

# 颈动脉粥样硬化斑块新生血管的超声造影强化特征研究

林玲, 张梅, 邱邈, 罗燕, 彭玉兰, 周翔

四川大学华西医院 超声科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨颈动脉粥样硬化斑块新生血管的超声造影(contrast-enhanced ultrasonography, CEUS)强化特征。方法 运用实时超声造影技术对78例有颈动脉粥样硬化斑块患者进行斑块新生血管强化特征分级和量化分析,探讨斑块新生血管灌注模式以及斑块强化与斑块厚度的关系,并根据斑块回声分类进行斑块强化特征的组间比较。对5例患者颈动脉内膜剥脱术后斑块的病理组织学微血管计数与术前斑块超声造影强化指标进行相关分析。结果 78个斑块常规超声显示低回声斑23例(29.49%),混合回声斑30例(38.46%),等回声斑20例(25.64%),高回声斑5例(6.41%);斑块最厚者5.5 mm,最薄者2.6 mm。本组60例(76.9%)颈动脉粥样硬化斑块CEUS显示不同程度的新生血管强化。斑块厚度与斑块强化程度存在相关关系( $r=0.686, P<0.05$ )。低回声斑和混合回声斑强化程度高于等回声斑及高回声斑( $P<0.05$ );斑块病理组织学新生血管数量分级与超声造影强化程度呈正相关( $r=0.886, P<0.05$ )。结论 超声造影能够实时地观察和评价颈动脉粥样硬化斑块内的新生血管的灌注特征,为斑块易损性的临床评估提供了新的影像学检查方法。

**【关键词】** 超声造影 颈动脉 粥样硬化斑块 新生血管

**Characteristics of Carotid Atherosclerotic Plaques in Contrast-enhanced Ultrasonography of Neovascularization** LIN Ling, ZHANG Mei, QIU Li, LUO Yan, PENG Yu-lan, ZHOU Xiang. Department of Ultrasound, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**【Abstract】** **Objective** To examine the characteristics of carotid arteriosclerotic plaques in contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) of neovascularization. **Methods** Seventy-eight patients with carotid atherosclerotic plaques were examined with real-time CEUS. The perfusion modes of neovascularization in relation to the carotid arteriosclerotic plaques were identified. Patients were categorized into four groups according to their plaque echo. Five patients with serious atherosclerotic carotid artery disease received carotid endarterectomy. The intra-plaque neovascularization recorded by CEUS were validated by post-surgery pathology examinations of the tissues. **Results** In routing ultrasound examinations, 23 (29.49%) plaques were identified with low-echo, 30 (38.46%) with mixed-echo, 20 (25.64%) with equal-echo, and 5 (6.41%) with high-echo. The CEUS imaging revealed 60 carotid atherosclerotic plaques (76.9%) with various degrees of enhancement in intra-plaque neovascularization. The thickness of plaques was correlated with the enhanced intensity of ultrasonography, with a Pearson correlation coefficient of 0.686 ( $P<0.05$ ). Compared with equal and high echo plaques, the enhanced intensity of ultrasonography in low and mixed echo plaques was higher ( $P<0.05$ ). The intra-plaque neovascularization recorded by CEUS was correlated with the grade of neovascularization resulted from post-surgery examinations (Spearman coefficient=0.886,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The real-time CEUS can assess the neovascularization in carotid atherosclerotic plaques non-invasively and quantitatively.

**【Key words】** Contrast-enhanced ultrasonography Carotid Atherosclerotic plaque Neovascularization

颈动脉粥样硬化斑块破裂并继发血栓是脑血管事件发生的重要病理学基础。近近研究表明,与斑块易损性相关的因素除了以往认为的大脂质核、薄纤维帽、钙化等,还包括活跃的斑块内炎症反应,和丰富的新生血管的增生<sup>[1]</sup>。在易损性粥样硬化斑块的发生和发展过程中,都伴随着斑块内新生血管的增生<sup>[2]</sup>。近年来,随着新型超声显影剂的发展,超声造影技术(contrast-enhanced ultrasonography, CEUS)被广泛应用于临床肿瘤和炎症性疾病的新

生血管观察,但在动脉粥样硬化斑块的研究领域,斑块内新生血管的超声造影强化特征及其临床适用性仍有待进一步研究。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

