

✦ 实验研究

CEUS parameters in evaluation of muscle viability after ischemia-reperfusion in rabbit skeletal muscles

ZHANG Weilin¹, CAO Liting^{2,3}, JIANG Binglei^{2,3*}, XIONG Yuntao⁴

(1. Department of Ultrasonography, the People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, China;

2. Department of Ultrasonography, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College,

Nanchong 637000, China; 3. Medical Imaging Key Laboratory of Sichuan Province,

Nanchong 637000, China; 4. Department of Ultrasonography,

Sichuan Science City Hospital, Mianyang 621900, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the feasibility of CEUS parameters in evaluation of muscle viability after ischemia-reperfusion in rabbit skeletal muscles. **Methods** Ischemia-reperfusion injury models of skeletal muscles (SMIRI) were established in rabbits. According to the "4C" sign of muscles in the most severely damaged area, the rabbits were then divided into muscle vitality group ($n=10$) and non-muscle vitality group ($n=8$). CEUS parameters of the most severely damaged area of the affected leg were compared between 2 groups before modeling (T_0) and immediately (T_1), 1 h (T_2), 2 h (T_3), 4 h (T_4) after the rubber rings were removed. ROC curves were used to evaluate the diagnostic efficiency of CEUS parameters on viability of skeletal muscles after ischemia-reperfusion. **Results** Absolute peak intensity (API) of T_1 and T_4 in muscle vitality group was higher than those in no-muscle vitality group (both $P<0.05$), there were no significant differences in other indexes between 2 groups at each time point (all $P>0.05$). ROC curves results showed that the sensitivity and specificity of API on T_1 (cut-off value 6.93 dB) for evaluating muscle viability after ischemia-reperfusion of skeletal muscles was 100% and 60%, AUC was 0.85 (95%CI [0.67, 1.00], $P<0.05$), while API on T_4 (cut-off value 4.25 dB) were 100% and 70%, AUC was 0.89 (95%CI [0.75, 1.00], $P<0.05$), respectively. **Conclusion** CEUS parameters can reflect muscle viability after ischemia-reperfusion of skeletal muscles, and API can be used as an evaluation index in ischemia-reperfusion injury rabbit models.

[Keywords] muscle, skeletal; reperfusion injury; ischemia; ultrasonography; contrast media

DOI:10.13929/j.1003-3289.201809094

CEUS 参数评估兔骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力

张卫林¹, 曹礼庭^{2,3}, 蒋冰蕾^{2,3*}, 熊云涛⁴

(1. 德阳市人民医院超声科, 四川 德阳 618000; 2. 川北医学院附属医院超声科, 四川 南充 637000;

3. 四川省医学影像学重点实验室, 四川 南充 637000; 4. 四川省科学城医院

超声科, 四川 绵阳 621900)

[摘要] **目的** 探讨 CEUS 参数评估兔骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力的可行性。**方法** 建立兔骨骼肌缺血再灌注损伤(SMIRI)模型。根据损伤最严重区域肌肉“4C”征, 将其分为有肌肉活力组($n=10$)和无肌肉活力组($n=8$)。对比 2 组造模前(T_0)及去掉橡胶圈(再灌注)即刻(T_1)、1 h(T_2)、2 h(T_3)、4 h(T_4)时患侧小腿损伤最严重区域 CEUS 参数。采用 ROC 曲线分析各参数对骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力的诊断效能。**结果** 有肌肉活力组 T_1 及 T_4 时绝对峰值强度(API)

