

利用剪切波弹性成像技术评价大鼠非酒精性脂肪性肝病严重程度

周琴¹, 吕国荣^{1,2}, 郭海欣¹, 李靖云², 张少波³, 陈永健¹

1. 福建医科大学附属第二医院超声科, 福建 泉州 362000; 2. 泉州医学高等专科学校临床医学院, 福建 泉州 362000; 3. 晋江市安海医院超声科, 福建 泉州 362000

【摘要】目的:探讨剪切波弹性成像(SWE)技术评估非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)严重程度的可行性及其影响因素。**方法:**SD大鼠随机分为对照组(40只)和实验组(48只),实验组通过不同饮食建立严重程度不同的NAFLD大鼠模型,分别于第1、2、3、8、12周末检测肝脏杨氏模量平均值(E_{mean})并切除大鼠肝脏行组织病理学和mRNA表达分析。**结果:** E_{mean} 与NAFLD严重程度呈显著正相关($r=0.838$, $P<0.001$)。NAFLD不同病理分组间的 E_{mean} 差异有统计学意义($F=113.58$, $P<0.001$)。非酒精性脂肪性肝炎(NASH)组和肝硬化组 E_{mean} 显著高于正常组、单纯性脂肪变性和临界组($P<0.001$);肝硬化组的 E_{mean} 显著高于NASH组($P<0.001$);正常组、单纯性脂肪变性组和临界组之间, E_{mean} 没有显著差异($P>0.05$)。 E_{mean} 与MCP-1、TNF- α 、I型胶原和 α -SMA表达水平平均呈显著正相关($r=0.340\sim0.678$, P 均 <0.01),而MCP-1($B=0.560$, $P<0.001$)、I型胶原($B=0.429$, $P<0.001$)是与肝脏 E_{mean} 呈独立相关的因素。SWE诊断NASH及肝硬化的截值分别为6.0 kPa、9.7 kPa,曲线下面积分别为0.95、0.98,敏感性分别为88.9%、86.5%,特异性分别为100%、92.7%。**结论:**SWE技术可用于评估NAFLD严重程度;MCP-1、I型胶原是影响肝脏硬度的主要生物分子。

【关键词】非酒精性脂肪性肝病;剪切波;弹性成像技术;生物分子;杨氏模量

【中图分类号】R365

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2021)08-0955-05

Evaluating the severity of nonalcoholic fatty liver disease in rats by shear wave elastography

ZHOU Qin¹, LÜ Guorong^{1,2}, GUO Haixin¹, LI Jingyun², ZHANG Shaobo³, CHEN Yongjian¹

1. Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China; 2. School of Clinical Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China; 3. Department of Ultrasound, Jinjiang Anhai Hospital, Quanzhou 362000, China

Abstract: Objective To explore the feasibility and influencing factors of shear wave elastography (SWE) technique in assessing the severity of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** SD rats were randomly divided into control group ($n=40$) and experimental group ($n=48$). The rat models with various degrees of NAFLD severity in experimental group were created by different diets. The mean Young's modulus (E_{mean}) of the livers was detected at the end of the 1st, 2nd, 3rd, 8th and 12th weeks, and finally the livers were excised for histopathologic evaluation and mRNA expression analysis. **Results** E_{mean} was positively correlated with NAFLD severity in all rats ($r=0.838$, $P<0.001$). There was statistical difference in E_{mean} among different pathological groups ($F=113.58$, $P<0.001$). E_{mean} in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and cirrhosis groups was significantly higher than that in normal, simple steatosis and borderline groups ($P<0.001$). E_{mean} of cirrhosis group was also significantly higher than that of NASH group ($P<0.001$), and no significant difference was found in E_{mean} among normal group, simple steatosis group and borderline group ($P>0.05$). The mRNA expressions of MCP-1, TNF- α , type I collagen and α -SMA had significant positive correlations with E_{mean} ($r=0.340\sim0.678$, all $P<0.001$). Among them, MCP-1 ($B=0.560$, $P<0.001$) and type I collagen ($B=0.429$, $P<0.001$) were independent risk factors for NAFLD. The optimal SWE cutoff values for the diagnosis of NASH and cirrhosis were 6.0 and 9.7 kPa, respectively, with the area under curve of 0.95 and 0.98, sensitivity of 88.9% and 86.5%, and specificity of 100% and 92.7%, respectively. **Conclusion** SWE technique can be used to assess the severity of NAFLD. MCP-1 and type I collagen are the major biomolecular indicators that affects liver stiffness.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease; shear wave; elastography; biomolecule; Young's modulus

