

安徽医科大学

硕士学位论文

论文题目 **超声造影与血清学指标评价肝纤维化程度的
临床应用价值**

**Clinical application value of evaluation liver fibrosis stage by
contrast enhanced ultrasound and serum fibrotic markers**

作者姓名 詹韵韵

指导老师 张新书

学科、专业 影像医学与核医学

研究方向 超声造影

论文工作时间 2010年9月至2012年5月

学位论文独创性声明

本人所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示谢意。

学位论文作者签名：

日期：

学位论文使用授权声明

本人完全了解安徽医科大学有关保留、使用学位论文的规定：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。愿意将本人的学位论文提交《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》和《中国学位论文全文数据库》中全文发表，并可以以电子、网络及其他数字媒体形式公开出版，并同意编入 CNKI《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名：

导师签名：

日期：

日期：

目 录

英文缩略词表	1
中文摘要	2
英文摘要	4
引言	6
材料与amp;方法	8
结果	10
结 论	19
讨 论	20
展 望	31
参考文献	33
附录	37
致谢	38
综述及参考文献	39

英文缩略词表

CPS	contrast pulse sequence	对比脉冲序列
HAAT	hepatic artery arrival time	肝动脉到达时间
PVAT	portal vein arrival time	门静脉到达时间
HVAT	hepatic vein arrival time	肝静脉到达时间
HCC	hepatocellular carcinoma	原发性肝癌
LSEC	liver sinusoidal endothelial cells	肝窦内皮细胞
HSC	hepatic stellate cells	肝星状细胞
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
CDFI	Color Doppler Flow Imaging	彩色多普勒
PWD	Pulsed-wave Doppler	频谱多普勒
CEUS	contrast-enhanced ultrasound	超声造影技术
MI	mechanical index	机械指数
UCA	ultrasound contrast agent	超声造影剂
FNH	focal nodule hyperplasia	局灶性结节样增生
FS	fibroscan	单维瞬变弹性图
VTQ	virtual touch tissue quantification	声触诊组织量化技术
ARFI	acoustic radiation force impulse imaging	声辐射力脉冲成像
SPIO	superparamagnetic iron oxide	超顺磁性氧化铁
DC~MRI	double-contrast MRI	双对比增强磁共振成像
EPI	echo-planar imaging	快速平面回波成像
ADC	apparent diffusion coefficient	表观弥散系数

超声造影与血清学指标评价肝纤维化程度的 临床应用价值

中文摘要

目的 以肝脏穿刺组织病理学结果为分组标准，经肘静脉注射超声造影剂声诺维（Sonovue）研究不同程度的肝纤维化患者的肝脏血流显像特征，同时观察患者肝纤维化血清学指标的变化，探讨两者在评价慢性乙型肝炎肝纤维化程度中的临床应用价值，筛选与肝纤维化程度密切相关的评估参数。

方法 选择 38 例慢性乙型肝炎患者及 8 例健康对照人群行肝脏二维超声及彩色多普勒超声检查，而后将探头变换至造影模式，开启对比脉冲序列（contrast pulse sequence CPS）成像系统。经肘静脉团注（3~5s）造影剂 Sonovue 2.4ml，从注射造影剂即刻开始启动超声诊断仪的内置计时器计时，实时不间断的观察肝动脉、门静脉与肝静脉的血流信号，动态图像以 AVI 格式存储在超声诊断仪相连接的计算机中。以肝动脉、门静脉、肝静脉血管腔内开始出现造影剂微泡的时间记录为造影剂到达时间。实验结束后由两名经验丰富的超声诊断医生独立回放动态录像得出造影剂到达肝动脉时间（hepatic artery arrival time HAAT），到达门静脉时间（portal vein arrival time PVAT），到达肝静脉时间（hepatic vein arrival time HVAT），计算造影剂达到肝动脉-静脉时间之差即肝动脉-静脉渡越时间（VAT），肝-门静脉到达时间之差即肝-门静脉渡越时间（VVT），后取平均值做为最终实验数据。同日清晨采集上述患者及健康对照人群的空腹静脉血液 5ml，用化学发光法测定透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN）、III 型胶原前肽（PIIINP）、IV 型胶原（IVC）的血清学水平。超声造影与血清学检查均于肝脏穿刺活检后第二日进行。以肝脏穿刺组织病理学结果为分组标准，观察不同程度的肝纤维化患者的 HAAT、PVAT、HVAT、VAT、VVT 及上述肝纤维化四项血清学指标的变化趋势。

结果 不同程度肝纤维化患者的 HAAT、PVAT 比较差异无统计学意义。HVAT、VAT、VVT 随着肝纤维化程度的加重而缩短 ($P < 0.05$), HVAT、VAT、VVT 与肝纤维化程度均呈负相关 ($P < 0.01$), 且 VVT 相关性最高 ($r = -0.88$)。不同程度肝纤维化患者的 PIIIINP 比较差异无统计学意义。HA、LN、IVC 随着肝纤维化程度的加重而升高 ($P < 0.05$), HA、LN、IVC 与肝纤维化程度均呈正相关 ($P < 0.01$), 且 HA 相关性最高 ($r = 0.54$)。

结论 (1) 经肘静脉团注造影剂后应用 CPS 成像系统可以评估肝纤维化的严重程度。(2) 肝纤维化血清学指标: 透明质酸 (HA)、IV 型胶原 (IVC)、层粘连蛋白 (LN) 可指导肝纤维化程度的分级。(3) 超声造影检查与肝纤维化四项血清学指标可用于评估肝纤维化严重程度。超声造影指标较血清学指标而言, 其与肝纤维化程度关系更为密切, 可以更准确地指导临床制定适宜的治疗方案、动态评估患者的病情变化及判断慢性肝病患者的预后。

关键词 超声检查 造影剂 血清学指标 肝纤维化

Clinical application value of evaluation liver fibrosis stage by contrast enhanced ultrasound and serum fibrotic markers

Abstract

Objective According to the liver histopathology, to study liver blood flow imaging after intradermal injection of microbubbles and the serum fibrotic markers of patients with liver fibrosis, to investigate the clinical application value of evaluating the liver fibrosis by them and to filter the close parameters.

Methods The study included 38 patients with chronic hepatitis B and 8 healthy controls. After two-dimensional and color Doppler ultrasonography, bolus of ultrasound contrast agent was injected through cubital under the mode of contrast pulse sequence imaging. Meanwhile built-in timer of the ultrasonic diagnostic apparatus was started. The blood flow imaging of hepatic artery, portal vein, hepatic vein were observed real-time and uninterrupted. The dynamic image was stored in the computer connected with the ultrasonic diagnostic apparatus. The appearance of ultrasound contrast agent in the lumen was the ultrasound contrast agent arrival time. Two experienced ultrasound doctor played back the dynamic image independently after study. The hepatic artery arrival time (HAAT), portal vein arrival time (PVAT), hepatic vein arrival time (HVAT) were recorded. The interval time between hepatic artery arrival time and hepatic vein arrival time (VAT) and the interval time between portal vein arrival time and hepatic vein arrival time (VVT) were calculated. The last experimental data was average value. In the morning of the same day, the patients and healthy controls were drawn off fasting vein blood. The serum levels of HA, LN, PIIINP, IVC were determined by chemiluminescence. The contrast-enhanced ultrasound and serological tests were done on the next day after liver biopsy. According to the liver histopathology, the changes of HAAT, PVAT,

HVAT, VAT, VVT and serum fibrotic markers were observed.

Results The HAAT and PVAT showed no correlation with the stage of liver fibrosis. The HVAT, VAT, VVT decreased as the increase of liver fibrosis ($P < 0.05$). HVAT, VAT, VVT correlated negatively with the development of fibrosis ($P < 0.01$). The correlation coefficient of VVT was highest ($r = -0.88$). The PIIINP showed no correlation with the stage of liver fibrosis. The HA, LN, CIV increased as the increase of liver fibrosis ($P < 0.05$). HA, LN, CIV correlated just with the development of fibrosis ($P < 0.01$). The correlation coefficient of HA was highest ($r = 0.54$).

Conclusion (1) The stage of liver fibrosis can be evaluated by contrast pluse sequence imaging with contrast agent.(2) HA, IVC, LN are able to assess the liver fibrosis.(3)The contrast-enhanced ultrasound and HA, IVC, LN can evaluate the stage of liver fibrosis. The contrast-enhanced ultrasound is closer with the stage of liver fibrosis than the serum fibrotic makers .The contrast-enhanced ultrasound can guid the doctor to draft treatment, evaluate changes in condition and judge the prognosis more accurately than the serum fibrotic markers.

Key Words Ultrasound/Contrast agent/Serum fibrotic markers/Liver fibrosis

超声造影与血清学指标评价肝纤维化程度的 临床应用价值

1 引言

肝纤维化是慢性肝病的一个中间、可逆环节，早期诊断及治疗可以逆转这一病变过程，若不能得到及早的诊断和治疗，可进一步发展成为肝硬化，转为不可逆的过程。我国是慢性肝病的高发地区，预计目前现有乙型肝炎病毒感染者 1.3 亿以上，此种情况严重威胁着国民的身体健康^[1]。慢性肝病病情迁延反复，可逐步发展为肝硬化，甚至癌变。而原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma HCC) 是常见的恶性肿瘤之一，发病率居恶性肿瘤第三位，占全球死亡数的 45%。近年来，肝硬化和 HCC 的发病率和死亡率均呈现上升趋势，发病年龄也趋于年轻化，使得广大人民群众的生命健康受到严重的威胁。

肝脏循环有两大特征：(1)肝动脉与门静脉两大供血系统，正常情况下肝动脉提供的血流量约 25%，门静脉约 75%，(2)人体内唯一缺乏基底膜结构的毛细血管-肝窦为其独有的结构特征。良好的肝内循环能够保证肝细胞从外界获得充足的养分，并且带走代谢废弃物，维持正常的肝功能。肝脏的细胞是由实质细胞和非实质细胞组成，其中实质细胞（即肝细胞）占肝脏内细胞总数 80%，其余 20%为非实质细胞，主要包括肝窦内皮细胞、星状细胞、库普弗细胞、树突状细胞和淋巴细胞。这些细胞具有不同的结构和功能以及分化来源，连同肝细胞一起共同调节着局部和全身的免疫功能。肝窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cells LSEC) 是肝脏非实质细胞的主要细胞群，约占 50%。在生理条件下，由 LSEC 所构成的肝窦是人体内唯一缺乏基底膜结构的毛细血管。LSEC 有许多窗孔，除了血细胞外，血浆成分均可由此透过进入 Disse 间隙，从而进行物质交换和免疫应答。肝星状细胞 (hepatic stellate cells HSC) 又称储脂细胞、Ito 细胞、维生素 A 存储细胞，是肝脏非实质细胞之一，位于肝细胞与 LSEC 的间隙内^[2]，是细胞外基质 (extracellular matrix ECM) 的主要来源。

肝纤维化的主要发生机理是 ECM 过度增多和异常沉积^[3]。肝纤维化时, HSC 被激活并发生细胞表型的改变, 成为肌纤维母细胞, 其合成和分泌大量 ECM, 而降解减少, 平衡失调。在肝纤维化时肝星状细胞合成大量层粘连蛋白 (LN), 其与 IV 型胶原 (IVC) 共同维持肝窦的基底膜, 使得肝窦内皮细胞失去筛孔, 肝窦毛细血管化, 这一变化既妨碍了肝细胞与肝窦之间的物质交换同时产生了门静脉高压。肝纤维化时, 为了代偿, 肝脏常发生以下血流动力学的改变: ①肝内动脉、门静脉、肝静脉之间出现短路分流; ② 肝内血管动脉化; ③患者出现肺动-静脉瘘; ④患者心输出量增加及体循环阻力下降。

目前诊断肝纤维化程度的方法主要包括肝脏穿刺组织病理学活检、影像学诊断、血清学检查及临床诊断。肝脏穿刺组织病理学活检仍然是诊断肝纤维化程度的“金标准”, 其可以准确判断肝纤维化的程度及肝炎的炎症活动程度, 指导临床制定适宜的治疗方案及准确地评估患者的预后。然而肝脏穿刺活检取材部位较局限, 只能反映穿刺部位的肝组织病变, 不能够精准地反映肝脏整体情况。对于有如重度黄疸、凝血功能障碍等穿刺禁忌症的患者不宜采用肝脏穿刺活检术。同时作为一种有创性检查, 肝脏穿刺活检术会造成出血等并发症, 具有一定的风险性, 无法重复操作来动态评估肝纤维化的程度。

肝脏实质背景加之超声检查的无创、简便、经济等特点, 使得超声检查一直以来是肝脏疾病的首选检查方法。普通二维灰阶超声可以通过观察肝脏形态、肝包膜、肝边缘角、肝脏实质的回声及肝静脉等直接指标与胆囊壁、脾脏等间接指标, 给予肝纤维化患者定性诊断。但是由于缺少定量指标, 普通二维灰阶超声所提供的信息总体上的敏感性和特异性还是不能令人十分满意。应用彩色多普勒 (Color Doppler Flow Imaging CDFI) 和频谱多普勒 (Pulsed-wave Doppler PWD) 超声检查可观察到器官在不同时相的血流速度变化, 把这些信息与相关的二维超声解剖结构信息结合即可判断被检组织器官的病变情况。通过 CDFI 和 PWD 观察包括门静脉、脾静脉、肝静脉内径及相应血管内的血流速度^[4]等参数可以诊断肝纤维化, 但是这些参数容易受到多种因素的影响, 其诊断价值也有限。

超声造影技术 (contrast-enhanced ultrasound, CEUS) 是近年来医学领域中发展比

较迅速的技术之一，目前成熟地应用于肝脏局灶性病变的诊断中，在心脏、前列腺及其他脏器中的应用也越来越广泛。超声造影剂的研究经历了逐步完善的阶段，造影效果逐步提高，造影剂安全性能也逐步提高。近来，越来越多的学者致力于运用超声造影评估肝脏血流动力学情况，在诊断肝硬化方面已取得一定成就^[5]。但对于肝纤维化还缺乏系统性研究。本文旨在探讨CEUS及血清学指标评价慢性乙型肝炎肝纤维化程度中的临床应用价值，筛选与肝纤维化程度密切相关的评估参数。

