

超声造影技术评价兔腹主动脉斑块内新生血管形成及斑块稳定性的研究

高 雪^{1,2} 郑晓慧¹ 宋宏萍¹ 刘丽文¹ 李 妍¹ 陈 磊¹ 易小敏¹ 赵永峰¹
贺建国¹ 张 铮¹ 周晓东^{1,△}

(1 第四军医大学第一附属医院 陕西 西安 710032 2 中国人民解放军北京军区总医院超声科 北京 100700)

摘要 目的 通过超声造影技术评价不同时间点兔主动脉粥样硬化斑块内新生血管的变化,并进一步判断斑块稳定性。方法 60 只纯种新西兰大白兔随机分为 4 组,每组 15 只。正常对照组、高脂饲养组、球囊损伤组、球囊损伤联合高脂饲养组。分别于第 8、14、20 周进行超声造影检查,比较斑块及斑块内新生血管形成率。20 周后抽血测定血脂及炎症因子水平。处死动物,取腹主动脉,HE 染色观察斑块形态及组成成分,并统计各组存活率。结果 高脂饲养组与高脂饲养联合球囊损伤组血脂无显著差异,但明显高于对照组($P<0.05$)。高脂饲养联合球囊损伤组斑块内新生血管明显多于单纯高脂饲养以及球囊损伤组($P<0.05$)。HE 染色提示高脂饲养联合球囊损伤组不稳定斑块明显多于单纯高脂饲养以及球囊损伤组。结论 超声造影可以明确动脉粥样硬化斑块内新生血管,并进一步判断斑块稳定性。

关键词 新生血管 动脉粥样硬化 不稳定斑块 超声造影

中图分类号: Q95-33 R541 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)16-3080-04

Imaging by Contrast Enhanced Ultrasonography for Evaluating the Neovascularization and Stability of Plaques Induced by Balloon Injury and High Fat Diet

GAO Xue^{1,2}, ZHENG Xiao-hui¹, SONG Hong-ping¹, LIU Li-wen¹, LI Yan¹, CHEN Lei¹, YI Xiao-min¹, ZHAO Yong-feng¹,
HE Jian-guo¹, ZHANG Zheng¹, ZHOU Xiao-dong^{1,△}

(1 Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of ultrasonography, The Military General Hospital of Beijing PLA, Beijing, 100700, China)

ABSTRACT Objective: To assess the diagnostic value of contrast enhanced ultrasound (CEUS) for neovascularization and stability of atherosclerosis plaques. **Methods:** Sixty New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups: control group (A, n=15), high fat diet group (B, n=15), balloon injured group (C, n=15) and high fat diet plus balloon injured group (D, n=15). Neovascularization in unstable plaques was determinate by contrast enhanced ultrasound (CEUS). Furthermore, the histological characteristic of unstable atherosclerotic plaques was observed by HE stain. **Results:** The ratio of neovascularization in group D was significantly higher than that in control group, even higher than that in groups B,C ($P<0.05$). Furthermore, the unstable plaque was more observed in group D than other groups by CEUS, which were confirmed by HE stain ($P<0.05$). **Conclusion:** The technique of contrast enhanced ultrasound offers a new clinically applicable examination method for determination neovascularization and furthermore evaluating the stability of atherosclerosis plaques.

Key words: Neovascularization; Atherosclerosis; Unstable plaque; Contrast enhanced ultrasound

Chinese Library Classification(CLC): R95-33, R541 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)16-3080-04

前言

急性冠状动脉综合征(Acute coronary syndrome, ACS)是冠心病中致死率最高的临床类型,严重危害人们健康^[1]。研究证实,不稳定斑块(unstable plaque)是 ACS 的病理基础,并且斑块的稳定性与 ACS 的发生、发展密切相关。明确冠心病患者斑块稳定性是降低 ACS 死亡率的关键,但目前对不稳定斑块的识别仍没有良好手段。最新研究提示,斑块内新生血管的增加直接导致了不稳定性斑块的形成与破裂。超声造影技术已被广泛用于组织器官微循环以及新生血管研究^[2],因此,本研究拟采用

