压水峰,受激回波采样定域技术 (stimulated echo acquisition mode, STEAM)选体素,在 T2 加权像上,对大脑高信号强度区(即梗死最明显区域),选取 $2.5\text{mm} \times 2.5\text{mm} \times 2.5\text{mm}$ 大小的正方体进行 ^1H -MRS 的检测,测试时间 15min, 重复时间 1500ms。将 NAA 峰定标在 2.02ppm^[2],计算出各峰的积分面积,以 NAA 峰作为标准,进行相位、基线校正,最后对取得的波谱数据进行分析,主要观察乳酸(lactate, Lac)和磷酸肌酸(phosphocreatine/creatine, PCr/Cr)波峰域(波峰包括的总面积)的改变,以积分面积表示峰域并进行比较。

1.5 统计学分析

应用电脑 Xwin-NMR1.0 版处理软件自动完成信号平均、基线校正、相位循环、代谢识别和各代谢物的谱线下面积计算,用 SPSS12.0 统计软件包对数据进行统计学分析。所得数据以均数 $\pm$ 标准差表示,两两比较并进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

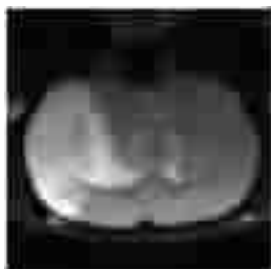
2.1 核磁共振 T2WI 检测

分别检测实验大鼠,确保正常对照组和假手术组未发生脑梗死,MCAO 模型组和单纯梗死组发生了脑梗死。脑梗死后的 T2WI 检测(图 1),图中高亮信号区为水肿区域,即梗死损伤区,其 T2 弛豫时间较正常组织 T2 弛豫时间明显增长。

2.2 ^1H -MRS 检测结果

2.2.1 各组大鼠不同缺血时段脑组织 Lac 和 PCr/Cr 的波峰面积积分:正常对照组大鼠(表 1)和假手术组大鼠(表 2)手术前后不同时段脑组织乳酸和磷酸肌酸/肌酸的波峰面积积分,各代谢物质在不同时段

图 1 脑梗死后的 T2WI 检测



变化无显著性差异 ($P>0.05$)。MCAO 模型组大鼠不同缺血时段脑内 Lac 和 PCr/Cr 的变化(表 3),脑缺血 15min Lac 峰与缺血前相比显著增高 ($P<0.05$),

Lac 峰于再灌注后 30min 与再灌注前相比短暂下降 ($P<0.05$),3h 时与再灌注 2h 时相比显著增高 ($P<0.05$);PCr/Cr 峰缺血 1h 与缺血 30min 相比显著降低 ($P<0.05$),再灌注 30min 与再灌注前相比显著降低 ($P<0.05$),并在该较低水平维持稳定。

单纯梗死组大鼠不同缺血时段脑内 Lac 和 PCr/Cr 的变化(表 4)。脑缺血 15min Lac 峰与缺血前相比显著增高 ($P<0.05$),在缺血 1h 至 6h 保持相对稳定,缺血 6h 时与缺血 5h 时相比再次显著增高 ($P<0.05$);PCr/Cr 峰缺血 1h 与缺血 30min 相比显著降低 ($P<0.05$),在缺血 1h 后一直保持相对稳定 ($P<0.05$)。

表 1 正常对照组不同缺血时段脑组织乳酸和磷酸肌酸/肌酸峰面积比 ($\bar{x}\pm s$)

	Lac	PCr/Cr
麻醉前 30min	0	1.422±0.055
麻醉后 15min	0	1.396±0.036
30min	0	1.385±0.045
1h	0	1.412±0.026
2h	0	1.418±0.029
2.5h	0	1.428±0.053
3h	0	1.425±0.062
4h	0	1.505±0.079
5h	0	1.529±0.065
6h	0	1.468±0.058
7h	0	1.453±0.047
8h	0	1.455±0.039