2 材料与方法

2.1 病例资料

收集2011年3月至2011年10月在我院已行肝脏穿刺活检的慢性乙型肝炎患者38例及乙型肝炎表面抗原（HBsAg）阴性的健康人群8例行肝脏超声造影，其中男34例，女12例，年龄18-65岁，平均（39.0±11.4）岁。肝纤维化程度的病理分级采用 Scheuer方案，按照肝纤维化不同程度分为5期：S₀期：无纤维化；S₁期：汇管区纤维化扩大，局限窦周及小叶内纤维化；S₂期：汇管区周围纤维化，纤维间隔形成，小叶结构保留；S₃期：大量纤维间隔形成伴小叶结构紊乱，无肝硬化；S₄期：早期肝硬化。本研究中再分为正常对照组（8例），轻度肝纤维化组（S₀、S₁期，16例），中度肝纤维化组（S₂、S₃期，10例），重度肝纤维化组（S₄期，12例）。所有患者的乙肝标志物均为阳性，存在肝内占位性病变或患有哮喘、心脏疾病的受试者不纳入本研究。所有受试者均于肝脏穿刺活检后第二日行造影检查，且造影之前签署知情同意书。采集造影检查同日清晨空腹静脉血5ml，及时分离血清，-20℃保存，1周内测定。

2.2 仪器设备

穿刺枪为美国Bard公司生产的连续可调式自动活检枪，型号 MG1522，射程1.5-2.2cm，配以16G一次性穿刺针。超声造影采用西门子Acuson Sequoia 512 超声诊断仪，4C1-S探头，探头频率：4.0MHZ。全部实验过程中超声造影的预设条

件包括机械指数 (mechanical index MI) : 0.11-0.21, 深度, 动态范围等调至适宜状态并保持不变且所有受检者的造影检查均由同一操作者进行。造影剂采用意大利Bracco Imaging B.V. 公司生产的六氟化硫(SF₆)微泡造影剂SonoVue (声诺维, 英文名称Sulphur Hexafluoride Microbubbles for Injection)。准备100ml 无菌生理盐水(0.9%NaCl), 均在有效期内使用。图像采集工作站具有动态存储及大容量存储的功能。血清学指标检测使用Roche 2010电化学发光仪, 试剂盒使用肝纤维化四项定量测定试剂盒, 由郑州安图绿科生物工程公司提供。

2.3 操作方法

2.3.1 肝脏穿刺活检步骤

受检者平卧, 术前超声予以定位, 穿刺部位一般选择于肝右前叶距包膜下2~3cm处, 避开肝内可见的管道。常规消毒、铺巾, 以5%的利多卡因局部麻醉, 穿刺针按照引导路径进行肝组织活检, 取出组织长1~2cm。将活检肝组织用中性10%的福尔马林液固定标本, 石蜡包埋, 连续切片, 然后进行常规HE染色、Masson染色、网状纤维染色。显微镜下进行肝组织纤维化分期, 标准依据Scheuer方案。

2.3.2 超声造影的操作步骤

2.3.2.1 由一名经验丰富的超声诊断医师在注射造影剂前观察受试者肝脏二维及彩色多普勒声像图表现, 初步判断肝纤维化程度。本组中中度及重度的肝纤维化患者声像图大多表现为: 肝脏体积缩小或尚正常, 对于重度肝纤维化患者肝左叶体积增大、右叶体积缩小, 肝门右移。肝脏包膜粗糙, 表面呈锯齿状, 肝实质回声增粗、不均匀, 甚至有结节感。胆囊壁增厚、粗糙, 脾脏体积增大。肝静脉变细, 走行扭曲, 门、脾静脉内径增宽。彩色多普勒图像(CDFI)及频谱多普勒(PWD)显示门静脉主干血流最大速度、血流平均速度减小, 肝静脉频谱反向波消失, 波幅平坦。(见图1-2)。

2.3.2.2 由另一操作者取下声诺维药瓶上的塑料弹盖, 将药瓶推进配液器的透明套筒内并按压, 使瓶子固定在特定装置上; 然后推动注射器活塞杆将预先吸入的5ml生理盐水注入药瓶中; 剧烈震荡30秒钟直至瓶中内容物混合均匀配制成8 μ l/ml(相当于45 μ g/ml)的六氟化硫微泡悬浮液(乳白色), 混悬液PH: 4.5-7.5。受检者仰

卧位，在基波状态下选取肝动脉、门静脉、肝右静脉显示在同一切面上。将探头变换至造影模式，开启CPS成像系统，将仪器参数：MI、深度、增益等调节至适宜状态并保持不变。用注射器抽取2.4ml声诺维悬浮液，经肘静脉团注，然后迅速尾随注射5ml生理盐水冲洗。从注射造影剂即刻开始计时，启动超声诊断仪中内置计时器，造影过程中受检者保持平稳呼吸，与超声诊断仪相连接的计算机存储全部扫查过程。造影结束后，两名超声诊断医生在动态回放录像的基础上独立分析，记录造影剂到达肝动脉时间（HAAT），到达门静脉时间（PVAT），达到肝静脉时间（HVVT），即造影剂微泡在该血管内开始出现的时间，而后取平均值。计算造影剂达到肝动-静脉时间之差即肝动-静脉渡越时间（VAT），肝-门静脉到达时间之差即肝-门静脉渡越时间（VVT）。

2.3.3 血清学指标的检测方法

用化学发光法检测38例慢性乙型肝炎患者及8例乙型肝炎表面抗原（HBsAg）阴性的健康人群的HA、PIIINP、LN、CIV肝纤维化四项血清学指标，HA、PIIINP用免疫发光竞争法，LN、CIV用免疫发光双抗体夹心法。所有检测均严格按照试剂盒操作方法进行。

2.4 统计学处理

超声造影结果与血清学指标结果均以 $\bar{X} \pm S$ 表示，分别采用单因素方差分析，不同程度肝纤维化组间两两比较采用LSD法（最小显著差法），相关性分析采用非参数方差Spearman等级相关分析。

3 结果

3.1 不同程度肝纤维化患者的肝脏造影血流显像特征

注射造影剂后，约10-13s左右可见造影剂首先出现于肝动脉管腔内，大约2-3s后门静脉管腔内开始出现造影剂，然后肝实质呈整体增强，最后造影剂出现于肝静脉内（见图3-8）。各组HAAT、PVAT比较差异均无统计学意义。HVAT、VAT、VVT均随着肝纤维化程度的加重而缩短。并且轻度肝纤维化组HVAT、VAT、VVT

较中度肝纤维化组、重度肝纤维化组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 中度肝纤维化组较正常对照组、重度肝纤维化组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 重度肝纤维化组较正常对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同程度肝纤维化造影剂达到肝内各血管时间 ($\bar{X} \pm S$)

Tab1: The arrival time of contrast agent in liver vascular of liver fibrosis ($\bar{X} \pm S$)

参数(s)	正常对照组 (n=8)	轻度 肝纤维化组 (n=16)	中度 肝纤维化 (n=10)	重度 肝纤维化 (n=12)
HAAT	12.80±0.84	14.13±1.41	13.71±1.11	13.17±1.47
PVAT	15.20±0.84	16.73±1.44	16.57±0.54	16.00±1.65
HVAT	30.00±2.74	31.27±2.25	27.14±1.35*▲	23.33±1.67*▲◆
VAT	17.20±1.92	17.07±1.91	13.43±1.99*▲	10.17±0.72*▲◆
VVT	14.80±2.17	14.53±1.64	10.57±1.13*▲	7.33±1.30*▲◆

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与轻度肝纤维化组比较: ▲ $P < 0.05$; 与中度肝纤维化组比较: ◆ $P < 0.05$ 。

3.2 超声造影时间灌注参数与肝纤维化程度的相关性

HVAT、VAT、VVT 均与肝纤维化程度呈负相关性 ($P < 0.01$), 相关系数分别为 $r = -0.71$, $r = -0.84$, $r = -0.88$, 且 VVT 的相关系数最高。HAAT、PVAT 与肝纤维化程度无相关性。

3.3 不同程度肝纤维化患者的血清学指标结果

各组 PIIINP 比较差异均无统计学意义。HA、CIV、LN 均随着肝纤维化程度的加重而升高。见表 2。

表 2 不同程度肝纤维化患者各血清学指标结果 ($\bar{X} \pm S$)Tab2:The result of serum fibrotic markers of liver fibrosis($\bar{X} \pm S$)

参数 (ng/ml)	正常对照组 (n=8)	轻度 肝纤维化组 (n=16)	中度 肝纤维化 (n=10)	重度 肝纤维化 (n=12)
HA	77.45±24.51	112.96±58.69	225.47±76.54 ^{○△}	354.28±90.62 ^{○△◇}
PIIINP	12.45±8.41	14.82±10.24	28.51±12.56	16.98±9.10
CIV	58.78±12.02	81.78±20.38	102.37±24.52 [○]	138.07±32.81 ^{○△}
LN	88.62±17.42	102.75±20.52	124.51±26.13 [○]	191.71±36.75 ^{○△◇}

与正常对照组比较：[○] $P < 0.05$ ；与轻度肝纤维化组比较：[△] $P < 0.05$ ；与中度肝纤维化组比较：[◇] $P < 0.05$ 。

3.4 各血清学指标与肝纤维化程度的相关性

HA、CIV、LN 均与肝纤维化程度呈正相关性 ($P < 0.01$)，相关系数分别为 $r=0.54$ ， $r=0.32$ ， $r=0.42$ ，且 HA 的相关系数最高。PIIINP 与肝纤维化程度无相关性。

