

❖ 实验研究

Intravoxel incoherent motion diffusion weighted imaging in diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease of rabbits

DENG Yu¹, LIANG Changhong^{2*}, WU Xiaomei¹, LI Xinchun¹, HE Jianxun¹, QIN Jilong¹

(1. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Radiology, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective** To assess the feasibility of intravoxel incoherent motion-DWI (IVIM-DWI) in diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Totally 49 healthy New Zealand rabbits were randomly divided into control group that were fed with standard diet, and HFD group that were fed with high fat and high cholesterol diet. IVIM-DWI using 10 b values were performed on all the rabbits. ADC, diffusion coefficient (D), pseudo diffusion coefficient (D^*) and perfusion fraction (f) were measured respectively. One way ANOVA and multiple comparison were performed. **Results** Final cohort consisted of 41 rabbits, and 9, 13, 19 rabbits were grouped into control group, borderline (suspected NASH) group and NASH group, respectively. D, D^* , f and ADC in borderline group and NASH group were lower than those in control group (all $P < 0.05$). D and ADC in NASH group were lower than that in Borderline group ($P < 0.05$). No significant difference were found of D^* and f between Borderline and NASH group ($P > 0.05$). **Conclusion** IVIM parameters can represent the histopathological changes of NAFLD quantitatively of rabbits and serve as a imaging biomarker for the noninvasive and quantitative evaluation of NAFLD.

[Key words] Fatty liver, nonalcoholic; Diffusion magnetic resonance imaging; Intravoxel incoherent motion

DOI:10.13929/j.1003-3289.2016.07.002

体素内不相干运动磁共振扩散加权成像诊断 兔非酒精性脂肪肝病

邓宇¹, 梁长虹^{2*}, 伍筱梅¹, 李新春¹, 何建勋¹, 秦积龙¹

(1. 广州医科大学附属第一医院放射科, 广东 广州 510120; 2 广东省医学科学院
广东省人民医院影像医学部, 广东 广州 510080)

[摘要] **目的** 探讨体素内不相干运动(IVIM)的 DWI 定量参数诊断兔非酒精性脂肪肝病的可行性。**方法** 采用 49 只新西兰大白兔, 正常组采用标准饮食, 实验组采用高脂高胆固醇饮食。采用 10 个 b 值的 IVIM-DWI 对实验兔肝脏成像, 得到 ADC 值、扩散系数(D)、假扩散系数(D^*)和灌注分数(f 值)。对各实验组间参数行单因素方差分析及两两比较。**结果** 最后实验样本为 41 只实验兔, 正常组 9 只, Borderline 组(可疑 NASH 组)13 只, NASH 组 19 只。NASH 组、Borderline 组的 D、 D^* 、f 及 ADC 值均低于正常组(P 均 < 0.05); NASH 组的 D 及 ADC 值低于 Borderline 组(P 均 < 0.05), 而两组 D^* 和 f 值差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** IVIM 参数能客观反映兔非酒精性脂肪肝病的组织学改变, 可作为非酒精性脂肪肝病的重要无创性量化评价指标。

[基金项目] 国家自然科学基金(81271654、U1301258)、广东省医学科研基金(A2015390)。

[第一作者] 邓宇(1978—), 男, 湖南邵阳人, 博士, 副主任医师。研究方向: 胸、腹部功能磁共振成像。E-mail: hotden_1@163.com

[通信作者] 梁长虹, 广东省医学科学院 广东省人民医院影像医学部, 510080。E-mail: cjr.lchh@vip.163.com

[收稿日期] 2015-12-24 **[修回日期]** 2016-04-19

[关键词] 脂肪肝;非酒精性;扩散磁共振成像;体素内不相干运动

[中图分类号] R364.24; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2016)07-1000-05

