

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

建立肝硬化肝癌動物模式以比較 Gd(DTPA-BBA) 及  
Ferumoxide 對小肝癌的診斷價值

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-039-030-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：中國醫藥大學醫學系

計畫主持人：陳中和

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 1 月 12 日

# 結果

## 預備實驗之結果

### 一、症狀及死亡率

TAA 組大鼠會有飲水量減少體重下降、食慾下降及黃疸的情形，此組的死亡率高達 50 %。CCl<sub>4</sub> 組的大鼠體重則呈緩慢上升，偶有黃疸及血尿情形。此組死亡率較低，約 20 %。

### 二、肉眼及組織病理變化

TAA 組大鼠的肝臟除了觸感堅實之外，在肉眼下表面有白斑散佈且已呈凹凸不平、腫大、小葉邊緣變鈍及顆粒樣結節，切面可見到許多小結節，經由顯微鏡下觀察可見到原本只含極少量纖維的肝臟出現大量結締組織，除了門脈附近之外，主要環繞在膽管周圍，肝臟實質已被結締組織區隔成偽小葉狀。大多數的肝細胞還算正常，只有部分呈水樣變性、壞死或空泡化。膽管增生得非常厲害，因此判斷其腫瘤型態屬於膽管癌(Cholangiocarcinoma)，腫瘤隨著膽管的位置呈瀰漫性分佈。

CCl<sub>4</sub> 組的大鼠肝臟在肉眼檢查下較為蒼白、小葉邊緣變鈍，體積則明顯腫大且觸感較硬，部分大鼠可見到肝臟有白斑及許多顆粒樣的結節而使表面呈凹凸不平。在顯微鏡下可觀察到有指部分肝細胞有壞死或空泡化的情形，肝臟實質中也出現大量結締組織，分佈位置主要在門脈附

近。接種的腫瘤細胞核大而濃染，腫瘤外圍並有莢膜包圍，與正常肝實質有明顯的區隔。

### 三、肝臟纖維含量分析

經 Free Max Image Analysis System 分析，發現 TAA 組大鼠肝臟中的纖維含量達到 11.78%，而 CCl<sub>4</sub> 組的大鼠的纖維含量則為 6.01%。

### 四、磁共振影掃瞄

TAA 組大鼠在影像中可見到肝臟腫大且呈明顯的不均質樣，但無法確定腫瘤的位置及範圍。而 CCl<sub>4</sub> 組的大鼠的肝臟則較 TAA 組均質，與腫瘤的界線也較為清楚。

## 正式實驗之結果

### 一、病理學檢查

#### 肉眼病變

對照組大鼠肝臟外觀正常，而大鼠肝臟在肉眼檢查下較為蒼白、小葉邊緣變鈍，體積則明顯腫大且觸感較硬，部分大鼠可見到肝臟有白斑及許多顆粒樣的結節而使表面呈凹凸不平。在顯微鏡下可觀察到有指部分肝細胞有壞死或空泡化的情形，肝臟實質中也出現大量結締組織，分佈位置主要在門脈附近。接種的腫瘤細胞核大而濃染，有絲分裂明顯，腫瘤外圍並有結締組織包圍，與正常肝實質有明顯的區隔。腫瘤中央則

因生長太快、血液供應不足，可見腫瘤細胞核濃縮與核破裂溶解的壞死現象。

全部共 33 顆腫瘤， 0.5 公分的有 18 顆， 1 公分有 8 顆， > 1 公分的有 7 顆。

### 肝臟膠原纖維含量分析

對照組與實驗組切片分別以 MT stain 染色，可清楚見到肝臟中成淺綠色之膠原纖維的分佈情形。經 Free Max Image Analysis System 分析肝臟中膠原纖維所佔的比例，結果發現對照組大鼠膠原纖維含量約佔肝臟的  $1.12 \pm 0.02\%$ ，而實驗組的大鼠的膠原纖維含量則為  $7.47 \pm 0.34\%$ 。與對照組相較，實驗組大鼠肝臟中的膠原纖維含量有極顯著性的增加( $p < 0.01$ )。

### 磁共振影掃瞄

#### (一)SNR

##### Unhanced

在肝臟部分：

以 Independent t test 分析，結果發現經  $\text{CCl}_4$  誘導後，實驗組大鼠肝臟的 T1 SNR 有極顯著的下降( $p < 0.01$ )；但與對照組間的 T2 SNR 則無顯著差異。與肝臟纖維量作回歸分析後，T1 SNR 與纖維量的回歸有意義，得到的回歸係數為 -2.014，決定係數  $R^2 = 0.347$ ，表

示 Un - enhanced T1 SNR 會隨纖維量的增加而下降。但 T2 SNR 的改變則與肝臟纖維量並無直接關係。

在腫瘤部分：

以 Independent t test 分析腫瘤 T1 SNR，結果發現實驗組大鼠腫瘤的 T1 SNR 有極顯著的下降( $p < 0.01$ )。但其 T2 SNR，在兩組之間的並無顯著差異。

### **Gd(DTPA-BBA) - enhanced**

在肝臟部分：

以 Paired t test 分析，對照組除 4 6 分鐘時有較顯著的下降外，2 4、6 8 分鐘的 SNR 並無顯著降低。實驗組則皆隨時間下降。以 Independent t test 分析實驗組各時間點的肝臟 SNR 皆較對照組低，但其中仍以 2 分鐘 SNR 的平均值較高，因此以 2 分鐘的 SNR 與 Unhanced 比較。

以 Paired t test 分析，發現對照組及實驗組大鼠肝臟組織以 2 分鐘之 T1 SNR 與打對比劑前相比，皆有極顯著的上升( $p < 0.01$ )，顯示 Gd(DTPA-BBA)能使肝臟 SNR 明顯提高。以 Independent t test 分析，發現與對照組相較，實驗組 T1 SNR 顯著的下降( $P < 0.05$ )，但與肝臟纖維量作回歸分析後，注射 Gd(DTPA-BBA)後 T1 SNR 和纖維量的

回歸無意義，表示 Gd(DTPA-BBA) - enhanced T1 SNR 的改變與肝臟纖維量並無直接關係。

在腫瘤部分：

實驗組腫瘤組織以 2 分鐘之 T1 SNR 與打對比劑前相比，以 Paired t test 分析發現皆有極顯著的下降( $p < 0.01$ )，有可能是腫瘤中央壞死造成訊號較低。而對照組和打對比劑前則無顯著差異。

