

论 著

磁共振细胞外容积分数联合PDFF成像在NAFLD食蟹猴模型中对早期肝脏纤维化的诊断价值*

芮茂萍¹ 朱晓艳² 吕 梁²
刘兴利² 范 东^{2,*} 朱正华³

- 1.云南省第一人民医院；昆明理工大学
附属医院磁共振科(云南 昆明 650032)
2.云南省第一人民医院；昆明理工大学
附属医院放射科(云南 昆明 650032)
3.昆明科灵生物科技有限公司
(云南 昆明 650500)

【摘要】目的 探讨肝脏磁共振细胞外容积分数(extracellular volume, ECV)及质子密度脂肪分数(proton density fat fraction, PDFF)在非酒精性脂肪性肝病早期肝纤维化(F1期)食蟹猴中的诊断价值。方法 纳入经肝穿病理证实的早期肝纤维化食蟹猴104只(F1期组)和10只健康对照组,对比两组肝ECV和PDFF值差异及对早期肝纤维化的诊断效能。结果 F1期组ECV、PDFF值均高于对照组($P<0.001$)。ECV和PDFF与肝NAS评分呈中度相关($r_{ECV-小叶炎症评分}=0.432$ $P<0.001$, $r_{PDFF-脂肪变性评分}=0.628$ $P<0.001$),ECV在早期肝纤维、PDFF在脂肪定量评估中均具有良好的诊断效能($AUC-ECV=0.884$, $P<0.001$, $AUC-PDFF=0.991$, $P<0.001$)。结论 MRI-ECV联合PDFF成像在NAFLD食蟹猴中对早期肝纤维化及脂肪定量评估具有巨大潜力。

【关键词】细胞外容积分数；质子密度脂肪分数；
肝脏纤维化；非酒精性脂肪性肝病；
食蟹猴

【中图分类号】R445.2

【文献标识码】A

【基金项目】云南省万人计划名医专项
(YNWR-MY-2019-011)；
中华国际医学交流基金会-SKY
影像科研基金(Z-2014-07-1912-17)

DOI:10.3969/j.issn.1672-5131.2024.05.038

Diagnostic Value of MRI-ECV Combined with MRI-PDFF Imaging for Early Liver Fibrosis in a NAFLD Cynomolgus Model*

RUI Mao-ping¹, ZHU Xiao-yan², LV Liang², LIU Xing-li², FAN Dong^{2,*}, ZHU Zheng-hua³.
1.Department of Magnetic Resonance Imaging, The First People's Hospital of Yunnan Province;
The Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032,
Yunnan Province, China
2.Department of Radiology, The First People's Hospital of Yunnan Province; The Affiliated Hospital
of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, Yunnan Province, China
3.Kunming Biomed International, Kunming 650500, Yunnan Province, China

ABSTRACT

Objective To investigate the diagnostic value of magnetic resonance extracellular volume fraction (ECV) and proton density fat fraction (PDFF) in cynomolgus monkey model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** 104 cynomolgus monkeys (F1 group) with early liver fibrosis (stage F1) were confirmed by liver puncture pathology and 10 normal cynomolgus monkeys (normal group) were included for abdominal T1 mapping and PDFF imaging. The liver magnetic resonance extracellular volume fraction (MRI-ECV) and the fat fraction of the two groups were compared. **Results** the MRI-ECV and PDFF value in the F1 group were higher than those in the normal group, and there was significant difference between the two groups ($P_{ECV}<0.001$, $P_{PDFF}<0.001$). There was a moderate correlation between MRI-ECV and MRI-PDFF with NAS scores of liver ($r_{ECV-lobular\ inflammation}=0.432$ $P<0.001$, $r_{PDFF-steatosis}=0.628$ $P<0.001$), demonstrating good diagnostic efficacy in liver fibrosis and fat assessment. **Conclusion** MRI-ECV combined with MRI-PDFF has great potential for quantitative evaluation of early liver fibrosis and fat fraction in NAFLD cynomolgus monkey model.