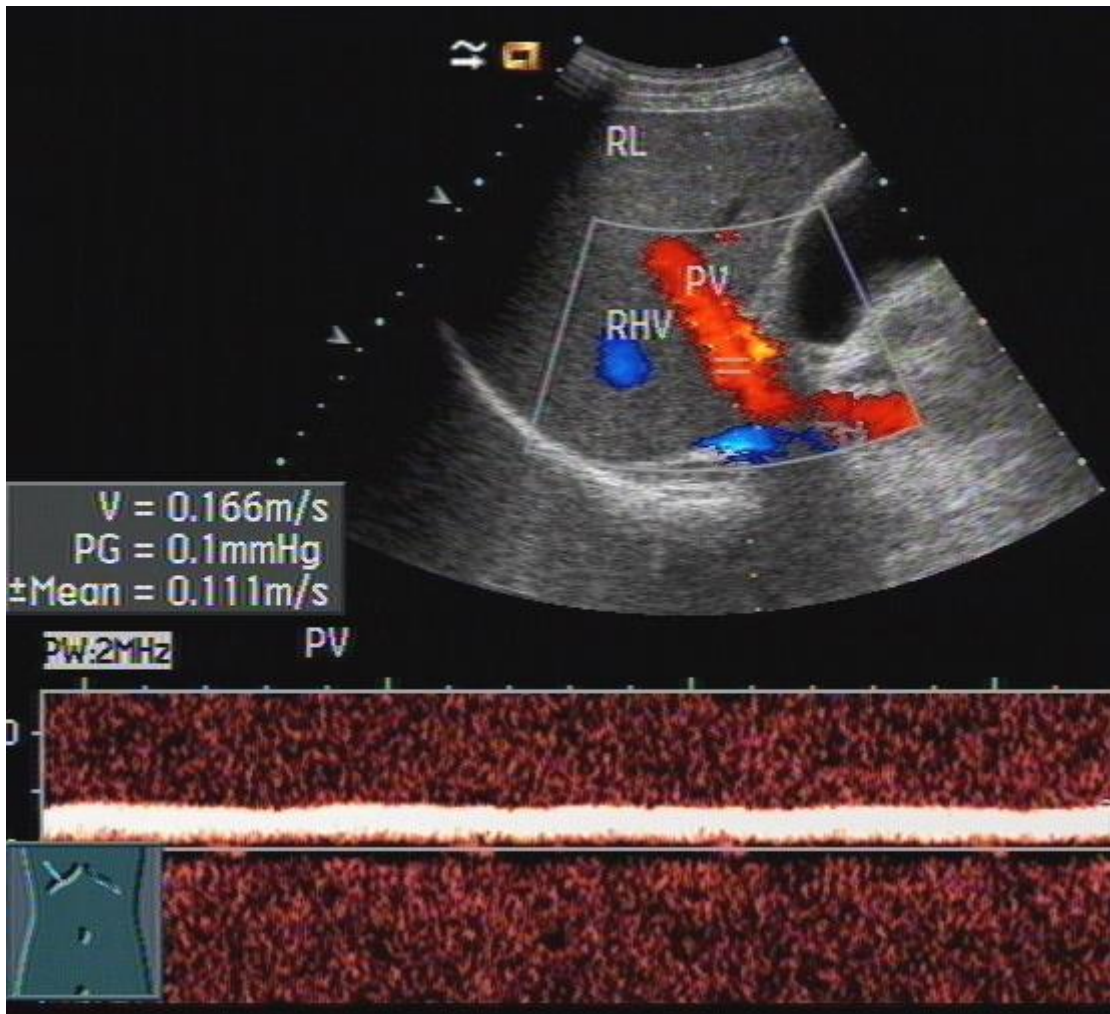


图1 正常人门静脉彩色多普勒血流频谱图

Fig1 The PWD image of portal vein of normal

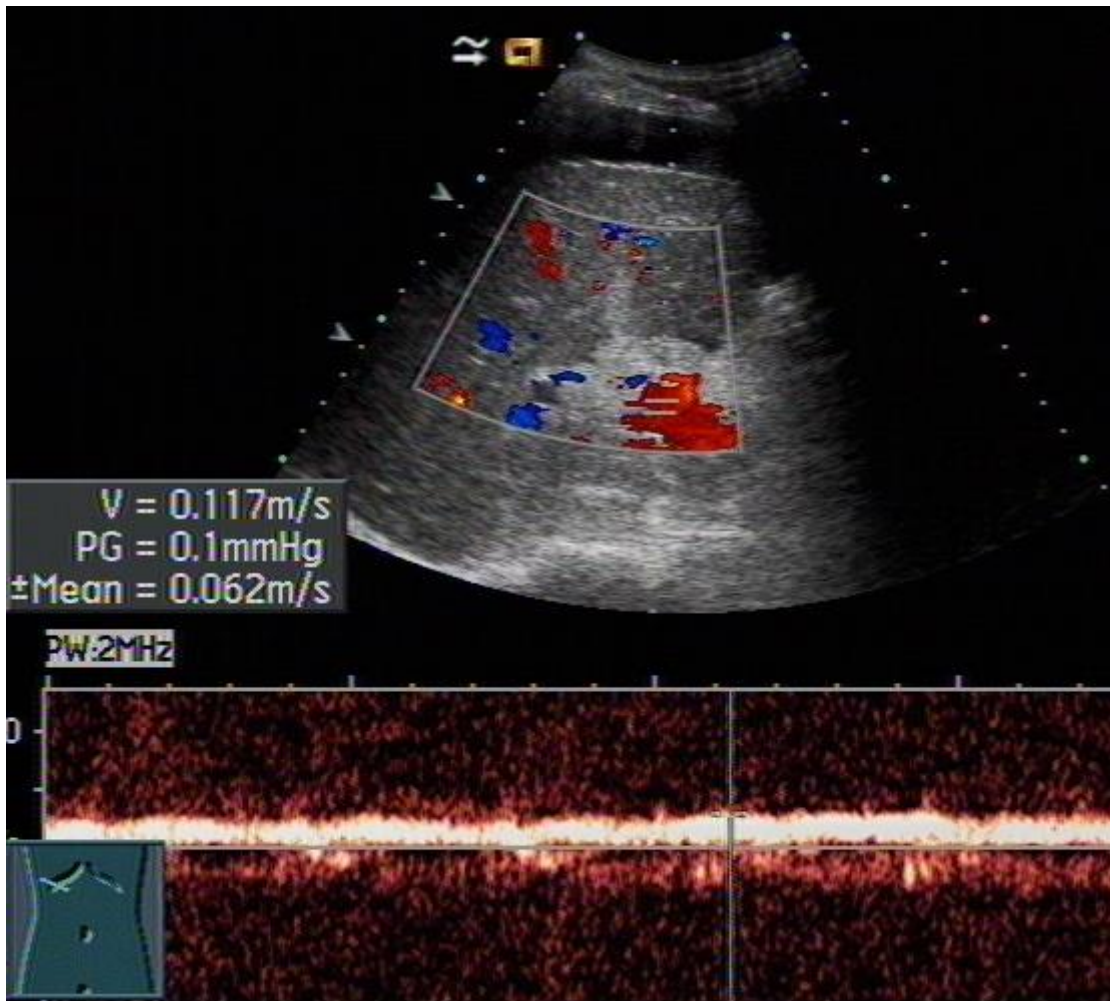


图 2 肝硬化患者门静脉的彩色血流频谱图

Fig2 The PWD image of portal vein of liver cirrhosis

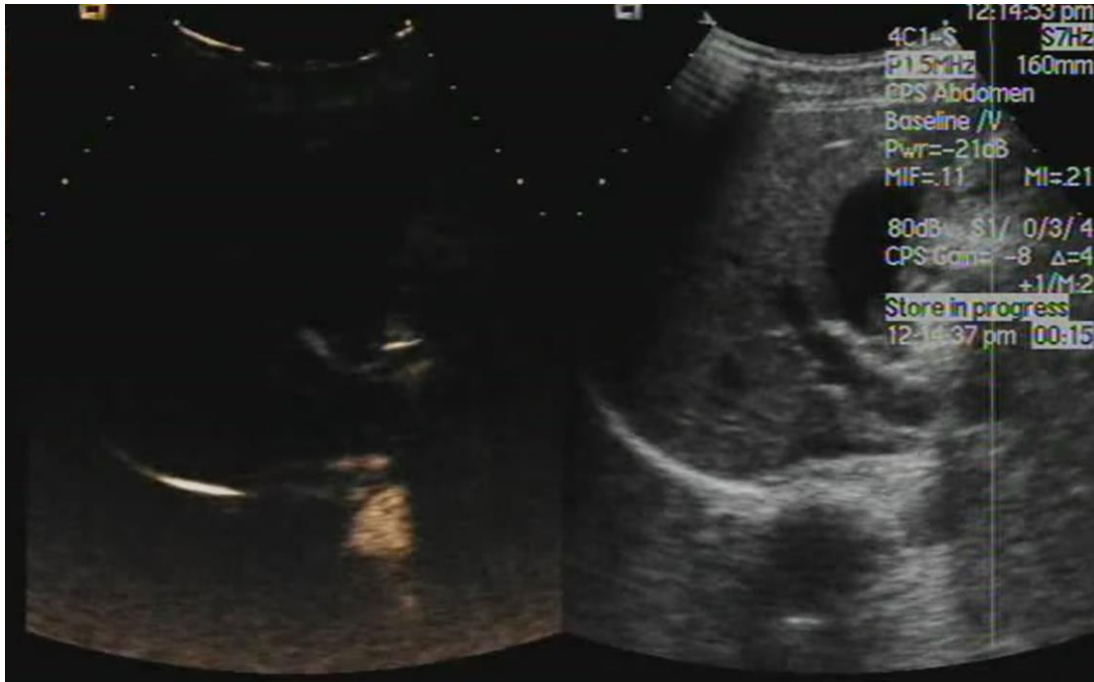


图 3 S1 期造影剂到达肝动脉图像

Fig3 The image of HAAT of S1

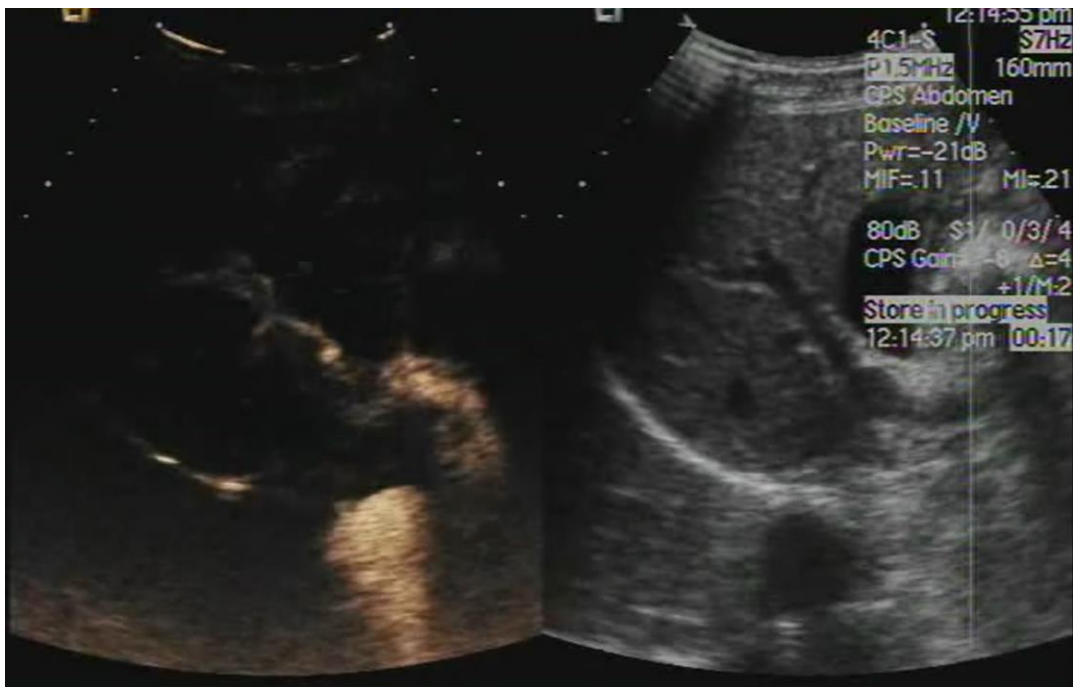


图 4 S1 期造影剂到达门静脉图像

Fig4 The image of PVAT of S1



图 5 S1 期造影剂到达肝静脉图像

Fig5 The image of HVAT of S1

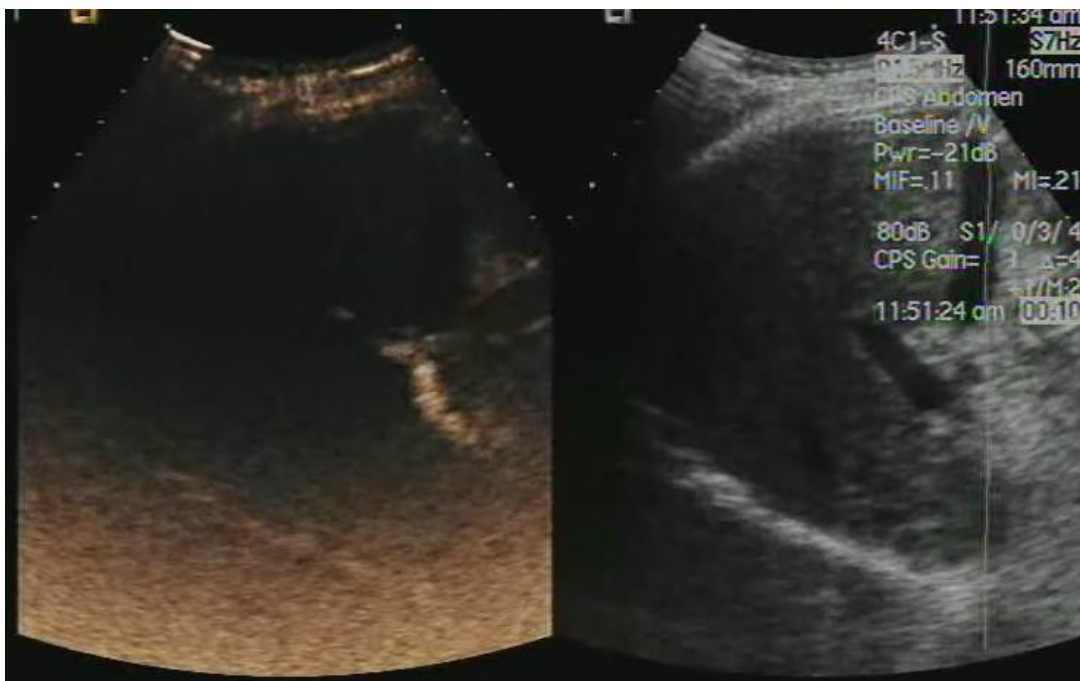


图 6 S4 期造影剂到达肝动脉图像

Fig6 The image of HAAT of S4



图 7 S4 期造影剂到达门静脉图像

Fig7 The image of PVAT of S4

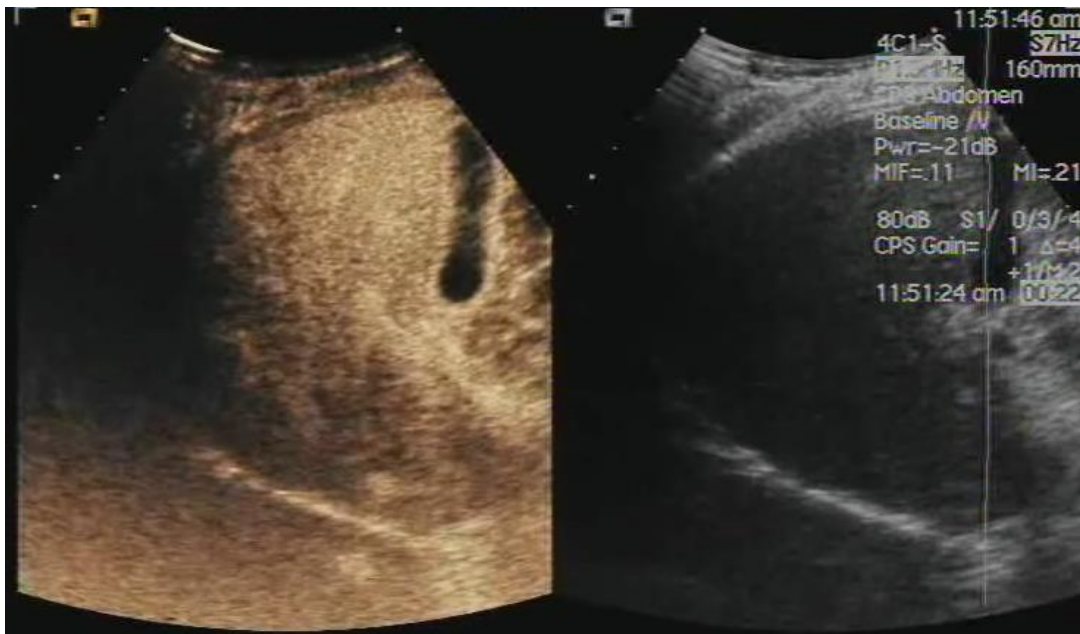


图 8 S4 期造影剂到达肝静脉图像

Fig8 The image of HVAT of S4



图9 肝纤维化肝脏标本组织

Fig9 The example of liver fibrosis

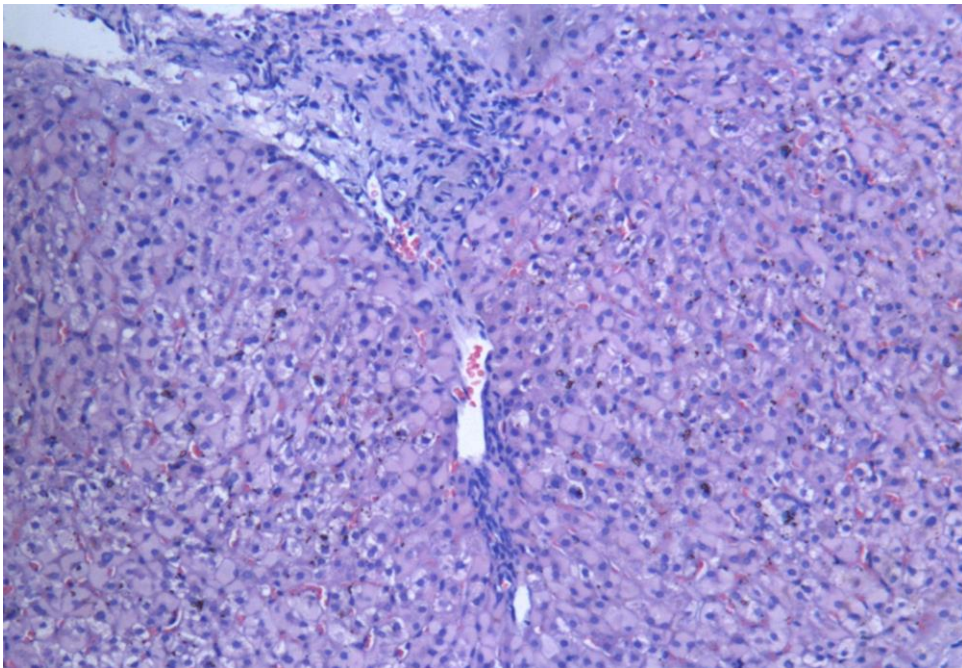


图 10 S1 期肝脏组织病理 (HE 染色)

