

超声造影定量分析重度失血性休克再灌注模型大鼠复苏期的肾血流灌注

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3054>

曾 祯, 胡经纬, 李 璇, 唐琳梅, 黄志强, 李明星

2095-4344.3054

投稿日期: 2020-03-17

送审日期: 2020-03-21

采用日期: 2020-05-09

在线日期: 2020-09-25

中图分类号:

R445.1; R318; R692

文章编号:

2095-4344(2021)08-01201-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章亮点一

△肾功能往往与肾脏血流动力学变化呈平行关系, 超声造影技术能够定量、实时监测肾脏血流灌注情况, 该技术为临床失血性休克复苏期肾脏功能的监测提供了新的思路。

雄性 SD 大鼠随机分组

- 假手术组;
- 失血性休克再灌注 2 h 组;
- 失血性休克再灌注 6 h 组;
- 失血性休克再灌注 24 h 组。

检测指标

- 血肌酐、尿素氮水平;
- 肾组织髓过氧化物酶、内皮素 1、前列腺素 E1 水平;
- 肾组织病理形态。

相关性分析

- 超声造影检测指标;
- 实验室生化指标。

文题释义:

超声造影: 是利用对比剂使后散射回声增强, 明显提高超声诊断的分辨力、敏感性和特异性的技术, 能有效增强乳腺、甲状腺、心肌、肝、肾、脑等实质性器官的二维超声显像和血流多普勒信号, 反映和观察正常组织和病变组织的血流灌注情况, 已成为超声诊断重要发展方向。

失血性休克复苏期: 机体因大量失血引起的休克称为失血性休克, 器官、组织或细胞等在积极的液体灌注后所经历的阶段称为失血性休克复苏期, 该阶段功能损伤未减轻, 甚至进一步加重。

摘要

背景: 肾脏血流灌注量往往与肾功能呈平行关系, 若能利用超声造影技术实时定量分析复苏期肾血流灌注变化来间接反映肾功能, 这将为临床评估失血性休克再灌注肾损伤提供一个新的思路。

目的: 建立 SD 大鼠重度失血性休克再灌注模型, 探讨超声造影参数评估肾脏血流灌注的价值。

方法: 20 只雄性 SD 大鼠随机分 4 组, 每组 5 只, 假手术组、失血性休克再灌注组 2, 6, 24 h 组。各组对应时间行超声造影检查并获得峰值强度、达峰时间、曲线下面积、平均渡越时间定量参数, 分析时间-强度曲线参数与血肌酐、尿素氮水平、肾组织髓过氧化物酶、内皮素 1、前列腺素 E1 水平的相关性。

结果与结论: 与假手术组比较, 失血性休克再灌注组病理损伤显著, 达峰时间、平均渡越时间延长, 曲线下面积、峰值强度值增大 ($P < 0.05$), 血清肌酐、尿素氮水平升高, 以再灌注 24 h 损伤最严重, 再灌注各组间达峰时间、平均渡越时间差异有显著性意义。双变量 Pearson 相关性分析显示时间-强度曲线参数达峰时间、平均渡越时间与血肌酐、尿素氮水平、肾组织髓过氧化物酶、内皮素 1、前列腺素 E1 水平均存在显著相关性。结果表明: ①超声造影能够有效地监测失血性休克复苏进程中肾脏的血流灌注变化, 并能够进行定量评估; ②时间-强度曲线中达峰时间、平均渡越时间 2 个指标具有一定参考价值; ③失血性休克再灌注后, 肾脏损伤未减轻反而加重, 复苏后 24 h 损伤最严重; ④超声造影为临床评估失血性休克再灌注肾损伤提供了一个新的思路。

关键词: 肾; 失血性休克; 再灌注; 超声造影; 肾功能; 肾损伤; 大鼠

Quantitative analysis of renal blood flow perfusion using contrast-enhanced ultrasound in rats with hemorrhagic shock during resuscitation

Zeng Zhen, Hu Jingwei, Li Xuan, Tang Linmei, Huang Zhiqiang, Li Mingxing

Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Zeng Zhen, Master candidate, Physician, Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Li Mingxing, Chief physician, Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

西南医科大学附属医院超声科, 四川省泸州市 646000

第一作者: 曾祯, 女, 1993 年生, 四川省内江市人, 在读硕士, 医师, 主要从事腹部超声方面的研究。

通讯作者: 李明星, 主任医师, 西南医科大学附属医院超声医学科, 四川省泸州市 646000

<https://orcid.org/0000-0003-1887-1755> (曾祯)

基金资助: 四川省教育厅科研资助课题 (142A0139), 项目负责人: 李明星

引用本文: 曾祯, 胡经纬, 李璇, 唐琳梅, 黄志强, 李明星. 超声造影定量分析重度失血性休克再灌注模型大鼠复苏期的肾血流灌注 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(8):1201-1206.



Abstract

BACKGROUND: The amount of renal blood perfusion is often in parallel with renal function. If contrast-enhanced ultrasound (CEUS) can be used to quantitatively analyze changes in renal blood flow perfusion during resuscitation so as to indirectly reflect changes in renal function, this will provide a new way for the clinical assessment of hemorrhagic shock-reperfusion injury of the kidney.

