

超声不同指标评估肺高压大鼠肺动脉压力的实验研究

俞春芳 祝玉玲 杨 军 孙 青 黄瑜琳 李冰冰

摘要 目的 评价 4 种超声不同指标预测肺高压大鼠肺动脉压力的准确性。方法 选取 8 周龄雄性大鼠 41 只,分为对照组 11 只和野百合碱组 30 只(MCT 组),应用脉冲多普勒测定两组大鼠肺动脉血流加速时间(PAAT)、肺动脉射血时间(PET)及三尖瓣反流峰值流速(TR peak)。受试者工作特征(ROC)曲线分析 PAAT、PAAT/PET、PAAT 与心率比值(PAAT/HR)及 TR peak 预测大鼠肺动脉压力的诊断效能。结果 两组大鼠 PAAT、PAAT/PET、PAAT/HR 及 TR peak 比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示以 PAAT/PET 为 0.381 为截断值,其评估肺动脉压力的敏感性 81.8%,特异性 90.0%,准确率 71.8%,明显高于 PAAT 和 PAAT/HR 的诊断效能。结论 应用多普勒超声评估大鼠肺动脉压力时,PAAT/PET 的预测准确性更高,可为无创诊断大鼠肺动脉高压提供新的手段。

关键词 肺动脉高压;多普勒超声;大鼠

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Experimental study of different ultrasonic modalities in evaluation of pulmonary arterial pressure in rats with pulmonary arterial hypertension

YU Chunfang, ZHU Yuling, YANG Jun, SUN Qing, HUANG Yulin, LI Bingbing

Department of Anesthesiology, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing Medical University School, Nanjing 210008, China

ABSTRACT Objective To evaluate the accuracy in estimating pulmonary arterial pressure(PAP) with four ultrasonic Doppler modalities in rats with pulmonary artery hypertension. **Methods** A total of 41 male rats at the age of 8 weeks were divided into control group($n=11$) and monocrotaline group(MCT group, $n=30$). 4 weeks after treatment, the pulmonary arterial acceleration time(PAAT), pulmonary arterial ejection time(PET) and tricuspid regurgitation peak flow velocity(TR peak) were measured by pulse Doppler. The diagnostic efficiency of PAAT, PAAT/PET, ratio of PAAT and heart rate(PAAT/HR) and TR peak in assessing PAP in rats were analyzed by ROC curve. **Results** There were significant differences of PAAT, PAAT/PET, PAAT/HR and TR peak between two groups (all $P < 0.05$). ROC curve showed that PAAT/PET had the highest diagnostic value and its cut off value of 0.381 had 81.8%, 90.0% and 71.8% in sensitivity, specificity and accuracy respectively on estimating PAP. **Conclusion** PAAT/PET is more reliable in assessing PAP in rats, which provides a new method for noninvasive diagnosis of pulmonary hypertension in rats.

KEY WORDS Pulmonary artery hypertension; Doppler ultrasound; Rat

应用野百合碱建立大鼠肺动脉高压模型已广泛应用于肺高压机制的研究和药物疗效评价^[1],常需测定大鼠肺动脉压力的变化,而右心导管技术测量方法创

伤性大,操作过程复杂,故受到限制。此外,临床上应用多普勒超声测定三尖瓣反流峰值流速(tricuspid regurgitation peak flow velocity, TR peak)可间接评估肺

基金项目:国家自然科学基金项目(81470242);江苏省六大人才高峰项目(WSN-147);南京市青年卫生人才项目(QRX17013)

作者单位:210008 南京市,南京医科大学附属鼓楼临床学院麻醉科(俞春芳、李冰冰);南京大学医学院附属鼓楼医院麻醉科(祝玉玲、孙青、黄瑜琳),病理科(杨军)

通讯作者:李冰冰,Email:icecolor@163.com

动脉收缩压力水平。动物实验^[2]显示,可采用 TR peak、肺动脉血流加速时间(pulmonary arterial acceleration time, PAAT)及肺动脉射血时间(pulmonary arterial ejection time, PET)等超声指标评估大鼠肺动脉压力,但相关性和准确性尚不明确。本实验以肺动脉直接测压值为金标准,旨在评估 PAAT、PAAT/PET、PAAT 与心率比值(PAAT/HR)及 TR peak 预测肺高压大鼠肺动脉压力的诊断效能。

