

通过亚纳米级硫酸钡进行骨内微血管显影及三维重建

黄连芳¹, 朱觉新¹, 梁洪英², 陈艳^{1*} (广东医科大学 1. 湛江科研中心; 2. 基础医学院, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 建立使用亚纳米级硫酸钡灌注并经Micro-CT骨内微血管显影方法。**方法** SD大鼠腹主动脉内灌注亚纳米级硫酸钡, 下腔静脉置管作为流出端。处死大鼠并置于4℃过夜, 次日取出双侧股骨标本, 10%中性福尔马林液固定1周, 分别进行Micro-CT扫描、三维重建、骨组织形态计量学分析。**结果** 三维形态上能明显区分出微血管和骨小梁, 二维观察可见硫酸钡进入直径5~10 μm血管。骨内血管和骨小梁三维重建的数量小于二维($P<0.01$ 或 0.05), 而分离度则高于二维($P<0.01$), 但骨内血管的厚度三维和二维重建比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 通过亚纳米级硫酸钡灌注及Micro-CT扫描, 成功建立了大鼠骨内微血管显影方法。

关键词: 微血管造影; 骨血管; 硫酸钡; 大鼠

中图分类号: R 33

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2018)01-0049-04

Intraosseous microangiography and 3D reconstruction using subnanometer barium sulfate

HUANG Lian-fang¹, ZHU Jue-xin¹, LIANG Hong-ying², CHEN Yan^{1*} (1. Zhanjiang Scientific Research Center; 2. Basic Medical College; Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** To construct an intraosseous microangiography using subnanometer barium sulfate perfusion and Micro-CT scan. **Methods** The subnanometer barium sulfate was perfused into the abdominal aorta of SD rats, with the inferior vena cava catheter as the outflow end. The rats were sacrificed and kept at 4℃ overnight. Next day, the femurs were extracted and fixed in 10% neutral formalin solution for 1 week, and then underwent Micro-CT scan, 3D reconstruction, and bone histomorphometry. **Results** The 3D reconstruction showed the microvessels and trabeculae, while 2D imaging demonstrated the perfusion of barium sulfate into the vessels with diameters of 5-10 μm. Compared with 2D imaging, the number of intraosseous vessels and trabeculae was decreased ($P<0.01$ or 0.05), whereas the separation degree increased ($P<0.01$) on 3D reconstruction. However, there was no significant difference in the intraosseous vessel thickness between 2D and 3D reconstruction ($P>0.05$). **Conclusion** An intraosseous microangiography method in rats is successfully established using subnanometer barium sulfate perfusion and Micro-CT scan.

Key words: microangiography; bone vasculature; barium sulfate; rat

骨内微血管的生成、分布及结构分析对股骨头坏死、骨折愈合、骨瘤形成和骨肿瘤等实验研究具有重要的意义^[1-2]。目前采用的主要方法是血管造影法, 墨水乳胶、泛影葡胺、Microfil等是常用的造影剂^[3-4], 但这些方法存在一定的局限性, 易破坏骨质, 且不能直观反映骨内血管, 骨结构不能同时显

现并进行定量^[5]。国内目前仅有1例借助硫酸钡及Micro-CT用于鸟类骨内微血管显影的报道^[1], 且其三维图像没有定量分析。因此本研究选用更理想的大鼠作为模型, 参照此法进一步提供骨内微血管和骨小梁的同步三维显像, 并使用不脱钙二维骨切片进行对照观察。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

亚纳米级硫酸钡(CAS: 7727-43-7, 批号187, 3.0 μm, 5 000目, 广州先万化工有限公司), 甲基丙烯酸甲酯(CAS: 1330-20-7, 批号20161017, 北京化工厂)。小动物活体显微成像CT(vivaCT40, Scanco Medical, 瑞士), 慢速锯(Buehler, 美国), LeicaRM

基金资助: 广东省科技计划项目(No.2015A030302077),
湛江市科技攻关项目(No.2016B01131、
No.2017B01140)

