

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫 : Mapping plasticity in the rat hippocampus after
* 名稱 prenatal radiation exposure using MEMRI
* *****

執行計畫學生： 郭乃瑛
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-009-B
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 翁駿程

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學影像暨放射科學系

中華民國 100年03月04日

二、研究計畫內容：

(一)摘要

在懷孕早期時接受放射和核子醫學檢查以及放射治療會使胚胎增加罹患腦腫瘤的風險，胚胎時期受到輻射曝露會導致不同疾病，例如腦積水、胎兒畸形還有海馬迴萎縮等疾病。在輻射曝露下會造成腦室擴張和破壞內皮血管細胞，近而引起腦積水症狀的產生。近年來，錳離子增強磁振造影技術已被證實能夠用來觀察神經結構，且能有效的評估經放射線照射所引起的中樞神經系統疾病。因此我們實驗的目的是透過錳離子增強磁振造影技術來評估在胚胎時期接受輻射曝露所導致的神經系統疾病。在實驗結果顯示，經靜脈注射錳離子造影劑會使組織的T1值縮短，並且能觀察到在正常鼠及胚胎時期受輻射曝露的老鼠其海馬區域與細胞內有錳離子濃度的改變，而腦室有體積的變化。在此利用量化錳離子增強磁振造影技術提供在胚胎時期受輻射暴露導致腦部退化更多的評估和診斷訊息。

關鍵字：輻射暴露、胚胎、中樞神經系統、錳離子增強磁振造影、顯影劑

(二)研究動機與研究問題

目前非侵入性的診斷工具有X光攝影、電腦斷層及數位化血管攝影等，雖然這些診斷工具能提供我們直接透視分析身體各部分的內在構造，包括頭部和腹部一些創傷、腫瘤、不正常的解剖構造的存在與否，或從外在創傷導致的身體上的變化以及對身體器官定位非常有幫助，但是這些診斷工具會帶來輻射劑量對細胞或組織造成傷害的風險。懷孕早期的婦女在工作、生活以及疾病等情況下經常會暴露於輻射下，它會使胚胎、胎兒或新生兒死亡而存活嬰兒常伴有嚴重發育不全或畸形、生長發育遲緩、身高、體質低於正常兒且發生惡性腫瘤的概率也較高，在神經系統快速成長時接受到輻射線照射，神經系統的缺損嚴重程度會和劑量呈高度相關性。

現今在臨床上想了解神經組織受到輻射傷害的情況，大多都是利用病理切片、核子醫學來了解，在病理檢查中顯示輻射暴露會導致海馬迴萎縮等神經病變，但這些檢查都是屬於侵入性的方法，因此在這個研究中我們選擇最小侵入性的錳離子增強磁振造影技術(manganese-enhanced magnetic resonance imaging, MEMRI)做為觀察在胚胎時期時受到放射線傷害的成鼠神經受損狀況。MEMRI可以讓我們了解大腦的神經受損程度及病變情形，藉由注射錳離子到大鼠腦內，當一個區域被活化時錳離子可由鈣離子通道進入神經細胞，錳離子會順著軸突運輸傳送至軸突末端釋放，再被下一個神經細胞吸收，含有錳離子的神經細胞可以在T1加權影像上被突顯出來產生亮訊號，藉此我們了解神經系統的構造及受損程度。但是錳具有生物金屬毒性，可利用分次劑量注射錳離子能減輕其毒性，目前仍在動物實驗階段，未來朝藥物修飾研發成適合臨床上使用的顯影劑，增進人

