

❖ 实验研究

Effect of N-acetylserotonin on brain edema after cerebral ischemia reperfusion with DWI in rats

YAN Shaozhen¹, WANG Xiaoli^{1*}, ZHAO Yuehua²,MU Qingjie³, WANG Haiyu¹, ZHAO Yansong⁴

(1. Department of Medical Imaging, Weifang Medical University, Weifang 261053, China; 2. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261000, China;

3. Department of Hematology, 4. Department of Ophthalmology, Clinical Medicine

College of Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

[Abstract] **Objective** To observe the protective effect of N-acetylserotonin (NAS) on brain edema induced by focal cerebral ischemia reperfusion (IR) in rats using DWI. **Methods** Sixty-six rats were divided randomly into Sham-operation group ($n=10$), middle cerebral artery occlusion (MCAO) group ($n=28$) and NAS group ($n=28$). The rats of NAS and MCAO groups were performed DWI and pathological examination at 6 h, 24 h, 72 h and 7 days after IR, performed at 72 h for sham-operation group. And the relative apparent diffusion coefficient (rADC), relative exponential apparent diffusion coefficient (reADC) and AQP4 positive cells in cerebral infarction area were measured. 72 h after IR, the changes of brain water content were measured in all the three groups. **Results** In Sham-operation group, no abnormal signal was seen on DWI. In the NAS and MCAO groups, abnormal high signals in the cerebral cortex and striatum in the injured side on DWI, low signal on ADC map and high signal on eADC map were shown respectively. 6 h, 24 h and 72 h after IR, the value of rADC in NAS group was significantly higher than that in MCAO group (all $P<0.05$), while the value of reADC and AQP4 positive cells were significantly lower than those in MCAO group (all $P<0.05$). 7 days after IR, there were no significant differences of rADC, reADC, and AQP4 positive cells in all groups (all $P>0.05$). The water content of the NAS group was much lower than that in the MCAO group ($P<0.05$). **Conclusion** NAS can reduce brain edema and down-regulated the AQP4 expression in IR rats. DWI plays an important role in the evaluation of the neuroprotective effect of NAS.

[Key words] Brain ischemia; Reperfusion; Diffusion magnetic resonance imaging; N-acetylserotonin; Aquaporin 4

DOI:10.13929/j.1003-3289.2016.10.001

DWI 评估 N-乙酰-5-羟色胺对脑缺血再灌注大鼠脑水肿的影响

闫少珍¹, 王晓莉^{1*}, 赵月华², 牟青杰³, 王海宇¹, 赵岩松⁴

(1. 潍坊医学院医学影像学系, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院附属医院儿科, 山东 潍坊 261000; 3. 潍坊医学院临床医学院血液科, 4. 眼科, 山东 潍坊 261053)

[摘要] **目的** 采用 DWI 观察 N-乙酰-5-羟色胺(NAS)对急性局灶性脑缺血再灌注(IR)大鼠脑水肿的神经保护作用。
方法 将 66 只大鼠随机分为假手术组($n=10$)、大脑中动脉阻塞(MCAO)组($n=28$)和 NAS 组($n=28$)。对 MCAO 组和

[基金项目] 国家自然科学基金(81000268)、山东省自然科学基金(ZR2014JL049、ZR2013HL067)、山东省医药卫生科技发展计划(2014WS0466)。

