

尹红霞, 张鹏, 刘云福, 等. 小鼠在体内耳微小结构的相位对比 Micro-CT 研究[J]. CT 理论与应用研究, 2017, 26(4): 403-410. doi:10.15953/j.1004-4140.2017.26.04.02.

Yin HX, Zhang P, Liu YF, et al. Imaging microstructures of mouse inner ears in situ by phase contrast micro-CT[J]. CT Theory and Applications, 2017, 26(4): 403-410. (in Chinese). doi:10.15953/j.1004-4140.2017.26.04.02.

小鼠在体内耳微小结构的相位对比 Micro-CT 研究

尹红霞¹, 张鹏¹, 刘云福², 杨正汉¹, 李静¹,
赵鹏飞¹, 吕晗¹, 肖体乔³, 鲜军舫², 王振常¹✉

1. 首都医科大学附属北京友谊医院放射科, 北京 100050
2. 首都医科大学附属北京同仁医院放射科, 北京 100730
3. 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201204

摘要: 目的: 通过相位对比 Micro-CT 研究小鼠在体内耳微小结构, 并探讨该技术对在体内耳微小结构的显示能力。方法: 成年小鼠, 麻醉后处死; 应用基于传播的相位对比 Micro-CT 扫描小鼠双侧内耳; 重建 CT 数据, 像素点大小 $9\ \mu\text{m}$; 进行图像重组, 得到像素点尺寸不同的 CT 图像。结果: 在像素点大小为 $9\ \mu\text{m}$ 的 CT 图像上, 可清晰观察耳蜗蜗轴、骨螺旋板、椭圆囊斑、球囊斑等微小结构; 像素点大小为 $36\ \mu\text{m}$ 的图像仍可显示以上目标结构; 像素点大小为 $54\ \mu\text{m}$ 的图像上, 各微小结构边缘不太清晰, 只可显示其轮廓; 像素点大小为 $72\ \mu\text{m}$ 的图像上, 椭圆囊斑和球囊斑已不可见。结论: 基于传播的相位对比 Micro-CT 对小鼠在体内耳微小结构成像具有明显优势, 且在像素点尺寸不大于 $36\ \mu\text{m}$ 的条件下, 相位对比 Micro-CT 可较为清晰地显示在体内小鼠内耳微小结构。

关键词: 相位对比 Micro-CT; 内耳; 在体成像; 微小结构; 耳石器

doi:10.15953/j.1004-4140.2017.26.04.02 中图分类号: R 814; TP 391.5 文献标志码: A

内耳是位于颞骨的重要功能器官, 其主要功能是形成听觉和维持平衡觉。内耳结构细小且复杂, 对其进行无创性的影像观察一直是影像技术的难点。目前, 临床广泛应用的高端螺旋 CT 受空间分辨力 (可达 $0.3\ \text{mm}$) 的影响, 无法清晰显示蜗轴、骨螺旋板、椭圆囊斑和球囊斑等微小结构。近几年, 基于平板探测器的锥形束 CT (空间分辨力可达 $75\ \mu\text{m}$) 也开始用于颞骨成像, 但其空间分辨能力仍无法满足对内耳微小结构的观察^[1-3]。吸收对比 Micro-CT (空间分辨力可达 $10\ \mu\text{m}$) 借助特殊染色方法, 可用于内耳微小结构离体标本的观察, 但无法用于活体或在体成像^[4]。

相位对比 Micro-CT (phase contrast micro-CT) 是近 20 年兴起的成像新技术之一^[5], 与吸收对比成像相比, 该技术对轻原子序数物质组成的物体 (如乳腺等) 进行成像, 密度分辨力可提高约 1 000 倍; 对原子序数较大物质组成的物体 (如骨组织等) 进行成像, 密度分辨力可提高约 100 倍^[6]。近 10 年来, 有学者相继应用该技术对内耳离体标本进行成像实验研究。2007 年, 尹红霞等^[7-8]应用该技术对豚鼠耳蜗的显微结构进行了观察和三维显示。

收稿日期: 2017-03-08。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81000612); 北京市自然科学基金项目 (3122017); 科技北京百名领军人才培养工程 (Z141107001514002)。

