

• 弥漫性肝疾病专题 •

^1H -MRS 两种后处理方法量化分析酒精性与非酒精性大鼠脂肪肝模型的比较研究

阳宁静, 宋彬, 袁放, 唐鹤函, 黄子星

【摘要】 目的:探讨 $3.0\text{T } ^1\text{H}$ -MRS 的两种后处理方法对大鼠酒精性脂肪肝(ALD)和非酒精性脂肪肝(NAFLD)的诊断价值。**方法:**将 120 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、高脂组(NAFLD)、酒精组(ALD)及酒精+高脂组(ALD)共 4 组,后 3 组统称为模型组,在第 0、4、8 和 12 周进行 ^1H -MRS 扫描,计算两种后处理方法下的肝脏相对脂肪含量(RLC),其中以亚甲基为计算指标的结果用 RLC1 表示,以所有脂肪基团为计算指标的结果用 RLC2 表示,以病理结果为金标准,进行 RLC1 及 RLC2 与病理结果的相关性分析;按脂肪肝程度的病理结果将大鼠分为正常、轻度、中度及重度组 4 组,分析各组间 RLC1 及 RLC2 的差异。**结果:**模型组(NAFLD 和 ALD)的 RLC1、RLC2 均与病理结果呈正相关($r=0.45\sim 0.96$, $P<0.05$),且 RLC1 与病理结果的相关性($r=0.92$, $P<0.05$)高于 RLC2 与病理结果的相关性($r=0.77$, $P<0.05$);RLC1 在正常、轻度、中度和重度组间差异具有统计学意义($P<0.01$),RLC2 在重度组与余组间、中度组与余组间差异均具有统计学意义(P 均 <0.05)。**结论:** ^1H -MRS 的两种后处理方法均可用于诊断大鼠脂肪肝;RLC1 诊断轻度脂肪肝准确性高,而对于中重度脂肪肝的诊断则应该与 RLC2 诊断结果相结合。

【关键词】 酒精性脂肪肝; 非酒精性脂肪肝; 磁共振波谱学; 病理学

【中图分类号】 R445.2; R575.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2012)02-0132-04

Comparison of two different processing methods of ^1H -MR spectroscopy in quantifying relative lipid content in alcoholic and non-alcoholic fatty liver in mice model YANG Ning-jing, SONG Bin, YUAN Fang, et al. Department of Radiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, P. R. China

【Abstract】 Objective: To investigate the values of ^1H -MR spectroscopy (^1H -MRS) in quantifying liver relative lipid content (RLC) in rat models with two different processing methods for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). **Methods:** A total of 120 healthy sprague-dawle male rats were randomly divided into 4 groups: control group, high-fat diet group (as NAFLD), alcoholic diet group and the mixed model group (as ALD). RLC were measured according to different processing methods in 0th, 4th, 8th and 12th week (RLC1: only methylene was considered as the calculation factor; RLC2: all lipid groups were considered as the calculation factor) and compared to biopsy. **Results:** Significant positive correlation was demonstrated between RLC1, RLC2 and biopsy in both NAFLD and ALD ($P<0.05$, $r=0.45\sim 0.96$). Much closer correlation was found on RLC1 ($r=0.92$) compared to RLC2 ($r=0.77$). Significant differences were demonstrated between all the grades for RLC1 ($P<0.01$). Significant differences were demonstrated between the severe, moderate and the rest grades for RLC2. **Conclusion:** ^1H -MRS is a feasible method for diagnosing fatty liver at 3.0T MR in rat models either ALD or NAFLD. RLC1 is more accurate and reliable for discriminating normal and mild fatty liver while RLC2 can be an important supportive method when it comes to moderate and severe fatty liver.

【Key words】 Alcoholic liver disease; Non-alcoholic fatty liver disease; Magnetic resonance spectroscopy; Pathology

^1H -MRS 作为一种活体评价肝脏脂肪含量的无创性方法已具有充分的理论和实践依据。本研究利用酒精性脂肪肝(alcoholic liver disease, ALD)和非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠模型,在 3.0T MR 扫描仪上,初步探讨 ^1H -MRS 两种不同后处理方法在 ALD 和 NAFLD 诊断中的应用价值。

材料与方法

1. 大鼠脂肪肝模型的建立

雄性清洁级 SD 大鼠 120 只,随机分为正常对照组($n=20$)、高脂组($n=30$)、酒精组($n=30$)和酒精+高脂组($n=40$)4 组,后 3 组统称为模型组。高脂组代表 NAFLD 模型,酒精组及酒精+高脂组代表 ALD 模型。喂养时间为 4~12 周^[1]。

