

谷氨酸化学交换饱和转移 MR 成像对脂多糖诱导脓毒症相关性脑病的大鼠血脑屏障损伤的应用研究

钟雅志¹, 吴仁华²

(1. 惠州市中心人民医院放射科, 广东 惠州 516000; 2. 汕头大学医学院第二附属医院医学影像科, 广东 汕头 515000)

[摘要] 目的: 采用谷氨酸化学交换饱和转移成像(Glu-CEST)观察由脂多糖诱导的脓毒症相关性大鼠脑内的影像改变与大鼠血脑屏障损伤的关系。方法: 将 24 只健康雄性 SD 大鼠均分为脓毒症相关性脑病(SAE)组(10 mg/kg 脂多糖)和对照组(注射与脂多糖等量的生理盐水)两组, 并通过旷场实验分别观察两组大鼠行为学表现, 其行为学指标包括大鼠的活动总路程、活动时间、站立次数以及跨格次数。采用 7.0T 小动物专用磁共振扫描仪获得大鼠脑中的 Glu-CEST 图像。最后通过伊文思蓝实验检测大鼠血脑屏障的损伤。结果: 旷场实验的行为学表现表明与对照组对比, SAE 组的大鼠的活动时间、站立次数显著下降($P < 0.01$), 提示 SAE 组大鼠焦虑、抑郁症状更显著; SAE 组大鼠脑中的 Glu-CEST 值($(15.20 \pm 0.79)\%$)较对照组($(11.93 \pm 1.63)\%$)显著升高($P < 0.01$), 同时 SAE 组((4.07 ± 0.64) ng/mL)的伊文思蓝溶液渗透结果亦较对照组((1.97 ± 0.23) ng/mL)更显著($P < 0.05$), 且通过 Person 相关性分析提示伊文思蓝实验的渗透值与 Glu-CEST 值具有正相关。结论: 结合 Glu-CEST MRI 可在分子影像水平上无创性地反映脂多糖诱导脓毒症相关性脑病的大鼠脑中的血脑屏障受损变化及程度。

[关键词] 脓毒症相关性脑病; 血脑屏障; 磁共振成像

[中图分类号] R742; R445.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1008-1062(2025)01-0011-04

DOI:10.12117/jccmi.2025.01.003

Application research of glutamate chemical exchange saturation transfer MR imaging in the blood-brain barrier injury of rats with sepsis associated encephalopathy induced by lipopolysaccharide

ZHONG Ya-zhi¹, WU Ren-hua²

(1. Department of Radiology, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou Guangdong 516000, China; 2. Department of Medical Imaging, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou Guangdong 515000, China)

Abstract: Objective: To observe the relationship between brain image changes and blood-brain barrier injury in rats with sepsis associated encephalopathy induced by lipopolysaccharide using glutamate chemical exchange saturation transfer (Glu-CEST) imaging. **Methods:** Twenty-four healthy male SD rats were divided into two groups: the sepsis-associated encephalopathy(SAE) group (10 mg/kg lipopolysaccharide) and the control group (injected with the same amount of normal saline as lipopolysaccharide). Open field experiment was conducted to observe the behavioral performance of the rats in the two groups, including the total distance of activity, activity time, standing times and span times. The image of Glu-CEST in rat brain was obtained by 7.0T MR scanner for small animals. Finally, the damage to the blood-brain barrier in rats was detected by the Evans blue test. **Results:** Compared with the control group, the activity time and standing times of the SAE group decreased significantly ($P < 0.01$), indicating that anxiety and depression symptoms were more significant in the SAE group. The level of Glu-CEST in the brain of the SAE group ($(15.20 \pm 0.79)\%$) was significantly higher than that of the control group ($(11.93 \pm 1.63)\%$) ($P < 0.01$). Meanwhile, the penetration result of Evans blue solution in the SAE group ((4.07 ± 0.64) ng/mL) was more significant than that in the control group ((1.97 ± 0.23) ng/mL) ($P < 0.05$), and the Person correlation analysis suggested that the infiltration value of Evans blue test was positively correlated with Glu-CEST value. **Conclusion:** Combination with Glu-CEST MRI can noninvasively reflect the changes and extent of blood-brain barrier damage in rats with lipopolysaccharid-induced SAE at the molecular imaging level.