2008 年, Parsons 等^[9]用相位对比成像观察了小鼠离体标本的中耳和耳蜗结构。2012 至 2013 年, 孙程成^[10-11]等用相位对比 Micro-CT 对豚鼠耳蜗和小鼠听泡的离体标本进行成像研究。但这些研究都局限于离体标本。

本研究拟用基于传播的相位对比 Micro-CT 对小鼠在体内耳进行成像研究, 探讨该技术对内耳微小结构的显示能力。

1 方法

1.1 实验设备和原理

本实验在上海光源 (Shanghai Synchrotron Radiation Facility, SSRF) X 射线成像及生物医学应用光束线站 (BL13W1) 完成。成像方法是基于传播的 X 射线相位对比 Micro-CT 技术, 成像系统实验装置示意图详见图 1。该系统由同步辐射光源、晶体单色器、样品转台和 CCD 探测器组成, 储存环束流强度为 210 mA。

同步辐射扭摆器光源产生的 X 射线, 经过双晶单色器单色化后, 得到空间相干性较好的单色 X 光束。单色光束照射被检物体后, 发生衰减或相位改变, 然后继续在空气中传播距离 d , 最后被 X 射线探测器记录, 得到吸收对比和相位对比混合信息的图像。X 射线在穿过被检物体后, 在空气中传播距离 d , 使得相位信息转化为强度变化, 相位变化被探测器记录。距离 d 需要根据图像测试质量进行调整, 以获得最佳图像质量的距离值为准。基于传播的相位对比 Micro-CT 满足菲涅尔衍射原理。

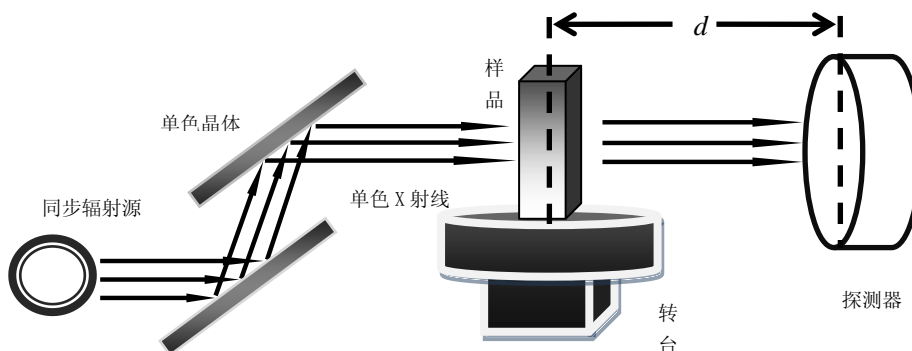


图 1 相位对比 Micro-CT 实验装置示意图

Fig.1 Diagram of phase contrast Micro-CT system

1.2 研究对象和实验方法

成年昆明小鼠, 体重 200 g 左右。腹腔注射戊巴比妥钠 (1.5%, 0.1 mL/20 g) 麻醉, 然后继续注射过量戊巴比妥钠, 使小鼠麻醉致死。

先将样品转台进行旋转中心轴校正, 将麻醉致死的小鼠固定于实验台上, 使照射野覆盖双侧颞骨区域, 进行相位对比 Micro-CT 扫描。CT 扫描参数: 单色 X 射线能量 25 keV, CCD 探测器像素大小 9 μm , 位深 12 bit, 成像视野 35 mm (W) \times 3.8 mm (H), 360° 数据采集。因扫描视野限制, 垂直方向小鼠内耳需进行上、下视野两次 CT 数据采集, 两次扫描野存在较小重叠。CT 扫描在小鼠死亡后 1 h 内完成。实验过程中未对实验小鼠进行任何有创处理,

死亡后 1 h 内内耳结构的组织变形程度很小，可以忽略不计。因此，可以认定在体内耳微小结构的形态与活体状态接近。

1.3 数据分析

应用实验站 CT 重建软件 (X-TRACT, CSIRO) 进行相位对比 Micro-CT 数据重建, 重建方法为滤波反投影 (filtered back-projection, FBP)。通过对上、下视野数据进行拼接, 得到完整覆盖双侧内耳的相位对比 Micro-CT 数据。应用 VGStudio Max (公司: Volume Graphics, 版本: v2.1) 对内耳微小结构进行多角度观察。相位对比 Micro-CT 在 X、Y、Z 方向上的像素点大小均为 $9\ \mu\text{m}$ 。

