

组织光透明技术在骨透明化中的 生物医学成像应用与展望

周康为^{1,2}, 杨林海², 邱棋³, 郑翔隆¹, 蒋位财¹, 林李嵩^{1*}, 赵庆亮^{2**}

¹福建医科大学附属第一医院口腔颌面外科, 福建医科大学面部整复与重建研究室, 福建省颌面医学中心, 福建 福州 350005;

²厦门大学公共卫生学院分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 分子影像暨转化医学研究中心, 福建 厦门 361102;

³厦门大学医学院, 福建 厦门 361102

摘要 近年来组织光透明技术的飞速发展, 为现代骨科临床基础研究带来了新的契机。组织光透明技术主要通过多种物理、化学手段, 降低组织的光散射和光吸收, 使光能在组织中更好地传播, 从而增加光学成像的深度和对比度。结合多种荧光标记策略, 实现更深层、更高分辨的骨组织及三维空间微结构信息, 为突破骨这种高散射组织及骨疾病的分子影像学带来新的视角与方法。对组织光透明技术的原理及机制进行介绍, 并重点从骨组织光透明成像技术的应用现状、新方法及透明机制三个方面加以详述, 最后对该技术应用于骨及骨疾病的分子影像学研究前景进行展望。

关键词 医用光学; 组织光透明技术; 骨透明化; 光学成像; 三维成像

中图分类号 Q631

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202158.2000001

Bone Transparency Imaging Using Tissue Optical Clearing Technique

Zhou Kangwei^{1,2}, Yang Linhai², Qiu Qi³, Zheng Xianglong¹, Jiang Weicai¹,
Lin Lisong^{1*}, Zhao Qingliang^{2**}

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Facial Plastic Surgery and Reconstruction of Fujian Medical University, Craniofacial Medical Center of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350005, China;

²State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics and Center for Molecular Imaging and Translational Medicine, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China;

³Medical College, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China

Abstract Recently, the rapid advancements in tissue optical clearing technology have brought new opportunities for modern orthopedic optical imaging research. Tissue optical clearing technology primarily reduces tissue light scattering and light absorption through various physical and chemical methods, allowing light energy to better spread in the tissue in order to increase the depth and contrast of optical imaging. Deeper and higher resolution bone tissue images and 3D spatial microstructure information can be obtained when combined with various fluorescence-labeling strategies, presenting a novel perspective and method for a breakthrough in the molecular imaging study of bone tissue with high scattering and bone disease. In this study, we will discuss the principle and mechanism of tissue optical clearing technology, focusing on the current state, most recent methods, and the mechanism of bone tissue clearing imaging, and prospect the possibility of using this technique in the molecular imaging of bone.

收稿日期: 2020-11-05; 修回日期: 2020-12-07; 录用日期: 2021-01-02

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81701743)、福建省科技创新联合基金项目(2019Y9128)、厦门市产学研科技合作项目(3502Z20183018)

通信作者: *dr_lls@163.com; **zhaoql@xmu.edu.cn

Key words medical optics; tissue optical clearing technique; bone transparency; optical imaging; three-dimensional imaging

OCIS codes 110.6680; 170.6930; 290.7050; 160.4760

1 引 言

生物体的组织、器官由不同类型的细胞所构成,并发挥着重要功能。因此,高分辨可视化细胞的生理及病理学状态,对指导临床疾病的发生发展具有重要的指导意义。然而,大多数生物组织的浑浊高散射特性,严重降低了光学成像的深度,进而严重影响了当前光学成像技术在生物组织器官成像中的应用能力。

现代成像技术电子计算机断层扫描(CT)^[1]、磁共振成像(MRI)^[2]、正电子发射断层扫描(PET)^[3]的发展及应用,在临床医学中具有举足轻重的作用。然而,在基础研究中,由于缺乏高对比度的细胞标记工具,这些传统技术在细胞水平的成像上还存在一定的不足。组织切片技术^[4]虽然能达到细胞水平的分辨率,但需要对组织进行染色、切片和固定包埋等操作,过程繁琐,且连续切片时容易丢失信息。光学成像技术如共聚焦显微镜^[5]、双光子显微镜^[6]、光片显微镜^[7]等的操作简单,且其成像分辨率可达到细胞水平,但在实际的活体成像应用中,生物组织具有高度不透明特征,这一特征极大地限制了成像深度。

生物组织的不透明性,主要是因为光散射和光吸收阻碍了光在组织中的传播,其中:光散射使光偏离原有的方向,不能径直穿过组织向前方传播;光吸收则会将光能转换为其他形式的能量(如热),导致光强度的衰弱^[8]。近些年兴起的组织光透明技术,通过物理和(或)化学手段,降低了组织的光散射和光吸收,使光能在组织中更好地传播,从而增加了光学成像的深度和对比度。该技术已被广泛应用于神经病学领域,成为神经学家研究突触或分析各种脑细胞空间信息的重要工具^[9-13]。目前,该技术也逐渐被应用于骨科学的研究,已经开发的几种骨骼透明方法有 Bone CLARITY (Bone Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/*in situ* hybridization-compatible Tissue-hydrogel)、PEGASOS (Polyethylene Glycol (PEG)-Associated Solvent System)、vDISCO (nanobody(V_HH)-boosted 3D Imaging of Solvent-Cleared Organs)、SOCS (Skull Optical Clearing Solution) 等^[14-20],上述方法可以实现细胞水平的三

维成像,为骨及骨疾病的分子影像学研究提供新的视角与方法。

本文将对组织光透明技术的原理及机制进行介绍,就现有骨组织光透明成像技术的研究现状进行综述,并重点阐述组织光透明技术在骨科学的应用及成像方法,简要介绍组织光透明技术在其他方向的研究,最后对该技术在骨及骨疾病的分子影像学中的前景进行展望。

2 光透明技术原理及机制

生物组织的不透明性主要是因为光散射和光吸收阻碍了光在组织中的传播。大多数生物组织由水、蛋白质、脂质等构成,而这些成分的光学性质具有较大的差异。当入射光穿过生物组织时,不同成分的折射率(RI)差异会导致光散射^[21]。此外,生物组织内的内源性色素如血红素、核黄素、黑色素等存在光吸收,这进一步阻碍光在组织中的传播。因此组织光透明技术的关键是降低组织光散射与光吸收。其原理是在清除内源性色素的基础上,通过高渗、高折射率的组织光透明剂,使组织成分的折射率与细胞外液相匹配,进而减少组织的散射^[22]。现有的光透明技术主要分为两类:基于有机溶剂的透明方法[图 1(a)]与基于亲水性试剂的透明方法[图 1(b)]。

目前组织光透明技术的机制存在 4 种假说,分别为物理机制假说、分子机制假说、脱水机制假说和在体机制假说。

物理机制假说。物理机制假说认为组织光透明技术的机制主要包括两个方面:一是组织光透明剂与组织相互作用,使组织更加透明但不均匀;二是组织光透明剂引起背景介质折射率增加^[23]。

