

网络出版时间: 2019-9-3 17:26 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.013.html

# 恒河猴慢性酒精暴露肝损伤的多模态 MRI 实验研究

王松<sup>1</sup> 李燕<sup>1</sup> 余永强<sup>1,2</sup> 王海宝<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨多模态 MRI 评估恒河猴慢性酒精暴露肝损伤的可行性。方法 利用 7 只健康雄性恒河猴建立慢性酒精暴露肝损伤模型,于建模前(P0 期)及酒精诱导期结束后持续喂养 1 月(P1 期)、3 月(P2 期)及 6 月(P3 期),并于各维持期末行相同的多模态 MRI 扫描,采用单因素方差分析方法分析不同时间点多模态 MRI 参数间的差异,进一步分析采用 SNK-q 检验法,用 Pearson 相关性分析的方法分析多模态 MRI 参数和血液学指标之间的相关性。结果 建模成功。表观扩散系数(ADC)值及真性扩散(D)值在部分时间点之间差异有统计学意义,ADC 值及 D 值与三酰甘油指标呈显著负相关;假性扩散(D\*)及灌注分数(f)值在各时间点之间差异无统计学意义;D\* 及 f 值与血液学指标之间均无显著相关;脂肪分数(FF):在部分时间点之间差异有统计学意义;FF 与三酰甘油、AST 指标呈显著正相关;ADC 值、D 值与 FF 呈显著负相关。结论 慢性酒精暴露会对肝脏造成损伤,利用多模态 MRI 可对其进行定量评价,非人灵长类动物疾病模型的建立对临床相关疾病研究具有重要参考价值。

**关键词** 酒精;磁共振成像;体素内不相干运动;定量非对称回波的最小二乘估算法迭代水脂分离;恒河猴

中图分类号 R 445.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1557-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.012

酒精性肝损伤一直是临床和科研的研究热点之一,肝脏对酒精滥用的最早反应是肝细胞中的脂质积累,该病程是可逆的,可继续发展为酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌,脂肪肝也可直接发展为肝癌。肝脏活检仍旧是目前诊断和评估肝损伤的金标准,但它是一种侵入性手术,患者可能会出现不良反应及引起并发症,并难以进行动态观测,因此寻找出对酒精性肝损伤程度进行定量、无创的诊断方

法显得尤为重要<sup>[1-3]</sup>。Le Bihan et al<sup>[4]</sup>首次提出了体素内不相干运动(intravoxel incoherent motion, IVIM)的概念,将反映组织水分子扩散以及微循环灌注的参数分离开来。非对称回波的最小二乘估算法迭代水脂分离技术(iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation quantitation, IDEAL-IQ)则通过将水、脂二者的信号分离来获得脂肪分数(fat fraction, FF)。目前,国内外还未见对于酒精性肝损伤的动态研究及利用多模态 MRI 进行评价。该实验通过建立恒河猴慢性酒精暴露肝损伤模型,结合血液学指标,探讨多模态 MRI 技术无创、定量、动态评价酒精性肝损伤的可行性。

## 1 材料与方法

**1.1 动物模型的建立** 购买 7 只健康恒河猴[河南省南阳市新野县新豫野生动物养殖有限公司(豫林护许准字)[2006]21 号],均为雄性,无酒精及相关乙醇类物质接触史,年龄 7 岁,体质量 6.5~17.5 (10.79±3.55) kg。喂养环境:单笼喂养,20~25℃室温,湿度 55%~60%,每隔 12 h 调整光线明暗 1 次。建模过程如下:根据 Cosgrove et al<sup>[5]</sup>报道的时间表程序诱导法逐渐增加乙醇(浓度为 40%的瑞典绝对风味伏特加)用量,用纯葡萄糖增加甜味并用自来水稀释乙醇,任由恒河猴自由口服,随着周数的增加,逐渐调整用量,直至第 5 周达到 3.2 g/(kg·d)后维持该用量(第 1 周至第 5 周乙醇每天用量分别为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 g/kg 体质量),诱导期在第 5 周结束。

