

超声造影定量分析大鼠肝缺血再灌注损伤的实验研究

南格利 阮欣宇 王柳 刘洁 段麦叶 王莉 王欢

摘要 目的 探讨超声造影定量分析大鼠肝缺血再灌注损伤(HIRI)的可行性。方法 49只SD大鼠因造模死亡7只,余42只随机分为假手术组和HIRI组,HIRI组根据不同再灌注时间分为0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h共6个亚组,每组各6只。建立大鼠HIRI模型,应用超声造影观察各组肝灌注情况,获得超声造影定量参数,包括峰值强度(PI)、曲线下面积(AUC)、达峰时间(TP)、平均渡越时间(MTT)。抽取大鼠下腔静脉血,检测其谷丙转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平。分析超声造影定量参数与血清ALT、AST水平间的相关性。结果 HIRI 0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h组PI、AUC均低于假手术组,TP、MTT均高于假手术组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。HIRI 0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h组ALT、AST水平均高于假手术组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。相关性分析显示,AUC与血清ALT、AST水平均呈负相关($r=-0.754$ 、 -0.808 ,均 $P<0.001$);TP与血清ALT、AST水平均呈正相关($r=0.731$ 、 0.709 ,均 $P<0.001$);MTT与血清AST水平呈正相关($r=0.718$, $P<0.001$);PI与血清ALT、AST水平无相关性。结论 超声造影能准确反映大鼠HIRI微循环的变化,对评估HIRI的病情具有一定价值。

关键词 超声检查;造影剂;肝缺血;再灌注损伤;大鼠

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Quantitative analysis of contrast-enhanced ultrasound for hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: a experimental study

NAN Geli, RUAN Xinyu, WANG Liu, LIU Jie, DUAN Maiye, WANG Li, WANG Huan

Department of Ultrasound, Xi'an Gaixin Hospital, Xi'an 710075, China

ABSTRACT Objective To investigate the feasibility of quantitative analysis in the hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI) in rats by contrast-enhanced ultrasound. **Methods** Forty-nine SD rats were selected, 7 rats died due to modeling, and the remaining 42 rats were randomly divided into sham operation group and HIRI group, HIRI group was divided into 6 subgroups according to different reperfusion time: 0.5 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h, with 6 rats in each group. The HIRI model of rats were established, the hepatic perfusion of each group was observed by contrast-enhanced ultrasound, and the quantitative parameters of contrast-enhanced ultrasound were obtained, including peak intensity (PI), area under the curve (AUC), time to peak (TP) and mean transit time (MTT). The inferior vena cava blood was taken to detect the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in each sample. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between each parameter of contrast-enhanced ultrasound and serum ALT and AST levels. **Results** The PI and AUC in the HIRI 0.5 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h group were lower than those of sham operation group, and the TP and MTT were higher than those of sham operation group, the differences were statistically significant (all $P<0.05$). The ALT and AST levels in the HIRI 0.5 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h group were higher than those of sham operation group, the differences were statistically significant (all $P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that AUC was negatively correlated with serum ALT and AST levels ($r=-0.754$, -0.808 , both $P<0.001$), and TP was positively correlated with serum ALT and AST levels ($r=0.731$, 0.709 , both $P<0.001$), MTT was positively correlated with serum AST level ($r=0.718$, $P<0.001$), PI was not correlated with serum ALT and AST levels. **Conclusion** Contrast-enhanced ultrasound can accurately assess the changes of HIRI microcirculation in rats, and has important clinical value in the evaluation of HIRI.