分子机制假说。分子机制假说认为醇类对皮肤的透光效果与羟基数目有关,而与透光剂的折射率和分子量无关。另外,碳链上具有较长距离羟基的醇可能比只有羟基相邻的醇具有更好的光学透明效果^[24]。

脱水机制假说。脱水机制假说认为在组织表面应用高渗的组织光透明剂可增加组织间质的液体渗透压,诱导水向组织表面甚至组织外转移。间质中水分的减少提供了额外的折射率匹配效果,并减小

了组织的整体厚度,使组织更致密有序^[25-27]。

在体机制假说。由于在体、离体条件下组织的结构和功能存在显著差异,在体机制假说认为组织光透明技术的在体和离体机制可能也具有一定的差异。例如离体研究认为胶原的解离是光透明化的重要机制,在体研究则认为胶原仅是体积大小发生了改变^[28-29]。

综上所述,一般认为组织光透明技术是由一种或多种机制来实现的:高渗组织光透明剂诱导组织脱水,减小组织厚度;组织与组织光透明剂发生分子动力学反应,导致组织脱水或组织结构暂时性改变;组织光透明剂增加间质液体折射率,增强组织内各物质之间的折射率匹配。

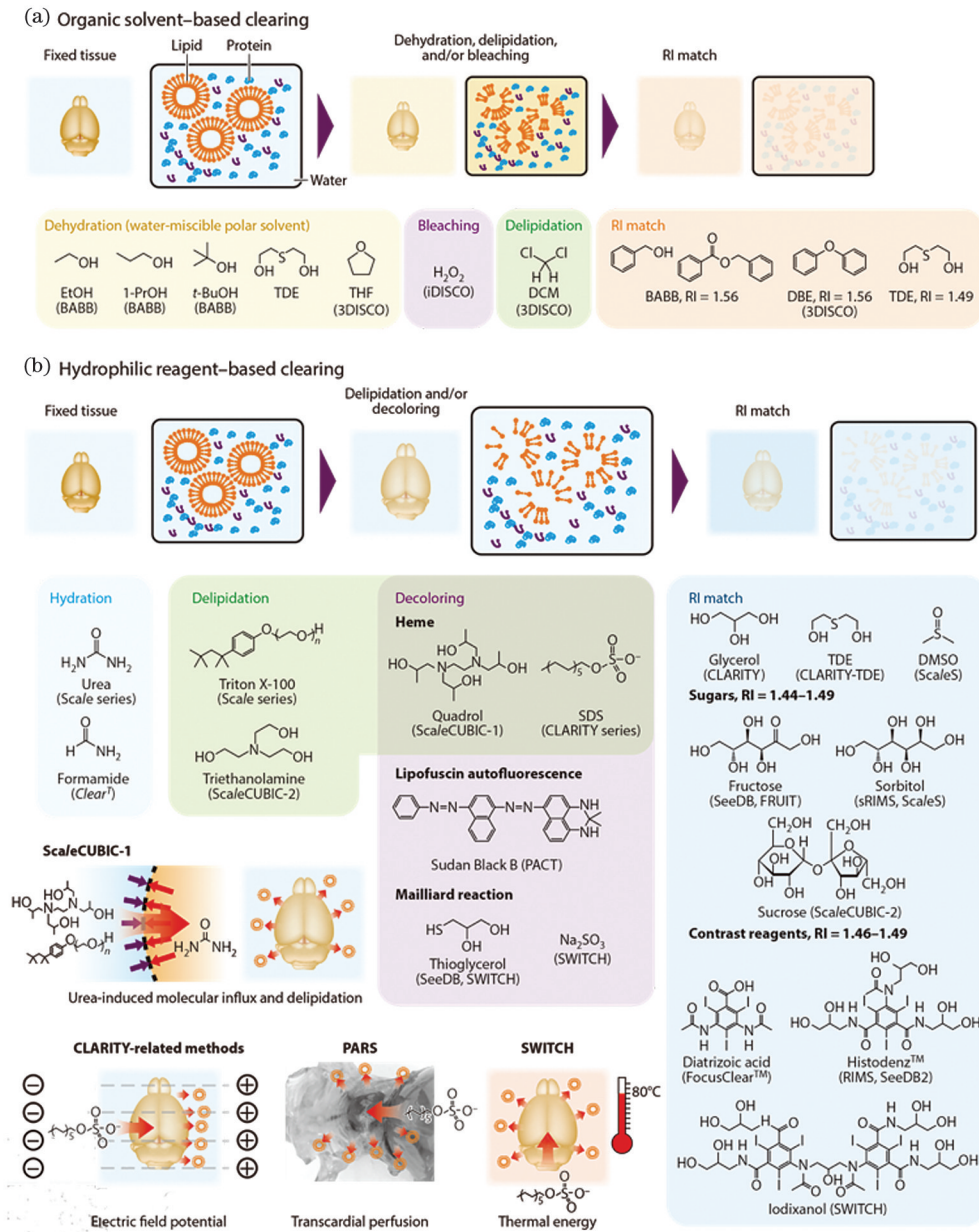


图 1 组织光透明化示意图^[22]。(a)基于有机溶剂的透明方法;(b)基于亲水性试剂的透明方法
Fig. 1 Schematic diagrams of tissue optical clearing^[22]. (a) Organic solvent-based clearing;
(b) hydrophilic reagent-based clearing

3 骨组织光透明技术原理

骨组织与软组织成分的不同在于:矿化程度高,富含胶原蛋白,脂质含量相对较低,骨髓间隙含有高度彩色的血细胞。这些差异使得许多组织光透明方

法应用于骨组织时受限。因此,一些新的硬组织器官透明方法应运而生。尽管名称和化学物质不同,但所有这些方法都遵循相似的原理(如图 2 所示),即通过固定、脱钙、脱色、脱脂、脱水和折射率匹配,使硬组织透明化^[30]。

