

❖ 实验研究

Application of proton magnetic resonance spectroscopy in the rabbit models of liver fibrosis

WANG Qiu-shi, LIU Hui, LIANG Chang-hong*, LIU Zai-yi, ZHENG Jun-hui,
ZENG Qiong-xin, ZHANG Ming-hui

(Department of Radiology, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy
of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) in the diagnosis of liver fibrosis in rabbits. **Methods** Rabbits with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride and controls were examined with ^1H -MRS. According to histological fibrosis stage, the rabbits were divided into three groups: No fibrosis (S0), mild/moderate fibrosis (S1—S2), and severe fibrosis/cirrhosis (S3—S4). The peak areas of lipid, choline (Cho), glycogen and glucose complex (Glyu) as well as the ratios of Cho/lipid, Glyu/lipid were calculated and compared among groups of liver fibrosis. The ultra-structural changes of the liver were observed with transmission electronic microscope. **Results** Cho, Glyu, lipid decreased in mild/moderate fibrosis and increased in severe fibrosis/cirrhosis, while Cho/lipid and Glyu/lipid increased gradually as the severity of fibrosis progressed. Of all parameters, only Cho/lipid was statistically different between severe fibrosis/cirrhosis and the other groups of fibrosis ($P < 0.05$). On electron microscopy, the main abnormalities in mild/moderate fibrosis were hepatocyte injury, while in severe fibrosis and cirrhosis, both hepatocyte injury and extracellular matrix deposition were prominent. **Conclusion** Destroyed hepatocytes result in reduction of intracellular metabolites, while extracellular matrix accumulation disturbs excretion of metabolites. The spectral abnormalities of ^1H -MRS in liver fibrosis are consistent with ultra-structural alterations. Cho/lipid is an effective marker for detecting severe fibrosis/cirrhosis.

[Key words] Liver cirrhosis; Magnetic resonance spectroscopy; Microscopy, electron; Animals, experimentation

磁共振氢质子波谱在兔肝纤维化模型中的应用

王秋实, 刘 辉, 梁长虹*, 刘再毅, 郑君惠, 曾琼新, 张明辉

(广东省人民医院放射科 广东省医学科学院, 广东 广州 510080)

[摘要] **目的** 通过动物模型评价氢质子磁共振波谱(^1H -MRS)在肝纤维化诊断中的应用价值。**方法** 对以四氯化碳诱导产生的肝纤维化模型兔和对照组兔行 ^1H -MRS检查, 获得肝脏主要含氢代谢物的波峰下面积, 包括脂质(lipid)、胆碱(Cho)、糖原/葡萄糖复合物(Glyu), 同时计算代谢物与脂质的波峰下面积比值(Cho/lipid、Glyu/lipid)。以病理学肝纤维化分期为基础将兔划分为无纤维化组(S0)、轻中度纤维化组(S1~S2)和重度纤维化/肝硬化组(S3~S4), 比较不同组间 ^1H -MRS参数变化情况, 同时观察透射电镜下肝脏超微结构的变化。**结果** Cho、Glyu和lipid在轻中度纤维化组降低, 在重度纤维化/肝硬化组升高; Cho/lipid和Glyu/lipid随肝纤维化的加重而升高。重度纤维化/肝硬化组与另两组Cho/lipid比较, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05), 其余指标在纤维化各组间差异无统计学意义。肝组织超微结构改变在轻中度纤维化时以肝细胞损伤为主, 在重度纤维化/肝硬化时肝细胞损伤与细胞外纤维基质沉积并重。**结论** 肝纤维化时肝细胞损伤引起代谢物减少, 细胞外基质沉积阻碍代谢物排出, ^1H -MRS变化是对肝组织超微结构改变的综合反映。Cho/lipid是检测重度纤维化/肝硬化的有效指标。

[关键词] 肝硬化; 磁共振波谱; 显微镜检查, 电子; 动物实验

[中图分类号] R575.2; R445.2; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2010)05-0789-04

