

· 实验研究 ·

实时剪切波弹性成像评估兔急性肌肉损伤的实验研究

周晓华 王 闯 毛 林 陈少娜 陈 菲 邱少东

摘 要 **目的** 探讨实时剪切波弹性成像在评估兔急性肌肉损伤中的应用价值。**方法** 选用健康成年雄性新西兰大白兔 20 只,将其中 10 只制作成急性肌肉损伤模型(损伤组),另 10 只为其对照(正常组)。应用实时剪切波弹性成像获取正常肌肉及损伤后 12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 及 14 d 的杨氏模量平均值(E_{mean})和最大值(E_{max}),并在各时间点穿刺活检,比较两组上述各指标。**结果** 损伤组损伤区肌肉各时间点 E_{mean} 和 E_{max} 均显著高于正常组的 E_{mean} 和 E_{max} ,差异均有统计学意义($F=10.216, 11.286$, 均 $P=0.000$),且于损伤后第 1 天最高[(45.00±7.45)kPa 和 (59.16±8.08)kPa],之后呈逐渐下降趋势。病理结果提示各时间点炎症细胞浸润程度比较差异有统计学意义($\chi^2=46.588, P=0.000$),以损伤后第 1 天炎症细胞浸润程度最高,之后逐渐减少。**结论** 实时剪切波弹性成像能很好地观察兔急性肌肉损伤和修复的变化,有望为临床评估肌肉损伤提供可靠的依据。

关键词 超声检查;弹性成像;肌肉损伤,急性;炎症;兔

[中图分类号] R-33;R445.1

[文献标识码] A

Experimental study on evaluation of acute muscle injury in rabbits by real-time ultrasonic shear wave elastography

ZHOU Xiaohua, WANG Chuang, MAO Lin, CHEN Shaona, CHEN Fei, QIU Shaocong

Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

ABSTRACT **Objective** To explore the application value of real-time ultrasonic shear wave elastography in evaluating acute muscle injury in rabbits. **Methods** Twenty healthy adult male New Zealand rabbits were randomly divided into normal group and injury group with 10 in each group. The ones in injury group were made into acute muscle contusion model. Real-time ultrasonic shear wave elastography was performed on each rabbit. The mean values(E_{max}) and the max values(E_{mean}) of Young's modulus were obtained from normal muscles and injured muscles at 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d after contusion. Then the biopsy samples at different time point were taken for pathological observation. **Results** E_{mean} and E_{max} of Young's modulus after injury at different time were significantly higher than those in normal group ($F=10.216, 11.286$, both $P=0.000$). E_{mean} and E_{max} were highest at 1 d after injury [(45.00±7.45)kPa and (59.16±8.08)kPa], then showed a gradual decrease. Pathological findings showed that there were significant differences in the infiltration degree of inflammatory cell at different time points ($\chi^2=46.588, P=0.000$), and the infiltration degree of inflammatory cell was most significant at 1 d after injury, then gradually decreased. **Conclusion** Real-time ultrasonic shear wave elastography can well observe the changes of muscle damage and muscle healing in acute muscle injury in rabbits. So it can provide a reliable basis for the clinical assessment of muscle injury.

KEY WORDS Ultrasonography; Elastography; Muscle injury, acute; Inflammation; Rabbit

临床上,急性肌肉损伤较为常见,发生率约 10%~55%,其中以钝挫伤和牵拉伤最为常见^[1]。目前,诊断肌肉损伤的影像学检查方法主要有 MRI 和超声。虽然

MRI 对软组织有良好的分辨能力,但其检查时间长,费用昂贵,不适用于肌肉损伤治疗过程的监测及随访。剪切波弹性成像(shear wave elastography, SWE)技术可

基金项目:广东省省级科技计划项目(2016A020215165)

作者单位:510260 广州市,广州医科大学附属第二医院超声科(周晓华、毛林、陈少娜、陈菲、邱少东);广州增城区人民医院 中山大学附属博济医院普通外科(王闯)