**1.2 MRI 检查方法** 在建模前及维持期 1 个月末、3 个月末及 6 个月末行多模态 MRI 扫描。应用 GE Discovery MR 750 W 3.0 T 高场磁共振仪,单通道膝关节线圈,包裹腹部,仰卧,放置沙袋加压以抑制呼吸。扫描前采用 3%戊巴比妥钠(剂量为 1.0 ml/kg 体质量)臀部肌肉注射的麻醉方法。MRI 检查序列及参数如下:IDEAL-IQ 序列:TR=10.5 ms, TE=3.3 ms, Flip Angle(翻转角)=3°, Bandwidth(接收带宽)=111.11, Slice Thickness(层厚)

2019-06-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171326、81571308);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2013ZD08)

作者单位:<sup>1</sup> 安徽医科大学第四附属医院放射科,合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院放射科,合肥 230022

作者简介:王松,男,硕士研究生;

余永强,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yuyongqiang@hotmail.com

= 2.0 mm 轴位扫描, Matrix  $320 \times 224$ , 扫描时间为 55 s。RTr fs T2FSE ARC 序列: 呼吸触发序列, TR 由呼吸频率决定, TE = 80.3 ms, Bandwidth(接收带宽) = 83.33, Slice Thickness(层厚) = 6.0 mm, Spacing = 2.0 mm, Frequency(频率)为 288, 轴位扫描, Matrix  $288 \times 224$ , 扫描时间为 104 s。RTr Sag 3D T1 FSPGR 序列: TR = 3.7 ms, TE = 1.8 ms, Flip Angle(翻转角) =  $3^\circ$ , Bandwidth(接收带宽) = 111.11, Slice Thickness(层厚) = 2.0 mm, 轴位扫描, Matrix  $320 \times 224$ , 扫描时间为 128 s。IVIM - DWI 序列: 呼吸触发序列, TR 由呼吸频率决定, TE = Minimum, Slice Thickness = 7.0 mm, Spacing = 2.0 mm, Frequency(频率) = 96, 轴位扫描, Matrix  $320 \times 224$ , 扩散采用 X、Y、Z 共 3 个方向, 应用 13 个 b 值, 分别为: 0、10、20、30、50、100、200、300、500、600、800、1 000、1 200。单位为  $\text{mm}^2/\text{s}^2$ , 扫描时间 230 s。

**1.3 图像分析** 采用 GE Work Station ADW 4.6 图像后处理工作站中 Function 软件包内的 MADC 软件对所获得的 IVIM - DWI 序列数据进行后处理, 使用统一的 ROI 测量范围, 拟合常规图像与伪彩图, 选择图像信噪比最高的层面, 在肝左叶及肝右叶内各放置 2 个圆形 ROI, 尽量避开胆囊、胆管、血管、肝裂及韧带、肺内气体的影响, 距离肝脏边缘至少 5 mm, 由 2 名放射科主治医师各测量 1 次表观扩散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)、真性扩散(true diffusion, D)、假性扩散(pseudodiffusion,  $D^*$ )、灌注分数(perfusion fraction,  $f$ )值后取平均值, 记录并保存图像。选择 IDEAL - IQ 序列中的 Fat Fraction 图像, 在图像信噪比最高层面勾画感兴趣区, 在尽量避开血管、肝裂、胆囊及胆管、腹腔内脂肪组织及肺内气体等影响的情况下, 尽可能勾画较大面积的感兴趣区, 测量并记录感兴趣区 FF, 保存图像。

**1.4 血液学指标的获取** MRI 检查前, 经小隐静脉采集 4 ml 静脉血来测定 ALT、AST、三酰甘油、铁蛋白及血液酒精浓度。所有恒河猴麻醉前均禁食 12 h, 禁水 4 h, 并于扫描前 12 h 停止乙醇供给。

**1.5 统计学处理** 使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 组间比较采用 SNK -  $q$  检验法, 各因素间的相关关系采用 Pearson 相关分析, 结果均以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般情况** 7 只恒河猴均实验成功, 每次扫描

前均将恒河猴称重, 扫描结束后将动物安全送回动物房, 清醒后 6 h 恢复正常饲食, 各期体质量经单因素方差分析两两比较最小显著法(LSD)检验,  $F = 0.124$ 、 $P = 0.945$ , 差异无统计学意义。恒河猴酒精摄入量  $2.5 \sim 3.2(3.03 \pm 0.25) \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。检查前恒河猴血液酒精浓度为  $0 \sim 1.23 \text{ mg/ml}$ 。

