

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.007

1- α 羟化酶和人成纤维细胞生长因子 -23 基因修饰小鼠离体股骨及下颌骨 X 线影像的分形分析研究 *

杨春艳¹ 李书书² 王 姝³ 林梓桐¹ 刘 浩¹ 王 超² 王铁梅^{1△}

(1 南京大学医学院附属口腔医院颌面影像科 江苏南京 210008; 2 南京医科大学公共卫生学院 江苏南京 211166;

(3 南京医科大学康达学院 江苏南京 211166)

摘要 目的: 初步分析 1- α 羟化酶 (1-alpha-hydroxylase, 1 α (OH)ase)、人成纤维细胞生长因子 -23 (fibroblast growth factor-23, FGF23) 基因修饰小鼠离体股骨及下颌骨 X 线平片的分形维数 (fractal dimension, FD), 为其在骨质疏松症评价中的运用提供实验依据。**方法:** 以 6 周龄的 1 α (OH)ase^{-/-}、FGF23^{+/+}、1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+} 小鼠为模型, 以同龄的野生型 (Wild-Type, WT) 小鼠为对照, 采集小鼠的股骨和下颌骨, 使用离体 X- 射线摄影评估骨质疏松状况, 利用 Image J 软件测量各组小鼠股骨和下颌骨 X- 射线影像兴趣区域的 FD 值, 分析其差异及相关性。**结果:** 1) 与 WT 小鼠相比, 1 α (OH)ase^{-/-}、FGF23^{+/+}、1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+} 小鼠均出现骨质疏松征象, 包括股骨和下颌骨骨长度及体积减少、骨密度明显下降, 下颌磨牙、切牙及牙槽骨的射线透光度增高、牙髓腔宽大、根管变薄。2) 1 α (OH)ase^{-/-}、FGF23^{+/+}、1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+} 小鼠的股骨头和股骨远端干骺端的 FD 值均较 WT 小鼠明显增加 ($P<0.05$), 但股骨干未见差异; 下颌骨升支的 FD 值在 1 α (OH)ase^{-/-}、FGF23^{+/+}、1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+} 小鼠中明显增高 ($P<0.05$), 而在牙槽骨中未见差异; 3) 下颌骨升支 X 平片的 FD 值与股骨干干骺端的 FD 值显著相关 ($r=0.541$, $P=0.049$)。**结论:** FD 值可以较好地反映骨质疏松状况, 股骨干干骺端、下颌骨升支是较合适的兴趣部位, 分形分析可运用于下颌骨影像学的再分析。

关键词: 小鼠; 1- α 羟化酶; 人成纤维细胞生长因子 -23; 骨质疏松症; X 线影像; 分形分析**中图分类号:** Q95-3; R445; R782 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)32-6229-04

Fractal Analysis of X-ray Photography to Isolated Femora and Mandible in Mice Genetically Modified by 1- α -Hydroxylase and Human Fibroblast Growth Factor-23*

YANG Chun-yan¹, LI Shu-shu², WANG Shu³, LIN Zi-tong¹, LIU Shu¹, WANG Chao², WANG Tie-mei^{1△}

(1 Department of Radiology, Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu, 210008, China;

2 School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China;

3 KangDa College, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China)

ABSTRACT Objective: The fractal dimension (FD) of X-ray photography to the isolated femur and mandible were explored in mice genetically modified by 1-alpha-hydroxylase (1 α (OH)ase) / or human fibroblast growth factor-23 (FGF23), which tried to provide an experimental evidence for its application in the diagnosis of osteoporosis. **Methods:** Six weeks old 1 α (OH)ase^{-/-}, FGF23^{+/+} and 1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+} mice were used as the model of osteoporosis, and their wild type (WT) littermates were used as control. The isolated femur, mandible microarchitecture and the status of osteoporosis were estimated by X-ray photography. In addition, the FD values on the interest region in X-ray photography were measured by Image J software, which was then used to analyze the difference of FD value between the models and control, and the relationship between the FD in the femur and mandible as well. **Results:** 1) Compared with WT mice, all the 1 α (OH)ase^{-/-}, FGF23^{+/+} and 1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+} mice appeared the osteoporosis features, including the reduced length and volume of the femur and mandible, the decrease in bone mineral density, the increase in light transmittance of X-ray in mandibular molar, incisor, and alveolar, the widen pulp cavity widened, and the thinner root canals. 2) The FD values of femoral head and metaphyses significantly increased in 1 α (OH)ase^{-/-}, FGF23^{+/+} and 1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+} mice ($P<0.05$) while no significant differences were observed in femoral medullary cavity. Additionally, the FD value of the mandibular ramus significantly increased in 1 α (OH)ase^{-/-}, FGF23^{+/+} and 1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+} mice ($P<0.05$) while no significant differences was observed in the alveolar bone. 3) The FD values in mandibular ramus was significantly related to those in metaphysis ($r=0.514$, $P=0.049$). **Conclusion:** FD values could reflect the status of osteoporosis, the femoral metaphysis and mandibular ramus were more suitable regions of interest. Moreover, the fractal analysis could be used in the evaluation of the mandible imaging, and the optimized method might be expected to an auxiliary tool in the diagnosis of osteoporosis.