KEY WORDS Ultrasonography; Contrast agent; Liver ischemia; Reperfusion injury; Rat

肝缺血再灌注损伤(hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI)是指肝脏缺血一段时间后血流再灌注时引发的一系列炎症反应、代谢紊乱、氧自由基生成等造成的肝实质损伤^[1-2]。目前临床诊断HIRI的方法主要有病理检查、MRI和肝功能检测等,但均有其局限,其中病理检查虽为诊断HIRI的金标准,但其具有创伤性,可能对肝脏造成损伤^[3]。因此,寻求一种更为安全、有效的检测方法极为重要。超声造影通过静脉注射造影剂显示病变的血液循环情况,从而评估病情,克服了常规超声对低速血流敏感性差的不足^[4]。本实验通过探讨超声造影在大鼠HIRI病情评估中的应用价值,旨在为临床提供参考依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

雄性SD大鼠49只,体质量170~210g,平均(192.16±10.21)g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[动物合格证号:SCXK(沪)2008-0016]。49只大鼠中,因麻醉、术中出血过多及未到设定再灌注时间点意外死亡7只,余42只采用随机数字表法分为7组,每组各6只,分别为假手术组和HIRI 0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 6个亚组。

二、实验方法

1. 实验动物模型建立:15%水合氯醛(西安天正药用辅料有限公司)腹腔注射麻醉(350 mg/kg)后将大鼠固定于手术台上,腹部至剑突术区备皮消毒,于上腹部正中切口打开腹腔,分离出肝脏左、中叶之肝蒂,使用无创血管夹夹闭肝中叶和左叶处门静脉、肝动脉,阻断血供,止血钳夹闭切口临时关闭腹腔。持续缺血1h后取出血管夹,再灌注成功后关闭腹腔。假手术组未夹闭门静脉和肝动脉,其余实验方法同上。

2. 超声造影检查:使用西门子Acuson S 2000彩色多普勒超声诊断仪,9L4线阵探头,频率7~12 MHz;造影剂使用意大利博莱科公司生产的SonoVue,加入5.0 ml生理盐水稀释后振荡混匀成混悬液备用。常规超声显示肝左叶及腹主动脉切面,然后开启超声造影模式,机械指数0.07,深度、增益等参数在实验过程中保持不变。将0.2 ml超声造影剂混悬液注入大鼠尾静脉,随后注射0.5 ml生理盐水,开启计时器并存储视频90 s。开启对比脉冲序列超声造影后处理软件,脱机处理存储的视频。将感兴趣区(region of interest, ROI)置于肝实质,大小设为5.0~8.0 mm²。软件自动生成超声

造影时间-强度曲线(TIC),获取峰值强度(PI)、曲线下面积(AUC)、达峰时间(TP)、平均渡越时间(MTT)等参数。每只大鼠选取3个ROI并重复测量3次取平均值。

3. 实验室检查:各组大鼠再灌注后取其下腔静脉血3 ml,置于4℃冰箱保存2 h,3000 r/min离心15 min,取其上清液于-80℃下保存,应用7600-120全自动生化分析仪(日本HITACHI公司)检测谷丙转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平。

4. 病理检查:取各组大鼠肝左叶组织标本,10%甲醛液固定后切片,HE染色后置于CX31光学显微镜(日本奥林巴斯公司)下观察病理组织学改变。

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,多组比较采用方差分析,两两比较行 t 检验。相关性分析采用Pearson相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、超声造影检查结果比较

HIRI 0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h组PI、AUC均低于假手术组,TP、MTT均高于假手术组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。随着HIRI时间延长,AUC先逐渐降低,于48 h时再升高,TP、MTT先逐渐升高,于48 h时再降低。见表1和图1。

表1 各组超声造影定量参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	PI(dB)	AUC(dB·s)	TP(s)	MTT(s)
假手术组	22.96±1.54	1065.36±48.47	27.83±2.05	37.92±2.14
HIRI组				
0.5 h	15.35±2.14*	952.28±36.64*	31.75±2.74*	46.85±2.11*
3 h	16.84±2.39*	910.18±40.36*	33.14±3.18*	45.36±2.98*
6 h	14.56±2.58*	730.48±45.23*	36.23±3.39*	49.28±3.06*
12 h	12.12±2.28*	672.84±38.25*	44.08±3.84*	58.43±4.15*
24 h	9.15±1.84*	581.67±37.55*	48.12±4.06*	62.89±4.56*
48 h	17.95±2.98*	795.39±53.25*	30.15±2.84*	47.33±2.58*

