

王泽静,王询,肖康,等. 微型 CT 在血管钙化动物模型中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 853-856.
Wang ZJ, Wang X, Xiao K, et al. Advances in the application of micro-CT in animal models of vascular calcification [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 853-856.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.017

微型 CT 在血管钙化动物模型中的应用进展

王泽静¹,王询²,肖康¹,张晶^{2*}

(1. 河北省秦皇岛市第一医院 CT 室,河北 秦皇岛 066000; 2. 河北省秦皇岛市第一医院 心内科,河北 秦皇岛 066000)

【摘要】 血管钙化是钙盐过度沉积于血管壁导致的异位钙化现象,是动脉粥样硬化的病理表现,是糖尿病、高血压病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑梗死、肾功能衰竭等多种疾病的共有的病理生理过程。目前的 CT 技术可以完整的重建钙化的动脉并提供准确的量化信息。高分辨率的微型 CT 可以区分和量化宏观和微观的血管钙化。将 CT 与 18F-NaF micro-PET/CT 相结合,可以增强体内活动的微钙化的检测,并帮助我们了解不同信号通路和药物在血管钙化发展中的作用。更重要的是 3D 微型 CT 可以和组织病理学、免疫组化、蛋白组学处理相结合,提供同一血管片段的互补信息。微型 CT 的技术进步可以为血管钙化的动物活体研究提供更多的方法。

【关键词】 血管钙化;微型 CT;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0853-04

Advances in the application of micro-CT in animal models of
vascular calcification

WANG Zejing¹, WANG Xun², XIAO Kang¹, ZHANG Jing^{2*}

(1. Department of CT Room, the First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, China.
2. Department of Cardiology, the First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000)
Corresponding author: ZHANG Jing. E-mail: zhangjing8162@126.com

【Abstract】 Vascular calcification is an ectopic calcification phenomenon caused by excessive deposition of calcium salts in the vascular wall. This pathological manifestation is common in diseases such as atherosclerosis, diabetes, hypertension, and chronic renal insufficiency; it is an important risk factor for cardiovascular and cerebrovascular diseases. Current computed tomography (CT) techniques can completely reconstruct calcified arteries and provide accurate quantitative information. High resolution micro-CT can distinguish and quantify areas of macroscopic and microscopic vascular calcification. CT combined with 18F-sodium fluoride (18F-NaF) micro-PET/CT can enhance the detection of microcalcification in vivo and aid in understanding the roles of signaling pathways and drugs in the development of vascular calcification. Furthermore, three-dimensional micro-CT can be combined with histopathological, immunohistochemical, and proteomic analysis method to provide complementary information regarding a single vascular segment. Advances in micro-CT techniques may provide additional method for the analysis of vascular calcification in animals *in vivo*.

【Keywords】 vascular calcification; micro-CT; Animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金课题(30871086),秦皇岛市科技计划(201602A239),秦皇岛市科学技术研究与发展计划(201902A180)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(30871086), Science and Technology Planning of QinHuangDao(201602A239), Science and Technology Research and Development Program of QinHuangDao(201902A180)。

【作者简介】 王泽静(1982—),女,硕士研究生,研究方向:心脑血管病变的影像学研究。Email:876053997@qq.com

【通信作者】 张晶(1978—),男,博士研究生,硕士生导师,研究方向:血管介入影像学、心身医学、心力衰竭的研究和临床工作。
Email:zhangjing8162@126.com

血管钙化是钙盐过度沉积于血管壁导致的异位钙化现象,是动脉粥样硬化的病理表现,是糖尿病、高血压病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑梗死、肾功能衰竭等多种疾病的共有的病理生理过程^[1]。CT 作为动物模型中血管钙化分析的一种工具,能够非破坏性的在三维创建目标血管并定位和量化其钙化程度,在动脉粥样硬化病理生理研究中有重要地位。对微型 CT 在血管钙化动物模型中的应用进展进行综述。

