文章编号:1000-5404(2012)19-1961-04

论著

心肌声学造影评价大鼠心脏移植急性排斥反应模型心肌血流灌注的动态变化

华 兴[1],吴 蔚[2],卓丽莎[3],丁 俊[1],何 芸[1],陈朝辉[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:超声科[1],胸心外科[2];400037 重庆,第三军医大学新桥医院超声科[3])

[摘要] **目的** 评价心肌声学造影在检测大鼠心脏移植急性排斥反应心肌灌注变化中的价值。**方法** 采用 Brown Norway 大鼠 23 只为同种异体移植供体[雄性,12~15 周,体质量(143±23) g],Lewis 大鼠 53 只为同种异体移植受体、同系移植供体及受体[雄性,12~15 周,体质量(158±19) g]建立大鼠心脏移植模型(同种异体移植 18 只,同系移植 12 只),按移植后第 2、4、6 天分为 3 组(每组同种异体移植 6 只、同系移植 4 只),分别行心肌声学造影,自动拟合曲线,比较不同组间 A、β 及 A×β 值差异及同组内同系移植与同种异体移植大鼠间差异。**结果** 成功建立大鼠心脏移植模型(同种异体移植 18 只,同系移植 12 只)。同种异体移植大鼠于术后第 6 天 A 值(15.87±4.20)、β 值(0.320±0.019)、A×β 值(4.974±1.355)显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),同系移植大鼠术后第 2 天 A 值(21.71±0.017)、β 值(0.365±0.013)、A×β 值(7.908±0.374)低于第 4、6 天($P<0.05$)。在同种异体与同系比较中,A 与 β 值于术后第 6 天均有差异($P<0.05$),而 A×β 值则于术后第 4 天出现差异($P<0.05$),到第 6 天差异更加显著($P<0.01$)。**结论** 心肌声学造影可反映大鼠心脏移植后缺血再灌注及急性排斥反应发展过程中心肌灌注逐渐下降的变化特点,对于急性排斥反应的诊断与监测具有应用价值,A×β 值为较敏感指标。

[关键词] 心肌声学造影;心脏移植;急性排斥反应;心肌灌注;大鼠
[中图法分类号] R445.1; R322.11; R654.2 [文献标志码] A

Dynamic myocardial perfusion in acute rejection models of rats following heart transplantation with myocardial contrast echocardiography

Hua Xing[1], Wu Wei[2], Zhuo Lisha[3], Ding Jun[1], He Yun[1], Chen Zhaohui[1] ([1]Department of Ultrasonography, [2]Department of Cardio-thoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To assess the value of myocardial contrast echocardiography (MCE) for the myocardial perfusion of acute rejection in rats following heart transplantation. **Methods** Twenty-three male Brown Norway rats aged 12–15 weeks with a BMI of 143±23 g were used as allograft donors, and 53 male Lewis rats aged 12–15 weeks with a BMI of 158±19 g were used as allograft recipients ($n=23$), isograft donors ($n=15$) and recipients ($n=15$) in this study. Rat heart transplantation models were established by transplanting allograft in 23 rats and by transplanting isograft in 15 rats. Thirty established transplanted rats were divided into 3 groups on days 2, 4 and 6 with 6 allografts and 4 isografts in each, and then underwent MCE. Automatic fitting curve was plotted. A, β and A×β values were compared among 3 groups and between allograft and isograft transplantation groups. **Results** The rat heart transplantation models were successfully established in 18 allograft rats and in 12 isograft rats. The A, β and A×β values were significantly lower in allograft transplantation group on day 6 after transplantation (15.87±4.20, 0.320±0.019, 4.974±1.355, $P<0.05$, $P<0.01$) and in isograft transplantation group on day 2 than on days 4 and 6 after transplantation (21.71±0.017, 0.365±0.013, 7.908±0.374, $P<0.05$). A significant difference was found in the A and β values between allograft and isograft transplantation groups on day 6 after transplantation ($P<0.05$) and the A×β value was significantly different on day 4, especially on day 6, after transplantation ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** MCE can show the gradually decreasing myocardial perfusion characteristics of ischemia/reperfusion and acute rejection in rats following heart transplantation, and can thus be used in the diagnosis and

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(30801060)
[通信作者] 卓丽莎,电话:(023)68755631,E-mail:lisa_zhuo@163.com

monitoring of acute rejection, in which the A × β value is a rather sensitive index.