[基金项目] 四川省卫生厅科研课题(120429)。

[第一作者] 张卫林(1989—), 男, 四川德阳人, 硕士, 医师。研究方向: 心血管及浅表器官超声诊断。E-mail: 871573504@qq.com

[通信作者] 蒋冰蕾, 川北医学院附属医院超声科, 637000; 四川省医学影像学重点实验室, 637000。E-mail: 280311791@qq.com

[收稿日期] 2018-09-17 **[修回日期]** 2019-03-25

均大于无肌肉活力组(P 均 <0.05),其余指标同一时间点 2 组间比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。ROC 曲线结果显示, T_1 时 API(截断值为 6.93 dB)评估骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力的敏感度为 100%,特异度为 60%,AUC 为 0.85 [95%CI(0.67,1.00), $P<0.05$]; T_4 时 API(截断值为 4.25 dB)的敏感度为 100%,特异度为 70%,AUC 为 0.89 [95%CI (0.75,1.00), $P<0.05$]。结论 CEUS 参数可反映骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力,其中 API 可作为评价缺血再灌注后肌肉活力的指标。

[关键词] 肌,骨骼;再灌注损伤;缺血;超声检查;造影剂

[中图分类号] R685.4; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2019)05-0646-05

骨骼肌缺血再灌注损伤(skeletal muscle ischemia-reperfusion injury, SMIRI)是指各种原因使骨骼肌短时间缺血缺氧后血供恢复而引起的剧烈炎症反应,可导致机体发生生理、生化、免疫等一系列改变。SMIRI 常致肌肉活力降低甚至丧失,及时切除失活肌肉对预防感染及其他严重并发症意义重大,但切除过多肌肉不利于患肢功能恢复。早期评估肌肉活力,对治疗 SMIRI 和改善预后均有重要意义。本研究探讨 CEUS 参数评估兔下肢骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取健康清洁级新西兰兔 22 只,雌雄不限,体质量 2.0~2.5 kg,由川北医学院动物实验中心提供(动物许可证号:SCXK 川 2013-18)。本研究经川北医学院动物伦理委员会批准。

1.2 SMIRI 模型建立 采用肌注速眠新 II 进行麻醉诱导,剂量为 0.1 ml/kg 体质量,待角膜反射消失后随机选择一侧耳缘及下肢备皮,建立耳缘静脉通道;30 min 后肌注 3%戊巴比妥钠(1.0 ml/kg 体质量)维持麻醉;将 5 个橡胶圈捆绑于备皮下肢膝关节,触摸胫前动脉搏动消失、针刺足底未见明显出血认为血流阻断,5 h 后去掉橡胶圈。

1.3 仪器与方法 采用 Philips iU22 超声仪, L9-3 线阵探头,探头频率 3~9 MHz。首先对兔患侧小腿行常规超声扫查,设定机械指数为 0.07,启动脉冲反向谐波影像(pulse inversion harmonic imaging, PIH),进入 CEUS 模式。经耳缘静脉团注造影剂声诺维(0.1 ml/kg 体质量)^[1],并以 5 ml 0.9%生理盐水迅速冲注。分别采集造模前(T_0)及去掉橡胶圈(再灌注)即刻(T_1)、1 h(T_2)、2 h(T_3)、4 h(T_4)患侧小腿常规超声和 CEUS 图像(图 1)。将图像导入 Qlab 软件,于腓骨侧皮下 1 cm 处(大体病理示受累最严重区)勾画 ROI(5 mm×5 mm),绘制时间-强度曲线(time-intensity curve, TIC),计算绝对峰值强度(absolute peak intensity, API)、峰值强度(peak

intensity, PI)、达峰时间(time to peak, TTP)、升支斜率(ascending slope, AS)、降支斜率(descending slope, DS)、始增时间(arrival time, AT)、降支减半时间(half time of descending, HT)及 50%清除率(PI/HT×50%)。

1.4 组织病理学检查 对所有实验兔分别于 T_0 、 T_1 、 T_2 、 T_3 时在造影部位腓骨侧皮下 1 cm 处穿刺取患侧肌肉组织,行常规 HE 染色。于 T_4 时造影后处死实验兔,分别在肌肉穿刺部位取约 5 mm×5 mm×5 mm 组织块,经固定、脱水等处理后行常规 HE 染色。由 2 名具有 15 年以上工作经验的病理科主任及副主任医师在不知晓实验设计的情况下阅片,分别对肌细胞完整性、肌间隙宽度、炎细胞浸润程度等做出评价,意见不同时经协商达成一致。根据损伤最严重区域肌肉大体及病理学表现“4C”征^[2]将实验兔分为有肌肉活力组及无肌肉活力组。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计分析软件。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间各时间点 API、PI、TTP、AS、DS、AT、HT 及 50%清除率比较采用两独立样本 t 检验;同组各时间点比较采用方差分析,各时间点两两比较采用 LSD 检验。采用 ROC 曲线分析 API 对肌肉活力的诊断效能。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

