

超声造影监测丹参治疗兔肾缺血再灌注损伤的实验研究*

叶帆, 李明星[△], 罗志建, 张敏, 宣吉晴, 陈晓梅
(泸州医学院附属医院超声诊断科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 运用超声造影定量分析技术监测丹参治疗兔肾缺血再灌注损伤前后肾皮质血流灌注的变化, 探讨超声造影在评价药物治疗肾缺血再灌注损伤疗效中的应用价值。方法 家兔切除右肾, 夹闭左肾肾蒂缺血 60 min 后恢复灌注建立兔左肾缺血再灌注损伤模型, 并给予丹参注射液对比观察左肾病理改变及在超声造影下肾皮质血流灌注并应用时间-强度曲线定量分析肾皮质血流灌注参数。结果 缺血再灌注损伤后, 兔肾皮质时间-强度曲线上升缓慢, 峰值灌注时间延长, 曲线上升支斜率下降($P < 0.05$); 经丹参治疗后峰值灌注明显缩短, 曲线上升支斜率明显上升($P < 0.05$)。结论 超声造影定量分析技术能反映兔肾缺血再灌注损伤所致的肾血流灌注异常, 并能发现经药物治疗后兔肾血流再灌注的改变。

关键词:肾; 缺血; 再灌注损伤; 灰阶超声造影; 定量分析; 丹参; 兔

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.02.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)02-0200-03

Experimental study on ultrasound contrast for monitoring *Salvia miltiorrhiza* in treating rabbit renal ischemia-reperfusion injury*

Ye Fan, Li Mingxing[△], Luo Zhijian, Zhang Min, Xuan Jiqing, Chen Xiaomei

(Department of Ultrasound Diagnosis, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To apply the real-time gray scale contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) with quantitative analysis technique to monitor the change of the renal cortex blood perfusion before and after *Salvia miltiorrhiza* treatment of rabbit renal ischemia-reperfusion injury and to investigate the application value of the ultrasound contrast for evaluating the effect of medication in the treatment of rabbit renal ischemia-reperfusion injury (IRI). **Methods** The rabbit right kidney was resected and the left renal pedicle was occluded for 60 min ischemia, then the perfusion was recovered for establishing the IRI model. *Salvia miltiorrhiza* injection was given for observing the pathological changes of the left kidney and the renal cortex blood perfusion under the contrast-enhanced ultrasonography. The parameters of renal cortex blood perfusion were quantitatively analyzed by the time-intensity curves. **Results** After IRI occurrence, the time-intensity curve (TIC) of the rabbit renal cortex was slowly ascended. The time to peak (TTP) was extended and the rising slope (Grad) of the curve ascending branch was declined ($P < 0.05$); after *Salvia miltiorrhiza* treatment, TTP decreased and Grad increased obviously ($P < 0.05$). **Conclusion** CEUS combined with quantitative analysis can reflect the renal blood perfusion abnormality caused by ischemia-reperfusion and discover the change of the renal blood perfusion after medication treatment.

Key words: renal; ischemia; reperfusion injury; gray-scale contrast-enhanced ultrasonography; quantitative analysis; *Salvia miltiorrhiza*; rabbit

缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 在临床上十分常见, 可导致急性肾小管坏死甚至急性肾功能不全。如何早期发现 IRI 所致的肾损害及促进肾功能的恢复一直是临床重要的研究课题。我国传统中药丹参广泛应用于缺血性疾病的治疗, 对肾 IRI 有保护作用^[1-2]。本研究通过制备家兔肾 IRI 模型, 应用超声造影及其定量分析技术评价丹参治疗兔肾 IRI 前后兔肾皮质血流灌注的变化规律, 探讨其在诊断肾 IRI 和评价治疗肾 IRI 效果中的应用价值。

1 材料与与方法

1.1 实验动物与分组 健康成年雄性新西兰大白兔 10 只 (体质量 2.0~2.5 kg, 由泸州医学院实验动物中心提供)。术前先对 10 只家兔行左肾超声造影检查作为对照组, 然后将 10 只家兔随机分为 IRI 组和丹参+IRI 组 (丹参治疗组), 每组各 5 只。

