

## Doppler ultrasound and CEUS in evaluation of synovial changes based on rabbit model

CHEN Shuqiang<sup>1\*</sup>, YE Zhen<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, ZENG Jinshu<sup>1</sup>,  
XU Xiang<sup>1</sup>, BAO Zhongtao<sup>1</sup>, ZHENG Qing<sup>2</sup>

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Hematology and Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate value of Doppler ultrasound and CEUS in assessing rheumatoid arthritis (RA) activity and synovial pathology changes based on rabbit model. **Methods** A total of 30 New Zealand rabbits were divided into 2 groups, including 25 in model group and 5 in contrast group. RA models were established on rabbits in model group induced by egg-protein. Meanwhile saline injections were performed on rabbits in contrast group. After Doppler ultrasound and CEUS, pathological examinations were done to evaluate the activity of RA. Taking pathological results as the golden standard, the diagnostic efficiency of Doppler ultrasound and CEUS for active synovitis were compared. And the correlations of Doppler ultrasound flow scores, CEUS enhanced scores and pathological scores were studied. **Results** RA models were established successfully in 23 of 25 rabbits in model group. And all the 46 knees of RA rabbits were manifested as redness and swollen. Both of Doppler ultrasound and CEUS could reflect synovial inflammation. The manifestations of contrast group were negative. Synovium could not be displayed by Doppler ultrasound and CEUS. The sensitivity, specificity and accuracy of Doppler ultrasound in finding active synovitis was 80.56% (29/36), 60.00% (6/10) and 76.09% (35/46), respectively. And the sensitivity, specificity and accuracy was 94.44% (34/36), 90.00% (9/10) and 93.47% (43/46) for CEUS, respectively. The differences of sensitivity, specificity and accuracy were statistically significant between Doppler ultrasound and CEUS ( $\chi^2=6.35, 4.25, 5.11$ , all  $P<0.05$ ). Doppler ultrasound flow scores were positively correlated with pathological scores ( $r_s=0.557, P<0.05$ ), and the positive correlations were also found between CEUS enhanced scores and pathological scores ( $r_s=0.715, P<0.01$ ). **Conclusion** Both of Doppler ultrasound and CEUS can reflect synovitis pathological changes of knees in RA rabbit models. CEUS shows better diagnostic efficiency for active synovitis.

**[Key words]** Arthritis, rheumatoid; Models, animal; Rabbits; Ultrasonography; Pathology

DOI:10.13929/j.1003-3289.2016.11.002

## 多普勒超声与超声造影评价兔类风湿性关节炎模型滑膜病变

陈树强<sup>1\*</sup>, 叶真<sup>1</sup>, 刘晖<sup>1</sup>, 曾锦树<sup>1</sup>, 许翔<sup>1</sup>, 包中涛<sup>1</sup>, 郑擎<sup>2</sup>

(1. 福建医科大学附属第一医院超声影像科, 2. 风湿科, 福建福州 350005)

**[摘要]** **目的** 探讨多普勒超声与 CEUS 评估兔类风湿性关节炎(RA)模型膝关节滑膜病理改变及早期诊断活动性滑膜炎的价值。 **方法** 将 30 只新西兰兔随机分为两组, 对模型组 ( $n=25$ ) 以卵蛋白诱导建立双膝关节 RA 模型, 对照组