材料与方法

一、实验动物

41 只健康雄性 SD 大鼠(南京医科大学动物实验中心提供),8 周龄,体质量 220~250 g。所有动物均在 SPF 级条件下饲养。

二、仪器与试剂

1.仪器:Vevo 2100 彩色多普勒超声诊断仪(加拿大 Visual Sonics 公司),MS-250 心脏探头(频率 21 MHz,扫描速度 1000 Hz),小动物呼吸机(江西特力公司),压力换能器(Philips,荷兰),生命监护仪(Philips Intelli Vue MP2,荷兰),留置针(BRAUN,马来西亚),光学显微镜(配备 Image-Pro Plus 6.0 测量软件)。

2.试剂:野百合碱(美国 Sigma 公司),二甲基亚酚(美国 Sigma 公司),肝素钠注射液(常州千红生化制药股份有限公司),戊巴比妥(上海生物化学制药厂),10% 中性甲醛溶液(江西南昌雨露实验器材有限公司),生理盐水(安徽双鹤药业有限责任公司)。

三、实验方法

1.实验动物分组及模型制备:41 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组 11 只和野百合碱组 30 只(MCT 组)。MCT 组大鼠皮下注射 60 mg/kg 野百合碱;对照组大鼠皮下注射等容量的二甲基亚酚。

2.超声指标测量方法:大鼠皮下注射药物 4 周后,经戊巴比妥那(50 mg/kg)麻醉,胸前脱毛,取仰卧位固定,应用二维超声于大动脉水平短轴切面测量大鼠右室舒张期前壁厚度;心尖四腔水平测量舒张末期和收缩末期容积,计算左室射血分数(LVEF);四腔心切面测量 TR peak;应用脉冲多普勒于大动脉短轴切面在肺动脉内取样,获得肺动脉收缩期血流频谱后测定 PAAT 和 PET,并计算 PAAT/HR 和 PAAT/PET。

3.肺动脉压力测量方法:大鼠麻醉后,平卧并固定于鼠板上,直视下气管内插入 16 号静脉穿刺针外套管,接小动物呼吸机行机械通气(潮气量 8 ml/kg,频率 60 次/min,吸呼比 1:1),经左侧心尖搏动最强处打开胸

腔,游离心包,24 号留置针经右室流出道穿刺置管于肺动脉主干处,并连接预冲肝素生理盐水的压力换能器,当生命监护仪出现典型的肺动脉压力波形后稳定 1 min,记录此时数值。当 MCT 组平均肺动脉压力 ≥ 25 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)时诊断为肺动脉高压。

4.肺组织固定及形态学测定:动物处死后,用生理盐水冲洗肺血管中红细胞,直至流出血液变透明。经气管导管灌注 10% 的中性甲醛致肺组织均匀膨胀,5 min 后取右下肺组织放入 10% 中性甲醛溶液中固定,经常规石蜡包埋切片后行 HE 染色,光学显微镜下观察肺血管组织的病理学变化。肺小动脉血管中膜厚度百分比(WT%)测定:随机选取肺小动脉(直径 50~100 μ m) 20 根,测量最长血管外径即外弹力板之间的厚度(ED)和血管中膜直径即内外弹力板之间的厚度(MT),计算 $WT\%=(2MT \div ED) \times 100\%$ 。

四、统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行独立样本 *t* 检验;相关性分析采用 Pearson 相关分析法和线性回归分析;绘制受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线,分析各超声指标预测大鼠肺动脉高压的诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、两组平均肺动脉压力、各超声指标测值及 WT% 比较

MCT 组平均肺动脉压力显著高于对照组(均 $P < 0.01$);两组大鼠 PAAT、PAAT/PET、PAAT/HR 及 TR peak 比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);MCT 组 WT% 为 0.764 ± 0.086 ,对照组 WT% 为 0.225 ± 0.067 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1 和图 1~3。

二、各超声指标与肺动脉压力的相关性分析

PAAT、PAAT/PET、PAAT/HR 及 TR peak 与肺动脉压力的相关系数分别为 0.469、0.490、0.267 及 0.173(均 $P < 0.05$)。见图 4~6。预测平均肺动脉压力的直线回归方程:平均肺动脉压力 = $150 \times (\text{PAAT/PET}) \pm 12.5$ 。