Keywords: Extracellular Volume Fraction; Proton Density Fat Fraction; Liver Fibrosis; Nonalcoholic Fatty Liver Disease; Cynomolgus

肝纤维化是所有慢性肝病共有的病理生理过程，可导致肝脏结构的扭曲，肝功能受损，被认为是疾病发展到肝硬化、肝细胞肝癌等不可控终末阶段的最后一道关卡^[1-3]。早期肝纤维化(Metavir F1期)及时有效的积极干预治疗可以明显减缓甚至逆转疾病的进程。^[4]因此，早期肝脏纤维化的诊断具有重要的临床价值，但现有的诊断技术(肝穿活检、弹性成像等)仍不够理想。亟需准确、无创、可实现全肝评估诊断技术。在我们的前期研究中已证明了MRI-ECV在灵长类动物模型中对非酒精性脂肪性肝病肝脏纤维化各期分期定量诊断具有较高的诊断效能($ROC-AUC>0.945$)及较好的可重复性^[5]，但样本量较小，各期的诊断阈值尚无法直接推广至临床运用。本研究拟针对更有临床干预意义的早期纤维化(F1期)，通过扩大样本量，进一步评估MRI-ECV联合MRI-PDFF成像对早期纤维化(F1期)的诊断价值及其阈值范围，为未来的MRI-ECV联合PDFF成像在非酒精性脂肪性肝病中的临床应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 实验动物 普通级雄性食蟹猴135只，平均体重 9.26 ± 2.4 kg，平均年龄 15.78 ± 3.2 years，全部来自昆明科灵生物科技有限公司[SCXK(滇)2020-0007]，实验动物全部饲养于昆明科灵生物科技有限公司[SYXK(滇)K2022-0005]，该研究通过云南省第一人民医院伦理委员会审核批准(KHLL2020-KY007)，在实验动物饲养和实验过程中做到按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型建立及入组 随机选择125只成年雄性食蟹猴每天添加100 g高脂饮食专用饲料进行饲养(昆明科灵生物科技有限公司:脂肪20%，糖25%，基础饲料45%，胆固醇5%，非营养基质5%)，饲养1年后进行肝脏穿刺活检，其中病理结果证实为F1期且磁共振检查符合要求的动物共104只(17.09 ± 1.84 岁)，不具备穿刺条件或磁共振图像质量不符合要求的共21只，被排除。另外挑选10只(11.1 ± 0.32 岁)经病理证实无非酒精性脂肪性肝炎及肝脏纤维化的雄性食蟹猴为对照组进行对照评估，对照组给与非高脂正常饮食饲养。

1.2.2 肝脏活检及组织评估 肝脏活检由经验丰富的超声科医生在超声(M9CV, Mindray)引导下进行，使用16号穿刺针经右侧肋弓下进行肝右叶穿刺获取2~3块肝组织。将样品浸泡在福尔马林中并经石蜡包埋固定后切成0.4mm的切片，最后通过0.1%天狼星红染色，对肝纤维化程度进行Metavir评分(F0无纤维化，F1汇管区纤维性扩大但无纤维间隔形成，F2汇管区纤维性扩大，少数纤维间隔形成，F3多数纤维间隔形成，无硬化结节，F4肝硬化)。同时采用NAS评分系统对NAFLD程度进行评估，肝细胞脂肪变(0~3分)、小叶内炎症(0~3分)，肝细胞气球样变(0~2分)这三项评分相加为NAS总分。

1.2.3 磁共振扫描 为尽可能减少肝脏穿刺活检对磁共振评估结果的影响，活检2周后才进行MRI扫描，采用1.5T扫描仪(Magnetom Aera, Siemens Healthcare)通过18通道腹

【第一作者】芮茂萍，女，主管技师，主要研究方向：MRI影像技术。E-mail: ruimaoping@163.com

【通讯作者】范 东，男，副主任医师，主要研究方向：腹部影像诊断。E-mail: fdj1997@163.com

部线圈进行肝脏增强T1mapping扫描。扫描序列采用改良的Look-Locker反转恢复的T1序列进行(MOLLI)。MOLLI序列选择冠状位成像,进行5-7个肝脏层面及1-2个主动脉层面单层逐一扫描,每个层面扫描时均经自制的呼吸机气管导管装置控制动物呼吸,实现被扫描动物被动屏气以尽可能降低呼吸运动对肝脏成像影响。对比剂注射方案为0.1mmol/kg,流速为1mL/s(钆特酸葡胺注射液,江苏恒瑞医药)。对比剂注射后延迟10min进行增强后肝脏的MOLLI序列扫描,增强前后MOLLI序列扫描保持位置一致。具体扫描参数如表1所示。全肝PDFF成像在对比剂注射前完成,采用六回波化学位移编码梯度回波序列成像在动物麻醉后自由呼吸状态下进行。

