

超声生物显微镜在心血管疾病研究中的应用进展

范 凡(综述) 卜丽萍^Δ(审校)

(复旦大学附属中山医院心内科-上海市心血管病研究所 上海 200032)

【摘要】 超声生物显微镜(ultrasound biomicroscopy, UBM)作为近年新兴的活体成像技术,已成功用于观察各种小动物模型及人类浅表组织。在心血管疾病研究领域,该技术显现出独特优势,如非侵入性、观察连续性、高分辨率、实时性、价格优势等,使充分利用模型动物进行实时连续心血管形态功能分析成为可能。本文对 UBM 的特点进行介绍,并就其在动脉粥样斑块、心肌梗死、心力衰竭、心肌病、瓣膜病、心脏发育和引导穿刺等方面的应用进行综述。

【关键词】 超声生物显微镜; 心血管疾病; 疾病模型; 小鼠

【中图分类号】 R 540.4⁺5 **【文献标志码】** B **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2011.02.017

The advance in the application of ultrasound biomicroscopy in cardiovascular research

FAN Fan, BU Li-ping^Δ

(Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases-Department of Cardiology,
Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Ultrasound biomicroscopy (UBM) is an innovative technique of living tissues imaging, which has been used in visualization of small-animal models and superficial human tissues. When applying in cardiovascular researches, its unique advantages, such as noninvasive, quick and real-time imaging, high-resolution and low cost, increase the possibility of obtaining the structural, functional, and hemodynamic information consecutively from animal models substantially. This review describes the characters of ultrasound biomicroscopy and highlights its current medical applications in atherosclerosis, myocardial infarction, heart failure, cardiomyopathy, valve disease, embryonic heart development and ultrasound guided injection.

【Key words】 ultrasound biomicroscopy; cardiovascular disease; disease model; mice

心脏病严重危害人类健康,也是引起死亡的重要原因之一,如何从疾病发生发展研究其特点一直是心血管病研究中的难题。建立小鼠心血管疾病模型被认为是有力的研究手段,在发病机制、疾病进展及治疗等方面占有举足轻重的地位。及时可靠地分析模型小鼠心血管形态和功能在研究过程中显得尤为重要^[1],但是由于小鼠心脏过小、心率过快,传统方法如 15 MHz 左右的普通超声、MRI 和 CT 等都不能很好地满足研究需要。随着科学技术的进步,

超声生物显微镜(ultrasound biomicroscopy, UBM)的出现给这方面的研究带来了曙光,并已经成功应用在各种小鼠模型的心血管研究中。UBM 具有诸多优点,如非侵入性、观察连续性、高分辨率、实时性、廉价等,从而使更加精确及时的心血管形态成像和功能分析成为可能,本文就其小鼠心血管研究中的应用综述如下。

UBM 的特点 UBM 的频率一般为 20~60 MHz,由实时影像系统主机、小鼠手术台、气体麻醉系统和

^ΔCorresponding author E-mail: bu.liping@zs-hospital.sh.cn

不同型号的高频率超声探头组成。UBM可以对小鼠及其他种类小动物进行实时二维超声图像采集和测量、心电图采集、多普勒血流速度测量、心脏M型超声检测、解剖型心动周期重建及心功能分析等,同时还可进行超声实时定位引导注射和胚胎研究微玻璃管注射。UBM的优势和特点体现在:(1)能够提供高清晰超声图像,分辨率达 $100\sim 30\mu\text{m}^{[2]}$,图像与组织切片具有高度相关性;(2)对实验动物生理过程和病理变化进行实时监测,易于得到连续完整的实验数据;(3)具有非侵入性,实验动物易耐受,对其生理状态影响小,可减少由于应激反应引发的数据波动,符合动物实验伦理要求;(4)具有价格优势,使用方便,与T和MR相比无辐射和污染。

UBM在冠状动脉斑块发生发展中的应用 冠状动脉内斑块的形态学研究一向是心血管领域临床及科研工作的重点。这类研究通常应用侵入性的方法,如血管造影,近年来CT和MRI冠脉成像等技术的发展使非侵入性冠脉内斑块研究成为可能。作为新兴非侵入性技术之一的UBM能够很好显示小鼠微小的冠脉病变并克服小鼠过快心率的影响,其优越性及实用性已得到认可。

