

实验方法

大鼠脑皮层血管栓塞和再生过程的实时动态记录方法

丁惠洁^{1, #}, 刘珂舟^{1, 3, #}, 杨珊珊², 李鹏², 严明^{1, *}

¹杭州电子科技大学生命信息与仪器工程学院, 杭州 310018; 浙江大学²光学科学与工程学院; ³生物医学工程与仪器科学学院, 杭州 310027

摘要: 本研究旨在建立观察脑皮层血管堵塞、脑缺血损伤区血管再生、重构的动态变化过程的方法。创建能够在体连续观测大鼠皮层血管缺血后变化的动物光窗模型, 并用光化学栓塞法建立大鼠皮层局部脑缺血模型, 通过光相干层析成像术 (optical coherence tomography, OCT) 实时记录血管堵塞的形成过程以及周围小血管的损伤、再生情况。结果显示, 激光照射 30 min 可以形成完全堵塞大鼠皮层血管的栓塞; 缺血后 24–48 h 内, 脑损伤程度最大, 损伤区域内血管数量达到最少, 随后堵塞的主血管开始疏通, 缺血区域内周围小血管开始再生; 激光照射后皮层浅层/深层的小血管显著消失, 在照射后第 10 天, 皮层浅层出现大量新生血管, 而深层血管仍未恢复。以上结果表明, 本研究建立的方法可以进行不间断地长期观测, 为深入定量研究脑缺血恢复期间栓塞血管及周边毛细血管的动态奠定了基础, 为损伤区血管重构网络调控模式研究提供帮助, 为脑缺血性疾病的治疗提供理论指导和新研究方法。

关键词: 光化学栓塞法; 局部脑缺血; 光相干层析成像; 血管再生

中图分类号: R363.1; R363.2+1

Real-time dynamic recording of cerebral cortical vascular embolization and regeneration in rats

DING Hui-Jie^{1, #}, LIU Ke-Zhou^{1, 3, #}, YANG Shan-Shan², LI Peng², YAN Ming^{1, *}

¹College of Life Information and Instrument Science, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, China; ²College of Optical Science and Engineering; ³College of Biomedical Engineering and Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

Abstract: The purpose of this study was to establish a method to record the dynamic process of vascular regeneration and remodeling in rat cerebral ischemic regions. An animal brain window model was established to continuously observe the changes of rat cortical vascular ischemia *in vivo*, and the model of cerebral ischemia was established by photochemical embolization. Optical coherence tomography (OCT) was performed to record the formation of vascular blockage and the injury and regeneration of small vessels during cerebral ischemia recovery. The results showed that 30 min of laser irradiation could completely block the cortical vessels in rats. Within 24–48 h after ischemia, the degree of brain injury was the greatest, and the number of blood vessels in the ischemic region reached the minimum. Then the blocked blood vessels began to be dredged, and the small blood vessels around the ischemic area began to regenerate. Small blood vessels in the superficial/deep layers of the cortex disappeared significantly after laser irradiation. During 10 d after ischemia, the blocked blood vessels were gradually dredged and recovered. On the 10th day after laser irradiation, a large number of neovascularization appeared in the superficial layer of cortex, but the deep vessels did not recover. These results indicate that the method established in this study can observe the changes of blood vessel in cerebral ischemic region continuously, which lays a foundation for further quantitative study on the dynamics of embolized blood vessels and peripheral capillaries during the recovery of cerebral ischemia.

Key words: photothrombosis; focal cerebral ischemia; optical coherence tomography; angiogenesis

Received 2018-10-09 Accepted 2018-12-03

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31401008).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: yanming@hdu.edu.cn

脑卒中又称中风或脑血管意外,是近几十年来影响人们寿命的主要原因之一。卒中分为出血性和缺血性两大类,其中发病率较高的为缺血性卒中,占卒中病例总数的60%~80%^[1],其高患病率、高死亡率、高致残率严重影响到患者的生存质量,使得患者及其家人承受着巨大的精神、身体以及经济等方面的压力^[2]。

