

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.18.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210621.1713.004.html\(2021-06-22\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210621.1713.004.html(2021-06-22))

超微血流成像技术对兔腹主动脉斑块易损性的研究^{*}

王子龙¹,杨莉红²,杨寒凝²,陆永萍^{2△}

(1.大理大学临床医学院,云南大理 671000;2.云南省第二人民医院,昆明 650021)

[摘要] **目的** 探讨超微血流成像技术对不同病理分型斑块易损性评价的可行性。**方法** 使用超微血流成像技术检测 60 只新西兰大白兔腹主动脉斑块模型内的血流情况,按标准进行血流分级。计算各斑块内血流信号面积与斑块总面积之比,即彩色像素密度(MCD),根据 MCD 结果按评分标准评分,对斑块做病理分型并统计分析。绘制受试者工作特征(ROC)曲线,得出诊断易损斑块的最佳界点值。**结果** 斑块病理分型与超微血流强度呈正相关($r_s=0.735,P<0.05$),超微血流增强评分与斑块内微血管数呈正相关($r_s=0.751,P<0.05$)。ROC 曲线显示:曲线下面积 0.962,灵敏度 82.3%,特异度 95.4%,诊断易损斑块的最佳分界点 11.5 分。**结论** 超微血流成像技术的灵敏度与特异度较高,可应用于斑块易损性的诊断。

[关键词] 超微血流成像;动脉粥样硬化;斑块;易损性;兔腹主动脉

[中图法分类号] R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)18-3079-05

Study on the vulnerability of rabbit abdominal aortic plaque by superb microvascular imaging^{*}

WANG Zilong¹,YANG Lihong²,YANG Hanning²,LU Yongping^{2△}

(1.Clinical College,Dali University,Dali,Yunnan 671000,China;2.The Second People's Hospital of Yunnan Province,Kunming,Yunnan 650021,China)

[Abstract] **Objective** To explore the feasibility of evaluating the vulnerability of different pathological types of plaque by using the technique of Superb microvascular imaging (SMI). **Methods** The blood flow in the abdominal aortic plaque model of 60 New Zealand white rabbits was detected by ultramicro flow imaging, and the blood flow was graded according to the standard. The ratio of blood flow signal area in each plaque to the total plaque area, namely color pixel density (MCD), was calculated. According to the MCD results, the plaque was scored according to the scoring standard. The plaque was pathologically classified and statistically analyzed. Draw the receiver operating characteristic (ROC) curve to get the best cut-off value of vulnerable plaque. **Results** There was a positive correlation between plaque pathological classification and SMI blood flow classification ($r_s=0.735,P<0.05$). There was a positive correlation between the score of ultramicro blood flow enhancement and the number of microvessels in plaque ($r_s=0.751,P<0.05$). The results show that the area under the curve was 0.962, the sensitivity was 82.3%, the specificity was 95.4%, the best boundary value of vulnerable plaque was 11.5 points. **Conclusion** The sensitivity and specificity of SMI are high, which could be used in the diagnosis of plaque vulnerability.

[Key words] superb microvascular imaging; atherosclerosis; plaque; vulnerability; rabbit abdominal aorta

动脉粥样硬化是心脑血管系统中最常见的疾病之一,易损斑块对人体的危害性极大,且趋于年轻化。本研究拟用超微血流成像技术对兔腹主动脉斑块易损性进行研究,以更好、更早地预防动脉粥样硬化所

致的急性心脑血管疾病的发生,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性新西兰大白兔 60 只,兔龄 5 周,体重

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81660084);云南省医学领军人才培养基金项目(L-201616)。 作者简介:王子龙(1993—),在读硕士研究生,主要从事心血管与介入超声研究。 △ 通信作者,E-mail:luyongp@163.com。