2011年7月至2012年5月间我院收治的存在颈动脉粥样硬化斑块的患者78例,男性57例,女性21例;年龄61~79岁,平均(65.7±10.2)岁。合

并高血压 54 例(69.23%),糖尿病 30 例(38.46%),吸烟史 31 例(39.74%)。其中 5 例具备手术指征患者行颈动脉内膜剥脱术。存在多个斑块者以最厚的斑块作为 CEUS 研究对象,共研究颈动脉斑块 78 个。

## 1.2 仪器与方法

采用 PHILIPS IU22 彩色多普勒超声诊断仪,探头选用 9L 宽频线阵探头,频率范围 6~9 MHz;仪器具备低机械指数脉冲反向谐波成像,支持编码谐波成像下的浅表器官造影成像,能够实现低机械指数实时灌注成像。

**1.2.1 常规超声** 记录斑块位置、数目、形态、内部回声及厚度。存在多个斑块者以最厚的斑块作为研究对象。本研究中斑块最厚者 5.5 mm,最薄者 2.6 mm。根据斑块回声进行分类<sup>[3]</sup>。低回声斑:斑块面积 80% 以上回声低于颈动脉外膜;混合回声斑:斑块面积 80% 以下回声低于颈动脉外膜,同时伴有高回声和/或无回声;等回声斑:斑块面积 80% 以上回声等于颈动脉外膜;高回声斑:斑块回声高于颈动脉外膜,高回声区域大于斑块圆周的 90% 且后方伴声影。

**1.2.2 超声造影** 经过斑块最大厚度的切面,局部放大图像,启动实时 CEUS 模式,即新生血管灌注模式下,采用低机械指数脉冲反向谐波造影成像技术,机械指数(mechanical index, MI)设定为 0.08~0.13,频率 1.7~3.4 MHz,帧频 12 帧/s,图像深度 3~5 cm。超声造影剂采用声诺维(SonoVue, Bracco, Switzerland)冻干粉剂(59 mg)和 5 mL 生理盐水混合,然后充分震荡至冻干粉末完全分散呈白色混悬液,内含六氟化硫微泡,微泡平均直径 2.5  $\mu\text{m}$ ,随血液循环,最终经呼吸排出。注射造影剂时采用 18G 针经患者外周静脉注射,2~3 s 内团注 SonoVue 2.0 mL,随后以 3~5 mL 生理盐水以

相同速度冲注。注射造影剂后同步计时,2 min 内连续观察颈动脉斑块显影情况,并将整个造影过程进行动态储存以备后期分析处理。图像分析:①肉眼直观观察和分析斑块和管腔强化显影情况,然后对斑块强化程度分级<sup>[4]</sup>。I 级:斑块内部无活动的造影剂微泡强化信号。II 级:斑块基底面和/或管腔面稀疏点状强化。III 级:强化程度介于 II 级和 IV 级之间。IV 级:由基底面和/或管腔面向内部呈密集点状、片状、线状强化(图 1A~1D)。②利用时间-强度曲线分析软件对图像进行声学定量分析:采用 QLAB8.1 软件,人工描绘斑块范围作为感兴趣区,并启用动态追踪功能,结合手动逐帧修正,对斑块强化情况建立时间-强度曲线(time-intensity curve, TIC 曲线),并行曲线的伽马拟合,获得强化定量参数:峰值强度(peak intensity, PI)、曲线下面积(area under the curve, AUC)、上升时间(rise time, RT)。造影强化程度分析由两名有经验的超声医生分别进行,两名超声医生对患者状况不知情。

**1.2.3 颈动脉斑块组织中新生血管的观察** 本组中 5 例患者因具备手术指征而行颈动脉内膜剥脱术,术后选取具有 CEUS 记录的颈动脉斑块进行病理组织学检查,标本用 10% 缓冲福尔马林液(体积分数)固定,行石蜡包埋,切片厚度为 5  $\mu\text{m}$ ,采用免疫组织化学检查,用内皮细胞标记物 CD31、CD34 单克隆抗体(1:4 000 稀释液)以及新生血管标记物 VIII 因子进行染色(棕色为阳性)。采用 Jeziorska 等<sup>[5]</sup>的新生血管分析方法对斑块内新生血管进行评分,首先在 40 倍光镜下扫描血管密度较高区域,然后在 100 倍光镜下根据新生血管的数量进行评分。病理评分标准为:0 分,切片内没有观察到新生血管的形成;1 分,有极少量新生血管形成,分布稀疏;2 分,血管分布情况介于 1~3 分之间;3 分,切片内见到大量新生血管形成,分布密集。评分过程由两