应用自编软件, 对像素点大小为 $9\ \mu\text{m}$ 的相位对比 Micro-CT 数据进行图像重组, 分别得到像素尺寸为 $18\ \mu\text{m}$ 、 $36\ \mu\text{m}$ 、 $54\ \mu\text{m}$ 和 $72\ \mu\text{m}$ 的 CT 数据。

2 结果

2.1 相位对比 Micro-CT 对小鼠在体内耳微小结构的显示

本研究应用相位对比 Micro-CT 技术获得了清晰的双侧内耳在体状态图像 (图 2)。

图 2 (a) 显示, 小鼠耳蜗为螺旋状骨管, 前庭阶和鼓阶由底圈向顶圈逐渐变窄。蜗轴由疏松骨组成, 在图像上显示为“蜂窝”状。骨螺旋板与蜗轴相连, 向耳蜗骨管内探出两片菲薄的骨板, 尖端呈不闭合的“鸟嘴”样, 为神经出入通道。骨螺旋板绕蜗轴螺旋走形, 构成鼓阶和前庭阶的内侧分界线。图像未能显示与骨螺旋板相连的基底膜。骨螺旋板内侧见低密度膨大腔隙, 为螺旋神经节区域 (Rosenthal 腔)。鼓阶底圈终端可见线状圆窗膜。

图 2 (b)、图 2 (c) 和图 2 (d) 显示, 小鼠前庭骨腔呈不规则形, 与三个半规管相通。前庭内-贴近前庭骨壁区可见线状结构高密度影, 为椭圆囊斑和球囊斑。前庭窗位于前庭外壁, 由中耳的镫骨足板封闭。相位对比 Micro-CT 图像清晰显示镫骨足板及周围结构。前、后半规管、水平半规管及壶腹骨腔均可全程显示。

2.2 不同像素大小的相位对比 Micro-CT 对内耳微小结构显示能力的比较

图 3 所示为不同像素大小 ($9\ \mu\text{m}$ 、 $18\ \mu\text{m}$ 、 $36\ \mu\text{m}$ 、 $54\ \mu\text{m}$ 和 $72\ \mu\text{m}$) 的相位对比 Micro-CT 图像。像素大小为 $9\ \mu\text{m}$ 的图像 (图 3A) 是实验所获取的 CT 图像, 其显示的蜗轴、骨螺旋板、椭圆囊斑和球囊斑等微小结构, 边缘锐利、清晰。随着像素点变大, 图像所显示结构的清晰度逐渐下降。其中, 在图 3 (b) 和图 3 (c) ($18\ \mu\text{m}$ 和 $36\ \mu\text{m}$) 中, 蜗轴、骨螺旋板、椭圆囊斑和球囊斑等微小结构还可以被清晰观察。在图 3 (d) ($54\ \mu\text{m}$) 中, 各微小结构边缘变得模糊, 只可见其走形和轮廓。而在图 3 (e-1) ($72\ \mu\text{m}$) 中, 蜗轴和骨螺旋板隐约可见, 骨螺旋板的螺旋缘不能清晰分辨; 椭圆囊斑和球囊斑不可见 (图 3 (e-2))。

3 讨论

内耳的蜗轴、骨螺旋板、椭圆囊斑和球囊斑等微小结构是相关听觉、平衡觉生理和病理的重要解剖结构, 是基础医学研究和相关疾病诊疗的基础。但这些结构深埋于致密的颞骨内, 其结构形态在体显示困难。传统的内耳微小结构形态学研究主要依赖组织切片等手