收稿日期: 2017-12-25; 修订日期: 2018-01-16

作者简介: 黄连芳(1963-), 女, 学士, 高级实验师。

通信作者: 陈艳(1973-), 女, 硕士, 副研究员,

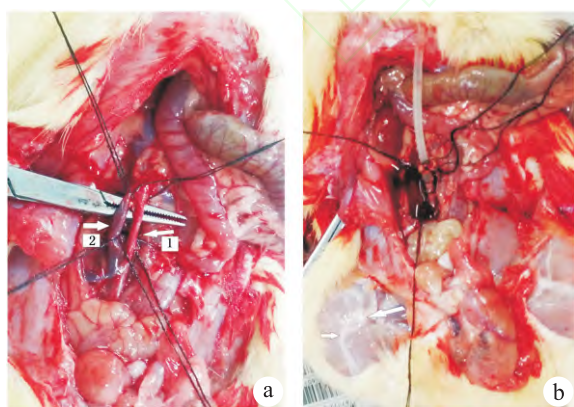
E-mail: chenyan8182@163.com。

2265硬组织切片机(Leica, 德国), 荧光显微镜(DMLB, Leica, 德国), 显微照相机(Olympus DP72, 日本), 骨形态计量学测量系统(OsteoMetrics, Inc, 美国)。

1.2 方法

事先配置好硫酸钡灌注液, 配置方法如下: A型明胶(进口分装)25 g溶于500 mL 0.85%等渗氯化钠溶液, 60~70 ℃不停搅拌30 min, 得到5%凝胶溶液, 使用前放37 ℃水浴。500 mL 5%明胶溶液加300 g 亚纳米级硫酸钡, 不停搅拌15~20 min, 使其完全混合成均匀的糊状。依次加入柠檬酸钠(0.5 g/100 g BaSO₄)和D-山梨醇(1.5 g/100 g BaSO₄), 降低溶液的黏度, 然后进行过滤。使用前再次搅拌至均匀, 37 ℃水浴。

选取4月龄清洁级SD大鼠2~3只, 雌雄不限, 体质量为450~500 g, 由广东医科大学实验动物中心提供。灌注前先给予3%戊巴比妥钠进行全身麻醉, 腹部正中切口, 暴露腹主动脉, 下腔静脉, 在肾动脉分支以上分离腹主动脉, 近端结扎, 向远心端方向插管至肾动脉分支以下作为注入端, 下腔静脉置管作为流出端。灌注前注入4%肝素生理盐水50 mL, 使下肢血液肝素化, 至流出端血液清亮无色即可(图1)。然后将事先配置好的硫酸钡灌注液自输入端缓慢注入, 至流出端液体也全部变成白色为止。注入完毕, 封闭注入端及流出端, 将实验动物置于4 ℃环境下过夜, 使明胶充分固化, 第2天取出双侧股骨标本, 置于10%中性福尔马林液中固定1周, 之后取出标本先进行Micro-CT检测和图像重建, 再通过不脱钙骨切片方法进行组织病理观察。



腹部正中切口, 注入端为腹主动脉(图1 a, 白色箭头1), 流出端为下腔静脉(图1 a, 白色箭头2), 灌注后可见表层血管呈现白色(图1 b箭头所示)