表1 增强前、后的MRI-MOLLI 序列扫描参数

	增强前	增强后
重复时间	393ms	373ms
回波时间	1.43ms	1.43ms
反转时间	233ms	213ms
扫描视野	170mm	170mm
翻转角	35deg	25deg
反转次数	2	3
回波间隔	3.5ms	3.5ms
层厚	8mm	8mm

1.2.4 图像分析及测量 将扫描获取的同一层面增强前、后的MOLLI序列图代入基于MATLAB自主改编的软件Image analysis suite 2.0(MathWorks, Natick, MA),并结合Image J(Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD)软件生成ECV图(图1)。在图像后处理过程中要特别注意选择增强前-后图像吻合度高、对位良好的层面进行测量,避免移动或呼吸伪影明显的层面。肝脏感兴趣区绘制应尽可能和穿刺活检的位置相同同时尽量避开大血管、胆管及肝脏包膜。血池感兴趣区的绘制注意避开血管壁并尽量选择主动脉下段,以减小血流流入效应对测量值的影响,同时避免了扫描时部分层面由于心脏的收缩心腔血池信号难以测定情况。

PDFF测量通过后处理软件Invicro software (Konica Mionlta Company)在肝脏横断位上进行逐层全肝勾画后自动获取全肝平均脂肪定量分数(图1)。

2 结果

2.1 F1期组与对照组磁共振多参数对照 F1期组MRI-ECV值及PDFF高于对照组($P_{ECV}, P_{PDFF} < 0.001$)。PDFF、ECV与肝脏局部穿刺活检病理NAS评分间表现出不同程度相关,其中MRI-ECV与小叶间炎症评分、MRI-PDFF与肝细胞脂肪变评分间呈中等程度相关,但增强前的T1值与各病理评分间均无相关性(与表3内容不吻

1.3 统计学方法 统计学软件使用SPSS(Version 22, IBM),两组间的对比采用独立样本T2检验或非参数检验。相关性分析采用Spearman进行,相关系数 $r < 0.4$ 为弱相关,0.4~0.7为中等程度相关, > 0.7 为强相关。诊断效能分析通过ROC曲线完成,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

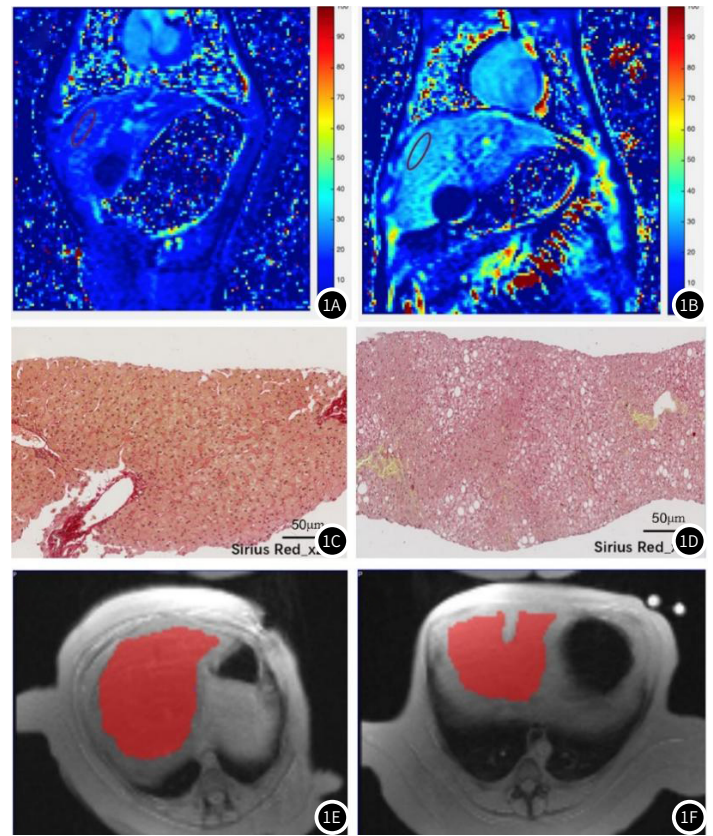


图1A-图1F MRI-ECV图和PDFF图;图1A 正常肝脏ECV图,MRI-ECV分数为21%,图1B 早期肝脏纤维化F1期的ECV图,MRI-ECV分数为24.7%。图1C-1D为图1A、图1B对应的肝脏组织天狼猩红染色病理图,对应的病理分期分别为F0期和F1期。图1E-1F为PDFF测量的部分肝脏勾画层面示意。