超声造影技术(contrast enhanced ultrasound CEUS)观察兔腹主动脉斑块内新生血管结构,初步探讨其评价斑块稳定性的应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性纯种新西兰大白兔 60 只,由第四军医大学动物实验中心提供。平均体重(2.5 ± 0.4)kg,随机分为 4 组,每组 15 只,即正常对照组(A 组)、高脂饲养组(B 组)、单纯球囊损伤组(C 组)、球囊损伤联合高脂饲养组(D 组)。高脂饲养组给予高脂饲料(1%胆固醇+5%猪油+5%蛋黄粉+普通颗粒饲料)喂养。对照组给予普通颗粒饲料,自由饮水。

1.2 球囊损伤手术

△通讯作者 周晓东,男,主任医师,教授。电话:029-84775443,

Email: zhouxd@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2012-03-06 接受日期: 2012-04-05)

3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉成功后将实验动物固定于手术台。左侧腹股沟区常规皮肤消毒,沿股动脉走行切开皮肤,分离并穿刺右股动脉,在x射线监测下将4.0 mm×15 mm的球囊逆行送入胸主动脉,以16atm的大气压充盈球囊后拉回至髂总动脉分叉处,反复回拉5次以造成内膜损伤。3/0丝线缝合伤口。术后每日肌注青霉素2万单位,连续5天。

1.3 超声造影检测

分别于高脂饮食前、高脂饮食8周、14周、20周进行超声造影检查,比较斑块及斑块内新生血管形成。3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉成功后,探头自剑突下扫查,于髂动脉与腹主动脉分叉以上5 cm处观察斑块,记录体表对应位置,测量斑块数量、斑块厚度和面积。经兔耳缘静脉于1s内快速注入超声造影剂(0.05 ml/kg)。注入造影剂的同时开启造影程序,同步采集并存储造影剂开始注入后至注射后3 min的连续动态图。血管内超声图像由两名操作者独立观察。

1.4 血脂水平检测

于高脂饲料喂养20周后采血,每次采血前禁食12 h,经耳缘静脉抽血3 mL,常温下静置20~30分钟后3000 rpm离心10 min,提取血清,-80℃保存,统一送检。采用半自动生化分析仪检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)。

1.5 病理学检查

于高脂饲料喂养或腹主动脉球囊损伤20周处死实验动物,取腹主动脉全长,生理盐水冲洗后观察斑块破裂、血栓形成

情况。分别截取实验组动脉斑块形成段和对照组腹主动脉下段1cm,4%多聚甲醛固定24小时后,常规行石蜡包埋、连续切片、苏木素-伊红(HE)染色,光镜观察腹主动脉管壁病理学改变。每组各选10张片子进行图像分析,测量斑块面积占内膜面积的百分比。

1.6 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件包进行统计学分析。各组间的比较经方差齐性检验后采用t检验,P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

球囊损伤联合高脂饲养组(D组)因腹泻死亡2只,肠梗死死亡2只,麻醉意外死亡1只,单纯球囊损伤组(C组)因腹泻死亡2只,高脂饲养组(B组)因肺部感染死亡1只,正常对照组(A组)因腹泻死亡1只,余51只兔完成实验。

2.2 血脂水平

与正常对照组(A组)相比,20周后高脂饲养组(B组)和高脂饲养联合球囊损伤组(D组)在TC、TG及LDL有显著增高(P<0.05),而HDL并无明显变化。单纯球囊损伤组(C组)与正常对照组(A组)之间血脂水平并无较大差异(P>0.05)(表1),说明单纯球囊损伤对血清中的TC、TG、HDL及LDL均无较大影响。

表1 各实验组间血脂水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of levels of TC, TG, HDL and LDL in all groups

分组 Groups	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)
A组 (n=14)	0.95± 0.17	0.57± 0.48	0.52± 0.19	0.23± 0.10
B组 (n=14)	27.96± 5.31 *	0.55± 0.34 *	0.86± 0.54	19.46± 3.79 *
C组 (n=13)	0.95± 0.17	0.57± 0.48	0.52± 0.19	0.23± 0.10
D组 (n=10)	29.53± 6.08 *	0.62± 0.45 *	1.10± 0.81	20.67± 3.96 *

注: * 为P<0.05,与对照组比较。

Note: * P<0.05, vs. Control.

