

T₂* mapping MR 成像评价脊髓缺血再灌注后铁死亡的机制研究

李可心¹, 郑 阳¹, 袁正伟², 王小明¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院放射科, 辽宁 沈阳 110004;

2. 中国医科大学附属盛京医院 国家卫健委小儿先天畸形重点实验室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的:通过 7.0T T₂* mapping MR 成像技术检测脊髓缺血再灌注(Spinal cord ischemia-reperfusion, SCIR)损伤后脊髓前角铁沉积变化,并分析其与铁死亡蛋白变化的关系,以此反映 SCIR 后铁死亡的作用机制。方法:选取 48 只 Wistar 大鼠(雄性,280~300 g),随机分为假手术组(n=8)和 SCIR 实验组(n=40)。实验组按缺血再灌注后不同恢复时间分为 6 h 组(n=8),12 h 组(n=8),24 h 组(n=8),48 h 组(n=8)和 72 h 组(n=8)。建模完成后进行 7.0T MR 扫描。扫描后进行脊髓组织溶质载体家族 11 成员 2(Solute carrier family 11 member 2, SLC11A2)、铁蛋白重链 1(Ferritin heavy chain 1, FTH1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(Glutathione peroxidase 4, GPX4)的免疫组化染色。采用方差分析、Tukey 检验比较各组 T₂* 值和蛋白质表达水平的差异。结果:SCIR 后 6 h,脊髓前角 T₂* 值显著降低($P<0.001$, Tukey 检验),至 24 h 达到最低($P<0.001$, Tukey 检验),48 h 组回升($P<0.001$)。SCIR 损伤后 6 h, SLC11A2 表达具有轻度增加趋势, FTH1 表达显著降低 ($P=0.007$, Tukey 检验), SCIR 损伤后 24 h, SLC11A2、FTH1、GPX4 表达均显著降低 ($P=0.031$, $P=0.009$, $P=0.004$, Tukey 检验)。结论:SCIR 损伤后脊髓前角 T₂* 值、SLC11A2、FTH1、GPX4 均出现一过性降低过程,且 T₂* 变化与 GPX4 蛋白变化一致,提示 T₂* mapping 可通过检测脊髓铁沉积的变化进一步反映铁死亡的作用机制。

[关键词] 脊髓缺血;铁;磁共振成像

[中图分类号] R744;R445.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1008-1062(2024)01-0007-04

DOI:10.12117/jccmi.2024.01.002

The mechanism of ferroptosis after spinal cord ischemia-reperfusion evaluated by T₂* mapping MR

LI Ke-xin¹, ZHENG Yang¹, YUAN Zheng-wei², WANG Xiao-ming¹

(1. Department of Radiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Key Laboratory of Health Ministry for Congenital Malformation, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: Objective: To examine the changes of iron deposition in the spinal cord by 7.0T T₂* mapping MR imaging after spinal cord ischemia-reperfusion (SCIR) and analyze the relationship between T₂* and protein of ferroptosis, to reflect the mechanism of ferroptosis after SCIR. **Methods:** Forty-eight Wistar rats (male, 280~300 g) were selected and randomly divided into sham group(n=8) and SCIR group(n=40). The SCIR group was divided into 6 h(n=8), 12 h(n=8), 24 h(n=8), 48 h(n=8) and 72 h (n=8) subgroups. A 7.0T MR scan was performed after the modeling was completed. After scanning, immunohistochemical staining of family 11 member 2 (SLC11A2), ferritin heavy chain 1 (FTH1), glutathione peroxidase 4 (GPX4) were performed. Analysis of variance and Tukey test were used to compare the differences in T₂* values and protein expression levels in each group. **Results:** At 6 h after SCIR, the T₂* value of the anterior spinal horn decreased significantly ($P<0.001$, Tukey test), reaching the lowest at 24 h ($P<0.001$, Tukey test), and the 48 h subgroup recovered ($P<0.001$). At 6 h after the SCIR injury, SLC11A2 expression showed a slight increase trend, while FTH1 expression was significantly reduced($P=0.007$, Tukey test). At 24 h after the SCIR injury, the expression of SLC11A2, FTH1, and GPX4 were significantly decreased ($P=0.031$, $P=0.009$, $P=0.004$, Tukey test). **Conclusion:** After SCIR injury, the T₂* value, SLC11A2, FTH1, and GPX4 all show a transient decrease, and the T₂* change is consistent with the GPX4 protein change, suggesting that T₂* mapping can further reflect the mechanism of ferroptosis by detecting the changes in spinal iron deposition.