1.2 实验药品 速眠新 II (吉林省有限公司华牧动物保健品有限公司生产), 规格: 2 mL 40 mg。丹参注射液 (正大青春宝药业有限公司), 规格: 每支装 10 mL, 每 mL 含丹参 1 g。

SonoVue (上海博莱科信谊有限责任公司包装, BRACCO Imaging B. V 公司生产), 规格: 59 mg 六氟化硫, 冻干粉 25 mg。

1.3 动物模型的建立 术前对 10 只家兔行左肾超声造影检查。检查完毕后速眠新 0.2 mL/kg 肌肉注射麻醉家兔。俯卧位固定, 双肾区脱毛, 消毒皮肤后行右侧腰部正中旁切口, 钝性分离肾周脂肪囊, 暴露右肾, 结扎右肾蒂, 切除右肾, 同样方法游离左肾, 然后用无创动脉夹夹闭左肾肾蒂造成缺血, 观察到左肾颜色由鲜红变暗红, 表明缺血成功, 60 min 后松开动脉夹, 观察左肾颜色由暗红变鲜红, 表示再灌注成功, 松开动脉夹时计算再灌注时间。术后, 家兔自由饮水进食。丹参+IRI 组于恢复肾血流灌注后第 1 天开始按 0.5 mL/kg 腹腔注射丹参注射液, 每 6 小时重复 1 次; IRI 组于相同时间点腹腔注射同容量的 5% 葡萄糖注射液。IRI 组及丹参+IRI 组均于恢复灌注后第 3 天行超声造影检查。完成检查后, 切除左肾行 HE 染色。

1.4 超声造影检查 采用 GE LOGIQ 9 彩超诊断仪, 10L 变

频线阵探头,选用编码反向脉冲谐波造影技术进行超声造影检查。进入造影模式后,保持仪器设置恒定(基波频率 7.5 MHz,机械指数 0.08,深度 4 cm,增益 52%,帧频 50 Hz,动态范围 50 dB,时间增益补偿,聚焦范围等滑块全部置于中间位置)。将 SonoVue 按说明将冻干粉中注入生理盐水 5 mL 配置成混悬液,按 0.1 mL/kg 剂量抽取震荡混匀后的造影剂经耳缘静脉快速团注,随后注入 1.5 mL 生理盐水冲洗管道,同时启动超声仪内置计时器,并同步采集并保存动态影像 6 min。应用彩超仪内置时间-强度曲线(time-intensity curve, TIC)分析软件(Wash in/Wash out),感兴趣区域(region of interest, ROI)设置为直径约 3 mm,面积约为 7.07 mm² 的圆形,放置于肾最大冠状截面中央的外层皮质,自动描计曲线。观察和分析如下 TIC 参数:灌注峰值时间(time to pick, TTP),曲线上分支斜率(Grad),灌注峰值强度(amplitude of peak intence, A),曲线下面积(area under curve, Area)。所有参数测量 3 次以减少误差。

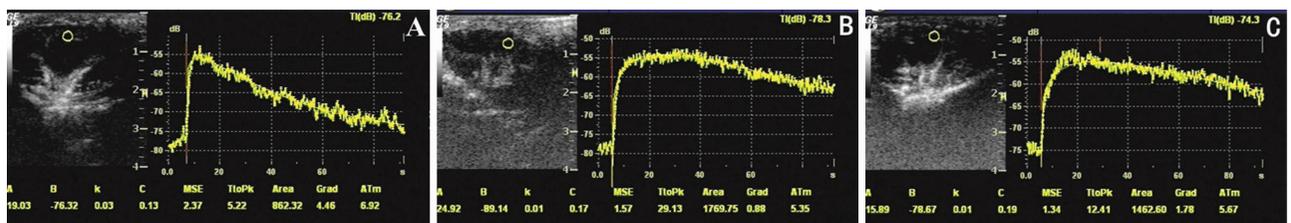
1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件处理所得数据,各参数测值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用配对 *t* 检验,以 *P* <