Key words: Sepsis-Associated Encephalopathy; Blood-Brain Barrier; Magnetic Resonance Imaging

脓毒症相关性脑病 (Sepsis-associated encephalopathy, SAE) 是脓毒症的一种可危及生命的常见的神经系统并发症, 由宿主对感染的反应失调引起, 可导致器官功能障碍和衰竭, 而其中感染性休克

患者平均死亡率高达 42.9%, 是重症患者的首要致死原因^[1-2]。脓毒症期间全身产生的内毒素血症和促炎细胞因子导致小胶质细胞和脑内皮细胞激活、紧密连接下调和白细胞募集增加, 由此产生的神经炎

[收稿日期] 2024-03-25; **[修回日期]** 2024-04-21

[作者简介] 钟雅志(1993-), 女, 广东梅州人, 住院医师。E-mail: zhongyazhi160@163.com

[通信作者] 吴仁华, 汕头大学医学院第二附属医院医学影像科, 515000。E-mail: rhwu@stu.edu.cn

症和血脑屏障损伤会加剧 SAE 病理过程并加重脑功能障碍^[3]。血脑屏障由于其高度选择的性质可有效地阻止神经毒性分子及有害物质通过,并调节大脑和血液之间的大分子、氨基酸、离子和肽类等物质的转运。血脑屏障主要由内皮细胞和基底膜基本构成,同时它还受血管周细胞、神经元、少突胶质细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞等免疫细胞共同维持作用^[4]。内皮细胞上的兴奋性氨基酸转运蛋白是调节脑实质细胞内与血液中谷氨酸浓度梯度机制的基础,当内皮细胞受损时,细胞外的谷氨酸不能有效清除从而导致脑脊液和细胞外中谷氨酸含量增加^[5]。此外,神经元损伤也会导致谷氨酸过度兴奋和额外释放,而神经元活动产生的谷氨酸也会引发星形胶质细胞释放 ATP,从而进一步调节突触中谷氨酸的浓度^[6]。因此血脑屏障的完整程度是控制正常和受损大脑中谷氨酸浓度范围的关键因素^[7]。SAE 的动物模型在国内外文献中已知公认的造模方法主要有以下两种:一是通过手术盲肠结扎法,此法手术操作难度不大,相对经济,然而手术对动物创伤较大,手术后大鼠往往由于腹腔感染严重,存活率不高使造模成功率相对较低;二是通过腹腔注射脂多糖诱导大鼠的 SAE,此法相对简便但造模试剂成本较高^[8]。本文主要通过腹腔注射脂多糖诱导大鼠的 SAE,并通过神经反射和旷场实验的行为学表现进一步评估大鼠脑内的精神状态。

化学交换饱和转移成像 (Chemical exchange saturated transfer, CEST) 是由磁化转移技术发展而来的 MRI 新技术之一,能从分子水平探测组织中特定物质浓度的变化,可以反映内源性和外源性的含有的可交换质子并获得空间图像,在多个系统领域方面已有诸多文献研究^[9]。CEST 技术原理是基于化学位移现象,利用特定高斯分布的预饱和和脉冲对溶质中的特定物质进行选择性的预饱和和可交换质子。其经典理论模型是两池模型,分别是自由水池和可交换质子池。MR 虽然可直接探测氢质子信号,却无法直接探测特定大分子质子池的信号,但是多种生物大分子物质内含有的可与自由水进行化学交换的氢质子,并在适宜的温度、pH、浓度等实验条件下,可交换质子池中的氢质子能与自由水池的氢质子发生化学交换,再通过磁化传递来探测水的信号变化,从而间接反映了溶质中特定的低浓度物质及组织微环境的变化^[10]。

