

• 实验研究 •

磁共振灌注成像在鼠肝纤维化、肝硬化病理分级中的价值

王国光, 孟令平, 胡明秀, 洪玉萍, 官兵, 乔伟伟

【摘要】 目的:分析大鼠肝纤维化、肝硬化磁共振灌注成像(MR-PWI)参数特征,评价 PWI 对肝纤维化、肝硬化病理分级的价值。**方法:**清洁级 SD 大鼠 100 只,体重约 150~200 g,雄性。将大鼠随机分为 2 组,对照组($n=16$),实验组($n=84$);实验组腹腔定点注射硫代乙酰胺(TAA),对照组同期腹腔注射相同剂量生理盐水。建模成功后实验组和对照组分批进行肝脏常规磁共振扫描及 PWI 扫描。依据病理结果将肝脏损伤分为 5 组:肝纤维化 0 期(对照组)、肝纤维化 I 期(S1),肝纤维化 II 期(S2),肝纤维化 III 期(S3),肝硬化结节期(S4),然后分析灌注参数与病理分级的相关性。**结果:**共 69 只大鼠(实验组 57 只,对照组 12 只)成功获取 PWI 图像并进行灌注参数测量,成功率 69%(69/100)。各期门静脉灌注参数之间差异有统计学意义($P<0.05$),各期肝实质灌注参数之间差异有统计学意义($P<0.001$)。门静脉 TTP 及 WOR 与肝纤维化分级之间存在相关性($r=0.420, -0.464, P<0.001$)。肝实质 TTP 及 WIR 与肝纤维化分级之间存在相关性($r=0.424, -0.488, P<0.001$)。**结论:**MR-PWI 参数与大鼠肝纤维化、肝硬化的分级有一定相关性。MR-PWI 对评价肝纤维化分期具有一定的临床价值。

【关键词】 灌注加权成像; 肝纤维化; 肝硬化; 动物模型

【中图分类号】 R445.2; R575.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2017)11-1117-05

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2017.11.004

Value of MR-perfusion weighted imaging in the pathology grading of hepatic fibrosis and cirrhosis of rat WANG Guo-guang, MENG Ling-ping, HU Ming-xiu, et al. Department of Radiology of Shanghai Sixth People's Hospital Jinshan Branch, Shanghai 201599, China

【Abstract】 Objective: To analyze the characteristics of MR-perfusion weighted imaging (MR-PWI) of hepatic fibrosis and cirrhosis of rat, and to assess the value of PWI in the pathology grading of liver fibrosis and cirrhosis. **Methods:** 100 clean SD rats, weighting ranged from 150~180g, male, were randomly divided into two groups; experimental group ($n=84$) and control group ($n=16$). Thioacetamide (TAA) was injected into the peritoneal cavity of the experimental group, and the same dose of normal saline was injected into the control group in the same way. Routine MR scanning and MR-PWI were applied afterwards. According to pathology results, liver damage was divided into 5 grades: fibrosis stage 0 (control group), I (S1), II (S2), III (S3) and existence of cirrhosis nodule (S4). The correlation of perfusion parameters and pathology grading was analyzed. **Results:** PWI images were successfully obtained from 69 rats (69%; control group, $n=12$; experimental group $n=57$). There were significant differences among all groups of perfusion parameters of portal vein ($P<0.05$), as well as among all groups of perfusion parameters of liver parenchyma ($P<0.001$). TTP and WOR of portal vein were correlated with pathology grading of hepatic fibrosis and cirrhosis ($r=0.420, -0.464, P<0.001$). TTP and WOR of liver parenchyma were also correlated with pathological grading of hepatic fibrosis and cirrhosis ($r=0.424, -0.488, P<0.001$). **Conclusion:** Correlation was existed between MR-PWI parameters and pathology grading of hepatic fibrosis and cirrhosis of rats. MR-PWI provides clinical value for the grading of hepatic fibrosis.

