

分类号_____

论文编号_____

密 级_____

海军军医大学

博士学位论文

慢性胰腺炎胰管结石临床影像学研究及纤维 化分子影像初探

Clinical imaging study of pancreatic duct stones and
preliminary study on fibrotic molecular imaging in
chronic pancreatitis

研究生姓名： 刘 日 学 号： 20162060

指 导 教 师： 陆建平 教授 海军军医大学第一附属医院

学 科、专 业： 影像医学与核医学

学 位 类 型： 学术学位

答 辩 日 期： 2019 年 5 月

二〇一九年五月

海军军医大学

博士学位论文

慢性胰腺炎胰管结石临床影像学研究及纤维化分子影像初探

Clinical imaging study of pancreatic duct stones and preliminary study on fibrotic molecular imaging in chronic pancreatitis

研究生姓名： 刘 日 学 号： 20162060

指 导 教 师： 陆建平 教授

学科、专业： 影像医学与核医学

学 位 类 型： 学术学位

答辩委员会主席： 曾蒙苏 复旦大学附属中山医院

委员： 汪登斌 上海交通大学医学院附属新华医院

王 莉 海军军医大学第一附属医院

颜志平 复旦大学附属中山医院

李文涛 复旦大学附属肿瘤医院

许亚萍 同济大学附属肺科医院

曾昭冲 复旦大学附属中山医院

答 辩 日 期： 2019 年 5 月 21 日

二〇一九年五月二十一日

目 录

摘 要.....	- 1 -
Abstract.....	- 5 -
缩略词表.....	- 10 -
前 言.....	- 12 -
参考文献.....	- 14 -
第一部分 多层螺旋 CT 对胰管结石体外震波碎石治疗疗效的定量评估价值.....	- 16 -
一、材料与方法	- 16 -
二、结果.....	- 19 -
三、讨论.....	- 21 -
参考文献.....	- 25 -
附 图.....	- 28 -
第二部分 单源双能 CT 对混合胰管结石成分的定量体外研究	- 29 -
一、资料与方法	- 29 -
二、结果.....	- 33 -
三、讨论.....	- 35 -
参考文献.....	- 39 -
第三部分 胰腺纤维化动物模型的分子磁共振诊断	- 42 -
一、材料与方法	- 42 -
二、结果.....	- 47 -
三、讨论.....	- 58 -
参考文献.....	- 62 -
综述一.....	- 66 -
综述二.....	- 86 -
在读期间发表论文和科研情况	- 98 -
致 谢.....	- 100 -

摘 要

第一部分 多层螺旋 CT 对胰管结石体外震波碎石治疗疗效的定量评估价值

目的：探讨多层螺旋 CT 定量指标对于预测胰管结石患者体外震波碎石（Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy, ESWL）清除率的价值。

方法：纳入 2014 年-2016 年在我院就诊的 106 名多发胰管结石的患者，结石全部位于胰头部。运用体外震波碎石系统进行 ESWL 治疗，每个疗程冲击波次数不超过 6000 次，当结石小于 3mm 时认为碎石成功，停止碎石。ESWL 治疗前、后均采用东芝 320 排螺旋 CT 进行上腹部扫描，利用 Philip 工作站进行图像三维重建后处理并测量定量指标。根据治疗前、后结石体积 V_0 、 V_1 ，计算结石清除率（stone clean rate, SCR）， $SCR = [(V_0) - (V_1)] / (V_0) \times 100\%$ ，并以 $SCR > 90\%$ 、 $50 \leq SCR \leq 90\%$ 和 $SCR < 50\%$ 为界将患者分为 A、B、C 三组。记录患者性别、年龄等临床特征，在治疗前 CT 图像上测量结石最大横径(maximal transverse length, MTL)、结石平均 CT 值(mean stone density, MSD)、结石 CT 值标准差(stone density standard deviation, SDSD)、结石 CT 值变异系数(variation coefficient of stone density, VCSD)、胰管直径(pancreatic duct diameter, PDD)、体表-结石距离(skin-stone distance, SSD)、ESWL 碎石次数和 HU 密度(hounsfield density, HD)，其中 $HD = MSD / MTL$ 。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，计数资料采用 $N(\%)$ 表示；首先采用单变量分析比较 A、B 和 C 三组间各个临床特征和影像学特征的组间差异，进行单变量筛选，然后将单因素分析中有统计学意义的变量 ($P < 0.20$) 纳入多因素有序 logistic 回归中，筛选 SCR 的独立预测因素， $P < 0.05$ （检验水准）时认为有统计学意义。统计分析采用 IBM SPSS 统计软件（version 21.0, Chicago, III）。

结果：本研究共纳入 106 个病例，包含 71 名男性和 35 名女性。平均年龄 45.2 ± 13.3 岁（极小值-极大值：12-75 岁）。碎石术前结石大小 MTL 范围为 3.1-36mm，结石平均体积为 $5647.8 \pm 6487.0 \text{ mm}^3$ ，术后平均体积为 $1918.8 \pm 2944.0 \text{ mm}^3$ 。所有患者接受碎石次数 1-8 次不等，平均 2.5 ± 1.3 次，平均 $SCR = (65.0 \pm 25.9)\%$ 。多因素有序 logistic 回归发现 VCSD ($\beta = -4.517$, $OR = 0.011$, $P = 0.025$) 是预测 ESWL SCR 的独立预测指标($P = 0.025$)。

结论：VCSD 是预测 ESWL 治疗胰管结石患者碎石疗效的独立预测因子。“完全清除组和部分清除组”与“清除失败组”相比较，VCSD 更小；“完全清除组”与“部分清除组和清除失败组”相比较，VCSD 更小。

关键词：慢性胰腺炎，胰管结石，CT，X 线衰减值，体外震波碎石

第二部分 单源双能 CT 对混合胰管结石成分的定量体外研究

目的：评估使用单源双能计算机断层扫描（dual-energy CT, DECT）来量化和区分混合成分的胰管结石的碳酸钙（calcium carbonate, CA）和非碳酸钙（non-calcium carbonate, NCA）成分的可行性及应用价值。

方法：采用显微 CT 扫描结果作为 CA 和 NCA 所占胰管结石比例的参考标准，对我院普外科收集的 12 颗完整胰管结石进行分析。将这些结石置于直径为 35cm 的 TOS 水体模中，以模拟标准成人体型。从单源 DECT 扫描获得高能量和低能量图像集，分别对应 80kVp 和 140kVp 的高、低管电压。使用 MATLAB (Matlab R2015b, Mathworks Inc) 软件编码进一步分析所有重建的 DICOM 图像。针对图像的每个像素计算 CT 值比(CTR)，其定义为 80kVp、140kVp 两个管电压扫描所得图像单个像素 CT 值的比值。CTR 阈值预设 1.00 和 1.25 之间，以对 CA 和 NCA 像素点进行分类。CTR 高于阈值的胰管结石像素被分类为 CA，而 CTR 低于阈值的胰管结石像素被分类为 NCA。通过计算 CA 和 NCA 像素的数量来确定每块结石的 CA / NCA 比例，结合显微 CT 扫描得出 CA / NCA 比例作为参考标准，计算得出不同 CTR 阈值下的均方根误差(root-mean-square errors, RMSE)，代表 DECT 预测结石成分与参考标准之间的误差。最小 RMSE 即对应最佳 CTR 阈值。使用配对 t 检验来比较由 DECT 确定的结石组成与参考标准一致性。

结果：最佳 CTR 阈值为 1.16，RMSE 为 6.0%。不同的 CTR 对应的最小和最大 RMSE 分别为 0.22% 和 11.35%。配对 t 检验显示 DECT 预测胰管结石成分和显微 CT 参考标准的差异无统计学意义($p=0.414$)。

结论：单源 DECT 能在离体结石水模研究中准确定量和鉴别混合胰管结石中 CA 和 NCA 成分，未来应用前景光明，需开展进一步临床研究。

关键词：胰管结石，单源 DECT，显微 CT，碳酸钙

第三部分 胰腺纤维化动物模型的分子磁共振诊断

目的：构建不同胰腺纤维化程度小鼠模型，为纤维化分子 MRI 做准备。探讨含钆 I 型胶原蛋白靶向探针（EP3533）分子 MRI 技术在胰腺纤维化的诊断和分级诊断研究的可行性与应用价值。

方法：选取 42 只雄性 C57BL/6 小鼠，随机分为对照组、轻度胰腺纤维化组、中重度胰腺纤维化组，分别腹腔注射生理盐水（对照组），雨蛙素（50 μ g / kg），乙醇（3g / kg，33%）联合雨蛙素，持续注射 6 周，造模结束后三组小鼠各取 4 只，

鼠尾静脉注射提前合成的 Cy5.5-EP3533(500 μ g Cy5.5/ kg), 1 小时后处死小鼠取出胰腺, 在小动物活体光学成像系统中进行荧光定量观察。余下三组模型小鼠经尾静脉注射 EP3533(20 μ mol/ kg), 增强后 5-60min 内的多次采集 T1WI 图像, 扫描结束后, 处死小鼠取出胰腺进行病理学评估与纤维化分级, 验证不同严重程度的胰腺纤维化模型是否建立。为确保 Gd-DTPA 代谢完全, 中重度胰腺纤维化组小鼠在注射 EP3533 之前 72 小时, 经鼠尾静脉注射非靶向造影剂 Gd-DTPA(100 μ mol/ kg), 增强后 5-60min 内的多次采集 T1WI 图像。在 T1WI 图像胰腺层面勾画 ROI, 测量增强前、增强后每个时间点的 SNR 值、 Δ SNR 值, 其中 Δ SNR=(增强 SNR-平扫 SNR)÷平扫 SNR。比较不同组小鼠间在 EP3533 增强后各时间点的强化程度。两相关样本的比较采用配对样本 t 检验或符号秩检验; 重复测量资料采用重复测量的方差分析进行组间比较。采用 SPSS 21 进行统计分析, 检验水准 α 取双侧 0.05。

结果: 病理证实轻度胰腺纤维化组、中重度胰腺纤维化组模型均发生胰腺纤维化改变, 经病理证实并且后者纤维化分级高于前者。中重度胰腺纤维化小鼠分别接受 Gd-DTPA、EP-3533 增强扫描, Gd-DTPA 注射 5min 后胰腺 SNR 即达到峰值 46.02 ± 9.5 , 5-60min 时间段内胰腺 SNR 急剧下降, 至 60min 时胰腺 SNR 已经降至 33.82 ± 7.08 ; Gd-DTPA 代谢完全后对应同组中重度胰腺纤维化小鼠胰腺 SNR 在注射 EP3533 后 5min 达到 41.42 ± 8.91 , 5-60min 时间段内胰腺 SNR 持续渐进性升高, 至 40min 时胰腺 SNR 达峰值 51.85 ± 7.35 , EP3533 组 40min 的胰腺 Δ SNR 显著高于 Gd-DTPA 组 ($p < 0.001$)。在 EP3533 注射后 30min、40min、60min 时间点胰腺 ROI 中 Δ SNR 值显示中重度纤维化 > 轻度纤维化 > 对照组, 经重复测量方差分析发现, 时间与组别存在交互作用 ($p < 0.01$), 故无需进行主效应分析, 直接进行处理组别的单独效应分析。组间效应方差分析结果显示, 三个组别的差异有统计学意义 ($p < 0.001$), 进一步, 采用 LSD-t 检验方法比较了上述三个时间点的三组模型鼠两两之间的 Δ SNR, 结果显示 30min 时: 对照组与轻度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p = 0.011$); 对照组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p < 0.001$); 轻度纤维化组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p = 0.001$)。40min 时: 对照组与轻度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p < 0.001$); 对照组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p < 0.001$); 轻度纤维化组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p = 0.005$)。60min 时: 对照组与轻度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p < 0.001$); 对照组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p < 0.001$); 轻度纤维化组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p < 0.001$)。Cy5.5-EP3533 注射 1 小时后, 正常胰腺、轻度纤维化胰腺与中重度纤

维化胰腺的荧光强度依次升高。

结论：我们成功建立了两种不同胰腺纤维化程度的小鼠模型，并且发病机制模拟人类酒精性慢性胰腺炎。EP3533 在增强 30min、40min、60min 时的 Δ SNR 能帮助鉴别不同纤维化程度的小鼠模型。

关键词：慢性胰腺炎，小鼠模型，纤维化，分子影像，I 型胶原蛋白，钆，EP-3533

Abstract

Part 1 Quantitative factors of unenhanced CT for predicting fragmenting efficacy of extracorporeal shock wave lithotripsy on pancreatic duct stones

Objective: To find potential predictors at unenhanced computed tomography (CT) to evaluate the stone clearance rate (SCR) of pancreatic duct stones (PDS) by extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL).

Methods: Including 106 patients with multiple pancreatic duct stones who were treated in our hospital from 2014 to 2016, the stones were all located in the head of the pancreas. All patients receive ESWL treatment. The number of shock waves per treatment was not more than 6,000. Stop ESWL treatment when the diameter of the stone is less than 3mm by X-ray fluoroscopy. Toshiba 320-slice spiral CT was used for upper abdominal scan before and after ESWL treatment. The Philip workstation was used to perform three-dimensional reconstruction of the image and measure the quantitative indicators. Calculate SCR based on changes in stone volume before and after treatment, we define the volume of stones before and after treatment as V_0 and V_1 . $SCR = [(V_0) - (V_1)] / (V_0) \times 100\%$, and patients divided into three groups with threshold values of $>90\%$, $50-90\%$ and $<50\%$ of SCR. The clinical characteristics of the patient's gender and age were recorded and number of ESWL treatment. The following indicators were measured on the CT image before treatment: the maximum transverse length (MTL) of the stone, the mean stone density (MSD) of the stone, and the standard deviation of the stone density (SDSD), variation coefficient of stone density (VCSD), pancreatic duct diameter (PDD), skin-stone distance (SSD), HU density (HD), where $HD = MSD / MTL$. Measurement data were expressed as $\bar{X} \pm S$, and count data were expressed as $N(\%)$. First, univariate ordered logistic regression was used to analyze the differences between groups of clinical features and imaging features among groups A, B and C, and single-variant screening was performed. Then, the statistically significant variables ($P < 0.20$) in the univariate analysis were included in the multivariate ordered logistic regression, and the independent predictors of SCR were screened. $P < 0.05$ (test level) was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistical software (version 21.0, Chicago, III).

Results: This study included 106 cases, including 71 males and 35 females. The

average age was 45.2 ± 13.3 years (minimum - maxima: 12 - 75 years). The size of the pre-calculus stone MTL ranged from 3.1 to 36 mm, the average volume of the stone was $5647.8 \pm 6487.0 \text{ mm}^3$, and the average postoperative volume was $1918.8 \pm 2944.0 \text{ mm}^3$. All patients received number of ESWL treatment ranging from 1-8 times, with an average of 2.5 ± 1.3 times, with an average SCR = $(65.0 \pm 25.9) \%$. VCSD is an independent predictor of predicting ESWL SCR ($P=0.025$).

Conclusions: VCSD is an independent predictor of the efficacy of ESWL in the treatment of patients with pancreatic duct stones. The smaller the VCSD, the better the removal effect of pancreatic duct stones.

KEY WORDS: chronic pancreatitis, pancreatic duct stone, Computed Tomography, X-ray attenuation value, ESWL

Part 2 Quantification and Differentiation of Composition of Mixed Pancreatic duct stones Using Single-source Dual-Energy CT: An *Ex Vivo* Study

Objective: To evaluate the feasibility of using Single-source dual-energy CT (DECT) to quantify and differentiate calcium carbonate (CA) and non-calcium carbonate (NCA) components of pancreatic duct stones (PDS) with mixed composition.

Methods: A total of 12 PDS harvested from general surgery department in our hospital were analyzed with micro-CT as a reference standard for CA and NCA composition. These stones were placed in a TOS water phantom of 35 cm diameter to simulate standard adult body size. High and low energy image sets were acquired from SS DECT scans with high/low tube potential pairs of 80kVp/140kVp. All the image sets were imported into an in-house software for further post-processing. CT number ratio (CTR), defined as the ratio of the CT number at 80kVp to 140kVp, was calculated for each pixel of the images. Threshold was preset between 1.00 and 1.25 to classify CA and NCA components. Pixels in PDS with CTR higher than the threshold were classified as CA, and those with CTR lower than the threshold were classified as NCA. The percentages of CA and NCA for each stone were determined by calculating the number of CA and NCA pixels. Finally, the minimal, maximal and root-mean-square errors (RMSE) of composition measured by SS DECT under each threshold were calculated by

referring to the composition data from micro-CT. The optimal threshold was determined with the minimal RMSE. A paired *t*-test was used to compare the stone composition determined by DECT with micro-CT.

Results: The optimal CTR threshold was 1.16, with RMSE of 6.0%. The minimum and maximum absolute errors were 0.22% and 11.35%, respectively. Paired *t*-test showed no statistically significant difference between DECT and micro-CT for characterizing CA and NCA composition ($p=0.414$).

Conclusions: SS DECT is a potential approach for quantifying and differentiating CA and NCA components in PDS with mixed composition.

KEY WORDS: pancreatic duct stones, single-source dual-energy CT, micro-CT, calcium carbonate

Part 3 Molecular MRI of Collagen to Diagnose and Stage Pancreas Fibrosis

Objective: To establish mouse models with different degrees of pancreatic fibrosis and prepare for fibrosis molecular MRI. To investigate the feasibility and application value of molecular MRI with gadolinium type I collagen targeted probe (EP3533) in the diagnosis and grading of pancreatic fibrosis.

Methods: We randomly divide 42 male C57BL / 6 mice into control group, mild pancreatic fibrosis group and moderate-to-severe pancreatic fibrosis group. They were intraperitoneally injected with normal saline (control group) and cerulein (50 $\mu\text{g/kg}$) or ethanol (3g/kg, 33%) combined with cerulein independently , the entire modeling cycle lasts 6 weeks. After the models were established, four mice in each group were injected intravenously with Cy5.5-EP3533(500 μg Cy5.5/ kg) which was synthesized in advance. One hour later, the mice were sacrificed and the pancreas was taken out and placed in a small animal optical imaging system for quantitative fluorescence observation. The remaining three groups of model mice were injected with EP3533(20 $\mu\text{mol/kg}$) via the tail vein, and T1WI images were collected multiple times within 5 to 60 minutes after the enhancement. After the the scan, the mice were sacrificed and the pancreas was taken for pathological evaluation and fibrosis grading. To ensure complete metabolism of Gd-DTPA, mice in the moderate-to-severe pancreatic fibrosis group were injected with non-targeted contrast agent Gd-DTPA(100 $\mu\text{mol/kg}$) 72 hours before injection of EP3533,

and T1WI images were collected multiple times within 5 to 60 minutes after enhancement. The ROI was delineated at the pancreas level of the T1WI image, and the SNR value and Δ SNR value at each time point before and after enhancement were measured. The degree of enhancement at different time points after EP3533 enhancement in different groups of mice was compared. The comparison between the two related samples was performed by paired sample t test or signed rank test; the repeated measurement data were analyzed by repeated measures analysis of variance for comparison between groups. Statistical analysis was performed using SPSS 21, and the test level α was taken as 0.05 on both sides.

Results: Pathologically confirmed pancreatic fibrosis changes in the mild pancreatic fibrosis group and moderate to severe pancreatic fibrosis group, which were confirmed by pathology and the fibrosis grade of the latter was higher than the former. Mice with moderate to severe pancreatic fibrosis received Gd-DTPA and EP-3533 enhanced scans, and the SNR of pancreas reached a peak of 46.02 ± 9.5 after 5 minutes of Gd-DTPA injection. The pancreatic SNR decreased sharply during the 5-60min period, and the pancreas SNR decreased to 60min. It has been reduced to 33.82 ± 7.08 ; after the metabolism of Gd-DTPA is complete, the SNR of pancreas in mice with severe pancreatic fibrosis in the same group reaches 41.42 ± 8.91 5 min after EP3533 injection, and the pancreatic SNR continues to increase gradually in the period of 5-60 min. The pancreatic SNR peaked at 51.85 ± 7.35 at 40 min, and the pancreatic Δ SNR at 40 min in the EP3533 group was significantly higher than that in the Gd-DTPA group ($p < 0.001$). The pancreatic Δ SNR at 30 min, 40 min, and 60 min after EP3533 injection showed moderate to severe fibrosis > mild fibrosis > control group. After repeated measures analysis of variance, it was found that there was interaction between time and group ($p < 0.01$), so no main effect analysis was needed, and the individual effect analysis of the treatment group was directly performed. Inter-group effect analysis of variance showed that the differences between the three groups were statistically significant ($p < 0.001$).

Further, three groups of models at the above three time points were compared by LSD-t test. The Δ SNR between the two mice showed that the difference in pancreatic Δ SNR between the control group and the mild fibrosis group was statistically significant at 30 min ($p = 0.011$); the difference in pancreatic Δ SNR between the control group and the moderately severe fibrosis group statistically significant ($p < 0.001$); the difference in pancreatic Δ SNR between the mild fibrosis group and the moderately severe fibrosis

group was statistically significant ($p = 0.001$). At 40 min, the difference in pancreatic Δ SNR between the control group and the mild fibrosis group was statistically significant ($p < 0.001$); the difference in pancreatic Δ SNR between the control group and the moderate-severe fibrosis group was statistically significant ($p < 0.001$); The difference in pancreatic Δ SNR between the fibrosis group and the moderately severe fibrosis group was statistically significant ($p = 0.005$). At 60 min, the difference in pancreatic Δ SNR between the control group and the mild fibrosis group was statistically significant ($p < 0.001$); the difference in pancreatic Δ SNR between the control group and the moderate-severe fibrosis group was statistically significant ($p < 0.001$); The difference in pancreatic Δ SNR between the fibrosis group and the moderately severe fibrosis group was statistically significant ($p < 0.001$). One hour after Cy5.5-EP3533 injection, the fluorescence intensity of normal pancreas, mildly fibrotic pancreas and moderately severe fibrotic pancreas increased in turn.

Conclusion: We successfully established two mouse models of different degrees of pancreatic fibrosis, and the pathogenesis mimics human alcoholic chronic pancreatitis. The Δ SNR of EP3533 at 30min, 40min, and 60min can help identify mouse models of different degrees of fibrosis.

KEY WORDS: chronic pancreatitis, mouse model, fibrosis, molecular imaging, type I collagen, gadolinium, EP-3533

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
CA	calcium carbonate	碳酸钙
CT	Computed Tomography	电子计算机断层扫描
DECT	Dual-energy CT	双能 CT
CP	chronic pancreatitis	慢性胰腺炎
DECT	dual-energy CT	双能 CT
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
ERCP	endoscopic retrograde cholangiopancreatography	内镜逆行胰胆管造影术
ESWL	Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy	体外震波碎石
FOV	field of view	视野
FSE	fast spine echo	快速自旋回波
Gd	gadolinium	钆
Gd-DTPA	gadolinium diethylenetriamine penta-acetic acid	钆-二乙烯二胺五醋酸
MRE	MR elastography	磁共振弹性成像
MRI	magnetic resonance imaging	磁共振成像
MSD	mean stone density	结石平均 CT 值
MTL	maximal transverse length	最大横径
NCA	non-calcium carbonate	非碳酸钙
PDD	Pancreatic duct diameter	胰管直径
RMSE	root-mean-square errors	均方根误差
ROC	receiver operating curve	受试者曲线
ROI	region of interest	感兴趣区
SCR	stone clean rate	结石清除率
SD	standard deviation	标准差
SDSD	stone density standard deviation	结石 CT 值标准差
SI	signal intensity	信号强度
SNR	signal to noise ratio	信噪比

SSD	the skin-to stone distance	体表-结石距离
T1WI	T1 weighted imaging	T1 加权成像
T2WI	T2 weighted imaging	T2 加权成像
TE	echo time	回波时间
TI	inversion time	反转时间
TR	Repetition time	重复时间
VCSD	variation coefficient of stone density	结石 CT 值变异系数

前言

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)的特点是胰腺进行性炎症,导致胰腺结构、功能的永久性损害,临床往往表现为发作性或顽固性腹痛,并伴有进行性外、内分泌功能下降^[1]。

胰管结石是其主要并发症之一,与胰管阻塞导致胰液中钙沉积增加、胰石蛋白分泌不足、乳铁蛋白分泌过多^[2, 3]有关。胰管结石的形成可通过阻塞胰管或损害胰腺组织而加重胰腺实质高压,引起炎症反复发作,腺泡结构、胰岛结构破坏从而引起内分泌和外分泌功能障碍^[1]。导管高压被认为是 CP^[4]疼痛的主要原因,因此去除胰管结石造成的胰管梗阻是慢性胰腺炎治疗的关键。

胰管梗阻可通过外科手术或体外冲击波碎石术(ESWL)和内镜治疗。欧洲胃肠内镜学会推荐 ESWL 和内镜治疗作为胰腺的一线治疗措施^[5]。与外科手术相比,体外冲击波碎石术和内镜逆行胰胆管造影术(ERCP)侵入性较小,但在结石负荷较小的情况下最有可能成功^[6]。查阅文献发现,尽管内镜治疗有限制作为胰管结石的一线治疗手段,但仍有 50%内科治疗失败 CP 患者最终选择手术治疗^[7]。并且长期无效的内镜治疗也会耽误患者病程,使得手术收益下降^[8]。是否可以在内镜治疗前的无创性评估是十分必要的,通过无创的影像学方法预测内镜治疗结局,以期早期合理制定治疗方案,提高治疗效率。因为胰腺结石的主要成分是碳酸钙,所以使用计算机断层扫描(Computed Tomography, CT)可以清楚地发现胰腺结石,CT 平扫已被证明是诊断泌尿系结石最敏感、最准确的影像学技术^[9]。然而,目前有关胰管结石的相关研究并不多见,也不完整。因此本研究第一部分希望探讨多层螺旋 CT 定量指标对于预测胰管结石患者体外震波碎石清除率的价值。

近来有关泌尿系结石的一系列研究发现 ESWL 治疗结果与结石的一些影像学因子密切相关,如结石大小,位置,数量,密度等^[10, 11],其中结石密度被认为是 ESWL 疗效最重要的预测参数^[12, 13]。由于结石密度由其内部成分决定,我们因此推断结石成分是影响其脆性的重要因素。学界已经证明,可以通过使用双能 CT (dual-energy CT, DECT)扫描仪,可以在离体环境中准确区分含尿酸和非尿酸的结石^[14]而胰腺结石成分是否与治疗方式的选择存在关系,目前尚无统一意见,通过查阅文献发现,胰管结石中的成分相对简单,主要是碳酸钙(90%)和少量蛋白质或粘多糖^[15],而这两者的具有明显不同的硬度与脆性。最近报道^[16]单发胰管结石($P=0.007$)和低密度结石($P<0.001$)与胰管结石接受 ESWL 治疗完全清除密切相关。这从一个侧面提示我们碳酸钙百分比占优势的胰管结石是否意味着 ESWL 疗效的不佳?因此本研究第二部分希望通过单源双能计算机断层扫描来量化和区分混

合成成分的胰管结石的碳酸钙和非碳酸钙成分，为胰管结石成分的在体非侵入性诊断打下基础。

然而由于 CP 患者早期临床表现极不典型，到出现典型胰管结石、内外分泌功能失调症状时，往往已经是 CP 中晚期，此时患者的生存质量已经明显下降，临床干预治疗效果往往不佳。因此早期诊断一直是 CP 的难点与痛点。而 CP 早期主要的病理改变胰腺间质纤维化^[17]，胰腺纤维化分期对评价 CP 进展及预后具有重要意义[18, 19]，胰腺穿刺活检虽是诊断 CP 纤维化的金标准^[20]，但由于穿刺的有创性、取材局限性等缺点，限制了其在临床上的应用。因此临床迫切需要一种非侵入性地检测胰腺纤维化程度的诊断方法。胰腺纤维化的基本病理特征是细胞外基质（extracellular matrix, ECM）蛋白（主要为 I 型胶原蛋白）的过度沉积，同时 I 型胶原蛋白的浓度随着纤维化的进展而增加^[21]，并且其位于细胞外，易于分子探针与之连接。因此 I 型胶原蛋白是一个理想的纤维化分子影像靶标。本研究最后一个部分目的意在构建不同胰腺纤维化程度小鼠模型，为纤维化分子 MRI 做准备，同时探讨含钆 I 型胶原蛋白靶向探针（EP3533）分子 MRI 技术在胰腺纤维化的诊断和分级诊断研究的可行性与应用价值。

参考文献

- [1] Majumder S, Chari ST. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2016; 387: 1957-1966.
- [2] Hu G, Duan L, Hu X, Li J, Yang G, Tang H. [Clinical trial on pancreatic duct stones caused by chronic pancreatitis]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2009; 34: 630-633.
- [3] Hu GH, Sun WJ, Duan L. [Debridement and drainage of infected necrosis for severe acute pancreatitis via lumbo-retroperitoneal route]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2008; 33: 642-644.
- [4] Tillou JD, Tatum JA, Jolissaint JS, Strand DS, Wang AY, Zaydfudim V, et al. Operative management of chronic pancreatitis: A review. *Am J Surg*. 2017; 214: 347-357.
- [5] Dumonceau JM, Delhaye M, Tringali A, Dominguez-Munoz JE, Poley JW, Arvanitaki M, et al. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy*. 2012; 44: 784-800.
- [6] Adamek HE, Jakobs R, Buttmann A, Adamek MU, Schneider AR, Riemann JF. Long term follow up of patients with chronic pancreatitis and pancreatic stones treated with extracorporeal shock wave lithotripsy. *Gut*. 1999; 45: 402-405.
- [7] 龚彪, 王伟. 慢性胰腺炎: 理论与实践. 人民卫生出版社, 2012.
- [8] Drewes AM, Bouwense SAW, Campbell CM, Ceyhan GO, Delhaye M, Demir IE, et al. Guidelines for the understanding and management of pain in chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2017; 17: 720-731.
- [9] Gupta NP, Ansari MS, Kesarvani P, Kapoor A, Mukhopadhyay S. Role of computed tomography with no contrast medium enhancement in predicting the outcome of extracorporeal shock wave lithotripsy for urinary calculi. *BJU Int*. 2005; 95: 1285-1288.
- [10] Lee JY, Kim JH, Kang DH, Chung DY, Lee DH, Do Jung H, et al. Stone heterogeneity index as the standard deviation of Hounsfield units: A novel predictor for shock-wave lithotripsy outcomes in ureter calculi. *Scientific Reports*. 2016; 6: 23988.
- [11] Kanao K, Nakashima J, Nakagawa K, Asakura H, Miyajima A, Oya M, et al. Preoperative nomograms for predicting stone-free rate after extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol*. 2006; 176: 1453-1456; discussion 1456-1457.
- [12] Kambadakone AR, Eisner BH, Catalano OA, Sahani DV. New and evolving concepts in the imaging and management of urolithiasis: urologists' perspective.

Radiographics. 2010; 30: 603-623.

[13] Graser A, Johnson TR, Bader M, Staehler M, Haseke N, Nikolaou K, et al. Dual energy CT characterization of urinary calculi: initial in vitro and clinical experience. Invest Radiol. 2008; 43: 112-119.

[14] Stolzmann P, Scheffel H, Rentsch K, Schertler T, Frauenfelder T, Leschka S, et al. Dual-energy computed tomography for the differentiation of uric acid stones: ex vivo performance evaluation. Urol Res. 2008; 36: 133-138.

