

超声量化技术在大鼠脂肪肝模型中应用的初步研究

徐旭, 席文恭, 王维亭, 赵专友, 汤立达

天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

摘要 目的: 探讨超声量化技术评价大鼠肝脏脂肪变的价值。方法: 大鼠 ig 酒精高脂乳液 12 周, 制备脂肪肝模型。测量正常大鼠及模型大鼠肝脏二维声像图的灰度值, 检测肝组织三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC), 并将肝脏组织做病理切片, 观察肝细胞脂变情况。结果: 与正常组比较, 模型组超声图像近区、远区灰度显著增加, 肝脏 TG、TC 明显升高。组织病理学分析可见模型大鼠肝脏典型脂肪样变。结论: 超声量化技术可作为一种无创性量化方法用于判断大鼠肝脏脂肪变化。

关键词 超声检查; 量化; 灰阶强度; 脂肪肝

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 04-0263-04

Preliminary study on application of the quantitative ultrasonic diagnostic technique in the study on a rat model of fatty liver disease

XU Xu, XI Wen-gong, WANG Wei-ting, ZHAO Zhuan-you, TANG Li-da

Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract **Objective:** To explore the quantitative assessment of fatty liver of rats by measuring ultrasonic gray scale. **Methods:** A mixture composed of alcohol, lard and cholesterol was supplied to rats for 12 weeks in order to establish a rat model of hepatic steatosis. To measure ultrasonic gray scale of liver and hepatic pathological feature liver, and the changes of the contents of triglyeeride (TG) and cholesterol (TC) in liver tissue were observed. **Results:** Gray scale from near or far areas of ultrasonic image in model rats was higher than that of normal rats. And the rats of fatty liver diseases had a significantly higher level of TG, and TC in liver tissue than those of normal rats. The typical fatty liver pathologic changes were observed in the model rats. **Conclusion:** Hepatic ultrasonic gray scale can reflect the grades of hepatic steatosis, which is served as reliable noninvasive tools for the quantitative diagnosis of fatty liver disease.

Key words ultrasonography; quantization; gray scale; fatty liver

脂肪肝的动物实验研究中常以肝脏脂质的变化作为评价药效的关键指标。但是, 肝脏脂质的直接测定要处死动物, 只适用于实验结束后一次性测定。目前, 临床上脂肪肝的无创诊断主要有 CT 和超声 2 种影像技术。利用超声影像技术间接测定肝脏脂质变化的方法, 因其简便、快捷、经济, 日益受到学者的关注。本研究初步探讨了超声量化技术在大鼠脂肪肝模型中的应用。

1 材料

1.1 药品及试剂

凯西莱 (硫普罗宁片): 河南省新宜药业股份有

限公司产品, 批号 070711。胆固醇: 天津市英博生化试剂有限公司产品, 批号 070803。猪油: 天津肉联厂产品, 自行熬制成大油。无水乙醇: 分析纯, 天津市天河化学试剂厂产品, 批号 20071008。丙酮: 分析纯, 天津市康科德科技有限公司产品, 批号 070201。总胆固醇 (TC) 试剂盒: 中生北控生物科技股份有限公司产品, 批号 070351.200710。三酰甘油 (TG) 试剂盒: 中生北控生物科技股份有限公司产品, 批号 080281.200803。

1.2 动物

SD 大鼠, SPF 级, 北京维通利华实验动物技术

收稿日期: 2009-12-15

基金项目: 国家新药重大创制项目 (2009zx09301-008)

