

❖ 实验研究

Contrast-enhanced ultrasound in evaluation on renal cortex blood perfusion in rat models of hemorrhagic shock

HU Jingwei¹, ZENG Zhen¹, LI Mingxing^{1*}, LI Xuan¹, HU Weizhong²

(1. Department of Ultrasound, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Department of Cardiovascular Ultrasound and Cardiac Function, Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective** Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) was used to investigate the feasibility of CEUS for evaluation on renal cortex blood perfusion changes in rat models of different degrees hemorrhagic shock (HS). **Methods** Twenty-four healthy male SD rats were randomly and equally divided into sham operation group (Sham group), mild hemorrhagic shock group (T₁ group), moderate hemorrhagic shock group (T₂ group) and severe hemorrhagic shock group (T₃ group, each $n=6$). CEUS was performed after establishment of models to observe renal cortex blood perfusion, and analysis was performed on the time-intensity curve (TIC). Comparative parameters, including peak, time to peak (TTP), AUC and mean transition time (MTT) were analyzed. Venous blood was taken for renal biochemical examination after CEUS, and renal tissue was taken for pathological examination after the rats were killed. **Results** TTP, AUC, MTT and urea nitrogen (Urea) in T₁ group increased compared with those in Sham group (all $P<0.05$), but pathological changes were not obvious. TTP, MTT and creatinine (Crea) in T₂ group increased than those in Sham group and T₁ group (all $P<0.05$), AUC in T₂ group increased than that in Sham group ($P<0.05$), and pathological changes in T₂ group were more damaging compare with T₁ group. TTP, AUC, MTT and Crea in T₃ group increased than that in the other groups (all $P<0.05$), and peak in T₃ group increased than that in Sham group and T₁ group (both $P<0.05$). Urea in T₃ group increased than that in Sham group ($P<0.05$), and pathological changes were significant. Significant positive correlations were found between TTP, AUC, MTT and Crea ($r=0.789, 0.790, 0.800$, all $P<0.001$). **Conclusion** CEUS can quantitatively analyze renal cortex blood perfusion changes of rat models caused by hemorrhagic shock. TIC is useful for quantitative analysis, of which TTP, AUC and MTT can be used as sensitivity indexes.

[Keywords] shock, hemorrhagic; perfusion; ultrasonography, interventional

DOI:10.13929/j.issn.1003-3289.2020.03.012

超声造影评价大鼠失血性休克肾皮质血流灌注

胡经纬¹, 曾 楨¹, 李明星^{1*}, 李 璇¹, 胡卫中²

(1. 西南医科大学附属医院超声医学科, 四川 泸州 646000; 2. 四川省医学科学院
四川省人民医院心血管超声及心功能科, 四川 成都 610072)

[摘要] **目的** 应用超声造影(CEUS)技术评价不同程度失血性休克(HS)大鼠肾皮质血流灌注变化。**方法** 将 24 只健康雄性 SD 大鼠随机均分为假手术组(Sham 组)、轻度失血性休克组(T₁组)、中度失血性休克组(T₂组)、重度失血性休

[基金项目] 四川省教育厅科研资助课题(14ZA0139)。

[第一作者] 胡经纬(1993—), 女, 四川乐山人, 在读硕士。研究方向: 腹部超声诊断。E-mail: 419349165@qq.com

[通信作者] 李明星, 西南医科大学附属医院超声医学科, 646000。E-mail: lmx526@sina.com

[收稿日期] 2019-07-18 **[修回日期]** 2019-11-03

克组(T_3 组)。造模后行 CEUS, 观察肾皮质血流灌注状况, 获取时间-强度曲线(TIC), 对比各组峰值浓度(Peak)、达峰时间(TTP)、曲线下面积(AUC)及平均渡越时间(MTT)。造影结束后取静脉血行肾功能生化检查, 处死大鼠取肾组织行病理检查。**结果** T_1 组 TTP、AUC、MTT、尿素氮(Urea)较 Sham 组增加(P 均 <0.05), 病理改变不明显; T_2 组 TTP、MTT、血肌酐(Crea)较 Sham 组和 T_1 组增加(P 均 <0.05), AUC 较 Sham 组增加($P<0.05$), 病理改变加重; T_3 组 TTP、AUC、MTT、Crea 较其余 3 组增加(P 均 <0.05), Peak 较 Sham 组、 T_1 组增加、Urea 较 Sham 组增加(P 均 <0.05), 病理改变显著。TTP、AUC、MTT 与 Crea 均呈显著正相关($r=0.789, 0.790, 0.800, P$ 均 <0.001)。**结论** CEUS 可定量分析大鼠失血性休克所致肾皮质血流灌注改变; TTP、AUC、MTT 可作为敏感指标。