### **Ferumoxide - enhanced**

在肝臟部分：

不論對照組或實驗組，大鼠肝臟組織在注射 Ferumoxide 後的 T2 SNR 以 Paired t test 分析，發現與打對比劑前相較皆有極顯著的下降( $P < 0.01$ )，顯示 Ferumoxide 能使肝臟 SNR 明顯降低。但以 Independent t test 分析發現實驗組與對照組無顯著差異。與肝臟纖維量作回歸分析後，Ferumoxide - enhanced T2 SNR 的改變與肝臟纖維量並無直接關係。

在腫瘤部分：

不論對照組或實驗組，大鼠腫瘤組織在注射 Ferumoxide 後的 T2 SNR 以 Paired t test 分析，發現與打對比劑前相較皆無顯著差異。

## **(二)RE**

## **Gd(DTPA-BBA) - enhanced**

在肝臟部分：

以 Paired t test 分析，對照組除 4、6 分鐘時有較顯著的下降外，2、4、6、8 分鐘的 RE 並無顯著降低。實驗組則皆隨時間下降。以 Independent t test 分析實驗組各時間點的肝臟 RE 與對照組皆無顯著差異，但其中仍以 2 分鐘 RE 的平均值較高，因此以 2 分鐘的 RE 與 Ferumoxide-enhanced RE 比較。

在腫瘤部分：

以 Independent t test 分析，實驗組與對照組腫瘤組織的 RE 皆無顯著差異。

## **Ferumoxide - enhanced**

在肝臟部分：

以 Independent t test 分析，發現實驗組與對照組間肝臟的 Ferumoxide - enhanced RE 有顯著差異( $p < 0.05$ )。以 Paired t test 比較 Gd(DTPA-BBA)及 Ferumoxide - enhanced RE，對照組大鼠肝臟對兩對比劑的反應相當，但實驗組則以 Ferumoxide 較佳。與肝臟纖維量作回歸分析後，Ferumoxide - enhanced RE 的改變與肝臟纖維量並無直接關係。

在腫瘤部分：

以 Independent t test 分析，發現實驗組與對照組間腫瘤的 Ferumoxide - enhanced RE 並無顯著差異。

### (三)CNR

#### **Unenhanced**

以 Independent t test 分析，結果發現實驗組與對照組大鼠間的 T1 CNR 及 T2 CNR 並無顯著的差異。且與肝臟纖維量作回歸分析後，Unenhanced CNR 的改變與肝臟纖維量並無直接關係。

#### **Gd(DTPA-BBA) - enhanced**

在肝臟部分：

以 Paired t test 分析，在不同時間點對照組及實驗組的 CNR 並無顯著降低，表示 Gd(DTPA-BBA)改善對比在 8 分鐘內的效果並沒有下降。以 Independent t test 分析實驗組與對照組各時間點的肝臟 CNR，發現皆無顯著差異，但其中仍以 2 分鐘 CNR 的平均值較高，因此以 2 分鐘的 CNR 與 Unhanced 比較。

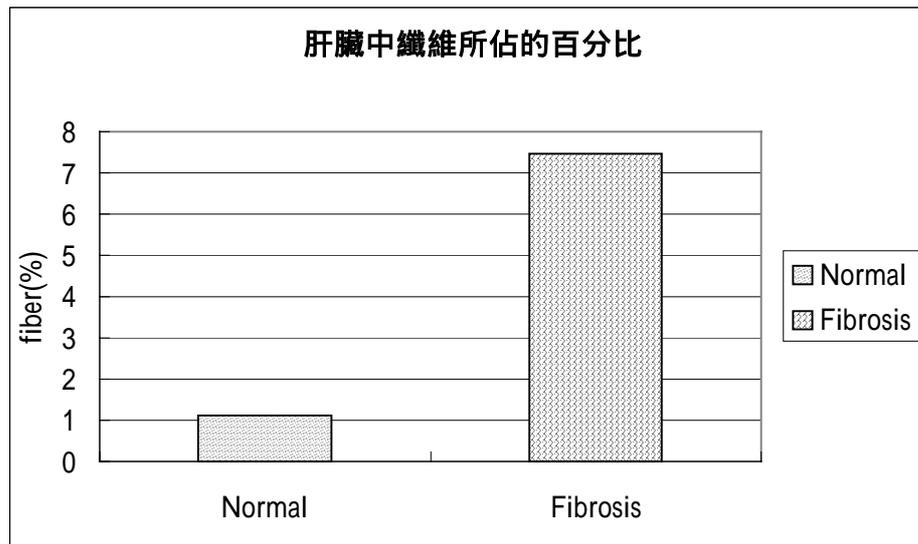
以 Paired t test 分析，發現對照組及實驗組大鼠肝臟組織以 2 分鐘之 T1 CNR 與打對比劑前相比，皆有極顯著的上升( $p < 0.01$ )，顯示 Gd(DTPA-BBA)能使肝臟與腫瘤間的對比明顯提高。

以 Independent t test 分析，發現兩組的 CNR 無顯著差異。而與

肝臟纖維量作回歸分析後，Gd(DTPA-BBA) - enhanced T1 CNR 與纖維量的回歸係數為-1.11， $R^2 = 0.201$ 。表示 Gd(DTPA-BBA) - enhanced T1 CNR 會隨纖維量的增加而下降。

### Ferumoxide - enhanced

不論對照組或實驗組，大鼠肝臟組織在注射 Ferumoxide 後的 T2 CNR 以 Paired t test 分析，發現與打對比劑前相較皆有極顯著的上升( $P < 0.01$ )。以 Independent t test 分析發現實驗組與對照組無顯著差異。而與肝臟纖維量作回歸分析後，Ferumoxide - enhanced T2 CNR 與纖維量的回歸係數為-2.022， $R^2 = 0.166$ 。表示 Ferumoxide - enhanced T2 CNR 會隨纖維量的增加而下降。