[**Key words**] myocardial contrast echocardiography; heart transplantation; acute rejection; myocardial perfusion; rats

Supported by the Young Scientists Program of National Natural Science Foundation of China (30801060). Corresponding author: Zhuo Lisha, Tel: 86-23-68755631, E-mail: lisa_zhuo@163.com

心脏移植是治疗终末期心脏病的重要手段,急性排斥反应是影响手术成功和患者存活的主要障碍之一。动态观察心脏移植后心肌灌注的变化情况,有助于判断和监测急性排斥反应(acute rejection,AR)的发生和发展,从而提高移植心脏的存活率[1-2]。实时心肌声学造影(myocardial contrast echocardiography,MCE)是近年来研究较多的评价心肌血流灌注的新技术,具有无创、直观、操作简便且重复性较好等特点,可用于心肌血流灌注的动态监测[3-4]。本研究建立大鼠心脏移植急性排斥反应模型,以MCE技术观察其心肌灌注的动态变化,以评估心肌灌注变化在评价心脏移植急性排斥反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

采用Brown Norway大鼠23只[雄性,12~15周,体质量(143±23) g]为同种异体移植供体;Lewis大鼠53只[雄性,12~15周,体质量(158±19) g]为同种异体移植受体、同系移植供体及受体。实验动物购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.2 大鼠心脏移植模型的建立[5]

1.2.1 受体手术 麻醉固定脱毛。腹部正中切口,用4把5寸弯血管钳分别夹住切口两侧的腹膜及腹壁并向两旁牵开腹腔,将肠袢小心牵出腹腔推向左侧,并以温生理盐水纱布覆盖,注意勿损伤肠系膜血管。打开后腹膜,在肾静脉水平下用2把显微镊钝性剥离出腹主动脉和下腔静脉,结扎吻合区下腔静脉两侧的所有属支,等待供心取出后行移植手术。

1.2.2 供体手术 麻醉固定消毒,正中线开腹,使全身肝素化。暴露胸腔,迅速用生理盐水冰屑敷于心脏上降温,至心脏停搏。分别结扎、离断下腔静脉及右上腔静脉,游离升主动脉及肺动脉主干,分别剪断肺动脉主干与升主动脉,集束结扎左右肺静脉、左上腔静脉及左心耳和部分左房壁,剪断剩余组织取下心脏,立即置于0 ℃生理盐水中保存。

1.2.3 移植手术 先后阻断下腔静脉远心端、近心端,用显微剪纵行剪开下腔静脉壁,将供心置入腹腔,由远心端开始,先经右侧壁后经左侧壁连续缝合。先后阻断受体腹主动脉近心端、远心端,纵行切开主动脉壁,由远心端开始,先经右侧壁后经左侧壁连续缝合。动静脉吻合完毕后,依次开放下腔静脉近心端、远心端,腹主动脉远心端、近心端直至心律恢复正常,全层关闭腹腔。

1.3 动物分组

成功获得同系心脏移植大鼠12只,同种异体心脏移植大鼠18只。将30只移植心脏大鼠分为3组:移植术后2 d、4 d、6 d组。各组中分别包含6只发生急性排斥反应的同种异体移植大鼠和4只作为对照的同系移植大鼠。

1.4 MCE检测

所有大鼠按分组分别于移植后第2、4、6天进行MCE 1次。

大鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,取平卧位,以硫化钠去除腹部体毛,尾静脉建立输液通道。采用德国西门子公司Sequoir 512彩色多普勒诊断仪,15L8w-s探头,频率14 MHz,自带CARDIAC条件,深度2 cm,聚焦于1.5 cm,平均灰度4 dB。获得清晰大鼠左室短轴切面后,将条件切换至CPS模式行心肌声学造影,频率7 MHz,机械指数0.22。造影剂采用第三军医大学新桥医院自制脂质微泡脂氟显,以0.02 ml/kg经尾静脉于2 min内匀速缓慢推注完后,用1 ml生理盐水以同样速度冲管。观察造影过程中心肌回声变化,存储其动态影像。造影结束后,回放动态影像,以仪器自带软件进行定量分析,自动形成指数方程 $Y = A \times (1 - e^{-\beta}) + B$ 拟合曲线,其中A为平台期强度,代表心肌血容量;β为曲线上升速率,代表心肌灌注速度;A×β代表心肌灌注血流量。

1.5 病理检查

实验结束后,断头处死大鼠,取出移植心脏,即以福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片后苏木精-伊红(HE)染色后光学显微镜下观察。急性排斥反应的病理分级依照国际心肺移植学会(International Society for Heart Lung Transplantation, ISHLT)1990年制定的心脏移植AR统一分级标准[1],按照心肌组织内淋巴细胞浸润与心肌炎症坏死程度,分为0~4级。