Fig10 The pathology (HE) of liver tissue of S1

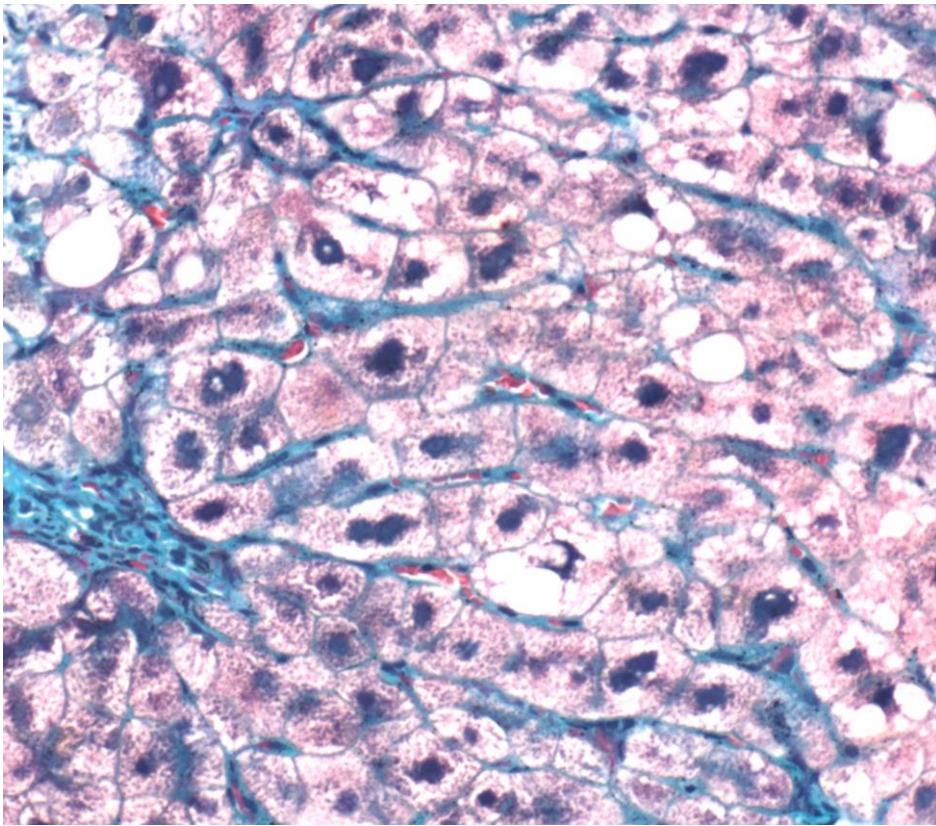


图 11 S4 期肝脏组织病理 (HE 染色)

Fig11 The pathology (HE) of liver tissue of S4

4 结论

(1) 经肘静脉团注造影剂后应用超声造影检查可以评估肝纤维化的严重程度，操作方便，安全性能高。HVAT、VAT、VVT 与肝纤维化程度密切相关，尤其是 VAT、VVT 可作为间接评价肝纤维化程度的指标。

(2) 肝纤维化血清学指标：透明质酸 (HA)，IV 型胶原 (IVC)，层粘连蛋白 (LN) 可指导肝纤维化程度的分级。

(3) 超声造影检查与肝纤维化血清学指标可用于评估肝纤维化的严重程度。超声造影较血清学指标而言，其与肝纤维化程度关系更为密切，其可以更准确地指导临床制定最佳治疗方案、判断慢性肝病患者的预后。

5 讨论

5.1 超声造影原理、应用及超声造影剂的发展

超声造影（CEUS）是利用向体内注入适量的造影剂，借助微泡造影剂的散射信号和非线性声学效应，改变声波与组织间的相互作用，使靶器官的回声信号增强，从而提高灰阶成像的对比分辨率和空间分辨率，达到疾病诊断目的。1968年，Gramiak等^[6]行x线主动脉造影时，经左心导管注入振荡的生理盐水后，在超声心动图上偶然观察到主动脉内“云雾状”回声增强现象，自此掀开了超声造影的研究序幕。

超声造影剂(ultrasound contrast agent, UCA)自1968年开始，至今经历了大约4个发展阶段。第一代造影剂为自由空气微泡。20世纪80年代，临床上多采用手摇生理盐水、双氧水等产生自由微泡，此种微泡尺寸较大且不均匀，半衰期时间短，不能通过肺部微循环，且容易产生气栓。第二代造影剂是以Albunex、levovist为代表的具有包膜的空气微泡，其分子量小，受动脉压力影响，包膜里的空气很快扩散，球壁塌陷而迅速失去声反射性，不能随血流分布至全身，所以限制了使用范围。第三代造影剂是包含低溶解度、低弥散度惰性气体（如氟硫或氟碳气体）的包膜造影剂，其以SonoVue、Optison为代表。该类惰性气体分子量比空气大得多，且不易扩散，能耐受250mmHg以上的动脉压力，它半衰期时间长，能够满足实际应用所需要的最大值。该类气体的引入使微泡的存活时间、稳定性和有效性有极大提高，在临床中广泛应用。第四代造影剂为靶向微泡造影剂，携带有靶向配体可以靶向成像或携带药物、基因具有治疗作用。利用靶向超声造影剂与靶组织特异性结合，可在疾病发生的早期在分子或细胞水平对靶组织特异性显像。携带药物或基因的靶向微泡造影剂的出现，使得超声造影不仅仅可以起到疾病诊断的目的，同时可以达到疾病治疗的效果。因此作为一种新型的药物或基因的载体，靶向泡造影剂越来越受到研究者的关注，超声联合微泡如今已成为一种靶向治疗的新模式。

超声造影剂经过不断发展，其质量有很大提高，安全性有可靠的保证。目前使用超声造影剂具有如下特点：（1）高安全性、低副作用；（2）造影剂微气泡大小均匀，其直径小10um，可自由通过人体的毛细血管，有类似红细胞的血流动力学特征；（3）使用时能产生丰富的谐波；（4）造影剂的稳定性良好。本实验中应用的SonoVue，于2001年在欧洲应用于临床，于2004年在中国正式注册上市，被批准可应用于临床。SonoVue主要由磷脂包裹六氟化硫微泡而组成，是一种纯血池造影剂，平均直径2.5微米，比红细胞小，能到达毛细血管末端，可顺利通过肺循环进入动脉循环中，但不会进入组织间隙中。六氟化硫在经过肺循环、体循环后，十分钟内可以完全被代谢掉，磷脂与人体具有生物兼容性，经过肝脏或肾脏代谢排出体外，无任何毒副作用。

在新型造影剂不断出现的同时，超声造影显像技术也有着不断地进步。超声造影技术在原有的多普勒血流显像、瞬间反应成像的基础上，又出现了二次谐波显像、反相脉冲谐波成像、对比脉冲序列成像。这些新技术其共同点是均为低机械指数、实时灰阶超声造影。在低MI的情况下，造影微气泡不易破裂，持续时间较长；实时图像能够实时、动态地观察造影全过程；将基波抑制后仅显示造影增强部分的灰阶图像，显著提高了造影图像质量与造影效果。我们拥有的Acuson Sequoia 512彩色多普勒超声诊断仪，使用的造影技术为对比脉冲序列成像技术，其首次利用造影剂微泡产生的非线性基频信号，同时接受与超声波相遇后微泡产生的基频和谐频成分，最大限度地显示造影剂微泡产生的回波成份，信号强度提高30dB，能实时显示信号强度和对比分辨率。

肝动脉与门静脉两系统的供血加之肝脏的实质背景，使肝脏成为造影增强的最好靶器官，因此肝脏超声造影是超声造影应用最早、最多，效果也最为显著的领域。超声造影在临床上应用最广泛的是对肝脏局灶性病变的诊断及鉴别诊断。肝脏超声造影分为动脉相、门脉相及实质相，不同病变其血供各异，因此我们可以根据其不同的造影特点进行鉴别诊断^[7,8]。恶性肿瘤中如原发性肝癌，以动脉供血为主，血流速度较快，表现以“快进快出”的增强模式为主^[9]；良性肿瘤中的血管瘤，由扩张的异常血窦组成，边缘结节内分布有动脉性血管，造影表现为以周

边增强为主、由周边向中心的向心性增强模式，表现以“快进慢出”的增强模式为主；而肝脏局灶性结节样增生(focal nodule hyperplasia FNH)的特异性表现是动脉相的离心性轮辐状血管的显示，门脉相出现中心低回声瘢痕。近年来，国内除了将超声造影应用于肝脏外，还将之拓展至肾脏、前列腺、腹部损伤及外周血管疾病当中。超声造影应用于肾脏病变中，主要用于肾脏肿瘤的诊断^[10]、肾实质血流灌注的评估^[11]、肾动脉狭窄的诊断及移植肾的术后评估^[12]。超声造影观察前列腺癌的肿块的位置，肿块大小及评价肿块血供情况是近年来造影临床应用研究较关注的领域^[13]。超声造影还可增强实质性脏器损伤部位与相应正常组织的对比度，发现常规超声不易发现的损伤，确定损伤的范围，尤其是可以通过观察造影剂漏出显像，直接观察到活动性出血^[14]。同时超声造影还通过造影剂进入血管显影，可实时观察造影过程，能清晰显示血管有无狭窄、闭塞以及血管畸形、曲张等病变^[15]，从而发挥其对外周血管病变的诊断的优越性。随着第四代新型造影剂的出现，超声造影不仅可以实现对体内组织器官的微观病变分子水平的探测和显像，还可实现药物的靶向定点输运和释放^[16]。

5.2 肝纤维化程度的影像学诊断方法

目前诊断慢性肝炎肝纤维化的方法包括病理诊断、临床诊断、影像学检查及生化学检查。当然肝脏穿刺组织病理学检查仍然是此类疾病诊断的金标准。但肝脏穿刺是有创性检查，难以进行重复操作，不可连续观察肝脏病变的进展情况，对慢性肝炎临床治疗的指导作用有限。故临床迫切需要一种可靠、无创的诊断肝纤维化程度的技术。

超声检查作为一种非创伤性的检查，简便而经济，被广泛应用于慢性肝炎的诊断中。早年，借助着二维超声、彩色多普勒超声可以对肝纤维化进行诊断。中重度肝纤维化超声二维图像可表现为肝实质回声不均匀、粗糙甚至结节样改变，肝包膜也可呈现不规则或波纹状，边缘变钝，肝内静脉变细变窄，胆囊壁增厚、粗糙，脾脏肿大等^[17]。评价肝纤维化的二维超声指标很多，各研究学者的侧重点不同。Zheng^[18]等在44项超声指标中，选出肝表面回声、肝实质回声和胆囊壁厚度等3项指标作为独立的预测肝纤维化最有价值的指标。国内学者探索性使用高频超

声诊断肝纤维化, 此类超声具有较高的分辨率和低穿透力, 主要用于浅表器官的检测。孟繁坤^[19]等采用高频超声对慢性肝病组403例及正常对照组57例进行检测, 结果将慢性肝病肝实质回声、形态改变声像图共分为5个级别, 与肝组织病理纤维化分期比较后发现高频超声对肝纤维化诊断的敏感性为87.8% (354 / 403), 特异性为87.7% (50 / 57), 诊断正确率为87.7% (404 / 460), 提示二维超声诊断对肝纤维化分期有指导意义, 但精准度有待提高。陶承颜^[20]采用彩色多普勒诊断肝纤维化程度, 结果发现, 门静脉主干内径、门静脉主干血流最大速度、门静脉主干血流平均速度、门静脉淤血指数在肝纤维化分期组间差异有统计学意义。也有部分学者通过观察肝静脉频谱改变(正常型、衰减型、平坦型)来检测肝纤维化, 但是这不能区分相近级别的纤维化程度。近年来有研究发现, 肝纤维化时肝动脉血流速度增加, 门静脉血流速度减慢, 二者的比值(A / V)能更全面地反映肝纤维化的血流动力学变化以及区分肝纤维化各级之间的差别, 晚期肝纤维化时导致肝血管受压、牵拉等导致管腔明显变窄、血流变慢的频谱, 尤为典型。

自1991年Ophir^[21]等提出超声弹性成像这一概念以来, 超声弹性成像得到了广泛关注并迅猛发展。作为一种全新的成像方式, 弹性成像已经成为医学超声成像的一个研究热点。超声弹性成像的基本原理是对组织(包括正常和病理组织)施加一个内部(包括自身的)或外部的动态或者静态 / 准静态激励, 根据各种不同组织的弹性系数(应力 / 应变)的不同, 在弹性力学、生物力学等物理规律作用下, 组织产生一个响应, 这种响应具体表现为位移、应变、速度等方面的变化。弹性模量较大即较硬的组织应变较小或者振动的幅度较小或速度较大, 结合数字信号处理或者数字图像处理技术, 可以估计出组织内部的相应情况, 从而反映组织内部的弹性模量等力学属性的差异。目前有关超声弹性成像的技术较多, 大体分为3种: ①压迫性弹性成像(compression elastography or strain imaging); ②瞬时弹性成像(transient elastography); ③振动性弹性成像(vibration sonoelastography)。压迫性弹性成像目前主要运用于浅表器官, 而评价肝纤维化程度方面的研究主要集中在瞬时弹性成像和振动性弹性成像两方面。瞬时弹性成像也称单维瞬变弹性(fibroscan, FS), 袁鹰等^[22]通过瞬时弹性成像观察胆管结扎胆汁淤

积性大鼠模型的肝纤维化程度,认为该技术对早期肝纤维化的诊断具有一定的价值。Nguyen—Khac等^[23]利用瞬时弹性成像诊断S₂、S₃及S₄期的受试者工作特征曲线(ROC)下面积分别为0.79-0.83、0.90-0.91、0.91-0.97,FS还可以无创诊断各种病因的早期肝硬变,其阳性预测值为70%-95%,阴性预测值为77%-95%。采用声辐射力激励的声辐射力脉冲成像(acoustic radiation force impulse imaging, ARFI)属于振动性弹性成像的一种。国外有学者以肝穿刺活检结果作为标准,应用ARFI对HCV感染的病人进行肝纤维化测定,结果显示ARFI方法与病理结果有高度相关性($r: 0.919$),因此认为ARFI弹性成像在评价HCV感染肝脏纤维化患者中有着较高的诊断价值。王文伟^[24]等利用ARFI技术选取肝硬化、慢性肝病、脂肪肝人群及正常人群进行研究,发现肝硬化患者的剪切波速度(2.47 ± 0.59)m/s,慢性肝病组为(2.08 ± 0.63)m/s,肝硬化患者较慢性肝病测值增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。健康成人组与脂肪肝组剪切波速度分别为(1.15 ± 0.43)m/s和(1.03 ± 0.37)m/s,慢性肝病组与健康成人组及脂肪肝组之间差异有统计学意义($P < 0.01$),但健康成人组及脂肪肝组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。瞬时弹性成像与声辐射力脉冲成像相比较,其主要不足之处就是无法对肥胖症的患者^[25]及肋间隙太窄^[26]的病人实行检查。由于肥胖症患者脂肪组织将对低频剪切波和超声波产生强烈的衰减作用,因此瞬时弹性成像对于肥胖症患者肝纤维化程度的评估意义有限。ARFI原理的声触诊组织量化技术(virtual touch tissue quantification VTQ)使用的是标准超声探头,可应用于肋间隙窄的病人。对于重度肥胖(BMI>30)的病人,ARFI技术也能成功测得其VTQ值。但目前大部分的声辐射力脉冲成像技术的研究主要针对国外肝纤维化患者(以HCV感染患者为主),针对国人的大规模的HBV感染肝纤维化患者,此方面的研究还有待于进一步深入探讨。