合)。(表3)表3中增强前T1值与各病理评分相关性 P 值均 ≥ 0.05 。

2.2 ECV、T1、PDFF值诊断效能评价 通过计算约登指数获得最佳节点(阈值标准),ECV、增强前T1值及PDFF在最佳节点下诊断早期肝脏纤维化F1期及肝脏脂肪变性的诊断效能(ROC曲线下的面积)分别为88.4%、71.2%、99.1%(图2)。

表2 F1期组和对照组MRI参数及病理学参数对比

组别	MRI			组织病理学评分		
	增强前T1值(ms)	ECV(%)	PDFF	肝细胞脂肪变性评分	小叶间炎症评分	气球样变评分
F1期组(104只)	522(505.0,555.5)	25.36(24.29,26.59)	15.29(10.38,10.87)	1(0,2)	1(1,2)	1(0,1)
对照组(10只)	540.5(515.0, 575.0)	22.56(21.22,23.54)	4.36(3.96,4.89)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
Z值	1.202	3.982	5.139	3.697	5.372	4.097
P值	0.229	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:所有数值表示为中位数M(P_{25}, P_{75})。ECV:细胞外容积分数PDFF:质子密度脂肪分数。

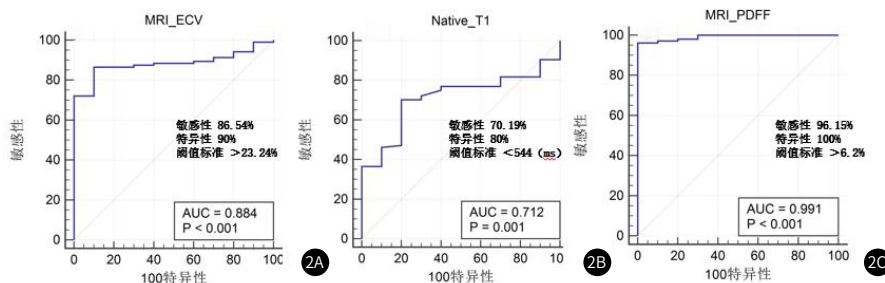


图2A-图2C ROC曲线图;区分早期纤维化(F1期)组和对照组的ECV(图2A)和增强前T1值(图2B),区分早期肝脏纤维化脂肪变性组及无脂肪变性的对照组的PDFF值(图2C)。

表3 MRI参数与肝组织NAS评分相关性(表格项目设置不规范, r、P值改为两列)

	肝细胞脂肪		气球样变		小叶间炎症	
	r	P	r	P	r	P
MRI-ECV	0.210	0.025	0.272	0.003	0.432	<0.001
MRI-PDFF	0.628	<0.001	0.168	0.073	0.350	0.001
增强前T1	0.026	0.781	-0.165	0.080	0.021	0.819

注: ECV: 细胞外容积分数; PDFF: 质子密度脂肪分数。

3 讨 论

肝纤维化是肝硬化及肝细胞肝癌发展的重要环节。F1期肝脏纤维化的积极干预可明显延缓甚至部分逆转疾病进展。但目前尚缺乏早期肝脏纤维化的有效诊断手段。常见诊疗手段主要包括肝脏穿刺活检、弹性成像(超声/磁共振)、计算机断层扫描(CT)和血清学检查等。检查准确性不高是主要问题^[6-11], 金标准的“肝活检”也存在局部取材取样误差大, 无法代表全肝整体情况的弊端^[12-13]。本研究中拟探讨MRI-ECV联合MRI-PDFF技术在早期肝脏纤维化评估中的价值。