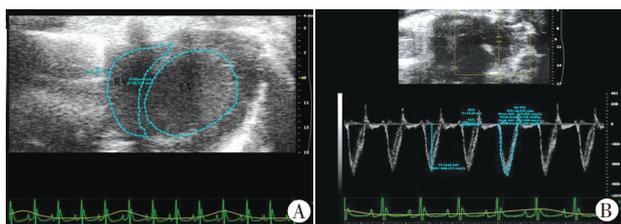
三、各超声指标预测大鼠肺动脉压力的 ROC 曲线

PAAT、PAAT/PET 及 PAAT/HR 预测大鼠肺动脉压力的 ROC 曲线下面积分别为 0.873、0.894 及 0.718,敏感性分别为 100%、81.8% 及 90.9%,特异性分别为 63.3%、90.0% 及 56.7%,准确率分别为 63.3%、71.8% 及 47.6%。见图 7。

表 1 两组大鼠 PAP、超声指标值的比较($\bar{x}\pm s$)

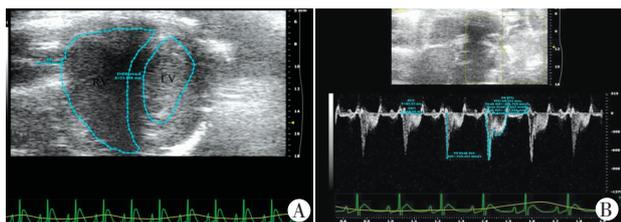
组别	PAP(mm Hg)	RVAWd(mm)	PAAT(s)	PAAT/PET	PAAT/HR	PET(s)	LV Vol d (ml)	LV Vol s(ml)	LVEF(%)	HR(次/min)
对照组	22.18±1.78	0.712±0.097	30.85±3.82	0.410±0.066	0.094±0.020	76.47±11.22	283.31±104.89	89.44±45.70	69.47±1.02	335.09±45.62
MCT 组	34.67±9.43	0.879±0.172	23.44±5.32	0.286±0.075	0.077±0.022	82.77±7.80	311.40±131.16	97.53±59.04	71.13±8.98	312.30±39.61
t 值	-6.920	-3.900	4.220	4.810	2.300	-2.030	-0.638	-0.410	-0.507	1.570
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.049	0.527	0.684	0.615	0.125

PAP:肺动脉压力;RVAWd:右室舒张期前壁厚度;PAAT:肺动脉血流加速时间;PET:肺动脉射血时间;LV Vol d:左室舒张期容积;LV Vol s:左室收缩期容积;LVEF:左室射血分数;HR:心率。1 mm Hg=0.133 kPa。



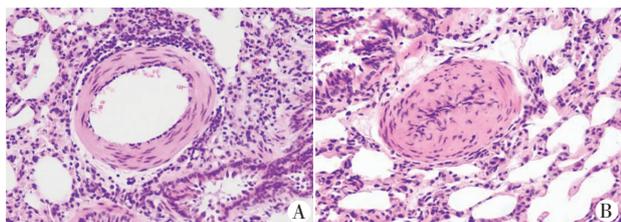
A:左、右心室超声图像;B:PAAT 和 PET 超声图像。

图 1 对照组大鼠超声图像



A:左、右心室超声图像;B:PAAT 和 PET 超声图像。

图 2 MCT 组大鼠超声图像



A:对照组;B:MCT组。

图 3 两组大鼠肺小动脉的病理图(HE 染色,×400)

