

# 剪切波弹性成像诊断大鼠非酒精性脂肪肝病的实验研究

石莹 杨增娣 吕永燕 杨艳婷 任明磊 徐翠萍 童清平

**摘要** **目的** 探讨剪切波弹性成像(SWE)诊断大鼠非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的价值。**方法** 将52只雄性SD大鼠随机分为实验组40只和对照组12只,其中实验组喂饲蛋氨酸和胆碱缺乏饲料建立NAFLD模型,对照组正常喂养,分别于实验1周、2周、3周和4周后随机抽取实验组10只、对照组3只大鼠,均于麻醉状态下及处死即刻行SWE检测肝脏硬度(LSM)及标准差(SD);然后解剖大鼠,获得离体状态下LSM及SD。对切除的肝脏组织进行病理学检查判断有无脂肪变性。绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析SWE诊断大鼠NAFLD的效能。**结果** 根据病理学检查结果,将大鼠分为非脂肪变性组17只,脂肪变性组35只。脂肪变性组处死即刻和离体状态下LSM分别为 $(3.95\pm1.78)$ kPa、 $(1.53\pm0.32)$ kPa,均高于非脂肪变性组 $[(2.91\pm1.53)$ kPa、 $(1.23\pm0.16)$ kPa],差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );两组麻醉状态下LSM比较差异无统计学意义。非脂肪变性组、脂肪变性组麻醉状态下SD分别为 $(1.70\pm0.56)$ kPa、 $(1.86\pm1.21)$ kPa,均高于处死即刻SD $[(0.92\pm0.65)$ kPa、 $(1.08\pm0.73)$ kPa]和离体状态下SD $[(0.26\pm0.16)$ kPa、 $(0.33\pm0.16)$ kPa],差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。ROC曲线分析显示,处死即刻和离体状态下LSM诊断大鼠NAFLD的曲线下面积分别为0.69、0.86,灵敏度和特异度分别为60.0%、60.0%和82.4%、100%。**结论** 应用SWE诊断大鼠NAFLD具有较好的价值,NAFLD大鼠不同状态下LSM均明显升高。

**关键词** 剪切波弹性成像;非酒精性脂肪肝;离体测量;大鼠

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]A

## Experimental study of shear wave elastography in the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in rats

SHI Ying, YANG Zengdi, LV Yongyan, YANG Yanting, REN Minglei, XU Cuiping, TONG Qingping

Clinical College of PLA of Anhui Medical University, Hefei 230001, China

**ABSTRACT** **Objective** To explore the value of shear wave elastography (SWE) in the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. **Methods** Fifty-two male SD rats were randomly divided into experimental group ( $n=40$ ) and control group ( $n=12$ ). The experimental group was fed with methionine and choline deficiency diet to establish NAFLD models, while the control group was fed normally. After 1 week, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks, 10 rats in the experimental group and 3 rats in the control group were randomly selected for the liver stiffness measurement (LSM) and standard deviation (SD) which were measured by SWE under anesthesia and after execution. Then the rats were dissected to obtain LSM and SD in vitro. The excised liver tissue was examined by pathology to determine the presence or absence of steatosis. Receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to analyze the diagnostic efficiency of SWE in the diagnosis of NAFLD in rats. **Results** According to the results of pathological examination, the rats were divided into non-steatosis group ( $n=17$ ) and 35 steatosis group ( $n=35$ ). In the steatosis group, LSM was  $(3.95\pm1.78)$  kPa after sacrifice and  $(1.53\pm0.32)$  kPa in vitro, respectively, which was higher than that in the non-steatosis group  $[(2.91\pm1.53)$  kPa,  $(1.23\pm0.16)$  kPa], and the differences were statistically significant (both  $P<0.05$ ). There was no significant difference in LSM between the two groups under anesthesia. The SD in non-steatosis group and steatosis

基金项目:南京军区医学科技创新课题(12MA030)

