

❖ 实验研究

Resting-state functional MRI observation on regional homogeneity of whole brain in rat models of vascular dementia

HE Huan¹, DING Wencai^{2*}

(1. Imaging Center of Radiology, Shiyuan Renmin Hospital, Shiyuan 442000, China; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the changes in regional homogeneity (ReHo) of whole brain in vascular dementia (VD) rat models with resting-state functional MRI (rs-fMRI), and to evaluate the behavioral changes of VD rats. **Methods** Fifty male Wistar rats were divided into VD group ($n=35$) and control group ($n=15$). VD models were established through ligations of bilateral common carotid arteries in VD group, while the bilateral carotid arteries were only isolated in control group. Four weeks after modeling, Morris water maze experiment was carried out. The rats learned twice a day for 5 days. The escape latencies were compared between the groups. Then data of brain rs-fMRI were collected using a 9.4T MR scanner, brain regions with ReHo value changes between groups were observed. **Results** VD models were successfully established in 20 rats, while the sham operation was successfully performed in 10 rats in control group. In Morris water maze experiment, the rats in VD group took longer time than those in control group to find the platform. After learning, the escape latency of rats gradually shortened in both 2 groups, but of VD group was still longer than of control group at all points (all $P<0.01$). Compared with control group, the ReHo values of bilateral corpus striatum, and of right dorsolateral entorhinal cortex and right neocortex increased in VD group decreased (all $P<0.05$, GFR correction). **Conclusion** ReHo in brain regions of VD rat models were different from those of controls. ReHo changes of bilateral corpus striatum, dorsolateral entorhinal cortex and right neocortex might be associated with cognitive decline.

[Keywords] dementia, vascular; magnetic resonance imaging; rats

DOI:10.13929/j.issn.1003-3289.2022.07.003

静息态功能 MRI 观察血管性痴呆大鼠模型 全脑局部一致性

贺欢¹, 丁文才^{2*}

(1. 十堰市人民医院放射影像中心, 湖北 十堰 442000; 2. 哈尔滨医科大学附属
第一医院神经内科, 黑龙江 哈尔滨 150000)

[摘要] **目的** 采用静息态功能 MRI(rs-fMRI)评价血管性痴呆(VD)大鼠全脑局部一致性(ReHo)改变,并观察其行为学改变。**方法** 将 50 只雄性 Wistar 大鼠分为 VD 组($n=35$)和对照组($n=15$)。VD 组通过结扎双侧颈总动脉建立 VD 模型,对照组仅分离其双侧颈动脉。4 周后行 Morris 水迷宫实验,大鼠每日学习 2 次、持续 5 日,比较组间逃逸潜伏期的差异。以 9.4T MR 采集大鼠颅脑 rs-fMRI 数据,观察组间 ReHo 值出现变化的脑区。**结果** 对 VD 组 20 只大鼠成功建模,对照组 10 只成功施行假手术。Morris 水迷宫实验中,VD 组逃逸潜伏期较对照组延长;随学习次数增加,2 组大鼠逃逸潜伏期均逐渐缩短,但 VD 组逃逸潜伏期均长于对照组(P 均 <0.01)。rs-fMRI 结果显示,相比对照组,VD 组双侧纹

[第一作者] 贺欢(1990—),男,湖北十堰人,硕士,主治医师。研究方向:痴呆与神经影像。E-mail: 97077277@qq.com

[通信作者] 丁文才,哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科,150000。E-mail: 306523804@qq.com

[收稿日期] 2021-10-26 **[修回日期]** 2022-01-17

状体 ReHo 值减低,右侧背外侧内嗅皮层、右侧新脑皮层 ReHo 值升高(P 均 <0.05 , GFR 校正)。结论 VD 大鼠部分脑区 ReHo 值与对照组存在差异;双侧纹状体、右侧背外侧内嗅皮层及右侧新脑皮层改变可能与其认知功能下降有关。

[关键词] 痴呆,血管性;磁共振成像;大鼠

[中图分类号] R741; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2022)07-0975-04

血管性痴呆(vascular dementia, VD)主要指与脑血管病相关的认知、记忆功能损伤及精神行为异常^[1],临床表现与阿尔兹海默病较为相似,鉴别诊断困难;随着 MRI 技术的发展,静息态功能 MRI(resting-state functional MRI, rs-fMRI)及相关分析技术用于缺血性脑小血管病^[2],可观察能够间接反映神经元活动的接近生理状态下脑内血氧水平依赖(blood oxygenation level dependent, BOLD)信号自发活动。已有研究以 fMRI 所示局部一致性(regional homogeneity, ReHo)^[3]及功能连接^[4]评价 VD 患者,发现额叶-皮质下环路受损可能与认知功能损害有关,但部分脑区 ReHo 结果存在一定矛盾,可能与 MR 设备的分辨力、个体差异及患者配合度等因素相关。本研究采用 rs-fMRI 评价 VD 大鼠全脑 ReHo 变化,并观察其行为学改变。