【收稿日期】2021-02-20

【基金项目】福建省临床重点专科建设项目(2017(739))

【作者简介】周琴,在读硕士,研究方向:超声诊断,E-mail: zhouqin_0506@sina.com

【通信作者】吕国荣,E-mail: lgr_feus@sina.com

前言

剪切波弹性成像 (Shear Wave Elastography, SWE)能实时定量检测肝脏硬度,但目前利用SWE评估非酒精性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic Steatohepatitis, NASH)及其相关肝硬化的研究较少^[1]。有研究表明非酒精性脂肪性肝病 (Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)伴随的多种生物分子改变可能会影响剪切波传播^[2],但有关SWE与NAFLD相关分子改变的相关性鲜有报道。因此,本实验利用SWE研究NAFLD大鼠肝脏硬度的改变并进一步明确影响剪切波在NAFLD肝脏传播的相关生物分子,旨在为临床无创性评估NASH及肝硬化提供参考。

1 资料与方法

1.1 实验动物及模型制备

选取雄性SD大鼠88只,质量250~270 g。随机选择40只作为对照组,其余为实验组。实验组按喂养方式不同随机分为6个亚组,每个亚组8只(图1)。高脂饲料 (High-Fat Diet, HFD): 2%胆固醇+15%猪油+5%蛋黄粉+0.5%胆盐+2%白糖+75.5%普通基础颗粒饲料;动物和HFD由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供;蛋氨酸/胆碱缺乏饲料 (Methionine-Choline Deficient Diet, MCDD)由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。其中,40%四氯化碳 (CCl₄)溶液 (CCl₄:橄榄油=2:3),剂量为1.5 mL/kg,每周两次。