(624±207)g。

1.2 方法

1.2.1 腹主动脉斑块模型的制备

高脂喂养实验兔 12 周后行内膜的球囊损伤术：经耳缘静脉缓慢注射 4% 的戊巴比妥钠(1 mL/kg)进行全身麻醉，于股动脉投影段切开皮肤，分离后结扎远心端，见图 1。股动脉近心端血流被提起的手术丝线阻断；穿刺针以 25°刺入股动脉，放入导丝，退出穿刺针后沿导丝送入成人桡动脉穿刺用鞘管，并在超声引导下立即推入 6F Fogarty 球囊鞘管至腹腔干水平，注入空气至 2~4 个大气压，回拉有阻力感即可，重复推拉 5 次以致腹主动脉内膜损伤。操作结束后用生理盐水清洗并用青霉素粉涂抹创口预防感染。经耳缘静脉推注剂量 250 mg/kg 的牛血清清蛋白(GE, 乌拉圭, SV30087.03)行免疫损伤, 3 d, 每天 1 次, 继续高脂喂养 8 周。

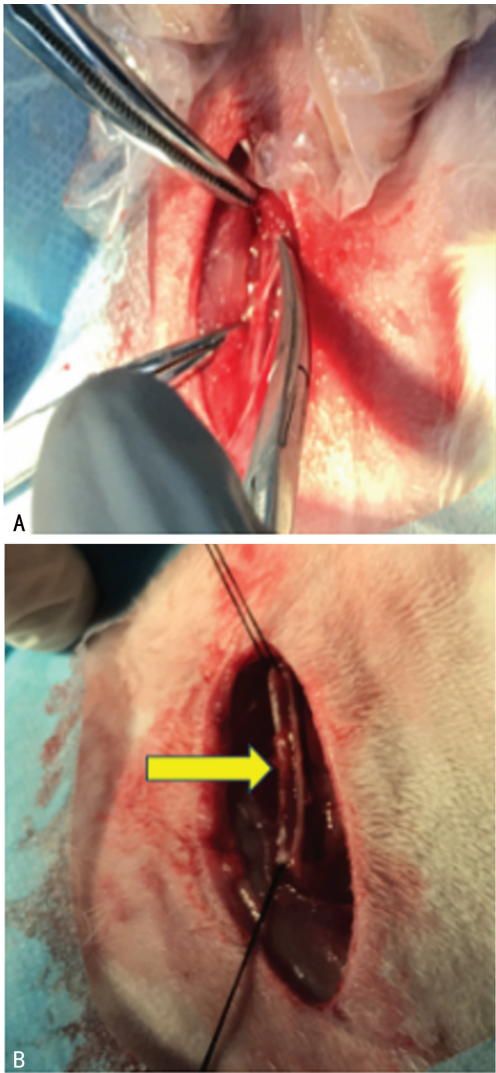
1.2.2 超声检查

选用东芝公司 Aplio 500 超声诊断仪, 11-4L 线阵探头, 频率 4~11 MHz。于 20 周末麻醉实验兔, 在腹主动脉投影位置横纵切交叉扫描, 观察有无斑块形成, 发现目标斑块后记录斑块相应特征。

1.2.3 超微血流成像检查

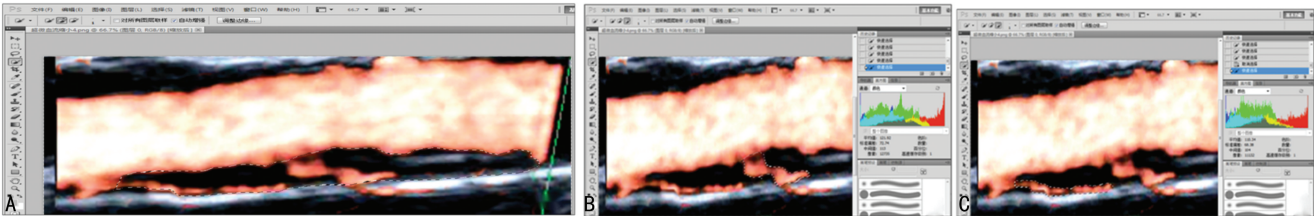
找到目标斑块后, 开启超微血流成像模式, 选择合适的深度和增益, 观察斑块内有无点、线状超微血流声像及个数, 选择血流最丰富区域, 固定探头, 连续观察不少于 30 s, 确认血流信号无误后, 详细记录并存图。根据血流强度分级, 标准如下^[1-2], 0 级: 斑块内无血流信号; 1 级: 斑块内显示 1~3 个点状血流信号; 2 级: 斑块内显示 3 个以上点状和(或)1~2 处短线状血流信号; 3 级: 斑块内显示 2 处以上线状且贯穿或大部贯穿的血流信号, 或有血液流动征。以上操作由 1 名中级医师进行, 斑块血流分级的统计分析汇总由 2 名高级医师完成。选取超微血流显像显示血流信号最丰富的切面, 运用 Adobe Photoshop CS5 图像分析软件, 计算整个斑块及内部的彩色血流信号面积, 并