作者单位:230001 合肥市,安徽医科大学解放军临床学院(石莹、童清平);解放军联勤保障部队第九〇一医院超声诊断科(杨增娣、吕永燕、杨艳婷、任明磊、徐翠萍)

通讯作者:童清平, Email: tongqp168@163.com

group under anesthesia was  $(1.70 \pm 0.56)$  kPa and  $(1.86 \pm 1.21)$  kPa, respectively, which was higher than that in the execution state  $[(0.92 \pm 0.65)$  kPa,  $(1.08 \pm 0.73)$  kPa] and in the isolated state  $[(0.26 \pm 0.16)$  kPa,  $(0.33 \pm 0.16)$  kPa], and the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). ROC curve analysis showed that the area under the curve of LSM in the diagnosis of rats with NAFLD were 0.69 and 0.86 for execution and in vitro, respectively, the sensitivity and specificity were 60.0%, 60.0% and 82.4%, 100%, respectively. **Conclusion** The application of SWE has good value in the diagnosis of NAFLD in rats. The LSM of rats with NAFLD is significantly increased.

**KEY WORDS** Shear wave elastography; Nonalcoholic fatty liver disease; In vitro measurement; Rats

非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的肝损害因素所致的以肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征,其主要病理改变为弥漫性肝细胞脂肪变,伴或不伴气球样变性、炎细胞浸润及纤维化变性。NAFLD是慢性肝病的常见病因,其发病率不断增加并呈低龄化趋势,严重影响患者身体健康和生命安全<sup>[1-2]</sup>。剪切波弹性成像(shear wave elastography, SWE)具有安全、无辐射、无临床禁忌症等优点,通过测量肝脏硬度(liver stiffness measurement, LSM)量化其纤维化程度,临床已广泛应用于乙型肝炎肝纤维化的诊断<sup>[3-5]</sup>。但在诊断NAFLD及评估病变进展方面的研究较少,且目前研究关于脂肪变性是否影响LSM测值尚存在争议<sup>[5]</sup>。本实验通过喂养蛋氨酸和胆碱缺乏饲料诱导SD大鼠发生不同程度的肝脏脂肪变性,分别于麻醉状态、处死即刻和离体状态下应用SWE测量大鼠LSM,旨在探讨SWE诊断大鼠NAFLD的价值。

## 材料与方法

### 一、实验动物

SPF级雄性SD大鼠52只,体质量240~300 g,购自安徽医科大学实验动物中心[批准号:SCXK(皖)2017-001]。

### 二、实验方法

1. NAFLD大鼠模型建立:适应性饲养1周后,将大鼠随机分为实验组40只和对照组12只,实验组喂养蛋氨酸和胆碱缺乏饲料(MCD: MD12052)建立NAFLD模型,对照组喂养正常饲料。光-暗周期为12 h,平均温度为23℃。

2. SWE检查:使用西门子Acuson Oxana 3彩色多普勒超声诊断仪,9L4线阵探头,频率4~9 MHz;配备声触诊组织定量分析软件。于实验1周、2周、3周和4周后随机抽取实验组10只、对照组3只大鼠进行SWE检查。大鼠禁食8~12 h,5%水合氯醛(0.5 ml/100 g)腹腔注射麻醉,备皮,取左侧卧位,于肝脏中叶避开大血

管、胆道和叶间裂区域,距离体表1.0 cm处选择感兴趣区,测量麻醉状态下LSM;然后采用颈椎脱臼法处死大鼠,在呼吸、心跳停止后立即测量处死即刻LSM;解剖大鼠,将肝脏置于装有胎牛血清的塑料器皿中,测量离体状态下LSM<sup>[6]</sup>。所有参数均重复测量5次取平均值,并计算其标准差(SD)。