[基金项目] 广东省医学科研基金课题(A2009026)。

[作者简介] 王秋实(1974—), 女, 辽宁鞍山人, 博士, 副主任医师。研究方向: 腹部影像诊断。E-mail: wangqscmu@gmail.com

[通讯作者] 梁长虹, 广东省人民医院放射科 广东省医学科学院, 510080。E-mail: dr_liang62@hotmail.com

[收稿日期] 2009-11-22 **[修回日期]** 2010-01-22

氢质子磁共振波谱(proton magnetic resonance spectroscopy, ^1H -MRS)是研究活体组织器官生化改变及代谢状态的一种无创性功能成像技术,在肝纤维化的研究中尚存在很多争议,且缺乏相关的基础研究予以解释^[1-2]。本研究采用动物模型研究不同程度肝纤维化的 ^1H -MRS 表现,探讨其与电镜下肝脏超微结构改变之间的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作 健康新西兰大白兔 45 只,雄性,3 个月龄,体质量 2.0~3.0 kg,由中山大学医学动物实验中心提供。随机分为 6 组:第 1~5 组为实验组,每组 8 只,共 40 只兔;第 6 组为对照组,5 只兔。实验组和对照组分别每周腹腔注射 1 次四氯化碳和生理盐水,剂量均为 0.1 ml/kg。在给药第 8、12、16、20、24 周周末分别选择对照组 1 只兔及 1 组实验组兔行 MR、MRS 检查后并处死(每个时间点检查及处死 1 组兔)^[3]。

1.2 MR 扫描 晨起停饲,检查前以 5 ml/kg 经耳缘静脉注射 20%氨基甲酸乙酯进行麻醉。采用 GE Signa Twinspeed 1.5T 双梯度超导 MR 仪,膝关节线圈。兔取仰卧位,腹部加压固定,将肝脏置于线圈中心。常规扫描序列(轴位 FSE T2WI、FSE T2WI 压脂序列、FSE T1WI)后行 ^1H -MRS 检查。 ^1H -MRS 应用单体素点分辨波谱分析(point-resolved spectroscopy, PRESS)序列进行检查,TR 1500 ms,TE 35 ms,激励次数 8,视野 16 cm×16 cm,感兴趣区分别置于肝左叶和右外叶,避开肝内大血管、肝周脂肪和气体,感兴趣容积(volume of interest, VOI)大小为 10 mm×10 mm×10 mm。在感兴趣区上下、前后、左右加饱和带以消除周围脂肪及气体的影响。采集 MRS 数据前先进行自动预扫描,包括匀场和抑水,观察水峰的半高全宽(full width at half maximum, FWHM)和抑水率(water suppression, WS),在 FWHM≤15 Hz、WS≥95%时行波谱采集。

1.3 ^1H -MRS 后处理及图像分析 在 MR 扫描仪上使用 GE Sage 7.0 软件对扫描数据进行后处理,软件可自动完成图像滤过重建、零填充、相位校正、基线校正程序,将波谱原始数据转化为标准的波谱图像。对于基线平稳、重要波峰可以辨认、无明显重叠的波谱图像进行分析,可用波峰的标准为信噪比>3^[4]。手动标记波谱图像中不同代谢物,软件自动计算得出各代谢物的波峰下面积。肝脏 ^1H -MRS 的 3 个主要代谢峰为:脂质(lipid):0.9~2.5 ppm;胆碱(choline, Cho):3.2 ppm;糖原与葡萄糖复合物峰(glycogen and glucose complex, Glyu):3.35~3.90 ppm;甘油三酯(triglyceride, TG)的亚甲基:1.4 ppm,该波峰最高,用其代表脂质的代谢变化(图 1)。记录波峰下面积作为代谢物含量的半定量指标,计算某代谢物波峰下面积/脂质波峰下面积作为代谢物含量的相对定量指标。