【Key words】 Perfusion weighted imaging; Hepatic fibrosis; Hepatic cirrhosis; Animal model

肝纤维化是引起肝功能障碍和肝硬化的病理基础,早期诊断尤为重要。磁共振灌注加权成像(magnetic resonance perfusion weighted imaging, MR-PWI)能够反映组织微血管灌注和血液动力学情况,已较广泛用于肝脏病变的实验与临床研究^[1],但其灌注参数还没有统一的定量标准。本实验采用药物诱导大

鼠肝损伤模型,以半定量方式,探讨肝纤维化、肝硬化磁共振灌注参数的意义及其与肝纤维化分级的相关性。

材料与方法

1. 实验动物与分组

选用纯系清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠共 100 只,鼠龄 6~7 周,均为雄性,体重约 180~200 g。大鼠均由上海睿太莫斯生物科技有限公司提供,在上海农林职业技术学院动物实验中心标准饲养。大鼠随

作者单位: 201599 上海,上海市第六人民医院金山分院放射科(王国光、孟令平、胡明秀、官兵),病理科(洪玉萍); 200232 上海,复旦大学动物科学实验部(乔伟伟)

作者简介: 王国光(1986—),男,山东省青州人,主治医师,主要从事功能磁共振成像对慢性肝病的诊断工作。

基金项目: 上海市科委医学引导类项目(12119b1400)

通讯作者: 孟令平, E-mail: menglingping2004@163.com

机分为两组:实验组($n=84$),剂量 200 mg/kg,经腹腔注射硫代乙酰胺(TAA,上海凌峰化学试剂有限公司提供),3 次/周,连续 7 周,第 8 周始,药物增加 20%,连续至第 17 周;第 18 周始,视大鼠状态再次增量 20%,连续至第 30 周。对照组($n=16$),正常喂饲同量生理盐水,腹腔注射,3 次/周。

2. 大体观察

在实验过程中,观察大鼠活性、激惹度及死亡情况;建模第 6 周开始至 30 周,分批次取大鼠进行 MRI 检查,深度麻醉后处死大鼠,动态观察肝脏的形态及结构变化,并作组织染片观察(图 1~3)。

3. MRI 检查

采用 Philips Achieve 1.5T 超导体磁共振成像仪,小动物专用线圈(内径 3 英寸正交线圈),腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉(2 mg/kg),俯卧于线圈中央,头先进,采用加压包扎法(棉纱布包裹)减少呼吸动度从而减少呼吸伪影。试验组大鼠(6 ± 1)~(30 ± 1)周后批次(1~5 只/次)、对照组同期(1~2 只/次)行磁共振常规横轴面 T_1 WI、压脂 T_2 WI(图 4)和冠状面压脂 T_2 WI 扫描后,进行 PWI 扫描:抑脂 THRIVE(3D T_1 -TFE)序列,翻转角 10° ,TR 7.5 ms,TE 3.7 ms,矩阵 128×128 ,采集次数 1,层厚 2.0 mm,层间隔 2 mm。全肝扫描 10 层,55 个时相,扫描时间 120 s。由鼠尾静脉团注对比剂 Gd-DTPA(0.05 mmol/kg,北陆药业),注射对比剂同时开始 PWI 扫描。原始灌注图像传入后处理工作站,采用 Basic- T_1 -Perfusion 软件包进行后处理,选择腹主动脉、门静脉和肝实质作为兴趣区(ROI),自动绘制时间-信号强度曲线(time-signal intensity curve, TIC)及伪彩图(图 5~6)。观察并记录:①达峰时间(time to peak, TTP),ROI 信号强度开始升高到升为峰值时刻之间的时间,即 T_0 到达峰值强度时间(T_1)之间的时间,是反映血管阻力的指标;②流入速率(wash in rate, WIR), T_0 与峰值强度时间 T_1 之间的最大

斜率,为门静脉血流灌注曲线评价指标,可以直接反映微循环血流量;③流出速率(wash out rate, WOR),峰值强度时间 T_1 和测量末端之间的最大斜率。