22 只实验兔中,2 只麻醉过程中心跳、呼吸骤停;2 只显影失败(1 只造影剂外漏、1 只静脉通道建立失败),最终纳入 18 只实验兔。18 只实验兔患侧小腿均较健侧小腿颜色暗淡,肌肉肿胀、饱满,张力增高,韧性稍差,均以小腿腓骨侧(中上份后比目鱼肌及周围肌群)损伤最明显。最终将 10 只归入有肌肉活力组,8 只归入无肌肉活力组。有肌肉活力组肌肉为红色,夹持或电刺激见肌肉收缩,肌肉韧性正常,边缘有出血点;无肌肉活力组肌肉呈褐色或黑褐色,夹持或电刺激其收缩减弱甚至消失,韧性降低或消失,边缘无出血或渗出极慢。

2.1 CEUS 参数 有肌肉活力组 T_1 及 T_4 时 API 均大于无肌肉活力组 (P 均 <0.05), 其余指标同一时间点 2 组间比较差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。有肌肉活力组内各时间点 API、PI、TTP 差异有统计学意义 (P 均 <0.01); T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 时 API 均较 T_0 时降低, T_4 时 PI 较 T_0 时降低, T_3 时 TTP 较 T_0 时升高 (均 $P < 0.05$)。无肌肉活力组内各时间点 API、PI、AT 差异有统计学意义 (P 均 <0.05), T_4 时 API、

PI 均较 T_0 时降低, AT 较 T_0 时升高 (P 均 <0.05)。见表 1。

2.2 诊断效能 ROC 曲线结果显示, T_1 时 API (截断值为 6.93 dB) 评估骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力的敏感度为 100%, 特异度为 60%, AUC 为 0.85 [95% CI (0.67, 1.00)], $P < 0.05$; T_4 时 API (截断值为 4.25 dB) 的敏感度为 100%, 特异度为 70%, AUC 为 0.89 [95% CI (0.75, 1.00)], $P < 0.05$ 。

