

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000452

Mimics 与 Micro-CT 内置软件测量
小鼠颅骨缺损骨再生的对比研究张玉凤¹, 王 璐¹, 辜向东¹, 王 超², 吴小红¹

(1. 重庆医科大学附属口腔医院修复科, 重庆 401147; 2. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147)

【摘要】目的:对比分析 Mimics 软件与显微-CT(Micro-computed tomography, Micro-CT)内置分析软件对颅骨缺损内新生骨量及骨愈合率的测量结果,评价 2 种测量方法的差异性。**方法:**在小鼠右侧颅顶骨制备直径 4 mm 圆形骨缺损,分别于术后当天、6 周、12 周,对小鼠颅骨进行活体 Micro-CT 扫描,然后利用 Micro-CT 扫描仪内置软件重建颅骨缺损的三维图像并测量缺损内新生骨体积及愈合率,且利用 Mimics 软件对 Micro-CT 扫描的二维图片进行三维重建,并测量缺损内新生骨体积及愈合率。**结果:**与术后 6 周相比,术后 12 周 Micro-CT 扫描仪内置软件和 Mimics 软件测量的缺损内新生骨体积和骨愈合率均增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);术后 6 周和 12 周, Mimics 软件的测量结果与 Micro-CT 扫描仪内置软件测量的颅骨缺损内新骨体积及骨愈合率相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**缺损术后 6 周和术后 12 周, Mimics 软件对 Micro-CT 扫描后的二维图片进行重建并计算出的颅骨缺损新生骨体积及骨愈合率,与 Micro-CT 扫描仪内置软件的测量结果均一致,且测量方法更简单。

作者介绍:张玉凤, Email: 814336296@qq.com, 研究方向: 小鼠颅骨缺损愈合。
通信作者: 吴小红, Email: hiwxh@hotmail.com。
基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81200767/H1402); 重庆市卫生局资助项目(编号: 2012-2-8)。
优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1707.017.html> (2015-01-12)

控 BMP9 诱导的成骨分化进程。AP2 α 作为成骨分化的重要转录因子, 下一步课题组将探讨调控 AP2 α 转录因子活性是否协同增强 BMP9 的成骨效应。采用基因调控方式优化 BMP9 成骨诱导因子在组织工程人工骨中的成骨效应, 有助于开拓骨缺损疾病临床治疗的创新之路。

参 考 文 献

- [1] Jain AP, Pundir S, Sharma A, et al. Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules[J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17(5): 583-586.
- [2] Lv Z, Yang D, Li J, et al. Bone morphogenetic protein 9 overexpression reduces osteosarcoma cell migration and invasion[J]. Mol Cells, 2013, 36(2): 119-126.
- [3] 龚梦嘉, 周建武, 毕 杨. AP2 α 荧光素酶报告基因的构建及在 BMPs 诱导成骨分化研究中的初步应用[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(11): 1571-1576.
- [4] 毕 杨, 何 昀, 李廷玉, 等. 显性负性突变体对 AP2 α 转录因子及其活性的影响[J]. 生命科学研究, 2011, 15(5): 402-409.
- [5] 毕 杨, 龚 敏, 陈 洁, 等. AP2 α 重组腺病毒质粒的构建及其在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(1): 13-17.
- [6] Crane GM, Lshaug SL, Mikos AG, et al. Bone tissue engineering[J]. Nat Med, 1995, 1(12): 1322-1324.
- [7] Yoshimaki T, Sato S, Tsunori K, et al. Bone regeneration with sys-

temic administration of lactoferrin in non-critical-sized rat calvarial bone defects[J]. J Oral Sci, 2013, 55(4): 343-348.