**2.2 IVIM - DWI 序列** 所获 IVIM - DWI 序列中不同时间点 ADC、D、 $D^*$ 、 $f$  值总体之间比较, ADC、D 值之间差异有统计学意义( $P = 0.020$ 、 $P = 0.000$ ),  $D^*$ 、 $f$  值之间差异具无统计学意义( $P = 0.179$ 、 $P = 0.077$ )。其中, P0 期、P1 期、P2 期与 P3 期之间 ADC 值差异有统计学意义; P0 期与 P1 期、P0 期与 P2 期、P0 期与 P3 期、P2 期与 P3 期之间 D 值差异有统计学意义。D\*、 $f$  值各期之间差异均无统计学意义。见图 1、表 1。

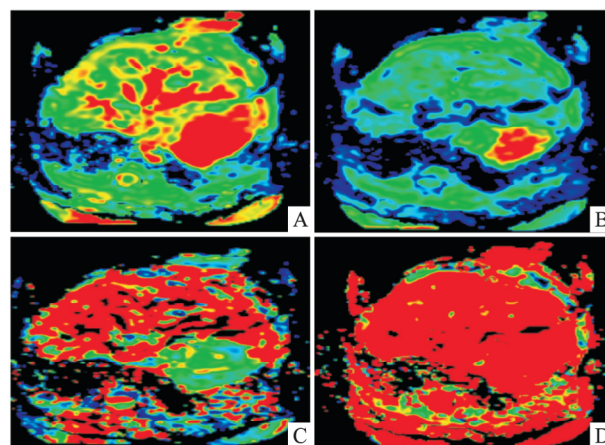


图 1 恒河猴肝脏 IVIM - DWI 序列图像

A: ADC 图; B: D 图; C:  $D^*$  图; D:  $f$  图

表 1 不同时间点恒河猴肝脏 ADC、D、 $D^*$ 、 $f$  值之间的比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 时间点  | ADC( $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ) | D( $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ ) | $D^*$ ( $\text{mm}^2/\text{s}$ ) | $f$ (%)           |
|------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| P0 期 | $1.450 \pm 0.220$                             | $0.760 \pm 0.131$                           | $0.078 \pm 0.028$                | $0.275 \pm 0.056$ |
| P1 期 | $1.460 \pm 0.250$                             | $0.635 \pm 0.116$                           | $0.078 \pm 0.034$                | $0.272 \pm 0.083$ |
| P2 期 | $1.440 \pm 0.260$                             | $0.647 \pm 0.105$                           | $0.079 \pm 0.036$                | $0.276 \pm 0.085$ |
| P3 期 | $1.280 \pm 0.240$                             | $0.581 \pm 0.127$                           | $0.078 \pm 0.037$                | $0.276 \pm 0.091$ |
| P 值  | 0.020                                         | 0.000                                       | 0.179                            | 0.077             |

**2.3 IDEAL - IQ 序列** 所获 FF 图像中不同时间点 FF 总体之间比较, 差异有统计学意义( $F = 9.417$ 、 $P = 0.000$ ), 各时间点之间 FF 两两比较, P0 期、P1 期及 P2 期与 P3 期之间差异有统计学意义。见表 2、图 2、3。

**2.4 MRI 参数与血液学指标相关性分析** ADC 值与三酰甘油指标、AST 指标呈显著性负相关( $r = -0.559$ 、 $-0.581$ ); D 值与三酰甘油指标呈显著负

相关( $r = -0.531$ );  $D^*$  值、 $f$  值与各血液学指标均无显著相关性; FF 与三酰甘油指标、AST 指标呈显著正相关( $r = 0.620, 0.690$ ); FF 与 ADC 值、 $D$  值呈显著负相关性( $r = -0.707, -0.523$ )。见图 4。