1.4 病理学检查 光镜检查:MR 扫描后立即取兔肝脏,10%甲醛固定,取材尽量与 MR 检查中感兴趣区设置层面相

表 1 肝纤维化不同组别 ^1H -MRS 结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Cho	Glyu	lipid	Cho/lipid	Glyu/lipid
无纤维化组	0.05±0.02	0.04±0.01	0.94±0.63	0.07±0.04*	0.05±0.02
轻中度纤维化组	0.04±0.03	0.03±0.02	0.59±0.51	0.10±0.08*	0.07±0.09
重度纤维化/肝硬化组	0.08±0.06	0.05±0.06	0.75±0.69	0.16±0.09	0.13±0.10
F 值	2.41	1.78	0.72	4.36	2.31
P 值	0.10	0.18	0.49	0.02	0.12

注:*,与重度纤维化/肝硬化组比较, $P<0.05$

对应,行 HE、Masson 胶原纤维染色和网状纤维染色。肝纤维化分期程度判定采用 5 分期:S0:无肝纤维化;S1:无汇管区扩大纤维化及局限窦周纤维化;S2:汇管区周围纤维化或纤维间隔形成,小叶结构保留;S3:大量纤维间隔形成伴小叶结构紊乱,无肝硬化;S4:可能的或肯定伴有肝硬化形成。电镜检查:对照组及每个实验组各 2 只兔处死后立即取肝,切除大小约 1 mm×1 mm×3 mm 肝组织即刻经 2.5%戊二醛固定,常规电镜标本制作,于 Philips CM10 透射电镜下观察肝组织超微结构改变。

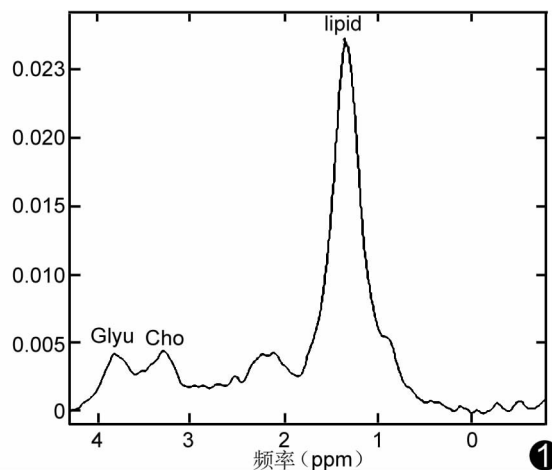


图 1 兔肝脏 ^1H -MRS 各代谢物波峰组成

1.5 统计学分析 所有测量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。根据病理结果将兔分为无纤维化组(S0)、轻中度纤维化组(S1~S2)、重度纤维化/肝硬化组(S3~S4)。对不同分组间 ^1H -MRS 各代谢物半定量指标及相对定量指标结果进行单因素方差分析,组间两两比较用最小显著差法(LSD); $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 造模期间对照组无死亡,实验组死亡 18 只,共 27 只兔完成实验。兔分组情况及各组肝纤维化分布为:无纤维化组($n=7$,包括全部对照组兔及 2 只实验组兔)、轻中度纤维化组($n=9$,S1 期 4 只、S2 期 5 只)、重度纤维化/肝硬化组($n=11$,S3 期 5 只、S4 期 6 只)。

2.2 ^1H -MRS 完成情况 27 只兔均行 ^1H -MRS 检查。1 只兔肝左叶自动预扫描失败,1 只兔肝左叶自动预扫描后 FWHM>20 Hz、WS<95%而中止波谱检查,肝左叶 MRS 扫描成功率为 92.59%(25/27)。所有动物肝右外叶 ^1H -MRS 自动预

扫描均可达到标准,扫描成功率为 100%(27/27)。所得 52 幅波谱图像,3 幅因波谱基线不稳、噪声过大而被排除,3 幅因主要波峰重叠过大而认为不合格未作进一步分析,所得波谱图像合格率为 88.46%(46/52)。

