口腔医学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001385

Micro-CT重建时分析区域变化对颅顶骨骨量参数的影响

郑仁建，张一弓，邵华英，Nisha-Mahato，吴小红
（重庆医科大学附属口腔医院修复科，重庆 401147）

【摘 要】**目的**：在分析区域包含整个颅顶骨的前提下，改变颅顶骨显微 CT(micro-computed tomography, Micro-CT)扫描后二维图像的重建层数或者位置，比较进行重建后的骨量参数(骨表面积、骨体积)是否出现改变。**方法**：4 日龄小鼠颅顶骨培养后置于含培养液的 EP 管中，进行连续 Micro-CT 扫描。根据重建时改变层数或位置来分别分析：①996~22 层组与 800~50 层组，分析层数不同(n=3)；②996~22 层组与随机选择层组，分析层数不同(n=3)；③近边界上缘组与近边界下缘组，分析层数相同(n=3)的骨量参数变化。**结果**：在分析区域包含整个颅顶骨的前提下：①增加或者减少层数导致骨表面积变化(F=47.798，P=0.002)，而骨体积无变化(F=7.083，P=0.056)。②随机选择层数组与 996~22 层数组分析比较时骨表面积(F=359.392，P=0.000)、骨体积(F=51.844，P=0.002)均有变化。③重建层数相同的前提下，改变分析区域位置时骨表面积(F=0.000，P=0.991)、骨体积(F=0.000，P=0.995)无变化。**结论**：①Micro-CT 三维重建时，改变重建层数可影响骨量参数。②Micro-CT 三维重建时，随机选择重建层数可影响骨量参数。③Micro-CT 三维重建时，保证分析层数相同而改变空白分析区域的位置不会影响骨量参数。

【关键词】显微 CT；分析区域；三维重建；器官培养
【中图分类号】R782.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-08-24

Influence of analysis region on parameters of mouse calvarial during micro-CT reconstruction

Zheng Renjian, Zhang Yigong, Shao Huaying, Nisha-Mahato, Wu Xiaohong
(*Department of Prosthodontic, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To compare the bone parameters of mouse calvarial when the two-dimentional image layers or position of analysis region for reconstruction were changed after Micro-CT scanning, under the precondition that the whole calvarial was included by the analysis region. ***Methods***: The calvarial of 4-day-old mice were scanned consecutively by micro-CT. The bone parameters were compared when the layers or position of analysis region for reconstruction were changed under the precondition that the whole calvarial was included by the analysis region. ***Results***: Under the precondition that the whole calvarial was included by the analysis region, increasing or decreasing the layers of analysis region could accordingly lead to the change of bone surface and bone volume of mouse calvarial. And the bone parameters of the layers selected randomly were significantly different from the parameters of the layers recommended by the NRecon of micro-CT. And there maybe difference when the total layers of analysis region was same but only the position was changed. ***Conclusion***: The change of layers of analysis region for reconstruction can influence the result of bone parameters. Selecting the layers of analysis region randomly will affect the bone parameters. The only change of position without the change of layers may have influence on the bone parameters.

【Key words】micro-CT; analysis layers; three-dimensional reconstruction; organ culture

骨器官培养作为研究骨形成和吸收机制的一种技术已经非常成熟，其优势在于不仅消除了体内激素、机械刺激等的影响，同时保留了骨内各种细胞之间及细胞与细胞外基质之间的联系。骨器官培养常用模型主要有胎鼠长骨和乳鼠颅顶骨。乳鼠颅顶骨因其保留了三维骨性结构及细胞多元性，常作为研究药物和细胞因子[1-3]对骨代谢影响的体外模型。

Micro-CT 作为一种非破坏性的 3D 扫描成像技术，是活体小动物、组织器官、牙及各种生物材料参

作者介绍：郑仁建，Email：748521601@qq.com，
研究方向：鼠颅顶骨生物学研究。
通信作者：吴小红，Email：hiwxh@hotmail.com。
基金项目：国家自然基金青年科学基金资助项目(编号：81200767/H1402)。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170630.1110.060.html (2017-06-30)