表 1 2 组兔骨骼肌缺血再灌注后各时间点 CEUS 相关参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	API(dB)	PI(dB)	TTP(s)	AS	DS	AT(s)	HT(s)	50%清除率
有肌肉活力组 ($n=10$)								
T_0	10.09 $\pm$ 3.87	14.98 $\pm$ 5.22	16.61 $\pm$ 3.60	1.06 $\pm$ 0.33	-0.13 $\pm$ 0.19	10.87 $\pm$ 3.66	15.15 $\pm$ 5.64	0.56 $\pm$ 0.30
T_1	7.66 $\pm$ 2.95 [#]	14.11 $\pm$ 4.51	17.66 $\pm$ 3.46	0.98 $\pm$ 0.39	-0.09 $\pm$ 0.04	10.53 $\pm$ 3.77	20.33 $\pm$ 13.48	0.45 $\pm$ 0.21
T_2	6.50 $\pm$ 3.07 [#]	12.67 $\pm$ 3.92	20.32 $\pm$ 5.17	0.91 $\pm$ 0.48	-0.10 $\pm$ 0.05	10.55 $\pm$ 2.92	18.75 $\pm$ 13.24	0.50 $\pm$ 0.33
T_3	5.06 $\pm$ 2.09 [#]	11.58 $\pm$ 3.38	21.97 $\pm$ 4.26 [#]	0.80 $\pm$ 0.53	-0.09 $\pm$ 0.04	12.80 $\pm$ 3.53	17.00 $\pm$ 12.30	0.47 $\pm$ 0.27
T_4	4.90 $\pm$ 2.09 [#]	10.74 $\pm$ 4.25 [#]	20.77 $\pm$ 3.71	0.73 $\pm$ 0.43	-0.33 $\pm$ 0.34	13.84 $\pm$ 3.31	12.28 $\pm$ 7.03	0.54 $\pm$ 0.27
F 值	21.64	9.23	5.02	2.85	0.45	3.93	1.85	0.28
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	0.06	0.58	0.07	0.16	0.69
无肌肉活力组 ($n=8$)								
T_0	6.59 $\pm$ 4.30	13.32 $\pm$ 3.06	18.75 $\pm$ 2.67	0.83 $\pm$ 0.41	-0.07 $\pm$ 0.04	12.46 $\pm$ 2.43	18.44 $\pm$ 13.69	0.51 $\pm$ 0.32
T_1	3.85 $\pm$ 1.51 [*]	11.30 $\pm$ 4.49	20.34 $\pm$ 3.43	0.57 $\pm$ 0.31	-0.06 $\pm$ 0.03	14.63 $\pm$ 3.25	17.86 $\pm$ 12.53	0.82 $\pm$ 1.41
T_2	4.27 $\pm$ 2.48	10.50 $\pm$ 3.51	21.01 $\pm$ 3.97	0.80 $\pm$ 0.34	-0.09 $\pm$ 0.03	15.70 $\pm$ 3.75	14.69 $\pm$ 10.63	0.49 $\pm$ 0.28
T_3	3.39 $\pm$ 2.49	11.01 $\pm$ 2.46	21.31 $\pm$ 7.40	0.57 $\pm$ 0.46	-0.13 $\pm$ 0.17	15.00 $\pm$ 5.23	11.74 $\pm$ 11.00	0.78 $\pm$ 0.43
T_4	2.07 $\pm$ 1.06 [*] [#]	9.76 $\pm$ 3.78 [#]	23.33 $\pm$ 5.22	0.55 $\pm$ 0.27	-0.24 $\pm$ 0.27	16.59 $\pm$ 6.78 [#]	14.36 $\pm$ 9.02	0.49 $\pm$ 0.36
F 值	14.66	6.99	1.07	2.66	0.60	3.32	1.29	0.65
P 值	<0.01	<0.01	0.41	0.12	0.45	0.04	0.29	0.64

