

## 论 著

(临床研究)

## 颈动脉斑块超声血管造影分级与病理微血管密度的相关性

何烜亚, 陈兆耀, 张琳, 刘牛, 李辉

**【摘要】 目的** 探索超声血管造影(CEUS)检测到的颈动脉粥样硬化斑块内新生血管是否与斑块病理检测的微血管存在相关性。**方法** 前瞻性入组行颈动脉内膜剥脱术(CEA)的 20 例患者,所有患者术前行 CEUS 检查,并按照检测到的斑块内增强情况分为 0~3 级,术后对患者斑块标本行常规 HE 染色及 CD31 单克隆抗体标记的免疫组化染色,并根据 CD31 标记的斑块内微血管计算微血管密度(MVD),通过相关性分析检验 CEUS 分级与 MVD 的相关性。**结果** 20 例患者的平均年龄为(64.9±7.1)岁,其中高血压病史 13 例(85%),糖尿病病史 5 例(25%),脑梗死病史 17 例(85%),冠心病病史 3 例(15%),外周血管病病史 8 例(40%),吸烟病史 5 例(25%),长期饮酒史 2 例(10%)。CEUS 成像检测了 20 个目标斑块,按照 0~3 级的分级标准,其中 1 级 2 个(10%),2 级 7 个(35%),3 级 11 个(55%)。CD31 免疫组化染色 200 倍高倍镜下 MVD 为(9.37±3.56)条/mm<sup>2</sup>。Spearman 相关性分析显示 CEUS 新生血管分级与 MVD 呈正相关( $r=0.662, P=0.001$ )。**结论** 颈动脉粥样硬化斑块 CEUS 的增强分级与斑块内新生血管密度密切相关。

**【关键词】** 颈动脉粥样硬化;斑块内新血管形成;超声血管造影;病理

**【中图分类号】** R543.5

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-271X(2022)02-0118-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2022.02.002

## Correlation between contrast-enhanced ultrasound grading of carotid atherosclerotic plaque and microvessel density densityon pathology

HE Xuan-ya, CHEN Zhao-yao, ZHANG Lin, LIU Niu, LI Hui

(Department of Neurology, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210021, Jiangsu, China)

**【Abstract】 Objective** Exploring whether neovascularisation within carotid atherosclerotic plaques detected by ultrasound angiography (CEUS) correlates with microvessels detected by plaque pathology. **Methods** For the enrolled patients undergoing CEA surgery, all patients underwent CEUS examination before surgery, and were classified into 0-3 grades according to the detected intraplaque enhancement. After surgery, routine HE staining was performed on the plaque samples of patients, and CD31 markers were used to show intraplaque microvessels, and MVD was calculated. The correlation between CEUS grade and MVD was established by correlation analysis. **Results** We enrolled 20 patients with an average age of (64.9±7.1) years, including 13 patients (85%) with hypertension, 5 patients (25%) with diabetes, 8 patients (40%) with cerebral infarction, 3 patients (15%) with coronary heart disease, 8 patients (40%) with peripheral vascular disease, 5 patients (25%) with smoking, and 2 patients (10%) with long-term drinking history. CEUS imaging detected 20 target plaques on a scale of 0-3, including 2 in grade 1 (10%), 7 in grade 2 (35%), and 11 in grade 3 (55%). The MVD value of CD31 immunohistochemical staining was (9.37±3.56) /mm<sup>2</sup> at 200 times high magnification. Spearman correlation analysis showed that CEUS neovascularization grade was positively correlated with MVD ( $r=0.662, P=0.001$ ). **Conclusion** CEUS enhancement grade is closely related to intraplaque microvessel density.

