

❖ 实验研究

Acoustic radiation force impulse and aspartate aminotransferase to platelet ratio index for evaluation of liver fibrosis in rabbits

WANG Rui, MA Su-mei*, ZHANG Xiao-yuan, YAO Ya-ning, YANG Dong-hong, FENG Fei
(Department of Ultrasound, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective** To assess the value of acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography and AST to platelet ratio index (APRI) for staging liver fibrosis in rabbit models. **Methods** Liver fibrosis models (model group) were established in 32 rabbits by subcutaneously infusing thioacetamide (TAA), 8 rabbits were enrolled as control group. Some rabbits in model group and the control group were randomly selected and underwent ARFI elastography in order to obtain the shear wave velocity (SWV) respectively at the 4th, 8th and 12th week after the first injection. APRI was calculated through routine biochemical examination, and the rabbit's liver were taken for pathology analysis. Taking histopathological staging of liver fibrosis as golden standards, the diagnostic performance of SWV and APRI were compared using ROC curve analysis. **Results** Liver fibrosis models were successfully established in 29 rabbits, among them 10, 8, 7 and 4 were classified as S1, S2, S3 and S4 of liver fibrosis by pathology, respectively. The mean value of SWV and APRI increased with the exacerbation of liver fibrosis ($P < 0.05$). SWV ($r = 0.724$, $P < 0.05$) and APRI ($r = 0.555$, $P < 0.05$) showed correlation with fibrosis. The area under tROC curves for SWV and APRI was 0.92 and 0.81 for $S \geq 1$, 0.87 and 0.78 for $S \geq 2$, 0.82 and 0.76 for $S \geq 3$, 0.89 and 0.79 for $S = 4$, respectively. The area under ROC curves for combination SWV and APRI in the diagnosis of $S \geq 3$ was 0.84, for the sensitivity was 81.80%, the specificity was 73.10%, the positive predictive value was 56.23%, the negative predictive value was 90.48%. **Conclusion** Both ARFI and APRI can provide accurate quantitative evaluation of liver fibrosis in rabbits. ARFI is better than APRI for diagnosis of liver fibrosis.

[Key words] Liver fibrosis; Rabbits; Acoustic radiation force impulse; Elasticity imaging techniques

声辐射力脉冲技术和天门冬氨酸氨基转移酶与血小板比值指数评价家兔肝纤维化

王蕊, 马苏美*, 张晓媛, 姚亚宁, 杨东红, 冯菲

(兰州大学第一医院超声科, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的** 探讨声辐射力脉冲(ARFI)技术和天门冬氨酸氨基转移酶与血小板比值指数(APRI)评价家兔肝纤维化模型的价值。**方法** 应用硫代乙酰胺(TAA)对32只家兔以皮下注射的方法建立肝纤维化模型,以8只家兔作为对照组。于首次注射后第4、8、12周分批应用ARFI获取剪切波速度(SWV),计算APRI,取其肝脏行病理肝纤维化分期。以病理检查结果为金标准,比较SWV和APRI指数对家兔肝纤维化分期的诊断价值。**结果** 共29只家兔造模成功,其中肝纤维化分期为S1、S2、S3和S4期者分别为10、8、7和4只。SWV值和APRI均随纤维化程度加重而增高($P < 0.05$)。SWV ($r = 0.724$, $P < 0.05$)和APRI ($r = 0.555$, $P < 0.05$)与肝纤维化病理分级均存在相关性。SWV和APRI诊断家兔肝纤维化 $S \geq 1$ 、 $S \geq 2$ 、 $S \geq 3$ 、 $S = 4$ 的ROC曲线下面积分别为0.92、0.81、0.87、0.78、0.82、0.76、0.89、0.79。SWV和APRI联合诊断 $S \geq 3$ 的AUC为0.84,敏感度为81.80%,特异度为73.10%,阳性预测值为56.23%,阴性预测值为90.48%。**结论**

[作者简介] 王蕊(1988—),女,宁夏吴忠人,在读硕士。研究方向:肝脏疾病的超声诊断。E-mail: wangrui19871113@126.com

[通讯作者] 马苏美,兰州大学第一医院超声科,730000。E-mail: lzmsm6711@163.com

[收稿日期] 2013-11-07 **[修回日期]** 2014-01-19

ARFI 技术与 APRI 可定量评估家兔肝纤维化程度, ARFI 技术的价值较高。

[关键词] 肝纤维化;兔;声辐射力脉冲;弹性成像技术

[中图分类号] R-332; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2014)03-0329-05