[15] Farnbacher MJ, Voll RE, Faissner R, Wehler M, Hahn EG, Lohr M, et al. Composition of clogging material in pancreatic endoprotheses. Gastrointest Endosc. 2005; 61: 862-866.

[16] Ohyama H, Mikata R, Ishihara T, Tsuyuguchi T, Sakai Y, Sugiyama H, et al. Efficacy of stone density on noncontrast computed tomography in predicting the outcome of extracorporeal shock wave lithotripsy for patients with pancreatic stones. Pancreas. 2015; 44: 422-428.

[17] Büchler Uhl Malfertheiner Sarr. Diseases of the Pancreas. Beijing: People's Military Medical Press, 2009.

[18] Ketwaroo GA, Freedman SD, Sheth SG. Approach to patients with suspected chronic pancreatitis: a comprehensive review. Pancreas. 2015; 44: 173-180.

[19] Ceyhan GO, Friess H. Pancreatic disease in 2014: Pancreatic fibrosis and standard diagnostics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015; 12: 68-70.

[20] 中国医师协会胰腺病专业委员会慢性胰腺炎专委会. 慢性胰腺炎诊治指南（2018年，广州）. 中华消化杂志. 2018; 38:

[21] Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. Hepatology. 2003; 38: 1449-1457.

第一部分 多层螺旋 CT 对胰管结石体外震波碎石治疗疗效的定量评估价值

慢性胰腺炎是一种多病因的进行性炎症性疾病，其特点是胰腺结构和功能持续受损，表现为持续性或间歇性腹痛。胰管结石是其主要并发症之一，与胰管阻塞导致胰液中钙沉积增加、胰石蛋白分泌不足、乳铁蛋白分泌过多^[1, 2]有关。胰管结石的形成可通过阻塞胰管或损害胰腺组织而加重胰腺实质高压，引起炎症反复发作，腺泡结构、胰岛结构破坏从而引起内分泌和外分泌功能障碍。

由于胰管结石的形成和发展既是慢性胰腺炎的原因，也是慢性胰腺炎的结果，因此去除胰管结石造成的胰管梗阻是慢性胰腺炎治疗的关键。传统的胰腺外科手术取石不可避免地对正常胰腺组织和功能造成损害，同时并发症发生率高达 30%，死亡率高达 2%。在过去的几十年中，欧洲胃肠内镜学会(European Society of Gastrointestinal Endoscopy, ESGE)推荐体外冲击波碎石术(ESWL)结合内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)内镜取石作为一线治疗方案^[3]。例如，Hu 等人的一项长期随访研究^[4]表明 ESWL 和 ERCP 可以有效地缓解胰管结石相关的疼痛。近年来有更多的研究报道，单纯 ESWL 是治疗慢性胰腺炎的最佳选择，具有疗效高、结石清除率高（46%~91%）、安全性好、并发症少、无创等优点^[5, 6]。

碳酸钙是胰管结石的主要成分，使得其在多层螺旋 CT 平扫中很容易被发现。一些研究使用了不同的 CT 定量参数，如位置^[7]、大小^[8]、密度^[9]、成分^[10]、体脂^[11]、梗阻或感染的严重程度^[12]等，用于预测 ESWL 治疗泌尿系结石的疗效；然而，关于多层螺旋 CT 平扫用于胰管结石的类似报道并不多见。这项回顾性研究分析了多层螺旋 CT 平扫结石参数，目的是找出 ESWL 必要性和成功率的潜在预测因素，从而帮助选择适当的治疗策略，避免不适合 ESWL 治疗的胰管结石患者接受不必要的治疗。

一、材料与方法

（一）患者

共回顾 106 名在 2014 年 10 月至 2016 年 10 月期间在我院消化内科接受了 ESWL 治疗的胰管结石患者。每例患者胰头区域有单发或多发结石，结石最大横径为 3.1~36mm。所有患者均有典型腹痛症状，ESWL 术前均行多层螺旋 CT 平扫。结石

最大横径<3 mm、胰腺手术史或胰腺 ESWL 治疗史的胰管结石患者被排除在本研究之外。

(二) ESWL

ESWL 治疗由两位有资质的消化内科医生操作第三代电磁碎石机(Compact DeltaII; Dornier Med Tech, Wessling, 德国), 利用 X 线透视进行胰管结石的定位。在 ESWL 前, 所有患者均接受静脉麻醉(氟比洛芬和瑞芬太尼)以缓解疼痛, 并保持仰卧位, 碎石机探头接触腹部皮肤。冲击波强度为 6(16000 kV), 震级为 1~6 级, 频率为 100 次/分钟。每次 ESWL 治疗的持续时间为 60 至 90 分钟, 单次最多 5000 次冲击。连续数天重复碎石治疗, 直至透视观察到胰管结石被破碎成<3 mm 的碎片, 如出现任何不良症状终止 ESWL 治疗。

(三) 结石影像学特征测量

多层螺旋 CT (Brilliance 320; 东芝, 日本)定期预校准的空气和水模型, 以保障影像学测量结果可靠。每名患者在检查前都接受了严格和规范的屏气训练, 并被指示在扫描过程中保持仰卧位。CT 成像参数为: 管电压 120 kV, 管电流 500 mAs, FOV 为 200×200cm², 准直宽度 128×0.625mm, 单圈转速 0.5s, 螺距 0.915。层厚、层间距为 1mm, 所有图像均采用标准算法进行重建, 详见表 1。扫描范围为肝脏上缘至髂前上棘。

表 1 多层螺旋 CT 检查中的关键扫描参数、重建参数

扫描类型	螺旋扫描
单圈转速	0.5s
FOV	200×200cm
准直宽度	128×0.625mm
螺距	0.915
管电压 / 管电流	120kV / 500mAs
重建算法	标准算法
层厚	1mm
层间距	1mm

将层厚为 1mm 的 DICOM 原始图像传输到 PHILIPS Intelli Space Portal v6.0.4(Nederland)工作站, 调整窗宽窗位, 在骨窗中进行影像学参数测量。该软件能够准确、高效地自动识别所有的胰管结石, 计算并输出结石参数, 包括 ESWL 前(V₀)

和 ESWL 后(V_1)的体积。随后,利用工作站上的电子卡尺对最大的石头进行定位和测量,以获得最大横径(Maximal transverse length, MTL)。

手工绘制小于结石 1/3 横断面积的 3 个感兴趣区域(ROI),得到每个 ROI 的结石平均 CT 值(mean stone density, MSD)和结石 CT 值标准差(standard deviation of stone density, SDSD)后,计算 3 个 ROI 的平均值,以代表最大结石的密度水平(图 1)。在胰头结石远端的胰管扩张处测量胰管直径(pancreatic duct diameter, PDD)。根据 Pareek 等人^[13]的描述,体表-结石的距离(the skin-to stone distance, SSD)是从最大的结石中心到皮肤表面 0°、45°和-45°垂直距离的平均值(图 2)。最终结石清除率(SCR)按以下公式计算进行计算: $SCR = \{[(V_0) - (V_1)] / (V_0)\} \times 100 (\%)$ 。

用 SDSD 除以 MSD,计算出结石 CT 值变异系数(VCSD)。根据 Motley 等人^[14]报道,通过计算 MSD 和 MTL 的比值得到 HU 密度(Hounsfield density, HD)。



图 1 结石平均 CT 值测量示意图(骨窗,轴位 CT 平扫)。在胰头最大尺寸结石的最大层面上测量 CT 值。绘制三个等大非重叠的 ROI,测得的 CT 值分别为 $1636.7 \pm 235.5 \text{HU}$, $1527.5 \pm 205.9 \text{HU}$ 和 $1779.4 \pm 130.1 \text{HU}$ 。计算平均值, $\text{MSD} = 1647.9 \text{HU}$ 和 $\text{SDSD} = 109.5 \text{HU}$

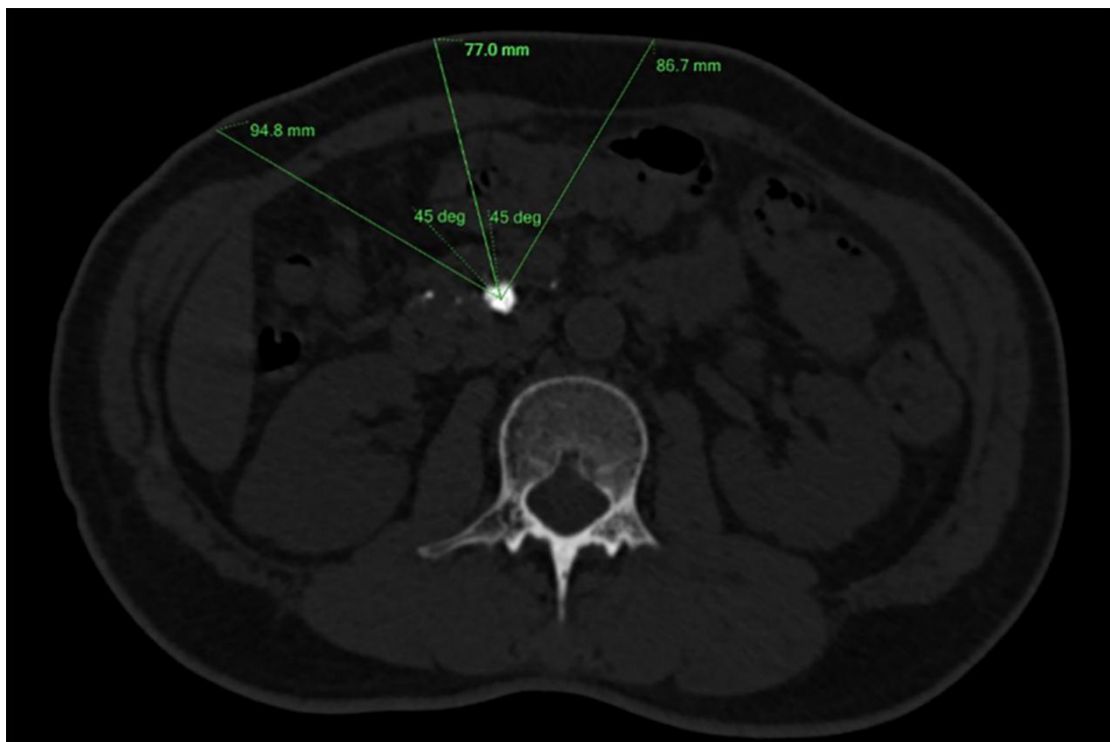


图 2 SSD 测量示意图(骨窗, 轴位 CT 平扫)。在胰头最大尺寸结石的最大层面上测量 SSD, 胰管结石 0°、45°和-45°处的 SSD 值分别为 94.8、77 和 86.7 mm。SSD 平均值为 86.2mm。

(四) 统计方法

统计分析采用 IBM SPSS 统计软件 (version 21.0, Chicago, III)。计量资料根据各组资料是否服从正态分布以及方差相等选择采用 $\bar{X} \pm S$ 或 Median (Q1, Q3) 表示, 组间比较采用完全随机设计的方差分析或 Kruskal-Wallis 检验。计数资料采用例数 N (%) 表示, 组间比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法; 将单因素分析中有统计学意义的变量 ($P < 0.20$) 纳入多因素有序 logistic 回归中, 筛选 SCR 的独立预测因素, $P < 0.05$ (检验水准) 时认为有统计学意义。

二、结果

(一) 患者特征与 ESWL 疗效

106 例患者(男 71 例, 女 35 例; 平均年龄 45.2 ± 13.3 岁; 年龄 12~75 岁)。ESWL 治疗前结石体积 V_0 为 5647.8 mm^3 。所有患者均接受 ESWL 治疗, 共 263 个疗程, 平均每个患者 2.5 ± 1.3 个疗程(范围 1~8 次)。治疗后 V_1 值为 $1918.8 \pm 2944 \text{ mm}^3$ 。总体 SCR 为 $65 \pm 25.9\%$ 。表 2 总结了其他基本特征和影像学表现。

表 2 患者基本特征和影像学特征(n=106)

变量	清除失败组 (n=31)	部分清除组 (n=51)	完全清除组 (n=24)	统计量	P 值
性别, n%				$\chi^2=4.518$	0.104
男	25(81%)	33(65%)	13(54%)		
女	6(19%)	18(35%)	11(46%)		
年龄, 年	48.5±11.5	43.6±13.6	44.3±14.7	F=1.422	0.246
影像学特征					
MTL, mm	8.0(4.4, 11.0)	9.9(7.0, 15.1)	9.1(6.1, 12.3)	K-W=5.450	0.066
MSD, HU	549.7±202.6	629.4±198.8	651.9±192.2	F=2.208	0.115
SDSD, HU	408.4±155.8	439.9±136.3	443.4±125.2	F=0.601	0.550
VCSD	0.74±0.14	0.70±0.07	0.68±0.06	F=2.073	0.131
HD, HU / mm	66.86(49.53, 96.57)	57.01(45.56, 68.00)	80.67(50.66, 98.65)	K-W=5.224	0.073
PDD, mm	8.0±4.6	9.6±3.6	9.0±4.5	F=1.472	0.234
V ₀ , mm ³	2800(800, 6400)	3499(1600, 7400)	3750(1500, 7975)	K-W=0.602	0.740
V ₁ , mm ³	1661(738, 4685)	965(407, 1860)	184(57, 322)	K-W=33.542	<0.001
SSD, mm	91.7±18.1	94.9±15.8	85.2±26.5	F=1.032	0.360
ESWL 次数	2(1, 3)	2(2, 4)	2(2, 3)	K-W=1.189	0.552

(二) Logistic 回归分析 CT 影像学特征

所有患者均接受单次或多次 ESWL 治疗,直到 X 线透视观察到结石碎裂至 ≤ 3 mm。为确定 ESWL 治疗后 SCR 的预测因子,我们根据 SCR 值将患者分为三组:1、结石清除失败组: $SCR < 50\%$ ($n=31$, 平均 31.3%); 2、结石部分清除组: $50\% \leq SCR \leq 90\%$ ($n=51$, 平均 71.6%); 3、结石完全清除组: $SCR > 90\%$ ($n=24$, 平均 94.5%)。本研究选取的 50%、90% 两个界值的依据是 Tandan M 等在 2016 年 Gut Liver 中的报道,将 SCR 离散化处理更符合临床实践的需要,具体请参见[文献 15]^[15]。

单因素分析:所有自变量如年龄、性别等均通过了有序 logistic 回归的平行性检验 ($P > 0.05$),因而采用有序 logistic 回归进行单变量筛选是合适的。结果显示:性别、MSD 和 VCSD 与治疗后 SCR 的关联性具有统计学意义(单因素分析时,采用 $P < 0.2$ 作为统计显著性的判断标准)。

多因素分析:因变量 SCR 的取值分别设为(结石清除失败组=1,结石部分清除组=2,结石完全清除组=3),将性别、MSD 和 VCSD 三个指标纳入到多因素有序 logistic 回归中进行建模。结果显示数据满足平行性假设(平行性检验 $P=0.826$),性别($P=0.107$)和 MSD($P=0.258$)不再具有统计学意义,而 VCSD 具有统计学意义($\beta=-4.517$, OR=0.011, OR 值的 95%CI: [0.000, 0.567], $P=0.025$)。VCSD 是 ESWL 碎石疗效的唯一独立预测因子。结果表明,“完全清除组和部分清除组”与清除失败组相比较,VCSD 更小;完全清除组与“部分清除组和清除失败组”相比较,VCSD 更低。

表 3 患者临床特征和影像学特征与结石清除率的多因素有序 logistic 回归分析

		β	S.E.	OR 值	OR 的 95% CI	P 值*
阈值	SCR=1.00	-3.907	1.673	0.020	0.001, 0.534	0.020
	SCR=2.00	-1.621	1.632	0.198	0.008, 4.845	0.321
位置	性别	-0.699	0.434	0.497	0.212, 1.164	0.107
	MSD, HU	0.001	0.001	1.001	0.999, 1.003	0.258
	VCSD	-4.517	2.015	0.011	<0.001, 0.567	0.025*

三、讨论

慢性胰腺炎是一种进展性和不可逆性的纤维炎症性疾病,近 50% 的患者出现胰管结石^[16],可导致上游高血压、实质内压力升高甚至缺血。目前,胰管结石的治疗方法包括手术、内镜治疗和 ESWL,其中 ESWL 因其更高的效率、安全性和非侵入性而受到临床医生的更多关注;然而,ESWL 治疗失败也可能导致胰腺实质不必要地暴露于冲击波中,从而增加疼痛和医疗成本。因此,在实施 ESWL 之前,判断 ESWL 的必要性和有

效性是至关重要的。在过去的几十年中,许多研究试图发现结石的影像学特征与 ESWL 结果之间的关系,而 CT 平扫已被证明是诊断泌尿系结石最敏感、最准确的影像学技术^[17]。然而,目前有关胰管结石的相关研究并不多见,也不完整。因此,本研究的目的是对胰管结石的 CT 平扫特征进行综合分析,以寻找 ESWL 疗效的潜在预测因素。同时我们引入了反映结石密度均质性的参数 VCSD,据我们所知,这是第一篇关于 VCSD 对胰管结石 ESWL 碎石效果的临床报告。

以往的研究^[18, 19]广泛采用反映结石平均密度的 CT 平均衰减值(或 MSD)作为预测 ESWL 疗效最有代表性和有价值的因素。例如, Wang 等人发现密度大于 900Hu 的泌尿系结石发生 ESWL 失败的可能性更大。随后的研究推测,结石异质性也可能是 ESWL 成功的一个预测因素。在 Lee 等人^[20]的回顾性研究中,SDSD 被认为是输尿管结石患者 ESWL 结果的独立预测因子,它被认为反映了结石的脆性。虽然 SDSD 被认为代表了结石的异质性,但由于标准差通常受平均值的影响,因此 SDSD 可能受 MSD 的影响。本研究通过单因素分析发现 SDSD 在预测 ESWL 碎石疗效方面没有统计学意义($p=0.32$), MSD 与 SDSD 值呈显著正相关(图 3, Spearman 秩相关系数 0.948, $p<0.001$),这可能是导致 SDSD 在预测 ESWL 碎石疗效方面没有统计学意义的原因。根据这些结果,我们认为 VCSD 比 SDSD 更适合于通过消除石材硬度的影响来表征石材的异质性。相比之下,变异系数是标准差除以平均值($VCSD=SDSD / MSD$),通常用于比较具有不同均值的多组数据之间的离散度。我们推测 VCSD 比 SDSD 更能反映结石的异质性。

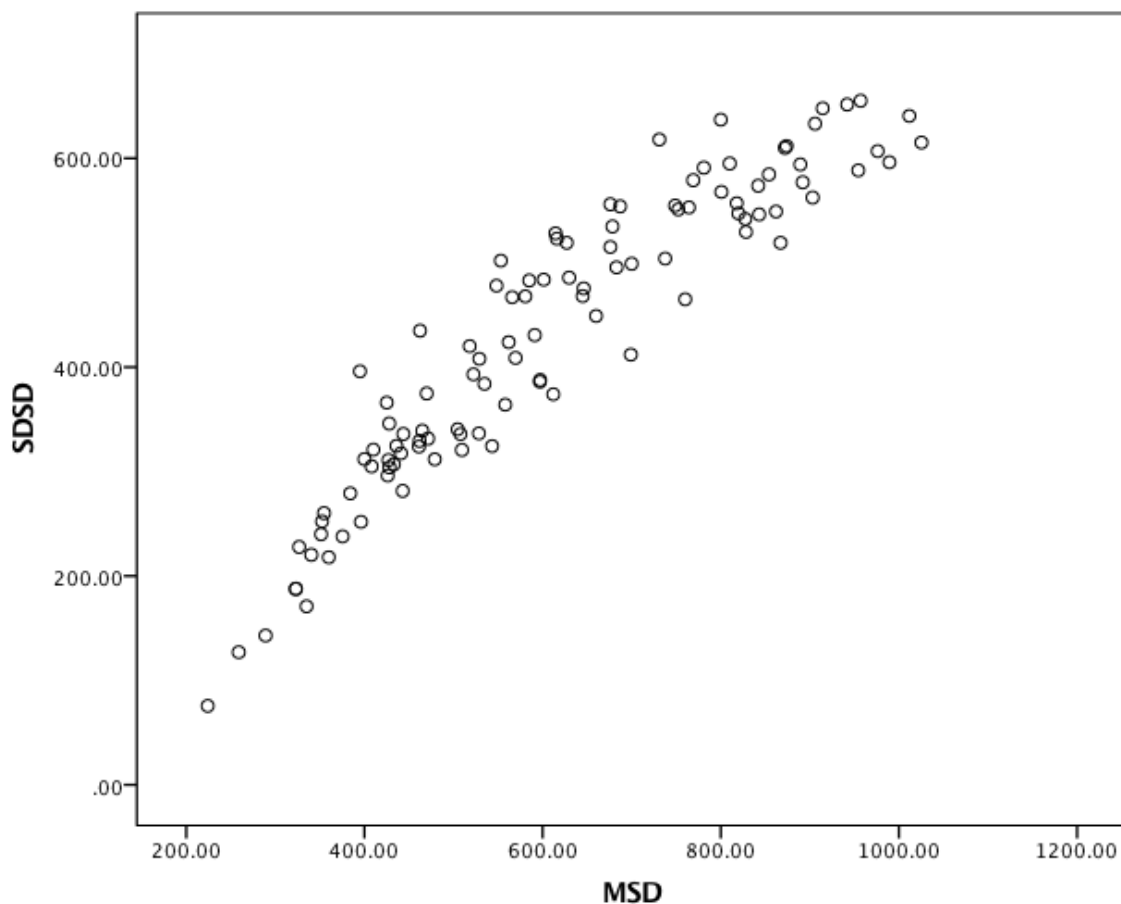


图3 MSD与SDDS关系的散点图

本研究通过多因素分析发现 VCSD ($\beta=-4.517$, $OR=0.011$, $P=0.025$) 是 ESWL 碎石疗效的唯一独立预测因子。“全清除组和部分清除组”与“清除失败组”相比较, VCSD 更小;“完全清除组”与“部分清除组和清除失败组”相比较, VCSD 更低。意味着胰管结石的 VCSD 越小, 胰管结石的清除效果越好。较之泌尿系结石胰管结石的成分相对简单, 主要是碳酸钙(90%)和少量蛋白质或粘多糖^[21], VCSD 越低意味着结石内部结构越均匀, 成分越单一, VCSD 可能从一个侧面反映了胰管结石成分, 我们猜测成分越单一的胰管结石 ESWL 碎石效果越好, 因此我们在本研究第二部分开展 DECT 预测胰管结石成分定量分析研究。

然而, 与肾结石的研究相比, 本研究发现 MSD、SSD 和 VCSD 对 ESWL 碎石效果的预测价值不大。部分原因可能是由于患者数量有限, 或由于胰腺结石往往多发, 笔者为了测量结石的 CT 值, 人工判断并选择最大的结石并进行测量, 这种主观上的筛选测量对象可能也是导致其他在泌尿系被证实的 ESWL 预测参数在本研究中失效的原因。虽然对于有多发大结石的患者, 这可能是一种次优方法, 但通过在最大横断面上取多个 ROI 的平均值, 可以尽可能地减小了由个人主观因素或结石形状引起的测量误差。

在以往肾结石的研究中, 结石成分被认为是 ESWL 疗效的重要预测因子^[10], Youssefzadeh & Lumerman^[22]发现, 尿路结石成分与其在 CT 平扫的 CT 值相关。Motley 等人^[14]首次将 HU 密度(HD)定义为 HU/MTL 的比值, 以消除因结石大小和 CT 值引起的混杂偏差, 并证明它能更好地描述不同成分泌尿系结石的差异, 同时报道 HD 能区分含钙结石和尿酸结石。另外, Shahnani 等人^[23]报道肾结石成分与 HD 的关系($p < 0.001$), 较 CT 值($p = 0.001$)和结石尺寸($p = 0.001$)更为显著; 然而, 本研究在胰管结石的 ESWL 疗效中没有发现 HD 的预测作用, 这可能与胰腺本身的组织病理学有关, 也可能受测量技术或样本量的影响。根据先前的研究^[24], ESWL 的疗效受胰管结石大小而异。在本研究中, 我们仅测量了最大胰管结石的直径, 但其他未测量的结石可能会降低 ESWL 整理碎石效果, 并可能导致此次研究的测量结果与治疗结果相左。

胰管狭窄和梗阻是胰管结石形成的原因之一。胰管结石远端胰管扩张的直径可以间接反映结石带来的梗阻, 但本研究未能发现胰管扩张程度与 ESWL 疗效的关系, 这在一定程度上可能是由于检测技术或测量方法的不同所致, 毕竟在 CT 中测量胰管直径的精度是显著低于 MRCP 的。SSD 对 ESWL 预后的影响也存在争议^[25, 26], 且由于受患者脂肪百分比或分布的影响^[27], SSD 与预后指标无相关性。此外, 本研究结果发现 ESWL 治疗的次数越多并不能带来更高的结石清除率, 否定了更多 ESWL 治疗可以产生更好结石清除效果这一常规逻辑, 因此临床应该强调合理的治疗方案对于避免不必要或过度治疗的重要性。

本研究存在以下局限性。虽然 CT 平扫是胰管结石患者 ESWL 治疗前最常用的检查方法, 但以胰管扩张为基础的胰管结石鉴别诊断的准确性仍有争议, 尤其是伴有胰腺实质钙化(假性结石)的胰管结石患者。此外, 由于分辨率有限, PDD 测量的准确性也受到了影响。另外, 磁共振胰胆管成像(MRCP)比 CT 更敏感、侵入性更小, 应成为今后研究的重点。以往的报道^[28, 29]发现, 双能 CT 测定结石成分对术前最佳治疗方案的判断可能更为敏感。因此我们在下一部分将重点探索 DECT 在胰管结石成分测量中的应用价值。

基于这项回顾性研究, 我们发现 VCSD 是 ESWL 碎石疗效的唯一独立预测因子。胰管结石的 VCSD 越小, 胰管结石的清除效果越好。参考胰管结石患者的 VCSD, 可以协助临床作出诊疗决断, 为 ESWL 筛选最佳受治人群。

参考文献

- [1] Hu G, Duan L, Hu X, Li J, Yang G, Tang H. [Clinical trial on pancreatic duct stones caused by chronic pancreatitis]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2009; 34: 630-633.
- [2] Hu GH, Sun WJ, Duan L. [Debridement and drainage of infected necrosis for severe acute pancreatitis via lumbo-retroperitoneal route]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2008; 33: 642-644.
- [3] Dumonceau JM, Delhaye M, Tringali A, Dominguez-Munoz JE, Poley JW, Arvanitaki M, et al. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. Endoscopy. 2012; 44: 784-800.
- [4] Hu LH, Ye B, Yang YG, Ji JT, Zou WB, Du TT, et al. Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy for Chinese Patients With Pancreatic Stones: A Prospective Study of 214 Cases. Pancreas. 2016; 45: 298-305.
- [5] Tandan M, Reddy DN, Santosh D, Vinod K, Ramchandani M, Rajesh G, et al. Extracorporeal shock wave lithotripsy and endotherapy for pancreatic calculi-a large single center experience. Indian J Gastroenterol. 2010; 29: 143-148.
- [6] Seven G, Schreiner MA, Ross AS, Lin OS, Gluck M, Gan SI, et al. Long-term outcomes associated with pancreatic extracorporeal shock wave lithotripsy for chronic calcific pancreatitis. Gastrointest Endosc. 2012; 75: 997-1004 e1001.
- [7] Cho KS, Jung HD, Ham WS, Chung DY, Kang YJ, Jang WS, et al. Optimal Skin-to-Stone Distance Is a Positive Predictor for Successful Outcomes in Upper Ureter Calculi following Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy: A Bayesian Model Averaging Approach. PLoS One. 2015; 10: e0144912.
- [8] Shah K, Kurien A, Mishra S, Ganpule A, Muthu V, Sabnis RB, et al. Predicting effectiveness of extracorporeal shockwave lithotripsy by stone attenuation value. J Endourol. 2010; 24: 1169-1173.
- [9] Perks AE, Schuler TD, Lee J, Ghiculete D, Chung DG, RJ DAH, et al. Stone attenuation and skin-to-stone distance on computed tomography predicts for stone fragmentation by shock wave lithotripsy. Urology. 2008; 72: 765-769.
- [10] Kijvikai K, de la Rosette JJ. Assessment of stone composition in the management of urinary stones. Nat Rev Urol. 2011; 8: 81-85.
- [11] Lee HY, Yang YH, Lee YL, Shen JT, Jang MY, Shih PM, et al. Noncontrast computed tomography factors that predict the renal stone outcome after shock wave lithotripsy. Clin Imaging. 2015; 39: 845-850.

[12] Abe T, Akakura K, Kawaguchi M, Ueda T, Ichikawa T, Ito H, et al. Outcomes of shockwave lithotripsy for upper urinary-tract stones: a large-scale study at a single institution. *J Endourol*. 2005; 19: 768-773.

[13] Pareek G, Hedican SP, Lee FT, Jr., Nakada SY. Shock wave lithotripsy success determined by skin-to-stone distance on computed tomography. *Urology*. 2005; 66: 941-944.

[14] Motley G, Dalrymple N, Keesling C, Fischer J, Harmon W. Hounsfield unit density in the determination of urinary stone composition. *Urology*. 2001; 58: 170-173.

[15] Tandan M, Talukdar R, Reddy DN. Management of Pancreatic Calculi: An Update. *Gut Liver*. 2016; 10: 873-880.

[16] Rosch T, Daniel S, Scholz M, Huibregtse K, Smits M, Schneider T, et al. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: a multicenter study of 1000 patients with long-term follow-up. *Endoscopy*. 2002; 34: 765-771.

[17] Gupta NP, Ansari MS, Kesarvani P, Kapoor A, Mukhopadhyay S. Role of computed tomography with no contrast medium enhancement in predicting the outcome of extracorporeal shock wave lithotripsy for urinary calculi. *BJU Int*. 2005; 95: 1285-1288.

[18] Ng CF, Siu DY, Wong A, Goggins W, Chan ES, Wong KT. Development of a scoring system from noncontrast computerized tomography measurements to improve the selection of upper ureteral stone for extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol*. 2009; 181: 1151-1157.

[19] Wiesenthal JD, Ghiculete D, Ray AA, Honey RJ, Pace KT. A clinical nomogram to predict the successful shock wave lithotripsy of renal and ureteral calculi. *J Urol*. 2011; 186: 556-562.

[20] Lee JY, Kim JH, Kang DH, Chung DY, Lee DH, Do Jung H, et al. Stone heterogeneity index as the standard deviation of Hounsfield units: A novel predictor for shock-wave lithotripsy outcomes in ureter calculi. *Sci Rep*. 2016; 6: 23988.