**基金项目:**江苏省自然科学基金(BK20201095)

**作者单位:**210021 南京,南京中医药大学附属医院神经内科(何

烜亚、陈兆耀、张琳、李辉),超声医学科(刘牛)

**通信作者:**李辉, E-mail: mlihui99@163.com

**【Key words】** carotid atherosclerosis; intraplaque neovascularization; contrast-enhanced ultrasound; pathology

## 0 引 言

颈动脉粥样硬化是缺血性脑卒中的常见病因,既往对于卒中风险的评估多集中在脑动脉狭窄程度以及临床症状,但是对于无症状的患者仅凭狭窄程度无法为预测卒中风险提供充分的依据,对斑块性质即斑块易损性的评估对于减少动脉粥样硬化性的脑卒中发生率、致残率、死亡率具有重要意义<sup>[1]</sup>。目前关于“易损斑块”(vulnerable plaque)的定义还是基于病理检测结果,临床上对于易损斑块的诊断尚缺乏统一标准<sup>[2]</sup>。越来越多的证据表明,斑块内新生血管(intraplaque neovascularization, IPN)与斑块破裂出血、炎症密切相关,是导致斑块生长和易损的重要因素<sup>[3,4]</sup>。因此,临床上准确地识别斑块内新生血管,有助于易损斑块的识别与诊断,对于指导心脑血管疾病的预防有着重要的意义。

颈动脉血管彩超由于其无创性与快捷性是目目前临床最常用的辨别颈动脉易损斑块的临床方法,但是检查结果有时依赖检查者的主观判断与操作时超声探头的角度、方向与位置,特异性较差。超声血管造影(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)是识别颈动脉斑块内新生血管的超声新技术,其利用发射声波与造影剂微气泡谐振所产生的二次谐波信号进行成像,能敏感获取斑块内微小血管的灌注特征<sup>[5]</sup>。本研究拟通过对比颈动脉粥样硬化斑块 CEUS 分级与斑块病理标本新生血管密度,确认 CEUS 识别斑块内新生血管的准确性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 前瞻性入组 2017 年 11 月至 2019 年 12 月在南京市鼓楼医院的神经外科接受颈动脉内膜剥脱术(carotid endarterectomy, CEA)的患者,手术适应证为狭窄程度>70%无症状或有症状的颈动脉粥样硬化。如果患者曾经出现过缺血性中风或短暂脑缺血发作,则被定义为有症状的颈动脉粥样硬化。排除标准:感染和(或)败血症、高凝状态和(或)近期的血栓栓塞以及严重肝、肾功能障碍以及对超声造影剂过敏患者。所有患者术前至江苏省中医院超声医学科行颈动脉 CEUS 检查并记录检查结果,检查后 1 周内行 CEA。共入组 20 例患者,其中 17 例为有症状患者,3 例为无症状患者。本研究经江苏省中医院伦理委员会批准(批准号:2017NL-004-02),符合《赫尔辛基医学研究伦理原则宣言》,

所有患者均给予书面知情同意参与。

**1.2 颈动脉斑块 CEUS 检查** 传统颈动脉超声和 CEUS 是使用配有 L9-3 换能器的 Philips iU-22 超声仪(美国博塞尔的 Philips Medical Systems)进行的。使用对比度为 70%的特定于对比度的软件设置。颈动脉成像是由 2 名经验丰富的超声医师根据美国超声心动图学会共识声明使用标准的扫描方案进行<sup>[6]</sup>。患者仰卧姿势,该姿势朝向检查的对侧,并露出脖子。B 型和彩色多普勒超声分别在左右方向上扫描左右颈总动脉、颈总叉、颈内动脉、颈外动脉和椎动脉<sup>[7]</sup>。充分评估所有斑块,并记录颈动脉狭窄程度。

在常规颈动脉超声检查之后,利用第二代回声造影剂(Bracco, 米兰, 意大利)进行 CEUS,该造影剂由磷脂稳定的六氟化硫微泡组成。静脉通道首先用 5 mL 等渗盐水冲洗,然后向左肘浅静脉注射 1.2 mL 造影剂,然后立即予以 5 mL 的 0.9%NaCl 等渗盐水冲洗。内置定时装置和图像采集同步启动。在 CEUS 检查期间,探头聚焦于先前已确定目标斑块部位,并在低声压下通过纵向扫描完成图像采集。