類福祉。

(三)文獻回顧與探討

3-1 輻射照射對胚胎的影響

在懷孕之後兩週內(著床前)照射游離輻射並沒有觀察到會增加胎兒畸形的機會,可能若游離輻射對著床前的胚胎有傷害的話,就直接造成流產。其他懷孕期間暴露游離輻射則被報告增加流產、死產、新生兒死亡、出生兒先天缺陷。暴露游離輻射的時間和胎兒神經系統的發育息息相關,若在懷孕前七週暴露不會觀察到出生兒心智發育遲緩、IQ 低、痙攣,但是若在懷孕 8-15 周暴露大於 0.5Gy 的輻射量,因為懷孕 8-15 周是胎兒神經系統正在發展及神經細胞一動的顛峰時期,會發現新生兒神經系統的缺損且呈劑量—反應關係。雖然我們是指 0.5 Gy 以上暴露,但是在這一段時期我們不能明確的定出一個閾值是不會引起神經系統的傷害的。在懷孕 16-25 周暴露游離輻射也是會影響新生兒的神經系統發展,但是沒有 8-15 周那麼劇烈,沒有明顯的劑量—反應關係,且似乎有一個不會造成傷害的閾值。懷孕 25 周之後再照射游離輻射,會造成新生兒體重較低,但是在其他方面都正常。〔1〕

3-2 造影劑

(1)陽性造影劑(positive contrast agent):所謂的陽性造影劑是指可以用來縮短 T1,在 T1 加權影像上面可以增強訊號,呈現明亮的影像。此種造影劑大部分為包含釧系元素、錳或是鐵離子的小分子量化合物。這些元素皆具有未成對電子和長的鬆弛速度。常見的陽性造影劑有用於中央神經系統和全身,例如 Gd-DTPA、Gd-HP-D03A 和 Gd-DOTA。而 Mn-DPDP 特別用於觀察肝臟的損害。〔2〕

(2)陰性造影劑(negative contrast agent):陰性造影劑,在 MRI 影像上主要呈現黑色的影像,是由超順磁氧化鐵(superparamagnetic iron oxide)微粒子鎖聚集的化合物,可以縮短 T1 和 T2 的鬆弛時間。超順磁氧化鐵粒子和超微順磁氧化鐵粒子(小於 300nm)是由包含數以千計的鐵原子所構成的結晶性氧化鐵核心和聚合體外殼層所組成,造成非常高的 T2 鬆弛速度。特殊型的陰性造影劑為全氟化碳(perfluorocarbons),因為他可以將氫原子排除在外,而顯示出黑色的影像。〔2〕

3-3 MEMRI

錳離子是最近推出的磁振造影像技術用於高分辨率的解剖,可活體觀察腦中有較高的活性區域,加上其生化特質與鈣離子相似,當一個區域被活化時可由鈣離子管道進入神經細胞。由於神經系統沒有代謝錳離子之機制,因此錳離子會順著軸突運輸傳送至軸突末端釋放,再被下一個神經細胞吸收,含有錳離子的神經

細胞可以在 T1 加權影像上被突顯出來，使錳離子可作為顯影劑、神經徑路追蹤劑、以及神經活動標記，通稱為「錳離子增強磁振造影」。相較於功能性核磁共振顯影，錳離子增強磁振造影顯影的信號提升率較高，且提供一個能直接追蹤神經活動之方法，MEMRI 可以用在檢測特定的變化包含重硬化症在胼胝體這個區域的離子平衡的可能現象，並顯示三維分佈的海馬迴 mossy fiber 的路徑，錳離子的累積在 CA3 區和齒狀海馬迴是最有反應訊號的地方且在注射顯影劑 24hr 後會獲得最佳的影像。〔3, 4〕

3-4 分次劑量注射

錳的分次劑量增強了 MR 影像訊號此獨特的性能讓錳成為 MR 的神經造影劑，錳需要相當劑量才能在腦部產生高對比度，但是錳是具有毒性，高劑量的錳會對神經系統產生影響，利用分次劑量減輕錳離子作用在動物的毒性，腦中的錳離子累積在不同的地方是根據大腦的神經元密度。在人類和靈長類高劑量的錳離子會產生錳中毒，有可能是因錳離子累積在基底神經節，在齧齒動物上主要危險是急性損害心臟和肝臟，特別是在動物有癌症或是中風等健康損害時。