OBJECTIVE: To establish a reperfusion model of severe hemorrhagic shock in Sprague-Dawley rats and to explore the value of CEUS parameters in evaluating renal perfusion.

METHODS: Twenty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: sham operation group, and 2-, 6-, and 24-hour hemorrhagic shock reperfusion groups (2-, 6-, and 24-hour HS-R groups). CEUS examination was performed in each group, and the quantitative parameters of peak intensity, time to peak, area under curve, average transit time were checked and obtained. The correlation between time-intensity curve parameters and serum creatinine, urea nitrogen, renal tissue myeloperoxidase, endothelin 1, and prostaglandin E1 levels was analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the sham operation group, the pathological injury was significant in the HS-R groups, especially in the HS-R group, with increased peak intensity, time to peak, area under curve, and average transit time ($P < 0.05$) as well as increased serum creatinine and urea nitrogen levels. There were significant differences in peak arrival time and average transit time among groups. Bivariate Pearson's correlation analysis showed that time to peak and average transit time were significantly correlated with serum creatinine, urea nitrogen, renal tissue myeloperoxidase, endothelin 1, and prostaglandin E1 levels. To conclude, (1) CEUS can effectively monitor and quantitatively evaluate the renal perfusion changes during the recovery of hemorrhagic shock. (2) Time to peak and average transit time are two indexes of the time-intensity curve with some reference value. (3) After hemorrhagic shock and reperfusion, the kidney injury is aggravated but not alleviated, and the injury is the most serious at 24 hours after resuscitation. (4) CEUS provides a new idea for clinical evaluation of hemorrhagic shock-reperfusion injury of the kidney.

Key words: kidney; hemorrhagic shock; reperfusion; contrast-enhanced ultrasound; renal function; renal injury; rat

Funding: the Scientific Research Project of Sichuan Provincial Department of Education, No. 142A0139 (to LMX)

How to cite this article: ZENG Z, HU JW, LI X, TANG LM, HUANG ZQ, LI MX. Quantitative analysis of renal blood flow perfusion using contrast-enhanced ultrasound in rats with hemorrhagic shock during resuscitation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(8):1201-1206.

0 引言 Introduction

肾脏是直接依赖灌注压和血流量来维持滤过和再吸收之间平衡的器官, 生理条件下平均动脉压在 75–80 mm Hg 以上, 肾脏可以通过自身代偿机制维持肾小球灌注, 如果失血量较大造成失血性休克, 肾小球滤过率会突然降低, 导致肾脏损伤^[1]。当机体发生失血性休克恢复血液供应时, 肾脏损伤未减轻反而加重的病理生理现象成为失血性休克再灌注损伤 (hemorrhagic shock and reperfusion injury, HS-RI)^[2]。超声造影 (contrast-enhanced ultrasound, CEUS) 又称声学造影, 是一种由微泡组成的药物静脉注射在体腔内, 动态监测器官血流灌注变化的超声新技术^[3]。该实验拟利用超声造影技术监测大鼠失血性休克复苏期肾脏血流灌注情况, 通过该技术了解肾功能的潜在价值。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物实验研究。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 11 月至 2019 年 4 月在西南医科大学附属医院超声科及西南医科大学心研所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验试剂 超声对比剂声诺维 Sonovue® (意大利 Bracco 公司), 每瓶含 59 mg 六氟化硫气体 (SF₆), 25 mg 冻干粉 (由聚乙二醇、DSPC、二棕榈磷脂酰甘油钠、棕榈酸组成); 肝素钠溶液 (10 mg/kg, 规格 2 mL : 100 mg, 成都市海通药业有限公司); 10% 水合氯醛 (2 mL/kg, 规格 10 mL : 1 g, 国药集团化学试剂有限公司); 生理盐水注射液 (规格 100 mL : 0.9 g, 四川美大康佳乐药业有限公司); 羟乙基淀粉氯化钠注射液 (规格: 500 mL, 成都正康药业有限公司); 甲醛 (规格: 1 L, 生工生物工程有限公司); 苏木精-伊红染色试剂盒 (广州威佳科技有限公司); Rat ET-1 ELISA KIT、Rat MPO ELISA KIT、Rat PGE1 ELISA KIT (规格: 48 孔/盒, 上海茁彩生物科技有限公司)。

1.3.2 实验仪器 超声诊断仪 (ACUSON S3000, 德国西门子), 9L4 变频线阵探头, 配置造影成像及软件包进行定量分析;

多功能心电监护仪 (BL-420S, 成都泰盟软件有限公司); 离心机 (湖南平凡科技有限公司); 全自动生化分析仪 (ADVIA 2400, 德国西门子); 显微镜 (德国 Leica 公司); 酶标仪 (SpectraMAX Plus384, 美谷分子仪器有限公司); 优普超纯水制造系统 (UPH- II -10T, 成都超纯科技有限公司); 电子恒温水浴锅 (DZKW-4, 北京中兴伟业仪器有限公司); 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器 (上海沪粤明科学仪器有限公司); 移液枪、枪头、EP 管 (美国 Axygen 公司)。

1.3.3 实验动物 健康成年雄性 SD 大鼠 20 只, 体质量 250–350 g, 由成都达硕实验动物中心提供, 将 20 只大鼠随机分为假手术组、失血性休克再灌注 2, 6, 24 h 组, 每组 5 只。该实验经西南医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.4 实验方法