在脑缺血损伤造成的大脑损伤区中,血管的再生与重构是一个复杂的四维时空过程,了解其动态变化过程以及再生血管的特性对于损伤的治疗和功能的康复有着至关重要的作用。缺血性脑卒中发生后,经典炎症小体途径在脑卒中过程中活化,进一步加重脑损伤,影响缺血区血管重构进程^[3]。研究表明,缺血损伤的程度不仅取决于动脉闭塞时间,而且与侧支血管循环相关^[4]。缺血后产生的组织缺氧往往会导致血管的代偿性生长,以满足供血代谢的需求^[5]。血管恢复的程度与脑卒中患者的生存率显著相关^[6,7]。Krupinski等人曾对卒中后存活时间为5~92天的患者进行脑组织切片研究,发现卒中后梗死区微血管密度较正常侧高,且微血管密度高者,中位存活时间相对长,表明卒中后血管再生可在一定程度上改善预后^[8]。因此,研究脑卒中的发病过程及其后的血管再生行为,成为近年来研究热点。与此同时,脑缺血动物模型建立方法也日趋成熟,其中,由Waston等^[9]建立的光化学栓塞型局灶性脑缺血模型,通过控制光源的强度、时间和药物用量来控制脑梗死的部位、范围和深度;该方法具有操作简便,侵入性小,模型存活时间长,稳定性好,重复率高的特点,其最大的优势在于研究人员可以针对性地控制梗死灶位置和大小,俗称定点卒中,是研究缺血性脑卒中病理机制的良好方法^[10]。

然而,目前所有针对脑缺血损伤的研究都无法得到血管栓塞和再生的在体实时数据,均是通过离体的方法在离散的时间点得到大脑损伤和血管分布的参数。由于是离体数据,对于同一只大鼠,无法得到全部离散的时间点的血管变化情况,无法记录某一根特定的血管长时程变化。因此,为了研究生物组织缺血后的血管网络恢复过程,需要建立能够实时在体观测血管变化的动物模型,并且使用先进的影像学技术进行记录。

近年来,光相干层析成像术(optical coherence tomography, OCT)是发展较快的一种新型层析成像技术,特别是在生物组织活体检测和成像方面具有

诱人的应用前景,是上述领域中继X-CT和磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)技术之后的又一大技术突破。由于光化学脑缺血动物模型的照射(光源选定后)范围、部位、时间、功率可控,因此,缺血模型可做定点卒中,可操作性强,重复率高,非常有助于对缺血脑组织进行对比研究^[11,12]。

本研究旨在建立一种适合长时程实时在体观测大鼠脑皮层血管的方法,结合光化学栓塞法局部脑缺血模型,采用OCT成像技术对脑皮层缺血大鼠实施血管成像,实时记录缺血前后皮层血管的变化过程,观察血管在缺血损伤后的再生过程,揭示血管再生过程的规律,为脑缺血性损伤评估和康复奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF级Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠,体重220~250 g,7~8周龄,购于浙江省动物医学科学院,置于恒温、恒湿动物房饲养,定时提供食物和水,本研究动物实验方案经浙江大学实验动物伦理委员会批准,对动物的处理均符合国际动物使用准则。

1.2 试剂及仪器 立体脑定位仪(C6V06-001,深圳瑞沃德生命科技有限公司),手动颅骨钻(STRONG90,深圳瑞沃德生命科技有限公司),戊巴比妥钠,孟加拉玫瑰红(rose bengal)和琼脂糖购自Sigma-Aldrich公司,义齿基托聚合物(Vertex-Dental B.V.,荷兰),离心管(1.5 mL,杭州浙大同心科教仪器有限公司),大鼠脑切片模具(200~400 g, ASI Instruments公司),激光器(MW-GX532/100 mW,长春新产业光电技术有限公司)。本研究采用的OCT成像系统由浙江大学光电系设计并组装完成,具体包括包括光学低相干干涉系统、光电转换及电信号处理、图像识别处理、显示等三大部分。宽带光源选用超发光二极管(Thorlabs, SLD1325, Newton, NJ, 美国),该光源中心波长为1325 nm,半峰全宽为100 nm。探测臂使用焦距为36 mm的物镜将探测光束聚焦在感兴趣区域,横向分辨率约为10 μm ,焦深约122 μm 。光谱仪的设计光谱分辨率为0.076 nm,空气中零光程每一侧的理论成像深度约为2.9 mm。