Zhou等^[3]在2004年利用UBM(30 MHz)对正常小鼠心脏结构进行成像,其中包括对左冠状动脉(Left coronary artery, LCA)的成像,并与3-D MRI所示解剖结构进行对比,证实UBM在正常冠脉成像上的可靠性。Wikström等^[4]在研究中应用UBM(40 MHz)对LDL受体基因敲除小鼠LCA近段进行形态学成像,不仅能够清晰显示LCA近段管腔狭窄,并测量到最小管腔直径(minimum diameter of lumen, MDL);同时应用多普勒超声心动测量LCA的冠脉流速储备(coronary flow velocity reserve, CFVR),证明CFVR与MDL具有很好的相关性。Wikström等^[5]采用相同的技术评价ApoE/LDL受体双基因敲除小鼠LCA斑块的发生、发展和管腔内血流动力学状况。UBM测量LCA近段最小管腔的内径和外径,并计算小鼠冠状动脉管壁(wall thickness, WT)厚度(外径-内径)和管壁厚度百分率(percentage wall thickness, PWT),PWT的计算方法为(外径-内径)/外径 $\times 100\%$ 。研究证明PWT随年龄增长而显著增加,10周龄时为 $36.6\% \pm 3.6\%$,40周龄时为 $47.6\% \pm 2.5\%$,80周龄时为 $64.7\% \pm 2.1\%$,WT与组织切片观察结果有较好的相关性。同时利用CDE测量LCA近段流速,证实UBM测量的PWT和CDE测量的近段流速之间有较好的相关性。

以上研究证明UBM能够清晰显示冠脉形态,

定量测量小鼠冠脉病变,并能够连续监测病变发生、发展及变化,是研究小鼠冠心病模型的良好方法。

UMB在大动脉斑块发生发展中的应用 UBM对血管成像技术及对斑块病变过程的跟踪观察已经广泛应用于大动脉,如主动脉和颈动脉。ApoE/LDL受体双基因敲除小鼠动脉斑块多发生在主动脉根部和升主动脉,UBM可用来监测此部位病变的进程,观察斑块面积和斑块负荷的关系,测量动脉内膜中层厚度。

Gan等^[6]应用UBM(40 MHz)测量不同年龄ApoE/LDL受体双基因敲除小鼠升主动脉内膜中层厚度(intima-media thickness, IMT)及斑块面积,研究显示在主动脉弓无名动脉分支前水平的斑块面积和斑块总负荷高度相关;UBM测量的斑块厚度和面积与组织学结果有较好的相关性;16只32~35周龄小鼠升主动脉IMT每周都有显著增长,32周龄时为 $(0.106 \pm 0.108)\text{mm}$,35周龄时增长到 $(0.256 \pm 0.345)\text{mm}$ 。杨娅等^[7]观察32只健康小鼠的主动脉及其分支结构,测量升主动脉IMT,并与病理结果进行对照比较。UBM成像测量值与病理测量值有较好的相关性,UBM成像能清晰显示正常小鼠主动脉切面并测量升主动脉IMT,为进一步研究动脉粥样硬化小鼠模型奠定了基础。在颈动脉应用方面,Ni等^[8]对ApoE基因敲除小鼠颈动脉进行UBM成像,测量了动脉IMT,偏心指数(eccentricity index, EI),重塑指数(remoulding index, RI)和最大血流速度(Vmax)。结果显示,各项指标与组织学数据有良好相关性;与非破裂斑块相比,IMT、EI、RI和Vmax在破裂斑块处更高;IMT和Vmax可以独立预测斑块的破裂。

由此认为,UBM为非侵入性定量分析大动脉斑块提供了可靠方法。

UMB监测小鼠心肌梗死后左室功能 研究者们多通过对小鼠实施冠状动脉结扎手术来建立急性心肌梗死模型,而UBM可用来对术后小鼠左室形态及功能进行连续观察,进而评价梗死后心功能变化。

Zhou等^[3]展示了清晰的正常左右心室形态影像,与MRI显示的解剖结构吻合良好,证实UBM在快心率条件下心室成像的可靠性。Okajima等^[9]采用UMB(30 MHz)评价了20例LCA结扎术后小鼠的左室功能,包括局部室壁运动(wall motion, RWM)、左室收缩末容积(left ventricular end-diastolic dimension),短轴缩短率(fractional shortening)、左室前壁厚度(anterior left ventricular wall thickness)、E/A和心肌工作能力指数(myocardial performance index),并与传