作者简介: 徐旭 (1976—), 男, 助理研究员, 研究方向: 中药药理、心血管药理、新药药效学评价。E-mail: xuxutj@sina.com

有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2007-0001。

1.3 仪器

Vivid 3 Pro 彩色多普勒超声诊断仪, 美国 GE 公司产品。AU640 型全自动生化分析仪, Olympus 产品。

2 实验方法

2.1 分组及模型制备

SD 大鼠 30 只, 雄性, 200~223 g。随机分为 3 组, 正常对照组给予 0.5%CMC, ig, 其余大鼠每天给予造型乳液 15 mL/kg, ig, 用以制造与人类的饮食结构相似的慢性脂肪肝模型。造型乳液按以下比例配制: 60%乙醇 10 mL/kg、胆固醇 1 g/kg、猪油 5 g/kg, 连续 ig 12 周。造型 8 周后, 将模型动物随机分为 2 组, 每组 10 只。模型对照组给予 0.5%CMC, ig, 阳性药组给予凯西来, ig, 剂量为 140 mg/kg, 给药体积均为 5 mL/kg。每日给药 1 次, 共给药 4 周。给药期间继续给予造型乳液。

2.2 指标测定

大鼠分别于治疗前 (造型 8 周) 及治疗后 (造型 12 周) 后, 以 Vivid 3 Pro 彩色多普勒超声诊断仪进行肝脏超声检查。探头频率为 10 MHz, 调整并固定增益及深度等仪器条件, 在图像显示最佳时选取剑下横切面, 采取超声图像。采用 Photoshop 6.0 图像分析系统, 图像灰度等级 0~255, 11×11 圆形像素取样框, 于距肝表面 0.8、1.5 cm 处各取近区、远区 2 点, 取其灰度平均值, 以图像灰度表示脂肪肝的严重程度。处死动物, 摘取肝脏, 称取左叶边缘 200 mg, 以 2 mL 丙酮-乙醇混合液 (1:1) 研磨制备匀浆, 抽提脂质, 离心后, 取上清液用比色法测定 TG、TC。再取 1 cm×1 cm×0.5 cm 肝右叶浸入福尔马林液中固定, HE 染色, 观察肝细胞脂变情况, 按附表 1 标准进行分级和评分。

表 1 肝细胞脂变情况半定量评分标准

Table 1 Semi-quantitative score standard of fatty degeneration of liver cells

肝细胞脂变情况	分级	评分
肝细胞内脂滴散在, 稀少	0	0
含脂滴的肝细胞不超过 1/4	I	1
含脂滴的肝细胞不超过 1/2	II	2
含脂滴的肝细胞不超过 3/4	III	3
肝组织几乎被脂滴代替	IV	4

2.3 统计方法

应用 SPSS 10.0 软件进行统计处理, 计量资料采用单因素方差分析, 计数资料采用 Ridit 分析。

3 实验结果

3.1 对肝脏超声检查的影响

肝脏超声显示正常组大鼠肝实质回声均匀, 模型组大鼠肝实质回声不均匀, 超声图像近区、远区灰度显著增加。ig 给予凯西来 (140 mg/kg) 后能明显减轻造型乳剂引起的肝脏超声图像灰度的增加。结果见表 2、图 1。

3.2 对肝脂代谢的影响

模型组大鼠给予造型乳液 12 周, 与正常组比较, 大鼠肝脏 TG、TC 均显著升高。连续给予凯西来 (140 mg/kg) 4 周, 肝脏升高的 TG、TC 明显降低。结果见表 3。

3.3 对肝细胞脂变情况的影响

病理检查表明正常组大鼠肝小叶轮廓清楚, 汇管区结构正常, 无肝细胞变性坏死、瘀胆, 未见明显炎细胞浸润, 无脂滴堆积。模型组肝细胞肿胀, 胞浆疏松, 肝窦扩张明显, 脂滴明显堆积, 呈脂肪变性表现。ig 凯西来 (140 mg/kg) 后能明显改善酒精和高脂诱发的肝细胞脂肪变性。结果见表 4、图 1。

