

# 轻中度肝纤维化大鼠肝脏 3.0 T MR 表观扩散系数与基质金属蛋白酶-1 表达的相关性研究

范 龙<sup>1</sup>,王松海<sup>2</sup>,邱丽莉<sup>1</sup>,罗毓媛<sup>2</sup>,张凯航<sup>2</sup>

(1.海南医学院第二附属医院 放射科,海南 海口 570311; 2.海口市中医医院 放射科)

**摘要:**目的:探讨轻度-中度肝纤维化大鼠肝脏ADC值与MMP-1的表达趋势。方法:采用肝纤维化大鼠模型。造模开始一个月后每周随机抽取大鼠行磁共振检查,DWI检查取 $b$ 值=800s/mm<sup>2</sup>,通过后处理计算ADC值。MR检查后处死大鼠灌注固定,行HE、Masson三色染色、网状纤维染色,RT-PCR检测MMP-1 mRNA表达。结果:模型组中轻度肝纤维化大鼠11只,中度肝纤维化大鼠15只,对照组8只。DWI检查结果及分子生物学检查结果显示三组大鼠肝脏ADC值及MMP-1 mRNA比较 $P$ 值<0.05,其中中度肝纤维化组与对照组及轻度肝纤维化组比较 $P$ 值<0.05,余无差异。秩相关分析显示大鼠肝脏ADC值与相近感兴趣区肝组织MMP-1 mRNA表达( $r=0.64, P<0.05$ )。结论:轻度肝纤维化向中度肝纤维化过渡中,大鼠肝脏ADC值及MMP-1 mRNA表达均有降低趋势且提示呈正相关。

**关键词:**肝纤维化;大鼠;基质金属蛋白酶-1;表观扩散系数

**中图分类号:** R575.5

**文献标识码:** B

**文章编号:** 2095-512X(2020)06-0591-04

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)<sup>[1-2]</sup>的逐渐沉积是导致肝纤维化进展的重要途径,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)可特异性降解ECM。MMPs家族中基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)广泛存在于人体中<sup>[1,2]</sup>,被肝细胞、枯否氏细胞等分泌,是组织肝纤维化进展的主要蛋白酶<sup>[3,4]</sup>。MMP-1在肝组织中的表达也可以客观反映肝纤维化病理程度。

美国肝脏疾病研究协会指南上<sup>[5]</sup>提出F2期肝纤维化对临床治疗选择上具有重要的意义。Ronot<sup>[6]</sup>等研究结果也支持中度肝纤维化是影响慢性肝病预后的重要一步。MRI-DWI目前已经是较成熟的功能成像技术<sup>[7-10]</sup>,ADC值可在体量化评估肝纤维化,在分子生物学评估研究中具有一定的前景。本研究旨在研究轻中度肝纤维化肝脏ADC值变化与MMP-1 mRNA的表达相关性,为下一步MMP-1基因沉默干扰肝纤维化提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型建立

实验大鼠来源于海南省实验动物中心,采用随机抽样法分为模型组和对照组。本研究中大鼠模型组总共32只,体质量165~206g,造模采用腹腔注射猪血清(市场购买猪血、离心取血清)法<sup>[7]</sup>,剂量0.5mL/次,每周2次,食物亦购自海南医学院医学动物实验中心,常规自来水饮用。

### 1.2 MRI-DWI及后处理计算ADC值

MR检查使用西门子3.0 T磁共振机(德国),专业实验动物线圈,后处理软件[Function Tool(GE AW 4.4)]。技术扫描方案及参数参考战跃福<sup>[7]</sup>等研究:扫描前6h禁止饮食、饮水,采用戊巴比妥钠(1%)1.0 mL/100 g体质量腹腔注射麻醉。为防止过度呼吸运动及检查室温度过低采用自制棉带腹部加压固定,体位采用俯卧位,并调整肝脏位于线圈中心。MRI-DWI检查 $b$ 值=800 s/mm<sup>2</sup>,SE-EPI序列加脂肪抑制。扫描参数参考战跃福等<sup>[7]</sup>研究:TR=3000 ms,TE=75.6 ms,层间距=0 mm,层厚=3.0 mm, NEX=8,FOV=100mmX100mm,矩阵=192×192。专配后处理工作站,取肝脏3个感兴趣区取平均值<sup>[7]</sup>,距离肝包膜应>1.0cm,尽量避开肝内胆管、肝脏血管等干扰。