[关键词] 休克, 失血性; 灌注; 超声检查, 介入性

[中图分类号] R-332; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2020)03-0372-05

失血性休克(hemorrhagic shock, HS)指短时间内有效循环血量大量丢失或大量减少, 组织器官血液灌注不足。肾脏作为少有侧支循环的高灌注脏器, 依靠血流灌注压力和血液流动来维持滤过与重吸收之间的平衡, HS 时血压过低超过肾脏自我调节能力可致肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)降低, 肾功能受损。肾脏微循环灌注改变在急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)发展中扮演重要角色。早期有效监测肾脏血流动力学变化, 能早期诊断、及早干预、最大程度减轻肾损伤、促进肾功能恢复。本研究超声造影(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)运用定量分析技术实时观察大鼠肾脏血流灌注、特别是肾皮质的微循环灌注变化, 以期临床早期、有效干预和治疗 HS 提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康成年雄性 SD 大鼠 24 只[体质量(300 ± 50)g, 成都达硕实验动物有限公司提供], 于恒温动物房(25°C)适应性喂养 3 天, 自由摄入食水, 术前 6 h 停饲、停水。随机将大鼠分为假手术组(Sham 组)、轻度 HS 组(T_1 组)、中度 HS 组(T_2 组)及重度 HS 组(T_3 组), 每组 6 只。

1.2 HS 模型建立 腹腔注射肝素钠溶液(10 mg/kg 体质量)进行全身肝素化, 15 min 后以 10%水合氯醛行腹腔麻醉(2 ml/kg 体质量, 规格 $10\text{ ml}:1\text{ g}$), 备皮后保定于手术台上。于颈部偏左侧做一纵形切口, 钝性分离左侧颈总动脉, 置入 24G 留置针并固定。连通多导生物转换器并实时监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP), 记为 MAP_0 。同法于左侧股总动脉及静脉内分别置入 24G 留置针, 经左侧股总动脉迅速放血, MAP 下降达到 70% MAP_0 时记为 MAP_1 。经左侧股总动脉少量放血, 或左侧股总静脉少量补液(晶体:胶体=2:1), 维持 MAP_1 60 min, 标志 T_1 组模型建造成功。以同样方法制备 T_2 组(50% MAP_0)、 T_3 组(40% MAP_0)动物模型。对 Sham 组仅

行全身肝素化、腹腔麻醉、血管插管及监测 MAP_0 操作。

1.3 仪器与方法 采用 Siemens ACUSON S3000 超声诊断仪, 9L-4 变频线阵探头, 参数:深度 3.5 cm、频率 4.0 MHz、机械指数 0.05。以 SonoVue (上海 Bracco 公司)为超声造影剂, 将 5.0 ml 生理盐水注入瓶内用力振荡, 配置成六氟化硫微泡混悬液。模型建造成功后稳定 10 min, 行右肾 CEUS。经左侧股总静脉置管团注造影剂(0.4 ml/kg 体质量), 随后迅速注入 0.4 ml 生理盐水进行冲管。采集右肾最大纵切面 CEUS 图像, 连续观察 3 min。使用机载内置分析软件(auto tracking contrast quantification, ACQ)进行定量分析, ROI 设置为 0.05 mm^2 圆形取样框, 放置在同一深度、与声束垂直的肾皮质区外层。绘制时间-强度曲线(time-intensity curve, TIC), 经软件计算得出相关定量参数, 包括峰值浓度(Peak)、达峰时间(time to peak, TTP)、AUC 及平均通过时间(mean transition time, MTT), 并进行组间分析。

1.4 肾功能检查 造影结束后经左侧股总静脉取静脉血 2~3 ml, 室温离心($4\ 000\text{ r/min}$, 5 min)后取上层血清, 检测大鼠肾功血肌酐(creatinine, Crea)及尿素氮(urea nitrogen, Urea)。

1.5 病理学检查 经左侧股总静脉注入空气 3~4 ml 处死大鼠, 迅速取大鼠右肾组织固定于 10%中性甲醛, 脱水 24 h 以上, 石蜡包埋切片行 HE 染色, 镜下观察病理改变。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计分析软件。各参数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用单因素方差分析, 两两比较使用 LSD 法。运用 Pearson 相关分析评价 CEUS 各指标与大鼠生化指标之间的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CEUS 表现 Sham 组(图 1A)可见造影剂迅速充盈到肾脏血管内, 按肾动脉、肾皮质、肾髓质依次充