**[基金项目]** 福建医科大学附属第一医院中青年骨干教师基金(JGG201307)。

**[第一作者]** 陈树强(1976—), 男, 福建莆田人, 博士, 副主任医师。研究方向: 腹部与浅表超声影像学。

**[通信作者]** 陈树强, 福建医科大学附属第一医院超声影像科, 350005。E-mail: chenshu0518@163.com

**[收稿日期]** 2015-12-15 **[修回日期]** 2016-07-01

( $n=5$ )相应时间点仅注射生理盐水。对两组均于多普勒超声和 CEUS 检查后进行病理检查。以病理检查为金标准,评价多普勒超声及 CEUS 对活动性滑膜炎的诊断效能,并分析多普勒超声血流分级、CEUS 增强程度分级与滑膜炎病理评分的相关性。**结果** 模型组 23 只兔建模成功,46 个膝关节均出现不同程度红肿,模型组多普勒超声与 CEUS 均可反映滑膜炎炎症。对照组膝关节均无明显变化。多普勒超声对兔 RA 模型膝关节活动性滑膜炎的诊断敏感度、特异度、准确率分别为 80.56%(29/36)、60.00%(6/10)、76.09%(35/46);CEUS 分别为 94.44%(34/36)、90.00%(9/10)、93.47%(43/46);两种方法的敏感度、特异度、准确率差异均有统计学意义( $\chi^2=6.35, 4.25, 5.11, P$  均 $<0.05$ )。多普勒超声血流分级( $r_s=0.557, P<0.05$ )、CEUS 增强程度分级( $r_s=0.715, P<0.01$ )均与滑膜炎病理评分呈正相关。**结论** 多普勒超声和 CEUS 均可反应兔 RA 模型膝关节滑膜病理改变,CEUS 对活动性滑膜炎的诊断效能更优。

**[关键词]** 关节炎;类风湿;模型;动物;兔;超声检查;病理学

**[中图分类号]** R-332; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2016)11-1639-05

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)治疗过程中,药物作用使病变滑膜出现不同程度的纤维化、玻璃样变或其他变性改变,针对滑膜炎病理状态的准确评估有助于优化治疗方案<sup>[1]</sup>。多普勒超声和 CEUS 均可反映滑膜血管翳血流状态。本研究建立兔 RA 模型,对比观察多普勒超声与 CEUS 滑膜灌注的情况,评估二者反映滑膜病理改变的价值。

## 1 材料与方法

**1.1 建立动物模型** 选取 6 月龄左右雄性新西兰大白兔 30 只,体质量 2.5~3.0 kg,平均(2.66±0.46)kg。按照随机对照表分为模型组(25 只)和对照组(5 只)。对模型组以卵蛋白诱导建立 RA 模型<sup>[2-3]</sup>,主要步骤包括:①基础致敏,以 20 g/L 的鸡卵清蛋白(OVA, Sigma 公司)弗氏完全佐剂溶液(Sigma 公司),1 ml 背部皮下致敏,间隔 1 周注射 1 次,连续 3 周。②局部致敏,末次基础致敏注射后 1 周(即第 4 周),于每只兔后腿大膝关节内分别注入 1.6 ml 溶解的卵蛋白溶液(5 g/L)。对照组兔的处理时间点与模型组相同,每次注射剂均为 1 ml 的生理盐水。

**1.2 超声检查** 于模型建立后病理检查前对两组每周进行 1 次超声检查,包括多普勒超声及 CEUS。

**1.2.1 多普勒超声** 采用 Philips iU22 超声诊断仪, L5-12 探头,频率 5~12 MHz。检查前 30 min 以 1% 戊巴比妥钠麻醉实验兔,剂量 6 mg/kg 体质量。将实验兔摆放适当的体位(前后位、侧位),以骨骼、肌肉低速血流条件对各膝关节进行扫查。主要观察关节腔积液及关节滑膜血流信号。

末次多普勒超声检查时,对滑膜血流灌注进行分级评价<sup>[4-5]</sup>:0 级,无血流信号;1 级,增生的滑膜内见少许星点状血流信号;2 级,增生的滑膜内见条状血流信号,充盈面积 $<$ 滑膜面积的 50%;3 级,增生的滑膜内见条状丰富血流信号,充盈面积 $\geq$ 滑膜面积的 50%。将其中 2、3 级诊断为严重的滑膜炎,相当于活动性滑膜炎。

**1.2.2 CEUS** 采用 Philips iU22 超声诊断仪, L5-12 探头,频率 5~12 MHz。于多普勒超声检查完成后行 CEUS,机械指数为 0.08,灰阶增益 35~45,谐波发射频率设置为 RES。造影剂为 SonoVue(Bracco, Milano),以造影剂内自带的深静脉留置管穿刺兔耳缘静脉,团注 1 ml 造影剂后,以 4 ml 生理盐水冲管。