Key words: Mice; 1-alpha-hydroxylase; Human fibroblast growth factor-23; Osteoporosis; X-ray photography; Fractal analysis**Chinese Library Classification:** Q95-3; R445; R782 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)32-6229-04

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81372956); 南京市科技发展计划项目(201201079)

作者简介: 杨春艳(1975-), 女, 硕士生, 医师, 主要研究方向: 颌面影像数字化诊断, 电话: 025-83620553, E-mail: njyangcy@126.com

△ 通讯作者: 王铁梅, 电话: 025-83620351, E-mail: tmwang_nju@126.com

(收稿日期: 2014-03-24 接受日期: 2014-04-21)

前言

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨的微观结构退化以及骨脆性增加为特征,最终容易造成低创伤性骨折的全身性骨骼疾病,以股骨和椎骨常见,多发生在绝经后的女性^[1,2]。作为全身骨骼的一部分,颌骨的骨组织代谢和骨量变化常受到全身骨代谢变化的影响,常常也被认为骨质疏松的易发部位^[3,4]。尽管X线影像是目前最普遍、最有效的骨科检查工具,然而对其分析亟需一种基于影像的定量分析手段。分形分析是近些年发展起来的新兴学科。由于分形维数(Fractal Dimension, FD)可以有效度量物体的复杂性,使得分形与图像之间关系更加明确,在图像处理中的应用愈来愈受到关注^[5]。分形算法应用到X线平片的边缘检测中,能得到比较好的边缘、清晰地确定大部分标志点,可有效弥补传统图像处理技术的不足。近年来,通过图像的二进制赋值转换图像的像素点覆盖法和计盒维数的计算,使得分形维数在医学图像处理中得到了广泛的应用,已应用于解剖形态学、肿瘤病理学、传统影像学等图片处理^[6,7]。本课题组近年来运用FD对部分骨质疏松患者的下颌骨骨微结构进行了评价^[8],但FD与骨质疏松的关系,尤其对下颌骨骨微结构的评价还有待明确。骨质疏松模型是研究和优化FD的良好模型,通过分析FD与骨质结构变化过程、变化程度等的关系,有利于探寻合适的FD评价方法。基因修饰动物可以通过疾病相关基因的敲除、消减、过表达来实现,可再现疾病发生的全过程。目前,根据骨骼发育过程的相关基因,已成功制备了多种基因修饰的骨质疏松模型^[9],有效地弥补了诱导法和去势法所致的骨质疏松模型的不稳定性。本研究以1 α (OH)ase^{-/-}和FGF23^{+/+}基因修饰(Genetically Modified, GM)小鼠为模型,以同窝繁殖的野生型(Wild-Type, WT)小鼠为对照,通过X线影像评价小鼠的骨质疏松程度;利用分形分析法对股骨和下颌骨X线平片进行分形维数(FD)计算,为分形分析运用于骨质疏松症评价,尤其为下颌骨及牙齿骨微结构变化的可行性评估提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

以6周龄的1 α 羟化酶基因敲除纯合子小鼠(1 α (OH)ase^{-/-})、人成纤维细胞生长因子-23转基因小鼠(FGF23^{+/+})小鼠和1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+}小鼠(以下统称为基因修饰小鼠)为模型,以同窝繁殖的野生型小鼠(WT)作为对照。上述动物由南京医科大学骨与干细胞研究中心苗登顺教授实验室提供并进行基因型鉴定、确认。仔鼠由其母鼠喂养,均饲养于南京医科大学实验动物中心SPF级动物房中。