[第一作者] 闫少珍(1991—), 女, 河北邯郸人, 在读硕士。研究方向: 磁共振成像。E-mail: yansz_me@yeah.net

[通信作者] 王晓莉, 潍坊医学院医学影像学系, 261053。E-mail: wxlpine@163.com

[收稿日期] 2016-04-21 **[修回日期]** 2016-08-21

NAS 组大鼠 IR 后 6 h、24 h、72 h、7 天,对假手术组于 72 h,分别行 DWI 和病理学检查,比较 3 组不同时间点脑梗死区相对 ADC 值(rADC)、相对指数 ADC 值(reADC)、水通道蛋白 4(AQP4)阳性细胞数的变化。IR 后 72 h,测量各组脑组织含水量的变化。**结果** 假手术组大鼠 MRI 检测未见异常信号。NAS 组与 MCAO 组大鼠 DWI 图均可见损伤侧大脑皮层及纹状体异常高信号,ADC 图为低信号,eADC 图为高信号。IR 后 6、24、72 h,NAS 组 rADC 值均高于 MCAO 组($P < 0.05$),reADC 值和 AQP4 阳性细胞数低于 MCAO 组($P < 0.05$);IR 后 7 天,各组 rADC 值、reADC 值及 AQP4 阳性细胞数差异无统计学意义($P > 0.05$)。IR 后 72 h,NAS 组大鼠脑组织含水量低于 MCAO 组($P < 0.05$)。**结论** NAS 可减轻急性 IR 脑损伤大鼠脑水肿,其机制可能与下调 AQP4 蛋白的表达有关;DWI 对评价 NAS 的神经保护作用具有重要价值。

[关键词] 脑缺血;再灌注;扩散磁共振成像;N-乙酰羟色胺;水通道蛋白 4

[中图分类号] R-332; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2016)10-1475-05

脑水肿是脑缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤的常见表现,可造成二次损伤,是急性脑损伤患者病情恶化或死亡的主要原因之一^[1]。N-乙酰-5-羟色胺(N-acetylserotonin, NAS)由血清素生成并转化为褪黑素,可穿过血脑屏障。有研究^[2-5]发现在缺血性脑损伤和其他神经系统疾病的实验模型中,NAS 具有神经保护作用。水通道蛋白 4(aquaporin 4, AQP4)在脑组织水的代谢调节中起重要作用。DWI 可在脑缺血后 30 min 内发现病灶,并可在体观察脑梗死区脑水肿等病理生理学变化,可评估神经保护剂等药物的疗效。本研究采用 DWI 和组织病理学检查观察 NAS 对大鼠急性脑 IR 后脑水肿和 AQP4 表达的影响,为 NAS 治疗局灶性脑缺血疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与模型建立 选取成年雄性 Sprague Dawley 大鼠 66 只,由山东省青岛市实验动物和动物实验中心提供[批号 SCXK(鲁 20140001)],体质量 280~320 g,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学。参照改良 Longa 线栓法^[6]制作大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。

1.2 分组 将 66 只大鼠随机分为 3 组,NAS 组($n=28$),造模前和造模后 30 min 分别腹腔注射 10 ml/kg 体质量 NAS(Sigma 公司,浓度 10 mmol/L);MCAO 组($n=28$),造模前和造模后 30 min 腹腔注射同等剂量生理盐水;假手术组($n=10$),仅分离血管后缝合,并于手术前和手术后 30 min 腹腔注射同等剂量生理盐水。MCAO 组和 NAS 组造模后 6 h、24 h、72 h、7 天每个时间点取 6 只进行 MR 检查,检查完毕后断头取脑进行病理学检查;造模后 72 h 对假手术组 6 只大鼠进行 MR 及病理检查。对每组 4 只大鼠取脑测定脑组织含水量。

1.3 MR 检查与图像分析 采用 GE Signa Excite HDxt 3.0T 超导 MRI 系统,腕关节相控阵线圈,将大

鼠麻醉后,将其俯卧位保定于线圈内,行鼠脑冠状位 DWI,采用单次激发自旋回波-回波平面成像序列, $b=0,1\ 000\ \text{s/mm}^2$,TR 2 400 ms,TE 94.5 ms,NEX 3,FOV 10 cm $\times$ 10 cm,矩阵 160 $\times$ 160,层厚 3.0 mm,层距 0.2 mm。

