

离体小鼠股骨骨小梁与骨皮质 CT 样品制备探索

王战京, 武文琦, 赵媛媛, 雷建锋

(首都医科大学中心实验室, 北京 100069)

摘要:目的 探索不同的样品制备方法对离体小鼠股骨骨小梁密度(BMD)与骨皮质密度(TMD)CT定量测量的影响。方法 购入6~8周雌性BALA/C小鼠20只,取出40根小鼠股骨浸泡于戊二醛溶液1周,将小鼠股骨随机分为无水合制备组和水合制备组,每组20根。无水合制备组于扫描当天直接从戊二醛溶液中取出离体小鼠股骨,扫描过程中采用直接暴露在空气中。水合制备组于扫描前1天将固定于戊二醛溶液中的离体小鼠股骨放入EP管中,加入纯净水进行12h水合,扫描过程中内部采用湿润纸巾包裹,外边再包保鲜膜,模拟小鼠股骨在活体的环境下进行显微CT(Mirco-CT)扫描。两组采用完全一致的CT扫描参数,进行重建与分析,对比两组BMD和TMD检测结果。结果 水合制备组BMD检测结果高于无水合制备组,差异有统计学意义($P<0.05$);两组TMD检测结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 无水合制备法直接影响了BMD的测量结果准确性,对TMD的测量结果产生的影响较小,使用水合制备法更能保证实验结果的准确性。

关键词: Mirco-CT; 小鼠股骨; 骨小梁密度; 骨皮质密度; 水合制备

中图分类号: R68

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2022.12.028

文章编号: 1006-1959(2022)12-0118-04

Exploration on the Preparation of CT Samples of Isolated Mouse Femoral Trabecular Bone and Cortical Bone

WANG Zhan-jing, WU Wen-qi, ZHAO Yuan-yuan, LEI Jian-feng

(Core Facility Center, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To explore the effect of different sample preparation methods on CT quantitative measurement of trabecula bone mineral density (BMD) and cortical bone tissue mineral DENSITY (TMD) in isolated femur of mice. **Methods** Twenty female BALA/C mice from 6 to 8 weeks were taken out and soaked in glutaraldehyde solution for 1 week. The femurs of mice were randomly divided into two groups: non-hydration preparation group and hydration preparation group, with 20 femurs in each group. In the non-hydrated preparation group, isolated mouse femurs were directly removed from glutaraldehyde solution on the day of scanning, and exposed to air during scanning. In the hydration preparation group, the isolated mouse femur fixed in glutaraldehyde solution was placed into EP tube one day before the scanning, and purified water was added for hydration for 12 h. During the scanning process, the inside of the femur was wrapped with moist paper towels, and the outside was wrapped with plastic film. Micro-ct (mirco-CT) scanning was performed to simulate the femur of mice in vivo. The two groups were reconstructed and analyzed using CT scan parameters that were completely consistent, and BMD and TMD detection results were compared between the two groups. **Results** BMD test results of hydration group were higher than those of non-hydration group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in TMD test results between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** Anhydrous preparation method directly affects the accuracy of BMD measurement results, and has little effect on TMD measurement results. Hydration preparation method can ensure the accuracy of experimental results.

Key words: Mirco-CT; Mouse femur; Bone trabecular density; Bone cortical density; Hydration preparation

小动物活体分子影像学是近些年来新兴的交叉学科,其使用影像手段显示组织水平、细胞和亚细胞水平的特定分子,进而了解活体动物体内的相关生理变化^[1-3]。显微CT(Mirco-CT)是小动物活体分子影像影像学重要的实验方法,它适用于研究对象为小型啮齿类动物(小鼠,大鼠等),可无创、定量、多次重复的提供小动物骨组织与肺组织结构学变化^[4,5]。同时它还是对离体小动物骨组织进行骨密度、骨小梁测量的重要手段^[6-8]。小动物CT对骨密度进行测算的原理是通过测量X射线衰减系数(AC)与该材料的质量密度的相关性进行配准计算,从而得出实验样品的密度。本次实验主要探索不同的样品制备方法对离体小鼠股骨骨小梁密度(BMD)和骨皮质密度(TMD)CT定量测量的影响,为小动物离体样品制

