

## Evaluation of hepatic pathological damage after orthotopic liver transplantation with integrated backscatter in rats

CAI Zhen-gang<sup>1</sup>, LIU Xiao-li<sup>2</sup>, GAO Xiao-jun<sup>3</sup>, CAI Ye-ping<sup>3</sup>, WANG Zhong-yu<sup>1\*</sup>

(1. Second Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China; 2. Department of Interventional Radiology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 3. Department of Ultrasound, Dalian Friendship Hospital, Dalian 116011, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the hepatic pathological damage after orthotopic liver transplantation (OLT) in rats with integrated backscatter (IBS). **Methods** Thirty-two SD rats and 40 Wistar rats were included, and stable OLT models were established except 8 Wistar rats as blank group. The rat models were randomly divided into 4 groups (each  $n = 8$ ): normal group (given no treatment), CsA-treated group (30 mg/[kg · d]), SIN-treated group (40 mg/[kg · d]), SIN and CsA-treated group (SIN 40 mg/[kg · d] + CsA 15 mg/[kg · d]). Hepatic IBS (peak to peak intensity: PPI; average image intensity: AII; standard deviation of image intensity: SDI) was measured on 4th and 10th day after OLT. The rats were sacrificed and a part of liver was cut off for pathological examination. **Result** Four days later, AII of control and SIN groups were higher than those in other groups ( $P < 0.05$ ), and of CsA-treated and SIN + CsA-treated groups were higher than that of blank group ( $P < 0.05$ ), while no difference of PPI and SDI was detected between each two groups. Ten days later, AII in CsA-treated, SIN + CsA-treated and SIN-treated groups were lower than that of control group ( $P < 0.05$ ), no difference of PPI and SDI was detected between each two groups. IBS was positively correlated with liver pathological damage ( $r = 0.814$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Detecting hepatic IBS contributes to the diagnosis of the level of liver damage after OLT.

**[Key words]** Integrated backscatter; Liver transplantation; Pathology; Rats

## 背向散射积分技术评价大鼠原位肝脏移植病理损害

蔡振刚<sup>1</sup>, 刘晓黎<sup>2</sup>, 高晓军<sup>3</sup>, 蔡叶萍<sup>3</sup>, 王忠裕<sup>1\*</sup>

(1. 大连医科大学附属第一医院普外二科, 辽宁 大连 116011; 2. 大连医科大学附属第二医院介入科, 辽宁 大连 116027; 3. 大连市友谊医院超声科, 辽宁 大连 116001)

**[摘要]** **目的** 应用背向散射积分 (IBS) 技术评价原位肝移植 (OLT) 后大鼠肝脏病理损害。**方法** 32 只 SD 大鼠, 40 只 Wistar 大鼠, 按不同处理方法分组。建立 SD-Wistar OLT 模型, 分为 4 组: 对照组: 8 只未予药物干预; CsA 组: 8 只给予环孢素 A 30 mg/(kg · d); SIN 组: 8 只给予青藤碱 40 mg/(kg · d); CsA + SIN 组: 8 只给予青藤碱 40 mg/(kg · d) + 环孢素 15 mg/(kg · d)。正常组: 8 只 Wistar 大鼠, 为空白对照。术后 4 天、10 天测量肝脏的 IBS 值 [峰-峰强度 (PPI), 平均强度 (AII), 强度标准差 (SDI)], 术后 10 天处死大鼠取肝脏组织行病理检查。**结果** 术后 4 天 AII 对照组和 SIN 组较正常组、CsA 组、SIN + CsA 组增高 ( $P < 0.05$ ); CsA 组、SIN + CsA 组高于正常组 ( $P < 0.05$ )。术后 10 天组间 AII 对比: CsA 组、SIN + CsA 组、SIN 组较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ )。PPI、SDI 术后 4 天、10 天各组内及组间比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。大鼠肝移植后肝脏病理损害程度与 IBS 呈正相关 ( $r = 0.814$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 测定移植肝脏的 IBS 有助于判断移植肝脏损害的程度。

**[关键词]** 背向散射积分; 肝移植; 病理学; 大鼠

**[中图分类号]** R657.3; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2010)03-0432-03

**[作者简介]** 蔡振刚 (1975—), 男, 河北沧州人, 在读博士, 主治医师。研究方向: 普通外科。E-mail: dscaga@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** 王忠裕, 大连医科大学附属第一医院普外二科, 116011。

