

· 论著—数字化医学专题 ·

# 人皮肤显微结构三维可视化方法的初步研究与建立

陈伟<sup>\*1</sup> 王琴<sup>\*1</sup> 陈骁俊<sup>1</sup> 马建华<sup>2</sup> 林力<sup>1</sup> 辛宇<sup>1</sup> 柴岗<sup>1</sup> 张艳<sup>1</sup>

【摘要】 目的 建立一种基于计算机图形学实现人类皮肤显微结构三维可视化的方法。方法 取 1 例接受除皱术的女性患者头皮及皮下组织,做连续石蜡切片并行 HE 染色,每层切片厚约 4  $\mu\text{m}$ ,20 倍显微镜下按切片顺序获得原始皮肤二维图像共 100 张,像素为 1280  $\times$  960。将连续二维图像利用 ImageJ 软件进行人工配准,消除切片及拍照过程中发生的图片变形,基于不同图像特征对不同组织结构进行标定,设定局部阈值区间并重建三维图像。结果 成功获得可用 ImageJ 软件进行动态显示的局部皮肤三维显微结构,且可重建各角度平面二维结构;另可构建动画显示文件(.gif)与视频显示文件(.avi),可用各类常见软件播放。结论 初步建立了皮肤显微结构三维可视化方法,模拟了皮肤中各种细胞的空间分布情况,为最终实现皮肤细胞三维生物打印奠定基础。

【关键词】 三维数字重建;皮肤显微结构;ImageJ;三维细胞生物打印

## A preliminary study on three-dimensional visualization of human skin microstructure

CHEN Wei, WANG Shen, CHEN Xiao-jun, MA Jian-hua, LIN Li, XIN Yu, CHAI Gang, ZHANG Yan. (Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Corresponding author: CHAI Gang, Email:13918218178@163.com; ZHANG Yan, Email:13651817522@163.com

【Abstract】 Objective To establish a digitalized 3D visualization method of human skin microstructure based on computer graphics. Methods The scalp and subcutaneous tissues of 1 female patient who underwent rhytidectomy were subjected to continuous paraffin section with HE staining. One hundred digital images (1280  $\times$  960 pixels) of 4  $\mu\text{m}$  slice thickness were photographed under a 20 times microscope. The continuous 2D images were aligned manually to eliminate image distortion and the 3D microstructure of the skin was reconstructed by ImageJ software. Results Using ImageJ software, the motion 3D display of skin microstructure can be displayed and multi-angular 2D images can be reconstructed. Motion and media files (.avi and .gif) were created, which can be opened in various software. Conclusion This research established a method of skin microstructure 3D visualization. By successfully modeling the space distribution of skin cells, it is possible to realize skin cell 3D bio-print in the future.

【Key words】 3D digital reconstruction; Skin microstructure; ImageJ; 3D cell biological printing

近年来,随着 3D 生物打印技术的出现和迅猛发展,其在临床皮肤缺损修复中的应用不断推陈出新,为解决供体皮肤组织受限和皮肤创面修复带来了新的曙光<sup>[1]</sup>。目前,3D 打印修复皮肤缺损的方法以体外培养细胞、构建皮肤替代物后移植覆盖创面为主,按目前体外培养的条件,无法模拟细胞

在体内环境所达到的成熟分化程度,同时也无法在皮肤构建中将各要素按体内组织的结构精确定向分配在三维复合物中,细胞之间的相互作用更是无法实现。Michael 等<sup>[2]</sup>应用激光生物打印机制作的由 20 层角质细胞、20 层成纤维细胞和 Matrigel<sup>®</sup> 组成的皮肤类似物移植后存活良好,但新生皮肤缺乏皮肤附属结构、无相应生理功能,与理想的皮肤替代物仍有差距。生物打印技术可以实现成纤维细胞、表皮细胞,生长因子的分层打印,将其精确定位于组织缺损原位,做到生物打印原位修复,有望精确构建皮肤层次、重构皮肤附属器,其成功有赖于 3D 生物打印机对微细结构打印精确度的提升和正常皮肤生理结构模型的建立<sup>[3]</sup>。自 2016 年 6 月,上海交通大学医学院附属第九人民医院整复外科运用正常皮肤连续切片分别行 HE 染色,将图像数据

DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.01.002

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81372097);上海市科学技术委员会科研计划项目(14441900800,14441900802);上海交通大学“医工交叉研究基金”(YG2014MS06);上海交通大学医学院高峰高原计划研究型医师(20161420)