备和CT扫描提供选择依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8周雌性BALA/C小鼠20只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。取出40根小鼠股骨浸泡于戊二醛溶液1周,股骨重量0.13~0.8g,长度5.3~4.8cm。实验中对动物的处置符合动物伦理学研究准则。

1.2 仪器设备和软件 仪器设备为BRUKER公司in-vivo X-ray Microtomograph SkyScan-1276,由首都医科大学中心实验室提供,扫描系统为SKSCAN-1276 SYSTEM OVERVIEW,重建系统为SkyScan NRecon,2D图像观察与校正软件为SkyScan DataViewer,3D图像展示软件为SkyScan Volume Rendering,图像分析软件为SkyScan 2D/3D Image Analysis。

1.3 分组及方法 采用随机数字表法将40根小鼠股骨分为无水合制备组和水合制备组,每组20根。按照不同的方法制备实验样品,然后在相同条件下对

作者简介:王战京(1981.11-),男,河北石家庄人,硕士,主管技师,主要从事小动物医学影像成像技术及图像后处理的研究

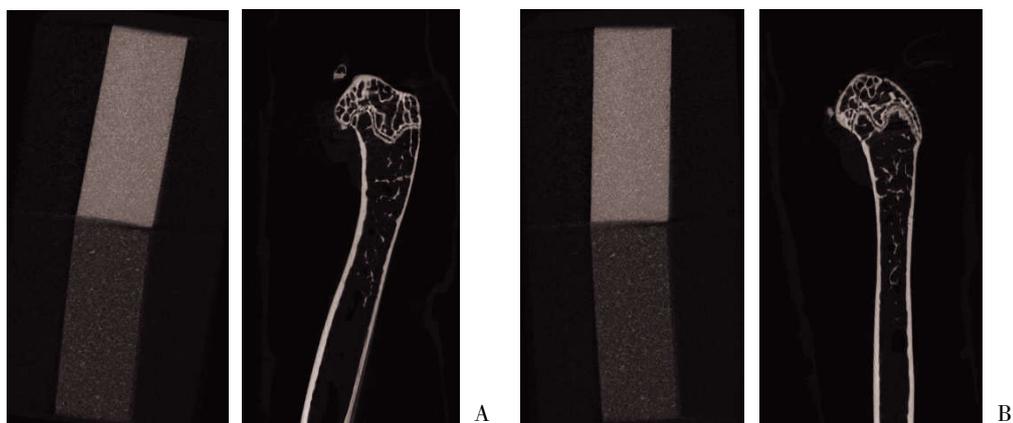
通讯作者:雷建锋(1975.9-),男,山西太原人,硕士,副主任技师,主要从事小动物医学影像的研究

样品采用相同扫描参数进行扫描。无水合制备组于扫描当天直接从戊二醛溶液中取出离体小鼠股骨,扫描过程中采用直接暴露在空气中。水合制备组于扫描前 1 d 将固定于戊二醛溶液中的离体小鼠股骨放入 EP 管中,加入纯净水进行 12 h 水合,扫描过程中内部采用湿润纸巾包裹,外边再包保鲜膜,模拟小鼠股骨在活体的环境下进行 Micro-CT 扫描。

1.4 图像采集与骨密度计算 将标本水平固定于样品床上,使标本与样品床旋转中心保持一致。选择的扫描参数:矩阵 2048×2048×116,电压 57 kV,电流 72 μ A,图像分辨率 5 μ m/px,曝光时间 1300 ms,旋转步长 0.4 度,滤光片选择厚度为 0.25 mm 的 Al,旋转度数为 206°,扫描时间 22 min。扫描完成后,再用布鲁克公司提供的密度标准样品羟基磷灰石 (CaHA)密封分别为 0.25 g/cm³ 和 0.75 g/cm³ 进行相同条件下 CT 扫描^[9-11]。扫描结束后分别对标准样品与股骨头使用 SkyScan NRecon 进行相同参数的样品重建,参数设置为平滑度为 3,射线硬度设为 60%。重建完成后使用 SkyScan DataViewer 对标准样与小鼠股骨进行物理位置的校正,校正结果为样品在图像中心,见图 1;样品摆放整齐以便于下一步