MRI-ECV已被认为是心肌纤维化评估的“相对金标准”^[14-15], 但在肝脏纤维化应用尚处于探索性初步验证阶段^[16-17], 研究较少。究其原因主要为动物模型不成熟, 其次为早期患者病理活检难以开展。因此目前已有研究多为啮齿小动物研究或样本量有限的临床研究。在本研究中F1期ECV均值为25.28±1.99(范围为20.01~28.96, ROC最佳诊断阈值>23.24%), 这与盛若凡^[18]等人报道的乙型肝炎肝纤维F1~2期的ECV值范围(24.72±4.54)较为接近, 但在盛若凡等人的研究中F1病例仅有4例, 在另一项涉及慢性乙型肝炎患者的研究中^[17], 其F1及F0的ECV值均略低于本研究(F0=20.26±4.91, F1=23.40±4.56), 而国内一项关于兔肝纤维化的实验研究发现F1期的对应的ECV值和T1值均高于本研究^[19], 其原因可能是疾病或实验模型的差异, 其次上述研究样本量较小也有可能是原因之一。除此之外, 目前国内外相关ECV定量研究较少, 尚无更多的F1期对应的ECV定量数值可供对比。增强前T1值过去被证明与肝脏纤维化存在弱到中等程度的相关, 但无法实现早期纤维化的鉴别诊断(F0 vs F1, F1vs F2)^[20], 本研究中ECV对肝脏纤维化的诊断效能明显高于传统的增强前T1值(图2), 提示MRI-ECV较传统增强T1值在肝脏纤维化的诊断中更有潜在的价值。此外, 在MRI参数与组织病理学评分的相关性分析中, MRI-ECV和MRI-PDFF较增强T1值表现出了更强的相关性, 张炜等人的研究也得到类似的结论, 但未进一步进行定量对比^[21]。其中MRI-ECV与NAFLD病理改变中的小叶间炎症关系更为密切, 提示早期肝脏纤维化主要的病理学改变可能是炎症活动增加。有研究指出NAFLD早期纤维化患者中, 高水平的肝脏脂肪与疾病快速进展有关。MRI-PDFF作为检测和准确定量肝脏脂肪的最佳方法^[21-25], 在本研究中与肝脏脂肪样变也表现出了极佳的诊断效能(AUC=0.99)和中等程度的病理相关。值得注意的是, 病理学检查的局部取材和MRI-PDFF的全肝评估可能会一定程度上影响二者间的相关性分析。

本研究也存在一些局限性, 如ECV测量的ROI与病理活检的位置很难绝对一致, 会对结果产生一定的误差, 其次, 由于所有动物均要进行穿刺活检, 出于成本控制, 正常对照组的样本量较小。

早期肝脏纤维化患者多无症状, 肝脏活检的意愿不明显, 这使得相应的临床研究往往因为活检病理对照困难而无法开展。而小动物研究往往因为物种差异, 研究结果难以直接转化到临床。本研究研究对象为与人类高度同源的灵长类动物, 可以一定程度上弥补以人类为研究对象的临床研究无法开展的缺憾, 较好的实现啮齿类动物研究向人类研究的过渡。本研究基于大样本量灵长类动物的研究结果为未来MRI-ECV联合PDFF技术的临床应用提供了重要的数值参考。为NAFLD的肝脏纤维化及脂肪定量评估提供了新的技术方向。

参考文献

[1]Hinkson A,Lally H,Gibson H,et al.Meta-analysis:enhanced liver fibrosis test to identify hepatic fibrosis in chronic liver diseases[J].Aliment

