

• 实验研究 •

BOLD MRI 对兔肝热缺血再灌注损伤及 Lipo-PGE1 干预作用的评价

李婧瑶¹ 褚志强³ 于文娟² 李明阳¹ 任涛² 季倩²¹天津医科大学第一中心临床学院 300070; ²天津市第一中心医院放射科 300192;³天津市第一中心医院移植科 300192

通信作者: 季倩, Email: jiqianq@aliyun.com

【摘要】目的 定量评价血氧水平依赖磁共振成像(BOLD MRI)对兔肝不同程度热缺血再灌注损伤(WIRI)的诊断价值及脂质体携带前列腺素 E1(Lipo-PGE1)的干预作用评估。**方法** 70 只成年、健康新西兰大白兔分组随机分为假手术组(A0 组)、不同热缺血时间组(A1~A3 组)和相应 Lipo-PGE1 干预组(A4~A6 组),再灌注 6 h 后行 MRI 检查,两名影像医生测量计算出各组表观自旋-自旋弛豫率(R2*)值。检测血清丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)并获取肝脏病理切片。使用单因素方差分析和 Spearman 相关性分析进行统计,受试者工作曲线(ROC)分析 R2* 值的诊断效能。**结果** 两名测量者之间组内相关系数(ICC) = 0.805,可重复性好。单因素方差分析显示,R2* 值在假手术组、热缺血组、干预组之间总体比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。假手术组与各热缺血组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),随着热缺血时间延长,R2* 值升高;假手术组与各干预组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),假手术组、相同时间热缺血组及干预组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组与对应热缺血组比较 R2* 值均减低,热缺血时间越长,减低程度越明显,但未达到正常组水平。R2* 值与 ALT、AST 和 LDH 间呈显著正相关($r > 0.5$, $P < 0.05$)。ROC 分析 R2* 值诊断效能好。**结论** BOLD MRI 可无创、定量、动态评价不同程度的肝热缺血再灌注损伤;Lipo-PGE1 能减轻肝热缺血再灌注损伤,BOLD MRI 可无创、定量评价其缓解程度。

【关键词】 磁共振成像;肝;缺血再灌注损伤**基金项目:**国家自然科学基金青年基金(81301197);天津市卫计委攻关课题(16KG109);江苏省博士后基金(1601125B)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.03.012

Using blood oxygen level dependent (BOLD) MRI in the diagnosis of hepatic warm ischemia - reperfusion injury in rabbits and evaluation of liposomal prostaglandin E1 intervention effectLi Jingyao¹, Chu Zhiqiang³, Yu Wenjuan², Li Mingyang¹, Ren Tao², Ji Qian²¹First Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ²Department of Radiology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; ³Department of Transplantation, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Ji Qian, Email: jiqianq@aliyun.com

【Abstract】Objective To quantitatively evaluate the diagnostic value of blood oxygen level - dependent (BOLD) MRI in the diagnosis of different degrees of liver warm ischemia - reperfusion injury (WIRI) in rabbits and evaluate the intervention effect of liposomal prostaglandin E1 (Lipo - PGE1). **Methods** Seventy healthy adult New Zealand white rabbits were randomly divided into sham - operated group (A0), thermal ischemic groups (A1~A3) and intervention groups (A4~A6). All experimental rabbits were scanned by routine MR and BOLD MRI after 6 - hour reperfusion. R2* images were calculated by two radiologists. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) were examined. And liver pathological sectioning was performed. All data were processed by one - way, Spearman's correlation and receiver operating characteristic curve analyses. **Results** The intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.805 of two measurements suggesting that the repeatability of the outcome was decent. R2* values among sham - operated, thermal ischemia and intervention groups were statistically significant ($P < 0.05$). R2* values in sham - operated and ischemia groups were statistically significant ($P < 0.05$). As warm ischemia time elapsed, R2* value showed a rising trend. R2* values in sham - operated and intervention groups were statistically significant ($P < 0.05$). R2* values of sham - operated group at

the same timepoint of thermal ischemia and intervention groups were statistically significant ($P < 0.05$). Under the same ischemic time, $R2^*$ values of intervention groups were smaller than those of thermal ischemia groups. With the prolongation of ischemia time, reduction of $R2^*$ values became more pronounced. However, it did not reach the level of A0 group. $R2^*$ values were significantly positively correlated with ALT, AST and LDH ($r > 0.5$, $P < 0.05$). ROC analysis indicated that $R2^*$ had an excellent diagnostic performance. **Conclusions** BOLD MRI may be applied for noninvasive assessment of liver ischemia-reperfusion injury in different degrees. Lipo-PGE1 alleviates ischemia-reperfusion injury and BOLD MRI can evaluate the relieving degree of Lipo-PGE1.