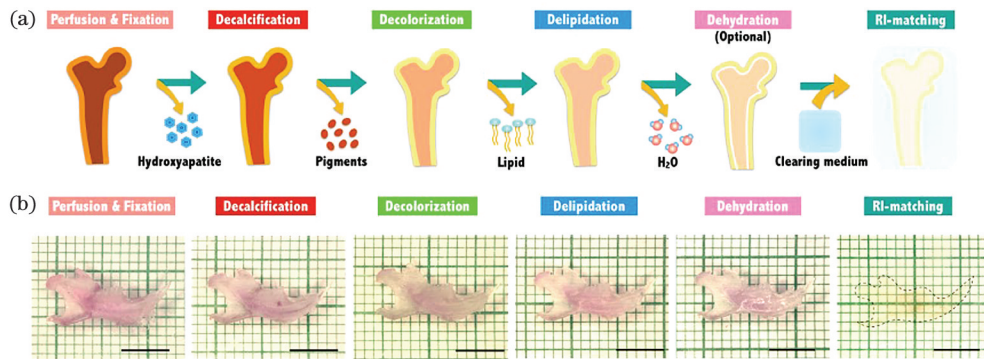


图 2 骨组织透明化的一般原理^[30]。(a)多数组织透明方法采用的透明步骤；
(b)采用 PEGASOS 透明成年小鼠下颌骨大体图

Fig. 2 General principles for bone tissues clearing^[30]. (a) Similar treatment steps have been adapted by most tissue-clearing methods; (b) adult mouse mandible was cleared by the PEGASOS method and images were taken after each treatment step

与此同时, Chen 等^[31]通过高光谱 SRS (Stimulated Raman Scattering) 显微镜揭示了不同活体颅骨光透明方法的作用机理: USOCA (Urea Based Skull Optical Clearing Agents) 的主要作用是降解富含蛋白质的成分, 比如颅骨表面的胶原纤维和嵌入骨头的蛋白质; EDTA (乙二胺四乙酸) 能够防止蛋白质形成多聚体, 并通过螯合钙离子有效分解无机磷酸盐的基质, 显著减小头骨中无机矿物质的厚度和密度; USOCA 和 EDTA 联合使用, 可以在降低骨骼有机和无机成分的密度同时, 维持颅骨的厚度; 甘油则主要通过匹配折射率来改善颅骨

的透明度。

4 骨组织光透明成像技术研究现状

如表 1 所示, 目前已经开发出几种骨骼透明方法, 可实现小鼠骨骼或全身的透明化, 被广泛用于小鼠骨髓内造血干细胞 (HSC) 的定位、颅骨下脑膜血管和 SMCs (Skull-Meninges Connections) 的三维成像、脊髓及牙齿内的血管网络可视化等研究。然而现有的几种骨骼透明方法, 在骨骼透明过程中会对软组织造成一定的影响。

表 1 几种常见的骨组织光透明技术的优缺点

Table 1 Several bone tissue optical clearing techniques and their advantages and disadvantages

Method	Bone sample	Advantage	Disadvantage
Modified Murray's clearing ^[32]	Mouse femur	Deep imaging of bone marrow	Lacking of endogenous fluorescence preservation
Bone CLARITY ^[14]	Mouse tibia, femur, and vertebral column	Clearing of osteoprogenitors within intact bone marrow	Hard to make soft tissue organs clearing
vDISCO ^[16]	Whole-body of mouse	Enhancing endogenous fluorescence	Shrinkage of soft tissue from dehydration
CUBIC series ^[33]	Whole-body of mouse	Achieving high transparency and preserving endogenous fluorescence	Decrease of tissue transparency and precipitation due to the possible evaporation of water during imaging
PEGASOS ^[15]	Whole-body of mouse	Achieving superior transparency and providing better green fluorescent proteins preservation capability	Shrinkage of soft tissue organs from dehydration and muscle tissue presenting high autofluorescence after clearing

4.1 骨组织光透明技术

4.1.1 改良 Murray 氏透明法

为了对骨髓进行成像, Acar 等^[32]对 Murray 氏透明法进行改良: 采用梯度浓度甲醇或乙醇溶液进行脱水, 舍弃脱钙、脱色的过程。透明剂为 BABB (苯甲醇与苯甲酸苄酯的体积比为 1:2), 为消除

BABB 暴露在空气或光线下可能产生的过氧化物, 使用前需将 10 g 活性氧化铝加入 40 mL 的 BABB 中旋转至少 1 h, 然后在 2000 g 离心 10 min 以除去悬浮的氧化铝颗粒。为使抗体和透明剂进入髓腔, 需要将骨头一分为二。此方法可实现对骨髓的三维成像, 能够定位骨髓中的造血干细胞。其主要缺点

是会淬灭内源性荧光,这不利于其与免疫荧光技术的结合。

4.1.2 Bone CLARITY

Bone CLARITY 是一种基于水凝胶的透明方法,专用于硬组织透明^[14]。多聚甲醛固定之后,使用质量分数为 10% 的 EDTA 对骨组织脱钙 2 周,使之利于光和分子的穿透,同时保留具有与致密纤维结缔组织相似结构特征的骨基质框架。然后用丙烯酸酰胺水凝胶包埋,SDS(十二烷基硫酸钠)溶液脱脂,使其光散射效果最小化。接着使用 EDTP(四羟丙基乙二胺)去除血红素基团使组织脱色。最后使用 RIMS(Refractive Index Matching Solution)系列透明剂进行折射率匹配^[34]。该方法可使小鼠的完整股骨、胫骨和脊柱透明化(如图 3 所示)。其主要缺点是对软组织器官透明效果较差,这限制了它在复杂组织中的应用。

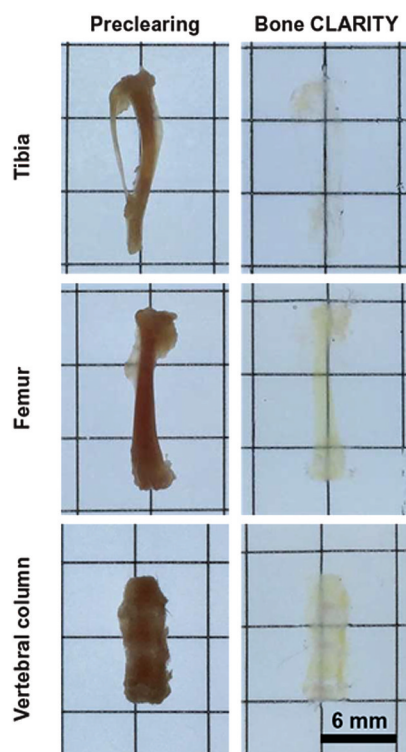


图 3 Bone CLARITY 使完整骨骼透明化^[14]

Fig. 3 Bone CLARITY makes the complete bone transparent^[14]

4.1.3 DISCO 系列

3DISCO^[35] 作为第一个能部分保留内源性荧光蛋白的基于有机溶剂的透明方法,经过了多次改良,如 iDISCO^[36]、uDISCO^[37]、vDISCO^[16] 等,目前广泛应用于脑组织透明化,且均具有较佳的透明能力。其中基于 uDISCO 方法的最新变体 vDISCO 开始应用于小鼠全身透明化,其涉及硬组织的神经系统透

明化。vDISCO 脱色和脱钙分别使用 CUBIC reagent 1 和 EDTA 对动物进行灌注,采用梯度浓度的叔丁醇脱水,最后使用加入二苯醚和维生素 E 的 BABB 进行折射率匹配。值得注意的是,vDISCO 还使用了基于纳米体的全身免疫标记技术,显著提高了荧光信号强度。此方法的主要缺点为脱水导致软组织收缩。