统超声(13 MHz)进行比较。结果显示,UBM 观察数据的稳定性明显高于传统超声,对所监测的各项指标梗死前后的变化也更加敏感。Novan-Ashraf 等^[10]在探索 GLP-1 促进心肌梗死后心功能恢复机制的研究中成功应用 UBM 对结扎术后 28 天的小鼠进行左室收缩和舒张功能的评价,研究显示 GLP-1 受体激动剂可以改善梗死后小鼠的心功能。

小鼠模型的应用能够在短期内连续监测心梗后心血管系统的病理生理学变化,而这一变化过程在人体中可长达数月,所以相对较短的实验周期为科学研究带来了便利。UBM 在小鼠模型中的应用实现了连续实时观察病变情况,能够及时获得有效信息,并使小鼠模型在研究中得到更充分的利用。

UMB 在心力衰竭及心肌病中的应用 UBM 观察左心功能变化同样适用于心衰和心肌病的研究。Zhou 等^[11]对 Holt-Oram 综合症模型小鼠($Tbx5^{del/+}$ 小鼠)的研究中利用 UBM 对小鼠左右心腔同时成像并分析功能。研究显示, $Tbx5^{del/+}$ 小鼠二尖瓣血流参数有明显改变,包括 E 峰下降,A 峰上升,E/A 值下降或倒置。1 周龄 $Tbx5^{del/+}$ 小鼠就可监测到左室等容舒张期延长;左室壁厚度正常,但左室容积明显减少;左室收缩功能正常;三尖瓣处 E 峰 A 峰均上升但 E/A 值无改变。研究证明, $Tbx5$ 基因在心室肌中的表达水平与左室充盈参数有相关性, $Tbx5^{del/+}$ 小鼠舒张功能显著恶化而收缩功能并未受损。Du 等^[12]研究了限制性心肌病模型小鼠($cTnI^{193His}$ 小鼠),利用 UBM 对其进行 12 个月的连续观察,得到从心肌松弛异常到舒张功能不全再到充血性心力衰竭的一系列数据,其中包括 E/A 值倒置、减速时间延长、等容舒张期延长、心输出量下降;并证明了心肌钙蛋白 I($cTnI$)羧基末端区域在心肌舒张功能中起关键作用。

以上研究显示 UBM 在心室功能异常特别是左室功能异常监测中的实用性,并突出其在观察舒张功能不全这一重要病理生理过程中的作用。Rottman 等^[13]曾对 UBM 在此领域的应用进行总结,与 PET 和 MRI 进行比较,UBM 的连续性、简便性和价格优势使其在研究工作中的应用更加广泛。

UMB 对瓣膜的成像 Hinton 等^[14]利用 UBM 观察小鼠的正常瓣膜,小鼠的年龄跨度为 18.5 天(胚胎)至 16 个月(老年),并建立小鼠各个瓣膜在形态和功能上的 UBM 标准,从而证实超声影像与组织切片有良好的相关性,为后续的瓣膜疾病研究提供了参照。该研究认为,UBM 能够对小鼠瓣膜清晰成像,是一种观察小鼠瓣膜病变的良好方法,能够为病变定位、发生和发展提供有效信息。

UMB 在胚胎心脏发育中的应用 Srinivasan 等^[15]首次报道应用高频超声(40 MHz)观察子宫内胚胎小鼠的心血管发育,显示了 9.5 天胚胎的心房和心室,连续监测 10.5~13.5 天胚胎的心脏形态和大小变化,并观察基因突变胚胎小鼠的心脏形态。Zhou 等^[16]对 14.5 天和 17.5 天的胚胎小鼠心脏进行 UBM 成像,并观察出生后 1~7 天、1~4 周和 4~12 周小鼠的心脏血流动力学指标。该研究较完整地观察了小鼠心脏发育过程,证实心室舒张功能在其出生后 3 周左右发育成熟。

Spurney 等^[17]在综述中提到高频超声(20~55 MHz)能够明确显示 8.5 天胚胎小鼠心脏的搏动,清晰分辨 12.5 天胚胎的心房和心室,该技术的应用能够帮助研究者更早、更清楚地发现先天畸形,从而为先天性心脏病的研究提供更好的途径。

超声引导下的穿刺技术 Springer 等^[18]曾报道在 UBM 引导下向心肌梗死模型小鼠心肌层内注射干细胞技术,研究利用超声对比剂和荧光微粒作为示踪剂。结果显示,UBM 引导注射可获得与开胸直视注射相当的注射效果;能够成功定位梗死周边标记区并进行靶注射;心腔内注射示踪剂后在心肌层监测到少量积累,提示非引导细胞心腔注射是可行的。这种准确的引导注射技术使更简便更精准的小鼠心肌层内细胞移植成为可能。