- [8] Lamplot JD, Qin J, He TC, et al. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis[J]. Am J Stem Cells, 2013, 2(1): 1-21.
- [9] Wang W, Olson D, Liang G, et al. Collagen XXIV (Col24 α 1) promotes osteoblastic differentiation and mineralization through TGF- β /Smads signaling pathway[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(10): 1310-1322.
- [10] Zhang WB, Zhong WJ, Wang LA. signal-amplification circuit between miR-218 and Wnt/ β -catenin signal promotes human adipose tissue-derived stem cells osteogenic differentiation[J]. Bone, 2013, 58C: 59-66.
- [11] Zhao Y, Song T, Wang W, et al. P38 and ERK1/2 MAPKs act in opposition to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43383.
- [12] Zarelli VE, Dawid IB. Inhibition of neural crest formation by Kctd15 involves regulation of transcription factor AP-2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(8): 2870-2875.
- [13] Ding X, Yang Z, Zhou F, et al. Transcription factor AP-2 α regulates acute myeloid leukemia cell proliferation by influencing Hoxa gene expression[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(8): 1647-1656.
- [14] Wenke AK, Anja K. Bosserhoff. Roles of AP-2 transcription factors in the regulation of cartilage and skeletal development[J]. FEBS J, 2010, 277(4): 894-902.
- [15] Qiao YB, Zhu Y, Sheng N, et al. AP2 γ regulates neural and epidermal development downstream of the BMP pathway at early stages of ectodermal patterning[J]. Cell Res, 2012, 22(11): 1546-1561.

(责任编辑: 关蕴良)

【关键词】活体显微 CT; 颅骨缺损; Mimics 软件; 骨愈合

【中图分类号】R782.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-07-07

Evaluation on bone regeneration in mouse calvarial defect model using Mimics vs. Micro-CT scanner's built-in software

Zhang Yufeng¹, Wang Lu¹, Gu Xiangdong¹, Wang Chao², Wu Xiaohong¹

(1. Department of Prosthodontics, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University;

2. Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences)

【Abstract】**Objective:** To compare the results of bone regeneration condition in mouse calvarial defects measured by Mimics or Micro-CT scanner's built-in software and to evaluate the differences of the two methods. **Methods:** Defect of 4 mm in diameter was prepared on the right cranium of mice, and *in vivo* Micro-CT scan was performed immediately after surgery, 6 weeks and 12 weeks postoperatively. Then new bone volume and bone healing rate within the defect were measured after reconstructing 3D images by Micro-CT scanner's built-in software. The new bone volume and bone healing rate within the defect were quantitatively analyzed using Mimics software. The 2D data of Micro-CT were imported into Mimics software and 3D images were reconstructed by it as well. **Results:** The bone regeneration volume and bone healing rate at 12 weeks postoperatively were significantly higher than those at 6 weeks postoperatively, no matter measured by Micro-CT scanner's built-in software or Mimics software ($P < 0.05$). In addition, there was no significant difference in the new bone volume and bone healing rate between the results of Mimics software and the results of Micro-CT scanner's built-in software at 6 weeks and 12 weeks postoperatively ($P < 0.05$). **Conclusion:** Similar results of new bone regeneration within the calvarial defect are obtained by the two softwares at 6 weeks and 12 weeks postoperatively. However, mimics software is simpler to operate than Micro-CT scanner's built-in software.

【Key words】*in vivo* Micro-CT; calvarial defect; Mimics software; bone regeneration

动物颅骨缺损模型一直被广泛应用于修复颌颌面缺损的骨移植材料及骨组织工程^[1-3]。活体显微-CT (Micro-computed tomography, Micro-CT) 扫描是近几年发展起来的一种可靠、重复性高的新型影像学技术, 它可监测同一只动物随时间变化骨骼三维结构的变化情况^[4], 可清晰、准确地显示缺损内新骨愈合情况, 进行三维重建的同时即可测量出缺损内新生骨量。为纵向研究减少所用动物数量, 也增加了统计学可靠性。

Micro-CT 扫描完成后, 需通过选择兴趣区域 (region of interest, ROI) 确定重建范围并进行计算, 这要求不同动物标本之间、同一动物前后摆放的位置完全一致^[5], 以确保不同动物之间、同一只动物前后选择的 ROI 为同一部位。然而活体 Micro-CT 扫描时, 很难确保每次扫描摆放于同一位置^[5-6], 因此还需借助三维配准软件进行分析^[6], 或者利用长骨的生长板等作为解剖标志来确定相同的 ROI^[7]。对活体动物的颅骨进行扫描时, 缺乏解剖标志作为参照^[8-9], 难以将颅骨每次精确摆放在同一位。所以有学者借助 Adobe Photoshop 等软件, 利用活体 Micro-CT 扫描所得二维或三维图像测量出颅骨缺损内的新生骨面积^[1,10], 但新骨形成是在三维立体空间中进行的, 这种二维测量不能准确反映新生骨的三维情