非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的病理改变是由简单的脂肪变性发展为非酒精性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH),并已成为发达国家乃至全世界最常见的慢性肝病^[1]。部分 NASH 患者可发展为肝硬化,甚至肝细胞癌。NASH 相关性肝硬化的预后比肝炎性肝硬化差,因此早期诊断并治疗 NASH 可改善肝纤维化,阻止其向肝硬化发展^[2]。目前,肝活检穿刺是诊断 NAFLD 和 NASH 的金标准,但其为有创性检查且采样时存在一定的误差,不能做为常规检查方法^[2-3]。因此,临床上迫切需要无创性检查手段,能准确地分析 NAFLD 的病变严重程度及评价临床疗效。DWI 可检测活体水分子的扩散运动;而体素内不相干运动(intravoxel incoherent motion, IVIM)将扩散现象进一步解释为毛细血管微循环导致的假扩散和真正的分子扩散的综合效果^[4]。本研究旨在通过 IVIM 影像学方法探讨兔 NAFLD 中肝脏组织微结构及血流动力学的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用健康新西兰大白兔 49 只,6~8 个月龄,体质量 2.2~2.5 kg,均为雄性。将实验室温度控制在 16~26℃,相对湿度 40%~70%,换气次数 8~10 次/小时,昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h;于实验室饲养 1 周实验兔,均为单笼饲养,自由饮食、饮水。

1.2 实验方法

1.2.1 造模方法 将实验兔随机分为:正常组 10 只采用标准饮食,余 39 只采用高脂高胆固醇饮食(88%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇混合制备而成^[5-6]),高脂高胆固醇饮食 4 周(HFD-4W)8 只、高脂高胆固醇饮食 8 周(HFD-8W)8 只、高脂高胆固醇 12 周(HFD-12W)8 只和高脂高胆固醇饮食 16 周(HFD-16W)8 只,另外 7 只作为高脂高胆固醇饮食实验兔死亡时,随机抽取的补充兔。

1.2.2 MR 扫描 将实验兔固定于动物线圈内,取俯卧位,采用 Philips Achieva 3.0T MR 扫描仪进行扫描。扫描序列包含轴位 T2WI TSE 序列及 IVIM DWI 序列。轴位 T2WI TSE 序列参数:TR/TE 365.58 ms/80.00 ms,翻转角 90°,回波链(echo train length, ETL) 16,层厚/层间隔 2.0 mm/0.2 mm,FOV 150 mm×150 mm,矩阵 152×146,带宽 184 Hz, NEX 6。IVIM DWI 采用自由呼吸状态下单次激发的

平面回波成像,b 值选择 10 个(0、10、20、30、50、80、100、200、400、800 s/mm²),扫描参数为 TR/TE 1 743.36 ms/45.17 ms,层厚/层间隔为 3.0 mm/0.3 mm,FOV 130 mm×130 mm,矩阵 64×65,带宽 2 994 Hz, NEX 8,采集时间约 13 min。

1.2.3 病理学检查 组织学病理:在肝左外叶、左内叶、右内叶、右外叶分别取一肝组织块,体积不超过 1.5 cm×1.5 cm×0.3 cm,用 4%甲醛液固定,行苏丹Ⅲ染色,经石蜡固定后行 HE 染色、Masson 染色及银染。组织学评价:以非酒精性脂肪肝病活动评分(NAFLD activity score, NAS;0~8 分)对脂肪肝进行分级诊断研究,评价标准参照中华肝脏病学会 2010 年修订版非酒精性脂肪性肝病诊疗指南^[7]。NAS<3 分可排除 NASH, NAS>4 分可诊断 NASH(NASH 组),介于两者之间诊断为可疑 NASH(borderline 组)。规定不伴有小叶内炎症、气球样变和纤维化但肝脂肪变>33%者为非酒精性肝脂肪变性(nonalcoholic fatty liver, NAFL),脂肪变达不到此程度者仅称为肝细胞脂肪变。