2. MRI 扫描及图像分析

于第 0、4、8 和 12 周任意选取每组中的 6 只以上大鼠进行 MRI 检查,采用大鼠专用体线圈(上海晨光医疗科技有限公司提供)。采用 Philips Achieva 3.0T

作者单位: 610041 成都,四川大学华西医院放射科(阳宁静、宋彬、袁放、唐鹤函、黄子星); 610041 成都,四川省肿瘤医院放射科(阳宁静)

作者简介: 阳宁静(1980—),女,四川仪陇人,硕士,住院医师,主要从事腹部影像诊断工作。

通讯作者: 宋彬, E-mail: cjr_songbin@vip.163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30770622)

超导型 MR 成像仪,¹H-MRS 波谱采集序列为单体素点分辨波谱法(single voxel point-resolved selective spectroscopy, PRESS), 放置饱和带, 自动匀场。扫描参数: TR 2000 ms, TE 40 ms, 视野 65 mm×65 mm, 体素 10 mm×10 mm, 回波链采集次数 144, 扫描时间 4 min 52 s。采用 Philips 后处理工作站和 Spectro-View 软件对原始数据进行后处理, 测定脂峰的峰下面积(S_{lipid}), 其中亚甲基峰的峰下面积以 S_{lipid1} 表示、所有脂肪基团峰的峰下面积以 S_{lipid2} 表示, 水峰的峰下面积以 S_{water} 表示, 分别采用两种方法计算肝脏相对脂肪含量(related lipid content, RLC), 计算公式如下:

$$\text{RLC1} = \frac{S_{\text{lipid1}}}{S_{\text{water}} + S_{\text{lipid1}}} \quad (1)$$

公式(1)采用亚甲基峰的峰下面积为计算指标。

$$\text{RLC2} = \frac{S_{\text{lipid2}}}{S_{\text{water}} + S_{\text{lipid2}}} \quad (2)$$

公式(2)采用所有脂肪基团峰的峰下面积为计算指标。

3. 病理学检查

MRI 检查结束后立即处死大鼠, 取病理标本, 在我院病理科制成冰冻切片, 采用苏丹Ⅲ染色。用 Image Pro-Plus 6.0 软件进行脂滴计数和细胞计数, 计算获得脂肪细胞百分比。分级标准按照 2003 年中华医学会肝脏病分会制订的脂肪肝分级标准: 30%~50% 的肝细胞脂肪变者为轻度脂肪肝, 50%~75% 的肝细胞脂肪变者为中度脂肪肝, 75% 的肝细胞脂肪变者为重度脂肪肝^[2-3]。

4. 统计学分析

采用单因素方差分析及多重比较来分析 RLC1 与 RLC2 对不同程度脂肪肝的诊断差异, 不同组别的 RLC1 和 RLC2 与组织病理学结果的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析法。统计软件为 SPSS 15.0, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. ¹H-MRS 表现

实验共纳入大鼠 120 只, 除去实验中死亡、失访的大鼠以及 MRI 扫描结果不符合要求的大鼠, 余下 73 只大鼠 MRI 结果进入有效统计。扫描所得¹H-MRS 图像显示清楚, 基线良好。水峰分布于 4.6~5.5 ppm, 以 5.0 ppm 居多; 亚甲基峰分布于 1.0~1.7 ppm, 以 1.5 ppm 居多, 但两者差值恒定, 约 3.5 ppm。正常对照组与模型组水峰无明显差异, 而亚甲基峰差异具有显著性意义($P<0.05$)。正常对照组中, 12 例未见亚甲基峰显示, 3 例仅见亚甲基峰轻微抬高(图 1)。模型组大部分亚甲基峰随肝脂肪变程度加重而明显抬高、增宽, 以中重度时改变最为明显; 各脂

肪基团峰陡且形态不规则, 位于 0.9~1.3 ppm 处的甲基峰、2.0~2.5 ppm 处的羧基峰和 2.8~3.2 ppm 处的烯属基团峰均明显抬高, 峰下面积均随之增大(图 2)。

ALD 模型中, 高脂+酒精组大鼠波谱图最早在第 4 周出现亚甲基峰轻度升高, 第 8 周时 10 只大鼠亚甲基峰明显升高; 酒精组大鼠波谱图差异较大, 至第 12 周时亚甲基峰既有轻度升高(亚甲基峰低于 1/3 水峰), 也有明显升高(亚甲基峰高于 1/3 水峰)。酒精组、高脂组和高脂+酒精组 3 组水峰均未见明显改变。NAFLD 模型的谱线改变缓慢稳定, 第 4、8 和 12 周分别以轻、中和重度改变为主, 亚甲基峰的峰下面积随脂肪变程度加重而增大。