末次 CEUS 检查时,对滑膜造影增强程度进行分级评价<sup>[6]</sup>:0 级:滑膜内未见增强,而周围组织(肌肉、肌腱及韧带等)可见造影剂充盈信号;I 级:滑膜内可见增强,但强度低于关节周围组织;II 级:滑膜内增强程度大于关节周围组织。将 II 级认为是严重的滑膜炎,相当于活动性滑膜炎<sup>[6-8]</sup>。

**1.3 病理学检查** 于模型建立后 3~4 周(即第 7~8 周)CEUS 后进行超声引导下滑膜活检。采用 18G 活检穿刺针,由髌韧带附着点处上方约 0.5 cm 处进针,避开大血管及关节腔积液,超声显示活检针进入关节腔内病变滑膜处后,根据滑膜情况,留取滑膜标本。将标本以常规方法制备、HE 染色后,镜下观察滑膜增生、周围组织炎性细胞浸润等情况。由 2 名病理医师共同进行滑膜炎病理评分,分为 0~3 分<sup>[7]</sup>,取得一致意见后予以记录。0 分,无滑膜炎,1 分,轻度滑膜炎,中性粒等炎性细胞轻度浸润;2 分,中度滑膜炎,炎性细胞中度浸润;3 分,中度滑膜炎,炎性细胞中度浸润。将 2~3 分认为活动性滑膜炎。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。以病理检查为金标准,采用四格表评价多普勒超声、CEUS 对兔 RA 模型膝关节活动性滑膜炎的诊断效能。两种方法诊断敏感度、特异度、准确率的比较采用  $\chi^2$  检验。等级资料的相关性采用 Spearman 秩相关性分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

模型组 23 只实验兔完成实验(共 46 个膝关节),2

只因麻醉原因未能进行活检。RA 模型建立(即第 4 周)后,模型组双侧膝关节均出现不同程度红肿。对照组 5 只实验兔相应时间点均生长正常,双膝关节(共 10 个膝关节)均无明显变化。

2.1 关节滑膜的多普勒超声及 CEUS 表现 对照组滑膜与关节囊、关节软骨区分不明显,多普勒超声及 CEUS 均无法显示。

模型组多普勒超声与 CEUS 均可反映滑膜炎症(图 1~3)。多普勒超声可见增厚的滑膜上呈现不同程度的血流信号,46 个膝关节中 0 级 1 个(1/46, 2.17%),1 级 12 个(12/46, 26.09%),2 级 15 个(15/46, 32.61%),3 级 18 个(18/46, 39.13%)。多普勒超声诊断活动性滑膜炎膝关节共 33 个。

模型组 CEUS 可见滑膜增强,呈明显的高回声,增强区域与未见造影剂充填的周围组织(关节积液及未强化的滑膜组织)之间界限清楚,增强的滑膜厚薄不均匀,形态不规则,部分关节腔内积液较为明显者可见

清晰的绒毛状结构。46 个膝关节中,CEUS 增强程度为 I 级 1 个(1/46, 2.17%),II 级 10 个(10/46, 21.74%),III 级 35 个(35/46, 76.09%)。CEUS 诊断活动性滑膜炎膝关节共 35 个。

2.2 滑膜组织病理表现 对照组滑膜均未见明显异常改变。模型组可见滑膜纤维素性变性 & 玻璃样变性,二者常交替出现而常不易区分(图 4、5);滑膜炎病理评分平均(2.14±0.78)分。46 个膝关节中,滑膜炎病理评分 0 分 1 个,1 分 9 个,2 分 20 个,3 分 16 个;病理诊断活动性滑膜炎膝关节共 36 个。

2.3 超声与病理对照 以病理结果为金标准,多普勒超声对兔 RA 模型膝关节活动性滑膜炎的诊断敏感度、特异度、准确率分别为 80.56%(29/36)、60.00%(6/10)、76.09%(35/46);CEUS 分别为 94.44%(34/36)、90.00%(9/10)、93.47%(43/46);两种方法的诊断敏感度、特异度、准确率差异有统计学意义( $\chi^2 = 6.35, 4.25, 5.11, P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