收稿日期:2020-06-13;修回日期:2020-11-01

基金项目:海南省自然科学基金(817390)

作者简介:范龙(1980-),男,海南医学院第二附属医院放射科主治医师。

通讯作者:王松海,副主任医师,硕士研究生导师,E-mail:18907539957@163.com 海口市中医医院放射科,570216

1.3 肝脏组织病理学检查(HE、Masson 三色染色、网状纤维染色)

影像学检查完成后过量麻醉剂处死大鼠,采用4%多聚甲醛左心灌注固定以排除血液对组织学标本的影响。尽量选择影像肝脏感兴趣区靶标本取材,病理学检查。病理结果判读由病理科两位高年资主治医师以上判读结果。根据中华医学会共识<sup>[1]</sup>。因为共识<sup>[1]</sup>中更加注重显著肝纤维化的临床意义(METAVIR≥S2 或 Ishak≥S3 定义为显著纤维化),因此本研究将S1 期归为轻度肝纤维化组,S2、S3期归为中度肝纤维化组,

1.4 MMP-1 mRNA 检测

根据解剖学定位选取与肝脏 DWI 成像 ROI 相同区域肝脏组织进行 Real time PCR 检测。按总 RNA 试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)说明书提取肝脏总 RNA。MMP-1、G3PDH Real Time-PCR 扩增引物(上海生工合成)根据 Okamoto<sup>[12]</sup>、Wasser<sup>[13]</sup>设计。MMP-1, forward primer: (5' -TCG TGA GAA TGT CTT CCC ATT-3'), reverse primer: (5' - TCTTGATTG ATTTGAGATAAGTGAAATC-3'); G3PDH forward primer: 5' CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATGG -3', reverse primer: 5' - CAT

GGT GGT GAA GAC GCC AG -3'。Real-time-PCR 根据 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0、SYBR Premix Ex Taq II 说明书进行检测肝脏组织 MMP-1 表达。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件包,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。统计学方法采用单因素方差分析、SNK 法、Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 大鼠肝纤维化模型的建立及病理组织学检查

模型组大鼠 32 只中,图像不符合分析要求 2 只,最终符合轻度肝纤维化组 11 只,中度肝纤维化组 15 只。对照组 8 只大鼠均完成 DWI 检查。

HE 染色:S1 期肝纤维化汇管区可见纤维增生(见图 3A),到中度肝纤维化则可出现桥接纤维化(见图 4A);Masson 三色染色:S1 期肝纤维化胶原纤维可见染色(图 3B),到中度肝纤维化组蓝染则增多(见图 4B)。网状纤维染色:S1 期肝纤维化可见黑褐色染色(见图 3C),到中度肝纤维化组黑褐色染色明显增厚,并可出现小叶内瘢痕(见图 4C)。

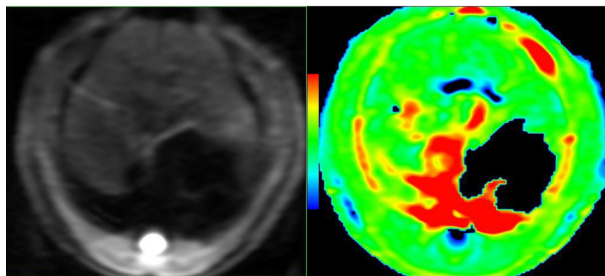


图1 肝纤维化S1期,DWI及ADC图,ADC值为  $1.95 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$