4. 病理组织学检查

全麻下剖腹取肝,按照 MRI 检查时所做横断切面取病理标本切片,厚度约 4 mm,切片做 HE 染色,两位病理医师镜下观察肝脏纤维化情况。按文献^[2]判断肝纤维化程度:0 级,无成纤维细胞增生,胶原纤维量正常;Ⅰ级,汇管区扩大,少量成纤维细胞增生,胶原纤维轻度增生;Ⅱ级,汇管区内成纤维细胞增生,胶原纤维呈条状延伸;Ⅲ级,汇管区内成纤维细胞大量增生,胶原纤维形成小叶纤维隔;Ⅳ级,伴肝硬化假小叶形成;

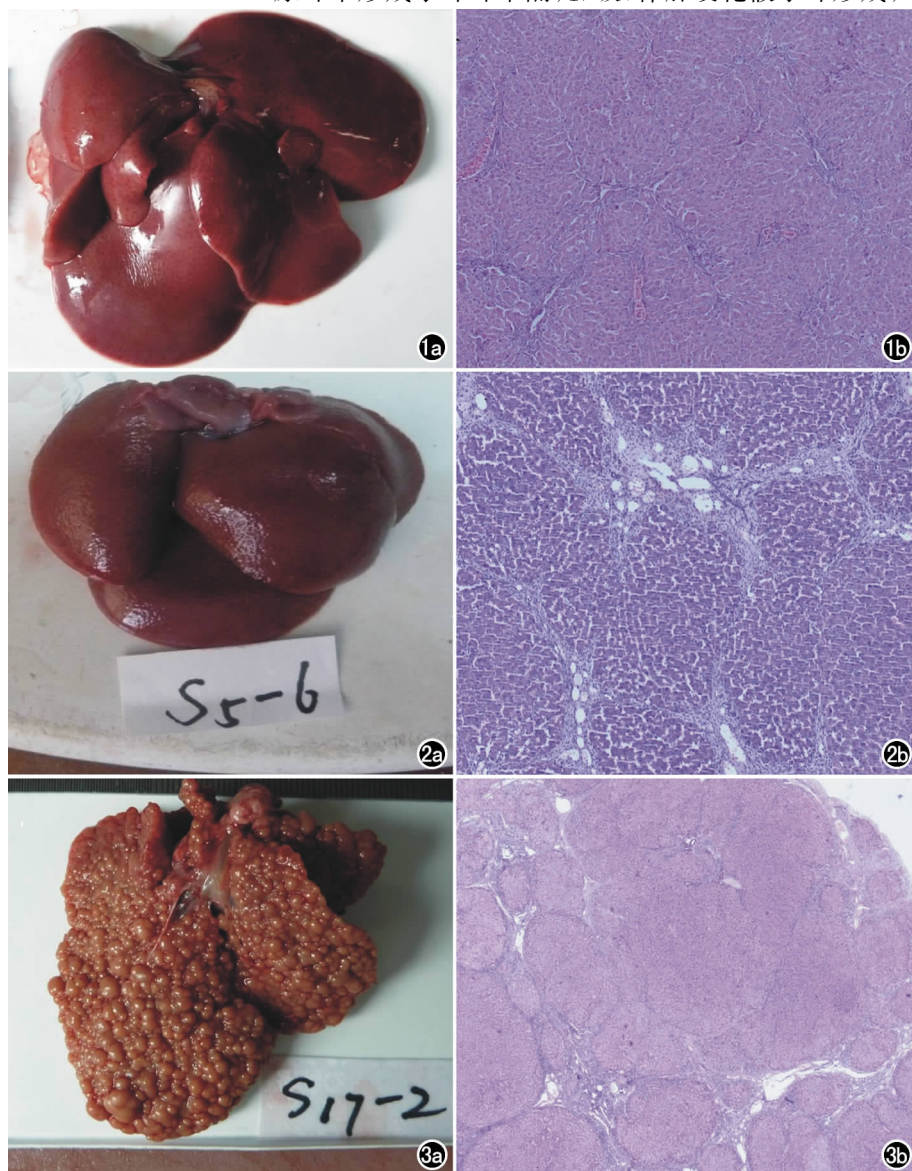


图 1 对照组。a) 鼠肝大体标本,质地光滑柔软;b) 病理切片(HE, $\times 400$)。

图 2 肝纤维化期。a) 鼠肝大体标本,肝脏标明不光泽,未见明显结节样改变;b) 肝细胞脂肪变性,肝小叶近中央静脉处肝细胞中-重度水变性,气球样变,汇管区纤维组织增生(HE, $\times 400$)。

图 3 肝硬化期。a) 鼠肝大体标本,可见肝质地毛糙,肝硬化结节突出于肝表面;b) 鼠肝 DN 有纤维隔,假小叶形成,部分肝细胞异型性变(HE, $\times 400$)。