2.3 ^1H -MRS 结果 无纤维化组、轻中度纤维化组及重度纤维化/肝硬化组 ^1H -MRS 各代谢物含量指标见表 1。随纤维化分组严重程度进展,Cho、Glyu 和 lipid 含量先下降再上升;Cho/lipid 和 Glyu/lipid 则依次升高。其中 Cho/lipid 在重度纤维化/肝硬化组与无纤维化组和轻中度纤维化组间差异有统计学意义($P=0.015$ 、

0.030),但在无纤维化组与轻中度纤维化组间差异无统计学意义($P>0.05$),其余指标在纤维化各组间差异无统计学意义。

2.4 肝脏超微结构改变 无纤维化组肝细胞之间界限清晰,细胞膜完整,胞质内可见丰富的细胞器和糖原;肝窦内皮细胞胞质有大量窗孔,窦周隙无明显纤维沉积(图 2)。轻中度纤维化时肝组织超微结构改变以不同程度的肝细胞损伤为主,表现为部分肝细胞肿胀、皱缩,胞质内细胞器肿胀、糖原减少,肝细胞间界限多存在(图 3);肝窦内皮细胞部分失窗孔,窦周隙可见少量纤维沉积。重度纤维化/肝硬化时可见大量细胞外纤维基质沉积,表现为肝窦内皮细胞窗孔消失,内皮下基底膜形成,窦周隙显著纤维形成并沿间质延伸;肝细胞仍可见明显损伤,胞质内糖原增多,严重者细胞器溶解消失,细胞膜破裂,肝细胞间界限消失(图 4)。

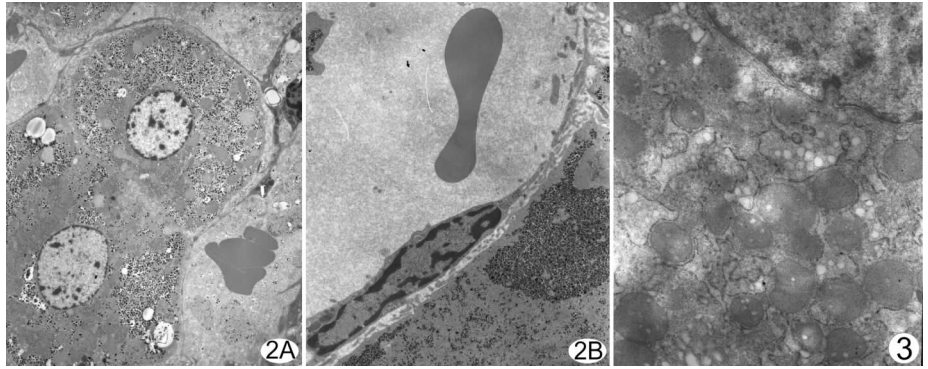


图 2 无纤维化组 A. 肝细胞界限清晰,细胞膜完整,细胞质内见丰富细胞器及糖原颗粒(TEM, $\times 2500$); B. 肝窦与肝细胞肝窦面,肝窦内皮细胞胞质存在大量窗孔(TEM, $\times 6000$) 图 3 轻中度纤维化组 肝细胞胞质内线粒体明显肿胀,粗面内质网轻度扩张并脱颗粒,糖原颗粒减少(TEM, $\times 10\ 000$)

来监测肝内脂质代谢变化。Cho 波峰与细胞膜的合成、分解以及磷脂代谢有关,此峰强度的增加认为是细胞更新的一个有效指标。Glyu 峰群与肝内糖代谢有关^[5-6]。正常肝脏和病变组织上述代谢物的组成和含量存在差异,根据 ^1H -MRS 谱线变化和曲线下面积的计算可以定性、定量分析肝内代谢物变化。

以往研究多选择代谢物/脂质或代谢物/ H_2O 的相对定量指标进行分析^[1,7-8],但在肝纤维化的发展过程中,肝内脂质及 H_2O 的含量并非恒定不变。本研究发现,在肝纤维化的发展过程中,部分实验动物会出现轻微脂肪变性、明显的水样变性等,因此仅使用代谢物/脂质或代谢物/ H_2O 比值作为指标进行分析有欠准确。本实验中磁共振信号的激发、采集及处理参数基本一致,所获得的半定量指标具有可比性,可反映肝内代谢物浓度的变化。以故本实验不仅使用相对定量指标(代谢物/脂质),也使用半定量指标(代谢物峰下面积)对 ^1H -MRS 进行量化分析。