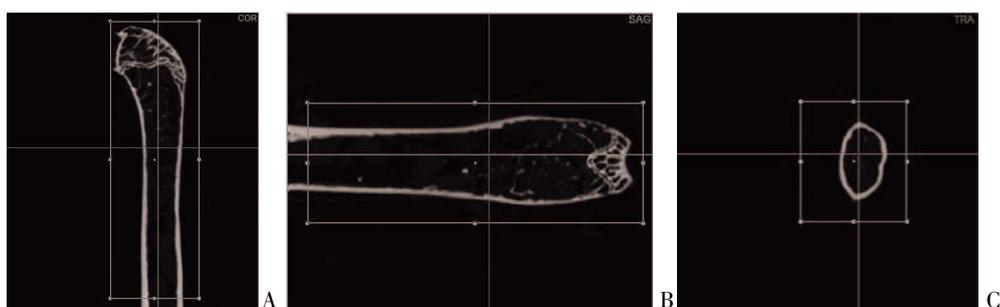
对其进行分析,图像调整完毕后划出感兴趣区域 (VOI)在对图像进一步进行重建,使在不损失图像质量的前提下,去除空白的像素区域,让文件变小以便于后期处理,见图 2。图像预处理结束后,使用 SkyScan 2D/3D Image Analysis 对分析部位制作 3D 重构图。BMD:起始位置从纵切面距离生长板远端 1.5 mm 处开始向下取 3.00 mm;TMD:起始位置从纵切面距离生长板远端 6 mm 处腔内没有骨小梁分布处开始向下取 3.00 mm。选取小梁内部区域与骨皮质外部区域同时进行重组获得 3D 图像,图像信息设为最低阈值^[12-14]。使用 SkyScan Volume Rendering 软件对重建的 3D 图像进行展示。对骨组织重组的图像使用 SkyScan 2D/3D Image Analysis 进行定量分析,可以得到 BMD 值和 TMD 值。首先测量标准样品的射线吸收率,建立骨密度计算公式,再将需要测量的骨组织的射线吸收率代入公式计算出相应的骨密度。

1.5 统计学方法 采用统计学软件 SPSS 17.0 进行数据分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,使用配对 *t* 检验,置信区间设为 95%。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。



注:A:校正前;B:校正后

图 1 SkyScan DataViewer 对标准样和小鼠股骨进行物理位置校正



注:A:矢状面;B:冠状面;C:横断面

图 2 重建感兴趣区域

2 结果

2.1 骨小梁与骨皮质 3D 重建结果 使用 SkyScan Volume Rendering 软件展示重建的 3D 图像,见图 3。

2.2 两组 BMD 检测结果比较 水合制备组 BMD 检

测结果高于无水合制备组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1~表 3。

2.3 两组 TMD 检测结果比较 两组 TMD 检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4~表 6。

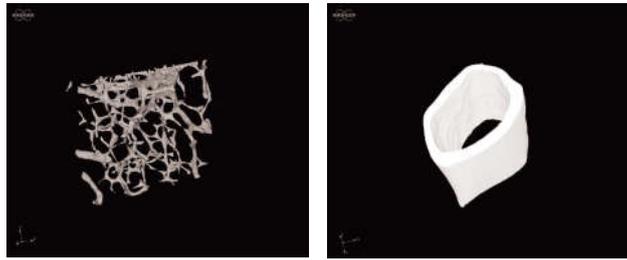


图 3 3D 骨小梁结构和 3D 骨皮质内部结构

表 1 两组 BMD 检测结果

编号	无水合制备组	水合制备组	编号	无水合制备组	水合制备组
1	0.0394	0.0670	11	0.0256	0.0657
2	0.0788	0.1222	12	0.0362	0.0943
3	0.0427	0.0620	13	0.0341	0.0758
4	0.0330	0.0658	14	0.0432	0.0655
5	0.0262	0.0359	15	0.0238	0.0823
6	0.0562	0.1055	16	0.0365	0.0752
7	0.0227	0.0368	17	0.0563	0.1023
8	0.0588	0.0730	18	0.0475	0.0793
9	0.0352	0.0843	19	0.0365	0.0865
10	0.0498	0.0924	20	0.0485	0.0725