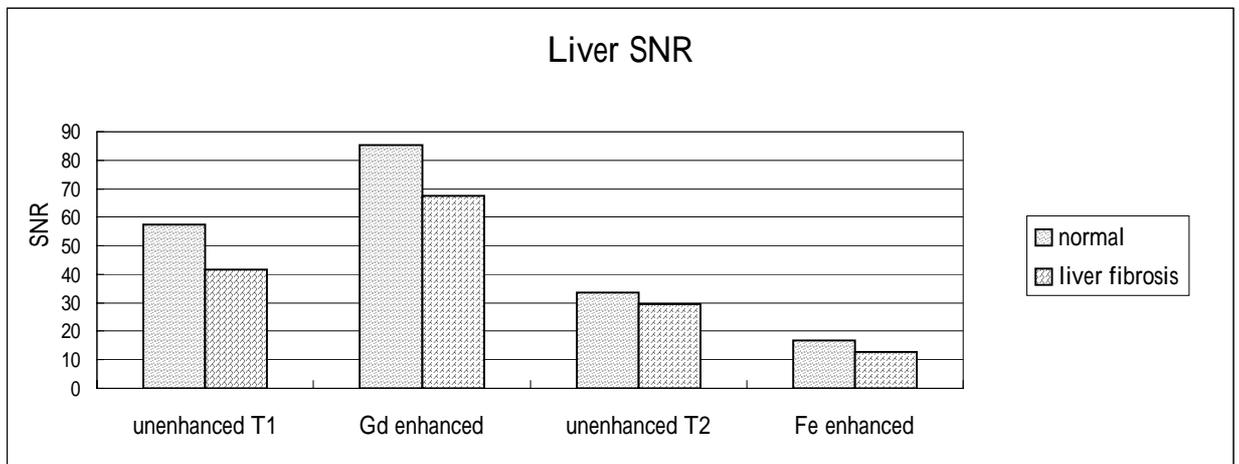


Liver SNR	T1 SNR		T2 SNR	
	Unenhanced	Gd-enhanced	Unenhanced	Fe-enhanced
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE
Control (n=7)	57.48 $\pm$ 1.31** <sup>a</sup>	85.40 $\pm$ 5.75* <sup>b</sup>	33.52 $\pm$ 3.16 <sup>a</sup>	16.70 $\pm$ 2.88** <sup>a</sup>
Treated (n=20)	41.73 $\pm$ 2.05 <sup>a</sup>	67.43 $\pm$ 4.44 <sup>b</sup>	29.64 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	12.92 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>

\*significant difference between control and treated(p<0.05).

\*\*significant difference between control and treated(p<0.01).

a-b: significant difference between Unhanced, Gd-enhanced T1 SNR and Unenhanced, Fe-enhanced T2 SNR in the same row (p<0.05).



Tumor SNR	T1 SNR		T2 SNR	
	Unenhanced	Gd-enhanced	Unenhanced	Fe-enhanced
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE
Control (n=7)	40.97 $\pm$ 1.90** <sup>a</sup>	58.43 $\pm$ 8.04* <sup>a</sup>	66.85 $\pm$ 3.82 <sup>a</sup>	64.61 $\pm$ 3.11* <sup>a</sup>
Treated (n=20)	28.07 $\pm$ 1.86 <sup>a</sup>	46.29 $\pm$ 3.72 <sup>b</sup>	57.05 $\pm$ 3.58 <sup>a</sup>	50.41 $\pm$ 3.74 <sup>b</sup>

\*significant difference between control and treated(p<0.05).

\*\*significant difference between control and treated(p<0.01).

a-b: significant difference between Unhanced, Gd-enhanced T1 SNR and Unenhanced, Fe-enhanced T2 SNR in the same row (p<0.05).

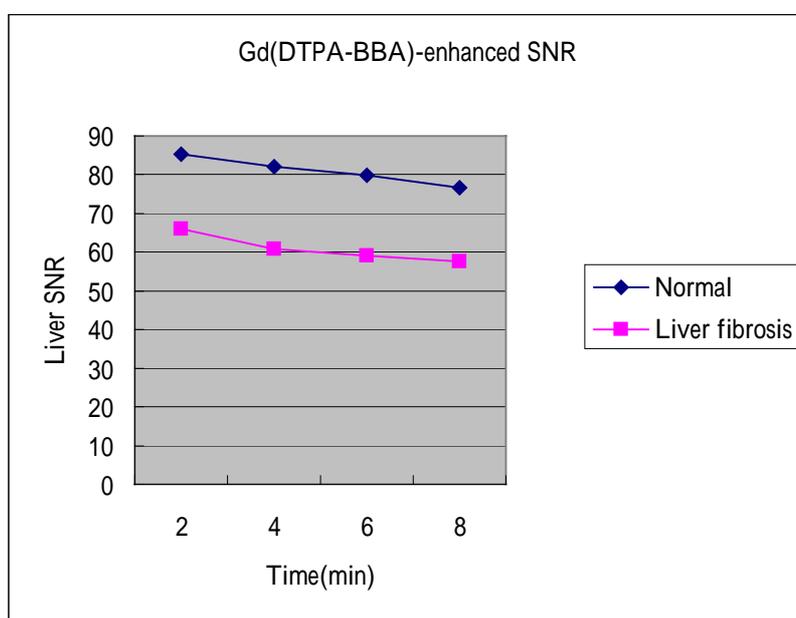
## Gd(DTPA-BBA)各時間點 SNR

Liver SNR	2 min	4 min	6 min	8 min
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE
Control (n=7)	85.40 $\pm$ 5.75* <sup>a</sup>	84.25 $\pm$ 4.82** <sup>a</sup>	81.99 $\pm$ 4.91** <sup>b</sup>	78.30 $\pm$ 5.67* <sup>b</sup>
Treated (n=17)	67.43 $\pm$ 4.44 <sup>a</sup>	61.39 $\pm$ 4.95 <sup>b</sup>	59.56 $\pm$ 4.76 <sup>c</sup>	58.20 $\pm$ 4.63 <sup>d</sup>

\*significant difference between control and treated(p<0.05).

\*\*significant difference between control and treated(p<0.01).