本研究显示,随肝纤维化的加重,Cho、Glyu、lipid 先下降再上升。Corbin 等^[9]在肝纤维化的 ^{31}P -MRS 研究中发现,“肝细胞面积比例”(liver cell area ratio, LCAR)降低与肝内代谢物 ATP 浓度降低呈正相关。在本研究中,伴随肝纤维化的形成和进展,超微结构观察可见兔肝细胞出现不同程度的损伤,正常肝细胞数量减少,使肝内各代谢产物的实际数量减少,这可能是 Cho、Glyu、lipid 三种代谢物的含量在轻中度肝纤维化时出现不同程度下降的原因。然而,在重度纤维化和肝硬化时,肝小叶结构紊乱,肝内大量胶原纤维与网状纤维增生,电镜显示肝细胞损伤,肝窦毛细血管化和窦周隙大量纤维物质沉积,此时 Cho、Glyu、lipid 含量再次升高,考虑与纤维化细胞外基质沉积导致肝内结构紊乱及肝窦毛细血管化影响代谢物的交换和排出有关^[1]。笔者推测肝纤维化时,肝细胞损伤引起代谢物数量减少和细胞外基质沉积引起代谢物排出受阻共同影响 ^1H -MRS 中肝内代谢物的检测,占主导地位的因素即决定肝内代谢物的含量的变化。本研究中 Cho、Glyu 和 lipid 的变化可能反映了肝纤维化早期以肝细胞损伤为主、晚期以细胞外基质沉积为主的病理学超微结构改变。本研究同时发

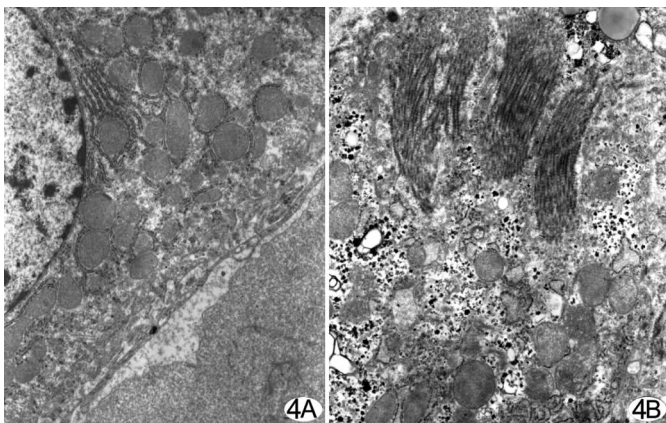


图 4 重度纤维化/肝硬化组 A. 肝窦内皮细胞窗孔消失(TEM, $\times 8000$); B. 肝细胞膜崩解,细胞质溢出,可见大量纤维沉积(TEM, $\times 8900$)

3 讨论

^1H -MRS 可检测出生物体细胞内的许多代谢物,在肝脏主要有 lipid、Cho、Glyu 等,其中 lipid 内 TG 波峰最高,可用

现 Cho、Glyu 含量在重度纤维化/肝硬化组最高,提示在晚期纤维化时,肝细胞更新活跃、糖原分解减少,这与电镜下观察到的明显肝细胞损伤修复、胞质内糖原增多等改变一致。由此可见,不同纤维化分期时肝内¹H-MRS 中各代谢物含量的变化机制可以由相应的病理学改变解释。然而,不同肝纤维化分期时上述各代谢物的半定量指标间差异总体上不显著,尚无法用于定量肝纤维化程度,提示不同纤维化分期时肝内各代谢物的绝对浓度变化并不明显。