医学影像技术的迅速发展对肝脏病变的影像学检测能力产生了巨大的推动作用。CT动态增强扫描和血流灌注成像以及MR组织特异性造影剂、MR扩散加权成像等新技术的开发应用,更进一步拓展了肝纤维化的影像学研究领域。CT增强扫描可通过观察肝脏密度变化和血管情况及继发的改变,包括脾大、腹水并能评价肝硬化时门静脉高压表现及侧支循环形成,为临床诊断及治疗方案的制订提供较

多的信息。CT血流灌注成像是指在静脉注射对比剂的同时对选定的层面进行连续不断的扫描,以获得该层面内每一像素的密度随强化时间而演变的曲线,该曲线被称为时间-密度曲线。在该曲线中,横坐标为时间,纵坐标为注药后增加的CT值,所反映的是对比剂在该器官中浓度的变化,进而间接反映组织器官内灌注量的变化。肝纤维化时肝脏血管阻力的增加使门静脉灌注逐渐减少,同时侧支循环的形成更使得门静脉对肝脏的灌注减少。Van Beers等^[27]采用双输入单室模型,根据去卷积法计算肝脏的灌注参数,发现肝脏灌注值在肝硬变组与慢性肝病组之间差异有统计学意义,肝脏总灌注量肝硬化组较正常对照组下降,肝动脉/门静脉灌注指数较正常组升高。关于此方面的研究国内外学者^[28]得到结果是一致的。然而由于受CT具有放射性,只能研究同一层面,不能全面地观察肝脏,灌注参数易受外界影响等因素的制约,其在临床中的应用范围尚局限。

MRI检查对肝硬化病变形态学上的分辨能力明显优于CT检查,以T₂ WI最为敏感,可见到肝实质形态呈细网状或粗网状改变。MRI对比剂的应用又极大地提高了图像的信噪比和病变的显示率,以Gd-螯合物为基础的顺磁性对比剂,可显示出对比剂在纤维组织的延缓分布,因此,在T₁ WI上出现肝脏间隔纤维化的延迟强化。而超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide SPIO)是聚集在肝脏的网状内皮细胞中,引起肝脏T₂的缩短和信号的丧失。Semelka等^[29]认为Gd-螯合物增强MR检查中,肝脏延迟线形增强与肝纤维化有高度的相关性。Lucidarme等^[30]认为SPIO增强MR检查可用于肝纤维化的分期检测及进展。Aguirre等^[31]通过利用以Gd-螯合物为基础的顺磁性对比剂和超顺磁性氧化铁相结合,进行双对比增强磁共振成像(double-contrast MRI, DC~MRI),由于两者的协同作用使肝实质的信号降低而纤维间隔的显示更为清楚,与病理组织学比较其对S₃、S₄期肝纤维化总的评估特异性和敏感性均高于90%。目前对于SPIO的研究较多,也较广泛。但网状内皮细胞仅占肝组织的2%,致使一般MR设备对早期肝纤维化的增强表现与正常肝脏不易区分;同时成像序列的研究还有待进一步的深入与完善;另外,许多对比剂尚处于临床试验期,其效果及不良反应还有待于进一步的研究。近年来,随着快速平面回波成像(echo-planar imaging EPI)序列的应用使MR弥散成像在肝脏的运

用成为可能。MR弥散成像通过检查组织内水分子运动及血流量灌注来反映组织的结构特点，可从微观分子水平上为肝脏病变的诊断及鉴别诊断提供有价值的诊断信息。王秋实等^[32]通过建立家兔纤维化模型，发现表观弥散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)值与纤维化程度呈负相关。Koinuma等^[33]对不同程度的肝纤维化患者行MR弥散成像检查测量ADC值，发现ADC值减低的程度与肝纤维化程度存在相关性，认为ADC值可作为评估肝纤维化程度的手段。但是EPI图像信噪比不高，易受磁化率伪影影响，造成图像变形或信号缺失；为抑制化学位移伪影必须采用有效的脂肪抑制技术。

5.3 超声造影评价肝纤维化程度

肝纤维化时，细胞外基质（EMC）合成分泌增加和降解减少，导致其在肝脏沉积。轻度肝纤维化时肝脏形态学上的改变与正常肝脏无明确的界限，但是此时肝脏的微循环与血流动力学发生着变化。肝纤维化时，为了代偿肝脏常发生以下血流动力学的改变：①肝内动脉、门静脉、肝静脉之间出现短路分流；②肝内血管动脉化；同时患者还会出现肺动-静脉瘘，心输出量增加及体循环阻力下降等高动力状态。超声造影（CEUS）组织增强主要来自于微泡造影剂的散射信号。超声造影使用的微泡造影剂的平均直径仅为几微米，远远小于目前使用的超声诊断仪发射的声波波长，微泡造影剂进入血液循环后，其与周围组织声阻抗差极大，使得造影剂引起的背向散射强度大大增加，利用微泡对超声波谐振的非线性特性，使用对比脉冲序列成像技术，可以增强多普勒信号强度和实质脏器的灰阶显像。同时超声造影剂为血池性示踪剂，其血流动力学效应与红细胞相似。超声造影利用微泡造影剂能够动态、实时观察组织的血流充盈方式、速度与强度等，真实地反映出组织的血流灌注情况。

基于肝纤维化时肝脏血流灌注的改变与超声造影的特性，1999年Albrecht首先通过肝脏超声造影提出采用“肝脏通过时间”诊断肝硬化，即开始注射造影剂到肝静脉内出现造影剂信号的时间值，小于24s对诊断肝硬化有100%的敏感性和96%的特异性，并推测造成造影剂“肝脏通过时间”缩短的原因可能为肝内动静脉分流所致^[34]。近年来，有部分学者选择肝硬化患者、无肝硬化慢性肝炎患者、健

康对照组^[35]及不同肝功能分级的肝硬化患者^[36]作为研究对象,进行超声造影检查,结果发现肝硬化患者的 HVAT 较无肝硬化慢性肝炎患者及健康对照组明显提前,且肝硬化患者的 HVAT 随着肝功能分级的加重而缩短。超声造影对于评价肝硬化患者肝脏血流动力学的改变提供了重要的参考价值,但是对于不同程度的肝纤维化的研究尚不多。

然而肝纤维化作为慢性肝病的一个可逆的中间环节,早期诊断、治疗对于临床的意义更为重要。近年来,国内外部分学者选取肝纤维化动物模型进行超声造影检查评价其肝纤维化程度,且已证实超声造影评价肝纤维化程度的可行性^[37,38]。本研究选取的 38 例患者均为不同程度的慢性乙型肝炎肝纤维化的患者。研究结果显示,HAAT、PVAT 在轻、中、重度肝纤维化患者及正常对照组之间比较差异无统计学意义,而 HVAT 随着肝纤维化程度的加重而缩短,与肝纤维化程度呈负相关,这与 Lim 等^[39]研究结果相似。超声造影剂经肘静脉注入人体后,微泡经肺循环分别经肝动脉和门静脉进入肝实质血窦,最后到达肝静脉。HAAT、PVAT 与肝纤维化的程度无明显相关性可能是由于造影剂进入人体后直接经肺循环到达在肝动脉、门静脉内,而不经肝脏内部微循环,HAAT、PVAT 不受肝纤维化时肝脏内部血流动力学改变的影响,因其主要仅与肝外体循环有关。而 HVAT 随着肝纤维化程度的加重而缩短,这可能是由于造影剂在经肝动脉、门静脉入肝后,需经肝实质循环后,最后才达到肝静脉,而进入肝脏后的循环受到肝纤维化时肝脏发生的血流动力学改变的影响,HVAT 受肝外体循环与肝内微循环的双重影响,因此随着肝纤维化程度的加重 HVAT 缩短。

在研究中,我们进一步计算出相对灌注时间参数即肝动-静脉渡越时间(VAT)、门-肝静脉渡越时间(VVT),结果显示 VAT、VVT 均随着肝纤维化程度的加重而缩短,且 VAT、VVT 的相关系数较 HVAT 更高(HVAT: $r=-0.71$, VAT: $r=-0.84$, VVT: $r=-0.88$)。说明 VAT、VVT 在评价肝纤维化程度中更为可靠。此结果与解丽梅^[40,41]等研究结果相似。不同程度肝纤维化的 HVAT 的变化受肝外体循环与肝内微循环的双重影响,而肝外体循环因受试者个体而异,此方面可能会影响 HVAT 评价肝纤维化程度的准确性。而 VAT、VVT 为相对灌注时间,是以 HAAT、PVAT

为校正值得出，测量的是造影剂从肝动脉到肝静脉的时间、从门静脉到肝静脉的时间，排除了高动力状态和肺动静脉分流及呼吸等肝外个人因素的影响，避免了因受试者个体差异对实验造成的影响，主要反映肝纤维化时肝内血流变化。同时采用 VAT、VVT 可消除因推注造影剂时间与记录时间不一致造成的误差，故可以更快速、更敏感地反映肝纤维化时肝脏血流动力学的改变。

此次实验我们采用目测法获得 HAAT、PVAT、HVAT。目测法在实验过程中易出现因肉眼观察产生的人为误差及由于推注造影剂时间与计时时间不一致造成的客观偏倚等，这些影响着实验的精准度。为尽量避免此类误差，本实验中所有受试者均经肘静脉团注（3-5s）造影剂，从注射造影剂即刻开始启动超声诊断仪的内置计时器计时，实时不间断的观察肝动脉、门静脉与肝静脉的血流信号，动态图像以 AVI 格式存储在与超声诊断仪相连接的计算机中。并且全部实验过程中机械指数、增益、深度等预设条件调至适宜状态并保持不变。以肝动脉、门静脉、肝静脉血管腔内开始出现造影剂微泡的时间记录为造影剂达到时间。实验完毕后，由两名经验丰富的超声诊断医生独立回放动态录像得出 HAAT、PVAT、HVAT，而后取平均值做为最终实验数据。另有国内外部分学者^[34,41]采用软件结合时间-强度曲线分析图像，以血管内造影剂强度较基线上升 10%的时间为造影剂到达时间。相比而言，目测法的灵敏度略低于时间-强度曲线分析法，但是两者评估肝纤维化程度的实验结果是一致的。目测法可以更快捷、更方便地对肝纤维化病人做出诊断。

5.4 血清学指标与肝纤维化程度的关系

一切慢性肝病的病理学特征均表现为肝纤维化，无论物理、生物还是化学因素，如病毒感染、过度饮酒、自身免疫性疾病、非酒精性脂肪肝等各种因素，只要能够引起肝细胞遭受损害的因子，均可引起肝细胞变性坏死和炎症反应以致于纤维组织增生。研究表明肝脏内 HSC 的激活转化为肌成纤维母细胞是肝脏纤维化发生的中心环节，并最终导致肝脏内细胞外基质的过度沉积。国内外的学者们发现了较多的与肝脏纤维化密切相关的血清学指标，总体而言，这些指标可以大体分为3类：细胞外间质成分 (ECM)、胶原酶类、细胞因子。透明质酸 (HA)、层

粘连蛋白 (LN)、III型胶原前肽 (PIIINP)、IV型胶原 (IVC) 属于ECM, 即我们通常所指的“肝纤四项”, 是研究最多的血清学指标, 大量动物实验及临床研究也证实了其与肝纤维化的密切关系。

透明质酸 (HA) 是一种葡萄糖胺多糖, 是构成肝细胞外基质的重要成分之一。由肝星状细胞合成后经血循环到达肝血窦内皮细胞降解。肝脏受损时合成增多, 降解减少, 血清水平增高。HA可较准确、灵敏地反映肝内已生成的纤维量及肝细胞受损状况, 是反映肝纤维化程度最具价值的血清学标志物。据报道用HA诊断肝硬化的敏感性为87%, 特异性为93%, 诊断率为90%^[42]。有学者认为本指标较之肝脏穿刺活检更能完整反映出慢性肝病全貌, 是肝纤维化和肝硬化的敏感指标。本次实验中可以发现HA随着肝纤维化程度的加重而升高, 并且HA在肝纤四项中其与肝纤维化程度关系最为密切, 相关系数 $r=0.54$ 。这点与大多数学者研究结果相似^[43,44]。同时HA水平与血清胆红素、血清谷丙转氨酶 (Serum glutamic-pyruvic, SGPT)、 γ -球蛋白呈正相关, 与血清白蛋白、凝血酶原时间呈负相关, 故认为血清HA水平可以反映肝损害严重程度、判断有无活动性肝纤维化。但是需要指出的是血清HA水平升高不是肝纤维化特有的, 在机体缺血、缺氧, 自由基损伤时, 血清透明质酸水亦可升高。

IV型胶原 (IVC) 是构成肝窦内皮细胞之间功能性基底膜的主要成分, 反映基底膜胶原更新率。肝窦内皮细胞的特点是细胞扁而薄, 其窦腔面可见有发达的窗孔, 细胞呈筛状形态。内皮窗孔无隔膜。肝窦内皮外无基底膜, 仅见少量网状纤维。肝窦是通透性最大的血窦之一, 是保证血液和肝细胞间正常物质交换的组织学基础。1963年Scbaftler发现随着肝硬化的发生, 肝窦内皮窗孔数逐渐减少或消失, 内皮下基底膜逐渐形成, 形似连续毛细血管, 称这一过程为肝窦毛细血管化 (sinusoid capillarization)。肝纤维化过程中一个重要的病理变化就是肝窦毛细血管化。在肝纤维化发生早期可见IVC增生, 后与持续沉积的LN 形成完整的基底膜, 即“肝窦毛细血管化”。因IV型胶原在合成代谢过程中不去除端肽即沉积于细胞外基质, 故血清中IV型胶原含量的升高反映了肝血窦基底膜的形成加快。基础和临床研究均发现, 血清IV型胶原水平和肝纤维化、门静脉高压程度密切