作者单位:1.上海交通大学医学院附属第九人民医院 整复外科,上海 200011;2.泰兴市人民医院 神经外科,江苏 泰兴 225400

通信作者:柴岗,Email:13918218178@163.com;

张艳,Email:13651817522@163.com

\* 共同第一作者

导入 ImageJ 软件进行处理,标定表皮、真皮的层次和不同细胞的分布及空间位置,构建皮肤三维模型,完成皮肤微观数字化三维结构的构建。

## 1 对象与方法

### 1.1 组织标本来源

头皮标本取自在本院接受面部除皱术的 1 例 45 岁女性患者。该患者对其标本用于本实验知情同意。取材后行甲醛固定、石蜡包埋、切片及 HE 染色等,切片厚 4  $\mu\text{m}$ ,共制作 100 张切片。

### 1.2 图像处理

**1.2.1 二维图像采集** 在 20 倍显微镜下按切片顺序进行图像采集,像素为 1280  $\times$  960,每张原始切片都放置标尺,测量后估算每个像素对应的切片实际大小约为 4  $\mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ 。共获得 100 张图片。

**1.2.2 二维图像处理** (1)配准。连续切片必须进行图像配准,旨在消除切片进行平移时的对位错误。在 ImageJ 软件中打开第 1 层及第 2 层两张皮肤切片图像作为图层 1 及图层 2,图层 2 透明度调整为 50%,移动图层位置并通过变形功能对两图层中皮肤表面高度、毛囊和主要血管进行配准,抵消切片制作及拍摄过程中造成的皮肤切面变形(图 1a)。连

续观察 3~5 张切片,根据皮肤结构连续变化的趋势对因制片过程所导致的明显变形做出判定。通过调整使该结构处于前后几层切片连续变化中的合理位置,并进一步校准其空间位置,弥补制片过程中的明显变形(图 1b)。(2)按上述方法对全部 100 层皮肤切片图像进行配准。(3)利用“Import Image Sequence”功能将 100 张切片图像按顺序导入软件中,利用“Crop”功能截取适当正方形范围的图像(图 1c)。(4)利用“Set Scale”功能设定标尺(图 1d)。(5)利用“Subtract Background”功能清除切片背景杂色,使用“Invert”将图像调整为反色,以提高对比度(图 1e)。

**1.2.3 三维模型的生成** 应用 ImageJ 软件中的插件“3D Viewer”将连续切片图像重建为三维模型,见图 2。

## 2 结果

在 ImageJ 软件中选择 3D Viewer,可浏览之前采集的各层二维结构,并重建各角度二维平面结构。另可生成动画(.gif)及视频(.avi)文件,可动态显示皮肤显微三维结构。

