

## X 射线显微 CT 用于大鼠骨小梁结构分析的研究

郭慧媛<sup>1</sup>, 张录达<sup>2</sup>, 郑丽敏<sup>3</sup>, 张昊<sup>1</sup>, 任发政<sup>1\*</sup>

1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083
2. 中国农业大学理学院, 北京 100094
3. 中国农业大学信息与电气工程学院, 北京 100083

**摘要** 应用 X 射线显微 CT(X- $\mu$ CT)对正常及骨质疏松大鼠的骨小梁结构进行了分析, 并与骨组织形态计量法的测量值进行了比较, 探讨了 X 射线光谱技术在骨结构分析中的应用。实验对大鼠骨样品进行 X- $\mu$ CT 扫描, 扫描条件为 80 kVp, 80  $\mu$ A, 360°旋转, 帧平均 4 帧, 角度增益 0.4°, 分辨率 14  $\mu$ m。三维重建并分析了骨小梁结构, 结构参数包括骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)以及骨小梁间隔(Tb. Sp)。结果表明, 采用 X- $\mu$ CT 分析不同组大鼠的骨小梁结构参数值之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 测定值与传统骨组织形态计量法的测定值显著相关, 其中胫骨骨小梁 BV/TV, Tb. Th, Tb. N, Tb. Sp 的相关系数  $r$  分别为 0.984, 0.960, 0.995, 0.988, 腰椎骨小梁各结构参数的相关系数分别为 0.938, 0.968, 0.877, 0.951。因此, X- $\mu$ CT 可以较好地呈现并区分正常骨组织、骨质疏松骨组织以及经雌激素治疗后骨组织的微观结构, 可以实现对骨小梁结构参数的分析测定, 与骨组织形态计量法相比是一种更精确、立体、快速且无损测量骨微结构和评价骨质量的方法。

**关键词** X 射线显微 CT; 骨小梁结构; 无损检测

**中图分类号:** O434.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)08-2276-05

### 引言

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨微结构退化、骨强度降低和骨折风险增加为主要特征的代谢性骨病<sup>[1]</sup>。目前在骨质疏松的临床诊断上, 只对患者进行骨量的测定, 然而骨量测定并不能代表骨骼结构的全部特征, 因此还需要对患者的骨结构进行分析<sup>[2]</sup>。目前骨结构的分析方法只有传统的骨组织形态计量法(Bone histomorphometry), 但该方法的前提是必须将样品制成组织切片<sup>[3]</sup>, 所以只能应用于实验动物, 不能应用于对人体骨结构的分析。因此, 开展快速、无损分析骨结构方法的研究, 对于骨质疏松症的诊断、治疗及相关研究具有重要意义。

X 射线显微 CT 技术(X- $\mu$ CT)是目前 X 射线光谱的最高级应用分析技术, 是利用 X 射线源的最先进的无损检测仪器。X- $\mu$ CT 的基本原理是: X 射线在不同物质中的穿透能力不同<sup>[4]</sup>, 对于理想单色源, X 射线衰减遵守 Beer 定律, X 射线穿过物质的衰减系数与物质密度有关, 而物质原子序数与被吸收的射线能量有关<sup>[5]</sup>。X- $\mu$ CT 对内部结构不均匀的样品进行扫描时, 穿透物质的 X 射线经不同物质吸收后, 投射部

分的强度可用探测器接收, 其信号强弱取决于该物质的密度, 不同的信号强度可以反映出不同物质的特性, 也就是衰减系数不同, 一幅 X- $\mu$ CT 图像实际上是对层面 X 射线衰减系数空间分布的反映<sup>[6]</sup>。X- $\mu$ CT 可以从各个方向发射 X 射线通过一个物体, 并且利用计算机对这些衰减的 X 射线作分析测量, 从而得到这个物体内部的几何信息和结构信息<sup>[7]</sup>。几何信息包括样品的尺寸、体积和各点的空间坐标, 结构信息包括样品的衰减值、密度和多孔性等材料学信息。

X- $\mu$ CT 技术于 1989 年首次被采用对骨结构进行分析研究, 近几年得以发展和成熟<sup>[8-10]</sup>。Feldkamp 等首先将其应用于骨结构的研究<sup>[11]</sup>, 采用了与普通临床 CT 不同的微焦点 X 射线球管, 以及锥形 X 射线束, 将分辨水平提高到几个微米, 可以实现生物体股骨和椎骨骨小梁结构的体外成像, 具有良好的“显微”作用, 满足了科学研究对高分辨率的要求。X- $\mu$ CT 与传统的骨组织形态计量法不同, 不仅无须对样品进行破坏, 而且能够准确测量样品任意形态的结构参数, 具有实现骨结构临床测量的可能性。