况, 且不能充分利用 Micro-CT 的优势。也有学者在制作颅骨缺损时, 通过在缺损前后左右 4 位点制作小缺损并放置汞合金, 便于每次活体 Micro-CT 扫描准确定位同一扫描部位及术后分割同一缺损区域, 从而成功测量出了缺损内新生骨体积^[11], 但另一种化学材料的引入, 是否会对实验动物颅骨本身及缺损愈合产生影响, 还有待研究。

Mimics 软件, 是一套高度整合、易操作的三维图像生成及编辑处理软件, 能输入各种扫描数据 (CT、MRI), 建立 3D 模型进行编辑, 具有强大的三维成像及不规则物体体积计算功能^[12], 其广泛应用于解剖学测量、有限元及三维分析等领域^[13-15]。它可对 Micro-CT 扫描完成后的二维图片先完成三维重建^[15], 基于重建出的可以任意旋转到最佳视觉位置的三维图像, 再选择目标区域进行包括面积、体积等在内的各种运算, 从而能克服活体动物颅骨扫描时因缺乏参考标志而难以摆放同一位置或额外引入汞合金等材料作为标志的缺点。

所以, 本实验拟应用 Mimics 软件对 Micro-CT 扫描的颅骨二维图像进行三维重建, 计算颅骨缺损内新生骨体积及愈合率, 并与 Micro-CT 扫描仪内置软件的分析结果比较, 对比分析 2 种测量方法的差异。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立

雄性 CD-1 小鼠 5 只, 6 月龄、体质量 (30.00 ± 0.30) g, 购自重庆医科大学实验动物中心。建立颅骨缺损动物模型 (图 1); 5% 水合氯醛 ($350 \sim 400$ mg/kg) 腹腔麻醉成功后, 常规消毒、铺巾、备皮, 无菌操作下沿头中线作长约 1.5 cm 切口, 全层分离皮肤及骨膜, 充分暴露小鼠颅顶骨, 用牙科低速环形钻在右侧颅顶骨制备直径为 4 mm 孔全层颅骨缺损, 全程生理盐水持续喷水冷却, 防止产热过多, 且注意保护下方硬脑膜, 冲洗术区并对位缝合。小鼠在无特殊致病源 (SPF) 级条件下饲养。



图 1 颅骨缺损模型的建立

Fig.1 Establishment of calvarial defect model

1.2 活体 Micro-CT 扫描小鼠颅骨

分别于手术当天、术后 6 周和 12 周, 小鼠在异氟烷吸入麻醉下取俯卧位, 使用 Viva CT40 型 Micro-CT (瑞士) 对小鼠进行活体扫描, 小鼠头中线对准鼠仓底平面的中线^[7], 用海绵及透明胶带固定小鼠头颅防止扫描过程中头部移动 (图 2), 尽量确保每次扫描时头颅摆放于同一位置, 扫描范围为双侧耳根连线及向前 10 mm 距离, 扫描条件为 55 kV, 109 μ A, 扫描层厚 10.5 μ m, 曝光时间 200 ms, 图像大小为 1024×1024 , 每个标本大约扫描 30 min, 得到约 950 张图片。



图 2 Micro-CT 扫描前小鼠俯卧位

Fig.2 Mice at prone position before Micro-CT scanning

1.3 观察指标

1.3.1 利用 Micro-CT 自带软件测量缺损内新骨体积及骨愈合率 在 Micro-CT 扫描的二维图片上, 缺损初始边界清晰可见, 选取缺损所在层面 (第 300~700 张), 在固定坐标位置画取像素为 254 的圆柱形 (对应颅骨缺损尺寸 3.8 mm) ROI,