盈增强,呈明显“树枝状”分布;达到 TTP 后造影剂开始缓慢廓清,按肾髓质、肾皮质、肾静脉顺序退出肾脏。 T_1 组(图 1B)造影剂进入肾脏时间较 Sham 组稍延迟。 T_2 (图 1C)、 T_3 组(图 1D)可见造影剂进入肾脏速度明显减慢,肾皮质增强明亮度较 T_1 组明显降低; T_3 组造影增强灰暗,肾内动脉分支“树枝状”明显变细。

2.2 各组 TIC 定量分析比较 T_1 组 TTP、AUC、MTT 较 Sham 组增加(P 均 <0.05); T_2 组 TTP、MTT 较 Sham 组和 T_1 组增加(P 均 <0.05),AUC 较 Sham 组增加($P<0.05$); T_3 组 TTP、AUC、MTT 较其余 3 组增加(P 均 <0.05),Peak 较 Sham 组、 T_1 组

增加(P 均 <0.05)。见表 1。

2.3 各组生化结果比较 Crea 在 Sham 组、 T_1 、 T_2 和 T_3 组依次升高,除外 T_1 组与 Sham 组,其余各组间差异均有统计学意义(P 均 <0.05), T_1 组和 T_3 组 Urea 较 Sham 组增加(P 均 <0.05)。见表 2。

2.4 相关性分析 4 组 Crea 与 TTP、AUC、MTT 均呈显著正相关($r=0.789、0.790、0.800, P$ 均 <0.001)。

2.5 病理结果 大体观察,Sham 组肾脏红润, T_1 肾脏较 Sham 组肉眼观无明显改变; T_2 组切面肾皮质较 Sham 组苍白,髓质颜色加深; T_3 组肾脏水肿黑红色,切

表 1 各组大鼠肾皮质 TIC 曲线参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Peak(dB)	TTP(s)	AUC(dB·s)	MTT(s)
Sham 组	47.83±3.35	15.71±1.97	2 578.83±87.59	39.20±4.01
T_1 组	48.87±2.09	25.50±5.54*	4 051.49±714.54*	61.01±10.13*
T_2 组	51.52±8.12	33.51±3.56*#	5 442.08±1292.99*	76.84±9.48*#
T_3 组	59.02±2.30*#	41.94±3.46*#▲	9 920.77±582.24*#▲	122.34±8.07*#▲
F 值	5.740	32.633	68.170	77.126
P 值	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001