采用 GE AW 4.2 工作站和 Functool 功能分析软件对图像进行处理。选择脑缺血病灶最大层面,于病变侧病灶中心和对侧镜像区放置 3 个面积为 2 mm² 的 ROI,测量 ADC 值及指数 ADC(exponential apparent diffusion coefficient, eADC)值,并计算其平均值;分别计算病变侧与对侧镜像区 ADC 值和 eADC 值的比值,即 rADC 及 reADC($\text{rADC} = \text{ADC}_{\text{患侧}} / \text{ADC}_{\text{对侧}}$, $\text{reADC} = \text{eADC}_{\text{患侧}} / \text{eADC}_{\text{对侧}}$)。

1.4 脑组织含水量(brain water content, BWC)测定

将大鼠麻醉处死后迅速取脑,采用电子分析天平(精确至 0.001 g)称湿重(W),再将脑组织置于 110℃ 的恒温干燥箱内烘烤 24 h 后称其干重(D)。采用 Elliot 公式计算 BWC: $\text{BWC} = (\text{W} - \text{D}) / \text{W} \times 100\%$ 。

1.5 AQP4 免疫组化染色 10%水合氯醛(3.5 ml/kg 体质量)麻醉动物后,以 4%的多聚甲醛行心脏灌注,迅速断头取脑,放入 4%的多聚甲醛中固定。AQP4 免疫组织化学染色后,光镜下观察阳性表达结果,随机选取梗死区 5 个高倍视野($\times 400$),分别计数免疫反应 AQP4 阳性细胞个数,取其平均值。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性资料的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MR 检查结果 MR 检查假手术组大鼠双侧大脑半球均无异常。MCAO 组和 NAS 组 DWI 图像可见右侧大脑皮层及纹状体病变区域呈高信号,ADC 图相应区域为低信号,eADC 图为高信号,IR 后 6 h、24 h、

72 h MCAO 组病变面积均大于 NAS 组(图 1、2)。

2.1.1 各组大鼠脑 IR 后不同时间点 rADC 值的变化(表 1) IR 后 6 h、24 h、72 h,3 组间 rADC 值差异有统计学意义(P 均 <0.05),且 NAS 组和 MCAO 组 rADC 值均低于假手术组(P 均 <0.05);NAS 组 rADC 值高于 MCAO 组(P 均 <0.05)。IR 后 7 天,3 组间差异无统计学意义($F=0.31, P>0.05$)。

2.1.2 各组大鼠脑 IR 后不同时间点 reADC 值的变化(表 2) IR 后 6 h、24 h、72 h,3 组间 reADC 值差异有统计学意义(P 均 <0.05),且 NAS 组和 MCAO 组 reADC 值均高于假手术组(P 均 <0.05),NAS 组 reADC 值低于 MCAO 组(P 均 <0.05)。IR 后 7 天,3 组间 reADC 值差异无统计学意义($F=1.01, P>0.05$)。

2.2 IR 后 72 h BWC 测定结果 MCAO 组大鼠

BWC 为 $(82.18 \pm 1.06)\%$, NAS 组为 $(79.75 \pm 0.75)\%$,假手术组为 $(77.58 \pm 0.09)\%$,差异有统计学意义($F=37.43, P<0.01$),两两比较脑组织含水量差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.3 AQP4 免疫组化染色结果 AQP4 在假手术组细胞胞浆内及毛细血管周围可见少量表达,呈棕黄色。IR 后 6、24、72 h,3 组间 AQP4 阳性细胞数差异有统计学意义(P 均 <0.05),且 NAS 组和 MCAO 组 AQP4 阳性细胞数均高于假手术组(P 均 <0.01),NAS 组 AQP4 阳性细胞数均低于 MCAO 组(P 均 <0.05)。IR 后 7 天,3 组 AQP4 阳性细胞数差异无统计学意义($F=5.20, P>0.05$),见表 3 和图 3。

3 讨论

DWI 是研究水分子运动的 MR 成像方法,是目前唯一能在体反映水分子弥散的成像技术,对检测细胞

表 1 各组大鼠脑 IR 后不同时间点脑梗死区 rADC 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	72 h	7 天
NAS 组	$0.89 \pm 0.05^{* \#}$	$0.82 \pm 0.10^{* \#}$	$0.72 \pm 0.11^{* \#}$	0.97 ± 0.10
MCAO 组	$0.80 \pm 0.03^{*}$	$0.70 \pm 0.06^{*}$	$0.59 \pm 0.03^{*}$	1.00 ± 0.08
假手术组	0.99 ± 0.16	0.99 ± 0.16	0.99 ± 0.16	0.99 ± 0.16
F 值	32.13	23.54	47.60	0.31
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