数分析的一种重要技术。高精度分辨率、样本可重复性处理、强大的三维图像重建以及分析软件是其近年来成为骨组织形态计量分析方法的重要原因。Micro-CT 扫描后对二维图像进行重建分析过程中涉及诸多参数设置。有学者研究了不同分辨率及分割阈值对 Micro-CT 扫描测量骨显微结构和生物力学参数精确性的影响，提示适宜分辨率和分割阈值可以在不降低准确度的前提下提高运算速度[4-6]。有学者研究了旋转中心偏移及步长对 Micro-CT 扫描骨参数的影响[7-9]。这些都提示重建过程中参数设置将影响最终分析结果。

以往认为 Micro-CT 三维重建时已使用阈值过滤杂质，选择重建层数时仅选择肉眼能见实物的层数即可。本课题组已发表的文章中将颅顶骨放在不同培养基中连续培养及 Micro-CT 扫描，以观察颅顶骨纵向生长情况[10-12]。结果发现 Micro-CT 扫描后利用配套分析软件 NRecon（Local，V1.6.10.1）重建二维图像、CTAn 分析测量结果时，增加或者减少空白区域分析层数会影响骨量参数。本实验拟利用颅顶骨培养后连续反复扫描观察颅顶骨生长情况，研究 Micro-CT 扫描所得的二维图像进行三维重建时，增加或者减少二维图像的空白区域层数对骨量参数的影响，分析在相同分析层数但不同分析层数位置的条件下测量结果是否存在差异，以及随机选择层数与 NRecon 建议层数对参数结果趋势的影响。

1　材料和方法

1.1　骨器官培养

4 日龄 CD-1 小鼠（n=3）由曼彻斯特大学生物研究中心提供。颈椎脱臼法处死，暴露小鼠颅顶骨后剥离颅骨，解剖过程中尽量保留表面的骨膜和硬脑膜（图 1）。将骨块凹面向下置于培养板中，加入含谷氨酸盐（Invitrogen，Paisley，UK）、10% FBS（Invitrogen）、100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM（Gibco）培养液，第 2 天更换培养板及培养基。37 ℃、5%CO_2 连续培养，每隔 3 d 换液。

1.2　Micro-CT 扫描

颅顶骨培养期间进行连续 Micro-CT（1072，SkyScan，BE）扫描。扫描时将骨块密封在一个内含塑料管支持且加入培养基的无菌 EP 管中，固定 EP 管于载物架内（图 2）。扫描后颅顶骨返回孵箱继续培养。Micro-CT 扫描参数设置如下：电压 100 kV，电流 98 μA；曝光时间 30 s；旋转角度 180°；放大倍数 25 倍；截面像素大小 10 μm，不同截面之间的距离为 10 μm。

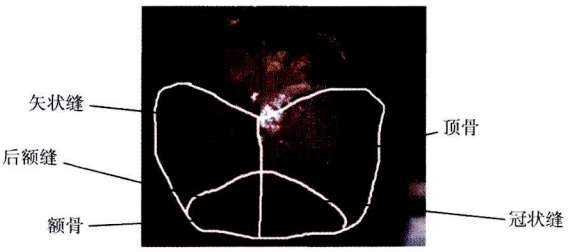


图 1　小鼠颅顶骨及其主要解剖标志

Fig.1　Mouse calvarial and the mainly anatomic landmarks

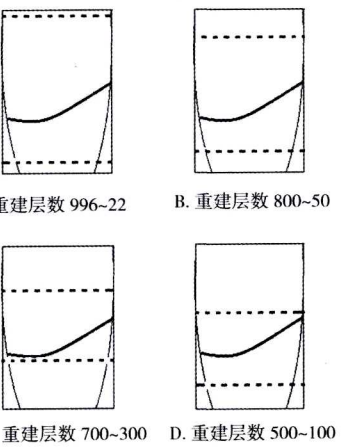


图 2　Micro-CT 扫描样本固定装置

Fig.2　Sample holder during Micro-CT scanning

1.3　选择重建层数

根据 Micro-CT 扫描图像选择不同层数进行重建。保证分析区域包含整个颅顶骨的前提下，改变空白区域分析层数或者位置：①Micro-CT 建议重建层数 996~22 层组（图 3A）与 800~50 层数组（图 3B），分析层数分别为 975 层和 751 层。②996~22 层数组与各个时间点随机选择不同的重建层数组比较，分析层数各不相同。③不同重建位置组比较，即近分析区域边界下缘（700~300 层）与近分析区域边界上缘（500~100 层），分析的层数均为 400 层（图 3C、D）。为了保证充分分割颅顶骨与管中液体及塑料管等，本实验选择较高阈值（100）。比较不同分析层数重建后骨量参数。