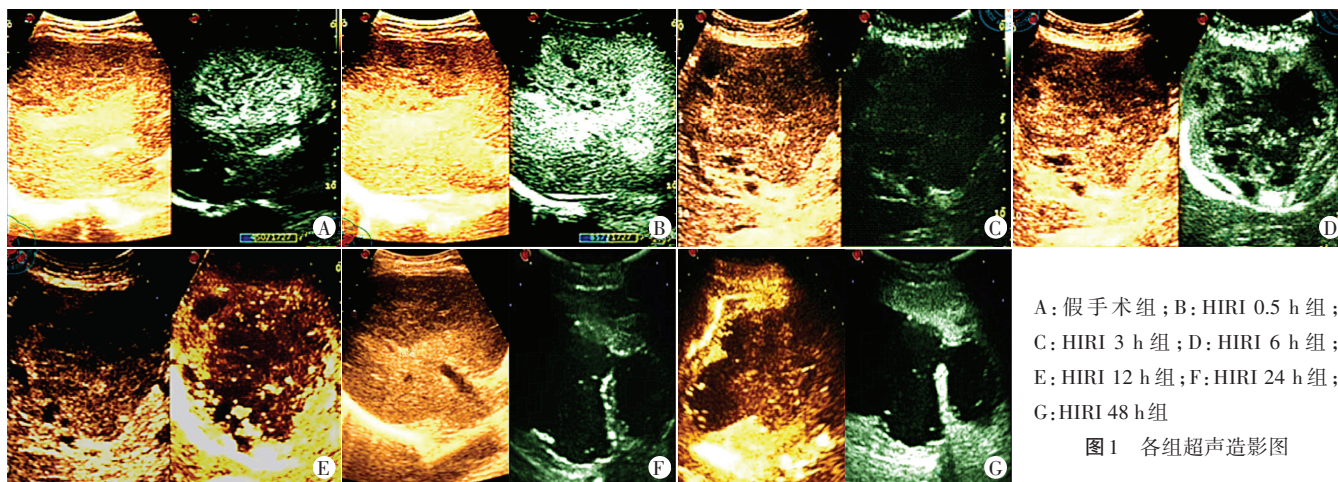
与假手术组比较,* $P < 0.05$ 。PI:峰值强度;AUC:曲线下面积;TP:达峰时间;MTT:平均渡越时间

二、实验室检查结果比较

HIRI 0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h组血清ALT、AST水平均高于假手术组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。随着HIRI时间延长,ALT、AST水平先升高后下降,在6 h时达到峰值。见表2。

三、病理检查结果

假手术组肝小叶结构清晰完整,肝细胞无变性坏



A: 假手术组; B: HIRI 0.5 h 组; C: HIRI 3 h 组; D: HIRI 6 h 组; E: HIRI 12 h 组; F: HIRI 24 h 组; G: HIRI 48 h 组
图1 各组超声造影图

表2 各组 ALT、AST 水平比较 ($\bar{x} \pm s$) U/L

组别	ALT	AST
假手术组	18.36±3.68	19.04±3.85
HIRI 组		
0.5 h	122.44±10.72*	118.62±9.38*
3 h	209.56±16.64*	209.17±20.49*
6 h	248.35±23.51*	342.89±24.67*
12 h	156.29±14.33*	189.63±15.25*
24 h	100.64±12.43*	99.35±12.78*
48 h	75.35±8.62*	80.19±9.52*

与假手术组比较, * $P < 0.05$ 。ALT: 谷丙转氨酶; AST: 天冬氨酸转氨酶

死, 排列整齐, 大小均匀, 无中心粒细胞聚集。HIRI 0.5 h 组肝细胞水肿变性, 肝窦可见大量红细胞淤积; HIRI 3 h 组肝细胞水肿变性, 肝窦可见红细胞淤积, 并可见少量中性粒细胞; HIRI 6 h、12 h 组肝小叶结构逐渐发生变化, 肝细胞水肿变性, 逐渐出现灶性坏死,