1 研究动脉钙化的常用小动物模型

由于小鼠和人类有许多共同的生理特征,小鼠可以为研究人类动脉钙化、畸形和主动脉瓣钙化的发病机制提供合适的模型。研究动脉中膜钙化常用慢性肾脏病的啮齿类动物模型。常见的慢性肾脏病的啮齿动物模型制备方法有:维生素 D3 超负荷、腺嘌呤注射和 5/6 肾切除术^[2]。在这些模型中观察到的钙化通常是局灶性分布的,本质上是“片状”^[3],这与在慢性肾病患者中观察到的钙化模式相似^[4]。研究动脉内膜钙化常用载脂蛋白 E 基因(ApoE)敲除和低密度脂蛋白受体基因(LDLR)敲除的小鼠,在这类模型中可检测到微钙化和大钙化^[5],这与人类血管的内膜钙化情况一样。

2 研究动脉钙化的传统方法

2.1 化学分析的方法

常用的方法是动脉烤干称重,放入盐酸中溶解,取上清液测钙含量,检测吸光度值,计算出钙含量。然而,使用这种方法酸性溶液将组织完全溶解破坏,并且测算到的钙化不能区分是真正的组织钙化还是仅仅含钙超量。更重要的是这种方法无法对钙化进行血管定位和分布情况的分析。

2.2 组织学方法

常用的组织病理学钙化染色技术包括:茜素红 S(Alizarin red S)钙染色法和冯·科萨(Von kossa)染色法。二者的原理不同:茜素红 S 钙染色法:通过螯合技术,使钙离子和茜素红 S 产生复合物,来分析固定处理的细胞样本中橘红色钙沉积。冯·科萨染色(Von kossa)利用钙盐中的磷酸根或碳酸根与硝酸银溶液与反应生成相应的磷酸银或碳酸银,后者可在紫外线条件下还原为黑色的金属银。两种方法各有利弊,茜素红 S 和钙离子复合物中,钙质容易从组织中溶解到溶液中,形成弥散物,相对不稳定。

而冯·科萨染色不直接检测钙离子,而是检测与钙离子结合的磷酸根或碳酸根,但是,磷酸根和碳酸根的存在并不意味着钙离子一定存在,所以冯·科萨染色的特异性不强。

3 微型 CT 在血管钙化动物模型中的应用

3.1 微型 CT 的分类

临床工作中,血管钙化的检测几乎完全依赖 CT,目前螺旋 CT 的分辨率可以达到毫米级别,冠状动脉钙化积分是评估冠状动脉粥样硬化的进展的方法之一,但是临床 CT 的分辨率不足以用来观察小鼠这一类动物模型的血管钙化情况。因此,分辨率可达微米的高分辨微型 CT(Micro-CT)应运而生。按组装模式分类,微型 CT 系统分为两种^[6]:(1)标本旋转型 CT:X 线球管和探测器固定:样品在球管和探测器之间旋转,可做上下和前后移动。空间分辨率高,但扫描速度较慢,射线剂量大,多用于离体标本扫描。(2)X 线成像系统旋转型 CT:原理和螺旋 CT 一致,X 线球管和探测器运动,球管绕样品旋转。扫描速度快,射线剂量小,但空间分辨率较低,多用于活体动物扫描。

3.2 微型 CT 与普通 CT 的区别

与普通 CT 成像原理相同,用 X 线束对被检查对象一定厚度的层面进行扫描,由探测器接收透过该层面的 X 线,经过数学算法构建图像。与普通 CT 所不一样的是^[7]:(1)微型 CT 多使用平板探测器和锥形 X 线束,图像采集的速度和射线利用率高于普通 CT,以获得各向同性容积图像,并且有像素高、体素小的优点,成像信息丰富,获得的图像能与组织病理学结果相匹配;(2)微型 CT 成像区域较小,空间分辨率较高,分辨率可达到 1~10 μm ;(3)微型 CT 微焦斑尺寸小于 100 μm ,且功率远小于普通 CT,产生的 X 辐射较低。