Key words: Spinal Cord Ischemia; Iron; Magnetic Resonance Imaging

脊髓损伤是一种严重致残性疾病,其病理生理过程主要分为两个阶段,即由始动因素(外伤、缺血等)引起的初始阶段以及由脊髓缺血再灌注(Spinal cord ischemia-reperfusion, SCIR)、炎症、细胞损伤等

[收稿日期] 2023-08-08

[作者简介] 李可心(1994-),女,辽宁锦州人,主治医师。E-mail:lkxcmu97@163.com

[通信作者] 王小明,中国医科大学附属盛京医院放射科,110004。E-mail:wangxm024@163.com;

袁正伟,中国医科大学附属盛京医院 国家卫健委小儿先天畸形重点实验室,110004。E-mail:yuanzw@hotmail.com

[基金项目] 国家重点研发计划(2021YFC2701104, 2021YFC2701003);国家自然科学基金项目(No.:82171649);

中国博士后科学基金(2023M743906)。

引起的继发阶段^[1]。SCIR 能够加重血脊髓屏障损伤,引起氧化应激及炎症反应,造成神经网络结构破坏及功能障碍^[2]。

近期研究认为,自由基过度产生引起氧化应激是 SCIR 造成神经细胞损伤的关键机制^[3]。羟基自由基在 SCIR 后的氧化应激中发挥重要作用,这类自由基需要亚铁离子 Fe^{2+} 参与芬顿反应生成,通过广泛氧化蛋白质、脂质、核酸破坏细胞结构甚至引起细胞死亡^[4]。Dixon 等^[5]将这种依赖于 Fe^{2+} 及脂质过氧化并引起程序性细胞死亡的过程定义为铁死亡。铁死亡以铁代谢异常及抗氧化途径失衡为特征,铁代谢异常包括溶质载体家族 11 成员 2 (Solute carrier family 11 member 2, SLC11A2) 介导的 Fe^{2+} 转运异常、铁蛋白重链 1 (Ferritin heavy chain 1, FTH1) 介导的 Fe^{2+} 储存减少等^[6],从而引起细胞内 Fe^{2+} 积累过多,进一步通过芬顿反应生成活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 自由基;抗氧化途径失调以谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Glutathione peroxidase 4, GPX4) 活性降低、清除 ROS 能力降低为特征^[7]。上述途径协同参与诱导脂质过氧化引起细胞死亡^[4]。近年来铁死亡在缺血再灌注损伤的作用机制中受到广泛关注,针对铁死亡进行无创评估及早期干预,将有助于延缓 SCIR 的继发性损伤、改善患者预后。

针对铁离子在促铁死亡机制中发挥关键作用这一特点,应用 MRI 检测铁顺磁性变化反映组织铁沉积有望成为评估铁死亡的重要手段^[8]。 T_2^* mapping 技术能够通过量化组织 T_2^* 弛豫时间来定量检测组织铁含量^[9]。本研究旨在应用 7.0T T_2^* mapping MR 成像技术检测 SCIR 后脊髓铁沉积变化,并分析其与铁死亡蛋白变化的关系,以此反映 SCIR 后铁死亡的作用机制。

1 资料和方法

1.1 实验动物及动物模型建立

选用生后 10~12 周的健康雄性 Wistar 大鼠 48 只 (SPF 级),体质量 280~300 g。大鼠 SCIR 模型采用介入球囊导管阻断胸主动脉法:异氟烷气体麻醉大鼠,颈部备皮消毒后穿刺左侧颈总动脉,在导丝引导下将球囊导管送入胸主动脉,扩张球囊,阻断血管 13 min 后恢复血流,缝合切口。假手术组动物在球囊导管进入胸主动脉后不做特殊处理。