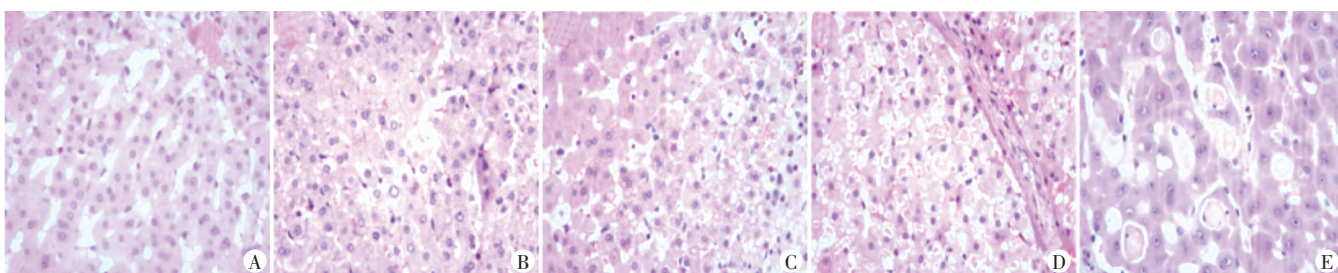
肝窦可见红细胞淤积减少, 中性粒细胞增多; HIRI 24 h 组肝小叶结构紊乱, 较 12 h 肝细胞水肿变性减轻, 中性粒细胞增多; HIRI 48 h 组较 24 h 组肝细胞水肿变性减轻, 中性粒细胞减少。见图 2。

四、相关性分析

Pearson 相关性分析显示, AUC 与血清 ALT、AST 水平均呈负相关 ($r = -0.754, -0.808$, 均 $P < 0.001$); TP 与血清 ALT、AST 水平均呈正相关 ($r = 0.731, 0.709$, 均 $P < 0.001$); MTT 与血清 AST 水平呈正相关 ($r = 0.718, P < 0.001$); PI 与血清 ALT、AST 水平无相关性。见表 3。

讨 论

HIRI 是由多细胞、多介质联合作用产生的级联反应, 其对机体的损伤程度远大于机体的自我保护系统, 可导致肝功能衰竭, 甚至其他器官功能衰竭, 严重



A: 假手术组 (HE 染色, $\times 100$); B: HIRI 0.5 h 组 (HE 染色, $\times 100$); C: HIRI 3 h 组 (HE 染色, $\times 100$); D: HIRI 12 h 组 (HE 染色, $\times 100$); E: HIRI 48 h 组 (HE 染色, $\times 200$)

图2 各组病理图

表3 超声造影定量参数与血清 ALT、AST 水平的相关性分析

指标	PI		AUC		TP		MTT	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
ALT	-0.245	0.076	-0.754	0.000	0.731	0.000	0.205	0.148
AST	-0.184	0.192	-0.808	0.000	0.709	0.000	0.718	0.000

PI: 峰值强度; AUC: 曲线下面积; TP: 达峰时间; MTT: 平均渡越时间

危害患者身体健康^[5]。因此,如何准确、快速诊断其病情并及时给予治疗极为重要。目前临床诊断 HIRI 的方法主要有病理、MRI 和肝功能指标检测等。其中病理检查是诊断 HIRI 的金标准,但其有创,极易对患者肝脏造成损伤。MRI 虽能够明确肝功能的病变性质,提供准确的影像学检查资料,但费用高,且无法实现动态监测。肝功能指标检测能实时监测患者的肝功能损伤程度,但无法提供影像学信息。超声造影通过静脉注射造影剂,造影剂再经肺循环到达各组织的微循环,显示病变的血液循环情况,可对肝内微循环进行无创、可重复性检查,能用于定性诊断肝脏肿瘤、评估肝射频消融疗效等。