1.6 统计学分析

采用SPSS 10.0软件统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析和 t 检验比较不同组间A、β及A×β值差异及同组内同系移植与同种异体移植大鼠间差异。

2 结果

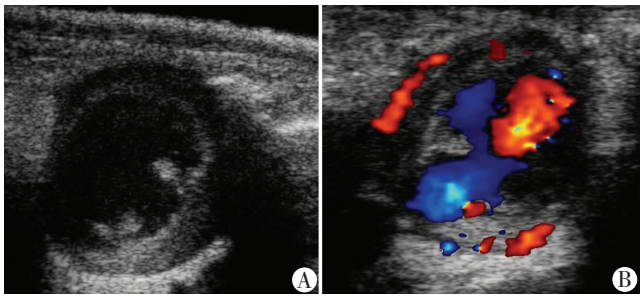
2.1 大鼠心脏移植模型建立及病理分级

同系移植组成功移植心脏12只,死亡3只;同种异体移植组成功移植心脏18只,死亡5只。死亡时间均为术后1~2 d。移植成功的大鼠成活良好,移植心脏搏动正常。显微镜下观察,同系移植的大鼠心肌中未见明显T细胞浸润,证明无急性排斥反应发生;同种异体移植后4 d的大鼠心肌中可见淋巴细胞灶性浸润,但心肌坏死不明显或仅见灶性坏死,病理分级为1~2级,其中1级4只,2级5只;移植后6 d的大鼠心肌中可见淋巴细胞弥漫性浸润并伴较为明显的心肌坏死,病理分级为3~4级,其中3级5只,4级4只。

2.2 MCE检测

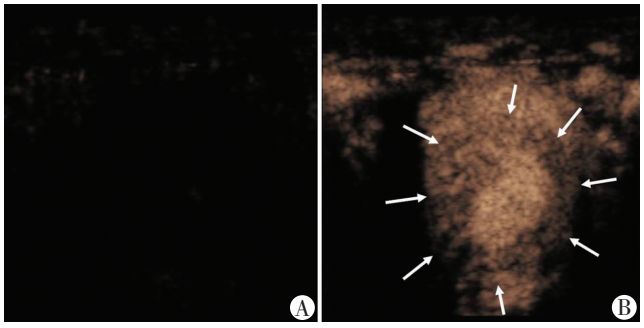
30例成功移植的大鼠心脏均可显示清晰的左室短轴切面

(图 1)。术后第 6 天,2 只同系移植心脏观察到左室内血栓形成,3 只同种异体移植心脏观察到左室内血栓形成,4 只同种异体移植心脏观察到心脏周围积液。各组大鼠成功实施移植心脏心肌声学造影(图 2)。同种异体移植组与同系移植组术后 2、4、6 d 心肌声学造影后 A、β 及 A×β 值测值如表 1 所示。随着移植天数的增加,代表心肌血容量的 A 值与代表心肌灌注速度的 β 值,在同种异体移植大鼠中于术后第 6 天显著降低($P<0.05$),而同系移植大鼠中无显著差异。代表心肌灌注血流量的 A×β 值,在同种异体移植大鼠中术后第 6 天显著降低($P<0.01$),而同系移植大鼠术后第 2 天明显低于第 4、6 天($P<0.05$)。在移植相同时间组内同种异体与同系比较中,A 与 β 值于术后第 6 天均有显著差异($P<0.05$),而 A×β 值则于术后第 4 天出现差异($P<0.05$),到第 6 天差异更加显著($P<0.01$)。



A:二维声像图;B:彩色多普勒血流显像

图 1 Sequoir 512 彩色多普勒诊断仪 CARDIAC 条件下大鼠心脏移植模型超声表现(左室短轴切面)



A:造影前;B:造影后 ↑:示大鼠左室心肌

图 2 Sequoir 512 彩色多普勒诊断仪 CPS 条件下大鼠心脏移植后心肌声学造影表现(左室短轴切面)

3 讨论

心脏移植是目前治疗终末期心脏病最有效的方法,然而 AR 是导致器官移植失败和病人死亡的主要原因之一,其发生率达 50%[6]。评价移植心的血流灌注情况,有助于判断手术效果,评价 AR 程度与估测其预后[7]。移植心恢复血供后,早期由于缺血再灌注损伤,心肌出现水肿,心肌收缩乏力,冠状动脉呈收缩状态,血流灌注减少[8],此后随着缺血再灌注损伤的恢复,心肌水肿消退,心肌收缩力增强,冠状动脉扩张,血流灌注逐渐恢复。然而,一旦发生 AR,心肌细胞、血管内皮细胞损伤加重,心肌收缩力逐渐下降,血管内出现血栓及出血,血流灌注逐渐下降,直到排斥终末期,血流灌注基本停止[9]。