相关,而与肝脏炎症活动指数关系较小。层粘连蛋白(LN),主要来源于HSC,其在细胞粘连、分化和基因表达中起重要作用,主要存在于肝内胆管、血管等的基底膜中。LN为分子量较大的糖蛋白,在肝纤维化时能与IV型胶原、非胶原性糖蛋白及硫酸肝素等多种基质成分交联,并能自身交联,在基底膜的形成中起重要作用,降低内皮细胞的通透性使其毛细血管化,并使门脉压升高,故可反映肝窦毛细血管化和汇管区纤维化。血清学结果显示,CIV与LN均随着肝纤维化程度的加重而升高,与肝纤维化呈正相关(CIV: $r=0.32$, LN: $r=0.42$)。但是CIV升高不仅仅见于肝纤维化时,在其他胶原代谢异常的疾病中同样可以出现,如甲状腺功能亢进、硬皮病等中。并且血清LN水平易受多种因素影响,如营养不良、各种维生素缺乏等均可致LN异常。这些因素可能会影响血清学指标评价肝纤维化程度的准确性与敏感性。

III型胶原前肽(PIIINP)为III型胶原的前体,主要由肝星状细胞(HSC)合成,反映肝内III型胶原合成的情况。PIIINP在向III型胶原转化的过程中,其氨基末端和羧基末端的肽被酶裂解,主链交联形成III型胶原,裂解下来的氨基末端肽即为III型胶原前肽。大量学者研究发现血清PIIINP升高早于形态学观察纤维增生,能早期特异地反映肝内有活跃纤维形成^[45,46]。然而在本实验中,PIIINP在轻度、中度肝纤维化中其血清中含量高于正常对照组,但是在重度肝纤维化组中其含量反而较中度肝纤维化组下降。PIIINP与肝纤维化程度无明显相关性。这与部分学者的研究结果相似^[47]。其可能与肝纤维化晚期因纤维合成和增生不如初期活跃,PIIINP可较前降低,说明其在反映肝脏纤维化程度的敏感性方面尚存在一定的缺陷。

当然与肝纤维化程度密切相关的血清学指标除了上述四项外,还包括一些酶类、细胞因子。基质金属蛋白酶(MMP2)及其抑制物(TIM P1),两者的平衡在ECM降解过程中起着至关重要的作用。基质金属蛋白酶(MMP2)主要由肝星状细胞(HSC)和Kupffer细胞分泌表达,主要参与降解胶原、蛋白多糖等细胞外基质。TIMP1在肝脏中主要来源于HSC、Kupffer细胞, TIMP1对MMP2降解ECM有特异性抑制作用。在肝纤维化发生时,由于TIMP1相对增加,ECM不能被MMP2及时降解造

成堆积。转化生长因子 (TGF- β_1)是目前认为致肝纤维化最强有力的细胞因子之一。肝纤维化早期表达增加主要来源于肝间质细胞,随着肝纤维化的发展,肝细胞也成为TGF- β_1 的重要来源。血小板衍生生长因子在生理状态下主要储存在血小板的 α 颗粒中。肝脏受损时,巨噬细胞、血小板、浸润的炎细胞、受损的内皮细胞及激活的肝星形细胞均可释放血小板衍生生长因子。血小板衍生生长因子与慢性乙型肝炎病情程度及肝细胞受损的严重程度一致,与肝组织纤维化发展阶段相一致,也是一个较好的提示肝纤维化的指标。

5.5 本实验解决的问题及存在的不足

本研究在国内外学者研究基础上,运用超声造影与血清学指标对肝纤维化程度进行评估,筛选出与肝纤维化程度密切相关的参数,为临床动态监测肝纤维化患者的病情及判断患者的预后提供了一种无创的手段。然而本研究具有一定的局限性,实验中搜集肝纤维化各期的病例数较少,未能全面反映慢性乙型肝炎患者的肝纤维化状况,这将会在后续研究中改进,不断加进新病例,解决上述存在的问题。

6 展望

本实验表明超声造影可以较准确地反映肝纤维化时肝脏的血流动力学的改变,为评估慢性乙型肝炎肝纤维化程度提供了一种新的无创手段,对于临床治疗、动态监测病情变化有一定的指导意义。尤其是对于有肝脏穿刺活检禁忌症的患者更具有重要的临床应用价值。肝纤维化血清学指标:透明质酸(HA)、IV型胶原(IVC)、层粘连蛋白(LN)可指导肝纤维化程度的分级,但是其准确性低于超声造影指标。

理想的、能准确地评价肝纤维化程度的诊断措施应具备以下特点:无创、简便、具有肝脏特异性、有高度的准确度和灵敏度、能动态监测疾病的变化、可广泛用于多种肝病、具有较高重复性。超声造影作为一种无创的检查方法,对于肝纤维化程度的评估有广阔的应用前景,但与肝脏穿刺活检相比,需采用血清学等

多方面指标综合评估，以提供其诊断的准确性、敏感性。相信在不久的将来，经过不断探索可以设立特异性强、能反映肝纤维化不同程度的影像学及血清学评估参数，健全简便易行且准确性高的诊断及评估体系，从而使慢性肝病肝纤维化的防治迈入崭新的阶段。

参考文献

- 1 李进.中医药治疗慢性肝病的几点思考.江西中医药,2005,36 (10):50-1.
- 2 Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol*,2002,1(1):1.
- 3 Friedman SL. Liver fibrosis--from bench to bedside. *Hepatol*,2003, 38,(suppl):38-53.
- 4 冯彦红,钱林学,胡向东等.肝纤维化及早期肝硬化的超声研究进展.世界华人消化杂志,2010,18(5):454-61.
- 5 Abbattista T, Ridolfi F, Ciabattoni E, etal. Diagnosis of liver cirrhosis by transit-time analysis at contrast-enhanced ultrasonography. *Radiol Med*,2008,113(6):860-74.
- 6 Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol*, 1968,3(5):356-66.
- 7 Wilson SR, Bums PN, Muradali D, etal. Harmonic hepatic US with microbubble contrast agent: initial experience showing improved characterization of hemangioma, hepatocellular carcinoma, and metastasis. *Radiology*,2000,215(1):153-61.
- 8 Kim TK, Ang HJ, Wilson SR, etal. Benign liver masses: imaging with microbubble contrast agents. *Ultrasound Q*,2006,22(1):31-9.
- 9 吕明德,徐辉雄,刘广健等.应用低机械指数连续超声造影鉴别诊断肝脏局灶性病变.中国超声医学杂志,2005,21(6):440-3.
- 10 高云华,曾功君,谭开彬等.自制脂膜氟烷超声造影剂对实验性肾肿瘤显影效果的研究.临床超声医学杂志,2004,6(5):257-9.
- 11 周翔,张青萍等.造影增强能量图对肾灌注形态学及半定量实验研究.中华超声影像学杂志,2001,10(1):57-60.
- 12 李颖嘉,文戈,龚渭水等.脉冲反相谐波声学造影诊断移植肾动脉狭窄初探.中国超声医学杂志,2005,21(3):228-30.
- 13 Pallwein L, Mitterberger M, Gradl J, etal. Value of contrast-enhanced ultrasound

- and elastography in imaging of prostate cancer. *Curr Opin Urol*,2007,17(1):39-47.
- 14 王月香,唐杰,梅兴国等.灰阶超声造影对肝外伤活动性出血的诊断研究.中国超声医学杂志,2005,21(12):887-9.
- 15 孙英,王传英,李秀清.超声造影诊断食管胃底静脉曲张.中国医学影像技术,2010,26(4):712-4.
- 16 王志刚.超声分子影像学研究进展.中国医学影像技术,2009,25(6):921-4.
- 17 Macfas Rodfiguez MA, Rendon Unceta P, Navas Relinque C, etal .Ultrasonography in patients with chronic liver disease, its usefulness in the diagnosis of cirrhosis. *Esp Enferm Dig*, 2003,95(4): 258-64.
- 18 Zheng RQ, Wang QH, Lu MD, etal. Liver fibrosis in chronic viral hepatitis: an ultrasonographic study. *World J Gastroenterol*,2003,9(11):484-9.
- 19 孟繁坤,郑颖,丁蕾.高频超声检查与病理肝纤维化分期相关性的半定量研究.中国超声医学杂志,2007,23(11):846-8.
- 20 陶承颜.彩色多普勒超声诊断肝纤维化程度的临床价值分析.医学信息:下旬刊,2009,1 (8) :211-2.
- 21 Ophir J, Cespedes I, Ponnekanti H, etal. Elastograplay: A quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrason Imaging*,1991,13(2):111-34.
- 22 袁鹰,龚渭冰,张守华等.超声弹性成像诊断大鼠部分淤胆型肝炎纤维化的初步研究.临床超声医学杂志,2007,9(6):326-8.
- 23 Nguyen-Khac E, Capron D. Noninvasive diagnosis of liver fibrosis by ultrasonic transient elastography (Fibroscan).*Eur J Gastroenterol Hepatol*,2006,18(12):1321-5.
- 24 王文伟, 苏瑞娟, 马桂英等.声脉冲辐射力成像技术对慢性肝病肝纤维化的弹性研究.中国超声医学杂志, 2011,27(5):440-3.
- 25 Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, etal. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut*,2007,56(7):968-73.

- 26 Roulot D, Czernichow s, Le Ciesiau H, etal. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *J Hepatol*,2008,48(4):606-13.
- 27 Van Beers BE, Leco nte I, Mateme R, etal. Hepatic perfusion pa—rameters in chronic liver disease: dynamic CT measurements correlated with disease severity. *AJR Am J Roentgenol*, 2001,176(3):667-73.
- 28 魏萍,李江.螺旋CT灌注成像技术在肝纤维化中的临床观察.中国医药导报, 2010,7(9):17-8.
- 29 Semelka RC, Chung JJ, Hussain SM,etal. Chronic hepatitis: correlation of early patchy and late linear enhancement patterns on gadolinium enhanced MR images with histopathology initial experience. *J Magn Reson Imaging*,2001,13(3): 385-91.
- 30 Lucidarm EO, Baleston F, Cadi M,etal. Non-invasive detection of liver fibrosis:Is superparamagnetic iron oxide particleenhanced MR imaging a contributive technique? *Eur Radiol*,2003,13(5): 467-74.
- 31 Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, etal. Liver fibrosis: noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging. *Radiology*, 2006,239(2): 425-37.
- 32 王秋实,郭启勇,梁长虹等. MR弥散加权成像评价肝纤维化的初步实验研究.解剖学研究,2007,29(3):212-6.
- 33 Koinnma M, Ohashi I, Hanafusa K, etal. Apparent diffusion CO efficient measurement with diffusion weighted magnetic resonance imaging for evaluation of hepatic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*, 2005,22(1):80-5.
- 34 Albrecht T, Blomley MJ, Cosgrove DO, etal. Non-invasive diagnosis of hepatic cirrhosis by transit-time analysis of an ultrasound contrast agent.*Lancet*,1999,353(9164):1579-83.

- 35 Giuseppetti GM, Argalia G, Abbattista T. Liver cirrhosis: evaluation of haemodynamic changes using an ultrasound contrast agent. *Eur J Radiol*,2004,51(1):27-33.
- 36 郭梦安,廖锦堂.肝硬化肝功能分级的超声造影定量分析.中国医学影像技术,2009,25(10):1824-6.
- 37 张莉,段云友,张勇等.超声造影指导肝纤维化分级的初步研究.中华超声影像学杂志,2007,16(7):616-9.
- 38 林希元,丁红,范培丽等.超声造影定量分析技术评估大鼠肝纤维化程度的初步研究.上海医学影像,2008,17(1):56-8.
- 39 Lim AK, Patel N, Eckersley RJ, et al. Hepatic vein transit time of SonoVue :a comparative study with Levovist.*Radiology*,2006,240(1): 130-5.
- 40 解丽梅,郭启勇,刘鑫.超声造影评价肝纤维化.中国医学影像技术,2009,25(8):1447-9.
- 41 丁红,李娜,林希元等.超声造影评估肝纤维化程度的可行性及定量参数筛选.复旦学报(医学版),2010,37(3):265-68,273.
- 42 丁红兵,陈永鹏,冯筱榕.慢性乙型肝炎肝纤维化分期与血清肝纤维化标志物的相关性分析.中华肝脏病杂志,2001,9(2):78-80.
- 43 刘道洁,孙琳,刘芳等.化学发光法在肝纤维化血清学指标检测中的应用.医学理论与实践,2008,21(7):768-9.
- 44 吴正林,吴意,叶军等.血清中肝纤维化指标测定在肝病中的应用价值.国际检验医学杂志,2011,32(1):31-2.
- 45 Macwell P, Flisiak R. Change in serological biomarkers of liver function and connective tissue turnover in chronic hepatitis B during lamivudine therapy. *Biomarkers*,2005,10(6):475-48.
- 46 李媛媛,田苗.肝纤维化和血清标志物联合检测在肝病诊断中的作用.贵阳医学院学报,2005,30(1):39-40.
- 47 贾长河.肝纤维化血清学诊断指标.实用诊断与治疗杂志,2006,20(1):34-8.

附录

个人简历

1 个人简历:

詹韵韵，女，1985年11月出生，中共党员

2000年9月-2003年7月凤台县第一中学 高中

2003年9月-2008年7月蚌埠医学院 医学影像系 本科

2009年9月-至今 安徽医科大学 影像医学与核医学 硕士研究生

2010年3月-至今 安徽医科大学第二附属医院超声诊断科 实习

2010年10月-2011年3月 中国人民解放军总医院超声诊断科 实习

2 发表论文:

发表刊物名称: 安徽医科大学学报

卷册号: 47(4)

页码 468-71 页

年月: 2012年4月

论文署名: 《超声造影评价肝纤维化程度的临床应用价值》

作者排序: 詹韵韵 张新书 姜凡 彭梅 解翔 单永

致 谢

在硕士毕业论文完成之际,我要向所有支持、关心、帮助过我的人们表示最诚挚的谢意!

首先由衷地感谢尊敬的导师张新书教授的谆谆教诲。三年来,张新书教授在学习、工作、生活方面给予了我无微不至的关怀,为我提供一切可能的机会进行学习和锻炼,可以说我的每一步成长,每一点成绩都凝聚着张老师的心血。本论文是在张老师的精心指导下完成的,在论文的选题,实验的进展以及文章的修改等环节,张老师的言传身教使我受益匪浅。谨向张老师致以深深的谢意!

感谢超声科姜凡主任、彭梅主任,两位主任在学习和工作中给予了极大的关心和帮助,在论文的设计和完成过程中给了我很大的帮助和指导,向两位主任致以深深的敬意!同时感谢超声科的全体老师及同学在论文完成过程中对我的帮助及在工作生活中的关心和照顾!