我們無法測試大腦中錳離子在高分次劑量中飽合的程度，因為劑量超過 180mg/kg 就會達到死亡，在第一次注射時老鼠體重都會下降，下降不超過原始體重的 10%，在錳離子注射劑量為 60mg/kg 時或是超過 60mg/kg 以上時會在注射部位產生毒性作用。在腹腔注射的大鼠中，有少數動物產生硬化導致腹腔中大量出血，發生腹腔大量出血主要是因為技術的錯誤，在腹腔注射位置不夠深，在靜脈注射的動物中接受 90mg/kg 分次劑量，有時在注射部位的尾巴下面會看到嚴重壞死，嚴重壞死現象存在每隻老鼠注射單次劑量為 180mg/kg，雖然錳離子水溶液等張性和緩衝的生理 PH 值，但仍有金屬本身的毒性作用在接觸的組織上，所以最安全的注射路線為注射到大空間的腹腔中。發現重覆分次劑量在 30mg/kg 的氯化錳水溶液在 T1 加權影像產生更好的訊號增強比單一次的劑量為 30mg/kg 訊號增強來的好，此劑量也是動物能容忍的劑量範圍，確定分次注射的次數已達到能充分發揮增強訊號的功能並也限制了錳離子的毒性。除此之外，在大腦中能夠分辨結構是在低錳離子的分次劑量，想分辨在大腦精細的結構是由高劑量分次來解決的。〔5〕

3-5 腹腔注射

(1) 先替老鼠量體重，計算造影劑劑量。

(2) 先保定老鼠時，將老鼠頭部朝下傾斜，讓頭部低於身體，是為了使腹腔中最大的器官肝臟向地面，避免插入肝臟。

(3) 腹腔注射位置通常在下腹部偏左或偏右處，避免將針插入膀胱，以酒精消毒後，取適當大小的針頭，穿過下腹部的皮膚、皮下及腹膜。

(4) 先回抽以確定沒有刺到腸或膀胱。若無回抽物，即可將物品緩慢注入腹

腔；若刺到腸或膀胱，則必須換掉針頭及針筒。

(四)研究方法及步驟

4-1 研究步驟

(1)取得兩組成鼠，一組是正常健康的成鼠；另一組是在胚胎時期接收到放射線照射的成鼠。

(2)將大鼠依放射線照射劑量分組，依其在胚胎時期接收照射劑量有 0.75Gy 及 1.5Gy

(3)利用分次劑量注射找尋大鼠能忍受其顯影劑錳離子毒性的劑量，並分次注射 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 。

(4)24hr 後利用氣麻裝置(isoflurane)將成鼠麻醉。

(5)將受麻醉的成鼠放置在 1.5Tesla 的 MR 下做造影。

(6)將做完造影後所得的資料研究討論。

4-2 研究方法

將 400-500g Wistar 大白鼠分為三組，一組是健康的成鼠做為對照組(n=5)，另二組是在胚胎期 7 天時接受由 Varian Linac 發出 6MeV X-ray 照射的成鼠為實驗組，實驗組分為接收 0.75Gy (n=5)與 1.5Gy (n=5)二種放射線照射劑量，為探討接收不同放射線劑量對海馬迴受傷的影響程度。分組後由腹腔進行分次注射錳離子顯影劑($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)到成鼠體內，總劑量為 175mg/Kg (0.12M)，在注射時以 isoflurane 2% 氣體麻醉把成鼠麻醉並給予溫水循環加熱使成鼠不至於在麻醉情況下失溫，注射後經 24 hr 後以 1.5T SIEMENS Magnetom Sonata 進行造影，使用 T2WI 與 spin echo, gradient echo and MPRAGE T1WI 的 MRI 影像造影結束後將資料拿到 mathematica 去分析，觀察海馬迴的 mossy fiber、腦室。

實驗設備及裝置：

1. 氣麻裝置

壓縮氣鋼筒、壓力錶、減壓裝置、流量計、吸入麻醉藥汽化器、二氧化碳吸收裝置、導向活瓣、逸氣活閥。

2. 麻醉箱

清醒的動物很難直接帶面罩，所以先將清醒的動物放入該箱進行預麻醉。

3. 氣體麻醉藥

異氟醚(Isoflurane 1.5-2% with O₂)。

4. 熱水循環裝置(water bath, temperature controller)