注:*,与 Sham 组比较, $P<0.05$;#,与 T_1 组比较, $P<0.05$;▲与 T_2 组比较, $P<0.05$

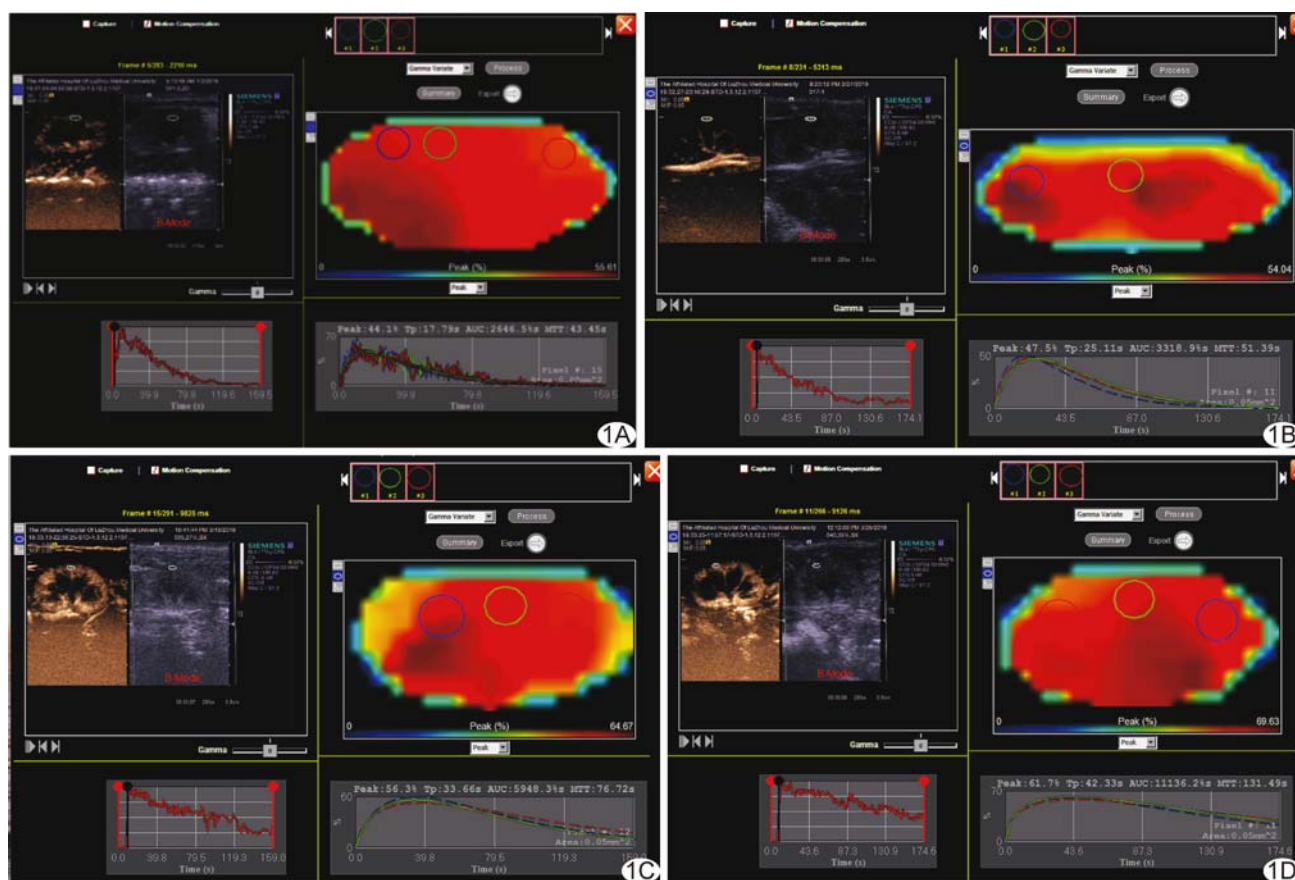


图 1 各组大鼠超声造影图 A. Sham 组; B. T_1 组; C. T_2 组; D. T_3 组

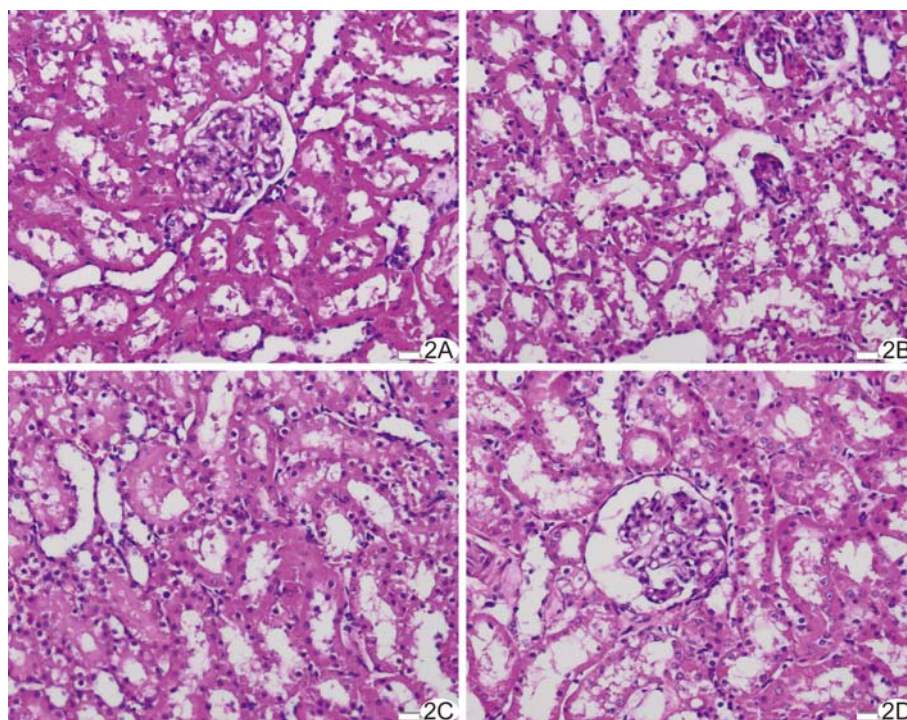


图 2 各组大鼠肾脏病理图(HE, ×200) A. Sham 组; B. T₁ 组; C. T₂ 组; D. T₃ 组

面皮质肿胀、苍白更为严重,髓质呈暗红色。光镜下 Sham 组(图 2A)肾小管、肾小球结构未见明显病理学改变;T₁、T₂、T₃组肾小球未见明显收缩、硬化改变,肾小管内未见明显铸型结构。T₁组(图 2B)肾小管上皮细胞肿胀不明显,未见明显炎性细胞浸润;T₂组(图 2C)肾小管上皮细胞肿胀较 T₁组明显,间质内偶见少量炎性细胞浸润;T₃组(图 2D)肾小管上皮细胞明显肿胀,部分呈“气球样”改变,可见炎性细胞浸润。T₁、T₂、T₃组均未见明显细胞凋亡。

表 2 各组大鼠 Urea、Crea 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Urea(mmol/L)	Crea(μ mol/L)
Sham 组	7.02±0.49	41.85±16.10
T ₁ 组	10.57±1.06 *	43.38±8.49
T ₂ 组	8.13±1.23	57.57±4.98 * #
T ₃ 组	10.23±3.61 *	72.25±12.17 * #▲
F 值	3.003	9.358
P 值	0.059	<0.001

注: * :与 Sham 组比较, $P < 0.05$; # :与 T₁组比较, $P < 0.05$; ▲ :与 T₂组比较, $P < 0.05$

3 讨论

HS 是急诊和重症监护常见病症,机体有效循环血量大量丢失会迅速引起全身性低血压,引发机体组织器官低灌注。肾脏灌注量约占心排量的 20%,HS 时首先受到影响。肾脏结构复杂,功能涉及排泄代谢

废物及对机体调节渗透压和酸碱平衡,很大程度上受肾脏血流灌注改变的影响;肾血流量(renal blood flow, RBF)90%供应肾皮质,准确测量肾皮质血流灌注变化可为评价肾功能改变提供依据^[1-2]。