表 2 不同时间点恒河猴肝脏 FF( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 恒河猴编号 | P0 期              | P1 期              | P2 期              | P3 期               |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 1     | 2.251 $\pm$ 0.362 | 1.772 $\pm$ 0.285 | 3.420 $\pm$ 0.475 | 12.013 $\pm$ 1.741 |
| 2     | 4.683 $\pm$ 0.643 | 4.802 $\pm$ 0.682 | 6.357 $\pm$ 0.572 | 6.896 $\pm$ 1.069  |
| 3     | 2.822 $\pm$ 0.347 | 2.695 $\pm$ 0.421 | 4.015 $\pm$ 0.664 | 5.918 $\pm$ 0.954  |
| 4     | 1.274 $\pm$ 0.138 | 1.183 $\pm$ 0.166 | 2.275 $\pm$ 0.406 | 13.989 $\pm$ 2.856 |
| 5     | 2.223 $\pm$ 0.479 | 2.531 $\pm$ 0.396 | 3.356 $\pm$ 0.445 | 4.016 $\pm$ 0.559  |
| 6     | 3.318 $\pm$ 0.452 | 3.515 $\pm$ 0.403 | 4.080 $\pm$ 0.883 | 6.226 $\pm$ 0.972  |
| 7     | 2.096 $\pm$ 0.288 | 2.287 $\pm$ 0.416 | 3.410 $\pm$ 0.645 | 5.729 $\pm$ 1.136  |

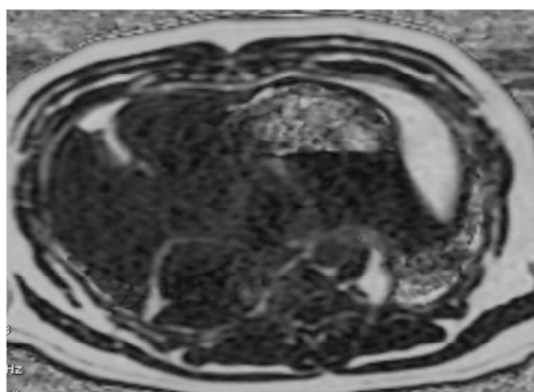


图 2 恒河猴肝脏 FF 图像

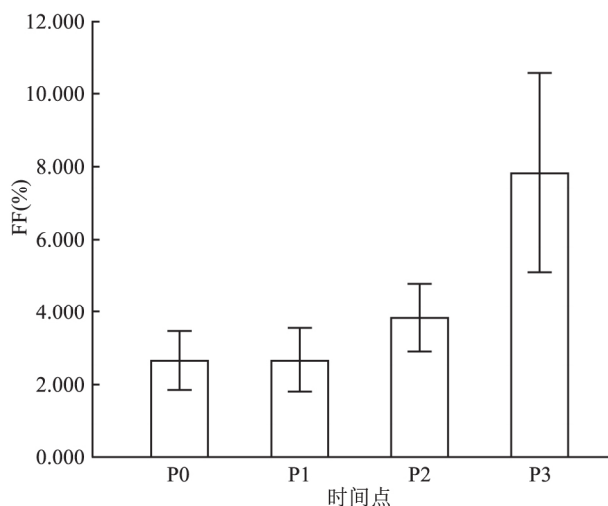


图 3 各时间点 FF 变化

### 3 讨论

早期的肝损伤是可逆的,因此在该期发现并定量判断其损伤程度显得尤为重要,而传统的诊断方法均具有一定局限性。基于双指数模型理论的 IVIM - DWI 成像可以将组织的真实扩散和微循环

灌注两种信息分离出来,IDEAL - IQ 成像则可反映酒精性肝损伤早期肝脏脂肪含量的改变,二者可定量分析肝脏病理生理状态的改变来评估肝损伤的程度,早期动态、无创地发现肝脏细微的改变。

每只恒河猴在维持期内的酒精摄入量达到了 Vivian et al<sup>[6]</sup> 定义的对于重度饮酒者的乙醇摄入量要求,平均乙醇摄入量  $> 3.0 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。四期体质量比较差异无统计学意义,说明总体能量的摄入是较稳定的。每次扫描前 12 h 最后 1 次喂酒,检查前恒河猴模型血液酒精浓度为  $0 \sim 1.23 \text{ mg/ml}$ ,说明该实验受酒精急性损伤影响较小。同时,根据王东等<sup>[7]</sup> 的研究,表明该恒河猴慢性酒精暴露肝损伤模型成功建立。