2.3 超声结果

二维超声检测结果显示,高脂喂养前实验动物腹主动脉内膜光滑,结构呈清晰。8周时A组、B组未见斑块形成,C组及D组兔腹主动脉内膜不光滑,可见血管内膜连续性中断,伴有微小斑块形成,呈低回声。16周时,D组10只兔中8只腹主动脉存在斑块形成。C组13只兔子中10只形成斑块,形成斑块

多为低回声,且斑块面积较小。超声造影结果显示:A组、B组未见新生血管形成,C组中5个斑块及D组16个斑块内可见细小条索样造影剂穿过,为斑块内新生血管(图1)。20周进行超声二维及造影检测,D组斑块生成情况高于C组,且D组斑块内新生血管明显多于C组(表2)。

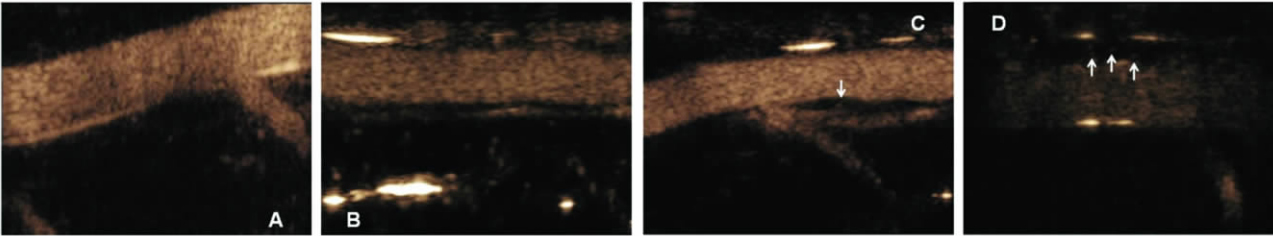


图1 各组实验兔腹主动脉斑块超声造影显示斑块内新生血管

A 为正常对照组, B 为高脂饲养组, C 为单纯球囊损伤组, D 为球囊损伤联合高脂饲养组
箭头所示为斑块内新生血管

Fig.1 Representative images of contrast enhanced ultrasound assay for the neovascularization of abdominal aorta atherosclerotic plaques in all groups
A: Control group, B: High fat diet (HFD) group, C: Balloon injured group, D: HFD+ Balloon injured group (array: neovascularization in abdominal aorta atherosclerotic plaques)

表 2 各实验组间斑块及新生血管形成情况
Table 2 Atherosclerotic plaques and neovascularization in all groups

分组 Groups	存在斑块动物数 Cases with plaque	斑块数量 Number of plaques	低回声斑块 Low echo plaques	新生血管斑块 New blood vessels plaque
A Group (n=14)	0	0	0	0
B Group (n=14)	5	8	3	3
C Group (n=13)	10	17	10	5
D Group (n=10)	8	25	17	16

2.4 病理学结果

20 周后处死动物 取腹主动脉进行 HE 染色 ,光镜观察 :A 组主动脉结构完整 ,内膜光滑 ,内皮细胞形态正常 ,中层平滑肌细胞排列整齐 ,无明显脂质沉积。B 组腹主动脉内膜增厚 ,内皮细胞部分脱落、不完整 ,局部可见有斑块形成 ,斑块表面有纤维组织覆盖。C 组腹主动脉内膜断裂明显 ,内皮细胞完全脱落 ,内

膜下炎症细胞脂质泡沫细胞浸润、平滑肌细胞增殖明显 ,排列紊乱 ,形成典型的 " 纤维帽 " ,部分斑块中有新生血管。D 组多数腹主动脉内三层结构破坏严重 ,可见粥样斑块形成 ,内含大量泡沫细胞以及炎性细胞浸润 ,并可见新生血管形成。多数斑块纤维帽明显变薄 ,连续性中断甚至破裂及血栓形成。

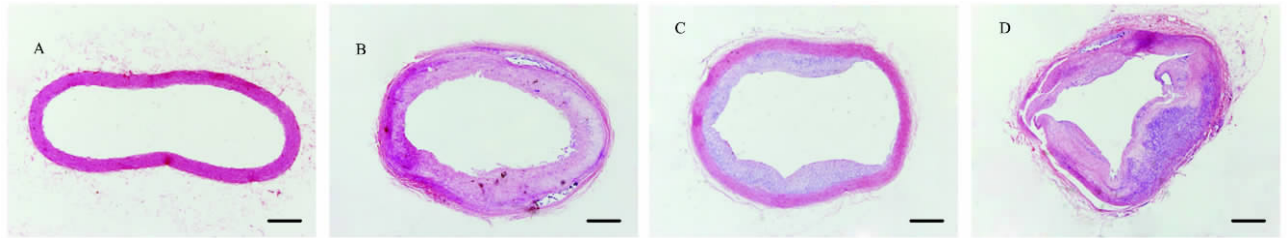


图 2 各组实验兔腹主动脉斑块 HE 染色
A 为正常对照组 ,B 为高脂饲养组 ,C 为单纯球囊损伤组 ,D 为球囊损伤联合高脂饲养组 (标尺 :500μm)
Fig.2 Hematoxylin - Eosin (HE) stain for the pathologic characters of abdominal aorta atherosclerotic plaques in all groups
A: Control group, B: High fat diet (HFD) group, C: Balloon injured group, D: HFD+ Balloon injured group (scale bar: 500μm)