本研究采用卵巢切除大鼠以模拟绝经后的骨质疏松症, 应用 X- $\mu$ CT 对正常大鼠、骨质疏松大鼠、雌激素治疗大鼠的

收稿日期: 2008-05-06, 修订日期: 2008-08-12

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD04A06)资助

作者简介: 郭慧媛, 女, 1982 年生, 中国农业大学食品科学与营养工程学院讲师 e-mail: czar000@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: renfazheng@263.net

骨小梁结构进行了分析测量, 并与传统骨组织形态计量法进行比较, 探讨了 X 射线光谱技术在骨结构分析测量中实际的应用效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与处理

3 月龄雌性 SD 大鼠 30 只(北京大学医学部实验动物中心提供), 平均体重( $293 \pm 10$ )g, 随机分为 3 组, 假手术组(正常组), 双侧卵巢切除组(骨质疏松组); 双侧卵巢切除组+雌激素组(雌激素治疗组), 每组 10 只。后两组大鼠进行双侧卵巢切除手术以模拟绝经后的骨质疏松症, 雌激素治疗组自手术后隔天腹腔注射雌激素( $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )进行治疗。实验采取标准饲料喂养(钙含量为 1.40%, 磷含量为 0.9%), 自由饮水; 饲养环境温度为  $22 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$ , 12 h 昼夜照明节律。3 个月后戊巴比妥钠麻醉, 处死大鼠, 剥离胫骨与腰椎, 以生理盐水纱布包裹,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冻存储备。

### 1.2 X- $\mu$ CT 分析

将大鼠胫骨或腰椎除尽肌肉和附着组织, 放入 X- $\mu$ CT 仪(Explore Locus SP, GE Healthcare Technologies, USA), 对胫骨近干骺端或腰椎骨进行 X-射线扫描。扫描条件为: 电

压 80 kVp, 电流  $80 \mu\text{A}$ ,  $360^\circ$  旋转扫描, 扫描时间为 150 min, 间隔时间为 70 ms, 帧平均 4 帧, 角度增益  $0.4^\circ$ , 分辨率  $14 \mu\text{m}$ 。对同一样品扫描获得 500 张不同截面的  $2048 \times 2048$  像素的图片, 对于胫骨选取距生长板远端 0.8 mm, 层厚 0.5 mm 的骨组织为兴趣区域(region of interest, ROI)进行三维重建; 对于腰椎骨, 选取腰椎中心位置进行三维重建, 分割值均为 1 600, 完成图像二值化, 选定 ROI 内松质骨进行三维可视化呈现。定量分析使用 MicroView 软件(GE Healthcare), 分析参数包括骨体积分数, 骨小梁厚度, 骨小梁间隔, 骨小梁数量, 以及结构模型指数。

### 1.3 骨组织形态计量学分析

将 X- $\mu$ CT 扫描后的大鼠胫骨与腰椎, 固定于 10% 福尔马林液中, 按硬组织切片法用塑料包埋不脱钙骨<sup>[12]</sup>, Leica 硬组织切片机切成  $30 \mu\text{m}$ , 丽春红三色染色, 在 50 倍视野下进行骨组织形态参数测量<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 X- $\mu$ CT 对大鼠骨小梁结构的分析