1.4.1 动物模型建立 腹腔注射肝素钠溶液 (10 mg/kg) 全身肝素化, 15 min 后腹腔注射 10% 水合氯醛 (2 mL/kg) 麻醉大鼠, 仰卧位固定, 左侧颈部、腹股沟区剃毛, 碘伏消毒。左侧颈部、腹股沟区切开皮肤, 逐层钝性分离, 游离左侧颈总动脉, 置入 24G 留置针, 经三通管接生物多导生命监测仪, 血压曲线平稳, 记录初始平均动脉压。左侧股总动脉置入 24G 留置针作为放血通道, 放血至 40% 初始平均动脉压, 维持 1 h, 建立重度失血性休克定压模型, 左侧股总静脉置入 24G 留置针作为补液通道, 回输羟乙基淀粉酶 130/0.4 补液, 待血压回升至 80% 初始平均动脉压, 再灌注模型建立成功, 拔管、结扎血管, 缝合皮肤, 术后大鼠清洁饲养, 自由饮水进食。假手术组未行放血及补液处理, 其余操作流程同上。

1.4.2 超声造影检查 各组大鼠于失血性休克再灌注 2, 6, 24 h 行超声造影检查, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (2 mL/kg) 麻醉大鼠, 仰卧位固定, 右侧肾区、腹股沟区剃毛、碘伏消毒。游离右侧股总静脉置入 24G 留置针, 建立对比剂注射通道。超声仪器采用西门子 Acuson S3000 超声诊断仪, 9L4 高频线阵探头。在二维模式下观察大鼠右肾大小, 彩色多普勒模式下观察右肾血流, 选取肾脏最大冠状切面, 固定探头, 转换

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	模拟失血性休克再灌注肾损伤
模型与所研究疾病的关系:	经大鼠右侧股总动脉放血, 模拟失血性休克, 再经右侧股总静脉补液, 制造大鼠失血性休克再灌注肾损伤动物模型, 探究临床患者大量失血造成失血性休克, 给予液体复苏后肾脏损伤进一步加重的病理生理现象
造模技术描述:	经右侧股动脉放血, 血压降至 40% 初始平均动脉压维持 1 h, 模拟失血性休克; 右侧股总静脉输注羟乙基淀粉酶使血压回升至 80% 初始平均动脉压, 制造失血性休克再灌注损伤模型
动物数量及分组方法:	将 20 只 SD 大鼠随机分为假手术组、失血性休克再灌注 2, 6, 24 h 组, 每组 5 只
造模成功评价指标:	实时平均动脉压 (降至 40% 初始平均动脉压模拟失血性休克; 血压回升至 80% 初始平均动脉压模拟失血性休克再灌注损伤)
造模后取材及观察指标:	下腔静脉血 2 mL (检测指标: 肌酐、尿素氮水平); 右肾组织 (1/2 肾组织行病理切片检测; 1/2 肾组织 ELISA 检测髓过氧化物酶、内皮素 1、前列腺素 E1 水平)
伦理委员会批准:	实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 201910-5

为超声造影模式, 机械指数 (MI) 0.05, 频率 4.0 MHz, 深度 3.5 cm, 整个实验过程仪器设置固定不变。超声微泡对比剂采用 Sonovue (规格: 59 mg 六氟化硫, 25 mg 冻干粉), 对比剂干粉用 5 mL 无菌生理盐水稀释配置成混悬液, 经右侧股总静脉按 0.4 mL/kg 剂量团注, 随即注射 0.4 mL 无菌生理盐水冲管。注射对比剂的同时开启计时器, 存储 3 min 动态影像。存储的图像运用西门子公司所提供的 ACQ 软件进行定量分析, 将感兴趣区域设置为面积为 0.05 mm² 的椭圆形取样框, 尽量避开大血管, 均置于与声束垂直的外层肾皮质中部, 以保证获得的参数具有可比性。ACQ 定量分析软件自动生成时间-强度曲线 (time-intensity curve, TIC), 并获得曲线下面积 (area under curve, AUC)、达峰时间 (time to peak, TP)、峰值强度 (peak intensity, Peak)、平均渡越时间 (mean transit time corresponding to the center of gravity, MTT) 相关指标。以上参数均测量 3 次求取平均值以减少误差。

1.5 主要观察指标

1.5.1 血生化指标 各组 SD 大鼠造影结束后立即取下腔静脉血 2 mL, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上层血清, 全自动生化分析仪分析肌酐、尿素氮水平。

1.5.2 肾组织髓过氧化物酶、内皮素 1、前列腺素 E1 水平和病理形态 取血结束后, 立即处死大鼠, 取右肾组织, 沿最大冠状切面将肾组织均分为两部分, 一部分肾组织采用 ELISA 法检测髓过氧化物酶、内皮素 1、前列腺素 E1 水平, 另一部分肾组织用体积分数为 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片后行苏木精-伊红染色, 病理专业人员单盲法显微镜下观察病理形态变化。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件分析所得数据, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析法, 组间比较采用 LSD-t 检验, Pearson 分析时间-强度曲线参数与实验室生化指标的相关性。P < 0.05 为差异