表 2 两组大鼠肝脏超声图像灰阶平均强度的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Average strength comparison of ultrasonic gray scale of liver between the normal rats and model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	近区/(灰度等级)		远区/(灰度等级)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常组	—	28.50±3.82	31.18±5.29	24.73±5.03	23.91±7.46
模型组	—	78.07±11.42 ^{△△}	88.36±7.09 ^{△△}	65.01±13.42 ^{△△}	78.55±5.39 ^{△△}
凯西来	140	74.92±12.30	55.85±9.13 ^{**}	63.87±8.84	49.30±6.20 ^{**}

与正常组比较: ^{△△} P<0.01; 与模型组比较: ^{**} P<0.01

^{△△} P<0.01 vs normal group; ^{**} P<0.01 vs model group

表3 两组大鼠肝脏 TG、TC 量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Changes of TG & TC contents between fatty liver tissue and normal liver tissue ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TG / (mmol·kg ⁻¹)	TC / (mmol·kg ⁻¹)
正常组	—	18.72 ± 5.28	9.52 ± 1.00
模型组	—	31.61 ± 3.92 ^{△△}	13.95 ± 2.88 ^{△△}
凯西莱	140	26.84 ± 5.02 [*]	11.29 ± 2.13 [*]

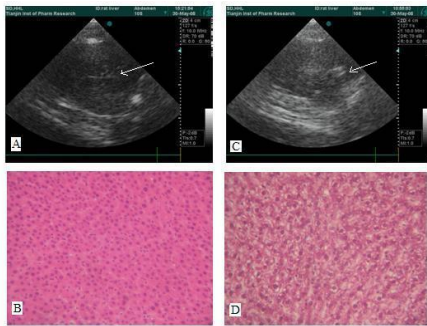
与正常组比较: ^{△△}*P* < 0.01; 与模型组比较: ^{*}*P* < 0.05
^{△△}*P* < 0.01 vs normal group; ^{*}*P* < 0.05 vs model group

表4 对肝细胞脂变情况的影响 (n=10)

Table 4 Change of the grease in hepatic cell by pathological detection (n=10)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脂变严重程度					总分
		0	I	II	III	IV	
正常对照	—	8	2	0	0	0	2
模型对照	—	0	0	2	4	4	32 ^{△△}
凯西莱	140	2	3	4	1	0	14 ^{**}

与正常组比较: ^{△△}*P* < 0.01; 与模型组比较: ^{**}*P* < 0.01
^{△△}*P* < 0.01 vs normal group; ^{**}*P* < 0.01 vs model group



A-正常组大鼠肝脏二维声像图, 肝实质回声均匀, 灰度较低;
 B-正常组大鼠肝脏病理组织图, 肝小叶轮廓清楚, 汇管区结构正常, 无肝细胞变性坏死、瘀胆, 未见明显炎症细胞浸润;
 C-模型组大鼠肝脏二维声像图, 肝实质回声不均匀, 灰度较高;
 D-模型组大鼠肝脏病理组织图, 肝细胞肿胀, 胞浆疏松, 肝窦扩张明显, 肝细胞呈脂肪变性表现。箭头所示为肝叶间隙。

图1 大鼠肝脏二维声像图及病理组织图

Fig.1 2D Ultrasonic images and pathological appearances of normal liver or fatty liver

3.4 肝脏超声检查与病理、生化结果的比较

比较肝脏超声检查与病理、生化的结果, 发现随着肝脂变病理分级及肝组织 TG 的增加, 超声图像灰阶平均强度也随之增加。回归分析结果显示, 肝脂变病理分级与超声图像灰阶平均强度存在相关性, 肝组织 TG 与超声图像灰阶平均强度亦存在相关性。结果见表 5。

4 讨论

乙醇具有肝毒性, 可抑制脂肪酸 β 氧化^[1]。高

脂可增强乙醇对肝脏的损伤。乙醇在伴有高脂的情况下, 能产生更多的自由基, 进而攻击脂类造成脂质过氧化损伤。高胆固醇也能直接损伤肝筛, 从而使肝细胞从血液摄取大量的 TG, 使肝脏中的 TG 明显增加。采用大鼠 ig 高脂、酒精的方法可制造与人类的饮食结构相似的慢性脂肪肝模型。该造模方法已被证明是制作脂肪肝模型的可靠方法^[2]。