超声造影作为一种出色的评价脏器血流灌注的影像学方法,近年来已逐渐广泛应用于临床。造影剂微泡体积与红细胞相仿,能模拟红细胞在血管内的活动状态,是真正意义上的"血池内"造影剂,可作为红细胞"示踪剂"[10]。低机械指数 MCE 能实时连续观测心肌造影剂在心肌内的充盈状况,定量评价心肌血流灌注,其效果已被大量文献所证实[11-13]。

本研究结果也证明心肌声学造影能较好地反映心脏移植后心肌灌注的变化规律。移植术后第 2 天,无 AR 的同系移植大鼠心肌声学造影 A、β 及 A×β 值与第 4、6 天相比较低,与同是术后第 2 天的同种异体移植大鼠相比无显著差异,而同系移植大鼠第 4 天与第 6 天保持同一水平,证明无论是同种异体还是同系移植,术后即遭遇缺血再灌注损伤,导致其心肌灌注降低,在无 AR 的同系移植中,随后心肌灌注逐渐变为正常。同种异体移植后第 4、6 天,大鼠心肌声学造影 A、β 及 A×β 值均低于同系移植大鼠,且随着时间增加,差异也更加显著,证明随着移植时间的增加,AR 心肌灌注逐渐下降,而到终末期,灌注下降更加显著。在以上比较中,无论是同种异体与同系移植比较,还是移植不同时间之间,A×β 值比 A 和 β 值差异更为显著,证明在反映心肌灌注的指标中,A×β 值较 A 和 β 值更为敏感,这也与以往研究相符[14-15]。

综上所述,本研究以低机械指数 MCE 证实了大鼠心脏移植后缺血再灌注损伤导致心肌灌注的短暂下降以及 AR 发生后随其进展心肌灌注逐渐下降的现象,证明 MCE 可反映大鼠心脏移植后 AR 心肌灌注变化规律,对于其诊断、监测以及疗效评价具有一定的应用价值。

表 1 同种异体移植组与同系移植组大鼠心肌声学造影后 A、β 及 A×β 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	A			β			A×β		
		移植后 2 d	移植后 4 d	移植后 6 d	移植后 2 d	移植后 4 d	移植后 6 d	移植后 2 d	移植后 4 d	移植后 6 d
同种异体移植组	6	21.97 ± 1.48^{c}	23.06 ± 1.61^{c}	15.87 ± 4.20^{b}	0.362 ± 0.017	0.362 ± 0.040	0.320 ± 0.019^{bc}	7.938 ± 0.570^{d}	7.142 ± 0.636^{ad}	4.974 ± 1.355^{b}
同系移植组	4	21.71 ± 0.02	23.66 ± 1.13	23.95 ± 1.85	0.365 ± 0.013	0.413 ± 0.036	0.410 ± 0.057	7.908 ± 0.374	9.783 ± 1.215^{e}	9.741 ± 0.717^{e}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与同系移植组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与移植后 6 d 比较;e:$P<0.05$,与移植后 2 d 相比较

参考文献：

[1] Hiemann N E, Wellnhofer E, Lehmkuhl H B, *et al*. Everolimus prevents endomyocardial remodeling after heart transplantation[J]. Transplantation, 2011, 92(10): 1165 - 1172.

[2] Estep J D, Shah D J, Nagueh S F, *et al*. The role of multimodality cardiac imaging in the transplanted heart[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2009, 2(9): 1126 - 1140.

[3] Ito H. Myocardial contrast echocardiography after myocardial infarction [J]. Curr Cardiol Rep, 2012, 14(3): 350 - 358.

[4] Modonesi E, Balbi M, Bezante G P. Limitations and potential clinical application on contrast echocardiography[J]. Curr Cardiol Rev, 2010, 6(1): 24 - 30.

[5] Ruzza A, Vespignani R, Czer L S, *et al*. Heterotopic heart transplantation in rats: improved anesthetic and surgical technique[J]. Transplant Proc, 2010, 42(9): 3828 - 3832.

[6] Verheyen J, Vermeulen T, Janssen-Van-Doorn K, *et al*. Treating humoral rejection after cardiac transplantation[J]. Acta Cardiol, 2011, 66(2): 263 - 266.

[7] Potluri S P, Mehra M R, Uber P A, *et al*. Relationship among epicardial coronary disease, tissue myocardial perfusion, and survival in heart transplantation[J]. J Heart Lung Transplant, 2005, 24(8): 1019 - 1025.