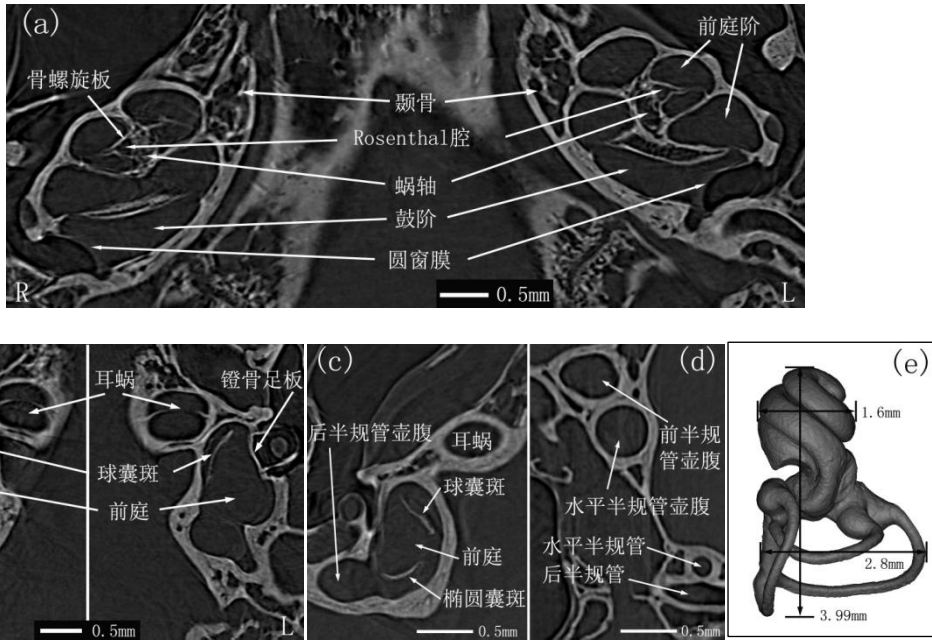


图 2 小鼠在体内耳相位对比 Micro-CT 图像。(a) 平行于双侧耳蜗蜗轴层面；(b) 双侧前庭层面；(c) 经后半规管壶腹层面；(d) 经前半规管和水平半规管壶腹层面；(e) 内耳迷路的三维显示

Fig. 2 Phase contrast Micro-CT images of mouse inner ears in situ. (a) Slice image paralleling to both cochlear modiolus. (b) Slice image paralleling to both vestibules. (c) Slice image across ampulla of posterior semicircular canal. (d) Slice image across ampulla parts of anterior semicircular canal and horizontal semicircular canal. (e) Three-dimensional view of the inner ear bony labyrinth (left)

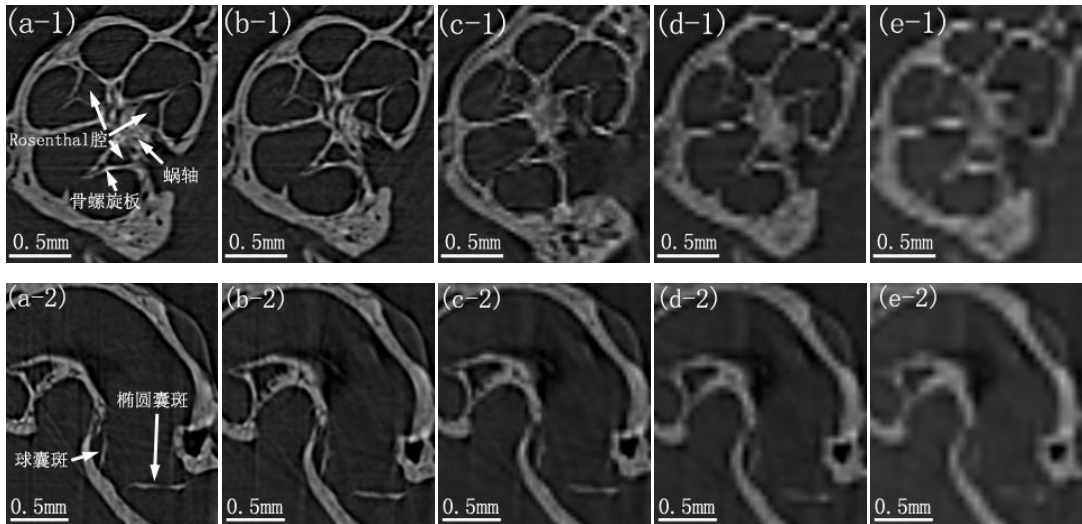


图 3 不同像素尺寸相位对比 Micro-CT 图像对内耳微小结构显示的比较。(a-1) 平行于蜗轴层面图像；(a-2) 经过前庭阶和前庭连接区的层面。(a)~(e) 像素点大小分别为 9 μm 、18 μm 、36 μm 、54 μm 和 72 μm 的 CT 图像