在該水箱上設置有連接水冷熱毯的進水快速接頭和出水快速接頭，用於形成水循環通道，此裝置溫度設在 37 度，給麻醉中大鼠加熱保暖。

5. 動物架設系統

牙齒勾桿(tooth bar)-作用在勾住動物牙齒，以利固定麻醉中的動物。

耳朵固定桿(ear bar)-作用亦在固定動物頭部，以利實驗進行。

6. 實驗機組

1.5T 磁振造影儀 (SIEMENS Magnetom Sonata)使用 finger loop 線圈做掃描。



圖 3.1 氣麻裝置

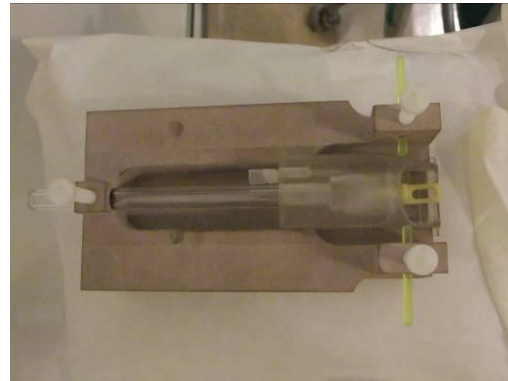


圖 3.2 動物架設系統



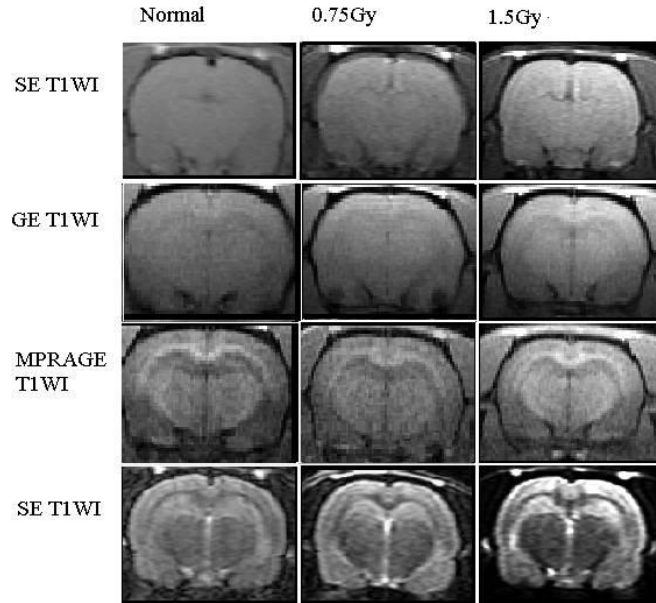
圖 3.3 磁振造影機組



圖 3.4 熱水循環裝置

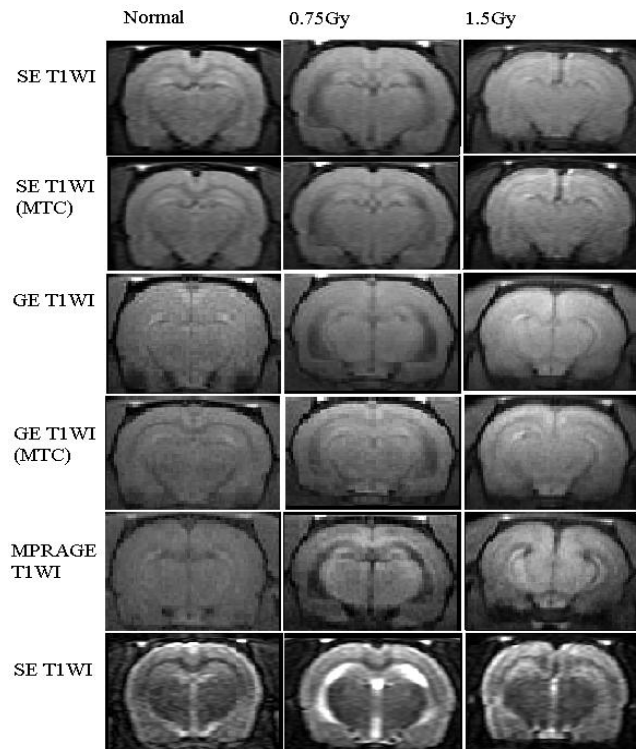
(五) 結果與討論

圖一為未注射錳離子顯影劑的大鼠在 1.5T SIEMENS Magnetom Sonata 造影所得到的影像，橫軸分別為胚胎期未受放射線照射、胚胎期 7 天時受到 0.75Gy 放射線照射及胚胎期 7 天時受到 1.5Gy 放射線照射，縱軸為利用不同 Sequence 造影。圖一中顯示出在胚胎時期接受到放射線照射的大鼠在成鼠後，其腦部腦室會有擴大的現象，且接受 1.5Gy 輻射劑量照射後，腦室擴大現象更為明顯。



圖一為未注射錳離子顯影劑

