❖实验研究

Microvasculature imaging of biliary atresia samples based on X-ray phase-contrast CT

SUN Mengyu[1], LYU Wenjuan[1], ZHAO Xinyan[2], QIN Lili[1], HU Chunhong[1*]
(1. College of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Liver Research Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the application value of X-ray phase-contrast CT (PCCT) in investigation of the microvasculature of human biliary atresia (BA) tissues. **Methods** Four resected samples of BA children were douched and fixed. After alcohol dehydration, the samples were examined with Shanghai Synchrotron Radiation Facility (SSRF) beamline BL13W1 PCCT. The images were reconstructed using filtered back projection (FBP) algorithm. Combined with 3D visualization technology, the whole structure and microvasculature of the samples were revealed and used for differentiating different vessels. Then the samples were embedded in paraffin, cut into 4 μm sections and stained with Sirius red, cytokeratin 19 (CK19) and stone mastic asphalt (SMA). The reconstruction images of FBP algorithm and the 3D microvascular images were observed and compared with the corresponding histological findings. **Results** Both of the reconstruction images of FBP algorithm and 3D microvascular images could be used for differentiation of different types of vessels, including hepatic artery, bile duct and neoformative bile duct, as well as portal vein. The microstructure characteristics of different types of vessels in BA samples were shown accurately and were consistent with histology. **Conclusion** Combined FBP algorithm with 3D visualization technique, PCCT can be used to clearly display the microstructures of BA tissues in vitro.

[**Key words**] X-ray phase-contrast imaging; Tomography, X-ray computed; Biliary atresia; Microvasculature; 3D visualization
DOI: 10.13929/j.1003-3289.201803014

X 线相衬 CT 成像显示人体胆道闭锁样品微脉管结构

孙梦燏[1], 吕文娟[1], 赵新颜[2], 秦莉莉[1], 胡春红[1*]
(1. 天津医科大学生物医学工程与技术学院, 天津 300070;
2. 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心, 北京 100050)

[**摘 要**] **目的** 探讨 X 射线相衬 CT(PCCT)对人体胆道闭锁(BA)样品中脉管显微结构的显示作用。**方法** 将 4 份人体 BA 样品进行冲洗、固定并以乙醇脱水干燥,采用上海同步辐射光源 BL13W1 线站进行 PCCT 成像,通过图像处理分别获得滤波反投影算法重建图像、样品整体及微脉管的 3D 重建图像,并对不同类型脉管进行区分。而后对样品进行石蜡包埋,4 μm 切片,并行平滑肌细胞抗体(SMA)、细胞角蛋白 19 抗体(CK19)免疫组化染色及苦味酸天狼星红染色组织病理检查。对比观察滤波反投影算法及微脉管 3D 重建图像与相应病理图。**结果** 滤波反投影算法重建 CT 图像及微脉管 3D 重建图像均可用以区分人体 BA 样品中的肝动脉、胆管及增生胆管、门静脉,并清晰显示不同类型脉管的结构特征,所示

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81671683、81670545、81371549)、天津市自然科学基金(16JCYBJC28600)。
[**第一作者**] 孙梦燏(1994—),女,山东临沂人,硕士。研究方向:相衬成像和医学图像处理。E-mail: sunmy_94@163.com
[**通信作者**] 胡春红,天津医科大学生物医学工程与技术学院,300070。E-mail: chunhong_hu@hotmail.com
[**收稿日期**] 2018-03-02 [**修回日期**] 2018-05-24

微脉管结构与组织病理学检查相符。**结论**　结合滤波反投影重建算法及 3D 可视化技术，PCCT 能够清晰显示离体 BA 组织的微脉管结构。

[**关键词**]　X 射线相衬成像；体层摄影术，X 线计算机；胆道闭锁；微脉管；3D 可视化
[**中图分类号**]　R-332；R814.42　[**文献标识码**]　A　[**文章编号**]　1003-3289(2018)09-1318-05