使其每次恰好位于缺损初始边缘内, 分割阈值范围为 225~500 (总范围为 0~1 000), 且利用高斯过滤器去除噪音, 运用 Viva CT40 型 Micro-CT 扫描仪的内置图像分析与重建软件 (micro-computed tomography V6.1, μ CT V6.1) 进行三维重建, 测量颅骨缺损范围内新骨体积并计算愈合率^[11]。

1.3.2 利用 Mimics 软件测量缺损内新骨体积及骨愈合率

将 Micro-CT 扫描所得的小鼠颅骨二维图片以 DICOM 格式导入 Mimics 14.1 (Materialise software, Belgium) 软件进行三维重建; 生成 1 个直径 4 mm, 高 3 mm 的圆柱, 利用三维配准功能将每只鼠前后 3 次扫描重建所得三维图像重叠成一个组合, 并使圆柱与上述组合的缺损部位完全重叠; 利用布尔运算得出新生骨体积, 并计算骨愈合率。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用配对 t 检验对比分析不同时间点同一测量方法前后检测出的缺损内新生骨量变化情况; 采用两独立样本 t 检验对比分析 2 种不同测量方法在同一时间点的测量结果。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 活体 Micro-CT 扫描后不同方法测量骨愈合

活体 Micro-CT 扫描的二维图片 (图 3) 及 2 种软件三维重建出的图像 (图 4、5) 均十分清晰。经 Mimics 软件重建的缺损及骨愈合情况与 μ CT V6.1 软件重建图像的观察结果一致。术后当天, 小鼠颅骨缺损边缘规则, 缺损内无明显新生骨质; 随时间变化, 可见颅骨缺损边缘新生骨逐渐增多, 且紧靠缺损边缘 (图 4、5), 分别与 2 种方法在不同时间点测量的缺损内骨愈合结果一致, 即与术后 6 周的测量结果相比, 2 种方法测量的术后 12 周小鼠颅骨缺损内新生骨体积和骨愈合率, 均明显增加, 差异具有统计学意义 (表 1、2)。Mimics 与 μ CT V6.1 软件的测量结果相比, 术后 6 周缺损内新生骨体积及骨愈合率结果的差异无统计学意义 (表 3), 术后 12 周缺损内新生骨体积及骨愈合率结果的差异也均无统计学意义 (表 4)。

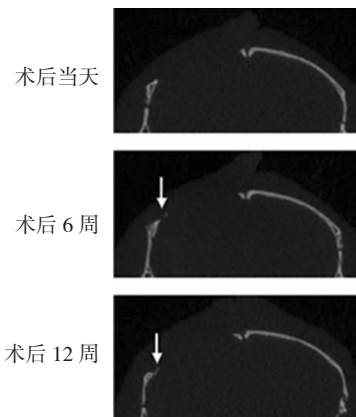


图 3 Micro-CT 扫描的颅骨缺损二维图像

Fig.3 Two-dimensional images of the calvarial defect by in vivo micro-CT scanning

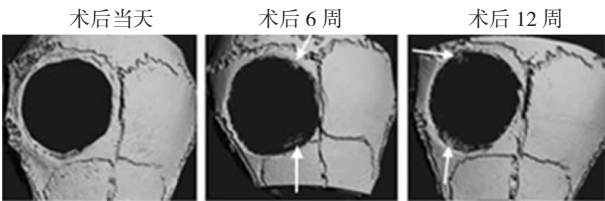


图 4 Micro-CT 扫描仪内置软件三维重建的颅骨图像
Fig.4 Three-dimensional images of the skull by micro-CT scanner's built-in software

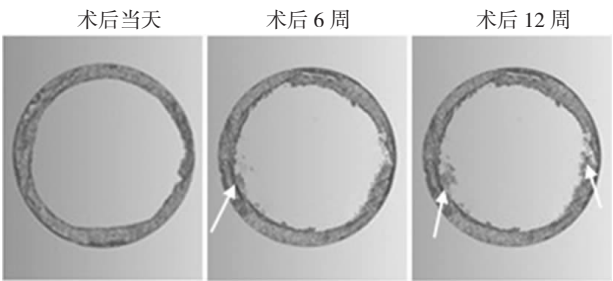


图 5 Mimics 软件重建的颅骨缺损部位三维图像
Fig.5 Three-dimensional images of calvarial defect by Mimics software