讨论

肺动脉高压是由多种因素造成的肺血管收缩,原性血栓形成,肺血管重构的血管性病变起病隐匿,最终

可造成患者严重的右心功能不全,甚至猝死^[3]。野百合碱大鼠肺动脉高压模型是目前最常用于该疾病发病机制研究和药物疗效评价的动物模型^[4],该实验需采用右心导管技术测定大鼠肺动脉压力,但该技术创伤大,检测后实验动物存活率低,不利于后续观察。多普勒超声是评价肺动脉高压和右室功能最常用的无创方法,具有简便、快捷及重复性好等优势。早在 1984 年 Yock 等^[5]就应用三尖瓣反流速度测算的压力差作为无创评估肺动脉压力的方法。但近来有研究^[6]发现采用上述方法检测约有 50%的患者存在高估或低估肺动脉压力的问题,因此,新的评估肺动脉压力的方法和参数在临床被逐渐应用。本实验应用不同超声指标预测肺高压大鼠肺动脉压力的准确性,结果表明 MCT 处理 4 周后,大鼠肺动脉压力显著升高,并伴有右室肥厚和肺血管中膜增厚。与 TR peak 比较,PAAT/PET 和 PAAT 更能准确预测大鼠肺动脉压力;ROC 曲线分析显示 PAAT/PET 的诊断价值最高,以 0.381 为截断值,其预测大鼠肺动脉高压的敏感性 81.8%,特异性 90.0%,准确率 71.8%,曲线下面积为 0.894。

本实验结果显示,TR peak 与肺动脉压力的相关性最差,其原因可能与三尖瓣反流束与多普勒取样线不能保证平行及大鼠表现为轻、中度肺动脉高压有关。既往研究^[7]表明两者之间的夹角达 10°时,血流速度会被低估 1.5%,本实验中有 23 只大鼠存在明显反流,反流量少可导致反流频谱轮廓欠清晰完整,造成检查结果不准确。Jones 等^[8]研究显示,当 TR peak<3 m/s 时与

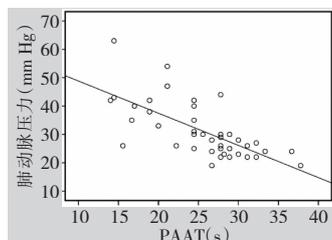


图 4 PAAT 与肺动脉压力相关性分析的散点图

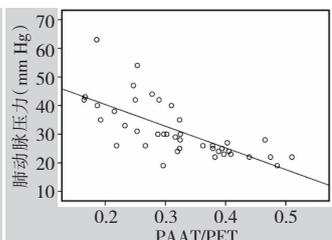


图 5 PAAT/PET 与肺动脉压力相关性分析的散点图

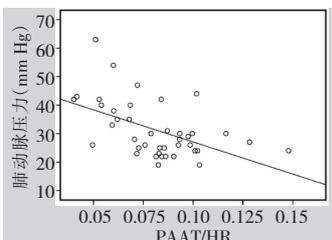


图 6 PAAT/HR 与肺动脉压力相关性分析的散点图

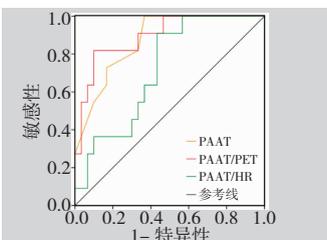


图 7 各超声指标预测大鼠肺动脉压力的 ROC 曲线图

肺动脉压力相关性差。Ishikura 等^[9]研究指出 MCT $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 连续注射 15 d, 大鼠可出现严重肺动脉高压, TR peak 与直接测量的右心室压相关系数达 0.94。在本实验条件下, 大鼠肺动脉压力仅能达到此水平, 今后需在更严重的肺动脉高压模型中探讨, 随着压力进一步升高, 不排除 PAAT 下降, PET/PAAT 升高的可能。此外, 通过 TR peak 估算肺动脉收缩压时, 还需估测右房压力, 以上因素均可导致 TR peak 在预测肺动脉压力准确性方面有一定的局限性^[10]。

正常肺动脉血流频谱呈圆顶状, 加速和减速较缓慢, 当肺动脉压力升高时, 肺动脉血流频谱呈先尖峰后圆顶的形态, PAAT 与肺血流量和肺血管顺应性均呈负相关, 有研究^[11]采用 PAAT > 120 ms 预测肺动脉高压, 具有较高的敏感性和特异性。本实验结果表明, MCT 组大鼠的 PAAT 为 $(23.44 \pm 5.32) \text{ s}$, 远低于人类的 120 s, 这可能与大鼠心率快, 心动周期明显缩短有关。为消除心动周期对 PAAT 的影响, 有学者^[12]采用 PAAT/HR 来评估肺动脉压力, 发现具有较好的相关性, 但本实验结果发现 PAAT/HR 并不能进一步提高 PAAT 与肺动脉压力的相关性。冷晓萍和田家玮^[13]研究表明, PAAT/PET 不能准确评估患者肺动脉压力, 推测在肺动脉压力升高时导致右室射血受阻, PET 也会同步缩短。不同于其研究, 本实验结果发现, 肺动脉高压大鼠 PET 相对于正常大鼠有所延长 ($P < 0.05$), 与肺动脉压力相关性也不高。但 PAAT/PET 与肺动脉压力相关性最佳, 对肺动脉高压的诊断敏感性和特异性最高。分析原因可能为: 本实验中肺动脉高压大鼠的肺血流频谱呈特征性的先尖峰后圆顶的改变, 肺血管阻力增加缩短了 PAAT, 而 PET 延长, 表现为 PAAT/PET 显著下降。