肝纤维化是所有肝脏疾病慢性损伤后的共同病理特征,可进一步发展为肝硬化甚至肝癌;肝纤维化和早期肝硬化可逆转已成共识,准确定量评估和分析肝纤维化对治疗和改善预后具有重要意义。研究^[1-2]证实声辐射力脉冲(acoustic radiation force impulse, ARFI)技术和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)与血小板(platelet, PLT)比值指数(AST/PLT ratio index, APRI)诊断模型均可无创预测肝纤维化程度。本研究采用硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)建立家兔肝纤维化模型,以 ARFI 技术和 APRI 指数定量评价家兔肝纤维化程度。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 普通健康家兔 40 只,购自兰州大学动物实验中心[许可证号:SCXK(甘)2013-0002],4~6 月龄,体质量 2.0~2.5 kg,雌雄各半,随机分为模型组 32 只和对照组 8 只,单笼、复合颗粒饲料喂养,自由饮水。

1.2 模型建立 适应性饲养 1 周后,模型组皮下注射生理盐水配制的 5% TAA(Sigma),对照组皮下注射生理盐水。首次注射剂量 1.5 ml/kg 体质量,后改为

1 ml/kg 体质量,每周 2 次,共 12 周,期间观察动物饮食情况、毛色、精神状态,注射前称重,根据一般状况随时调整注射剂量^[3]。模型组分别在建模第 4、8、12 周随机取 9~10 只、对照组取 3~4 只家兔获取实验数据。

1.3 血生化指标检测 空腹时经耳缘静脉取血 5 ml,行 AST 和 PLT 检测。APRI 计算公式:APRI=AST(ULN)×100/PLT(10⁹/L),ULN 为 AST 正常上限^[4]。

1.4 仪器与方法 采用 Siemens Acuson S2000 超声成像仪和 ARFI 技术软件,9L4 线阵探头,频率 4~9 MHz。以 10%水合氯醛 3 ml/kg 体质量腹腔注射麻醉后仰卧保定于兔架,8%硫化钠液脱净肝区毛发。对家兔肝脏进行二维超声扫查后,避开肝内管道结构,选择平行于右肋缘上第三肋间右肝切面,保持探头固定,激活 ARFI 功能,垂直腹壁距包膜 1~2 cm 处取样,获得该处剪切波速度(shear wave velocity, SWV),重复 10 次,成功率(SC)>60%,且四分位间距与测量值中位数的比值(IQR/M)<30%纳入统计数据^[5],去掉最大及最小值后取平均值。