1.2 X-射线摄影

为保证拍摄质量,采用离体骨骼进行X-射线摄影。取各组小鼠,每组4只,颈椎脱臼处死,解剖分离左侧股骨和下颌骨,75%酒精固定,X-射线摄影仪(Faxitron model 805 radiographic inspection system, Faxitron Contact, Faxitron, Germany)进行X射线摄影,拍摄条件:电压22kV,曝光时间4min,常规方法显影、定影。胶片采用HP扫描仪进行扫描。

1.3 分形维数分析

以WT小鼠和基因修饰小鼠的股骨和下颌骨X线平片为

研究对象,分别选取股骨的股骨头、股骨腔、股骨远端干骺端(简称干骺端),下颌骨的下颌升支、下颌第一、二磨牙间根尖下方牙槽骨(简称牙槽骨)为兴趣区域,利用Adobe Photoshop 8.0.1软件,将兴趣区截取下来,转存为TIFF图像格式,进行分形维数(FD)值测定。兴趣区的大小取决于各区域的解剖特征,一般选择的大小为32pix×32pix或64pix×64pix。

兴趣区确定后,采用Image J 13.0软件进行FD值分析。FD值测定大致过程如下:先用Image J软件打开拟分析的兴趣区图像,进行高斯过滤(sigma=2.0),然后对处理后的图像进行二值化,再根据兴趣区图像的大小和复杂程度选择适当的计盒参数(32或64),通过软件模块自行运算FD值。

1.4 统计分析

将测定获得的各兴趣区的FD值录入到EXCEL表格中,并进行分析结果作图。采用SPSS18.0软件计算各组小鼠、不同骨组织、不同兴趣区的FD值的均数和标准差并进行差异比较,组间的FD值比较采用方差分析,股骨和下颌骨FD值的相关性采用Pearson分析法,计算相关系数(r)和显著性水平,P<0.05被认为有统计显著性。

2 结果

2.1 模型小鼠股骨和下颌骨X线影像鉴定

与WT小鼠相比,基因修饰小鼠的股骨长度明显缩短、骨密度降低、次级骨化中心明显缩小;下颌骨长度缩短,磨牙、切牙及下颌牙槽骨的射线透光度都明显提高、牙髓腔宽大、根管变薄,尤以1 α (OH)ase^{-/-}FGF23^{+/+}小鼠最为明显(图1),基因修饰小鼠呈现显著的骨质疏松。

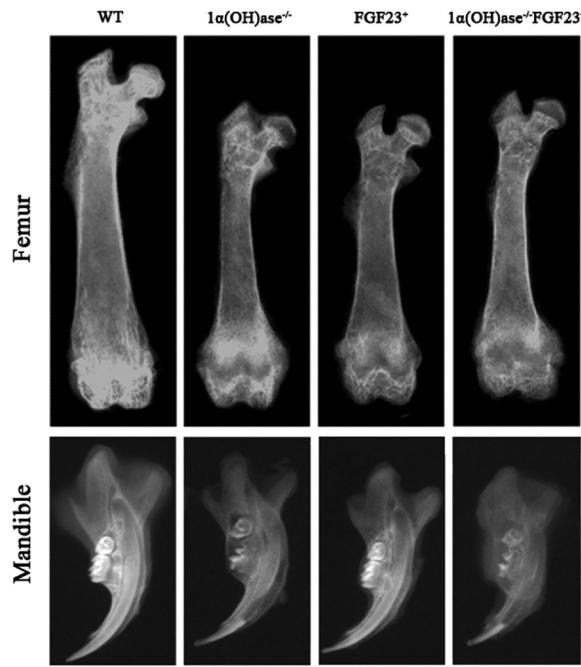


图1 模型小鼠股骨和下颌骨X线影像

Fig. 1 X-ray photography of the femora and mandible in mice models

2.2 模型小鼠股骨X线平片的FD值差异比较

与WT小鼠相比,基因修饰小鼠的股骨头和股骨远端干骺端的FD值明显升高(P<0.05),升高了17.9%-26.1%,但股骨腔的FD值,各组间维持在1.737-1.796之间,无明显差异(图2)。

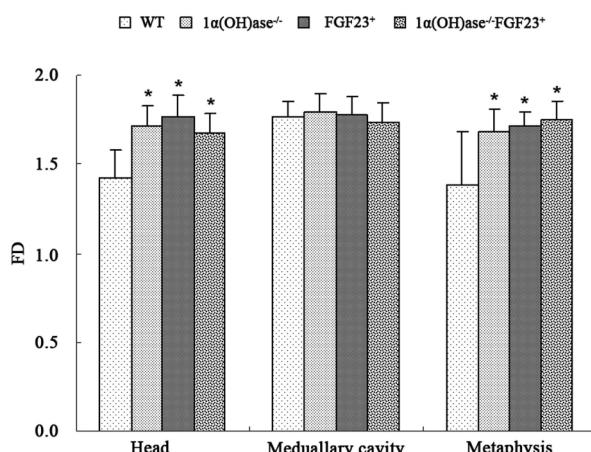


图2 模型小鼠股骨X线平片各兴趣区的FD值比较

Fig. 2 Comparison of FD values of X-ray photography in the interest regions of femora in mice models
注: *P<0.05 与 WT 小鼠相比。
Note: *P<0.05 compared with WT mice.