1.3 统计学分析 采用 IBM SPSS 22.0 及 GraphPad Prism 6.01 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Levene 法对多样本方差齐性进行检验,方差齐使用完全随机设计的单因素方差分析(one-way ANOVA),方差不齐则采用近似 F 检验 Welch 法。对多样本均数间的比较,方差齐时采用 LSD-t 检验,方差不齐采用 Dunnett's T3 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成模情况 饲养过程中,正常组中 1 只实验兔不明原因死亡。HFD-8W 死亡 1 只, HFD-12W 死亡 3 只, HFD-16W 死亡 3 只,死亡原因均为腹泻,死亡后随机补充。最后实验样本为 41 只实验兔。根据 NAS 评分系统,正常组 9 只, borderline 组 13 只(NAS 为 3~4 分),其中 HFD-4W 5 只、HFD-8W 2 只、HFD-12W 5 只、HFD-16W 1 只, NASH 组 19 只(NAS>4 分),其中 HFD-4W 3 只、HFD-8W 6 只、HFD-12W 3 只、HFD-16W 7 只。

2.2 病理学改变 正常肝组织镜下表现为小叶结构正常,肝板及肝窦呈规则轮辐状排列,肝窦结构清晰,细胞质丰富核,肝细胞内无脂滴形成,未见气球样变及炎症(图 1A),苏丹Ⅲ染色显示肝细胞内无脂滴聚集(图 1B)。高脂高胆固醇饮食兔肝的病理学表现为肝细

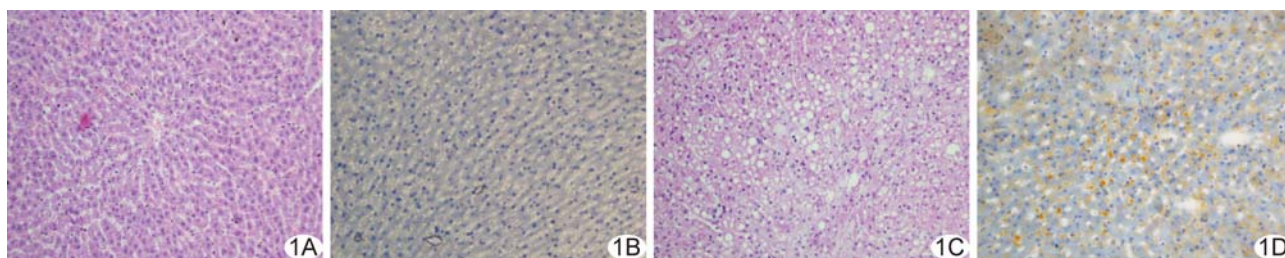


图 1 病理图 A. 正常兔肝脏 HE 染色(×200); B. 正常兔肝脏苏丹Ⅲ染色(×200); C. NAFLD 兔肝脏 HE 染色(×200); D. NAFLD 兔肝脏苏丹Ⅲ染色(×200)

胞脂肪变性、气球样变性、小叶内炎症;肝细胞脂肪变性为肝细胞被脂滴占据,细胞核受压、偏移,肝小叶结构紊乱,肝窦消失(图 1C),苏丹Ⅲ染色表现为肝细胞浆内见橘红色脂滴形成(图 1D)。

2.3 MR 平扫表现及 IVIM、ADC 参数比较 正常实验兔肝脏 IVIM-DWI 表现为随 b 值增加,肝脏信号增加,ADC 图呈中等信号,信号衰减曲线呈典型的双指数改变,低 b 值部分斜率陡峭(图 2);高脂高胆固醇饮食兔的肝脏 IVIM-DWI 上表现为随 b 值增加,肝脏信号增加更明显,ADC 呈较低信号,信号衰减曲线接近单指数改变,低 b 值部分斜率变小(图 3)。NASH 组、Borderline 组的 D、D*、f 及 ADC 值均低于正常组(P 均<0.05);NASH 组的 D 及 ADC 值低于 Borderline 组(P 均<0.05),两组 D* 和 f 值差异无统计学意义(P 均>0.05),见表 1。

3 讨论

3.1 NAFLD 的 IVIM 表现 本组正常实验兔的肝脏 D 值为 $(1.20 \pm 0.09) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$,与 Guiu 等^[8-10]的研究结果接近 $(1.10 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s} \sim 1.17 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s})$,但 Joo 等^[6]的研究中,正常实验兔的 D 值仅为 $0.8 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$,该研究可能低