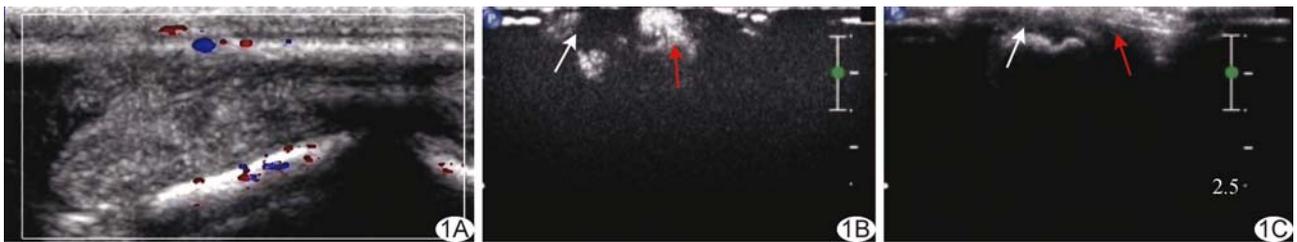


图 1 兔膝关节 RA 模型,多普勒超声显示滑膜组织无血流信号(0 级,A),CEUS 示滑膜内无造影剂充填(白箭),而肌肉、韧带等关节周围组织可见增强(红箭,B,C)

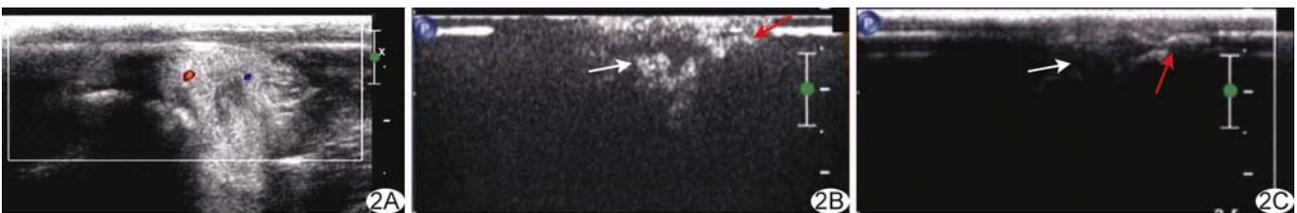


图 2 兔膝关节 RA 模型,多普勒超声显示滑膜内少许星点状血流信号(1 级,A),CEUS 示滑膜内可见增强(I 级,白箭),但强度稍低于肌肉、韧带等关节周围组织(红箭,B,C)



图 3 兔膝关节 RA 模型,多普勒超声显示滑膜内较为丰富的血流信号(3 级,A),CEUS 示滑膜内增强程度(II 级)高于肌肉、韧带等关节周围组织(箭,B,C)

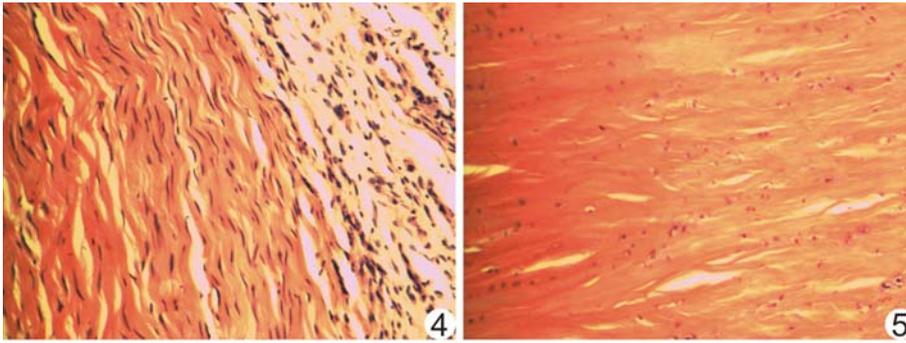


图 4 兔膝关节 RA 模型滑膜纤维素样变性 炎性滑膜表面可见浸润的炎性细胞减少或消失,并见边界不清的颗粒状或块状无结构嗜酸性红染物质,状似纤维素(HE,×200) 图 5 兔膝关节 RA 模型滑膜玻璃样变性 细胞成分稀少,可见嗜伊红染色同质状半透明的蛋白样物质(HE,×200)

多普勒超声血流分级 ( $r_s = 0.557, P < 0.05$ )、CEUS 增强程度分级 ( $r_s = 0.715, P < 0.01$ ) 均与滑膜炎病理评分呈正相关。