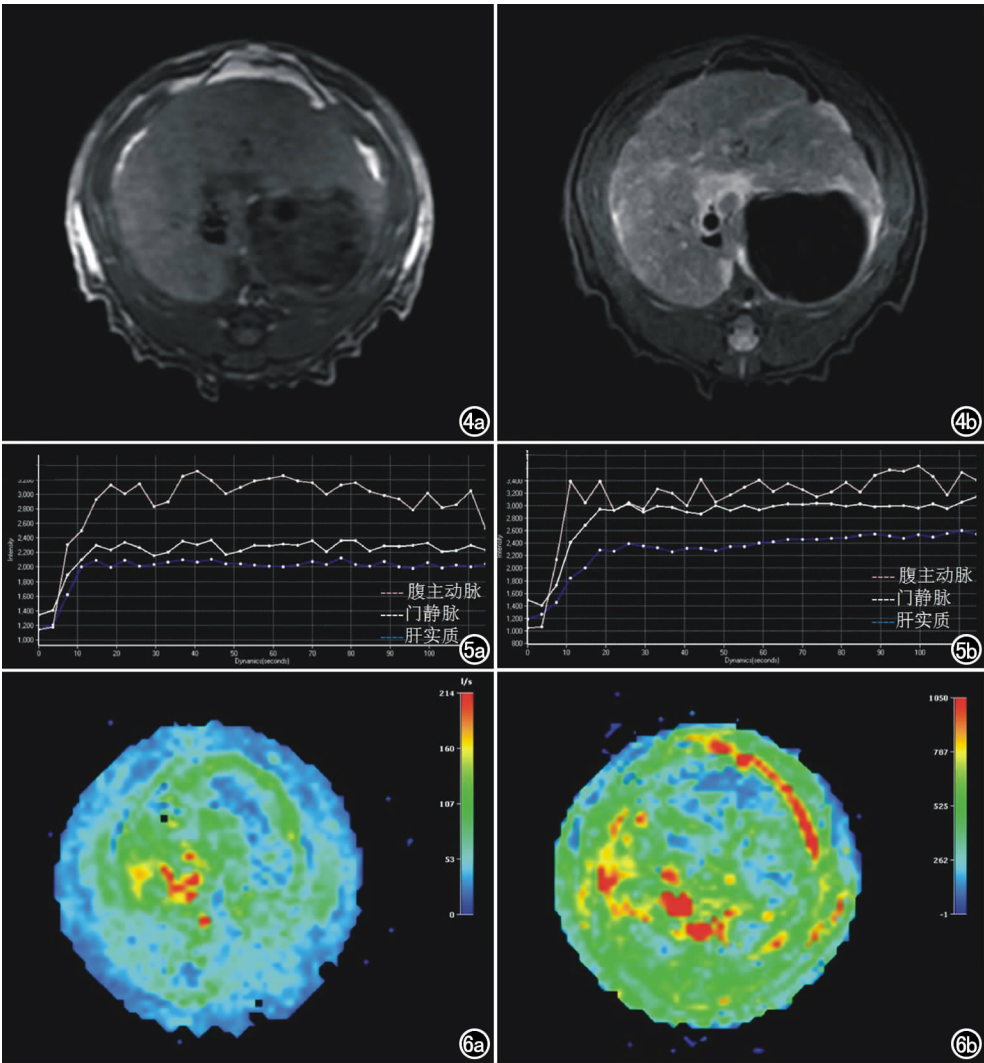


图 4 肝硬化组,大鼠肝脏边缘不光整,各叶比例失调,肝实质信号不均。a) T₁ WI; b) T₂ WI。
图 5 a) S₀ 期 TIC 曲线; b) 肝硬化期 TIC 曲线。 图 6 a) S₀ 期 PWI 伪彩图; b) 肝硬化期 PWI 伪彩图。

肝硬化结节期,大体观弥漫性肝结节(直径>2 mm)。

5. 统计学分析

使用 SPSS 19.0 统计学软件包对数据进行统计学处理。首先对灌注数据结果进行方差齐性检验及正态性检验(单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验),对不符合正态分布的数据结果用中位数(四分位数)表示,采用非参数检验(Kruskal-Wallis 检验)分析,对符合正态分布的数据结果进行单因素方差分析;各灌注参数与病理分级相关性,采用 Spearman 相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 肝脏纤维化-硬化模型门静脉灌注参数测量结果

参数	S0	S1-2	S3	S4	χ^2 值	P
TTP(s)	60.82(47.92,73.72)	87.27(66.32,98.61)	83.77(65.45,94.25)	73.30(62.83,97.74)	15.014	0.002
WIR(L/s)	269.39±81.38	268.94±111.1	262.26±99.19	216.54±113.17	2.679*	0.049
WOR(L/s)	40.88(30.70,67.72)	56.10(45.18,136.21)	73.02(40.89,104.00)	34.62(18.40,66.11)	20.058	0.000

