

❖ 实验研究

Virtual touch tissue quantification for elastic assessment of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats

TIAN Gui-xiang¹, LI Zhi-xian^{1*}, ZHONG Dan-ni², ZENG Jia¹

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Neonatology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the feasibility of virtual touch tissue quantification (VTQ) in assessing brain change of newborn rats with varying degrees of hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** The right common carotid artery of 30 healthy 7-day-old Wistar neonate rats was separated under anesthesia. Then the rats were randomly divided into ischemia group ($n=10$, the right common carotid artery was ligated), asphyxia group ($n=10$, 1 h after ligation of right common carotid artery, the rats were put in a box of 8% hypoxia for 30 min) and control group ($n=10$, no ligation was performed after anesthesia). VTQ was measured before and 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after surgery in three groups. The rats were executed after experiment, and pathological features of the brain were observed under microscope. **Results** In ischemia and asphyxia group, VTQ increased with ischemia time prolonged. Within 72 h after surgery, VTQ values in ischemia group was higher than pre-operation and control group. VTQ values in asphyxia group increased from (0.65 ± 0.04) m/s before surgery to (0.76 ± 0.07) m/s at 24 h after surgery. Pathologic results showed that nerve cells reduced in the right cerebral cortex and hippocampus of asphyxia group, especially in the right hippocampus. The gliocytes proliferated reactively, edema occurred in interstitial tissue of brain and perivascular tissues, and a small amount of red blood cells could be observed in ependymal area and the periventricular parenchyma. **Conclusion** With the time of hypoxic-ischemia passing by, brain injury gradually increases, and VTQ values of the brain also increase in rats. It is feasible to evaluate the degree of HIBD in newborn rats with VTQ technique.

[Key words] Hypoxic-ischemic; Brain injury; Virtual touch tissue quantification; Rats

声触诊组织量化技术评价新生大鼠 缺氧缺血性脑损伤

田桂湘¹, 李智贤^{1*}, 钟丹妮², 曾佳¹

(1. 广西医科大学第一附属医院超声科, 2. 新生儿科, 广西南宁 530021)

[摘要] **目的** 探讨声触诊组织量化(VTQ)技术评价新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)程度的可行性。**方法** 7日龄 Wistar 新生大鼠 30 只, 麻醉后分离右侧颈总动脉, 随机分为 3 组。单纯缺血组 10 只, 结扎颈总动脉; 窒息组 10 只, 结扎颈总动脉, 术后恢复 1 h 置于缺氧箱中, 持续缺氧 30 min; 对照组 10 只, 分离颈总动脉后未予结扎。应用 VTQ 技术分别测量术前和术后 12、24、48、72 h 各组大鼠的脑组织 VTQ 值。实验结束后处死大鼠, 取出脑组织行病理检查。**结果** 随着缺血时间延长, 单纯缺血组和窒息组大鼠的 VTQ 值逐渐增高。单纯缺血组 VTQ 值在术后 72 h 明显高于术前及对照组。窒息组 VTQ 值在术后 24 h 明显增高, 从术前的 (0.65 ± 0.04) m/s 上升至术后 72 h 的 (0.76 ± 0.07) m/s。病理检

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划课题项目(2007BAI07A17-11)。

[作者简介] 田桂湘(1983—), 女, 广西南丹人, 在读博士, 医师。研究方向: 超声在诊断新生儿颅脑疾病的研究。E-mail: tiantian181@163.com

[通讯作者] 李智贤, 广西医科大学第一附属医院超声科, 530021。E-mail: gxydlzx@163.com

[收稿日期] 2012-08-17 **[修回日期]** 2012-09-27

查可见窒息组右侧大脑皮层、海马等区域神经细胞减少,尤以海马区域更为明显;胶质细胞反应性增生,脑间质及血管周围水肿明显,室管膜区及脑室周围的脑实质内可见红细胞。**结论** 随着缺氧缺血时间延长,大鼠脑损伤加重,其脑组织的 VTQ 值逐渐增高。VTQ 技术可用于评价新生大鼠 HIBD 程度。