1.3 大鼠脑部光窗制作 为了配合OCT成像系统更好地拍摄记录大鼠皮层血管,在大鼠头部制作一个适用于大鼠皮层血管长期观察、稳定的光窗。光窗主要的盖帽部分由离心管(1.5 mL)制作而成,简

单易行、成本低廉，具体制作流程如图 1A 所示，用剪刀减去离心管底部，保留长度为 6 mm，防止因离心管过高减少光线的透入而导致成像效果不佳，同时用 20 mL 注射器针头刺穿离心管盖帽，以便增加渗出液的蒸发，促进大鼠手术创口的愈合。

术前将手术器械、生理盐水、琼脂、玻璃片、剪短并盖穿孔的离心管进行 121 °C、20 min 的高温高压灭菌备用。大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (0.5 mL/100 g)，每只额外增加 0.5 mL。剃除大鼠眼部至耳朵区域的毛发，用立体脑定位仪固定大鼠头部，用碘伏、酒精进行头部皮毛常规消毒，腹腔注射 0.5 mL 甘露醇和 0.5 mL 地塞米松。剪去顶部头皮，露出颅骨，清理皮下组织，及时用电凝刀进行止血，用洗耳球吹干颅骨，使得纹路更清晰，在颅骨四周钻孔，固定颅钉。用记号笔以距离矢状缝 2 mm，

冠状缝 4.5 mm 为中心位置画出 2 mm × 3 mm 的矩形，用颅钻沿着矩形边缘打磨开窗。去除颅骨后，立即腹腔注射甘露醇 0.5 mL，降低颅压，防止脑部凸起。小心挑去窗口内的硬脑膜后，以 1 mL 针筒抽取 60 °C 保温的 0.2% 琼脂糖溶液，待其温度降至约 45 °C 时滴入窗口，并迅速盖上直径 8 mm，厚度 0.2 mm 的圆形玻璃片，等待琼脂糖凝固后，清理玻片表面及周边残留的琼脂糖。用牙科胶将玻璃片固定于窗口上方，和颅钉粘结。将离心管置于颅骨玻璃片上方，尽量将离心管中央对准窗口，用手固定离心管，同时用牙科胶粘合离心管及其周围的玻璃片边缘。用牙科胶密封玻璃片周围，最后用牙科水泥覆盖所有裸露颅骨以便更好地固定离心管 (图 1B)。手术完成后大鼠头部光窗的实物图如图 1C 所示。