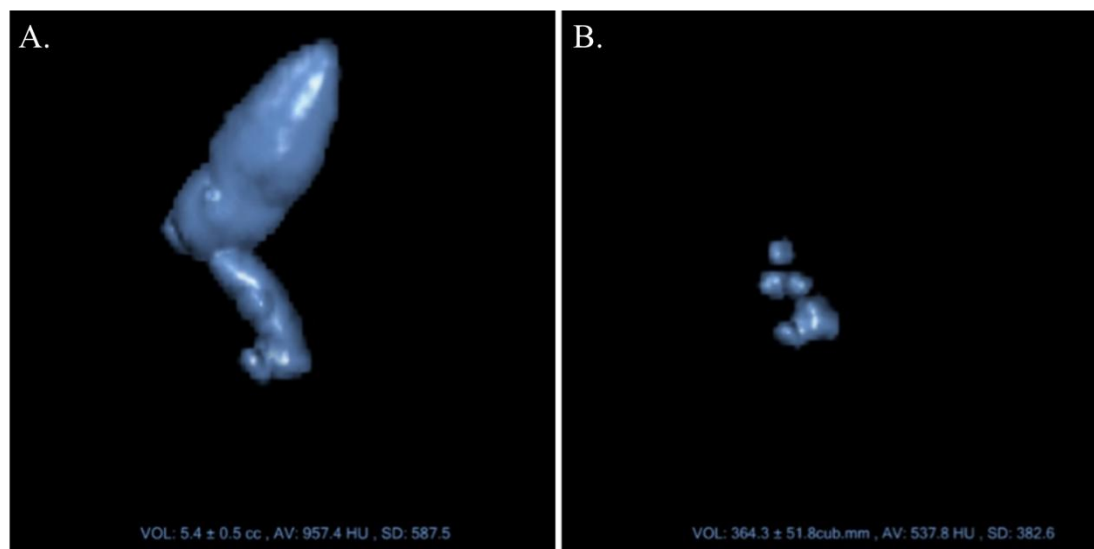
[21] Farnbacher MJ, Voll RE, Faissner R, Wehler M, Hahn EG, Lohr M, et al. Composition of clogging material in pancreatic endoprostheses. *Gastrointest Endosc*. 2005; 61: 862-866.

[22] Youssefzadeh D KD, Lumerman JH. Unenhanced helical CT in the evaluation of suspected renal colic. 1999.

[23] Shahnani PS, Karami M, Astane B, Janghorbani M. The comparative survey of Hounsfield units of stone composition in urolithiasis patients. *J Res Med Sci*. 2014; 19: 650-653.

- [24] Farnbacher MJ, Schoen C, Rabenstein T, Benninger J, Hahn EG, Schneider HT. Pancreatic duct stones in chronic pancreatitis: criteria for treatment intensity and success. *Gastrointest Endosc.* 2002; 56: 501-506.
- [25] Bandi G, Meiners RJ, Pickhardt PJ, Nakada SY. Stone measurement by volumetric three-dimensional computed tomography for predicting the outcome after extracorporeal shock wave lithotripsy. *BJU Int.* 2009; 103: 524-528.
- [26] Wiesenthal JD, Ghiculete D, RJ DAH, Pace KT. Evaluating the importance of mean stone density and skin-to-stone distance in predicting successful shock wave lithotripsy of renal and ureteric calculi. *Urol Res.* 2010; 38: 307-313.
- [27] Yamashita S, Kohjimoto Y, Iguchi T, Nishizawa S, Iba A, Kikkawa K, et al. Variation Coefficient of Stone Density: A Novel Predictor of the Outcome of Extracorporeal Shockwave Lithotripsy. *J Endourol.* 2017; 31: 384-390.
- [28] Ferrandino MN, Pierre SA, Simmons WN, Paulson EK, Albala DM, Preminger GM. Dual-energy computed tomography with advanced postimage acquisition data processing: improved determination of urinary stone composition. *J Endourol.* 2010; 24: 347-354.
- [29] Oehlschlager S, Hakenberg OW, Froehner M, Manseck A, Wirth MP. Evaluation of chemical composition of urinary calculi by conventional radiography. *J Endourol.* 2003; 17: 841-845.

附图



附图 1 女, 52 岁, 因腹痛就诊, 临床诊断为慢性胰腺炎伴胰管多发结石, 在我院接受了三次 ESWL 治疗, 图 A-B 代表 ESWL 治疗前后结石三维重建图像。相关胰管结石 CT 值参数: MTL=15mm; SSD=112.4mm; MSD=957.4HU; SDSD=587.5HU; VCSD=0.61; HD=63.8HU / mm; $V_0=5400\text{mm}^3$; $V_1=364.3 \text{ mm}^3$; SCR=93.9%。ESWL 治疗 3 次后 6 个月复查, 结石清除率达 93.9%, 病人的原发性腹痛大大减轻, 精神状态和生活质量得到改善。

第二部分 单源双能 CT 对混合胰管结石成分的定量体外研究

显微 CT (micro CT) 可以仅基于三维图像的灰度分割原理, 准确地区分具有不同 X 射线衰减值的结石成分。显微 CT 成像已成为泌尿系结石研究的重要工具, 在一些研究中已经将显微 CT 用作参考标准, 因为它能够反映混合结石的异质性及每种成分的实际所占百分比^[1]。但是, 检测成本高昂即仅适用于单一结石的离体测量, 限制了其在临床中的应用。双能计算机断层扫描 (Dual-energy computed tomography, DECT) 使用两种不同的能量水平管电压用于采集图像, 通过图像后处理可以区分具有不同原子序数但 X 线衰减值相似的物质^[2]。

胰管结石是慢性胰腺炎 (Chronic pancreatitis, CP) 最常见的病理特征, 其在西方国家 CP 患者中的发病率为 50-90%^[3]。对于胰管结石直径>5mm 的 CP 患者, 首选体外震波碎石术 (Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy, ESWL) 辅助内镜逆行胰胆管造影术 (Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography, ERCP) 取石作为一线治疗手段^[4], 但不同个体对内镜取石治疗反应各不相同, 这也许与胰管结石成分存在一定关系。最近关于泌尿系结石的几项研究^[5, 6]指出, 泌尿系结石的 CT 值等影像学特征可以辅助术前预判解释的硬度或脆性, 以达到预判碎石治疗预后的目的。

本研究以显微 CT 作为参考标准, 探讨单源 DECT 在胰管结石中区分和定量碳酸钙 (calcium carbonate, CA) 和非碳酸钙 (non-calcium carbonate, NCA) 成分的可行性和应用价值。

一、资料与方法

(一) 研究对象

连续收集笔者医院普通外科 2018 年 05 月至 2018 年 07 月期间慢性胰腺炎患者接受胰管切开取石的完整胰管结石 12 枚, (最大直径 10.59-13.53 mm; 平均 12.40 mm)。所有胰管结石均采用高分辨率的 Skyscan Micro-CT (Bruker, Billerica, MA) 进行扫描, 扫描参数: 管电位, 70kV; 源头采用 1.0 mm 铝质过滤器 (图 1)。基于显微 CT 三维图像的灰度分割原理确定 CA / NCA 比值, 并以此作为胰管结石成分参考标准。

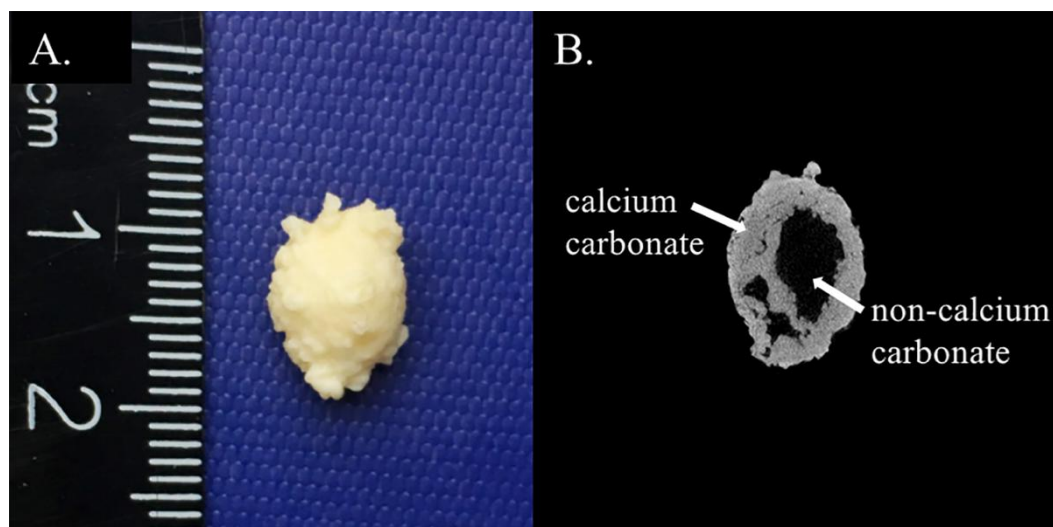


图 1 使用显微 CT 区分胰管结石的碳酸钙 (CA) 和非碳酸钙 (NCA) 成分。图 A 胰腺结石照片；图 B 胰腺结石的显微 CT 核心层面，显示 CA (具有特征性的高 X 射线衰减) 和 NCA (具有特征性低的 X 射线衰减)

在单源 DECT 扫描之前，将每块石头放入充满水的 TOS 水模型 (Toshiba, Japan) 中 24 小时，以模拟临床情况下胰管结石被胰液包绕的实际情况。TOS 水模型横向宽度为 35 厘米，以模拟结石在正常体型成人内部的实际扫描情况 (图 2)。

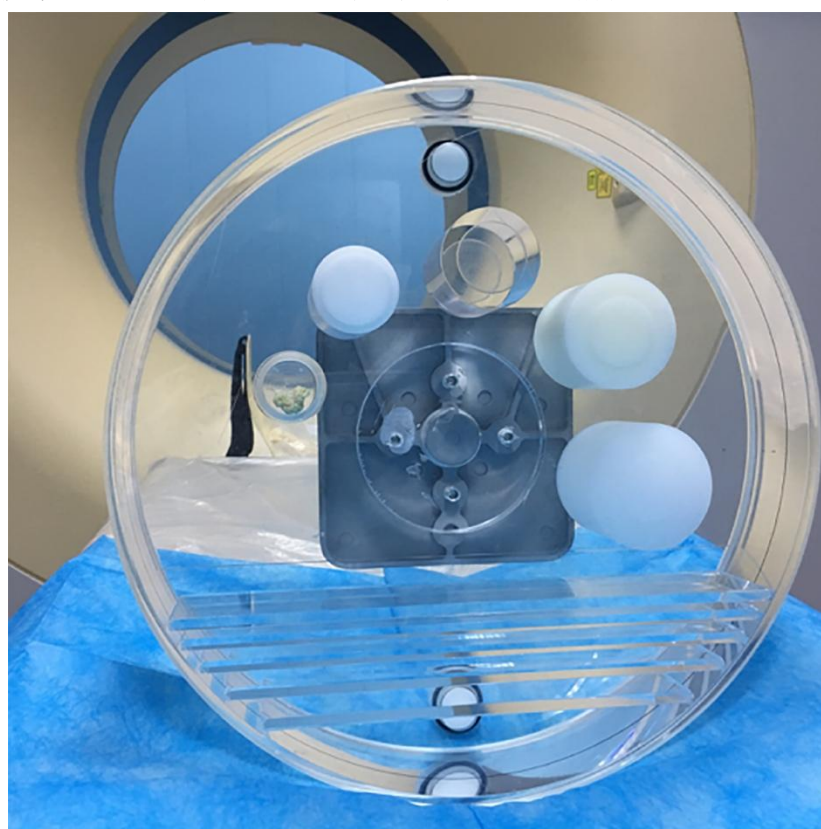


图 2 将胰管结石置于 TOS 水模型中，横向宽度为 35cm

（二）DECT 扫描方法

由具有 CT 扫描 5 年工作经验的放射科技师操作 256 层单源 CT 扫描仪（Brilliance iCT, Philips Healthcare, Cleveland, Ohio）进行 DECT 扫描。双能扫描协议将低/高管电压设置为 80kVp/140kVp，以实现最佳的 X 射线光能谱差异。基本扫描参数:转速:0.5 秒;准直宽度:16x0.625mm; 螺距:0.19。管电流设定，80kVp 时为 600mAs，140kVp 时为 150mAs。基本重建参数:层厚层间距均为 1mm，采用全模型迭代重建算法（IMR-级别 1）进行数据重建，详见表 1。

表 1 双能 CT 检查中的关键扫描参数、重建参数

扫描类型	螺旋扫描 / 双能
单圈转速	0.5s
准直宽度	16×0.625mm
螺距	0.19
水模尺寸	35cm
双能方案	80kV（600mAs） / 140kV（150mAs）
重建算法	IMR-等级 1
滤波函数	Routine
层厚	1mm
层间距	1mm

（三）图像分析

使用 MATLAB（Matlab R2015b, Mathworks Inc）编程的定制胰管结石分析软件对 DECT 的 DICOM 图像后处理，重建得到胰管结石的 CTR（CT number ratio，CTR）伪彩图与灰白图。CTR 定义为图像像素在低管电位下的 CT 值与高管电位下的 CT 值之比，结石的每个像素的 CTR 与预设的 CTR 阈值进行比较，CTR 高于阈值的像素被分类为 CA，CTR 低于阈值的像素被分类为 NCA。基于此对胰管结石进行成分分割。然后根据整块石头中的 CA 和 NCA 像素的数量得出 CA / NCA 比值（图 3、图 4）。预设阈值范围为 1.00~1.25，增量为 0.01。

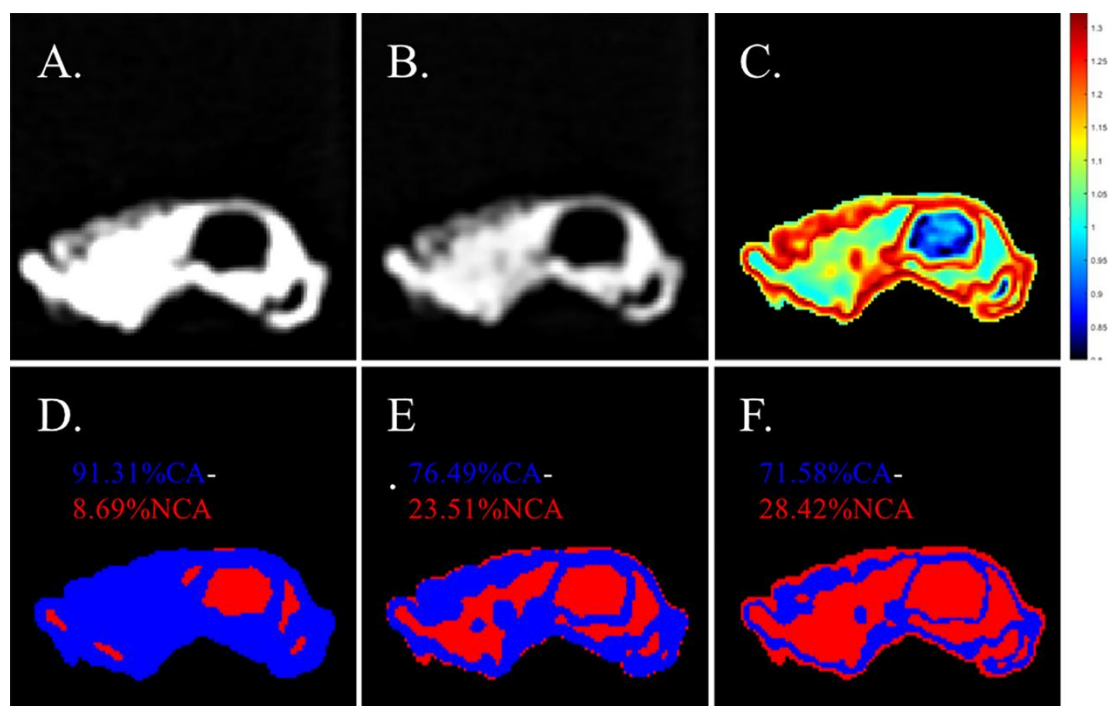


图 3 单源 DECT 的胰管结石成分示例。图 A、B、C 分别为胰腺结石同一层面的低能量和高能量 CT 图像以及相应的 CTR 伪彩图。图 D、E、F 分别为 CTR 阈值对应 1.00 (D)、1.16 (E)、1.20 (F) 的结石成分分析示意图, CA 为蓝色, NCA 为红色, 该结石的显微 CT 结石成分为 77.67%CA, 22.33%NCA, 单源 DECT 在不同 CTR 阈值下计算 CA 百分比的 RMSE 分别为 17.56% (D), 1.19% (E) 和 7.84% (F)

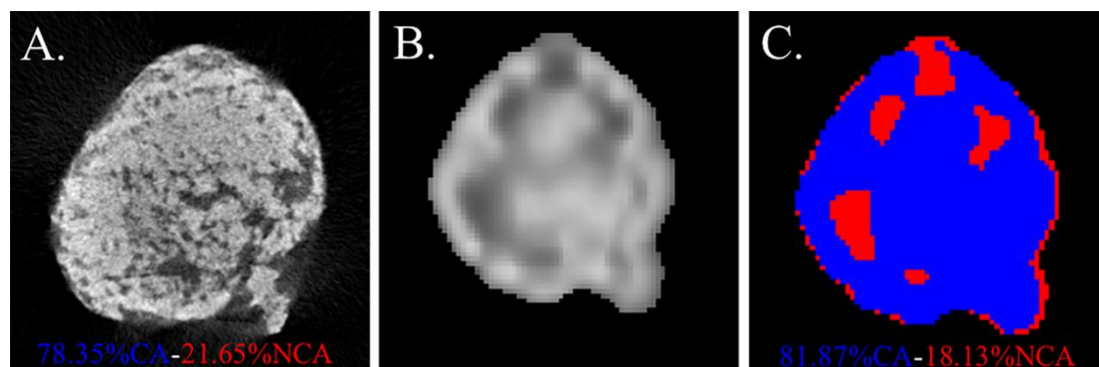


图 4 胰管结石显微 CT 图像 (A), CTR 灰度图 (B) 和 CTR 阈值对应 1.16 的结石成分图 (C) 展示

(四) 统计学方法

使用 SPSS 统计软件 (version 21.0, Chicago, III) 进行数据分析。

将在预设 CTR 阈值下从 DECT 图像计算得出的 CA 百分比与从显微 CT 获得的参考标准进行比较, 计算每个石头预设 CTR 阈值的 CA 百分比与参考标准的误差。由于胰腺结石被分为 CA 和 NCA 两大部分, 笔者选择每块石头中的 CA 百分比来评估两种

技术之间的差异。计算每个预设 CTR 阈值下 CA 百分比的均方误差 (RMSE)。RMSE 计算公式为: $RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (CA_{DECT} - CA_{microCT})^2}$, 其中 N 代表胰管结石数量(本研究取 12), CA_{DECT} 和 $CA_{microCT}$ 分别是单源 DECT 和显微 CT 计算得出的 CA 百分比。RMSE 最小值对应的预设 CTR 阈值为识别胰管结石成分的最佳 CTR 阈值。利用最佳 CTR 阈值, 将单源 DECT 图像计算的 CA 百分比与显微 CT 得出的参考标准进行配对 t 检验, $p < 0.05$ 判断为有统计学差异。

二、结果

(一) 显微 CT 计算胰管结石成分

胰管结石体积为 23.95~404.94mm³, 平均 (125.35±115.41) mm³。显微 CT 计算胰管结石 CA 百分比为 66.63%~83.54%, NCA 百分比为 16.46%~33.37%, 详见表 2。

表 2 显微 CT 计算胰管结石体积与成分

结石编号.	体积(mm ³)	CA(%)	NCA(%)
1	206.23	74.72	25.28
2	50.09	74.50	25.50
3	56.46	74.73	25.27
4	39.81	75.57	24.43
5	48.65	83.54	16.46
6	104.82	77.67	22.33
7	54.00	78.35	21.65
8	23.95	78.39	21.61
9	69.73	73.29	26.71
10	209.68	66.63	33.37
11	404.94	73.98	26.02
12	235.79	73.40	25.60

(二) DECT 计算胰管结石成分

计算每个预设 CTR 阈值下胰管结石的 CA 和 NCA 百分比，并将其与显微 CT 得出的结石成分参考比较，得出该 CTR 阈值下的 RMSE（表 3）。不同 CTR 计算得出的结石成分与参考标准的 RMSE 范围为 6%~16.96%。CTR 在（1.00，1.16）区间里，RMSE 随 CTR 增加而减小；CTR 在（1.16，1.25）区间里，RMSE 随 CTR 增加而增加。故得出最优 CTR 阈值取 1.16 时，DECT 计算得出的结石成分与参考标准最为接近，RMSE 仅为 6%（表 3，图 5）。

表 3 单源 DECT 在不同 CTR 阈值下的 CA 百分比和参考标准的 RMSE

结石编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	RMSE
ref.	74.72%	74.50%	74.73%	75.57%	83.54%	77.67%	78.35%	78.39%	73.29%	66.63%	73.98%	73.40%	
CTR													
1.00	88.76%	96.62%	84.93%	95.99%	96.43%	91.31%	90.65%	89.58%	95.95%	88.63%	87.37%	94.35%	16.96%
1.01	88.70%	96.43%	84.93%	95.30%	96.08%	90.65%	90.51%	89.30%	95.21%	88.17%	87.13%	93.81%	16.57%
1.02	88.26%	96.09%	83.84%	94.95%	95.37%	90.46%	90.08%	88.17%	94.47%	87.84%	86.63%	93.17%	16.06%
1.03	88.15%	95.66%	83.70%	93.90%	94.30%	89.90%	89.80%	87.61%	94.10%	87.32%	86.00%	92.32%	15.52%
1.04	87.65%	95.24%	82.74%	93.73%	93.23%	89.52%	89.52%	86.48%	93.37%	86.61%	85.36%	91.68%	14.95%
1.05	87.37%	94.66%	82.47%	93.21%	92.34%	88.48%	88.67%	85.35%	92.01%	85.79%	84.77%	90.83%	14.21%
1.06	86.98%	93.81%	81.51%	91.29%	91.44%	87.35%	88.53%	82.25%	91.65%	85.15%	84.23%	90.13%	13.40%
1.07	86.09%	93.19%	80.68%	89.55%	91.09%	86.31%	88.53%	81.41%	90.42%	84.41%	83.54%	89.71%	12.65%
1.08	85.25%	92.19%	80.00%	88.33%	89.13%	85.65%	88.53%	79.15%	89.56%	83.95%	83.00%	88.85%	11.90%
1.09	84.86%	91.09%	78.77%	87.11%	87.34%	85.17%	88.10%	77.46%	88.45%	83.07%	82.41%	87.79%	11.08%
1.10	84.42%	90.09%	78.22%	85.19%	86.45%	84.51%	87.25%	76.90%	86.86%	82.18%	81.62%	86.61%	10.16%
1.11	83.81%	89.09%	76.58%	83.62%	85.38%	83.29%	86.40%	75.77%	85.26%	81.51%	80.98%	85.65%	9.28%
1.12	83.31%	87.99%	75.21%	82.40%	83.07%	82.34%	85.41%	74.08%	83.66%	80.65%	80.44%	84.53%	8.48%
1.13	82.30%	86.76%	74.11%	81.18%	81.82%	80.83%	84.14%	71.83%	81.94%	79.86%	79.66%	83.89%	7.75%
1.14	81.86%	84.42%	72.88%	79.09%	80.21%	79.41%	83.43%	70.99%	80.10%	78.85%	78.53%	82.77%	6.86%
1.15	81.19%	82.09%	71.23%	78.05%	78.43%	77.53%	82.72%	69.30%	78.26%	77.96%	77.59%	81.23%	6.28%
1.16	80.47%	79.56%	68.90%	75.78%	77.90%	76.49%	81.87%	67.04%	76.41%	77.02%	76.66%	79.73%	6.00%
1.17	79.24%	77.80%	67.12%	72.82%	76.47%	75.45%	80.17%	64.51%	74.32%	76.34%	75.23%	78.77%	6.28%
1.18	78.30%	75.85%	64.79%	69.51%	75.40%	74.41%	77.76%	63.38%	71.87%	75.49%	73.76%	77.33%	6.76%
1.19	77.30%	73.51%	63.42%	66.20%	73.80%	73.56%	76.35%	61.13%	69.41%	74.60%	72.53%	75.95%	7.77%
1.20	76.52%	71.32%	61.23%	64.11%	72.73%	71.58%	74.65%	58.87%	66.71%	73.47%	71.25%	74.61%	9.01%
1.21	75.18%	68.94%	59.59%	62.72%	71.66%	69.78%	73.23%	57.75%	64.37%	72.25%	70.22%	73.28%	10.03%
1.22	73.62%	66.27%	57.12%	59.76%	69.70%	68.46%	71.39%	56.34%	62.65%	71.03%	69.14%	71.57%	11.54%
1.23	72.79%	63.46%	55.34%	58.89%	67.38%	67.33%	69.55%	52.68%	61.18%	69.74%	67.52%	69.92%	13.22%
1.24	71.90%	60.79%	54.52%	57.32%	65.42%	66.38%	69.12%	49.86%	58.85%	68.89%	66.19%	68.48%	14.69%
1.25	70.56%	58.31%	53.15%	55.40%	63.10%	64.78%	67.42%	47.32%	56.76%	67.60%	65.16%	66.19%	16.39%

释：ref.-结石成分参考标准

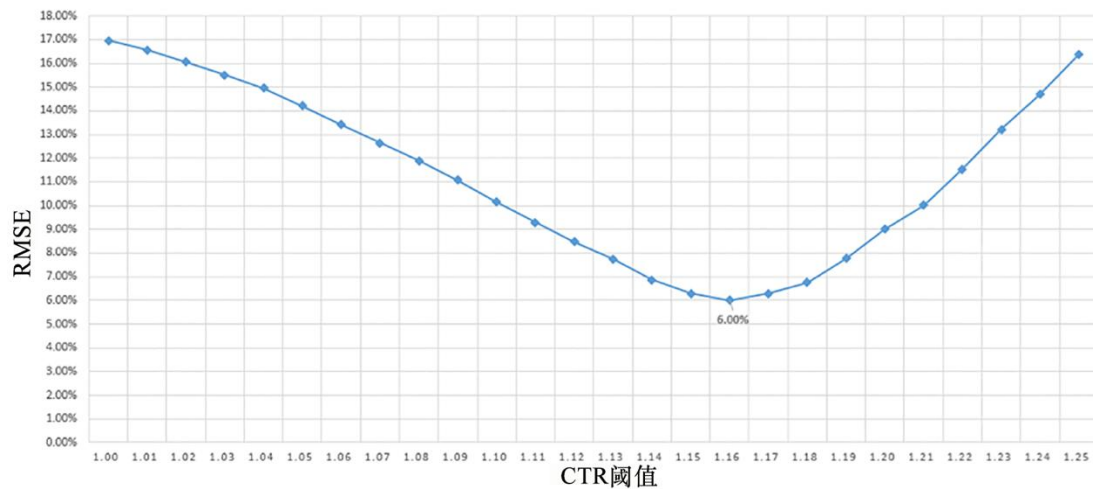


图 5 RMSE-CTR 阈值曲线图

最佳 CTR 阈值为 1.16 时, DECT 与显微 CT 计算的 CA 百分比进行配对 t 检验, 结果显示两者差异无统计学意义 ($p=0.414$)。

三、讨论

对于泌尿系结石或慢性胰腺炎胰管结石患者, ESWL 是一种被广泛接受的治疗方案, 但是无效的 ESWL 可能会延长患者的病程, 浪费医疗资源并导致经济负担, 因为 ESWL 术前评估是十分必要的。近年来关于泌尿系结石的一系列研究揭示了 ESWL 治疗结果与结石的一些影像学因子密切相关, 如结石大小, 位置, 数量, 密度等^[7, 8], 其中结石密度被认为是 ESWL 疗效最重要的预测参数^[9, 10], 这也正是笔者在第一部分研究得出的主要结论。学界普遍认为, 结石密度由其内部成分决定, 结石成分是影响其脆性的重要因素。

(一) 显微 CT 与结石成分分析

影像学显示胰管结石的几种成像方法中最简单的是传统的平片 X 线摄影术, 广泛用于检测结石的位置和大小, 但由于其分辨率低及重叠成像等限制, 无法用于描绘结石的内部结构^[11]。在泌尿系结石影像学研究中, 已经有报道指出高分辨率多层螺旋 CT 作为一种经济便捷的检查手段可以通过 X 线衰减值来区分尿酸 (uric acid, UA) 结石与非尿酸结石^[12, 13]。然而, 在单源 CT 扫描中不同物质成分的 X 线衰减值存在重叠, 导致结石含钙成分与其他混合成分的区别存在困难, 因此单源 CT 常规临床应用于预判结石成分并不可靠^[14]。在一些研究中使用红外光谱 (IR) 作为结石成分分析的金标准^[15, 16], 但是该方法需要破坏结石整体结构, 并且点采样的结石成分分析无法全面体现混合结石成分分布特征, 这些都限制了其在临床中对混合结石的成分分析中的应用。

显微 CT 是一种强大的结石分析工具,其采集图像可以达到微米级别的分辨率^[17],可以提供任何其他方法无法获得的结石的微观细节;可以在不破坏结石前提下对结石内部任何层面,任何角度进行观测。典型的显微 CT 系统的包括一个产生锥形光束的 X 射线源和一个探测器。与商用螺旋 CT 中 X 射线源和检测器围绕患者旋转不同,显微 CT 中,样本在静止 X 射线束内自身进行旋转。标本被放置在 X 射线的路径中,探测器获取信号。然后将样本旋转几分之一度,并获取另一幅图像。重复这个过程,直到试样旋转至少 180 度。然后用计算机对这组 X 射线图像进行重建,得到标本内部结构的图像^[18-20]。为了获得显微 CT 的高分辨率特征, X 射线的强度高且曝光时间长,使得这种显微 CT 不适合于活体。

泌尿系统中的结石具有相对较高的发病率以及较为复杂的成分,其中包括草酸钙(70%),磷酸钙(20%),尿酸(UA)(10%),胱氨酸,鸟粪石等^[21]。有研究将尿结石简单区分为 UA 和 NUA^[22],但由于混合结石的多样性,未能明确区分每个成分。相比之下,胰管结石中的成分相对简单,主要是碳酸钙(90%)和少量蛋白质或粘多糖^[23],两种成分具有明显不同的硬度和脆性。因此通过显微 CT 可以很容易地区分 CA 和 NCA 两种成分,其中 CA 成分由于质地坚硬很可能是 ESWL 治疗失败的主要原因。基于类似的机制,笔者推测具有高 CA 成分百分比的胰管结石对 ESWL 碎石效果具有更强的抵抗性,并且可能需要其他补充或替代疗法。相反,以 NCA 为主要成分的慢性胰腺炎胰管结石患者应该是更为适合 ESWL 治疗的候诊群体。这需要未来进一步的临床试验来证实这一假设。

(二) DECT 与结石成分分析

DECT 有四种主要技术,原理均基于两种不同能量的 X 射线穿透被测物,利用不同物质对 X 射线能量吸收曲线的差异,达到区分不同物质结构的目的^[24-26]。

1、双源 DECT:同时使用两个 X 射线管和两个探测器分别采集高、低能级的数据。该技术具有高时间分辨率等优点,但有限的中心视野降低了数据准确性;

2、瞬时双 kV 切换为技术核心的 DECT:单一 X 射线管顺势切换高低管电压,探测器收集在空间上高度吻合的高低能级数据。其具有完整的 50cm 视场等优点,但能谱的重叠相对较高;

3、双层探测器为技术核心的 DECT:采用双层探测器同时收集低能量和高能量数据,可以实现单次扫描即达到物质区分的目的,减少受检者辐射剂量,但也具有相对较高的能谱重叠;

4、单源 DECT:单源 CT 依次采取两次高低管电压扫描,探测器依次获取高能量数据和低能量数据进行数据后处理,但是在两次扫描之间发生的任何物理运动都可能干

扰图像质量和成分分析结果。由于本次研究我们采取的是体模测试,采用单源 DECT 技术可以排除因为体模在两次扫描期间移动带来的结果干扰,同时可以保持与传统 CT 扫描相同的高空间分辨率。