X- $\mu$ CT 对各组大鼠胫骨 ROI 区的三维重建图见图 1, 测定大鼠胫骨与腰椎骨小梁结构参数见表 1。

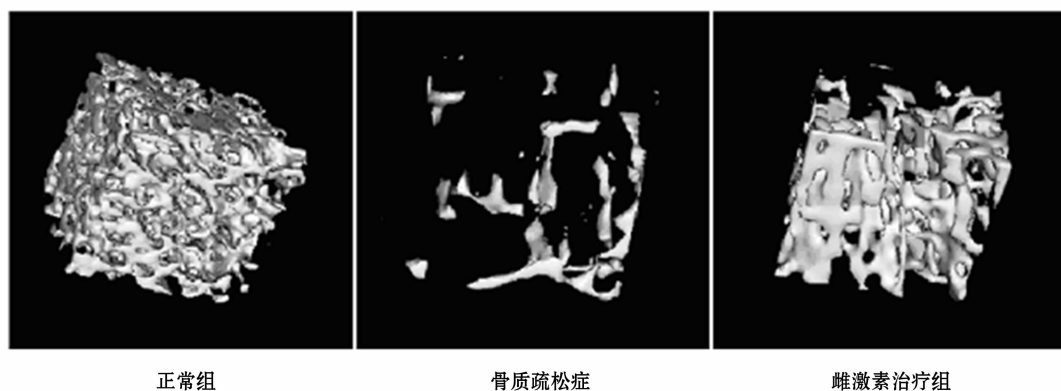


Fig. 1 Images of tibia ROI of tibia obtained by X- $\mu$ CT

Table 1 Microstructural parameters of tibia and lumbar determined using X- $\mu$ CT

	正常组	骨质疏松组	雌激素治疗组
胫骨			
BV/TV/%	$48.01 \pm 5.61^a$	$4.32 \pm 1.88^c$	$28.29 \pm 3.05^b$
Tb. Th/mm	$0.10 \pm 0.019^a$	$0.04 \pm 0.005^c$	$0.05 \pm 0.005^b$
Tb. N/mm <sup>-1</sup>	$5.81 \pm 0.43^a$	$1.00 \pm 0.12^c$	$3.41 \pm 0.44^b$
Tb. Sp/mm	$0.07 \pm 0.01^c$	$0.96 \pm 0.12^a$	$0.24 \pm 0.04^b$
SMI	$0.56 \pm 0.07^c$	$2.78 \pm 0.24^a$	$1.94 \pm 0.15^b$
腰椎			
BV/TV/%	$47.74 \pm 4.98^a$	$23.76 \pm 3.09^c$	$34.32 \pm 3.07^b$
Tb. Th./mm	$0.10 \pm 0.015^a$	$0.07 \pm 0.009^c$	$0.08 \pm 0.010^b$
Tb. N./mm <sup>-1</sup>	$4.94 \pm 0.39^a$	$3.33 \pm 0.40^c$	$4.56 \pm 0.48^b$
Tb. Sp./mm	$0.11 \pm 0.01^c$	$0.23 \pm 0.03^a$	$0.14 \pm 0.02^b$
SMI	$0.05 \pm 0.003^c$	$0.86 \pm 0.07^a$	$0.23 \pm 0.02^b$

所有数据均以平均数±标准差表示, 同一行中标注不同字母的为存在显著性差异( $p < 0.05$ )

由表 1 可知, 骨质疏松组的骨体积分数(BV/TV)显著低于正常组, 表明大鼠胫骨及腰椎的松质骨在去卵巢后出现了极显著的骨小梁体积分数下降, 骨小梁大量丢失; 骨质疏松组的骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数量(Tb. N)显著低于正常组, 而骨小梁间隔(Tb. Sp)显著高于正常组, 说明骨小梁数量和连接密度降低, 间隙增宽, 出现了严重的结构退变; 骨质疏松组的结构模型指数(SMI)值显著高于正常组, 说明卵巢切除大鼠的骨小梁结构形态由板状结构退变成了杆状结构, 呈现出了典型的骨质疏松症状。雌激素治疗组的各个值介于骨质疏松组与正常组之间, 且各个值与骨质疏松组相比均有显著差异, 说明雌激素显著地改善了卵巢切除所引发的骨小梁结构的退变。

