

光学成像观测大鼠局灶性脑缺血的动态过程^{*}

冯哲¹⁾ 陈尚宾²⁾ 李鹏程^{1,2)} 曾绍群^{1,2)} 骆清铭^{1,2)**}

¹⁾华中科技大学, 生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074;

²⁾华中科技大学, 湖北省生物信息与分子成像重点实验室, 武汉 430074)

摘要 采用 550 nm 内源信号光学成像 (optical intrinsic signal imaging, OISI) 监测左侧大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 局灶性脑缺血大鼠顶叶皮层. MCAO 后 4 h 内, 观测到一系列自发扩散性抑制 (spreading depression, SD) 波 (10.3±4.6) 次. 前 2 h 内的 SD 波通常会侵袭整个左侧顶叶皮层, 但光信号有明显的区域差异. 后 2 h 内的 SD 波局限于顶叶皮层中央区域, 且传播面积逐次减少; 旁侧区域光强基线逐步升高, 4 h 时, 反射光强升高 (8.4±1.2)%. 随后 TTC 染色证明上述旁侧区域已经梗死. 实验表明光学成像为确定缺血半暗带并监测其动态发展提供了一种有效方法.

关键词 大脑中动脉栓塞, 局灶性脑缺血, 内源信号光学成像, 扩散性抑制

学科分类号 Q63

局灶性脑缺血是常见的脑血管疾病之一, 致残率和致死率高, 研究其病理机制和防治措施具有重大意义. 局部脑组织缺血后, 病灶区由严重缺血的中心区 (梗死区) 和周围处于低灌注状态的半暗带组成. 半暗带的血流供应受到限制, 其内的神经元虽结构完整, 但不足以维持正常神经功能. 由于氧和葡萄糖供应不足, ATP 生成不足, 导致主动转运失常. 细胞外空间出现高 K⁺和谷氨酸等兴奋性递质, 造成兴奋毒性, 自发产生扩散性抑制 (SD) 波, 还有一系列炎症反应和细胞凋亡相继发生^[1]. 局灶性缺血性损伤是一个动态过程, 随着缺血时间的推移, 中心区与半暗带处于动态变化中, 在有利条件下, 如在一定时限 (再灌注时间窗) 内迅速恢复供血, 神经元可恢复功能, 而在不利情况下会转化为不可逆性梗死区, 并从中心区向邻近组织扩散. 因此, 对于局灶性缺血的治疗, 首要任务就是抢救半暗带, 避免其进一步梗死^[1].

不少技术被引入到局灶性缺血的研究中. Nedergaard 和 Astrup^[2]首次在大脑中动脉栓塞 (MCAO) 旁梗塞区采用电极记录技术记录到短暂而反复的去极化波. Koroleva 和 Bures^[3]采用扩散性抑制 (SD) 波监测 MCAO 及再灌注后的半暗带变化. 但电记录技术的空间分辨率不高, 且电极的插入本身可能诱发 SD 波, 加重脑缺血损伤. 还有核磁共振成像 (MRI)、正电子发射层析 (PET) 成像技术, 可以检测缺血造成脑组织的血流动力学变化、水肿, 从而确定缺血半暗带和梗死区域^[4], 但时间和空间

分辨率仍不够高. 光学技术作为一种非侵入性技术, 有较高的时间分辨率, 如激光多普勒流速仪^[5]和近红外光谱术^[6], 特别是激光散斑成像^[7]和内源信号光学成像 (OISI) 还具有高的空间分辨率, 能为局灶性缺血研究提供血流、血容和血氧信息. 其中, OISI 已广泛用于研究 K⁺和针刺诱发 SD^[8~12], 但将其用于研究局灶性脑缺血的自发 SD 尚未见报道. 本文拟利用 OISI 监测缺血过程中的自发 SD 波, 以光信号特征来反映缺血半暗带并监测其动态发展.