近年来有关 DECT 鉴别泌尿系结石类型的报道十分多见,但在胰腺结石研究方面上鲜有类似的报道。本研究在预设的 CTR 阈值为 1.16 的情况下,我们获得了 DECT 和显微 CT 之间的最小差异(6%),这小于 Leng S^[27]对泌尿系结石的研究中的误差。我们的研究表明,DECT 可以准确预测正常成人体型水模中体外胰管结石成分,为 DECT 预测 ESWL 治疗结果的临床应用奠定基础。但是需要考虑到的是,本次研究仅使用 80 和 140kV 两种管电压分别对应高低两种 X 射线,对于正常体型人群来说应该不存在问题,但是对于肥胖的受试者可能会造成胰管结石成分测量准确性的降低,主要是由于 80kV 管电压产生的 X 射线穿透力有限^[21, 28]。

为与临床工作流程相匹配,应当根据患者体型大小而改变扫描模式,对于肥胖体型受试者,DECT 扫描的高、低能级管电压应当适当地提升以追求理想的 X 线穿透力,并要求针对每个双能量(kV)模式调整最佳 CTR 阈值,这就意味着 DECT 预测结果的 RMSE 曲线会随着体型的改变而改变,我们结果表明 DECT 可以对正常体型患者混合胰管结石中 CA 和 NCA 成分的准确定量 RMSE 为 6%。所以本次研究的最佳 CTR 阈值仅适用于正常体型的水模。在这项研究中,预测结石成分的最佳 CTR 不仅取决于所使用的双能扫描模式,还可能取决于患者的体型^[15]。RMSE-CTR 阈值曲线如图 5 所示在最佳 CTR 阈值附近显示相对平坦的波谷,表明当选择的 CTR 与最佳值略有不同时, RMSE 不会显著增加。这使得在非理想情况下,如存在图像噪声时,CTR 阈值即使出现偏差也不会对 DECT 定量分析胰管结石结果产生太大的影响。

商用 DECT 数据中的一个潜在误差源是来自部分体积效应,这是由商用 CT 扫描仪有限的像素尺寸(约 0.5mm)和分辨率所限制。然而,显微 CT 数据由于非常高的空间分辨率,像素尺寸更是可以轻易达到微米级别,从而提供高度准确量化信息,因此大大降低了部分体积效应。本次研究发现 DECT 与显微 CT 计算的 CA 百分比进行配对 t 检验,结果显示两者差异无统计学意义($p = 0.414$),表明在量化胰管结石的 CA 百分比方面,商用 DECT 的空间分辨率是完全足够的。

(三) 研究的缺陷

本研究存在一下几点局限性。

首先,这是一项体外研究。将结石放置于模拟正常成人体型的水模中,摆放位置与实际胰腺结石所在人体体内的位置存在差异。而且不同体形之间的 X 射线穿透存在明显差异,这直接影响了胰管结石成分计算和最终的得到的最佳 CTR 阈值^[28]。最近一项

研究^[27]设计使用了各种尺寸的水模幻像以代表瘦到极度肥胖的各种体型,并根据体模大小得出了不同体型受检者的最佳 CTR 阈值。因此,未来研究还需要基于个体化的水模进行进一步的研究。

其次,胰管结石的数量相对较少。主要原因是大多数慢性胰腺炎胰管结石患者在消化内科就诊,ESWL+ERCP 取石是首选治疗方案,外科取石往往作为备选治疗方案。

第三,本研究仅关注 NCA 成分与 CA 成分的区分与定量。在未来更大样本量的研究中,有可能进一步区分和量化 NUA 成分。

尽管我们设定了一系列阈值来确定具有最小 RMSE 的最优 CTR 阈值,但这种体外研究不能完全取代人体。因此,本研究需要得到进一步临床试验的确认。将 DECT 对胰管结石成分的研究结合胰管结石成分对 ESWL 的疗效预测研究,深挖胰管结石成分的临床意义,为进一步合理制定慢性胰腺炎治疗策略打下基础。

总之,单源 DECT 能在离体结石水模研究中准确定量和鉴别混合胰管结石中 CA 和 NCA 成分,未来应用前景光明,需开展进一步临床研究。

参考文献

- [1] Zarse CA, McAteer JA, Sommer AJ, Kim SC, Hatt EK, Lingeman JE, et al. Nondestructive analysis of urinary calculi using micro computed tomography. *BMC Urol.* 2004; 4: 15.
- [2] Pramanik R, Asplin JR, Jackson ME, Williams JC, Jr. Protein content of human apatite and brushite kidney stones: significant correlation with morphologic measures. *Urol Res.* 2008; 36: 251-258.
- [3] Di Sebastiano P, di Mola FF, Büchler MW, Friess H. Pathogenesis of Pain in Chronic Pancreatitis. *Digestive Diseases.* 2004; 22: 267-272.
- [4] Dumonceau JM, Delhay M, Tringali A, Dominguez-Munoz JE, Poley JW, Arvanitaki M, et al. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy.* 2012; 44: 784-800.
- [5] Kijvikai K, de la Rosette JJM. Assessment of stone composition in the management of urinary stones. *Nature Reviews Urology.* 2010; 8: 81.
- [6] Zarse CA, Hameed TA, Jackson ME, Pishchalnikov YA, Lingeman JE, McAteer JA, et al. CT visible internal stone structure, but not Hounsfield unit value, of calcium oxalate monohydrate (COM) calculi predicts lithotripsy fragility in vitro. *Urol Res.* 2007; 35: 201-206.
- [7] Lee JY, Kim JH, Kang DH, Chung DY, Lee DH, Do Jung H, et al. Stone heterogeneity index as the standard deviation of Hounsfield units: A novel predictor for shock-wave lithotripsy outcomes in ureter calculi. *Scientific Reports.* 2016; 6: 23988.
- [8] Kanao K, Nakashima J, Nakagawa K, Asakura H, Miyajima A, Oya M, et al. Preoperative nomograms for predicting stone-free rate after extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol.* 2006; 176: 1453-1456; discussion 1456-1457.
- [9] Kambadakone AR, Eisner BH, Catalano OA, Sahani DV. New and evolving concepts in the imaging and management of urolithiasis: urologists' perspective. *Radiographics.* 2010; 30: 603-623.
- [10] Graser A, Johnson TR, Bader M, Staehler M, Haseke N, Nikolaou K, et al. Dual energy CT characterization of urinary calculi: initial in vitro and clinical experience. *Invest Radiol.* 2008; 43: 112-119.
- [11] Krishnamurthy MS, Ferucci PG, Sankey N, Chandhoke PS. Is stone radiodensity a useful parameter for predicting outcome of extracorporeal shockwave lithotripsy for stones < 2 cm? *International braz j urol.* 2005; 31: 3-9.

- [12] Perks AE, Schuler TD, Lee J, Ghiculete D, Chung D-G, D'A Honey RJ, et al. Stone Attenuation and Skin-to-Stone Distance on Computed Tomography Predicts for Stone Fragmentation by Shock Wave Lithotripsy. *Urology*. 2008; 72: 765-769.
- [13] Sheir KZ, Mansour O, Madbouly K, Elsobky E, Abdel-Khalek M. Determination of the chemical composition of urinary calculi by noncontrast spiral computerized tomography. *Urol Res*. 2005; 33: 99-104.
- [14] Shahnani PS, Karami M, Astane B, Janghorbani M. The comparative survey of Hounsfield units of stone composition in urolithiasis patients. *J Res Med Sci*. 2014; 19: 650-653.
- [15] Qu M, Jaramillo-Alvarez G, Ramirez-Giraldo JC, Liu Y, Duan X, Wang J, et al. Urinary stone differentiation in patients with large body size using dual-energy dual-source computed tomography. *Eur Radiol*. 2013; 23: 1408-1414.
- [16] Li X, Zhao R, Liu B, Yu Y. Gemstone spectral imaging dual-energy computed tomography: a novel technique to determine urinary stone composition. *Urology*. 2013; 81: 727-730.
- [17] Williams JC, Jr., McAteer JA, Evan AP, Lingeman JE. Micro-computed tomography for analysis of urinary calculi. *Urol Res*. 2010; 38: 477-484.
- [18] Ritman EL, Bolander ME, Fitzpatrick LA, Turner RT. Micro-CT imaging of structure-to-function relationship of bone microstructure and associated vascular involvement. *Technol Health Care*. 1998; 6: 403-412.
- [19] Ruegsegger P, Koller B, Muller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int*. 1996; 58: 24-29.
- [20] Muller R, Hahn M, Vogel M, Delling G, Ruegsegger P. Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies: comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections. *Bone*. 1996; 18: 215-220.
- [21] Primak AN, Fletcher JG, Vrtiska TJ, Dzyubak OP, Lieske JC, Jackson ME, et al. Noninvasive differentiation of uric acid versus non-uric acid kidney stones using dual-energy CT. *Acad Radiol*. 2007; 14: 1441-1447.
- [22] Mansouri M, Aran S, Singh A, Kambadakone AR, Sahani DV, Lev MH, et al. Dual-Energy Computed Tomography Characterization of Urinary Calculi: Basic Principles, Applications and Concerns. *Curr Probl Diagn Radiol*. 2015; 44: 496-500.
- [23] Farnbacher MJ, Voll RE, Faissner R, Wehler M, Hahn EG, Lohr M, et al. Composition of clogging material in pancreatic endoprostheses. *Gastrointest Endosc*. 2005;

61: 862-866.

[24] Rassouli N, Etesami M, Dhanantwari A, Rajiah P. Detector-based spectral CT with a novel dual-layer technology: principles and applications. *Insights Imaging*. 2017; 8: 589-598.

[25] McCollough CH, Leng S, Yu L, Fletcher JG. Dual- and Multi-Energy CT: Principles, Technical Approaches, and Clinical Applications. *Radiology*. 2015; 276: 637-653.

[26] Kulkarni NM, Eisner BH, Pinho DF, Joshi MC, Kambadakone AR, Sahani DV. Determination of renal stone composition in phantom and patients using single-source dual-energy computed tomography. *J Comput Assist Tomogr*. 2013; 37: 37-45.

[27] Leng S, Huang A, Cardona JM, Duan X, Williams JC, McCollough CH. Dual-Energy CT for Quantification of Urinary Stone Composition in Mixed Stones: A Phantom Study. *American Journal of Roentgenology*. 2016; 207: 321-329.

[28] Qu M, Ramirez-Giraldo JC, Leng S, Williams JC, Vrtiska TJ, Lieske JC, et al. Dual-energy dual-source CT with additional spectral filtration can improve the differentiation of non-uric acid renal stones: an ex vivo phantom study. *AJR Am J Roentgenol*. 2011; 196: 1279-1287.

第三部分 胰腺纤维化动物模型的分子磁共振诊断

慢性胰腺炎（chronic pancreatitis）患者早期多无不适，中晚期典型的临床表现为腹痛、消化不良、腹泻、糖尿病。这都与胰腺强大的外分泌功能储备有密切关系。早期诊断一直是 CP 的一大挑战，典型影像学表现（胰管结石；胰管狭窄、串珠样扩张；腺体萎缩等）出现往往已经提示 CP 进入中晚期，此时患者的生存质量已经明显下降，临床干预治疗效果往往不佳。CP 早期主要的病理改变是胰腺间质纤维化^[1]，胰腺纤维化分期对评价 CP 进展及预后具有重要意义^[2,3]，胰腺穿刺活检虽是诊断 CP 纤维化的金标准^[4]，但由于穿刺的有创性、取材局限性等缺点，限制了其在临床上的应用。目前胰腺纤维化的机制目前尚不完全明了，临床对胰腺纤维化的整体认识尚浅^[5]，并且临床缺乏有效的逆转胰腺纤维化的治疗方案。

胶原蛋白的过度表达是胰腺纤维化的标志。EP3533 是一种基于钆的分子探针，可以与 I 型胶原蛋白特异性结合^[6]，此前已有报道其在心肌^[7]、肝脏^[8,9]的纤维化动物模型中的应用。

本研究通过构建不同纤维化程度的 CP 小鼠模型，对其进行 EP3533 分子 MRI 成像，测量胰腺组织不同强化时间点的ΔSNR 值，判断与胰腺纤维化分级之间的关系。

一、材料与方法

（一）实验动物

从中国人民解放军海军军医大学实验动物中心购买雄性 SPF 级 C57BL / 6 小鼠 42 只，6-7 周龄，体重 21.94±0.88g。实验前置于 SPF 级实验室内常规饲养一周，湿度恒定适宜，环境温度 23±2℃ 的温度，昼夜交替 12 小时。

（二）实验试剂

试剂	厂家
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司
雨蛙肽	美国 YEASEN 公司
生理盐水	杭州天瑞药业有限公司
HE 染色液	武汉云克隆
磷酸盐缓冲液（PBS）	自制

Weigert 铁苏木素染色液	自制
PBS	自制
立春红酸性品红	自制
1%磷钼酸液	自制
2%醋酸苯胺蓝	自制
异氟烷	河北一品制药有限公司
EP3533	北京孚博生物科技有限公司
Gd-DTPA	北京北陆药业股份有限公司
Cy5.5 NHS ester	美国 Lumiprobe 公司

(三) 实验仪器

名称	厂家	型号
包埋机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-BM
病理切片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-2258
摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-P
冻台	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-BL
烤箱	上海精宏实验设备有限公司	PHG-9070A
载玻片及盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432C
正置光学显微镜	日本奥林巴斯	OLYMPUS CK31
数字全扫仪器	3DHISTECH	Pannoramic SCAN
成像系统	明美 MSHOT	TVO.63XC-MO
3.0T 超导型磁共振成像仪	美国 GE 公司	Signa HDX
4 通道 MOUSE 专用线圈	上海辰光医疗科技股份有限公司	未知
小动物活体光学成像系统	美国 Xenogen 公司	IVIS Lumina II
小动物麻醉机	英国 MSS 公司	MSS-3

(四) Cy5.5-EP3533 合成

将 1mg EP3533 (Gd-DTPA-GKWHCTTKFPHHYCLY) 粉末加入 1ml 纯水, 配比成 1mg / ml 溶液。取 100 μ g Cy5.5 NHS 溶于 400 μ l 纯水中, 同时加热至 37 $^{\circ}$ C 并通过超声波水浴增加其溶解度。将配置好的 EP3533 溶液与 Cy5.5 NHS 溶液混合, 注意避光操作, 混合溶液过夜保存。次日将配比好的混合溶液至于 5KD 分子量的透析袋中, 过夜保存, 备用。

(五) 胰腺纤维化小鼠模型建立

1、动物分组与编号

42 只雄性 C57BL / 6 小鼠采用完全随机分组发分为对照组 (n=14), 轻度胰腺纤维化组 (n=14) 以及重度胰腺纤维化组 (n=14)。具体随机化分组的方式为: 采用 SAS 9.4 软件的 PLAN 过程生成随机数, 种子数设为 123456, factors 语句中的水平数设为 42, 代表 42 只小鼠; 然后使用 treatments 语句将产生的随机号均匀分到三个组, cyclic 选项中的编码 1、2、3 分别代表对照组、轻度纤维化组和重度纤维化组, 每组各 14 个相同编码, 共 42 个编码, 由此完成完全随机化分组设计。采用金属耳标对小鼠编号。

2、建模方案

42 只雄性 C57BL / 6 小鼠采用完全随机分组发分为对照组, 轻度胰腺纤维化组以及中重度胰腺纤维化组, 每组 14 只。轻度胰腺纤维化组: 一天腹腔注射雨蛙肽 7 次, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1.25 $\mu\text{g}/\text{只}$), 每次注射间隔 1 小时, 每周一天。共注射 6 周。中重度胰腺纤维化组: 每周第 1~3 天、5~7 天腹腔注射乙醇 (33%) 两次, 每次 150ul, 2 次腹腔注射间隔 12 小时。第 4 天腹腔注射雨蛙肽 7 次, 每次 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1.25 $\mu\text{g}/\text{只}$), 注射间隔 1 小时。对照组: 每天腹腔注射与中重度纤维化组等量的生理盐水。

以上建模方式持续 6 周, 详见表 1。

表 1 不同胰腺纤维化程度 CP 小鼠模型建模方案

		对照组	轻度胰腺纤维化组	中重度胰腺纤维化组
注射药物	生理盐水 0.9%(150μl)	雨蛙素 (50μg / kg)	雨蛙素 (50μg / kg) + 乙醇 33% (3g / kg)	
一天 2 次乙醇腹腔注射， 间隔 12 小时每周 6 天， 持续 6 周	否	否	是	
一天内 2 次生理盐水腹腔 注射，间隔 12 小时，每 周 6 天，持续 6 周	是	否	否	
一天内连续 7 次雨蛙素腹 腔注射每次间隔 1 小时， 每周 1 天，持续 6 周	否	是	是	

一天内连续7次生理盐水

腹腔注射每次间隔1小

是

否

否

时,每周1天,持续6周

(六) Cy5.5-EP3533 胰腺分布

为证明 EP3533 能否有效区分轻度、中重度胰腺纤维化模型,三组模型鼠各取4只,通过异氟烷吸入麻醉小鼠。通过尾静脉注射 Cy5.5-EP3533,剂量为 $500\mu\text{g Cy5.5/kg}$ 。注射后1小时,将模型小鼠处死,并取出胰腺组织,用 IVIS Lumina II 小动物活体光学成像系统(美国, Xenogen)立刻进行拍摄,并通过内置的 CCD 照相机采集图片。

(七) 影像学检查

1、动物麻醉与磁共振扫描摆位

(1) 填充麻药:在刻度盘关闭或气源关闭的情况下打开倒药口,加入至少20ml 异氟烷,加药后拧紧倒药口

(2) 打开空气泵,开至最大。打开流量计,调节流量到 1L/min 。

(3) 麻醉诱导:将气路引入诱导箱,流量计开到 1L/min ,调节刻度盘至麻醉药浓度到5%,诱导箱中放入小鼠一只2分钟左右,后面平均1分钟,老鼠倒下后建议静置10余秒,待老鼠完全麻醉后诱导即完成

(4) 面罩控制与摆位:将气路切换到面罩,流量调到 $400\sim 600\text{ml/min}$ 之间,浓度调到1%~3%,将诱导箱内小鼠拿出,连接麻醉面罩后放入4通道小动物专用线圈,小鼠取仰卧位,为减少呼吸伪影,用自制米袋放置于小鼠腹部,剑突下水平对准线圈中心“十字”标记,等待扫描。

2、磁共振扫描方法

MR 检查之前,小鼠禁食过夜6-8小时。麻醉摆位后在3.0T MRI 扫描仪进行数据采集,扫描采用美国 GE Signa Excite 3.0T MR 扫描仪。EP3533 粉末用 PBS 溶液配制成 5mmol/L 靶向造影剂溶液,给药剂量 $20\mu\text{mol/kg}$ 。Gd-DTPA 用 PBS 稀释成 15mmol/L 非靶向造影剂溶液,为与靶向造影剂产生类似的信号增强,给药剂量 $100\mu\text{mol/kg}$ ^[8]。

(1) 中重度胰腺纤维化模型的分子 MRI 成像

中重度胰腺纤维化组小鼠10只,麻醉摆位后首先平扫采集基线图像,然后经尾静脉推注 Gd-DTPA,注射造影剂之前和之后的扫描部位尽可能保持一致。并在注射造影剂后5-60min 内进行多次 T1WI 扫描。结束扫描将动物放回笼中继续饲喂。为确保 Gd-DTPA 代谢完全,待48-72 小时后再次成像,再次平扫采集基线图像,然后经尾静脉注射 EP3533,注射造影剂之前和之后的扫描部位尽可能保持一致。并在注射造影剂

后 5-60min 内重复 T1WI 扫描。采集增强图像时间点分别为注射造影剂之后的 5min、10min、20min、30min、40min、50min、60min。在第二次成像后，处死动物，取出胰腺组织待进一步分析。

(2) EP3533 在鉴别轻度、中重度胰腺纤维化模型中的应用

对照组 (n=10)、轻度胰腺纤维化组 (n=9) 小鼠，麻醉摆位后首先平扫采集基线图像，然后经尾静脉推注 EP3533，注射造影剂之前和之后的扫描部位尽可能保持一致。并在注射造影剂后 5-60min 内进行多次 T1WI 扫描。扫描完成后，处死动物并解剖取出胰腺组织进行下一步分析。

(3) 基线扫描参数

	(Axi) T1WI 3D	(Axi) T2WI
TR (ms)	7.7	2867
TE (ms)	2.9	110
FOV (cm ²)	7×7	8×8
层厚 (mm)	1.2	2
矩阵	512×512	256×256
翻转角 (°)	15	/

(4) 影像数据处理

所有影像图像导入影像后处理工作站，单只动物模型平扫、增强不同时间点图像测量选取同一层面，尽量在胰腺面积最大层面。在胰腺区域手绘 ROI，避开周围大血管。观察并记录 T1WI 信噪比 (Signal-Noise Ratio, SNR)，通过如下公式计算得出 $\Delta\text{SNR}^{[10]}$ ，代表增强后每个时间点胰腺 ROI 区域胰腺 SNR 相对于基线的强化程度。

$$\Delta\text{SNR} = \frac{\text{Post contrast SNR} - \text{Pre contrast SNR}}{\text{Pre contrast SNR}} \tag{1}$$

(八) 组织病理学检查

1、取材、制片、HE 染色与 Masson 染色

扫描后 2 小时内采取颈椎脱臼法处死小鼠，平铺于自制动物手术台上，四肢取弹簧夹固定，手术刀沿腹中线打开腹腔，将胃向上翻提暴露胰腺，观察胰腺整体形态、色泽，于十二指肠降段找到附着于此处的胰头，沿十二指肠壁用眼科剪分离胰腺，取出胰腺肉眼观察，生理盐水冲洗后，用 4% 多聚甲醛固定液固定 24 小时以上。去除组织脱水与包埋制成蜡块，将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片，得到石蜡切片。然后进行 HE 染色与 Masson 染色。

2、病理学胰腺纤维化分级

根据 Wellner 于 2010 报道的胰腺纤维化分级标准^[11]，由具有 10 年工作经验的病理

学家在对胰腺 HE 染色切片不知情的情况下对样本使用胰腺纤维化分级标准进行分级（表 2）。使用以下标准进行胰腺实质的组织学评估：正常胰腺实质，无纤维化变化;轻度纤维化，导管纤维组织增厚;中度纤维化，小叶间隔明显硬化，没有明显结构破坏；重度纤维化，导管纤维组织增厚，小叶间隔明显硬化，同时观察到腺泡结构的破坏。

表 2 胰腺纤维化分级标准

纤维化等级	病理学描述
正常	腺泡结构完整，导管纤维组织无明显增厚
轻度纤维化	导管纤维组织轻度增厚
中度纤维化	导管纤维组织增厚，小叶间隔明显硬化
重度纤维化	导管纤维组织增厚，小叶间隔明显硬化，检测到腺泡结构破坏

（九）统计学分析

使用 SPSS 统计软件（version 21.0, Chicago, III）进行统计学分析。正态分布的计量资料用（ $\bar{x} \pm SD$ ）表示，非正态分布的计量资料采用 Median（Q1, Q3）表示。两相关样本的比较采用配对样本 t 检验或符号秩检验（图 3）；重复测量资料采用重复测量的方差分析进行组间比较（图 4）。若处理组与时间不存在交互作用，可进一步进行处理组间或测量时间点主效应的两两比较。若存在交互作用，则无需进行主效应分析，而应进行处理组别的单独效应分析（本研究主要关注处理组的单独效应），即检验固定时间因素于某一水平时各个组别之间的 ΔSNR 均值是否不全相同。具体的单独效应分析方法为：采用单因素方差分析比较三组之间的 ΔSNR 均值总体上差异是否有统计学意义，若有，则进一步采用 LSD-t 检验方法进行多重比较。P 值<0.05 被认为具有统计学意义（* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001）。

二、结果

（一）动物模型一般情况

造模 6 周结束，对照组（n=14）、重度胰腺纤维化组（n=14）全部存活。轻度胰腺纤维化组（n=13）造模第 5 周死亡 1 只，观察发现躯干无打斗痕迹，解剖打开腹腔发现大量褐色混浊液体，考虑造模过程中腹腔注射不当引起肠穿孔导致小鼠死亡。对照组小鼠造模期间食欲可，精神正常，夜间活动频繁，毛色光亮，对外界反应灵敏。轻度胰腺纤维化组小鼠成模期间互相打斗明显，食量减少，毛色尚光亮。中重度组小鼠在造模第

4 周开始出现毛色灰暗无光泽及脱毛的表现，精神萎靡，夜间活动较少。

（二）大体标本观察及镜下观察

1、大体标本

影像学扫描后，小鼠依次采取颈椎脱臼法处死打开腹腔，三组小鼠均可发现中量透亮积液。暴露胰腺后进行大体观察：对照组小鼠胰腺组织形态完整，呈粉红色，质地均匀细腻；轻度胰腺纤维化组小鼠胰腺组织形态尚完整，颜色稍灰白，轻度水肿；中重度胰腺纤维化组小鼠胰腺组织体积较小，形态欠规则，可见水肿。



图 1 三组模型鼠大体胰腺标本观察。

2、HE 染色与纤维化分级

（1）对照组胰腺组织分叶状结构存在，腺泡未见萎缩，小叶内及小叶间导管均未见纤维化，其间散在无异常的胰岛组织。未见明显炎细胞浸润。（图 2A）

（2）轻度胰腺纤维化组显示轻度胰腺纤维化的组织病理学变化，胰腺组织分叶状结构存在，腺泡未见萎缩，胰岛组织无异常。小叶间导管轻度纤维化，导管纤维组织增厚，间质见血管扩充血张，未见炎细胞浸润。（图 2B）

（3）中重度胰腺纤维化组显示中重度胰腺纤维化的组织病理学变化，胰腺组织分叶状结构破坏，部分腺泡细胞疏松水肿，部分腺泡细胞鹰眼样巨细胞病变，胰岛组织无异常。小叶间导管明显纤维化，导管纤维组织增厚，周围见小灶淋巴细胞浸润，灶性小导管增生，间质见血管扩张充血。（图 2C）

3、Masson 染色

根据 Masson 染色结果，纤维化程度中重度胰腺纤维化组>轻度胰腺纤维化组>对照组。

（1）对照组胰腺组织胰腺导管周围及小叶周围可见胶原纤维染成蓝色，胶原纤维未见明显增厚。（图 2D）

(2) 轻度胰腺纤维化组胰腺导管周围及小叶周围可见胶原纤维染成蓝色，小叶间导管周围可见胶原纤维增厚，小叶间隔胶原纤维未见明显增厚。(图 2E)

(3) 重度胰腺纤维化组胰腺导管周围及小叶周围可见胶原纤维染成蓝色，小叶间导管周围及小叶间隔可见胶原纤维增厚。(图 2F)

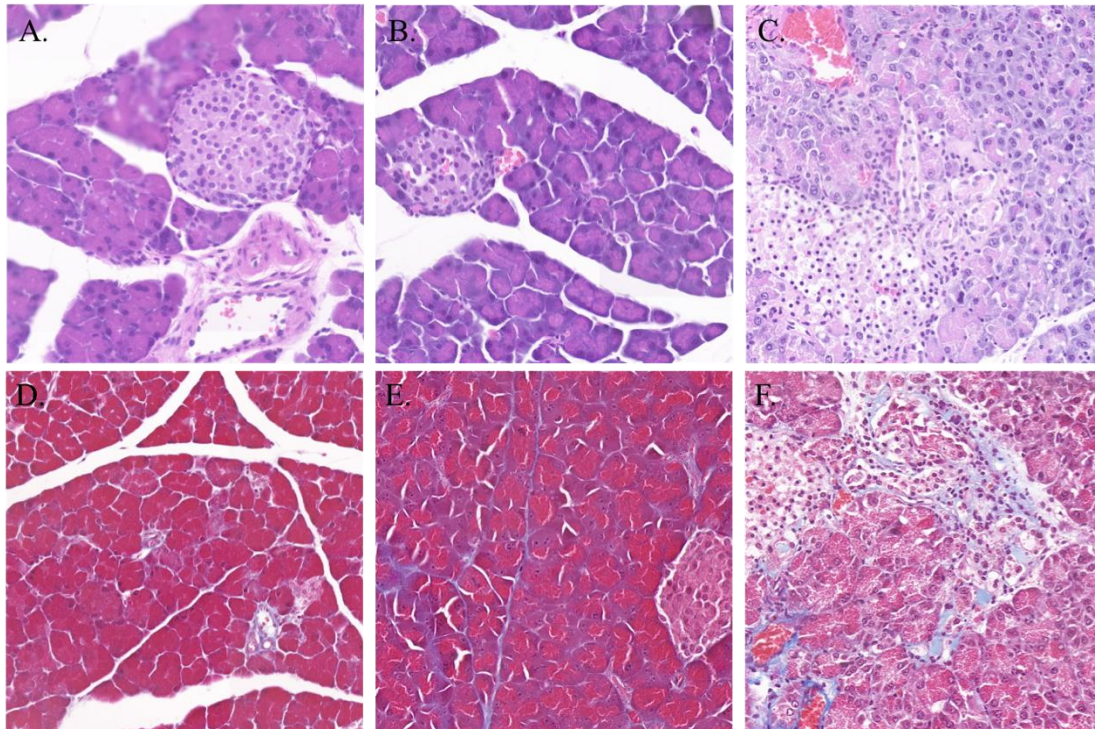


图 2 胰腺纤维化动物模型病理学检查图片 图 2A-C 分别对应对照组、轻度胰腺纤维化组、中重度胰腺纤维化组的胰腺组织 HE 染色 $\times 40$ ；图 2D-F 分别对应对照组、轻度胰腺纤维化组、中重度胰腺纤维化组的胰腺组织 Masson 染色 $\times 40$

(三) 胰腺纤维化的分子成像

1、中重度胰腺纤维化模型的分子 MRI 成像

中重度纤维化模型建立后，取 10 只模型鼠，经尾静脉注射 Gd-DTPA 后 5-60min 内重复进行 T1WI 扫描，48-72 小时后再次尾静脉注射 EP3533，5-60min 内重复 T1WI 扫描。对比两种造影剂注射前、注射后各时间点的轴位 T1WI 的胰腺 ROI 区域信号强度。图 3A 展示了两组造影剂注射后 T1WI 图像上小鼠胰腺 ROI 中 SNR 的定量变化。模型鼠在两次增强前的胰腺基线 SNR (time=0) 差异无统计学意义 ($p=0.166$)，可以观察到模型鼠胰腺 SNR 在注射 Gd-DTPA 后 5min 即达到峰值 46.02 ± 9.5 ，5-60min 时间段内 SNR 急剧下降，至 60min 时 SNR 已经降至 33.82 ± 7.08 。模型鼠胰腺 SNR 在注射 EP3533 后 5min 达到 41.42 ± 8.91 ，5-60min 时间段内 SNR 持续渐进性升高，至 40min SNR 达峰值

51.85±7.35, 图 3B 所示 EP3533 组 40min 的胰腺ΔSNR 显著高于 Gd-DTPA 组($p<0.001$), 表明 EP3533 能在中重度纤维化的胰腺组织内持久停留, 缩短胰腺组织的氢质子 T1 弛豫时间并导致组织 T1WI 信号增高, 提高组织间及组织病变间对比度。