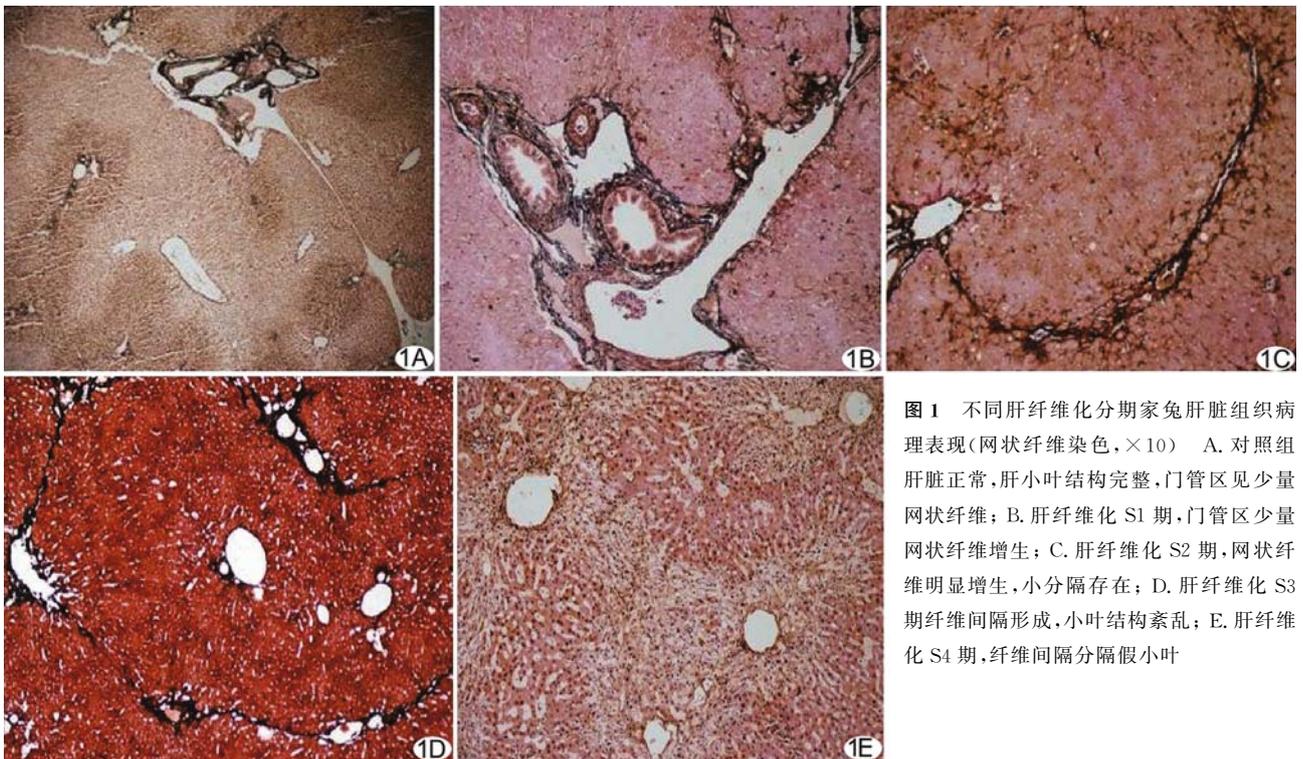


图 1 不同肝纤维化分期家兔肝脏组织病理表现(网状纤维染色,×10) A. 对照组肝脏正常,肝小叶结构完整,门管区见少量网状纤维; B. 肝纤维化 S1 期,门管区少量网状纤维增生; C. 肝纤维化 S2 期,网状纤维明显增生,小分隔存在; D. 肝纤维化 S3 期纤维间隔形成,小叶结构紊乱; E. 肝纤维化 S4 期,纤维间隔分隔假小叶