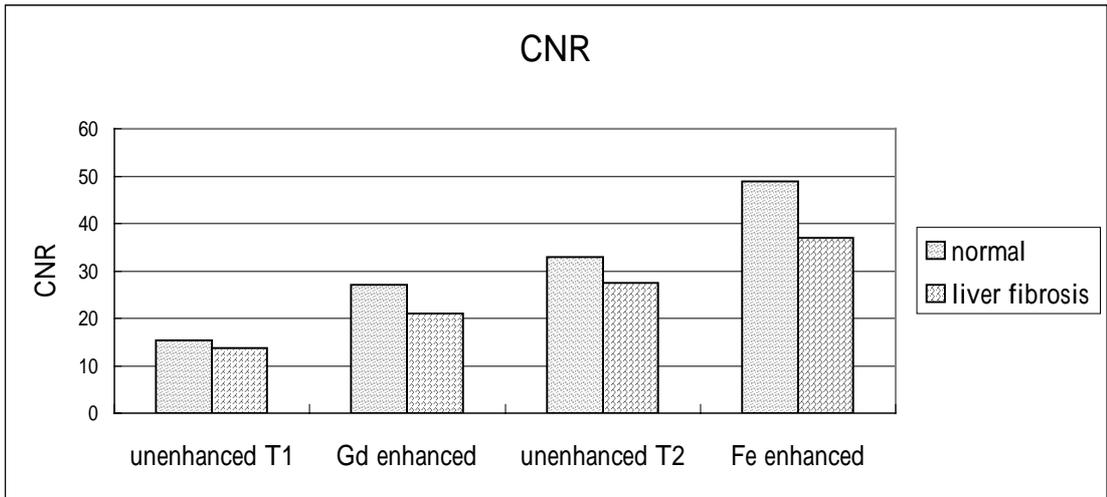
a-d: significant difference between different time in the same row (p<0.05).



CNR	T1 CNR		T2 CNR	
	Unenhanced	Gd-enhanced	Unenhanced	Fe-enhanced
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE
Control (n=7)	15.29 $\pm$ 1.32 <sup>a</sup>	26.97 $\pm$ 2.96 <sup>b</sup>	32.92 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	48.86 $\pm$ 2.97 <sup>b</sup>
Treated (n=20)	13.73 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	22.01 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>	27.50 $\pm$ 2.81 <sup>a</sup>	36.88 $\pm$ 3.66 <sup>b</sup>

No significant difference between control and treated.

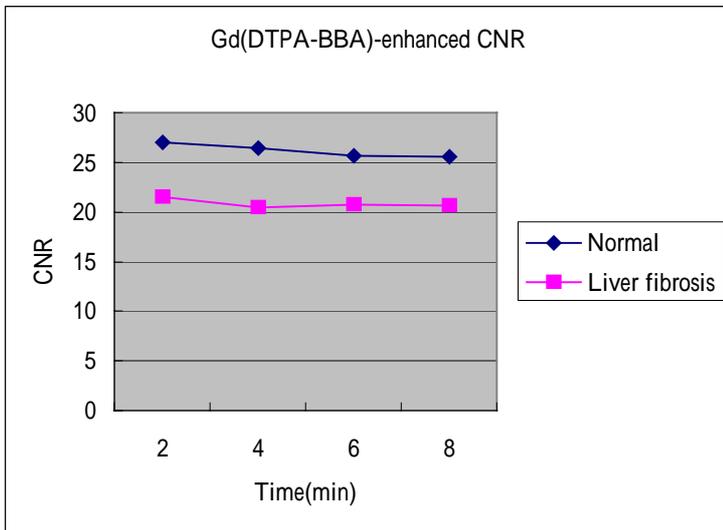
a-b: significant difference between Unenhanced, Gd-enhanced T1 CNR and Unenhanced, Fe-enhanced T2 CNR in the same row (p<0.05).



### Gd(DTPA-BBA)各時間點 CNR

Liver SNR	2 min	4 min	6 min	8 min
	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE
Control (n=7)	26.97 ± 2.96 <sup>a</sup>	26.56 ± 3.66 <sup>b</sup>	24.96 ± 3.49 <sup>ab</sup>	24.94 ± 2.86 <sup>ab</sup>
Treated (n=17)	22.01 ± 1.58 <sup>a</sup>	21.10 ± 1.72 <sup>a</sup>	21.29 ± 1.80 <sup>a</sup>	21.09 ± 1.76 <sup>a</sup>

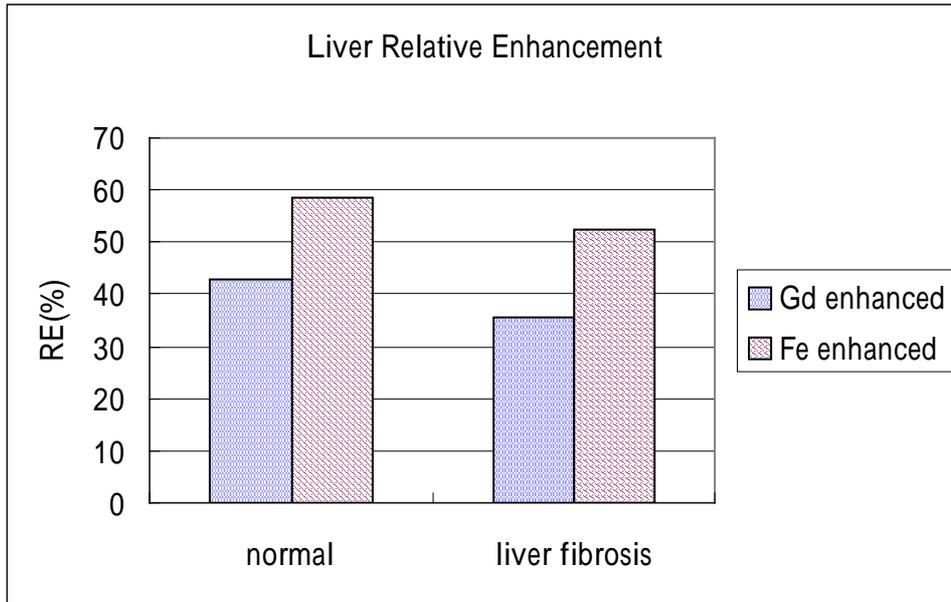
a-b: significant difference between different time in the same row (p<0.05).



Liver RE	Gd-enhanced	Fe-enhanced
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE
Control (n=7)	43.40 $\pm$ 4.89 <sup>a</sup>	58.66 $\pm$ 7.26* <sup>a</sup>
Treated (n=20)	35.70 $\pm$ 5.90 <sup>a</sup>	52.37 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>

\*significant difference between control and treated(p<0.05).