## 3 讨论

ImageJ 软件是由美国国家健康协会开发

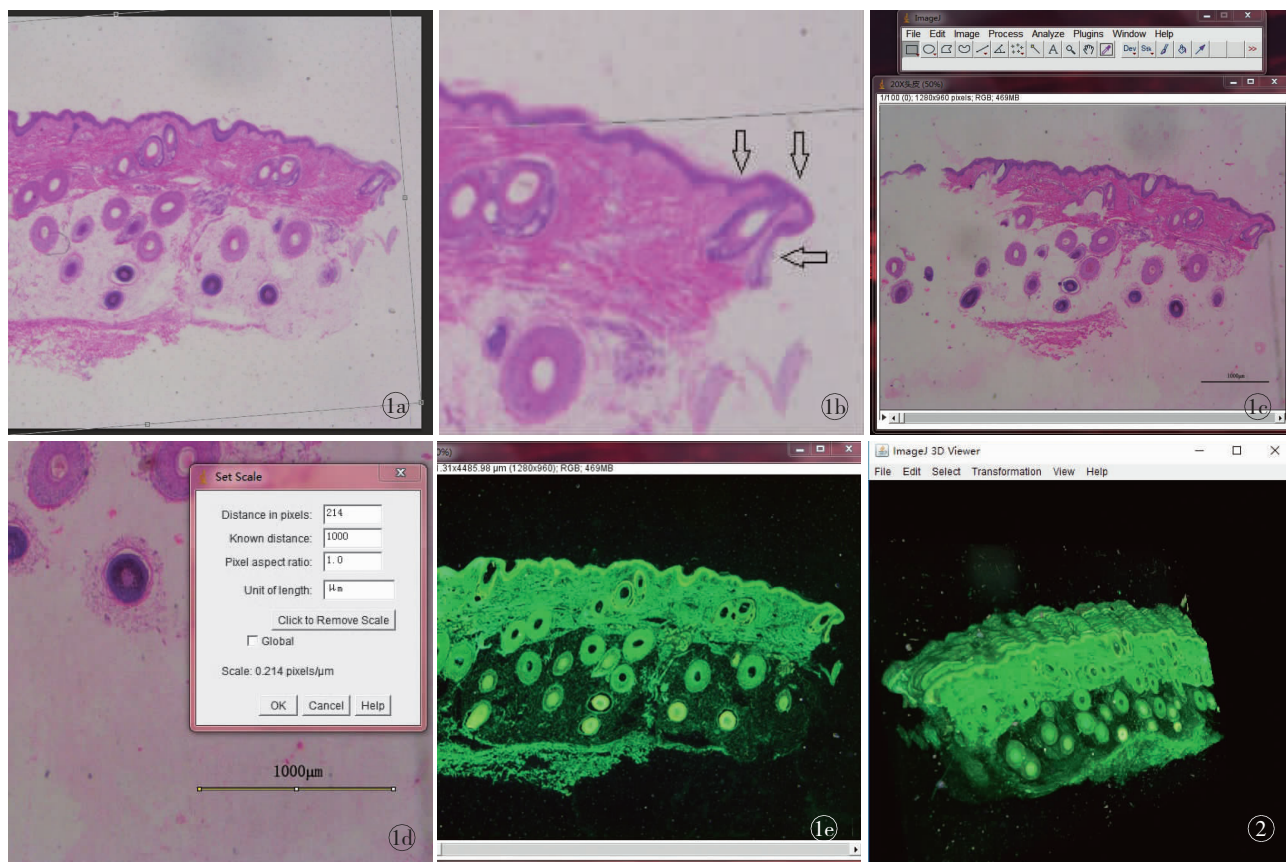


图 1 在 ImageJ 中对所有二维图像进行处理 a. 旋转、平移 b. 调整至合理位置 c. 导入连续切片 d. 设定标尺 e. 颜色反转  
图 2 ImageJ 显示重建后的皮肤三维显微结构



(NIH),可运行于 Microsoft Windows、Mac OS 等多种平台,除了基本的图像操作,如缩放、旋转、扭曲、平滑处理外,还能进行图片的区域和像素统计,间距和角度计算,柱状图和剖面图的创建,以及傅里叶变换。图像分析处理功能强大。目前广泛用于医学、生物学、航空等领域<sup>[4]</sup>。冯爱芬和张永久<sup>[5]</sup>应用 ImageJ 软件对显微镜下拍摄的织物图像进行处理分析,快速、有效地统计出织物的孔隙率,具有精度高、再现性好等特点。Cai 等<sup>[6]</sup>利用 ImageJ 软件和自定义宏成功地对不同治疗方法下乳腺癌细胞 gamma-H2AX 病灶的数量、面积和密度进行了定量分析和比较。余琦等<sup>[7]</sup>提出的基于 ImageJ 软件的动脉粥样硬化病变的图像分析方法,能够准确、有效地评估动脉粥样硬化病变程度,降低了研究工作难度和成本,并指出此方法能够推广到更多的动物模型及临床组织学图像的分析中去。Rha 等<sup>[8]</sup>运用 ImageJ 软件分别以面部计算机断层扫描、乳腺磁共振数据为基础测量了眼眶容积及乳房体积,并与其他方法测得结果并无明显区别,证明了其在宏观体积测量中的可靠性。Elsayed 等<sup>[9]</sup>利用 ImageJ 分析了在微流体环境下的精子运动模式。根据以上大量经验,我们可以肯定 ImageJ 软件在生物医学领域测量细胞相对位置、构建三维结构图的可行性和可靠性。

本研究中,切片图像中毛囊及皮脂腺等皮肤附属器的分割采用人工标注的半自动分割方法,原因是连续切片厚度只有 4  $\mu\text{m}$ ,制作过程中易变形,且 HE 染色后得到的切片图像内不同结构颜色值相近,自动化分隔极其困难且精度不高;同样的结构由于切片制作时切割角度不同,在切片上显示的截面形状复杂,造成分割算法很难确定;皮肤结构复杂,HE 染色中除了角质细胞、成纤维细胞、毛囊等附属器之外,背景中充斥着大量胶原纤维染成的均匀粉红色图形,因此,分割的最直接而有效的方法是人工对切片逐个进行辨识。这种方法的优点是物体分割准确,能够排除切片制作过程中皮肤结构变形、染色不均等造成的影响;缺点是时间长,耗精力,不同的人分割的结果可能不完全相同。