本研究显示,P0 期、P1 期、P2 期的 ADC 值均与 P3 期有显著性差异;P0 期与 P1 期、P0 期与 P2 期、P0 期与 P3 期的  $D$  值均有显著性差异,并且 ADC 值与  $D$  值均与三酰甘油指标、FF 呈显著负相关,说明 ADC 值及  $D$  值可在一定程度上反映酒精性肝损伤肝细胞脂肪变性与脂肪沉积的程度, $D$  值较 ADC 值来说在酒精性肝损伤早期即可对其进行很好的区分。

长期过量饮酒会引起肝纤维化,使肝脏内自由水的布朗运动受限和门静脉血流灌注减少。水分子运动的快慢虽然可以通过 ADC 值反映,但 ADC 值同时也受微循环的灌注作用影响,缺乏特异性。在低  $b$  值时,主要反映的是灌注效应,所测 ADC 值偏高于  $D$  值,从而降低了 ADC 值的检验效能<sup>[8-10]</sup>。作为真实扩散系数的  $D$  值代表了纯水分子的扩散效应,其指标相对 ADC 值来说则更具有特异性。这是因为除了大量纤维结缔组织弥漫性增生并沉积而限制了水分子的扩散运动外,肝细胞变性水肿、炎性细胞浸润、其他物质如脂肪和铁沉积等改变亦会对水分子的扩散造成一定的影响<sup>[10-11]</sup>,所以纯水分子扩散系数  $D$  值较 ADC 值提高了对慢性酒精暴露肝损伤的诊断特异性,与 Yoon et al<sup>[12]</sup> 的相关研究结果一致。

本研究  $D^*$  值在各期之间比较差异均无统计学意义,可能本研究中各期均未见或仅有少量胶原纤维沉积,而肝内炎性细胞浸润及肝细胞肿胀变性等才是最主要的病理学改变,肝小叶结构未出现明显变化,所以对肝脏微循环的灌注未起到改变作用或者作用很小,因此慢性酒精暴露前后各期  $D^*$  值无明显差异。相应的,慢性酒精暴露前后各期  $f$  值亦无明显差异<sup>[13]</sup>。