有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加实验 22 只 SD 雄性大鼠, 进入结果分析数量 20 只; 1 只于麻醉后死亡, 分析其原因可能因个体对麻醉药过敏所致; 1 只放血过程中死亡, 分析其原因可能为该大鼠身体状况较差, 对短时间大量失血无法耐受。

2.2 大鼠肾脏灰阶超声造影分析 经大鼠右侧股总静脉团注超声对比剂后, 观察灰阶超声造影模式下假手术组对比剂沿各级肾动脉分支迅速显影呈现“血管树样改变”, 紧接着整个肾脏迅速增强呈现“火球样改变”, 随后亮度逐渐减低, 直至对比剂完全廓清, 见图 1; 失血性休克再灌注组和假手术组沿着相同的顺序灌注/廓清, 但肾动脉“树枝”较假手术组变细, 亮度减低; “火球样改变”亮度较假手术组减低, 见图 2。

2.3 时间-强度曲线及参数比较 感兴趣区域自动生成时间-强度曲线, 该曲线客观地反映了超声对比剂微泡在肾脏微循环灌注的渡越过程。假手术组时间-强度曲线上陡直, 迅速到达峰值再缓慢下降至基础水平; 失血性休克再灌注组与假手术组相比, 时间-强度曲线上升及下降减缓, 峰值升高, 随着复苏时间的逐渐延长, 上升曲线逐渐减缓, 峰值逐渐升高。时间-强度曲线获得各参数比较结果: 与假手术组相比, 失血性休克再灌注组达峰时间、平均渡越时间延长, 曲线下面积值、峰值强度增大 (P < 0.05), 随着灌注时间延长, 达峰时间、平均渡越时间逐渐增大, 且 2 个指标在失血性休克再灌注各组内比较差异有显著性意义 (P < 0.05); 与失血性休克再灌注 2 h 组相比, 其余失血性休克再灌注组的峰值强度、曲线下面积值均增大, 差异有显著性意义 (P < 0.05), 见图 3、表 1。

表 1 | 各组大鼠肾皮质时间-强度曲线参数比较 ($\bar{x} \pm s$, n=20)
Table 1 | Comparison of time-intensity curve parameters of the renal cortex in rats

组别	峰值强度 (%)	达峰时间 (s)	曲线下面积 (%)	平均渡越时间 (s)
假手术组	45.77±2.92	15.73±1.43	2 622.18±107.92	39.59±2.94
失血性休克再灌注 2 h 组	52.18±2.55 ^a	23.19±4.05 ^a	4 662.96±613.68 ^a	74.43±9.46 ^a
失血性休克再灌注 6 h 组	58.03±0.94 ^{ab}	35.35±3.27 ^{ab}	8 044.36±312.97 ^{ab}	95.94±8.41 ^{ab}
失血性休克再灌注 24 h 组	59.67±0.85 ^{ab}	44.42±2.80 ^{abc}	11 168.12±1 787.78 ^{abc}	127.27±6.26 ^{abc}
F 值	47.95	87.71	77.00	130.67
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表注: 与假手术组相比, ^aP < 0.05; 与失血性休克再灌注 2 h 组相比, ^bP < 0.05; 与失血性休克再灌注 6 h 组相比, ^cP < 0.05

2.4 生化指标检测结果 假手术组血清肌酐值为 (26.86±2.01) μmol/L, 失血性休克再灌注各组血清肌酐值较假手术组增高, 失血性休克再灌注 6, 24 h 组与假手术组比较差异有显著性意义 (P < 0.05), 失血性休克再灌注各组内比较血清肌酐值差异有显著性意义 (P < 0.05)。假手术组尿素氮值为 (7.01±0.42) mmol/L, 失血性休克再灌注各组尿素氮值较假手

术组增高 ($P < 0.05$), 与失血性休克再灌注 2 h 组相比, 失血性休克再灌注 24 h 组尿素氮值增高 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 | 各组大鼠血清肌酐、尿素氮水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	血清肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮 (mmol/L)
假手术组	26.86 \pm 2.01	7.01 \pm 0.42
失血性休克再灌注 2 h 组	30.50 \pm 1.00	9.10 \pm 1.36 ^a
失血性休克再灌注 6 h 组	42.26 \pm 5.42 ^{ab}	9.85 \pm 1.55 ^a
失血性休克再灌注 24 h 组	56.22 \pm 7.11 ^{abc}	10.98 \pm 1.64 ^{ab}
F 值	41.35	7.85
P 值	< 0.001	0.002

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与失血性休克再灌注 2 h 组相比, ^b $P < 0.05$; 与失血性休克再灌注 6 h 组相比, ^c $P < 0.05$

2.5 肾组织髓过氧化物酶、内皮素 1、前列腺素 E1 水平 与假手术组相比, 失血性休克再灌注各组大鼠肾组织匀浆中内皮素 1 水平增高, 前列腺素 E1 水平降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 失血性休克再灌注组内比较内皮素 1 及前列腺素 E1 水平差异无显著性意义。与假手术组相比, 失血性休克再灌注各组大鼠肾组织匀浆中髓过氧化物酶水平增高, 失血性休克再灌注 6, 24 h 组与假手术组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 失血性休克再灌注组内比较髓过氧化物酶水平差异无显著性意义, 见表 3。