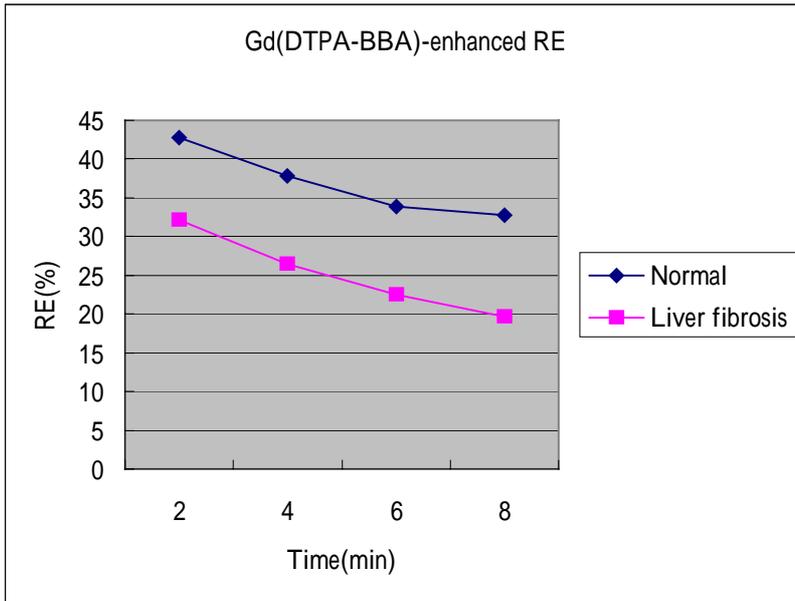
a-b: significant difference between liver RE in the same row (p<0.05).



### Gd(DTPA-BBA)各時間點 RE

Liver RE	2 min	4 min	6 min	8 min
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE
Control (n=7)	43.40 $\pm$ 4.89 <sup>a</sup>	37.99 $\pm$ 3.15 <sup>a</sup>	34.19 $\pm$ 3.35 <sup>b</sup>	33.19 $\pm$ 3.42 <sup>b</sup>
Treated (n=17)	35.70 $\pm$ 5.90 <sup>a</sup>	26.50 $\pm$ 5.78 <sup>b</sup>	22.99 $\pm$ 5.26 <sup>c</sup>	20.20 $\pm$ 5.15 <sup>d</sup>

a-d: significant difference between different time in the same row (p<0.05).

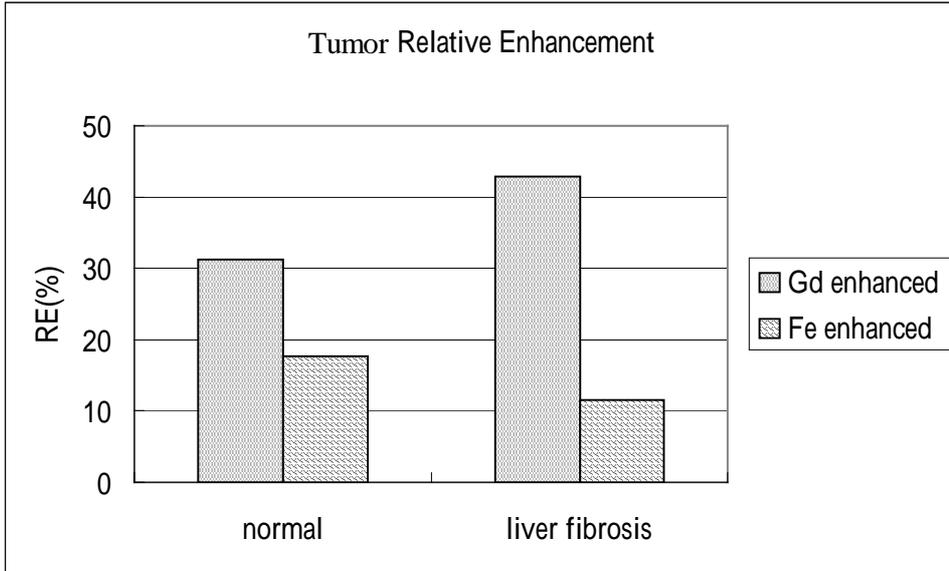


Tumor RE	Gd-enhanced	Fe-enhanced
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE
Control (n=7)	31.26 $\pm$ 8.99	17.75 $\pm$ 4.85
Treated (n=20)	42.93 $\pm$ 8.20	11.56 $\pm$ 2.17

\*significant difference between control and treated(p<0.05).

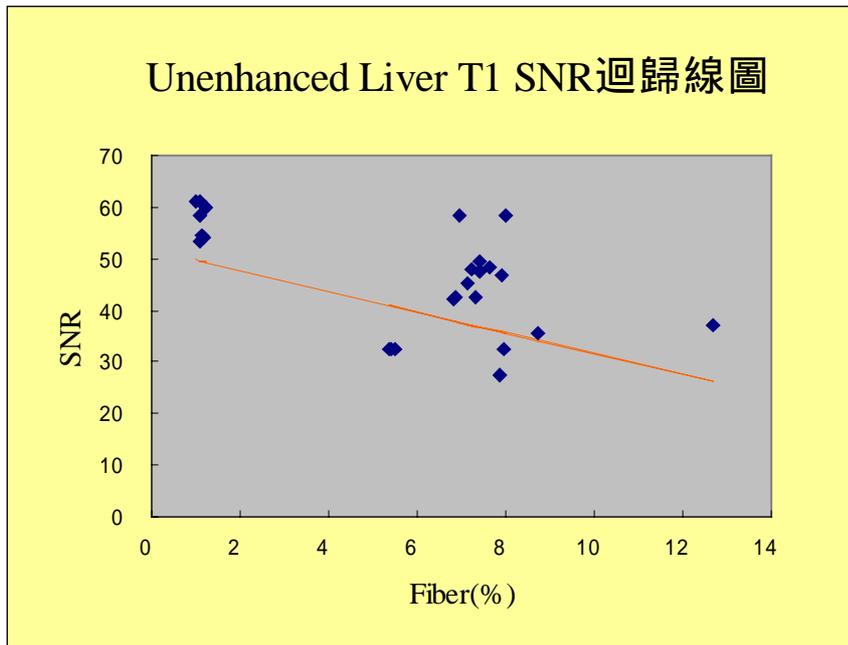
\*\*significant difference between control and treated(p<0.01).

a-b: significant difference between Unhanced and Gd-enhanced T1 SNR、 Unenhanced and Fe-enhanced T2 SNR(p<0.05).