[**关键词**] 缺氧缺血;脑损伤;声触诊组织量化;大鼠

[**中图分类号**] R541.4; R817.4 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1003-3289(2012)12-2109-04

新生儿缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 的主要病理改变有脑水肿、神经元坏死、神经数量减少及神经胶质网破坏,随后出现反应性神经胶质增生;病变严重时,大范围脑组织坏死液化,可导致颅内出血,严重影响新生儿智力及运动发育^[1-2],故早期诊断和治疗尤为重要。对新生儿 HIBD 的超声观察结果一直很难获得病理改变的证实。已有研究^[3-4]表明,不同日龄大鼠的大脑发育程度不一样,出生后 7 天大鼠的发育程度类似于孕 32~36 周的人类胎儿或新生儿,其能量代谢、神经递质、血流动力学改变等与新生儿的临床发现相似。本研究通过建立新生大鼠 HIBD 模型,应用声触诊组织量化(virtual touch tissue quantification, VTQ)检测其模型脑组织的 VTQ 值改变,与病理结果的对照,探讨 VTQ 技术评价新生大鼠 HIBD 程度的可行性,为今后进一步研究提供基础参考资料。

1 材料与方

1.1 实验动物与建模 购买广西医科大学实验动物中心的临产 Wistar 大鼠,分笼饲养。分娩后,选择体质量>10 g 的 7 日龄新生大鼠 30 只作为实验对象。用 1%异戊巴比妥钠(100 mg/kg 体质量)腹腔注射麻醉后,仰卧保定大鼠于手术板上,切开颈部正中皮肤,分离右侧颈总动脉。按处理方式随机分为 3 组:①单纯缺血组(n=10),结扎颈总动脉后直接缝合伤口;②窒息组(n=10),结扎颈总动脉,术后恢复 1 h 置于缺

氧箱中,输入氮氧混合气体维持缺氧舱内氧浓度 8%,持续缺氧 30 min;③对照组(n=10),分离颈总动脉后未予结扎,缝合切口。

1.2 仪器与方法 使用 Simens Acuson S2000 彩色多普勒超声诊断仪,内置声脉冲辐射力成像(acoustic radiation force impulse, ARFI)技术,9L4 探头,频率 7~9 MHz。

1.3 颅内超声检查 分别于术前和术后 12、24、48、72 h 将大鼠保定于操作台,探头置于头部顶骨中线旁,激活 ARFI 功能,于距体表深度约 5~6 mm 处取样,获取该处脑组织的弹性参数 VTQ 值;重复测量 5 次,取平均值。

1.4 病理检查 观察至规定时间,处死大鼠后取脑组织,即刻置于 10%甲醛溶液中固定,固定 72 h 以上。以视交叉和乳头体中部为切面行冠状切片,常规脱水、石蜡包埋、切片(4 μm),行 HE 染色,于光镜下观察。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件包,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用两因素重复测量数据的方差分析比较不同时间点的资料,以 *q* 检验比较两组均数。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 超声检查结果 单纯缺血组颅脑结构在二维超声(two-dimensional ultrasound, 2DUS)图像上与对照组无明显差异。窒息组大鼠的右侧颅脑结构回声稍强,可见弥漫性稍高回声,偶见点状强回声,术后 48 h