圖二為大鼠以分次劑量注射錳離子顯影劑經 24 小時後在 1.5T SIEMENS Magnetom Sonata 造影所得到的影像，橫軸分別為胚胎時期未受放射線照射、胚胎期 7 天時受到 0.75Gy 放射線照射及胚胎期 7 天時受到 1.5Gy 放射線照射，縱軸為利用不同 Sequence 造影。圖二中顯示經注射錳離子顯影劑後能觀察到在胚胎時期接受到放射線照射的大鼠在成鼠後，其腦部腦室有擴大的現象在海馬迴有萎縮的情況，海馬迴並有錳離子增強的訊號。



圖二為注射錳離子顯影劑

接著，我們利用三種指標來評估在胚胎時期接受放射線照射後腦部神經受損狀況：

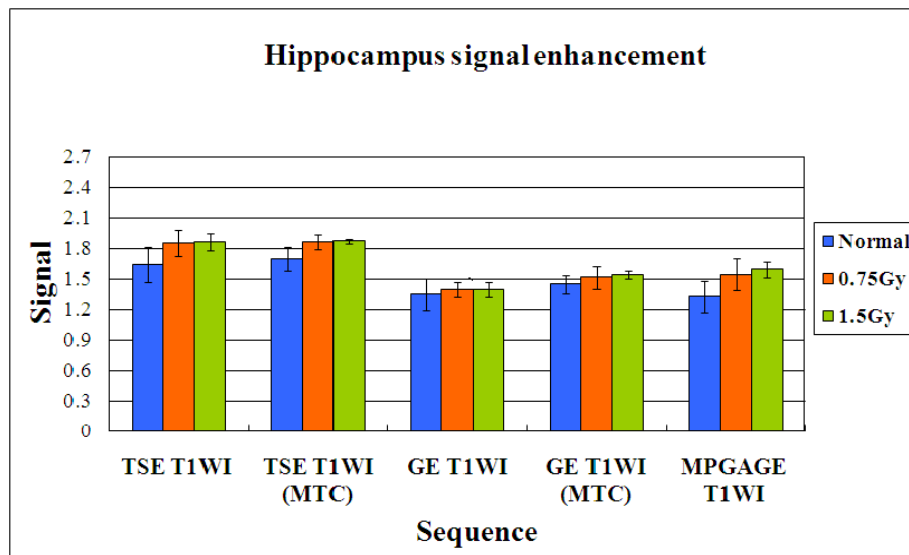
1. 海馬迴受錳離子增強的訊號量

在表一中利用海馬迴的平均值/肌肉平均值此式得到海馬迴受錳離子增強的訊號量。並將結果繪製成圖三。

表一、海馬迴受錳離子增強的訊號量

MR signal	Normal	0.75Gy	1.5Gy
TSE T1WI	1.644±0.386	1.8552±0.290	1.863±0.1845
TSE T1WI (MTC)	1.697±0.264	1.866±0.169	1.871±0.051
GE T1WI	1.3521±0.346	1.398±0.154	1.400±0.164
GE T1WI (MTC)	1.451±0.202	1.519±0.253	1.543±0.095
MPRAGE T1WI	1.327±0.355	1.545±0.341	1.595±0.171