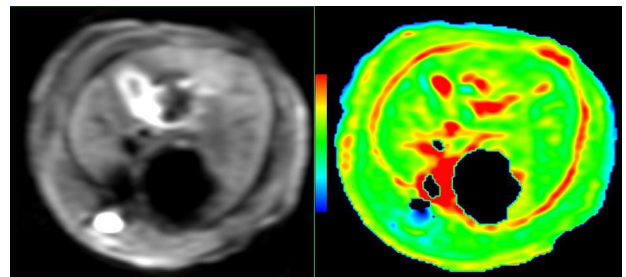
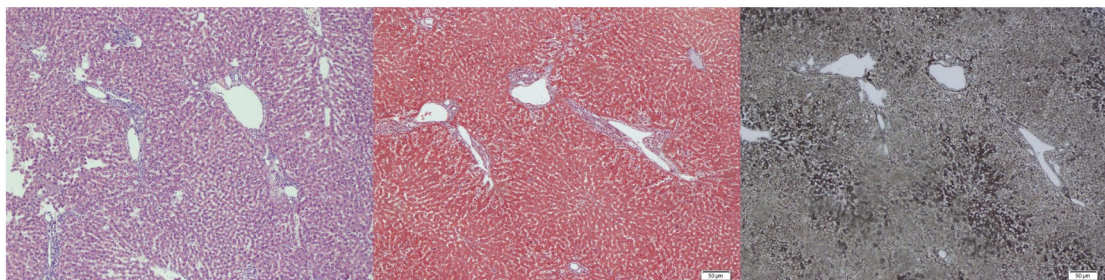


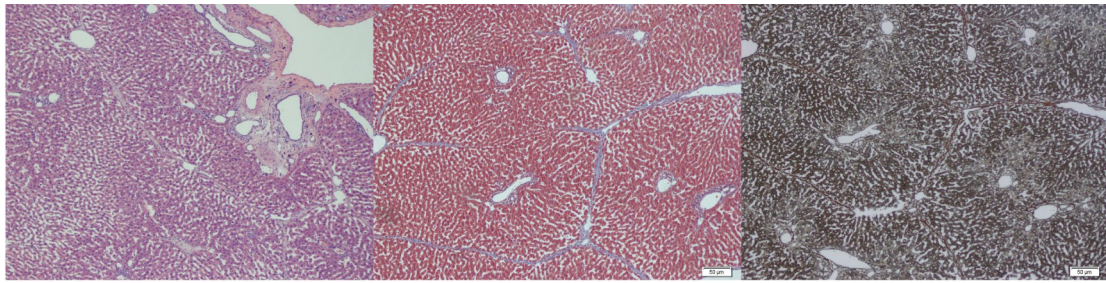
图2 肝纤维化S2期,DWI及ADC图,ADC值为  $1.24 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$



图A.HE可见个别汇管区少量纤维化(HE × 100);图B.Masson 三色染色可见少许蓝染的纤维组织(Masson × 100);图C.网状纤维染色可见少许黑褐色网状纤维增生(网状纤维染色×100)。

图3 肝纤维化S1期:小于50%汇管区轻度纤维化





图A.HE可见桥接纤维化,纤维带纤细,小叶结构尚可辨(HE × 100);图B.Masson三色染色可见蓝染的纤维组织,小叶内瘢痕(Masson × 100);图C.网状纤维染色可见网状纤维增厚呈黑褐色,并可见小叶内瘢痕(网状纤维染色x100)。

图4 肝纤维化S2期:70%汇管区纤维化,约50%为桥接纤维化

2.2 影像学及分子生物学结果(见表1)