3. 病理组织学检查:于实验1周、2周、3周和4周SWE检查后进行病理组织学检查,判断大鼠肝脏有无脂肪变性。取部分肝组织于10%中性福尔马林溶液中固定,包埋、切片,行HE和Masson染色;另取部分肝组织行冰冻切片及油红O染色。对所有切片进行SAF评分<sup>[7]</sup>,其中S代表肝脏脂肪变,A代表肝脏炎症活动度,F代表纤维化。

### 三、统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用 $t$ 检验。以病理组织学结果为金标准,绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析SWE诊断大鼠NAFLD的效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

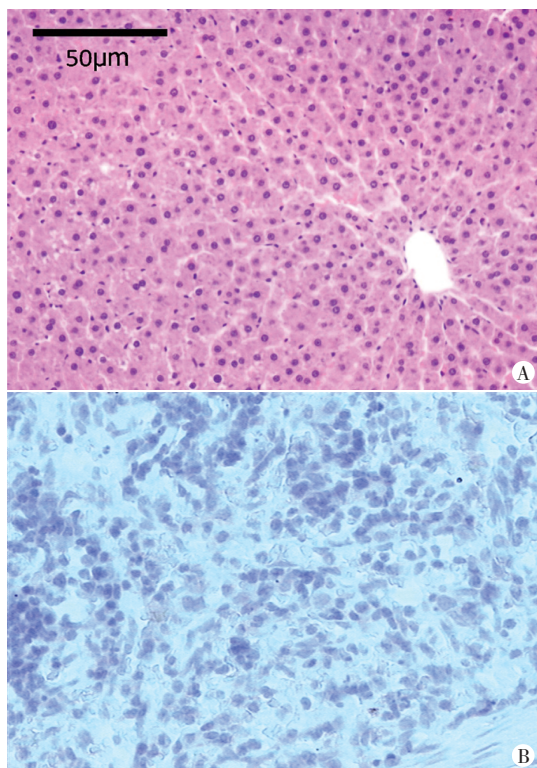
### 一、模型建立情况及分组

52只SD大鼠全部成活。病理结果显示所有大鼠肝脏均未见明显炎症及纤维化,其中对照组12只大鼠均未见明显脂肪变性;实验组中5只大鼠未见明显脂肪变性,其余35只大鼠肝脏均见大量脂肪空泡。根据病理结果分为非脂肪变性组17只和脂肪变性组35只,实验建模成功。见图1,2。

### 二、非脂肪变性组、脂肪变性组不同状态下LSM及SD比较

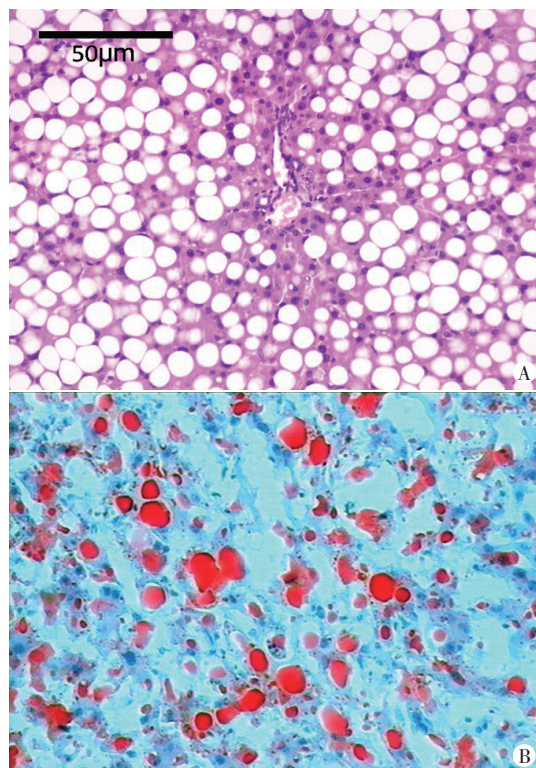
1. 脂肪变性组处死即刻和离体状态下LSM均高于非脂肪变性组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ );两组麻醉状态下LSM比较,差异无统计学意义。见图3,4和表1。