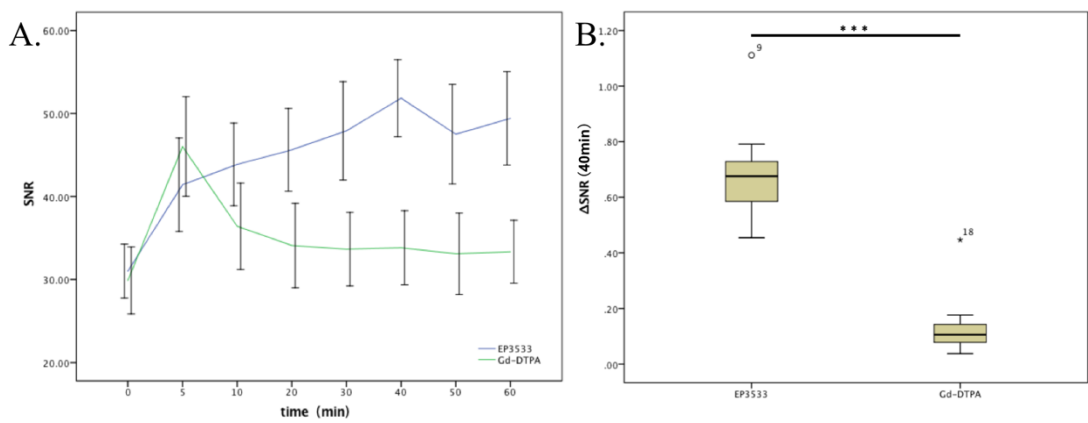


图 3 中重度胰腺纤维化小鼠分子 MRI 成像。图 3A 中重度胰腺纤维化小鼠模型分别注射 Gd-DTPA 和 EP3533 后胰腺 SNR 值随时间变化曲线; 图 3B Gd-DTPA 和 EP3533 鼠尾静脉注射后 40min, 胰腺 ROI 中ΔSNR 均值比较, 采用配对样本 t 检验(*** $p<0.001$ 。)

2、EP3533 在鉴别轻度、中重度胰腺纤维化模型中的应用

应用 EP3533 来验证它是否可用于鉴别轻度和中重度胰腺纤维化。图 4A 展示三种模型小鼠胰腺的轴位 T1WI。在图像中手动绘制的 ROI (红色虚线) 用于定量测定注射造影剂前及注射造影剂后各时间点胰腺的 SNR。为了获得更佳的辨别效果, 我们使用等式 (1) 计算 ΔSNR 值。图 4B 展示 EP3533 注射后胰腺 ROI 定量测量的ΔSNR 随时间变化曲线。如表 3 所示: 对照组健康小鼠注射 EP3533 的ΔSNR 在 5min 时到达峰值, 为 0.40±0.09, 并在 60min 下降至 0.11±0.08; 而轻度和中重度胰腺纤维化模型在注射 EP3533 后 40min 达到ΔSNR 峰值, 分别为 0.49±0.14、0.69±0.18。

表 3 不同组别在注射 EP3533 后各时间点ΔSNR 的均值

组别	0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
对照组	0	0.40	0.38	0.32	0.21	0.11	0.09	0.11
轻度纤维化	0	0.35	0.34	0.35	0.35	0.49	0.42	0.42
中重度纤维化	0	0.33	0.41	0.47	0.54	0.69	0.53	0.59

进一步, 采用重复测量方差分析 (repeated ANOVA) 比较不同时间点的各个组别的ΔSNR 值, 用于反映胰腺 ROI 中ΔSNR 值对于胰腺纤维化程度的鉴别能力。结果见表 4-表 6 和图 4B、图 4C。

表 4 球形性检验结果

组内效应	Mauchly's W	卡方	自由度	P 值	校正系数 ϵ		
					格林豪斯-盖 斯勒	辛-费德特	下限
t	0.077	60.080	27	<0.001	0.599	0.783	0.143

表 5 组内效应一元方差分析结果

变异来源	检验统计量	III 型平方和	自由度	均方	F 值	P 值
time	假设球形度	3.708	7.000	0.530	54.163	<0.001
	格林豪斯-盖斯勒	3.708	4.190	0.885	54.163	<0.001
	辛-费德特	3.708	5.480	0.677	54.163	<0.001
	下限	3.708	1.000	3.708	54.163	<0.001
time * group	假设球形度	2.318	14.000	0.166	16.926	<0.001
	格林豪斯-盖斯勒	2.318	8.381	0.277	16.926	<0.001
	辛-费德特	2.318	10.960	0.211	16.926	<0.001
	下限	2.318	2.000	1.159	16.926	<0.001
误差 (time)	假设球形度	1.780	182.000	0.010		
	格林豪斯-盖斯勒	1.780	108.948	0.016		
	辛-费德特	1.780	142.482	0.012		
	下限	1.780	26.000	0.068		

表 6 组间效应方差分析结果

	III 型平方和	自由度	均方	F 值	P 值
截距	25.160	1	25.160	1402.160	<0.001
group	2.346	2	1.173	65.377	<0.001
误差	0.467	26	0.018		

从表 4 的球形性检验结果可知, $P<0.001$, 故需对自由度进行校正。该表右侧列出了 3 种校正方法的校正系数。从组内效应一元方差分析结果(表 5)可知, 不同时间 ΔSNR 值差异有统计学意义 ($P<0.001$), 时点与组别存在交互作用 ($P<0.001$)。组间效应方差分析结果(表 6)提示三个组别 (group) 的差异有统计学意义 ($P<0.001$), 不同组别对 ΔSNR 值的主效应不全相同。从图 4B 和 4C 可知, 随着时间变化, 各个组别的 ΔSNR 平均值的变化趋势不尽相同, 组别与时间存在交互作用。

由于存在交互作用, 则无需进行主效应分析, 而应进行组别因素的单独效应分析, 即检验固定时间因素于某一水平时各个组别之间的 ΔSNR 值是否不全相同。本研究将分别考察固定时间 30min、40min 和 60min 三个时间点的三组模型鼠的 ΔSNR 值。具体为:

以时间点 30min 为例,采用单因素方差分析比较三组之间的 Δ SNR 平均值总体上差异是否有统计学意义,若有,则进一步采用 LSD-t 检验方法进行多重比较。结果见表 7-表 12。

(1) 30min: 由表 7 可知,EP3533 注射后 30min 时三组的 Δ SNR 值总体差异有统计学意义,由表 8 两两比较结果可知,对照组与轻度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义($p=0.011$);对照组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义($p<0.001$);轻度纤维化组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义($p=0.001$)。

表 7 EP3533 注射后 30min 时组别因素单独效应方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
组间	0.537	2	0.268	23.959	<0.001
组内	0.291	26	0.011		
总计	0.828	28			

表 8 EP3533 注射后 30min 时不同组别两两比较结果

(I) group	(J) group	平均值差值		P 值	差值 95% 置信区间	
		(I-J)	标准误		下限	上限
对照	轻度	-0.134*	0.049	0.011	-0.234	-0.034
	中重度	-0.326*	0.047	<0.001	-0.423	-0.229
轻度	对照	0.134*	0.049	0.011	0.034	0.234
	中重度	-0.192*	0.049	0.001	-0.292	-0.092
中重度	对照	0.326*	0.047	<0.001	0.229	0.423
	轻度	0.192*	0.049	0.001	0.092	0.292

注: *: 平均值差值的显著性水平为 0.05。

(2) 40min: 由表 9 可知,EP3533 注射后 40min 时三组的 Δ SNR 值总体差异有统计学意义,由表 10 两两比较结果可知,对照组与轻度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义($p<0.001$);对照组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义($p<0.001$);轻度纤维化组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义($p=0.005$)。

表 9 EP3533 注射后 40min 时组别因素单独效应方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
组间	1.685	2	0.843	43.172	<0.001
组内	0.507	26	0.020		

总计	2.193	28
----	-------	----

表10 EP3533注射后40min时不同组别两两比较结果

(I) group	(J) group	平均值差值		P 值	差值 95% 置信区间	
		(I-J)	标准误		下限	上限
对照	轻度	-0.375	0.064	<0.001	-0.507	-0.243
	中重度	-0.572	0.062	<0.001	-0.700	-0.444
轻度	对照	0.375	0.064	<0.001	0.243	0.507
	中重度	-0.197	0.064	0.005	-0.329	-0.065
中重度	对照	0.572	0.062	<0.001	0.444	0.700
	轻度	0.197	0.064	0.005	0.065	0.329

注：*：平均值差值的显著性水平为 0.05。

(3) 60min: 由表 11 可知, EP3533 注射后 60min 时三组的 Δ SNR 值总体差异有统计学意义, 由表 12 两两比较结果可知, 对照组与轻度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p<0.001$); 对照组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p<0.001$); 轻度纤维化组与中重度纤维化组的胰腺 Δ SNR 的差异具有统计学意义 ($p<0.001$)。

表 11 EP3533 注射后 60min 时组别因素单独效应方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
组间	1.685	2	0.843	43.172	<0.001
组内	0.507	26	0.020		
总计	2.193	28			

表12 EP3533注射后60min时不同组别两两比较结果

(I) group	(J) group	平均值差值		P 值	差值 95%置信区间	
		(I-J)	标准误		下限	上限
对照	轻度	-0.319	0.039	<0.001	-0.399	-0.238
	中重度	-0.486	0.038	<0.001	-0.565	-0.408
轻度	对照	0.319	0.039	<0.001	0.238	0.399
	中重度	-0.168	0.039	<0.001	-0.248	-0.087
中重度	对照	0.487	0.038	<0.001	0.408	0.565
	轻度	0.168	0.039	<0.001	0.087	0.248

注：*：平均值差值的显著性水平为 0.05。

总之，上述结果表明 EP3533 在注射后 30-60min 内，造影剂能在胰腺中的持久高水平地停留，这不仅有助于轻度胰腺纤维化的诊断，也可以鉴别轻度、中重度胰腺纤维化。

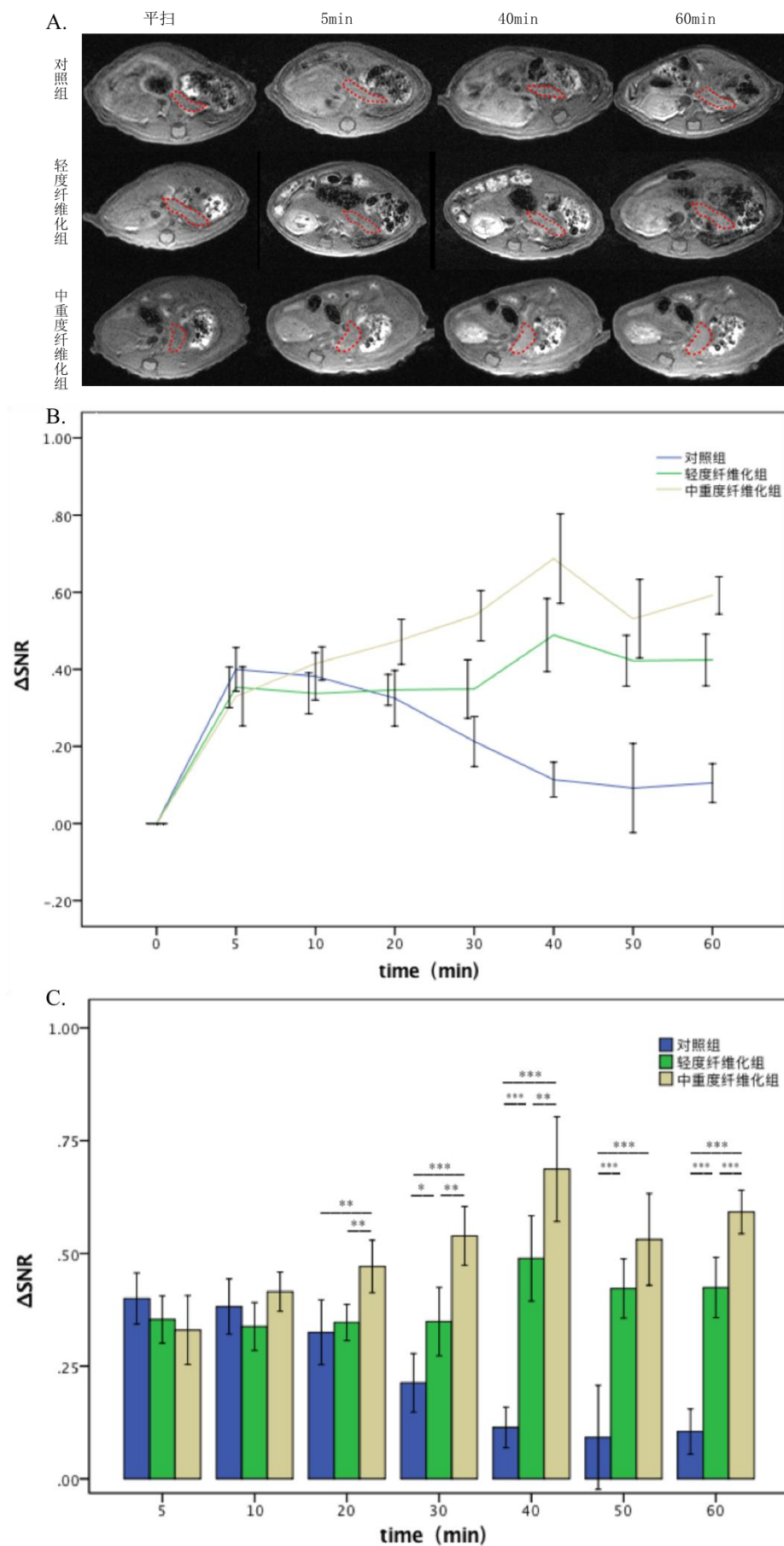


图 4 EP3533 鉴别不同胰腺纤维化程度小鼠中的应用。图 4A 平扫及 EP3533 注射后 5-60

分钟多次采集轴位 T1WI 图像（同一层面），并根据胰腺轮廓绘制 ROI（红色虚线）进行 SNR 定量测量；图 4B T1WI 图像胰腺 ROI 中 Δ SNR 随时间变化曲线；图 4C EP3533 注射后 5-60 分钟各时间点 T1WI 图像胰腺 ROI 中 Δ SNR 柱状图

3、Cy5.5-EP3533 胰腺分布

我们还向三组模型鼠注射 Cy5.5-EP3533，以证明 EP3533 是否可用于区分轻度和中重度胰腺纤维化。经鼠尾静脉注射 Cy5.5-EP3533，1 小时后用 IVIS Lumina II 小动物活体光学成像系统对小鼠活体以及切除的胰腺进行成像。如图 5A-C 所示，轻度胰腺纤维化小鼠、中重度胰腺纤维化小鼠的左上腹部可见荧光浓聚，并且荧光强度中重度胰腺纤维化组>轻度纤维化组。而对照组的腹部未观察到明显荧光浓聚现象。图 5D 所示三组小鼠离体胰腺标本的荧光测量图像，荧光强度中重度胰腺纤维化组>轻度纤维化组>对照组。

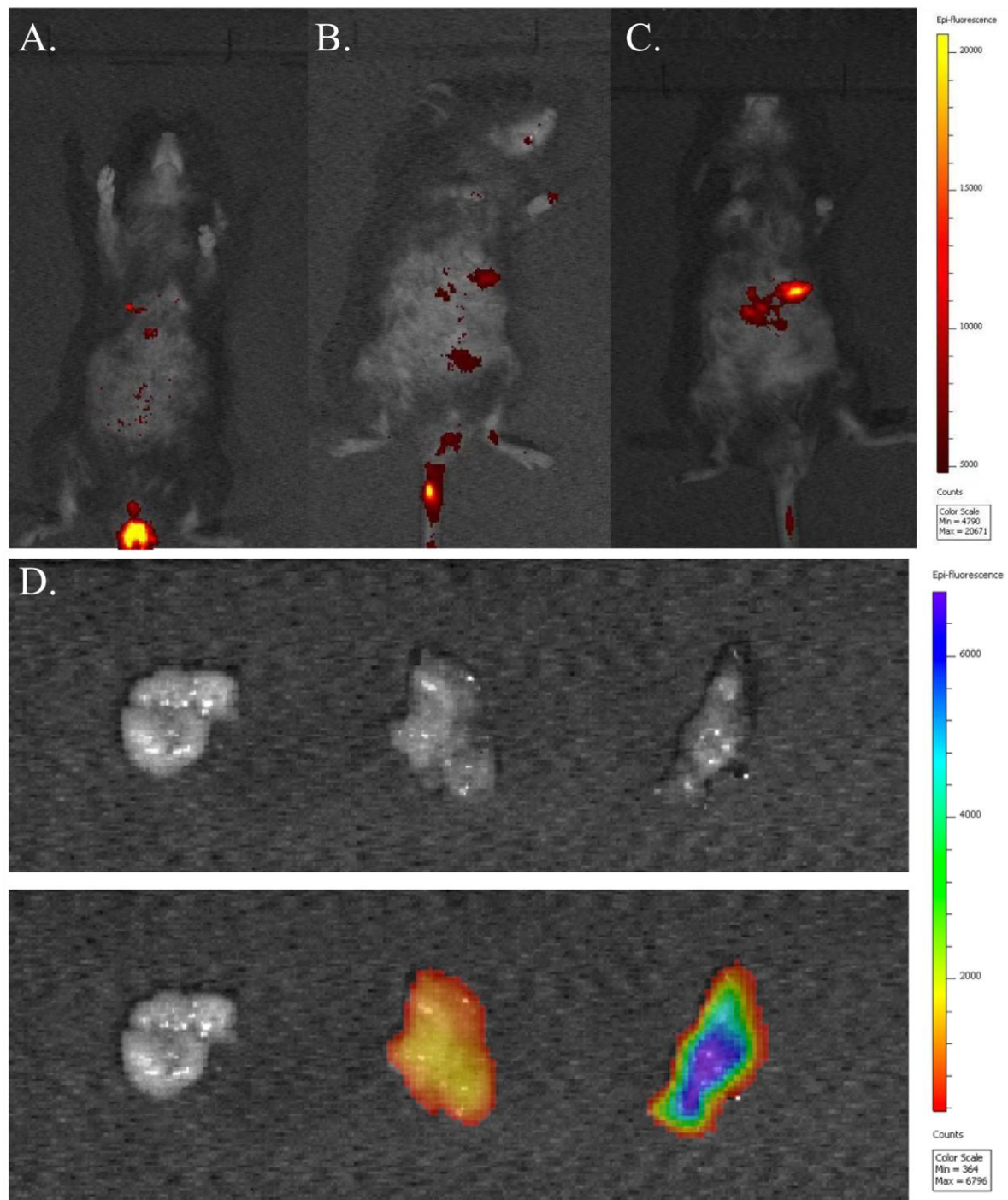


图 5 Cy5.5-EP3533 在三组模型鼠体内胰腺分布情况。图 5A-C 从左至右依次代表对照组、轻度胰腺纤维化组、中重度胰腺纤维化组小鼠在 Cy5.5-EP3533 注射后 1h 体内荧光测量图像。图 5D 从左至右分别代表对照组、轻度胰腺纤维化组、中重度胰腺纤维化组小鼠离体胰腺标本的荧光测量图像。

三、讨论

CP 早期主要的病理改变是胰腺间质纤维化^[1], 胰腺纤维化分期对评价 CP 进展及预后具有重要意义^[2, 3]。虽然可以使用活组织检查来鉴定和量化纤维化^[4], 重复活检的有创性限制其在疾病进展监测、疗效评估中的应用。虽然近年来已经有许多非侵入性的方法来对胰腺纤维化进行评估。有报道弹性成像^[12]和某些 CT^[13]、MRI 测量值^[14]与胰腺纤维化程度相关。然而, 由于这些检查或测量值与真实的纤维化均为间接关系, 这些技术中的测量值可以通过纤维化以外的因素改变。从理论上讲, 纤维化的直接测量应该比这些相关方法更准确。

在胰腺活组织检查中, 通过 Masson 染色在组织学上评估胶原沉积。通过类比, 我们推断胶原蛋白的分子成像可以直接反映胰腺纤维化的直接和客观测量。胰腺纤维化的基本病理特征是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白 (主要为 I 型胶原蛋白) 的过度沉积, 同时 I 型胶原蛋白的浓度随着纤维化的进展而增加^[15], 并且其位于细胞外, 易于分子探针与之连接。因此 I 型胶原蛋白是一个理想的纤维化分子影像靶标。与其他成像技术相比, MRI 具有高软组织空间分辨率、多层面成像、无电离辐射等优点, 有利于动态检测纤维化进展及评估纤维化治疗效果。

(一) 胰腺纤维化模型建立机制与意义

胰腺纤维化模型的成功构建有助于阐明该病的病因学、发病机制以及开发新的治疗措施。所以 CP 的动物模型应从模拟其发病机制、外界刺激、生长环境、基因缺陷等因素出发进行构建。重度饮酒是与 CP 相关的主要病因^[16]。由于尚未充分了解酒精性慢性胰腺炎的确切病理生理机制, 因此关于酒精对胰腺的损伤作用的研究具有很高的需求。此外, 由于临床难以获得人类胰腺活组织切片, 所以我们对 CP 的发病机制的认识很大程度上依赖于动物模型^[17, 18]。重复注射雨蛙素诱导急性胰腺炎反复发作最终达到诱导 CP 模型的目的, 该造模方案是 CP 最经典、最常用的方法之一, 因其具有简单易操作、模型稳定、可重复性高等优点^[19]。但该模型所造成的胰腺纤维并不十分显著, 并且在雨蛙素刺激停止后, 胰腺的纤维化大部分在 3-6 周内逐渐分解^[20]。

慢性胰腺炎的主要形态学特征是整个胰腺中存在大量纤维化和腺泡细胞团丢失^[21]。超生理剂量的缩胆囊素类似物雨蛙素对胰腺的过度刺激引起小鼠急性胰腺炎的组织学和生化变化, 从而复制人类急性胰腺炎的病理学形态和生化表现^[22]。在单次雨蛙素诱导的急性胰腺炎后, 如停止雨蛙素刺激后, 数周内胰腺正常结构将完全恢复^[23]。这应该是由于在促纤维细胞因子和基质成分的产生增加的同时负责基质降解的金属蛋白酶会相应的增加^[24]。有文献报道仅通过酒精饲喂以诱导 CP 小鼠模型难以得到理想的效果^[25, 26]。

同样本研究的 Et 组采取单纯酒精腹腔注射的诱导方案, 其胰腺 HE 染色、Masson 染色显示胰腺无明显纤维化。尽管如此, 学界多有报道酒精可以提高小鼠易感性, 使其胰腺易受到其他有害物质的伤害^[17, 27]。同样在酒精联合 LPS 给药进行 CP 建模研究中, 接受酒精喂养的大鼠胰腺的腺泡空泡形成, 腺泡细胞坏死, 炎性浸润和出血, 更为严重, 而在对照饮食喂养加 LPS 组中几乎没有发现胰腺病灶^[28]。2008 年, Gukovsky 等^[29]报道了酒精联合环孢菌素、雨蛙素 CP 模型, 在用酒精喂养的大鼠中添加环孢菌素和雨蛙素可以导致胰腺实质减少约 86%。

本研究的中重度胰腺纤维化组采取酒精联合雨蛙素腹腔注射的诱导方案, 其胰腺 HE 染色、Masson 染色均提示酒精联合雨蛙素诱导可以增强 CP 的进展, 诱导胰腺中重度纤维程度的 CP 模型。这些结果与酒精喂养联合雨蛙素注射的小鼠模型中发现胰腺纤维化程度和腺泡受损萎缩程度均高于单纯雨蛙素注射诱导小鼠模型^[30, 31]等研究结果类似, 但由于腹腔注射酒精的可重复性明显高于酒精饲喂或灌胃, 故本研究采取腹腔注射酒精的诱导方案^[32]。

(二) 靶向探针的选择

选取合适的探针靶向结合 I 型胶原蛋白是实现胰腺纤维化成像的关键^[33]。意味着需要找到一种与 I 型胶原蛋白具备很高结合亲和力的分子物质作为靶向造影剂的靶向组件, 结合亲和力是指单个生物分子 (例如蛋白质或 DNA) 与其配体/结合配偶体 (例如药物或抑制剂) 之间相互结合的强度。结合亲和力通常以平衡解离常数(K_d)进行测量或表示, 此常数用于评估双分子相互作用的强度以及对此类强度进行排序。 K_d 值越小, 配体对于其目标的结合亲和力就越大。

Muzard J^[34]等合成 ^{99m}Tc 标记的 collagelin, collagelin 是胶原纤维表面受体 GPVI 的抗体类似物, 其与胶原纤维的 K_d 为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$, 具有较高的结合力, 然而, 自 Muzard 后, 至今未见 collagelin 相关研究。CNA35 为一种存在于野生型金葡菌表面的蛋白, 通过两个 hugging 样的结构功能区与胶原纤维的三螺旋结构相结合^[35], 介导金葡菌与胶原纤维的连接, 从而实现细菌的锚定, 进而进一步增殖及侵犯, CNA35 与 I 型胶原纤维的 K_d 为 $2.8 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ 。EP3533 的研究始于 2007 年^[6], GKWHCTTKFPHHYCLY 是一种 I 型胶原结合肽, 随后在酰胺化 C 末端添加联苯基丙氨酸以改善其对胶原蛋白结合, 再连接 3 个 Gd-DTPA 作为分子探针成像组件, 形成的 Gd-DTPA-GKWHCTTKFPHHYCLY (EP3533) 可以用于在纤维化的分子 MR 成像^[6, 7]。其对 I 型胶原纤维的 K_d 为 $1.8 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$, 为了证明其结合的特异性, Caravan P^[6]制备了异构体 EP-3612。异构体 EP-3612 与 EP3533 分子组成完全相同, 不同之处在于一个半胱氨酸残基的手性被反转 (D-Cys)。实验证明 EP-3612 对胶原蛋白的 K_d 为 4×10^{-4}

mol/l, 比 EP3533 对胶原蛋白结合力低了两个数量级。尽管 EP3533 对 I 型胶原蛋白的结合力低于 collagelin 及 CNA35, 但因其近年来在各器官纤维化的研究中广泛被报道, 是一种较为成熟且被业内广泛认可的纤维化靶向 MRI 造影剂, 相关文献报道较多, 但在胰腺纤维化未见 EP3533 的相关报道, 因此本研究采用 EP3533 作为分子探针。

(三) 纤维化分子成像

磁共振对比剂根据其磁化性质的不同分为三大类^[36]: 抗磁性物质; 顺磁性物质; 铁磁性物质和超顺磁性物质^[37]。抗磁性物质一般很少使用, 铁磁性物质包括交联氧化铁 (CLIO) 纳米颗粒和其它氧化铁颗粒等^[34], 主要影响 T2 弛豫时间并导致组织的 T2WI 信号降低^[38], 而器官纤维化与正常组织 T2WI 对比不佳, 故一般不选用铁磁性物质。顺磁性物质包括钆 (Gd^{3+}) 和锰^[39] (Mn^{2+}) 螯合物等, 能加速 T1 弛豫时间并导致组织 T1WI 信号增高, 增加组织间及组织病变间对比度。钆喷酸葡胺 (Gd-DTPA) / 钆特酸葡甲胺 (Gd-DOTA) 是临床上最常使用的静脉 MRI 非特异性造影剂, 毒副作用小, 理化性能稳定。故近年来有多篇报道提到将 Gd-DTPA / Gd-DOTA 作为信号组件与抗体、蛋白质等靶向组件结合, 开发出各种用于靶向分子成像研究的大分子螯合物。本研究采用的分子探针 EP3533 即以 Gd-DTPA 作为成像组件。

为了量化 ROI 的强化程度, 我们测定注射前和注射后胰腺 ROI 中的 SNR 值并计算了 Δ SNR 值。如图 3B 所示 Gd-DTPA 和 EP3533 在模型鼠增强或对照组小鼠的早期增强曲线高度重叠, 并且如图 4C 所示三组模型鼠在增强 5min ($p=0.279$)、10min ($p=0.153$) 两个时间点的 Δ SNR 无统计学差异, 随着增强时间的后移三组之间的 Δ SNR 差距逐渐增大, 30min ($p<0.001$)、40min ($p<0.001$)、60min ($p<0.001$) 时间点的组间 Δ SNR 具有差异, 并且随后的 LSD-t 检验方法比较了上述三个时间点的三组模型鼠两两之间的 Δ SNR, 得出两两差异具有统计学意义。这与我们的预期推断相符合, 造影剂在注射后短时间内其在血液中浓度相对于胰腺中胶原浓度过剩, 使得纤维化动物和对照之间的信号强度可能很小或没有差异, 然而当造影剂经体循环清除后, 靶向连接胶原蛋白的 EP3533 在胰腺组织内逐渐浓聚, 成像组件 Gd-DTPA 通过缩短组织内氢质子的纵向弛豫时间, 实现增加胰腺纤维化组织 T1 信号, 增加纤维化胰腺组织对比度的目的。

图 5 所示, 在注射 Cy5.5-EP3533 注射 1 小时后的小鼠荧光成像中我们发现, 正常胰腺、轻度纤维化胰腺与中重度纤维化胰腺的荧光强度依次升高, 说明与 Cy5.5 相绑定的 EP3533 在三组中的浓度随胰腺纤维化程度的进展而升高, 这从一个侧面说明 EP3533 确实能在注射后 60min 左右较高浓度地在纤维化胰腺中浓聚, 并且浓聚程度随纤维化程度增加而增加。

（四）本研究局限性

本研究有以下局限性。第一，胶原蛋白大量存在于 ECM 中，使得其 EP3533 的靶向性特异欠佳。然而，由于纤维化疾病中往往存在病理性的 ECM 累积，远远超出正常组织 ECM 的含量^[40]，故胶原蛋白仍被用作许多分子影像研究的靶向配体^[6, 8, 9, 41-43]。第二，胰腺纤维化分级没有统一的国际标准，限制了 EP3533 在进一步细化胰腺纤维化的应用。

（五）总结

首先，本研究成功建立了两种不同胰腺纤维化小鼠模型，通过胰腺组织形态学证实模型建立成功，为进一步分子 MRI 的研究建立了良好的基础。

第二，我们证实可以通过 EP3533 分子 MRI、Cy5.5-EP3533 荧光成像区分正常小鼠、轻度、中重度胰腺纤维化小鼠模型。

参考文献

- [1] Büchler UH, Malfertheiner P. Diseases of the Pancreas. Beijing: People's Military Medical Press, 2009.
- [2] Ketwaroo GA, Freedman SD, Sheth SG. Approach to patients with suspected chronic pancreatitis: a comprehensive review. *Pancreas*. 2015; 44: 173-180.
- [3] Ceyhan GO, Friess H. Pancreatic disease in 2014: Pancreatic fibrosis and standard diagnostics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 12: 68-70.
- [4] 中国医师协会胰腺病专业委员会慢性胰腺炎专委会. 慢性胰腺炎诊治指南(2018年, 广州). *中华消化杂志*. 2018; 38:
- [5] Kelly KA, Hollingsworth MA, Brand RE, Liu CH, Singh VK, Srivastava S, et al. Advances in Biomedical Imaging, Bioengineering, and Related Technologies for the Development of Biomarkers of Pancreatic Disease: Summary of a National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases and National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering Workshop. *Pancreas*. 2015; 44: 1185-1194.
- [6] Caravan P, Das B, Dumas S, Epstein FH, Helm PA, Jacques V, et al. Collagen-targeted MRI contrast agent for molecular imaging of fibrosis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007; 46: 8171-8173.
- [7] Helm PA, Caravan P, French BA, Jacques V, Shen L, Xu Y, et al. Postinfarction myocardial scarring in mice: molecular MR imaging with use of a collagen-targeting contrast agent. *Radiology*. 2008; 247: 788-796.
- [8] Polasek M, Fuchs BC, Uppal R, Schuhle DT, Alford JK, Loving GS, et al. Molecular MR imaging of liver fibrosis: a feasibility study using rat and mouse models. *J Hepatol*. 2012; 57: 549-555.
- [9] Fuchs BC, Wang H, Yang Y, Wei L, Polasek M, Schuhle DT, et al. Molecular MRI of collagen to diagnose and stage liver fibrosis. *J Hepatol*. 2013; 59: 992-998.
- [10] Tian B, Liu R, Chen S, Chen L, Liu F, Jia G, et al. Mannose-coated gadolinium liposomes for improved magnetic resonance imaging in acute pancreatitis. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 1127-1141.
- [11] Wellner UF, Kayser G, Lapshyn H, Sick O, Makowiec F, Hoppner J, et al. A simple scoring system based on clinical factors related to pancreatic texture predicts postoperative pancreatic fistula preoperatively. *HPB (Oxford)*. 2010; 12: 696-702.
- [12] Watanabe H, Kanematsu M, Tanaka K, Osada S, Tomita H, Hara A, et al. Fibrosis and postoperative fistula of the pancreas: correlation with MR imaging findings--preliminary

results. *Radiology*. 2014; 270: 791-799.