计算彩色像素密度(MCD)^[3], 即血流信号面积与斑块总面积之比(此斑块的 MCD 为图 2B 与 2C 的像素之和与 2A 像素比值), 见图 2。根据 MCD 的数值来计算超微血流增强评分值, 如 MCD 为 1%, 则超微血流增强评分值为 1 分, MCD 为 2%, 则超微血流增强评分值为 2 分, 以此类推, MCD 为 100%, 则超微血流增强评分值为 100 分。



A: 股动脉分离操作; B: 已分离出的股动脉, 结扎远心端, 近心端黑色丝线为阻断血流做准备(黄色箭头)。

图 1 腹主动脉斑块模型的制备



A: 斑块总面积; B、C: 2 个血流信号面积。

图 2 斑块面积与血流信号面积

1.2.4 病理检查

处死实验兔, 分离并切开腹主动脉, 找出与超声

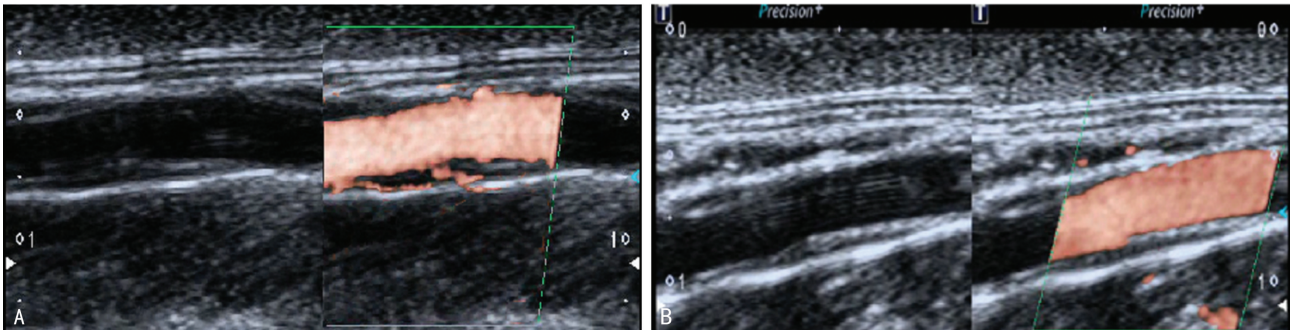
图像对应的斑块,用 4% 的甲醛溶液固定,行石蜡包埋,以 5 μm 厚度切取最大切面切片,行抗 CD34 抗体免疫组织化学染色。病理分型:依据文献[4-5]方法将斑块分为 I ~ VI 共 6 种类型, I 型:巨噬细胞和泡沫细胞的沉积; II 型:脂质在斑块内积聚到显现脂肪点或条纹的点; III 型:细胞外脂质沉积; IV 型:细胞外脂质变得致密并且更广泛地形成脂质核; V 型:纤维结缔组织形成部分斑块(有或没有脂质核),在脂质核心周围,毛细血管增生和炎症反应增加,包括淋巴细胞和巨噬细胞,出现微水肿; VI 型:破裂的斑块,特征在于斑块内的出血和原位血栓形成,可导致栓塞或血管闭塞,暂不纳入研究。 I ~ III 型被认为是稳定斑块,即稳定组; IV ~ VI 型被认为是易损斑块,即易损组。微血管密度为 200 倍显微镜视野下每个视野内 CD34 免疫组织化学检测呈阳性的血管数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对样本 t 检验,多组间比较采用方差分析;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 Spearman 秩相关检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 兔腹主动脉斑块生长情况及斑块病理类型



A: V 型斑块的长线状血流信号;B: I 型斑块的无明显血流信号。

图 3 不同病理分型斑块的血流信号

2.2.2 兔腹主动脉斑块超微血流增强评分值与斑块内微血管数的比较

与稳定组比较,易损组超微血流增强评分值更高,微血管数更多,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。超微血流增强评分值与斑块内微血管数存在正相关性($r_s = 0.751, P < 0.05$),见图 4、5。

