

# 声触诊组织成像定量技术在野百合碱诱导肝窦阻塞综合征大鼠模型中的无创性评价

李霞, 杨建, 韩浩, 金伟奎, 孔文韬, 诸葛宇征, 吴敏

南京大学医学院附属南京鼓楼医院超声诊断科, 江苏 南京 210008

**摘要:** **目的** 探讨声触诊组织成像定量(VTIQ)技术在野百合碱诱导的肝窦阻塞综合征大鼠模型中的无创性评价。**方法** SD大鼠70只随机分为对照组( $n=10$ )和实验组( $n=60$ )。对照组大鼠给予2 ml 自来水灌胃;实验组大鼠给予浓度为130 mg/kg 野百合碱2 ml 单次灌胃,其中单纯灌胃组(MCT组, $n=30$ )大鼠只给予野百合碱灌胃,灌胃加低分子肝素治疗组(MCT-L组, $n=30$ )大鼠野百合碱灌胃24 h后皮下注射低分子肝素(96 iu, bid)。所有大鼠于灌胃后3、5 d行常规超声检查,检测大鼠门静脉内径及血流速度变化,然后应用VTIQ技术测量肝脏剪切波速度(SWV)值。VTIQ检查结束后2 h内,MCT组和MCT-L组分别处死15只大鼠,取肝脏标本行病理检查,光镜下参照Deleve评分标准判定病变。**结果** 大鼠野百合碱单次灌胃后,体重下降。灌胃后3、5 d,与对照组相比,MCT组、MCT-L组的大鼠的门静脉内径无明显变化( $P>0.05$ ),门静脉流速降低、肝SWV值明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。灌胃后3、5 d,与MCT组相比,MCT-L组大鼠门静脉内径未发生明显变化( $P>0.05$ ),门静脉流速有所升高、肝SWV值下降、肝组织学评分降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** VTIQ技术检测肝脏的SWV,能反映肝脏组织病理学变化,可以无创性评价低分子肝素治疗野百合碱诱导的肝窦阻塞综合征的疗效。

**关键词:** 弹性成像技术; 声触诊组织成像定量; 野百合碱; 肝窦阻塞综合征; 门静脉; 无创性评价

**中图分类号:** R445.1 R575 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)06-0762-04

## Noninvasive evaluation of quantitative technique of acoustic touch tissue imaging in rat model of hepatic sinusoidal obstruction syndrome induced by monocrotaline

LI Xia, YANG Jian, HAN Hao, JIN Wei-kui, KONG Wen-tao, ZHUGE Yu-zheng, WU Min

Department of Ultrasound, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China

Corresponding author: WU Min, E-mail: 13770703868@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the noninvasive evaluation of virtual touch tissue imaging quantification (VTIQ) in the rat model of hepatic sinusoidal obstruction syndrome (HSOS) induced by monocrotaline. **Methods** A total of 70 SD rats were randomly divided into control group ( $n=10$ ) and experimental group ( $n=60$ ). Rats in the control group were given 2 ml tap-water by gavage. Rats in the experimental group were given 2ml monocrotaline (130 mg/kg) by gavage. Rats in the MCT group ( $n=30$ ) were only given monocrotaline by gavage. Rats in the MCT-L group ( $n=30$ ) were given low molecular weight heparin (96 iu, bid) by subcutaneous injection 24 hours after monocrotaline gavage. The portal vein diameter and blood flow velocity were detected by conventional ultrasonography on the 3rd and 5th day, and then the shear wave velocity (SWV) of liver was measured by VTIQ. Within 2 hours after the VTIQ, 15 rats in MCT group and 15 rats in MCT-L group were killed. Liver samples were taken for pathological examination, and the lesions were determined according to the Deleve grading standard under light microscopy. **Results** The body weight of rats decreased after a single intragastric administration of monocrotaline. Compared with the control group, the inner diameter of portal vein in MCT group and MCT-L group had no significant differences after 3 and 5 days' gavage ( $P>0.05$ ). The portal vein velocity

decreased, the liver SWV value increased and the liver histological score increased significantly ( $P < 0.05$ ). After 3 and 5 days' gavage, there was no significant difference in the diameter of portal vein between MCT-L group and MCT group ( $P > 0.05$ ), but the portal vein flow rate was significantly higher, liver SWV value and liver histological score were significantly lower in MCT-L group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** VTIQ could be used to detect SWV of liver, which could reflect the pathological changes of liver tissue and evaluate the therapeutic effect of low molecular weight heparin in the treatment of monocrotaline induced HSOS noninvasively.