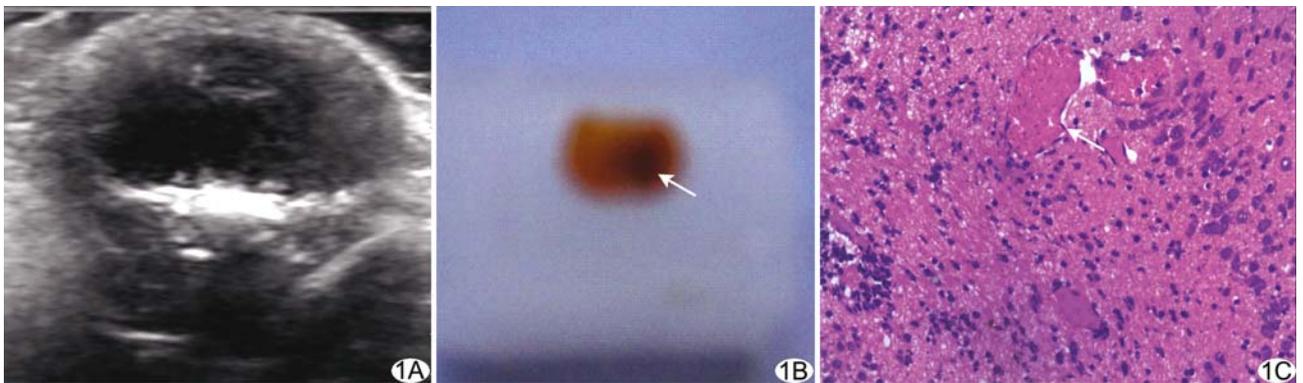


图 1 窒息组新生大鼠 A. 术后 72 h 右侧大脑回声较左侧回声增高; B. 模型标本右侧大脑可见出血病灶(箭); C. 病理切片显示大鼠脑右侧可见红细胞堆积(箭, HE, ×100)

表 1 术前、术后新生大鼠的脑组织 VTQ 值比较(m/s)

组别	术前	术后 12 h	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h
单纯缺血组 (n=10)	0.64±0.04	0.66±0.04	0.67±0.03	0.68±0.03	0.70±0.03 [#]
窒息组 (n=10)	0.65±0.04	0.69±0.08	0.72±0.06* [△] [▲]	0.75±0.05* [△] [▲]	0.76±0.07* [△] [▲]
对照组 (n=10)	0.66±0.04	0.67±0.04	0.67±0.03	0.68±0.05	0.68±0.03

注: * :与对照组比较, P<0.05; △:与单纯缺血组比较, P<0.05; # :与术前比较, P<0.05; ▲:与术后前一时间点比较, P<0.05

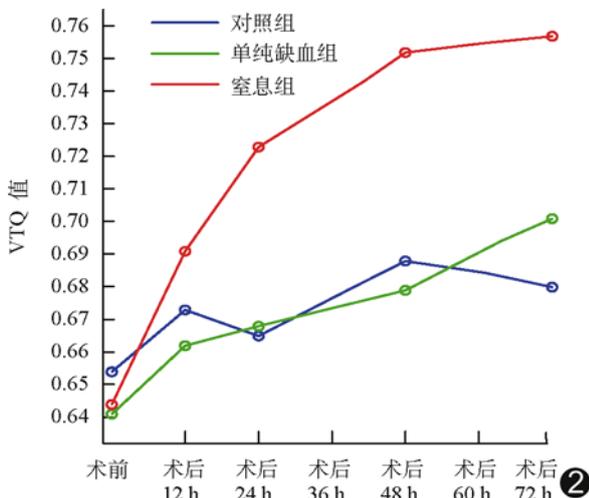


图 2 术前、术后各时间点新生大鼠脑组织 VTQ 值比较图

之后尤其明显(图 1A)。各组新生大鼠术前、术后脑组织 VTQ 值比较见表 1。术后 24 h 内,3 组 VTQ 值差异无统计学意义(P>0.05)。随着缺血时间延长,单纯缺血组和窒息组的 VTQ 值逐渐增高(图 2、3),单纯缺血组 VTQ 值由术后 12 h 的(0.66±0.04)m/s 上升至 72 h 的(0.70±0.03)m/s,术后 72 h 的 VTQ 值与术前比较差异有统计学意义(P<0.05),但与对照组各时间点差异均无统计学意义(P 均>0.05)。术后 24 h 始,窒息组与单纯缺血组及对对照组的 VTQ 值均有统计学差异(P 均<0.05),从术前的(0.65±0.04)m/s 上升至术后 72 h 的(0.76±0.07)m/s;且窒息组术后各个时间点脑组织 VTQ 值与前一时间点比较均明显增高(P<0.05)。