表 2 两组 BMD 检测结果描述统计量

组别	均值	标准差	均值的标准误
无水合制备组	0.0415	0.013 923 79	0.003 113 45
水合制备组	0.0772	0.020 864 09	0.004 665 35

表 3 两组 BMD 成对差分检测结果 t 检验结果

组别	差分的 95%置信区间					t	Df	Sig.(双侧)
	均值	标准差	均值的标准误	下限	上限			
无水合制备组 水合制备组	-0.0356	0.0148	0.0033	-0.0287	-0.0425	-10.77	19	0.0001

表 4 两组 TMD 检测结果

编号	无水合制备组	水合制备组	编号	无水合制备组	水合制备组
1	0.9985	0.9985	11	0.9935	0.9667
2	0.9888	1.0268	12	0.9735	0.9899
3	0.9940	1.0079	13	0.9876	0.9975
4	0.9820	0.9698	14	1.0031	0.9986
5	0.9962	0.9733	15	0.9674	0.9976
6	0.9765	1.0613	16	0.9865	0.9963
7	1.0086	0.9798	17	0.9726	0.9678
8	1.0085	0.9842	18	0.9865	0.9974
9	0.9836	0.9974	19	0.9856	1.0036
10	0.9658	0.9733	20	0.9986	1.0231

表 5 两组 TMD 检测结果描述统计量

组别	均值	标准差	均值的标准误
无水合制备组	0.9879	0.012 553	0.002 806 951
水合制备组	0.9951	0.022 992	0.005 126 153

表 6 两组 TMD 成对差分检测结果 t 检验结果

组别	差分的 95%置信区间					T	Df	Sig.(双侧)
	均值	标准差	均值的标准误	下限	上限			
无水合制备组	-0.00715	0.2594	0.0058	-0.0192	0.0049	-1.323	19	0.233
水合制备组								

3 讨论

小鼠是最常用的实验动物之一,在骨科医学、口腔医学中常常用于各类疾损伤修复的研究。CT 对骨组织成像有独特优势,在临床疾病诊断中有重要意义,是目前最为广泛的检测项目之一^[15-18]。Micro-CT 作为骨组织形态计量学的重要检测手段具有不可替代性,尤其是对 BMD 和 TMD 的测量具有突出优势。精度可以达到微米级别,能够清晰的分辨骨小梁结构,精准测算出骨小梁与骨皮质的密度等相关数据,再配合三维重构软件、几何测量软件,可以对各类硬组织进行精准观测。动物离体骨具有便于保存,有助于各类实验顺利展开,在医学科研领域研究使用十分广泛^[18]。而离体骨的检测与活体骨组织检测由于存在环境不同,实验结果存在一定的差异。如何让保存的离体骨的测量结果更加接近与真实的活体检验结果,一直是实验员探讨的课题之一。同时在不影响扫描结果的前提下,如何短时间测量打样品量也是实验室科学探索方向之一。

本次研究显示,水合制备组 BMD 检测结果高于无水合制备组,差异有统计学意义($P < 0.05$);说明两种制备方法样品对 CT 扫描结果存在差异。由于显微 CT 扫描测试是小动物骨小梁 BMP 分析的金标准,其中骨小梁密度作为重要参数之一,测量结果直接影响的实验结果的准确性。通过结果可以看出水合后 CT 扫描结果密度增加,更加接近与动物体内真实数值;同时观察骨小梁结构状态无明显变化。本次研究中,两组 TMD 检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明两种制备方法样品对 CT 扫描结果存在差异不明显。TMD 作为 CT 扫描重要参数之一,测量结果直接影响实验结果的准确性。无水合与水合后 CT 扫描结果密度无明显差异,说明骨皮质密度高,水分子很难渗透到骨皮质之中,无水合不影响 CT 扫描结果。