由圖三可以觀察到在胚胎期7天時接受1.5Gy放射線照射的成鼠其海馬迴訊號亮度大於在胚胎期7天時接受0.75Gy放射線照射的成鼠，且兩者的海馬迴訊號亮度皆大於正常大鼠的海馬迴訊號亮度。



圖三、海馬迴受錳離子增強的訊號量圖

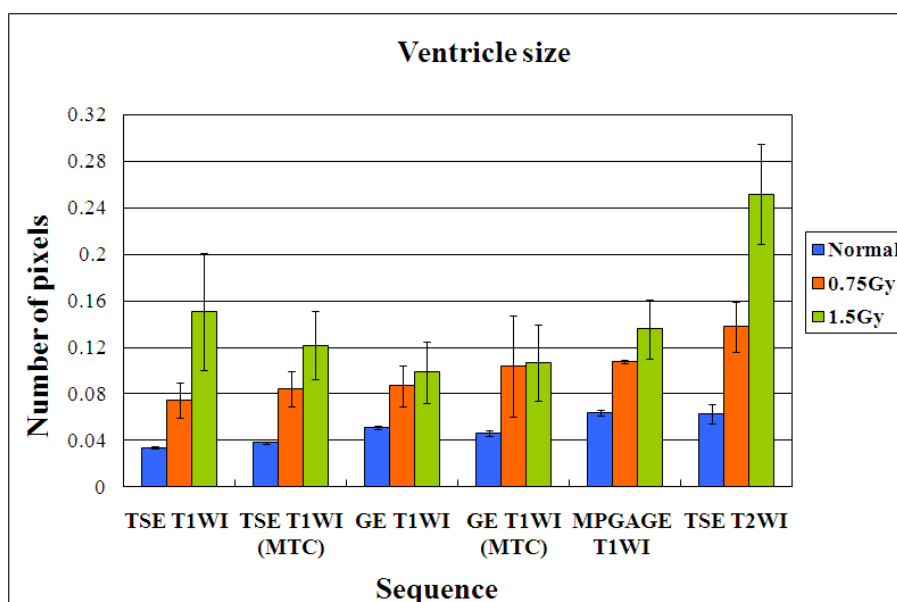
2. 腦室和大腦的尺寸比例

在表二中利用腦室的像素個數/大腦的像素個數此式得到腦室和大腦間的尺寸比例關係。並將結果繪製成圖四。

表二、腦室和大腦的尺寸比例

Ventricle/ hole brain	Normal	0.75Gy	1.5Gy
TSE T1WI	0.034±0.003	0.075±0.034	0.151±0.113
TSE T1WI (MTC)	0.038±0.003	0.084±0.034	0.122±0.066
GE T1WI	0.051±0.004	0.087±0.039	0.099±0.059
GE T1WI (MTC)	0.046±0.005	0.104±0.097	0.107±0.074
MPRAGE T1WI	0.064±0.005	0.108±0.004	0.136±0.057
TSE T2WI	0.063±0.019	0.138±0.048	0.252±0.096

由圖四可以觀察到在胚胎期 7 天時接受 1.5Gy 放射線照射的成鼠其腦室尺寸大於在胚胎期 7 天接受 0.75Gy 放射線照射的成鼠，且兩者的腦室尺寸皆大於正常大鼠的海馬迴訊號亮度。