3.3 软组织增强微型 CT

软组织(比如血管)与支撑材料(比如石蜡)之间 x 射线衰减对比较低,从而影响成像质量。使用重金属染色可以克服这个问题,常用的重金属染色剂有:四氧化钨^[8]、磷钨酸^[9]和碘^[10]。这些染色剂可以结合到样品的内部,提供更高的 X 线对比度。然而,染色剂的浓度和时间必须针对特定的组织类型做出调整。

3.4 其他软组织 CT 成像方案

有的重金属染色如磷钨酸与随后的组织学染

色方案不兼容,包括 HE 染色和 Weigert's 弹性蛋白染色,因此,工程师们研发了不依赖重金属染色的软组织 CT 成像方案^[11]。

X 射线相位衬度 CT 成像:相对于传统的吸收成像,相位衬度 CT 成像原理是:X 射线穿过物体时,物体内部各部位折射率的差异引起光的折射的差异,导致相位的变化。适用于弱吸收材料物体(生物软组织,聚合物),还可以减少吸收剂量。相位衬度成像可以使血管等软组织与周围的支撑结构的对比度提高 1000 倍以上。

K 缘减影 CT 成像,操作原理是,每一种元素吸收光子能量可以有几十倍的差异。即可使 CT 在某一元素的 K 吸收光子能量之下和之上两次扫描成像,然后减影,这样可以加大该特定元素的对比度,获得高密度分辨。

散射 CT 与荧光减影 CT 成像无需染色,但由于对技术要求很高,尚未在实验室内成熟应用。

在软组织的 CT 图像采集过程中,必须对软组织进行固定。首先使用酒精或玉米油的液体浸泡,然后使用琼脂糖凝胶、塑料包埋树脂、和石蜡等进行组织包埋。

3.5 微型 CT 动物模型中的血管钙化典型案例

目前为止,仅少数研究利用实验室微型 CT 分析动物模型中的血管钙化。2013 年 Huesa 等^[12]对小鼠的主动脉经玉米油浸泡处理固定后,使用微型 CT 扫描并进行三维重建,获得大小为 7~10 μm 的各向同性体素,在这些三维重建的血管中对钙化区域进行了精确量化评估。整个主动脉的钙化情况被完整的呈现出来。该成像方案为研究主动脉钙化的发展和临床干预的潜在治疗提供了一个强有力的工具。然而,该项研究的一个局限性是无法将 3D CT 数据与随后的 2D 组织病理学分析结合起来。为克服这一问题,Awan 等人^[13]使用动脉粥样硬化模型小鼠的主动脉用石蜡包埋,将同一动脉的钙化斑块使用微型 CT 三维重建分析与二维组织学分析相结合。然而,在这些研究中血管壁钙化斑块和细胞外基质(ECM)的精细结构并不能完美呈现,这主要是由于所使用的微型 CT 的分辨率(5~20 μm 的各向同性体素)不够。为克服血管钙化研究分辨率低的问题,使用多尺度 CT 扫描方法检测和量化血管中的钙化沉积,可以实现各向同性体素降至 0.5 μm 。Rawson 等^[14]将血管用福尔马林固定、脱水并包埋在石蜡中,首先对整个血管进行快速、低分辨率的

CT 扫描,以便在三维重建中显示钙化的位置和分布,然后以更高的分辨率对感兴趣区域进行扫描,以检查钙化斑块和血管细胞外基质的精细结构。这些更高分辨率的扫描可使用实验室 CT 实现 0.5 μm 的空间分辨率。或者使用实验室纳米 CT(NCT)可以实现亚微米(例如 150 nm)的分辨率。纳米 CT 可以观察到大鼠颈动脉的内膜^[15],随后可以对蜡包埋的血管进行组织学、免疫组织化学甚至激光捕获微型切割技术的研究^[13,15-16]。