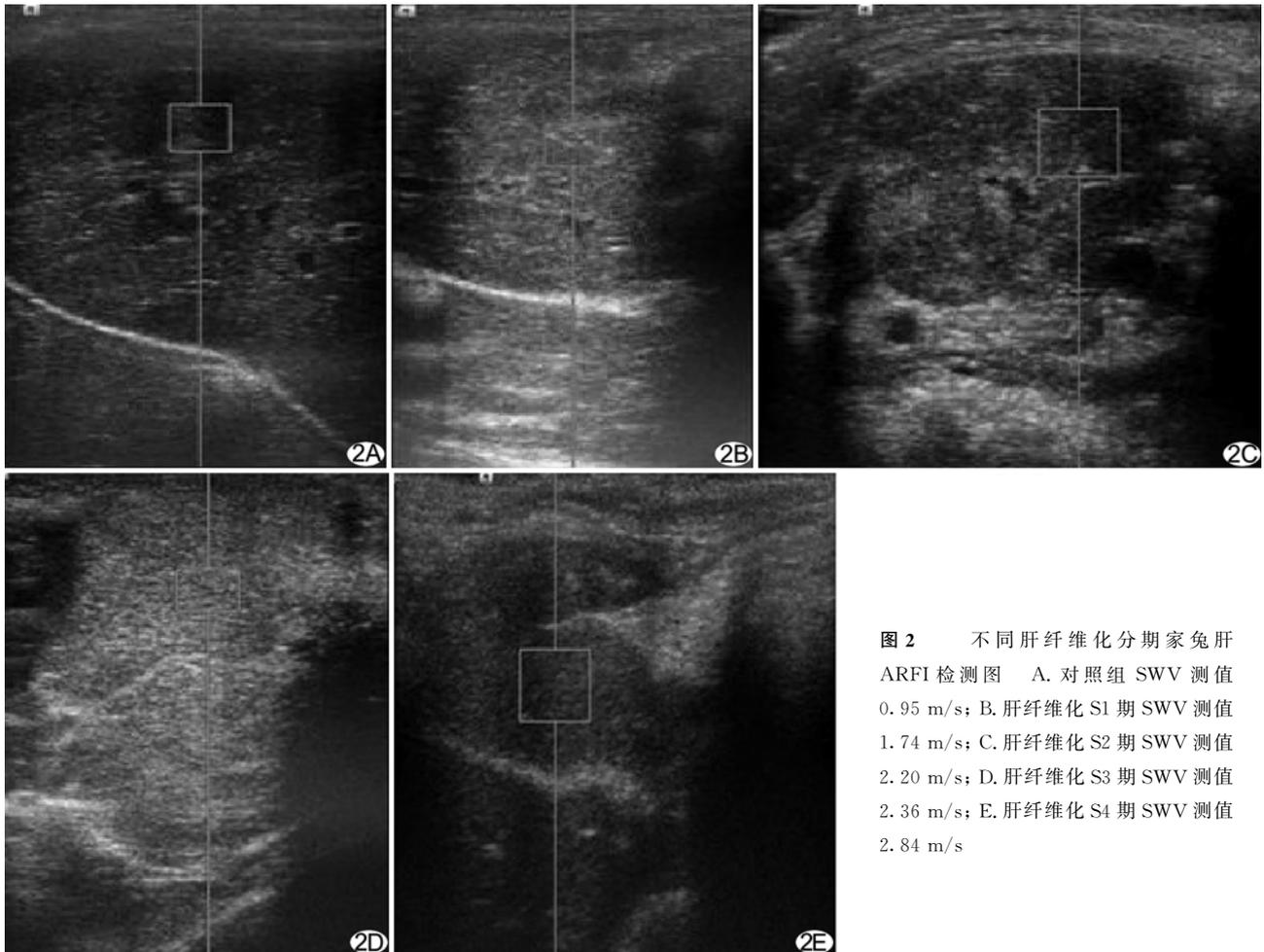


图 2 不同肝纤维化分期家兔肝 ARFI 检测图 A. 对照组 SWV 测值 0.95 m/s; B. 肝纤维化 S1 期 SWV 测值 1.74 m/s; C. 肝纤维化 S2 期 SWV 测值 2.20 m/s; D. 肝纤维化 S3 期 SWV 测值 2.36 m/s; E. 肝纤维化 S4 期 SWV 测值 2.84 m/s

1.5 病理学检查 超声检查结束后立即以空气栓塞法处死动物,剖腹选择 ARFI 检测区域进行取材,所取肝组织大小约 20 mm×10 mm×15 mm,固定后行 HE 染色、Masson 及网状纤维染色。参照 2000 年病毒性肝炎防治方案标准进行肝纤维化病理分级^[6]。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 及 Medcalc 11.5.0.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间采用单因素方差性分析,以 Spearman 相关分析进行相关性检验;以 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 评价诊断效能;采用 Logistic 回归分析进行风险预测,并通过预测值绘制诊断肝纤维化的 ROC 曲线。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

模型组中 3 只家兔死亡,其中 2 只行病理检查发现肝脏严重坏死而无纤维化,死于急性肝功能衰竭,另 1 只死于腹泻。29 只家兔造模成功,其中肝纤维化分期为 S1、S2、S3 和 S4 期者分别为 10、8、7 和 4 只;对照组家兔全部存活。最终 37 只家兔纳入研究,均完成

ARFI 检测并获得肝实时弹性值。家兔不同肝纤维化分期病理图和 ARFI 检测图见图 1、2。

表 1 家兔不同肝纤维化分期肝 ARFI 与 APRI 测值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ARFI 值(m/s)	APRI 指数
模型组 (n=29)		
S1 期 (n=10)	1.71±0.51	0.33±0.29
S2 期 (n=8)	2.25±0.71	0.59±0.47
S3 期 (n=7)	2.36±0.70	0.73±0.57
S4 期 (n=4)	2.89±0.62	1.47±1.33
对照组 (n=8)	1.13±0.13	0.17±0.15

2.1 SWV 值及 APRI 指数 对照组与模型组各期总体 SWV 和 APRI 差异有统计学意义 (F=9.071、4.351, P<0.05), 不同纤维化分期的测值见表 1。两两比较,对于 SWV,除 S2 与 S3、S2 与 S4、S3 与 S4 间差异无统计学意义 (P>0.05) 外,余各组间差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); 对于 APRI,仅 S4 与对照

表 2 ARFI 与 APRI 指数对家兔肝纤维化的诊断性能

纤维化分期诊断技术	S \geq 2		S \geq 3		S=4	
	APRI	ARFI	APRI	ARFI	APRI	ARFI
诊断截值	1.62	0.37	1.96	0.45	2.04	1.78
曲线下面积	0.87	0.78	0.82	0.76	0.89	0.79
95%CI	0.72~0.96	0.62~0.90	0.66~0.93	0.59~0.89	0.74~0.97	0.63~0.91
敏感度(%)	89.50	63.20	81.80	63.60	100	50.00
特异度(%)	72.20	83.30	69.20	80.80	69.70	100
阳性预测值(%)	77.30	80.01	52.88	58.32	28.55	100
阴性预测值(%)	86.67	68.16	90.00	84.01	100	94.29

