

大鼠股骨骨小梁微观结构的显微 CT 评价

陈立, 李成辉

(四川大学分析测试中心, 四川成都 610064)

摘要: 显微 CT 可以在不破坏样本的情况下清楚获取样本内部详尽的三维结构信息。以活体小动物显微 CT 对大鼠股骨骨小梁进行分析评价的实验为例, 展示了用气体麻醉装置麻醉活体小动物的基本操作流程、显微 CT 的基本扫描参数的设置、数据分析中感兴趣区域 (ROI, Region of Interest) 的选取及数据报告中各项骨参数的含义等各步骤的操作方法, 为骨小梁微观结构的显微 CT 评价提供了参考依据。

关键词: 显微 CT; 骨小梁; 微观结构; 股骨

中图分类号: R445.3; R814.42

文献标识码: A

Micro-CT Evaluation of the Microstructure of Rat Femoral Trabeculae

Chen Li, Li Chenghui

(Analytical & testing center, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: Micro-CT can provide the detailed internal three-dimensional structural information non-destructively and clearly. Taking the analysis and evaluation experiment of rat femoral trabeculae using vivo Micro-CT of as an example, presents the operation methods of each step. Such as basic procedures of using gas anesthesia device to anesthetize the in vivo small animals, the setting of basic scanning parameters of Micro-CT, the selection of regions of interest (ROI) in data analysis, and the meanings of various bone parameters in data reports. This example provides a reference basis for the Micro-CT evaluation of trabeculae microstructure.

Keywords: Micro-CT, trabeculae, microstructure, femoral

1 引言

显微 CT (Micro-CT) 是一种非破坏性的三维 (3D) 成像技术, 可在不破坏样本情况下清楚地了解样本内部显微结构, 它与普通 CT 最大的差别在于其分辨率极高, 空间分辨率达 $1-10\mu\text{m}$ ^[1], 部分先进机型分辨率甚至高达 $0.1-0.25\mu\text{m}$, 并同时具有成像范围小 (直径 12cm 以内)、拓展性强 (二维和三维分析及内部显微结构观察、力学结果输出)、应用范围广等

特点。因此无论是数据分析还是图像处理，显微 CT 拥有许多不可替代的优势，可广泛用于医学、生物、考古、材料、电子、食品、地质学等诸多领域的研究^[2]。其中，活体显微 CT 配备如生命体征监测设备、呼吸门控系统和环境加热设备等多种设备和系统，不仅能够支持活体动物的扫描，也能实现牙齿、材料、岩石和金属等多种离体样本的扫描。

显微 CT 能够提供 2 类基本信息^[3]：几何信息和结构信息。前者包括样品的尺寸、体积和各点的空间坐标，后者包括样品的衰减值、密度和多孔性等材料学信息。因此，显微 CT 在科研及临床上已经得到了广泛的应用，特别在骨组织显微三维结构的观察上已经取得了许多成果。在骨组织工程的研究中，显微 CT 技术以体素为测试单元，在微米级高清晰的扫描重建骨小梁立体结构，除能精确计量标本整体骨量参数外，还能测试大量骨结构参数，为骨组织“量”与“质”两方面均提供了全新的测试方法与手段^[4]，被认为是骨组织的细微三维结构观察的一种可行而又有效的方法。

在显微 CT 实验中，由于大鼠样本大小适中，不仅可进行离体标本研究，也可以通过活体扫描进行连续跟踪研究。大鼠骨小梁结构典型且具有代表性，其显微 CT 分析评价过程比较适合作为骨小梁微观结构分析的演示实验。同时，骨小梁的评价涉及到显微 CT 参数设置、数据分析方法和骨参数解析等各个方面。此外，骨小梁的骨微结构参数包含骨密度、骨体积分数、各向异性程度、结构模型指数、骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁连接密度以及骨小梁间隙等，分别从不同的角度描述了骨微结构，代表了较为全面的骨微结构分析参数。除此之外，在进行其他样本分析时，这些参数也能为解释相应的指标发挥重要的作用。例如，骨体积分数 (BV/TV) 表示阈值二值化后骨骼体积占总体积的比例，用 $1-BV/TV$ 即可视为多孔材料的孔隙率。