表 1 Micro-CT 扫描仪内置软件测量的缺损内新生骨体积及愈合率

Tab.1 The new bone volume and bone healing rate measured by micro-CT scanner's built-in software

时间	新生骨体积 (mm ³)	骨愈合率 (%)
术后 6 周	0.041 ± 0.001	1.616 ± 0.044
术后 12 周	0.058 ± 0.001	2.284 ± 0.032
<i>t</i> 值	-36.427	-83.500
<i>P</i> 值	0.000	0.000

表 2 Mimics 软件测量出的缺损内新生骨体积及愈合率

Tab.2 The new bone volume and bone healing rate measured by Mimics software

时间	新生骨体积 (mm ³)	骨愈合率 (%)
术后 6 周	0.041 ± 0.002	1.644 ± 0.073
术后 12 周	0.058 ± 0.001	2.288 ± 0.052
<i>t</i> 值	-14.965	-15.325
<i>P</i> 值	0.000	0.000

3 讨论

Micro-CT 扫描已被广泛应用于动物缺损模型或骨缺损修复材料的研究。通过 Micro-CT 扫描仪内置软件重建并计算出的骨愈合量是基于三维方向的测量,且进行图像重建的同时即完成计算,无需将扫描得到的二维图片导出再使用其他软件完成重建并测量^[6-7]。但其测量出的新骨体积,是基于三维重建之前描画的 ROI,即需在相同坐标位置画 ROI,以确保每次扫描后重建的区域相同,这要求在不同扫描时间点动物的目标扫描区域需摆放相同位置,尽管本实验利用海绵辅助固定小鼠头颅,但因小鼠为活体动物及人为因素,仍不能确保小鼠头颅前后摆放位置完全相同,且完成多个样本的重建和计算时,程序运行较慢,增加了结果运算的时间和所需费用。

利用 Mimics 软件时,首先完成小鼠头颅三维重建,得到的图像旋转至观察颅骨缺损的最佳视角,再完成缺损内新生骨体积的测量^[14-15],在前后不同扫

表 3 术后 6 周 Mimics 和 Micro-CT 内置软件测量的结果比较

Tab.3 Comparison on the measured results between Mimics and micro-CT scanner's built-in software at 6 weeks postoperatively

	测量指标	术后 6 周	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
新生骨体积 (mm ³)	Micro-CT内置软件测量结果	0.041 ± 0.001	0.471	0.650
	Mimics软件测量结果	0.041 ± 0.002		
骨愈合率 (%)	Micro-CT内置软件测量结果	1.616 ± 0.044	-0.147	0.887
	Mimics软件测量结果	2.288 ± 0.052		

表 4 术后 12 周 Mimics 和 Micro-CT 内置软件测量的结果比较

Tab.4 Comparison on the measured results between Mimics and micro-CT scanner's built-in software at 12 weeks postoperatively

	测量指标	术后 12 周	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
新生骨体积 (mm ³)	Micro-CT内置软件测量结果	0.058 ± 0.001	0.471	0.650
	Mimics软件测量结果	0.058 ± 0.001		
骨愈合率 (%)	Micro-CT内置软件测量结果	2.284 ± 0.032	-0.147	0.887
	Mimics软件测量结果	2.288 ± 0.052		

描时间小鼠头颅可任意摆放,避免了 μ CT V6.1 测量时小鼠头颅必须摆放于同一位置的误差。同时, Mimics 软件基于三维图像计算出的新骨体积及愈合率,较二维方法测量的新骨面积及愈合率更具代表性,这与 Micro-CT 内置软件的特点一致,但前者还可避免外来标记物介入。此外,利用 Mimics 这种免费软件进行测量,可以节省使用 Micro-CT 进行结果运算的费用。但此种测量方法需要电脑安装 Mimics 软件,且实验者需对这种软件进行学习,才能正确测量,但操作较简单,初学者也能很快掌握。