本研究经中国医科大学附属盛京医院医学伦理委员会批准 (编号:2023PS140KX1)。

1.2 T_2^* mapping 扫描及数据后处理

动物造模后进行 7.0T 高分辨力 MR (Nova, 美时医疗, 中国) 扫描。扫描序列包括 T_2 WI 序列、 T_2^*

mapping 序列。扫描参数: T_2 WI 序列:TR 2 500 ms, TE 44.8 ms, FOV 40 mm×40 mm, 重复次数 4; T_2^* mapping 序列:TR 800 ms, TE 4 ms, FOV 40 mm×30 mm, 重复次数 2。其余参数二序列相同:矩阵 256×192、层厚 2.0 mm、层间隔 0.2 mm、层数 12。

1.3 图像分析及评估

由两位有经验的 MR 诊断专家共同进行影像质量评价,做出影像诊断。各序列后处理使用 NOVA 操作系统自带软件进行。以脊髓轴位 T_2 WI 图像为参照,分别勾画脊髓前角区域的 ROI (直径 0.5 mm) (图 1a~1f),并将 ROI 复制到对应的 T_2^* mapping 图像,为减少测量误差,每个层面测量 3 次,取平均值作为该层面的最终测量值。

1.4 免疫组织化学染色

脊髓组织经甲醛固定后切成 3 mm 厚病理切片,切片经脱蜡、水化及抗原修复后,使用免疫组化试剂盒 (PV-9003, 中杉金桥) 进行 SLC11A2、FTH1、GPX4 的免疫组化染色。免疫组化图像使用 NIS-Elements F (版本 4.6, Nikon) 软件采集。图像采集后用 ImageJ 软件 (Java 1.6.0, 美国国立卫生研究院) 测定蛋白表达,使用光密度累积值来代表蛋白的染色强度。

1.5 统计学分析

采用单因素方差分析、Tukey 检验比较各亚组之间的差异, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。所有统计分析均采用 SPSS (版本 22.0) 和 GraphPad Prism (版本 8.0.2) 软件进行。

2 结果

2.1 T_2^* mapping 定量检测 SCIR 后脑内铁沉积变化

假手术组 T_2^* 值与 SCIR 各组相比均具有统计学差异 ($P < 0.001$, Tukey 检验)。与假手术组相比, SCIR 后 6 h T_2^* 值显著降低 ($P < 0.001$, Tukey 检验),至 24 h 达到最低 ($P < 0.001$, Tukey 检验), 48 h、72 h 组逐渐回升 ($P < 0.001$)。假手术组、SCIR 各组 T_2 WI、 T_2^* mapping 图及变化趋势见图 1。

2.2 SCIR 后脑内 SLC11A2 表达变化

SCIR 损伤后脊髓 SLC11A2 表达随时间变化趋势见图 2。SLC11A2 表达水平在 SCIR 损伤后 6 h 具有轻度增加趋势,但与假手术组相比无统计学差异 ($P = 0.996$, Tukey 检验),于 24 h 显著下降 ($P = 0.031$, Tukey 检验),至 SCIR 后 48 h 表达显著降低 ($P = 0.004$, Tukey 检验)。

2.3 SCIR 后脑内 FTH1 表达变化

SCIR 损伤后脊髓 FTH1 表达随时间变化趋势见图 3。FTH1 表达在 SCIR 损伤后 6 h、24 h 显著降

低 ($P=0.007, P=0.009$, Tukey 检验), SCIR 后 48 h 开始具有上升趋势, 但与假手术组相比并无统计学差异 ($P=0.261, P=0.872$, Tukey 检验)。

2.4 SCIR 后脑内 GPX4 表达变化

SCIR 损伤后脊髓 GPX4 表达随时间变化趋势见图 4。GPX4 表达在 SCIR 损伤后逐渐下降, 于 SCIR 后 24 h 降至最低 ($P=0.004$, Tukey 检验), 与假

手术组相比, SCIR 后 48 h GPX4 表达仍显著降低 ($P=0.033$, Tukey 检验), 于 72 h 轻度升高 ($P=0.557$, Tukey 检验)。