1 材料与方法

1.1 动物准备

成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (11 只, 体重 250~350 g), 由湖北省疾病预防控制中心提供. 2% 水合氯醛和 10% 氨基甲酸乙酯混合腹腔注射麻醉 (0.9 ml/kg), 固定于脑立体定位仪上. 暴露左侧顶骨并实施牙科钻打磨, 不时用冰冻生理盐水冷却钻头, 直至骨片透明、皮层上血管清晰可见. 从定位仪上取下大鼠, 将其仰卧固定于手术台上, 颈部正中切开, 分离皮肤与筋膜, 暴露左侧颈总动脉, 钝性分离颈内和颈外动脉, 结扎颈外动脉的分支, 并在结扎线远侧剪断颈外动脉, 将颈外动脉拉向下

^{*}国家自然科学基金资助项目 (60278017, 60478016), 教育部科学技术研究重大资助项目 (重大 10420).

^{**} 通讯联系人.

Tel: 027-87792033, Fax: 027-87792034

E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2005-04-08, 接受日期: 2005-06-28

方,使其与颈内动脉成直线,在颈外动脉切口处插入头端烫为圆钝的5号高碳索尼龙线(直径0.2 mm,经肝素浸泡处理),至稍遇阻力时中止插线.插线深度从颈总动脉分叉处计为18~20 mm左右,线头前端到达大脑前中动脉以阻断大脑中动脉血流.将尼龙线与颈外动脉近心端结扎,缝合手术切口,将大鼠重新固定于定位仪上.反馈式控温加热板置于动物腹下,实验中维持肛温在37.5℃.

1.2 光学成像

实验动物准备完毕,置于成像台上.为记录内源光学信号,利用卤素灯加滤光片选取波长550 nm ($\Delta\lambda=20$ nm)对观测区域加以照明,导光束从两侧呈一定倾斜角度(约45°)照射,反射光由连接在体视显微镜(Olympus SZ60, Japan)上的12 bit 快速 CCD 相机(Pixel Fly VGA, PCO, Germany)获取.在动物MCAO后,约15 min开启光学成像.该CCD相机分辨率为640(H)×480(V)像素,曝光时间25 ms,采用256帧在线平均作为一帧结果图像保存.连续记录1 000帧图像,每帧图像6.4 s,共计6 400 s;将获取图像数据保存到计算机硬盘,5 min内再次启动光学成像,同上参数获取并保存1 000帧图像.

1.3 TTC 染色

成像完毕后,将大鼠断头取脑,除去硬脑膜,用人工脑脊液洗净表面血渍.将所取鼠脑转移到2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)溶液中,水浴加热37℃,保持30 min,取出后用数码相机拍摄其俯视图片.

1.4 数据分析

在Matlab计算平台下对实验中采集的图像序列进行分析处理.所用算法主要为感兴趣区域(region of interest, ROI)的光强信号分析,可参考文献[11,12];所有结果统计数据为均值±方差($\bar{x}\pm s$).

2 结 果

大脑中动脉栓塞后约4 h内,连续2次进行光学成像(实际成像时间为 $2\times 6\,400$ s),第一次成像称为前2 h,后一次成像称为后2 h.光学成像区域大小统一为6 mm×8 mm,基本覆盖顶叶皮层,如图1a所示.在一次典型实验中,观测到5次自发SD波.为分析自发SD波的时间特征,在图像中选取8个感兴趣区域(ROI),ROI1~4分布在顶叶皮层中央区域(前囟侧向1.5 mm),而ROI5~8分布在旁侧区域(前囟侧向5 mm),尽量避开大血管,图1b为MCAO前2 h内一次SD波光强变化结果.顶叶皮层中央和旁侧区域内的光强信号有显著性差异.中央区域光强变化规律为:光强轻微下降,幅度为 $(-1.1\pm 0.8)\%$,持续时间 (19.2 ± 5.2) s,短暂小幅度光强上升 $(3.5\pm 1.7)\%$,持续时间 (14.4 ± 3.2) s,大幅度的光强下降 $(-12.0\pm 2.3)\%$,持续时间 (67.2 ± 14.8) s,较长时间(约5~7 min)的光强回复.而在旁侧区域:光强上升 $(5.2\pm 1.3)\%$,持续时间 (28.8 ± 6.4) s,光强下降 $(-3.5\pm 1.6)\%$,持续时间 (247.6 ± 39.0) s,光强回复需要较长时间(约6~7 min).而且,2个区域组内的4条光信号曲线之间表现出一