2.2 新生大鼠模型脑组织病理形态学改变

2.2.1 大体标本观察

单纯缺血组右侧大脑比左侧大脑饱满。窒息组右侧大脑明显较左侧大脑体积增大,脑组织易碎,并有出血灶(图 1B)。

2.2.2 HE 染色光镜下观察

对

照组大鼠的脑组织结构层次明显,皮质及髓质界限清楚;神经细胞核清晰可见,核仁清楚,细胞浆丰富,可见 Nissl 小体。单纯缺血组的脑组织结构层次清,皮质及髓质界限尚清楚;神经细胞核清晰可见,偶见区域神经细胞核固缩,着色加深,Nissl 小体仍可见,血管周围水肿,但比窒息组较轻。窒息组的脑组织层次结构较模糊,皮质及髓质界限不清,部分区域神经细胞核固缩,着色加深,核结构不易辨认,细胞浆内 Nissl 小体减少;右侧大脑皮层、海马等区域神经细胞减少,尤以海马区域更为明显,胶质细胞反应性增生,脑间质及血管周围水肿明显;室管膜区及脑室周围的脑实质内可见红细胞(图 1C)。

3 讨论

超声的组织应变分析已引起越来越多的关注^[5],超声 ARFI 技术是最近研发的定量超声弹性新技术之一^[6],可对组织弹性进行检测及评价,不仅能提供关于组织弹性的组织力学属性信息,还可通过其 VTQ 功能获得准确的组织硬度测量数值,弥补了以往弹性成像只能定性或半定量评价的缺陷,有利于评估组织硬度^[7-8]。VTQ 技术测量的是剪切波通过组织的速度,通过高强度声脉冲短时间集中使局部组织产生局部位移^[7],其整体组织不会产生位移及形变;VTQ 技术应用短暂声脉冲(时间小于 1 ms)穿透组织,产生的能量小,使组织温度的改变小于 0.7℃。有研究^[8-9]报道

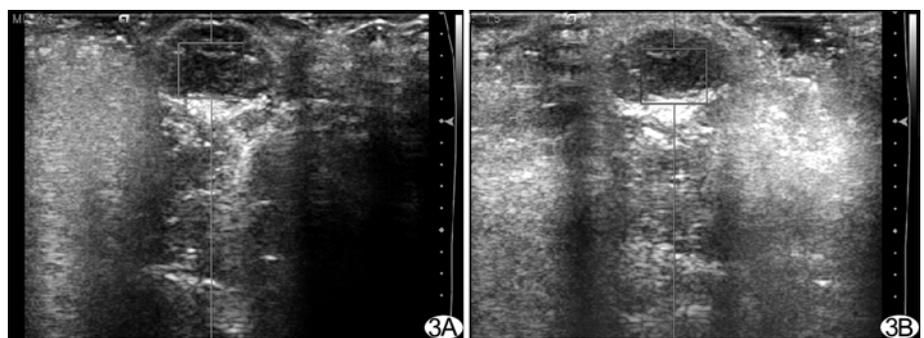


图 3 窒息组新生大鼠术前和术后 72 h 的 VTQ 值 A. 术前大鼠脑组织的 VTQ 值为 0.52 m/s; B. 术后 72 h 大鼠脑组织的 VTQ 值增高至 0.76 m/s

VTQ 测量时使用高频聚焦脉冲及低机械指数对组织的影响较小,可用于脑损伤的评估。目前,国内已有学者^[10-11]将该项技术应用于诊断新生儿 HIBD,发现不同程度 HIBD 患儿大脑各部位 VTQ 值有差异,病情越重,VTQ 值越高,但尚无病理学研究结果证实。本研究借助大鼠动物模型研究 HIBD 的 VTQ 值与病理改变的关系。