本实验中 Micro-CT 扫描仪内置软件 μ CT V6.1 和 Mimics 软件测量颅骨缺损内骨愈合的结果均显示,即使在术后 12 周,缺损内骨愈合率均小于 10%,符合骨临界缺损(critical size defect,CSD)标准,即直径 4 mm 缺损是成年小鼠颅骨的 CSD,这与 Gupta 等^[16]的研究一致,从而验证了本实验采用的 2 种测量方法的可靠性。江晓兵等^[15]利用 Mimics 软件计算骨质疏松患者椎体骨内注射的骨水泥体积,并证明了它对 CT 扫描的二维图像进行重建后计算出的骨水泥体积的准确性及可重复性。本实验中,在术后 6 周和 12 周, Mimics 软件结果与 μ CT V6.1 测量结果相比,差异均无统计学意义,此实验结果表明 Mimics 软件对颅骨缺损内新生骨测量结果的准确性,与江晓兵等^[15]的观点一致。

总之,本研究表明, Mimics 软件对颅骨缺损新生骨的测量结果与 Micro-CT 扫描仪内置软件 μ CT V6.1 测量结果的差异无统计学意义,无需引入其他标记物,且测量过程较简单,为 Micro-CT 评估生物材料修复动物颅骨缺损的效果,提供了一种有效的测量手段。

参 考 文 献

- [1] Levi B,James AW,Nelson ER,et al.Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects[J].PLoS One,2010,5(6): e11177.
- [2] Ye JH,Xu YJ,Gao J,et al.Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2-modified iPSCs[J].Biomaterials,2011,32(22):5065-5076.
- [3] Lin CY,Chang YH,Kao CY,et al.Augmented healing of critical-size calvarial defects by baculovirus-engineered MSCs that persistently express growth factors[J].Biomaterials,2012,33(14):3682-3692.
- [4] Jiang Y,Zhao J,White DL,et al.Micro CT and micro MR imaging of 3D architecture of animal skeleton[J].J Musculoskelet Neuronal Interact,2000,1(1):45-51.
- [5] Waarsing JH,Day JS,Weinans H.Longitudinal micro-CT scans to evaluate bone architecture[J].J Musculoskelet Neuronal Interact,2005,5(4):310-312.
- [6] Waarsing JH,Day JS,van der Linden JC,et al.Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats;a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data[J].Bone,2004,34(1):163-169.
- [7] Perilli E,Le V,Ma B,et al.Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized,zoledronic acid-treated,and sham-operated rats[J].Osteoporos Int,2010,21(8):1371-1382.
- [8] Yao W,Cheng Z,Busse C,et al.Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis;a longitudinal study of gene expression in bone tissue from glucocorticoid-treated mice[J].Arthritis Rheum,2008,58(6):1674-1686.
- [9] Kramer I,Loots GG,Studer A,et al.Parathyroid hormone (PTH)-induced bone gain is blunted in SOSTO verexpressing and deficient mice[J].J Bone Miner Res,2010,25(2):178-189.
- [10] Cowan CM,Shi YY,Aalami OO,et al.Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects[J].Nat Biotechnol,2004,22(5):560-567.
- [11] Cacciafesta V,Dalstra M,Bosch C,et al.Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects[J].Eur J Orthod,2001,23(6):733-740.
- [12] 范海涛,苏秀云,刘蜀彬,等.计算机辅助术前计划 Sky 膨胀式椎体成形器治疗骨质疏松椎体压缩骨折[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(48):9423-9426.
- [13] 赵峰,高勃,刘震侠,等.Dicom 标准和 Mimics 软件辅助建立下颌骨三维有限元模型[J].西南国防医药,2005,15(5):479-481.
- [14] 张国栋,陶圣祥,毛文玉,等.基于三维重建技术及有限元分析的骨密度测量[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(9):1539-1544.
- [15] 江晓兵,黄伟权,庞智晖,等.基于 Mimics 软件计算椎体强化术后椎体内骨水泥体积及骨水泥/椎体体积比的新方法[J].中国脊柱脊髓杂志,2013,23(3):238-243.
- [16] Gupta DM,Kwan MD,Slater BJ,et al.Applications of an athymic nude mouse model of nonhealing critical-sized calvarial defects[J].J Craniofac Surg,2008,19(1):192-197.

(责任编辑:冉明会)