本文通过大鼠股骨骨小梁进行分析评价为例，对活体显微 CT 的常规实验步骤进行展示和说明，为显微 CT 的教学和相关研究实验提供参考和依据。

2 实验材料与设备

2.1 实验动物：SD 大鼠

2.2 仪器设备：显微 CT (vivaCT80, 瑞士 SCANCO Medical AG); 小动物吸入式气体麻醉机 (R550, 深圳市瑞沃德生命科技有限公司)

2.3 实验材料：异氟烷

2.4 分析软件：SCANCO MEDICAL μ CT Evaluation Program

3 大鼠股骨骨小梁显微 CT 分析实验步骤

大鼠股骨骨小梁显微 CT 分析实验步骤如图 1 所示：

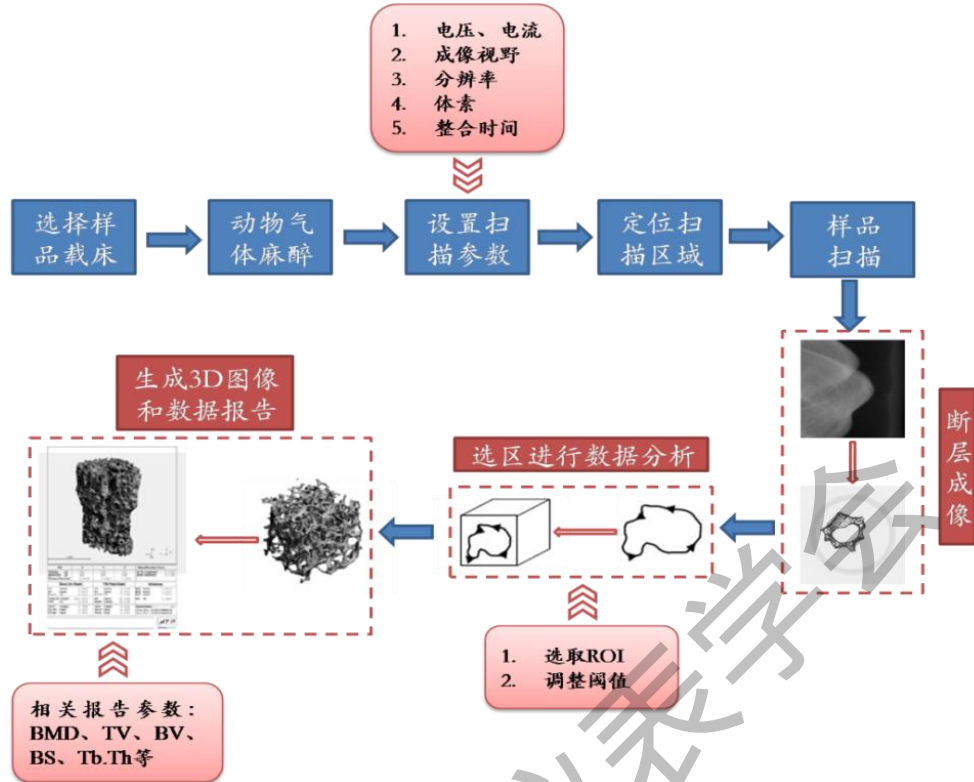


图 1 显微 CT 分析活体小动物步骤流程图

3.1 选择样品载床

活体样品扫描，首先需根据不同的扫描部位选择不同种类的样品载床。扫描大鼠股骨需要选择大鼠肢端载床将腿部进行固定，如图 2 所示。



图 2 大鼠肢端固定的样品载床

3.2 动物气体麻醉

- 1)在气体麻醉机中倒入异氟烷。
- 2)如图 3 所示，打开氧气气源（或空气泵），调节 O₂ 流量调节阀①，并查看流量计内浮

标位置，调节气体流量调节阀，使流量计内浮标保持在 0.5-0.7 之间（大鼠调节范围：500-700 mL/min，小鼠调节范围：300-500 mL/min）。