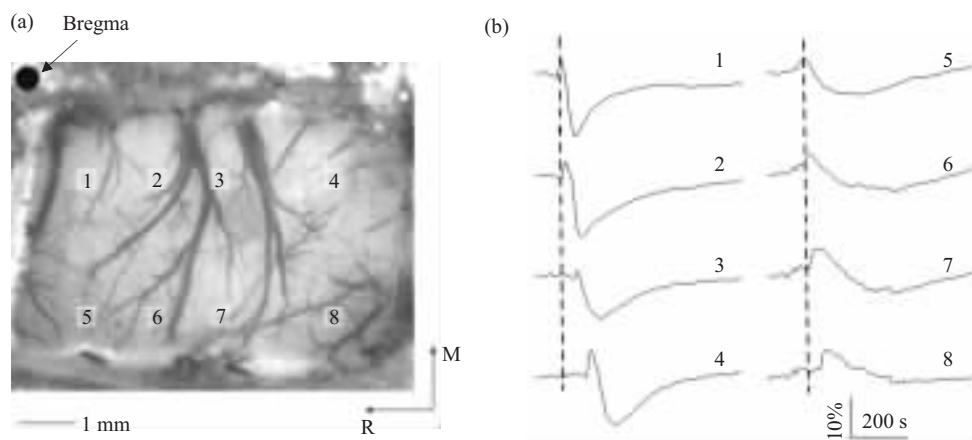


Fig.1 Temporal characteristics of optical signals from 8 ROIs during a spontaneous SD

(a) 8 ROIs were selected in a control optical imaging of the parietal cortex. Bar was 1 mm and the arrows were rostral (R) and median (M) respectively. (b) The intrinsic optical signals from 8 ROIs in Figure 1a, the time delay among ROI 1~4 and ROI 5~8 suggested SD wave's propagation, and the two groups of curves varied regionally.

定的时间延迟,提示光强变化具有传播性,且传播方向为从左向右.这对应于自发SD波以一定的速度传播,其速度为 (3.5 ± 0.5) mm/min.

在MCAO后2 h内,同样提取8个ROI的光强变化;4次自发SD波被观测到,只是SD波限制在顶叶皮层中央区域,在旁侧区域,SD波的传播消失.如图2所示,ROI 1~4的光信号有明显的光强下降,幅值约-15%,单次SD波持续约为10 min.而ROI 5~8的光信号表现出光强逐步升高,最后光强升高为 $(8.2 \pm 1.6)\%$,无明显SD波特征.而且,旁侧区域(如图3a中虚线所围部分),皮层实质明显泛白,这与图2b中的光强信号升高相一致.大脑中动脉栓塞(MCAO)前2 h内,仅记录到的1次SD波在整个观察区域内扩展,而且有

区域性差异,如图1b光强曲线变化所示.随后的2 h内,4次SD波并没有传播到顶叶皮层区域旁侧部分,但靠近中央区域SD的传播明显.故而图2中ROI 1~4光信号有SD特征:显著的光强下降,而ROI 5~8光信号仅仅是基线上升.而且,SD波传播面积的减少呈现“步进”现象,每次减少面积约占观察区域10%,最后一次SD波没有传播到的区域约占成像面积的50%.成像完毕,对大鼠断头取脑,采用TTC染色,白色梗死区域(图3b中黑色虚线所围)位于左侧脑半球腹侧、颞侧和顶叶旁侧,约占整个左侧脑半球表面积70%.其中,顶叶皮层梗死区域与图3a所示皮层泛白区域较为一致,重合率约为90%,图3b黑色虚线框为成像区域.