【Key words】 Magnetic resonance imaging; Liver; ischemia-chemia reperfusion injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81301197); Key Task Program of Tianjin Health & Family Planning Commission (16KG109); Postdoctoral Science Foundation of Jiangsu Province (1601125B)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.03.012

肝脏对缺血、缺氧较为敏感,严重的肝外伤、肝移植,以及出血性休克都会导致肝热缺血再灌注损伤(WIRI)。有研究表明^[1],在伴有部分肝组织缺失的WIRI模型中,WIRI能引发残肝再生能力下降,诱发肝功能衰竭。故而,定量评价及减轻肝WIRI程度尤为重要。目前普遍认为,评判急性肝损伤程度最好的实验室指标是血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST),但其无法反应肝脏特定部位的功能改变。肝活检是评价肝损伤的金标准,但不能反映整个肝脏病理改变,活检后易出现并发症,不能作为常规及动态监测的方法^[2]。目前已有用超声造影^[3]和CT灌注成像^[4]评价肝WIRI的研究,但对比剂的使用和电离辐射不能被频繁的用于肝WIRI程度的评价。近年来,随着功能MR成像技术逐渐应用于各个领域,MRI评价肝脏WIRI的优势日益显现^[5]。其中血氧水平依赖MR成像(BOLD MRI)是一种非侵入性检查方式,由于组织中去氧血红蛋白含量与表观自旋-自旋弛豫率($R2^*$)值呈正相关,可以定量分析肝组织的氧代谢情况,间接反映血容量、血流量以及组织代谢的信息^[6]。本课题组前期工作证实^[7],兔肝热缺血30 min、再灌注6 h的模型中,3.0T BOLD MRI能准确、无创评价肝热缺血-再灌注损伤所致的病理生理变化,对动态监测及评价肝WIRI具有重要临床意义。有研究提示肝脏所能耐受的最长热缺血时限可达60 min^[8],本研究在此基础上将热缺血时间详细划分为30 min、40 min和60 min,可动态评价缺血再灌注损伤,并可定量评价脂质体携带前列腺素E1(Lipo PGE1)对肝WIRI的改善效果。

材料与方法

一、实验动物及分组

成年、健康新西兰大白兔70只,雄性,体重2.5~3 kg。将其分组随机分为7组,每组10只,分别为

A0:假手术组、A1:热缺血30 min组、A2:热缺血40 min组、A3:热缺血60 min组、A4:热缺血30 min干预组、A5:热缺血40 min干预组、A6:热缺血60 min干预组。本研究经我院伦理委员会批准(2017N030KY)。

二、热缺血及干预组模型的建立

手术前动物禁食水12 h,称重进行术前麻醉,仰卧位固定,应用质量分数5%水合氯醛(2 ml/kg)经耳缘静脉注射加5%水合氯醛(2 ml/kg)腹腔浸润联合麻醉。假手术组开腹后仅分离肝周韧带,解剖肝十二指肠韧带而不阻断;热缺血组参照Pringle法建立兔肝热缺血再灌注损伤模型,即解剖肝十二指肠韧带后,用无损伤血管夹夹闭肝尾叶动、静脉,阻断血流达到规定时间(30 min、40 min和60 min)后,移去血管夹,手术后关闭腹腔,再灌注6 h后进行MRI检查;干预组对应不同热缺血时间建立Lipo-PGE1干预组动物模型,Lipo-PGE1在缺血处理前经门静脉给药,所用剂量为2 μ g/kg。术中及术后适量补液,静脉输注生理盐水(5 ml·kg⁻¹·h⁻¹)。