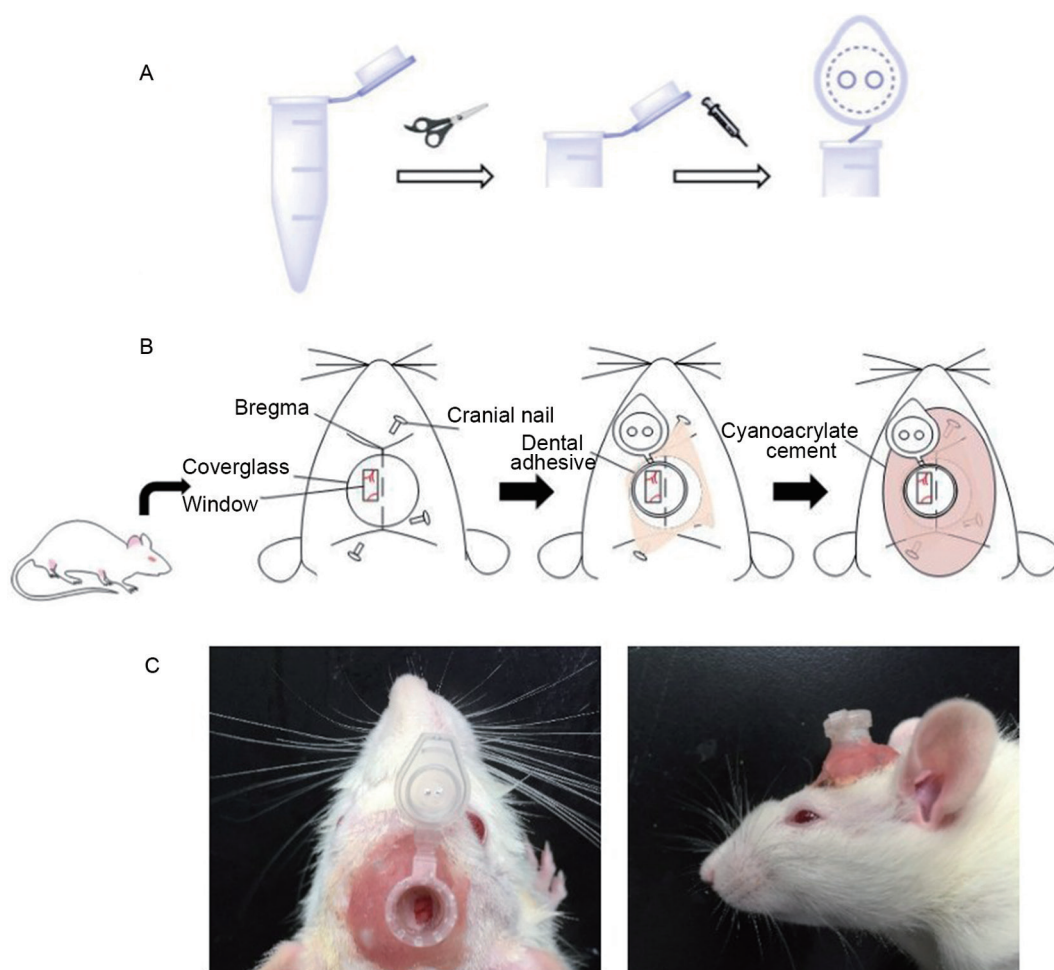


图 1 大鼠脑部光窗制作流程图及实物图

Fig. 1. The process flow diagram and the photo of rat brain window system. A: Processing steps of centrifugal pipe. B: The surgical process of the rat head. The lid of brain window is fixed with dental adhesive, cyanoacrylate cement and cranial nail. C: The photo of rat brain window system.

1.4 光化学栓塞法建立局部脑缺血模型和 OCT 成像记录

缺血组大鼠开窗手术过后, 腹部注射光敏感材料玫瑰红 (7.5 mg/mL, 剂量为 2.5 mg/100 g), 20 min 后用波长 532 nm 的绿色激光照射光窗, 强度 30 mW, 将激光聚焦在窗口中管径最大的血管 (主血管, 为静脉血管) 上, 调整激光光源距离, 使得血管上光斑的直径为 1 mm, 照射 30 min。同时, 采用 OCT 血管成像装置实时记录激光照射期间的皮层血管动态变化。空白对照组以生理盐水替代玫瑰红溶液, 注射量与对应的玫瑰红溶液量相同, 其余手术过程与缺血组相同, 但不进行激光照射。在激光照射的 30 min 内, 每间隔 2 min 进行一次 OCT 成像, 具体操作为固定大鼠脑部位置与激光位置, 成像聚焦在欲缺血区, 通过调节 OCT 系统参数, 覆盖感兴趣的窗口区域, 进行扫描拍摄。

手术完成后的大鼠仍处于麻醉状态, 体温比较低, 身体机能尚未恢复, 置于加热垫上进行保温, 帮助大鼠复苏。苏醒后的大鼠送入动物房单独喂养, 留作后期观察。每隔几天观察光窗是否被大鼠抓挠, 窗口内部是否受到影响。

1.5 血管缺血后长期观察

从缺血日开始算, 每

天固定时间, 将大鼠麻醉, 固定于脑立体定位仪, 打开离心管顶盖, 用棉签清理玻片表面后, 用 OCT 血管成像装置对窗口内所有血管形态进行拍摄。

1.6 四氮唑红 (TTC) 染色

腹腔注射过量水合氯醛处死大鼠, 然后迅速断头取脑, 将大脑放入盛有 0~4 °C 生理盐水的烧杯中, 冷冻 15 min 后取出, 适当清理, 置入大鼠模具中, 以 1 mm 间隔对光窗对应的皮层区域进行冠状切片, 所用刀片使用前均匀沾染 2% TTC 溶液, 保证切片时 TTC 溶液充分渗透脑组织。脑切片有序放入盛有 TTC 溶液的玻璃皿, 锡纸包裹避光, 37 °C 培养箱内孵育 30 min 后取出, 排列整齐并拍照记录。