[8] Chin J T, Trok J J, Kimura N, *et al*. A novel cardioprotective agent in cardiac transplantation: metformin activation of AMP-activated protein kinase decreases acute ischemia-reperfusion injury and chronic rejection [J]. Yale J Biol Med, 2011, 84(4): 423 - 432.

[9] Rivard A L, Swingen C M, Blake D, *et al*. A comparison of myocardial perfusion and rejection in cardiac transplant patients[J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2007, 23(5): 575 - 582.

[10] 黄泽君，李锐，张莹，等. 兔VX2肿瘤超声造影灌注定量参数与肿瘤组织周细胞变化[J]. 第三军医大学学报，2010，32(4)：331 - 333.

[11] 姚桂华，张运，室生卓，等. 应用实时心肌造影超声心动图对心肌灌注的定量评价[J]. 中华超声影像学杂志，2004，13(2)：124 - 126.

[12] 郭士遵，舒先红，潘翠珍，等. 心肌超声造影结合多巴酚丁胺负荷试验探讨冠心病心肌灌注与心肌收缩功能的关系[J]. 中华超声影像学杂志，2005，14(7)：485 - 489.

[13] Wei K. Future applications of contrast ultrasound[J]. J Cardiovasc Ultrasound, 2011, 19(3): 107 - 114.

[14] 姚桂华，张运，张梅，等. 实时心肌造影超声心动图对心肌灌注跨壁分布的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志，2004，13(11)：853 - 856.

[15] Cosgrove D, Lassau N. Imaging of perfusion using ultrasound[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010, 37(Suppl 1): S65 - S85.

（**收稿**：2012-03-25；**修回**：2012-05-25）

（编辑　栗　嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2012)19-1964-01

儿童支原体肺炎56例临床及实验室检查结果分析

刘树刚[1]，冯永格[1]，王红艳[1]，国献素[1]，唐井刚[2]　（050041 石家庄，解放军第260医院：儿科[1]，呼吸消化科[2]）

［**关键词**］　支原体肺炎；冷凝集试验；支原体抗体；咽拭子

［**中图法分类号**］　R725.631　　［**文献标志码**］　B

由于抗生素滥用，很多儿童支原体肺炎的表现越来越不典型，这给临床的诊治工作带来一定困难[1-2]。我院自2010年11月至2012年3月收治的儿童肺炎中，56例经过各种辅助检查并结合临床表现确诊的支原体肺炎患儿，均符合儿童支原体肺炎的临床及实验室诊断标准[3]。现将其临床表现及主要辅助检查结果分析报告如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料

2010年11月至2012年3月儿科收治的肺炎患儿中，56例经过家长同意进行了X线胸片、冷凝集试验、支原体抗体及咽拭子支原体病原检测并结合临床表现最终确诊为支原体肺炎的患儿，纳入观察对象，采集标本困难及家长不配合检查的患儿除外。56例患儿入院前发病时间最长10 d，最短2 d，市内患儿20例，郊区及农村患儿36例，其中男性32例，女性24例，平均年龄7.6(3～13)岁。均有不同程度发热及咳嗽症状，其中高热35例，多为弛张热及不规则热，中度发热10例，低热11例，咳嗽多为干咳，伴胸痛12例，气喘11例，腹痛、恶心呕吐8例，皮疹5例，肌肉关节痛3例。体征主要有呼吸音粗，16例可闻及中小水泡音，局部叩诊浊音9例。X线胸片48例为单侧或双侧肺野纹理增粗、增多，肺门阴影增大，结构不清，边缘模糊，18例有沿肺段或肺叶分布的片状云絮状浸润影，部分呈网格状，密度均匀不一，其中12例在右肺上叶，3例在右肺中叶，3例在左肺下叶。

1.2　实验室检查

全部患儿入院时抽血检查冷凝集、支原体抗体，咽拭子支原体病原。32例患儿三者均阳性：冷凝集结果21例阳性，阳性率35.7%，比价最高1∶256；支原体抗体检查32例阳性，阳性率57.1%；咽拭子支原体病原检测46例阳性，阳性率82.1%。

1.3　临床治疗

56例患儿有41例在社区及村镇卫生机构进行不同程度的治疗，频繁使用激素及其他退热药物。入院后给予阿奇霉素静滴，部分加用头孢霉素两联静滴治疗，静脉或口服配合使用清热

（下转1984页）

［**通信作者**］　冯永格，电话：(0311)87970790，E-mail：hospital260_fyg@126.com