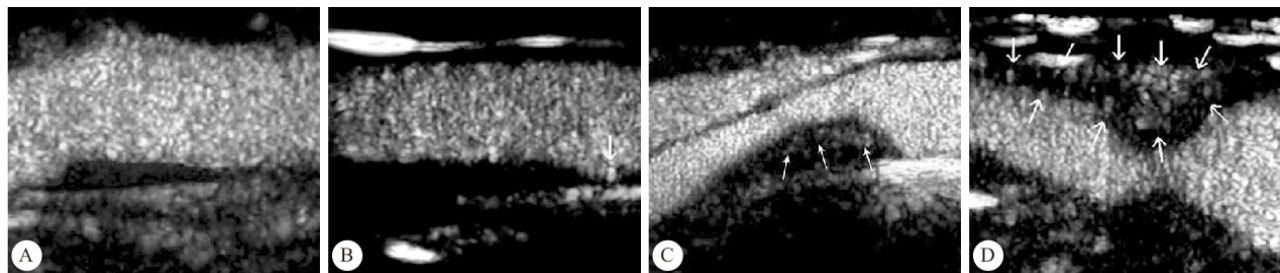


图 1 斑块新生血管 CEUS 强化程度分级

Fig 1 The degree of intra-plaque neovascularization on CEUS was categorized

1A: Grade I, no appearance of moving bubbles within the plaque; 1B: Grade II, sparse moving bubbles within the plaque at the adventitial side and/or at intimal side; 1C: Grade III, between grade II and IV; 1D: Grade IV, extensive appearance of bubbles moving to the plaque core from adventitial side and/or intimal side

名有经验的病理科医师完成,病理医师在进行评分之前对于颈动脉斑块的术前 CEUS 结果不知情,取两者评分的平均值进行下一步分析。

### 1.3 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示;两组均数比较采用  $t$  检验,多组均数比较采用方差分析;对斑块 CEUS 强化参数与斑块厚度关系采用 Pearson 相关分析;斑块病理组织学微血管计数与 CEUS 强化程度的关系采用 Spearman's 相关分析。 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 颈动脉粥样硬化斑块常规超声和 CEUS 检查结果

本研究中 78 个斑块常规超声显示低回声斑 23 例(29.49%),混合回声斑 30 例(38.46%),等回声斑 20 例(25.64%),高回声斑 5 例(6.41%);斑块最厚者 5.5 mm,最薄者 2.6 mm。CEUS 图像显示 78 例颈动脉粥样硬化斑块中的 60 例不同程度的新生血管强化,强化阳性率 76.9%;斑块新生血管的 CEUS 灌注模式表现为:强化多始于斑块基底部和内膜面,然后逐渐向斑块内部呈点状、片状或短线状强化。斑块强化程度分级:Ⅰ级 18 例(23.08%),Ⅱ级 16 例(20.51%),Ⅲ级 24 例(30.77%),Ⅳ级 20 例(25.64%)。

### 2.2 CEUS 检查斑块强化程度与斑块厚度及强化定量参数间的关系

本组斑块最厚者 5.5 mm,最薄者 2.6 mm。斑块 TIC 曲线见图 2。斑块厚度与斑块强化程度、PI、AUC、RT 之间存在相关关系, $r$  值分别为 0.686、0.730、0.628、 $-0.582(P<0.001)$ 。

常规超声斑块不同回声分类的斑块造影强化参数 PI、AUC、RT 见表 1,低回声斑和混合回声斑 PI 和 AUC 高于、RT 低于等回声斑及高回声斑( $P<0.05$ );低回声斑与混合回声斑间,等回声斑组与高

回声斑间各参数差异无统计学意义。

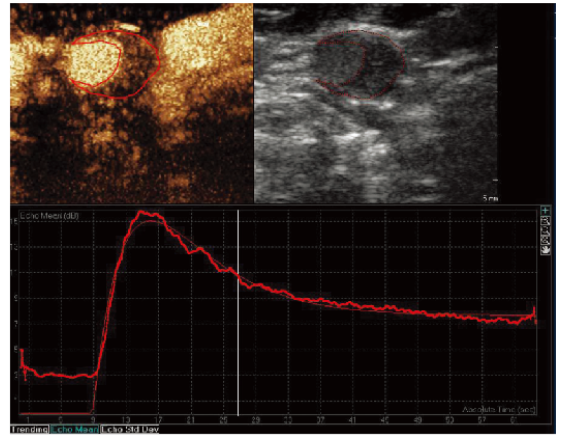


图 2 颈动脉粥样硬化斑块新生血管 CEUS 时间-强度曲线分析  
Fig 2 CEUS time-intensity curve analysis of intra-plaque neovascularization