Fig. 3 Comparing phase contrast Micro-CT images of different pixel sizes to visualize the microstructures of inner ear. (a-1) Slice image paralleling to modiolus. (a-2) Slice image across over connection area between scala vestibuli and vestibule. (a)~(e) The CT images of pixel sizes of 9 μm , 18 μm , 36 μm , 54 μm and 72 μm , respectively

段，用光学显微镜和电镜进行观察^[12-13]。

20 世纪 90 年代以来，正交平面荧光光学切片(orthogonal plane fluorescence optical sectioning, OPFOS)显微镜^[14-17]、扫描薄片激光成像显微镜(scanning thin-sheet laser imaging microscopy, sTSLIM)^[18-19]和吸收对比的 Micro-CT^[4]等技术借助特殊的标本处理方法，被用于内耳离体标本的显微结构观察。由于离体研究无法保持真实的在体环境，导致了离体实验结果与在体时的组织变形和数据差异。光学相干断层成像(optical coherence tomography, OCT)^[20-21]和高场 MRI^[22-25]可以用于内耳活体成像，但是受空间分辨力的限制，无法真正显示微小结构的三维形态。

本研究将相位对比 Micro-CT 这一新的影像技术用于小鼠在体内耳成像，不仅清晰显示了耳蜗、前庭和半规管的骨性轮廓，而且可以清晰观察蜗轴、骨螺旋板、椭圆囊斑、球囊斑等微小结构。在体成像一直在临床实践与医学科研中发挥着独特而无可替代的作用，对实验室小动物的在体成像也日益发展成为临床前生物医学研究的关键组成部分。因此，基于同步辐射光源的相位对比 Micro-CT 应用于小鼠在体内耳微小结构成像，在方法学上具有突破性进展。

理论研究证明，与吸收对比 Micro-CT 相比，相位对比 Micro-CT 的关键技术优势是大幅度提高了密度分辨力。耳蜗蜗轴由疏松骨构成，骨螺旋板是菲薄的骨板，而椭圆囊斑和球囊斑的耳石膜是由碳酸钙沉积的高密度薄膜结构。虽然这些结构都是对 X 射线强吸收的结构，但由于它们结构纤细，被致密的颞骨包绕，在密度分辨力有限的吸收对比 Micro-CT 成像中，这些微小结构的信息就很容易被淹没。相位对比 Micro-CT 对骨结构成像的密度分辨力提高 100 倍^[6]，更易于将内耳微小结构显示出来。应用该技术对小鼠在体内耳进行微小结构显示，无需注射影像增强对比剂，是一种无损性的内耳微小结构观察手段。而小鼠的基因与人类的基因具有高度的同源性，其内耳结构与人类内耳结构也存在极大相似性。因此，小鼠的内耳微小结构研究将为人类内耳微小结构研究提供影像学基础，对听觉和平衡觉相关研究具有重要意义。

不同像素点大小的相位对比 Micro-CT 图像重组的结果，分析了空间分辨力对内耳微小结构显示的影响。CT 系统的空间分辨力主要由射线源焦点尺寸和探测器像素大小决定。本研究所使用的相位对比 Micro-CT 成像系统，采用理想的平行光源，因此，光源对成像系统空间分辨能力的影响可忽略，该系统的空间分辨力只决定于探测器像素大小。图像重组后，等同于获得了空间分辨力分别为 18 μm 、36 μm 、54 μm 和 72 μm 的图像。结果对比表明，在该系统的密度分辨力不变的条件下，空间分辨力降低到 36 μm 时，小鼠的蜗轴、骨螺旋板、椭圆囊斑和球囊斑等内耳微小结构可被清晰显示；空间分辨力降低到 54 μm 时，这些微小结构的显示就不再清晰；而空间分辨力降低到 72 μm 时，微小结构几乎不可见。由此可推断，构建高密度分辨力的相位对比 Micro-CT 系统，实现不小于 36 μm 的空间分辨力，即可满足小鼠在体内耳微小结构的显示。

