

基于声辐射力脉冲弹性成像技术初步 探索肝纤维化小鼠肝剪切波速

陈高峰^{1*}, 高志玲^{2*}, 楼唯薇³, 黄凌鹰^{3#}, 金树根^{4#}

(上海中医药大学附属曙光医院 1. 肝病研究所,

2. 超声诊断科, 3. 肝病科, 4. 细胞免疫室, 上海 201203)

[摘要] 目的 应用声辐射力脉冲弹性成像 (acoustic radiation force impulse imaging, ARFI) 技术探索四氯化碳 (CCl₄) 诱导的肝纤维化模型小鼠肝内剪切波速变化特征与意义。方法 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠分为 3 组: 对照组采用食用油 (0.1 mL/20 g 体质量) 隔日一次灌胃, 共 8 周; 4 周组实验 1~4 周采用上述食用油隔日一次灌胃, 实验第 5 周开始灌胃 1% CCl₄ 食用油混合液 (250 μ L/kg) 染毒, 隔日一次共 4 周; 8 周组实验第 1 周开始灌胃 CCl₄ 食用油混合液 (250 μ L/kg) 染毒, 隔日一次共 8 周。实验 8 周后及停毒正常饲养 2 周后采用 ARFI 技术检测肝内剪切波速, 然后处死所有小鼠, 收集肝组织, 进行 HE 和天狼猩红胶原纤维染色, 观察肝组织病理学变化。结果 与对照组小鼠相比, 4 周组正常饲养 2 周后肝内剪切波速增加, 组织学观察见纤维化形成; 而 8 周组正常饲养 2 周后肝内剪切波速更高, 组织学观察见肝硬化形成。但 4 周组、8 周组染毒结束时肝内剪切波速相似, 均明显高于各自正常饲养 2 周后。结论 应用 ARFI 技术检测的肝剪切波速能反映小鼠肝纤维化变化, 但须排除肝内炎性损伤对肝内剪切波速的影响。

[关键词] 肝纤维化; 超声成像; 声辐射力脉冲弹性成像; 剪切波速; 小鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0361-06

弹性成像除超声和磁共振两大类外, 还有光和机械压力传感器等。在超声四大弹性成像技术即瞬时弹性成像 (transient elastography, TE)、

声辐射力脉冲弹性成像 (acoustic radiation force impulse imaging, ARFI)、实时组织弹性成像 (real-time tissue elastography, RTE) 和实时剪切波弹性成像 (real-time shear wave elastography, SWE) 中, 应用于肝纤维化检测的 Fibroscan 和 FibroTouch 是采用 TE 技术开发的, 其中 FibroTouch 是 TE 与二维超声影像技术结合。虽然 Fibroscan 和 FibroTouch 广泛应用于临床肝病患者的肝纤维化检测和疗效评价观察, 但临床实践发现炎性反应因素影响检测结果^[1]。迄今为止, Fibroscan 和 FibroTouch 仍不能在大鼠和小鼠的肝纤维化实验中应用。仅有一项研究采用 TE 技术研发出一种瞬间微弹性成像技术, 成功应用于检测小鼠四氯化碳 (CCl₄) 诱导的肝纤维化和淀粉样变性模型^[2]。与 Fibroscan 和 FibroTouch 仅限于检测肝纤维化不同, 理论上 ARFI 可检测其他组织器官弹性变

[收稿日期] 2020-01-08

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81603589)

[作者简介] 陈高峰(1974—), 男, 主治医师、主管技师, 主要从事肝病病理诊断与临床工作。

E-mail: gaofengchen06@126.com

高志玲(1983—), 女, 主管技师, 主要从事肝脏肿瘤、甲状腺肿瘤的超声诊断及介入性治疗工作。E-mail: 15800389546@139.com

* 共同第一作者

[通信作者] 黄凌鹰(1985—), 女, 主治医师, 主要从事肝病基础研究与临床工作。E-mail: hly320@126.com

金树根(1965—), 男, 主治医师, 主要从事肝病基础研究与临床工作。E-mail: jingsg@hotmail.com

共同通信作者

化。目前, ARFI 的声触诊组织量化已被应用于大鼠肠^[3]、肝^[4-5]、眼^[6]和脑^[7]组织炎性损伤、脂肪变性和纤维化检测的动物实验, 但未见应用于小鼠肝纤维化检测的报道。本研究采用 ARFI 技术检测 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化时肝内剪切波速变化, 评估其作为一种可替代肝活检的实时、非创伤性诊断肝纤维化方法的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 6 周龄, 体质量 (24 ± 2) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK (沪) 2017-0005]。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心[SYXK (沪) 2014-0008], 饲养室温度 25~26 °C, 相对湿度 50%~60%, 光照周期明暗各 12 h, 自由饮食。适应性饲养一周后开始实验。