0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组兔肾灰阶超声造影 TIC 参数比较 对照组兔肾皮质 TIC 曲线上升陡直,迅速达峰值后快速下降;IRI 组 TIC 曲线表现为上升缓慢,下降缓慢,丹参+IRI 组较 IRI 组 TIC 曲线表现为上升陡直,下降增快,见图 1。IRI 治疗前后与对照组相比,均表现为 TTP 延长,Grad 降低(*P* < 0.05)。A 值在 IRI 组与对照组相比有所下降(*P* < 0.05),在 IRI 后第 3 天,丹参+IRI 组 A 值与对照组相比差异无统计学意义(*P* > 0.05)。Area 在 IRI 组与丹参+IRI 组均增加(*P* > 0.05),但 IRI 组与丹参+IRI 组 Area 差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

2.2 病理表现 IRI 组肾脏增大而质软,剖面可见髓质淤血呈暗红色;皮质肿胀,镜检 IRI 组肾小管上皮发生空泡变性和坏死,近端肾小管管腔扩张,远端肾小管及集合管内可见细胞碎片浓缩形成的管型,肾间质充血、水肿,炎细胞浸润;丹参+IRI 组肾小管上皮细胞变性坏死现象有所改善,肾间质充血、水肿减轻,见图 2。

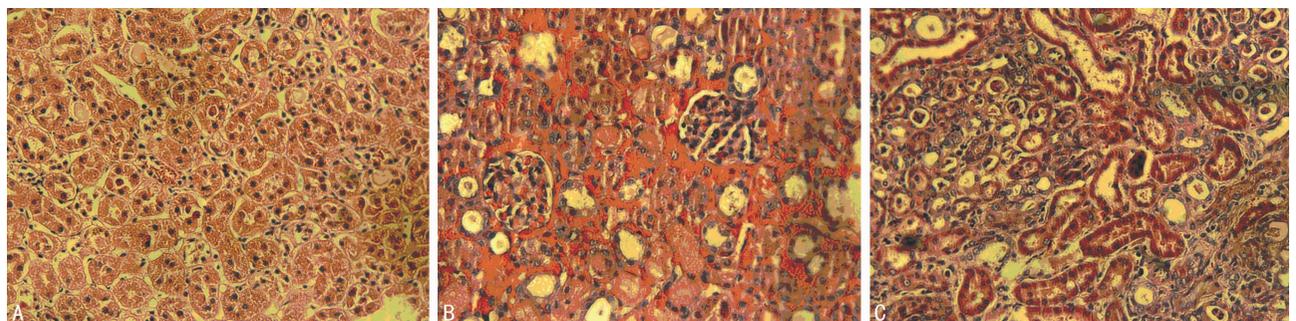


A: 对照组兔肾皮质 TIC 曲线; B: IRI 组缺血后恢复灌注第 3 天肾皮质 TIC 曲线; C: 丹参+IRI 组经丹参治疗 IRI 第 3 天肾皮质 TIC 曲线。

图 1 各组兔肾皮质 TIC

表 1 各组 TIC 参数分析($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TTP(s)	Grad(dB/s)	A(dB)	Area(dBs)
对照组	10	5.63 ± 2.01	4.11 ± 0.90	18.33 ± 2.91	871.02 ± 172.42
IRI 组	5	20.94 ± 2.60	0.86 ± 0.18	14.05 ± 2.71	1 199.50 ± 152.50
丹参+IRI 组	5	11.48 ± 3.21	1.94 ± 0.43	19.62 ± 4.99	1 247.73 ± 319.98



A: 正常兔左肾组织图; B: 缺血后恢复灌注第 3 天兔左肾组织图; C: 缺血后恢复灌注第 5 天兔左肾组织图。

图 2 各组左肾组织图(HE×200)