### 2.3 斑块内新生血管的观察及与术前斑块 CEUS 强化程度分级的关系

术前斑块 CEUS 及术后斑块组织学标本内新生血管的免疫组化染色见图 3,新生血管 CEUS 强化特征与新生血管评分(CD31、CD34 和 VIII 因子免疫组化新生血管评分的平均值)的关系见表 2。结果显示,造影强化程度分级较高的斑块病理组织学新生血管形成数量较多,两者呈正相关( $r=0.886$ ,  $P<0.05$ );造影 PI 较高的斑块病理组织学新生血管形成数量较多,两者呈正相关( $r=0.900$ ,  $P<0.05$ )。

表 1 不同回声类型斑块 CEUS 强化程度比较

Table 1 Four groups of plaque echo determined by contrast-enhanced intensity

Plaque group	n	PI (dB)	AUC (dB · s)	RT (s)
Low-echo	23	6.63±1.12	335.85±77.85	10.26±3.68
Mixed-echo	30	7.24±1.00	347.19±62.31	9.54±2.06
Equal-echo	20	4.98±0.94*	231.82±80.65*	17.33±5.61*
High-echo	5	3.61±0.98*	139.38±88.70*	20.41±6.97*

PI: Peak intensity; AUC: Area under the curve; RT: Rise time.

\*  $P<0.05$ , vs. low-echo and mixed-echo

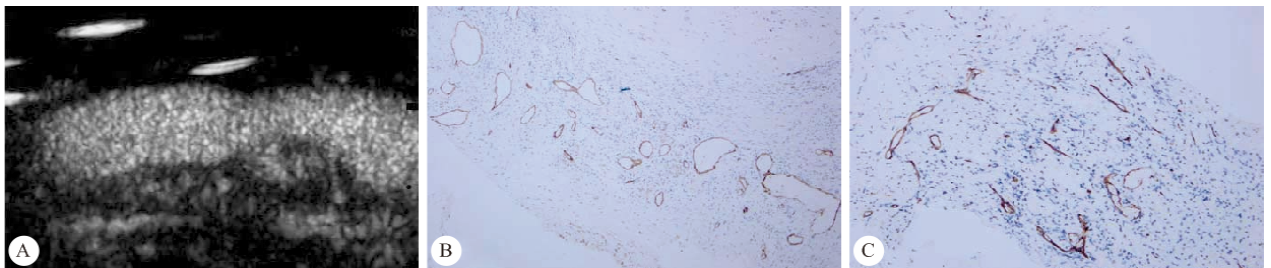


图 3 术前斑块 CEUS (A, Ⅳ级)与颈动脉内膜剥脱术后斑块新生血管的免疫组化染色(B:CD31, ×100;C:CD34, ×100)

Fig 3 The intra-plaque neovascularization recorded by CEUS imaging (A, grade IV) and neovascularization imaging on the tissues with immunohistochemical staining (B: CD31, ×100; C: CD34, ×100)

表 2 斑块新生血管 CEUS 强化特征与新生血管评分比较 ( $n=5$ )Table 2 Intra-plaque neovascularization recorded by contrast-enhanced ultrasonography and post-surgery examination of neovascularization of the tissues ( $n=5$ )

No.	Enhanced intensity grading	PI (dB)	AUC (dB · s)	RT (s)	Pathological score	CD31 score	CD34 score	Factor VIII score
1	IV	8.03	439.36	7.59	2	2	2	1
2	IV	8.82	462.45	6.04	2.67	3	3	2
3	III	8.27	456.77	7.02	2.33	3	2	2
4	III	7.96	443.82	6.91	1.33	1	2	1
5	III	6.84	302.31	9.76	1.67	2	2	1

PI: Peak intensity; AUC: Area under the curve; RT: Rise time

### 3 讨论

超声检查是颈动脉粥样硬化斑块评估的常用影像学手段。目前,常规的超声检查技术主要是通过斑块回声强弱来大致反映斑块组织构成,对于斑块内钙化的确认与病理结果有良好的一致性,但往往难于鉴别斑块内脂质、出血与血栓形成等易损性因素,因此,仅凭常规的超声检查方法对斑块易损性进行评估存在局限性。本研究运用超声造影新技术对颈动脉粥样硬化斑块进行观察,旨在探讨斑块内新生血管的超声造影强化特征,为斑块易损性评估提供新的超声影像学视角。