3 讨论

缺血再灌注是最常见的脊髓继发性损伤原因之一, SCIR 后铁过载、ROS 累积引起氧化应激损伤及

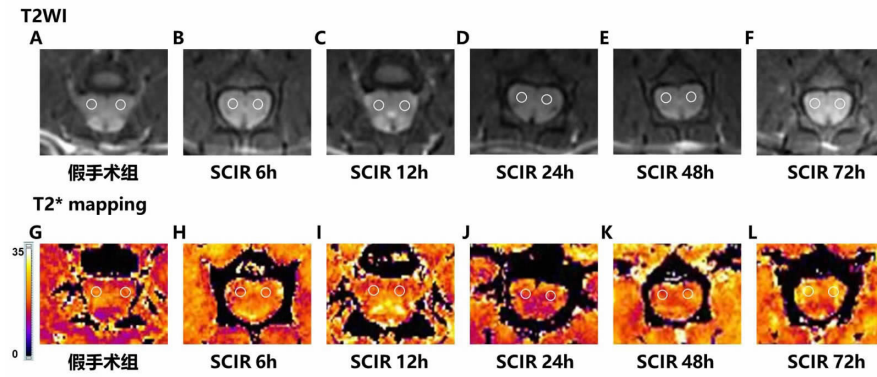


图 1 SCIR 后不同时间组 T_2^* mapping 变化。A~F: 基于 T_2WI 图像的 ROI 勾画示意图, ROI 勾画位置为脊髓前角。G~M: 假手术组及 SCIR 各组脊髓轴位 T_2^* mapping 变化。## 与其他各组相比, $P < 0.01$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 1. The changes of T_2^* mapping after SCIR. A~F: ROIs in T_2WI . The ROIs were delineated in the anterior horn of the spinal cord. G~M: Changes of T_2^* mapping in sham group and SCIR groups. ## compared with other groups, $P < 0.01$, ** $P < 0.01$.