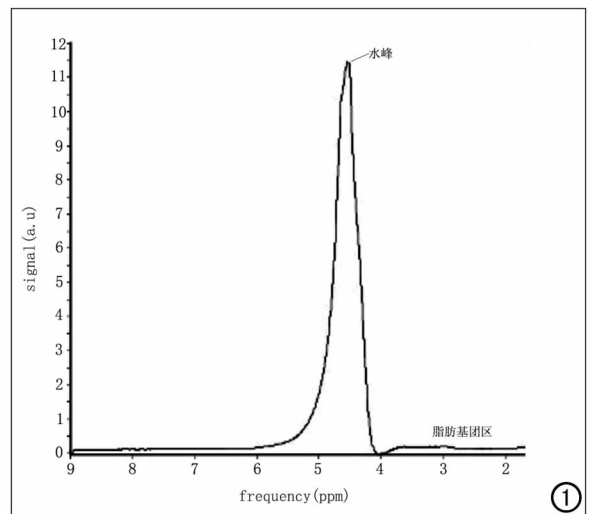


图 1 正常肝脏波谱图。脂肪基团区谱线平直无抬高, 水峰呈明显抬高。

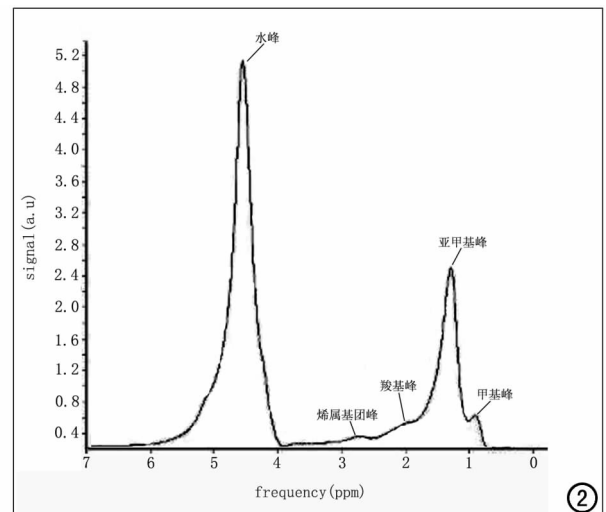


图 2 中度脂肪肝波谱图。烯属基团峰、羧基峰、亚甲基峰和甲基峰各峰陡且形态不规则, 波形明显抬高, 波峰下面积随之增大; 水峰明显抬高, 变化不明显。

2. 统计学分析

按脂肪肝程度的病理结果将大鼠分为正常、轻度、中度和重度共 4 组, 各组 RLC 值见表 1。经单因素方差分析结果显示, 正常、轻度、中度和重度组间的 RLC1 差异具有极显著性意义($P<0.01$)。中度组与余组间、重度组与余组间的 RLC2 差异均具有极显著性意义(P 均 <0.01)。

表 1 不同程度脂肪肝 2 种后处理方法测得的肝脏脂肪含量

脂肪肝程度	例数	RLC1	RLC2
正常	15	0.178±0.023	0.203±0.170
轻度	15	0.425±0.184	0.351±0.271
中度	19	0.603±0.124	0.711±0.120
重度	24	0.940±0.164	0.890±0.200

注: 四组多重比较 RLC1 在各组间差异均有显著性($F=65.072$, P 均 <0.01); RLC2 在中度组与余组间, 重度组与余组间差异均具有显著性($F=22.306$, P 均 <0.01), 正常组与轻度组间差异无显著性($P>0.05$)。

在模型组 (ALD 和 NAFLD) 中, 3 组 RLC1 和 RLC2 均与病理结果呈正相关(P 均 <0.01)。RLC1 与病理结果的相关程度($r=0.886\sim0.960$) 均优于 RLC2($r=0.637\sim0.862$, 表 2、3)。

表 2 各模型组 2 种方法测得的脂肪含量与病理结果的相关性

组别	例数	相关系数值	
		RLC1	RLC2
高脂组	25	0.886	0.637
酒精组	18	0.946	0.862
酒+脂组	15	0.96	0.784
合计	58	0.923	0.766