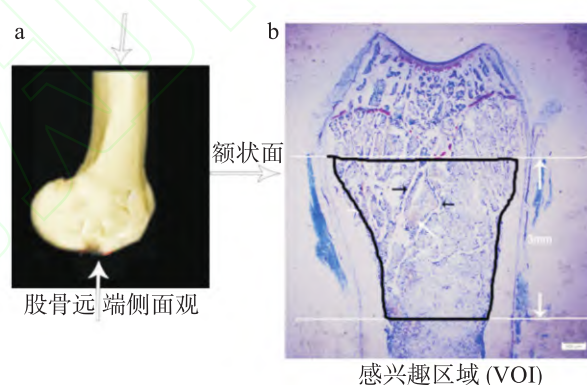
图1 大鼠双下肢经腹主动脉血管灌注图

1.3 骨内血管CT扫描及重建

本实验所用小动物活体显微成像CT为瑞士Scanco Medical公司开发的VIVA CT 40, 采用锥形束扫描和三维重建技术。将大鼠股骨标本放置于Micro-CT系统附带的小动物标本容器中, 沿标本长轴方向, 将股骨远端从生长板开始向中段延伸3 mm的区域(Volume of Interest, VOI)进行扫描和三维重建, 扫描分辨率为10 μm, 能量值选择70 KVP, 1 200 HA, 骨血管重建灰度阈值为447单位, 骨小梁重建灰度阈值范围200~300单位, Gauss Sigma 0.8。

1.4 骨形态学标本制备及二维形态观察

另一侧股骨远端除净肌肉和软组织后, 使用慢速锯从股骨远端额状面锯开, 暴露骨髓腔, 经过逐级脱水, 脱脂, 甲基丙烯酸甲酯进行塑料包埋, 打磨处理后经硬组织切片机切成5 μm的骨切片。甲苯胺蓝染色后经光镜下观察并进行定量。股骨远端侧面观察详见图2a, 测量范围见图2b所示。



a: 股骨远端侧面; b: 黑色框内为感兴趣区域, 框内黑色箭头指示骨小梁, 框内白色箭头指示造影剂密集部位。

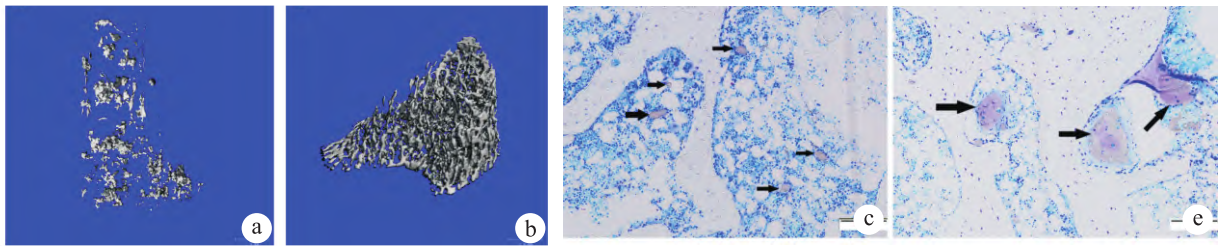
图2 感兴趣区域(VOI)

1.5 统计学处理

采用SPSS19.0软件进行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

由图3所见, 在形态特点上能明显区分重建的微血管和骨小梁的三维图像。血管总面积小, 整体分布不均, 较稀疏(见图3 a), 而骨小梁面积多, 分布均匀, 密度高于血管(见图3 b)。二维骨切片也证明了亚纳米级硫酸钡确实进入了微细血管, 与周围组织区分明显(见图3 c、d)。骨内血管和骨小梁微结构的二维数据与三维数据对比存在一定的差异, 最高达到15%左右。骨内血管二维面积为 $(8.10 \pm 0.32)\%$,



a: 骨内微血管三维重建图; b: 相同部位的骨小梁重建结果图; c、d: 不脱钙骨切片普通光镜下观察, 甲苯胺蓝染色, 黑色箭头所示为骨髓腔内血管, 直径大小为3~15 μm , c为200倍图, d为400倍图

图3 骨内微血管三维重建及不脱钙骨切片观察

三维体积为 $(6.99 \pm 0.29)\%$; 骨小梁二维面积为 $(22.71 \pm 2.19)\%$, 三维体积为 $(19.40 \pm 0.75)\%$ 。除骨内血管的厚度三维和二维重建比较差异无统计学意义($P > 0.05$)外, 骨内血管和骨小梁三维重建的数量小于二维, 而分离度则高于二维, 差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。详见表1。

表1 骨内血管、骨小梁三维扫描和二维计量结构参数的对比 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