A. 重建层数 996~22　B. 重建层数 800~50

C. 重建层数 700~300　D. 重建层数 500~100

虚线示选择层数，黑色实线示样本

图 3　Micro-CT 扫描后不同重建层数示意图

Fig.3　Sketches of different reconstructional layers after Micro-CT scanning

1.4 统计分析

统计分析采用 SPSS 21.0 统计软件，所有计量资料均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。以软件建议重建层数（996~22 层）骨量参数为对照组，重复测量方差分析数据。检验水准 α=0.05。

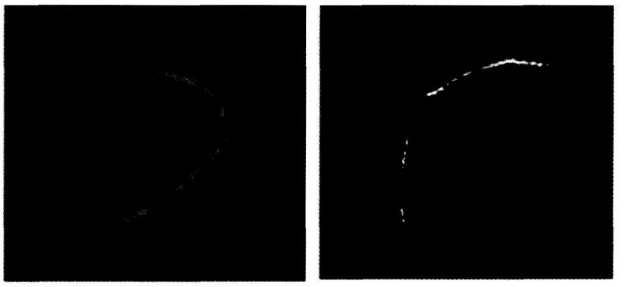
2 结 果

2.1 三维模型重建

图 4A 为 Micro-CT 扫描后的原始二维图像，图 4B 为重建并经阈值分割后的图像。可见颅顶骨基本连续，边缘清晰，周围无明显杂质。重建三维模型如图 5A~C 所示：重建层数为 996~22 时，颅顶骨在不同时间点扫描后三维重建模型，如图 5D~F 所示：重建层数为 800~50 时，颅顶骨在不同时间点扫描后三维重建模型。随着时间的增长，骨质密度逐渐增高，骨量增多。不同时间点骨表面积、骨体积见表 1、表 2，随着时间的增加骨表面积增加，差异有统计学意义（F=9.800，P=0.034）。随着时间的增加骨体积增加，差异有统计学意义（F=16.611，P=0.001）。

2.2 996~22 层数组与 800~50 层数组骨量参数比较

在 2、9、16 d 各个时间点选择重建层数组（800~50）和对照组（996~22）比较分析。由表 1、表 2 可见：改变重建层数后骨表面积随之改变，差异有统计学意义。而骨体积之间差异无统计学意义。