**Keywords:** Elastic imaging; Virtual touch tissue imaging quantification; Monocrotaline; Hepatic sinusoidal obstruction syndrome; Portal vein; Noninvasive evaluation

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81671701)

肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS), 又称肝小静脉闭塞病, 是由各种原因导致的肝血窦、肝小静脉和小叶间静脉内皮细胞水肿、坏死、脱落进而形成微血栓, 引起肝内淤血、肝功能损伤和门静脉高压的一种肝脏血管性疾病<sup>[1-2]</sup>。HSOS 病因较多, 国内外明显不同, 我国以服用含吡咯生物碱 (pyrrolidine alkaloid, PA) 的植物居多, 其中以土三七最多<sup>[3-4]</sup>。对于实验性的 HSOS 研究, 土三七诱导 HSOS 模型费时较长, 野百合碱大鼠模型简单、快速和可逆, 已被广泛使用<sup>[5-7]</sup>。

弹性成像是通过测量肝剪切波速来评估肝脏硬度的一种方法, 其对肝纤维化的临床诊断价值在各种肝病中得到了很好的验证<sup>[8-10]</sup>。在弹性成像技术中, 声辐射力脉冲 (acoustic radiation force impulse, ARFI) 弹性成像聚焦声压缩脉冲产生剪切波, 而最新的声触诊组织成像定量 (virtual touch tissue imaging quantification, VTIQ) 技术改进了传统 ARFI 技术单点取样、重复取样、取样框范围大等缺陷, 提高了剪切波速度 (shear wave velocity, SWV) 测量的准确性。本研究通过野百合碱诱导建立 HSOS 大鼠模型, 应用彩色多普勒超声检测不同处理的大鼠的门静脉血流动力学特征, 同时应用 VTIQ 技术检查评估不同处理的大鼠肝脏硬度变化, 旨在探讨 VTIQ 技术在评价 HSOS 大鼠模型中的价值。

## 1 材料与方法

1.1 野百合碱动物模型实验 70 只健康雄性 SD 大鼠, 周龄 3~4 周, 体重 250~300 g, 所有动物在鼓楼医院实验动物中心动物房饲养, 环境温度室温 22~25 °C, 湿度 45%~70%, 光照为 12 h 照明、12 h 黑暗。适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组 ( $n = 10$ ) 和实验组 ( $n = 60$ )。对照组大鼠给予 2 ml 自来水灌胃; 实验组大鼠中, 单纯灌胃组 (MCT 组,  $n = 30$ ) 只给予浓度为 130 mg/kg 野百合碱 2 ml 单次灌胃, 灌胃加低分子肝素治疗组 (MCT-L 组,  $n = 30$ ) 给予同剂量野

百合碱灌胃后 24 h 皮下注射低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH, 96 iu, bid)。MCT 组和 MCT-L 组分别于灌胃后 3 d、5 d 处死 15 只大鼠, 对照组大鼠于灌胃 5 d 后处死, 进行相关的实验室和病理学检查。

1.2 VTIQ 弹性成像检查 所有动物在 VTIQ 弹性成像检查前禁食 6~8 h, 用水合氯醛腹腔注射麻醉。将动物剃毛以获得合适的声波窗, 然后仰卧位放置并固定在鼠板上。采用西门子 Acuson S3000 型超声诊断仪, 探头为 9L4 线阵探头, 频率为 4~9 MHz; 配备 VTIQ 分析软件。VTIQ 弹性成像是由一位具有 4 年以上操作 VTIQ 弹性成像经验的超声科医师进行的。操作者在实时灰阶超声图像的帮助下, 选择合适的大鼠腹壁区作为 VTIQ 弹性成像的声窗。清晰显示大鼠肝脏切面, 弹力取样框包括肝脏及周边组织, 首先观察质量模式, 图像呈均匀分布的绿色时质量最高, 在质量最高时切换到速度模式, 速度最大量程为 10 m/s, 速度由低到高分别呈现蓝色、绿色、黄色、红色, 调节速度量程使肝脏组织呈淡绿色或浅蓝色为标准获得最终的 VTIQ 速度模式图像。肝脏设置为 sit1, 随机放置 9 组感兴趣区 (region of interest, ROI), 取中位数记录为肝脏 SWV 值。