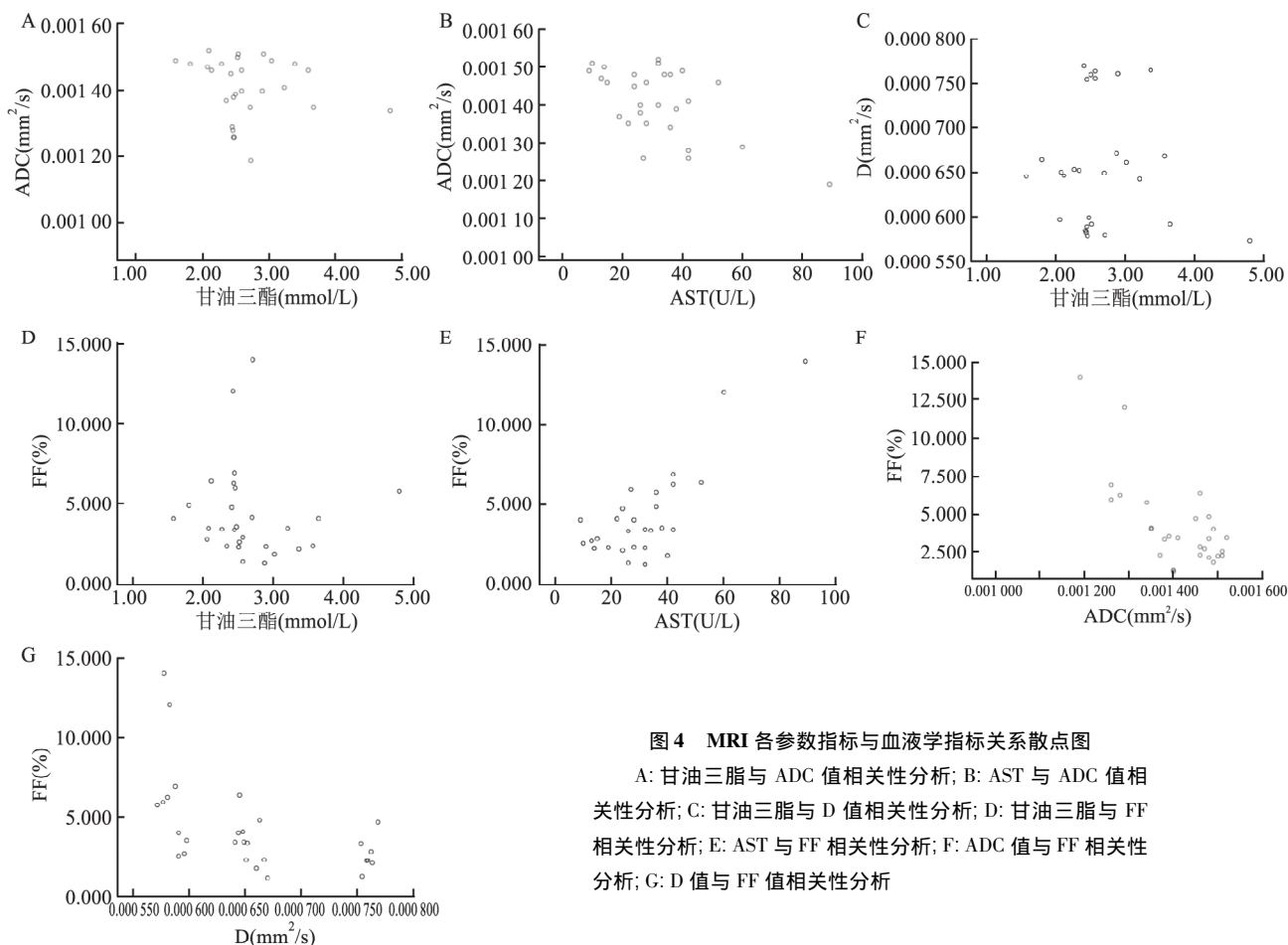


图4 MRI各参数指标与血液学指标关系散点图

A: 甘油三酯与ADC值相关性分析; B: AST与ADC值相关性分析; C: 甘油三酯与D值相关性分析; D: 甘油三酯与FF相关性分析; E: AST与FF相关性分析; F: ADC值与FF相关性分析; G: D值与FF值相关性分析

IDEAL-IQ技术是由IDEAL技术改进而获得的,一次屏气扫描可获得水像、脂像和FF图像<sup>[14-15]</sup>并且无需进行复杂的后处理。在本次实验中,采用MRI IDEAL-IQ序列测得的恒河猴肝脏的FF及三酰甘油含量不断上升,并且所测得FF与血液三酰甘油指标结果之间呈显著正相关,与陈晓等<sup>[15]</sup>的研究结果相类似,因此可将MRI IDEAL-IQ技术所测得的肝脏FF作为评价是否有慢性酒精暴露肝损伤以及严重程度一个可靠指标。

本实验的不足在于:①样本量较小,有待增加样本量进一步研究;②虽然恒河猴是非人灵长类动物模型,相对于其他实验动物,在该研究中具有优势,但是动物模型研究结果并不能代表真实的结果,动物与人之间翻译桥建立是难点,有待进一步研究。

综上,利用多模态MRI可对慢性酒精暴露肝损伤进行定量评价,IVIM-DWI序列上表现为ADC值、D值降低,IDEAL-IQ序列上表现为FF增加,部分参数与血液学指标之间呈显著正相关或显著负相关。非人灵长类动物疾病模型的建立对临床相关疾病研究具有重要参考价值。

## 参考文献

- [1] 杨万枝,吕雄文.酒精性肝病发病机制研究进展[J].安徽医科大学学报,2012,47(1):97-9.
- [2] Larrey D, Meunier L, Ursic-Bedoya J. Liver biopsy in chronic liver diseases: is there a favorable benefit: risk balance? [J]. Ann Hepatol, 2017, 16(4): 487-9.
- [3] Karanjia R N, Crossey M M, Cox I J, et al. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(45): 9880-97.
- [4] Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging [J]. Radiology, 1988, 168(2): 497-505.
- [5] Cosgrove K P, Kloczynski T, Bois F, et al. Decreased Beta(2)\*-nicotinic acetylcholine receptor availability after chronic ethanol exposure in nonhuman primates [J]. Synapse, 2010, 64(9): 729-32.
- [6] Vivian J A, Green H L, Young J E, et al. Induction and maintenance of ethanol self-administration in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis): long-term characterization of sex and individual differences [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2001, 25(8): 1087-97.
- [7] 王东,张宏峰,王改琴,等.酒精性肝损伤的基础医学研究进展[J].长治医学院学报,2016,30(2):158-60.