临床常用于评估肾脏血流灌注情况的影像学方法包括增强 CT(contrast-enhanced computed tomography, CECT)、磁共振灌注成像(perfusion weighted imaging, PWI)、核素灌注成像(nuclear medicine imaging, NMI)及 CEUS,但传统影像学方法用于肾病患者有其特定局限性和禁忌证^[3]。部分肾功能不良患者无法耐受碘对比剂和钆对比剂的肾毒性;且 CECT、NMI 均有辐射,使其应用受限^[4-5]。

CEUS 可动态监测宏观血流和微循环变化^[6]。超声造影剂微泡被限制在血池中,不渗入血管间质,也不被肾小球滤过和肾小管重吸收^[7];其微泡直径 1~5 μ m,是理想的红细胞示踪剂,能进入几乎所有毛细血管,可使血管微结构可视化,达到监测毛细血管微循环水平血流动力学变化的目的;其惰性气体核心不被代谢,气泡溶解后数分钟内随呼吸排出,不通过肾脏排泄,无肾毒性。本实验建立大鼠 HS 模型,采用 CEUS 监测大鼠肾皮质微循环灌注变化,探讨以 CEUS 评估不同程度 HS 大鼠肾皮质血流灌注变化的可行性^[8-9]。

本研究结果显示,随休克程度加重, TTP、MTT 时间延长, AUC 增加(P 均 < 0.05),与罗志建等^[10]、LI 等^[11]的结果一致。TTP 指 ROI 内出现造影剂到达峰值强度的时间,反映造影剂灌注速度;MTT 是造影剂开始增强到峰值浓度下降一半的时间,反映其廓清速度。AUC 为 TIC 下面积,反映一定时间内 ROI 内造影剂累积。发生休克时,全身性低血压导致炎性介质渗出,引起血管内皮活化、损伤,多种因素共同作用,最终导致肾皮质内微循环灌注降低,表现为灌注和廓清速度降低, TIC 定向表现为 TTP、MTT 延长;释放的炎性细胞可吞噬造影剂微泡,导致造影剂廓清减慢,而被吞噬微泡仍保留声学活性,表现为 AUC 增加^[12]。本研究中 Peak 值在 Sham 组、T₁、T₂ 和 T₃

组依次升高,但仅 T_3 组与 Sham 组、 T_3 组与 T_1 组差异有统计学意义(P 均 <0.05),可能因为 Peak 代表 ROI 内造影剂含量达到峰值时的浓度,为瞬间指标,无明显累积效应,不能很好地反映肾皮质微循环灌注变化。