注射微泡后约 15 min 内,颈动脉腔内可观察到增强的对比效果,持续时间约 5 min。如果检测到多个斑块,则患者可以重复接受以上检查操作,2 次检查之间的间隔时间必须超过 15 min。如果检测到噬菌斑,则将静止帧和片段以数字方式存储至少 10 min 以进行进一步分析。为了降低噪声并获得均匀的信号强度,我们调制了时间增益补偿。采用 0.06 的机械指数,并且在测试过程中焦点位于屏幕的底部,以减少微气泡的破坏。同时,将帧频和图像深度分别调制为 12/s 和 3~5 cm,以适应颈动脉的直径。前面提到的所有设置在每次检查中都保持不变。

CEUS 斑块分级:①0 级:斑块内未见增强回声;②1 级:斑块内小范围点样增强回声;③2 级:点状、短线样增强回声;④3 级:斑块内长线样或网状增强回声。CEUS 易损斑块标准:其中 0~1 级为稳定斑块,2~3 级为不稳定斑块。

**1.3 颈动脉内膜剥脱术(CEA)** 手术在全麻下进行。患者取仰卧位,肩部垫高、头偏向对侧,切口位于胸锁乳突肌前缘,以颈动脉分叉为中心稍靠上,长 5~7 cm。斜行切开皮肤及颈阔肌,乳突撑开器及两把甲状腺拉钩牵开切口。锐性分离颈深筋膜至颈动脉鞘,双重结扎面总静脉,充分解剖暴露颈总

动脉、颈外动脉及颈内动脉远心段。全身肝素化、基础血压升高 15% 后分别阻断颈内动脉、颈总动脉、颈外动脉,测颈内动脉残端压。纵行切开颈内动脉、颈总动脉。专用神经剥离子剥脱斑块,圈镊摘除残留斑块。分别缝合内膜及颈动脉壁,吻合完毕后开放阻断的动脉,基础血压降低 15%。检查吻合口彻底止血,放置负压引流管,全层连续稀松缝合颈阔肌和皮肤。

**1.4 斑块组织学检查** 行颈动脉内膜剥脱术后,取出的斑块用等渗盐水冲洗,经 4% 甲醛溶液固定,24 h 脱钙处理并石蜡包埋后连续切片(3~5  $\mu\text{m}$ )。行 HE 染色及 CD31 单克隆抗体免疫组化(IHC)染色。HE 染色观察斑块内组织成分及血管。CD31 是内皮细胞间连接的组成部分,CD31 单克隆抗体免疫组化染色标记新生血管,镜下观察,40 倍低倍镜下选 3~5 个血管丰富的热点区域,转至 200 倍和 400 倍高倍镜下进行计数取均值,通过 Image-Pro Plus (IPP) 图像分析软件进行微血管密度(MVD)定量分析。

