·基础与实验研究 ·

Impact of iron deposition on liver proton density fat fraction in non-alcoholic steatohepatitis rabbit models

LIU Zhu¹, XIAO Ruhui¹, ZHAO Yanfen¹, ZHANG Zhitao², DU Yong^{1*}

(1.Department of Radiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China;
2.Siemens Digital Medical Technology [Shanghai] Co., Ltd. Chengdu Branch, Chengdu 610095, China)

[Abstract] Objective To establish rabbit non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model, and to observe the impact of iron deposition on liver proton density fat fraction (PDFF). Methods Seventy New Zealand white rabbits were randomly divided into simple high-fat group (group A, n=35) and high-fat combined iron group (group B, n=35), then those in group B were further divided into 7 subgroups (each n=5). NASH models were established through simply feeding with high-fat feed in group A, or combined with injecting iron dextran solution (containing 100 mg/ml iron) 1, 2, 3, 4, 8, 12 and 16 ml, respectively. MRI and pathological examinations were performed, and the correlation between PDFF measured with MRI and fat fraction (FF) measured with pathology was analyzed. **Results** After modeling, the survival rates of rabbits in group A and B was 91.43% and 74.29%, respectively, with modeling time of (7.27±1.01) and (5.07±1.27) weeks, respectively. In group B, with the increase of the iron content injection, the liver signal on MRI gradually decreased, and the gallbladder and large blood vessels became not clear, the goodness of fit scores of 1 and 2 ml subgroups (r= 0.961, 0.893; P=0.039, 0.041). **Conclusion** The increased liver iron deposition could impact the accuracy of MRI measurement of PDFF in rabbit NASH models.

[Keywords] rabbits; non-alcoholic fatty liver disease; adipose tissue; iron; magnetic resonance imaging DOI:10.13929/j.issn. 1672-8475. 2024. 04. 010

铁沉积对非酒精性脂肪性肝炎兔模型肝脏 质子密度脂肪分数的影响

刘 祝¹,肖如辉¹,赵艳芬¹,张治涛²,杜 勇^{1*}

[1.川北医学院附属医院放射科,四川南充 637000;2.西门子数字医疗科技(上海) 有限公司成都分公司,四川成都 610095]

[摘 要] 目的 建立兔非酒精性脂肪性肝炎(NASH)模型,观察铁沉积对肝脏质子密度脂肪分数(PDFF)的影响。 方法 将70只新西兰大白兔随机分为单纯高脂组(A组,n=35)及高脂联合铁剂组(B组,n=35);再将B组分为1、2、 3、4、8、12及16ml共7个亚组,每组5只。对A组以高脂饲料饲养,对B组以高脂饲料饲养并经耳缘静脉注射右旋糖 酐铁溶液(含铁100mg/ml),建立NASH模型;行MRI及病理学检查,观察基于MRI所测PDFF与基于病理所测脂肪 分数(FF)的相关性。结果 建模结束时A、B组兔存活率分别为91.43%和74.29%,建模用时分别为(7.27±1.01) 周和(5.07±1.27)周。B组各亚组中,随注射铁含量增加,MRI显示肝脏信号逐渐减低、胆囊及大血管显示欠清,其中

[[]基金项目]国家临床重点专科建设项目(川卫医政函[2023]87号)。

[[]第一作者]刘祝(1998—),女,贵州仁怀人,在读硕士。研究方向:腹部影像学诊断与CT、MRI介入治疗。E-mail: liuzhu202103@163.com

[[]通信作者] 杜勇,川北医学院附属医院放射科,637000。E-mail: duyong@nsmc.edu.cn

[[]收稿日期] 2024-01-12 [修回日期] 2024-03-01

• 2

1及2ml亚组拟合优度分数均<5%、其余各亚组均≥5%,且仅1及2ml亚组PDFF与FF相关(r=0.961、0.893,P=0.039、0.041)。结论 NASH模型兔肝脏铁沉积增加将影响MRI测量肝脏PDFF的准确性。
[关键词] 兔;非酒精性脂肪肝;脂肪组织;铁;磁共振成像
[中图分类号] R575.1; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-8475(2024)04-0232-05