表 2 两组超微血流增强评分值与斑块内微血管数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	增强评分值(分)	微血管数(条)
易损组	17	12.34 $\pm$ 6.42	20.00 $\pm$ 3.72
稳定组	44	3.20 $\pm$ 4.22	12.81 $\pm$ 3.13

存活的 52 只实验兔共检出 61 个斑块,其中 I 型 15 个, II 型 18 个, III 型 11 个, IV 型 9 个, V 型 8 个。

2.2 超微血流成像技术对各个病理分型斑块的评价

2.2.1 61 个兔腹主动脉斑块的超微血流成像结果

61 个斑块中,超微血流显像显示 41 个有不同强度血流信号,20 个无血流信号。易损斑块血流信号明显,可见多个点状甚至线状血流信号;稳定斑块血流信号不明显,无血流信号或仅可见 1 ~ 2 个点状血流信号。超微血流成像技术检测不同病理分型的斑块,结果显示病理分型与超微血流强度之间呈正相关($r_s = 0.735, P < 0.05$),见表 1、图 3。

表 1 超微血流成像技术对不同病理分型斑块的评价结果(*n*)

病理分型	超微血流强度				总数
	0 级	1 级	2 级	3 级	
I 型	12	3	0	0	15
II 型	4	13	1	0	18
III 型	4	5	2	0	11
IV 型	0	2	4	3	9
V 型	0	1	2	5	8
总数	20	24	9	8	61

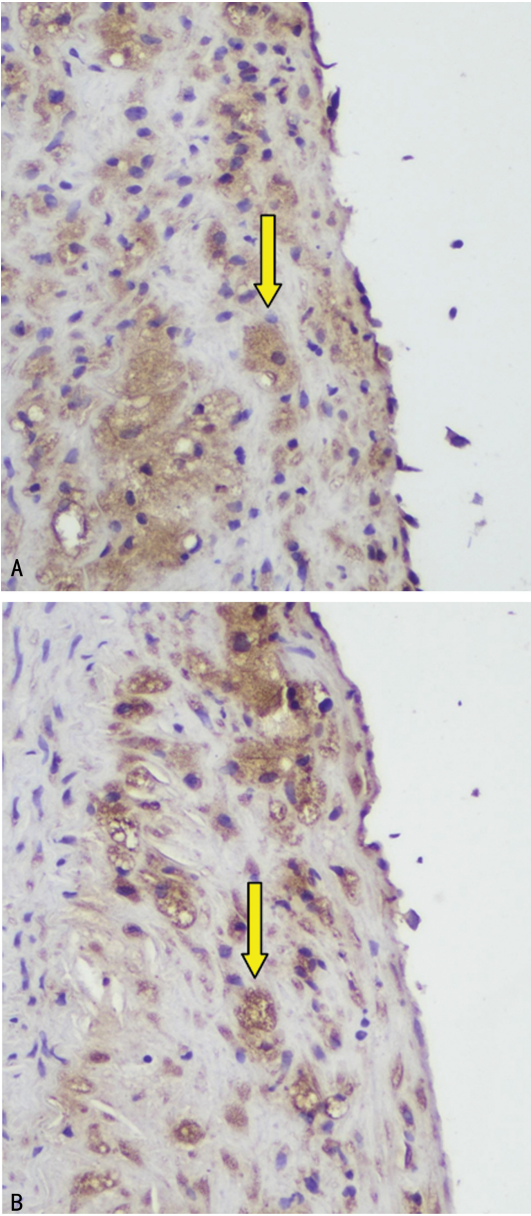
双向等级资料,应用秩相关检验,相关系数 $r_s = 0.735$ 。

续表 2 两组超微血流增强评分值与斑块内微血管数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	增强评分值(分)	微血管数(条)
<i>t</i>		139.876	60.607
<i>P</i>		< 0.001	< 0.001

2.3 超微血流成像技术检测斑块的 ROC 曲线

将超微血流成像技术对斑块的评分值绘制受试者工作特征(ROC)曲线,结果显示曲线下面积为 0.962,灵敏度为 82.3%,特异度为 95.4%,诊断易损斑块的最佳分值界点为 11.5 分,见图 6。