注:由于 S1、S2 期病例数较少,所以并为一组进行统计学分析;* 采用单因素方差分析。

结 果

1. 动物观察及病理分型

大鼠饲养过程中,对照组 16 只,15 只存活;实验组 84 只中,MRI 检查前、后大鼠死亡 15 只,死亡率为 17%。病理诊断(图 1~3)肝纤维化 0 期(S₀ 期)15 只(共 12 只成功进行 MR-PWI 检查并后处理生成 TIC 曲线);肝纤维化 I 期(S₁)8 只(7),肝纤维化 II 期(S₂)10 只(8),肝纤维化 III 期(S₃)30 只(24),肝纤维化 IV 期(S₄)21 只(18)。

2. MR-PWI 表现

共 69 只大鼠成功获得较满意肝灌注图像(图 5~6)。主动脉灌注曲线形态呈骤升骤降型,分为升段、降段及水平段,水平段呈不规则锯齿样来回波动,肝纤维化各期之间差异无统计学意义。对照组门静脉灌注曲线呈速升速降型,峰值出现时间较主动脉迟,幅度较主动脉小,降段亦可见小幅锯齿样波动;肝实质灌注曲线稳定,波动小,动脉期上升缓慢,门静脉期上升较快并达峰值,降段缓慢;肝纤维化期及肝硬化结节期大鼠门静脉灌注曲线呈速升缓降型,峰值出现时间较主动脉晚,幅度小;肝实质灌注曲线稳定,波动小,动脉期上升缓慢峰值不明显,下降缓慢。

3. 门静脉灌注参数变化

对照组门静脉 TTP 低于肝纤维化各期,差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。门静脉 WIR 随着肝纤维化进展呈下降趋势,差异有统计学意义($P<0.05$),其中 S₄ 期下降最明显。门静脉 WOR 在 S₄ 期低于其余