谷氨酸是脑中重要的神经递质与代谢物质,并在突触传递和炎症代谢中具有重要的作用。谷氨酸因其含有较多的胺基,其胺基中的氢质子作为可交换质子,可通过 CEST 成像来检测其含量及比变化^[11]。

因此,谷氨酸 CEST (Glumate CEST, Glu-CEST) 技术具有独特的无创性、无辐射,并可利用体内的物质作为天然对比剂,在神经系统疾病中如癫痫、肿瘤、脑炎、创伤等疾病中具有广泛的生理及病理机制研究^[12-14]。本文主要使用脂多糖腹腔注射的方法进行 SAE 的动物造模诱导^[15],通过相关的神经反射指标及旷场实验对其进行行为表现评估,并结合 Glu-CEST 成像技术和伊文思蓝实验检测研究 SAE 早期的脑内分子影像改变与血脑屏障损伤的关系。

1 材料与方法

1.1 动物准备

取 24 只约 8~12 周龄无特定病原体动物级 SD 大鼠并平均分为两组 (购于广东省实验动物中心),平均体质量约 180 g。腹腔注射 10 mg/kg 的脂多糖 (Sigma 公司, Escherichia coli (O55:B5)) 制备脓毒症模型并于 24 h 后观察神经反射评估指标,如角膜反射、翻正反射、甩尾反射、耳廓反射及逃避反射 5 项内容。每项指标 0 分为无反射,1 分为反射减弱 (10 s 内缺乏反射),2 分为正常反射。计算 5 项神经反射得分总和,总分 ≤ 6 分为 SAE 模型;SAE 模型不达标需剔除在外并重新制作模型补充^[16]。此外通过旷场试验对大鼠的行为表现及精神症状进一步评估。本研究经汕头大学医学院实验动物伦理委员会批准 (批准号:2020-15)。

1.2 旷场实验

旷场实验是一种广泛应用于人类精神疾病动物模型行为研究,是评价啮齿类动物在新异环境中自主行为、探索行为和焦虑程度的方法^[17]。采用自制的 100 cm×100 cm×40 cm 的箱子,并将其划分为九宫格。通过可分析小动物行为轨迹的摄像机录影并记录 5 分钟内大鼠活动总路程、活动时间、站立次数及跨格次数。每次实验结束时,应擦拭或清洗实验箱子,避免前一个动物的尿液、粪便等残余信息影响后一个实验鼠的行为表现结果^[18]。

1.3 影像扫描

采用 7.0T 小动物磁共振扫描仪分别扫描麻醉后的各组大鼠并获得相应的 Glu-CEST 图像。同时使用 MRI 兼容的小动物监测系统来监测扫描期间大鼠的呼吸频率和心率。采用连续波饱和和脉冲的单次回波平面成像序列,获得所选平面的 Glu-CEST 图像,其参数设置如下: B1 3.6 μ T, 脉宽 4s, 视野 37 mm×37 mm, 层厚 2 mm, 重复时间 6 000 ms, 回声时间 27.97 ms, 矩阵 64×64。CEST 采集频率范围设置为 -6.0 ppm~6.0 ppm 之间, 总共采集 121 幅图像。再用获得的 B1 和 WASSR B0 域图用于校正 CEST 图。

最后用 Matlab 2016b 软件对原始 CEST 图像进行后处理。

1.4 伊文思蓝实验

伊文思蓝是一种常用的对血浆白蛋白有很高的亲和力和偶氮染料,且只有在中枢神经系统受损时才能进入脑内,因此常被用于评价血脑屏障通透性的变化。各组大鼠处死前经尾静脉注射 2%伊文思蓝溶液并循环 40 min,而后经麻醉、心内灌注、取脑称重,在每 100 g 脑组织加入 1 mL 的 50%的三氯乙酸并避光孵育 24 h,最后低温离心并取上清,用多功能酶标仪测定在波长 620 nm 情况下的吸光度。使用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,根据绘制的伊文思蓝标准曲线计算样品的伊文思蓝含量^[9]。