1.2 试剂

CCl₄ 购自国药集团化学试剂有限公司, 采用市售食用油 (福临门一级大豆油, 中粮集团生产) 配成质量分数为 1%; 异氟烷 (isoflurane) 购自河北一品制药股份有限公司。

1.3 主要仪器设备

呼吸麻醉机 (中国瑞沃德, R500)、彩超仪 (德国西门子, SC2000)、小动物光声成像系统 (加拿大 Fuji, LazrX)、脱水机 (德国莱卡, ASP 300S)、包埋机 (德国莱卡, EG1150H)、切片机 (德国莱卡, RM2235)、显微镜 (日本奥林巴斯, DP71) 及其图像处理分析系统 (MediaCybernetics, Image-Pro Plus)。

1.4 CCl₄ 染毒制备肝纤维化模型及分组

10 只雄性小鼠作为对照组, 自实验开始采用食用油 (0.1 mL/20 g 体质量) 隔日一次灌胃, 共 8 周。4 周组 (15 只) 在实验 1~4 周, 采用上述食用油隔日一次灌胃, 实验第 5 周开始灌胃 CCl₄ 食用油混合液 (250 μL/kg) 染毒, 隔日一次, 共 4 周。8 周组 (15 只) 在实验第 1 周开始灌胃 CCl₄ 食用油混合液 (250 μL/kg) 染毒, 隔

日一次, 共 8 周。实验 8 周后各组均正常饲养 2 周。实验结束, 处死小鼠并收集肝组织样本, 之前 12 h 禁食不禁水。

1.5 多模式小动物光声成像系统 B 超检测肝灰度

用 4% 的异氟烷诱导麻醉小鼠后, 用 1.5% 的异氟烷维持麻醉小鼠。采用多模式小动物光声成像系统, 高频线阵探头, 频率 40 MHz, 观察小鼠肝右叶同一区域, 读取肝灰度值。

1.6 ARFI 法检测肝内剪切波速

如前麻醉状态下, 采用西门子 Acuson S2000 彩色多普勒超声诊断仪, 9L4 高频线阵探头, 频率 9 MHz, 观察各小鼠肝右叶同一区域, 等待图像保持平稳后, 切换 UPDATE 按钮, 自动计算出结节内感光区域剪切波的速度。

1.7 肝组织 HE 与天狼猩红胶原染色

肝组织经中性甲醛缓冲液固定, 石蜡包埋。HE 染色: 石蜡切片, 切片厚度为 4 μm, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇溶液水化, 蒸馏水洗 3~5 min, Harris 苏木精染色 15 min, 自来水洗 3~5 min, 5% 盐酸乙醇溶液分化 10 s, 水洗蓝化 3~5 min, 镜检细胞核, 伊红复染 10 s, 梯度脱水, 二甲苯透明, 封固。天狼猩红胶原染色: 石蜡切片, 切片为 4 μm 厚度, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇溶液水化, 蒸馏水洗 3~5 min, 天狼猩红染色液滴染 15 min, 无水乙醇分化, 二甲苯透明, 封固。胶原染色阳性面积分析: 采用 Olympus DP71 显微数码 CCD 采集图片, 用 Image-Pro Plus 6.1 进行肝组织胶原面积 (反映纤维化) 半定量分析。

1.8 数据处理

所有数据均采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析, 组间差异比较采用方差分析法, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周时 B 超检测小鼠肝灰度和肝内剪切波速变化

正常小鼠的肝超声灰度为 0.6, 染毒 4 周、8 周时肝超声灰度均为 1.6 左右 (图 1); 正常小鼠肝内剪切波速为 0.6~0.8, 染毒 4 周、8 周时小鼠肝内剪切波速均在 2.6~2.8。