感谢答辩委员会各位专家教授对我的硕士研究生论文的评阅、指正。

最后,真诚地感谢我的父母和亲友,是他们对我永远不变的关心、理解和全力支持陪伴着我走过三年来的每一段时光。

综述

超声造影在肝纤维化及肝硬化诊断中的研究进展

摘要 慢性肝炎在人群中发病率很高,预计我国目前现有乙型肝炎病毒感染者 1.3 亿以上,严重威胁着人们的身体健康。肝纤维化是慢性肝病的一个中间环节,也是一个可逆的过程,早期诊断及治疗可以逆转这一病变过程,相反若不能得到及早的诊断和治疗,可进一步发展成为肝硬化,甚至癌变,转为不可逆的过程。目前肝脏穿刺组织活检仍然是诊断肝纤维化程度的“金标准”,但是作为一种有创性检查,适用范围有限且有出血等并发症。寻求一种无创、安全地评估肝纤维化程度的检查手段成为临床的迫切寻求。近年来有关超声造影评估肝纤维化及肝硬化程度的实验研究很多,本文旨在总结超声造影评估肝纤维化及肝硬化程度的进展及意义。

关键词 肝纤维化 肝硬化 超声造影

The progression of liver fibrosis and liver cirrhosis diagnosis by contrast-enhanced ultrasound

Abstract Chronic hepatitis has a high incidence in the crowd. It is estimated that about 130 million population infect hepatitis B virus in our country. This condition do great harm to people. Liver fibrosis is the intermediate links of chronic hepatitis and it is reversible. Early diagnosis and treatment can improve the condition. Otherwise it can deteriorate to liver cirrhosis, even canceration. Now liver puncture biopsy still is the gold standard of liver fibrosis' diagnosis. But it is invasive, it has limited use range and many complication. The clinicians urgently need a non-invasive and safe method. Researchers have done many investigation in recent years and this article is to summarize the progress of the evaluating liver fibrosis by contrast-enhanced ultrasound

and the significance of it.

Key words liver fibrosis/ liver cirrhosis/ contrast-enhanced ultrasound

慢性肝炎肝纤维化及肝炎后肝硬化在人群中的发病率甚高，尤其是肝硬化，给人民群众的生命健康构成了严重威胁。因此，早发现，早诊断，早治疗对于此病尤为重要。肝纤维化是慢性肝病的一个中间、可逆环节，早期准确地作出诊断并加以干预是极其重要的，如能减轻、阻断乃至逆转肝纤维化，就能在很大程度上改善慢性肝病的预后，使其不发展为肝硬化。目前诊断慢性肝炎肝纤维化和肝硬化的方法包括病理诊断、临床诊断、影像学检查及血清学检查。肝脏穿刺组织活检仍然是诊断肝纤维化程度的“金标准”，但肝脏穿刺是有创性检查，对于有如重度黄疸、凝血功能障碍等穿刺禁忌症的患者不宜采用。加之其取材部位较局限，只可反映穿刺部位的肝组织病变，且难以进行重复检查，不可连续观察肝脏病变的进展情况，对慢性肝炎临床治疗的指导作用有限。超声检查以其方便、安全、经济及较高的诊断准确性而成为肝炎、肝硬化的主要检查手段之一。常规二维超声及彩色多普勒超声检查可通过观察包括肝脏大小、肝实质回声，肝包膜改变及其他继发性改变、血流信号的改变等参数对肝纤维化及肝硬化做出诊断。但是由于缺乏量化指标其总体敏感性和特异性不够令人满意。近年来，随着新型超声造影剂及造影技术的出现，对肝脏病变的超声诊断进入了一个崭新的阶段。本文将就超声造影检查在肝纤维化及肝硬化诊断中的研究进展做一综述。

1 超声造影检查方法

1.1 超声微泡造影剂成像原理

超声造影技术起源于1968年, Gramiak 等^[1]通过左心导管注入振荡的生理盐水后，在超声心动图上偶然观察到主动脉内“云雾状”回声增强现象，自此掀开了超声造影的研究序幕。经过几十年的发展，微泡造影已由最初的经心导管注射心室造影发展到经外周静脉注射，通过肺循环进行实质脏器的超声造影。超声微泡造影

剂的平均直径仅为几微米，远远小于目前使用的超声诊断仪发射的声波波长，超声造影剂增强信号主要来自于微泡的散射信号。微泡造影剂进入血液循环后，其与周围组织声阻抗差极大，使得造影剂引起的背向散射强度大大增加，利用微泡对超声波谐振的非线性特性，使用反向脉冲谐波成像技术，从而获得造影微泡的清晰成像^[2]。造影剂为血池性示踪剂，其血流动力学效应与红细胞相似，能够动态、实时观察组织的血流充盈方式、速度与强度等，真实地反映出组织的血流灌注情况。超声造影剂微泡经周围静脉注入后，随血流通过肺循环达到肝实质。因此，肝组织中的微泡的多少也反映其血供状况。肝纤维化时，肝脏在发生纤维结缔组织异常沉积的同时，常伴微循环与血流动力学的改变。一般包括以下方面①肝内动脉、门静脉、肝静脉之间出现短路分流；②肝内血管动脉化；③患者出现肺动-静脉瘘；④患者出现心输出量增加及体循环阻力下降等高动力状态。基于超声造影的特性及肝纤维化、肝硬化时肝脏发生的血流灌注的改变,超声造影可以通过检测此时肝脏的血流灌注改变，对肝纤维化、肝硬化程度进行评估，从而为临床提供诊疗依据。

1.2 超声微泡造影剂分类

自1968年Gramiak等首次报道了注射盐水后用M型超声使主动脉根部结构显影增强提出了超声对比造影的概念。之后，微泡造影剂的声学特性不断地为人们所认识并应用于实践中。至今，微气泡超声造影剂的应用已经经历了四个阶段，现在使用的多为第三代产品，以其以SonoVue为代表，这种造影剂通过改变微泡包膜和气体内容物来延长其在血管内停留时间，提高其稳定性。气泡包膜由不透气的生物高聚物或稳定的脂质体组成，气体内容物为惰性气体。第四代微泡造影剂，即靶向微泡造影剂，目前还属于研究阶段，其携带有靶向配体可以靶向成像或携带药物、基因具有治疗作用。利用靶向超声造影剂与靶组织特异性结合，可在疾病发生的早期在分子或细胞水平对靶组织特异性显像^[3]。

表1列举了几种常用的超声微泡造影剂

Tab1:common ultrasound contrast agent

造影剂	气体成分	稳定剂	半衰期
第一代造影剂（不能经过肺循环） 手摇生理盐水等产生气泡	空气	无	<5min
第二代造影剂（不能经过肺循环） Levovist	空气	声振白蛋白	<5min
第三代造影剂（可经过肺循环） Sonovue	六氟化硫	磷脂	> 5min
第四代造影剂（可通过肺循环并具有器官 特异性） Sonazoid	氟烷	表面活性剂	> 5min

目前临床上使用的超声微泡造影剂主要为声诺维（Sonovue），内含六氟化硫气体，微泡平均直径 2.5 μ m，分子量大。其溶解度及弥散性低，稳定性较第二代的 Levovist 更佳，微泡更难破坏，持续增强时间更长，且无毒无害，性能安全，无需做过敏测试，病人容易接受。

1.3 微泡造影剂注射方式：团注与推注

微泡造影剂注射方式分为团注与推注两种，团注即3~5s内将造影剂全部推入，推注即30s匀速推入造影剂。尹珊珊等^[4]应用造影剂SonoVue及匹配成像技术观察不同注射方法对肝硬化患者的肝动脉、门静脉以及肝脏实质的灌注规律的影响。推注速度分2种：其中15例肝硬化患者采用团注法；11例肝硬化、8例对照者采用推注法。结果团注法肝动脉、门静脉显影时间，达峰值时间以及肝实质增强峰值时间均比推注法提前，肝动脉显影时间(14.80 \pm 4.96)s vs(19.45 \pm 10.16)s，肝动脉达峰时间(22.80 \pm 5.87)s vs(27.45 \pm 11.99)s，门静脉显影时间(26.67 \pm 6.92)s vs(39.36 \pm 11.89)s，门静脉达峰时间(33.87 \pm 6.06)s vs(39.36 \pm 11.89)s，肝实质达峰时间(35.93 \pm 9.71)s vs(60.91 \pm 15.67)s。除肝动脉时相外，其余各时相差异有统计学意义(P<0.05)。但肝硬化患者的上述时相均与患者的Child—Paugh分级无相关性。推注法肝硬化的门静脉显影时间与肝实质增强峰值时间均较正常肝脏显著延长，均为P<0.05；肝动脉显

影时间、达峰值时间以及门静脉达峰值时间均与正常组差异无统计学意义。由此可见不同的造影剂推注方式对结果可能有着影响。

2 超声造影在慢性肝炎肝纤维化及肝硬化诊断中的应用

2.1 肝脏血流造影定量参数的研究

肝静脉到达时间 (hepatic vein arrival time, HVAT) : 从注射超声微泡造影剂到肝静脉内首次出现造影剂微泡的时间或从注射超声微泡造影剂到较基线强度上升10%所需时间。1999年Albrecht等^[5]率先提出利用超声造影剂的肝静脉到达时间诊断肝硬化。其观察了11例正常人, 12例非肝硬化弥漫性肝病, 15例肝硬化患者。研究结果发现在肝硬化组与正常对照组或者非肝硬化弥漫性肝病组间, 差异有统计学意义, 肝硬化组HVAT较正常对照组或者非肝硬化弥漫性肝病组提前。而正常对照组与非肝硬化弥漫性肝病组间的比较则没有统计学意义。其中HVAT以24s为界值诊断肝硬化时, 敏感性为100%, 特异性为96%。所有肝硬化病人的HVAT均低于24S, 而非肝硬化的病人及正常人中仅一例低于24S。同时并未发现HVAT与Child分级相关。Albrecht等对此研究结果做出解释, 认为这与肝硬化时肝内肝外的血流动力学异常改变有关, 包括: ①肝内血管动脉化(Arterialisation)而使造影剂于动脉期早期就大量到肝内; ②肝内肝动脉、门静脉及肝静脉间出现大量短路分流(Intrahepatic shunts); ③肝硬化时也可出现大量肺动静脉分流(Pulmonary arteriovenous shunts)而使造影剂提前到达肝内; ④心输出量增加及体循环阻力的下降也对通过时间的提前起一定作用。随后其他研究者也进行了类似的研究, 并支持Albrecht等的研究结果。

Hirota M^[6]等采用脉冲反向谐波成像观察了9例正常人, 20例非肝硬化慢性肝病患者及20例代偿期肝硬化患者, 发现HVAT在肝硬化组较非肝硬化组 ($P<0.05$), 正常对照组 ($P<0.01$) 明显缩短。以HVAT $<24S$ 诊断肝硬化的敏感性85%, 特异性85%, 准确率85%。说明超声造影可以反映代偿期肝硬化肝内血液动力学改变。

Bang等的研究中所有正常对照组肝静脉通过时间均大于30S，而肝硬化病人均小于20S，差别有统计学意义^[7]。Sugimoto等的研究中非肝硬化病人的HVAT均大于26S，而肝硬化病人均小于21S，两者间差别有统计学意义。该研究还同时观察到肝动脉和门静脉的到达时间在肝硬化病人和非肝硬化病人间差别无统计学意义^[8]。张晓丽等采用20只新西兰大白兔应用四氯化碳腹腔注射法进行早期肝硬化造模，采取自身对照，结果显示造模后HVAT为(9.20±1.09)s，造模前(11.88±1.30)s，两组间比较差异有统计学意义(P<0.01)^[9]。

Giuseppetti等的研究中HVAT在肝硬化病人组与慢性肝病组、正常对照组及非肝硬化组(包括慢性肝病组和正常对照组)间比较有统计学意义。其中肝硬化组病人的HVAT均少于17s，而非肝硬化组病人均大于17s。Giuseppetti等还发现，Child C级的HVAT较Child A级短且有统计学意义(Child B级病例仅一例，不予比较)^[10]。Blomley MJ等对39例肝病患者进行了研究，其中9例无明显肝纤维化，10例肝纤维化，20例肝硬化。经研究得出肝硬化组与正常对照组比较肝静脉HVAT有统计学意义，但肝纤维化组(无肝硬化)与肝硬化组比较无统计学意义。肝纤维化组与正常对照组比较接近于有统计学意义(P=0.072)。如果以低于24S作为界点时，诊断肝硬化的敏感性为100%，特异性为83.35% (15 / 18)，有3例肝纤维化病人到达时间低于24s，而所有正常对照组均大于25s。同时Blomley等的研究发现Child各级的HVAT与正常对照组的比较均有统计学意义^[11]。郭梦安、廖锦堂等选择Child各级的肝硬化患者进行超声造影，结果显示肝硬化患者的HVAT随着肝功能分级的加重而缩短，说明HVAT与Child各级有着相关性^[12]。

Lim等对85例丙肝病毒感染的病人进行检查，根据他们的肝纤维化程度和炎症严重程度分为轻度肝炎组、中重度肝炎组和肝硬化组，并与正常对照组比较。其中肝静脉HVAT正常对照组与轻度肝炎组比较无统计学意义，但对照组与中重度肝炎组和肝硬化组两两比较有统计学意义。以≤21s作为诊断肝硬化的界值，敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为100%、80%、74%、100%；而以HVAT>28s作为诊断轻度肝炎的界值，敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为95%、86%、70%、98%。并认为肝静脉HVAT与肝纤维化程度关系密切(r=-0.73，