1.5 统计分析

采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行统计分析并采用 Kruskal-Wallis 检验分析。所有数据均表示

为平均值±标准误差。差异有统计学意义的水平设定为 $P<0.05$; $P<0.01$ 差异有显著统计学意义。

2 结果

在大鼠旷场实验的行为表现结果显示,与造模前的正常对照组相比,注射脂多糖后造模成功的 SAE 组大鼠的各项行为指标如活动的总路程、活动时间、站立次数和跨格次数均有不同程度的下降,其中两组大鼠的活动时间与站立次数的差异具有统计意义 ($P<0.01$),这提示造模后的 SAE 大鼠焦虑、抑郁的行为表现及精神症状更显著。

在本文的 CEST 实验结果中显示,造模后的 SAE 组大鼠的脑内 Glu-CEST 分布浓度总体较对照组效应更高(图 1~4),造模后的 SAE 组与对照组的 Glu-CEST R 值分别是 $(15.20\pm 0.79)\%$ 和 $(11.93\pm 1.63)\%$,且两者之间存在统计学差异 ($P<0.01$)。

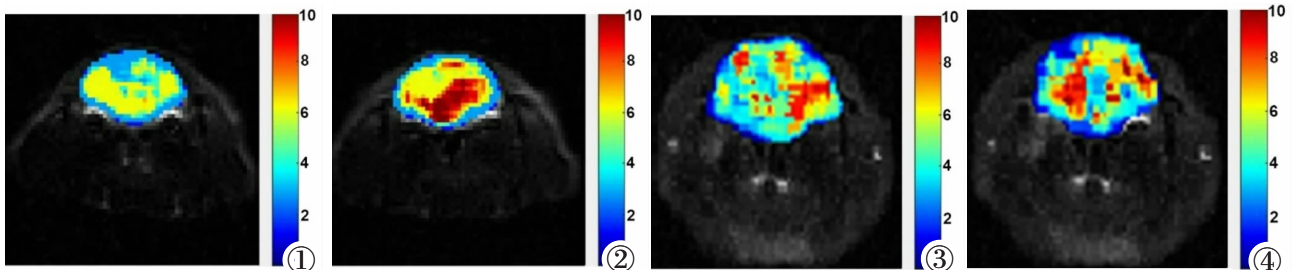


图 1-4 大鼠脑内谷氨酸的 Glu-CEST 图(图 1、3 分别表示造模前的两只正常对照组大鼠,图 2、4 是造模后的 SAE 大鼠);红色区域代表 CEST 效应较高,蓝色则反之。

Figure 1-4. Glu-CEST diagram of glutamate in the brain of rats(Figure 1 and 3 respectively represent the two normal control rats before modeling, Figure 2 and 4 represent the SAE rats after modeling): the red area represents a higher CEST effect, and the blue area is vice versa.

在伊文思蓝实验中的结果表示,与对照组 (1.97 ± 0.23) ng/mL 相比,SAE 组 (4.07 ± 0.64) ng/mL 的溶液外渗浓度较高,且差异具有统计学意义 ($P<0.05$),这提示 SAE 组大鼠的血脑屏障损伤更明显。此外进一步通过 Person 相关性分析表明伊文思蓝浓度与 Glu-CEST 的效应也具有正相关(图 5),且差异具有统计学意义 ($P<0.05$),这也意味着 Glu-CEST 在一定程度或可反映中枢神经系统的微观组织损伤,且其影像的变化可能与血脑屏障受损相关。

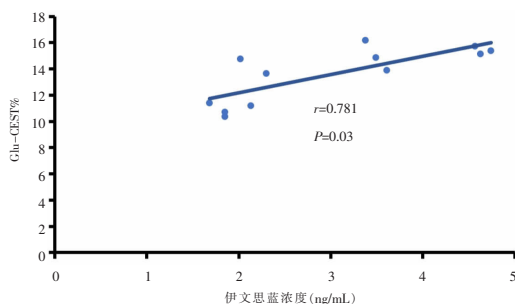


图 5 伊文思蓝浓度与 Glu-CEST% 值的相关性分析 ($P<0.05$)。

Figure 5. Correlation analysis between Evans blue concentration and Glu-CEST% value ($P<0.05$).