综上所述, 本实验结果表明, 在 MCT 大鼠肺动脉高压模型中, 采用 PAAT/PET 能更准确地预测大鼠肺动脉压力, 并确定 PAAT/PET 评价肺动脉高压的截断值, 为无创诊断大鼠肺动脉高压提供了新的方法。

参考文献

- [1] 李波, 何巍. 肺动脉高压动物模型的理论研究及其制备特点[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 5(11): 2039-2042.
- [2] Cottrill CM, Johnson GL, Gillespie MN. Echocardiographic detection of pulmonary hypertension in anesthetized rats[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1988, 60(2): 189-196.
- [3] 王士锋, 郑华萍, 丁小莉. 超声心动图评估新生儿肺炎肺动脉压力的临床价值[J]. 临床超声医学杂志, 2016, 13(7): 470-473.
- [4] Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(4): 363-369.
- [5] Yock PG, Popp RL. Noninvasive estimation of right ventricular systolic pressure by Doppler ultrasound in patients with tricuspid regurgitation[J]. Circulation, 1984, 70(4): 657-662.
- [6] Methia N, Latreche S, Ait Mokhtar O, et al. Assessment for pulmonary artery hypertension using clinical and echocardiographic criteria in patients with systemic sclerosis[J]. Am J Med Sci, 2016, 352(4): 343-347.
- [7] Li XY, Li Z, Feng F, et al. Correlation between severity of adolescent idiopathic scoliosis and pulmonary artery systolic pressure: a study of 338 patients[J]. Eur Spine J, 2016, 25(10): 3180-3185.
- [8] Jones JE, Mendes L, Russo G, et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(1): 364-371.
- [9] Ishikura F, Azakami R, Asanuma T, et al. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension with sufficient tricuspid regurgitation in a rat model[J]. J Med Ultrason (2001), 2012, 39(4): 221-226.
- [10] 魏丽群, 李越, 王广义. 超声心动图无创性评估肺血管阻力[J]. 中国医学影像学杂志, 2014, 9(4): 272-277.
- [11] Dabestani A, Mahan G, Gardin JM, et al. Evaluation of pulmonary artery pressure and resistance by pulsed Doppler echocardiography[J]. Am J Cardiol, 1987, 59(6): 662-668.
- [12] Levy PT, Patel MD, Groh G, et al. Pulmonary artery acceleration time provides a reliable estimate of invasive pulmonary hemodynamics in children[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2016, 29(11): 1056-1065.
- [13] 冷晓萍, 田家玮. 超声多普勒无创性估测肺动脉压力的方法[J]. 中国医学影像技术, 2001, 9(3): 277-279.

(收稿日期: 2018-03-07)

《临床超声医学杂志》征订启事

《临床超声医学杂志》是经国家科委批准, 集超声影像诊断、治疗、工程及基础研究为一体的科技刊物。国内外公开发行, 月刊。为“中国科技论文统计源期刊”、“中国科技核心期刊”。设有临床研究、实验研究、综述、经验交流、临床报道、病例报道、述评、专家讲座、工程技术及译文等栏目。以各级超声医学工作者、相关临床专业医师及医学院校师生为主要读者对象。

本刊刊号: ISSN 1008-6978; CN 50-1116/R; 邮发代号 78-116。

每期定价: 16 元, 全年 192 元(含邮寄费)。请到全国各地邮局订阅, 也可直接向本刊编辑部订阅。

地址: 重庆市渝中区临江路 74 号, 重庆医科大学附属第二医院内, 临床超声医学杂志编辑部。邮编: 400010

电话: 023-63811304 023-63693117 Email: lccscq@vip.163.com