[13] Sinha A, Singh VK, Cruise M, Afghani E, Matsukuma K, Ali S, et al. Abdominal CT predictors of fibrosis in patients with chronic pancreatitis undergoing surgery. *Eur Radiol*. 2015; 25: 1339-1346.

[14] Noda Y, Goshima S, Tanaka K, Osada S, Tomita H, Hara A, et al. Findings in pancreatic MRI associated with pancreatic fibrosis and HbA1c values. *J Magn Reson Imaging*. 2016; 43: 680-687.

[15] Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38: 1449-1457.

[16] Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, Apte MV. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health*. 2007; 30: 48-54.

[17] Siegmund SV, Haas S, Singer MV. Animal models and their results in gastrointestinal alcohol research. *Dig Dis*. 2005; 23: 181-194.

[18] Otsuki M, Yamamoto M, Yamaguchi T. Animal models of chronic pancreatitis. *Gastroenterol Res Pract*. 2010; 2010: 403295.

[19] Murtaugh LC, Keefe MD. Regeneration and Repair of the Exocrine Pancreas. *Annual Review of Physiology*. 2015; 77: 229-249.

[20] Neuschwander-Tetri BA, Bridle KR, Wells LD, Marcu M, Ramm GA. Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells. *Lab Invest*. 2000; 80: 143-150.

[21] Suda K, Shiotsu H, Nakamura T, Akai J, Nakamura T. Pancreatic fibrosis in patients with chronic alcohol abuse: correlation with alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 1994; 89: 2060-2062.

[22] Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology*. 1985; 88: 1192-1204.

[23] Adler G, Hupp T, Kern HF. Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1979; 382: 31-47.

[24] Muller-Pillasch F, Gress TM, Yamaguchi H, Geng M, Adler G, Menke A. The influence of transforming growth factor beta 1 on the expression of genes coding for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during regeneration from cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas*. 1997; 15: 168-175.

[25] Kono H, Nakagami M, Rusyn I, Connor HD, Stefanovic B, Brenner DA, et al.

Development of an animal model of chronic alcohol-induced pancreatitis in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280: G1178-1186.

[26] Haber P, Nakamura M, Tsuchimoto K, Ishii H, Keogh GW, Apte MV, et al. Alcohol and the pancreas. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25: 244S-250S.

[27] Pandol SJ, Gukovsky I, Satoh A, Lugea A, Gukovskaya AS. Animal and in vitro models of alcoholic pancreatitis: role of cholecystokinin. *Pancreas*. 2003; 27: 297-300.

[28] Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, Kumar RK, Pirola R, Wilson J, et al. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology*. 2007; 133: 1293-1303.

[29] Gukovsky I, Lugea A, Shahsahebi M, Cheng JH, Hong PP, Jung YJ, et al. A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294: G68-79.

[30] Deng X, Wang L, Elm MS, Gabazadeh D, Diorio GJ, Eagon PK, et al. Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Pathol*. 2005; 166: 93-106.

[31] Perides G, Tao X, West N, Sharma A, Steer ML. A mouse model of ethanol dependent pancreatic fibrosis. *Gut*. 2005; 54: 1461-1467.

[32] Schneider L, Dieckmann R, Hackert T, Gebhard MM, Werner J. Acute alcohol-induced pancreatic injury is similar with intravenous and intragastric routes of alcohol administration. *Pancreas*. 2014; 43: 69-74.

[33] Lee JH, Huh YM, Jun YW, Seo JW, Jang JT, Song HT, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med*. 2007; 13: 95-99.

[34] Muzard J, Sarda-Mantel L, Loyau S, Meulemans A, Louedec L, Bantsimba-Malanda C, et al. Non-invasive molecular imaging of fibrosis using a collagen-targeted peptidomimetic of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *PLoS One*. 2009; 4: e5585.

[35] Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Hook A, Gurusiddappa S, et al. A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J*. 2005; 24: 4224-4236.

[36] Xiao YD, Paudel R, Liu J, Ma C, Zhang ZS, Zhou SK. MRI contrast agents: Classification and application (Review). *Int J Mol Med*. 2016; 38: 1319-1326.

[37] Taylor RM HDF-MT, Monson Tc Fau - Ali A-MS, Ali Am Fau - Bisoffi M, Bisoffi M Fau - Sillerud LO, Sillerud LO. Multifunctional iron platinum stealth immuno micelles:

targeted detection of human prostate cancer cells using both fluorescence and magnetic resonance imaging.

[38] Shokrollahi H. Contrast agents for MRI. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013; 33: 4485-4497.

[39] Silva AC, Lee JH, Aoki I, Koretsky AP. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR Biomed*. 2004; 17: 532-543.

[40] Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci Transl Med*. 2013; 5: 167sr161.

[41] Chen W, Cormode DP, Vengrenyuk Y, Herranz B, Feig JE, Klink A, et al. Collagen-specific peptide conjugated high density lipoprotein nanoparticles as MR contrast agents to evaluate compositional changes in murine atherosclerotic plaques under regression conditions. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013; 6: 373-384.

[42] Farrar CT, DePeralta DK, Day H, Rietz TA, Wei L, Lauwers GY, et al. 3D molecular MR imaging of liver fibrosis and response to rapamycin therapy in a bile duct ligation rat model. *J Hepatol*. 2015; 63: 689-696.

[43] Polasek M, Yang Y, Schuhle DT, Yaseen MA, Kim YR, Sung YS, et al. Molecular MR imaging of fibrosis in a mouse model of pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2017; 7: 8114.

综述一

慢性胰腺炎动物模型研究进展

慢性胰腺炎（Chronic Pancreatitis, CP）的动物模型应从模拟其发病机制、外界刺激、生长环境、基因缺陷等因素出发进行构建。模型的成功构建有助于阐明该疾病的病因学、发病机制以及开发新的治疗措施。在本篇综述中，我们总结近年来最常用的 CP 动物模型，概述它们的病理生理学，并讨论它们的优点和局限性。我们还将简要介绍常见的 CP 动物模型建模的实验路径。尽管 CP 动物模型包括猪，狗，负鼠和其他动物等，但本篇综述主要关注的是啮齿动物类 CP 模型，因为它们具有经济、造模周期短、易于成模等优点。近年来，越来越多的研究证实部分 CP 患者具有遗传特性，使得基因型 CP 动物模型的制备和应用成为 CP 研究的新方向。

CP 是一种不可逆的炎症过程，形态学变化主要表现为间质纤维化和腺泡细胞萎缩。目前 CP 的早期诊断尚未达成共识，需要结合影像学、胰腺功能测试、临床表现等进行综合判断^[1-4]。我们对胰腺炎发病机制的理解主要依赖于实验动物模型的数据。而 CP 动物模型同样尚无一致的标准。在人类中，急性胰腺炎（acute pancreatitis, AP）和复发性急性胰腺炎可发展为 CP^[5-7]。这些疾病具有相似的遗传和环境因素。因此，AP、复发性 AP 和 CP 现在被认为是一种连续性疾病^[8]。CP 的动物模型应从模拟其发病机制、外界刺激、生长环境、基因缺陷等因素出发进行构建。模型的成功构建有助于阐明该疾病的病因学、发病机制以及开发新的治疗措施。本文旨在介绍几种 CP 的代表性实验动物模型及近年来的研究进展。

一、CP 病因学

到目前为止已经学界已经确认关于 CP 常见病因有以下几点：

1、酒精、烟草

CP 最常见的病因是酒精摄入过度，占西方国家所有病例的 70%至 90%。通常 CP 的发作与酒精摄入的持续时间和量相关，近来一项研究中指出，乙醇摄入量控制在 60-80g / 天之内不会产生 CP 的风险，优势比为 3.10(95%CI: 1.87-5.14)^[9]。然而乙醇摄入如超过此阈值将导致罹患 CP 的风险显著增加^[10]。此外，急性胰腺炎后停止饮酒可减少急性胰腺炎复发和进展为 CP 的可能性^[11]。

吸烟是 CP 的独立危险因素^[12]。吸烟以剂量依赖的方式增加 CP 的风险^[9, 13]。对于吸烟者，合并发展 CP 的相对风险为 2.8(95%CI: 1.8-4.2)。戒烟后相对危险度显著降低，戒烟者合并发展为 CP 的相对风险为 1.4(95%CI: 1.1-1.9)[14]。在大鼠模型中，吸入烟

草导致胰腺细胞外基质合成增加,胰腺纤维化,腺泡结构减少,小叶结构异常,并伴有炎症细胞浸润^[15-17]。吸烟和高脂肪和高蛋白质的饮食结构结合酒精滥用可能会导致 CP 的发展,后者与胰腺钙化的更快发展有关^[18, 19]。有关特发性 CP 患者发展的临床研究证实了上述发现并且表明滥用酒精和烟草疾病可能加速腹痛发作和内分泌功能不全^[20, 21]。

2、热带性胰腺炎 (Tropical Pancreatitis, TP)

TP 是印度和热带地区最常见的 CP 形式,其流行程度高于酒精作为煽动事件的地理区域^[22]。其分布通常仅限于赤道 30 度以内的区域。该疾病的病理生理学尚不明确,但被认为与木薯摄入有关,因为这种食物的膳食摄入量经常与 TP 的地方性分布相关^[23, 24]。木薯是氰甙的来源,后者与胰腺的氧化损伤有密切联系。

3、遗传性胰腺炎 (Hereditary pancreatitis, HP)

HP 是一种罕见的 CP 病因,约占胰腺炎总数的 8.7%^[25]。在西方国家^[26]和日本^[27],遗传性胰腺炎的发病率约为每 10 万人 0.3 例,中国没有相关系统性、大规模的研究,HD 论著大多数集中于综述与个案报道^[28-32]。叶博等人回顾上海长海医院近 20 年收治 2180 例 CP 的临床资料,报道 HD 约占整体 CP 患者的 0.73%^[33]。

HD 最常见的原因是 PRSS1 的突变,其中四个最常见的突变是 R122H、R122C、N29I 和 A16V^[34-36]。在体外,PRSS1 突变增加了非活性胰蛋白酶原向活性胰蛋白酶 1 的转化,或者减少了活性胰蛋白酶 1 的水解^[36, 37]。上述过程被认为是通过胰腺蛋白的自身消化作用引起急性胰腺炎反复发作的发病机制,从而进展为 CP^[35, 38]。此外,一些突变可能是通过未折叠蛋白反应^[39]而引起慢性应激和胰腺炎症,而并非胰酶激活诱导 CP 这一常规途径,其中典型代表是 CPA1 突变。

糜蛋白酶 C (Chymotrypsin C, CTRC) 是由胰腺腺泡细胞合成,胰腺导管细胞分泌的蛋白酶原,其主要作用是通过降解过早激活的胰蛋白酶原来保护胰腺。CTRC 基因位点突变,使得胰蛋白酶原的活化及胰蛋白酶的降解异常,导致 CP 的发生^[40]。

维持胰管正常功能最重要的分子是囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)。CFTR 基因编码一种氯通道蛋白,在胰腺中位于胰管上皮细胞表面,是胰管细胞分泌碳酸氢盐的阴离子通道。CFTR 基因位点发生突变,使得氯离子通道异常导致碳酸氢盐无法正常通过上皮细胞转运至胰管内,导致胰液少而粘稠,导致胰腺发生囊性纤维化^[41]。CFTR 的功能障碍似乎与胰蛋白酶损伤途径有关,因为 CFTR 和 SPINK1 联合突变显著增加了急性和 CP 复发的风险^[42, 43]。

然而在部分具有阴性家族史的 CP 患者中发现 PRSS1, SPINK1 和 CFTR 突变^[44],这使得“遗传性”和“特发性”CP 的定义出现了重叠区域。

4、特发性 CP

在多达三分之一的 CP 患者中, CP 的病因仍然未知。这些病例被定义为特发性 CP 分组, 并且无明确家族史, 并且已成为许多研究的焦点^[45, 46]。与其他形式的 CP 一样, 这种疾病与外分泌和内分泌功能障碍有关, 尽管这些生理性紊乱进展缓慢。

二、CP 动物模型建模机制

CP 最重要的病理特征为进行性的纤维化, 而引发并维持进行性纤维化的核心因素是复发性 / 持续性的上皮损伤。目前大多数纤维化动物模型中, 均以损伤上皮作为初始的发病机制, 如博莱霉素或者肺部射线照射引发小鼠肺纤维化模型, 反复雨蛙素腹腔注射、DBTC 鼠尾静脉注射诱发小鼠 / 大鼠胰腺纤维化模型, CCl₄ 饲喂或胆管结扎引发大鼠肝纤维化模型等。免疫异常同样可以导致上皮细胞受损从而诱发病理性纤维化, 如 Fas 缺陷型淋巴组织增生 (lpr) 小鼠较之野生型小鼠接受胆管结扎, 其纤维化程度较低, 说明野生型小鼠中 Fas 介导的免疫损伤会引起更为严重的病理性纤维化^[47]。目前已知的五种上皮细胞接收损失后的反应可以诱导病理性纤维化。

(一) 细胞死亡 / 凋亡

上皮损伤的带来的一系列反应通常是由细胞凋亡或坏死引起的^[48]。但是目前尚不清楚上皮细胞死亡 / 凋亡是否直接启动成纤维细胞的下游纤维化通路。

(二) 代谢途径失调

第二种常见的上皮损伤反应是代谢途径失调, 导致细胞应激和活化。细胞和组织损伤改变局部微灌注、营养输送、pH 平衡和毒素清除能力。细胞对这种恶劣环境的反应具有多种应激反应, 这些应激反应共同促进细胞存活^[49]。这些细胞反应不足往往细胞死亡。在慢性疾病中, 应激反应是细胞为生存而作出的一系列适应性改变。应激细胞是促炎细胞因子、趋化因子和其他促纤维化细胞因子的来源。

1、内质网应激

未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR), 或内质网应激, 是一种典型的保护性反应, 可减轻未折叠或折叠不良蛋白积累的后果^[50]。

2 型肺泡上皮细胞, 胰腺 β 细胞和肝细胞等细胞, 特别容易发生 ER 应激, 因为这些细胞的内质网需要转运大量的蛋白质。例如, 在具有显性遗传性肺纤维化的家族中, 肺泡上皮细胞中编码表面活性蛋白 A (surfactant protein A, SPA)^[51] 和 C (surfactant protein C, SPC)^[52, 53] 的基因发生突变, 随之破坏 SPA、SPC 折叠并导致 ER 应激^[52, 54], 诱导肺组织发生病理性纤维化。同样, 在散发性肺纤维化患者的肺泡上皮细胞中也发现了

ER 应激的证据^[55], 非酒精性和酒精性脂肪性肝病以及病毒性肝炎和 A1 抗胰蛋白酶缺乏症患者^[56, 57]的肝脏中同样能观察到 ER 应激的发生。

2、腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 产生途径改变

损伤引起的细胞代谢变化中最显著的是 ATP 产量显著减少。在恶劣的局部环境中, 细胞产生 ATP 的途径将发生改变。尤其是在损伤后, 细胞通过改变脂肪酸代谢而产生 ATP, 这会导致有害的氧自由基在局部累积。不能通过脂肪酸代谢产生足够 ATP 的细胞也会通过线粒体的解耦连和降低过氧化物酶体功能而产生更高水平的活性氧(ROS), 后者能促进纤维化进展。

(一) 上皮-间充质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT)

EMT 是一种离散的基因表达改变模式, 其首先被 Frey Hay 在 20 世纪 80 年代报道, 并被认为是胚胎发生的一个特征^[58, 59]。基于生物学背景, EMT 分为 I、II、III 3 种类型, II 型 EMT 与纤维化过程密切相关^[60]。聚集于受损区域的巨噬细胞和肌成纤维细胞通过释放大量的生长因子、趋化因子, 活化多条信号转导路径, 如 ERK-MAPK 通路、Smads 通路、PI3K-AKT 通路等, 启动 II 型 EMT。因此上皮细胞损伤后可以重新编程为间充质样表型, 成为肌成纤维细胞。不论是病理性还是生理性 EMT, 都存在着关键上皮表面蛋白的表达减少, 后者可维持细胞间紧密连接, 阻止细胞转移扩散。Twist 和 Snail1 等转录因子可以通过抑制上皮表面蛋白的表达的方式诱导 EMT。有报道指出, Snail1 缺失的小鼠可以免受 CCl₄ 诱导的肝纤维化^[61]。TGF- β 是一种重要的促纤维化细胞因子, 其诱导 EMT 的部分机制是通过诱导上皮细胞中 Twist 和 Snail 的表达, 文献报道 TGF- β 的 II 型受体缺失的小鼠可以免受博来霉素诱导的肺纤维化^[62]。尽管 Twist 和 Snail1 在发育过程中的转录靶点已经确定^[63], 但这些基因是否与纤维化 EMT 相关尚不清楚。

(二) 整合素与 TGF- β 间相互作用

哺乳动物几乎所有的细胞和器官都分泌 TGF- β , 后者通过与 ECM 的化学交联大量存在于 ECM 中^[64]。潜在性 TGF- β 的激活也是通过损伤细胞产生的危险信号来调节的, 这些细胞因子包括溶血磷脂酸 (lysobisphosphatidic acids, LPA)^[65], 以及凝血蛋白酶, 凝血酶^[66]等。这些介质伴随着上皮损伤而被释放, 并随后与上皮细胞的 G 蛋白耦联受体结合, 诱导肌动蛋白/肌球蛋白介导的收缩^[67]。由于潜在性 TGF- β 结合的上皮细胞表面的 $\alpha_v\beta_6$ 整合素, 上皮细胞收缩借此对其施加收缩力, 诱导 TGF- β 激活^[68]。

随着 TGF- β 的活化, 损伤部位的上皮细胞接触活化的 TGF- β , 诱导上皮细胞重编程转分化为肌成纤维细胞或刺激邻近成纤维细胞产生 ECM。而活化的 TGF- β 本身又能诱导上皮细胞^[69, 70]表达 $\alpha_v\beta_6$ 整合素, 产生正向反馈, 加速随后纤维化的进展。

（三）免疫反应

上皮细胞受损会同时启动先天性和适应性免疫反应。损伤的上皮细胞分泌趋化因子, 这些趋化因子可以聚集中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞进入受损组织、器官, 从而推动组织纤维化。这些细胞类型与纤维化模型有关, 但它们在人类特定的慢性纤维化疾病中的作用尚不清楚。慢性肝炎患者可以通过使用抗炎药物来抑制甚至逆转纤维化^[71], 这表明炎症细胞在这些临床环境中以持续的方式促进纤维化。然而, 抗炎药在特发性肺纤维化(IPF)中的作用并不明显, 提示在 IPF 这类疾病中, 上皮损伤并非纤维化的主导因素^[72]。

二、CP 动物模型

（一）药物注射所致的 CP 模型

1、雨蛙素注射 CP 模型

在雨蛙素(caerulein)诱导的 AP 模型中, 单次雨蛙素刺激之后一周内胰腺将恢复正常。在此模型中的大鼠胰腺腺泡细胞和基质细胞中 TGF- β 的水平增加, 而 TGF- β 是促纤维化表达的关键因子之一, 这表明蛙皮素反复刺激可能导致纤维化, 纤维化正是 CP 的关键病理特征^[73]。事实上, 雨蛙素反复刺激可能诱发外分泌、分泌功能不足和纤维化^[74]。因其简单易操作、模型稳定、可重复性高等优点, 重复注射雨蛙素是 CP 最常用的造模方法之一。雨蛙素注射的具体操作在不同的研究中有所不同, 并且可以联合其他促炎症因子、脂多糖等使用, 刺激胰腺星形细胞(pancreatic stellate cells, PSCs)致纤维化。一项研究发现^[75], 小鼠每周两次雨蛙素腹腔注射($50\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\times 6\text{h}$)连续 10 周, 可导致急性胰腺损伤, 镜下观察发现腺泡单位周围和小叶间隙内的 ECM (extracellular matrix, ECM) 中有前胶原蛋白表达并随造模时间逐步累积。在另一项研究中^[76], 采取大鼠水浸应激处理 5 小时, 并且每周两次腹腔注射雨蛙素($20\mu\text{g}/\text{kg}$), 16 周后镜下见胰腺萎缩并有明显的小叶结构破坏、纤维化、脂肪浸润; 同时出现内分泌功能异常。有学者采取更加密集的注射策略^[77, 78], 每周 3 次雨蛙素腹腔注射, 6 周即可观察到显著的腺泡结构改变和更迅速的腺泡周围纤维化累积。对于雨蛙素 CP 模型来说, 更高频率的雨蛙素注射似乎会导致更多的胰腺纤维化形成。但在刺激停止后, 胰腺的纤维化大部分在 3-6 周内逐渐分解, 提示胰腺中 ECM 降解途径仍有活性^[78]。

另有研究采取雨蛙素与其他药物联合应用, 有研究将雨蛙素联合脂多糖(LPS)进行 CP 模型制作, 发现 LPS 的联合应用增加了纤维化的量^[79]。Ahmadi A^[80]等联合雨蛙素、乙醇小鼠腹腔注射进行 CP 造模, 6 周后发现乙醇依赖组(乙醇-雨蛙素)中的病理变化比乙醇非依赖性组(雨蛙素)更显著, 并且前者胰腺组织中的 TGF- β 水平、病理

纤维化评分^[81]明显高于后者，而单纯乙醇注射组并未发现明显胰腺病理改变。

2、左旋精氨酸（L-Arg）注射 CP 模型

大鼠经腹腔注射 L-Arg,以 500mg / 100g 为初始剂量，接下来以 250mg / 100g 的剂量每天注射 3 次，连续 10 天即可产生 CP 模型。24 小时后，镜下胰腺表现为严重的水肿型 AP。第 5 天，高达 90%的腺泡破坏并被脂肪组织替代，但导管和胰岛细胞未损。且造模成功 6 个月后上述病理改变仍存在^[82]。在另一项研究中，大鼠以 350mg / 100g 为剂量经腹腔注射 L-Arg，每天一次持续 4 周，发现导管周围，血管，胰腺内神经和胰岛的纤维结缔组织基质中仅有少量腺泡细胞保留，^[83]。Yamaguchi 等人^[84]发现，在第一次腹腔注射 L-Arg 后第 54 天，85%至 90%的腺泡组织被脂肪组织和扩张的胰管代替而非纤维化。

3、二丁基二氯化丁基（DBTC）注射 CP 模型

二丁基二氯化丁基（DBTC）是一种化学品，在工业上用于聚氯乙烯塑料的热稳定。静脉注射 DBTC 能诱导慢性胰腺损伤，将 DBTC 溶于 100%乙醇中，然后与甘油混合。然后将 200μL 体积的 DBTC(8mg / kg 体重)注射到尾静脉中以诱导大鼠的 CP^[85]。DBTC 在 24 小时内诱发急性水肿性胰腺炎^[86]。第 7 天后可观察到单核细胞的大量浸润，随后发生纤维化，该时间点同时观察到编码 I 型胶原蛋白的 tRNA 和 TGF-β 的上调。DBTC 胰腺损伤的病理机制与其对胰腺的直接毒性作用及其对胆管上皮的坏死作用有关，诱导胰管梗阻。但该造模方式同样引起严重的肝损害^[86]。

另有研究^[87]采取 DBTC 尾静脉注射联合乙醇喂食进行小鼠的 CP 建模，实验组小鼠可见急性间质性胰腺炎伴胰腺水肿，腺泡细胞坏死，胰腺持续炎症和胰腺永久性纤维化等 CP 的典型形态学改变。并且较对照组，实验组胰腺基质金属蛋白酶（MMP-1）mRNA 表达降低，基质金属蛋白酶抑制剂（TIMP-1）mRNA 表达升高，MMP-1 的功能在降解 ECM 组成中起着重要作用^[88]。它的低水平导致降解 ECM 的能力降低。TIMP-1 过度表达抑制了 MMP-1 的活性，进一步削弱了 MMP-1 降解 I 型胶原的能力，并导致 ECM 在胰腺中沉积^[89]，即胰腺纤维化。

（二）胰管结扎（pancreatic duct ligation，PDL）的 CP 模型

人类胰腺炎中过氧化物和 NO 合成酶（NO 合成酶，NOS）的表达上调，有研究表明在 PDL 诱导的大鼠胰腺炎模型中发现腺泡和导管周围发现类似的氧化应激和 NOS 上调模式。这表明 PDL 诱导的大鼠胰腺炎是进一步研究人类胰腺炎发展的适当模型^[90]。而在小鼠和大鼠中，完全胰管梗阻主要导致器官萎缩，此改变并非 CP 的特征。胰管结扎数月后，胰腺的小叶内可见脂肪浸润^[91]。因此，单独导管结扎不会导致典型的 CP。然而，完全胰管结扎联合雨蛙素给药在 72h 后即可引起大量的间质胶原蛋白表达^[92]。

最近,有文章报道了一种改良 CP 模型,具体操作是通过分支导管结扎结合雨蛙素给药实现建模^[93]。在这项研究中,通过接扎大鼠胃和胰腺十二指肠叶之间的交界处的胰管来诱导 CP,从而避免了胆管及其伴随动脉的损伤。模型鼠在导管结扎后第 2 天接受单次雨蛙素给药(50 μ g/kg)。术后 3 天,结扎的胰腺部分发生严重的坏死性胰腺炎。模型相关的死亡率范围从 10%到 15%,并始终发生在注射雨蛙素的 48 小时内。胰腺坏死区域被纤维化和脂肪组织替代,21 天后检测到纤维化范围最大。

(三) 胰管内注射的 CP 模型

1、牛黄胆酸钠(NaTc)胰管内注射 CP 模型

牛黄胆酸钠逆行注入大鼠胰管可引起急性出血性胰腺炎,72 小时可见明显的腺泡萎缩和纤维化^[94]。

然而,在单次逆行胰管内输注剂量为 40 μ l/100g 的 3%牛磺胆酸钠时,42 天后胰腺组织学表型正常,提示该剂量下 NaTc 诱导的胰腺炎是可逆的^[84]。另外注射剂量、药物浓度、注射压强和持续时间可能是这些复杂表型变化的因素。

2、酒精胆胰管内注射 CP 模型

大鼠胆总管几乎全长被胰腺组织包围,并在其行程中接收若干条胰管汇入,最终开口于十二指肠乳突上^[95]。Ethem Unal^[96]等通过剖腹手术暴露胰腺,使用胰岛素注射器将 48%乙醇注入 1mL 的胆道。用 1/0 丝线缝合导管,以防止酒精逆行渗漏。在乙醚麻醉下对术后第 7 天处死,镜下发现所有大鼠均发生 CP(100%)。在胰腺组织中见到间质纤维化,淋巴管浸润,导管和导管扩张,腺泡细胞萎缩,导管周围导管增生。

(四) 改变饮食结构的 CP 模型

1、酒精相关的 CP 模型

1967 年,Maki 等人^[97]研究了口服酒精对大鼠胰腺的影响以及酒精与各种膳食组合物的相互作用。在动物饮用水中加入浓度为 15%的酒精 2 个月。酒精摄入导致血清淀粉酶水平升高,胰腺水肿和腺泡细胞空泡化,但未发现到脂肪坏死或胰腺坏死。

1975 年,Lieber 和 DeCarli 为研究酒精对肝损伤机制而开发了一种酒精饲养动物模型,该模型现广泛应用于模拟酒精对各脏器影响的研究^[83]。饲喂方式是将乙醇补充到饮用水中(称为 Lieber-Dezarli 饮食),并且可以适当增加总酒精摄入量。这种饮食会导致肝脏严重的器官损伤,但胰腺形态变化很轻微,大多数情况下,胰腺只有轻度功能不全,而未到 CP 的程度。酒精是一种非常微弱的 CP 诱导物。但是,乙醇 Lieber-DeCarli 饮食可能使腺体产生一些易于受损的变化,喂养乙醇 9-12 个月的大鼠的胰腺比对照组的胰腺更容易受到雨蛙素诱导产生 CP 样改变^[98]。酒精喂养联合雨蛙素注射加剧了

胰腺的炎症反应, 加剧纤维化程度增加和腺泡受损萎缩^[99, 100]。酒精模型联合 LPS 给药进行 CP 建模, 发现接受酒精喂养大鼠显示出更严重的腺泡空泡形成, 腺泡细胞坏死, 炎性浸润和出血, 而在对照饮食喂养加 LPS 组中几乎没有发现胰腺病灶^[101]。2008 年, Gukovsky 等^[102]报道了乙醇联合环孢菌素、雨蛙素 CP 模型, 在用乙醇喂养的大鼠中添加环孢菌素和雨蛙素导致胰腺实质减少约 86%。

2、慢性高脂饮食的 CP 模型

单纯的高脂饮食也可造成 CP 改变。近年来, 有学者报道单纯的高脂饮食可以诱导胰腺发生 CP^[103], 该研究采取高脂喂食方案 (1%胆固醇, 10%动物脂肪, 0.3%NaTc) 饲养 10 周后发现胰腺中游离脂肪酸、丙二醛升高, 镜下可见显著的腺泡细胞破坏萎缩、脂肪浸润、间质纤维化等典型 CP 病理表现, 提示高脂饮食可能促进脂质过氧化和 PSCs 激活。已经在乙醇联合高蛋白高脂饮食喂养的动物模型中发现胰酶分泌增加^[104]。1988 年 Tsukamoto 研究指出慢性乙醇喂养大鼠联合高脂饮食导致腺泡细胞凋亡增加。低脂饮食, 慢性乙醇喂养只产生轻度胰腺病理, 如脂肪变性和间质水肿。然而, 乙醇与高脂肪和超高脂饮食导致腺泡细胞凋亡增加^[105]。

3、缺乏胆碱补充乙硫氨酸饮食 (choline deficient ethionine-supplemented, CDE) CP 模型

用间歇性的 CDE 饮食 (3 天的 CDE 饮食和 3 天的正常饮食交替) 的小鼠, 长时间 24 小时的饮食可以发展出一些 CP 的组织学特征, 但仅能造成轻度纤维化^[106]。

(五) 遗传性 CP 模型

丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal-1 型 (SPINK1), 阳离子胰蛋白酶原基因 (PRSS1), 囊性纤维化跨膜转导调节因子 (CFTR) 这三种基因已经被证实与人类 CP 发病密切相关。通过转基因技术制备这 3 种显性遗传缺陷的小鼠, 这些小鼠成为研究人类遗传性 CP 很好的实验对象。