4.1.4 CUBIC

CUBIC^[33, 38-40] 是一种基于尿素的透明方法,使用 N-烷基咪唑进行脱色,使用高辛醇/水分配系数(LogP)的无盐胺进行脱脂,使用芳香酰胺进行折射率匹配。最初的 CUBIC 不包含脱钙处理,无法有效地将骨骼透明化。在 CUBIC protocol II 中,CUBIC 加入了 CUBIC-B 步骤,即使用 EDTA 溶液脱钙,实现了骨骼透明化。总体而言,CUBIC 能在保留内源荧光的同时实现高度透明化。

4.1.5 PEGASOS

PEGASOS^[15] 是一种基于聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)的溶剂型透明方法,既适用于软组织,也适用于硬组织。采用质量分数为 4% 的多聚甲醛固定,使用质量分数为 20% 的 EDTA 进行脱钙,使用质量分数为 25% 的四甲基乙二胺进行脱色,使用梯度浓度的叔丁醇脱脂,使用叔丁醇和 PEGMMA (Polyethylene Glycol Methacrylate)组成的 TB-PEG 溶剂进行脱水,最后使用苯甲酸苄酯和 PEGMMA 组成的 BB-PEG 将组织透明化及进行折射率匹配。此方法实现了高透明度,提供了较好的 GFP (Green Fluorescent Protein) 保存能力。其主要缺点是脱水导致软组织收缩。虽然收缩不会导致器官内部的组织变化,但它会造成大脑与颅骨分离。此外,收缩还会显著增加肌肉组织的自发荧光,进而降低图像的信噪比。

除以上几种专门针对骨组织开发的透明方法之外,还有一些透明方法也涉及骨组织或小鼠全身的透明化,如:利用 PACT-deCAL^[34] 方法对小鼠胫骨透明化及成像,如图 4 所示,其中图 4(a)为未经透明化的对照胫骨图片,图 4(b)为透明化后的胫骨图片,图 4(c)和图 4(d)为图 4(b)中对应区域的胫骨共聚焦显微图像;利用 uDISCO^[37] 方法对小鼠胫骨、股骨透明化及成像,如图 5 所示,其中图 5(a)和图 5(b)分别为透明化前后的小鼠胫骨图片,且该方法成功实现了小鼠全身尺度的三维荧光成像;CUBIC-HV^[41] 方法实现了小鼠全身乃至幼年狨猴全身的染色、透明及成像(如图 6 所示);FDISCO^[42]

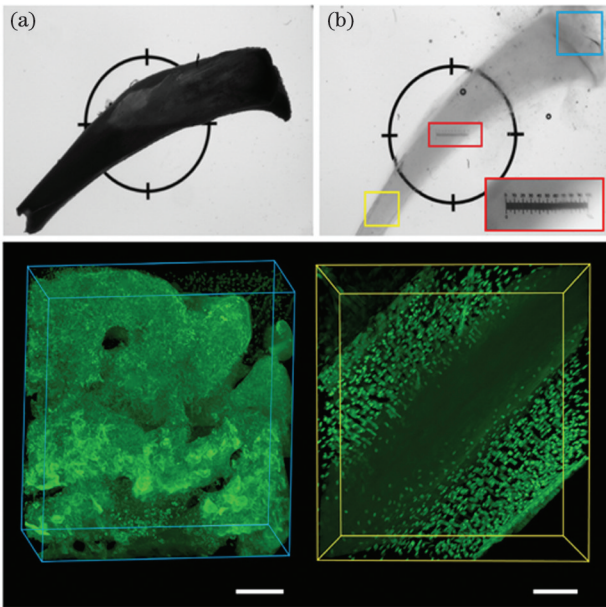


图 4 PACT-deCAL 实现了小鼠胫骨透明及成像^[34]。(a)未经透明化的对照胫骨；(b)透明化后的胫骨；(c)图 4(b)中右上角方框区域对应的胫骨共聚焦显微图像；(d)图 4(b)中左下角方框区域对应的胫骨共聚焦显微图像

Fig. 4 Clearing and imaging of mouse tibia performed by PACT-deCAL^[34]. (a) Tibia without clearing; (b) tibia after clearing; (c) confocal microscopic image of the tibia corresponding to the upper-right box region in Fig. 4 (b); (d) confocal microscopic image of the tibia corresponding to the bottom-left box region in Fig. 4 (b)

方法实现了小鼠和大鼠全身的透明化,其中包括脊髓和股骨,图 7(a)和图 7(b)分别为小鼠和大鼠各器官透明化前后的对比图;MACS^[43]方法实现了小鼠全身透明化,其中包括股骨(如图 8 所示)。

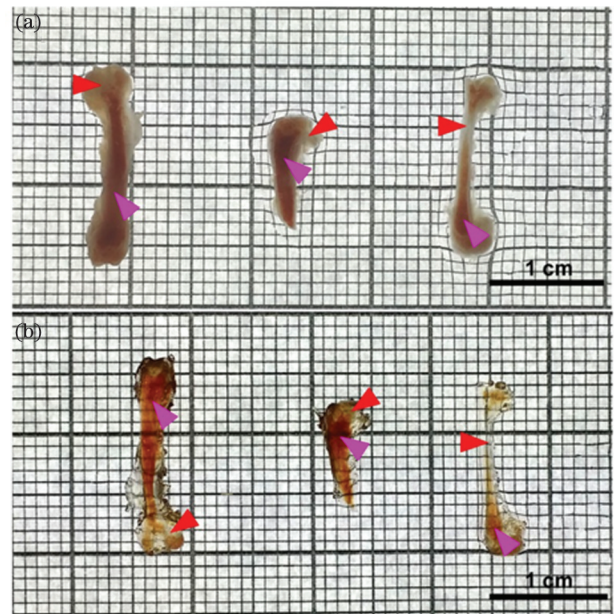


图 5 经 uDISCO 有效透明化的小鼠股骨^[37]。(a)未经透明化的小鼠胫骨及股骨图像；(b)透明化后小鼠胫骨及股骨图像

Fig. 5 Clearing mouse femur performed by uDISCO^[37]. (a) Images of tibia and femur in mice before clearing; (b) images of tibia and femur in mice after clearing