注: * : 与有肌肉活力组同时时间点比较, $P < 0.05$; # : 与同组 T_0 时比较, $P < 0.05$

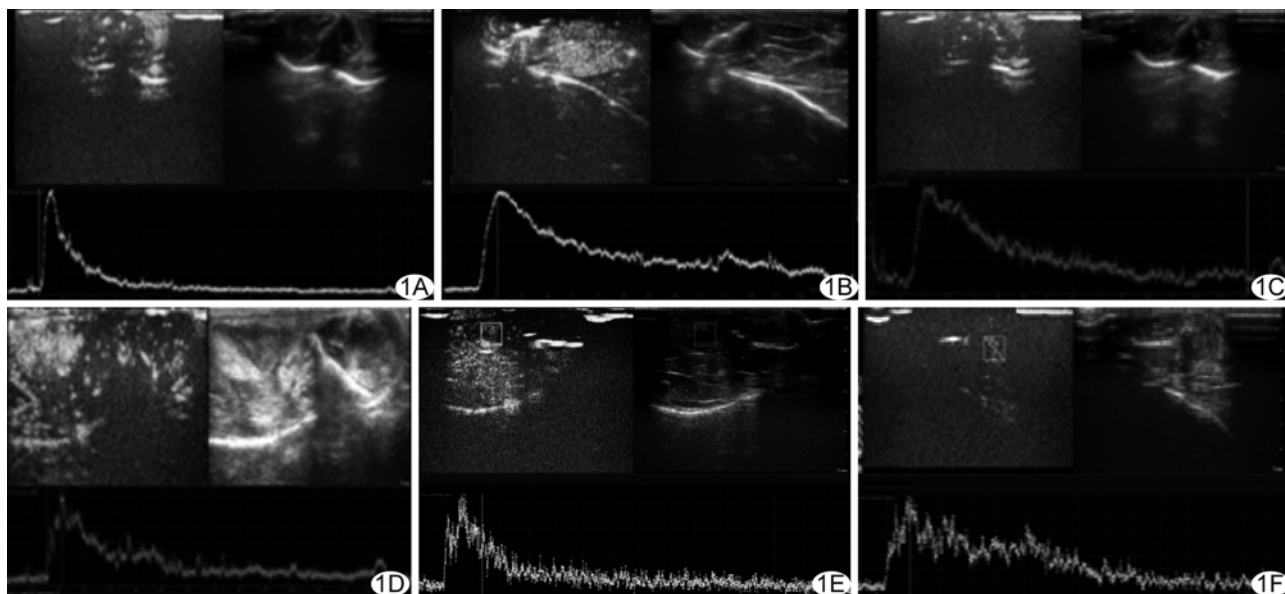


图 1 2 组兔骨骼肌缺血再灌注后不同时间点声像图 A. 有肌肉活力组 T_0 ; B. 无肌肉活力组 T_0 ; C. 有肌肉活力组 T_1 ; D. 无肌肉活力组 T_1 ; E. 有肌肉活力组 T_4 ; F. 无肌肉活力组 T_4 ; 与 T_0 (A、B) 时相比, T_1 (C、D)、 T_4 (E、F) 时肌组织增厚明显, 回声局灶性增强、减弱并存, 部分组织间隙积液, 而 2 组间同时点比较未见显著差异

2.3 病理表现 与 T_0 、 T_1 时比较, T_2 、 T_3 时肌细胞稍肿胀, 细胞间隙略增宽, 肌原纤维溶解、断裂增多, 部分肌细胞见多个“筛网状”圆形空泡; 与 T_2 、 T_3 时比较, T_4 时肌原纤维溶解、断裂更明显, 部分肌间隙出现中性粒细胞。无肌肉活力组上述组织病理学变化均较有肌肉活力组更显著(图 2)。

3 讨论

临床上 SMIRI 常见于四肢, 亦可累及非毗邻器官或组织^[3], 甚至引发弥漫性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 及多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 等, 病因包括止血带使用时间过长、动脉损伤、急性栓塞等。SMIRI 发病率约 13/100 000 ~ 17/100 000, 但死亡率高达 21%^[4]。目前主要采用检测肌肉损伤程度评估局部 SMIRI^[5]。近红外光谱测定是评估肌肉微循环的有效工具, 但其可穿透深度小于 3 cm; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑和氮蓝四唑染色法^[6]可用于测定肌肉活力, 但为有创性检查。本研究以新西兰兔为研究对象, 制备 SMIRI 模型, 采用 CEUS 动态观察患侧骨骼肌肌肉活力, 探讨 CEUS 参数用于早期无创评价 SMIRI 实验兔肌肉活力的可行性。

既往研究^[7]报道, 缺血 6 h 几乎整个肌群均将受累, 故本研究将实验兔下肢缺血时间设定为 5 h。大体病理示缺血再灌注侧小腿均较健侧小腿颜色暗淡、肌肉肿胀、张力增高、韧性差, 提示造模成功。根据损伤最严重区域肌肉“4C”征^[2], 实验兔分有肌肉活力组及无肌肉活力组, 相同条件下 2 组表现不同可能与实验兔对缺血敏感性、耐受性及损伤修复机制存在差异有关。本研究通过分别采集 2 组造模前(T_0)及再灌注后不同时间点患侧小腿声像图, 获得 CEUS 相关参数, 结果显示 2 组内各时间点 API、PI 差异均有统计学意义(P 均 < 0.01), 且病理结果显示, 随再灌注时间延长, 2 组病理损伤表现均加重, 无肌肉活力组较有肌肉活力组损伤更严重, 提示 CEUS 参数可能反映缺血再灌注后肌肉损伤情况, 有肌肉活力组 T_1 及 T_4 时 API 均大于无肌肉活