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是常见慢性肝病,可分为单纯性脂 肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化及肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)^[11]。NASH新药靶点 是当前研究难点^{[21};而铁沉积是加剧NASH进展的重 要因素之一,且不同研究^[3-5]之间针对铁沉积是否影响 测量脂肪含量结果的差异较大。本研究建立兔NASH 模型,以观察铁沉积对MRI检测肝脏脂肪含量的 影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性新西兰大白兔70只,由川 北医学院附属医院动物管理中心提供[许可证号: SYXK(川)2018-076],6月龄,体质量2.5~3.0 kg。 本研究经院动物伦理委员会审查并批准(伦理动物审 [2023]068号)。

1.2 建立模型 将兔随机分为单纯高脂组(A组,n= 35)与高脂联合铁剂组(B组,n=35),再将B组分为1、 2、3、4、8、12及16 ml共7个亚组,每组5只。对A组单 纯以高脂饲料(83%兔繁殖饲料+10%猪油+5%蔗 糖+2%胆固醇)饲养^[6];对B组以高脂饲料饲养,并 经耳缘静脉对各亚组分别注射1、2、3、4、8、12、16 ml 右旋糖酐铁溶液(含铁100 mg/ml),每隔2天注射1 次(1、2、3 ml亚组均为1次注射完毕,4、8、12 ml亚组 每次注射2 ml,16 ml亚组前5次每次注射2 ml、后2次 每次3 ml)。于实验第4、6、8周及第3、4、6、8周分别对 A、B组行MR扫描及肝脏穿刺活检;于末次MR检查 后处死动物取出肝脏进行病理检查。实验期间分笼饲 养,使兔自由采食、饮水;实验房温度(22±2)℃,湿度 40%~60%^[7]。

1.3 MR 扫描 检查前停饲、禁饮 12 h。采用

Siemens Skyra 3.0T 超导型 MR仪。穿刺兔耳缘静脉 并注射3%戊巴比妥钠1ml/kg体质量麻醉兔后,将其 以仰卧位保定于实验台上,以绷带束缚兔上腹,使肝脏 处于8通道膝关节相控阵线圈中心,行T1梯度回波容 积内插屏息评估水脂分离(T1 volume interpolated breath-hold examination evaluation Dixon, T1-Vibe-e-Dixon)、T1梯度回波容积内插屏息定量水脂分离(T1 volume interpolated breath-hold examination quantification Dixon, T1-Vibe-q-Dixon)、T1梯度回波 容积内插屏息脂肪抑制(T1 volume interpolated breath-hold examination fat suppress, T1-Vibe-FS), T2水脂分离(T2-Dixon)及T2半傅里叶采集单次激发 快速自旋回波(T2 half Fourier acquisition single-short turbo spin echo, T2-Haste)序列扫描,参数见表1。

1.4 图像处理 采用MR仪自带Syngo. Via图像后 处理工作站进行图像分析。由2名不知晓实验内容且 具有10年以上工作经验的主治医师基于T1-Vibe-q-Dixon图生成的脂肪分数(fat fraction, FF)图,于分别 显示肝脏最大、最清晰层面及其上、下2层勾画1个约 0.35 cm²的ROI,测量肝脏质子密度FF(proton densityFF,PDFF),取3个层面的平均值作为结果; 根据自动生成的拟合优度分数评估PDFF测值的准确 性:分数<5%表明测量PDFF准确性较高, \geq 5%表 明准确性较低。

1.5 病理组织学检查 每次 MR 扫描结束后,以 Philips 16 排螺旋 CT 机为引导设备,以巴德 20G 穿刺 活检针穿刺肝脏取肝组织条。于末次 MR 检查后处死 兔,剪取 0.5~1.0 cm³肝组织。由 2 名病理医师独立 观察 HE 染色及普鲁士蓝分布情况,测量肝脏 FF。