### 2. 脂肪变性组和非脂肪变性组内不同状态下SD



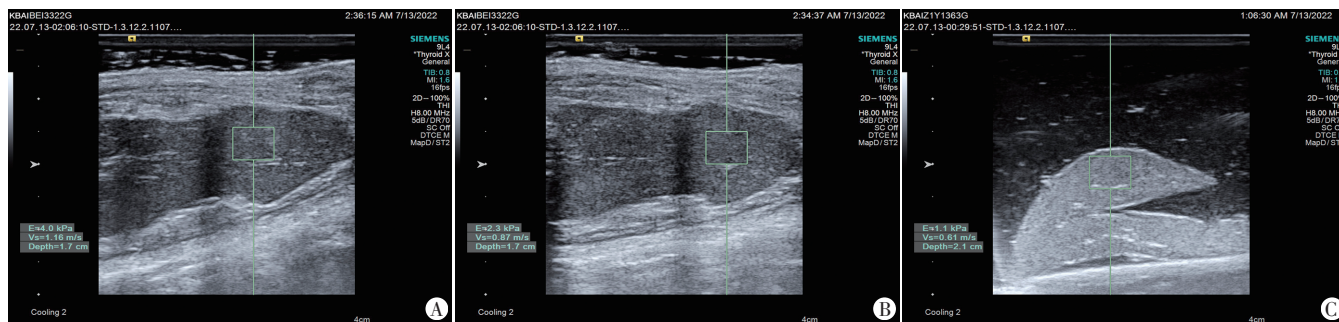
A: 肝小叶结构正常, 未见明显细胞坏死(HE 染色,  $\times 200$ ); B: 肝细胞无脂肪变性(油红 O 染色,  $\times 200$ )

图 1 非脂肪变性组大鼠肝组织病理图



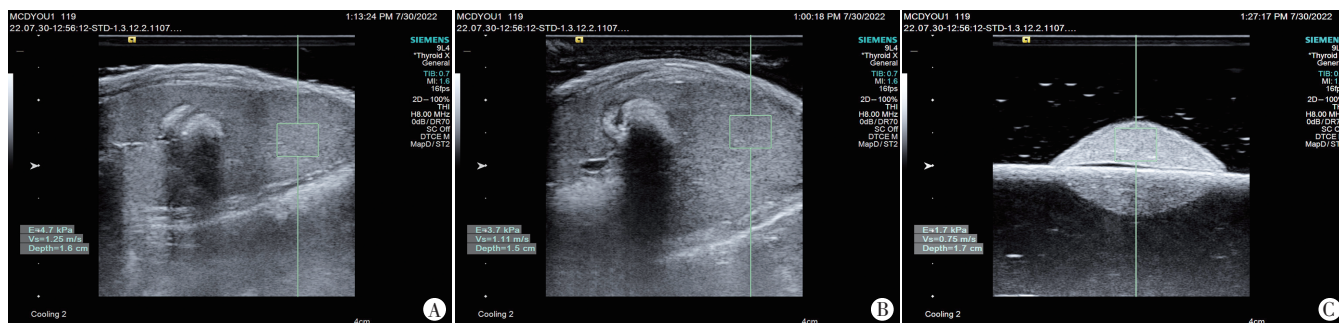
A: 肝细胞体积增大, 大泡状脂肪变性, 细胞核移位(HE 染色,  $\times 200$ ); B: 肝细胞广泛大泡状脂肪变性(油红 O 染色,  $\times 200$ )

图 2 脂肪变性组大鼠肝组织病理图



A: 大鼠肝脏实质呈均匀点状中等回声, 麻醉状态下 LSM 为 4.0 kPa; B: 处死即刻 LSM 为 2.3 kPa; C: 离体状态下 LSM 为 1.1 kPa