小 结 UBM 分辨率已达到微米水平,因其具有活体观察、非侵入性观察、实时性观察和连续性观察等优点,而在未来的心血管研究中具有应用潜力。目前,UBM 成像仅限于二维图像,无法应用于三维成像,且不能与彩色多普勒血流成像相结合,因此还不能对血管微循环进行显像。此外,微气泡对比剂的应用也处于起步阶段^[19]。超声固有的分辨率与穿透力成反比的特性使高分辨超声仅限于应用在体型较小的动物和较浅表的组织中,但随着超声技术的发展和对比剂的使用,其应用领域会更加非常广泛。

参 考 文 献

- [1] Collins KA, Korcarz CE, Lang RM. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice [J]. *Physiol Genomics*, 2003, 13(3): 227 - 239.
- [2] Foster FS, Pavlin CJ, Harasiewicz KA, et al. Advances in ultrasound biomicroscopy [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26(1): 1 - 27.
- [3] Zhou YQ, Foster FS, Nieman BJ, et al. Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic

- resonance imaging[J]. *Physiol Genomics*, 2004, 18(2): 232 – 244.
- [4] Wikström J, Grönros J, Bergström G, *et al.* Functional and morphologic imaging of coronary atherosclerosis in living mice using high-resolution color Doppler echocardiography and ultrasound biomicroscopy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(4): 720 – 727.
- [5] Wikström J, Grönros J, Hägg U, *et al.* Proximal to middle left coronary artery flow velocity ratio, as assessed using color Doppler echocardiography, predicts coronary artery atherosclerosis in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5): 1 126 – 1 131.
- [6] Gan LM, Grönros J, Hägg U, *et al.* Non-invasive real-time imaging of atherosclerosis in mice using ultrasound biomicroscopy[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 190(2): 313 – 320.
- [7] 杨娅,王艳红,李治安,等.正常小鼠主动脉的超声生物显微镜成像分析[J]. *中华医学超声杂志*, 2009, 6(5): 835 – 840.
- [8] Ni M, Zhang M, Ding SF, *et al.* Micro-ultrasound imaging assessment of carotid plaque characteristics in apolipoprotein-E knockout mice[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 197(1): 64 – 71.
- [9] Okajima K, Abe Y, Fujimoto K, *et al.* Comparative study of high-resolution microimaging with 30-MHz scanner for evaluating cardiac function in mice[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2007, 20(10): 1 203 – 1 210.
- [10] Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, *et al.* GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice[J]. *Diabetes*, 2009, 58(4): 975 – 983.
- [11] Zhou YQ, Zhu YH, Bishop J, *et al.* Abnormal cardiac inflow patterns during postnatal development in a mouse model of Holt-Oram syndrome[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(3): H992 – H1 001.
- [12] Du J, Liu J, Feng HZ, *et al.* Impaired relaxation is the main manifestation in transgenic mice expressing a restrictive cardiomyopathy mutation, R193H, in cardiac TnI[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(6): H2 604 – H2 613.
- [13] Rottman JN, Ni G, Brown M. Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice [J]. *Echocardiography*, 2007, 24(1): 83 – 89.
- [14] Hinton RB, Alfieri CM, Witt SA, *et al.* Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(6): H2 480 – H2 488.
- [15] Srinivasan S, Baldwin HS, Aristizabal O, *et al.* Noninvasive, in utero imaging of mouse embryonic heart development with 40-MHz echocardiography[J]. *Circulation*, 1998, 98(9): 912 – 918.
- [16] Zhou YQ, Foster FS, Parkes R, *et al.* Developmental changes in left and right ventricular diastolic filling patterns in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(4): H1 563 – H1 575.
- [17] Spurney CF, Lo CW, Leatherbury L. Fetal mouse imaging using echocardiography: a review of current technology [J]. *Echocardiography*, 2006, 23(10): 891 – 899.
- [18] Springer ML, Sievers RE, Viswanathan MN, *et al.* Closed-chest cell injections into mouse myocardium guided by high-resolution echocardiography [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(3): H1 307 – H1 314.
- [19] Kaufmann BA, Lankford M, Behm CZ, *et al.* High-resolution myocardial perfusion imaging in mice with high-frequency echocardiographic detection of a depot contrast agent[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2007, 20(2): 136 – 143.

(收稿日期:2010-04-15;编辑:段佳)