诊断NASH标准^[1]:①肝细胞脂肪变>5%;②肝 小叶内见炎性细胞浸润;③肝细胞气球样变性。根据

MR序列	TE(ms)	TR(ms)	层厚(mm)	矩阵	带宽(Hz)	FOV(mm)	并行采集(次)
T1-Vibe-e-Dixon	1.25,2.48	4.06	2.0	195 imes 320	1 040	$330 \! imes \! 406$	2
T1-Vibe-q-Dixon	1.49.2.84.4.19.5.54.6.89.8.24	9.95	2.0	111×160	1 080	$157 \! \times \! 180$	2
T1-Vibe-FS	1.51	3.65	2.0	176×320	600	$144\! imes\!210$	2
T2-Dixon	89.00	5 970	3.0	235 imes 384	930	237×330	2
T2-Haste	116.00	1 100	2.0	210 imes 384	723	148×190	2

表1 用于实验兔的MR序列及参数

NASH临床研究网络标准^[8]将脂肪肝分为4级:0级, FF<6.9%;1级,6.9%~16.4%;2级,16.5%~ 23.5%;3级,>23.5%。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 26.0统计分析软件。 以 $x \pm s$ 表示满足正态分布的计量资料,组间行独立样 本 t检验。采用组内相关系数(intra-class correlation coefficient, ICC)评估2名医师测值的一致性,以*ICC*> 0.75为一致性好。以 Pearson 相关性分析评估基于 ME Dixon 所测 PDFF 与基于病理所测 FF 的相关性。 P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立 NASH 兔模型 建模结束时,共58 只兔存活,A、B组存活率分别为91.43%(32/35)和74.29%
(26/35);B组1、2、3、4、8、12及16 ml亚组分别存活4、5、4、4、4、3及2只。A组兔第8周出现脱毛、毛发暗沉、饮食减少等表现,解剖后见其肝脏稍增大、变硬,其中2只见肝脏局部组织溃烂;建模时间为(7.27±1.01)周。B组兔第6周出现消瘦、脱毛、毛发暗沉、反应迟钝等表现,解剖后发现其中3只腹腔积液、2只肝脏与腹膜粘连并呈黑红色;建模时间为(5.07±1.27)周。A、B组并发症差异无统计学意义(P>0.05)。

2.2 MRI 2名医师测量 PDFF 的一致性好(ICC=
0.865)。A组 MRI 均见正常肝实质信号,胆囊及大血管显示清晰,PDFF 为 1.66%~29.43%、平均

(15.98±7.28)%。B组各亚组中,随注射铁含量增加,肝脏MRI信号逐渐减低,胆囊及大血管显示欠清; 1及2ml亚组的铁溶液注射剂量拟合优度分数均< 5%,≥3ml各亚组均≥5%;1及2ml亚组PDFF为 5.67%~22.62%、平均(13.62±6.48)%(其余5个亚 组未统计)。见图1~4。

2.3 病理组织学检查 A组及B组1及2ml亚组光 镜下见肝细胞肿胀变形,体积增大,部分肝细胞脂肪变 性及圆形脂滴伴极少量或少量炎性细胞浸润,肝窦内 无或极少量含铁血黄素沉积;B组其余亚组部分肝组 织被膜明显增厚,肝细胞点状坏死,坏死区及门管区炎 性细胞浸润,极少量或少量纤维组织增生,含铁血黄素 不同程度沉积。A组脂肪肝分级包括0级3只、1级8 只、2级14只、3级7只,FF为2.74%~26.38%、平均 (18.59±6.27)%;B组脂肪肝分级包括0级4只、1级 11只、2级5只、3级6只,FF为4.30%~30.90%、平均 (15.48±8.07)%。见图1~4。