表 3 两种模型组 2 种方法测得的肝脏脂肪含量与病理结果的相关性

模型组	例数	相关系数值	
		RLC1	RLC2
ALD	33	0.967	0.850
NAFLD	25	0.854	0.637

讨 论

人体内脂类的主要来源是外源性食物, 如酒精、高热量饮食、药物和/或各种化学因素等。肝脏是脂类代谢的主要器官。当肝内脂肪氧化分解能力减低, 脂肪合成增多或者磷脂合成障碍时会导致脂肪过量沉积, 出现脂肪肝。根据摄入酒精与否将脂肪肝大致分为 ALD 和 NAFLD 或两者并存^[4]。本研究模拟中国居民的饮食结构, 诱导复制两种大鼠模型, 其发病机制、病理演变过程均与人类脂肪肝类似, 虽耗时长, 但模型真实可靠, 为后续¹H-MRS 研究打下了基础。

¹H-MRS 技术测量肝脏脂肪含量的理论基础为: 通过水和脂肪中质子群的共振频率 (Larmor 频率) 不同, 可以同时获得活体肝脏内水和脂肪中质子的 MRS 信息, 并以此分析计算肝脏脂肪含量 (主要是三酰甘油 triglyceride, TG)^[4-6]。本研究主要选择观察水和脂肪共振频率的分布范围、峰值高度以及峰下面积, 并以峰

下面积计算 RLC。共振频率的观察以四甲基硅烷为参照, RLC1 值只参考亚甲基峰, RLC2 值参考亚甲基峰及其它脂肪基团波峰之和。笔者在计算中使用水和脂峰的峰下面积而没有使用峰值进行计算, 是为了排除绝对值波动对波谱结果的影响。本研究结果发现在 ALD 及 NAFLD 两种模型中, RLC1 与 RLC2 均与病理结果呈正相关, 且 RLC1 与病理结果的相关性高于 RLC2, 因此得出结论: 这两种后处理方法均可用于 ALD 及 NAFLD 肝脏脂肪含量的检测, 但 RLC1 检测准确性较高。这是由于 RLC1 以亚甲基峰为参考指标来计算脂肪含量, 而健康人肝内脂肪以甘油三酯 (亚甲基) 含量最多, 信号最强, 若单独参考亚甲基的峰线图, 可以提高测量信噪比, 即提高 RLC1 测量肝脏脂肪含量的准确性。

本研究同时发现, 以亚甲基峰为参考指标计算的 RLC1 在正常、轻度、中度和重度组间均有差异, 而参考所有脂肪峰的 RLC2 仅在中、重度组间有差异, 即 RLC1 能鉴别正常至不同程度的脂肪肝, 而 RLC2 只能鉴别中、重度脂肪肝。这同样与上述提到的信噪比增强有关, 且还需结合脂肪肝发生过程的病理组织学改变进行分析。早期脂肪肝的特征性病理变化是脂肪变性和脂肪性肝炎, 晚期脂肪肝的主要病理学特征是纤维化与肝硬化。正常肝脏和轻度肝脂肪变时, 亚甲基以外的其它脂类沉积相对较少, 不易被¹H-MRS 检测到, 或者信号强度太低可以忽略, 此时单独参考亚甲基峰线图是较为真实可靠的, 因此 RLC1 在正常、轻度脂肪肝中更具鉴别优势。中后期脂肪肝是以甘油三酯为主、其它脂类共同沉积的病理改变, 中重度脂肪肝的磷脂、甘油三酯、脂酸、胆固醇及胆固醇酯等其它脂类沉积增加^[7-8], 因此在中后期脂肪肝动物模型中, 位于 0.9 ppm 处的甲基峰、2.0 ppm 的羧基峰和 2.8 ppm 的烯属基团峰会出现谱线上抬和峰下面积增加 (但仍明显低于甘油三酯, 图 2), 此时 RLC1、RLC2 均能测定肝脂肪变程度, 但如果仅仅以亚甲基为单一指标计算 RLC1 则会忽略其它基团, 而 RLC2 则计算上述所有脂类峰下面积, 更接近真实肝脂变程度的定量检测, 因此 RLC2 在中、重度脂肪肝中较 RLC1 更具诊断优势。另外以往研究均认为脂肪与水的比例大于 20% 才能定义为脂肪肝, 此处的脂肪应当包含所有脂肪基团, 因此用 RLC2 计算更接近实际情况。McPherson 等^[9]的临床试验结果表明, 晚期肝脏的其它病理变化并不影响 MRS 对脂肪肝分级诊断的准确性, 尤其是中重度肝脂肪变。但使用 RLC2 对其它脂肪基团进行测定时, 对 MRS 的扫描及后处理技术要求更高, 对波谱理论谱线与实际谱线吻合度一致性的要求更为严格, 同时测量需更为精准, 否则很有可能出现偏差, 诊