本研究受制于计算机硬件,仅初步验证了所采用图像处理方法的可行性。在进一步的研究中,将更新计算机硬件,并逐步实现以下 5 个目标:(1)分辨率更高的显微结构数据采集;(2)细胞标记方法多样化,重建含有更多细胞种类信息的三维结构;(3)采集多人多部位样本,建立皮肤显微结构数据库,用于大数据分析;(4)对不同种类细胞进行彩色标记,

实现细胞空间分布情况可按种类逐个显示;(5)观察干细胞及生长因子在皮肤愈合过程中的动态变化。

皮肤显微结构三维重建的最终目的是实现皮肤 3D 细胞打印。3D 打印技术,尤其是近年来新提出的原位 3D 打印技术有望成为一种外科修复重建的全新医疗模式,尽管仍处在起步阶段,但依然具有极大的优势和发展潜力<sup>[10-11]</sup>。要达到原位打印精确修复组织缺损的目的,正常组织结构的微观三维地图是不可或缺的,以本实验建立的数字化皮肤计算机辅助设计模型为基础,辅以合适的细胞外基质模拟材料——如多孔纳米生物材料<sup>[12]</sup>或静电纺丝技术制作的纳米级纤维多微孔支架<sup>[13]</sup>进行的 3D 打印,能够准确模拟成纤维细胞、表皮干细胞在正常皮肤中的空间位置以及生长因子的多浓度梯度,在类似正常生理状况细胞的微环境下,表皮干细胞有望分化出皮肤附属器,构建更高质量的再生皮肤。然而,本实验获得的皮肤三维显微结构图仍是不完美的,由于现有切片、染色、抗体标记及人工标定细胞技术水平的限制,并不能完全展现生理状态下皮肤的状态,如黑色素细胞、周围神经细胞等的标定和修复并不是目前 3D 图像重建和打印技术所能达到的。原位 3D 打印的临床应用也存在如下问题:(1)测量技术。原位 3D 打印是生物制造技术和成像技术的结合<sup>[14]</sup>,3D 打印的质量依赖于测量技术对损伤部位实时测量所获得的打印区域精确的几何形状。(2)无菌环境。原位 3D 打印不同于传统 3D 打印构建的组织工程皮肤,前者的机械结构在治疗过程中无可避免地与患者发生接触,而手术环境的清洁直接决定了打印组织的成活与否。(3)打印材料。3D 打印皮肤的最佳材料无疑是表皮干细胞、毛囊干细胞,但是这些细胞的来源和分选方法仍是临床应用的难点。

尽管原位 3D 打印精确修复组织缺损的研究困难重重,但凭借其修复精准、重构组织质量优异以及有望完成机械化自动控制的优点,必将成为学科发展的主流趋势。以本实验皮肤微观三维结构图的成功构建为基础,人体各种器官结构也能准确构建,这将使原位 3D 打印技术成为一种高效、精准的临床治疗手段。

#### 参考文献:

- [1] Mironov V, Reis N, Derby B. Review: bioprinting: a beginning[J]. Tissue Eng, 2006,12(4):631-634.

(下转 11 页)

尖隆起或延长作用并不十分明显<sup>[10]</sup>,这是注射隆鼻对鼻长和鼻尖的改善不及鼻根明显的原因,对于鼻部瘢痕粘连,严重短鼻或鼻尖圆顿、过低的患者,手术隆鼻仍是首选。

3D 测量极大地弥补了二维测量及手工测量的缺陷,其特有的测量项目包括极点分析、体积(容积)测量、三维空间距离测量和角度测量。鼻部在面部较为突出、立体,各亚单位的数据难以手工测量,传统使用照片进行测量的方法难以得到准确的结果,对 3D 模型进行计算机测算具有快捷、方便、精准等优势,是一个可量化评估鼻外形变化的有效工具。

#### 参考文献:

- [1] Kook MS, Jung S, Park HJ, et al. A comparison study of different facial soft tissue analysis methods[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2014, 42(5):648-656.
- [2] Cheung LK, Chan YM, Jayaratne YS, et al. Three-dimensional cephalometric norms of Chinese adults in Hong Kong with balanced facial profile[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,

2011,112(2):e56-e73.