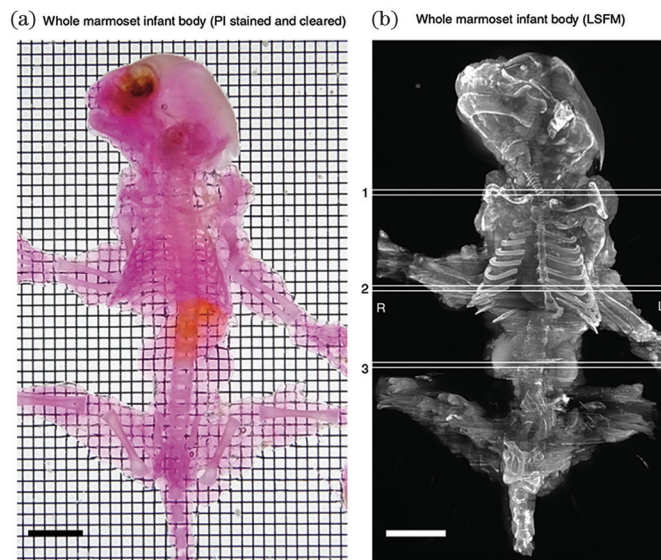


图 6 幼年狨猴全身的染色、透明及成像^[41]。(a)经透明及 PI 染色后的幼年狨猴；(b)经特制光片显微镜成像并三维重建的幼年狨猴

Fig. 6 Whole marmoset infant body by PI staining (propidium iodide), clearing and LSFM (light-sheet fluorescence microscope) imaging^[41]. (a) Cleared and PI-stained infant marmoset body; (b) reconstituted whole-body 3D image acquired with a custom-built LSFM after staining and clearing

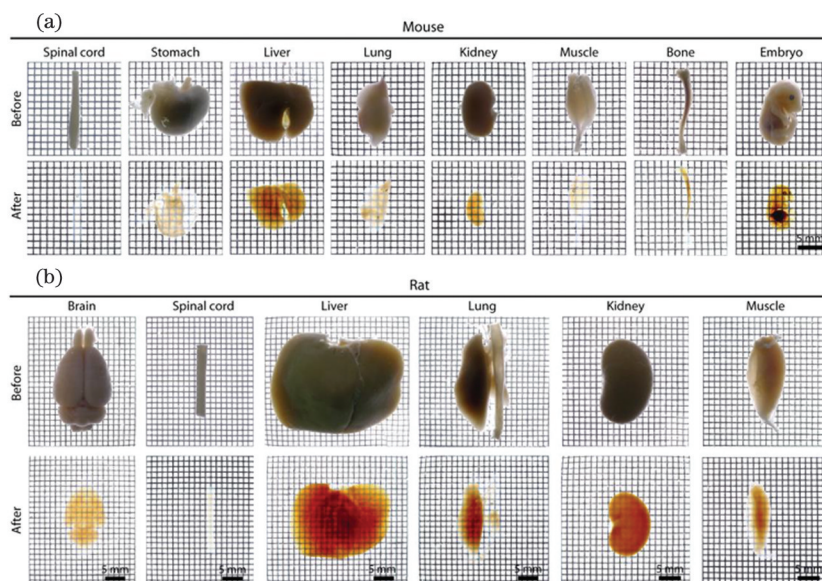


图 7 FDISCO 实现小鼠和大鼠多个器官透明化^[42]。(a)小鼠多器官透明化前后对比图；(b)大鼠多器官透明化前后对比图
Fig.7 FDISCO achieves individual organs clearing in mouse and rat^[42]. (a) Comparison of multiple organs of mouse before and after clearing; (b) comparison of multiple organs of rat before and after clearing

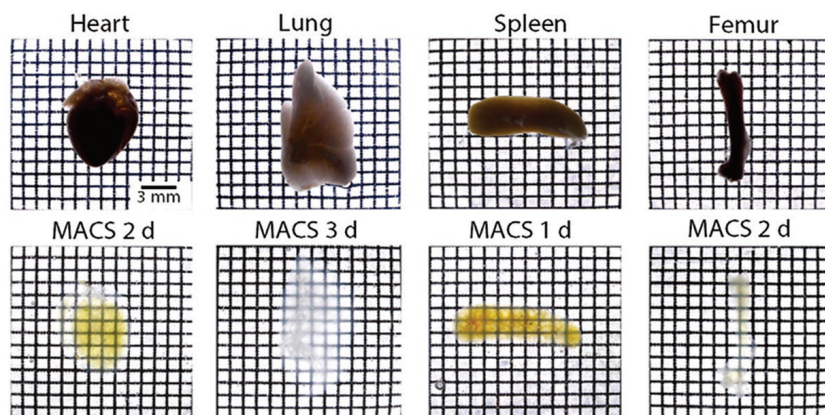


图 8 经 MACS 有效透明化的小鼠软、硬器官^[43]

Fig.8 Clearing performance of both hard and soft organs cleared by MACS^[43]

4.2 组织光透明技术在骨科学中的应用

Acar 等^[32]使用改良 Murray 氏透明法对骨髓透明化,并对大段骨髓进行三维重建(图 9),实现了对未分裂和分裂的造血干细胞的全面定位。图 9(c)和图 9(d)为透明前后的胫骨图片,图 9(e)~(l)显示作者在骨髓中全面定位的造血干细胞。

Greenbaum 等^[14]对 CLARITY 透明法进行了改进,提出了专用于硬组织的 Bone CLARITY 透明法。结合荧光显微镜和计算程序,实现完整骨组织中细胞群体的可视化 and 量化。此方法在使骨骼透明化的同时,保留了内源性荧光,可实现胫骨和椎体细胞水平的三维成像(图 10)。图 10(a)为胫骨和放大的数字切片最大强度投影(MIP)荧光图像,其中虚线表示密质骨的边界。图 10(b)为椎体的 MIP 荧

光图像。

Cai 等^[16]使用 vDISCO 透明法对完整小鼠的骨骼、皮肤和高度自发荧光组织透明化,实现了亚细胞结构的成像和量化。研究发现颅骨骨髓和脑膜之间的短血管连接,并且中风时这些连接充满免疫细胞。图 11 和图 12 分别为经 vDISCO 全景成像的完整颅骨下脑膜血管和 SMCs。图 11(a)和图 11(b)所示,与未损伤的对照组相比,免疫细胞侵犯脑中中风模型小鼠的脑膜血管(箭头)。图 12(a)和图 12(b)为 6 月龄小鼠的矢状面视图;图 12(c)和图 12(d)为 6 月龄小鼠的横断面视图,其中箭头所指处为颅骨与大脑表面之间的 SMCs;图 12(e)和图 12(f)为不同标记方法标记后 SMCs 的详细信息。