表 3 | 各组肾组织髓过氧化物酶、内皮素 1、前列腺素 E1 水平 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	内皮素 1(ng/L)	髓过氧化物酶 ($\mu\text{g/L}$)	前列腺素 E1 (ng/L)
假手术组	27.00 \pm 0.92	23.04 \pm 2.05	50.95 \pm 2.08
失血性休克再灌注 2 h 组	29.00 \pm 1.27 ^a	25.44 \pm 3.11	49.10 \pm 0.40 ^a
失血性休克再灌注 6 h 组	28.75 \pm 0.50 ^a	27.83 \pm 1.15 ^a	49.21 \pm 1.27 ^a
失血性休克再灌注 24 h 组	28.89 \pm 1.23 ^a	28.13 \pm 1.83 ^{ab}	48.86 \pm 0.64 ^a
F 值	6.09	2.85	4.25
P 值	0.006	0.07	0.02

表注: 与假手术组相比, ^a $P < 0.05$; 与失血性休克再灌注 2 h 组相比, ^b $P < 0.05$

2.6 时间 - 强度曲线参数与实验室生化指标相关性分析 见表 4。峰值强度、达峰时间、曲线下面积、平均渡越时间与血清肌酐呈高度正相关; 峰值强度、达峰时间、曲线下面积、平均渡越时间与尿素氮、内皮素 1、髓过氧化物酶呈中度正相关; 达峰时间、平均渡越时间与前列腺素 E1 呈中度负相关。

2.7 各组大鼠肾组织病理形态 假手术组肾小球及肾小管结构无明显病理改变; 失血性休克再灌注 2 h 组肾小管上皮肿胀, 肾小球未见明显肿胀、硬化及萎缩等改变; 失血性休克再灌注 6 h 组肾小管上皮细胞肿胀情况较失血性休克再灌注 2 h 组稍加重, 肾血管未见明显充血, 肾小球未见明显改变; 失血性休克再灌注 24 h 组随着复苏时间的延长, 损伤进一步加重, 肾小管上皮细胞肿胀, 间质可见少量炎细胞浸润, 肾血管轻度充血, 见图 4。

3 讨论 Discussion

失血性休克是一种伴有快速失血的生理状态, 引起休克

表 4 | 时间 - 强度曲线参数与实验室生化指标相关性分析
Table 4 | Correlation analysis of time-intensity curve parameters and laboratory biochemical parameters

指标	峰值强度	达峰时间	曲线下面积	平均渡越时间
血清肌酐	r 值	0.805	0.867	0.914
	P 值	0.000	0.000	0.000
尿素氮	r 值	0.746	0.639	0.785
	P 值	0.000	0.002	0.000
内皮素 1	r 值	0.569	0.479	0.510
	P 值	0.009	0.033	0.022
髓过氧化物酶	r 值	0.721	0.612	0.682
	P 值	0.000	0.004	0.001
前列腺素 E1	r 值	-0.406	-0.499	-0.404
	P 值	0.075	0.025	0.078

表注: $0.3 < |r| \leq 0.5$ 为低度相关, $0.5 < |r| \leq 0.8$ 为中度相关, $0.8 < |r| < 1$ 为高度相关

的原因众多, 如创伤、消化道出血、围术期出血、动脉瘤破裂等, 有效的液体复苏是稳定失血性休克所致组织低灌注的关键, 但再灌注同时也可导致器官进一步受损^[4]。损伤主要与氧化应激反应、炎症反应、钙超载、细胞凋亡、自噬机制、微循环障碍等过程有关^[5-8]。肾脏血供丰富, 动脉按段分区供血, 侧支循环少, 对再灌注过程十分敏感, 可造成肾功能严重损伤, 目前关于肾脏再灌注损伤的研究分为单纯型再灌注损伤和全身型再灌注损伤两种。单纯型: 因肾血管因素导致肾脏缺血后恢复血供, 如肾动脉闭塞再通、肾移植术后等; 全身型: 因全身循环血量下降导致肾脏缺血后复苏, 如失血性休克再灌注、心脏停搏后恢复等。动物实验以单纯型再灌注损伤研究较多, 该研究经股动脉放血、股静脉补液模拟失血性休克再灌注肾损伤模型, 探究全身型再灌注肾损伤。肾功能受损往往与肾脏血流灌注情况呈平行关系, 因此探究一种无创监测肾脏微循环血流灌注的技术就成为了临床关注的重点。

目前, 可评价肾血流的影像学方法较多, 主要有 CT 灌注成像、MRI 灌注成像、核素显像、彩色多普勒及脉冲多普勒超声等^[9-11], 前 3 种检查方法有放射性、肾毒性, 并且价格昂贵, 后 2 种方法对血流敏感性较差且无法定量分析, 因此以上影像学方法均限制了临床评估肾脏血流的应用。确定肾功能最准确的方法是测定肾小球滤过率, 但它耗时长、劳动强度大^[12], 临床上主要以测定血肌酐及尿素氮来确定肾功能变化, 但以上 2 个指标变化具有一定的滞后性^[13]。超声造影可以通过对比剂在声场中振荡, 产生非线性响应来清楚地显示组织和小血管中的血液流动。目前已将该技术应用于肝脏、乳腺、甲状腺等疾病的诊断^[14-16], 根据最新的 EFSUB1 指南, 超声造影可应用于肾脏的血管疾病^[17]。肾灌注显像首次报告于 1998 年, SEHGAL 等^[18]了解超声造影有助于早期发现犬肾微血管的损害和功能障碍。SonoVue 超声对比剂由气体微泡和稳定外壳组成, 微泡可经肺排出, 外壳可由身体代谢, 安全性较高, 并且对比剂不会从毛细血管中排除, 也不会溢出至组织间隙或者尿液, 因此可作为一种定量和可视化手段来实时动态观察记录肾脏微循环的变化^[19]。肾皮质的血流灌