三、MRI检查

采用Siemens Magnetom Trio Tim 3.0T MR扫描仪检查。扫描前10 min用盐酸赛拉嗪注射液(40 mg/2 ml/支)0.2 ml/kg于后腿处肌注麻醉,将动物取仰卧位固定,6通道体部相控阵线圈包裹腹部,并放置沙袋加压。(1)常规MRI扫描:横断位及冠状位T2WI采用FSE序列,冠状位:TR/TE 1500/97 ms,FOV 200 mm×200 mm, NEX 1,层厚2 mm,矩阵128×128;横断位:TR 2 000 ms,TE 80 ms,FOV 180 mm×180 mm, NEX 3,层厚3 mm,矩阵128×128。横断位T1WI采用SE序列,TR 457 ms,TE 2.45/3.99 ms, NEX 3,FOV 210 mm×210 mm,层厚3 mm,矩阵128×128。(2)BOLD MRI检查:采用GRE序列,TR 75 ms,9个不同TE时间(2.57、5.23、7.52、9.81、12.1、14.39、16.68、18.97、24.25 ms),层

厚 4 mm, FOV 200 mm×200 mm, 带宽 350, 矩阵 128×128, NEX 1。BOLD MRI 数据经 Siemens Post Proc. Evaluation 软件自动后处理后获得 T2* 图, 将 T2* 原始数据传送至 Image J 后处理软件, 获得 R2* 图像。

四、肝功能及病理检查

3T MR 检查后:(1)肝功能测定:经耳缘静脉抽取 4 ml 静脉血,离心(3000 r/min,离心半径 16 cm)6 min,分离血清,-20℃保存,使用全自动生化分析仪(东芝、型号:TAB-40F2)检测 ALT、AST 及 LDH 水平;(2)病理组织获取:随后立即处死实验兔,切除新鲜肝组织,除去包膜后切成 1 cm³ 的小块,置于质量分数 100 g/L 甲醛溶液中固定 24 h 以上,常规石蜡包埋和 5 μm 连续切片,做常规 HE 染色,光镜观察肝脏组织病理学及微观形态学变化。

五、数据测量及处理

由两位经验丰富的影像医师对肝尾叶感兴趣区域(ROI)分别进行选取,测量时选取肝脏中间的 3 层相邻图像,参照同层面的 T2WI 图像,避开胆囊、血管及肝脏边缘,每层选取 3 个 ROI,将 9 个 ROI 的平均值作为定量值,将所测 T2* 值经公式 $R2^* = 1/T2^*$ 计算出 R2* 值,所有数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。使用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理,对所测数据进行正态性检验。采用单因素方差分析(ANOVA)评价各组数据之间的差异性,以 P<0.05 为差别有统计学意义。应用 Spearman 相关分析评价 R2* 值与临床化验指标之间的相关性,r>0.5 为显著相关。使用受试者工作曲线曲线(ROC)分析 R2* 值的诊断效能。

结 果

一、数据分析

1. BOLD MRI 参数比较:各组 R2* 场值分别为 A0:91.89±8.168, A1:112.58±11.809, A2:133.31±9.484, A3:175.57±12.302, A4:103.16±8.951, A5:105.69±10.961, A6:118.92±13.171(sec⁻¹)两位测量者所测数值经组内相关系数(ICC)检验,结果显示一致性较好(ICC=0.805, ICC>0.75),两位测量者之间信度及复测信度较高。经正态性检验,每组 R2* 数据均符合正态分布。单因

素方差分析显示,R2* 值在假手术组、热缺血组、干预组分别为(91.89±8.168)sec⁻¹、(139.27±28.418)sec⁻¹、(109.26±12.859)sec⁻¹,总体比较差异有统计学意义(F=34.951,P<0.05)(表 1)。假手术组与各热缺血组之间总体比较差异有统计学意义(P<0.05),且随着热缺血时间延长,R2* 值呈升高趋势;两两比较显示 R2* 值在 A0 组与 A1、A2、A3 组之间差异有统计学意义(P<0.05),在 A1、A2、A3 组之间差异有统计学意义(P<0.05);假手术组与各干预组之间总体比较差异有统计学意义(P<0.05),两两比较显示 A0 组与 A4、A5、A6 组之间差异有统计学意义(P<0.05),在 A4、A5、A6 组之间差异有统计学意义(P<0.05)。干预组与对应热缺血组比较 R2* 值均减低,且随热缺血时间延长,减低程度越明显;假手术组、不同时间热缺血组及干预组之间比较,差异有统计学意义,两两比较显示各组之间差异均有统计学意义(P<0.05,表 1)。