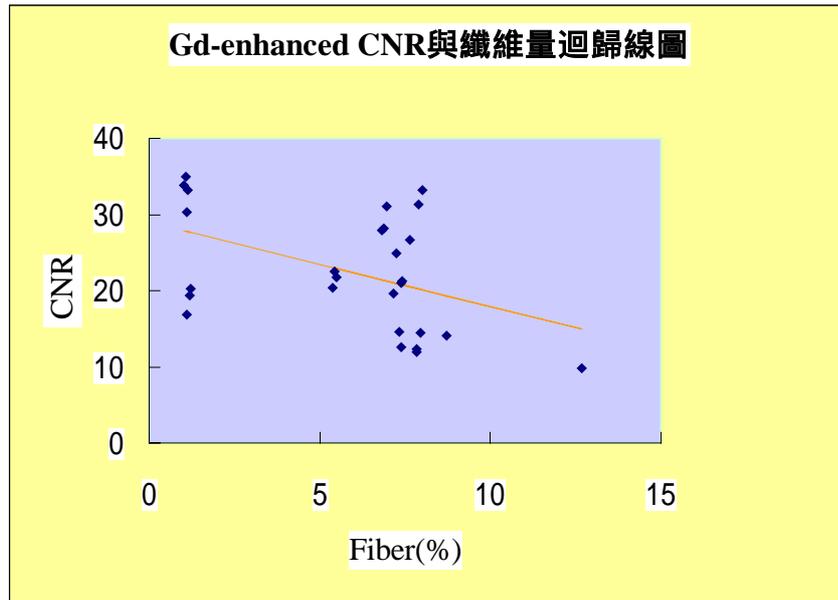


回歸線圖

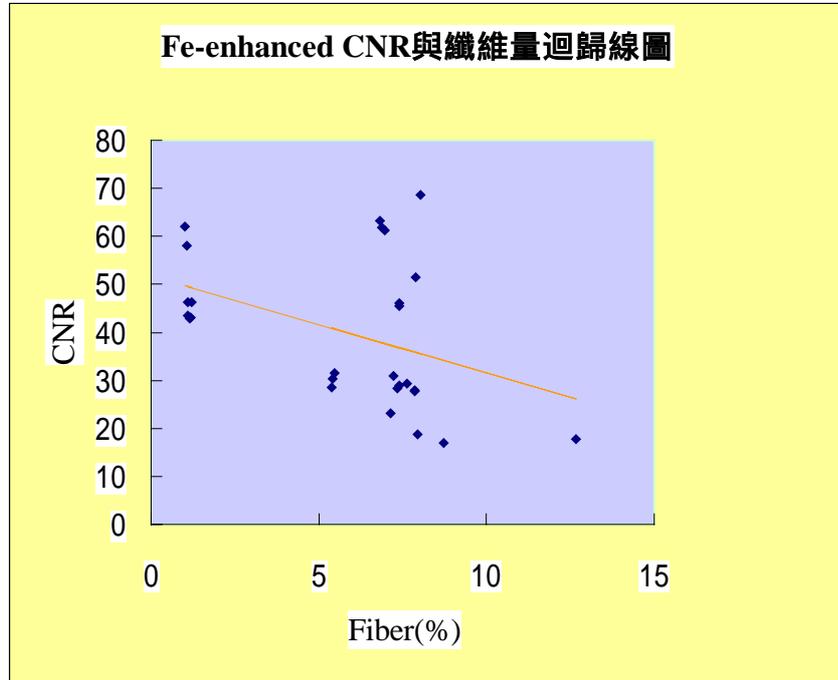
Unenhanced Liver T1 SNR-Fiber



### Gd(DTPA-BBA) CNR-Fiber



### Ferumoxide CNR-Fiber



## 討論

### 磁振造影掃瞄

由實驗數據可以得知，Gd(DTPA-BBA)及 Ferumoxide 皆能有效增強肝臟訊號，且皆能改善 N1S1 腫瘤與肝臟的對比而使偵測率提高。由實驗組與對照組可以得知，雖然增強的情形並沒有明顯受到纖維量的影響，但仍有隨纖維量增加而下降的趨勢。

Gd(DTPA-BBA)仍處於實驗階段，尚未進入臨床實驗，研究其性質的報告很少。和 Gd-DTPA 不同的是，藉由親脂性及分子量的提高，Gd(DTPA-BBA)延長了對肝臟訊號改變的時間，又其會經膽管排泄的特性，大大的增加了對肝臟的特異性。但受限於生物分佈性質，Gd(DTPA-BBA)雖會經膽管排泄，卻無法如 SPIO 被肝細胞或腫瘤細胞攝入，對腫瘤的界線也就無法像 SPIO 那麼明顯。

如 Misaaki 的發現，肝臟的 Unenhanced T1 SNR 受纖維量增加的影響，在實驗組與對照組有明顯差異，推測應該是因為大量的結締組織將肝臟區隔成偽小葉狀，因而影響 Gd(DTPA-BBA)的分佈。由於實驗中大鼠肝臟只呈現不同程度的纖維化，並未達到肝硬化，Kupffer cell 也沒有向肝硬化時大量減少甚至於消失的情形，經由組織病理學檢查，可以說明 Ferumoxide-enhanced 後肝臟 T2 SNR 並沒

有和 Gd(DTPA-BBA)一樣受到纖維量影響的現象。

除了肝臟的訊號，腫瘤的訊號亦會影響 CNR。雖然 Gd(DTPA-BBA)或 Ferumoxide-enhanced 皆有明顯的提升對比，但腫瘤的性質也會影響訊號的改變，此時相對的也會影響到 CNR，因此，與組織病理切片對照的工作也就更顯的重要。部分訊號較低的腫瘤，的確中心已可見到壞死的病理變化。對照組腫瘤的訊號較高，應與肝臟纖維量無關，可能是由於大鼠數目較少，並無法像實驗組一樣客觀的數據，若能增加對照組隻數或腫瘤的數目，以更多的數據進行分析較能瞭解其中的關係。