囊性纤维化 (CF) 是一种常见的常染色体隐性遗传性疾病, 一种编码囊性纤维化跨膜转导调节因子 (CFTR) 氯离子通道的基因被认为是 CF 的致病基因。1992 年, 第一个 CF 小鼠模型被建立, 此后继续开发出一系列更接近人类的更特异性 CF 模型, 这些模型可以出现与人类的 CP 相似的病理变化^[107]。胰腺腺泡细胞显著萎缩, 小叶间胰腺导管扩张并充满淀粉酶阳性的聚合物, 伴有中度的炎性细胞浸润。

小鼠的 SPINK3 与人类的 SPINK1 同源^[108], 两者编码产生胰蛋白酶抑制剂, 防止胰蛋白酶早期在细胞内活化, SPINK3 基因敲除的小鼠, 在胚胎发育 16.5 天后胰腺停止发育并出现胰腺萎缩, 出生后 1.5 天胰腺内检测到活化的胰蛋白酶^[109]。

人类阳离子胰蛋白酶原蛋白 (PRSS1) 上的精氨酸-组氨酸突变 (R122H) 导致一种

以坏死和慢性炎症为特征的罕见类型的遗传性胰腺炎^[110]。携带胰蛋白酶 4 的 R122H 过度表达的错义突变的转基因小鼠会出现胰腺纤维化^[111]，对雨蛙素诱导的急性胰腺炎的易感性增加^[112]，说明 PRSS1 突变在胰腺炎发生过程中起重要作用。

编码消化酶羧肽酶 A1 的 CPA1 中的功能丧失突变在部分散发性早发 CP 和遗传性胰腺炎中十分常见^[113, 114]。CPA1 突变诱导蛋白质错误折叠和内质网（ER）应激被认为是潜在的发病机制。但由于缺乏来自动物模型的证据，CPA1 突变的疾病机制仍然是假设性的。动物模型的缺乏限制了我们对疾病机制的认识，也阻碍了新疗法的临床前试验。最近 Hegyi E^[115]等将最常发生的人 CPA1 p.N256K 突变敲入小鼠 CPA1 基因座，CPA1 N256K 小鼠胰腺切片上观察到了进行性的病理变化，其中包括由于腺泡丢失、炎症细胞浸润和假性管状复合物的存在而形成的松散的组织结构。在 CPA1 N256K 小鼠中，通过腺泡细胞面积定量测量显示，待小鼠发育到 12 个月时腺泡面积丢失了 30%。组织学观察结果与进展性 CP 的发生发展相一致。Masson 染色显示 CPA1 N256K 小鼠剩余的腺泡中存在广泛的纤维化变化，进一步证实了这一结论。

三、总结

1984 年胰腺炎的 Marseille 分类指出承认 AP 可以进展到 CP，尽管发生率很低^[7]。坏死-纤维化理论表明 AP 对胰腺的损伤导致炎症，胰腺导管阻塞，纤维组织形成，这些都是 CP 的病理特征^[116]。前哨急性胰腺炎事件（theory of the sentinel acute pancreatitis event, SAPE）理论支持 AP、CP 是一个连续性的概念，该理论假设首次胰腺炎发作将触发一系列反应，通过氧化应激或反复发作的急性炎症对胰腺造成持续损害，这可能没有临床表现，最终进展为 CP^[6]。

现将目前常见的 CP 动物模型优点及局限性总结至表 1。CP 的动物模型旨在重现胰腺腺泡萎缩和间质纤维化等关键组织病理学特征。胰管结扎模拟胆石梗阻性急性胰腺炎反复发作，比较适用于 CP 的发病机制和治疗措施的研究，但由于其有创性，操作有一定难度，并且该模型倾向于诱导萎缩并且纤维化的发展较其他模型缓慢。CP 研究最常用的模型之一是雨蛙素诱导模型，通过腹腔反复注射雨蛙素诱导的反复胰腺损伤导致模拟 CP 的胰腺纤维化。这模拟临床上急性胰腺炎反复发作最终导致萎缩和纤维化的实际情况。该模型还可以通过联合其他试剂如脂多糖，乙醇和环孢菌素 A 促进胰腺的纤维化。

乙醇是人类 CP 的最常见的原因之一^[117-119]，但在单纯乙醇饲养的大鼠模型中仅导致轻度功能不足且基本无形态学变化。乙醇喂养更常用于联合药物如雨蛙素或脂多糖组合以开发新型 CP 模型。虽然这些全新的动物模型大多从缩短成模时间、改善造模成本出发，但不太可能会显着改善我们对 CP 疾病的理解和治疗，但将转基因小鼠和大鼠中

现有模型望显著提高我们对疾病发病机制的认识,并为显著改善治疗干预策略提供有力参考。

表 1 常见 CP 动物模型优点及局限性

CP 动物模型	优点	局限性
雨蛙素模型	操作便捷; 成模速度快; 可重复性高; 与人类 CP 病理特征相似; 具有对应的体外模型	临床相关性未知; CP 严重程度稍轻
L-Arg 模型	操作便捷; 成模速度快	临床相关性未知; 缺乏对应的体外模型
胰管结扎模型	成模速度快; 与临床发病机制相关	侵入性; CP 严重程度轻
胰管内注射模型	成模速度快; 与临床发病机制相关	侵入性; 造模操作难度大; 死亡率高
酒精饲养模型	操作便捷; 非侵入性; 联合其他刺激物提高 CP 造模敏感性	造模周期长; CP 严重程度轻
CDE 模型	操作便捷; 非侵入性	临床相关性未知; 造模周期长; 死亡率高
遗传性模型	与临床发病机制相关	成本高; 造模周期长

展望

经过 100 多年的努力,科研工作者已经开发出大量的不同类型的 CP,这些模型采取实验干预的方法来模拟 CP 的某一疾病过程,许多模型已经获得许多科研工作者的认可^[120-123],为人们研究疾病的病因、发病机理及各种治疗方法提供了很大的帮助。每个模型都有自己的优点或缺点,研究者应根据具体的实验目的并结合 CP 模型的特点,来选择合适的动物模型。然而,目前为止,还没有与人类 CP 发病完全相同的理想动物模型。仍需科研工作者的进一步研究。

参考文献

- [1] Majumder S, Chari ST. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2016; 387: 1957-1966.
- [2] Duggan SN, Ni Chonchubhair HM, Lawal O, O'Connor DB, Conlon KC. Chronic pancreatitis: A diagnostic dilemma. *World J Gastroenterol*. 2016; 22: 2304-2313.
- [3] 李兆申, 廖专. 2012 年《慢性胰腺炎诊治指南》解读. *中国实用内科杂志*. 2013; 191-192.
- [4] 《中华胰腺病杂志》编委会. 慢性胰腺炎诊治指南(2012,上海). *中华内科杂志*. 2012; 51: 922-924.
- [5] Sankaran SJ, Xiao AY, Wu LM, Windsor JA, Forsmark CE, Petrov MS. Frequency of progression from acute to chronic pancreatitis and risk factors: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2015; 149: 1490-1500 e1491.
- [6] Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. *Gut*. 1999; 45: 317-322.
- [7] Singer MV, Gyr K, Sarles H. Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterology*. 1985; 89: 683-685.
- [8] Whitcomb DC. Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004; 1: 46-52.
- [9] Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med*. 2009; 169: 1035-1045.
- [10] Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y, Research Committee on Intractable Pancreatic D. Associations of alcohol drinking and nutrient intake with chronic pancreatitis: findings from a case-control study in Japan. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96: 2622-2627.
- [11] Takeyama Y. Long-term prognosis of acute pancreatitis in Japan. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009; 7: S15-17.
- [12] !!! INVALID CITATION !!! {Wittel, 2006 #2554;Cote, 2011 #2601};
- [13] Rebours V, Vullierme MP, Hentic O, Maire F, Hammel P, Ruzsniwski P, et al. Smoking and the course of recurrent acute and chronic alcoholic pancreatitis: a dose-dependent relationship. *Pancreas*. 2012; 41: 1219-1224.
- [14] Andriulli A, Botteri E, Almasio PL, Vantini I, Uomo G, Maisonneuve P, et al.

Smoking as a cofactor for causation of chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas*. 2010; 39: 1205-1210.

[15] Wittel UA, Pandey KK, Andrianifahanana M, Johansson SL, Cullen DM, Akhter MP, et al. Chronic pancreatic inflammation induced by environmental tobacco smoke inhalation in rats. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101: 148-159.

[16] Thrower E. Pathologic cellular events in smoking-related pancreatitis. *Cancers (Basel)*. 2015; 7: 723-735.

[17] Yadav D, Whitcomb DC. The role of alcohol and smoking in pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; 7: 131-145.

[18] Levy P, Mathurin P, Roqueplo A, Rueff B, Bernades P. A multidimensional case-control study of dietary, alcohol, and tobacco habits in alcoholic men with chronic pancreatitis. *Pancreas*. 1995; 10: 231-238.

[19] Cavallini G, Talamini G, Vaona B, Bovo P, Filippini M, Rigo L, et al. Effect of alcohol and smoking on pancreatic lithogenesis in the course of chronic pancreatitis. *Pancreas*. 1994; 9: 42-46.

[20] Maisonneuve P, Frulloni L, Mullhaupt B, Faitini K, Cavallini G, Lowenfels AB, et al. Impact of smoking on patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2006; 33: 163-168.

[21] Maisonneuve P, Lowenfels AB, Mullhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut*. 2005; 54: 510-514.

[22] V M, CS P. Tropical calcific pancreatitis. Blackwell Science, 1998.

[23] McMillan DE, Geevarghese PJ. Dietary cyanide and tropical malnutrition diabetes. *Diabetes Care*. 1979; 2: 202-208.

[24] Felderbauer P, Klein W, Bulut K, Ansorge N, Dekomien G, Werner I, et al. Mutations in the calcium-sensing receptor: a new genetic risk factor for chronic pancreatitis? *Scand J Gastroenterol*. 2006; 41: 343-348.

[25] Cote GA, Yadav D, Slivka A, Hawes RH, Anderson MA, Burton FR, et al. Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011; 9: 266-273; quiz e227.

[26] Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Ferec C, Le Marechal C, Hentic O, et al. The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. *Gut*. 2009; 58: 97-103.

[27] Masamune A. Genetics of pancreatitis: the 2014 update. *Tohoku J Exp Med*. 2014;

232: 69-77.

[28] 刘奇才, 郜峰, 许幼仕, 王凤清, 潘云振, 欧启水. 遗传性胰腺炎胰蛋白酶原基因突变分析. 世界华人消化杂志. 2007; 15: 3514-3517.

[29] 骆休, 吴志雄, 刘奇才, 陈志东. 遗传性胰腺炎临床和遗传特点分析 13 例. 世界华人消化杂志. 2008; 16: 2188-2190.

[30] 余世界, 沈磊. 遗传性胰腺炎. 医学新知杂志. 2015; 73-74.

[31] 张平, 张虎. 家族性遗传性胰腺炎. 医学新知杂志. 2015; 25: 346-347,352.

[32] 李明阳 杨. 遗传性胰腺炎的研究进展. 中华胃肠内镜电子杂志. 2018; 5:

[33] 叶博 胡, 廖专, 孙涛, 刘牧云, 孙畅, 邹文斌, 辛磊, 邹多武, 金震东, 杜奕奇, 湛先保, 王东, 胡先贵, 金钢, 邵成浩, 郑建明, 陆建平, 李兆申. 2180 例慢性胰腺炎临床特征及治疗模式变迁分析. 中华消化内镜杂志. 2013; 30:

[34] Keim V, Bauer N, Teich N, Simon P, Lerch MM, Mossner J. Clinical characterization of patients with hereditary pancreatitis and mutations in the cationic trypsinogen gene. Am J Med. 2001; 111: 622-626.

[35] Whitcomb DC. Genetic risk factors for pancreatic disorders. Gastroenterology. 2013; 144: 1292-1302.

[36] Nemeth BC, Sahin-Toth M. Human cationic trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014; 306: G466-473.

[37] Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. Chronic pancreatitis. Lancet. 2011; 377: 1184-1197.

[38] Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. Nat Genet. 1996; 14: 141-145.

[39] Schnur A, Beer S, Witt H, Hegyi P, Sahin-Toth M. Functional effects of 13 rare PRSS1 variants presumed to cause chronic pancreatitis. Gut. 2014; 63: 337-343.

[40] J L, A L-L, K S, A M, V M, M OC, et al. The Common Chymotrypsinogen C (CTRC) Variant G60G (C.180T) Increases Risk of Chronic Pancreatitis But Not Recurrent Acute Pancreatitis in a North American Population. Clinical and translational gastroenterology. 2015; 6: e68.

[41] Colling KP, Bellin MD, Schwarzenberg SJ, Berry L, Wilhelm JJ, Dunn T, et al. Total Pancreatectomy With Intraportal Islet Autotransplantation as a Treatment of Chronic Pancreatitis in Patients With CFTR Mutations. Pancreas. 2018; 47: 238-244.

[42] Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA. Cystic

fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology*. 2001; 121: 1310-1319.

[43] Schneider A, Larusch J, Sun X, Aloe A, Lamb J, Hawes R, et al. Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2011; 140: 162-171.

[44] Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*. 2007; 132: 1557-1573.

[45] Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Mani KR, Bhaskar S, Rao GV, et al. Absence of PRSS1 mutations and association of SPINK1 trypsin inhibitor mutations in hereditary and non-hereditary chronic pancreatitis. *Gut*. 2004; 53: 723-728.

[46] Tzetis M, Kaliakatsos M, Fotoulaki M, Papatheodorou A, Doudounakis S, Tsezou A, et al. Contribution of the CFTR gene, the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) and the cationic trypsinogen gene (PRSS1) to the etiology of recurrent pancreatitis. *Clin Genet*. 2007; 71: 451-457.

[47] Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*. 2002; 123: 1323-1330.

[48] Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 1999; 18: 7719-7730.

[49] Lawson WE, Cheng DS, Degryse AL, Tanjore H, Polosukhin VV, Xu XC, et al. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 10562-10567.

[50] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13: 89-102.

[51] Maitra M, Wang Y, Gerard RD, Mendelson CR, Garcia CK. Surfactant protein A2 mutations associated with pulmonary fibrosis lead to protein instability and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2010; 285: 22103-22113.

[52] Mulugeta S, Nguyen V, Russo SJ, Muniswamy M, Beers MF. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32: 521-530.

[53] Thomas AQ, Lane K, Phillips J, 3rd, Prince M, Markin C, Speer M, et al. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165: 1322-1328.

[54] Whitsett JA. Genetic basis of familial interstitial lung disease: misfolding or function of surfactant protein C? *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165: 1201-1202.

[55] Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, et al. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178: 838-846.

[56] Hidvegi T, Mirnics K, Hale P, Ewing M, Beckett C, Perlmutter DH. Regulator of G Signaling 16 is a marker for the distinct endoplasmic reticulum stress state associated with aggregated mutant alpha1-antitrypsin Z in the classical form of alpha1-antitrypsin deficiency. *J Biol Chem*. 2007; 282: 27769-27780.

[57] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*. 2011; 54: 795-809.

[58] Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers (Basel)*. 2011; 3: 716-729.

[59] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15: 178-196.

[60] Phua YL, Martel N, Pennisi DJ, Little MH, Wilkinson L. Distinct sites of renal fibrosis in *Crim1* mutant mice arise from multiple cellular origins. *J Pathol*. 2013; 229: 685-696.

[61] Rowe RG, Lin Y, Shimizu-Hirota R, Hanada S, Neilson EG, Greenson JK, et al. Hepatocyte-derived *Snail1* propagates liver fibrosis progression. *Mol Cell Biol*. 2011; 31: 2392-2403.

[62] Li M, Krishnaveni MS, Li C, Zhou B, Xing Y, Banfalvi A, et al. Epithelium-specific deletion of TGF-beta receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2011; 121: 277-287.

[63] Zeitlinger J, Zinzen RP, Stark A, Kellis M, Zhang H, Young RA, et al. Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist, and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. 2007; 21: 385-390.

[64] Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazziere R, Nunes I, Rifkin DB. Latent

transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 1997; 51: 1376-1382.

[65] Xu MY, Porte J, Knox AJ, Weinreb PH, Maher TM, Violette SM, et al. Lysophosphatidic acid induces alphavbeta6 integrin-mediated TGF-beta activation via the LPA2 receptor and the small G protein G alpha(q). *Am J Pathol.* 2009; 174: 1264-1279.

[66] Jenkins RG, Su X, Su G, Scotton CJ, Camerer E, Laurent GJ, et al. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1606-1614.

[67] Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, Linn G, et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 121ra118.

[68] Giacomini MM, Travis MA, Kudo M, Sheppard D. Epithelial cells utilize cortical actin/myosin to activate latent TGF-beta through integrin alpha(v)beta(6)-dependent physical force. *Exp Cell Res.* 2012; 318: 716-722.

[69] Wang A, Yokosaki Y, Ferrando R, Balmes J, Sheppard D. Differential regulation of airway epithelial integrins by growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996; 15: 664-672.

[70] Sheppard D, Cohen DS, Wang A, Busk M. Transforming growth factor beta differentially regulates expression of integrin subunits in guinea pig airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 1992; 267: 17409-17414.

[71] 夏海珊. 肝纤维化的发病机制和药物治疗现况. *中国医药导报.* 2014; 11:

[72] 田莉莹. 特发性肺纤维化的治疗进展. *青岛大学医学院学报.* 2013;

[73] Gress T, Muller-Pillasch F, Elsasser HP, Bachem M, Ferrara C, Weidenbach H, et al. Enhancement of transforming growth factor beta 1 expression in the rat pancreas during regeneration from caerulein-induced pancreatitis. *Eur J Clin Invest.* 1994; 24: 679-685.

[74] Murtaugh LC, Keefe MD. Regeneration and Repair of the Exocrine Pancreas. *Annual Review of Physiology.* 2015; 77: 229-249.

[75] Neuschwander-Tetri BA, Burton FR, Presti ME, Britton RS, Janney CG, Garvin PR, et al. Repetitive self-limited acute pancreatitis induces pancreatic fibrogenesis in the mouse. *Dig Dis Sci.* 2000; 45: 665-674.

[76] Goto M, Nakano I, Kimura T, Miyahara T, Kinjo M, Nawata H. New chronic pancreatitis model with diabetes induced by cerulein plus stress in rats. *Dig Dis Sci.* 1995; 40: 2356-2363.

[77] Treiber M, Neuhofer P, Anetsberger E, Einwächter H, Lesina M, Rickmann M, et al.

Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2011; 141: 1473-1485, 1485 e1471-1477.

[78] Neuschwander-Tetri BA, Bridle KR, Wells LD, Marcu M, Ramm GA. Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells. *Lab Invest*. 2000; 80: 143-150.

[79] Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, Asada M, Tamaki H, Kawasaki K, et al. Overexpression of redox-active protein thioredoxin-1 prevents development of chronic pancreatitis in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8: 1835-1845.

[80] Ahmadi A, Nikkhoo B, Mokarizadeh A, Rahmani MR, Fakhari S, Mohammadi M, et al. An optimised mouse model of chronic pancreatitis with a combination of ethanol and cerulein. *Cent Eur J Immunol*. 2016; 41: 54-63.

[81] Bai H, Chen X, Zhang L, Dou X. The effect of sulindac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, attenuates inflammation and fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis. *BMC Gastroenterol*. 2012; 12: 115.

[82] Delaney CP, McGeeney KF, Dervan P, Fitzpatrick JM. Pancreatic atrophy: a new model using serial intra-peritoneal injections of L-arginine. *Scand J Gastroenterol*. 1993; 28: 1086-1090.

[83] Weaver C, Bishop AE, Polak JM. Pancreatic changes elicited by chronic administration of excess L-arginine. *Exp Mol Pathol*. 1994; 60: 71-87.

[84] Yamaguchi T, Kihara Y, Taguchi M, Nagashio Y, Tashiro M, Nakamura H, et al. Persistent destruction of the basement membrane of the pancreatic duct contributes to progressive acinar atrophy in rats with experimentally induced pancreatitis. *Pancreas*. 2005; 31: 365-372.

[85] 何新红, 陆建平, 廖专, 陆靖, 汪剑, 吴洪玉, et al. 二丁基二氯化物尾静脉注射建立大鼠慢性胰腺炎模型. *中华胰腺病杂志*. 2007; 7: 17-20.

[86] Sparmann G, Merkord J, Jaschke A, Nizze H, Jonas L, Lohr M, et al. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology*. 1997; 112: 1664-1672.

[87] Zhang H, Liu B, Xu XF, Jiang TT, Zhang XQ, Shi YL, et al. Pathophysiology of chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride joint ethanol in mice. *World J Gastroenterol*. 2016; 22: 2960-2970.

[88] Li L, Bachem MG, Zhou S, Sun Z, Chen J, Siech M, et al. Pancreatitis-associated protein inhibits human pancreatic stellate cell MMP-1 and -2, TIMP-1 and -2 secretion and

RECK expression. *Pancreatology*. 2009; 9: 99-110.

[89] Qin T, Liu CJ, Zhang HW, Pan YF, Tang Q, Liu JK, et al. Effect of the Ikb α mutant gene delivery to mesenchymal stem cells on rat chronic pancreatitis. *Genet Mol Res*. 2014; 13: 371-385.

[90] Buchwalow I, Schnekenburger J, Atiakshin D, Samoilova V, Wolf E, Boecker W, et al. Oxidative stress and NO generation in the rat pancreatitis induced by pancreatic duct ligation. *Acta Histochem*. 2017; 119: 252-256.

[91] Watanabe S, Abe K, Anbo Y, Katoh H. Changes in the mouse exocrine pancreas after pancreatic duct ligation: a qualitative and quantitative histological study. *Arch Histol Cytol*. 1995; 58: 365-374.

[92] Murayama KM, Barent BL, Gruber M, Brooks A, Eliason S, Brunt EM, et al. Characterization of a novel model of pancreatic fibrosis and acinar atrophy. *J Gastrointest Surg*. 1999; 3: 418-425.

[93] Sandler M, Beyer G, Mahajan UM, Kauschke V, Maertin S, Schurmann C, et al. Complement Component 5 Mediates Development of Fibrosis, via Activation of Stellate Cells, in 2 Mouse Models of Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2015; 149: 765-776 e710.

[94] Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 1980; 15: 411-416.

[95] R. L. Surgery of the Digestive System in the Rat. Springfield (IL): Thomas, 1965.

[96] Unal E, Atalay S, Tolan HK, Yuksekdog S, Yucel M, Acar A, et al. Biliopancreatic duct injection of ethanol as an experimental model of acute and chronic pancreatitis in rats. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8: 304-310.

[97] Maki T, Kakizaki G, Sato T, Saito Y, Onuma T. Experimental study on alcoholic pancreatitis. *Tohoku J Exp Med*. 1967; 92: 415-421.

[98] Ponnappa BC, Marciniak R, Schneider T, Hoek JB, Rubin E. Ethanol consumption and susceptibility of the pancreas to cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas*. 1997; 14: 150-157.

[99] Deng X, Wang L, Elm MS, Gabazadeh D, Diorio GJ, Eagon PK, et al. Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Pathol*. 2005; 166: 93-106.

[100] Perides G, Tao X, West N, Sharma A, Steer ML. A mouse model of ethanol

dependent pancreatic fibrosis. *Gut*. 2005; 54: 1461-1467.

[101] Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, Kumar RK, Pirola R, Wilson J, et al. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology*. 2007; 133: 1293-1303.

[102] Gukovsky I, Lugea A, Shahsahebi M, Cheng JH, Hong PP, Jung YJ, et al. A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294: G68-79.

[103] Zhang X, Cui Y, Fang L, Li F. Chronic high-fat diets induce oxide injuries and fibrogenesis of pancreatic cells in rats. *Pancreas*. 2008; 37: e31-38.

[104] Criddle DN. The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison. *Pancreatology*. 2015; 15: S6-S12.

[105] Kono H, Nakagami M, Rusyn I, Connor HD, Stefanovic B, Brenner DA, et al. Development of an animal model of chronic alcohol-induced pancreatitis in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280: G1178-1186.

[106] Ida S, Ohmuraya M, Hirota M, Ozaki N, Hiramatsu S, Uehara H, et al. Chronic pancreatitis in mice by treatment with choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Exp Anim*. 2010; 59: 421-429.

[107] Durie PR, Kent G, Phillips MJ, Ackerley CA. Characteristic multiorgan pathology of cystic fibrosis in a long-living cystic fibrosis transmembrane regulator knockout murine model. *Am J Pathol*. 2004; 164: 1481-1493.

[108] Ohmuraya M, Hirota M, Araki K, Baba H, Yamamura K. Enhanced trypsin activity in pancreatic acinar cells deficient for serine protease inhibitor kazal type 3. *Pancreas*. 2006; 33: 104-106.

[109] Romac JM, Ohmuraya M, Bittner C, Majeed MF, Vigna SR, Que J, et al. Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-1 rescues SPINK3-deficient mice and restores a normal pancreatic phenotype. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 298: G518-524.

[110] Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, Sossenheimer MJ, Barua PS, Zhang Y, et al. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology*. 1996; 110: 1975-1980.

[111] Archer H, Jura N, Keller J, Jacobson M, Bar-Sagi D. A mouse model of hereditary pancreatitis generated by transgenic expression of R122H trypsinogen. *Gastroenterology*. 2006; 131: 1844-1855.

- [112] Gaiser S, Daniluk J, Liu Y, Tsou L, Chu J, Lee W, et al. Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis. *Gut*. 2011; 60: 1379-1388.
- [113] Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet*. 2013; 45: 1216-1220.
- [114] Kujko AA, Berki DM, Oracz G, Wejnarska K, Antoniuk J, Wertheim-Tysarowska K, et al. A novel p.Ser282Pro CPA1 variant is associated with autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*. 2017; 66: 1728-1730.
- [115] Hegyi E, Sahin-Toth M. Human CPA1 mutation causes digestive enzyme misfolding and chronic pancreatitis in mice. *Gut*. 2019; 68: 301-312.
- [116] Kloppel G, Maillet B. Chronic pancreatitis: evolution of the disease. *Hepatogastroenterology*. 1991; 38: 408-412.
- [117] Ahmed SA, Wray C, Rilo HL, Choe KA, Gelrud A, Howington JA, et al. Chronic pancreatitis: recent advances and ongoing challenges. *Curr Probl Surg*. 2006; 43: 127-238.
- [118] Hanck C, Whitcomb DC. Alcoholic pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2004; 33: 751-765.
- [119] Dufour MC, Adamson MD. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*. 2003; 27: 286-290.
- [120] Lerch MM, Gorelick FS. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2013; 144: 1180-1193.
- [121] Aghdassi AA, Mayerle J, Christochowitz S, Weiss FU, Sendler M, Lerch MM. Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011; 4: 26.
- [122] Foster JR. A review of animal models of nonneoplastic pancreatic diseases. *Toxicol Pathol*. 2014; 42: 243-259.
- [123] Hyun JJ, Lee HS. Experimental models of pancreatitis. *Clin Endosc*. 2014; 47: 212-216.