2. R2* 值与生化指标的相关性:Spearman 相关分析结果显示 R2* 值与 ALT、AST、LDH 间均呈显著正相关(r>0.5,P<0.05,表 2)。

表 1 不同组 R2* 值单因素方差分析结果

不同组别之间 ANOVA 检验	F 值	P 值
A0、A1、A2、A3 之间比较	108.476	0.000
A0、A4、A5、A6 之间比较	11.184	0.000
A0、A1、A4 之间比较	11.247	0.000
A0、A2、A5 之间比较	48.215	0.000
A0、A3、A6 之间比较	131.883	0.000

表 2 R2* 值与各生化指标相关性分析

项目	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)
R2* r	0.606	0.618	0.542
P	0.00	0.00	0.00

3. R2* 值 ROC 曲线分析:R2* 的 ROC 曲线分析结果表明 R2* 评价不同程度兔肝热缺血再灌注损伤及 Lipo-PGE1 干预作用具有较高的诊断效能(表 3)。

二、病理结果分析

假手术组:肝细胞形态正常,无淤血及水肿。

热缺血组:A1 组可见汇管区轻度水肿,散在少量炎细胞浸润,以中性粒细胞为主,肝窦轻度扩张、淤血;A2 组可见少量纤维组织增生,肝窦扩张、淤血,并见淋巴细胞、浆细胞渗出;A3 组可见汇管区炎

表 3 R2* 的 ROC 曲线分析

分组	AUC(95% CI)	阈值(Hz)	敏感度(95% CI)	特异性(95% CI)
各组整体比较	0.850(0.621~0.968)	96.57	80.00(44.4~97.5)	80.00(44.4~97.5)
A0 组—不同时间热缺血组	0.940(0.737~0.997)	100.05	90.00(55.5~99.7)	90.00(55.5~99.7)
A0 组—不同时间干预组	0.850(0.621~0.968)	96.57	80.00(44.4~97.5)	80.00(44.4~97.5)

细胞浸润,纤维组织增生,散在肝细胞胞浆嗜酸性变,胞核固缩,趋向凋亡。

干预组:肝细胞轻度水肿变性,伴肝窦及中央静脉轻度扩张、淤血,汇管区少量急、慢性炎细胞浸润。

讨 论

各种原因造成组织器官血流灌注量减少时发生缺血性损伤,而恢复血流灌注后,细胞结构破坏反而加重,这种缺血组织或器官重获血流灌注或氧供后对组织和器官所产生的损伤作用称为缺血再灌注损伤^[9]。本研究中,由于缺血再灌注损伤引起肝细胞ATP缺乏,导致微循环障碍,热缺血组肝细胞水肿变性,并急、慢性炎细胞浸润及纤维化,恢复氧供过程中一系列损害性的细胞反应,导致炎症、细胞死亡^[10]。在肝细胞受损后,细胞通透性增强,使得细胞内ALT和AST渗出,本实验中肝功能指标在热缺血组升高,R2*与ALT、AST、LDH均呈显著正相关,说明BOLD MRI与ALT、AST、LDH评价肝缺血再灌注损伤具有一致性,但其他肝脏病变也可表现为ALT、AST和LDH升高,对缺血再灌注损伤的评价不具有特异性,而R2*值对组织的氧含量更敏感,且BOLD MRI是无创检查,可以直观显示肝脏局部病变,因此用来评价缺血再灌注损伤更有优势。

在前期研究基础上,本研究进一步应用BOLD MRI评价不同程度热缺血损伤及Lipo-PGE1的干预效果,即探索R2*值在肝I/R中的时间依赖性变化,结果显示热缺血组的R2*值大于假手术组,随着热缺血时间的延长,R2*值呈逐渐增大的趋势,证实热缺血时间越长,组织中去氧血红蛋白的含量越多,肝组织损伤越严重,R2*值可以动态、定量、无创的评价不同程度的缺血-再灌注损伤。