2.2 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时肝内剪切波速变化

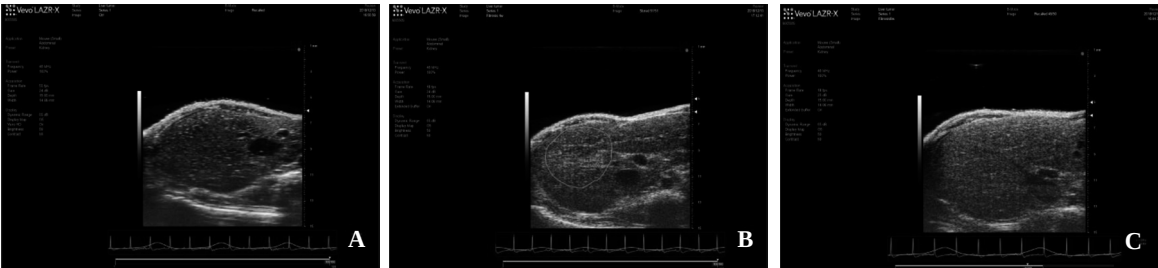
与对照组比, CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时肝内剪切波速依次增加 (均 $P < 0.05$), 各组肝内剪切波速变化见图 2 和表 1。

2.3 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时小鼠肝组织病理改变

CCl₄ 染毒 4 和 8 周后正常饲养 2 周时肝纤维化

半定量分析结果见表 2。

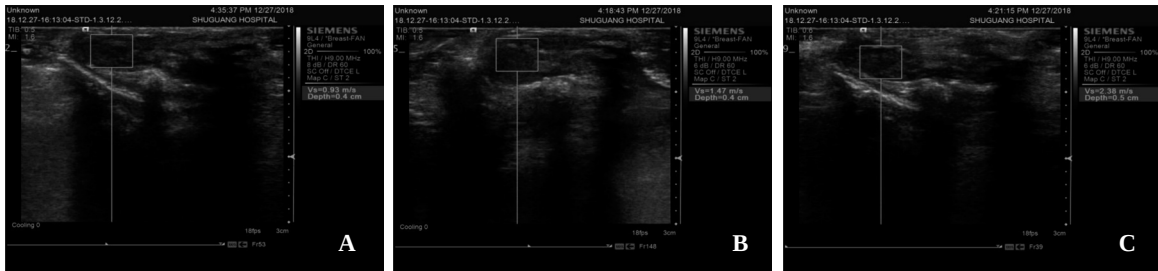
与正常组 (图 3 A、D) 比, 4 周组 (图 3 B、E) 肝细胞的细胞质疏松, 汇管区没有明显炎性细胞聚集, 汇管区胶原纤维变粗向肝实质伸入; 8 周组 (图 C、F) 肝细胞的细胞质疏松明显, 汇管区炎性细胞聚集, 胶原纤维变粗且向肝实质伸入, 形成典型的 P-P、P-C 纤维间隔 (假小叶形成)。



A 为对照组, B 为 4 周组, C 为 8 周组。

图 1 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周时小动物光声成像系统 LazrX 检测小鼠肝超声灰度值

Figure 1 The gray scale value of liver ultrasound in mice at 4 and 8 weeks after CCl₄ exposure was detected by photoacoustic imaging system LazrX



A 为正常组, B 为 CCl₄ 染毒 4 周后正常饲养 2 周, C 为 CCl₄ 染毒 8 周后正常饲养 2 周。

图 2 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周小鼠肝内剪切波速

Figure 2 The intrahepatic shear wave velocity at 2 weeks of normal feeding after CCl₄ exposure for 4 and 8 weeks

表 1 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时肝内剪切波速
Table 1 The intrahepatic shear wave velocity (SWV) at 2 weeks of normal feeding after CCl₄ exposure for 4 and 8 weeks