肾脏最重要的功能之一是滤过和排泄血液中的含氮废物,Crea 升高可作为肾功能下降的指标。本研究各 HS 组 Crea 值相比 Sham 组均升高,其中 T_1 组与 Sham 组差异无统计学意义,提示随着休克程度加重,肾脏血流灌注下降,肾功能损伤进一步加重,与超声造影参数 TTP、AUC、MTT 的走向及统计学结果一致,证明 CEUS 能反映 HS 所致肾功能改变。既往研究^[13]显示,Crea 下降可在数小时至数日内发生。但 Crea 作为肾小球滤过率的替代标记物相对不准确,而 CEUS 有望通过监测肾皮质微循环灌注变化间接评估肾损伤。

本研究中采用 TIC 参数评估肾功能损伤程度,所获结果与生化指标 Crea 结果存在高度一致性,TTP、AUC、MTT 与 Crea 均呈显著正相关,随缺血再灌注肾功能损伤程度增加而增高,而 MTT 与 Crea 相关性最高。

超声造影剂无肾毒性^[8,14],可安全用于肾功能受损患者。CEUS 具有实时性、便携性和可重复性,且能降低对金属和运动伪影的敏感性。利用 CEUS 可在数分钟内确定器官不同区域组织血流量,提供关于肾血流动力学及肾血流区域变化的信息。

本实验具有以下不足:①动物样本量相对较少;②基于麻醉并全身肝素化建造实验动物模型,与实际临床情况有所出入。

综上所述,CEUS 各参数可为观察大鼠肾脏损伤早期肾皮质血流灌注变化提供可靠信息,TTP、AUC、MTT 可作为评价早期肾损伤的敏感指标。

[参考文献]

- [1] FISCHER K, MERAL F C, ZHANG Y, et al. High-resolution renal perfusion mapping using contrast-enhanced ultrasonography in ischemia-reperfusion injury monitors changes in renal microperfusion[J]. *Kidney Int*, 2016,89(6):1388-1398.
- [2] WEI K, LE E, BIN J P, et al. Quantification of renal blood flow with contrast-enhanced ultrasound[J]. *J Am Coll Cardio*, 2001, 37(4):1135-1140.
- [3] HULL T D, AGARWAL A, HOYT K. New ultrasound techniques promise further advances in AKI and CKD[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017,28(12):3452-3460.
- [4] PUTZ F J, ERLMEIER A, WIESINGER I, et al. Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in renal imaging at an interdisciplinary ultrasound centre: Possibilities of dynamic microvascularisation and perfusion [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2017,66(4):293-302.
- [5] Kalantarina K. Novel imaging techniques in acute kidney injury [J]. *Curr Drug Targets*, 2009,10(12):1184-1189.
- [6] LAMBY P, PRANTL L, KRÜGER-GENGE A, et al. Influence of ultrasound microbubbles on kidney oxygen tension [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2017,67(3-4):211-214.
- [7] GREIS C. Quantitative evaluation of microvascular blood flow by contrast-enhanced ultrasound (CEUS) [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2011,49(1-4):137-149.
- [8] CHONG W K, PAPADOPOULOU V, DAYTON P A. Imaging with ultrasound contrast agents: Current status and future [J]. *Abdom Radiol (NY)*, 2018,43(4):762-772.
- [9] 何晶玲. 超声造影评价失血性休克液体复苏肾血流灌注的实验研究[D]. 广州:南方医科大学,2017.
- [10] 罗志建,李明星,陈晓梅,等. 超声造影监测兔肾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.
- [11] LI M, LUO Z, CHEN X, et al. Use of contrast-enhanced ultrasound to monitor rabbit renal ischemia-reperfusion injury and correlations between time-intensity curve parameters and renal ICAM-1 expression [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2015, 59(2):123-131.
- [12] 乔实,贾化平,梁会泽,等. 超声造影时间-强度曲线对急性肾损伤的诊断价值 [J]. *中国超声医学杂志*, 2017, 33(9):833-836.
- [13] SALMON-GANDONNIERE C, BENZ-DE I, MERCIER E, et al. Iohexol clearance in unstable critically ill patients: A tool to assess glomerular filtration rate [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(11):1777-1786.
- [14] MEOLA M, NALESSO F, PETRUCCI I, et al. Ultrasound in acute kidney disease [J]. *Contrib Nephrol*, 2016,188:11-20.

[1] FISCHER K, MERAL F C, ZHANG Y, et al. High-resolution renal perfusion mapping using contrast-enhanced ultrasonography