综述二

钆类分子探针在纤维化靶点显像中的研究进展

纤维化是组织响应于损伤，导致细胞外基质（ECM）过度沉积和组织重塑的病理过程^[1]。进行性纤维化可导致器官衰竭并最终导致死亡。肺纤维化^[2]，肝硬化^[3]，高血压性心脏病^[4]，糖尿病肾病^[5]，和动脉粥样硬化^[6]，慢性胰腺炎^[7]是以组织纤维化为特征的最常见疾病。纤维化疾病占工业化世界死亡人数的近 45%^[8]，但往往被临床所忽视，并且由于缺乏有效的治疗方法，使得纤维化疾病的诊治成为一项巨大的医学挑战。

病理活检可以为纤维化疾病提供重要信息，但是有创性及较高的并发症风险限制了重复活检在评估疾病进展或评估疗效中的应用。所以，目前纤维化疾病诊治困境在于缺乏有效的非侵入性成像方法用以早期诊断，预测进展，评估疗效。

近年来，分子影像学发展迅速，为评价纤维化疾病提供了有力的手段，分子影像学的成像手段主要有核素（PET、SPECT）、MR 分子成像及光学成像、CT 等^[9]。MR 分子成像可提供高的分辨率、无限的穿透能力、良好的软组织对比，是理想的成像手段^[10]，但是敏感度欠佳。近年来随着纤维化发病中涉及的分子机制被进一步阐明，业内学者采用高度特异性靶向的分子探针及高性能的显像剂可以提高成像的灵敏度，达到理想的显像效果。目前以钆剂临床应用最为广泛^[11]。本文总结近年来钆类分子探针在纤维化分子影像中的研究进展。

一、纤维化的分子机制

纤维化是组织、器官炎症损伤后的常见病理转归，可见于肝脏、肾脏、肺脏、胰腺、心脑血管、骨髓、皮肤等脏器和组织。组织、器官损伤将触发一系列细胞和分子反应以促进创伤愈合^[12]。创伤愈合最终结局只有两种，一种是组织细胞再生完全恢复正常结构与功能，另一种则是发生纤维化导致正常组织结构与功能遭到破坏。这两种结局完全取决于创伤愈合反应的程度。创伤愈合的第一阶段主要表现为血管通透性增加和血管外凝血^[13]。创伤后，上皮和 / 或内皮细胞释放炎症介质，启动凝血级联反应^[8]。循环血小板在接触胶原纤维和血管性血友病因子（von Willebrand Factor, vWF）后迅速聚集和激活。血小板脱颗粒促进血管舒张，增加血管通透性。同时外源性凝血途径激活凝血酶原，形成凝血酶。凝血酶将可溶性纤维蛋白原转化为可溶性纤维蛋白单体，伴随着凝血酶激活凝血因子 XIII, XIIIa 使得纤维蛋白单体聚集成网，将血小板聚集形成纤维蛋白凝块^[14]。创伤同时刺激上皮细胞和内皮细胞产生基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase, MMPs）。MMPs 破坏基底膜，使炎症细胞能够迁移聚集到损伤部位。损伤上皮细胞释

放生长因子、细胞因子和趋化因子募集并激活多种免疫细胞,同时这些免疫细胞反过来释放促纤维化细胞因子和生长因子,如白细胞介素 13(IL-13)、转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等,促进肌成纤维细胞的扩散、聚集和 / 或活化^[14]。损伤上皮细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)并诱导血管生成。活化的巨噬细胞和中性粒细胞清除组织碎片和死亡细胞。活化的成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞并迁移到伤口产生新的结缔组织(I 型胶原、纤维连接蛋白、弹性蛋白)^[15]。结缔组织促进伤口的收缩。胶原纤维通过 LOX 酶(LOX, LOXL2)的作用开始形成交联^[16]。随着组织的修复,瘢痕组织被清除。

然而,在慢性炎症和修复过程中,由于肌成纤维细胞的持续活化和胶原交联的增加,可导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的累积。正常组织中 ECM 的合成和降解存在着动态平衡,上皮损伤修复过程中的任何的改变都会使细胞外基质的平衡向瘢痕形成方向转移。如果 ECM 胶原的生成速率超过其降解速率,就会发生纤维化。

二、纤维化分子 MR 探针

近年来随着纤维化发病中涉及的分子机制被进一步阐明,以纤维化和纤维化发生过程中涉及的细胞、细胞因子为靶点,为纤维化的靶点成像提供了多种可能。目前,已经报道了几种针对纤维化和纤维发生过程的钆类分子探针成像靶标,主要集中在四个方向:血管外凝血途径、I 型胶原蛋白、氧化胶原蛋白、弹性蛋白(表 1)。

表 1 纤维化成像钆类分子探针

分子探针	生物学靶点	应用
EP-2104R	纤维蛋白	肺纤维化
Gd-P	纤维蛋白 / 纤维蛋白原复合物	肝纤维化
EP-3533	I 型胶原蛋白	心肌梗塞、肝纤维化、肺纤维化等
CM-101	I 型胶原蛋白	肝纤维化
Gd-ESMA	弹性蛋白	动脉粥样硬化、肝纤维化
Gd-Hyd	氧化胶原蛋白	肝纤维化、肺纤维化等

(一) 钆类分子探针与血管外凝血途径 (EP-2104R、Gd-P)

上皮损伤时,受损细胞通过细胞旁通路将信号传递给邻近间充质细胞(如周细胞)^[17],如果损伤持续或反复,则周细胞增殖并基因转录发生显著改变,导致它们转分化为肌成纤维细胞。这些肌成纤维细胞丧失周细胞作为维持毛细血管稳态功能。毛细血管内皮发生渗漏导致纤维蛋白原 / 其他血浆蛋白渗入血管外 / 细胞外间隙,通过凝血途径的激活导致血管外纤维蛋白沉积^[18]。2004 年,Ren é M. Botnar 报道了一种 Gd 标记肽衍生

物 EP-1873, 其与纤维蛋白能特异性结合。在新西兰白兔动脉粥样硬化模型触发斑块破裂后 20 小时, EP-1873 能特异性浓聚于破裂的斑块组织, 非侵入性地检测动脉粥样硬化小鼠模型中的斑块负荷^[19]。

纤维化肺病, 特别是特发性肺纤维化 (IPF), 被认为是肺组织对重复性肺损伤的异常愈合反应引起的。血管通透性增加可通过促进血管外凝血, 导致纤维蛋白沉积降解失衡, 促进 IPF 进展^[20, 21]。小动物研究中, UTE (ultrashort TE) 序列已经能实现在高分辨率形态学肺显像^[22]。2008 年, Botnar RM 开发了一种基于 Gd 的纤维蛋白结合分子探针 EP-2104R, 其包含 11 个氨基酸的肽衍生物, 在肽的 C 和 N 末端各具有 2 个 Gd-DOTA 样部分^[23]。EP-2104R 对纤维蛋白具有高度特异性。Shea BS^[24]团队利用 UTE 序列与 EP-2104R 造影剂评估血管渗漏相关的肺纤维化小鼠模型的纤维蛋白沉积程度和检测药物疗效。

短期肝损伤或肝纤维化过程中纤维蛋白 / 纤维蛋白复合体会在细胞外基质沉积^[25]。已有多篇文献报道一种名为 CLT1 的环状十肽可以靶向不同肿瘤和组织损伤的细胞外基质中的纤连蛋白-纤维蛋白复合物^[26, 27], 基于此靶向肽研制的 CLT1 肽靶向钆类分子探针 (Gd-P) 已经被研究用于癌症的分子成像造影增强 MRI^[28-30]。

Chow AM 团队报道 Gd-P 可以用于检测 CCl₄ 损伤小鼠的肝纤维化, 尽管如此, 但其在分期疾病方面的使用受到限制, 因为 Gd-P 无法区分受 CCl₄ 造模 4 周的小鼠和 CCl₄ 造模 8 周的小鼠^[31]。

(二) 钆类分子探针与 I 型胶原蛋白 (EP-3533、CM-101)

胶原蛋白是细胞外基质中最丰富的结构白质, 约占总蛋白质含量的 30%^[32]。纤维化组织中最丰富的基质蛋白是 I 型和 III 型胶原蛋白, 但也有显著增加的纤维连接蛋白, 骨桥蛋白, 透明质酸和蛋白多糖, 同时存在胶原蛋白和层粘连蛋白的不同亚型。纤维化组织中的 I 型胶原浓度高于 10 μ M, 这使其成为一种理想的纤维化成像靶标。

EP-3533 的研究始于 2007 年^[33], EP-3533 由一条肽链连接三个 Gd-DTPA 制备而成, 肽链由 16 氨基酸分子组成, 并通过二硫键结合折叠, 其对 I 型胶原纤维的结合力为 1.8 $\times 10^{-6}$ mol/L。EP-3533 有种名为 EP-3612 的异构体, 后者与前者的区别仅在于肽链中 L-半胱氨酸被替换为 D-半胱氨酸, 其对胶原结合力将降低 100 倍以上。

研究发现, 在心肌梗塞小鼠模型中, 动态 T1WI MRI 显示 EP-3533 的廓清时间比瘢痕形成区域中 Gd-DTPA (25 分钟) 的廓清时间长得多 (195 分钟); 梗塞后瘢痕形成区域与正常心肌相比, 前者 EP-3533 廓清时间明显长于后者。增强区域与胶原的组织学存在相关, 在注射 EP-3533 后 50 分钟, 瘢痕中的钆浓度比正常心肌高 2 倍^[34]。

巨噬细胞和胶原蛋白是重要的斑块内成分, 在斑块消退过程中, 二者所占比例会发

生显著变化：从高巨噬细胞，低胶原蛋白转变为低巨噬细胞，高胶原蛋白。由于 HDL 纳米颗粒、EP-3533 肽链分别对于巨噬细胞、胶原蛋白具有高结合力，Wei Chen 等^[35]用胶原特异性 EP-3533 肽功能化标记 HDL 纳米颗粒，命名为 EP3533-HDL。体外实验证实 EP3533-HDL 能与胶原蛋白特异性结合。Reversa 小鼠模型^[36]接收降血脂干预后出现斑块的消融。Reversa 小鼠降血脂干预 28 天后，EP3533-HDL 延迟增强 24 小时在主动脉血管壁中显示出显著增加的 MR 信号，对照组 EP3612-HDL 延迟增强 24 小时无增强信号^[35]。

EP-3533 在检测肺纤维化方面也很有效。Caravan P 等^[37]报道 EP-3533 可以检测博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型中的肺纤维化，并且探针摄取与羟脯氨酸水平（代表胶原蛋白含量）呈正线性相关。

EP-3533 同样被报道可以用于检测肝纤维化。Fuchs BC 团队^[38]报道在 CCl₄ 诱导肝纤维化模型小鼠中注射 EP-3533，延迟增强 45min 后肝脏 Δ CNR 与肝羟脯氨酸、Ishak 纤维化评分之间分别呈强烈的正线性相关性。此外，EP-3533 还可以用于区分早期（Ishak \leq 3）和晚期（Ishak \geq 4）纤维化，ROC 曲线下面积为 0.942 ± 0.052 （ $p < 0.001$ ）。不仅如此，EP-3533 在评估肝抗纤维化治疗效果中也取得了一定的进展，Christian T. Farrar^[39]团队对大鼠进行胆管结扎，结扎周期与肝纤维化程度正相关，不同纤维化程度的模型鼠进行 EP-3533 增强扫描，研究发现 EP-3533 延迟增强 1h 的 Δ R1 值可以区分不同严重程度的肝脏纤维化，并且雷帕霉素干预治疗后肝脏纤维化程度与 Δ R1 值均明显降低。

有部分实体瘤以纤维化为显著特征，胰腺导管腺癌（PDAC）就是其中典型的代表，最近 Polasek M^[40]团队使用磁共振成像与 EP-3533 对 PDAC 中的纤维化进行成像和量化。注射对比剂后肿瘤体外定量显示钆的 EP-3533 的摄取较 EP-3612 更高。T1WI 中的 EP-3533 增强区域显示出与二次谐波成像（SHG）图像中富含胶原蛋白的区域的极好重叠。

然而，EP-3533 本质上是靶向肽连接线性 Gd-DTPA 而合成的靶向造影剂，已经有研究报道 EP-3533 会造成 Gd 在骨骼或其他组织中的累积^[33]，并且近年来越来越多的报道指出肾源性系统性纤维化与严重肾脏疾病患者使用钆类造影剂有关^[41, 42]，这一缺点限制其向临床进一步转化。最近 Farrar, C.T. 团队报道了一种名为 CM-101 的胶原蛋白靶向造影剂^[43]，CM-101 与 EP-3533 使用相同的胶原蛋白靶向组件，但将线性 Gd-DTPA 替换为更为稳定的大环螯合物 Gd-DOTA 螯合物，动物体内研究结果表明较之 EP-3533，CM-101 呈快速的血液清除，在骨骼或组织中可钆累积可以忽略不计，并同样能检测出检测 CCl₄ 损伤小鼠的肝纤维化，上述特征均提示 CM-101 在临床转化方面极具优势。

（三）钆类分子探针与氧化胶原蛋白（Gd-Hyd）

纤维化发生过程中，胶原蛋白肽链中赖氨酸残基经赖氨酰氧化酶及其旁系同源物（LOX/LOXL1-4）氧化脱氨形成的醛赖氨酸（Allysine），因此纤维化伴随着细胞外醛赖氨酸的积聚^[44]。胶原蛋白氧化是活性胶原纤维发生过程的普遍特征，并且醛赖氨酸在胶原蛋白与弹性蛋白交联过程中扮演了重要的角色，能够使弹性蛋白和胶原更为稳定^[45-47]。Waghorn PA 团队开发一种用于量化醛赖氨酸的方法，经测定博来霉素肺纤维化小鼠模型中肺组织内烯丙氨酸浓度超过了 150nmol/g^[48]。因为细胞外空间约占组织的 20%，这意味着在肺纤维化模型中组织细胞外的醛赖氨酸浓度达到了 1mM，醛赖氨酸是一种理想的针对纤维化发生的生物学靶点。

醛赖氨酸与酰肼发生可逆缩合反应形成腙，基于此 Chen HH^[49]团队设计了一种名为 Gd-Hyd 的纤维化靶向分子探针，Gd-Hyd 分子结构上是将一个 Gd-DOTA 连接至酰肼，以达到靶向结合氧化胶原蛋白的目的。博来霉素给药两周的肺纤维化小鼠模型中，采集注射药物前平扫 MR 图像与注射靶向探针 Gd-Hyd 或非靶向探针后 12 分钟获得 MR 图像。注射 Gd-Hyd 的肺纤维化小鼠的 ΔCNR 较注射 Gd-DiMe 肺纤维化小鼠更高。正常小鼠相比，Gd-Hyd 注射导致肺纤维化小鼠的 ΔCNR 是正常小鼠的 3.7 倍。

（四）钆类分子探针与弹性蛋白（Gd-ESMA）

弹性蛋白在动脉血管壁中含量丰富^[50]，其在斑块形成过程中表达的增加^[51]，这使得弹性蛋白成为一种有前景的分子影像靶点，可以用于斑块负荷的无创性评估。Gd-ESMA 是一种弹性蛋白特异性 MR 造影剂^[52]。Gd-ESMA 对弹性蛋白表现出中等亲和力（ $\text{IC}_{50}=0.33\text{mM}$ ）^[52]。Apoe^{-/-}小鼠模型的动脉斑块表现出许多与人类动脉粥样硬化发病机制相关的特征^[53]。在正常小鼠中，Gd-ESMA 注射后的高分辨率延迟增强 MRI 显示头臂血管壁中存在弹性蛋白，这通过弹性蛋白特异性染色进一步证实（Verhoeff–Van Gieson 染色）。在动脉粥样硬化的小鼠（Apoe^{-/-}）模型中，Gd-ESMA 可以无创检测动脉粥样硬化斑块负荷，监测斑块进展和消退^[52]。

弹性蛋白已被证明在心肌梗死瘢痕愈合过程中起着保留心肌弹性、改善心脏功能的重要作用^[54]。健康心肌在间质和冠状动脉血管系统中仅含有微量的弹性蛋白，在心肌瘢痕形成早期，心肌瘢痕内的弹性蛋白增加，随着瘢痕组织的进一步成熟，弹性蛋白在残存心肌细胞、成纤维细胞及平滑肌细胞之间形成致密的网状结构^[55]；瘢痕愈合晚期，原弹性蛋白（弹性蛋白的可溶性前体）大量合成并沉积在重塑的心肌内^[56]。近年来，多篇报道指出 Gd-ESMA 可以定量观察心肌疤痕组织中弹性蛋白沉积和心肌 ECM 重塑过程^[57-59]。

胸主动脉瘤的病理学特征在于血管壁血管平滑肌细胞损伤，弹性纤维的碎片化和减少^[60, 61]。马凡综合征患者病变血管壁病理学特征包括弹性蛋白减少和细胞外基质降解增加^[62, 63]。Okamura H 团队报告了一种用于评估 Marfan 主动脉瘤模型小鼠(Fbn1^{C1039G/+})中主动脉壁弹性蛋白含量的非侵入性方法。与野生型(WT)小鼠对照相比，使用 ESMA 的 MRI 可准确测量主动脉壁内与弹性蛋白结合的钆，并最终病理证实 Fbn1^{C1039G/+}小鼠中主动脉壁弹性蛋白减少^[64]。

弹性蛋白积聚是肝纤维化晚期的典型病理学特征^[65]，Ehling J 团队用 CCl₄ 处理 C57bl/6 小鼠以诱导肝纤维化，静脉注射 Gd-ESMA 2 小时后，在肝脏中流空血管周围观察到 T1 信号明显增强，但在健康对照肝脏中未观察到增强信号，通过 Elastica-Van-Gieson 染色证实了纤维化肝脏中的血管外周有大量弹性蛋白积聚^[66]。证实了 Gd-ESMA 可以用于肝纤维化晚期弹性蛋白特异性成像，同时也意味着该造影剂在肝纤维化早期无太大诊断意义。

三、总结与展望

纤维化是慢性组织损伤的常见结果。尽管近年来关于进展纤维化发病机制及其潜在的分子机制有了很大进展，但纤维化疾病的治疗与管理仍很大程度上被临床忽视。抗纤维化的临床进展也存在很大障碍，仍需要长期的实验探索与临床试验。基于生物标记物的分子影像以其非侵入性和可重复性等优点，是理想的测量体内分子水平变化工具。纤维化分子成像具有非侵入性和可重复性等优点，促进了纤维化疾病新型治疗靶点的临床前研究，有利于新动物模型的验证，推动基础研究成果转化至临床进程，最后转化至临床改善纤维化患者的管理和治疗。

分子 MRI 是一种非侵入性技术，可在体内对生物标志物靶向显像。与其他临床分子影像学方法相比，该方法具有较高的空间分辨率、无限的穿透能力、良好的软组织对比，是理想的成像手段，但是敏感度欠佳。近年来随着纤维化发病中涉及的分子机制被进一步阐明，业内学者采用高度特异性靶向的分子探针及高性能的显像剂可以提高成像的灵敏度，达到理想的效果。本文总结的钆类分子探针代表解决这些问题的第一步。相信随着生物材料技术不断发展，纤维化分子影像学钆类分子探针转化为临床应用即将成为现实。

参考文献

- [1] Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci Transl Med*. 2013; 5: 167sr161.
- [2] Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2017; 389: 1941-1952.
- [3] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008; 371: 838-851.
- [4] Lip GY, Felmeden DC, Li-Saw-Hee FL, Beevers DG. Hypertensive heart disease. A complex syndrome or a hypertensive 'cardiomyopathy'? *Eur Heart J*. 2000; 21: 1653-1665.
- [5] Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008; 4: 444-452.
- [6] Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. *Circ Res*. 2016; 118: 531-534.
- [7] Majumder S, Chari ST. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2016; 387: 1957-1966.
- [8] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214: 199-210.
- [9] Hammoud DA. Molecular Imaging of Inflammation: Current Status. *J Nucl Med*. 2016; 57: 1161-1165.
- [10] Sosnovik DE, Weissleder R. Emerging concepts in molecular MRI. *Curr Opin Biotechnol*. 2007; 18: 4-10.
- [11] Nghia N, Tinet E, Etti D, Beilvert A, Pavon-Djavid G, Maire M, et al. Gadolinium/terbium hybrid macromolecular complexes for bimodal imaging of atherothrombosis. *J Biomed Opt*. 2017; 22: 76004.
- [12] Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis — A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *New England Journal of Medicine*. 2015; 372: 1138-1149.
- [13] Ahluwalia N, Shea BS, Tager AM. New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 190: 867-878.
- [14] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*. 2012; 18: 1028.
- [15] Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004; 9: 283-289.
- [16] Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*. 2003; 88: 660-672.

- [17] Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010; 11: 467-478.
- [18] Brown LF, Dvorak AM, Dvorak HF. Leaky vessels, fibrin deposition, and fibrosis: a sequence of events common to solid tumors and to many other types of disease. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140: 1104-1107.
- [19] Botnar RM, Perez AS, Witte S, Wiethoff AJ, Laredo J, Hamilton J, et al. In vivo molecular imaging of acute and subacute thrombosis using a fibrin-binding magnetic resonance imaging contrast agent. *Circulation.* 2004; 109: 2023-2029.
- [20] Chapman HA, Allen CL, Stone OL. Abnormalities in pathways of alveolar fibrin turnover among patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133: 437-443.
- [21] Kotani I, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res.* 1995; 77: 493-504.
- [22] Zurek M, Bessaad A, Cieslar K, Cremillieux Y. Validation of simple and robust protocols for high-resolution lung proton MRI in mice. *Magn Reson Med.* 2010; 64: 401-407.
- [23] Overoye-Chan K, Koerner S, Looby RJ, Kolodziej AF, Zech SG, Deng Q, et al. EP-2104R: A Fibrin-Specific Gadolinium-Based MRI Contrast Agent for Detection of Thrombus. *Journal of the American Chemical Society.* 2008; 130: 6025-6039.
- [24] Shea BS, Probst CK, Brazee PL, Rotile NJ, Blasi F, Weinreb PH, et al. Uncoupling of the profibrotic and hemostatic effects of thrombin in lung fibrosis. *JCI Insight.* 2017; 2:
- [25] Neubauer K, Knittel T, Armbrust T, Ramadori G. Accumulation and cellular localization of fibrinogen/fibrin during short-term and long-term rat liver injury. *Gastroenterology.* 1995; 108: 1124-1135.
- [26] Neri D, Carnemolla B, Nissim A, Leprini A, Querze G, Balza E, et al. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat Biotechnol.* 1997; 15: 1271-1275.
- [27] Halin C, Rondini S, Nilsson F, Berndt A, Kosmehl H, Zardi L, et al. Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature. *Nat Biotechnol.* 2002; 20: 264-269.
- [28] Tan M, Wu X, Jeong EK, Chen Q, Lu ZR. Peptide-targeted Nanoglobular Gd-DOTA monoamide conjugates for magnetic resonance cancer molecular imaging. *Biomacromolecules.* 2010; 11: 754-761.
- [29] Tan M, Wu X, Jeong EK, Chen Q, Parker DL, Lu ZR. An effective targeted

nanoglobular manganese(II) chelate conjugate for magnetic resonance molecular imaging of tumor extracellular matrix. *Mol Pharm*. 2010; 7: 936-943.

[30] Tan M, Burden-Gulley SM, Li W, Wu X, Lindner D, Brady-Kalnay SM, et al. MR molecular imaging of prostate cancer with a peptide-targeted contrast agent in a mouse orthotopic prostate cancer model. *Pharm Res*. 2012; 29: 953-960.

[31] Chow AM, Tan M, Gao DS, Fan SJ, Cheung JS, Man K, et al. Molecular MRI of liver fibrosis by a peptide-targeted contrast agent in an experimental mouse model. *Invest Radiol*. 2013; 48: 46-54.

[32] 高春芳; 陆伦根. 纤维化疾病的基础和临床. 上海科学技术出版社, 2004.

[33] Caravan P, Das B, Dumas S, Epstein FH, Helm PA, Jacques V, et al. Collagen-targeted MRI contrast agent for molecular imaging of fibrosis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007; 46: 8171-8173.

[34] Helm PA, Caravan P, French BA, Jacques V, Shen L, Xu Y, et al. Postinfarction myocardial scarring in mice: molecular MR imaging with use of a collagen-targeting contrast agent. *Radiology*. 2008; 247: 788-796.

[35] Chen W, Cormode DP, Vengrenyuk Y, Herranz B, Feig JE, Klink A, et al. Collagen-specific peptide conjugated HDL nanoparticles as MRI contrast agent to evaluate compositional changes in atherosclerotic plaque regression. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013; 6: 373-384.

[36] Feig JE, Parathath S, Rong JX, Mick SL, Vengrenyuk Y, Grauer L, et al. Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2011; 123: 989-998.

[37] Caravan P, Yang Y, Zachariah R, Schmitt A, Mino-Kenudson M, Chen HH, et al. Molecular magnetic resonance imaging of pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013; 49: 1120-1126.

[38] Fuchs BC, Wang H, Yang Y, Wei L, Polasek M, Schuhle DT, et al. Molecular MRI of collagen to diagnose and stage liver fibrosis. *J Hepatol*. 2013; 59: 992-998.

[39] Farrar CT, DePeralta DK, Day H, Rietz TA, Wei L, Lauwers GY, et al. 3D molecular MR imaging of liver fibrosis and response to rapamycin therapy in a bile duct ligation rat model. *J Hepatol*. 2015; 63: 689-696.

[40] Polasek M, Yang Y, Schuhle DT, Yaseen MA, Kim YR, Sung YS, et al. Molecular MR imaging of fibrosis in a mouse model of pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2017; 7: 8114.

[41] Marckmann P, Skov L, Rossen K, Dupont A, Damholt MB, Heaf JG, et al. Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for

contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2359-2362.

[42] Khurana A, Runge VM, Narayanan M, Greene JF, Jr., Nickel AE. Nephrogenic systemic fibrosis: a review of 6 cases temporally related to gadodiamide injection (omniscan). *Invest Radiol*. 2007; 42: 139-145.

[43] Farrar CT, Gale EM, Kennan R, Ramsay I, Masia R, Arora G, et al. CM-101: Type I Collagen-targeted MR Imaging Probe for Detection of Liver Fibrosis. *Radiology*. 2018; 287: 581-589.

[44] Pinnell SR, Martin GR. The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-aminoadipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968; 61: 708-716.

[45] Lent RW, Smith B, Salcedo LL, Faris B, Franzblau C. Studies on the reduction of elastin. II. Evidence for the presence of alpha-aminoadipic acid delta-semialdehyde and its aldol condensation product. *Biochemistry*. 1969; 8: 2837-2845.

[46] Starcher BC, Partridge SM, Elsdon DF. Isolation and partial characterization of a new amino acid from reduced elastin. *Biochemistry*. 1967; 6: 2425-2432.

[47] Franzblau C, Sinex FM, Faris B, Lampidis R. Identification of a new crosslinking amino acid in elastin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1965; 21: 575-581.

[48] Waghorn PA, Oliveira BL, Jones CM, Tager AM, Caravan P. High sensitivity HPLC method for determination of the allysine concentration in tissue by use of a naphthol derivative. *Journal of Chromatography B*. 2017; 1064: 7-13.

[49] Chen HH, Waghorn PA, Wei L, Tapias LF, Schu Hle DT, Rotile NJ, et al. Molecular imaging of oxidized collagen quantifies pulmonary and hepatic fibrogenesis. *JCI Insight*. 2017; 2:

[50] Brasselet C, Durand E, Addad F, Al Haj Zen A, Smeets MB, Laurent-Maquin D, et al. Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: H2228-2233.

[51] Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10: 267-274.

[52] Makowski MR, Wiethoff AJ, Blume U, Cuello F, Warley A, Jansen CHP, et al. Assessment of atherosclerotic plaque burden with an elastin-specific magnetic resonance contrast agent. *Nature Medicine*. 2011; 17: 383.

[53] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 133-140.

[54] Mizuno T, Yau TM, Weisel RD, Kiani CG, Li RK. Elastin stabilizes an infarct and preserves ventricular function. *Circulation*. 2005; 112: I81-88.

[55] Bassett EG, Wakefield JS. Elastic fibers in myocardial scars in rats: development teraction with other components. *Connect Tissue Res*. 2008; 49: 321-327.

[56] Lichtenauer M, Mildner M, Baumgartner A, Hasun M, Werba G, Beer L, et al. Intravenous and intramyocardial injection of apoptotic white blood cell suspensions prevents ventricular remodelling by increasing elastin expression in cardiac scar tissue after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2011; 106: 645-655.

[57] Ramos IT, Henningsson M, Nezafat M, Lavin B, Lorrio S, Gebhardt P, et al. Simultaneous Assessment of Cardiac Inflammation and Extracellular Matrix Remodeling after Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2018; 11:

[58] Protti A, Lavin B, Dong X, Lorrio S, Robinson S, Onthank D, et al. Assessment of Myocardial Remodeling Using an Elastin/Tropoelastin Specific Agent with High Field Magnetic Resonance Imaging (MRI). *J Am Heart Assoc*. 2015; 4: e001851.

[59] Wildgruber M, Bielicki I, Aichler M, Kosanke K, Feuchtinger A, Settles M, et al. Assessment of myocardial infarction and postinfarction scar remodeling with an elastin-specific magnetic resonance agent. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014; 7: 321-329.

[60] Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother*. 2003; 57: 195-202.

[61] Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res*. 2004; 94: 1158-1167.

[62] Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 2006; 312: 117-121.

[63] Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res*. 2001; 88: 37-43.

[64] Okamura H, Pisani Laura J, Dalal Alex R, Emrich F, Dake Benjamin A, Arakawa M, et al. Assessment of Elastin Deficit in a Marfan Mouse Aneurysm Model Using an Elastin-Specific Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *Circulation: Cardiovascular Imaging*. 2014; 7: 690-696.

[65] Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation

and repair in a solid organ. J Clin Invest. 2007; 117: 539-548.

[66] Ehling J, Bartneck M, Fech V, Butzbach B, Cesati R, Botnar R, et al. Elastin-based molecular MRI of liver fibrosis. Hepatology. 2013; 58: 1517-1518.

在读期间发表论文和科研情况

一、第一作者 / 共同第一作者发表论文情况

- 1、**Liu R**, Su W, Chen X, et al. Quantification and differentiation of composition of mixed pancreatic duct stones using single-source dual-energy CT: an ex vivo study[J]. Abdom Radiol (NY), 2018.
- 2、**Liu R**, Su W, Gong J, et al. Noncontrast computed tomography factors predictive of extracorporeal shock wave lithotripsy outcomes in patients with pancreatic duct stones[J]. Abdom Radiol (NY), 2018.
- 3、**Liu R**, Su W, Wang J, et al. Quantitative factors of unenhanced CT for predicting fragmenting efficacy of extracorporeal shock wave lithotripsy on pancreatic duct stones[J]. Clinical Radiology, 2019.
- 4、Zhang Y, Zhu X, **Liu R**, et al. Combination of Pre-Treatment DWI-Signal Intensity and S-1 Treatment: A Predictor of Survival in Patients with Locally Advanced Pancreatic Cancer Receiving Stereotactic Body Radiation Therapy and Sequential S-1[J]. Transl Oncol, 2018, 11(2): 399-405.
- 5、刘日, 弓静. 慢性胰腺炎动物模型进展[J]. 中华胰腺病杂志, 2019.
- 6、刘日, 田冰, 陆建平. 烟雾病的影像学研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2016, (05): 601-607.

二、会议论文

- 1、**Ri Liu**, Noncontrast Computed Tomography Factors that Predict Outcome after Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy in Patients with Pancreatic Duct Stones, RSNA 2018, Chicago, USA, 2018.
- 2、刘日, Quantitative Factors of Noncontrast Computed Tomography for Predicting Fragmenting Efficacy of Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy on Pancreatic Duct Stones, 中华放射学学术大会 2018, 北京, 2018
- 3、刘日, 多层螺旋 CT 对慢性胰腺炎体外震波碎石治疗疗效的评估价值, 第 19 届全国腹部影像学术会议, 成都, 2017
- 4、刘日, 单源双能 CT 对混合胰管结石成分的定量体外研究, 第 7 届亚洲腹部放射学大会, 成都, 2019

三、主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况

- 1、国家自然科学基金青年项目, 81400368, CNA35 胶原靶向金纳米粒 CT 诊断心肌瘢痕的实验研究, 已结题, 参加。
- 2、国家自然科学基金青年项目, 81300366, P 选择素为靶标的 MRI 分子成像在急性胰腺炎早期诊断及分型中的应用研究, 已结题, 参加。

四、获得学术奖励

- 1、刘日，第八届东方放射学大会中文论文比赛，二等奖，2018

致 谢

白驹过隙，时光荏苒，后知后觉中才发现第一次踏进军大的校门已是五年前的往事，而现在的我也即将踏出这座学术的象牙塔，回望这五年攻读硕博学位的日子，是我人生中最有意义最难以忘怀的记忆。我想用笨拙的指尖敲打出最真诚的致谢，感谢所有帮助过我的人。

衷心感谢导师陆建平教授对我的无私教诲。他的渊博学识、严谨治学态度是我学术生涯追求的目标；他的医者仁心是我作为医生的道德楷模；他的豁达睿智是我人生修行的榜样。他是治学严谨的教授，他是严厉的主任，在我眼里他更是一位如慈父般关爱学生的老师。感谢导师对我生活、学业无私的帮助。

衷心感谢弓静老师、边云博士后、田冰博士、曹凯博士手把手带我做科研，在我入门的时候教我如何阅读检索参考文献，在我遇到困哪时候耐心为我解答困惑，在我准备演讲时教我如何表达帮我树立稳健的台风。

衷心感谢田建明、叶华、王振堂、邵成伟、王莉、蒋涛、王飞、刘崎、郝强、生晶、陈炜、林琳、汪剑、马小龙、彭雯佳、马超等科里多位教授在影像专业上对我的指导。

衷心感谢苏维维博士在我课题开展过程中给予的帮助与指导，帮助我完成了大量的科研数据统计工作，并论文撰写中给予我很多建设性意见与帮助，在此向苏同学表示衷心的感谢！

衷心感谢陈士跃、尹伟、许兵、毛佳明、陈录广等老师及各位护士姐姐在科研影像扫描中给予我的帮助，你们牺牲晚上和周末休息时间来帮助我扫描，与你们一起做科研真的很幸运！

衷心感谢卢蕾、嵇铂尧老师在我课题的小动物造模，病理组织取材分析中给予的大力帮助！

衷心感谢陈杏彪博士在 MATLAB 胰管结石分析软件开发中给予的大力帮助！

衷心感谢王进、曹亚峰在我情绪最低落的时候的陪伴与开导，衷心感谢方旭、盛彧、费剑锋、王洋你们是我的同学更是我的好兄弟，每次当我遇到困难时，你们总是义无反顾地冲出来为我排忧解难，即将面临毕业分离，我祝你们前程似锦！

衷心感谢宋斌教授在我胰管结石标本收集过程中给予的大力支持。

衷心感谢郭威师兄在科研数据统计中给予我的大力支持与指导。

衷心感谢雷洁雯同学在我本科、研究生入学过程中给予的照顾与支持，没有你我可能与海军军医大学失之交臂，在此表示衷心的感谢与祝福，祝生活美满、前程似锦！

衷心感谢李晶、张瑜、贾国荣、李翠翠、刘芳、史张、景国东、邢鹏毅、董银梅等研究生同学的帮助，我们在长海医院影像医学科大家庭里共同奋斗、成长，相逢是首歌，祝你们前程似锦！

衷心感谢李生文、党永鑫、胡明、崔存玮、尹希、刘宇翔等同学在学业和生活上给予我的鼓励与支持。

衷心感谢我的家人多年的支持、理解与奉献。

谨以此文献给所有关心帮助过我的人！