2 结果

2.1 光化学栓塞法建立局部脑缺血模型全程的实时成像

激光照射前后的血管形态分别如图 2A、B 所示, 经过激光照射处的大鼠皮层血管血流量减少, 形成了栓塞, 栓塞大小与光斑大小基本吻合, 激光照射中心处的堵塞最为明显。

在激光照射过程中每 2 min 进行一次 OCT 成像,

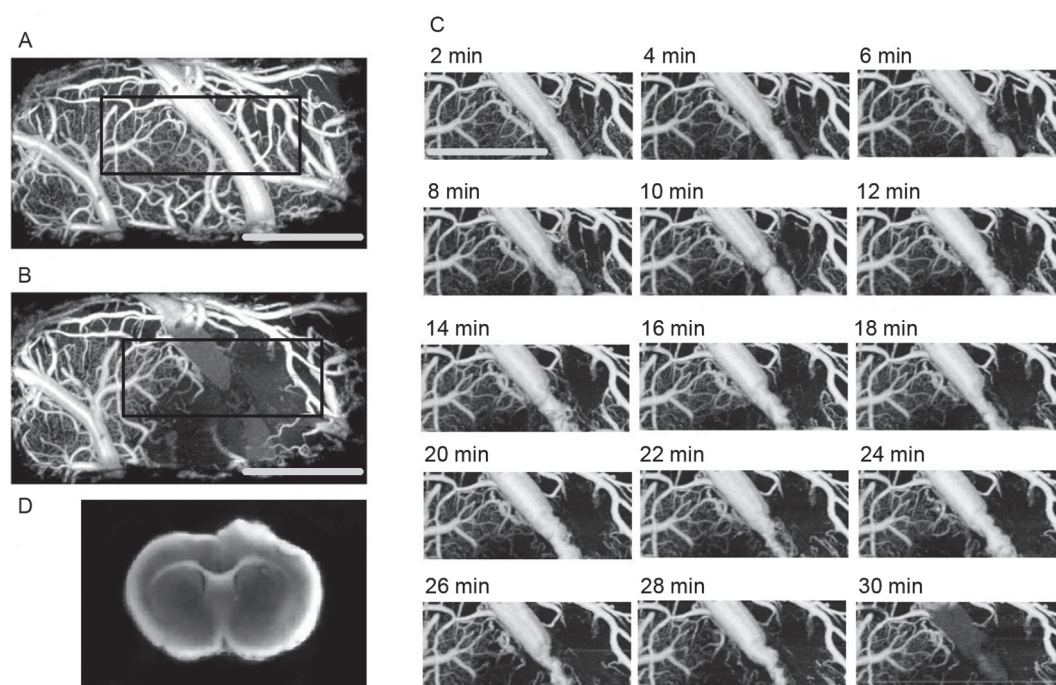


图 2. 光化学诱导大鼠脑皮层缺血过程光相干层析成像术(OCT)成像图

Fig. 2. The optical coherence tomography (OCT) images of cerebral cortex during 30 min of photothrombotic ischemia. A: Pre ischemia. B: One hour after onset of ischemia. C: Vascular morphologies at different time points after laser irradiation. The black rectangles in A and B are the regions where the laser illuminated, i.e. the observation area in C. D: Representative image of the brain slice stained by TTC at day 1 after laser irradiation. Scale bar, 1 mm.

可以完整记录下血管内栓塞形成的过程，30 min 内缺血区域的变化如图 2C 所示，光化学法造成的栓塞的形成是逐步蔓延的过程，由激光照射的最强点到沿着这个点扩散的一片区域。这是首次通过 OCT 成像方法观察记录光化学法造成血管栓塞的形成过程。本研究结果表明，激光的照射时间对于栓塞的形成是一个至关重要的因素，随着时间的延长，栓塞以及造成的损伤逐步增加。要形成一个能够完全堵塞皮层大血管的栓塞，照射时间应在 30 min 及以上。