本研究结果显示,随着缺血时间的延长,模型组新生大鼠的 VTQ 值逐渐增高。术后 72 h,单纯缺血组的脑组织 VTQ 值明显高于术前;术后 24 h,窒息组脑组织 VTQ 值与单纯缺血组及对照组开始出现明显差异,直至术后 72 h 差异最为明显;且窒息组术后各个时间点的脑组织 VTQ 值与前一时间点比较均明显增高,说明随着缺氧缺血加重,脑组织损伤逐渐加重,其弹性也随之下降。这与病理所见右侧大脑皮层、海马等区域神经细胞减少,胶质细胞反应性增生,脑间质及血管周围水肿明显所导致的弹性下降相吻合。

大鼠脑的血液供应与人类相似^[12],其颈内动脉和椎动脉在大脑底面形成 Willis 环,可以互通及代偿,单纯结扎一侧颈总动脉不能造成重度脑损伤^[13]。因此,本研究中的单纯缺血组大鼠模型模拟无明显临床症状的轻度 HIBD。对于轻度 HIBD 的早期及微小坏死灶,在影像学检查很难发现,其 2DUS 表现无明显特征。本研究结果显示,在 ARFI 模式下,超声可敏感探及单纯缺血组模型大鼠的脑组织的 VTQ 值在术后逐渐增加,以术后 72 h 增加尤为明显,但其 VTQ 值明显低于窒息组,与病理结果相符。上述结果表明,应用 VTQ 技术评估新生大鼠 HIBD 程度是可行的,此技术或有望用于临床早期评价新生儿特别是早产儿 HIBD 的程度。

[参考文献]

- [1] 邵肖梅. 新生儿缺氧缺血性脑病的诊治进展及相关问题. 临床儿科杂志, 2007, 25(3):179-182.
- [2] 中华医学会儿科学分会新生儿组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(2):97-98.
- [3] Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, 2001, 105(1):7-17.
- [4] Mccarran WJ, Goldberg MP. White matter axon vulnerability to AMPA/kainate receptor-mediated ischemic injury is developmentally regulated. *J Neurosci*, 2007, 27(15):4220-4229.
- [5] 魏凌琳, 叶真, 徐秋晨. 声触诊组织量化技术鉴别诊断肝脏局灶性病变. 中国医学影像技术, 2012, 28(7):1345-1349.
- [6] 李银燕, 康姝, 王学梅, 等. 采用声触诊组织量化技术定量分析正常乳腺实质. 中国医学影像技术, 2012, 28(8):1533-1536.
- [7] Rotemberg V, Palmeri M, Rosenzweig S, et al. Acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging-based needle visualization. *Ultrason Imaging*, 2011, 33(1):1-16.
- [8] Zhai L, Palmeri ML, Bouchard RR, et al. An integrated indenter-ARFI imaging system for tissue stiffness quantification. *Ultrason Imaging*, 2008, 30(2):95-111.
- [9] Fahey BJ, Palmeri ML, Trahey GE. Frame rate considerations for real-time abdominal acoustic radiation force impulse imaging. *Ultrason Imaging*, 2006, 28(4):193-210.
- [10] 卢丹, 张丙宏. 超声弹性成像技术在新生儿缺氧缺血性脑病中的应用. 微循环学杂志, 2012, 22(2):34-36, 42.
- [11] 夏世文, 陈欣林, 付春花, 等. 超声声脉冲辐射力成像技术评价缺氧缺血后新生儿早期脑损伤的初步研究. 中国新生儿科杂志, 2012, 27(1):10-13.
- [12] Bonnin P, Debbabi H, Mariani J, et al. Ultrasonic assessment of cerebral blood flow changes during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(6):913-922.
- [13] 马杰, 杨敏, 杨建华, 等. 新生小鼠脑缺氧缺血性脑病模型的制作. 中华神经外科杂志, 2007, 23(9):713-715.