图 3 非脂肪变性组大鼠不同状态下肝脏 SWE 图



A: 大鼠肝脏实质回声细密增强, 麻醉状态下 LSM 为 4.7 kPa; B: 处死即刻 LSM 为 3.7 kPa; C: 离体状态下 LSM 为 1.7 kPa

图 4 脂肪变性组大鼠不同状态下肝脏 SWE 图

比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。两组麻醉状态下和处死即刻 SD 均高于离体状态下 SD, 且麻醉状

态下 SD 均高于处死状态下 SD, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 非脂肪变性组与脂肪变性组不同状态下

LSM 比较( $\bar{x} \pm s$ )

kPa

| 组别     | 麻醉状态下 LSM | 处死即刻 LSM  | 离体状态下 LSM |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 非脂肪变性组 | 4.45±1.80 | 2.91±1.53 | 1.23±0.16 |
| 脂肪变性组  | 4.09±2.32 | 3.95±1.78 | 1.53±0.32 |
| t 值    | 0.467     | -2.067    | -5.978    |
| P 值    | 0.644     | 0.044     | <0.001    |

LSM: 肝脏硬度

表 2 不同状态下非脂肪变性组和脂肪变性组

SD 比较( $\bar{x} \pm s$ )

kPa

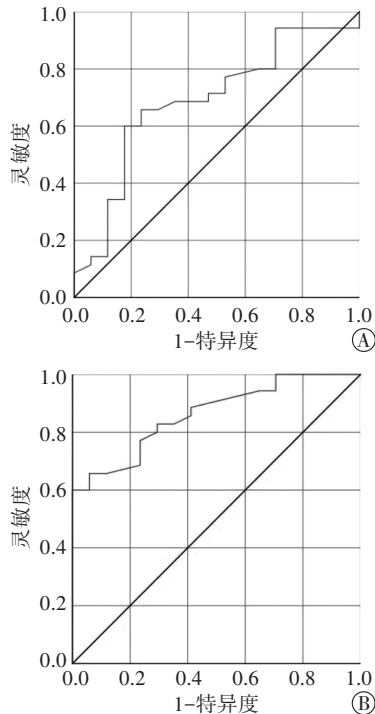
| 参数       | 非脂肪变性组                  | 脂肪变性组                   |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| 麻醉状态下 SD | 1.70±0.56* <sup>#</sup> | 1.86±1.21* <sup>#</sup> |
| 处死即刻 SD  | 0.92±0.65*              | 1.08±0.73*              |
| 离体状态下 SD | 0.26±0.16               | 0.33±0.16               |
| P 值      | <0.05                   | <0.05                   |

与同组离体状态下 SD 比较, \* $P<0.05$ ; 与同组处死即刻 SD 比较,

<sup>#</sup> $P<0.05$ 。SD: 肝脏硬度标准差

### 三、诊断效能分析

ROC 曲线分析显示, 处死即刻和离体状态下 LSM 诊断大鼠 NAFLD 的曲线下面积分别为 0.69、0.86, 灵敏度、特异度分别为 60.0%、60.0% 和 82.4%、100%。见图 5。