A. 扫描二维图像　　B. 分析后二维图像

图 4 Micro-CT 扫描二维图像

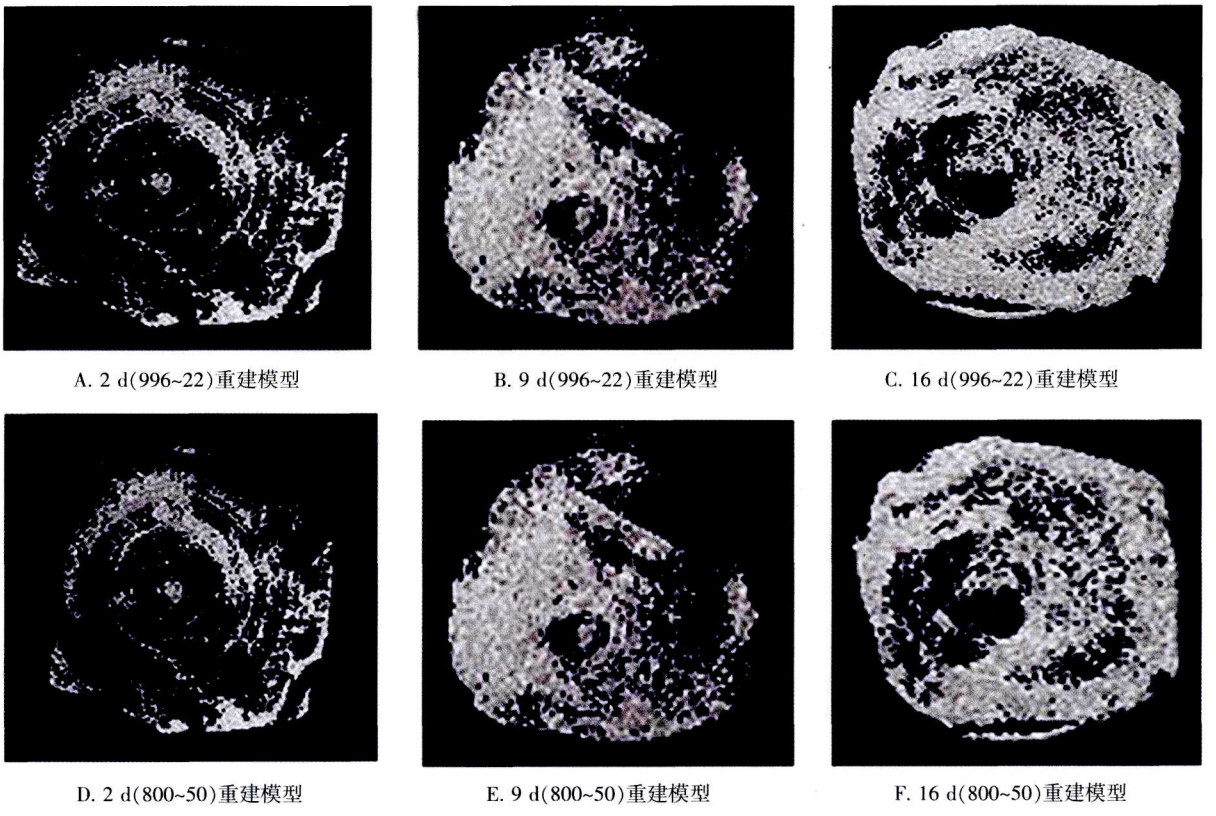
Fig.4 The 2D image after Micro-CT scanning

表 1 996 ~ 22 层数组与 800 ~ 50 层数组骨表面积比较（n=3，mm²）

Tab.1 Comparison of bone surface of different reconstruction layers（n=3，mm²）

重建层数	2 d	9 d	16 d
996 ~ 22	1 158.08 ± 12.46	1 192.01 ± 29.11	1 298.97 ± 115.19
800 ~ 50	901.69 ± 12.38	936.00 ± 28.83	1 029.28 ± 97.28

注：$F_{组间}$=47.798，$P_{组间}$=0.002；$F_{时间}$=9.800，$P_{时间}$=0.034；$F_{交互}$=0.031，$P_{交互}$=0.970



A. 2 d(996~22)重建模型　　B. 9 d(996~22)重建模型　　C. 16 d(996~22)重建模型

D. 2 d(800~50)重建模型　　E. 9 d(800~50)重建模型　　F. 16 d(800~50)重建模型

图 5 Micro-CT 三维重建模型

Fig.5 3D reconstruction model after Micro-CT scanning

表 2 996～22 层数组与 800～50 层数组骨体积比较（n=3，mm^3）

Tab.2 Comparison of bone volume of different reconstruction layers（n=3，mm^3）

重建层数	2 d	9 d	16 d
996～22	6.97±0.17	7.65±0.63	9.17±1.45
800～50	5.47±0.17	6.16±0.63	7.65±1.32

注：$F_{组间}$=7.083，$P_{组间}$=0.056；$F_{时间}$=16.611，$P_{时间}$=0.001；$F_{交互}$=0.001，$P_{交互}$=0.999

2.3 996~22 层数组与随机层数组骨量参数比较

在 2、9、16 d 各个时间点随机选择不同分析层数进行重建，与 996~22 层数组比较结果如下：996~22 层数组骨量参数均随时间增加而递增，而随机选择组从 2~9 d 时骨量参数均降低，从 9~16 d 时骨量参数均增加，差异有统计学意义（表 3、表 4）。