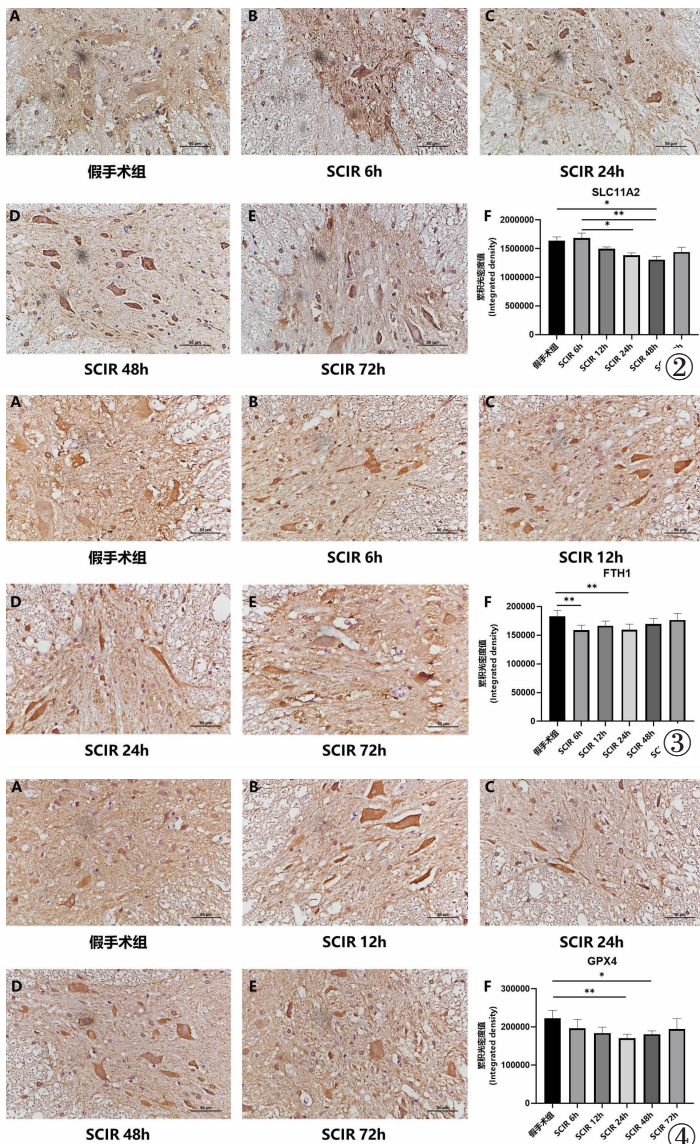


图 2 SCIR 后不同时间组脊髓前角 SLC11A2 表达变化。A~F: 假手术组、SCIR 后 6 h、24 h、48 h、72 h 组 SLC11A2 免疫组化染色及蛋白表达变化。** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 2. Differences in the expression of SLC11A2 after SCIR. A~F: Tendency for SLC11A2 staining and integrated density in the sham group and the SCIR groups at 6 h, 24 h, 48 h and 72 h after SCIR. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

图 3 SCIR 后不同时间组脊髓前角 FTH1 表达变化。A~F: 假手术组、SCIR 后 6 h、12 h、24 h、72 h 组 FTH1 免疫组化染色及蛋白表达变化。** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 3. Differences in the expression of FTH1 after SCIR. A~F: Tendency for FTH1 staining and integrated density in the sham group and the SCIR groups at 6 h, 12 h, 24 h and 48 h after SCIR. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

图 4 SCIR 后不同时间组脊髓前角 GPX4 表达变化。A~F: 假手术组、SCIR 后 12 h、24 h、48 h、72 h 组 GPX4 免疫组化染色及蛋白表达变化。** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 4. Differences in the expression of GPX4 after SCIR. A~F: Tendency for GPX4 staining and integrated density in the sham group and the SCIR groups at 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after SCIR. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

脂质过氧化,进一步导致神经细胞铁死亡^[10]。本研究利用 7.0T T_2^* mapping 成像技术,通过量化脊髓前角 T_2^* 值、反映脊髓铁代谢的变化以探讨 SCIR 后铁死亡的变化机制。

T_2^* mapping 成像是组织铁定量评估的常用方式,生理及病理因素使内源性顺磁性物质(如含铁血黄素、铁蛋白、铁离子等)增加时会导致局部磁场不均匀并增强质子失相位,从而缩短 T_2^* 弛豫时间^[11]。本研究利用 T_2^* mapping MR 成像检测 SCIR 后脊髓前角铁沉积的变化,结果显示 SCIR 后 6 h T_2^* 值出现显著降低,24 h T_2^* 降至最低,48~72 h 逐渐回升,表明在 SCIR 早期脊髓前角出现铁沉积现象。

为进一步验证 SCIR 后 T_2^* mapping 反映铁沉积的分子机制及对脊髓的影响,本研究分析了 SCIR 后 T_2^* 与铁代谢及铁死亡的关系。生理状态下细胞内的铁通过吸收-转运循环保持代谢稳态:亚铁离子 Fe^{2+} 被 SLC11A2 转运至细胞质内用于吸收和生物利用^[12],过多的 Fe^{2+} 可被铁蛋白亚基 FTH1 氧化为 Fe^{3+} 用于存储及运输^[6]。病理因素导致上述机制破坏将引起铁代谢紊乱,组织铁过载^[6,13], Fe^{2+} 过量累积通过芬顿反应生成 ROS 及 Fe^{3+} ,同时细胞内 GPX4 介导的抗氧化系统失调将进一步引起脂质过氧化导致铁死亡发生^[14-15]。本研究通过组织学证实 SCIR 后 6h SLC11A2 轻度升高,FTH1 显著减少,表明 SCIR 后早期 Fe^{2+} 转运增加、储存减少,细胞内 Fe^{2+} 含量增加,从而引起 T_2^* 值的降低,在此期间 GPX4 表达无显著下降,说明 SCIR 后 6 h GPX4 尚能维持一定的抗氧化活性。SCIR 后 24 h,SLC11A2、FTH1、GPX4 表达均显著降低,说明此时 Fe^{2+} 转运及储存均减少, Fe^{2+} 过载,且 GPX4 抗氧化活性降低,脊髓出现铁死亡。与铁死亡相关蛋白的变化一致, T_2^* 值在 SCIR 后 24 h 达到最低,可能由于 Fe^{2+} 通过芬顿反应大量产生 Fe^{3+} 所致。 Fe^{3+} 具有更多的核外未成对电子,其自旋磁矩增大,导致磁场不均匀性增加,使质子失相位加快, T_2^* 弛豫缩短^[16],针对 SCIR 后铁死亡进程中不同氧化还原态铁离子的 T_2^* 变化仍有待于进一步实验证实。