- [3] 李战强. 面部平衡性原则在鼻整形中的应用[J]. 中华医学美容美容杂志, 2016,22(4):240-241.
- [4] 马继光, 蔡磊, 王克明, 等. 自体颗粒肋软骨移植隆鼻的临床应用[J]. 中华整形外科杂志, 2016,32(1):25-28.
- [5] 吕伟, 范巨峰, 周璐, 等. 三段法透明质酸注射隆鼻术[J]. 中国美容整形外科杂志, 2016,27(4):222-224.
- [6] Baring DE, Marshall JN. How we do it - Hyaluronidase injection for the rhinoplasty patient[J]. Clin Otolaryngol, 2011,36(6):588-589.
- [7] Ozturk CN, Li Y, Tung R, et al. Complications following injection of soft-tissue fillers[J]. Aesthet Surg J, 2013,33(6):862-877.
- [8] Abhinav K, Acosta Y, Wang WH, et al. Endoscopic endonasal approach to the optic canal: anatomic considerations and surgical relevance[J]. Neurosurgery, 2015,(11 Suppl 3):431-445.
- [9] 王海平, 曾高, 吴毅平. 鼻修复重建相关的面部血管解剖[J]. 中华医学美容美容杂志, 2016,22(4):256.
- [10] 杨青, 樊星, 殷悦, 等. 透明质酸注射鼻整形的临床应用[J]. 中国美容整形外科杂志, 2016,27(1):6-8.

(收稿日期:2016-11-30)

**本文引用格式:** 齐向东, 陈建武, 周婕, 等. 透明质酸注射隆鼻的 3D 测量[J]. 中国美容整形外科杂志, 2017,28(1):8-11. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2017.01.003.

(上接 7 页)

- [2] Michael S, Sorg H, Peck CT, et al. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice[J]. PloS One, 2013,8(3):e57741.
- [3] Guillotin B, Souquet A, Catros S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization[J]. Biomaterials, 2010,31(28):7250-7256.
- [4] 宋玉丹, 容幸福, 秦志钰. 利用 ImageJ 提取目标物平面图像外轮廓的方法[J]. 中国高新技术企业, 2008,(1):104.
- [5] 冯爱芬, 张永久. 应用 ImageJ 软件进行图像处理统计织物孔隙率[J]. 针织工业, 2015,(1):9-11.
- [6] Cai Z, Vallis KA, Reilly RM. Computational analysis of the number, area and density of gamma-H2AX foci in breast cancer cells exposed to (111)In-DTPA-hEGF or gamma-rays using Image-J software[J]. Int J Radiat Biol, 2009,85(3):262-271.
- [7] 余琦, 陈颖, 韩莉娟, 等. 利用 ImageJ 软件对家兔动脉粥样硬化病变图像进行定量分析的方法[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015,24(4):297-301.
- [8] Rha EY, Kim JM, Yoo G. Volume measurement of various tissues using the imageJsoftware[J]. J Craniofac Surg, 2015,26(6):e505-e506.
- [9] Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad M. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm mo-

tion in microfluidic environments using Image-J[J]. Theriogenology, 2015,84(8):1367-1377.

- [10] 赵媛媛, 周果宏, 高殿帅, 等. 基于 3D Slicer 的成年大鼠侧脑室外侧壁脑室下区全部细胞核的三维重建[J]. 中国生物医学工程学报, 2004,23(6):589-592.
- [11] Binder KW, Zhao WZ, Aboushwareb T, et al. In situ bioprinting of the skin for burns[J]. Journal of the American College of Surgeons, 2010,211(3):S76.
- [12] Baca HK, Carnes EC, Ashley CE, et al. Cell-directed-assembly: directing the formation of nano/bio interfaces and architectures with living cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2011,1810(3):259-267.
- [13] Hodgkinson T, Bayat A. Dermal substitute-assisted healing: enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design[J]. Arch Dermatol Res, 2011,303(5):301-315.
- [14] Keriquel V, Guillemot F, Arnault I, et al. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice[J]. Biofabrication, 2010,2(1):014101.

(收稿日期:2016-12-10)

**本文引用格式:** 陈伟, 王□, 陈晓俊, 等. 人皮肤显微结构三维可视化方法的初步研究与建立 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2017,28(1):5-7,11. DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.01.002.