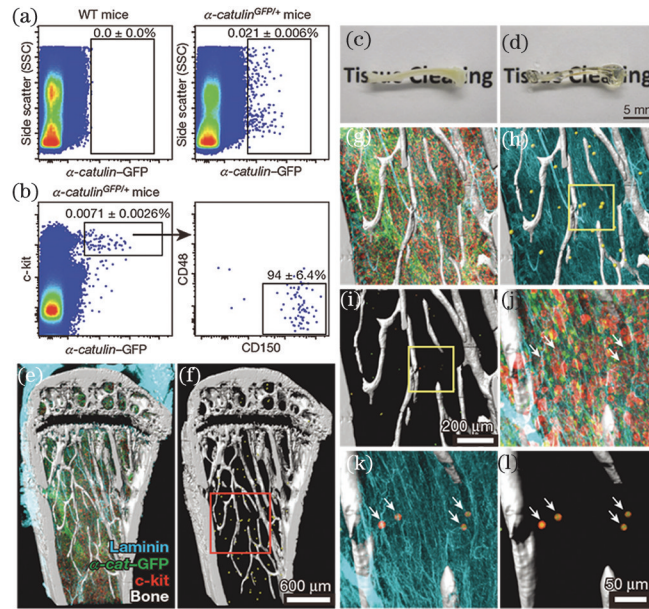


图 9 数字化重建骨髓中定位造血干细胞^[32]。(a)(b)流式细胞术分析骨髓干细胞类别；(c)(d)透明前后胫骨大体图；(e)~(l)骨髓中定位造血干细胞

Fig. 9 Deep imaging of HSCs in digitally reconstructed bone marrow^[32]. (a)(b) Flow cytometry analysis of bone marrow stem cell types; (c)(d) tibia before and after clearing; (e)~(l) deep imaging of HSCs in bone marrow

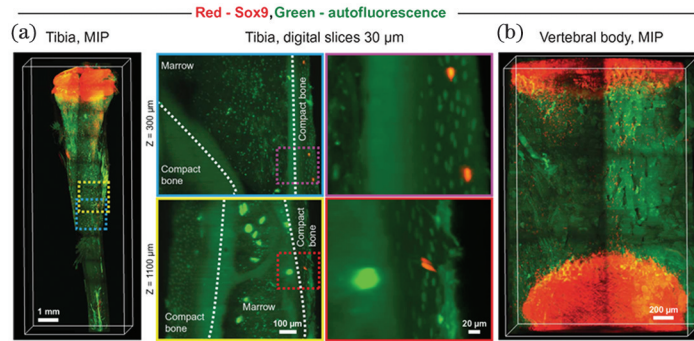


图 10 Bone CLARITY 使完整骨骼透明的同时保留内源性荧光^[14]。(a)胫骨最大强度投影荧光图像；(b)椎体最大强度投影荧光图像

Fig. 10 Bone CLARITY makes the whole bone transparent and makes endogenous fluorescence to be retained^[14]. (a) Maximum intensity projection fluorescence image of tibia; (b) maximum intensity projection fluorescence image of vertebral body

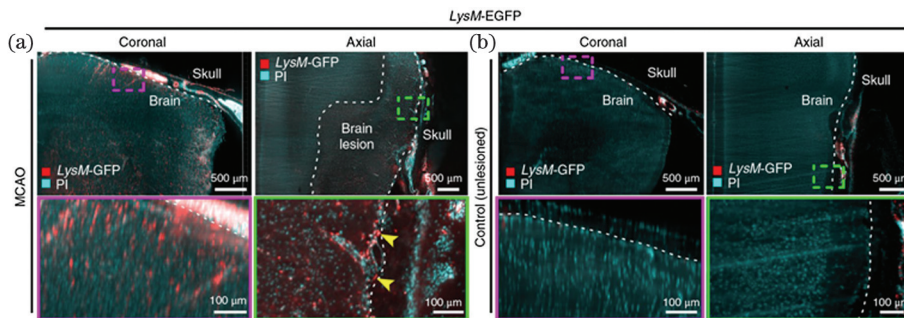


图 11 经 vDISCO 全景成像的完整颅骨下的脑膜血管^[16]。(a)免疫细胞侵犯脑中风模型小鼠的脑膜血管(箭头处)；(b)正常小鼠的脑膜血管未受到免疫细胞侵犯

Fig. 11 A vDISCO panorama shows the meningeal vessels under the complete skull^[16]. (a) Meningeal vessels of middle cerebral artery occlusion (MCAO) model of stroke (at the arrow) invaded by immune cells; (b) meningeal vessels of normal mouse uninvaded by immune cells

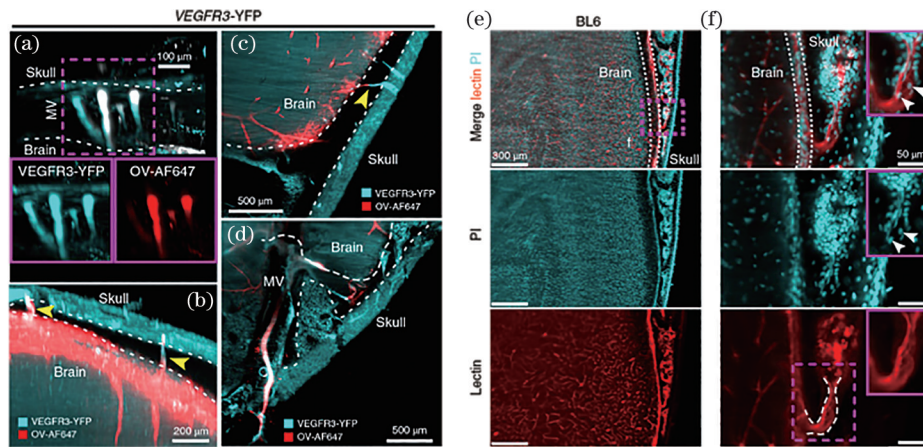


图 12 经 vDISCO 全景成像的完整颅骨下的 SMCs^[16]。(a)(b) 6 月龄 VEGFR3-YFP 小鼠矢状面视图；(c)(d) 6 月龄 VEGFR3-YFP 小鼠横断面视图；(e)(f) 不同标记方法标记后 SMCs 的详细信息

Fig. 12 VDISCO panoramic imaging of SMCs under a complete skull^[16]. (a)(b) A 6-month-old VEGFR3-YFP mouse head in sagittal views; (c)(d) a 6-month-old VEGFR3-YFP mouse head in axial views; (e)(f) details of SMCs after marking with different methods

Jing 等^[15]整合了脱钙、脱色、脱水以及折射率匹配等步骤，提出了基于有机溶剂的透明法 PEGASOS。PEGASOS 可对完整的股骨、短椎骨（长度小于 3 cm）和连带牙齿的下颌骨透明化，且联合应用共聚焦显微镜即可对小鼠的椎骨片段以及连带牙齿的下颌骨成像。可视化脊髓及牙齿内的血管

网络如图 13 和图 14 所示。图 13(c)和图 13(c') 为小鼠脊髓内部血管网络及放大图像，图 13(d)和图 13(d') 为小鼠牙齿内部血管网络及方法图像。图 14(d)和图 14(f)为小鼠牙槽骨和股骨的骨小梁结构，图 14(h)和图 14(h') 为箭头处透明化后小鼠关节韧带及关节盘的显微成像。