3.6 微型 CT 对于微钙化的识别

动脉粥样硬化斑块内膜钙化的大小和分布与斑块的破裂密切相关,微钙化可以明显增加斑块破裂的风险^[17]。微型 CT 能够检测到血管中的微钙化,这些微钙化不容易被二维组织学方法发现,除非分析连续的组织切片。血管壁和钙化斑块的 X 射线衰减是相似的,导致两者之间的吸收对比度较低^[18]。因此,斑块和血管壁目前必须在软件中手动区分然后进行量化分析。未来如果能将钙化血管的 3-D 数据导入可随时处理和分析平台中,将大大提高微型 CT 分析血管钙化的实用性。

3.7 微型 CT 在活体动物模型血管钙化研究中的应用

微型 CT 能够检测活体动物模型血管钙化的进展过程,从而受到广泛关注。活体的微型 CT 可以在长程的动物研究中连续监测动物血管钙化的变化情况,而无需在多个不同的时间点处死动物,这正符合动物研究的 3R 原则(reduction(减少)、replacement(替代)、refinement(优化))。然而目前微型 CT 还没有在啮齿类动物的活体研究中广泛应用,主要是因为普通微型 CT 的分辨率较低。高分辨的锥型束微 CT 的发展和广泛应用必将推动啮齿类动物血管钙化的活体研究。

3.8 微型 CT 与 18F-NaF micro-PET/CT 相结合

18F-NaF micro-PET/CT 检测活体动物血管钙化的敏感性和特异性很高,并且在临床前研究中能够非常好的区分大钙化和微钙化^[18]。18F-NaF 以离子键形式结合到磷酸盐表面,更重要的是可结合到小鼠的不易被微型 CT 检测到的小血管的钙化表面^[19]。F-NaF 摄取情况是测量总钙化表面积或钙化斑块代谢活动程度的一种重要方式^[20]。相反,微型 CT 却无法测量钙化区域的代谢程度。因此,将微型 CT 与 18F-NaF micro-PET/CT 相结合可以很好的检测动物血管的钙化情况及病理过程。

4 总结

传统上血管钙化在动物研究中使用 2D 组织学和化学分析的方法进行研究分析。然而,这些技术有几个缺点,包括切片导致的伪影,以及不能同时显现钙化的空间结构和整条血管的钙化程度。目前的 CT 3D 成像技术可以完整的重建钙化的动脉并提供准确的量化信息。微型 CT 所具有的高空间分辨率使得微观和宏观钙化得以区分和量化。将 CT 与 ^{18}F -NaF micro-PET/CT 相结合,可以增强体内活动的微钙化的检测,并加深我们对不同信号通路和药物的作用机制。目前还可以检测到血管的 ECM 变化,例如弹性蛋白的退化。更重要的是 3D 微型 CT 的分析可以和 2D 的组织病理学、免疫组织化学、蛋白组学处理相结合,提供同一血管片段的互补的信息,例如钙化体积、钙化负荷、信号机制。微型 CT 的技术进步可以为活体研究提供更多的方法,从而使整个动物血管的大钙化斑块和小钙化斑块同时成像,实现血管钙化的实时分析。

参 考 文 献(References)

[1] 刘国栋,刘秀华,白静,等.白藜芦醇对血管钙化大鼠血压和心脏功能的影响[J].中国比较医学杂志,2014,(10):58-62.
Liu GD, Liu XH, Bai J, et al. Effects of resveratrol on blood pressure and cardiac function in the rats with vascular calcification [J]. Chin J Comp Med, 2014, (10): 58-62.

[2] 康婷,陈波,欧三桃.慢性肾脏病血管钙化大鼠血清炎症因子抗体芯片检测及分析[J].中国比较医学杂志,2019,29(1):9-15.
Kang T, Chen B, Ou ST. Antibody microarray analysis of serum inflammatory cytokines in rats with chronic renal disease vascular calcification [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 9-15.

[3] Yamada S, Leaf EM, Chia JJ, et al. PiT-2, a type III sodium-dependent phosphate transporter, protects against vascular calcification in mice with chronic kidney disease fed a high-phosphate diet[J]. Kidney Int, 2018, 94(4): 716-727.