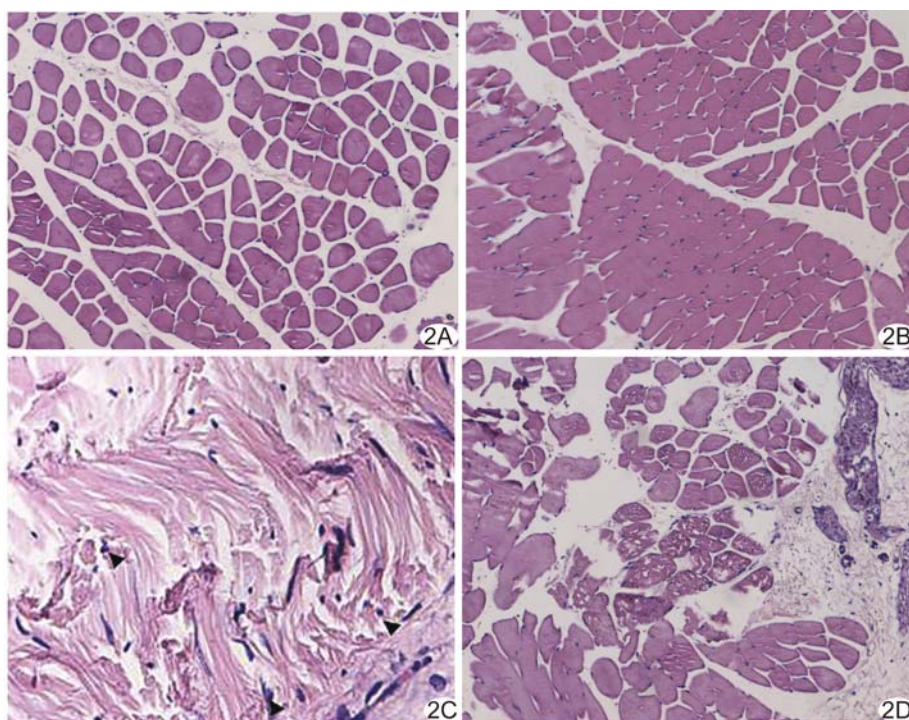


图 2 2 组兔骨骼肌缺血再灌注后不同时间点组织的病理表现(HE, $\times 400$) A、B. T_1 时肌细胞间隙增宽, 肌原纤维溶解、断裂, 无肌肉活力组(A)较有肌肉活力组(B)上述表现更显著; C、D. T_4 时细胞间隙增宽, 肌原纤维溶解及断裂均较 T_1 时更明显, 胞内见“筛网状”空泡, 肌间隙出现中性粒细胞, 无肌肉活力组(C)较有肌肉活力组(D)上述表现更显著

力组(P 均 < 0.05)。API 表示 TIC 内 PI 与基础强度的差异, 可反映病变组织血供情况。与有肌肉活力组相比, 无肌肉活力组血供减少、能量降低, 导致其神经-体液依赖性血管舒张减弱^[8], 毛细血管灌注差, 加之存在无复流现象, 肌肉组织早期即出现缺血坏死, 致 API 显著减小^[9], 且随再灌注时间延长损伤持续加重, API 呈减小趋势。 T_1 时无肌肉活力组 API 较有肌肉活力组明显降低, 提示 API 对早期区分肌肉活力有重要参考价值。进一步行 ROC 曲线分析结果显示, T_1 、 T_4 时 API 均可用于评估骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力(AUC 分别为 0.85、0.89, P 均 < 0.05), 可作为缺血再灌注后肌肉活力的评价指标。除 API 外, 本研究中 2 组间其余参数同一时间点比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05), 但样本量少, 有待加大样本量再行分析。