本实验结果显示,HIRI 0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 组 PI、AUC 均低于假手术组,TP、MTT 均高于假手术组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结合病理检查结果分析原因为:再灌注 0.5 h 后肝细胞肿胀导致肝血窦变窄,肝窦内红细胞淤积导致肝窦中无复流,使肝血窦内阻力升高,肝缺血后再灌注缓慢。再灌注 3 h 后,出现少量中性粒细胞,改善了微循环障碍的通透性,有利于降低肝血窦内阻力,再灌注血流流速增快,灌注量增加。再灌注 6~24 h 后,肝细胞水肿加重导致肝窦狭窄,中性粒细胞聚集增多阻塞了肝血窦,导致微循环障碍更严重,影响再灌注。再灌注 48 h 后,肝组织结构自我修复能力开始发挥作用,机体代偿逐渐趋于平衡,微循环障碍逐渐得到改善^[6-7]。另外,本实验结果显示,HIRI 0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 组 ALT、AST 水平均高于假手术组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。说明 HIRI 时肝细胞萎缩、坏死,严重影响其肝功能情况,与左嘉玮等^[8]研究结果相似。本实验结果显示,随着 HIRI 时间延长,血清 ALT、AST 水平先升高后下降,于 6 h 时达到峰值。分析原因为:HIRI 的发生表明其微循环已发生改变,使得炎症因子通过血液循环释放于肝脏,导致肝脏进一步受损,此时血清 ALT、AST 水平逐渐升高,且于 6 h 时达到峰值^[9];随着 HIRI 时间的延长,肝功能逐渐恢复,微循环得以改善,故血清 ALT、AST 水平呈下降趋势。

本实验 Pearson 相关分析显示,AUC 与血清 ALT、

AST 水平均呈负相关($r = -0.754$ 、 -0.808 ,均 $P < 0.001$); TP 与血清 ALT、AST 水平均呈正相关($r = 0.731$ 、 0.709 ,均 $P < 0.001$); MTT 与血清 AST 水平呈正相关($r = 0.718$, $P < 0.001$)。说明 AUC、TP、MTT 均能反映肝功能的变化的情况,与王双龙等^[10]研究结果相似。

综上所述,超声造影能实时、准确地评估大鼠 HIRI 微循环的变化,对评估 HIRI 的病情具有一定价值。但本实验仅比较了 HIRI 不同时间点超声定量参数和实验室检查结果,今后需进一步探讨随 HIRI 时间延长微循环的具体变化。

参考文献

- [1] 高宏,易竹君,李培志,等. SMAC 类似物 Birinapant 对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(8): 910-913.
- [2] Choi EK, Jung H, Kim KJ, et al. Sodium nitrite attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Exp Clin Transplant*, 2019, 17(3): 348-354.
- [3] 路涛,宋彬,蒲红,等. 功能 MR 成像在 DCD 供肝热缺血再灌注损伤评估中的应用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2019, 26(3): 351-357.
- [4] 郑小雪,唐敏,魏国李,等. 常规超声、超声造影及肿瘤标志物联合评分在肺周围型病变良恶性诊断中的价值[J]. 临床超声医学杂志, 2020, 22(3): 184-188.
- [5] Xiao Y, Zhang S, Li Q, et al. miR-219a-5p ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury via impairing TP53BP2 [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(8): 2177-2186.
- [6] 张思影,尧林鹏,洪源,等. 多种非高斯分布模型扩散加权成像对大鼠肝脏缺血再灌注模型的评价价值[J]. 中华放射学杂志, 2019, 53(1): 63-68.
- [7] 刘丽莉,崔南,王革丽. MMP-9 抑制剂对大鼠肝脏缺血再灌注模型的影响分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(3): 243-246.
- [8] 左嘉玮,屈豫花,赵辰怡,等. MMP13 和 TIMP2 在肝缺血再灌注损伤介导肝纤维化进程中的动态变化及作用[J]. 动物医学进展, 2020, 41(1): 78-82.
- [9] Xie F, Fei X, Zhang MB, et al. Quantitative evaluation of hepatic microvascular perfusion after ischemia-reperfusion injury in rabbits by contrast-enhanced ultrasound perfusion imaging [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2018, 44(5): 1053-1062.
- [10] 王双龙,于美,吕镔,等. 超声造影定量评估兔肝缺血再灌注损伤动态变化的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2018, 27(8): 725-729.

(收稿日期:2021-02-19)