1 材料与方法

1.1 建立实验动物模型 50 只 Wistar 雄性大鼠,体重 220~250 g,由哈尔滨医科大学附属第一医院动物中心提供,实验动物许可证号:SYXK(黑)2013-002 号,分别纳入 VD 组($n=35$)和对照组($n=15$),常规饲养,温度(21.0 ± 1.0) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%,明暗交替,自由采食与饮水,3 日后停饲 12 h 造模。

经腹腔注射 10%水合氯醛(350 mg/kg 体质量)麻醉大鼠后保定于小动物手术台,对颈部区域进行常规备皮、消毒及铺巾。沿大鼠颈部正中做切口,暴露双侧颈总动脉,分离迷走神经后,对 VD 组以细线结扎大鼠一侧颈总动脉两端并将其剪断,待大鼠生命体征平稳后分离另侧颈总动脉,以动脉夹夹闭 15 min 后通血 10 min,反复 3 次后予以永久性结扎;对照组仅行假手术,分离大鼠双侧颈总动脉而不予结扎。手术期间注意保暖,观察大鼠生命体征变化;术后逐层缝合皮肤并消毒,继续常规饲养 4 周。

1.2 Morris 水迷宫实验 以 4 个象限中的任意一点作为大鼠入水点,将其面向池壁放入水中,记录其游泳路线及爬上平台的时间(逃避潜伏期)。若大鼠于 90 s 内爬上平台即结束实验,超期则将其引导至平台上并停留 10 s 后结束实验。每只大鼠每日学习 2 次,持续 5 日^[5-6]。

1.3 图像采集 采用 Bruker 9.4T MR 仪,大鼠脑表面线圈。予大鼠吸入 5%异氟烷进行麻醉,扫描期间持续吸入 1%~2%异氟烷以维持麻醉,并以小型气枕头传感器(美国 SA 仪器有限公司)连续监测其呼吸状态。采集大鼠颅脑轴位、冠状位及矢状位 MRI,参数:T2WI, TR 3 000 ms, TE 33 ms, FOV 30 mm \times 30 mm,层数 30,层厚 1.0 mm,矩阵 256 \times 256,回波链长 8;行 T2 液体衰减反转恢复(fluid attenuated inversion recovery, FLAIR)序列扫描, TR 3 500 ms, TE 15 ms,层数 50,层厚 0.5 mm,矩阵 100 \times 100, FOV 30 mm \times 30 mm。

1.4 数据处理 采用 Matlab R2016b 平台中的统计参数映射(statistic parametric mapping, SPM)12 软件及 rs-fMRI 数据处理助手(data processing assistant for rs-fMRI, DPARSF)V4.3 版对 rs-fMRI 数据进行预处理。排除大鼠脑结构异常及成像质量不佳者。将 DICOM 数据格式转换为 NIFTI 格式,剔除前 10 个时间点的图像后,行去颅骨化处理、时间校正及头动校正,剔除头动 >2 mm,旋转 $>2^{\circ}$ 的图像。基于蒙特利尔神经研究所(Montreal Neurological Institute, MNI)坐标,利用空间归一化将所获数据配准至同一标准空间。

计算目标体素及其相邻 26 个体素的肯德尔一致性系数(Kendall's consistency coefficient, KCC),作为 ReHo 值,用于代表其在同一时间序列和空间位置上的活动一致性或相似度,以间接反映神经元活动的同步性,取值范围为 0~1,即局部脑区 ReHo 值增加代表神经元活动同步性增强、脑区活跃,ReHo 值减低提示神经元活动同步性降低。

1.5 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件。以双样本 t 检验比较 2 组大鼠逃逸潜伏期的差异。采用双样本 t 检验比较 2 组大鼠 ReHo 值存在差异的脑区,以 GFR 法校正多重比较,以校正前单个体素 $P<0.01$ 、团簇 >49 个体素和校正后 $P<0.05$ 区域为差异有统计学意义的脑区。

2 结果

造模后 VD 组 12 只大鼠死亡,3 只于图像分析过程中被排除,最终 VD 组共 20 只;对照组 1 只大鼠因

麻醉死亡, 4 只图像分析过程中被排除, 最终对照组 10 只大鼠纳入实验。

2.1 VD 大鼠行为学改变 Morris 水迷宫实验中, 对照组大鼠可于短时间内找到平台, 而 VD 组耗时较长; 随着学习次数增加, 2 组大鼠逃逸潜伏期均逐渐缩短, 但各时间点 VD 组逃逸潜伏期仍长于对照组 (P 均 < 0.01), 见图 1、2。