Pharm Therap, 2023, 57 (7): 750-762.
[2]Han NC,Hui LW,Grace En,et al.Mortality outcomes by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease:a systematic review and meta-analysis[J].Clin Gastroenterol H, 2023, 21 (4): 931-939.
[3]Yu S,Ericson M,Fan A,et al.Genome-wide CRISPR Screening to identify drivers of TGF-β-induced liver fibrosis in human hepatic stellate cells[J].Acs Chem Biol, 2022, 17 (4): 918-929.
[4]Shiha G,Ibrahim A,Helmy A,et al.Asian-pacific Association for the Study of the Liver (APASL) consensus guidelines on invasive and non-invasive assessment of hepatic fibrosis:a 2016 update[J].Hepatology Int, 2017, 11 (1): 1-30.
[5]L Lyu,XL Liu,MP Rui et al.Liver extracellular volume fraction values obtained with magnetic resonance imaging can quantitatively stage liver fibrosis:a validation study in monkeys with nonalcoholic steatohepatitis[J].European Radiology, 2020, 30 (10): 5748-5757.
[6]Li MS,Yang H,Liu Y,et al.Comparison of the diagnostic performance of 2D and 3D MR elastography in staging liver fibrosis[J].Eur-Radiol, 2021, 31 (12): 9468-9478.
[7]侯有帆,陆中奎,邓勇莹.慢性乙肝患者血浆同型半胱氨酸测定及其与肝纤维化程度的相关性研究[J].罕少疾病杂志, 2020, 27 (1): 46-48.
[8]于巧丽,张丽利.非酒精性脂肪性肝炎外周血NLR、RDW、MPV变化及其意义探讨于巧丽张丽利[J].罕少疾病杂志, 2023, 30 (4): 65-66, 81.
[9]Yano K,Onishi H,Tsuboyama T,et al.Noninvasive liver fibrosis staging:comparison of MR elastography with extracellular volume fraction analysis using contrast-enhanced CT[J].J Clin Med, 2022, 11 (19): 203-223.
[10]Niu A,Qi T.Diagnostic significance of serum type IV collagen (IVC) combined with aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) ratio in liver fibrosis[J].Ann Transl Med, 2022, 10 (24): 1310-1319.
[11]Lin B,Ma Y,Wu S,et al.Novel serum biomarkers for noninvasive diagnosis and screening of nonalcoholic fatty liver disease-related hepatic fibrosis[J].Omic, 2019, 23 (4): 181-189.
[12]Vaikunth S,Higgins JP,Concepcion,et al.Does liver biopsy accurately measure fibrosis in Fontan-associated liver disease? A comparison of liver biopsy pre-combined heart and liver transplant and liver explant post-transplant[J].Clin Transplant, 2020, 34 (12), 89-97.
[13]Poynard T,Lenaour G,Vaillant JC,et al.Liver biopsy analysis has a low level of performance for diagnosis of intermediate stages of fibrosis. Clinical gastroenterology and hepatology:the official clinical practice[J].J Magn Reson Imaging, 2012, 10 (6): 657-687.
[14]Terrier B,Dechartres A,Gouya H,et al.Cardiac intravoxel incoherent motion diffusion-weighted magnetic resonance imaging with T1 mapping to assess myocardial perfusion and fibrosis in systemic sclerosis:association with cardiac events from a prospective cohort study[J].Arthritis & Rheumatology, 2020, 72 (9): 1571-1580.
[15]KaoIawanich Y,Azevedo CF,Kim HW,et al.Native T1 mapping for the diagnosis of myocardial fibrosis in patients with chronic myocardial infarction[J].JACC-Cardiovascular Imaging, 2022, 15 (12): 2069-2079.
[16]胡根文,全显跃,QUEENIE CHAN,等.磁共振T1 ρ 在大鼠肝纤维化模型中的应用价值[J].中国CT和MRI杂志, 2016, 14 (5): 85-88.
[17]Luetkens JA,Klein S,Träber F,et al.Quantification of liver fibrosis at T1 and T2 mapping with extracellular volume fraction MRI:Preclinical Results[J].Radiology, 2018, 288 (3): 748-754.
[18]Jin K,Wang H,Zeng M,et al.A comparative study of MR extracellular volume fraction measurement and two-dimensional shear-wave elastography in assessment of liver fibrosis with chronic hepatitis B[J].Abdominal Radiology, 2019, 44 (4): 1407-1414.
[19]盛若凡,金开璞,汪禾青,等.磁共振成像细胞外容积对乙型肝炎肝纤维化的诊断价值研究[J].中华肝病杂志, 2018, 26 (9): 650-653.
[20]朱祖辉,邢伟,刘海峰,等.乳酸酸二钠T1 mapping磁共振成像定量评估兔肝纤维化的研究[J].磁共振成像, 2020, 11 (10): 890-895.
[21]张炜,翟斐斐.MRI测定肝细胞外体积分数在评估肝纤维化严重程度中价值分析[J].胃肠病学和肝病学杂志, 2020, 29 (2): 189-194.
[22]Schaapman JJ,Tushuizen ME,Coenraad MJ,et al.Multiparametric MRI in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J].J Magn Reson Imaging, 2021, 53 (6): 1623-1631.
[23]Hu HH,Yokoo T,Bashir MR,et al.Linearity and bias of proton density fat fraction as a quantitative imaging biomarker:a multicenter,multiplatform,multivendor phantom study[J].Radiology, 2021, 298 (3): 640-651.
[24]Kim HJ,Cho HJ,Kim B,et al.Accuracy and precision of proton density fat fraction measurement across field strengths and scan intervals:a phantom and human study[J].J Magn Reson Imaging, 2019, 50 (1): 305-314.
[25]黎永滨,钟洁愉,谢婷婷,等.瞬时弹性成像受控衰减参数与磁共振成像质子密度脂肪分数在肝脏脂肪变评估的相关性及一致性研究[J].中国CT和MRI杂志, 2023, 21 (3): 110-112.