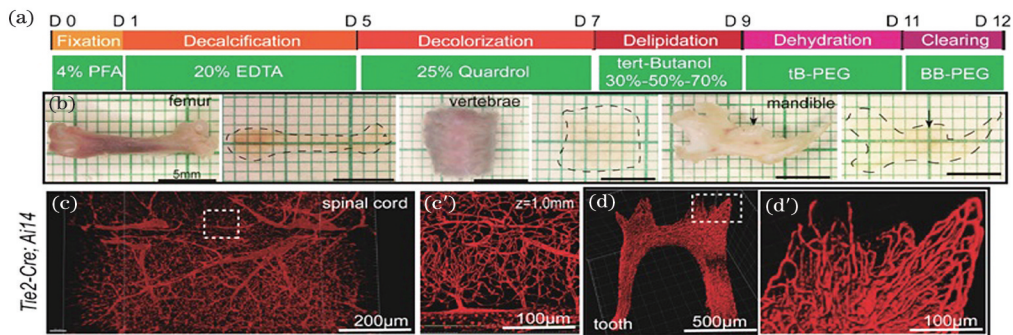


图 13 PEGASOS 被动浸泡程序使硬组织透明化^[15]。(a) PEGASOS 被动浸润透明硬组织流程图；(b) 硬组织透明前后图像对比，包括成年小鼠股骨、短椎骨 (<3 cm) 以及下颌骨；(c)(c') Tie2-Cre; Ai14 小鼠椎骨透明化后血管成像及其矩形框放大图；(d)(d') Tie2-Cre; Ai14 小鼠牙齿透明化后牙髓内血管成像及其矩形框放大图

Fig. 13 PEGASOS passive immersion procedure clears hard tissue organs^[15]. (a) Brief description of the PEGASOS passive immersion procedure for clearing hard tissue organs; (b) femurs, short vertebrae segment (<3 cm length) and mandible were harvested from adult mice (60 days of age) and imaged before and after clearing; (c) (c') short vertebrae from Tie2-Cre; Ai14 mice was imaged through the bone to reveal the inside vasculatures and enlarged view of the rectangular area in Fig. 13(c); (d) (d') tooth from Tie2-Cre; Ai14 was imaged after clearing to reveal the vascular network within the dental pulp and enlarged view of the rectangular area in Fig. 13(d)

Zhu 等^[17-20]使用 SOCS 透明法实现了小鼠颅骨的透明化。如图 15 所示，经 SOCS 处理，皮层微血管清晰可见。定量分析表明，通过透明颅窗，微血管的最小分辨直径为 $14.4 \mu\text{m} \pm 0.8 \mu\text{m}$ ，接近于外露的皮层微血管直径 $12.8 \mu\text{m} \pm 0.9 \mu\text{m}$ 。此外，激光

散斑成像的初步结果表明颅骨透明化对皮层血液没有影响。

在活体颅骨光透明领域，目前通过建立活体光透明颅窗 (SOCW) 可以实现对神经突触细微结构^[44]、双侧皮层血液流速分布^[45]和深皮层血管^[46]

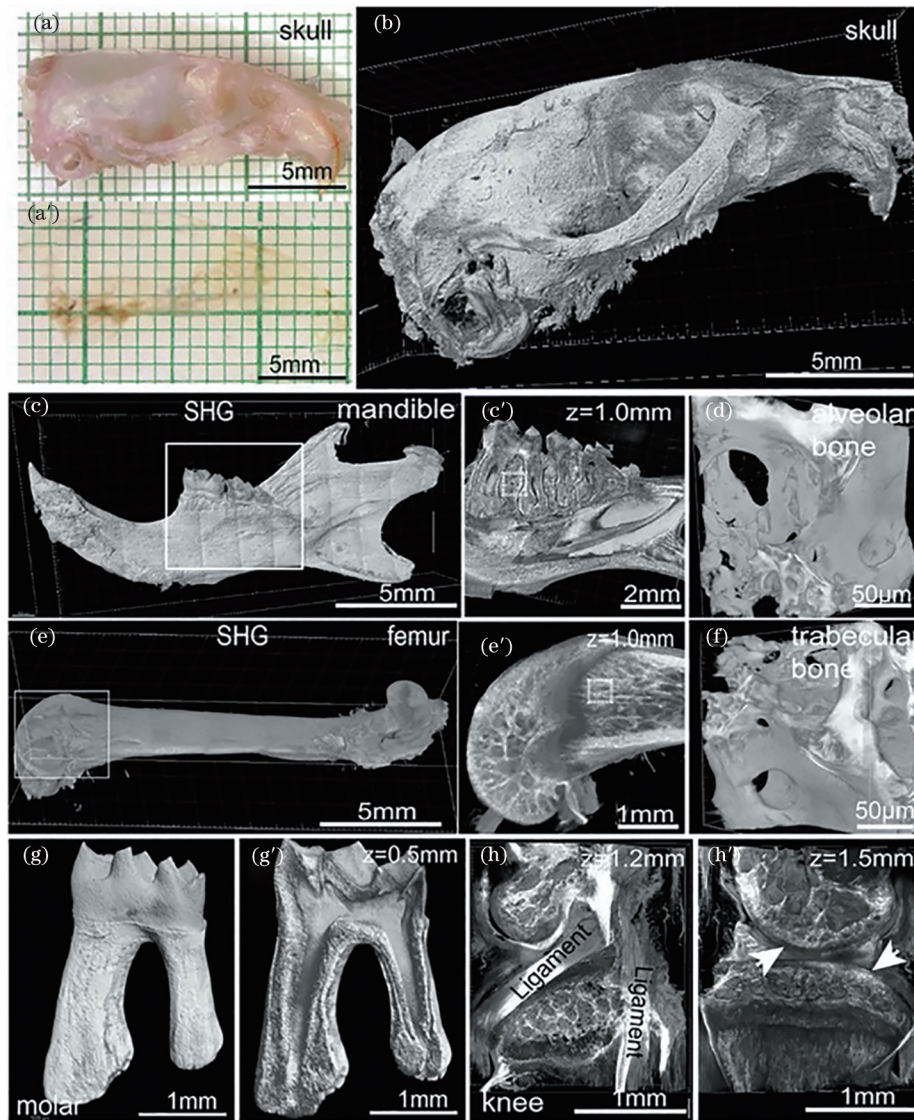


图 14 PEGASOS 为三维成像硬组织器官提供了新的方法^[15]。(a)透明化前成年小鼠颅骨大体图;(a')透明化后成年小鼠颅骨大体图;(b)透明化后颅骨双光子显微镜成像图;(c)(c')透明化后下颌骨双光子显微镜成像图及其矩形框放大图;(d)牙槽骨小梁[对应图 14(c')方框区域];(e)(e')透明化后股骨双光子显微镜成像图及其矩形框放大图;(f)股骨骨小梁[对应图 14(e')方框区域];(g)(g')透明化后小鼠牙齿双光子显微镜成像图及其成像髓腔截面图;(h)(h')透明化后膝关节不同深度的双光子显微镜成像图