斑块内新生血管被视为斑块易损性的标志。新生血管在斑块易损性中的作用可以简单概括为:运输释放炎症细胞和炎症介质,介导斑块内炎症反应并形成正反馈机制促进新生血管生成;新生血管管壁由简单内皮细胞围成,缺乏结缔组织及基底膜的支撑,血管脆性大,易于破裂,造成斑块内出血;新生血管管壁的不完整性使得富含胆固醇的红细胞易于漏出,导致脂质核不断增大。斑块内新生血管增生的结果必将促进斑块的破裂,从而最终导致心脑血管事件的发生<sup>[6]</sup>。因此,对于斑块内新生血管的评价可能是高风险斑块预测的一个重要的指标。近年来的研究表明,CEUS 技术能够对斑块内新生血管的观察和显示提供较为直观的方法,成为观察斑块内新生血管的一项新的无创性影像学手段<sup>[7]</sup>。Rajaram 等<sup>[8]</sup>发现在进行颈动脉 CEUS 时,斑块内部有造影增强现象,并且把这种强化现象归因于斑块内新生血管的存在。Lassau 等<sup>[9]</sup>对斑块的病理组织学信息与斑块 CEUS 强化信息进行比较,证明 CEUS 能够识别直径为 32~99  $\mu\text{m}$  的微血管,CEUS 强化区域正是斑块高度血管化的区域所在。CEUS 对于斑块微血管灌注的显示是实时动态的,因此可以进行灌注模式分析并进一步行量化分析,根据时间-强度曲线进行微血管定量<sup>[10-12]</sup>。

本研究中发现,颈动脉粥样硬化斑块的新生血管 CEUS 灌注模式表现为强化多始于斑块基底部和内膜面,然后逐渐向斑块内部呈点状、片状或短线状强化。这种血管分布特征可能与斑块内新生血管的形成方式有关。新生血管是在原有毛细血管的基础之上,通过芽生和非芽生的方式由血管内皮细胞增生并迁移而形成。关于斑块内新生血管的起源,Kumamoto 等<sup>[13]</sup>的研究证实斑块内新生血管主要来自外膜滋养血管,占 96.5%,来自管腔的滋养血管占 3.5%。

斑块厚度与斑块强化程度、PI、AUC、RT 之间存在相关关系( $r$  值分别为 0.686、0.730、0.628、-0.582,  $P < 0.001$ ),与 Coli 等<sup>[7]</sup>的研究结论相似。分析原因可能与动脉粥样硬化斑块新生血管的形成原因中缺氧依赖机制学说有关:在正常生理情况下,血管壁的营养来源有两个,一是外膜的滋养血管供给,二是血管腔内的氧弥散供给。当动脉粥样硬化斑块进展时,内膜及中层增厚,当内膜及中层厚度达到 500  $\mu\text{m}$  时,氧弥散就会受损,而滋养血管就成为了血管壁主要的营养供给来源,因此,斑块厚度增大可能造成的斑块缺氧是斑块内新生血管形成的主要启动机制<sup>[14]</sup>。

不同回声性质的斑块强化程度存在差异:低回声斑和混合回声斑 PI、AUC 高于,RT 低于等回声斑及高回声斑 ( $P < 0.05$ ),反映出低回声斑和混合回声斑较等-回声斑和高回声斑存在更多的新生血管。大量研究证实质地软、不均质的颈动脉粥样硬化斑块更趋于不稳定,发生破裂、血栓进而引发脑血管事件的危险性较高,可能与软斑及混合斑存在更多的新生血管和活跃的炎症反应有关<sup>[15]</sup>。软斑及混合斑在超声图像上通常表现为低回声斑块或混合回声斑块。由此可以认为 CEUS 对颈动脉粥样硬化斑块的新生血管定量分析与斑块性质之间存在相关关系,与黄品同等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。