2.4 相关性分析 B组仅1及2ml亚组PDFF与FF 相关(r=0.961、0.893, P=0.039、0.041)。

3 讨论

通过饮食诱导建立 NASH 动物模型成本低但较为耗时^[9]。肝脏铁浓度能反映人体组织内铁含量,大量铁沉积可影响肝脏代谢^[10]。有学者^[11]采用不同浓度 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt, DSS)+高



图1 B组1ml亚组兔 A.T1-Vibe-e-Dixon图; B.FF图示 PDFF=10.27%; C. 拟合优度图示拟合优度分数3.46%; D、E.HE染色(D,×400) 及普鲁士蓝染色(E,×100)病理图示FF=7.44% (圆圈为ROI)



图 2 B组2ml亚组兔 A.T1-Vibe-e-Dixon图; B.FF图示 PDFF=11.29%; C. 拟合优度图示拟合优度分数2.64%; D、E.HE染色(D,×400)及普鲁士蓝染色(E,×100)病理图示FF=16.72% (圆圈为ROI)



图 3 B组3ml亚组兔 A.T1-Vibe-e-Dixon图; B.FF图示 PDFF=6.15%; C.拟合优度图示拟合优度分数14.00%; D、E.HE染色(D,×400) 及普鲁士蓝染色(E,×100)病理图示FF=14.02% (圆圈为ROI)



图 4 B组4ml亚组兔 A.T1-Vibe-e-Dixon图; B.FF图示 PDFF=22.62%; C.拟合优度图示拟合优度分数 33.63%; D、E.HE 染色(D,×400)及普鲁士蓝染色(E,×100)病理图示 FF=30.90% (圆圈为 ROI)

脂饮食建立小鼠NASH模型,发现2.5% DSS可加速 高脂诱导NASH,造模时间约为2周,但仅适用于研究 肠道疾病所致NASH。另有学者^[12]分析地塞米松、四 环素、含丙基硫氧嘧啶和脱氧胆酸钠的高脂乳剂(硫氧 胆酸乳)用于建立小鼠NASH模型的价值,结果显示 地塞米松联合硫氧胆酸乳为最佳方法,但未提及造模 时间,且小鼠存在并发症严重,如高胆固醇血症等。贾 宏茹等^[13]建立肝脏铁过载模型,成功率为77.78% (49/63)。本研究通过高脂饲料饲养及静脉注射右旋 糖酐铁溶液建立NASH模型,造模时间最短为4周,且 所获模型兔适用于大部分NASH研究。本研究造模 结束后解剖发现A组2只兔肝脏局部组织溃烂,病理 提示肝包膜增厚;B组3只腹腔积液、2只肝脏与腹膜 粘连且呈黑红色,可能为NASH进展导致肝硬化并发 症所致。

既往部分研究^[14-16]认为ME Dixon 定量肝脏脂肪 含量不受铁沉积影响;但也有研究^[5]发现肝纤维化和 铁沉积均可影响肝脏脂肪含量;存在差异的原因可能 在于样本量过小或铁沉积程度不同。本研究将 B 组兔 按照铁沉积递增顺序分为7个亚组,发现仅1及2 ml亚 组铁溶液注射剂量拟合优度分数<5%,而其余≥3 ml 各亚组均≥5%,故仅针对 B 组 1、2 ml 亚组进行分析; 结果显示1及2 ml 亚组 PDFF 为 5.67%~22.62%,且 均与FF 呈正相关,提示仅1及2 ml 亚组 MRI 所测脂肪 含量不受铁沉积影响,而其余5个亚组MRI所测脂肪 含量均受铁沉积影响。

综上,本研究结果显示,NASH兔模型肝脏铁沉 积≥300 mg将影响MRI所测肝脏PDFF的准确性;但 本研究样本量过小,有待后续进一步观察。

利益冲突:全体作者声明无利益冲突。

作者贡献:刘祝研究设计和实施、撰写和修改文 章;肖如辉研究设计、查阅文献;赵艳芬研究实施、图 像分析;张治涛数据分析;杜勇经费支持、审阅文章。

[参考文献]