表 2 肝脏纤维化-硬化模型肝实质灌注参数测量结果

参数	S0	S1-2	S3	S4	χ^2 值	P
TTP(s)	55.29(36.86,73.72)	94.25(87.27,101.23)	97.74(87.27,104.72)	102.22(73.62,114.26)	99.120	0.000
WIR(L/s)	111.28(86.83,129.52)	143.01(113.90,182.69)	124.42(104.54,153.75)	86.01(36.80,123.41)	58.202	0.000
WOR(L/s)	31.11(19.07,51.98)	27.09(11.25,58.09)	18.86(4.88,42.06)	12.13(4.67,29.97)	37.047	0.000

各期,差异有统计学意义($P<0.001$)。

4. 肝实质灌注参数

肝实质 TTP 随着肝纤维化的进展逐渐增加,差异有统计学意义($P<0.001$,表 2)。肝实质 WIR 肝硬化结节期低于其余各期,差异有统计学意义($P<0.001$)。肝实质 WOR 随着肝纤维化进展而逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.001$)。

5. MR-PWI 与肝纤维化-硬化分级的相关性

门静脉 TTP 与肝纤维化分级间呈轻度相关($r=0.420$, $P<0.001$),肝实质 TTP 与肝纤维化分级间呈轻度相关($r=0.424$, $P<0.001$);门静脉 WOR 与肝纤维化分级间存在相关性($r=-0.464$, $P<0.001$);肝实质 WIR 与肝纤维化分级间存在相关性($r=-0.488$, $P<0.001$),见表 3。门静脉 WIR 及肝实质 WOR 与肝纤维化-硬化分级之间的相关系数过低,尽管 $P<0.001$,实验结果仍认为门静脉 WIR 及肝实质 WOR 与肝纤维化-硬化分级之间不存在相关性。

表 3 肝脏纤维化-硬化模型灌注参数与肝纤维化分级相关性

参数	门静脉		肝实质	
	r 值	P 值	r 值	P 值
TTP	0.420	0.000	0.424	0.000
WIR	-0.230	0.003	-0.488	0.000
WOR	-0.464	0.000	-0.305	0.000

讨 论

肝纤维化是肝脏损伤后,多种细胞外基质过度沉积,纤维化增生,影响肝脏功能的过程^[3],以纤维组织大量增生、肝胆管变形或炎症、肝小叶结构无序化为特征。在肝纤维化进程中,肝脏整体及局部的血液动力学均发生变化,并出现肝动脉缓冲反应,即肝门静脉供血逐渐减少,并通过门体分流绕过肝脏实质,而肝动脉血流逐渐增多,以抵消门静脉血流减少的影响^[4]。另外,结缔组织广泛增生,肝血窦闭塞及窦周纤维化,假小叶形成及纤维结缔组织压迫小叶下静脉,同时部分肝动脉小分支与门静脉小分支在汇入肝窦前异常吻合,导致肝门静脉压力逐步增高。所以,伴随着纤维化、炎性反应的进展以及血液动力学的改变,肝脏组织的微循环代谢障碍逐渐显现^[5-6]。

PWI 可以观察肝脏微循环血流动力学变化,同时可以对组织活性和功能进行评价。依据成像原理,PWI 可大致分为 3 种类型:①对比剂首过灌注,分两种: T_1 加权动态对比增强磁共振成像(DCE-MRI),对