表 3 MCAO 模型组不同缺血时段脑组织乳酸和磷酸肌酸/肌酸峰面积比 ($\bar{x}\pm s$)

	Lac	PCr/Cr
梗死前 30min	0	0.200±0.030 ^①
梗死后 15min	0.252±0.032	0.372±0.055
30min	0.386±0.026	0.300±0.033 ^①
1h	0.316±0.042	0.356±0.066
2h	0.622±0.056 ^①	0.637±0.070
再灌注 30min	0.645±0.065	0.648±0.042
1h	1.422±0.055	1.376±0.036
2h	1.355±0.045	1.172±0.026 ^①
3h	1.218±0.083	1.025±0.073 ^①
4h	1.050±0.089	1.029±0.065
5h	1.048±0.058	1.052±0.045
6h	1.068±0.068	1.056±0.042

①与上一时刻相比 $P<0.05$

3 讨论

脑缺血是指脑血流量减少而引起的脑细胞功能和形态改变。脑缺血再灌注损伤过程不仅包含炎症机制,还有氧自由基损伤、兴奋性氨基酸损伤、钙超载、细胞凋亡等一系列复杂的病理生理变化^[3]。脑血

表 2 假手术组不同缺血时段脑组织乳酸和磷酸肌酸/肌酸峰面积比 ($\bar{x}\pm s$)

	Lac	PCr/Cr
术前 30min	0	1.422±0.055
术后 15min	0	1.376±0.036
30min	0	1.355±0.045
1h	0	1.372±0.026
2h	0	1.428±0.083
2.5h	0	1.461±0.064
3h	0	1.525±0.057
4h	0	1.450±0.089
5h	0	1.529±0.065
6h	0	1.548±0.058
7h	0	1.496±0.078
8h	0	1.473±0.049

表 4 单纯梗死组不同缺血时段脑组织乳酸和磷酸肌酸/肌酸峰面积比 ($\bar{x}\pm s$)

	Lac	PCr/Cr
梗死前 30min	0	0.202±0.030 ^①
梗死后 15min	0.242±0.032	0.371±0.025
30min	0.372±0.033	0.398±0.040
1h	0.426±0.025	0.486±0.027
2h	0.492±0.032	0.728±0.036 ^①
2.5h	0.836±0.028	0.945±0.032
3h	1.420±0.020	1.371±0.025
4h	1.352±0.022	1.171±0.011 ^①
5h	1.168±0.012	1.156±0.023
6h	1.220±0.019	1.218±0.022
7h	1.203±0.018	1.196±0.017
8h	1.186±0.023	1.180±0.021

①与上一时刻相比 $P<0.05$

流量(cerebral blood flow, CBF)下降、脑缺血均可导致细胞缺氧,线粒体氧化代谢过程发生障碍,ATP 产生减少或停止,细胞一方面通过无氧酵解产生部分 ATP 来补偿缺失的能量;另一方面作为能量储存形式的 PCr 释放 ATP,产生 Cr,结果使乳酸堆积^[4]。

Lac 反映了糖酵解的过程,它在正常脑组织的浓度低,不足以产生可测量信号^[5],缺血缺氧时,有氧呼吸受到抑制,能量代谢紊乱,无氧酵解加重,Lac 上升。缺血 15min Lac 即发生了显著上升,随缺血时间的延长,Lac 呈缓慢上升趋势,再灌注 30 min 时发生了显著下降,表明再灌注后无氧代谢暂时缓解,Lac 浓度下降;而再灌注 3h 时 Lac 却发生了显著上升,且上升后的峰值较再灌注前更高,可能为再灌注供氧缓解部分无氧代谢,但无氧代谢仍在继续^[6-7],亦可能为梗死区血管挛缩,再灌注血流未能缓解梗死区无氧代谢的局面,或可能为再灌注多发级联损伤影响糖代谢变化,笔者更倾向于三者综合作用的结果。实验较为遗憾的是未能继续检测 Lac 随时间变化规律:峰值达到的高度、何时达到最大高度、下降变化规律以及何时完全消失等。单纯梗死组缺血 15min Lac 即发生了显著上升,而 1h 至 6h 维持该较高水平,6h 后再次显著上升更加印证了缺血后无氧代谢的持续存在。缺血 6h 内尚有一定地代偿过程,失代偿后即 6h 时再次显著上升。