E-mail: fishflowers@hotmail.com

**[收稿日期]** 2009-08-23 **[修回日期]** 2009-10-13

近年来,背向散射积分(integrated backscatter, IBS)技术用于肝脏疾病的研究明显增多。IBS对于脂肪肝、肝脏纤维化、肝内占位性病变是一项无创、量化、标准化的新指标<sup>[1-3]</sup>。目前应用 IBS 评价移植肝脏的排斥情况尚处于临床探索阶段<sup>[4-5]</sup>,相关基础性研究鲜见报道。本实验采用 IBS 技术评价大鼠原位肝脏移植(orthotopic liver transplantation, OLT)的排斥情况并与病理损害进行对照,探讨 IBS 与大鼠排斥反应的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8~12 周龄雄性 SD、Wistar 清洁级大鼠(大连医科大学动物实验中心提供,饲养于大连医科大学附属第一医院实验中心清洁级实验室),体质量 200~300 g,供体体质量轻于受体体质量 20~30 g。其中 SD 大鼠 32 只, Wistar 大鼠 40 只。采用 Zimmermann 等的改良“二袖套”法完成 SD-Wistar 大鼠肝移植 32 只,建立 SD-Wistar OLT 模型<sup>[6]</sup>,其余 8 只 Wistar 大鼠作为空白对照(正常组)。建模后的大鼠分为 4 组:对照组:8 只 SD-Wistar OLT 大鼠未给予药物干预;CsA 组:8 只 SD-Wistar OLT 大鼠给予环孢素 A 30 mg/(kg·d) 胃内灌注;SIN 组:8 只 SD-Wistar OLT 大鼠给予青藤碱 40 mg/(kg·d) 胃内灌注;CsA + SIN 组:8 只 SD-Wistar OLT 大鼠给予青藤碱 40 mg/(kg·d) + 环孢素 A 15 mg/(kg·d) 胃内灌注。

术后第 4 天、10 天测量每只大鼠肝脏 IBS 参数(图 1、2),术后第 10 天处死大鼠取肝脏组织行病理检查。

1.2 仪器与方法 HP Sonos 5500 型彩超仪,11-3L 宽频线阵探头,配有组织 IBS 二维图像采集和联机声学定量分析系统。

启动 AD-IBS 程序,机械指数 0.3,调节总增益为 50 dB,动态压缩范围为 70,深度 4 cm,关闭侧向增益补偿(lateral gain compensation, LGC)及固定时间增益补偿(time gain compensation, TGC)8 个点,得到良好的二维图像,在整个实验中仪器设置保持不变。大鼠采用水合氯醛(3 ml/kg)腹腔麻醉,取剑突下横切面图像显示肝脏左外叶,图像储存在光盘以供分析。

取剑突下横切面二维清晰显示肝脏左外叶,距离体表 0.6 cm 处,选择椭圆形感兴趣区(region of interest, ROI),大小 11 像素×11 像素,同时避开可见的肝静脉、门静脉、胆管等组织,手动跟踪分别测定 IBS 参数:图像峰-峰强度(peak to peak intensity, PPI),图像平均强度(average image intensity, AII),图像强度标准差(standard deviation of image intensity, SDI),采集 2 点,取平均值。

采用 TGC 对 IBS 进行标化,标化 IBS = 实测 IBS 值 × TGC

技术用于肝脏疾病的研究明显增多。IBS对于脂肪肝、肝脏纤维化、肝内占位性病变是一项无创、量化、标准化的新指标<sup>[1-3]</sup>。目前应用 IBS 评价移植肝脏的排斥情况尚处于临床探索阶段<sup>[4-5]</sup>,相关基础性研究鲜见报道。本实验采用 IBS 技术评价大鼠原位肝脏移植(orthotopic liver transplantation, OLT)的排斥情况并与病理损害进行对照,探讨 IBS 与大鼠排斥反应的关系。