通信作者:邱少东, Email:shaodongqiu@126.com

以直接测量代表组织生物力学特性的杨氏模量值,这对于疾病的诊断具有重要的参考价值。本实验应用 SWE 评估兔急性肌肉损伤程度,旨在探讨超声在肌肉损伤中的应用价值。

材料与方法

一、实验动物及分组

健康成年新西兰大白兔 20 只, 雄性, 体质量 (2.65 ± 0.25) kg, 由广东省医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(Yue)2014-0035。实验操作均经动物伦理委员会审议批准。将 20 只实验兔随机分为正常组和损伤组, 每组各 10 只。正常组作为对照, 损伤组制备成急性肌肉损伤模型。

二、实验仪器及材料

使用法国 Supersonic Imagine AixPlorer 彩色多普勒超声诊断仪, SL15-4 探头, 频率 4~15 MHz; 具备 SWE 功能。95%乙醇、伊红、苏木素、切片石蜡、10%中性福尔马林液(广州维格斯生物科技有限公司)及 3% 戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司), 电动剪毛器(宁波爱克利浦电器有限公司), Max-core 18 G 活检针(美国巴德医疗科技有限公司)。

三、实验方法

1. 建立动物模型: 实验前适应性饲养新西兰大白兔 72 h。参照文献[2-3]制备兔急性肌肉损伤模型。3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘静脉注射行全身麻醉, 用电动剪毛器剪去左后肢兔毛, 将左后肢预打击的部位做好标记并固定, 正上方垂直放置一个内壁光滑的硬塑料管(长 100.0 cm、外径 3.0 cm、内径 2.8 cm), 打击锤(质量 450 g、直径 2.5 cm)经塑料管上口自由落下, 在兔子左后肢肌肉组织较厚处击打 1 次。击打后局部皮肤出现肉眼可见出血点, 皮温升高, 组织肿胀, 说明造模成功。若出现皮肤破裂或骨折者, 予以去除。

2. SWE 检查: 待造模成功后 12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 及 14 d 对两组进行 SWE 检查。将探头置于兔左后肢受损部位, 常规二维超声检查确定损伤区域后, 使探头方向与肌肉长轴平行; 切换至 SWE 程序, 弹性范围设定为 180 kPa, 选择受损肌肉损伤病灶为感兴趣区(ROI), 检查过程中不要施压, 至少静置 3 s 以上, 待图像稳定后停顿, 利用该仪器内置的定量分析系统(Q-Box), 测量 ROI 杨氏模量值。同一 ROI 重复测量 3 次以上, 获得 3 组数据, 每组数据均包括杨氏模量平均值

(E_{mean})、杨氏模量最大值(E_{max}), 取 3 组数据 E_{mean} 和 E_{max} 的均值。

3. 病理学检查: 取材部位均为兔左后肢肌肉, 正常组于实验开始用 18 G 活检针穿刺取材, 损伤组于损伤后 12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 及 14 d 在超声定位下对损伤病灶穿刺活检。组织标本用 10% 中性福尔马林固定后, 常规制成组织切片、HE 染色。200 倍光镜下观察切片病理结构, 400 倍光镜下随机挑选至少 3 个视野拍照, 要求背景一致和组织满屏。应用 Image-pro plus 6.0 分析软件, 在 400 倍视野内对炎症细胞(包括中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞及肥大细胞)进行阴性和阳性评分, 阴性以(-)表示, 阳性按程度以(+~+++++)表示。其中, (-): 炎症细胞 1~5 个; (+): 炎症细胞 6~10 个; (++) : 炎症细胞 11~20 个; (+++) : 炎症细胞 20~30 个; (++++): 炎症细胞 30 个以上。

四、统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 同一时间点不同组别 E_{mean} 和 E_{max} 比较、同一组别不同时间点 E_{mean} 和 E_{max} 比较采用重复测量数据的方差分析。等级资料比较行 Kruskal-Wallis *H* 检验; 两两比较行 Mann-Whitney *U* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