表1 三组大鼠肝脏ADC值及MMP-1 mRNA相对表达量

肝纤维化	动物数(只)	ADC值(×10 <sup>-3</sup> mm <sup>2</sup> /s)		MMP-1 mRNA (MMP-1/G3PDH)
		b=800 mm <sup>2</sup> /s		
对照组	8	1.72 ± 0.58		0.21 ± 0.09
轻度肝纤维化组(S1期)	11	1.54 ± 0.62		0.18 ± 0.11
中度肝纤维化组(S2,S3期)	15	1.27 ± 0.35		0.11 ± 0.09
F值		38.66		41.72
P值		0.033		0.041

表1 与对照组比较, P<0.05;与轻度肝纤维化组相比较, P<0.05。

2.3 三组大鼠肝脏ADC值及MMP-1 mRNA表达相关性

对照组、轻-中度肝纤维化组大鼠肝脏ADC值与MMP-1 mRNA表达Pearson相关系数为0.64(P<0.05),结果提示呈正相关。

3 讨论

3.1 肝纤维化分组及模型的选择及意义

美国肝脏疾病指南上<sup>[5]</sup>也指出肝纤维化F2期被认为具有重要的临床意义;国外学者Ronot<sup>[6]</sup>等认为中度肝纤维化是慢性肝病诊断和治疗的重要阶段。因此本研究根据指南及学者的研究<sup>[5,6]</sup>选择轻-中度肝纤维化组的功能影像及分子生物学研究更具有临床价值。本文采用的是免疫法猪血清腹腔注射造模,其肝纤维化形成过程虽然较长,但确是研究肝纤维化转归较可靠的模型<sup>[7,14,15]</sup>,为下一步MMP-1基因沉默干扰肝纤维化提供实验基础。

3.2 影像学评估肝纤维化-肝硬化

目前超声弹性成像虽已经写进肝纤维化评估指南中,是目前比较可靠的影像学评估方法,但对操作者仍具有一定的要求,且普及并不是太广,对

基层医院推广价值仍有一定限制;CT灌注成像评估参数较多,评估价值也比较显著,临床应用前景也非常广泛,但辐射剂量仍是制约其全面推广的主要原因;磁共振功能成像,如DWI, MRS, PWI, BOLD等多种影像技术方法,其中DWI应用最为广泛且最具有前景。ADC值虽已广泛应用于肝纤维化的研究<sup>[7-10]</sup>,且b值选取800 s/mm<sup>2</sup>普遍认为图像质量清晰,评估能力最佳,但对于早中期肝纤维化的诊断价值尚有一定争议。

3.3 MMP-1 mRNA表达在轻中度肝纤维化中的意义及ADC值反映MMP-1表达的能力

本文研究结果轻-中度肝纤维化MMP-1 mRNA表达呈下降趋势,MMP-1广泛存在于肝脏中,被肝细胞、枯否氏细胞等分泌,由轻度肝纤维化进展为中度肝纤维化,肝脏炎性反映加重,MMP-1必然亦随之减少<sup>[3,4]</sup>,因而MMP-1在肝组织中的表达水平可以真实反映肝纤维化程度。本文研究结果显示轻度肝纤维化进展为中度肝纤维化,大鼠肝脏DWI-ADC值同病理分期表达相一致,且同国内外学者研究一致<sup>[7-10,15]</sup>,ADC降低有统计学意义,是由于I、III型胶原纤维的增加,导致水分子弥散受限所致。

战跃福<sup>[7]</sup>研究结果提示 ADC 值不能区分 S1 与 S2 期、S2 与 S3 期,国内范国华<sup>[8]</sup>研究结果也提示 ADC 值不能区分 S2 与 S3 期;有学者指出原因可能由于存在部分病例病理分期上的重叠;综上所述 ADC 值在评估肝纤维化精度上确实存在较多的影响因素,仍有待进一步研究。本研究结果显示 S1 期与 S2、S3 期间肝脏 ADC 值及 MMP-1 mRNA 表达均具有统计学意义,虽然轻-中度组间仍有一部分病理分期存在重叠,但较战跃福<sup>[7]</sup>、范国华<sup>[8]</sup>等研究在分组上更具有临床探讨价值。