部位	数量/(N/mm)	分离度/ μm	厚度/ μm
骨内血管	三维 1.97 ± 0.09^b	380.00 ± 18.19^b	22.13 ± 3.21
	二维 2.21 ± 0.12	353.12 ± 15.22	20.11 ± 1.88
骨小梁	三维 5.03 ± 0.30^a	163.67 ± 6.30^b	56.97 ± 6.96^b
	二维 5.41 ± 0.44	147.32 ± 15.00	47.48 ± 3.75

与二维比较: $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$

3 讨论

骨的血液循环是骨内输送营养物质、骨基质形成及骨细胞生理功能所必须的, 与骨的形成以及重建都有重要的关系^[2]。Barou等^[3]发现在大鼠的骨小梁骨形成与血管相关参数之间存在线性相关关系。还有研究认为, 在骨重建过程中, 骨吸收与骨形成之间就是由骨的血管化所介导的^[4]。骨内微血管生成、分布、结构及血液循环状态在骨坏死、骨质疏松、骨折愈合、骨痂形成和骨肿瘤发育等病理过程中都起到关键的作用^[5-6]。因此, 不管是研究正常生理或者病理状态下, 或是使用药物的情况下的骨微血管的状态都具有重要的意义^[7-8], 而最直接的观察骨微血管状态的方法就是进行血管造影。

血管造影是选用不同的造影剂灌注后经X线方法显影或者通过组织病理切片进行血管的二维观察。而由于骨组织的特殊性, 一般的造影剂是无法显示出骨血管的。目前最常采用的造影剂是墨水乳胶, 其操作简便, 但颗粒大, 不能进入微小血管, 只能进行二维观察, 有极大的局限性^[9]。另一类近

年来经常使用是含特殊复合物的造影剂Microfil、Angiofil等, 血管灌注后进行Micro-CT扫描, 可实现骨内微血管的三维重建。但是由于此类造影剂的CT值比较低, 与骨组织会有一定的重合, 无法同步进行骨结构的观察^[10]。还有一种使用合成树脂(Mercor)进行血管铸型的方法, 可以实现血管和骨的三维显示, 通过电镜还可以获得高精度图像, 但是图像难以量化分析, 操作步骤复杂, 耗时, 骨组织也容易受到破坏^[11-12]。硫酸钡以往主要是作为“钡餐”应用于消化道造影, 由于其无毒, 无污染的特点也被应用于软组织的血管造影^[13-14]。而将其应用于骨组织血管造影时则存在一定的限制, 骨内血管直径较小, 灌注困难, 微血管显像需借助Micro-CT这种高分辨率的仪器。因此纳米级颗粒的硫酸钡开始得到实验者的关注, 亚纳米级硫酸钡颗粒直径小于500 nm, 可以进入骨内的微小动脉、静脉及毛细血管, 其CT值较高, 大多高于3 000 亨氏单位(HU), 而松质骨的CT值一般小于1 500 HU, 可以不脱钙就进行Micro-CT扫描, 显示骨内血管。而且此方法成本低廉, 明显优于Microfil等商业化造影剂。但是目前国内只有1例使用纳米硫酸钡用于骨内微血管显影并进行三维重建的报道, 且其股骨远端三维图像没有具体的展示和定量分析, 实验对象鸟类也不是理想的动物模型, 且用的是破坏骨组织的脱钙方法, 不能很好地说明此灌注法的优越性^[15]。

大鼠可以说是最常使用的小动物实验模型。本研究选用大鼠为实验对象, 腹部血管清晰可辨, 容易分离及进行插管操作^[16]。灌注后不需特殊处理就可以进行CT扫描。重建时可以通过选择不同的灰度阈值显影血管和小梁^[17], 同时对骨小梁和微血管结构进行观察和量化评估。结果发现, 骨小梁结构和微血管在三维重建图像上存在不同的结构特点, 骨小梁分布均匀, 而血管整体分布不均, 且体积只有骨小梁的1/3, 而通过不脱钙切片获得的二维图像