3 讨 论

肾脏通过排泄代谢产物及调节水、电解质和酸碱平衡维持机体内环境稳定。其中肾小球滤过功能是排泄代谢物的主要形式,而肾血流对肾小球滤过率的影响甚为明显,肾血流动力学变化可反映肾功能的改变,与许多肾脏疾病的发生、发展及预后密切相关。肾 IRI 发生初期肾皮质血流明显减少,而此时往往还未出现明显的肾小管上皮细胞坏死,肾血流灌注的改变

反映肾功能的敏感性高于血液生化检查。随着医学成像技术的不断突破,医学影像学已不再局限于形态学诊断的范畴,核素动态显像,螺旋 CT 动态增强扫描及 MRI 灌注成像等应用于评价肾血流灌注。超声医学在肾脏的血流灌注的研究随着新一代超声造影剂的出现也取得了极大进展。通过运用数学模型建立感兴趣区内造影剂回声的 TIC 以反映造影的动态过程和组织内造影剂的强度变化,由此评估组织内血流灌注的变

化^[3]。与核医学、CT 及 MRI 的功能成像相比,超声造影定量分析组织器官血流灌注具有操作简单、重复性好、费用低、造影剂无放射性或肾毒性等独特优势。

目前已有关于超声造影定量分析技术应用于肾血流灌注的研究报道。Leinonen 等^[4]观察到正常猫肾皮质血流的 TIC 形态表现为上升陡直,迅速达峰值后快速下降。许多研究表明肾 IRI 发生后,肾皮质血流 TIC 参数发生改变。Correas 等^[5]观察到超声造影剂在肾皮质缺血区较相邻正常肾皮质进入延迟。有学者观察到发生肾 IRI 后兔肾皮质 TIC 参数 TTP、Area 值增大^[6-7],Grad 值降低。本研究旨在研究超声造影定量分析技术能否发现经药物治疗肾 IRI 后肾血流灌注的变化,以探讨超声造影在评价药物治疗肾 IRI 疗效中的应用价值。皮质肾血流量占总入肾血流量的 90% 以上,皮质区血流动力学变化可说明总的肾血流灌注的改变,因此本研究选择兔肾最大冠状切面皮质中央作为 ROI。研究发现肾 IRI 自然病程 1 周左右,坏死的肾小管上皮细胞开始再生,肾小管形态逐渐恢复正常。丹参是一种强抗氧化剂,还具有钙拮抗、抗炎、抗凋亡及改善微循环的作用,能多环节改善肾 IRI^[8]。因此本实验选用丹参治疗肾 IRI,于恢复灌注后第 3 天检查治疗前后兔肾皮质血流 TIC 参数的变化。

本实验发现肾 IRI 后第 3 天与对照组比较 TTP 延长,Grad 缩短,二者的改变说明造影剂进入肾内毛细血管床的时间延长,肾微循环阻力增高。其病理生理基础可能为发生 IRI 后,肾皮质血管痉挛收缩,受损血管内皮细胞肿胀,血小板及纤维蛋白栓塞,中性粒细胞与内皮细胞黏附,嵌顿,堵塞毛细血管,微血管通透性增加,组织水肿挤压微血管从而导致肾微循环阻力增高^[9]。而丹参+IRI 组与 IRI 组比较,TTP 缩短,Grad 值升高,表明肾皮质微循环有所改善,同时观察到丹参+IRI 组病理学较 IRI 组损伤程度明显降低。过往研究表明 Area 与肾实质的血流量成线性相关,当保持剂量及仪器条件设置恒定时,Area 则主要受流速和分布容积的影响^[10]。本实验中 Area 值在 IRI 组及丹参+IRI 组较对照组升高,而 Area 值在经丹参治疗前后无明显差别。分析原因可能为一方面微血管强烈收缩、内皮细胞损伤、白细胞淤滞,微血栓形成导致肾皮质血流量下降,另一方面血流速度降低而导致造影剂微泡廓清速度减慢,此外肾 IRI 后血管内皮细胞通透性增加,大量的炎性细胞淤滞于微血管及间质内,对造影剂微泡有一定的吞噬作用,被吞噬的微泡依然保持声学活性而仍能被检测到。而 Area 反映的是一定时间内特定 ROI 内造影增强的累积效应,影响因素多,此外 ROI 内造影剂浓度还受体表面积、心排血量及呼吸的影响。本实验中 IRI 组的 A 值与对照组相比有所降低,考虑 IRI 后第 3 天肾皮质损伤最为严重,血流灌注不足导致在相同时间内进入肾皮质的造影剂微泡数量相应减少。丹参+IRI 组 A 值升高,与对照组无显著差异,表明经治疗后肾皮质血流改善。A 代表灌注高峰时肾皮质局部组织微气泡的含量,反映瞬时的局部血流容积,受组织灌注血流量及微泡廓清速率的影响^[11]。有学者研究大鼠发生 IRI 后 1 周内 TIC 参数的变化,发现假手术组与 IRI 组大鼠同组之间不同时间点、两组之间对应时间点之间比较 A 值均无显著差异^[12]。因此 A 值的变化除组织血流灌注量外还需考虑血流速度减慢及炎性细胞吞噬作用导致造影剂在肾微毛细血管网内密度增加的影响。