3)将气体流向管路切换至诱导盒，并将大鼠放入诱导盒中。将蒸发器刻度盘②刻度调节至 3-3.5 之间（大鼠调节范围：3%-3.5%，小鼠调节范围：2%-2.5%），对大鼠进行诱导麻醉。

4)诱导麻醉完成后，将大鼠转移至带有麻醉面罩的样品载床中固定。将气体流向管路切换至麻醉面罩；调节维持麻醉浓度在 2-2.5 之间（大鼠维持浓度：2%-2.5%，小鼠维持浓度：1%-1.5%）。检查动物的麻醉状态，确定动物处于完全麻醉状态，方可开始扫描。



图3 气体麻醉机调节示意图

3.3 样品扫描

1) 设置扫描参数

扫描开始前，需要对以下参数进行设置。

(1) X 射线管能量与强度（电压电流，Energy/Intensity）：低电压适用于扫描直径较小的组织或低密度的软组织；中等电压适用于中等大小的组织；高电压适用于大的或密度高的组织或材料（种植体）。进行骨扫描时，电流一般选择 100 μ A 以上，其他低密度样本也可以根据需要调整至低电流。扫描大鼠股骨时，一般电压选择 70kV-90kV。

(2) 成像视野（FOV）直径：需要与样品管匹配，为达到最高分辨率，在可扫描范围内应设置尽量小的 FOV，如图 4 所示，同等条件下，视野越大，图像清晰度越低。大鼠股骨 FOV 选择范围在 25mm-35mm。

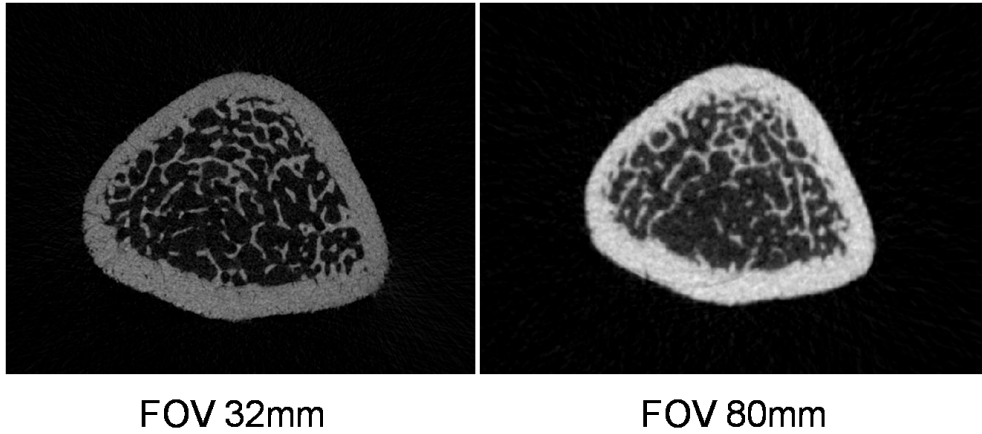


图4 大鼠股骨在不同直径成像视野下的断层图像

(3) 体素尺寸/扫描精度 (Voxel Size): 越小的体素尺寸具有越高的扫描精度、越好的扫描效果, 但精度设置过高会使显微 CT 数据过大, 增加数据分析时长, 因此, 需根据样本类型进行设置。大鼠股骨骨小梁的分析较适合的扫描精度范围在 $12\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ 。

(4) 投影次数/分辨率 (Resolution): 通过增加投影次数可提高扫描分辨率, 获得更多更完整的样品空间组成的细节信息。高分辨率扫描较低分辨率或中分辨率扫描存在更多的环境噪声干扰, 可以通过增加整合时间来达到降噪效果。扫描大鼠股骨一般选择中等分辨率 (MR: 500 projections / 180°) 即可。