注约占整个肾血供的 90%，因此肾皮质微泡灌注变化被作为肾血流量的变化^[13]。将感兴趣区域选定在外层肾皮质中部，ACQ 软件自动生成时间-强度曲线，血流情况由曲线下面积、达峰时间、峰值强度以及平均渡越时间 4 个参数量化反映。

实验研究结果显示，失血性休克再灌注各组与假手术组相比，表现为达峰时间、平均渡越时间延长，与叶帆等^[20]利用超声造影监测兔肾脏缺血再灌注损伤结果一致，且曲线下面积、峰值强度值增大 ($P < 0.05$)。达峰时间指对比剂开始注入到最大峰值强度的时间，平均渡越时间代表开始出现对比剂增强到下降为峰值一半的时间^[21]，当大鼠机体发生重度失血时，有效循环血量减少，启动神经和体液反应，激活交感神经系统及肾素-血管紧张素-醛固酮系统，生成甲状腺素及去甲肾上腺素等，引起血管平滑肌反应性收缩；髓过氧化物酶升高，中性粒细胞大量激活、自由基大量富集，肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 等炎症因子及细胞间黏附分子 1 等黏附分子、选择素大量产生，血液浓缩黏稠度增加^[22-24]；毛细血管通透性增加，中性粒细胞及血浆渗透于间质引起组织肿胀，限制微血管扩张，导致血循环管径变窄；中性粒细胞与内皮细胞相互作用导致内皮受损，纤维蛋白及血小板大量产生，易形成微血栓引起循环障碍^[25]；内皮素 1 等缩血管活性肽生成增加，前列腺素 E1 等舒血管物质生成减少，引起入球及出球小动脉收缩，微循环血容量减少^[26]；以上因素均可导致对比剂的灌注及廓清速度减慢，表现为达峰时间、平均渡越时间延长。曲线下面积指感兴趣区域内一段时间的对比剂累积总积分值^[26]，缺血缺氧导致大量的炎性细胞瘀滞于微血管及间质，炎细胞对对比剂有一定的吞噬作用，保留声学活性可以继续被检测，表现为失血性休克再灌注组较假手术组曲线下面积值增大。峰值强度代表最大峰值强度^[21]，反映肾皮质感兴趣区域内对比剂瞬时最大峰值浓度，失血性休克再灌注组较假手术组峰值强度值增大，分析其原因可能也因炎细胞的吞噬作用引起，但是峰值强度反映瞬时效应，累积效应差，该指标参考价值较小。观察实验结果发现，失血性休克再灌注 24 h 后损伤程度达最严重，再灌注 24 h 后生化指标血清肌酐、尿素氮达最高值，肾脏病理组织损伤最严重，肾小管上皮细胞肿胀、间质可见少量炎细胞浸润，肾血管轻度充血，与钟先阳等^[27]研究结果一致，达峰时间、平均渡越时间显著延长，峰值强度及曲线下面积达最大值，达峰时间、平均渡越时间 2 个指标于失血性休克再灌注各组间比较差异有显著性意义，峰值强度及曲线下面积值随复苏时间延长仅呈现逐渐上升趋势，但差异无显著性意义，分析其原因可能为 2 个指标受多种因素的影响，缩血管导致血流量减少，对比剂灌注减少，炎细胞吞噬对比剂又可导致对比剂持续保持声学效应，多种因素累积监测结果受影响。因此达峰时间、平均渡越时间 2 个参数评估失血性休克复苏期肾脏血流动力学变化具有一定的参考价值。

该研究还是具有一定局限性，以 SD 大鼠为研究对象总结出的结论不一定完全适用于人类；临床上失血性休克再灌

注是一个复杂的过程，实验过程不能完全模拟和替代；实验仅研究了 24 h 以内重度失血性休克复苏的微循环变化，轻度及中度失血的变化趋势以及 24 h 以后的肾脏灌注如何改变需进一步的实验探究；样本量较少。

结论：这项研究证实了超声造影定量分析技术可以快速、正确、低风险地监测失血性休克复苏期肾脏血流灌注变化，能够为判定失血性休克再灌注肾损伤提供依据，该技术有望成为临床监测肾功能的新方法。

致谢：感谢李明星老师对于课题设计、实验过程、论文撰写等方面的指导，感谢西南医科大学附属医院超声科、病理科、检验科及心电图实验室提供的实验平台以及老师提供的意见和建议，感谢胡经纬、李璇、唐琳梅、黄志强的帮助及鼓励。