本研究中,Cho/lipid 和 Glyu/lipid 随肝纤维化的加重而升高,与以往报道^[1,7]随纤维化分期进展代谢物/脂质逐渐升高相同,可能与 Cho、Glyu 随肝纤维化程度的加重,相对含量较 lipid 增加有关。其中 Cho/lipid 在重度纤维化/肝硬化组与另外两组比较差异有统计学意义,但尚不能从无纤维化组中有效地检出轻中度纤维化病例,提示¹H-MRS 具备一定的检测重度肝纤维化的能力,但对于早期纤维化的检出具有局限性。由于肝纤维化的划分是以病理上形态学改变为依据,而¹H-MRS 反映的是功能层面肝脏代谢的变化情况,代谢的改变往往先于形态变化,可能是导致¹H-MRS 无法有效检出早期肝纤维化的原因。

兔肝纤维化模型初步¹H-MRS 研究表明,不同程度肝纤维化时含氢代谢物含量变化可由相应的肝组织超微结构改变进行解释,Cho/lipid 相对含量随纤维化的加重而增加,具备一定的定量肝纤维化及检测重度纤维化/肝硬化的能力。¹H-MRS 通过探测肝内多种代谢物的组成和含量变化,可为评价肝纤维化提供新的信息。

[参考文献]

- [1] Cho SG, Kim MY, Kim HJ, et al. Chronic hepatitis: in vivo proton MR spectroscopic evaluation of the liver and correlation with histopathologic findings. *Radiology*, 2001, 221(3):740-746.
- [2] Lim AK, Hamilton G, Patel N, et al. ¹H MR spectroscopy in the evaluation of the severity of chronic liver disease. *Radiology*, 2003, 226(1):288-289.
- [3] 王秋实,刘辉,梁长虹,等.血液生化学与磁共振弥散加权成像在兔肝纤维化中的诊断价值比较及相关性分析. *中国医学影像技术*, 2009, 25(11):1961-1964.
- [4] Kuo YT, Li CW, Chen CY, et al. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of large focal hepatic lesions and metabolite change of hepatocellular carcinoma before and after transcatheter arterial chemoembolization using 3.0T MR scanner. *J Magn Reson Imaging*, 2004, 19(5):598-604.
- [5] 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. *Gut*, 2005, 54(1):122-127.
- [6] 吴坚,叶慧义,孙非,等.肝细胞癌 3.0T MR 氢质子波谱的初步研究. *中国医学影像技术*, 2006, 22(12):1856-1859.
- [7] Tarasów E, Wiercińska-Drapalo A, Jaroszewicz J, et al. Metabolic disturbances in liver ¹H MR spectroscopy in HIV and HCV co-infected patients as a potential marker of hepatocyte activation. *Acta Radiol*, 2004, 45(8):803-809.
- [8] Orlicchio A, Bolacchi F, Angelico M, et al. In vivo, high-field, 3-Tesla ¹H MR spectroscopic assessment of liver fibrosis in HCV-correlated chronic liver disease. *Radiol Med*, 2008, 113(2):289-299.
- [9] Corbin IR, Buist R, Peeling J, et al. Hepatic ³¹P MRS in rat models of chronic liver disease: assessing the extent and progression of disease. *Gut*, 2003, 52(7):1046-1053.

使用阿拉伯数字和汉字数字的一般原则

根据 GB/T 15835《出版物上数字用法的规定》

(1)在统计图表、数学运算、公式推导中所有数字包括正负整数、小数、分数、百分数和比例等,都必须使用阿拉伯数字。

(2)在汉字中已经定型的词、词组、成语、缩略语等都必须使用汉语数字,例如:一次方程、三维超声、二尖瓣、法洛四联症、星期一、五六月、八九个月、四十七八岁等。

(3)除了上述情况以外,凡是使用阿拉伯数字而且又很得体的地方,都应该使用阿拉伯数字。遇到特殊情况时,可以灵活掌握,但应该注意使全篇同一。

(4)如果数字的量级小于 1 时,小数点前面的零(0)不能省去,如 0.32 不能写成.32。