2.3 模型小鼠下颌骨X线平片的FD值差异比较

与WT小鼠相比,基因修饰小鼠下颌升支区域的FD值明显升高($P<0.05$),升高了20.6%-27.6%,但牙槽骨FD值与WT小鼠相比未见差异。无论是下颌升支还是牙槽骨,各基因修饰小鼠间未见差异(图3)。

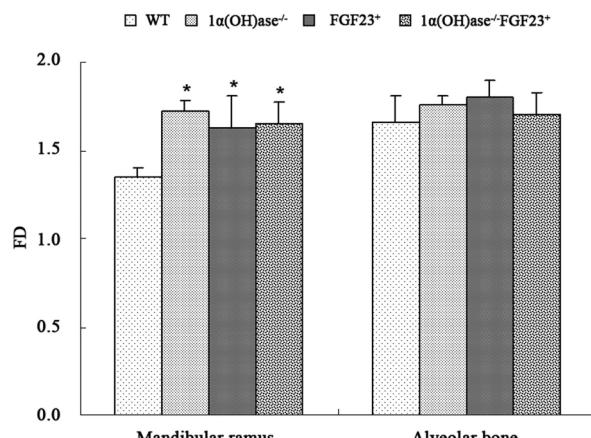


图3 模型小鼠下颌骨X线平片各兴趣区的FD值比较
Fig.3 Comparison of FD values of X-ray photography in the interest regions of mandible in mice models
注: *P<0.05 与 WT 小鼠相比。
Note: *P<0.05 compared with WT mice.

2.4 模型小鼠下颌骨和股骨FD值的相关性分析

股骨远端干骺端的FD值与下颌升支FD值两者呈正相关,相关系数(r)为0.541, $P=0.049$ (图4)。

3 讨论

本研究采用了 1α -羟化酶基因敲除小鼠[$1\alpha(OH)ase^{-/-}$]和过表达人成纤维生长因子-23的转基因小鼠($FGF23^+$)以及联合 $1\alpha(OH)ase$ 敲除和 $FGF23$ 过表达的小鼠($1\alpha(OH)ase^{-/-}FGF23^+$)为研究对象,初步研究了分形分析法评估骨质疏

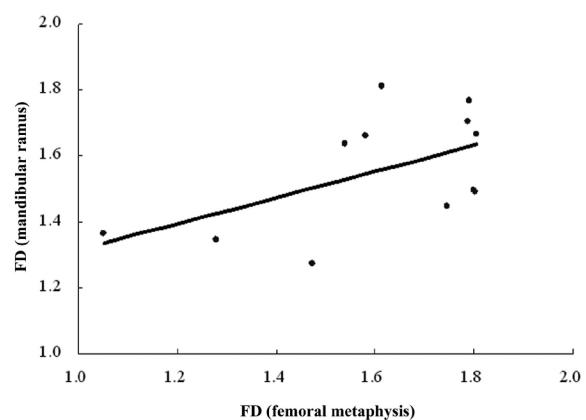


图4 模型小鼠下颌升支与股骨干骺端X片FD值的相关性

Fig. 4 Correlation between the FD values of X-ray photograph in mandibular ramus and femoral metaphysis in mice models

松症的可行性。 1α -羟化酶($1\alpha(OH)ase$)是 $1,25$ 羟化维生素D合成的关键酶,在骨骼发育中发挥了关键作用,缺乏可导致全身骨质疏松^[10]。 $FGF23$ 是近年来发现的一种新型调磷因子,在骨骼中含量最高^[11],过表达可导致低磷血症,诱发骨质疏松症^[12]。而 $1\alpha(OH)ase^{-/-}FGF23^+$ 小鼠则由 $1\alpha(OH)ase^{-/-}$ 成年雄鼠和 $FGF23^+$ 成年雌鼠交配获得。该小鼠既缺乏 1α 羟化酶,又过表达人 $FGF23$ 基因,因此骨质疏松程度要比 $1\alpha(OH)ase^{-/-}$ 小鼠和 $FGF23^+$ 小鼠更严重。本研究结果显示,上述小鼠均表现为股骨长度缩短,骨密度、小梁骨和皮质骨量降低;下颌骨长度缩短,磨牙和切牙及下颌牙槽骨的射线透光度明显提高、牙髓腔宽大以及根管变薄等征象。结果证明本研究所使用的基因修饰小鼠作为骨质疏松模型是合适的。