表 1 3 组实验兔肝脏 IVIM、ADC 参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	D ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)	D* ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)	f(%)	ADC ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)
Borderline 组(n=13)	$0.88 \pm 0.10^{*\Delta}$	$27.13 \pm 4.94^*$	$15.78 \pm 5.30^*$	$1.14 \pm 0.20^{*\Delta}$
NASH 组(n=19)	$0.80 \pm 0.08^*$	$23.42 \pm 8.00^*$	$14.38 \pm 1.27^*$	$0.98 \pm 0.15^*$
正常组(n=9)	1.20 ± 0.09	37.62 ± 5.05	29.61 ± 9.77	1.21 ± 0.09
F/Welch 值	62.334	14.266	10.814	7.750
P 值	<0.001	<0.001	0.001	0.002

注: *: 与正常组比较, $P < 0.05$; Δ : 与 NASH 组比较, $P < 0.05$

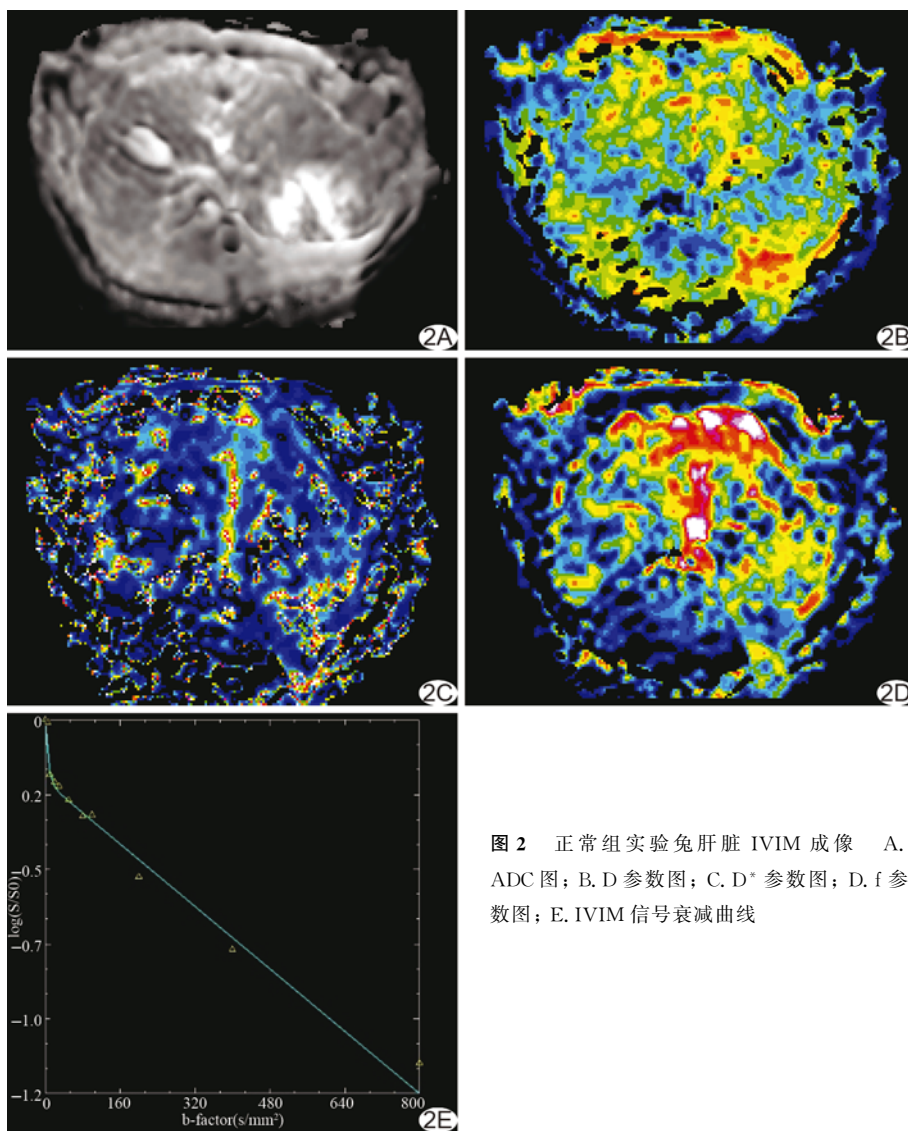


图 2 正常组实验兔肝脏 IVIM 成像 A. ADC 图; B. D 参数图; C. D* 参数图; D. f 参数图; E. IVIM 信号衰减曲线

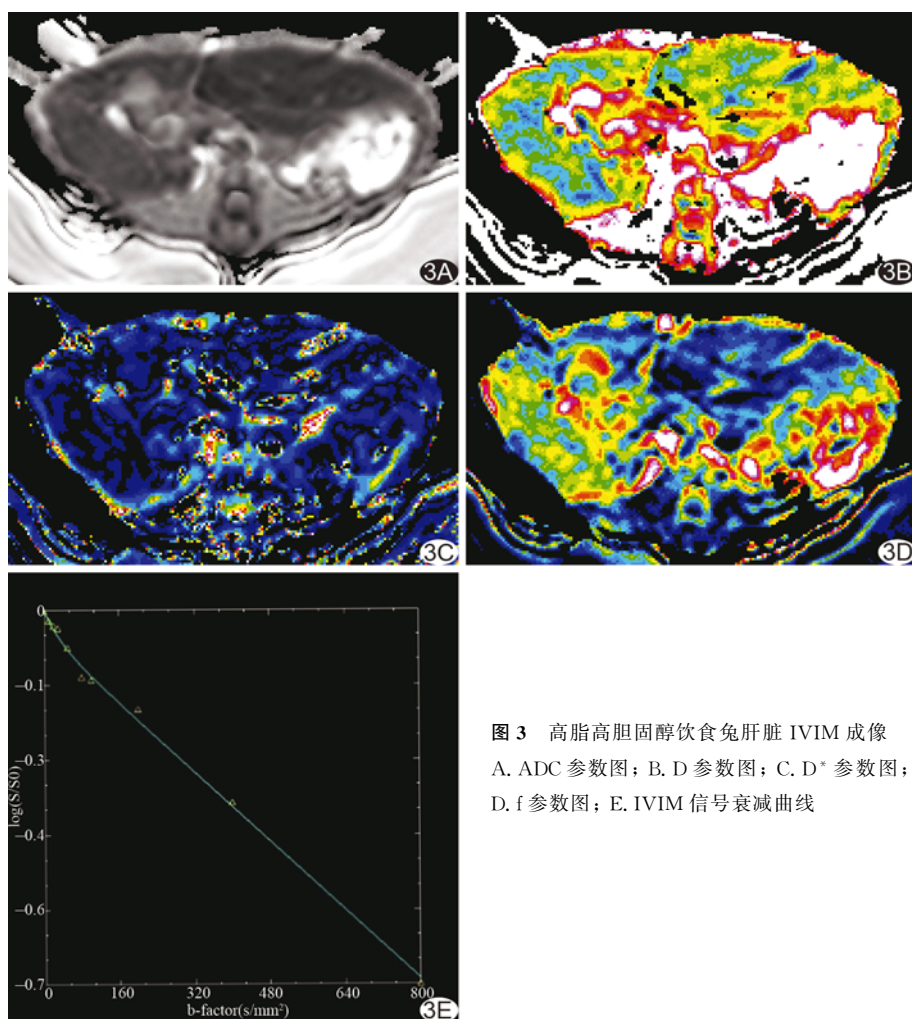


图3 高脂高胆固醇饮食兔肝脏 IVIM 成像
A. ADC 参数图; B. D 参数图; C. D* 参数图;
D. f 参数图; E. IVIM 信号衰减曲线