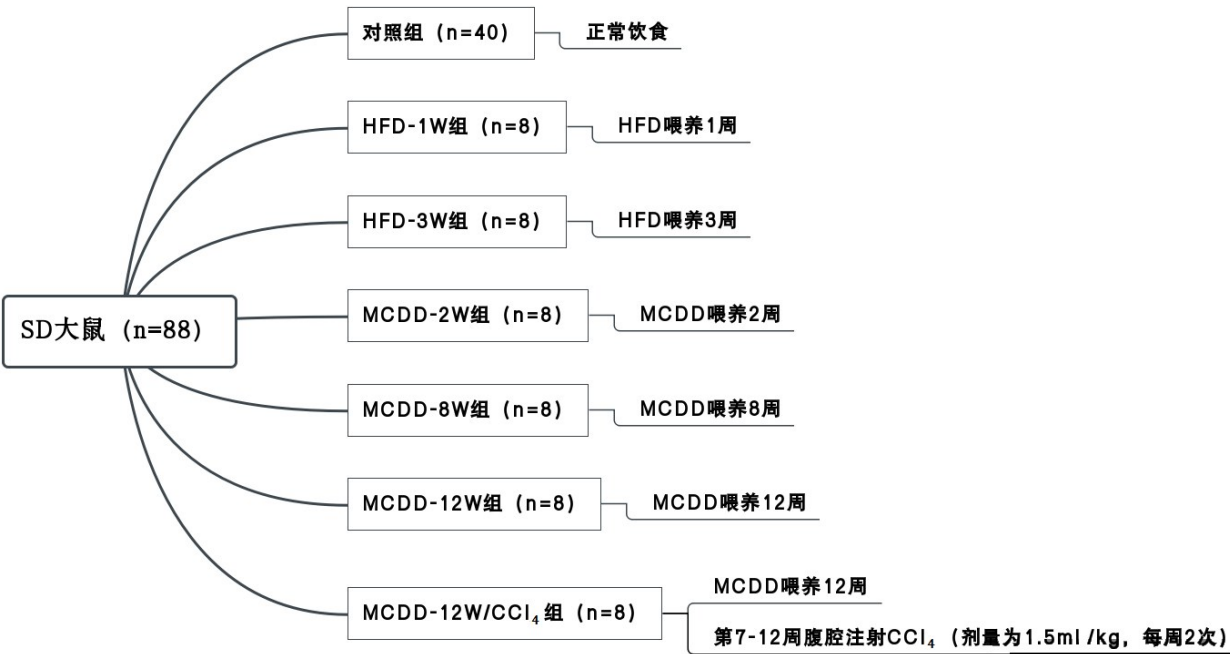


图1 实验动物分组及模型制备
Fig.1 Experimental animals grouping and model preparation

1.2 仪器和方法

采用法国声科 SuperSonic Imagine AixPlorer 型实时剪切波弹性成像超声诊断仪,线阵探头,频率4~15 MHz。

(1)肝脏超声检查:分别于第1、2、3、8、12周末随机抽取8只正常组大鼠,与预定喂养周期结束的实验组大鼠进行检测。检查前所有实验动物禁食12 h,禁水6 h。麻醉后肝区备皮,探头轻置于大鼠腹部,先行常规超声检查并统一选取肝中叶启用SWE模式,尽量避开肝脏大血管、胆道和叶间裂的区域,于距离体表1.0 cm处选择感兴趣区域 (Region of Interest, ROI),ROI设定为直径约2 mm的圆形,开启Q-BOX测量ROI的杨氏模量值,测量5次,取平均值,得到杨氏模量平均值 E_{mean} 。

(2)病理学检查及mRNA检测:超声检查完成后,解剖肝脏,取肝中叶(即SWE检查部位)固定于10%中性福尔马林并包埋在石蜡中,切片行HE染色、Masson染色,光镜下观察肝脏组织学改变。另取一部分肝组织在液氮中快速冻存。总RNA的提取依照Trizol (Invitrogen)的说明书进行。反转录依照试剂盒说明书进行。大鼠b-actin作为内参照,设计引物(表1)。利用RT-PCR技术对样品进行检测,读取荧光值。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算样本目标基因的相对含量。

1.3 判断标准

参考Kleiner等^[3]的方法,根据NAFLD活动性评分 (NAFLD Activity Score, NAS)及纤维化等级,将最终病理结果分为正常组 (NAS=0,纤维化F0),单纯脂

表1 RT-PCR的引物信息
Tab.1 Primer information for RT-PCR

基因名称	上游引物	下游引物	产物长度/bp
大鼠 b-actin	CCT CTA TGC CAA CAC AGT	AGC CAC CAA TCC ACA CAG	155
I型胶原	TTA ACA AGG GAG GAG AGA GTG	GGA GGG TTT CAG AAG AGA GA	111
α -SMA	GCA TCC ACG AAA CCA CCT A	GAG GGC TGT GAT CTC CTT CT	143
TNF- α	GAC TCT GAC CCC CAT TAC TCT	TGT TTC TGA GCA TCG TAG TTG T	143
MCP-1	ACC TGC TGC TAC TCA TTC ACT	CTG CTG CTG GTG ATT CTC TT	77

肪变性组(NAS=1~2, 纤维化F0), 边界组(NAS=3~4, 纤维化F0), NASH组(NAS \geq 5, 纤维化F0~F3), 肝硬化组(纤维化F4)。

1.4 统计学分析

使用SPSS23.0统计学软件包对数据进行分析, 计量资料用均数 \pm 标准差表示。多组均数比较采用单因素方差分析, 相关分析采用Spearman相关分析法。应用多元线性回归模型对多种影响因素进行显著性分析。以病理分级为金标准, 利用接受者操作特征(Receiver Operating Characteristic, ROC)曲线建立NASH及肝硬化的杨氏模量界值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理结果

对照组切片显示所有大鼠肝脏均未发生病变;HFD-1W组中2只可纳入正常组, 4只纳入单纯脂肪变性组, 2只纳入边界组;MCDD-2W组中单纯脂肪变性组和边界组各1只, 余6只纳入NASH组;HFD-3W组中2只纳入边界组, 6只纳入NASH组;MCDD-8W组和MCDD-12W组的所有大鼠均纳入NASH组;MCDD-12W/CCI4组中2只评为NASH, 6只具有肝硬化改变。