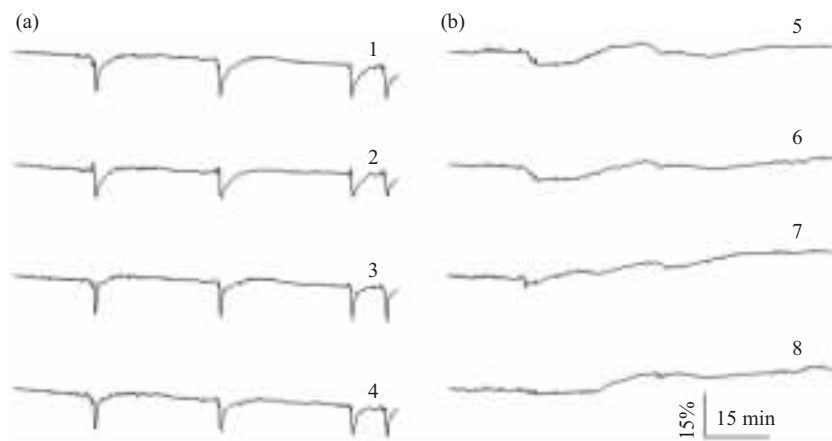


Fig.2 Time courses of optical signals during the later 2 h after MCAO

(a) Time courses of ROI 1~4 in the central parietal cortex, 4 SD waves happened. (b) Time courses of ROI 5~8 showed light intensity rose steadily, without SD properties.

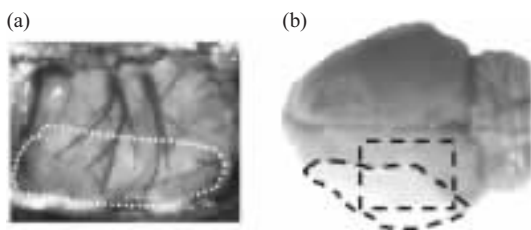


Fig.3 Localization of infarct in parietal cortex

(a) An optical image after MCAO 4 h. (b) The TTC staining showed the infarct area.

排除实验中猝死动物(3只),分析统计仅对8只实验成功动物进行.4 h内,在顶叶皮层可观测到多次SD波 (10.3 ± 4.6) 次.对SD速度的统计以近中央区域为准,为 (3.6 ± 0.4) mm/min.而且,在每一

次SD波发生时,近中央区域的光强信号有4相变化:依次为下降,幅度为 $(-0.9 \pm 0.6)\%$,持续时间 (20.4 ± 4.6) s,上升 $(3.5 \pm 1.7)\%$,持续时间 (14.4 ± 3.2) s,下降 $(-13.0 \pm 2.4)\%$,持续时间 (69.3 ± 13.5) s,上升(回复到基线,约5~6 min).与文献[12]正常诱发SD光强变化时程比较,可计算相关系数为 $r = 0.91 \pm 0.12$.同样地,MCAO前2 h旁侧区域的光强变化主要为更大的反射上升 $(5.3 \pm 0.6)\%$ 及随后更小的反射下降 $(-5.6 \pm 0.5)\%$,而且光强回复到基线水平时间约7 min,与正常诱发SD的相关系数为 $r = 0.23 \pm 0.15$.MCAO后2 h内,旁侧区域光强逐步上升,在成像结束时,光强升高为 $(8.4 \pm 1.2)\%$.重要的现象是,MCAO前2 h内的SD波一般能在整个观测区域传播,在MCAO后2 h内,随着自发

SD波数目增加,其传播面积逐渐减少,每次SD波面积减少(12.7 ± 8.2)%,一般在5次SD波之后,SD波将较为稳定地局限在顶叶皮层中央区域约(45.7 ± 6.4)%范围内.TTC染色结果显示,MCAO造成的皮层梗死面积占左半球面积的(70.3 ± 15.7)%,其中位于成像区域的梗死面积为(55.3 ± 6.3)%,与每只实验动物SD波最后不再传播的旁侧区域有约(85.6 ± 10.4)%的重合.

3 讨 论

本实验采用内源信号光学成像方法,首次在大鼠顶叶皮层区域记录到MCAO后多次自发SD波的光信号.这与电生理和MRI等技术,在局灶性缺血中心区周围,观测到反复的SD波发生一致^[3,4].由于550 nm为氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白的等值吸收点,故而光信号主要对被测区域血容敏感.在正常动物SD实验中^[12],550 nm内源光学信号通常呈现4相变化:降低,幅度(-2.1 ± 1.2)%,持续时间(16.2 ± 3.8)s,升高(2.9 ± 1.6)%,持续时间(13.8 ± 2.2)s,再降低(-14.2 ± 4.5)%,持续时间(40.6 ± 8.4)s和再升高持续时程(146.2 ± 40.3)s,其中第3相光强大幅下降被确认是由于血流灌注显著增加所致^[9~12].在中央区域的光信号,与正常SD信号在时程、幅度与传播速度无显著性差异.这表明脑缺血自发SD与正常诱发SD可能在产生和传播机制上有紧密联系.