胆道闭锁(biliary atresia，BA)是一种伴有进行性肝纤维化和肝内外胆管淤积的胆管炎性疾病，常发生于出生后 3 个月内婴儿，病情严重时可迅速进展为胆汁性肝硬化(biliary cirrhosis，BC)，导致患儿死亡。早期诊断对 BA 后续治疗具有重要意义，越早进行胆汁引流，术后效果越好，同时也越有利于进行肝移植手术[1]。在 BA 发病早期，小叶间胆管显著增生；随着病情发展，逐渐出现小动脉增生，并伴有动脉壁增厚，胶原大量增生，纤维化形成，最终原有胆管消失[2]。因此，分析脉管变化对诊断 BA 十分重要。目前研究 BA 的脉管结构变化通常基于肝脏组织切片，但该技术取样面积小，存在取样误差，需多次取样，且对脉管仅限于在 2D 层面进行观察[3]；传统 X 线、超声、CT 等临床常用的影像学检查技术则因存在空间和衬度分辨率较低的局限性，无法反映肝组织内的细微病理变化。X 线相衬 CT(phase-contrast computed tomography，PCCT)通过 X 线透过样品的相位移动信息进行成像，与传统 X 线吸收 CT 成像相比，可实现对软组织内部结构的清晰显像，并能够与 3D 可视化技术结合，获得高分辨率的软组织内部 3D 结构图像。随着近年来的发展，该技术已应用于多种疾病的显微结构分析研究[4-8]。本研究采用 PCCT 对离体 BA 组织进行成像，分析 BA 的脉管显微结构变化。

1　材料与方法

1.1　样品制备　4 份人体 BA 样品(1～4 号样品)由首都医科大学附属北京友谊医院肝病研究中心提供，本研究经医学伦理委员会审核批准并在征得患儿家属同意后取材。4 例 BA 患儿均接受肝移植手术，其中男 3 例，女 1 例，分别为 8、4、5 和 12 月龄；术后离体 BA 样品以磷酸缓冲液冲洗后，置于 4%中性甲醛溶液中固定保存。PCCT 扫描前，将样品切成厚 5 mm、宽约 6 mm 的块状组织；考虑到成像时间较长，如样品处于浸润状态，则组织内水分蒸发可引起组织变形，产生大量运动伪影，并对后续图像校轴产生严重影响，难以实现微小脉管的准确成像，本研究对 BA 样品进行梯度脱水，乙醇浓度分别为 50%、70%、80%、95%、95%、100%和 100%，每次间隔 2 h，使其充分干燥，以此消除样品变形对成像效果的影响。

1.2　PCCT 成像　采用上海同步辐射光源 BL13W1 线站进行成像实验，成像装置由 2 块平行摆放的单色晶体、旋转样品台和探测器组成，见图 1。探测器分辨力为 3.25 μm，X 线能量设为 16 keV，探测器距离样品 25 cm，曝光时间 0.5 s。PCCT 扫描时，将装有人体 BA 样品的锥形管固定于样品台并旋转 180°，拍摄 1 080张投影图，每间隔 120 张扫描 2 张背景图，共采集 20 张背景图，而后关闭光源，采集 10 张暗场图。

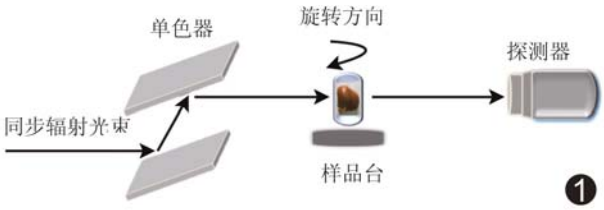


图 1　PCCT 成像装置示意图

1.3　图像处理　首先利用背景图和暗场图对 PCCT 投影图进行校正，并以相位恢复方法对校正后图像进行去噪处理和相位信息提取；而后采用滤波反投影算法重建，将重建获得的图像数据导入 Amira 6.3 (FEI，Thermo Fisher Scientific，Bordeaux，France)软件分别进行体绘制，实现人体 BA 样品整体 3D 重建。同时，利用阈值分割和区域生长算法实现对肝动脉、胆管及增生胆管、门静脉等脉管的区分。

1.4　组织病理学检查　完成 PCCT 成像实验后 3 个月内，对样品进行常规脱水和石蜡包埋，4 μm 连续切片，经平滑肌细胞抗体(smooth muscle cell antibody，SMA)、细胞角蛋白 19 抗体(cytokeratin 19，CK19)免疫组化染色及苦味酸天狼星红染色后，于光镜下观察。