### 2.2 骨组织形态计量法对大鼠骨小梁结构的分析

各组大鼠胫骨 ROI 区骨组织切片图见图 2, 骨组织形态

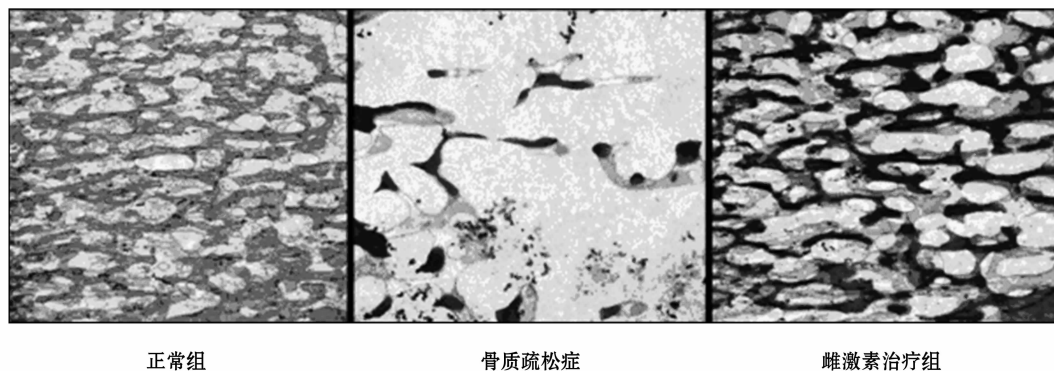


Fig. 2 Images of tibia ROI obtained by histomorphometry

计量法所测定的大鼠胫骨与腰椎的骨小梁结构参数见表 2, 各测量值与文献报道相一致<sup>[14, 15]</sup>。

由表 2 可知, 各组大鼠骨小梁结构参数的测定值与 X- $\mu$ CT 的测定结果具有相同的趋势: 三组大鼠的 BV/TV, Tb. Th, Tb. N 测定值中, 骨质疏松组的值最低, 正常组的值最高; Tb. Sp 的测定结果中, 骨质疏松组的值最高, 正常组最低, 雌激素治疗组的各个值介于正常组与骨质疏松组之间, 各测定值在三组之间均有显著性差异。

Table 2 Microstructural parameters of tibia and lumbar determined using histomorphometry

	正常组	骨质疏松组	雌激素治疗组
胫骨			
BV/TV/%	50.94±1.92 <sup>a</sup>	5.81±1.71 <sup>c</sup>	27.81±6.41 <sup>b</sup>
Tb. Th/mm	0.09±0.012 <sup>a</sup>	0.02±0.004 <sup>c</sup>	0.04±0.009 <sup>b</sup>
Tb. N/mm <sup>-1</sup>	4.89±0.75 <sup>a</sup>	0.69±0.21 <sup>c</sup>	3.13±0.24 <sup>b</sup>
Tb. Sp/mm	0.09±0.02 <sup>c</sup>	0.85±0.17 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>b</sup>
腰椎			
BV/TV/%	47.42±4.00 <sup>a</sup>	27.64±5.07 <sup>c</sup>	32.31±6.36 <sup>b</sup>
Tb. Th./mm	0.09±0.02 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>c</sup>	0.07±0.008 <sup>b</sup>
Tb. N./mm <sup>-1</sup>	4.37±0.85 <sup>a</sup>	2.78±0.45 <sup>b</sup>	4.43±0.42 <sup>a</sup>
Tb. Sp./mm	0.13±0.01 <sup>c</sup>	0.23±0.04 <sup>a</sup>	0.17±0.03 <sup>b</sup>

所有数据均以平均数±标准差表示, 同一行中标注不同字母的为存在显

著性差异( $p < 0.05$ )

### 2.3 X- $\mu$ CT 与骨组织形态计量法的比较研究

将 X- $\mu$ CT 三维重建所得到的胫骨 ROI 图(图 1)与骨组织形态计量学得到的骨切片图(图 2)进行比对, 可发现 X- $\mu$ CT 所获得的骨组织三维图像与骨切片二维图像具有高度一致性, 可以定性地表现出各组大鼠骨小梁结构的差异。

X- $\mu$ CT 与骨组织形态计量学两种分析方法均可以提供骨小梁 BV/TV, Tb. Th, Tb. N 及 Tb. Sp 结构指标, 而 SMI 值是建立在对骨小梁三维结构分析基础上的参数, 可以从 X- $\mu$ CT 分析中获得, 但却是二维的传统方法所无法提供的。将两种方法所测定的结果进行比较, 所得的相关性结果见图 3 与图 4, 其中胫骨骨小梁各结构参数 BV/TV, Tb. Th, Tb. N, Tb. Sp 的相关系数( $r$ )分别为 0.984, 0.960, 0.995, 0.988(图 3), 腰椎骨小梁各结构参数 BV/TV, Tb. Th, Tb. N, Tb. Sp 的相关系数分别为 0.938, 0.968, 0.877, 0.951(图 4), X- $\mu$ CT 对于胫骨骨小梁测定与传统方法的相关性要好于对腰椎骨小梁的测定。由此可知, 在胫骨与腰椎骨小梁结构测定中, X- $\mu$ CT 所测定的结构参数与传统方法的测定结果显著相关, 表明 X- $\mu$ CT 可以实现对正常骨组织、骨质疏松骨组织以及经药物治疗后骨组织结构参数的分析测量。