Micro-CT 是骨密度检测的金标准,它的结果可衡量前期实验动物模型建立是否成功,同时对下一步动物实验的修复治疗提供重要参考依据。因此,建议使用水合制备法以使实验结果更加准确。需要说明的是,本次研究实验的数量相对较少,并且采用单一的小鼠股骨,没有对大鼠以及裸鼠进行比较,研究使用的仪器也比较单一。今后需要更多的相关研究确保其有效性、实用性,从而为临床前实验动物研究提供有力保障。

综上所述,无水合制备法直接影响了 BMD 的测量结果准确性,对 TMD 的测量结果产生的影响较小,使用水合制备法更能保证实验结果的准确性。

参考文献:

- [1] 师长宏. 影像技术在动物实验中的应用[J]. 实验动物科学, 2016,33(2):66-69.
- [2] 汤颖,顾永春,朱琦. C57BL/6 小鼠牙齿解剖形态的显微 CT 观测[J]. 实用口腔医学杂志,2018,34(1):47-52.
- [3] 齐进,徐海峰,王晋中,等. 骨组织形态计量学和微 CT 测量技术在骨质疏松研究中的应用[J]. 国际骨科学杂志,2012,33(3):157-159.
- [4] 徐敬慈,许永华,李隽. 64 排螺旋定量 CT 骨密度测量影响因素初步研究[J]. 中国医学工程,2010,18(2):145-149.
- [5] 潘晓霞,屈泽华,卜娟,等. 小动物分子影像仪器的培训方法与平台管理[J]. 实验室研究与探索,2018,37(9):324-326,330.
- [6] 李剑波,刘磊,王雪梅. 小动物 CT 对人体骨骼的研究[J]. 内蒙古医科大学学报,2016,38(6):493-495.
- [7] 刘蓉,郭新路,张亚坤,等. 骨小梁 Micro-CT 图像形态计量学参数计算方法[J]. 中国生物医学工程学报,2018,37(2):237-246.
- [8] Wang J, Zhou B, Liu XS, et al. Trabecular plates and rods determine elastic modulus and yield strength of human trabecular bone[J]. Bone, 2015,72(11):71-80.
- [9] 李静,郑良,陈璐杰,等. 基于三维运动轨迹的高分辨显微 CT 环状伪影去除方法[J]. 中国医疗设备,2020,35(1):56-60.
- [10] 盖志琨,朱敏. 显微 CT 技术在古生代鱼类研究中的应用[J]. 生命科学,2013,25(8):779-786.
- [11] 巫旭娜,许碧莲,田佳,等. 用 Micro-CT 评价大鼠骨质疏松合并骨性关节炎模型[J]. 中国老年学杂志,2020,40(5):1044-1047.
- [12] 陈树越,李颖,邹凌. 基于 Micro-CT 的小鼠骨小梁 LBF 模型提取及特征分析[J]. 生物医学工程研究,2016,(2):65-70
- [13] 耿沁,朱森鑫,孙磊,等. micro-CT 法观测雌性小鼠股骨骨参数的分析[J]. 实验动物与比较医学,2014,34(1):46-49.
- [14] 王江雪,高玉,李辉,等. 离子造影剂增强 Micro-CT 扫描对大鼠关节软骨形态的定量分析[J]. 生物医学工程研究,2014,33(3):157-161.
- [15] 黄志荣,朱丽斌,吴海游,等. 辅酶 Q10 对 10 月龄小鼠股骨的 Micro CT 观察及骨生物力学检测[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016,22(3):366-371.
- [17] 孙莹霄,廖赞,欧阳丽萍,等. 小鼠股骨远端缺损植入模型的构建[J]. 吉林化工学院学报,2020,37(3):38-42.
- [18] 柴纪华,栗钰晴,袁国华,等. 基质金属蛋白酶-9 对出生后小鼠骨发育和骨改建的作用研究[J]. 口腔医学研究,2019,35(7):708-711.

收稿日期:2021-07-13;修回日期:2021-09-01

编辑/成森