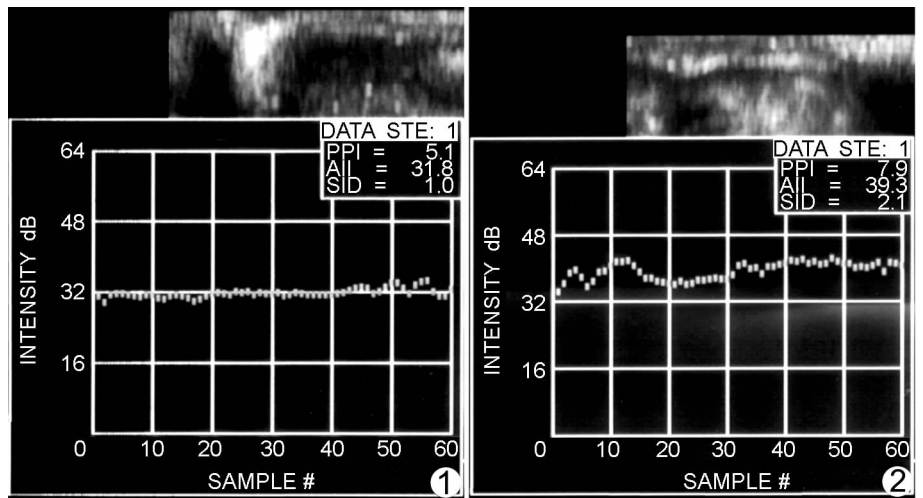


图 1 肝脏移植后治疗组(CsA 组 + SIN 组)IBS 测量 图 2 肝脏移植后对照组 IBS 测量

表 1 大鼠原位肝脏移植后 IBS 比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	术后 4 天			术后 10 天		
	PPI	SDI	AII	PPI	SDI	AII
CsA 组	5.43 ± 1.53	1.42 ± 0.45	35.08 ± 1.73	5.83 ± 1.87	1.38 ± 0.51	32.11 ± 2.03
SIN 组	5.18 ± 1.89	1.24 ± 0.49	37.06 ± 1.53	5.51 ± 1.77	1.43 ± 0.44	35.32 ± 1.73
SIN + CsA 组	4.92 ± 1.76	1.12 ± 0.31	35.05 ± 2.71	5.93 ± 1.97	1.41 ± 0.51	32.03 ± 2.90
对照组	7.05 ± 1.15	1.60 ± 0.48	38.43 ± 1.05	7.21 ± 1.86	1.76 ± 0.61	37.33 ± 1.19
正常组	6.10 ± 1.71	1.16 ± 0.37	30.33 ± 1.82	5.83 ± 1.98	1.38 ± 0.48	31.13 ± 2.05

均值/自身 TGC,即将所有受检 TGC 曲线的 8 个数值分别进行平均。

1.3 病理检查 所取肝脏组织用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,行 HE 染色,按 Willams 标准将急性免疫排斥反应病理改变分为 4 级<sup>[7]</sup>:0 级:不明确,汇管区炎性细胞浸润程度未达到急性排斥反应;I 级:轻度,炎性细胞浸润少量汇管区的胆管和血管,炎性细胞数量较少,仅局限于汇管区间隙;II 级:中度,炎性细胞多数或全部浸润汇管区的胆管和血管;III 级:重度,在中度基础上,炎性细胞浸润汇管区周围,伴有中-重度静脉炎并扩展到肝实质,引起静脉周围肝细胞坏死。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间的 IBS 参数采用 one-way ANOVA 分析;病理资料采用秩和检验,病理分级与 IBS 间相关性分析采用 Pearson 法; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏移植后肝脏 IBS 对比(表 1) 术后 4 天 AII:正常组分别与另外 4 组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );CsA 组、SIN + CsA 组与对照组、SIN 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。术后 10 天 AII:正常组、CsA 组、SIN + CsA 分别与 SIN 组、对照组、SIN 组与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。术后 4 天、10 天组内 AII 对比:正常组

与对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); CsA 组、SIN 组、SIN + CsA 组组内比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

PPI、SDI 术后 4 天、10 天各组内及组间比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.2 大鼠肝脏病理 Willams 分级 (表 2) 对照组表现为炎细胞浸润汇管区周围,伴有中-重度静脉炎并扩展到肝实质,引起静脉周围肝细胞坏死,与正常组及其他各组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );SIN 组表现为排斥性炎细胞浸润多数或全部汇管区的胆管和血管,SIN + CsA 组表现为排斥性炎细胞浸润少量汇管区的胆管和血管,两组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),但 CsA 组与 SIN 组以及 CsA 组与 SIN + CsA 组差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 大鼠肝脏的病理分级 (只)

组别	0 级	I 级	II 级	III 级
CsA 组	0	5	3	0
SIN 组	0	3	5	0
SIN + CsA 组	1	6	1	0
对照组	0	0	0	8
正常组	8	0	0	0

2.3 大鼠肝脏病理分级与背向散射积分相关性 大鼠肝脏病理损害程度与 IBS 呈正相关 ( $r = 0.814, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

肝脏产生背向散射信号的基础为组织中的细微结构<sup>[8,9]</sup>,这些复杂结构构成了不均匀的散射体。当组织发生病变时,组织结构变化将导致组织物理特性的改变,引起组织背向散射信号的改变。背向散射通过监测组织内微小散射梯度的变化,提取和处理组织散射信号并加以处理分析,能无创地评价组织细微结构损害的病理变化<sup>[10-11]</sup>。