2.2 VD 大鼠 ReHo 值改变 VD 组大鼠双侧纹状体 ReHo 值低于对照组 ($P < 0.05$, GFR 校正), 右侧背外侧内嗅皮层、右侧新脑皮层 ReHo 值高于对照组 (P 均 < 0.05 , GFR 校正), 见表 1 及图 3。

表 1 VD 组与对照组大鼠 ReHo 值存在差异的脑区

脑区	定位 标号	MNI 坐标			T 值
		X	Y	Z	
左侧纹状体	120*	-36	-6	-63	-3.253
右侧纹状体	119*	43	-8	-52	-2.698
右侧背外侧内嗅皮层	12#	63	-71	-63	4.088
右侧新脑皮层	139*	47	-74	-63	4.237

注: * : 脑区定位参考文献[7]; #: 脑区定位参考文献[8]

3 讨论

目前用于制备 VD 动物模型的方法包括血管阻断法、血管栓塞法、颅内注射及转基因法等^[9]。血管阻断法主要通过夹闭或结扎大鼠颈总动脉减少其脑部供血。直接阻断大鼠双侧颈总动脉法重复性好、可致大鼠学习记忆功能受损明显, 且无神经功能缺损症状, 但所致大鼠死亡率较高^[10], 甚至达 65%^[11]。本研究采用两步血管阻断法, 先结扎一侧颈总动脉, 之后对另一侧颈总动脉先间歇阻断后再予结扎, 操作简便, 常用于建立慢性低灌注及白质损伤动物模型, 可使动物出现明显的学习、记忆功能障碍, 具有慢性、持续性等特点, 且不引起明显的感觉、运动功能损害。水迷宫实验通过

训练黑暗环境下大鼠辨别方向的能力, 可测试其学习和记忆能力。本研究各时间点 VD 组大鼠逃逸潜伏期均较对照组明显延长, 提示 VD 组大鼠学习、记忆功能均已出现障碍。

纹状体属于基底神经节, 主要包括尾状核与壳核, 其功能为调节肌肉张力、协调精细复杂运动。近年来, 越来越多的研究表明纹状体在学习认知方面也具有举足轻重的作用, 如 LI 等^[12]发现纹状体多巴胺能功能可随语言功能下降而缓慢降低, 尾状核头在此过程中起关键作用, 而壳核则通过影响强化学习和内隐学习参与学习、认知过程。纹状体由深穿支动脉供应, 为脑神经回路的重要中转站。结扎 VD 大鼠双侧颈总动脉可使其血脑屏障损伤、神经元细胞损伤和脑灌注减少, 导致纹状体损伤; 纹状体损伤与海马引起的认知功能下降具有协同作用, 可进一步导致认知功能下降。本研究发现 VD 组大鼠纹状体 ReHo 值较对照组减低, 进一步证实纹状体功能降低可能与大鼠学习认知下降相关; VD 大鼠脑灌注降低致纹状体区神经元活动异常, 使其神经元同步性降低, 而纹状体 ReHo 减低则影响多巴胺信号的传递, 进而影响大鼠认知功能, 与 THERMENOS 等^[13]的结论相似。

大鼠内外侧内嗅皮层分工不同, 内侧内嗅皮层主要负责编码空间信息, 而外侧内嗅皮层主要编码嗅觉及形状等信息。LEE 等^[14]采用光遗传学技术、单细胞电生理记录和光纤记录系统进行观察, 发现受多巴胺信号控制的小鼠外侧内嗅皮层扇形细胞在关联性学习过程中具有关键作用; 大脑将任务相关信息发送至海马前, 外侧内嗅皮层接受来自嗅觉区域的气味信息并进行转换, 成为奖赏相关信息, 提示外侧内嗅皮层直接编码奖赏相关学习记忆^[14]。新脑皮层为大鼠大脑中较晚出现的区域, 但其体积逐渐增大, 是大部分感觉的汇