光镜下正常组的肝小叶结构完整, 肝细胞以中央静脉为中心, 呈放射状排列, 门管区未见炎性细胞浸润, 肝细胞内无明显脂肪空泡, 未见纤维间隔形成。随着病程进展, 实验组逐渐出现不同程度的肝细胞肿胀, 胞浆内可见大小不等的脂肪空泡, 部分肝细胞呈气球样变, 小叶内可见炎症、坏死;严重者为肝索排列紊乱, 肝窦间隙变窄, 纤维间隔形成, 可见假小叶形成(图2)。

2.2 E_{mean} 与病理结果的相关性

所有大鼠肝脏 E_{mean} 与NAFLD严重程度呈显著正相关($r=0.838, P<0.001$)。NAFLD不同病理分组间的 E_{mean} 差异有统计学意义($F=113.58, P<0.001$)。NASH组和肝硬化组 E_{mean} 显著高于正常组、单纯性脂肪变性和临界组($P<0.001$)。肝硬化组的 E_{mean} 显著高

于NASH组($P<0.001$)。在正常组、单纯性脂肪变性组和临界组之间, E_{mean} 没有显著差异($P>0.05$)。SWE测量见表2和图2。

2.3 E_{mean} 与mRNA表达水平的相关性

MCP-1 ($r=0.678, P<0.001$)、TNF- α ($r=0.340, P=0.001$)、I型胶原($r=0.402, P<0.001$)、 α -SMA($r=0.561, P<0.001$)均与 E_{mean} 呈正相关;且多元线性回归分析显示, MCP-1($B=0.560, P<0.001$)和I型胶原($B=0.429, P<0.001$)与 E_{mean} 呈独立相关。不同病理分组的 E_{mean} 和mRNA表达水平见表2。

2.4 ROC曲线分析

SWE诊断NASH、肝硬化的截值分别为6.0 kPa、9.7 kPa, 曲线下面积分别为0.95、0.98, 敏感性分别为88.9%、86.5%, 特异性分别为100%、92.7%, 见图3。

3 讨论

NAFLD的发病率逐年升高, 已成为全球最常见的慢性肝病^[4]。其疾病谱包括单纯性脂肪变性、NASH、肝纤维化和肝硬化^[5]。其中, NASH与肝纤维化密切相关, 它是肝硬化和肝癌的显著危险因素, 在NASH相关的肝硬化患者中, 肝癌的发病率至少为每年1%~2%^[6]。目前, 肝穿刺活检仍是确诊NASH及肝硬化的金标准^[7], 但其有创性和潜在的并发症限制了其在临床中的应用^[8]。因此, 寻找能够早期、无创识别NASH及肝硬化的非侵入性检测手段尤为重要。

超声弹性成像技术是一种可对组织硬度进行检测和评估的新型超声诊断技术^[9]。其中, SWE是目前最新应用于临床的一种弹性成像技术。其原理是通过发射高速聚焦的声辐射力脉冲在纵向不同深度上连续聚焦, 使不同深度的组织几乎同时产生横向位移, 通过“马赫锥”原理, 在聚焦部位而产生剪切波, 随后应用颜色编码技术实时显示组织弹性图^[10]。本研究通过检测实验动物的 E_{mean} 得出肝脏 E_{mean} , 提示诊断NASH的最佳临界点, 即当 $E_{\text{mean}}\geq 6.0$ kPa时, 必须高度警惕NASH的可能性。Kang等^[11]将NASH的 E_{mean} 截值定为5.9 kPa, 本实验结果与之相近。此外, 本实验认为, 肝硬化的最佳