表 3 996～22 层数组与随机层数组骨表面积比较（n=3，mm^2）

Tab.3 Comparison of bone surface of different reconstruction ways（n=3，mm^2）

重建层数	2 d	9 d	16 d
996～22	1 158.08±12.46	1 192.01±29.11	1 298.97±115.19
随机选择组	623.72±24.19	365.20±102.25	397.53±33.89

注：$F_{组间}$=359.392，$P_{组间}$=0.000；$F_{时间}$=6.314，$P_{时间}$=0.023；$F_{交互}$=18.491，$P_{交互}$=0.001

表 4 996～22 层数组与随机层数组骨体积比较（n=3，mm^3）

Tab.4 Comparison of bone volume of different reconstruction ways（n=3，mm^3）

重建层数	2 d	9 d	16 d
996～22	6.97±0.17	7.65±0.63	9.17±1.45
随机选择组	3.94±0.41	2.82±1.00	4.01±1.01

注：$F_{组间}$=51.844，$P_{组间}$=0.002；$F_{时间}$=8.798，$P_{时间}$=0.010；$F_{交互}$=5.469，$P_{交互}$=0.032

2.4 近边界上缘组与近边界下缘组骨量参数比较

在 2、9、16 d 各个时间点比较不同位置分析区域的骨量参数。可见在层数相同的情况下，改变空白分析区域（即所选层数上移或者下移）的位置不会影响 CT 扫描骨量参数值（表 5、表 6）。

表 5 近边界上缘组与近边界下缘组骨表面积比较（n=3，mm^2）

Tab.5 Comparison of bone surface of different reconstruction ways with same reconstruction layers（n=3，mm^2）

重建层数	2 d	9 d	16 d
近边界下缘组	730.74±12.30	764.83±28.50	846.76±83.13
近边界上缘组	730.47±12.24	764.63±28.64	848.38±88.00

注：$F_{组间}$=0.000，$P_{组间}$=0.991；$F_{时间}$=11.991，$P_{时间}$=0.024；$F_{交互}$=0.001，$P_{交互}$=0.979

表 6 近边界上缘组与近边界下缘组骨体积比较（n=3，mm^3）

Tab.6 Comparison of bone volume of different reconstruction ways with same reconstruction layers（n=3，mm^3）

重建层数	2 d	9 d	16 d
近边界下缘组	4.47±0.17	5.16±0.63	6.60±1.28
近边界上缘组	4.46±0.17	5.15±0.63	6.60±1.28

注：$F_{组间}$=0.000，$P_{组间}$=0.995；$F_{时间}$=18.804，$P_{时间}$=0.001；$F_{交互}$=0.000，$P_{交互}$=1.000

3 讨 论

Micro-CT 工作原理为对样本进行 360°旋转投照获得二维投影，通过图像重建算法生成断层图像及三维模型重建[13]。二维投影断层重建及相应数据分析等受诸多参数设置的影响，包括旋转角度、扫描分辨率[5]、曝光时间及分割阈值[14-15]等。分析时选择的分割阈值能有效区分所需测量物质与其他杂质，因此往往认为过滤后的空白区域分析层数将不影响测量结果。前期预实验发现扫描后投影经软件 NRecon 重建、CTAn 分析时根据选择层数的不同，所测得骨量参数会出现明显不同，且随着层数变化增大而增大。

本实验利用颅顶骨培养后反复扫描观察颅顶骨生长变化情况，研究 Micro-CT 扫描后三维重建时改变空白区域分析层数对骨量参数的影响。图像分割时采用阈值分割，以往研究均会选择较低阈值[10-12]。本次实验为了保证充分去除非骨标本之外的杂质，选择较高分割阈值，即 100。此阈值基本保证去除培养液中除骨标本之外对 X 线敏感的物质（图 4B），从而有效对比不同空白分析层数对最终骨量参数的影响。前期预实验拟手动选择感兴趣区域以测量骨参数，结果显示此方法将带来较大的偏差，由此提出在感兴趣区域包含检测样本的前提下，选择相同的重建层数比较 Micro-CT 扫描后三维重建测量骨参数。