本研究中 5 例患者在颈动脉粥样硬化斑块

CEUS 评估后作了内膜切除术,将术后斑块标本的病理组织微血管评分与术前斑块 CEUS 分级及定量分析结果进行相关性分析,发现采用 CD31、CD34、Ⅷ因子 3 种免疫组织化学方法标记的微血管密度分级的平均值与斑块 CEUS 强化程度分级、强化峰值强度存在相关关系,即:造影强化程度分级较高的斑块病理组织学新生血管形成数量较多,两者呈正相关( $r=0.886, P<0.05$ );强化峰值较高的斑块,病理组织学新生血管形成数量较多,两者呈正相关( $r=0.900, P<0.05$ )。这也证明了颈动脉粥样硬化斑块的 CEUS 增强程度分级的高低与病理组织学微血管评分具有较好的相关性。而先前一系列的研究结果<sup>[7,12,16]</sup>也提示,CEUS 所显示的颈动脉粥样硬化斑块中的新生血管强化信号的分级程度与斑块术后标本的病理组织学定量评分间具有较好的相关性。颈动脉粥样硬化斑块的 CEUS 增强量化分析方法能够对斑块的新生血管进行评估,其评估参数具有一定的可信度。但是,对于这种相关性的分析也可能存在被低估情况,因为组织病理学上的微血管密度分析与 CEUS 的功能评估相关性尚不够精确,特别是对于斑块内不成熟的新生血管,CEUS 存在盲区。

综上,本研究发现,超声造影能够对颈动脉粥样硬化斑块新生血管灌注模式进行实时动态观察,进一步的超声造影量化分析则更为客观地反映了斑块新生血管丰富程度。超声造影为颈动脉粥样硬化斑块易损性评估提供了新的无创性影像学方法。

### 参 考 文 献

- Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis. *Curr Mol Med*,2006;31(6):489-499.
- Redgrave JN, Lovett JK, Gallagher PJ, *et al*. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation*,2006;113(19):2320-2328.
- Hodgson JM, Reddy KG, Suneja R, *et al*. Intracoronary ultrasound imaging: correlation of plaque morphology with angiography, clinical syndrome and procedural results in patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 1993;21(1):35-44.
- Staub D, Partovi S, Schinkel AF, *et al*. Risk stratification of carotid atherosclerotic lesions by standard and contrast-enhanced ultrasound: correlation of lesion echogenicity and severity with intraplaque neovascularization. *Curr Mol Med*, 2007;26(6):489-499.
- Jeziorska M, Woolley DE. Neovascularization in early atherosclerotic lesions of human carotid arteries: its potential contribution to plaque development. *Hum Pathol*,1999;30(8):919-925.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, *et al*. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*, 2006;113(2):2245-2252.
- Coli S, Magnoni M, Sangiorgi G, *et al*. Contrast-enhanced ultrasound imaging of intraplaque neovascularization in carotid arteries: correlation with histology and plaque echogenicity. *J Am Coll Cardiol*,2008;52(3):223-230.
- Rajaram V, Pandhya S, Patel S, *et al*. Role of surrogate markers in assessing patients with diabetes mellitus and the metabolic syndrome and in evaluating lipid-lowering therapy. *Am J Cardiol*,2004;93(11A):32C-48C.
- Lassau N, Koscielny S, Opolon P, *et al*. Evaluation of contrast-enhanced color Doppler ultrasound for the quantification of angiogenesis *in vivo*. *Invest Radiol*,2001;36(1):50-55.
- 黄品同, 田新桥, 孙海燕. 不同类型颈动脉斑块与新生血管关系的超声造影研究. *中华超声影像学杂志*,2008;17(2):117-119.
- 熊莉, 邓幼斌. 超声造影颈动脉粥样硬化斑块显影程度与急性脑血管病的关系. *中国医学影像技术*,2008;24(10):1583-1585.
- 魏立亚, 何文. 颈动脉硬化斑块内新生血管的超声造影研究. *中华医学超声杂志*,2009;6(6):1095-1102.
- Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol*, 1995; 26(11):450-456.
- Williams JK, Heistad DD. Structure and function of vasa vasorum. *Trends Cardiovasc Med*,1996;16(6):53-57.
- Kristensen SD, Ravn HB, Falk E. Insights into the pathophysiology of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol*,1997;80(5A):5E-9E.
- Shah F, Balan P, Weinberg M, *et al*. Contrast-enhanced ultrasound imaging of atherosclerotic carotid plaque neovascularization: a new surrogate marker of atherosclerosis? *Vasc Med*,2007;12(4):291-297.

(2014-06-24 收稿, 2014-09-03 修回)

编辑 沈进