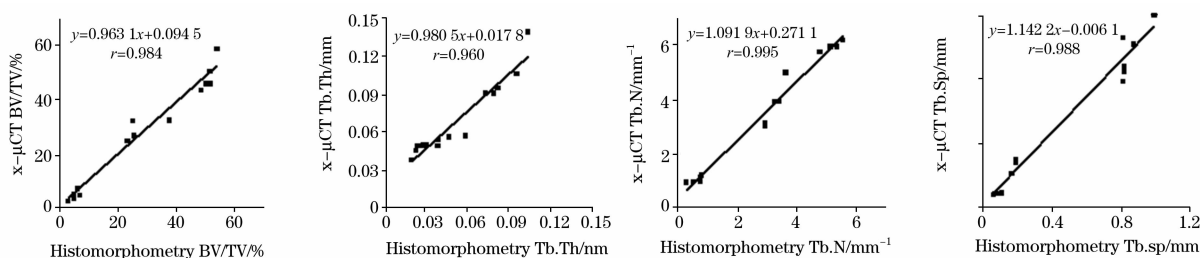


Fig. 3 Correlations of tibia structural indices determined by histomorphometry and X- $\mu$ CT analysis

通过以上研究可知, X- $\mu$ CT 可以满足科研及临床对于正常与病变骨组织结构分析测量的要求, 较传统的骨组织形态计量法具有很多优点。首先, 传统骨组织形态计量法只能呈现某一个切面的二维图像, 而 X- $\mu$ CT 直接呈现三维结构图, 成像更为直观, 结果一目了然。其次, X- $\mu$ CT 可以在三维重

建的骨小梁上直接测量各种形态的结构厚度, 摆脱了传统骨组织形态计量学以平行板模型为基础的体视学算法, 测量结果更为敏感、精确; X- $\mu$ CT 还可以分析得到结构模型指数、各向异性等骨组织形态计量法所无法分析的骨小梁三维结构参数。再次, 骨组织形态计量法要对样品进行甲醛固定、塑料

包埋、切片、染色、计量等多个步骤,耗时费力,在本研究中此部分用时 3 个月才得以完成,而 X- $\mu$ CT 对骨的分析过程是非常快速的,对于一个样品扫描及分析过程在 5 h 之内即可完成,大大缩短了测量时间。此外,骨组织形态计量法必须首先将骨组织制成切片,而 X- $\mu$ CT 对骨的分析是基于 X

射线扫描的无损检测,对样品没有破坏性,分析后的骨组织还可以用于其他实验分析,而 X- $\mu$ CT 无损测量的特性也在骨质疏松症临床诊断中分析人体的骨小梁结构提供了可能。

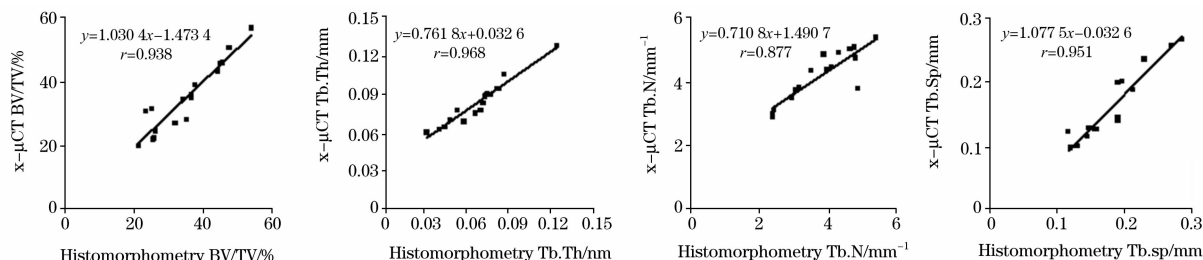


Fig. 4 Correlations of lumbar structural indices determined by histomorphometry and X- $\mu$ CT analysis

### 3 结 论

本研究通过应用 X 射线显微 CT 对正常及骨质疏松大鼠的骨小梁结构进行分析,并与传统方法的测量值进行比较,表明 X- $\mu$ CT 能够精确地反映出正常骨组织、骨质疏松骨组织以及经药物治疗后骨组织的微观结构,是一种能全面、立

体、精确、快速、无损测量骨微结构和评价骨质量的新兴技术,在骨质疏松症的诊断、治疗与相关研究方面具有很大的应用潜力。同时,由于 X- $\mu$ CT 的分辨率如此之高,其能够扫描的样品体积很小,只有几个厘米,目前 X- $\mu$ CT 只应用在科研方面,还无法在临床上使用,因此采用新技术提高 X- $\mu$ CT 的扫描体积,尽快在临床得以应用,将是未来 X- $\mu$ CT 的发展趋势。