2　结果

2.1　PCCT 投影图　人体 BA 样品 PCCT 投影图见图 2。在不使用对比剂的条件下，PCCT 投影图可清晰显示直径为 20 μm 的微脉管，汇管区内可见多条脉管伴行，但大小脉管交叠，难以区分脉管类型。

2.2　CT 重建图像与病理图对照　人体 BA 样品滤波反投影算法重建图像及相应的病理图见图 3。PCCT 投影图经滤波反投影算法重建后，可清晰显示汇管区周围密集的增生脉管的腔状结构。人体 BA 样品中，动脉形态未见明显异常，呈现圆形或椭圆形；胆管管腔

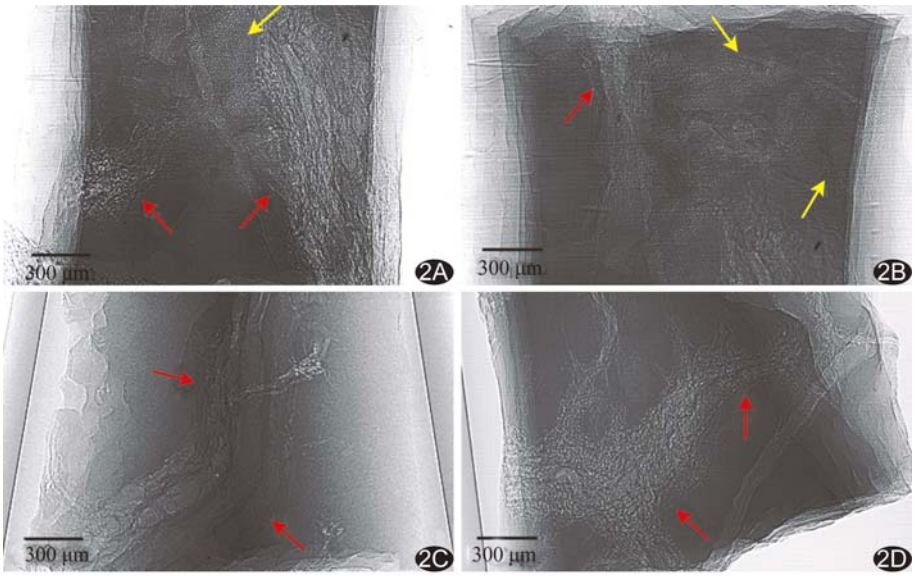


图 2　人体 BA 样品 PCCT 投影图　1、2 号样品(A、B)肝实质中存在大量粗糙的颗粒状结构，1～4 号样品(A～D)中汇管区均可见明显的脉管伴行　(红箭示脉管伴行，黄箭示颗粒状结构)

轮廓存在明显起伏呈现波浪状；门静脉血管破裂，内壁组织如絮状分布，难以观察到其管腔结构。对比 CT 重建图像及相应的 SMA、CK19 免疫组化染色及苦味酸天狼星红染色病理图，可见 PCCT 图像所示汇管区脉管结构与病理图所见相符。

2.3　微脉管 3D 重建图像　通过对 CT 重建图像进行体绘制，获得人体 BA 样品汇管区脉管 3D 结构(图 4A、4B)，其中可见明显大脉管伴行，汇管区周围存在大量细小的新生脉管，并成环状连接。选取 420×830×240 像素长方体区域(图 4A)对不同脉管类型进行区分后，分别获得肝动脉(红色脉管，图 4C)、胆管及增生胆管(绿色脉管，图 4D)、门静脉(黄色脉管，图 4E)的 3D 结构，可见胆管增生并连接成环(图 4D)，包绕汇管区内血管束形成网状结构，门静脉因管壁发生破裂且受其他脉管挤压而结构异常(图 4E)。对照相应病理图，发现 3D 重建图像所示血管及胆管结构与组织病理学所见相符。

3　讨论

BA 是新生儿肝内外胆道系统闭塞引起的最严重的消化系统疾病之一，其主要组织学特征包括小胆管增生、胆管淤积和汇管区炎性细胞浸润，而多核巨细胞样变、肝实质局灶性坏死和髓外造血等表征较少见[2]。胆管增生被认为是鉴别 BA 与其他胆汁淤积症的高特异性及高敏感性的指标[9]。本研究通过 PCCT 技术对离体 BA 组织进行成像，同时结合 3D 可视化技术观察离体 BA 组织内微脉管的 3D 结构，并基于脉管的 3D 结构特征对人体 BA 样品中肝动脉、胆管及增生脉管、门静脉进行区分；所得结果均与组织病理学检查相符，提示 PCCT 可用于肝脏内不同类型脉管的