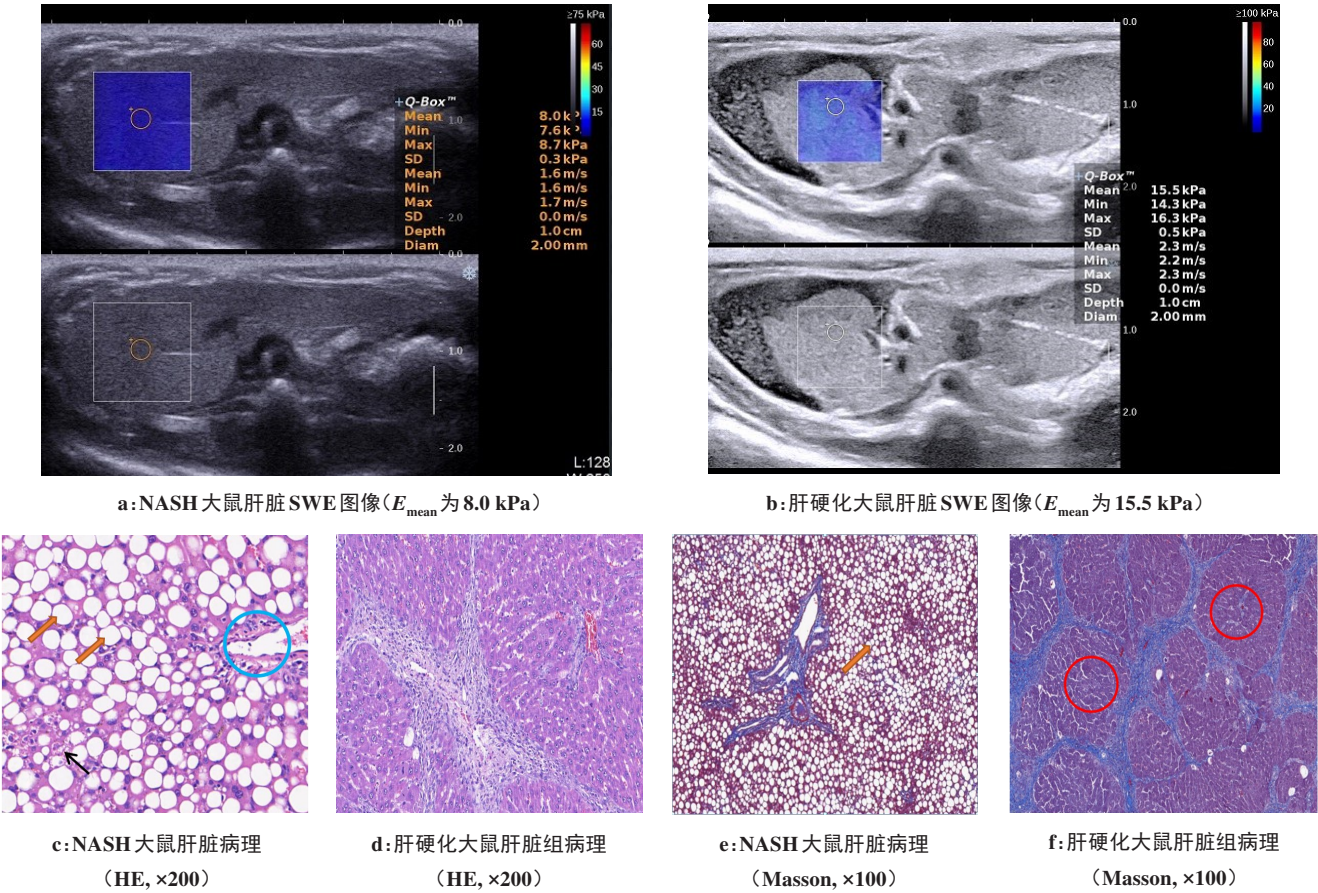


图2 实验组大鼠肝脏病理表现及SWE测量

Fig.2 Pathological manifestations and SWE measurement of rat liver in experimental groups

NASH组大鼠胞浆内可见大小不等的脂肪空泡(粗箭头所示),部分肝细胞气球样变(细箭头所示),血管周围淋巴细胞浸润(蓝色圆圈所示);肝硬化组肝脏假小叶形成(红色圆圈所示)

表2 不同病理分组的 E_{mean} 和mRNA表达

Tab.2 E_{mean} and mRNA expression in different pathological groups

参数	正常组($n=42$)	单纯脂肪变性组($n=5$)	边界组($n=5$)	NASH组($n=30$)	肝硬化组($n=6$)
$E_{\text{mean}}/\text{kPa}$	5.57 ± 0.37	5.64 ± 0.39	5.70 ± 0.42	7.33 ± 1.50	15.9 ± 2.49
MCP-1	0.29 ± 0.08	0.35 ± 0.10	0.34 ± 0.10	0.57 ± 0.22	1.50 ± 0.65
TNF- α	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.06	0.49 ± 0.12	1.18 ± 0.44
I型胶原	0.51 ± 0.15	0.63 ± 0.27	0.41 ± 0.11	0.76 ± 0.20	2.37 ± 0.95
α -SMA	0.50 ± 0.17	0.53 ± 0.10	0.52 ± 0.09	0.69 ± 0.26	4.89 ± 2.03