$P=0.001$)^[13]。

肝动、静脉渡越时间 (VAT)、门、肝静脉渡越时间(VVT) : 肝动、静脉渡越时间 (VAT) 即造影剂肝静脉达到时间与肝动脉达到时间之差。门、肝静脉渡越时间(VVT)即造影剂肝静脉到达时间与门静脉达到时间之差。Hirota M^[6]等发现肝硬化组的VAT、VVT较非肝硬化组($P<0.05$), 正常对照组($P<0.01$)明显缩短。以VAT $<11s$ 诊断肝硬化时, 敏感性100%,特异性90%,准确率95%; 以VVT $<6s$ 诊断肝硬化时, 敏感性100%,特异性90%,准确率95%。VAT $<11s$, VVT $<6s$ 可以用于诊断肝硬化。Sugimoto^[8]等对肝硬化及非肝硬化病人的超声造影研究中观察了VVT、VAT、HA-PV (肝动脉到达时间与门静脉达到时间之差)、HV的上升时间(肝静脉到达和达峰的时间差)及HV的上升率、PV的上升时间(门静脉到达和达峰的时间差)及PV的上升率等。结果发现HV的上升时间及HV的上升率在肝硬化病人和非肝硬化病人间差异有统计学意义。肝硬化组VVT、VAT较短,HV的上升时间较短, HV的上升率较高, 并且肝硬化病人的时间—强度曲线呈急升曲线(rapid—rising curve), 而非肝硬化病人的曲线则呈渐升曲线(gradual—rising curve); HA-PV、PV的上升时间及PV的上升率, 检查组间无统计学意义。Sugimoto等认为正常人造影剂由肝动脉进入肝窦汇入肝静脉前受到门静脉血流的稀释, 浓度不高, 所以强化程度较低, 观察不明显, 随后造影剂进入门静脉并流入肝静脉时, 肝静脉才真正得到明显强化, 同时枯否细胞(Kupffer cells)吸收了一部分造影剂也起一定作用; 而在肝硬化病人中, 由于存在广泛动静脉短路分流, 造影剂可以从肝动脉直接进入肝静脉而不需受到门静脉血流的稀释。这就是肝硬化病人与非肝硬化病人曲线差异的原因。

解丽梅等选取32例慢性病毒性肝炎患者及6例健康对照组进行超声造影检查, 发现VAT、VVT均随着肝纤维化程度加重而缩短, 与肝纤维化程度呈负相关, 相关系数为 $r=-0.57$, $r=-0.57$ ^[14]。李娜等选取67例慢性乙型肝炎患者及12例临床典型的肝硬化患者行超声造影检查。经实验得出VAT、VVT、PA-HV(肝实质到达时间与肝静脉到达时间之差)均随着肝纤维化程度加重而缩短, 与肝纤维化程度呈负相关, 相关系数为 $r=-0.5107$, $r=-0.7645$, $r=-0.4032$,其中VVT在轻、中、重度的差异均有统计学意义, VAT、PA-HV在轻度与中度、轻度与重度之间差异有统计学意义^[15]。

颈动脉延迟时间 (carotid delay time, CDT): CDT是指肝静脉和颈动脉的到达时间差。Blomley^[11]等认为由于肝硬化时肝外血流动力学也有改变,例如肺动静脉分流,这对肝静脉到达时间的结果有混杂,观察这个参数的目的就是减小肝外异常血流动力学改变的影响。所以在观察肝静脉通过时间的同时也观察了颈动脉的到达时间,结果发现如果以CDT小于10s作为诊断界值,诊断肝硬化的敏感性是100% (与肝静脉HVAT相同),特异性为89%。Lim^[13]等研究中CDT正常对照与中重度肝炎、肝硬化,轻度肝炎与中重度肝炎、肝硬化,中重度肝炎与肝硬化均有统计学意义($P<0.05$)。但正常对照组与轻度肝炎组比较无统计学意义,然而与肝静脉通过时间比较P值较低,并认为可以不观察CDT以简化研究。

阻力指数 (resistance index, RI): RI是可以用来表现患者肝血管血流学特点的指标,计算公式是 $RI = (\text{收缩期峰值流速} - \text{舒张期流速}) / \text{收缩期峰值流速}$ 。

Gaiani 等^[16] 观察12例肝硬化患者,12例健康人作对照。静脉注Levovist2.5g,分别在5-8min,12-15min 观察肝动脉,脾动脉,肠系膜上动脉。在5-8min肝硬化组肝动脉(0.80 ± 0.07 vs 0.71 ± 0.06 ; $P<0.01$),脾动脉(0.72 ± 0.06 vs 0.64 ± 0.06 ; $P<0.01$) 阻力指数有明显升高。在注药后12-15min期间,RI值又回复至原基础值水平。这种变化有统计学意义。而在正常对照组中则观察无此改变。Stefano Gaiani等还同时研究门静脉内径、门静脉速度及肠系膜上动脉RI值,并未发现有统计学意义的改变。Gaiani等认为这可能是由于在肝硬化病人,微泡暂时储积在异常的肝脏和脾脏血管循环中,引起血管内空间减小,而阻力增大,后期(12-15min)微泡基本被清除后,RI值又回复正常。

2.2 肝实质造影定量参数的研究

Kaneko等^[17]利用脉冲反相成像观察注射Levovist后肝实质峰值强度变化。6例患者,根据肝实质病理结果分为:肝实质正常(15例)、慢性肝炎(18例)、肝硬化(27例)。造影后肝实质峰值强度:正常肝脏 144.5 ± 29.1 ,慢性肝炎 133.6 ± 26.1 ,肝硬化 102.6 ± 18.0 ,肝硬化与正常人、慢性肝炎之间差异有统计学意义(均为 $P<0.01$),认为超声造影可以反映肝纤维化程度。平均肝实质峰值强度 122.4 ± 29.8 ,肝纤维化指数 0.0439 ± 0.0278 ,肝实质峰值强度与肝纤维化指数呈负相关($r=-0.809$, $P<0.01$)。

作者认为其机制在于造影剂微泡性质稳定，可以被肝窦和网状内皮系统的吞噬细胞吞噬，使实质回声增强^[18]。随着肝病的发展，肝脏出现肝纤维化、肝硬化，肝硬化血管阻力增高致使门静脉灌注减少。这种减少可以通过肝血管动脉化及肝动脉灌注增多补偿，但是，这种代偿不能完全弥补肝脏总灌注量的减少，大量肝内血管分流导致微泡在肝实质积聚减少。其次，肝硬化肝实质密度增大，声衰减增多，也造成肝实质峰值强度减少。

解丽梅^[19]等利用四氯化碳制作大鼠肝纤维化模型，观察注入Sonovue后大鼠的肝实质的峰值强度变化及其与IV胶原纤维（CIV）、层粘连蛋白（LN）免疫组化染色阳性反应面积百分比的相关性。按照病理肝纤维化分期：对照组11只，S₁期9只，S₂期8只，S₃期9只，S₄期11只。造影后肝实质峰值强度：对照组： 20.611 ± 2.582 ，S₁期： 22.130 ± 0.178 ，S₂期： 22.798 ± 0.679 ，S₃期： 17.024 ± 2.138 ，S₄期： 16.803 ± 2.747 。C-IV的免疫组化染色阳性反应面积百分比：对照组： 0.365 ± 0.149 ，S₁期： 0.804 ± 0.196 ，S₂期： 0.914 ± 0.112 ，S₃期： 3.434 ± 0.459 ，S₄期： 4.516 ± 0.611 。LN的免疫组化染色阳性反应面积百分比：对照组： 0.448 ± 0.176 ，S₁期： 1.410 ± 0.484 ，S₂期： 2.233 ± 0.405 ，S₃期： 8.134 ± 1.231 ，S₄期： 10.588 ± 1.045 。S₃期、S₄期肝实质时间-强度曲线峰值强度较对照组、S₁期、S₂期降低，峰值强度、下降斜率与C-IV、LN免疫组化染色阳性反应面积百分比呈负相关。肝实质时间-强度曲线的变化可能与肝窦毛细血管化、肝内分流形成等肝内血流动力学改变有关。肝窦内皮细胞（LSEC）是肝窦壁的主要细胞，占肝脏非实质细胞总数的50%。生理条件下的肝窦内皮细胞有许多窗孔，所构成的肝窦是人体内唯一缺乏基膜结构的毛细血管，除了红细胞，血浆成分均可因此透过进入Disse间隙，从而进行物质交换与免疫应答^[20]。各种原因所导致的肝纤维化过程中一个显著的病理变化过程是肝窦毛细血管化。即肝窦内皮细胞的窗孔数目减少，出现基底膜。肝窦毛细血管化干扰了肝脏的血液循环及物质从肝窦向肝细胞运输。由不同胶原和糖蛋白介导的Disse间隙中基质的改变可诱导肝窦内皮下基膜的形成。在肝纤维化发生早期可见IVC增生，后与持续沉积的LN形成完整的基底膜，即“肝窦毛细血管化”。Herbst等通过原位杂交技术发现四氯化碳诱导的肝纤维化模型中，表达IV型前胶原RNA的细胞主要是

肝窦内皮细胞，其次是肌纤维母细胞和胆管上皮细胞，提示肝窦内皮细胞通过IV型前胶原的合成，积极参与肝窦毛细血管化的形成。肝窦内皮细胞是肝脏内皮型一氧化氮合酶（ecNOS）的主要来源。四氯化碳或胆管结扎肝纤维化模型中，虽然ecNOS mRNA 及蛋白表达水平无改变，但ecNOS合成NO的能力下降，介导肝硬化门脉高压的形成，使得肝脏门静脉血流灌注减少，肝实质血供减少。因此，随着肝纤维化程度的加重，CIV及LN的免疫组化染色阳性反应面积百分比的提高，肝实质血管的减少，超声造影后肝实质峰值强度出现下降趋势。张关亭等国内部分学者^[21-22]通过对肝纤维化患者的血清学指标观察，显示其CIV与LN同样随着肝纤维化程度的加重有着不同程度的升高，这与动物实验的结果是一致的。李娜等选取67例慢性乙型肝炎患者及12例临床典型的肝硬化患者行超声造影检查。肝实质时间-强度曲线中门静脉和肝实质的PI（峰值强度）、ISI（强度增量）和AUC（曲线下面积）均随肝纤维化程度的增加而降低，但仅门静脉的PI、ISI和肝实质的ISI与纤维化程度有相关性（ $P<0.05$ ）。门静脉的PI、ISI及肝实质的ISI与纤维化程度的相关系数分别为 $r=-0.4310$ 、 $r=-0.4608$ 和 $r=-0.2803$ ，其中门静脉PI和ISI在轻度和重度组间差异统计学意义（ $P<0.05$ ）。作者认为可能原因是随着肝纤维化时纤维间隔形成，小叶间静脉及肝静脉窦受压而导致门静脉的回流受阻，出现门静脉和肝实质的血流灌注降低造成的^[15]。

综上所述，肝脏超声造影对于慢性肝炎肝纤维化及肝硬化的研究已经取得相当大的进展，肝纤维化、肝硬化与正常肝脏的肝脏通过时间大多数研究显示有显著差异，肝纤维化、肝硬化的肝脏通过时间明显提前，此点具有重要的鉴别诊断意义。由于超声造影应用于肝脏弥漫性病变的诊断时间有限，造影剂的种类、剂量及推注方式，成像方式及后处理的方式尚无统一标准，且各种指标的敏感性 & 特异性还有待于进一步研究。因此，应用超声造影检查应用于慢性肝炎肝纤维化及肝硬化断还需继续探索，以建立特异性强、能反映肝纤维化程度的评估参数，健全简便易行且准确性高的诊断及评估体系。

参考文献

- 1 Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol*,1968,3(5):356-66.
- 2 Albrecht T, Urbank A, Mahler M, et al . Prolongation and optimization of Doppler enhancement with a microbubble US contrast agent by using continuous infusion: preliminary experience. *Radiology*, 1998, 207 (2) : 339-47.
- 3 朱学功.微气泡超声造影剂工作原理及其临床应用.中国医学装备.2011,8(1):52-3.
- 4 尹珊珊,严昆,戴莹,等.实时灰阶超声造影对肝硬化定量诊断的初步探讨.中国医学影像技术,2004,20(5):731-3.
- 5 Albrecht T, Blomley MJ, Cosgrove DO ,etal . Non-invasive diagnosis of hepatic cirrhosis by transit-time analysis of an ultrasound contrast agent. *Lancet*,1999,353(9164):1579--83.
- 6 Hirota M, Kaneko T, Sugimoto H ,etal . Intrahepatic circulatory time analysis of an ultrasound contrast agent in liver cirrhosis. *Liver Int*,2005,25(2):337-42.
- 7 Bang N, Nielsen MB, Rasmussen AN, etal . Hepatic vein transit time of an ultrasound contrast agent: simplified procedure using pulse inversion imaging. *The British Journal of Radiology*, 2001,74 (884):752-5.
- 8 Sugimoto H, Kaneko T, Hirota M, etal . Earlier hepatic vein transit-time measured by contrast ultrasonography reflects intrahepatic hemodynamic changes accompanying cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 2002,37(5):578-83.
- 9 张晓丽,钱林学,谭小蕖等.超声造影诊断早期肝硬化的实验研究.中国超声医学杂志,2009,25(6):539-41.
- 10 Giuseppetti GM, Argalia G, Abbattista T. Liver cirrhosis: evaluation of haemodynamic changes using an ultrasound contrast agent. *European Journal of Radiology*,2004,51(1):27-33.

- 11 Blomley MJ, Lim AK, Harvey CJ, et al. Liver microbubble transit time compared with histology and Child-Pugh score in diffuse liver disease: a cross sectional study. *Gut* 2003,52(8): 1188-93.
- 12 郭梦安,廖锦堂.肝硬化肝功能分级的超声造影定量分析.中国医学影像技术, 2009,25(10):1824-6.
- 13 Lim AK, Taylor-Robinson SD, Patel N, et al. Hepatic vein transit times using a microbubble agent can predict disease severity non-invasively in patients with hepatitis C. *Gut*,2005,54(1):128-133.
- 14 解丽梅,郭启勇,刘鑫.超声造影评价肝纤维化.中国医学影像技术,2009,25(8):1447-9.
- 15 李娜,丁红,林希元等.超声造影评价肝纤维化的可行性及定量参数的筛选.复旦学报(医学版) 2010,37(3):265-8.
- 16 Gasparini C, Bertolotto M, Croce SL, et al. Evaluation of Liver Parenchymal blood flow with contrast-enhanced US: preliminary results in healthy and cirrhotic patients. *Acad Radiol*,2003,10(8): 869-76.
- 17 Kaneko T, Teshigawara O, Sugimoto H, et al. Signal intensity of the liver parenchyma in microbubble contrast agent in the late liver phase reflects advanced fibrosis of the liver. *Liver Int*,2005,25(2): 288-93.
- 18 Forsberg F,Goldberg BB, Liu JB, et al. Tissue-specific US contrast agent for evaluation of hepatic and splenic parenchyma. *Radiology*,1999, 210(1):125-132.
- 19 解丽梅,郭启勇,刘鑫.超声造影肝实质时间-强度曲线评价大鼠肝纤维化的实验研究.中国超声医学杂志.2009,25(10):924-6.
- 20 闫蕾.肝脏-一个新的免疫器官.国际内科学杂志.2009,36(4):206-10.
- 21 张关亭.4种血清学指标对肝病患者肝纤维化的诊断意义.医药论坛杂志.2010, 31(11):50-1.
- 22 王建荣.30例肝纤维化患者临床检验血清学指标检测.吉林医学.2011,32(21):4327-7.