综上所述, CEUS 参数可反映骨骼肌缺血再灌注后肌肉活力, 其中 API 可作为兔缺血再灌注后肌肉活力的评价指标。

[参考文献]

[1] 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. 中国医学影像技术, 2011, 27(8): 1533-1536.
- [2] Terry S, Beaty JH. 坎贝尔骨科手术学. 王岩, 唐佩福, 译. 12 版. 北京: 人民军医出版社, 2014: 2383.
- [3] Gillani S, Cao J, Suzuki T, et al. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*, 2012, 43(6): 670-675.
- [4] Ersoy A, Yavuz M, Usta M, et al. Survival analysis of the factors affecting in mortality in injured patients requiring dialysis due to acute renal failure during the Marmara earthquake: Survivors vs non-survivors. *Clin Nephrol*, 2003, 59(5): 334-340.
- [5] Andreas M, Schmid AI, Doberer D, et al. Heme arginate improves reperfusion patterns after ischemia: A randomized, placebo-controlled trial in healthy male subjects. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2012, 14: 55.
- [6] Szijarto A, Turoczi Z, Aranyi P, et al. Acute and critical ischemia of the lower limb. *Orv Hetil*, 2010, 151(50): 2057-2066.
- [7] Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardiovasc Surg*, 2002, 10(6): 620-630.
- [8] 金延武. 水飞蓟素在肺缺血再灌注损伤所致肺血管功能障碍中作用的实验研究. 济南: 山东大学, 2017: 97.
- [9] 王紫监, 张立民, 赵自刚, 等. 心肌缺血再灌注损伤研究进展. *中国老年学杂志*, 2018, 38(6): 1532-1536.

《中国医学影像技术》投稿要求(一)

1 总体要求 文稿应具有科学性、先进性、创新性和可读性, 力求重点突出, 论点明确, 资料详实, 数据可靠, 结构严谨, 写作规范, 表达准确, 文字精炼。文稿撰写应遵照国家标准 GB 7713 科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB 6447 文摘编写规则, GB 7714 文后参考文献著录规则; 专家述评 4 000 字左右, 研究论著、综述类论文 5 000 字左右, 经验交流一般不超过 2 500 字, 个案报道不超过 1 000 字。

2 题目 力求高度概括、言简意赅且能反映论文的主题, 文题字数一般不超过 20 个汉字, 尽量不设副标题, 题目中尽量不使用阿拉伯数字开头。

3 作者 作者姓名标注在文题下方, 按贡献大小顺序排列, 投稿后作者署名及顺序不得随意修改或变更。具备下列条件者可列为作者: ①参加选题、研究工作并能解释论文有关问题者; ②起草或修改论文中关键性理论或主要内容者; ③能对编辑部的修改意见进行核修, 并最终同意该文发表者。对研究工作有贡献的其他人可在致谢中列出。通信作者姓名旁应上标加注“*”号, 其应对全文内容负责, 还应具有对读者提出的质疑进行答辩的能力和义务。如有外籍作者, 应征得本人同意, 并附有本人签字。

4 单位 在作者的下一行写出单位的全称(具体到科室)、省市和邮政编码。署名作者分别在多个单位者, 应分别写出各单位的全称(具体到科室), 并用阿拉伯数字在对应的署名作者右上角标注。

5 英文题目 应简明扼要, 便于检索, 与中文题名内容上应一致, 以不超过 10 个实词为宜。除已得到整个科技界或本行业科技人员公认的缩略词语外, 不宜使用缩略词语。

6 英文作者 用汉语拼音拼写, 姓前名后, 姓氏全部大写, 名首字母大写, 双名首字母大写。例如: 王小五, 写为: WANG Xiaowu。依据《中国人姓名汉语拼音字母拼写规则》(国家标准编号: GB/28039-2011), 姓氏“吕”的汉语拼音应为“LYU”。

7 英文单位 应与中文单位对应, 按查阅本单位官方网站或咨询相关职能部门, 规范英文单位名称。