1.3 肝脏病理观察及评分 处死大鼠后留取肝脏标本, 对肝组织进行 HE 染色和 Masson 染色。参照 Deleve 评分标准, 两名肝脏病理学家 (均从事临床肝脏病理诊断 3 年以上) 根据 HE 染色和 Masson 染色对大鼠肝脏进行综合评分。评分共有六项指标, 包括中央静脉内皮损伤、肝细胞凝固性坏死、中央静脉内皮下出血、肝窦出血、中央静脉内皮下纤维化和中央静脉外膜纤维化, 每项指标分为 4 级, 分别计分 0、1、2、3 分; 对各项指标计分相加结果进行组织学评分。分数越高, 表示肝脏损伤越重。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用方差分析及两两比较的 LSD-*t* 检验。  $P < 0.05$  为

差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 各组大鼠一般情况** 实验前各组 SD 大鼠体毛、体重、排便、食量均正常, 各组间无明显差异。野百合碱灌胃后 3 d, 与对照组相比, MCT 组及 MCT-L 组大鼠体重较低; MCT 组有 12 只大鼠出现腹水, MCT-L 组有 3 只大鼠出现腹水。野百合碱灌胃后 5 d, 与对照组相比, MCT 组及 MCT-L 组大鼠体重较低; MCT 组大鼠都出现腹水, MCT-L 组有 4 只大鼠出现腹水。见表 1。

**2.2 不同时间段各组大鼠的超声特征及组织学评分** 灌胃后 3 d, 与对照组相比, MCT 组、MCT-L 组的门静脉内径变化不明显, 门静脉流速明显降低, 肝 SWV 值明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 MCT 组相比, MCT-L 组的大鼠的门静脉内径变化不明显,

门静脉流速明显增快、肝 SWV 值明显下降、肝脏组织学评分降低明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。灌胃后 5 d, 与对照组相比, MCT 组、MCT-L 组的大鼠的门静脉内径变化不明显, 门静脉流速明显降低, 肝 SWV 值明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 MCT 组相比, MCT-L 组门静脉流速增快明显、肝 SWV 值下降明显、肝脏组织学评分降低明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。MCT 组大鼠肝脏的常规超声及 VTIQ 见图 1。

表 1 不同组别大鼠的体重变化 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

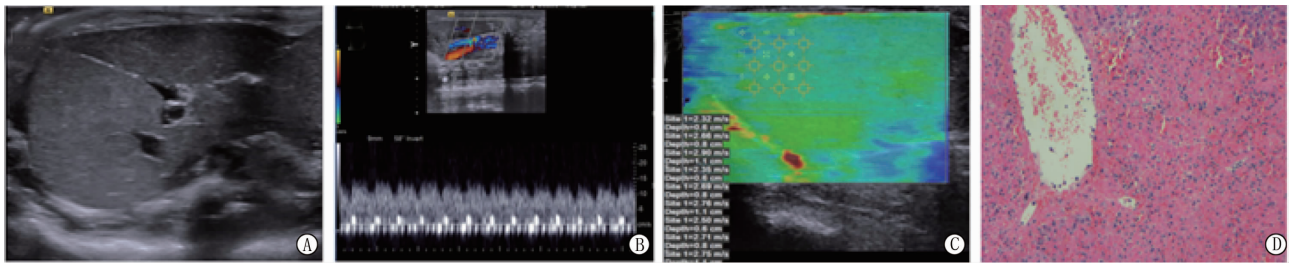
组别	例数	灌胃前	灌胃后 3 d	灌胃后 5 d
对照组	10	283.63 ± 4.18	305.21 ± 4.59	337.60 ± 4.51
MCT	30	287.08 ± 4.42	271.81 ± 8.83 <sup>a</sup>	254.64 ± 15.99 <sup>a</sup>
MCT-L	30	287.60 ± 4.87	273.13 ± 17.91 <sup>a</sup>	277.00 ± 12.25 <sup>a</sup>