[4] Benz K, Hilgers KF, Daniel C, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: the role of inflammation [J]. Int J Nephrol, 2018, 2018:4310379.

[5] Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, et al. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 109-116.

[6] 李军,朱德生,包尚联.显微 CT 技术及其在生物医学领域的应用[J].现代仪器与医疗,2009,15(6):19-23,28.
Li J, Zhu DS, Bao SL. The technology and application in biomedicine of micro-CT [J]. Modern Instrum, 2009, 15(6): 19-23,28.

[7] 杨曦.显微 CT 对小动物血管三维成像的研究进展[J].中国

骨与关节损伤杂志,2016,31(3):334-336.

Yang X. Progress in the study of three-dimensional microscopic CT angiography in small animals[J]. Chin J Bone Joint Injury, 2016, 31(3): 334-336.

- [8] Pai VM, Kozlowski M, Donahue D, et al. Coronary artery wall imaging in mice using osmium tetroxide and micro-computed tomography (micro-CT)[J]. J Anat, 2012, 220(5): 514-524.
- [9] Faight E, Verdelis K, Ahearn JM, et al. 3D MicroCT spatial and temporal characterization of thoracic aorta perivascular adipose tissue and plaque volumes in the Apoe^{-/-} mouse model [J]. Adipocyte, 2018, 7(3): 156-165.
- [10] Dunmore-Buyze PJ, Cruje C, Nong Z, et al. 3D vessel-wall virtual histology of whole-body perfused mice using a novel heavy element stain[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 698.
- [11] 桂建保,胡战利,周颖,等.高分辨显微 CT 技术进展[J].CT 理论与应用研究,2009,18(2):106-116.
Gui JB, Hu ZL, Zhou Y, et al. Technology development of Micro-CT with high spatial resolution [J]. CT Theor Appl, 2009, 18(2): 106-116.
- [12] Huesa C, Millán JL, van't Hof RJ, et al. A new method for the quantification of aortic calcification by three-dimensional micro-computed tomography[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(5): 1047-1050.
- [13] Awan Z, Denis M, Roubtsova A, et al. Reducing vascular calcification by anti-IL-1 β monoclonal antibody in a mouse model of familial hypercholesterolemia[J]. Angiology, 2016, 67(2): 157-167.
- [14] Rawson SD, Maksimcuka J, Withers PJ, et al. X-ray computed tomography in life sciences[J]. BMC Biol, 2020, 18(1): 21.
- [15] Walton LA, Bradley RS, Withers PJ, et al. Morphological characterisation of unstained and intact tissue micro-architecture by X-ray computed micro- and nano-tomography[J]. Sci Rep, 2015, 5:10074.
- [16] Awan Z, Denis M, Bailey D, et al. The LDLR deficient mouse as a model for aortic calcification and quantification by micro-computed tomography[J]. Atherosclerosis, 2011, 219(2): 455-462.
- [17] 李晓娜,岳春贤,练学淦,等.微钙化与动脉粥样硬化斑块易损性[J].国际脑血管病杂志,2019,27(8):624-628.
L XN, Yue CX, Lian XG, et al. Microcalcification and vulnerability of atherosclerotic plaques [J]. Int J of Cerebrovasc Dis, 2019, 27(8): 624-628.
- [18] Vågberg W, Persson J, Szekely L, et al. Cellular-resolution 3D virtual histology of human coronary arteries using x-ray phase tomography[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11014.
- [19] Hsu JJ, Fong F, Patel R, et al. Changes in microarchitecture of atherosclerotic calcification assessed by ^{18}F -NaF PET and CT after a progressive exercise regimen in hyperlipidemic mice[J]. J Nucl Cardiol, 2020, 2: 10.
- [20] Demer LL, Tintut Y. Interactive and multifactorial mechanisms of calcific vascular and valvular disease [J]. Trends Endocrinol Metab, 2019, 30(9): 646-657.