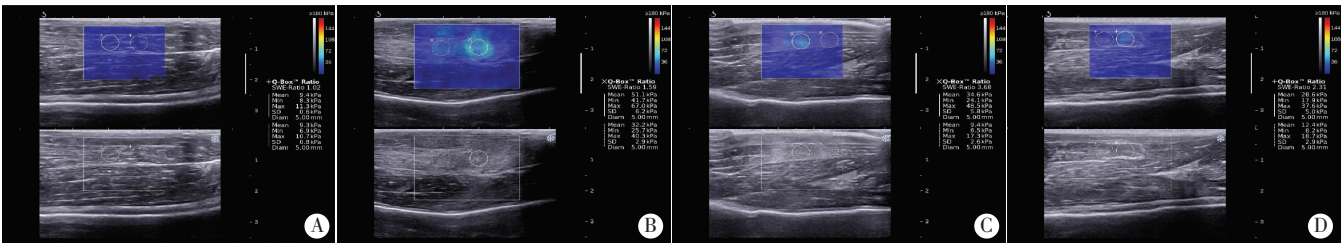
结 果

20 只新西兰大白兔完整采集 SWE 图像, 无脱失, 全部纳入结果分析。

一、两组 SWE 检查结果比较

1. 正常组肌肉 SWE 图像 ROI 内呈均匀一致的蓝色(图 1A), 损伤组 SWE 图像表现为损伤区肌肉呈绿色, 而周围肌肉组织呈蓝色, 提示损伤区域相对较硬(图 1B~D)。

2. 两组各时间点 E_{mean} 和 E_{max} 比较见表 1。重复测量方差分析: 由于 E_{mean} 和 E_{max} 的 Mauchly 球形检验, 结果均不满足球形对称性假设(均 $P < 0.01$), 故采用 Greenhouse-Geisser 校正系数。①组间相同时间点比较: 损伤组 E_{mean} 及 E_{max} 均显著高于正常组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); ②组内不同时间点比较: 时间主效应及交互效应 E_{mean} 和 E_{max} 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。损伤组肌肉损伤区肌肉 E_{mean} 和 E_{max} 均增高, 于损伤后第 1 天最高, 之后呈下降趋势; 正常组各时间点肌肉 E_{mean} 和 E_{max} 变化相对平缓, 差异均无统计学意义。见图 2。



A: 正常组肌肉 SWE 图像, 第 1 天 Emean 和 Emax 分别为 9.4 kPa、9.3 kPa 和 11.3 kPa 和 10.7 kPa; B、C、D 分别为损伤组肌肉损伤后第 1、3、7 天肌肉 SWE 图像, 病灶中央 Emean 分别为 51.1 kPa、34.6 kPa、28.6 kPa, Emax 分别为 67.0 kPa、48.5 kPa、37.6 kPa。

图 1 正常组和损伤组各时间点肌肉 SWE 图像

表 1 正常组和损伤组各时间点肌肉 Emean 和 Emax 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Emean						Emax					
	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
损伤组	30.96±5.25	45.00±7.45	43.15±9.60	41.50±14.11	32.75±9.14	23.51±9.40	42.83±6.23	59.16±8.08	56.28±10.78	54.09±13.85	42.76±9.72	32.80±11.68
正常组	9.82±0.97	10.27±1.02	9.87±0.60	10.44±1.08	10.50±1.19	10.13±1.05	15.91±2.89	16.94±2.13	15.90±1.60	16.08±1.82	16.13±2.16	15.88±1.71
$P_{\text{组间}}(F_{\text{组间}})$			0.000(194.684)						0.000(261.550)			
$P_{\text{时间}}(F_{\text{时间}})$			0.000(10.382)						0.000(12.364)			
$P_{\text{组间}\times\text{时间}}(F_{\text{组间}\times\text{时间}})$			0.000(10.216)						0.000(11.286)			