估了正常 D 值,这可能与 IVIM 采集方法、信噪比有关。本研究显示 NAFLD 组实验兔肝脏的 D 值较正常组明显下降,且更低于 Borderline 组。根据 IVIM 理论,D 值反应了组织内真实的分子扩散运动,而生物活体内的分子扩散包括细胞内和细胞外两个间室,NAFLD 时多个因素导致了肝脏组织细胞内、外的分子扩散下降。本实验的光镜和电镜结果均显示高脂高胆固醇饮食兔肝细胞内有大小不等的脂滴聚集,甚至大脂滴可占据整个细胞浆,部分肝细胞电镜下可见线粒体等细胞器肿胀,这些均可导致细胞内分子扩散的微环境发生变化,分子扩散通路拉伸、纡曲。也有学者^[11]认为,细胞膜的磷脂结构中,和表面膜平行的水分子与脂质和蛋白质大分子相互作用导致扩散下降,也可能是脂肪变性的细胞内水扩散受限原因之一。而肝细胞内脂滴堆积,气球样变性可使得肝细胞体积增大,周围的细胞外间隙减小,还有部分实验兔的肝细胞窦周隙出现了纤维化,均可造成细胞外间隙的分子扩

散受限。所以,NAFLD 的病理变化导致了细胞内、外两个间室的分子扩散运动同时发生障碍,D 值减低。本研究结果与一项对 2 型糖尿病患者的临床研究^[8]一致,但该研究仅以¹H MRS 结果肝脂肪含量 $\geq 5.56\%$ 做为肝脂肪变性的标准,无病理对照,且未对 NAFLD 进行分级。

D* 值反应了微循环中的血流,由于毛细血管网络的血流微循环无特定方向,其内的血流可类似于分子扩散运动,即所谓的宏观或假性扩散。由于 D* 值大致为生物组织内水的扩散系数 D 的 10 倍,因此其导致的信号衰减大于分子扩散^[12]。为保证 D* 的稳定性,本研究采用了 7 个 200 s/mm² 及以下的 b 值(0、10、20、30、50、100、200 s/mm²)进行检测。最近一项研究^[13]发现门静脉狭窄的 D* 值较正常组明显减低,也证实了 D* 和肝脏门静脉灌注的相关性。有很多因素导致了 NAFLD 的 D* 下降:①肝小叶结构紊乱,肝细胞肿胀、增大