3 讨论

SAE 是脓毒症最常见的并发症之一,是导致脓毒症患者死亡率增高和预后不良的重要原因。早期临床症状及实验室检查的阳性率及特异性低,而当临床发现症状时往往已经到了疾病比较晚期的阶段,炎症已经蔓延至全身其他组织及器官且难以有效控制,因此研究 SAE 的早期影像诊断对提前干预与治疗,并提高患者的预后具有重要的临床意义。SAE 的发病机制涉及多种因素,包括脑内神经递质的改变、微血管的损伤、血脑屏障的损伤以及神经炎症等,是多种生理及病理机制相互作用的结果^[3]。

谷氨酸在脑内的神经递质代谢中具有重要的生理作用,在突触间隙中,谷氨酸过度释放和清除不足时都会发生细胞的兴奋性毒性并损伤细胞。同时谷氨酸也是谷胱甘肽物质合成的来源之一,而谷胱甘肽水平的高低也受神经元细胞膜上 EAAC1 的调节,EAAC1 可促使细胞外的谷氨酸和半胱氨酸进入细胞内合成谷胱甘肽,从而降低谷氨酸的兴奋性毒

性并提高细胞抗氧化水平^[20]。谷胱甘肽最主要生理作用是可以清除体内的自由基,并提高机体中重要的蛋白质和酶等分子的抗氧化能力,是维持机体内细胞稳态中重要的抗氧化物^[21]。在 SAE 中发生细胞损伤与死亡时,往往伴有谷胱甘肽的水平降低^[22],这也意味着谷胱甘肽的减少除了在细胞炎症损伤时在抗氧化过程中的消耗,可能也与谷氨酸在突触间隙的过度释放或清除减少造成的兴奋性毒性相关,从而使可进入细胞内合成谷胱甘肽的谷氨酸原料减少。谷氨酸在 SAE 的神经及生理代谢中具有重要的作用,研究谷氨酸在 SAE 的脑内早期变化对疾病的诊断及治疗具有积极的作用。

既往文献研究表明,在脂多糖刺激下的脓毒症大鼠脑内星形胶质细胞的结构发生了广泛的变化,如结构重构、足突缺失等,这些也进一步促进血脑屏障破坏^[23]。在疾病极早期当脑内发生炎症时,尽管脑内细胞内谷氨酸的代谢就已经发生了改变和血脑屏障受损,但传统的影像学检查技术如螺旋 CT 扫描、常规的 MR 成像难以发现明显阳性征象,难以满足临床诊断的个性化需求。作为一种新兴的 MRI 技术,CEST 成像在传统影像技术如螺旋 CT 扫描以及 MR 等解剖成像上进一步补充了分子成像的物质浓度改变,同时也弥补了磁共振波谱在空间分辨率低、不能获得图像以及易受磁场不均匀影响的不足,从而得到所探测物质的 CEST 效应图,更直观地显示了特定溶质分子微观状况下的浓度分布及变化。本文的研究结果表明,在造模后早期可观察到 SAE 大鼠脑中的 Glu-CEST 效应的升高,且相关性分析提示 Glu-CEST 的效应与血脑屏障受损的程度具有正相关性,这也意味着 Glu-CEST 在揭示 SAE 的病理生理机制方面具有一定的潜力,结合 Glu-CEST 的改变或可无创性影像反映 SAE 脑中的微观损伤。

[参考文献]