本实验中监测各组大鼠术后 4 天与 10 天 IBS 变化,术后 4 天 AII 对照组和 SIN 组较正常组、CsA 组、SIN + CsA 组增高 ( $P < 0.05$ );CsA 组、SIN + CsA 组高于正常组 ( $P < 0.05$ );术后 10 天组间 AII 对比:CsA 组、SIN + CsA 组、SIN 组较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ )。三组药物治疗组 (SIN 组、CsA 组、SIN + CsA 组) 术后 10 天 AII 值低于术后 4 天,而正常组与对照组 AII 值差异无统计学意义。在术后 10 天测定 IBS 值后,处死大鼠取肝脏进行病理评级,CsA 组、SIN + CsA 组病理表现为汇管区轻度炎性细胞浸润,对照组则表现为汇管区显著的炎性细胞浸润,引起静脉周围肝细胞坏死,SIN 组病理损害介于两者之间。将 IBS 值与对应肝脏病理评分对比分析,病理损害越重 IBS 积分越高,两者之间呈正相关。同时从药物治疗组的疗效分析,CsA 组、SIN + CsA 组、SIN 组 AII 值在术后

10 天均低于对照组,而 CsA 组、SIN + CsA 组又低于 SIN 组。各组 IBS 值的变化符合各组病理分级的变化,表明通过测定 IBS 的变化,能够评价肝脏的病理变化,进而能够评价药物治疗效果。

在实验中同时对 PPI 和 SDI 组间及组内差异性进行了分析,无论组内还是组间差异均有统计学意义,PPI 与 SDI 值的高低反映的是病变的不均质性,这符合肝移植排斥反应是一种弥漫性病变的病理特点<sup>[12]</sup>。

本实验对大鼠肝移植后 IBS 与病理损害进行了探讨,发现随着病理损害程度的增加,IBS 呈增加趋势,提示 IBS 技术能够无创地诊断肝移植后的肝脏病理变化,而本实验结果为 IBS 技术的临床应用提供了基础理论依据。

### [参考文献]

- [1] Liu XZ, Gong XF, Zhang D, et al. Ultrasonic characterization of porcine liver tissue at frequency between 25 to 55 MHz. World J Gastroenterol, 2006, 12(14): 2276-2279.
- [2] Zhong H, Wan MX, Jiang YF, et al. Monitoring imaging of lesions induced by high intensity focused ultrasound based on differential ultrasonic attenuation and integrated backscatter estimation. Ultrasound Med Biol, 2007, 33(1): 82-94.
- [3] 高晓军, 臧福波, 闻月昇. 超声背向散射积分在肝占位性病变诊断中的应用价值. 中国超声医学杂志, 2004, 20(1): 53-55.
- [4] 薄华颖, 夏稻子. 移植肝超声背向散射积分测定. 中国超声医学杂志 2007, 23(11): 843-845.
- [5] 薄华颖, 夏稻子. 移植肝硬度及背向散射积分测定的临床诊断价值. 中国医学影像技术, 2008, 24(5): 703-705.
- [6] Ariyakagorn V, Schmitz V, Olschewski P, et al. Improvement of microsurgical techniques in orthotopic rat liver transplantation. J Surg Res, 2009, 153(2): 332-339.
- [7] 陆炯炯, 杜隽铭, 周学平, 等. 大鼠原位肝移植术后排斥反应病理动态变化. 上海交通大学学报(医学版), 2007, 27(4): 475-477.
- [8] Sriraam N, Roopa J, Saranya M, et al. Performance evaluation of computer aided diagnostic tool (CAD) for detection of ultrasonic based liver disease. J Med Syst, 2009, 33(4): 267-274.
- [9] 张超, 黄道中, 邓又斌, 等. Wistar 大鼠肝脏超声声像图表现及相关应用. 中国医学影像技术, 2006, 22(1): 39-41.
- [10] Guimond A, Teletin M, Garo E, et al. Quantitative ultrasonic tissue characterization as a new tool for continuous monitoring of chronic liver remodelling in mice. Liver Int, 2007, 27(6): 854-864.
- [11] 陈晓宇, 赵宝珍, 王茵, 等. 超声背向散射积分评估肝脏肿瘤的消融治疗疗效. 中国医学影像技术, 2006, 22(4): 578-580.
- [12] Lefkowitz JH. Pathology of the liver. Curr Opin Gastroenterol, 2001, 17(3): 197-204.