断效能反而小于 RLC1。

本研究使用了单体素方式进行采样, 尽管 van Werven 等^[10]用¹H-MRS 测定 NAFLD 的不饱和脂肪酸与亚甲基呈明显相关($r=0.81, P<0.01$), 且大多数 NAFLD 是均匀性肝脂肪变, 因此其认为用单体素测定适合代表肝脂肪变, 但 Cowin 等^[11]曾提出同肝叶不同区域的脂肪含量亦存在差异, 因此脂肪在肝内沉积是否均匀尚待进一步研究, 这也是本研究的不足之处, 笔者将在今后的研究中优化 MRI 序列, 尽可能减小脂肪沉积不均匀性带来的影响。

综上所述,¹H-MRS 的这两种后处理方法均适用于大鼠肝脏脂肪的活体定量分析及随访研究。RLC1 适用于各级脂肪肝的诊断, 尤其适于正常肝脏和轻度脂肪肝的诊断, 当需要诊断中重度脂肪肝时, 则需结合 RLC2 以得到更可信的结果。因此, 联合运用¹H-MRS 两种后处理方法分析肝内脂质改变, 能准确反映脂肪肝的严重程度, 并提升临床应用的可行性。

参考文献:

- [1] 南月敏, 王蕾, 李良霄, 等. 非酒精性脂肪肝动物模型研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2007, 28(1): 67-69.
- [2] 中华肝脏病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊断标准[J]. 中华肝病杂志, 2003, 11(2): 72.
- [3] 中华肝脏病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性肝病诊断标准[J]. 中华肝病杂志, 2003, 11(2): 71.
- [4] Springer F, Machann J, Claussen CD, et al. Liver fat content determined by magnetic resonance imaging and spectroscopy[J]. World

- J Gastroenterol, 2010, 16(13): 1560-1566.
- [5] Machann J, Thamer C, Schnoedt B, et al. Hepatic lipid accumulation in healthy subjects: a comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized ¹H-MR spectroscopy[J]. Magn Reson Med, 2006, 55(4): 913-917.
- [6] Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 288(2): 462-468.
- [7] Thomas EL, Hamilton G, Patel N, et al. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study[J]. Gut, 2005, 54(1): 122-127.
- [8] Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, et al. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance imaging[J]. J Hepatol, 2009, 51(3): 433-445.
- [9] McPherson S, Jonsson JR, Cowin GJ, et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered[J]. J Hepatol, 2009, 51(2): 389-397.
- [10] van Werven JR, Schreuder TC, Nederveen AJ, et al. Hepatic unsaturated fatty acids in patients with non-alcoholic fatty liver disease assessed by 3.0T MR spectroscopy[J]. Eur J Radiol, 2010, 75(2): 102-107.
- [11] Cowin GJ, Jonsson JR, Bauer JD, et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis[J]. J Magn Reson Imaging, 2008, 28(4): 937-945.

(收稿日期: 2011-11-28 修回日期: 2012-01-16)

《请您诊断》栏目征文启事

《请您诊断》是本刊 2007 年新开辟的栏目, 该栏目以临床上少见或容易误诊的病例为素材, 杂志在刊载答案的同时配发专家点评, 以帮助影像医生更好地理解相关影像知识, 提高诊断水平。栏目开办 3 年来受到广大读者欢迎。

本栏目欢迎广大读者踊跃投稿, 并积极参与《请您诊断》有奖活动。

《请您诊断》来稿格式要求: ①来稿分两部分刊出, 第一部分为病例资料和图片; 第二部分为全文, 即病例完整资料(包括病例资料、影像学表现、图片及详细图片说明、讨论等); ②来稿应提供详细的病例资料, 包括病史、体检资料、影像学检查及实验室检查资料; ③来稿应提供具有典型性、代表性的图片, 包括横向图片(X 线、CT 或 MRI 等不同检查方法得到的影像资料, 或某一检查方法的详细图片, 如 CT 平扫和增强扫描图片)和纵向图片(同一患者在治疗前后的动态影像资料, 最好附上病理图片), 每帧图片均需详细的图片说明, 包括扫描参数、序列、征象等, 病变部位请用箭头标明。

具体格式要求请参见本刊(一个完整病例的第一部分请参见本刊正文首页, 第二部分请参见 2 个月后的杂志最后一页, 如第一部分问题在 1 期杂志正文首页, 第二部分答案则在 3 期杂志正文末页)

联系人: 石鹤 联系电话: 027-83662887

(本刊编辑部)