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

表 2 灌胃 3 d、5 d 各组大鼠的超声特征及组织学评分 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	门静脉内径 (cm)	门静脉流速 (cm/s)	肝 SWV 值 (m/s)	肝组织学评分
对照组	10	1.83 ± 0.17	25.33 ± 2.98	2.05 ± 0.13	0
MCT 组灌胃后 3 d	15	1.91 ± 0.21	12.19 ± 2.96 <sup>a</sup>	2.86 ± 0.25 <sup>a</sup>	6.27 ± 1.71 <sup>a</sup>
MCT-L 组灌胃后 3 d	15	1.91 ± 0.18	15.88 ± 3.87 <sup>ab</sup>	2.55 ± 0.28 <sup>ab</sup>	4.84 ± 1.93 <sup>ab</sup>
MCT 组灌胃后 5 d	15	1.91 ± 0.13	14.03 ± 3.49 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.00 ± 1.56 <sup>a</sup>
MCT-L 组灌胃后 5 d	15	1.87 ± 0.22	18.32 ± 4.43 <sup>ab</sup>	2.37 ± 0.16 <sup>ab</sup>	3.41 ± 1.81 <sup>ab</sup>

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与同时间 MCT 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。



注: A 为常规超声表现为肝脏肿大, 均匀或不均匀的实质低回声; B 显示门静脉流速为 13.2 cm/s; C 为大鼠肝脏 VTIQ 模式下的速控图像, 肝脏的平均 SWV 为 2.63 m/s; D 为一只 HSOS 评分为 8 的 MCT 组大鼠的肝组织病理学标本, 包括 3 级中央静脉内皮损伤、3 级肝细胞凝固性坏死、3 级中央静脉内皮下出血、3 级肝窦出血。

图 1 MCT 组大鼠肝脏的常规超声及 VTIQ 图

### 3 讨论

HSOS 临床少见, 常见的致病原因目前所知有两大类, 一是食用 PA 或被其污染的谷类; 二是癌瘤化疗药物和免疫抑制剂的应用。在我国, 以误食含 PA 的中草药而患病者占多数。野百合碱灌胃因可诱导急性、严重和部分可逆的肝窦损伤, 而被广泛应用于 HSOS 动物建模实验<sup>[6]</sup>。本研究通过给予雄性 SD 大鼠野百合碱单次灌胃后, 成功建立大鼠 HSOS 模型。模型中大鼠体重下降明显, 部分大鼠甚至可以出现腹水。本研究中, 大鼠灌胃后 3 d, 肝窦损伤最重, 而

5 d 后大鼠肝窦损伤有所恢复。VTIQ 弹性成像结果表明, HSOS 可导致肝 SWV 升高, 之前本课题组的研究也报道了 HSOS 患者肝 SWV 增加<sup>[11]</sup>, 但缺乏相关的组织病理学依据。本研究不仅证实 SWV 与 HSOS 的关系, 并提供了组织学证据。本研究还证明肝脏 SWV 与 HSOS 的严重程度密切相关, HSOS 中升高的肝 SWV 随着 LMWH 治疗后 HSOS 的改善而降低, 表明 VTIQ 弹性成像不仅可用于诊断 HSOS, 还可用于 HSOS 的病情评估和预后随访。除超声弹性成像外, 还有几种已被建议用于检测 HSOS 的成像方法, 包括用钆氨酸或超顺磁性氧化铁增强的 MRI 所描绘的网

状肝脏信号模式和CT的脾脏尺寸测量<sup>[12]</sup>。然而,笔者认为超声弹性成像与这些成像方法相比具有优势,因为它可以在较短的时间内进行成像,并且不使用静脉造影剂,可以避免患者的创伤及CT的电离辐射,并提供客观的定量指标,即SWV值。

在临床上,存在腹水、黄疸等表现的急性期/亚急性期HSOS患者是抗凝治疗的主要人群,并应尽早开始。抗凝药物首选LMWH,亦可联合口服维生素K拮抗剂(华法林)。LMWH安全性较普通肝素高,出血不良反应少,大多数患者使用时无需监测。抗凝治疗两周后通过临床表现、肝功能、影像学检查结果评估效果,如治疗有效,继续抗凝至3个月以上;如治疗无效,停止抗凝,考虑其他治疗措施<sup>[13]</sup>。有报道在HSOS的治疗中使用肝素或LMWH抗凝,治愈和好转率达71.4%<sup>[14]</sup>。在本研究中,野百合碱灌胃后24h,给予大鼠皮下注射LMMH治疗,3d和5d后,大鼠体重有所上升,较未治疗的MCT组大鼠,门静脉流速明显增快,肝SWV值下降,组织学评分降低,治疗效果显著,与临床相关报道吻合。