使得肝血窦受压、变窄,血流阻力增加,微循环灌注下降;②胰岛素抵抗使胰岛素受体信号障碍致 PI-3 酶/Akt/eNOS 级联效应的 NO 介导血管扩张下降^[14-15];③激活的信号通过胰岛素受体介导 MAPK/ERK 旁路导致了血管收缩或异常血管新生^[16]。

f 值与组织中活动的毛细血管密度有关,本研究的正常肝组织 f 值平均值为 $(29.61 \pm 9.77)\%$,与研究^[8-10]报道的 22%~30% 一致。本研究发现 f 值在 NAFLD 组中明显减低,但其在 Borderline 组和 NASH 组间差异无统计学意义。有实验研究发现 f 值可以用于鉴别 NAFLD 的严重程度,有望成为评价脂肪肝严重程度的一种无创指标^[6]。在 Guin 等^[8]的研究中,f 值在肝脂肪变性患者中升高,与本研究及 Joo 等^[6,17]的动物实验结果相悖,作者也表示该结果与理论相反,其解释为可能 f 值依赖于回波时间,需要进行 T2 校正才能得到更准确的 f 值。笔者认为肝组织的 f 值和肝血窦开放程度密切相关,NAFLD 中病变区域

的肝血窦基本都被增大的肝细胞压迫,进而变窄、闭塞,使有效微循环数目减少,所以 f 值应减低而不会升高。

由于 NAFLD 的肝脏 D^* 和 f 值均有减低,本研究在 IVIM 信号衰减曲线上观察到,曲线的低 b 值部分斜率变小,与中高 b 值部分相续接近单指数改变,进一步说明了 NAFLD 时因低 b 值灌注效应减少,而对扩散信号的衰减作用减少。

近年来,已有多项研究^[18-19]利用 ADC 值对脂肪肝进行了研究,并观察到脂肪肝的 ADC 值较正常肝脏减低,ADC 值与肝细胞内脂肪含量呈负相关。本研究的 ADC 值和 IVIM 参数一致,NAFLD 实验兔低于正常兔。由于 ADC 值反应了体素内所有不相干的分子运动,所以 ADC 值的下降由多种综合因素造成,除前面提到的肝细胞内外分子扩散下降及灌注障碍外,肝细胞的肿胀也可能导致胆小管受压,肝细胞胆汁分泌障碍,进而对信号产生影响。