(5) 整合时间 (Integration Time): 时间越长, 质量越好, 可以过滤更多的噪声。设置范围在 100ms~1000ms 不等, 部分型号仪器可设置到 3s 以上。种植体等高密度样品需要考虑进一步增加时间以提高成像质量。提高整合时间不影响数据重构时间, 但会增加扫描用时。大鼠股骨扫描一般设定范围在 200ms-300ms。

2) 定位扫描区域

参数选择完成后则出现对样品初扫图, 即 X 光图。在初扫图上将参考线拖动到大鼠股骨远端干垢端位置, 设置精细扫描的区域, 如图 5 所示。设置完成后开始进行所选区域的扫描。



图5 大鼠肢端初扫图及定位区域

3)扫描完成

扫描完成，数据收集成功后，按顺序进行取出动物——去掉麻醉面罩——帮助动物尽快苏醒（保持动物在纯氧或室内空气中呼吸 5-10 min）。接着按顺序依次点击关闭蒸发器，O₂流量计，氧气或空气气源。

3.4 数据分析

1) 感兴趣区域（Region of Interest, ROI）的选择

扫描完成后，打开数据分析界面，将出现扫描区域的各个断层图。评估骨小梁需要选择合适的感兴趣区域（ROI），根据骨质疏松程度，从股骨远端骨垢线下端 0.2 mm-0.5 mm 处开始，往股骨近端方向，在 1.0 mm-2.5 mm 厚度范围内设置分析的感兴趣区域（ROI）。在 ROI 范围内的每一层断层中，沿着皮质骨内边界圈出骨小梁，如图 6 所示。

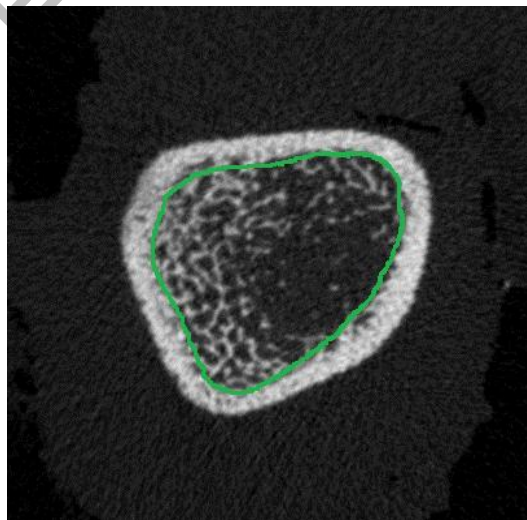


图6 在断层图中勾画 ROI

2) 设置分析阈值并计算

在实践中，阈值通常使用固定的 CT 值或 CT 值范围的百分比来设置。且适当的阈值选择需要对 2D 和 3D 二值化图像与原始灰度图像进行视觉检查和比较。阈值选定后，对感兴趣区域进行骨参数计算。