血管外细胞外间隙内对比剂较敏感,能够反应微血管灌注、渗透性及血管外细胞外间隙大小等情况; T_2/T_2^* 加权动态磁化率对比度成像(DSC-MRI),对血管内对比剂较敏感,可反应组织灌注、血容量等情况^[7]。②动脉血质子自旋标记技术(arterial spin labeling, ASL),利用血流内水分子自旋标记技术来观察微循环灌注情况。③血氧水平依赖的磁共振功能成像(BOLD-fMm),是 PWI 中的新领域^[8]。在 MR-PWI 中,目前最常用的是第一种方法,经静脉团注对比剂,而后采用快速扫描序列进行连续多层面、多次成像,获得一系列动态图像,目前较常用的序列是 3D 扰相梯度回波序列,它能够排除射频脉冲剖面作用导致的错误,具有较高的信噪比,同时应用敏感编码(sensitivity encoding, SENSE)技术,可以明显提高 PWI 的时间和空间分辨力。本研究以 TAA 诱导的大鼠肝纤维化、肝硬化模型为实验对象,采用对比剂团注示踪法进行检查,该方法能够反映组织血液灌注情况,从而间接评价组织微血管分布情况^[9-11]。在本实验中,门静脉的 TTP 及肝实质的 TTP 均与肝纤维化分期呈轻度正相关,门静脉的 WOR 及肝实质的 WIR 均与肝纤维化分期呈轻度负相关,与文献报道一致^[12],提示门静脉及肝实质的 TTP、WIR、WOR 等灌注参数作为 MR-PWI 分析的重要指标,可反映门静脉压力改变和肝实质灌注变化趋势。

正常肝组织主要由门静脉供血,肝脏 TIC 曲线呈缓升缓降特点,随着肝纤维化、肝硬化的进展,TIC 曲线也逐渐出现速升缓降变化^[13]。灌注参数可以从不同角度反映肝组织血流灌注情况:WIR 代表由血管增强开始到增强峰值的斜率,WOR 代表由血管增强峰值到第一循环结束时的斜率,两者都是单位时间内对比剂流入或流出引起组织信号升高或降低速度的改变,其变化程度受组织内对比剂浓度、血管通透性及血流速度等多项因素影响^[2,14-16]。肝实质 TTP 代表血浆内低分子量化合物(一般指顺磁性对比剂,如 GD-PA)自由进入肝 Disse 腔间隙的能力。本研究发现随着肝纤维化进展肝实质的 TTP 逐渐延长,可能是由于肝纤维组织增生以及假小叶形成造成肝血流异常,不成对的小动脉增多,肝窦毛细血管化以及窦后阻塞等,导致血管狭窄、闭塞,血流减慢,同时沉积在血管外间隙及 Disse 腔的胶原限制了化合物的移动,而小分子钆剂虽然能够通过变形的肝窦,但它在血管外间隙的

扩散减慢,故肝纤维化组肝实质 TIC 呈波形低平,TP 延长的特点^[17]。WIR 随着肝纤维化的进展逐渐递减,也反映肝实质灌注的下降趋势,但是肝纤维化早期及晚期组肝脏 WIR 与 S0 期 WIR 差异不明显,原因可能是此阶段肝纤维化的程度较轻,门脉血流阻力上涨幅度较小,肝脏可以通过自身的调节机制来补偿肝脏的血流灌注。肝硬化结节期肝实质灌注量明显下降,WIR 下降较明显,可能是由于随着肝纤维化的进展,大量胶原纤维沉积、肝小叶结构破坏及重构、肝硬化假小叶形成,压迫肝血窦^[18],同时肝窦内皮下基底膜形成,诱导肝窦毛细血管化,导致肝窦的渗透减压作用降低,肝硬化结节期出现新生及不成对血管,并形成较多闭塞血管及胆管纤维瘢痕^[19],这些都导致肝脏微循环阻力增高,肝实质灌注下降。

通过对大鼠肝纤维化模型的初步研究表明,PWI 通过观察肝脏血流灌注的变化,较准确地反映肝纤维化肝实质灌注下降和门静脉压力增高的血流动力学变化趋势,从而间接地反映了肝纤维化的发展过程及严重程度。作为一种无创性灌注测量技术,能够对不同阶段肝纤维化及肝硬化进行判断,有较好的应用前景和临床应用价值。但由于肝脏组织结构与双血供特点及肝脏灌注数学模型的复杂性,目前肝脏灌注血流精确定量尚未得到广泛应用。本实验受到检查设备软件限制,仅仅半定量分析了灌注参数 TTP、WIR、WOR 在不同时期肝纤维化、肝硬化中的数值变化^[20],不能提供肝动脉、门脉灌注量及肝总灌注量等指标,有其局限性^[21],今后有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] De Robertis R. Noninvasive diagnosis of cirrhosis: a review of different imaging modalities [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (23):7231.
- [2] Kanematsu M, Goshima S, Watanabe H, et al. Diffusion/perfusion MR imaging of the liver: practice, challenges, and future [J]. *Magn Reson Med Sci*, 2012, 11(3):151-161.
- [3] Batallr R, Brenner DA. Liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (2):209-218.
- [4] Eipel C. Regulation of hepatic blood flow; the hepatic arterial buffer response revisited [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16 (48): 6046-6057.
- [5] M Cke I, Richter S, Menger MD, et al. Significance of hepatic arterial responsiveness for adequate tissue oxygenation upon portal