Emean: 杨氏模量平均值; Emax: 杨氏模量最大值。

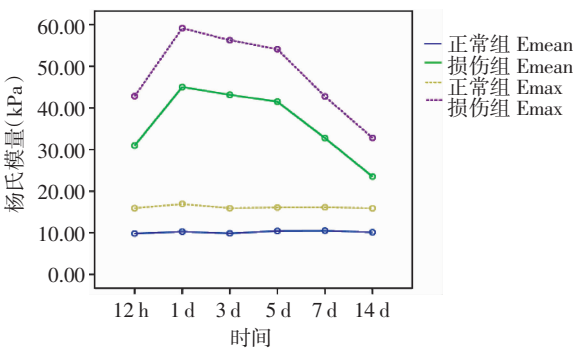


图 2 正常组和损伤组各时间点肌肉 Emean 及 Emax 变化趋势

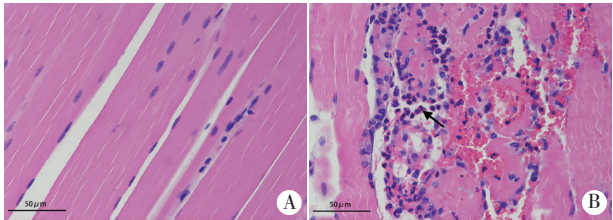
二、两组病理结果比较

正常组和损伤组肌肉损伤后各时间点炎症细胞不同浸润程度情况见表 2。肌肉损伤后, 炎症细胞浸润程度随时间变化表现为先增多, 后减少, 各组炎症细胞浸润程度比较差异有统计意义 ($\chi^2=46.588, P=0.000$); 损伤后各时间点两两比较, 炎症细胞浸润程度增加以损伤后第 1 天最为显著, 其次是损伤后第 3 天, 与其他各时间点比较差异均有统计意义 (均 $P<0.05$); 损伤后 12 h 与 5 d、7 d、14 d 比较差异均无统计意义 ($P=0.301、0.888、0.255$), 损伤后第 5 天炎症细胞程度较第 14 天多, 差异有统计意义 ($P=0.044$), 而与第 7 天比较差异无统计意义 ($P=0.211$); 损伤后第 7 天炎症细胞浸润程度与第 14 天时比较差异无统计意义 ($P=0.276$)。光镜下, 与正常组 (图 3A) 比较, 肌肉损伤 12 h 后可见血管扩张充血, 肌肉组织出血、水肿; 于损伤后第 1 天 (图 3B) 可见大量的炎症细胞浸润, 肌纤维坏死断裂,

随后炎症细胞数量呈下降趋势, 坏死肌纤维被结缔组织取代, 纤维组织增生。

表 2 正常组及损伤组肌肉损伤后各时间点炎症细胞不同浸润程度情况

组别	-	+	++	+++	++++
正常组	10	0	0	0	0
损伤组					
12 h	7	2	1	0	0
1 d	0	1	2	2	5
3 d	0	4	5	1	0
5 d	5	5	3	0	0
7 d	7	3	0	0	0
14 d	9	1	0	0	0



A: 正常组肌纤维结构完整; B: 损伤组肌肉损伤后第 1 天, 肌纤维走形不清, 局部坏死断裂、出血并伴有大量中性粒细胞浸润 (箭头示)。

图 3 两组肌肉组织病理图 (HE 染色, $\times 400$)

讨 论

目前, 应用 SWE 诊断肝脏和乳腺疾病趋于成熟, 且在甲状腺、前列腺及移植肾等方面也有相关研究^[4]。随着 SWE 的广泛应用, 其同样适用于肌肉组织的研

究。Ateş 等^[5]发现肌肉剪切弹性模量与肌肉扭矩在等长收缩强度范围内呈线性相关,能准确测量肌肉收缩时的硬度,且具有可重复性,可用于肌肉疾病的诊断。Lee 等^[6]应用 SWE 评估脑性瘫痪患者的肌肉,发现脑瘫患者的肌肉硬度较大,并认为 SWE 作为一种非侵入性的检查方法,能对肌肉组织的诊断及治疗提供良好的指导方向,进一步肯定 SWE 的临床应用价值。Du 等^[7]研究证实,SWE 能定量评估帕金森患者肱二头肌的硬度。另外,SWE 同样能够有助于肌肉良、恶性肿瘤的鉴别诊断^[8]。由此可见,SWE 对肌肉疾病的诊断具有很大的临床应用价值。