### 3.4 研究不足及展望

第一本研究结果提示轻-中度肝纤维化大鼠肝脏 ADC 值与 MMP-1 表达呈正相关,但关于两者是否具有相关性,需要下一步通过反义抑制 MMP-1 表达,再深入探讨两者之间的关系。第二难以精准实现影像上感兴趣区选择与组织病理学标本的完美对照,下一步拟引进计算机信息学图像分割方法予以解决。

### 参考文献

- [1] Berg G, Barchuk M, Miksztoiwicz V. Behavior of Metalloproteinases in Adipose Tissue, Liver and Arterial Wall: An Update of Extracellular Matrix Remodeling[J]. Cells. 2019; 8(2): pii: E158. PMID:30769840
- [2] Duarte S, Baber J, Fujii T, et al. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis[J]. Matrix Biol. 2015; 44(46): 147-56
- [3] Liu T, Wang P, Cong M, et al. Matrix metalloproteinase-1 induction by diethylthiocarbamate is regulated via Akt and ERK/miR222/ETS-1 pathways in hepatic stellate cells[J]. Biosci Rep. 2016; 36(4): 15-17
- [4] Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E. Mechanisms of fibrinolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs) [J]. Z Gastroenterol, 2007; 45(1): 25-33
- [5] Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update[J]. Hepatology. 2009; 49(4):1335-74
- [6] Ronot M, Asselah T, Paradis V, et al. liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection: differentiating minimal from intermediate fibrosis with perfusion CT[J]. Radiology. 2010; 256(1):135-42
- [7] 战跃福, 梁贤文, 韩向君, 等. 大鼠肝纤维化基质金属蛋白酶抑制剂-1 mRNA 表达与弥散加权成像表观扩散系数的相关性[J]. 中南大学学报(医学版), 2017; 42(2): 161-167
- [8] 范国华, 龚建平, 沈钧, 等. MR 扩散加权成像在大鼠肝纤维化诊断中的价值, 中华放射学杂志. 2013; 47(2):172-177
- [9] Yang L, Rao S, Wang W, et al. Staging liver fibrosis with DWI: is there an added value for diffusion kurtosis imaging? Eur Radiol. 2018; 28(7):3041-3049
- [10] Verloh N, Utpatel K, Haimerl M, et al. DWI - histology: a possible means of determining degree of liver fibrosis? Oncotarget. 2018; 9(28):20112-20118
- [11] 中华医学会肝病学会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 肝纤维化诊断及治疗共识(2019年), 实用肝脏病杂志, 2019; 22(6): 793-803
- [12] Okamoto K, Mimura K, Murawaki Y, et al. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. J Gastroenterol Hepatol. 2005; 20(7):1102-1108
- [13] Wasser S, Ho JM, Ang HK, et al. Salvia miltiorrhiza reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. J Hepatol. 1998; 29(5):760-71
- [14] 王宝恩, 王志富, 殷蔚黄, 等. 实验性免疫性肝纤维化模型的研究. 中华医学杂志. 1989; 69(9):503-505
- [15] 路洪剑, 战跃福, 李群, 等. 3.0 T MRI 表观扩散系数诊断中度肝纤维化价值的实验研究, 中国现代医学杂志, 2017; 27(19): 17-21

(上接第 585 页)

- [13] Ania C, Muntau, Marcel du Moulin, Francois Feillet. Diagnostic and therapeutic recommendations for the treatment of hyperphenylalaninemia in patients 0-4 years of age[J]. Orphanet J Rare Dis, 2018; 13: 173
- [14] Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism[J].

Orphanet J Rare Dis, 2010; 5: 17

- [15] Zdraveska N, Anastasovska V, Kocova M. Frequency of thyroid status monitoring in the first year of life and predictors for more frequent monitoring in infants with congenital hypothyroidism [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2016; 29(7): 795-800