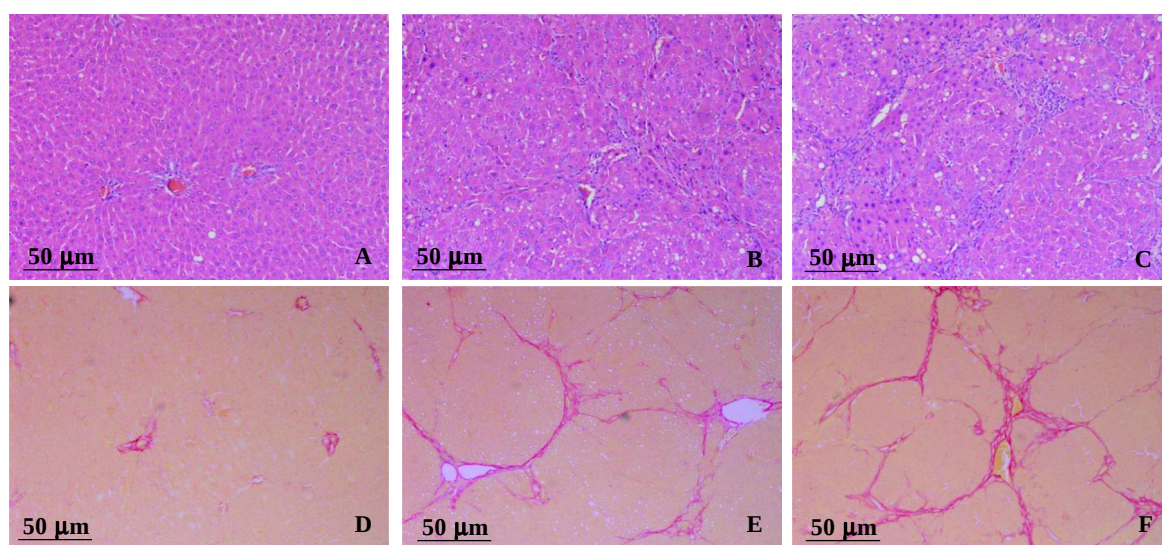
组别	n	SWV/(m · s ⁻¹)
对照组	10	0.89 ± 0.20
4 周组	12 [#]	1.52 ± 0.34 [*]
8 周组	10 [#]	2.47 ± 0.39 ^{*△}

注: [#] 在染色 4 周和 8 周期间小鼠死亡各 3 只和 5 只。与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 4 周组比较, [△] $P < 0.05$ 。

表 2 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时小鼠肝纤维化
Table 2 The liver fibrosis semi-quantitative analysis of mice at 2 weeks of normal feeding after CCl₄ exposure for 4 and 8 weeks

组别	n	纤维化半定量 /%
对照组	10	0.35 ± 0.24
4 周组	12 [#]	1.72 ± 0.39 [*]
8 周组	10 [#]	4.57 ± 0.76 ^{*△}

注: [#] 在染色 4 周和 8 周期间小鼠死亡各 3 只和 5 只。与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 4 周组比较, [△] $P < 0.05$ 。



A~C 为 HE 染色, D~F 为天狼猩红染色。A 和 D 为正常组, B 和 E 为 CCl₄ 染毒 4 周后正常饲养 2 周, C 和 F 为 CCl₄ 染毒 8 周后正常饲养 2 周。

图 3 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时小鼠肝组织病理改变

Figure 3 The pathological change of mouse liver tissues at 2 weeks of normal feeding after CCl₄ exposure for 4 and 8 weeks

3 讨论

采用小动物光声成像系统 LazrX 对肝纤维化造模小鼠检测发现, CCl₄ 染毒 4 周、8 周肝纤维化模型小鼠肝实质灰度相近, 同时采用 ARFI 技术检测 CCl₄ 染毒所致的肝纤维化小鼠肝剪切波速, 发现结果与小动物光声成像系统 LazrX 肝内灰度检测结果完全一致。考虑低剂量 CCl₄ 染毒肝损伤多在 24 h 前后达最高峰, 肝内炎性坏死 2 周后消失, 几乎接近正常^[8]。在 CCl₄ 染毒 4 周、8 周后正常饲养 2 周再进行肝剪切波速检测, 发现肝内剪切波速在 CCl₄ 染毒 8 周后正常饲养 2 周组 > CCl₄ 染毒 4 周后正常饲养 2 周组 > 正常对照组, 与肝内纤维化改变相一致。上述结果与临床检测发现肝功能异常可致肝弹性检测硬度明显上调, 随肝功能恢复正常而肝弹性检测硬度下调^[9-12]完全一致。除了实时与非创伤性, 考虑 ARFI 还能检测肝以外其他器官组织^[3, 6-7]。因此, 只要排除炎性损伤改变, ARFI 可作为替代活检的诊断纤维化的有效方法。换言之, 因为急性炎性损伤也能导致超声成像的剪切波速改变^[13-16], 所以可利用此特点将 ARFI 技术应用于急性肝等组织器官损伤的临床诊治和抗肝等组织器官损伤的药物筛选中。目前, 已开展对