A: 处死即刻 LSM 诊断大鼠 NAFLD 的 ROC 曲线图; B: 离体状态下 LSM 诊断大鼠 NAFLD 的 ROC 曲线图

图 5 处死即刻和离体状态下 LSM 诊断大鼠 NAFLD 的 ROC 曲线图

### 讨 论

NAFLD 包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂

肪性肝炎及相关肝纤维化、肝硬化和肝癌<sup>[8]</sup>。目前临床诊断 NAFLD 的金标准是肝脏活组织病理学检查(以下简称肝活检), 但其有创、价格昂贵, 导致出血、感染甚至死亡等严重并发症的概率可达 1.4%。且肝活检为抽样评估, 获得的组织样本仅为肝脏总体积的 1/50 000, 当肝脏脂肪变性分布不均匀时, 存在一定的抽样误差, 而观察者间的主观因素也可导致镜下评估结果存在差异。同时, 脂肪变性是一个连续性过程, 而肝活检是半定量分级结果, 因此该方法不适宜作为连续随访及疗效监测的常用手段<sup>[3,9]</sup>。如何无创、简便、准确、可重复地评估 NAFLD 的脂肪变性程度是临床急需解决的难题之一。SWE 基于超声探头发射低频声辐射力脉冲引起组织位移, 通过测量组织运动产生的横向波速度评估乙型肝炎肝纤维化程度, 具有无创、简便、可重复、价廉等优点<sup>[10]</sup>, 但其在诊断 NAFLD 及评估病变进展方面的研究目前较少。SWE 受多种因素的影响, 如检测体位、测量深度、呼吸、心跳、探头压力、饮食等均会影响测值<sup>[11]</sup>, 尤以心跳和呼吸的影响为著。本实验通过喂养不同时间蛋氨酸和胆碱缺乏饲料以构建不同程度肝脏脂肪变性大鼠模型, 测量并比较麻醉、离体状态下及处死即刻 LSM 及 SD, 结果发现非脂肪变性组和脂肪变性组大鼠离体状态下 SD 均最低, 处死即刻 SD 次之, 均显著低于麻醉状态下 SD, 差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ), 表明离体及处死状态下应用 SWE 测量的稳定性好, 可信度高。

目前对于脂肪变性是否影响 LSM 测值存在争议, 研究<sup>[12-13]</sup>认为脂肪变性可对 LSM 测值造成影响, 而另有学者<sup>[14-15]</sup>认为 LSM 与脂肪变性无相关性。本实验结果显示, 非脂肪变性组与脂肪变性组麻醉状态下 LSM 比较差异无统计学意义, 但排除了呼吸、心跳等因素后, 脂肪变性组处死即刻和离体状态下 LSM 均高于非脂肪变性组, 差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ), 提示脂肪变性对 LSM 测值存在影响, 且脂肪变性组 LSM 更高。上述差异可能因在体测量结果变异度较大所致, 本实验中脂肪变性组和非脂肪变性组麻醉状态下 SD 分别为 (1.86±1.21) kPa、(1.70±0.56) kPa, 但处死即刻 SD 分别为 (1.08±0.73) kPa、(0.92±0.65) kPa, 且脂肪变性组与非脂肪变性组处死即刻 LSM 差值小于麻醉状态下 SD, 因此当样本量较小且测量结果分布不均匀时, 可能导致脂肪变性影响 LSM 测值的研究结论存在争议。

本实验 ROC 曲线分析显示, 处死即刻及离体状态下 LSM 诊断大鼠 NAFLD 的曲线下面积分别为 0.69、

0.86, 灵敏度、特异度分别为 60.0%、60.0% 和 82.4%、100%, 表明去除呼吸、心跳等影响因素后, SWE 对大鼠 NAFLD 具有良好的诊断效能。因此, 当优化超声仪器性能、改善测量方法<sup>[16]</sup>, 以及降低心跳、呼吸等因素对 LSM 测值的影响后, SWE 能够作为诊断 NAFLD 的有效手段, 为今后进一步研究提供参考。

本实验的局限性: ①样本量较小, 未对 LSM 与肝脏脂肪变性程度的相关性进行分析, 今后需增大样本量进一步研究; ②纳入研究的大鼠虽均为成年雄性大鼠, 但是大鼠周龄、体质量等尚存在一定差异, 未排除其对 LSM 测值的影响。

综上所述, 应用 SWE 诊断大鼠 NAFLD 具有较好的价值, NAFLD 大鼠不同状态下 LSM 均明显升高。后续研究将进一步探讨 SWE 在诊断肝脏脂肪变性患者中的应用价值。