作者贡献：实验设计为李明星教授，实验实施为曾祯、胡经纬，实验评估为李明星教授，资料收集为曾祯、胡经纬、李璇、唐琳梅、黄志强。

经费支持：该文章接受了“四川省教育厅科研资助课题(142A0139)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准，批准号为 201910-5。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

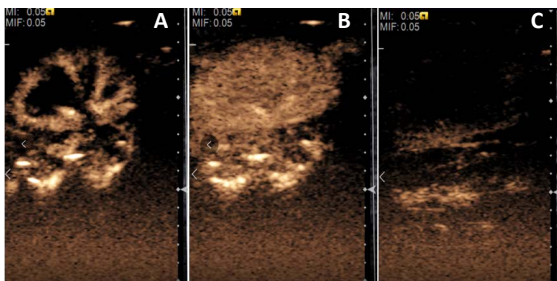
生物统计学声明：文章统计学方法已经通过西南医科大学杨超生物统计学专家审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

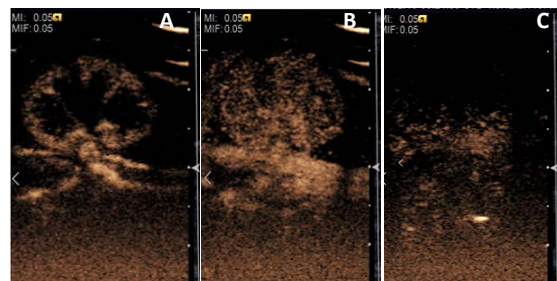
- [1] SHARFUDDIN AA, MOLITORIS BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(4):189-200.
- [2] HU JB, LI SJ, KANG XQ, et al. CD44-targeted hyaluronidase-curcumin prodrug protects renal tubular epithelial cell survival from oxidative stress damage. *Carbohydr Polym.* 2018;193:268-280.
- [3] TEDESCO G, SARNO A, RIZZO G, et al. Clinical use of contrast-enhanced ultrasound beyond the liver: a focus on renal, splenic, and pancreatic applications. *Ultrasonography.* 2019;38(4):278-288.
- [4] CANNON JW. Hemorrhagic Shock. *N Engl J Med.* 2018;378(4):370-379.
- [5] WANG ML, WEI CH, WANG WD, et al. Melatonin attenuates lung ischaemia-reperfusion injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2018;26(5):761-767.
- [6] YANG Y, SONG M, LIU Y, et al. Renoprotective approaches and strategies in acute kidney injury. *Pharmacol Ther.* 2016;163:58-73.
- [7] RAHMANIA L, ORBEGOZO D, SU F, et al. Administration of Tetrahydrobiopterin (BH4) Protects the Renal Microcirculation From Ischemia and Reperfusion Injury. *Anesth Analg.* 2017;125(4):1253-1260.
- [8] ZHANG LX, ZHAO HJ, SUN DL, et al. Niclosamide attenuates inflammatory cytokines via the autophagy pathway leading to improved outcomes in renal ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep.* 2017;16(2):1810-1816.



图注：图中 A 为肾动脉呈“血管树样改变”；B 为肾脏呈“火球样改变”；C 为肾脏对比剂基本廓清

图 1 | 假手术组大鼠肾脏超声造影过程

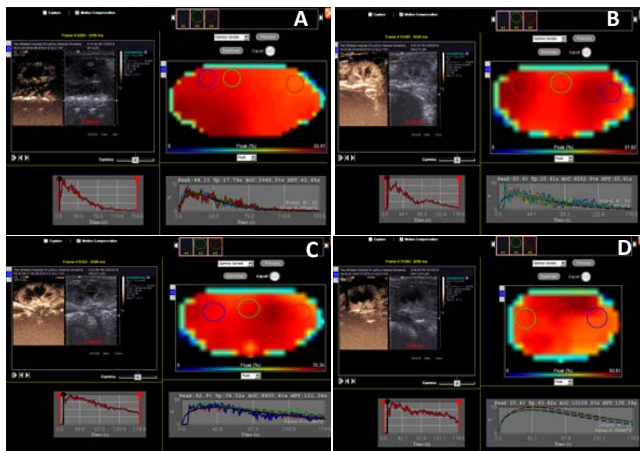
Figure 1 | Contrast-enhanced ultrasound of the rat kidney in the sham operation group



图注：图中 A 为肾动脉“树枝”变细、亮度变暗；B 为肾脏“火球样改变”亮度减低；C 为肾脏对比剂基本廓清

图 2 | 失血性休克再灌注 24 h 组大鼠肾脏超声造影过程

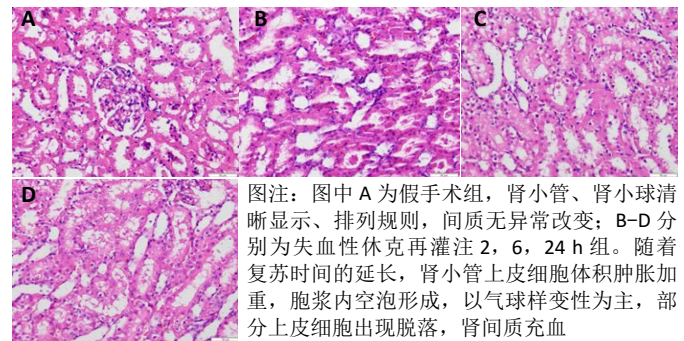
Figure 2 | Contrast-enhanced ultrasound of the rat kidney after 24-hour hemorrhagic shock and reperfusion