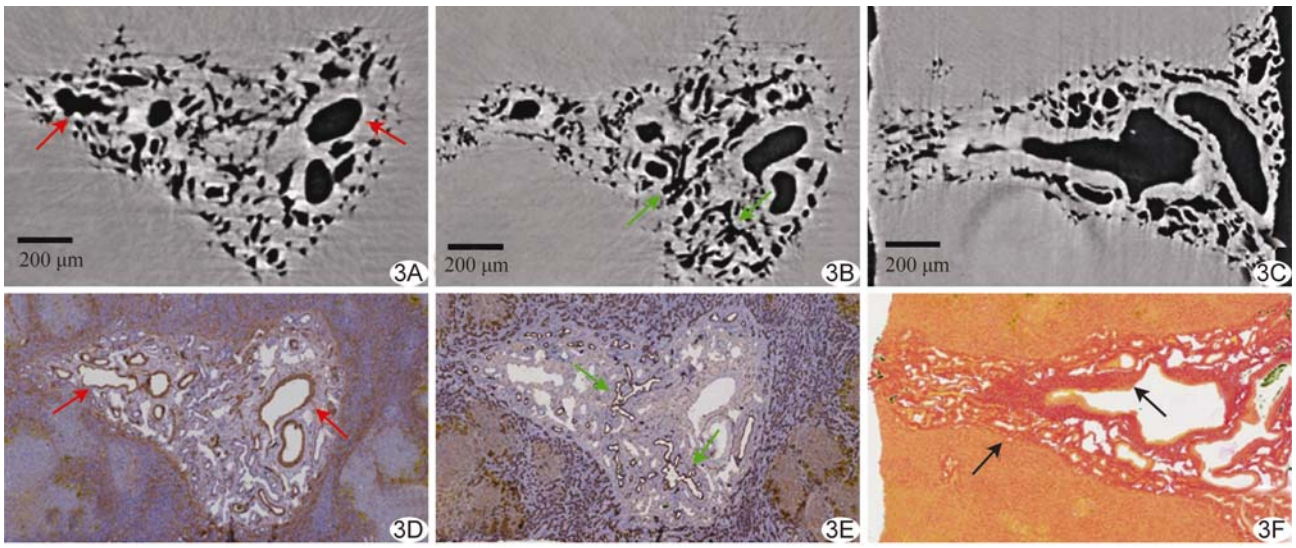


图 3　人体 BA 样品 PCCT 滤波反投影算法重建图像及相应病理图　A～C. 分别为第 421 层(A)、455 层(B)及 550 层(C)重建图像；D. 图 A 对应的 SMA 染色病理图(×40)；E. 图 B 对应的 CK19 染色病理图(×40)；F. 图 C 对应的苦味酸天狼星红染色病理图(×40)　(红箭示动脉血管；绿箭示胆管；黑箭示纤维组织)