表 1 多普勒超声、CEUS 诊断兔 RA 模型膝关节活动性滑膜炎与病理结果对照(个)

项目	病理		合计
	阳性	阴性	
多普勒超声			
阳性	29	4	33
阴性	7	6	13
CEUS			
阳性	34	1	35
阴性	2	9	11
合计	36	10	46

### 3 讨论

RA 的组织病理特征主要包括关节中的免疫复合物沉积,滑膜和滑液中含大量巨噬细胞、T 细胞、浆细胞等炎性细胞,同时滑膜增生和纤维化。RA 的滑膜病理过程可分为滑膜炎期、血管翳形成期和纤维化期。在血管翳形成期,肥厚的绒毛形成许多分支绒毛样的小突起,突向关节腔内,侵蚀周围组织包括软骨和骨质,造成关节破坏、畸形,从而引起功能障碍。进入纤维化期或经药物治疗后,细胞凋亡加速,滑膜出现纤维素样变性或玻璃样变性,血管翳中出现血管纤维化或血管坏死。纤维化的血管翳与活动性滑膜炎的鉴别对治疗及随访均有重要意义,滑膜可能包含数量不等的纤维组织,这部分并无活性,而能代表 RA 活动性的是有血液灌注增生滑膜<sup>[9]</sup>。本实验通过超声引导下滑膜活检,获取兔 RA 模型滑膜病理资料,发现膝关节滑膜在进入滑膜炎期就出现不同程度的纤维素

性变性或玻璃样变性,局部细胞成分稀疏或缺失,这部分组织可视作无活性的区域,与病理学研究<sup>[10-11]</sup>结果相符。由于病理学尚无法对纤维化的程度进行量化或半定量分析,为尽量减少主观误差,本研究中由 2 名病理医师协商进行评价。

有活性的滑膜组织较滑膜总体可更精确地反映 RA 滑膜病变情况,且有助于评价滑膜病变的微循环情况。目前可反映滑膜微循环的影像学方法包括增强

CT、增强 MRI、CEUS。CT 对滑膜和肌腱等软组织的分辨率较低;MRI 可通过 RA 临床实验结果评估-MR 评分(outcome measures in rheumatoid arthritis clinical trival-rheumatoid arthritis magnetic resonance imaging score, OMERACT-RAMRIS)量化评估关节 RA 病变情况<sup>[12]</sup>,其优势在于可显示滑膜下的软骨、骨质破坏及骨髓水肿,但检查费用高、耗时长,且 RA 早期软骨、骨质破坏及骨髓水肿少见,此外造影剂可能渗至血管外而不能真实反映滑膜内灌注情况<sup>[13]</sup>。二维灰阶超声及多普勒超声虽可显示病变局部的二维及血流病变情况,但由于分辨率及血流显示敏感性所限,彩色多普勒及能量多普勒超声均无法反映远端细微血流灌注区域滑膜组织的情况。近年来,CEUS 已广泛应用于临床,其可通过组织器官或病变的灌注反映微循环情况<sup>[14]</sup>。SonoVue 为第二代超声血池造影剂,在外周血液循环中持续时间长,增强显像效果好,可进行多次造影检查。目前多为关于 CEUS 与血清学变化的对照性研究<sup>[15]</sup>,与病理学的对照研究鲜见。本实验结果显示,多普勒超声血流分级 ( $r_s = 0.557, P < 0.05$ )、CEUS 增强程度分级 ( $r_s = 0.715, P < 0.01$ ) 均与滑膜炎病理评分均呈正相关,提示二者均可反映兔膝关节 RA 滑膜病理改变。

本研究中 CEUS 在 RA 早期诊断活动性滑膜炎的敏感度、特异度、准确率与多普勒超声差异均有统计学意义( $\chi^2 = 6.35, 4.25, 5.11, P$  均  $< 0.05$ )。通过二维超声有时难以鉴别 RA 关节腔积液(特别是透声较差者)与增生的滑膜,而多普勒超声由于敏感性的限制,容易出现假阴性,将有血流灌注的活性血管翳遗漏。通过 CEUS 可判断造影局部区域的微循环甚至毛细血管存在与否,因此可清晰显示有灌注区域的血