Van Beers 以 FSE 擷取 ferumoxide-enhanced 影像，可得到極佳的對比，本實驗中亦使用 FSE 作為 Ferumoxide 的波序，但 Marchal 則認為改以 SE 波序及較長的 TE 可使影像更好(Marchal *et al* , 1989)。波序的選用及各項參數值的設定都關係到影像及訊號，除了研究對比劑的效果之外，應比較更多不同的波序及參數，以找出最適合的設定。尤其是 Gd(DTPA-BBA)的研究尚在起步階段，各方面的資訊都不如 Gd-DTPA、Ferumoxide 完備，雖然在本實驗中對肝臟的增強效果略遜於 Ferumoxide，但對腫瘤的敏感性並沒有比較差，若能進行更多肝病變及腫瘤的動物實驗，採用更適合 Gd(DTPA-BBA)的使

用方式，也許可以得到更好的結果。

## 大鼠的麻醉

從數據中可以發現大鼠的死亡率很高，大鼠在各個實驗步驟都有可能死亡，這是本實驗中遇到的一個難題。由於啮齒動物的基礎代謝率較高，一般使用的麻醉劑量比犬貓高出許多，雖然麻醉實驗大鼠有許多種方式，但主要必須同時考慮麻醉時間的長短及動物的健康狀況才能決定麻醉的方式。肝硬化時由於肝臟的結構受到破壞而引起肝臟內血液動力學的改變，也會降低肝臟的代謝及解毒能力。Allis 在評估  $\text{CCl}_4$  對大鼠的傷害時發現，在停藥後一週大鼠的肝功能指數仍有顯著性的增加，表示其肝功能較差(Allis *et al* , 1990)。本實驗在停止給予  $\text{CCl}_4$  後，在接下來的兩週內又必須因手術及 MRI 而為大鼠進行多次的麻醉，非常容易造成大鼠的死亡。在實驗中也發現若以相同的劑量一次全部給予，實驗組的大鼠非常容易發生死亡。這些情形有可能是肝臟代謝較差的緣故。因此，改以 Ketamine (90 mg/Kg )及 Xylazine (100 mg/Kg )，並以生理食鹽水稀釋一倍，先給予 2/3 麻醉劑的方式，大多可以提供足夠的時間來進行手術或 MRI，大鼠死亡的情形也大為改善。若是設備及經費許可的話，使用吸入型的氣體麻醉劑將是比較安全的選擇，但由於磁振掃描儀具有很強的磁場，麻醉

機不能接近，而大鼠的潮氣量小，若將呼吸導管延長麻醉劑及氧氣又無法送達大鼠。因此，若能在剛停止給  $\text{CCl}_4$  而要進行手術時使用氣體麻醉，在 MRI 時再改用原本的麻醉方式，應該可以有效減少大鼠死亡的情形。

### 動物模式的選擇與探討

雖然 TAA 的動物模式誘導步驟比較單純，並不需接種腫瘤，但死亡率高且腫瘤呈瀰漫性的生長，並不適合本實驗。Kreft 指出這個動物模式較適於做肝硬化在血液動力學、形態學及肝臟功能的探討，而  $\text{CCl}_4$  動物模式則在組織病理學及血清生化學方面與人類的肝硬化相似 (Kreft *et al*, 1998)。雖然由預備實驗的結果可以發現肝臟中纖維的增加不如 TAA 組，但其誘導時間較短且死亡率較低，只要配合適當的腫瘤接種方式，便能誘導出非常適合本實驗所需的結果，是最後選擇此動物模式的原因。實驗中以餵食管給予  $\text{CCl}_4$ ，在 Proctor 的誘導方式中大鼠並未禁食，但本實驗中參考 Rosa 等的方式，事先為大鼠禁食，此種方式可確保  $\text{CCl}_4$  完全進入胃中，大鼠也不會因  $\text{CCl}_4$  誤入氣管而造成死亡，但必須做好保定，並盡量在及短時間內完成餵食，以免因大鼠掙扎而傷到食道。實驗組大鼠的肝臟經組織理學檢查大多判定為纖維化，並不如 Proctor 報告中皆達到肝硬化的程度，許多研究

皆沿用 Procter 建立的模式,但 Kreft 以相同方式誘導的結果也認為只有少數能成功的誘導出肝硬化。是否動物模式仍須進一步研究改進,或者只是人為操作造成的差異,有待進一步的探討。

## 肝臟纖維量分析

實驗誘導的肝臟纖維化或肝硬化,其分級有許多方式。有以纖維量做分級的方式,也有以病變程度來做分級:正常肝臟為 0 級,輕度纖維化為 1 級,肝臟呈廣泛的纖維化時為 2 級,肝硬化為 4 級(Clement *et al*, 1991)。本實驗考慮肝纖維及肝硬化是一連續而複雜的病變過程,各種病變不一定只出現在某一病程,且不同的人在做分級時可能會受經驗影響而有差異,因而以 Free Max Image Analysis System 來作分析,隨機並重複的計算每個肝葉的纖維量後再加以平均,如此所得的平均值應該比較客觀,也能與 MRI 所得到的數值作相關性的分析。Kreft 的研究中將大鼠分為輕度、中度纖維化及肝硬化的方式,並無法找出纖維量及訊號間的關係,而實際上從大鼠的肝臟切片中也可以證明病變及結締組織並非均勻的分佈在肝臟實質中,若以病變程度作分級或是只算某一區域的纖維量,來分析和各項數值之間的關係,可能較不客觀。實驗組大鼠肝臟纖維量的變異較大,表示對 CCl<sub>4</sub> 的反應有個體差異,但平均大約為對照組的 7 - 8 倍,與對照組相比仍有極顯著性的增加。