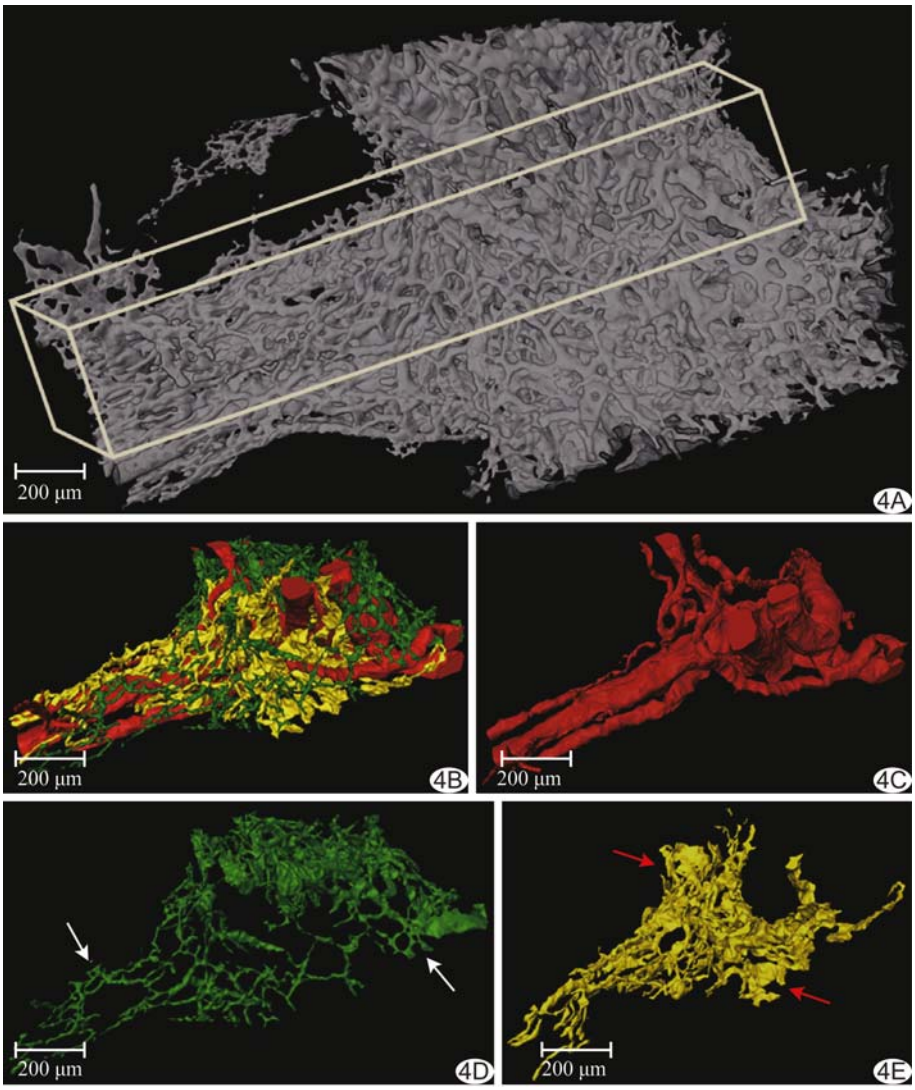


图 4　人体 BA 样品 3D 重建图像　A. 汇管区体绘制重建图像；B. 脉管分割整体图像；C～E. 分别为肝动脉(C)、胆管及增生胆管(D)、门静脉(E)3D 重建图像　(白箭示增生胆管的环状结构；红箭示门静脉形态异常)

PCCT 技术对大鼠肝纤维化组织进行成像，重建后获得 3D 微观结构；通过与病理切片对照，证实 PCCT 技术诊断大鼠肝纤维化具有较高的敏感度、特异度及准确率。本研究发现，利用 PCCT 可对直径仅为 20 μm 的微脉管清晰成像；对比观察 PCCT 图像与相应病理图，发现滤波反投影算法重建图像中门静脉血管壁破裂，内壁成絮状分布或堆叠在一起，原有胆管轮廓出现褶皱(图 3B、3E)；3D 重建结构中也发现胆管表面出现褶皱，新生胆管连接具有明显的成环趋势，在门静脉、肝动脉和原有的伴行胆管外周连接成网并与之伴行延伸(图 4D)。

本实验属基础研究，仍存在一些缺陷：①采用离体样品进行 PCCT 成像，需对人体 BA 样品进行冲洗和干燥，难免导致脉管变形；②样品量较少，未对微脉管进行定量分析。此外，与临床常用的传统 X 线、CT、超声等成像技术相比，PCCT 成像视野较小，仅为 6 mm×5 mm，且对光源的单色性要求较高，这在一定程度上限制了其推广应用，但目前基于常规 X 线管的 PCCT 大视野成像研究已取得一定进展[12-14]。

综上所述，通过 PCCT 及其图像后处理技术可实现对人体 BA 样品中微脉管的成像，并可清晰显示离体 BA 组织中肝动脉、胆管及增生胆管、门静脉的 2D 和 3D 结构特征，同时对不同脉管进行区分。

成像；但由于 PCCT 成像角度与病理切片包埋角度难以完全相同，CT 图像与组织病理学检查往往存在些许差别。

有关 BA 组织的影像学特征研究通常基于超声检查，但因声像图空间分辨率较低，超声医师主要依靠胆囊形态对 BA 进行诊断，难以实现早期诊断，还可能出现误诊为乳肝的情况[10]。目前传统 X 线、CT、超声等临床常用的影像学技术尚无法对＜200 μm 的微观结构成像。PCCT 不同于传统 CT 成像技术，系根据 X 线穿透样品时的相位改变信息进行成像，相位衬度变化约为吸收衬度变化的 1 000 倍，在生物软组织成像方面具有优势[11]。近年来，PCCT 技术已广泛应用于研究各种软组织的影像学特征。Xuan 等[5] 应用

[参考文献]

[1] 詹江华，陈亚军，李龙，等. 胆道闭锁诊疗流程(草案). 中华小儿外科杂志，2013，34(2)：147-149.