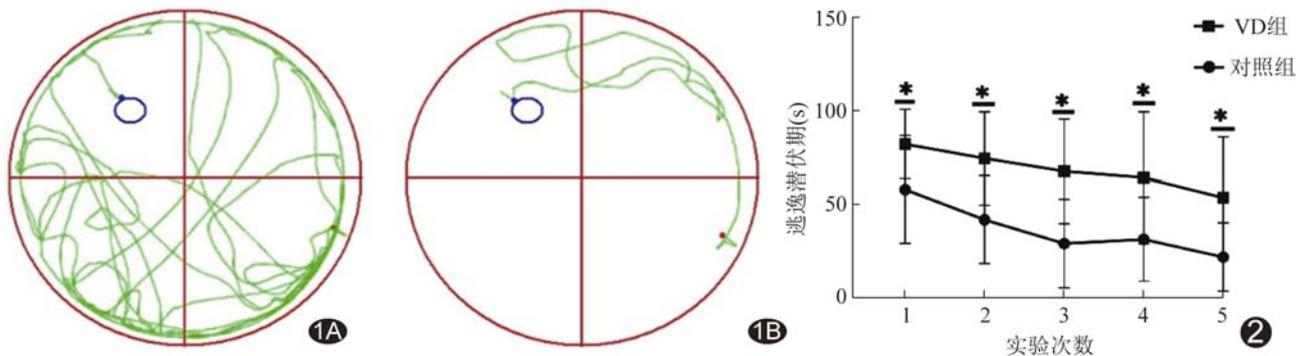


图 1 第 5 次 Morris 水迷宫实验大鼠游泳路线图 A. VD 组; B. 对照组 图 2 Morris 水迷宫实验大鼠逃逸潜伏期比较 (* : 与对照组比较 $P < 0.01$)



图 3 VD 组与对照组大鼠 ReHo 值存在差异的脑区 (右侧彩条代表 T 值大小)

总区,也是许多高级认知的关联皮层。本研究发现 VD 组大鼠右侧背外侧内嗅皮层及右侧新脑皮层 ReHo 值较对照组明显提高,提示水迷宫学习任务中,背外侧内嗅皮层处于关键环节,ReHo 值提高可能与 VD 组大鼠对位置信息的学习能力较差,须通过代偿性提高外侧内嗅皮层功能以弥补编码空间位置信息的能力缺失有关;新脑皮层 ReHo 值提高同样可能为代偿性反应,但其具体机制尚不明确,有待进一步观察。

综上,VD 大鼠模型局部 ReHo 值与对照组存在差异,其双侧纹状体、右侧背外侧内嗅皮层及右侧新脑皮层改变可能与认知功能下降有关。但本研究样本量小,未进一步分组观察,且未进行相关血液因子检测,有待后续加以完善。

[参考文献]

[1] 詹孔才,万瑶瑶,周伟强,等. MRI 线性测量对阿尔茨海默病与血管性痴呆的鉴别诊断价值 [J]. 海南医学, 2016, 27 (14): 2316-2318.
 [2] 杨君,李传明,刘晨,等. 缺血性脑白质病变伴轻度认知功能障碍患者记忆障碍的静息态功能磁共振成像 [J]. 中国医学影像技术, 2015, 31(4):512-517.
 [3] ZUO M, XU Y, ZHANG X, et al. Aberrant brain regional homogeneity and functional connectivity of entorhinal cortex in vascular mild cognitive impairment: A resting-state functional MRI study [J]. Front Neurol, 2019, 9:1177.
 [4] ZHOU X, HU X, ZHANG C, et al. Aberrant functional connectivity

and structural atrophy in subcortical vascular cognitive impairment: Relationship with cognitive impairments [J]. Front Aging Neurosci, 2016, 8:14.
 [5] 胡跃强,赖菁菁,汪庭龙,等. 温肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4):1804-1807.
 [6] 靳贺超,于文涛,刘晓,等. 补肾活血方对血管性痴呆大鼠海马细胞凋亡及 ERK2, CREB 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12):129-135.
 [7] DOOLITTLE N D, KORFEL A, LUBOW M A, et al. Long-term cognitive function, neuroimaging, and quality of life in primary CNS lymphoma [J]. Neurology, 2013, 81(1):84-92.
 [8] VALDÉS-HERNÁNDEZ P A, SUMIYOSHI A, NONAKA H, et al. An in vivo MRI template set for morphometry, tissue segmentation, and fMRI localization in rats [J]. Front Neuroinform, 2011, 5:26.
 [9] 彭晓燕,万婷,张丽丹,等. 血管性痴呆大鼠模型的研究概述 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2):311-314.
 [10] 胥青梅,白雪. 血管性痴呆动物模型的研究概述 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(4):391-394.
 [11] 葛侠,张庆萍,汪克明,等. 血管性痴呆大鼠模型两种复制方法的比较 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(1):16-17, 21.
 [12] LI H, HIRANO S, FURUKAWA S, et al. The relationship between the striatal dopaminergic neuronal and cognitive function with aging [J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12:41.
 [13] THERMENOS H W, JUELICH R J, DiCHIARA S R, et al. Hyperactivity of caudate, parahippocampal, and prefrontal regions during working memory in never-medicated persons at clinical high-risk for psychosis [J]. Schizophr Res, 2016, 173(1-2):1-12.
 [14] LEE J Y, JUN H, SOMA S, et al. Dopamine facilitates associative memory encoding in the entorhinal cortex [J]. Nature, 2021, 598(7880):321-326.