3.2 本研究的局限性 由于实验兔的 IVIM DWI 扫描为自由呼吸下进行,尽管实验兔处于麻醉状态,但是心脏搏动及呼吸运动可能对 IVIM 测量数据的准确性有一定影响。此外,本研究假设肝组织内的分子扩散为各向同性,实际上肝小叶内肝板、肝窦的排列呈轮辐状,这种特殊的空间构型可能使分子扩散存在各向异性,需要更为复杂的数学模型进行分析。

总之,NAFLD 实验兔的 D , D^* 和 f 值均较正常组下降,说明其肝组织的分子扩散及微循环灌注均出现障碍。IVIM 参数能客观反映兔 NAFLD 的组织学改变,可做为 NAFLD 的重要无创性量化评价指标。

[参考文献]

- [1] Bataller R, Rombouts K, Altamirano J, et al. Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2):231-244.
- [2] Hojo M, Watanabe S. Pharmacological therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*, 2011, 41(3):209-216.
- [3] Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: The TONIC randomized controlled trial. *JAMA*, 2011, 305(16):1659-1668.
- [4] Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. MR imaging of intravoxel incoherent motions: Application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, 1986, 161(2):401-407.
- [5] Fu JF, Fang YL, Liang L, et al. A rabbit model of pediatric non-alcoholic steatohepatitis: The role of adiponectin. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(8):912-918.
- [6] Joo I, Lee JM, Yoon JH, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging—An experimental study in a rabbit model. *Radiology*, 2014, 270(1):131-140.
- [7] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版). *现代医药卫生*, 2011, 27(5):641-644.
- [8] Guin B, Petit JM, Capitan V, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging in nonalcoholic fatty liver disease: A 3.0-T MR study. *Radiology*, 2012, 265(1):96-103.
- [9] Patel J, Sigmund EE, Rusinek H, et al. Diagnosis of cirrhosis with intravoxel incoherent motion diffusion MRI and dynamic contrast-enhanced MRI alone and in combination: Preliminary experience. *J Magn Reson Imaging*, 2010, 31(3):589-600.
- [10] Luciani A, Vignaud A, Cavet M, et al. Liver cirrhosis: Intravoxel incoherent motion MR imaging—pilot study. *Radiology*, 2008, 249(3):891-899.
- [11] Le Bihan D. The "wet mind": Water and functional neuroimaging. *Phys Med Biol*, 2007, 52(7):R57-R90.
- [12] Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology*, 1988, 168(2):497-505.
- [13] Moteki T, Horikoshi H. Evaluation of noncirrhotic hepatic parenchyma with and without significant portal vein stenosis using diffusion-weighted echo-planar MR on the basis of multiple-perfusion-components theory. *Magn Reson Imaging*, 2011, 29(1):64-73.
- [14] Rijzewijk LJ, Van Der Meer RW, Lubberink M, et al. Liver fat content in type 2 diabetes: Relationship with hepatic perfusion and substrate metabolism. *Diabetes*, 2010, 59(11):2747-2754.
- [15] Brock RW, Dorman RB. Obesity, insulin resistance and hepatic perfusion. *Microcirculation*, 2007, 14(4-5):339-347.
- [16] Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, et al. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (*fa/fa*) rats. *J Clin Invest*, 1999, 104(4):447-457.
- [17] Lemke A, Laun FB, Klauss M, et al. Differentiation of pancreas carcinoma from healthy pancreatic tissue using multiple b -values: Comparison of apparent diffusion coefficient and intravoxel incoherent motion derived parameters. *Invest Radiol*, 2009, 44(12):769-775.
- [18] Anderson SW, Soto JA, Milch HN, et al. Effect of disease progression on liver apparent diffusion coefficient values in a murine model of NASH at 11.7 Tesla MRI. *J Magn Reson Imaging*, 2011, 33(4):882-888.
- [19] Poyraz AK, Onur MR, Kocakoç E, et al. Diffusion-weighted MRI of fatty liver. *J Magn Reson Imaging*, 2012, 35(5):1108-1111.