- [1] Ceconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Lancet*, 2018, 392(10141): 75-87.
- [2] Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(10): 557-566.
- [3] Gao Q, Hernandez MS. Sepsis-Associated Encephalopathy and Blood-Brain Barrier Dysfunction [J]. *Inflammation*, 2021, 44(6): 2143-2150.
- [4] Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders[J]. *Neuron*, 2008, 57(2): 178-201.
- [5] Bai W, Zhou YG. Homeostasis of the Intraparenchymal-Blood Glutamate Concentration Gradient: Maintenance, Imbalance, and Regulation[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 400.
- [6] Dorsett CR, McGuire JL, Niedzielko TL, et al. Traumatic Brain Injury Induces Alterations in Cortical Glutamate Uptake without a Reduction in Glutamate Transporter-1 Protein Expression [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(1): 220-234.
- [7] Gruenbaum BF, Zlotnik A, Fleidervish I, et al. Glutamate Neurotoxicity and Destruction of the Blood-Brain Barrier: Key Pathways for the Development of Neuropsychiatric Consequences of TBI and Their Potential Treatment Strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9628.
- [8] Towner RA, Saunders D, Smith N, et al. Assessing long-term neuroinflammatory responses to encephalopathy using MRI approaches in a rat endotoxemia model[J]. *Geroscience*, 2018, 40(1): 49-60.
- [9] Zaiss M, Jin T, Kim SG, et al. Theory of chemical exchange saturation transfer MRI in the context of different magnetic fields[J]. *NMR Biomed*, 2022, 35(11): e4789.
- [10] Dou W, Lin CE, Ding H, et al. Chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging and its main and potential applications in pre-clinical and clinical studies[J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2019, 9(10): 1747-1766.
- [11] Li R, Dai Z, Hu D, et al. Mapping the Alterations of Glutamate Using Glu-Weighted CEST MRI in a Rat Model of Fatigue[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 589128.
- [12] Saito S, Takahashi Y, Ohki A, et al. Early detection of elevated lactate levels in a mitochondrial disease model using chemical exchange saturation transfer(CEST) and magnetic resonance spectroscopy(MRS) at 7T-MRI[J]. *Radiol Phys Technol*, 2019, 12(1): 46-54.
- [13] Kogan F, Singh A, Debrosse C, et al. Imaging of glutamate in the spinal cord using GluCEST[J]. *Neuroimage*, 2013, 77: 262-267.
- [14] Cai K, Singh A, Roalf DR, et al. Mapping glutamate in subcortical brain structures using high-resolution GluCEST MRI[J]. *NMR Biomed*, 2013, 26(10): 1278-1284.
- [15] Dumbuya JS, Li S, Liang L, et al. Effects of hydrogen-rich saline in neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in rat model of sepsis-associated encephalopathy [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 546.
- [16] Lin LC, Chen YY, Lee WT, et al. Heat shock pretreatment attenuates sepsis-associated encephalopathy in LPS-induced septic rats[J]. *Brain Dev*, 2010, 32(5): 371-377.
- [17] Kuniishi H, Ichisaka S, Yamamoto M, et al. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats[J]. *Neurosci Res*, 2017, 123: 27-35.
- [18] Huang P, Chen X, Hu X, et al. Experimentally Induced Sepsis Causes Extensive Hypomyelination in the Prefrontal Cortex and Hippocampus in Neonatal Rats [J]. *Neuromolecular Med*, 2020, 22(3): 420-436.
- [19] Goldim MPS, Della Giustina A, Petronilho F. Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2019, 126(1): e83.
- [20] Aoyama K, Nakaki T. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1)[J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 8742-8758.
- [21] Diaz-Vivancos P, de Simone A, Kiddle G, et al. Glutathione—linking cell proliferation to oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 1154-1164.
- [22] Wang J, Yang S, Jing G, et al. Inhibition of ferroptosis protects sepsis-associated encephalopathy[J]. *Cytokine*, 2023, 161: 156078.
- [23] Shulyatnikova T, Verkhatsky A. Astroglia in Sepsis Associated Encephalopathy[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(1): 83-99.