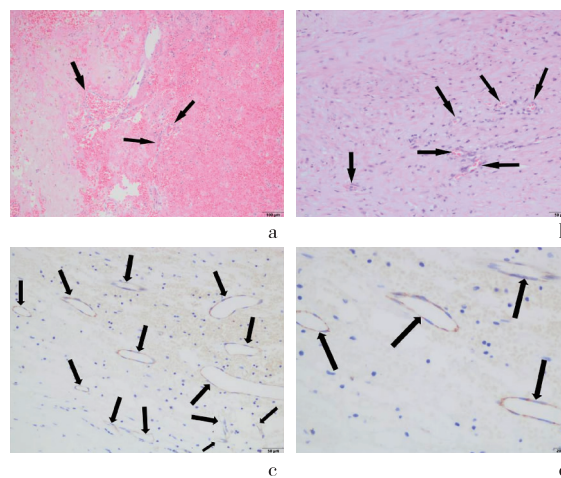
**1.5 统计学分析** 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据的分析整理,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )描述,相关性分析用 Spearman 相关性分析;计数资料以频数、百分比表示,采用卡方检验。以  $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 患者基线数据** 20 例患者中,男 18 例,女 2 例,高血压病史 13 例(85%),糖尿病病史 5 例(25%),脑梗死病史 17 例(85%),冠心病病史 3 例(15%),外周血管病病史 8 例(40%),吸烟病史 5 例(25%),长期饮酒史 2 例(10%)。年龄( $64.9\pm 7.1$ )岁,身高( $168.80\pm 7.48$ )cm,体重( $71.11\pm 11.48$ )kg,收缩压( $142.53\pm 10.90$ )mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),舒张压( $80.16\pm 12.24$ )mmHg,总胆固醇( $3.85\pm 0.83$ )mmol/L,三酰甘油( $1.73\pm 0.82$ )mmol/L,低密度脂蛋白( $1.73\pm 0.83$ )mmol/L,高密度脂蛋白( $1.15\pm 0.37$ )mmol/L,C 反应蛋白( $80.12\pm 96.45$ )mg/l,天冬氨酸转移酶( $27.67\pm 23.77$ )U/L,丙氨酸转移酶( $34.83\pm 41.40$ )U/L,肌酸激酶( $99.71\pm 61.27$ )U/L,血肌酐( $67.92\pm 14.25$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,尿素氮( $5.23\pm 1.72$ )mmol/L。

**2.2 斑块病理标本 HE 染色及 CD31 单克隆抗体的免疫组化染色** HE 染色可以见到斑块内新生血管,并且在血管周围可以见到大量的红细胞,提示

斑块内存在出血。CD31 单克隆抗体的免疫组化染色(IHC)中,蓝色为细胞核,黄色、棕黄色或有黄色棕色颗粒是 CD31 免疫组化阳性反应,标记为血管内皮细胞,并显示了斑块内新生血管形态。见图 1。



a,b: 斑块 HE 染色(a:100 倍,b:200 倍),黑色箭头示斑块内新生血管;c,d: 斑块 CD31 标记的 IHC(c:200 倍,d:400 倍),黑色箭头示斑块内新生血管

图 1 颈动脉粥样硬化斑块 HE 染色及 CD31 单克隆抗体免疫组化(IHC)染色

**2.3 CEUS 新生血管分级与斑块组织切片 MVD 相关性分析** 20 例患者 CEUS 成像检测 20 个目标斑块内的新生血管,按照 0~3 级的分级标准,其中 1 级 2 个(10%),2 级 7 个(35%),3 级 11 个(55%)。CD31 免疫组化染色 200 倍高倍镜下 MVD 为( $9.37\pm 3.56$ )条/ $\text{mm}^2$ 。Spearman 相关性分析显示 CEUS 新生血管分级与 CD31 免疫组化染色 200 倍高倍镜下组织切片 MVD 呈正相关( $r=0.662, P=0.001$ )。

## 3 讨 论

易损斑块定义主要依赖斑块的病理特征,如薄的纤维帽、大的坏死核心、胆固醇沉积以及斑块内炎症等<sup>[8]</sup>。IPN 是对动脉内膜增厚及斑块中需氧量增加的保护性生理反应,起始阶段分为芽生和管腔形成,随后血管内皮生长因子(VEGF)表达的下调和内皮中血管生成因子-1(Ang-1)、血小板衍生因子(PDGF)、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )等的升高介导新生血管消退的过程<sup>[9]</sup>。生理性新生血管的生成维持了斑块内的氧供,避免了斑块内细胞的坏死和凋亡。但是病理性新生血管大量生成成为循环中炎症细胞及炎症介质流入斑块的主要途径,加剧斑块内炎症、脂质核心的扩张、氧化损伤和蛋白酶