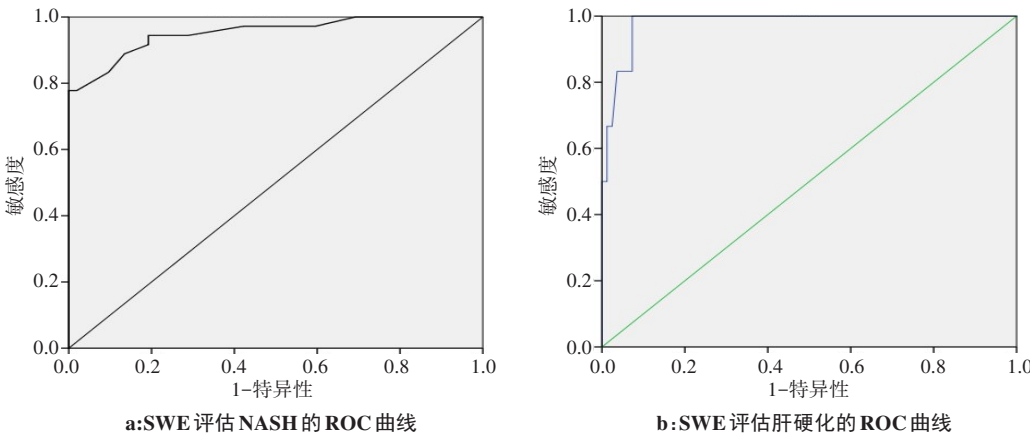


图3 SWE 对大鼠NASH和肝硬化的诊断效能

Fig.3 Diagnostic efficacy of SWE in NASH and liver cirrhosis

截值可定为9.7 kPa,该结果与Deffieux等^[12]提出的截值接近。

国内外有众多研究报道了SWE在评估慢性肝炎患者肝纤维化方面的高诊断性能^[13-15],但对评估NAFLD方面尚未得到充分验证,且NAFLD脂肪变性程度对肝脏硬度是否产生影响仍存在争议。Petta等^[16]研究结果提示脂肪变性程度是肝脏硬度增高的独立预测因子($P=0.03$);Guo等^[17]认为在不同严重程度的脂肪变性间肝脏硬度并未观察到明显的差异,即脂肪变性不影响肝脏硬度值;Rifai等^[18]研究发现肝脏硬度与肝纤维化分级($P<0.001$)和炎症活性($P<0.05$)相关,但肝脏脂肪变性对肝脏硬度的影响没有统计学意义($P>0.05$)。本研究在对NAFLD大鼠肝脏病理改变进行分析时发现,NASH组和肝硬化组的肝脏硬度显著高于正常、单纯性脂肪变性和临界组($P<0.001$),肝硬化组的肝脏硬度也显著高于NASH组($P<0.001$),而正常组、单纯性脂肪变性组和临界组之间,肝脏硬度没有显著差异($P>0.05$)。由此推测,肝脏硬度可能与纤维化程度相关,而与脂肪变性无关。NAFLD初期,肝脏还未出现纤维化,肝脏硬度未发生明显变化,随着NAFLD发展,纤维化程度逐渐加重,肝脏硬度和病变程度呈正相关。

NAFLD伴随着许多生物分子变化,包括促炎和纤维化细胞因子的激活。据报道,MCP-1、TNF- α 、I型胶原、 α -SMA的mRNA水平与NAFLD的发病机制密切相关^[19]。这些改变可能会影响超声波和剪切波传播,但对其影响较大的分子生物学指标是哪些仍未知^[20]。本研究发现,虽然MCP-1、TNF- α 、I型胶原和 α -SMA这4种mRNA的表达均与NAFLD严重程度呈正相关,但MCP-1和I型胶原的mRNA表达与 E_{mean} 呈独立相关($P<0.001$)。MCP-1可趋化巨噬细胞进而引起肝脏炎症浸润,并激活肝星状细胞导致I型胶原大量堆积,炎症反应和I型胶原沉积都促进了肝纤维化的发生发展^[21]。由此推测,MCP-1和I型胶原可能通过诱导肝纤维化进展从而影响剪切波传播。