- [1] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会 脂肪性肝病专家委员会.非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018更 新版)[J].传染病信息,2018,31(5):393-402,420.
- [2] 李国超,于嫚,李晓菲,等.非酒精性脂肪性肝炎治疗靶点和靶向 药物研发进展[J].河北工业科技,2023,40(3):225-234.
- [3] LV S, JIANG S, LIU S, et al. Noninvasive quantitative detection methods of liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Transl Hepatol, 2018,6(2):217-221.
- [4] HU F, YANG R, HUANG Z, et al. 3D multi-echo Dixon technique for simultaneous assessment of liver steatosis and iron overload in patients with chronic liver diseases: A feasibility study [J]. Quant Imaging Med Surg, 2019,9(6):1014-1024.
- [5] FRIEDRICH-RUST M, MÜLLER C, WINCKLER A, et al. Assessment of liver fibrosis and steatosis in PBC with FibroScan, MRI, MR-spectroscopy, and serum markers [J]. J Clin

Gastroenterol, 2010, 44(1):58-65.

- [6] 赵凡玉,周婷,黄江,等.MR定量技术评估伴纤维化非酒精性脂肪性肝病的研究[J].中国医学影像学杂志,2022,30(2):100-105.
- [7] LIB, FENG G L, FENG L, et al. Establishment of a rabbit liver metastasis model by percutaneous puncture of the spleen and implantation of the VX2 tumor strain under CT guidance [J]. Sci Rep, 2023,13(1):2802.
- [8] TANG A, DESAI A, HAMILTON G, et al. Accuracy of MR imaging-estimated proton density fat fraction for classification of dichotomized histologic steatosis grades in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Radiology, 2015,274(2):416-425.
- [9] ALSAQAL S, HOCKINGS P, AHLSTRÖM H, et al. The combination of MR elastography and proton density fat fraction improves diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. J Magn Reson Imaging, 2022, 56(2):368-379.
- [10] 许霄,黄求理,朱雪君,等.双能CT不同能量组合、重建算法及 ROI选择对家兔肝铁定量测量的影响[J].放射学实践,2018,33 (4):344-348.

- [11] 万小雨,曾俊豪,张婉怡,等.非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型的建 立[J].中国免疫学杂志,2020,36(16):1925-1930.
- [12] 谭婉莹,王淳,周翠香,等.复合因素致非酒精性脂肪性肝炎动物模型建立研究[J].中药药理与临床,2023,39(3):82-87.
- [13] 贾宏茹,王笑笑,胡景卉,等.MR超短回波序列在肝铁和脂肪过 载情况下定量分析肝铁浓度的实验研究[J].放射学实践,2022, 37(8):928-933.
- [14] GRĄT K, GRĄT M, ROWIŃSKI O. Usefulness of different imaging modalities in evaluation of patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Biomedicines, 2020,8(9):298.
- [15] DI MARTION M, PACIFICO L, BEZZI M, et al. Comparison of magnetic resonance spectroscopy, proton density fat fraction and histological analysis in the quantification of liver steatosis in children and adolescents [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22 (39):8812-8819.
- ZHAN C, OLSEN S, ZHANG H C, et al. Detection of hepatic steatosis and iron content at 3 Tesla: Comparison of two-point Dixon, quantitative multi-echo Dixon, and MR spectroscopy[J]. Abdom Radiol (NY), 2019,44(9):3040-3048.

中国学术期刊影响因子年报(2023版) ——《中国介入影像与治疗学》

"中国学术期刊影响因子年报(2023版)"于2023年11月由中国科学文献计量评价研究中心发布。《中国介入 影像与治疗学》杂志在复合类的相关数据为:

- 1 影响力指数(CI值):528.174;
- 2 总被引:1410;
- 3 影响因子:1.185;
- 4 他引影响因子:1.01;
- 5 5年影响因子:1.024;
- 6 即年指标:0.143。