圖四、腦室和大腦的尺寸比例圖

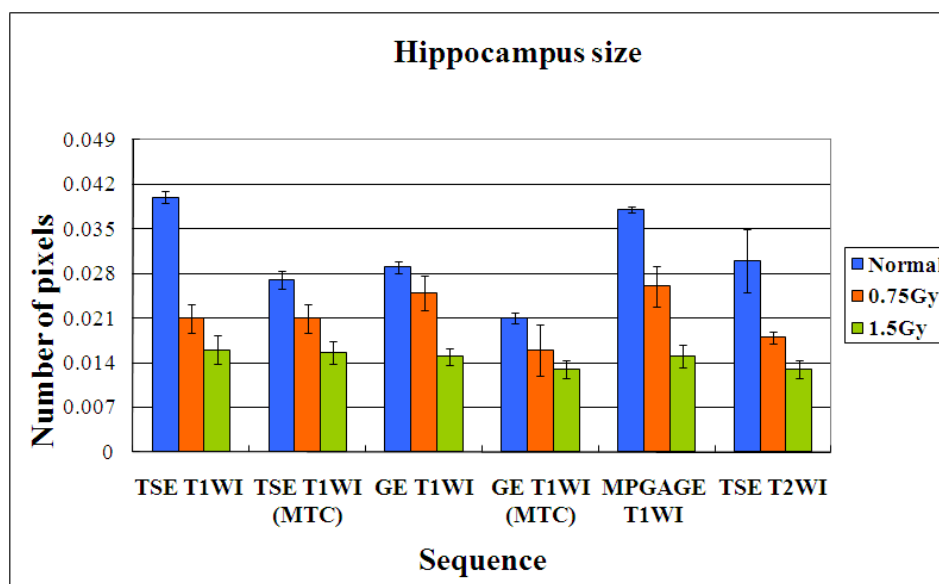
3. 海馬迴和大腦的尺寸比例

在表三中利用海馬迴的像素個數/大腦的像素個數此式得到海馬迴和大腦間的尺寸比例關。並將結果繪製成圖五。

表三、海馬迴和大腦的尺寸比例

Hippocampus/ hole brain	Normal	0.75Gy	1.5Gy
TSE T1WI	0.040±0.002	0.021±0.005	0.016±0.005
TSE T1WI (MTC)	0.027±0.003	0.021±0.005	0.0156±0.004
GE T1WI	0.029±0.002	0.025±0.006	0.015±0.003
GE T1WI (MTC)	0.021±0.002	0.016±0.009	0.013±0.003
MPRAGE T1WI	0.038±0.001	0.026±0.007	0.015±0.004
TSE T2WI	0.03±0.011	0.018±0.002	0.013±0.003

由圖五可以觀察到在胚胎期 7 天時接受 1.5Gy 放射線照射的成鼠其海馬迴尺寸小於在胚胎期 7 天接受 0.75Gy 放射線照射的成鼠，且兩者的海馬迴尺寸皆小於正常大鼠的海馬迴。



圖五、海馬迴和大腦的尺寸比例圖

(六) 結論

胚胎時期受到放射線照射傷害，會使大腦萎縮、腦室擴大，並傷害到腦部海馬迴的 mossy fiber 神經生長使海馬迴萎縮，在 MEMRI 中海馬迴成像為亮訊號。因此我們藉由錳離子做為顯影劑幫助我們可觀察到這些神經受到不同放射線之受傷程度，並與對照組比較可得到量化結果，未來朝藥物修飾研發成適合臨床上使用的顯影劑，增進人類福祉。

(七) 參考文獻

[1]趙玫、丰慧根 (2006)：高溫聯合輻射對胚胎神經發育及腦熱應激蛋白的影響。

[2]劉志忠 (2007)：Behavior of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents under Magic-Angle-Spinning.

[3]. 陳可欣(2007)：《Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging (MEMRI) Reveals Functional Connectivity Associated with Learning》. 臺灣大學心理學研究所碩博士論文

[4]黃婷婷(2007)：Applications of manganese- enhanced MRI to image the nervous system of animals.

[5]Nicholas A. Bock, Fernando F. Paiva and Afonso C. Silva (2008) Fractionated manganese- enhanced MRI. NMR Biomed 21 , pp. 473-478

[6]Riikka J. Immonen, Irina Kharatishvili, Alejandra Sierra, Christine Einula, Asla Pitkänen, and Olli H. J. Gröhn (2008) Manganese enhanced MRI detects mossy fiber sprouting rather than neurodegeneration, gliosis or seizure-activity in the epileptic rat hippocampus. NeuroImage 40 , pp. 1718-1730

[7]Afonso C. Silva, and Nicholas A. Bock (2008) Manganese-Enhanced MRI: An Exceptional Tool in Translational Neuroimaging. Schizophrenia Bulletin vol. 34 no. 4 pp. 595-604