为了进一步观察血管堵塞造成的损伤程度，在缺血后 24 h 后，对大鼠大脑切片进行 TTC 染色。

缺血部位的切片结果见图 2D 所示，脑片右上角存在对应激光照射部位的白色区域，表明血管堵塞对大鼠皮层造成了明显的损伤。

2.2 缺血后(1~10 d)损伤区域血管变化的实时记录

缺血后 24~48 h 内，缺血组大鼠脑损伤程度最大，区域内血管数量达到最少，位于激光照射区域的主血管和周围小血管逐渐消失，侧枝血管代偿性变粗。缺血后 2~3 d，主血管阻塞部位再通，缺血 4 d 后，侧枝血管直径逐渐减小，小血管自缺血边缘至缺血中心区渐渐浮现，到缺血后第 10 天，损伤区小血管数量明显增加，侧枝血管基本恢复到原始状态(图 3)。该结果表明，缺血区域内的血管经

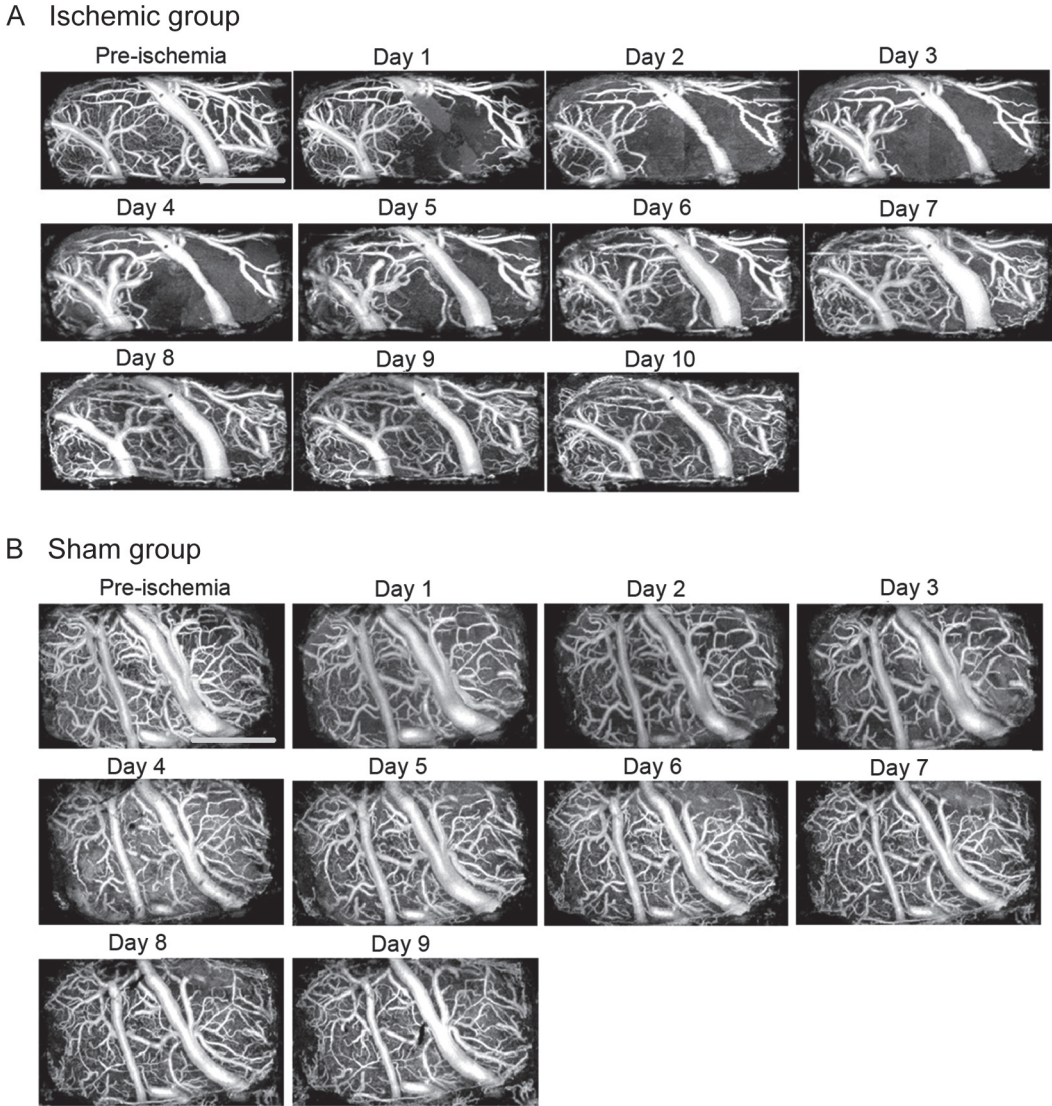


图 3. 缺血组 and 对照组皮层血管变化

Fig. 3. Cortical vascular changes (0-10 days) of ischemic and sham groups detected by optical coherence tomography (OCT). A: In ischemic group, the blood vessels in the ischemic area underwent a process of disappearance and recurrence. B: Sham group did not show any significant changes in the structure and morphology of blood vessels. Scale bar, 1 mm.