Micro-CT 作为近 20 年发展起来的一种新型测量、分析工具，已经广泛运用于骨组织、牙齿、生物材料及疾病机制等研究领域。本实验通过 SkyScan 公司 Micro-CT 扫描仪及相应配套分析软件分析结果证实增加或者减少重建层数均会影响最终测量结果。选择较少重建层数时，骨量参数也减少。其原

因可能是：虽然分割阈值已将高密度结构与低密度结构分开，但空白区域代表高密度结构的体素仍可能被识别（虽然从二维图像上显示周围液体和 EP 管已经被完全去掉），从而造成重建层数变化时骨量参数相应地出现变化。当随机选择重建层数时，可造成重建层数忽高忽低，从而导致骨量参数随之上下波动，因此在实际研究时，随机选择重建层数可能会导致骨量参数出现偏差。当选择相同重建层数但不同重建位置时，骨量参数无明显偏差。这提示在 Micro-CT 扫描后分析数据时，应该在重建层数包含所检测样本的前提下尽量保证相同的重建分析层数。本实验希望能为相关分析提供一定的参考。后期实验拟进一步研究标本置于空气中扫描以观察分析层数对扫描结果是否有影响。

参 考 文 献

[1] Liu J, Czernick D, Lin SC, et al. Novel bioactivity of phosvitin in connective tissue and bone organogenesis revealed by live calvarial bone organ culture models[J]. Dev Biol, 2013, 381(1): 256-275.

[2] Curtin P, Youm H, Salih E. Three-dimensional cancer-bone metastasis model using ex-vivo co-cultures of live calvarial bones and cancer cells[J]. Biomaterials, 2012, 33(4): 1065-1078.

[3] Stock SR, Ignatiev KI, Foster SA, et al. Micro-CT quantification of in vitro bone resorption of neonatal murine calvaria exposed to IL-1 or PTH[J]. J Struct Biol, 2004, 147(2): 185-199.

[4] 王法琪，严亚波，温鑫鑫，等. 显微 CT 分辨率对松质骨微观结构及生物力学测量的影响[J]. 现代生物医学进展，2015，15(10)：1877-1880.

[5] 石 磊，王 陵，王 军，等. Micro-CT 中椎弓根螺钉伪影对其周围骨计量学检测结果的影响及其校正[J]. 医疗卫生装备，2011，32(12)：60-61，76.

[6] Paolo EP, Lamera AI, Doty SB, et al. 3D assessment of cortical bone porosity and tissue mineral density using high-resolution micro-CT: effects of resolution and threshold method[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(1): 142-150.

[7] 盛志峰，徐 康，戴如春，等. 旋转中心偏移对显微 CT 松质骨定量分析的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志，2008，1(2)：134-141.

[8] 陶剑锋，赵丹慧，吴成爱，等. 显微 CT 旋转步长对牛腰椎松质骨重建图像及数据的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志，2012，22(9)：829-834.

[9] Zhao JT, Hu XD, Zou J, et al. Method for correction of rotation errors in Micro-CT system[J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2016, 816: 149-159.

[10] Wu XH, Wang L, Deng F, et al. Mouse calvarial defect model: an approach for the micro-tomographic evaluation of polymer scaffolds[J]. Microscopy Research and Technique, 2014, 77(12): 1037-1043.

[11] Wu XH, Deng F, Wang L, et al. Microtomographic evaluation of the bone-cell interactions with a silorane-based composite[J]. Microscopy Research and Technique, 2012, 75(9): 1176-1184.

[12] Wu XH, Dowens S, Watts DC. Evaluation of critical size defects of mouse calvarial bone: an organ culture study[J]. Microscopy Research and Technique, 2012, 73(5): 540-547.

[13] 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.

[14] Chang PC, Liang K, Lim JC, et al. A comparison of the thresholding strategies of micro-CT for periodontal bone loss: a pilot study[J]. Dentomaxillofac Radiol, 2013, 42(2), 66925194.

[15] Yan YB, Qi W, Qiu TX, et al. The effect of threshold value on the architectural parameters and stiffness of human cancellous bone in micro ct analysis[J]. Journal of Mechanics in Medicine and Biology, 2012, 12(5): 1250092.

（责任编辑：冉明会）