3 讨论

动脉粥样硬化发病率呈逐渐上升趋势 ,是影响人类健康的主要疾病之一。AS 的产生是血管内皮损伤、脂质沉积、斑块破裂进而导致血栓形成等多种因素相互作用的病理过程。不稳定斑块 (unstable plaque) 指易于发生血栓 ,以及可能快速进展从而成为罪恶斑块的那些粥样病变 ,是导致冠心病患者急性死亡的主要原因。多具有脂质中心大、纤维帽薄、平滑肌细胞和胶原含量少、炎性细胞量大等特点。目前关于不稳定斑块的判断尚无统一标准 :一般将脂质核心大于斑块体积的 40%、炎细胞丰富而平滑肌细胞较少、纤维帽较薄的斑块定义为不稳定斑块^[3,4]。通过观察其形态结构的差别可以明确判断斑块的稳定性。本研究即采用此种病理方法对兔腹主动脉不稳定斑块进行判断。
新生血管是指在原有的毛细血管基础上 ,微血管内皮细胞经过生芽、迁移、增殖与基质重塑等过程以芽生或非芽生的形式而产生的新血管。斑块内血管新生不仅是动脉粥样硬化疾病普遍存在的特征 ,而且在粥样硬化病变的发生发展中起着关键性作用。Barger 等人已证实斑块内新生血管的存在^[5]。moulton 首次采用血管生成抑制剂 TNP470 和 Endostatin 治疗 ,明显减少 ApoE-/- 小鼠的斑块面积 ,从治疗的角度证实了新生血管生成是动脉粥样硬化的发生发展的关键因素^[6]。与此同时 ,Celletti 等进一步证实了血管新生是不稳定斑块形成、破裂的关键环

节^[7]。因此应用影像学技术评估斑块内新生血管 ,对于辨识斑块稳定性 ,监测临床治疗疗效 ,减少冠心病患者死亡率至关重要。可用于临床的理想影像技术应符合以下条件 :无创 ,可重复性较高 ,适用于各部位 ,时间、空间分辨率高。目前常规影像检查手段主要包括 MRI ,CT ,PET ,超声等 ,虽然这些技术各有优点 ,但仍没有一种理想的检查方法可以实现不稳定斑块内新生血管的成像 ,因此 ,开发针对不稳定斑块内部新生血管的影像学技术是冠心病防治的关键。
超声是临床常用的影像学手段 ,具有无创、空间及时间分辨率较高的优点 ,可应用于各部位动脉粥样硬化的检查。但常规超声对不稳定斑块判断的敏感性及特异性均较差 ,而且不能直接探测斑块内的新生血管^[8,9]。超声造影目前已广泛用于临床及实验研究 ,其使用的超声造影剂直径约 2~5 μm ,可达到组织内毛细血管网 ,从而使超声微循环灌注成像成为可能^[2,10]。我们通过超声造影检查发现 :在兔腹主动脉粥样斑块内 ,新生血管多集中于斑块溃疡、脂肪核心区域 ,而在钙化等相对稳定区域内则无明显增强 ,这些结果与 Piao M 的研究结果一致^[11]。同时 ,我们通过 HE 染色方法 ,观察不同处理组兔腹主动脉的病理变化 ,发现单纯高脂饲养以及球囊拉伤均能够产生粥样硬化斑块 ,但是多为稳定性斑块 ,而高脂饲养联合球囊拉伤处理后 ,动脉斑块明显增加 ,且稳定性较差 ,该结果与超声造影结果一致 ,初步说明超声造影检查可以通过对新生血管的观察 ,从而