【参考文献】

- [1] 夏清蓉,段星星,李皓,等. 实时剪切波弹性成像对正常儿童肝脏硬度的研究[J]. 中国医学影像技术, 2017, 33(9): 1353-1356.
XIA Q R, DUAN X X, LI H, et al. Research of real-time shear wave elastography in liver stiffness of normal children[J]. Chinese Journal of Medical Imaging Technology, 2017, 33(9): 1353-1356.
- [2] TOSELLO-TRAMPONT A C, LANDES S G, NGUYEN V, et al. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production[J]. J Biol Chem, 2012, 287(48): 40161-40172.
- [3] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN N M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313.
- [4] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. Hepatology, 2016, 64(1): 73-84.
- [5] LIAO Y Y, YEH C K, HUANG K C, et al. Metabolic characteristics of a novel ultrasound quantitative diagnostic index for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7922.
- [6] LONGO D L, DIEHL A M, DAY C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. New Engl J Med, 2017, 377(21): 2063-2072.
- [7] GUO Y R, LIN H M, DONG C F, et al. Role of acoustic radiation force impulse imaging elastography in the assessment of steatohepatitis and fibrosis in rat models[J]. Med Eng Phys, 2018, 59: 30-35.
- [8] CASTERA L. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: non-invasive tests are enough[J]. Liver Int, 2018, 38(S1): 67-70.
- [9] 张少丹,李兵,陈薇. 超声弹性成像鉴别诊断肝脏良恶性肿瘤的准确性及其影响因素分析[J]. 中国医学物理学杂志, 2018, 35(7): 807-810.
ZHANG S D, LI B, CHEN W. Accuracy of ultrasound elastography in differential diagnosis of benign and malignant liver tumors and analysis of its influencing factors[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2018, 35(7): 807-810.
- [10] EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography. Part 1: basic principles and technology[J]. Ultrascall in der Medizin, 2013, 34(2): 169-184.
- [11] KANG B K, LEE S S, CHEONG H, et al. Shear wave elastography for assessment of steatohepatitis and hepatic fibrosis in rat models of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Ultrasound Med Biol, 2015, 41(12): 3205-3215.
- [12] DEFFIEUX T, GENNISSON J L, BOUSQUET L, et al. Investigating liver stiffness and viscosity for fibrosis, steatosis and activity staging using shear wave elastography[J]. J Hepatol, 2015, 62(2): 317-324.
- [13] FERRAIOLI G, TINELLI C, DAL BELLO B, et al. Liver Fibrosis Study Group. Accuracy of real-time shear wave elastography for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis C: a pilot study[J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2125-2133.
- [14] LEUNG V Y, SHEN J, WONG V W, et al. Quantitative elastography of liver fibrosis and spleen stiffness in chronic hepatitis B carriers: comparison of shear-wave elastography and transient elastography with liver biopsy correlation[J]. Radiology, 2013, 269(3): 910-918.
- [15] HERRMANN E, DE LÉDINGHEN V, CASSINOTTO C, et al. Assessment of biopsy-proven liver fibrosis by two-dimensional shear wave elastography: an individual patient data-based meta-analysis[J]. Hepatology, 2018, 67(1): 260-272.
- [16] PETTA S, MARCELLO M, MACALUSO F S, et al. The severity of steatosis influences liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2015, 62(4): 1101-1110.
- [17] GUO Y R, DONG C F, LIN H M, et al. Ex vivo study of acoustic radiation force impulse imaging elastography for evaluation of rat liver with steatosis[J]. Ultrasonics, 2016, 74: 161-166.
- [18] RIFAI K, CORNBERG J, MEDERACKE I, et al. Clinical feasibility of liver elastography by acoustic radiation force impulse imaging (ARFI)[J]. Dig Liver Dis, 2011, 43(6): 491-497.
- [19] ZHAN Y T, AN W. Roles of liver innate immune cells in nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(37): 4652.
- [20] LU Y P, WEI J, TANG Y Y, et al. Evaluation of fatty liver fibrosis in rabbits using real-time shear wave elastography[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(2): 355-362.
- [21] BAECK C, WEHR A, KARLMARK K R, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury[J]. Gut, 2012, 61: 416-426.

(编辑:谭斯允)