注:与假手术组比较,*: $P<0.05$,**: $P<0.01$;#:与 MCAO 组比较, $P<0.05$;假手术组均为 72 h 测值

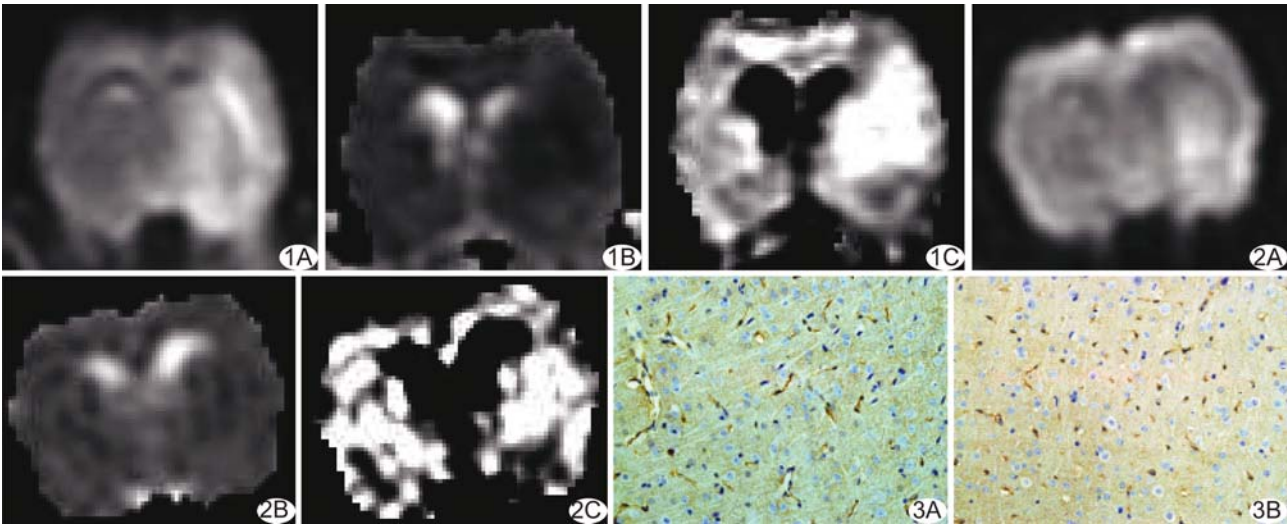


图 1 MCAO 组大鼠脑 IR 后 72 h DWI、ADC、eADC 图 DWI(A)示右侧大脑皮层及纹状体出现异常高信号,ADC 图(B)呈低信号,eADC 图(C)呈高信号 图 2 NAS 组大鼠脑 IR 后 72 h DWI、ADC、eADC 图 DWI(A)示右侧大脑皮层及纹状体出现异常高信号,ADC 图(B)呈低信号,eADC 图(C)呈高信号,与图 1(MCAO 组)比较,NAS 组病变范围较小 图 3 大鼠脑 IR 后 72 h 脑病变区 AQP4 免疫组化染色图($\times 400$) A. MCAO 组大鼠脑病变区可见大量 AQP4 阳性细胞; B. NAS 组大鼠脑病变区 AQP4 阳性细胞较 MCAO 组少

表 2 各组大鼠脑 IR 后不同时间点脑梗死区 reADC 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	72 h	7 天
NAS 组	1.08±0.07*#	1.13±0.07**#	1.25±0.08**#	1.03±0.05
MCAO 组	1.18±0.09*	1.25±0.09**	1.35±0.10**	1.03±0.07
假手术组	1.03±0.06	1.03±0.06	1.03±0.06	1.03±0.06
F 值	15.01	23.71	47.85	1.01
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