A: I 型斑块, 其内微血管数较少(黄色箭头); B: V 型斑块, 其内可见较多的微血管(黄色箭头)。
图 4 不同病理分型斑块内微血管分布(免疫组织化学染色, ×200)

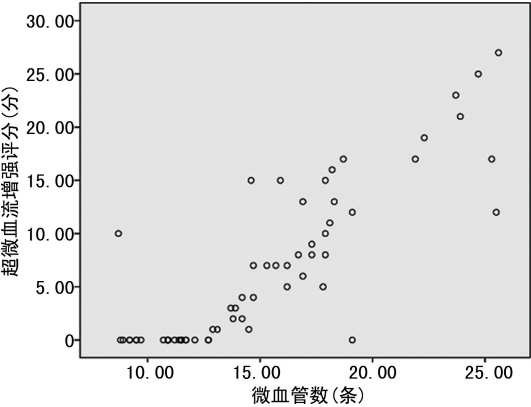


图 5 斑块超微血流增强评分值与斑块内微血管数相关性

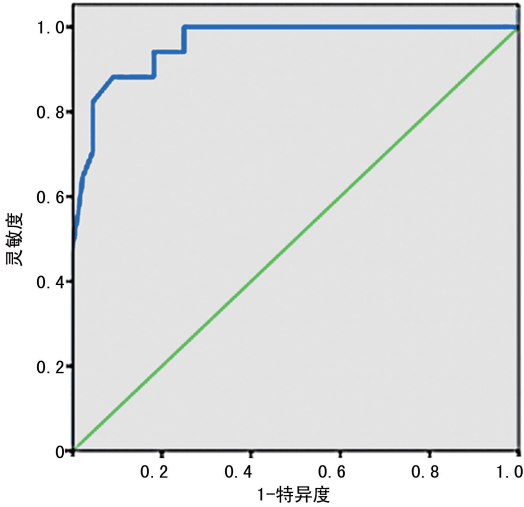


图 6 超微血流成像技术检测斑块的 ROC 曲线

3 讨 论

动脉粥样斑块的形成大多数与心脑血管疾病密切相关,斑块的易损性直接影响了临床的治疗方案和有效性,而斑块内新生血管是斑块易损性的标志^[6-8],故掌握斑块内新生血管情况对预测和预防心脑血管疾病的发生有着十分重要的意义。目前能够检测斑块内新生血管的技术除了超声造影,还有 CT 血管造影、磁共振血管成像等,但由于费用昂贵,可重复性差,部分为有创检查,且禁忌证多,难以在临床全面推广。

超微血流成像技术应用了自适应图像处理的基本原理,将图像逐像素处理,以分析血流及组织图像的信息,对微血流和组织微小运动产生的频谱信号的混杂分布区域的差异进行滤波处理^[9]。通过自适应算法能提取微小血管中的低速血流信号,分辨率较普通彩色多普勒超声高,无需注射造影剂即可过滤干扰信号,从而达到类似造影的极低流速微小血管显像效果^[10-11]。何广敏等^[3]研究表明, MCD 对血流的灵敏度、特异度和准确度均高于超微血流分级,是一种可靠的定量诊断方法。

本实验结果得出,斑块内微血管数与超微血流增强评分值、病理分型均呈正相关,说明血流增强评分值越高的斑块微血管数越多,血供越丰富,对应的病理分型越高,斑块越不稳定,与薛莉等^[12]研究结论有较高的一致性,即易损斑块的发生、发展与斑块内微血管数的形成密不可分。

超微血流成像技术检测颈动脉斑块的新生血管与超声造影有良好的一致性^[13-15]。研究表明,超微血流成像技术与超声造影检查评价斑块内血流情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$)^[16]。ROC 曲线结果显示,超微血流成像技术灵敏度与特异度均较高,同时还具备误诊率低、简单易行、可重复性好、检查费

用低等优点,弥补了超声造影检查的不足。魏小雨等^[17]证明了超微血流成像技术是颈动脉斑块内新生血管低速血流安全有效的检测方法,对斑块稳定性的评估具有重要意义,相对超声造影检查,某种程度上可以取而代之。