在MCAO后1~2 h内,自发SD波会在整个顶叶皮层扩散,但是光信号表现出了明显的区域差异.旁侧区域(5~8 ROIs)SD波信号虽然也表现出一定的传播特征,但是,其变化幅度和时程与正常SD波相差较大.顶叶皮层中央区域光强信号短时间内大幅度下降,提示皮层发生了快速充血过程.而旁侧区域,由于MCAO,又得不到较好的侧枝循环供应,故而没有出现较大的血流增加.Bures等采用DC电位记录到局灶性缺血去极化(focal ischemic depolarization, FID)持续时间和诱发SD波幅值的空间差异,并以这一特点对半暗带损伤进行监测^[9].我们的结果与之相吻合,光信号的区域差异同样可应用到脑缺血的早期诊断中确定半暗带区域,而且光学成像除了更高的空间分辨率,还是一种非侵入性方法.自发SD发生时,那些光信号无明显下降区域(阈值取-10%)被认为是半暗带.本实验中顶叶皮层的缺血半暗带位于旁侧区域.随着时间推移,MCAO后3~4 h内,自发SD波仅发

生在顶叶皮层中央区域,靠旁侧区域已经对SD无响应,伴随SD波的发生,SD波传播面积越来越小,表明这一区域皮层正在逐步梗死.随后的TTC染色结果表明主要是MCA周围的脑皮层区域出现梗死,证实了在4 h后,缺血半暗带会转化成缺血梗死区.这一结果支持脑缺血自发SD波加剧缺血伤害的观点^[13].所以,为了挽救半暗带,有必要阻断SD波进行脑保护,而且有效的治疗时间窗应该在4 h以内.

脑缺血自发SD波直接与神经元和胶质细胞的去极化相关,而这些去极化被认为是由梗死核缺氧释放的钾离子和兴奋性氨基酸(如谷氨酸)所触发^[1].对于自发SD诱发的脑损伤,不少作者支持能量代谢受损这一观点,也有不少工作证实在MCAO后,自发SD后半暗带内的代谢恢复受到破坏^[14],特别是血流供应大幅度下降^[5~8].事实上,在半暗带内,自发SD波会造成微循环的改变^[15],而且,供血的多少又会影响到去极化SD波DC电位幅值的变化^[16].本实验结果也表明,在顶叶皮层中央区域供血较为充足,自发的SD波后,能量代谢可以得到恢复,故而在4 h内都没有明显的功能和器质损伤.而旁侧区域恰好是供血不足的半暗带,在能量缺失的情况下,神经细胞很快梗死.

相反地,在正常动物上,SD预处理可以减小缺血损伤,有观点认为是SD预处理导致皮层代谢率下降,故而更能适应缺血后的能量危机^[9].另一方面,有观点认为是通过脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)机制实现^[17].这些都还有待进一步确证.不管怎样,如何有效地监测SD波的时空动力学特征,既是有效辨识半暗带,也是研究SD波在脑缺血中双相机制的关键.正是这样,OISI将在脑缺血自发SD波的研究中继续发挥作用.

4 结 论

本实验首次观测到大鼠局灶性脑缺血后顶叶皮层自发产生多次SD波的内源光信号.SD波光信号的区域特征可用于判别缺血半暗带,半暗带随着SD波逐渐转变成梗死区域;而且半暗带和梗死区域一致定位于旁侧区域.光学成像为监测局灶性脑缺血提供了一种非侵入性、高空间分辨率的有效方法.