本研究具有一些局限性。首先,只选择了处理后3、5d行实验及药物治疗计划,以实现HSOS的病情进展及动物的可接受存活率,未进行更长期的随访观察。其次,结果来自一个很好的、可控制的实验条件,未解决实际工作中患者由于不合作或过度肥胖造成的测量误差。

本研究采用野百合碱单次灌胃成功建立了SD大鼠HSOS模型,并运用VTIQ技术结合组织学评分对HSOS的大鼠模型进行了无创性评估;初步探讨了LMWH对HSOS大鼠的治疗效果,可给临床诊疗提供一定的参考。但对野百合碱诱导的HSOS大鼠模型严重程度的分级及长期的治疗随访还有待进一步研究。

## 参考文献

[1] Wang JY, Gao H. Tusanqi and hepatic sinusoidal obstruction syndrome [J]. *J Dig Dis*, 2014, 15(3): 105-107.  
 [2] Gao H, Li N, Wang JY, et al. Definitive diagnosis of hepatic sinusoidal obstruction syndrome induced by pyrrolizidine alkaloids [J]. *J*

*Dig Dis*, 2012, 13(1): 33-39.  
 [3] 董娜,何丹,张海霞. 土三七致肝小静脉闭塞病临床特点及预后影响因素[J]. *临床药物治疗杂志*, 2020, 18(8): 44-48.  
 [4] 许智婷,丁红,付甜甜,等. 肝窦阻塞综合征的超声影像学特征分析[J]. *中华医学超声杂志(电子版)*, 2020, 17(7): 691-696.  
 [5] DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, et al. Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease [J]. *Hepatology*, 1999, 29(6): 1779-1791.  
 [6] Park SH, Lee SS, Sung JY, et al. Noninvasive assessment of hepatic sinusoidal obstructive syndrome using acoustic radiation force impulse elastography imaging: a proof-of-concept study in rat models [J]. *Eur Radiol*, 2018, 28(5): 2096-2106.  
 [7] Nakamura K, Hatano E, Narita M, et al. Sorafenib attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in rats through suppression of JNK and MMP-9 [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(5): 1037-1043.  
 [8] Cassinotto C, Lapuyade B, Mouries A, et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis with impulse elastography: comparison of Supersonic Shear Imaging with ARFI and FibroScan? [J]. *J Hepatol*, 2014, 61(3): 550-557.  
 [9] Yasui Y, Abe T, Kurosaki M, et al. Non-invasive liver fibrosis assessment correlates with collagen and elastic fiber quantity in patients with hepatitis C virus infection [J]. *Hepatology Res*, 2019, 49(1): 33-41.  
 [10] Palmeri ML, Wang MH, Rouze NC, et al. Noninvasive evaluation of hepatic fibrosis using acoustic radiation force-based shear stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(3): 666-672.  
 [11] Han H, Yang J, Li X, et al. Role of virtual touch tissue imaging quantification in the assessment of hepatic sinusoidal obstruction syndrome in a rat model [J]. *J Ultrasound Med*, 2019, 38(8): 2039-2046.  
 [12] Han NY, Park BJ, Kim MJ, et al. Hepatic parenchymal heterogeneity on contrast-enhanced CT scans following oxaliplatin-based chemotherapy: natural history and association with clinical evidence of sinusoidal obstruction syndrome [J]. *Radiology*, 2015, 276(3): 766-774.  
 [13] 中华医学会消化病学分会肝胆疾病协作组. 吡咯生物碱相关肝窦阻塞综合征诊断和治疗专家共识意见(2017年,南京) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(9): 1627-1637.  
 [14] 徐小俊,陈洪潭,单国栋. 土三七致肝窦阻塞综合征42例诊治分析[J]. *中华危重症医学杂志(电子版)*, 2010, 3(3): 178-180.

收稿日期:2021-02-27 修回日期:2021-03-18 编辑:王娜娜