CCl₄ 中毒大鼠急性肝损伤进行 ARFI 法动态检测肝内剪切波速变化的研究, 旨在建立一个实时、非创伤性抗急性肝损伤的药物筛选平台。

另外, 考虑 SC2000 检测剪切波速时取框大而且固定不可调小, 因此实验动物应尽量选择体质量大一些的成年小鼠。本课题组同时对大鼠肝剪切波速检测发现, 3~4 周龄正常大鼠肝脏因体积小而受管道干扰, 其检测到的肝剪切波速竟高于 6 月龄大鼠。大龄大鼠因肝脏体积大, 如选择检测部位不同其所含管道密度也不同, 肝剪切波速相差很大, 这一现象也似表明: 与其说反映肝剪切波速增龄性变化不太明显, 不如说其含管道密度影响肝剪切波速检测结果 (将另文发表)。小动物 B 超如富士 VisualSonics 公司 VECO 系列 2100、3100, 特别是最新升级版的多模式光声成像系统 LazrX, 因其高分辨率 (30~40 MHz 甚至 70 MHz), 适合包括斑马鱼、小鼠在内的更小动物的急性肝炎和肝纤维化等慢性肝损伤的检测^[17]。事实上, 同时应用多模式光声成像系统 LazrX 的光声仪检测含氧与非含氧血红蛋白以分析肝内血氧饱和度时发现, 急性肝损伤时肝内灌注不足导致严重缺氧, 保肝有效药物可明显恢复肝内血氧供应, 而 CCl₄ 等肝损伤药物明显加重了肝内缺血

缺氧(结果待发表)。

综上所述,本研究结果表明,采用ARFI法进行肝剪切波速检测能反映小鼠肝纤维化变化,但炎性细胞浸润也导致肝剪切波速变化,因此须排除肝内炎性细胞浸润所致肝损伤对肝内剪切波速的影响。

参考文献:

- [1] 杨柯柯, 廖锦堂. ARFI评价急性药物性肝损伤的临床研究[J]. 肝脏, 2016, 21(5):338-340,359.
- [2] Bastard C, Bosisio MR, Chabert M, et al. Transient micro-elastography: A novel non-invasive approach to measure liver stiffness in mice[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(8):968-975.
- [3] Dillman JR, Stidham RW, Higgins PD, et al. US elastography-derived shear wave velocity helps distinguish acutely inflamed from fibrotic bowel in a Crohn disease animal model[J]. Radiology, 2013, 267(3):757-766.
- [4] Hu Z, Luo J, Wei H, et al. Correlation of virtual touch tissue quantification and liver biopsy in a rat liver fibrosis model [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5):3694-3700
- [5] Guo Y, Dong C, Lin H, et al. Ex vivo study of acoustic radiation force impulse imaging elastography for evaluation of rat liver with steatosis [J]. Ultrasonics, 2017, 74:161-166.
- [6] Zha L, Chen KQ, Zheng XZ, et al. The safety and feasibility of diagnostic acoustic radiation force impulse elastography used for eyes. A preliminary *in vivo* study[J]. Med Ultrason, 2017, 19(2):185-189.
- [7] Zhu ZH, Peng KP, Liu MH, et al. Acoustic radiation force impulse imaging with virtual touch tissue quantification enables characterization of mild hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. J Ultrasound Med, 2019, 38(7): 1797-1805.
- [8] Bruckner JV, MacKenzie WF, Muralidhara S, et al. Oral toxicity of carbon tetrachloride: acute, subacute, and subchronic studies in rats[J]. Fundam Appl Toxicol, 1986, 6(1):16-34.
- [9] 宋望姝, 王学梅, 姜锐, 等. 实时剪切波弹性成像检测急性肝炎肝脏弹性[J]. 中国医学影像技术, 2014, 30(11): 1687-1690.
- [10] 张志志, 李淑英, 王娟. 声辐射脉冲成像在评价急性药物性肝损伤中的应用价值[J]. 临床超声医学杂志, 2015, 17(5):320-322.
- [11] 卢超政. 实时剪切波弹性成像对急性肝炎的诊断价值 [J]. 河南医学研究, 2017, 26(3):467-468.
- [12] 杭敏, 王兴田. 弹性成像技术在肝炎、肝硬化诊断中的应用进展[J]. 山东医药, 2017, 57(7):108-110.
- [13] Cao W, Zhou Y, Niu Y, et al. Quantitative analysis of hepatic toxicity in rats induced by inhalable silica nanoparticles using acoustic radiation force imaging[J]. J Ultrasound Med, 2017, 36(9):1829-1839.
- [14] 武荣, 罗渝昆, 吕发勤, 等. 实时剪切波弹性成像诊断急性肝创伤的动物实验研究[J]. 中国医学影像学杂志, 2012, 20(4):294-297.
- [15] 刘涵生, 饶浩高, 徐清华, 等. 显微外科技术建立稳定的大鼠梗阻性黄疸内引流模型[J]. 中国现代普通外科进展, 2017, 20(1):845-850.
- [16] 黄品同, 王力, 孔凡雷, 等. 声辐射力脉冲成像技术对兔急性淤血肝的弹性评价[J]. 肝胆胰外科杂志, 2009, 21(3):184-186.
- [17] Naser MA, Sampaio DRT, Munoz NM, et al. Improved photoacoustic-based oxygen saturation estimation with SNR-regularized local fluence correction[J]. IEEE Trans Med Imaging, 2019, 38(2):561-571.

Experimental Study on Hepatic Shear Wave Velocity in Mice with Liver Fibrosis Based on Acoustic Radiation Force Impulse Imaging

CHEN Gaofeng^{1*}, GAO Zhiling^{2*}, LOU Weiwei³, HUANG Lingying^{3#}, JIN Shugen^{4#}

(1. Institute of Liver Diseases, 2. Department of Ultrasonography, 3. Department of Liver Diseases, 4. Cellular Immunology Lab, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

* These two authors contributed equally.

#Correspondence to: HUANG Lingying, hly320@126.com; JIN Shugen, jingsg@hotmail.com

[Abstract] Objective Acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) was used to explore the characteristics and significance of intrahepatic shear wave velocity of mice with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄). **Methods** Six weeks old male C57BL/6J mice were used. The control group mice were given edible oil (0.1 mL/20 g body weight) by gavage once every other day for 8 weeks. In the 4-weeks group, the above-mentioned edible oil was given by gavage once every other day for 4 weeks, then the mixture of 1% CCl₄ and edible oil (250 µL/kg) were given by gavage once every other day for 4 weeks. In the 8-weeks group, the mixture of 1% CCl₄ and edible oil (250 µL/kg) were given by gavage once every other day for 8 weeks. After 8 weeks of the experiment and another 2 weeks of normal feeding, ARFI was used to detect the intrahepatic shear wave velocity respectively. All the mice were sacrificed and the liver tissues were collected for HE and Sirius red collagen staining, and the pathological changes of liver tissues were observed. **Results** Compared with the control group, the intrahepatic shear wave velocity of the 4-week group was increased after 2 weeks of normal feeding, and the histological liver fibrosis was formed, while that of the 8-week group was higher than that of the control group after 2 weeks of normal feeding and the liver cirrhosis was formed. However, the intrahepatic shear wave velocity of 4-week group and 8-week group was similar, which was significantly higher than that of after 2 weeks of normal feeding respectively. **Conclusion** The intrahepatic shear wave velocity of ARFI can reflect the changes of liver fibrosis in mice, but the effect of intrahepatic inflammatory injury on intrahepatic shear wave velocity should be excluded.

[Key words] Liver fibrosis; Ultrasound elastography; Acoustic radiation force impulse imaging; Shear wave velocity; Mice