历了一个主血管堵塞再通,侧枝血管代偿恢复,小血管大量新生的过程,而空白对照组大鼠皮层血管结构与形态均无明显变化。

2.3 缺血后(1~10 d)损伤区域内新生小血管变化的实时记录

OCT 成像分辨率可达到毛细血管水平,且可以在深度方面分层分析图像。因此除了在平面上分析血管再生的过程及特点,还可以从深度上挖掘血管再生的特点。

图 4 为血管的纵剖面血流图,照射前皮层血管的剖面血流图的灰色方框里清晰可见较深位置上仍有大量小血管分布,而照射后浅层/深层的小血管均所剩无几,缺血后 24–48 h,小血管数量不断下降,直至最小值,缺血 3 d 后,浅层小血管开始再生,在缺血 6~7 d 后达到原有血管的密度,然后继续生长,到第 10 天浅层出现大量新生血管,而深层血管仍未恢复。由上述结果可知,主血管再通期间,皮层内的小血管也大量新生,但新生血管主要集中在浅层。

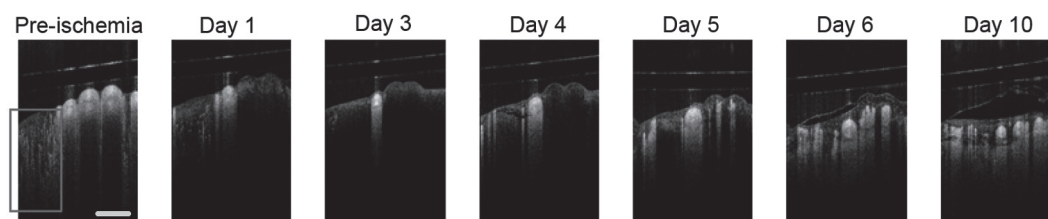


图 4. 皮层血管缺血前后光相干层析成像术(OCT)深度成像图

Fig. 4. The cross-section optical coherence tomography (OCT) images of cortical vessels (0–10 d). Pre-ischemia: Blood flow profile of cortical vessels before irradiation. Day 1–10: Blood flow profiles of cortical vessels from the onset of irradiation to Day 10 after ischemia. Scale bar, 200 μm .

3 讨论

本研究建立的大鼠头部光窗方法可在体实时连续观测模型动物皮层血管,同时利用 OCT 成像技术实现了对大鼠局部脑缺血后皮层血管的慢性再生过程的观察和记录。其中大鼠皮层血管长期观察窗口的建立是本研究的基础和重点之一。在窗口建立过程中需要注意多处细节,如颅骨的打磨、玻片的安放,以及硬脑膜去除、大脑凸起的处理,甚至是大鼠术后的护理方式等都决定了血管成像质量的好坏。在去除头皮、剥离颅骨表面组织的过程中,我们采用了电凝刀止血的方式,这种操作可以迅速地止血,防止盖帽封口过程中头皮大量出血,血液漫进窗口,导致实验失败。同时,在打磨颅骨时颅钻转速不宜过快,需要间歇性打磨,并用生理盐水不断冲刷,清除骨屑并散热,防止长时间高速打磨产生的热量使脑膜和脑皮层黏连,大脑凸起严重,导致去脑膜困难。当滴加的琼脂糖溶液漫过窗口时,窗口上方应迅速盖入洁净的玻片,微调玻片后,预留封胶区域,并用镊子固定玻片位置直至琼脂糖溶液凝固后,小心抽出镊子。而在手术收尾阶段,每一次用胶时,均需保持黏连面干燥,否则盖帽容易脱落。此外,由于 OCT 成像系统对实验对象静止