图注：图中 A 为假手术组；B-D 分别为失血性休克再灌注 2, 6, 24 h 组

图 3 | 各组大鼠肾脏皮质血流灌注时间 - 强度曲线

Figure 3 | Blood perfusion time-intensity curve of the renal cortex in rats



图注：图中 A 为假手术组，肾小管、肾小球清晰显示、排列规则，间质无异常改变；B-D 分别为失血性休克再灌注 2, 6, 24 h 组。随着复苏时间的延长，肾小管上皮细胞体积肿胀加重，胞浆内空泡形成，以气球样变性为主，部分上皮细胞出现脱落，肾间质充血

图 4 | 各组大鼠肾脏病理学图片 (苏木精 - 伊红染色, ×200)

Figure 4 | Renal pathology in rats (hematoxylin-eosin staining, ×200)

[9] JIANG T, KAMBADAKONE A, KULKARNI NM, et al. Monitoring response to antiangiogenic treatment and predicting outcomes in advanced hepatocellular carcinoma using image biomarkers, CT perfusion, tumor density, and tumor size (RECIST). *Invest Radiol.* 2012;47(1):11-17.

[10] SONG B, CAO Y, PEI L, et al. Efficacy of High-intensity Statin Use for Transient Ischemic Attack Patients with Positive Diffusion-weighted Imaging. *Sci Rep.* 2019;9(1):1173.

[11] JIA X, GAO R, LIANG Y, et al. Retroperitoneal Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor on 99mTc-DTPA Renal Scintigraphy. *Clin Nucl Med.* 2019;44(8):648-649.

[12] HALL JA, FRITSCH DA, YERRAMILI M, et al. A longitudinal study on the acceptance and effects of a therapeutic renal food in pet dogs with IRIS-Stage 1 chronic kidney disease. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2018;102(1):297-307.

[13] DONG Y, WANG W, CAO J, et al. Quantitative evaluation of contrast-enhanced ultrasonography in the diagnosis of chronic ischemic renal disease in a dog model. *PLoS One.* 2013;8(8):e70337.

[14] ZHAO H, LIU X, LI B, et al. Advantages of the Korean Thyroid Imaging Reporting and Data System Combined with Contrast-Enhanced Ultrasound in Diagnosing Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Iranian Journal of Radiology.* 2019; 16(4): e83460.

[15] WILDNER D, SCHELLHAAS B, STRACK D, et al. Differentiation of malignant liver tumors by software-based perfusion quantification with dynamic contrast-enhanced ultrasound (DCEUS). *Clin Hemorheol Microcirc.* 2019;71(1):39-51.

[16] 王晶, 史秋生, 李刚, 等. 超声造影在乳腺良恶性肿瘤鉴别诊断中的应用 [J]. *肿瘤影像学*, 2019,28(3):145-148.

[17] SIDHU PS, CANTISANI V, DIETRICH CF, et al. The EFSUMB Guidelines and Recommendations for the Clinical Practice of Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) in Non-Hepatic Applications: Update 2017 (Long Version). *Ultraschall Med.* 2018;39(2):e2-e44.

[18] SEHGAL CM, ARGER PH, PUGH CR, et al. Comparison of power Doppler and B-scan sonography for renal imaging using a sonographic contrast agent. *J Ultrasound Med.* 1998;17(12):751-756.

[19] LIMA A, VAN ROOIJ T, ERGIN B, et al. Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound Identifies Microcirculatory Alterations in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Crit Care Med.* 2018;46(8):1284-1292.

[20] 叶帆, 李明星, 罗志建, 等. 超声造影监测兔肾缺血再灌注损伤早期皮质血流动力学的改变 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2015,9(6):952-955.

[21] 孙晓颖, 邝斌, 罗志建, 等. 超声造影在评价地塞米松改善大鼠肾缺血再灌注损伤中的应用价值 [J]. *实用医学杂志*, 2019,35(7):1069-1072.

[22] LI H, MA Y, CHEN B, et al. miR-182 enhances acute kidney injury by promoting apoptosis involving the targeting and regulation of TCF7L2/Wnt/ β -catenins pathway. *Eur J Pharmacol.* 2018;831:20-27.

[23] AKARAS N. Gossypin Protects Against Renal Ischemia- Reperfusion Injury in Rats. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi.* 2020; 26(1):89-96.

[24] 潘宝华, 夏炜, 郭树忠, 等. 拮抗选择素对缺血 / 再灌注损伤皮肤的保护作用 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2007,18(2):84-86.

[25] CAKIR M, POLAT A, TEKIN S, et al. The effect of dexmedetomidine against oxidative and tubular damage induced by renal ischemia reperfusion in rats. *Ren Fail.* 2015;37(4):704-708.

[26] KATO A, EDWARDS MJ, LENTSCH AB. Gene deletion of NF-kappa B p50 does not alter the hepatic inflammatory response to ischemia/ reperfusion. *J Hepatol.* 2002;37(1):48-55.

[27] 钟先阳, 罗仁, 成玉斌, 等. 大鼠出血性休克再灌注肾损伤与时间的关系 [J]. *广东医学*, 2003,24(5):469-471.