组、S1、S2、S3 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SWV 值、APRI 与肝纤维化病理分期有相关性 (SWV 值: $r = 0.724, P < 0.05$; APRI: $r = 0.555, P < 0.05$)。

2.2 SWV 和 APRI 诊断肝纤维化程度的效能 SWV 和 APRI 诊断家兔肝纤维化 S \geq 1、S \geq 2、S \geq 3、S=4 的 ROC 曲线下面积分别为 0.92、0.81、0.87、0.78、0.82、0.76、0.89、0.79。ARFI 和 APRI 诊断兔肝纤维化 S2~S4 各期相应的诊断界值及诊断效能见表 2。ARFI 技术评价家兔肝纤维化各期的 AUC 均大于相应的 APRI, ARFI 技术和 APRI 均对肝纤维化 S3 或更高分期的效率最低。

2.3 ARFI 联合 APRI 对中重度肝纤维化(S=3)的评估 SWV 和 APRI 联合诊断 S \geq 3 的 AUC 为 0.84, 敏感度为 81.80%, 特异度为 73.10%, 阳性预测值为 56.23%, 阴性预测值为 90.48%, 联合诊断的效能较 ARFI 及 APRI 单独诊断均有所提高。

3 讨论

目前肝活检仍是诊断肝纤维化的“金标准”, 但其有创, 且存在取样误差、病理评价差异大以及潜在并发症风险, 不适合作为常规检查和随访监测手段^[7]。近年来, 临床多采用以血清学指标为基础的肝纤维化诊断模型, 但多数模型涉及的参数为非常规实验室检查项目, 未能在临床广泛应用。Wai 等^[8]建立 APRI 模型, 仅需检测 AST、PLT 两项常规指标, 计算公式简单, 用于评价 270 例慢性丙型肝炎患者肝纤维化程度, 发现 APRI 预测显著肝纤维化和肝硬化的 AUC 分别可达 0.88、0.94。

ARFI 是超声弹性成像技术的一种, 利用标准探头发射调制的聚焦低频声脉冲为激励, 生物黏弹性组织受力后产生纵向压缩和横向振动, 横向振动以声剪切方式向周边传播^[9]; 利用特定电子系统采集组织内剪切波信号, 通过量化处理获得 SWV。SWV 以 m/s 为单位, SWV 的速度越快, 肝脏弹性模量越大, 即肝

组织的硬度越大。一项涉及 36 篇外文文献的 Meta 分析^[10]结果显示, ARFI 诊断 F \geq 2、F \geq 3 和 F=4 的 AUC 分别为 0.84、0.89、0.91, 表明 ARFI 对中重度肝纤维化有很好的诊断准确性, 对早期肝硬化具有极好的诊断价值。Sporea 等^[11]利用 ARFI 技术对 274 例丙型肝炎患者进行检测, 与肝穿刺活检进行对照分析, 发现 SWV 与肝纤维化程度有很好的相关性 ($r = 0.707, P < 0.0001$), 诊断 F \geq 1、F \geq 2、F \geq 3 和 F=4 对应的 AUC 分别为 0.88、0.89、0.91、0.94, 表明 ARFI 技术对中晚期肝纤维化有很高的诊断价值。Friedrich-Rust 等^[12]研究也支持这一结论。本研究成功利用 ARFI 技术获得兔肝 SWV 值, 操作省时、易行, 可重复测量, 结果显示, SWV 值随纤维化程度的加重而增高。

用 TAA 建立肝纤维化模型的方法简便易行、病变分期明显, 与人类肝纤维化进展过程中形态学及功能学方面的改变非常相似^[13]。本研究采用 TAA 皮下注射造模方法, 在造模过程中发现早期实验兔对 TAA 反应较为敏感, 随着给药时间延长, 家兔状态逐渐稳定; 继续给药后家兔抵抗力降低, 状态下降明显, 最终死亡率为 9.38% (3/32), 证实该造模方法切实可行。