本研究的局限性为样本量较小,且动物实验结果仍不能完全代表人群的结果。此外,超微血流成像技术的应用处于初级阶段,对超声诊断医师及超声设备的要求较高,容易出现误差等。

综上所述,超微血流成像技术可以在二维超声的基础上对不同病理分型的斑块内新生血管做出精确判断,有望在临床中推广应用,为临床预防和诊治动脉粥样硬化所致心脑血管疾病提供了强有力的影像学依据。

参考文献

- [1] CHEN X, WANG H, JIANG Y, et al. Neovascularization in carotid atherosclerotic plaques can be effectively evaluated by superb microvascular imaging (SMI): initial experience[J]. Vasc Med, 2020, 25(4): 328-333.
- [2] 蒋彦彦, 朱建平, 孙立. 超声造影评价颈动脉斑块内新生血管的应用研究[J]. 中国超声医学杂志, 2016, 32(9): 776-779.
- [3] 何广敏, 左艳玲, 郑荣辉, 等. 超声超微血流分级与彩色像素密度对乳腺肿块诊断价值的对比研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2021, 27(1): 58-61.
- [4] THAMMONGKOLCHAI T, RIAZ A, SUNDARA RAJAN S. Carotid stenosis: role of plaque morphology in recurrent stroke risk[J]. Stroke, 2017, 48: e197-199.
- [5] 谢永富, 陶振荣, 孙羽东, 等. 颈动脉斑块稳定性评价方法的意义及研究进展[J/CD]. 中国血管外科杂志(电子版), 2018, 10(1): 65-70.
- [6] STAUB D, SCHINKEL A F, COLL B. Contrast-enhanced ultrasound imaging of the vasa vasorum: from early atherosclerosis to the identification of unstable plaques[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2010, 3: 761-771.
- [7] VAVURANAKIS M, SIGALA F, VRACHATIS D A, et al. Quantitative analysis of carotid plaque vasa vasorum by CEUS and correlation with histology after endarterectomy[J]. Vasa, 2013, 42(3): 184-195.
- [8] FILIS K, TOUFEK TZIAN L, GALYFOS G, et al. Assessment of the vulnerable carotid atherosclerotic plaque using contrast-enhanced ultrasonography[J]. Vascular, 2017, 25(3): 316-325.
- [9] 肖露, 褚雯, 王华. 超微血管成像技术对乳腺肿瘤血管形态分布特征及其诊断效能的初步分析[J]. 中华超声影像学杂志, 2018, 27(11): 973-976.
- [10] HOOGI A, ZURAKHOV G, ADAM D. Evaluation of a 3D technique for quantifying neovascularization within plaques imaged by contrast enhanced ultrasound[J]. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2013, 2013: 1124-1127.
- [11] 刘璐. 冠心病患者股动脉斑块超声声像特征及温胆片调节斑块作用的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [12] 薛莉, 王谦谦, 赵晓莉, 等. 超声造影成像技术评价颈动脉斑块内新生血管的临床研究[A]//中国超声医学工程学会. 中国超声医学工程学会成立 30 周年暨第十二届全国超声医学学术大会论文汇编[C]. 中国超声医学工程学会: 中国超声医学工程学会, 2014: 2.
- [13] AKKUS Z, HOOGI A, RENAUD G, et al. New quantification methods for carotid intra-plaque neovascularization using contrast-enhanced ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 2014, 40(1): 25-36.
- [14] 陈琛. 超微血管成像技术(SMI)在评价颈动脉粥样硬化斑块稳定性中的应用[J]. 影像技术, 2020, 32(2): 40-42.
- [15] 朱一成, 江泉, 邓舒昊, 等. 两种方法评估阿托伐他汀改善斑块内新生血管形成效果的一致性分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(11): 1499-1502.
- [16] 叶玉泉, 薛红元, 高丽. 颈动脉斑块内新生血管的超微血管显像: 与超声造影对比[J]. 中国医学影像技术, 2015, 31(5): 651-654.
- [17] 魏小雨, 杨力, 王雪, 等. SMI 和超声造影在颈动脉斑块内新生血管的比较分析[J]. 中国超声医学杂志, 2018, 34(4): 307-309.