- [8] Wáng Y X J ,Li Y T ,Chevallier O ,et al. Dependence of intravoxel incoherent motion diffusion MR threshold b - value selection for separating perfusion and diffusion compartments and liver fibrosis diagnostic performance [J]. *Acta Radiol* 2019 60(1):3-12.
- [9] Hu G ,Chan Q ,Quan X ,et al. Intravoxel incoherent motion MRI evaluation for the staging of liver fibrosis in a rat model [J]. *Magn Reson Imaging* 2015 42(2):331-9.
- [10] França M ,Martí - Bonmati L ,Alberich - Bayarri á ,et al. Evaluation of fibrosis and inflammation in diffuse liver diseases using intravoxel incoherent motion diffusion - weighted MR imaging [J]. *Abdom Radiol ( NY)* 2017 42(2):468-77.
- [11] Bülow R ,Mensel B ,Meffert P ,et al. Diffusion - weighted magnetic resonance imaging for staging liver fibrosis is less reliable in the presence of fat and iron [J]. *Eur Radiol* 2013 23(5):1281-7.
- [12] Yoon J H ,Lee J M ,Baek J H ,et al. Evaluation of hepatic fibrosis using intravoxel incoherent motion in diffusion - weighted liver MRI [J]. *J Comput Assist Tomogr* 2014 38(1):110-6.
- [13] Ichikawa S ,Motosugi U ,Morisaka H ,et al. MRI - based staging of hepatic fibrosis: Comparison of intravoxel incoherent motion diffusion - weighted imaging with magnetic resonance elastography [J]. *J Magn Reson Imaging* 2015 42(1):204-10.
- [14] Lv S ,Jiang S ,Liu S ,et al. Noninvasive quantitative detection methods of liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Clin Transl Hepatol* 2018 6(2):217-21.
- [15] 陈晓,孟晓岩,李晓娟,等. 采用基于最小二乘法估计和不对称回波迭代分解水和脂肪成像序列定量评估水 - 脂模型中脂肪含量的可行性和准确性 [J]. *中华放射学杂志* 2015 49(9):704-7.

## Study of liver injury caused by chronic alcohol exposure in rhesus monkeys by multimodal MRI

Wang Song<sup>1</sup>, Li Yan<sup>1</sup>, Yu Yongqiang<sup>1,2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Radiology, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Radiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract** **Objective** To evaluate the liver injury model caused by chronic alcohol exposure in rhesus monkeys by multimodal MRI. **Methods** The liver injury models were caused by chronic alcohol exposure with seven rhesus monkeys. The same multimodal MRI scans were performed before alcohol induction (P0) and continuous feeding for one month (P1), three months (P2), six months (P3) after alcohol induction. The comparison of multimodal magnetic resonance parameters at different time points were statistically analyzed with one-way ANOVA. The SNK-q test was used for further analysis. The correlation between multimodal magnetic resonance parameters and hematological parameters were statistically analyzed with Pearson correlation. **Results** The liver injury model caused by chronic alcohol exposure in rhesus monkeys was successfully established. There were significant differences in apparent diffusion coefficient (ADC) value and true diffusion (D) value between some time points. ADC value and D value were significantly negatively correlated with triglyceride indicators. Pseudodiffusion (D\*) value and perfusion fraction (f) value were not significantly different between all time points. D\* value and f value were not significantly correlated with hematological indicators. Fat fraction: There were significant differences between some time points. Fat fraction was significantly positively correlated with triglyceride and AST indicators. ADC value and D value were significantly negatively correlated with fat fraction. **Conclusion** Chronic alcohol exposure can cause liver injury, which can be quantitatively evaluated by multimodal MRI. The establishment of non-human primate disease model has important reference value for clinical research.

**Key words** alcohol; magnetic resonance imaging; intravoxel incoherent motion; iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation quantitation; rhesus monkeys