本研究观察并比较 ARFI 技术和 APRI 无创评估家兔肝纤维化模型的价值, 发现两者与病理纤维化分期的相关性均有统计学意义 ($r = 0.724, r = 0.555, P < 0.05$), 但 ARFI 较 APRI 有更高的相关性, 考虑主要因肝脏 SWV 值是通过采集组织内剪切波信号直接反映肝脏的弹性模量, 与纤维化病理分级间更具相关性。进一步分析显示, APRI 除诊断肝纤维化 S1 或更高分期纤维化外, AUC 均低于 0.8, 而 ARFI 各期 AUC 均大于 0.8。因此, 以 ARFI 测值反映肝纤维化程度更准确, 提示 ARFI 技术较 APRI 模型可更准确地评价家兔肝纤维化程度。本研究显示 SWV 对 S2 和 S3 期的阈值不能很好界定, 考虑可能因为肝纤维化

是连续动态发展的过程, S2 和 S3 期的病理分级标准区别仅在于小叶结构是否紊乱, 在此期间处于过渡量变期的肝组织质地未达到质变程度的改变, 故 S2 和 S3 间的 SWV 在统计学上未出现明显差异 ($P = 0.718$)。

本研究显示, ARFI 和 APRI 诊断家兔肝纤维化的效率均随肝纤维程度加重而呈下降趋势, 诊断 S3 的效率最低, 与 Friedrich-Rust 等^[12]的结果存在一定差异, 原因可能在于 TAA 是一种弱致癌物, 可作用于肝细胞 DNA、RNA 和蛋白合成酶而产生毒性作用, 还可诱导肝代谢紊乱甚至肝坏死^[14]; 造模初期 TAA 造成家兔急性肝损伤, 随后在肝脏修复过程中, 其病理改变类型变得更为复杂, 可能是也是导致诊断效率下降的原因之一。此外, 本研究对象为家兔, 所得数据与人体可能不同。本研究联合 SWV 及 APRI 对家兔中重度肝纤维化进行诊断, 结果显示联合诊断 $S \geq 3$ 的 AUC 为 0.84, 较 ARFI 及 APRI 单独诊断均有所提高。

综上所述, ARFI 技术和 APRI 均可用于定量评估家兔肝纤维化程度, 具有较好的诊断价值, 以 ARFI 技术更准确, 可为临床无创评估肝纤维化分期提供依据。

[参考文献]

- [1] Sporea I, Bota S, Peck-Radosavljevic M, et al. Acoustic Radiation Force Impulse elastography for fibrosis evaluation in patients with chronic hepatitis C: An international multicenter study. *Eur J Radiol*, 2012, 81(12):4112-4118.
- [2] Lin ZH, Xin YN, Dong QJ, et al. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: An Updated Meta-Analysis. *Hepatology*, 2011, 53(3):726-736.
- [3] 王鹤桦, 潘兴华, 庞荣清, 等. 兔肝纤维化模型建立与自体骨髓干细胞移植的疗效. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(43):8472-8476.
- [4] Wai C, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003, 38(2):518-526.
- [5] Bota S, Sporea I, Sirlu R, et al. Factors which influence the accuracy of acoustic radiation force impulse (Arfi) elastography for the diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Ultrasound Med Biol*, 2013, 39(3):407-412.
- [6] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝病杂志*, 2000, 8:324-329.
- [7] Castera L, Negre I, Samii K, Buffet C. Patient-administered nitrous oxide/oxygen inhalation provides safe and effective analgesia for percutaneous liver biopsy: A randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(5):1553-1557.
- [8] Wai C, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003, 38(2):518-526.
- [9] 刘龙, 杜联芳. 声脉冲辐射力成像技术的临床研究进展. *中国医学影像技术*, 2011, 27(6):1287-9-1290.
- [10] Nierhoff J, Chávez Ortiz AA, Herrmann E, et al. The efficiency of acoustic radiation force impulse imaging for the staging of liver fibrosis: A meta-analysis. *Eur Radiol*. 2013, 23: 3040-3053.
- [11] Sporea I, Sirlu R, Bota S, et al. Is ARFI elastography reliable for predicting fibrosis severity in chronic HCV hepatitis? *World J Radiol*, 2011, 3(7):188-193.
- [12] Friedrich-Rust M, Nierhoff J, Lupsor M, et al. Performance of acoustic radiation force impulse imaging for the staging of liver fibrosis: A pooled meta-analysis. *J Viral Hepat*, 2012, 19(2): e212-e219.
- [13] Muller A, Machnik G, Zimmermann T, et al. Thioacetate induced cirrhosis like lesion in rats: Usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol*, 1988, 34(4):229-236.
- [14] 刘立新, 韩德五, 任大宾. 肠源性内毒素血症在硫代乙酰胺所致肝损伤发病中的作用. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(3):174-175.