间接判断斑块稳定性。

本研究尚存在一定的局限性,如样本量偏小,超声造影剂衰减导致的新生血管显示受限,腹主动脉球囊损伤内膜情况存在偏差等问题有待进一步解决。

综上所述,本实验通过高脂喂养联合球囊损伤成功构建兔腹主动脉不稳定斑块模型,采用超声造影方法直观显示斑块内新生血管的存在及分布情况,从而判断斑块稳定性,为临床采用无创超声造影技术判断斑块稳定性奠定了理论基础。

参考文献(References)

- [1] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II[J]. Circulation, 2003, 108(15): 1772-1778
- [2] 宾建国. 血管内超声检测易损斑块的研究进展[J]. 临床超声医学杂志, 2009, 11(10):684-686
Bin Jian-guo. Research Progress on Intravascular ultrasound detection of the vulnerable plaques [J]. Journal of Ultrasound in Clinical Medicine, 2009, 11(10):684-686
- [3] Davies M J, Richardson PD, Woolf N, et al. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content[J]. Br Heart J, 1993, 69: 377-381
- [4] 石怀银, 韦立新, 余明鹏, 等. 冠脉斑块中炎细胞及平滑肌细胞含量对斑块稳定性的影响[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28: 256-259
Shi Huai-yin, Wei Li-xin, She Ming-peng, et al. Quantity of inflammatory cells and smooth muscle cells in coronary artery plaque and its relationship with the stability of plaques [J]. Chinese Journal of Pathology, 1999, 28(4): 256-259
- [5] Barger AC, Beeuwkes R 3rd, Lainey LL, et al. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries[J]. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. N Engl J Med, 1984, 310(3): 175-177
- [6] Moulton, K.S. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 1999, 99(13): 1726-1732
- [7] Celletti. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 37(8):2126-2130
- [8] Baldassarre D, Castelnuovo S, Frigerio B, et al. Effects of timing and extent of smoking, type of cigarettes, and concomitant risk factors on the association between smoking and subclinical atherosclerosis [J]. Stroke, 2009, 40(6):1991-1998
- [9] Funabashi N, Asano M, Komuro I. Predictors of non-calcified plaques in the coronary arteries of 242 subjects using multislice computed tomography and logistic regression models [J]. Int J Cardiol, 2007, 117(2):191-197
- [10] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005 Oct, (100):2054-2061
- [11] Piao M, Tokunaga O. Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study[J]. J Atheroscler Thromb, 2006 Apr, 13(2):82-89
- [12] Sergeev Y, R Caruso, M Meltzer, et al. Molecular modeling of retinoschisin with functional analysis of pathogenic mutations from human X-linked retinoschisis [J]. Human molecular genetics, 2010, 19(7): 1302-1313
- [13] Ho SN, HD Hunt, RM Horton, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59
- [14] Heckman KL, LR Pease. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension [J]. Nature protocols, 2007, 2(4): 924-932
- [15] Sancak Y, TR Peterson, YD Shaul, et al. The Rag GTPases bind rapTOR and mediate amino acid signaling to mTORC1 [J]. Science's STKE, 2008, 320(5882): 1496
- [16] Kunkel LM, AP Monaco, W Middlesworth, et al. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985, 82(14): 4778
- [17] Sugimoto M, N Esaki, H Tanaka, et al. A simple and efficient method for the oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA template and phosphorothioate-modified nucleotide [J]. Analytical biochemistry, 1989, 179(2): 309-311
- [18] Taylor WJ, J Ott, F Eckstein. The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA [J]. Nucleic acids research, 1985, 13(24): 8765-8785
- [19] Vandeyar MA, MP Weiner, CJ Hutton, et al. A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants [J]. Gene, 1988, 65(1): 129-133
- [20] Morinaga Y, T Franceschini, S Inouye, et al. Improvement of oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis using double-stranded plasmid DNA [J]. Nature Biotechnology, 1984, 2(7): 636-639
- [21] Lai D, X Zhu, S Pestka. A simple and efficient method for site-directed mutagenesis with double-stranded plasmid DNA [J]. Nucleic acids research, 1993, 21(17): 3977-3980
- [22] Braman J, C Papworth, A Greener. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates [J]. The Nucleic Acid Protocols Handbook, 2000, 835-844
- [23] Robl J, Z Wang, P Kasinathan, et al. Transgenic animal production and animal biotechnology [J]. Theriogenology, 2007, 67(1): 127-133
- [24] Maue RA. Understanding ion channel biology using epitope tags: Progress, pitfalls, and promise [J]. Journal of cellular physiology, 2007, 213(3): 618-625

(上接第 3070 页)