## 腫瘤誘導

目前已商品化的大鼠的肝腫瘤細胞株有 MH1C1、H-4-II-E、H4TG、H-4-II-E-C3、McA-RH7777、McA-RH8994，本實驗選擇 N1S1 是因為取得方便的緣故。N1S1 是以 2-dimethylaminoazobenzene 餵食雄性 SD 大鼠所誘導出來的肝腫瘤。1995 年 Lui 等試著以試著以 N1S1 細胞誘導大鼠腫瘤，結果發現，N1S1 可成功誘導出肝臟及脾臟腫瘤。其產生肝癌的能力與所注射的細胞數成正比，若能配合部分肝葉的切除，腫瘤可隨著肝葉再生而加快生長的速度，但腫瘤會在接種一個月後消失。此外，以直接接種腫瘤團塊的方式亦可在幾星期內產生肝癌(Lui *et al* , 1995)。報告中以脾臟轉移至肝臟並配合肝葉切除的接種方式，經評估後發現雖然腫瘤生長的速度較快、接種的成功率高，但並不適合本實驗。一方面切除肝葉大鼠容易死亡，一方面轉移的腫瘤呈大區域、瀰漫性的生長，在影像中很難與正常肝臟組織區分，增加了量取訊號的難度。所以後來改採局部接種的方式，腫瘤的生長速度雖然較慢，但腫瘤轉移的情形並不多(只有少數有轉移到肺臟，但並不會致死)，且腫瘤細胞會聚集在一起，和肝臟組織的區隔較佳，也比較適合本實驗的需求。但 N1S1 細胞株非常脆弱，必須嚴格控制培養液的酸鹼度來避免細胞的死亡。此外，由於 N1S1 是懸浮型的細胞，若細胞團塊

太大時，位於中央的細胞會因缺乏養分而死亡，因此每次更換培養液時必須以多次沖洗的方式來沖散團塊。在計算細胞時最好取部分做 Trypan blue 染色，確定細胞的死活，才能確保接種的皆為活細胞。

## **病理檢查**

在判讀影像時認定的腫瘤若不經病理檢查是無法確定是否為真正的腫瘤，而一般單純的病理檢查方式又沒有準確提供腫瘤位置與肝臟解剖構造之間的關係。本實驗中將取下的肝臟依照 MRI 每 5mm 做連續切面的方式，是希望盡量貼近 MRI 的影像來呈現腫瘤的位置，並提供一個參考以和影像中所見到的腫瘤做對照。雖然肝臟在取下後和在體內的角度仍有差異，這個步驟仍有其意義存在。在切開時可發現少數較大的腫瘤中央會有 色的壞死組織，由於接種後 10 天便進行 MR 檢查，大部分的腫瘤都未超過一公分，中心也沒有出現壞死的情形。實驗組大鼠的肝臟明顯的比對照組大，應與肝臟結締組織大量增加及造成血液動力學的改變有關。

## **MRI 假影**

進行 MRI、之前最好為大鼠禁食禁水。因為過多的食物會使胃漲大，肝臟受到胃的推擠後位置會稍有移動，且胃中的訊號過高會影響到靠近胃的肝臟訊號，使訊號變的較高。此外胃腸道的空氣也會影響訊

號，因此，量取訊號時盡量避開靠近血管、胃及腸道的區域，訊號才會比較準確。

## SNR

比較對照組和實驗組是為了瞭解各項數值之間的差異是否會受纖維量增加的影響。統計所得的結果和許多報告中指出的一樣，肝臟大部分的訊號值並無明顯的改變，可能的原因有：(1)在量取訊號時並無法分辨肝臟實質與結締組織，而是採大區域的訊號，而切片中又可以發現結締組織與各種病變只是零星的分佈在肝實質中，訊號可能是因此而沒有太大的改變。(2)若只比較各平均值，實驗組與對照組織間仍有差異存在，但由於實驗動物數目太少以致於標準差較大，若能增加實驗動物的數目使差異縮小，也許就能得到較理想及客觀的結果

除了理想對比劑應具有的優點之外，要作為診斷肝臟疾病的對比劑應具有肝臟特異性及加強正常肝臟組織及腫瘤之間的對比及延長造影時間的特點。攝入 T2 對比劑的程度，取決於肝臟中 Kupffer ' s cell 及內皮細胞的多寡，但在病變區中由於不含有 Kupffer ' s cell，此對比劑便不會被吸收。也由於這個特性，Kupffer ' s cell 的量會影響到對比劑的效果。這些報告都肯定了 SPI0 在肝癌診斷上的地位，但是，在正常肝臟中，Kupffer ' s cells 只佔 2%，而在肝硬化時，Kupffer ' s cells 數量減少，此時，攝入的對比劑減少，必須考慮對比也會有下

降的情形，此時，也許改良的 Gd chelates 會具較佳的診斷效果。不同程度之肝硬化會影響正常肝臟與腫瘤的對比。雖然近年來有相當多的研究都偏向於選用負對比劑，但是，在正常肝臟中，Kupffer ' s cells 只佔 2%，而在肝硬化時，Kupffer ' s cells 數量減少，此時，攝入的對比劑量勢必減少，此時便須考慮對比可能有下降的情形，也許，使用傳統的 Gadolinium 會具較佳的診斷效果。此外，近來也有一些新合成的 Gd chelates，已延長了其滯留的時間或增加其肝臟的特異性，研究結果中顯示其診斷的效果是比負對比劑好的。但是目前卻幾乎沒有同時比較正負兩種對比劑的研究報告，因此，重新比較並評估這兩種對比劑對肝硬化肝癌的診斷效果

以四氯化碳誘導後，肝臟中的纖維量明顯增加( $p < 0.01$ )，且已有不同程度的纖維化。除肝臟的 Unenhanced 及 Gd(DTPA)-enhanced T1 SNR 在對照組與實驗組間有差異外，T2 SNR、T1 CNR 及 T2 CNR 在對照組與實驗組間並無顯著差異，但經回歸分析後發現：隨纖維量的增加，訊號值仍有下降的趨勢；腫瘤的各項訊號值則無明顯改變。使用兩種對比劑後的 CNR 與造影前相較皆有極顯著差異( $p < 0.01$ )，有助於提高腫瘤的偵測率，其中 Ferumoxide 又優於 Gd(DTPA-BBA)，但兩種對比劑對肝臟訊號相對增強的效果則無明顯差異。進行影像判讀時也可以發現

Ferumoxide-enhanced 後能清楚分辨腫瘤的界線，有助於手術前的確認；而 Gd(DTPA-BBA)則使解剖構造更為清晰，可診斷除肝臟外是否有其他病灶，其增強肝臟訊號的效果在注射後 10 分鐘內並無明顯的降低，的確改善了傳統 Gd-DTPA 分佈過快的缺點，可提供更充裕的造影時間。由於生物分佈性的不同，兩種對比劑在影像中呈現不同的特性，應視診斷的需求選擇適合的對比劑，以得到最佳的影像。