[2] Saxena R. Practical hepatic pathology. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2011：89-93.

[3] Azar G, Beneck DB, Markowitz J, et al. Atypical morphologic presentation of biliary atresia and value of serial liver biopsies. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2002, 34(2)：212-215.

[4] Jian J, Yang H, Zhao X, et al. Visualization of microvasculature and thrombi by X-ray phase-contrast computed tomography in hepatocellular carcinoma. J Synchrotron Radiat, 2016, 23(2): 600-605.
[5] Xuan R, Zhao X, Hu D, et al. Three-dimensional visualization of the microvasculature of bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats by X-ray phase-contrast imaging computed tomography. Sci Rep, 2015, 5: 51100.
[6] Cao Y, Zhou Y, Ni S, et al. Three dimensional quantification of microarchitecture and vessel regeneration by synchrotron radiation microcomputed tomography in a rat model of spinal cord injury. J Neurotrauma, 2017, 34(6): 1187-1199.
[7] Notohamiprodjo S, Webber N, Birnbacher L, et al. Qualitative and quantitative evaluation of structural myocardial alterations by grating-based phase-contrast computed tomography. Invest Radiol, 2018, 53(1): 26-34.
[8] 张建发, 陈秀君, 李文靖, 等. 离体生物软组织同步辐射相衬 CT 成像. 中国医学影像技术, 2018, 34(2): 171-175.
[9] Balistreri WF. Early diagnosis of biliary atresia. J Pediatr, 2015, 116(4): 783-787.
[10] Qin L, Zhao X, Jian J, et al. High-resolution 3D visualization of ductular proliferation of bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats using x-ray phase contrast computed tomography. Sci Rep, 2017, 7(1): 4215.
[11] 王晓曼, 贾立群. 胆道闭锁的超声诊断. 放射学实践, 2011, 26(2): 220-222.
[12] Larsson DH, Vågberg W, Yaroshenko A, et al. High-resolution short-exposure small-animal laboratory X-ray phase-contrast tomography. Sci Rep, 2016, 6: 39074.
[13] Huang S, Kou B, Chi Y, et al. In-line phase-contrast and grating-based phase-contrast synchrotron imaging study of brain micrometastasis of breast cancer. Sci Rep, 2015, 5: 9418.
[14] Hetterich H, Willner M, Fill S, et al. Phase-contrast CT: Qualitative and quantitative evaluation of atherosclerotic carotid artery plaque. Radiology, 2014, 271(3): 870.

《中国医学影像技术》杂志 2019 年征订启事



《中国医学影像技术》杂志于 1985 年创刊，是由中国科学院主管，中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊。刊号：ISSN 1003-3289，CN 11-1881/R。曾获百种中国杰出学术期刊，现为中国精品科技期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊、《中文核心期刊要目总览》收录期刊、荷兰《医学文摘》收录源期刊、英国《科学文摘》收录源期刊、俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊、WHO《西太平洋区医学索引》(WPRIM)来源期刊、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JSTChina)收录期刊。

《中国医学影像技术》杂志是临床医学影像学与影像医学工程及理论研究相结合的综合性学术期刊，刊登放射、超声、核医学、介入治疗、影像技术学、医学物理与工程学等方面的基础研究及临床实验研究的最新成果。以论文质量优、刊载信息量大、发刊周期短为其特色，是我国影像医学研究探索和学术交流的良好平台。

《中国医学影像技术》为月刊，160 页，大 16 开本，彩色印刷。单价 26 元，全年定价 312 元。订户可随时向当地邮局订阅，邮发代号 82-509；亦可向编辑部直接订阅，免邮寄费(欢迎通过银行转账，附言栏请注明订阅杂志名称)。

联系电话：010-82547903　　传真：010-82547903

E-mail：cjmit@mail.ioa.ac.cn　　网址：www.cjmit.com

编辑部地址：北京市海淀区北四环西路 21 号大猷楼 502 室　　邮编：100190

银行账户名：《中国医学影像技术》期刊社　　账号：110907929010201

开户行：招商银行北京分行清华园支行　　联系人：田苗