利用上述小鼠模型,我们对股骨和下颌骨的X线平片进行了分形分析。分形维数(FD)作为分形的定量表征和基本参数,是分形理论的重要内容^[13,14]。FD描述的是图形的不规则度和复杂度,越复杂、结构越紊乱的物体,其FD值越高。许多研究者试图应用FD对骨质疏松进行评估,常见的是使用脊椎的CT图像或股骨颈平片图像^[15]。由于X线平片具有价格便宜、放射剂量小的优势,在用根尖片或全景片分析骨微结构上具有更好的临床便利性,因而有学者开始利用颌面部全景片和根尖片X线平片进行分形维数测量以评价骨微结构。Southard等^[16]利用激素诱导的新西兰兔为骨质疏松模型,发现激素的累积量与下颌骨的FD值呈负相关($r=-0.61$),考虑到激素在骨骼发育中的作用,因此认为FD值是一种良好的诊断骨丢失的方法。分形分析在临床上的研究也有报道。Law等^[17]通过比较骨质疏松症和正常妇女下颌骨的FD值,发现患者的FD值显著提高,并且认为FD值联合MDns和PI分级等手段可使诊断符合率达到83%。Bollen等^[18]的研究也发现,有过骨折病史的骨质疏松患者其全景片兴趣区的FD值明显增高。本研究发现,基因修饰小鼠的股骨头、干骺端、下颌升支X线平片的FD值明显增高,进一步支持了上述结论。可能的原因是骨质疏松造成的骨小梁吸收常伴随着新的骨小梁的形成,导致骨微结构更加复杂、更加紊乱,FD值自然会升高。本研究进一步证实,利用X线平片获得的FD值可以很好地反映骨质疏松状况。由于股骨腔和下颌牙槽骨的FD在基因修饰小鼠和正常小鼠间未见差

异,提示在分形分析时,兴趣区的选择也很重要,股骨头、干骺端和下颌升支可能更为合适。颌骨作为全身骨的一部分,其骨骼的代谢受到全身骨代谢的影响,骨质疏松与颌骨骨密度下降呈正相关^[19]。此外,牙周病、牙松动、牙脱落等口腔问题与牙槽骨骨质疏松有着密切的关系^[20],这增加了骨质疏松症患者到口腔医院就诊并拍摄全景片或根尖片的可能性。尽管分形分析已经被证明是分析骨质量的有效手段^[21],在牙科领域也开始用于分析和预测颌骨骨小梁结构^[22]。但目前国内对颌面部全景片和根尖片的分形分析尚未起步。本研究利用基因修饰的骨质疏松小鼠模型,发现下颌升支X线平片的FD值与股骨干骺端呈正相关,进一步提示分形分析运用于下颌骨影像学分析的可行性。

分形分析在医学上的研究和运用尚处于探索阶段,尤其在口腔医学领域,因此还需进一步的实验研究加以证实。考虑到人体下颌骨骨微结构的复杂性、口腔患者的个体差异、口腔门诊获得的信息量有限、临床影像学检查的诸多限制等因素,分形分析转化应用于口腔疾患的临床诊断尚需进一步研究。本研究应用基因修饰的骨质疏松症小鼠的离体下颌骨和股骨进行了初步研究,进一步对不同发育阶段的基因修饰小鼠以及活体下颌骨及股骨FD与骨微结构变化过程的关系,以及拍片条件和FD计算方法的研究,将会提供更多的研究信息和实验依据。

参考文献 (References)