故组织血容量不能单纯依靠 Area 及 A 值来判断。因此目前本实验认为 TTP 和 Grad 对判断肾组织血流动力学的改变具有参考价值。

综上所述,超声造影定量分析技术能在一定程度上反映兔肾 IRI 所致的肾血流灌注异常,并能发现经药物治疗后肾血流灌注的改变。本实验仅是对超声造影监测药物治疗肾 IRI 的初步研究观察,还有待于今后进行大样本动物实验以证实结果的稳定性及重复性。

参考文献:

- [1] Chen G, Fu Y, Wu X. Protective effect of *Salvia miltiorrhiza* extract against renal ischemia-reperfusion-induced injury in rats[J]. *Molecules*, 2012, 17(2):1191-1202.
- [2] 刘久波, 吕军, 张珍, 等. 银杏叶制剂和丹参对急性肾衰兔肾皮质局部血流量的影响[J]. *中国微循环*, 2004, 8(3): 149-151.
- [3] Ma F, Cang Y, Zhao B, et al. Contrast-enhanced ultrasound with SonoVue could accurately assess the renal microvascular perfusion in diabetic kidney damage[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(7):2891-2898.
- [4] Leinonen MR, Raekallio MR, Vainio OM, et al. Quantitative contrast-enhanced ultrasonographic analysis of perfusion in the kidneys, liver, pancreas, small intestine, and mesenteric lymph nodes in healthy cats [J]. *Am J Vet Res*, 2010, 71(11):1305-1311.
- [5] Correas JM, Claudon M, Tranquart F, et al. Contrast-enhanced ultrasonography: renal applications[J]. *J Radiol*, 2003, 84(12 Pt 2):2041-2054.
- [6] 罗志建, 李明星, 陈晓梅, 等. 超声造影监测兔缺血再灌注前后肾皮质、髓质血流灌注[J]. *中国医学影像技术*, 2011, 27(8):1533-1536.
- [7] 罗志建, 李明星, 陈晓梅, 等. 超声造影和彩超监测兔缺血再灌注损伤肾血流灌注的对比研究[J]. *重庆医学*, 2012, 41(1):69-71.
- [8] Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ, et al. Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat[J]. *Kidney Int*, 2000, 57(6):2375-2385.
- [9] Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure[J]. *Lancet*, 2005, 365(9457):417-430.
- [10] 董怡, 王文平, 丁红, 等. 实时谐波超声造影技术定量评价正常人肾脏皮质灌注[J]. *中国医学计算机成像杂志*, 2008, 14(2):160-164.
- [11] Waller KR, O'Brien RT, Zagzebski JA. Quantitative contrast ultrasound analysis of renal perfusion in normal dogs [J]. *Vet Radiol Ultrasound*, 2007, 48(4):373-377.
- [12] 罗晓莉, 周晓东, 朱建平, 等. 超声造影评价大鼠肾脏缺血-再灌注损伤血流灌注[J/CD]. *中华医学超声杂志: 电子版*, 2011, 8(5):950-957.