活化,促进斑块生长。大量不成熟的 IPN 由于严重的结构和功能异常,可以诱导斑块内出血 (intra-plaque hemorrhage, IPH) 及斑块破裂,导致各种心脑血管事件的发生<sup>[10]</sup>。所以,IPN 是动脉粥样硬化斑块发展的特征,也是动脉粥样硬化斑块稳定性的核心标志<sup>[11]</sup>。本研究中,患者手术切除斑块 HE 染色中可以检测到了大量的新生血管,证实斑块内存在大量新生血管生成,在血管周围发现大量红细胞,则提示可能存在新生血管破裂导致了 IPH。通过 CD31 标记的 IHC 染色,进一步确认斑块内存在大量的新生血管生成。

IPN 对于斑块生长及易损性的起到决定性作用,所以临床上对 IPN 的准确识别是临床诊断易损斑块的重要组成部分。目前诊断颈动脉易损斑块的方法有数字减影血管造影 (DSA)、CT 动脉成像 (CTA)、磁共振 (MR) 血管成像成像等。DSA 可以准确诊断动脉硬化血管狭窄程度以及斑块表面形态,是易损斑块重要诊断方法,然而,DSA 不能观察到斑块内部结构,虽然血管内超声 (IVUS)<sup>[12]</sup> 及光学相干断层扫描 (OCT)<sup>[13]</sup> 血管内成像方法在一定程度上弥补了这个缺陷,但是其仍然不能准确显示 IPN,另外,由于其有创性及价格高昂使得应用受到限制,临床上不作为常规筛查项目。CTA 对血管狭窄以及钙化有着良好的识别,但是对于血管壁及斑块内部组织成分的识别准确性不高<sup>[14]</sup>。DSA 以及 CTA 均使用含碘造影剂,较高的过敏率以及肾毒性也限制了两者在临床上的使用。MR 血管成像可以直接观察血管管壁及斑块内部结构,通过增强剂的作用可以识别斑块内强化,可以有效且准确诊断易损斑块,且可以检查颅内血管,如大脑中动脉,在易损斑块的诊断方面是仅次于病理诊断的准金标准<sup>[15]</sup>。但是,MRI 由于检测时间时间较长,受呼吸及运动伪影影响大,成功率仅有 70% 左右。另外,MRI 分辨率均在 0.2~1 mm,不能完全满足纤维帽厚度测量和斑块内组分成像的要求。同时,检测的准确性容易受到磁共振磁场、线圈及技师操作的干扰,导致准确性下降,且检查费用较高,这些也限制了其临床上应用。

利用斑块内新血管对造影剂微泡的摄取,CEUS 可提供高时空分辨率的血管造影样图像,以动态可视化颈动脉斑块的新血管形成。本研究通过与病理学 CD31 染色标记的血管比较,发现 CEUS 检测

新生血管分级与病理检测斑块内微血管密度有很好的相关性,证实 CEUS 技术可以精准识别颈动脉粥样硬化斑块中新生血管数量,通过新生血管数量的分级可以准确诊断易损斑块,与既往国内外研究结果一致<sup>[16-19]</sup>。与 MR 斑块增强成像及 CTA 相比,CEUS 可以提供连续、动态、实时斑块内血管成像,不易遗漏某个增强阶段<sup>[20]</sup>。除了可以准确识别斑块内新生血管,CEUS 可以在彩色多普勒超声 (CDUS) 的基础上改善颈动脉狭窄分级的准确性和斑块特征 (如表面溃疡) 的检测<sup>[21]</sup>。此外,CEUS 技术作为一种非侵入性、无创伤性的影像检查方法,还具有价格优势、便携性、可重复性以及更少禁忌证的特点。

总之,CEUS 技术可以安全、可靠地识别颈动脉粥样硬化斑块中的新生血管,准确诊断易损斑块。CEUS 未来还可用于监测颈动脉易损斑块的治疗疗效,并对指导脑卒中的二级甚至一级预防有着重要的临床意义。

本研究样本量较小,未来需要通过更大样本量或动物实验的研究进一步证实相关结果。另外,CEUS 斑块易损性分级依赖检测到斑块内的造影剂增强情况,并未带入其他斑块的特征,如斑块表面溃疡及内部信号特点等,未来应进一步探索基于 CEUS 检测全部内容的临床易损斑块诊断分级标准。