基本可保持骨组织不受破坏。骨形态计量学分析选取的是接近正中额状面的骨组织切片,然后根据公式推断三维结果,与真实的三维数据之间肯定存在一定的差异。本实验结果表明,此差异大概最高可达15%左右。除骨内血管的厚度三维和二维重建比较差异无统计学意义($P>0.05$)外,骨内血管和骨小梁三维重建的数量小于二维,而分离度则高于二维,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 0.05)。骨切片的组织观察结果显示,亚纳米级硫酸钡确实进入了髓腔内直径小于 $20\text{ }\mu\text{m}$ 的小血管,与周围组织容易鉴别。

总之,本研究以亚纳米级硫酸钡作为造影剂, Micro-CT 骨内微血管造影可以清晰地显示骨内微血管,并可与骨小梁显微结构同步定量评价,三维和二维数据可进行对比分析。此方法可以在大鼠等小动物实验中应用推广,对于股骨头坏死、骨折愈合、骨痂形成、骨肿瘤等的发生机理和治疗研究具有重要的作用。

参考文献:

- [1] 范猛,汪爱媛,王玉,等.基于Micro-CT的骨内微血管显影和三维重建[J].南开大学学报(自然科学版),2011,44(1): 78-84.
- [2] Lafage-Proust M H, Roche B, Langer M, et al. Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling[J]. Bonekey Rep, 2015, 4(1): 662-670.
- [3] Barou O, Mekraldi S, Vico L, et al. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study[J]. Bone, 2002, 30(4): 604-612.
- [4] Kusumbe A P, Ramasamy S K, Adams R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone[J]. Nature, 2014, 507(7492): 323-328.
- [5] 王晓燕,李冠武,常时新.三七总皂苷通过血管生成改善绝经后骨质疏松机制探析[J].中国骨质疏松杂志,2014, 20(8): 964-967.
- [6] Wideman R F, Prisby R D. Bone circulatory disturbances in the development of spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: a translational model for the pathogenesis of femoral head necrosis[J]. Front Endocrinol, 2012, 3(183): 1-14.
- [7] 马勇,马喜洪.股骨头坏死病因、发病机制及治疗研究进展[J].医学综述,2015,21(9): 1574-1576.
- [8] Weinstein R S. Glucocorticoid-induced osteonecrosis[J]. Endocrine, 2012, 41(2): 183-190.
- [9] 简月奎,吴雪晖,田晓滨,等.不同方法显像骨组织微血管的对比研究[J].中国矫形外科杂志,2008,16(7): 534-536.
- [10] 毛以华,朱昭炜,丁茂超,等.应用高分辨率显微CT进行大鼠周围神经微血管三维可视化研究[J].解剖学报,2013, 44(3): 353-356.
- [11] Stefanov M, Kim J. Visualizing the peripheral primo vascular system in mice skin by using the polymer mercocox[J]. J Pharmacopuncture, 2015, 18(3): 75-79.
- [12] 吴琳,荣小芳,钟鸣.应用血管铸型法探讨犬牙周膜微血管网的缓冲作用[J].上海口腔医学,2008,17(2): 184-186.
- [13] 许宏伟,刘蕾,罗东雷.泛影葡胺与硫酸钡在消化道异物诊断中的应用比较[J].河北医学,2017,23(10): 1687-1689.
- [14] 邹天乐,龚瑜,林爱娣,等.硫酸钡血管造影术的优化[J].中国临床解剖学杂志,2010,28(1): 104-106.
- [15] 赵斌,范猛,汪爱媛,等.骨内微血管和骨的同步三维显像及定量评价[J].中国矫形外科杂志,2011,19(24): 2072-2076.
- [16] 杨文涛,金星,薛智军,等.大鼠腹主动脉插管造影术[J].上海实验动物科学,2001,21(1): 62-63.
- [17] Sider K L, Song J, Davies J E. A new bone vascular perfusion compound for the simultaneous analysis of bone and vasculature[J]. Microsc Res Tech, 2010, 73(7): 665-672.