状态的高要求,为了获得高质量的血管三维图,大鼠适当麻醉深度的维持也是获得高质量成像结果的关键,所以我们在常规麻醉剂量的基础上,每只大鼠额外增加了适量麻醉剂。

本研究的另一个创新之处是对光化学法局部脑缺血模型建立过程的实时成像。国内外有很多学者对光栓塞法造模过程中的参数进行摸索,如 Schmidt 等^[13],Ding 等^[14],但他们都是基于损伤结果的评价,通过组织形态学、行为学测试、脑皮层血流图、磁共振成像等方法,对损伤程度进行观察来了解光化学法致栓塞的效果。而在本研究中,我们首次通过 OCT 成像方法在体实时记录光化学法导致栓塞的形成过程,直观展现出血栓是从激光照射最强点延伸到围绕该点的一片区域,而栓塞形成的过程也是一个需要时间积累,由量变到质变的过程。若要形成完全堵塞血管的栓塞,至少需要照射 30 min 以上。

同时,基于模型和方法学基础,本研究在缺血后 10 d 内,继续对窗口内的皮层血管进行观察。通过长期观察堵塞血管及皮层小血管的生长恢复状态,我们发现脑缺血的恢复主要是栓塞血管的疏通,以及周边小血管的恢复,同时伴随表层小血管的大量新生,但新生的血管主要集中在皮层浅层,并未

达到深层。表层血管的疏通、恢复与再生可以为损伤脑区提供血液供给, 但神经细胞活性的恢复及细胞损伤的程度则与深层血管网络的重建相关, 这也是本研究组接下来的工作重点。此外, 我们将对缺血后 (0~10 d) 的皮层血管变化情况, 从直径、数量、长度、深度等方面进行定性分析, 进一步揭示缺血刺激后血管再生的病理生理学特征, 以期为中风后的康复与治疗提供坚实的理论依据, 并为脑缺血性疾病的的治疗提供理论指导和新方法。

参考文献

- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd S E, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129(3): e28-e292.
- Wang LD (王陇德). Report on the Chinese Stroke Prevention. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2015, 9-11 (in Chinese).
- Tang B (唐标), Deng CQ. Pyroptosis and stroke. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2018; 70(1): 93-98 (in Chinese with English abstract).
- Lin CY, Chang C, Cheung WM, Lin MH, Chen JJ, Hsu CY, Chen JH, Lin TN. Dynamic changes in vascular permeability, cerebral blood volume, vascular density, and size after transient focal cerebral ischemia in rats: Evaluation with contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28(8): 1491-1501.
- Plate KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58(4): 313-320.
- Hermann DM, Zechariah A. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29(10): 1620-1643.
- Fei HR (费洪荣), Xu GQ, Zhu YP, Shi RJ, Wang DC, Wang FZ. Inhibitor of PI3K/Akt, CCT128930, suppresses proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报) 2012; 28(10): 1413-1416 (in Chinese with English abstract).
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25(9): 1794-1798.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 1985; 17(5): 497-504.
- Ma JN (马浚宁), Gao JW, Hou BR, Ren HJ, Liu JX, Chen SH, Yan GZ. Establishing an animal model of ischemic stroke with photothrombosis method. *Chin J Tissue Eng Res* (中国组织工程研究) 2015; 19(49): 7951-7957 (in Chinese with English abstract).
- Zhang LS (张连顺). Experimental research on optical coherence tomography. *J Dezhou Univ* (德州学院学报) 2002; 18(2): 15-18 (in Chinese with English abstract).
- Yang SM (杨尚明), Song DC, Chen RP, Wang XC. The imaging theory of optical coherence tomography. *J Yantai Univ Nat Sci Eng Ed* (烟台大学学报自然科学与工程版) 2003; 16(2): 104-108 (in Chinese with English abstract).
- Schmidt A, Hoppen M, Strecker JK, Diederich K, Schäbitz WR, Schilling M, Minnerup J. Photochemically induced ischemic stroke in rats. *Exp Transl Stroke Med* 2012; 4(1): 1-4.
- Ding GL (丁广良), Hu HB, Wang XB, Li LY, Ye CH, Zhang JW, Tong ET. Photochemical model of cerebral ischemic injury of rat demonstrated by T₂-weighted MRI. *Chin J Magn Reson* (波谱学杂志) 1999; 16(1): 1-4 (in Chinese with English abstract).