超声作为诊断脂肪肝的便捷手段一直广泛应用于临床, 但是该技术主要依赖于操作者的主观判断, 并无客观统一的量化标准, 在动物中的应用尤其缺乏经验。在前期研究中, 我们发现大鼠肝脏的解剖结构与人类肝脏并不相同, 分为 6 叶, 除尾状叶外, 其余各肝叶为薄片样结构, 各叶均具一肝蒂, 活动度较大^[3]。将超声探头直接置于肝脏表面, 通过超声动态图像与肉眼直视肝脏情况的比较, 我们发现在超声图像清晰时可见大鼠肝叶的间隙随呼吸一张一合的运动。因此, 将大鼠肝叶的间隙作为最佳超声图像的标准更合适、可操作性更强。

当肝脏发生脂肪变性时, 由于肝细胞内脂肪沉着, 对超声波能量吸收明显, 并产生散射作用, 使肝回声增强^[4]。肝回声的强弱可以采用灰度来量化, 通过对肝二维超声图像灰阶直方图的分析能分辨肉眼所不能识别的图像信号细微变化、辨别组织的均匀程度^[5]。本研究通过对比大鼠肝脏超声图像灰度值、肝脂肪变病理切片及肝脏 TG、TC, 表明超声

表 5 肝脏超声检查与病理、生化结果的比较

Table 5 Relationship between ultrasonic images and pathological appearances / TG contents of rat's liver

肝脂变病理分级	n	TG / (mmol·kg ⁻¹)	超声图像灰阶平均强度	
			近区	远区
0	10	17.10±3.07	31.05±5.06	23.55±6.55
I	5	26.15±2.30**	49.51±7.30**	44.83±2.99**
II	6	28.71±0.69*	64.89±7.07**	57.09±6.44**
III	5	31.02±0.68**	85.35±4.90**	76.26±3.65**
IV	4	35.68±2.58**	94.95±1.86**	83.52±1.94**
与病理分级的相关性			r=0.995 22	r=0.989 27
与 TG 的相关性			r=0.961 97	r=0.971 97

与上一低级别病理分级比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs lower pathological grade group

量化技术能真实反映肝组织的细微变化, 可作为一种无创性量化方法用于判断大鼠肝脏的脂肪变化。依据本研究的仪器条件, 大鼠肝脏近区超声图像灰阶平均强度增加 60% 时可认为脂肪肝形成。由于各实验室条件及仪器设置的不同, 其结果可能存在一定的差异, 因此需要建立实验室自己的参数条件及参考指标。

在抗脂肪肝药物的治疗研究中, 以往多以造模一定时间后默认为造模成功, 再随机分组给药。该方法因缺乏可参考的指标, 并不严谨。采用超声量化技术可解决这一问题, 为动物给药前的均匀分组提供重要的参考依据, 并能动态的观察药物不同时间的的作用效果。该方法值得进一步深入的研究及推广。

参考文献

- [1] 陈 奇. 中药药效研究思路与方法 (第一版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [2] 刘桂良, 高利忠, 蓝岚秀子, 等. 建立酒精性肝纤维化/高血脂双重疾病大鼠模型的快速方法[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11 (6): 650-654.
- [3] 吕 毅, 潘承恩, 孟令忠, 等. SD 大鼠肝脏及附属管道的应用解剖[J]. 西安医科大学学报, 1998, 19 (1): 70-73.
- [4] 季 榕, 姜 波. B 型超声对脂肪肝诊断指标体系及诊断价值的实验研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2007, 10 (4): 223-225.
- [5] 姚希贤, 南月敏, 王 莹, 等. 高脂高糖、饮酒建立家兔脂肪肝模型及超声量化诊断[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14 (15): 1481-1486.