### 参 考 文 献

- [1] Anonymous. American Journal of Medicine, 1991, 90: 107.
- [2] Frost H M. Journal of Bone and Mineral Research, 1999, 14: 1816.
- [3] LIU Zhong-hou(刘忠厚). Osteoporosis(骨质疏松学). Beijing: Science Press(北京:科学出版社), 1998. 443.
- [4] ZHANG Yang, PENG Xiao-feng(张 扬, 彭晓峰). Journal of Engineering Thermophysics(工程热物理学报), 2005, 26(5): 850.
- [5] PENG Guang-han, YANG Xue-heng, CAI Xin-hua, et al(彭光含, 杨学恒, 蔡新华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(4): 823.
- [6] YAN Wei(闫 伟). China Medical Equipment(中国医学装备), 2005, 2(3): 31.
- [7] LIU Guang-peng(刘广鹏). Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery(组织工程与重建外科杂志), 2006, 2(4): 228.
- [8] Waarsing J H, Day J S, van der Linden J C, et al. Bone, 2004, 34: 163.
- [9] Gasser J A, Ingold P, Grosios K, et al. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2005, 23(Suppl.): 90.
- [10] Devareddy L, Khalil D A, Smith B J, et al. Bone, 2006, 38: 686.
- [11] Feldkamp L A, Goldstein S A, Parfitt A M, et al. Journal of Bone and Mineral Research, 1989, 4: 3.
- [12] LIAO Er-yuan, ZHAO Chu-sheng(廖二元, 赵楚生). Endocrinology(内分泌学). Beijing: People's Medical Publishing House(北京:人民卫生出版社), 2001. 664.
- [13] YANG Gang(杨 钢). Endocrinology and Pathology(内分泌生理与病理生理学). Tianjin: Tianjin Science and Technology Press(天津:天津科学技术出版社), 1996. 248.
- [14] Parfitt A M, Mathews C H E, Villanueva A R, et al. Calcified Tissue International, 1983, 72: 1396.
- [15] Schenk R K, Olah A J. Handbuch der Inneren Medizin VI/1A, Knochen Gelenke Muskeln. Berlin: Springer, 1980. 437.

# A Quantitative Trabecular Structural Analysis Using X-Ray Micro CT in Ovariectomized Rats

GUO Hui-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Lu-da<sup>2</sup>, ZHENG Li-min<sup>3</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, REN Fa-zheng<sup>1\*</sup>

1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China

3. College of Information & Electrical Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

**Abstract** The objective of the present paper was to evaluate the X-ray three-dimensional micro-computed tomography (X- $\mu$ CT) method applied in assessing the trabecular structure in ovariectomized rats. Three-month-old female Sprague-Dawley rats ( $n=30$ ) were ovariectomized (OVX) or sham-operated (SHAM). OVX rats were treated with vehicle, or  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ , positive control) for 3 months. For the conventional histomorphometric analysis, undecalcified sections were prepared and stained with the Li Chunhong technique to obtain high-contrast two-dimensional images. Prior to the histologic sectioning the samples were measured by X- $\mu$ CT, providing a  $14\ \mu\text{m}$  resolution. The morphometric parameters computed by both methods in two or three dimensions, respectively, were bone volume over total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N) and trabecular separation (Tb. Sp). Results showed that there were significant differences in the trabecular structure among three groups. In the OVX control group, the platelike structure was mostly resolved into a rodlike structure, with lots of the connecting rods missing. Whereas in OVX+ $E_2$  groups, this loss of trabecular bone mass and connectivity was prevented, with the results being nearly the same as those in the SHAM group. It was shown that highly significant correlations between conventional histology and X- $\mu$ CT for BV/TV, Tb. Th, Tb. N and Tb. Sp were 0.984, 0.960, 0.995, and 0.988 in tibia, and 0.938, 0.968, 0.877 and 0.951 in lumbar. The high correlations between conventional histomorphometric and micro-tomographic analysis are very promising for the use of micro-tomographic imaging. X- $\mu$ CT is a nondestructive, fast, and very precise procedure that allows the measurement of cancellous tissue in unprocessed biopsies or small bones, as well as a fully automatic determination of three-dimensional morphometric indices.

**Keywords** X- $\mu$ CT; Trabecular structure; Nondestructive analysis

(Received May 6, 2008; accepted Aug. 12, 2008)

\* Corresponding author