- vein occlusion in cirrhotic livers [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2000, 15 (5-6):335-341.
- [6] 沈亚琪, 胡道予. 肝纤维化磁共振定量研究 [J]. *放射学实践*, 2012, 27(8):923-925.
- [7] 陈娟, 尹化斌. 磁共振灌注成像在肝脏疾病中的临床应用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2013, 29(10):793-796.
- [8] Jin N, Deng J, Chadashvili T, et al. Carbogen gas-challenge BOLD MR imaging in a rat model of diethylnitrosamine-induced liver fibrosis [J]. *Radiology*, 2010, 254(1):129-137.
- [9] Liu Y, Meyer C, Xu C, et al. Animal models of chronic liver diseases [J]. *Am J Physiol*, 2013, 304(5):G449-G468.
- [10] 闫成, 薛改, 刘建芳, 等. 硫代乙酰胺诱导大鼠持久性肝纤维化模型的制备 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(12):1937-1942.
- [11] 华晓萍, 张莉, 黄利, 等. 两种实验性肝纤维化大鼠模型肝脏组织学特点的比较研究 [J]. 2014, 19(7):741-751.
- [12] 刘鑫, 郭启勇, 廖伟, 等. 肝纤维化磁共振灌注成像的初步实验研究 [J]. *中国临床医学影像杂志*, 2009, 20(6):442-445.
- [13] 孟令平, 王国光, 胡明秀, 等. 大鼠肝纤维化和肝硬化 MR-PWI 参数与 CD34 和 α -SMA 的相关性 [J]. *放射学实践*, 2016, 31(7): 580-585.
- [14] Guan S, Zhao W, Zhou K, et al. Assessment of hemodynamics in precancerous lesion of hepatocellular carcinoma: evaluation with MR perfusion [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13 (8): 1182-1186.
- [15] 梁坚豪, 赵继泉, 曾惠良, 等. 磁共振灌注成像对肝硬化增生性结节与小肝癌的鉴别诊断 [J]. *临床医学工程*, 2012, 19(11):1863-1865.
- [16] Lee JH, Park MJ, Kim JK, et al. Assessment of angiogenesis of hepatocellular carcinoma using dynamic contrast enhanced MR and histopathologic correlation in an experimental rat model [J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61(130):447-452.
- [17] 黎钢, 沈比先, 谭四平, 等. 全肝 MR 容积动态增强扫描诊断肝纤维化的初步研究 [J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2015, 13(4):59-62.
- [18] Cichoz-Lach H, Celiński K, Słomka M, et al. Pathophysiology of portal hypertension [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59(Suppl 2): 231-238.
- [19] 李龔杼, 林楠, 卢逸, 等. 活化态肝星状细胞调控肝细胞癌微血管形成的机制 [J]. *中华肝脏外科手术学电子杂志*, 2014, 3(3):178-182.
- [20] Materne R, Smith AM, Peeters F, et al. Assessment of hepatic perfusion parameters with dynamic MRI [J]. *Magn Reson Med*, 2002, 47(1):135-142.
- [21] 胡晓峰, 刘斌, 钱银锋, 等. 磁共振灌注成像对肝纤维化的实验性研究 [J]. *放射学实践*, 2008, 23(10):1071-1075.

(收稿日期:2016-11-09)