本研究表明，基于传播的相位对比 Micro-CT 对小鼠在体内耳微小结构成像具有明显的优势。在像素点尺寸不大于 36 μm 的条件下，相位对比 Micro-CT 可观察在体小鼠内耳微小结构。相位对比 Micro-CT 作为一种最新的 CT 成像技术，具有高密度分辨力和高空间分辨力的优势，并且该方法具有无创性、可重复性强、操作简便等特点，将在内耳形态结构和疾病诊疗研究方面发挥优势。

参考文献

- [1] Zou J, Lahelma J, Koivisto J, et al. Imaging cochlear implantation with round window insertion in human temporal bones and cochlear morphological variation using high-resolution cone beam CT[J]. *Acta Oto-Laryngologica*, 2015, 135(5): 466-472.
- [2] Theunisse HJ, Joemai RM, Maal TJ, et al. Cone-beam CT versus multi-slice CT systems for postoperative imaging of cochlear implantation: A phantom study on image quality and radiation exposure using human temporal bones[J]. *Otology & Neurotology*, 2015, 36(4): 592-599.
- [3] Erovic BM, Chan HH, Daly MJ, et al. Intraoperative cone-beam computed tomography and multi-slice computed tomography in temporal bone imaging for surgical treatment[J]. *Otolaryngology-head and Neck Surgery*, 2014, 150(1): 107-114.
- [4] David R, Stoessel A, Berthoz A, et al. Assessing morphology and function of the semicircular duct system: Introducing new in-situ visualization and software toolbox[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32772.
- [5] Wu X, Liu H. Phase-space evolution of X-ray coherence in phase-sensitive imaging[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(22): E44-52.
- [6] Zhou SA, Brahme A. Development of phase-contrast X-ray imaging techniques and potential medical applications[J]. *Physica Medica*, 2008, 24(3): 129-148.
- [7] Yin H, Liu B, Gao X, et al. Application of synchrotron source based DEI method in guinea pig cochleae imaging[J]. *Progress in Natural Science*, 2007, 17(1): 59-67.
- [8] Yin HY, Zhao T, Liu B, et al. Visualization of guinea pig cochleae with computed tomography of diffraction enhanced imaging and comparison with histology[J]. *Journal of X-ray Science and Technology*, 2007, 15(2): 73-84.
- [9] Parsons DW, Morgan K, Donnelley M, et al. High-resolution visualization of airspace structures in intact mice via synchrotron phase-contrast X-ray imaging (PCXI) [J]. *Journal of Anatomy*, 2008, 213(2): 217-227.
- [10] 孙程成, 蒋子栋, 张凯. 小鼠听泡 Micro-CT 实验研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 48(8): 673-676.
Sun CC, Jiang ZD, Zhang K. Micro-CT imaging research of acoustic capsule in mice[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2013, 48(8): 673-676. (in Chinese).
- [11] 孙程成, 蒋子栋, 张凯. 豚鼠耳蜗的显微 CT 技术影像学研究[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(48): 3442-3444.
Sun CC, Jiang ZD, Zhang K. Micro-CT imaging of guinea pig cochlear[J]. *National Medical Journal of China*, 2012, 92(48): 3442-3444. (in Chinese).
- [12] Lins U, Farina M, Kurc M, et al. The otoconia of the guinea pig utricle: Internal structure, surface exposure, and interactions with the filament matrix[J]. *Journal of Structural Biology*, 2000, 131(1): 67-78.
- [13] Hughes I, Thalmann I, Thalmann R, et al. Mixing model systems: using zebrafish and mouse inner ear mutants and other organ systems to unravel the mystery of otoconial development[J]. *Brain Research*, 2006, 1091(1): 58-74.
- [14] Voie AH. Imaging the intact guinea pig tympanic bulla by orthogonal-plane fluorescence optical sectioning microscopy[J]. *Hearing Research*, 2002, 171(1-2): 119-128.
- [15] Voie AH, Spelman FA. Three-dimensional reconstruction of the cochlea from two-dimensional images of optical sections[J]. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 1995, 19(5): 377-384.
- [16] Voie AH, Burns DH, Spelman FA. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning:

- Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens[J]. *Journal of Microscopy*, 1993, 170(3): 229-236.
- [17] Hofman R, Segenhout JM, Wit HP. Three-dimensional reconstruction of the guinea pig inner ear, comparison of OPFOS and light microscopy, applications of 3D reconstruction[J]. *Journal of Microscopy*, 2009, 233(2): 251-257.
- [18] Kopecky BJ, Duncan JS, Elliott KL, et al. Three-dimensional reconstructions from optical sections of thick mouse inner ears using confocal microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2012, 248(3): 292-298.
- [19] Kopecky B, Johnson S, Schmitz H, et al. Scanning thin-sheet laser imaging microscopy elucidates details on mouse ear development[J]. *Developmental Dynamics*, 2012, 241(3): 465-480.
- [20] Cho NH, Jang JH, Jung W, et al. In vivo imaging of middle-ear and inner-ear microstructures of a mouse guided by SD-OCT combined with a surgical microscope[J]. *Optics Express*, 2014, 22(8): 8985-8995.
- [21] Subhash HM, Davila V, Sun H, et al. Volumetric in vivo imaging of intracochlear microstructures in mice by high-speed spectral domain optical coherence tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(3): 036024.
- [22] Thylur DS, Jacobs RE, Go JL, et al. Ultra-high-field magnetic resonance imaging of the human inner ear at 11.7 Tesla[J]. *Otology & Neurotology*, 2017, 38(1): 133-138.
- [23] Lane JJ, Witte RJ, Bolster B, et al. State of the art: 3T imaging of the membranous labyrinth[J]. *American Journal of Neuroradiology*, 2008, 29(8): 1436-1440.
- [24] van Egmond SL, Visser F, Pameijer FA, et al. In vivo imaging of the inner ear at 7T MRI: Image evaluation and comparison with 3T[J]. *Otology & Neurotology*, 2015, 36(4): 687-693.
- [25] van Egmond SL, Visser F, Pameijer FA, et al. Ex vivo and in vivo imaging of the inner ear at 7 Tesla MRI[J]. *Otology & Neurotology*, 2014, 35(4): 725-729.

Imaging Microstructures of Mouse Inner Ears in Situ by Phase Contrast Micro-CT

YIN Hong-xia¹, ZHANG Peng¹, LIU Yun-fu², YANG Zheng-han¹, LI Jing¹,
ZHAO Peng-fei¹, LV Han¹, XIAO Ti-qiao³, XIAN Jun-fang², WANG Zhen-chang¹✉

1. Department of Radiology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University,
Beijing 100050, China

2. Department of Radiology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University,
Beijing 100730, China

3. Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai
201204, China

Abstract: Objective: Aim of the study was to image the mouse inner ears in situ by phase contrast Micro-CT, and explore the ability of this technique to display the microstructures. Method: The experiment was performed according to our institution's guidelines on the care and use of laboratory animals. An adult mouse was anesthetized and sacrificed, followed by phase contrast Micro-CT scan for both inner ears. The CT data sets were reconstructed using the filtered back-projection (FBP) algorithm. Different pixel-size CT images, including 9 μm , 18 μm , 36 μm , 54 μm and 72 μm , were obtained after image processing. Results: The CT images of 9 μm pixel size

visualized clearly the microstructures of inner ears, including modiolus, osseous spiral lamina, utricular macula and saccular macula. The edge sharpness of the microstructures was decreasing when the pixel size of the images became bigger. The CT images of $18\mu\text{m}$ and $36\mu\text{m}$ pixel size also displayed all of the microstructures. The microstructures were seen in the CT images of $54\mu\text{m}$ pixel size, but their edges were blurry. The CT images of $72\mu\text{m}$ pixel size showed an indistinct outline only of the modiolus and osseous spiral lamina, while the outline of utricular macula and saccular macula was not observed. Conclusion: Phase contrast Micro-CT was demonstrated to have the potential to visualize the microstructures of mouse inner ears in situ.

Keywords: phase contrast Micro-CT; inner ear; in situ imaging; microstructure; otolith organ



作者简介: 尹红霞 (1979—), 女, 首都医科大学附属北京友谊医院放射科工程师, 研究方向: 相位对比 CT 的医学应用研究及眼、耳小器官的显微影像学研究, Tel: 010-63139371, E-mail: 282496774@qq.com; 王振常[✉] (1964—), 男, 首都医科大学附属北京友谊医院教授、博士生导师, 主要从事头颈部影像学及耳鸣的发病机制研究, Tel: 010-63139368, E-mail: cjr.wzhch@vip.163.com。