参 考 文 献

- 1 Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci, 1999, 22 (9): 391~397

- 2 Nedergaard M, Astrup J. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [^{14}C] 2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1986, **6** (5): 607~615
- 3 Koroleva V I, Bures J. The use of spreading depression waves for acute and long-term monitoring of the penumbra zone of focal ischemic damage in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (8): 3710~3714
- 4 Takano K, Latour L L, Formato J E, *et al.* The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping. *Ann Neurol*, 1996, **39** (3): 308~318
- 5 Otori T, Greenberg J H, Welsh F A. Cortical spreading depression causes a long-lasting decrease in cerebral blood flow and induces tolerance to permanent focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, **23** (1): 43~50
- 6 Culver J P, Durduran T, Furuya D, *et al.* Diffuse optical tomography of cerebral blood flow, oxygenation, and metabolism in rat during focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, **23** (8): 911~924
- 7 Ayata C, Dunn A K, Gursay-Özdemir Y. Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, **24** (7): 744~755
- 8 Yoon R S, Tsang P W, Lenz F A, *et al.* Characterization of cortical spreading depression by imaging of intrinsic optical signals. *Neuroreport*, 1996, **7** (15~17): 2671~2674
- 9 O'Farrell A M, Rex D E, Muthialu A, *et al.* Characterization of optical intrinsic signals and blood volume during cortical spreading depression. *Neuroreport*, 2000, **11**(10): 2121~2125
- 10 Ba A M, Guioi M, Pouratian N, *et al.* Multiwavelength optical intrinsic signal imaging of cortical spreading depression. *J Neurophysiol*, 2002, **88** (5): 2726~2735
- 11 李鹏程, 陈尚宾, 骆卫华, 等. 大鼠皮层扩散性抑制过程中在体内源光信号与脑血管形态变化的相关性. *自然科学进展*, 2003, **13** (12): 45~49
- Li P C, Chen S B, Luo W H, *et al.* *Prog Nat Sci*, 2003, **13** (12): 45~49
- 12 李鹏程, 陈尚宾, 骆卫华, 等. 大鼠皮层扩散性抑制过程的在体内源光信号成像. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (4): 605~611
- Li P C, Chen S B, Luo W H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (4): 605~611
- 13 Mies G, Iijima T, Hossmann K A. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport*, 1993, **4** (6): 709~711
- 14 Selman W R, Lust W D, Pundik S, *et al.* Compromised metabolic recovery following spontaneous spreading depression in the penumbra. *Brain Res*, 2004, **999** (2): 167~174
- 15 Elisabeth P, Nallet H, MacKenzie E T, *et al.* Penumbral microcirculatory changes associated with peri-infarct depolarizations in the rat. *Stroke*, 2002, **33** (2): 606~612
- 16 Nallet H, MacKenzie E T, Roussel S. Haemodynamic correlates of penumbral depolarization following focal cerebral ischaemia. *Brain Research*, 2000, **879** (1-2): 122~129
- 17 Yanamoto H, Xue J H, Miyamoto S, *et al.* Spreading depression induces long-lasting brain protection against infarcted lesion development via BDNF gene-dependent mechanism. *Brain Res*, 2004, **1019** (1-2): 178~188

Dynamic Evolution of Focal Cerebral Ischemia in Rats Observed by Optical Imaging*

FENG Zhe¹⁾, CHEN Shang-Bin²⁾, LI Peng-Cheng^{1,2)}, ZENG Shao-Qun^{1,2)}, LUO Qing-Ming^{1,2)**}

¹⁾Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

²⁾Hubei Bioinformatics and Molecular Imaging Key Laboratory, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract The optical intrinsic signal imaging (OISI) at 550nm was applied to examine the parietal cortex of focal cerebral ischemia rats with the left middle cerebral artery occlusion (MCAO). A series of spontaneous spreading depression (SD) waves (10.3 ± 4.6 times) were observed during the next 4 h after MCAO. In the earlier 2 h, the SD waves usually spread across the whole left parietal cortex, however, the optical signals showed significant regional differences. During the later 2 h, the waves were restricted in the medial parietal cortex, and the propagated area decreased reversely with the increasing times of SD waves. The baseline intensity in the lateral area increased steadily, up to (8.4 ± 1.2) % at the end of 4 h. By TTC staining, the lateral area proved to infract focus. The results suggested that the optical imaging supplied an effective method to identify the ischemic penumbra and monitor its dynamic evolution.

Key words middle cerebral artery occlusion, focal cerebral ischemia, optical intrinsic signal imaging, spreading depression

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (60278017, 60478016), Major Program of Science and Technology Research of Ministry of Education (10420).

**Corresponding author. Tel: 86-27-87792033, Fax: 86-27-87792034, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

Received: April 8, 2005 Accepted: June 28, 2005