本实验结果表明,损伤组各时间点肌肉损伤区的 Emean 和 Emax 均高于正常组(均 $P < 0.05$),提示受损肌肉与正常肌肉之间存在明显的硬度差,这可能与肌肉受损后局部病理变化有关系。肌肉损伤前,正常肌纤维结构完整,因此正常组肌肉的 Emean 和 Emax 于各时间点的变化相对稳定。当肌肉组织损伤后,由于受到外部机械因素的强烈打击,损伤处会发生炎症反应。于损伤后 12 h,肌肉损伤区杨氏模量值增高,本实验的病理结果表现为损伤区血管扩张充血,肌组织出血、肿胀,伴有少量炎症细胞浸润,提示受损组织发生水肿及炎性渗出。随着炎症的进展,炎症细胞渗出增多,以损伤后第 1 天炎症细胞浸润程度最为显著,本实验所测的第 1 天损伤区肌肉 Emean 和 Emax 最高,且与其他各时间点比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。另一方面,由于炎症细胞所释放的氧自由基、溶酶体酶及细胞因子等成分均可进一步加重肌肉组织和肌细胞的损伤,表现为变性、坏死、断裂及溶解消失,因此这可能是第 3 天 Emean 和 Emax 维持较高的主要原因。肌肉损伤后,其愈合基本过程包括损伤期、修复期及重塑期^[9-10]。损伤期一般发生在肌肉损伤后前 3 天,修复期一般发生在损伤后 4~5 d^[10]。此时,在第 5 天的病理结果可见炎症细胞浸润逐渐减少,随着组织逐渐修复,损伤区肌肉 Emean 和 Emax 较第 1 天呈逐渐下降趋势。本实验观察时间点到第 14 天为终止点,第 14 天时的病理结果主要表现为纤维组织增生,提示肌肉组织仍未完全修复,肌肉损伤后的整个愈合过程需要 4 周甚至更长时间。因此在第 14 天肌肉损伤区 Emean 和 Emax 虽较前有所下降,但仍高于正常组,且差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

本实验仍有不足之处,采用的实验动物为新西兰大白兔,其肌肉损伤的自然修复过程可能与人类存在一定差异,有待于在人体肌肉组织进行研究;同时,受制于目前的技术,SWE 暂时无法测量位于较深位置的组织硬度(自皮肤开始深度 > 9 cm)。

综上所述,兔急性肌肉损伤后不同观察时间段的杨氏模量值与肌肉损伤的病理演变过程及发展基本符合,而且符合一定的变化规律,即在肌肉组织的损伤阶段杨氏模量值呈升高趋势;随着肌肉的自我修复,杨氏模量值呈下降趋势。SWE 作为一种新的辅助检查手段,可监测兔急性肌肉损伤和修复的变化,为临床评估肌肉损伤提供可靠的依据,具有一定的应用价值。

参考文献

- [1] Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, et al. Muscle injuries: optimising recovery[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2007, 21(2): 317-331.
- [2] Liu S, Wang R, Luo D, et al. Effects of electroacupuncture on recovery of the electrophysiological properties of the rabbit gastrocnemius after contusion: an in vivo animal study[J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15(1): 69.
- [3] Souza Jd, Gottfried C. Muscle injury: review of experimental models [J]. J Electromyogr Kinesiol, 2013, 23(6): 1253-1260.
- [4] Franckenberg S, Gubler C, Frauenfelder T, et al. Radiology update ultrasound elastography quintessence for the primary care physician [J]. Praxis, 2016, 105(3): 139-145.
- [5] Ateş F, Hug F, Bouillard K, et al. Muscle shear elastic modulus is linearly related to muscle torque over the entire range of isometric contraction intensity[J]. J Electromyogr Kinesiol, 2015, 25(4): 703-708.
- [6] Lee SS, Gaebler-Spira D, Zhang LQ, et al. Use of shear wave ultrasound elastography to quantify muscle properties in cerebral palsy [J]. Clin Biomech, 2015, 31(1): 20-28.
- [7] Du LJ, He W, Cheng LG, et al. Ultrasound shear wave elastography in assessment of muscle stiffness in patients with Parkinson's disease: a primary observation [J]. Clin Imaging, 2016, 40(6): 1075-1080.
- [8] Pass B, Johnson M, Hensor EM, et al. Sonoelastography of musculoskeletal soft tissue masses: a pilot study of quantitative evaluation[J]. J Ultrasound Med, 2016, 35(10): 2209-2216.
- [9] Järvinen TA, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury[J]. Muscles Ligaments Tendons J, 2014, 3(4): 337-345.
- [10] Laumonier T, Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair[J]. J Exp Orthop, 2016, 3(1): 15.

(收稿日期: 2017-09-11)