3) 计算结果

计算完成后，可得到 ROI 的三维重建图以及骨参数计算结果，如图 7 所示。可根据实验目的对各个骨参数进行统计分析。

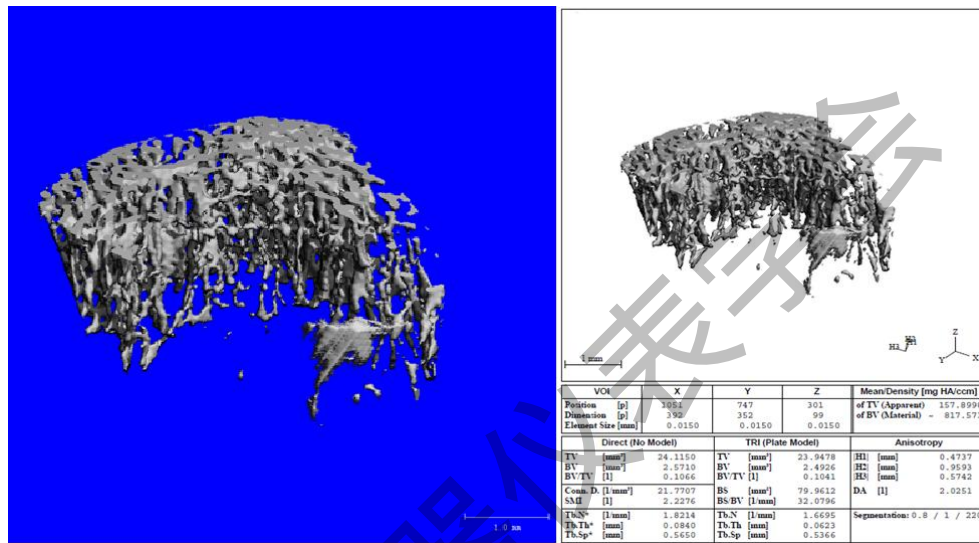


图 7 骨小梁三维重建图及骨参数计算结果

各骨小梁分析参数的定义及描述如表 1 所示：

表 1 骨小梁微结构三维结果的定义及描述[5]

缩写	变量	描述	标准单位
TV	总体积	整个感兴趣区域体积	mm ³
BV	骨体积	分割为骨的区域体积	mm ³
BS	骨表面积	分割为骨的区域面积	mm ²
BV/TV	骨体积分数	相对骨体积或骨体积分数	%
BS/TV	骨表面密度	骨表面积和组织体积的比值	mm ² /mm ³
BS/BV	具体骨表面	骨表面积和骨体积的比值	mm ² /mm ³
Conn.D	连接密度	通过 TV 标准化的小梁连接度的度量	1/mm ³
SMI	结构模型指数	定义骨小梁板状(plate-like)和杆状(rod-like)的程度，板状骨小梁和杆状骨小梁的 SMI	——

		数值分别为 0 和 3; 发生骨质疏松时, 骨小梁从板状向杆状转变, SMI 数值增加	
Tb.N	骨小梁数目	给定长度内骨组织与非骨组织的交点数量。 发生骨质疏松时, Tb.N 的值减小	1/mm
Tb.Th	骨小梁厚度	骨小梁的平局厚度, 单位是 μm ; 发生骨质疏松时, Tb.Th 值减小; 在多孔材料中, Tb.Th 即可理解为孔壁厚度	mm
Tb.Sp	骨小梁间距	骨小梁之间的髓腔平均宽度, 单位是 μm ; Tb.Sp 增加, 提示骨吸收增加, 可能发生骨质疏松; 在多孔材料中, Tb.Sp 即可理解为孔隙率	mm
Tb.Th.S	骨小梁厚度标准	使用直接 3D 方法评估骨小梁厚度的均匀性	mm
D	偏差	测量	
Tb.Sp.S	骨小梁间距标准	使用直接 3D 方法评估骨小梁间距的均匀性	mm
D	偏差	测量	
DA	各向异性程度	1 为各向同性, >1 定义为各向异性; $DA = \frac{\text{最长长度}}{\text{最短平均截距长度}}$	——

4 结论

用大鼠股骨骨小梁分析评价作为小动物活体显微 CT 的实验案例, 具有典型性和全面性, 有助于了解活体显微 CT 的测试流程, 包括麻醉步骤、扫描参数设置、数据分析和骨参数解析等各方面内容, 深入理解显微 CT 在科学研究和实际生活中的应用, 为相关领域提供研究依据和技术支持。

参考文献:

- [1]郭磊, 赵宏斌. 显微 CT 在骨科研究中的应用优势[J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(1B): 274-276.
- [2]谢俊祥,张琳. MicroCT 国内外技术、产业发展现状及应用趋势的研究[J].中国医疗器械信息, 2016, 22(2): 1-11.
- [3]刘广鹏. Micro CT 原理及应用[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2006, 2(4): 228-229.

- [4]Virk M S, Conduah A, Park S H, Liu, N. et al. Influence of short-term adenoviral vector and prolonged lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein-2 expression on the quality of bone repair in a rat femoral defect model[J]. Bone, 2008, 42(5), 921-931.
- [5]Bouxsein M L , Boyd S K , Christiansen B A ,et al.Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography[J]. J Bone Miner Res , 2010, 25(7): 1468-1486.

中国仪器仪表表学会