注: * :与假手术组比较, $P<0.05$; ** : $P<0.01$; # :与 MCAO 组比较, $P<0.05$; 假手术组均为 72 h 测值

表 3 各组大鼠脑 IR 后不同时间点脑梗死区 AQP4 阳性细胞数比较 (个/高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	72 h	7 天
NAS 组	26.25±4.83*#	34.50±5.97*#	41.25±7.95*#	23.50±7.23
MCAO 组	37.87±5.61*	42.25±7.27*	59.25±8.27*	27.00±7.40
假手术组	18.38±3.96	18.38±3.96	18.38±3.96	18.38±3.96
F 值	23.25	34.45	68.66	5.20
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

注: * :与假手术组比较, $P<0.01$; # :与 MCAO 组比较, $P<0.05$; 假手术组均为 72 h 测值

内水肿具有极大的优势。水肿的实质是水的分布失衡,从而引起水的扩散系数改变,进而导致 DWI 的信号异常。在缺血早期,脑血流量下降导致脑细胞缺氧并影响 ATP 合成,导致 Na-K-ATP 酶活性受到抑制,使细胞内离子浓度及渗透压升高,结果导致细胞毒性水肿,表现为水分子弥散能力降低,即表现为 ADC 值减低。但随着脑水肿的发展,血脑屏障破坏和继发的血管内液渗漏到细胞外间隙中,形成血管源性水肿,此阶段 ADC 值受多种因素的影响,逐渐恢复正常甚至升高。eADC 值是对 ADC 值取负指数,消除了 DWI “T2 透射效应”的干扰,两者相结合可更好地显示脑水肿。本研究结果发现大鼠 IR 后 6 h、24 h、72 h, rADC 值逐渐减低,而 7 天后与假手术组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。大鼠 IR 后 6 h、24 h、72 h, reADC 值逐渐升高,7 天后与假手术组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。rADC 值和 reADC 值的变化是由于随着 IR 后时间延长,血管源性脑水肿出现,神经细胞大量溶解,使缺血脑组织内水分明显增加所致,IR 后 7 天 rADC 值和 reADC 值出现假正常化,可能是多种病理结果的混合表现,与 Schlaug 等^[7-8]的研究结果相近。提示 DWI 能很好地监测大鼠 IR 后脑损伤区脑水肿情况。IR 后 6 h、24 h、72 h, NAS 组较 MCAO 组脑梗死区 rADC 值升高, reADC 值降低, MR 图像显示梗死区范围较小,本研究结果还发现大鼠脑 IR 后 72 h, NAS 组较 MCAO 组脑组织含水量明显减少,均提示 NAS 可明显减轻大鼠 IR 后脑水肿。

AQP4 是中枢神经系统的主要水通道蛋白,其对

水通透具有高度选择性,在神经组织、血液、脑脊液间进行水的调节,以维持中枢神经系统的水盐平衡。研究^[9]证实 AQP4 与脑水肿的发生、发展、消退密切相关,有研究^[10]发现,某些药物可下调 AQP4 表达,从而有效减轻脑水肿;另有研究^[11]表明 AQP4 抑制剂可有效减轻局灶性缺血引起的脑水肿。IR 后 AQP4 表达增多,星形胶质细胞水肿加重,随病变时间延长,脑组织水肿加重,造成 AQP4 表达进一步增多。本研究结果发现大鼠脑 IR 后 6 h、24 h、72 h, AQP4 阳性细胞数逐渐升高,7 天时各组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。AQP4 阳性细胞数的变化与脑水肿的发展时间具有一致性,与白永生等^[12]的研究结果一致。IR 后 6、24、72 h, NAS 组较 MCAO 组显著下调了脑梗死区 AQP4 蛋白的表达,而 AQP4 表达增强是缺血性脑水肿时 ADC 值下降的重要原因^[13]。NAS 是褪黑素的直接前体物质,研究^[14]发现褪黑素有减轻脑水肿的作用,其机制可能与褪黑素减少 AQP4 蛋白的表达有关^[15]。NAS 在缺血性脑损伤和其他神经系统疾病的实验模型中具有神经保护作用^[2-5],分析原因包括 NAS 可抑制线粒体细胞死亡通路和自噬性细胞死亡途径等,但具体机制尚不明确。结合本研究 AQP4 表达结果和 DWI 的变化,提示 NAS 减轻 IR 后的脑水肿,可能是通过下调 IR 后 AQP4 蛋白的表达实现。