管翳;对积液和纤维化的滑膜即使不能完全区分,但由于其均无活性,因此对判断 RA 病理情况并无影响<sup>[10]</sup>。虽然通过多普勒超声显示的血流充盈区域可判断其为有活性的滑膜组织,但多普勒超声对血流信号的显示有限,无法鉴别远端无血流信号充盈的区域是否有血流灌注。CEUS 的意义在于通过观察血流灌注,可区分出有血管翳活性的滑膜组织与出现变性而无活性的滑膜组织。

总之,多普勒超声及 CEUS 均可反映兔 RA 模型膝关节滑膜病理改变。与多普勒超声相比,CEUS 可更敏感地显示 RA 滑膜血流灌注的情况,从而更准确地早期诊断活动性滑膜炎。

### [参考文献]

- [1] Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(3):492-509.
- [2] Atkinson EG, Dinning WJ, Kasp E, et al. Precipitation of experimental autoallergic uveoretinitis by cyclosporin A withdrawal: An experimental model of uveitis relapse. *Clin Exp Immunol*, 1989, 78(1):108-114.
- [3] Glynn LE. Experimental model of rheumatoid arthritis. *J Belge Rhumatol Med Phys*, 1967, 22(4):201-203.
- [4] Szkudlarek M, Court-Payen M, Jacobsen S, et al. Interobserver agreement in ultrasonography of the finger and toe joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(4):955-962.
- [5] Chakr RM, Mendonca JA, Brenol CV, et al. Assessing rheumatoid arthritis disease activity with ultrasound. *Clinical rheumatology*, 2013, 32(9):1249-1254.
- [6] Klauser A, Demharter J, De Marchi A, et al. Contrast enhanced gray-scale sonography in assessment of joint vascularity in rheumatoid arthritis: Results from the IACUS study group. *Eur Radiol*, 2005, 15(12):2404-2410.
- [7] Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, et al. Synovitis score: Discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology*, 2006, 49(4):358-364.
- [8] Hammer HB, Terslev L. Role of ultrasound in managing rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Reports*, 2012, 14(5):438-444.
- [9] Smith MD, Weedon H, Papangelis V, et al. Apoptosis in the rheumatoid arthritis synovial membrane: Modulation by disease-modifying anti-rheumatic drug treatment. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, 49(5):862-875.
- [10] Hirohata S, Tomita T, Yoshikawa H, et al. TNF inhibitors induce discoid fibrosis in the sublining layers of the synovium with degeneration of synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*, 2013, 33(10):2473-2481.
- [11] Stone MA, White LM, Gladman DD, et al. Significance of clinical evaluation of the metacarpophalangeal joint in relation to synovial/bone pathology in rheumatoid and psoriatic arthritis detected by magnetic resonance imaging. *J Rheumatol*, 2009, 36(12):2751-2757.
- [12] Axelsen MB, Eshed I, Duer-Jensen A, et al. Whole-body MRI assessment of disease activity and structural damage in rheumatoid arthritis: First step towards an MRI joint count. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(5):845-853.
- [13] Solau-Gervais E, Legrand JL, Cortet B, et al. Magnetic resonance imaging of the hand for the diagnosis of rheumatoid arthritis in the absence of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies: A prospective study. *J Rheumatol*, 2006, 33(9):1760-1765.
- [14] Cokkinos DD, Antypa E, Kalogeropoulos I, et al. Contrast-enhanced ultrasound performed under urgent conditions. Indications, review of the technique, clinical examples and limitations. *Insights Imaging*, 2013, 4(2):185-198.
- [15] Stramare R, Raffeiner B, Ciprian L, et al. Evaluation of finger joint synovial vascularity in patients with rheumatoid arthritis using contrast-enhanced ultrasound with water immersion and a stabilized probe. *J Clin Ultrasound*, 2012, 40(3):147-154.

## 消 息

《中国医学影像技术》作者投稿请登录本刊网站(www. cjmit. com)主页,点击左上角“作者登录”进入,第一次投稿需完成作者注册;专家审稿请点击“审稿登录”进入。

为了便于广大作者、读者查阅本刊文献,本站提供从 1985 年起的过刊和现刊上午全文检索。