- [1] Okazaki R. New Diagnostic Criteria and Guidelines on Osteoporosis. Fracture risk associated with drugs other than glucocorticoids[J]. Clin Calcium, 2014, 24(3): 357-365
- [2] 朱哲宇, 郭晓东, 夏芊, 等. 老年慢性阻塞性肺病与继发性骨质疏松症的相关性分析[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(9):1736-1738
- Zhu Zhe-yu, Guo Xiao-dong, Xia Qian, et al. Analysis on the Relationship between Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Senior and Secondary Osteoporosis [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(9):1736-1738
- [3] Shimizu M, Furuya R, Kawawa T, et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis [J]. Anat Rec, 2000, 259(1): 76-85
- [4] Singhal S, Chand P, Singh B P, et al. The effect of osteoporosis on residual ridge resorption and masticatory performance in denture wearers[J]. Gerodontontology, 2012, 29(2): e1059-1066
- [5] 金春兰, 黄华, 刘扩彬. 基于多重分形的医学图像分割方法[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(9): 1535-1538
- Jin Chun-lan, Huang Hua, Liu Kuang-bin. Medical image segmentation based on multifractal theory [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(9): 1535-1538
- [6] Di Ieva A. Fractal analysis of microvascular networks in malignant brain tumors[J]. Clin Neuropathol, 2012, 31(5): 342-351
- [7] Karperien A, Ahammer H, Jelinek H F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis [J]. Front Cell Neurosci, 2013, 7(3):1-18
- [8] 刘澍, 王铁梅, 林梓桐, 等. 分形维数对骨质疏松症颌骨骨微结构检测的初步研究[J]. 口腔医学研究, 2013, 29(2):138-141
- Liu Shu, Wang Tie-mei, Lin Zi-tong, et al. Preliminary study on fractal dimension change of osteoporotic and ostopenia patients[J]. Journal of Oral Science Research, 2013, 29(2):138-141
- [9] Inada M, Miyaura C. Possible roles of gene deficient mice as a model of osteoporosis[J]. Clin Calcium, 2005, 15(7): 39-42
- [10] 刘洪, 苗登顺. 1-α 羟化酶基因敲除导致小鼠牙本质形成和前体牙本质矿化障碍 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2008, 28(8): 985-989
- Liu Hong, Miao Deng-shun. The deletion of 1- α -hydroxylase gene leads to a defect in the dentin formation and pre-dentin mineralization of mice[J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Science), 2008, 28(8):985-989
- [11] Mattoo R L. The Roles of Fibroblast Growth Factor (FGF)-23, alpha-Klotho and Furin Protease in Calcium and Phosphate Homeostasis: A Mini-Review[J]. Indian J Clin Biochem, 2014, 29(1): 8-12
- [12] Baix Y, Miao DS, Li JR, et al. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders [J]. Endocrinology, 2004, 145(11):5269-5279
- [13] Lopes R, Betrouni N. Fractal and multifractal analysis: a review[J]. Med Image Anal, 2009, 13(4): 634-649
- [14] Banerji A, Navare C. Fractal nature of protein surface roughness: a note on quantification of change of surface roughness in active sites, before and after binding[J]. J Mol Recognit, 2013, 26(5): 201-214
- [15] Licks R, Licks V, Ourique F, et al. Development of a prediction tool for low bone mass based on clinical data and periapical radiography [J]. Dentomaxillofac Radiol, 2010, 39(4): 224-230
- [16] Southard T E, Southard K A, Jakobsen J R, et al. Fractal dimension in radiographic analysis of alveolar process bone[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1996, 82(5): 569-576
- [17] Law AN, Bollen AM, Chen SK. Detecting osteoporosis using dental radiographs: a comparison of four methods [J]. J Am Dent Assoc, 1996, 127(12):1734-1742
- [18] Bollen A M, Taguchi A, Hujoel P P, et al. Fractal dimension on dental radiographs[J]. Dentomaxillofac Radiol, 2001, 30(5): 270-275
- [19] 张晓燕, 崔燎, 吴铁, 等. 雄激素对大鼠牙槽骨骨量的影响[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(6): 798-800
- Zhang Xiao-yan, Cui Liao, Wu Tie, et al. Effects of androgen on the amount of alveolar bone in rats [J]. Journal of Oral Science Research, 2010, 26(6): 798-800
- [20] Huh K H, Baik J S, Yi W J, et al. Fractal analysis of mandibular trabecular bone: optimal tile sizes for the tile counting method [J]. Imaging Sci Dent, 2011, 41(2): 71-78
- [21] Jolley L, Majumdar S, Kapila S. Technical factors in fractal analysis of periapical radiographs [J]. Dentomaxillofac Radiol, 2006, 35 (6): 393-397
- [22] Sindeaux R, Figueiredo P T, de Melo N S, et al. Fractal dimension and mandibular cortical width in normal and osteoporotic men and women[J]. Maturitas, 2014, 77(2): 142-148