#### 参考文献

- [1] 舒筠然, 李俊琪, 刘琼, 等. 非酒精性脂肪性肝病的流行病学和危险因素分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(9): 2085-2090.
- [2] Murag S, Ahmed A, Kim D. Recent epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gut Liver, 2021, 15(2): 206-216.
- [3] 中华医学会超声医学分会介入超声学组弹性成像评估肝纤维化专家组. 二维剪切波弹性成像评估慢性乙型肝炎肝纤维化临床应用指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(2): 255-261.
- [4] Saftoiu A, Gilja OH, Sidhu PS, et al. The EFSUMB guidelines and recommendations for the clinical practice of elastography in non-hepatic applications: update 2018[J]. Ultraschall Med, 2019, 40(4): 425-453.
- [5] European association for the study of the liver. EASL clinical practice guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis—2021 update[J]. J Hepatol, 2021, 75(3): 659-689.
- [6] Kong W, Tang Y, Liu L, et al. Stratifying non-alcoholic steatohepatitis with the non-invasive ultrasound markers shear wave dispersion slope and shear wave velocity: an animal study[J]. Ultrasound Med Biol, 2022, 48(12): 2442-2448.
- [7] Kaur G, Shivanandappa TB, Kumar M, et al. Fumaric acid protect the cadmium-induced hepatotoxicity in rats: owing to its antioxidant, anti-inflammatory action and aid in recast the liver function [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2020, 393(10): 1911-1920.
- [8] Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease[J]. Gastroenterology, 2020, 158(7): 1851-1864.
- [9] Barr RG, Ferraioli G, Palmeri ML, et al. Elastography assessment of liver fibrosis: society of radiologists in ultrasound consensus conference statement[J]. Ultrasound Q, 2016, 32(2): 94-107.
- [10] 吴冬秋, 崔丽华, 熊峰, 等. 血清 IL-34 联合超声弹性成像诊断慢性乙型肝炎患者肝纤维化的效能分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2021, 24(1): 23-26.
- [11] Dietrich CF, Bamber J, Berzigotti A, et al. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of liver ultrasound elastography, update 2017 (short version) [J]. Ultraschall Med, 2017, 38(4): 377-394.
- [12] Fierbinteanu Braticevici C, Sporea I, Panaitescu E, et al. Value of acoustic radiation force impulse imaging elastography for non-invasive evaluation of patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Ultrasound Med Biol, 2013, 39(11): 1942-1950.
- [13] Guo Y, Lin H, Dong C, 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(6): 30-35.
- [14] 周琴, 吕国荣, 郭海欣, 等. 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[J]. 中国医学物理学杂志, 2021, 38(8): 955-959.
- [15] Kang BK, Lee SS, 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.
- [16] Carbonell G, Berná-Serna JD, Oltra L, et al. Evaluation of rat liver with ARFI elastography: in vivo and ex vivo study [J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0217297.

(收稿日期: 2023-02-27)

## 《临床超声医学杂志》征订启事

《临床超声医学杂志》是经国家科委批准, 集超声影像诊断、治疗、工程及基础研究为一体的科技刊物。国内外公开发行, 月刊。为“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”“中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)”。设有临床研究、实验研究、综述、病例报道、述评、专家讲座、工程及译文等栏目, 报道超声医学领域影像诊断与治疗的先进技术和前沿进展, 为广大临床超声医师和研究人员提供良好的学术交流平台。

本刊刊号: ISSN 1008-6978; CN 50-1116/R。邮发代号: 78-116。

每期定价: 19 元, 全年 228 元(含邮寄费)。请到全国各地邮局订阅, 也可直接向本刊编辑部订阅。

地址: 重庆市渝中区临江路 74 号, 重庆医科大学附属第二医院内, 临床超声医学杂志编辑部。邮编: 400010。

联系电话: 023-63811304, 023-63693117。

Email: lccscq@vip.163.com。