缺血再灌注损伤最终导致肝脏微循环障碍,如何有效减轻肝脏损伤在肝移植和肝叶切除等手术中尤为重要。有研究表明,在肝脏再灌注之前给予药物预处理,可减轻肝脏损伤的程度^[11]。研究发现^[12],Lipo-PGE1具有前列腺素的特性,同时较前列腺素半衰期长,体内代谢持久,还可有效靶向中性粒细胞、内皮细胞及血小板,充分发挥作用,但其干预程度如何,尚无确切文献予以证明。本研究应用BOLD MRI无创、定量评价Lipo-PGE1对兔肝WI-RI的干预效果,结果显示干预组R2*值均低于对应的热缺血组,差异有统计学意义。热缺血时间越长,改善效果越明显,A4组比A1组改善了9%,A5组

比A2组改善了15%,A6组比A3组改善了29%;病理结果证实干预组的组织坏死及纤维化范围明显少于对应热缺血组,提示BOLD MRI可以无创、定量评价Lipo-PGE1对缺血-再灌注损伤的干预程度。

本研究存在一定的局限性,T2*值通过手动测定,易受多种因素等的影响。R2*值的改变也可能与铁沉积有关,胡粟等^[13]应用R2*值对铁过载受者的肝脏进行研究,发现R2*值与肝脏铁含量存在高度相关,后续将进一步深入研究对此进行评价。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 刘志刚,钱叶本. 缺血再灌注与肝再生[J]. 国际外科学杂志,2006,33(3):167-171. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4203.2006.03.003.
- [2] 周哲,周璐,王邦茂. 经皮肝穿刺活组织检查术安全性和有效性的研究进展[J]. 中华消化杂志,2017,37(10):711-713. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2017.10.016.
- [3] 李弘,程颖,杨蕾,等. 大鼠肝缺血再灌注后超声造影峰值强度与肝脏损伤程度之间的关系[J]. 中华器官移植杂志,2017,38(4):234-238. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2017.04.008.
- [4] 徐璐,褚志强,于文娟,等. CT灌注成像评价兔肝不同程度热缺血再灌注损伤的研究[J]. 中华器官移植杂志,2018,39(3):164-170. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2018.03.008.
- [5] 李倩,沈文. 心脏死亡捐献供肝热缺血再灌注损伤及MRI评价的研究进展[J]. 国际医学放射学杂志,2016,39(3):265-269. DOI:10.19300/j.2016.Z3731.
- [6] Jhaveri KS, Cleary SP, Fischer S, et al. Blood oxygen level-dependent liver MRI: Can It predict microvascular invasion in HCC? [J]. J Magn Reson Imaging, 2013, 37(3): 692-699. DOI: 10.1002/jmri.23858.
- [7] 许诗超,褚志强,任涛,等. 30T BOLD MRI在评价兔肝热缺血再灌注损伤中的应用价值[J]. 中华器官移植杂志,2016,37(2):112-116. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2016.02.010.
- [8] 马毅,何晓顺. 肝脏移植热缺血损伤的研究进展[J]. 中华肝胆外科杂志,2001,7(8):508-510. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2001.08.024.
- [9] Desai KK, Dikdan GS, Shareef A, et al. Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation [J]. Liver Transpl, 2008, 14(11): 1569-1577. DOI: 10.1002/lt.21630.
- [10] 彭娜,王彦峰,何维阳,等. 肝移植供肝缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中华肝胆外科杂志,2016,22(5):349-351. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2016.05.018.
- [11] 何剑戈,任爱红,施懿诚,等. 肝缺血再灌注损伤的机制及其预防[J]. 河南科技大学学报(医学版),2012,30(3):235-237. DOI:10.3969/j.issn.1672-688X.2012.03.030.
- [12] Bharathan VK, Chandran B, Gopalakrishnan U, et al. Perioperative prostaglandin e1 infusion in living donor liver transplantation: a double-blind, placebo-controlled randomized trial [J]. Liver Transpl, 2016, 22(8): 1067-1074. DOI: 10.1002/lt.24479.
- [13] 胡粟,胡春洪,张京刚,等. 磁共振-R2*值无创评估铁过载肝脏铁含量的初步研究[J]. 临床放射学杂志,2012,31(5):733-737. DOI:10.13437/j.cnki.jcr.2012.05.017.

(收稿日期:2018-08-20)