本研究的局限性:本研究仅通过动物模型证实了 SCIR 后应用 T_2^* mapping 成像评估脊髓铁死亡的可行性,由于动物样本量有限,无法计算 T_2^* 诊断铁过载及铁死亡程度的截断值,进一步扩大样本量或进行临床研究将更有助于对 SCIR 后铁死亡进行精准评估。

综上所述,SCIR 损伤后脊髓前角 T_2^* 值、SLC11A2、FTH1、GPX4 均出现一过性降低过程,且 T_2^* 变化与铁死亡关键蛋白 GPX4 的表达变化一致,

提示 T_2^* mapping 可通过检测脊髓铁沉积的变化进一步反映铁死亡的作用机制。

【参考文献】

- [1]Zhang Y, Yun HJ, Ji Y, et al. Advancements in our understanding of circular and long non-coding RNAs in spinal cord injury [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(11): 2399-2403.
- [2]Streijger F, So K, Manouchehri N, et al. Changes in Pressure, Hemodynamics, and Metabolism within the Spinal Cord during the First 7 Days after Injury Using a Porcine Model[J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(24): 3336-3350.
- [3]Choi EK, Yeo JS, Park CY, et al. Inhibition of reactive oxygen species downregulates the MAPK pathway in rat spinal cord after limb ischemia reperfusion injury[J]. *Int J Surg*, 2015, 22: 74-78.
- [4]Degregorio-Rocasolano N, Marti-Sistac O, Gasull T. Deciphering the Iron Side of Stroke: Neurodegeneration at the Crossroads Between Iron Dyshomeostasis, Excitotoxicity, and Ferroptosis [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 85.
- [5]Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [6]Chen X, Yu C, Kang R, et al. Iron Metabolism in Ferroptosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 590226.
- [7]Xie Y, Kang R, Klionsky DJ, et al. GPX4 in cell death, autophagy, and disease[J]. *Autophagy*, 2023, 19(10): 2621-2638.
- [8]Henninger B, Kremser C, Rauch S, et al. Evaluation of MR imaging with T1 and T_2^* mapping for the determination of hepatic iron overload[J]. *Eur Radiol*, 2012, 22(11): 2478-2486.
- [9]D W, L G, T Z, et al. Study of iron metabolism based on T_2^* mapping sequences in PI-RADS 3 prostate lesions [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1185057.
- [10]Guo L, Zhang D, Ren X, et al. SYVN1 attenuates ferroptosis and alleviates spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats by regulating the HMGB1/NRF2/HO-1 axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110802.
- [11]Bush AM, Sandino CM, Ramachandran S, et al. Rosette Trajectories Enable Ungated, Motion-Robust, Simultaneous Cardiac and Liver T (2)* Iron Assessment [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2020, 52(6): 1688-1698.
- [12]Zhang XD, Liu ZY, Wang MS, et al. Mechanisms and regulations of ferroptosis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1269451.
- [13]Luo Q, Zheng J, Fan B, et al. Enriched environment attenuates ferroptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by regulating iron metabolism[J]. *Brain Res Bull*, 2023, 203: 110778.
- [14]Chen J, Wang Y, Wu J, et al. The Potential Value of Targeting Ferroptosis in Early Brain Injury After Acute CNS Disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 110.
- [15]Hu X, Xu Y, Xu H, et al. Progress in Understanding Ferroptosis and Its Targeting for Therapeutic Benefits in Traumatic Brain and Spinal Cord Injuries[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 705786.
- [16]Cushing CM, Petronek MS, Bodeker KL, et al. Magnetic resonance imaging (MRI) of pharmacological ascorbate-induced iron redox state as a biomarker in subjects undergoing radio-chemotherapy[J]. *Redox Biol*, 2021, 38: 101804.