PCr/Cr 是能量代谢分子,其值的大小可反映脑内能量代谢变化^[8]。CBF 下降,ATP 产生减少或停止,PCr 释放 ATP,产生 Cr,结果使 Lac 和磷酸盐堆积,细胞 pH 值下降。数小时后组织细胞出现缺血坏死伴广泛水肿,神经细胞受损,出现脱髓鞘改变。通过 MRS 对代谢物进行波谱分析,可以了解脑缺血的程度。在缺血早期,其他能量代谢的代偿,使得 PCr/Cr 峰的下降较为缓慢,随时间延长,PCr 逐渐耗竭,导致 PCr/Cr 的下降。与本实验结果:缺血 1h 后才出现明显的下降、缺血再灌注 30min 后再次出现明显下降较为吻合。再灌注早期,局部脑组织血供恢复,使线粒体氧化代谢产生足够的 ATP,这时体内 PCr 暂不分解或少量分解为 Cr;再灌注后期,由于低灌注体内储存的 PCr 再次分解,导致 PCr/Cr 的下降。再灌注血流使供氧增加,有氧代谢加强,ATP 产生增

加,理应缓解 PCr 分解为 Cr,实验结果并非如此,再灌注 30min 后再次明显下降,说明再灌注供氧不足以代偿前期能量之缺失,与再灌注后 Lac 短暂下降后仍保持上升趋势相一致。单纯梗死组缺血 1h PCr/Cr 显著下降,之后未再显著下降,而是维持较低水平,结合 MCAO 模型组说明缺血后 PCr 分解为 Cr 持续存在,有无再灌注均不能缓解 PCr 分解为 Cr。再次印证再灌注并不能改变能量缺失变化。

综上所述,缺血后脑组织发生了明显的能量缺失,继发的其他损伤均可能与之有关,有无再灌注均不能改变短期内能量缺失之变化,相反再灌注的级联损伤反而会短暂加重损伤变化。再灌注后的长时间内的能量缺失变化,仍待进一步研究。

参考文献

- [1] 廖维靖,刘淑红,范明,等.线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良[J].中华物理医学与康复杂志,2002,24(6):345—348.
- [2] Xu S, Yang J, Shen J. Measuring N-acetylaspartate synthesis in vivo using proton magnetic resonance spectroscopy [J]. Neurosci Methods, 2008,172(1):8—12.
- [3] 彭昕,董志.脑缺血再灌注损伤的炎症反应机理研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2006,11:365—368.
- [4] 吴晓琰,程梅芬.脑梗死的磁共振波谱分析[J].中国现代医学杂志,2002,12(15):43—45.
- [5] 靳令经,杨振燕.急性缺血性脑卒中磁共振成像新技术进展[J].同济大学学报,2002,23(5):445—447.
- [6] Kamada K, Houkin K, Iwasaki Y, et al. Metabolic and neurological patterns in chronic cerebral infarction: a single-voxel 1H-MR spectroscopy study [J]. Neuro-radiology, 1997, 39(8):560—565.
- [7] Blumberg RM, Cady EB, Wigglesworth JS, et al. Relation between delayed impairment of cerebral energy metabolism and infarction following transient focal hypoxia-ischemia in the developing brain[J]. Exp Brain Res, 1997;113(1):130—137.
- [8] Ross B, Michaelis T. Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy [J]. Magn Reson Q, 1994, 10(4):191—247.