#### 【参考文献】

- [1] Brinjikji W, Huston JR, Rabinstein AA, *et al.* Contemporary carotid imaging: from degree of stenosis to plaque vulnerability[J]. *J Neurosurg*, 2016,124(1):27-42.
- [2] Hafiane A. Vulnerable Plaque, Characteristics, Detection, and Potential Therapies[J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2019,6(3):26. doi: 10.3390/jcdd6030026.
- [3] Parma L, Baganha F, Quax P, *et al.* Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017,816:107-115.
- [4] 周婷婷,李 辉,姜亚军,等. 左心室功能与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系[J]. *医学研究生学报*, 2019,32(9):954-957.
- [5] Camps-Renom P, Prats-Sanchez L, Casoni F, *et al.* Plaque neo-vascularization detected with contrast-enhanced ultrasound predicts ischaemic stroke recurrence in patients with carotid atherosclerosis[J]. *Eur J Neurol*, 2020,27(5):809-816.
- [6] Brisset M, Boutouyrie P, Pico F, *et al.* Large-vessel correlates of cerebral small-vessel disease[J]. *Neurology*, 2013,80(7):

- 662-669.
- [7] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, *et al.* Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(10):2054-2061.
- [8] Spacek M, Zemanek D, Hutyra M, *et al.* Vulnerable atherosclerotic plaque - a review of current concepts and advanced imaging[J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2018, 162(1):10-17.
- [9] Van der Veken B, De Meyer GR, Martinet W. Intraplaque neovascularization as a novel therapeutic target in advanced atherosclerosis[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(10):1247-1257.
- [10] Mantella LE, Colledanchise KN, Hetu MF, *et al.* Carotid intraplaque neovascularization predicts coronary artery disease and cardiovascular events[J]. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2019, 20(11):1239-1247.
- [11] Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2018, 123(10):1118-1120.
- [12] Mehta S K, McCrary J R, Frutkin A D, *et al.* Intravascular ultrasound radiofrequency analysis of coronary atherosclerosis: an emerging technology for the assessment of vulnerable plaque[J]. *Eur Heart J*, 2007, 28(11):1283-1288.
- [13] Farooq MU, Khasnis A, Majid A, *et al.* The role of optical coherence tomography in vascular medicine[J]. *Vasc Med*, 2009, 14(1):63-71.
- [14] Diab H, Rasmussen LM, Duvnjak S, *et al.* Computed tomography scan based prediction of the vulnerable carotid plaque[J]. *BMC Med Imaging*, 2017, 17(1):61.
- [15] Porambo ME, DeMarco JK. MR imaging of vulnerable carotid plaque[J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(4):1019-1031.
- [16] Shah F, Balan P, Weinberg M, *et al.* Contrast-enhanced ultrasound imaging of atherosclerotic carotid plaque neovascularization: a new surrogate marker of atherosclerosis? [J]. *Vasc Med*, 2007, 12(4):291-297.
- [17] 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]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(3):223-230.
- [18] 李宏波, 李辉, 黄辉, 等. 超声造影在颈动脉不同性质斑块评价中的应用价值[J]. *东南国防医药*, 2020, 22(2):152-155.
- [19] 李海欣, 阚艳敏, 宁彬, 等. 颈动脉斑块超声造影增强特征与其病理特征及易损性的相关性[J]. *中国医学影像技术*, 2021, 37(6):857-861.
- [20] Barr RG. How to Develop a Contrast-Enhanced Ultrasound Program[J]. *J Ultrasound Med*, 2017, 36(6):1225-1240.
- [21] Rafailidis V, Chrysogonidis I, Xerras C, *et al.* A comparative study of color Doppler imaging and contrast-enhanced ultrasound for the detection of ulceration in patients with carotid atherosclerotic disease[J]. *Eur Radiol*, 2019, 29(4):2137-2145.

(收稿日期:2021-12-19; 修回日期:2022-02-17)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕镗烽)