总之, NAS 可减轻 IR 后大鼠脑水肿,从而减轻脑损伤,具有神经保护作用,其减轻脑水肿的机制可能与下调 AQP4 蛋白的表达有关, DWI 对评价 NAS 的神经保护作用具有重要价值。

[参考文献]

- [1] Simard JM, Kent TA, Chen M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: Molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*, 2007, 6(3):258-268.
- [2] Zhou Y, Li HQ, Lu L, et al. Ginsenoside Rg1 provides neuroprotection against blood brain barrier disruption and neurological injury in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion through down regulation of aquaporin 4 expression. *Phytomedicine*, 2014, 21(7):998-1003.
- [3] Oxenkrug G, Ratner R. N-acetylserotonin and aging-associated cognitive impairment and depression. *Aging Dis*, 2012, 3(4):330-338.
- [4] Zhou H, Wang J, Jiang J, et al. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *Neuroscience*, 2014, 34(8):2967-2978.
- [5] Tosini G, Ye K, Iuvone PM. N-acetyl serotonin: Neuroprotection, neurogenesis, and the sleepy brain. *Neuroscientist*, 2012, 18(6):645-653.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [7] Schlaug G, Siewert B, Benfield A, et al. Time course of the apparent diffusion coefficient (ADC) abnormality in human stroke. *Neurology*, 1997, 49(1):113-119.
- [8] 贾秀川, 刘怀军, 吕红艳. 兔局灶性脑缺血/再灌注损伤后脑水肿的系列 MRI 动态演变. *中国医学影像技术*, 2005, 21(11):1671-1673.
- [9] Sulyok E, Vajda Z, Dóczy T, et al. Aquaporins and the central nervous system. *Acta Neurochir (Wien)*, 2004, 146(9):955-960.
- [10] Li W, Tan C, Liu Y, et al. Resveratrol ameliorates oxidative stress and inhibits aquaporin 4 expression following rat cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5):7756-7762.
- [11] Igarashi H, Huber VJ, Tsujita M, et al. Pretreatment with a novel aquaporin 4 inhibitor, TGN-020, significantly reduces ischemic cerebral edema. *Neurological Sciences*, 2011, 32(1):113-116.
- [12] 白永生. Fibulin-5 对大鼠缺血再灌注脑损伤后脑水肿和轴突再生的影响及机制研究. 重庆:重庆医科大学, 2014:1-52.
- [13] Yao X, Derugin N, Manley GT, et al. Reduced brain edema and infarct volume in aquaporin-4 deficient mice after transient focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 2015, 584:368-372.
- [14] Bayir A, Kiresi DA, Kara H, et al. The effects of mannitol and melatonin on MRI findings in an animal model of traumatic brain edema. *Acta neurologica Belgica*, 2008, 108(4):149-154.
- [15] 吕媛. 水肿相关蛋白在褪黑素干预新生大鼠缺氧缺血性脑病模型器官损伤中的作用. 苏州:苏州大学. 2013:1-56.

《中国医学影像技术》被数据库收录情况

《中国医学影像技术》杂志是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊,被以下数据库收录:

中国精品科技期刊

《中文核心期刊要目总览》收录期刊

中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

中国科学引文数据库核心期刊

WHO《西太平洋区医学索引》(WPRIM)来源期刊

荷兰《医学文摘》收录源期刊

英国《科学文摘》收录源期刊

俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊

《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JSTChina)收录期刊