Fig. 14 PEGASOS provides a new method for three-dimensional imaging of hard tissues and organs^[15]. (a) Skull was imaged with a stereomicroscope before clearing; (a') skull was imaged with a stereomicroscope after clearing; (b) two-photon microscope image of the skull after clearing; (c)(c') two-photon microscope image of mandible after clearing and enlarged view of the rectangular area in Fig. 14(c); (d) alveolar bone of mandible corresponding to the rectangular area in Fig. 14(c'); (e)(e') two-photon microscope image of the femur after clearing and enlarged view of the rectangular area in Fig. 14(e); (f) alveolar bone of femur corresponding to the rectangular area in Fig. 14(e'); (g)(g') tooth within the mandible was imaged with a two-photon microscope and optical section was obtained to show the pulp chamber; (h)(h') intact knee joint was cleared and optical sections acquired at different depths are displayed

的在体观测,并用于光动力效应打开血脑屏障的相关研究^[47-49]。图 16 为 SOCW 技术用于皮质成像的示意图;主要的实验步骤[图 16(a)]包括头部固定、颅骨光学透明、皮层成像和恢复。图 16(b)为小鼠

脑部固定装置。图 16(c)和图 16(d)分别为小鼠脑部结构图和 SOCW 示意图。另外由于颅骨成分随年龄而变化,不同年龄的小鼠需使用不同的透明方法[图 16(e)~(g)]。

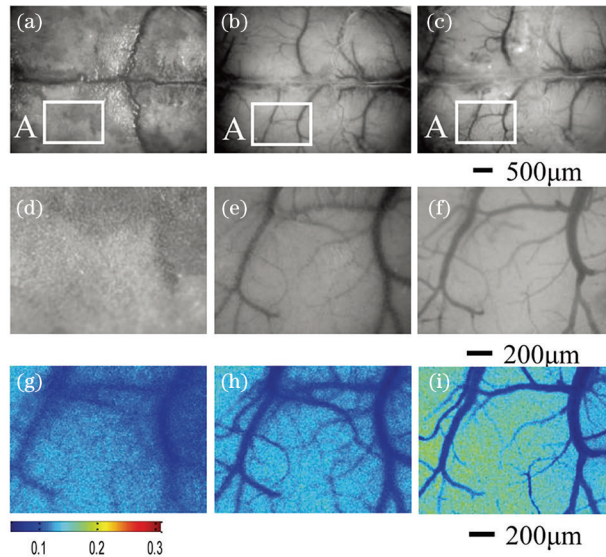


图 15 经 SOCS 透明化前后的颅骨对比图^[17-20]。(a)~(c) 颅骨白光成像、透明化后颅骨白光成像以及去除矩阵区域 A 的颅骨白光成像；(d)~(f) 图 15(a)~(c) 中方框区域的放大图；(g)~(i) 图 15(a)~(c) 对应的散斑图像

Fig. 15 Comparison of skulls before and after SOCS^[17-20]. (a)–(c) White-light images of intact skull, the transparent skull images after SOCS treatment for 25 min and after removing rectangle area A; (d)–(f) corresponding magnified white-light images of the rectangle area A shown in Fig. 15(a)–(c); (g)–(i) speckle contrast images of the rectangle area A shown in Fig. 15(a)–(c)

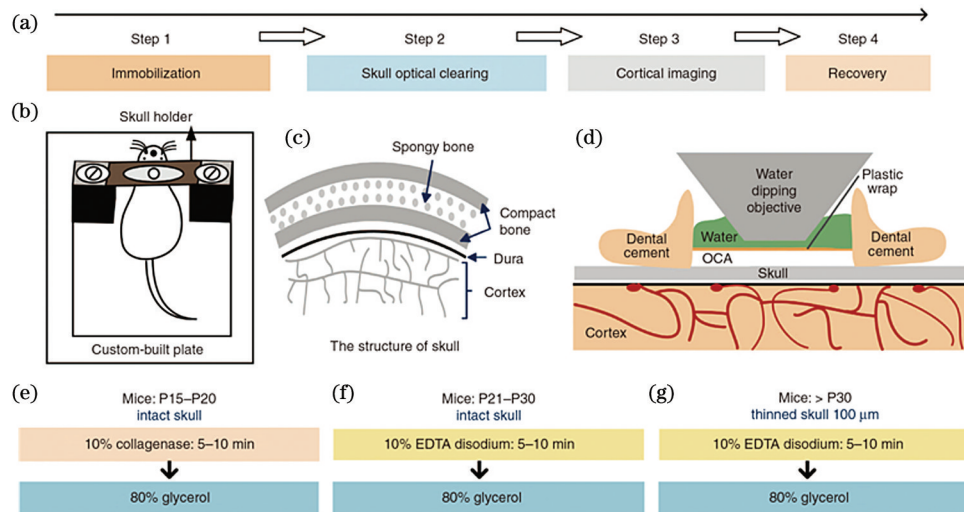


图 16 SOCW 技术用于皮质成像的示意图。(a) 主要实验步骤；(b) 小鼠脑部固定装置；(c) 小鼠脑部结构图；(d) SOCW 示意图；(e)~(g) 不同年龄小鼠所遵循的不同透明方法

Fig. 16 Schematic diagrams of SOCW technique for cortical imaging. (a) Main experimental steps; (b) brain fixation device of mouse; (c) brain structure map of mouse; (d) SOCW diagram; (e)–(g) different clearing methods followed by mouse of different ages

5 组织光透明技术在其他领域中的应用

组织光透明技术不仅被应用于骨组织，而且被广泛应用于其他领域，如：神经科学领域中，Murakami 等^[38]应用 CUBIC-X 将小鼠大脑透明化，在亚细胞分辨率下构建小鼠脑图谱，揭示了小鼠大

脑发育的不均匀性；肿瘤领域中，Kubota 等^[40]使用 CUBIC-cancer 透明技术在单细胞水平对小鼠模型的癌症转移进行定量分析；胚胎发育领域中，Belle 等^[50]结合免疫染色、光片成像和 iDISCO 透明技术，对人类发育中的神经、肌肉、血管、心肺和泌尿生殖系统进行了高分辨率 3D 成像。

6 展 望

虽然组织光透明技术发展迅速,但是目前仍然面临一些挑战。首先,大多数的透明方法都需要较长的时间,未来需要更加简化高效的透明方法。其次,更强大的标记方法有待开发,以期实现对啮齿动物和灵长类动物的深层组织、整个器官、大型人体组织,乃至成年啮齿动物和灵长类整个身体的蛋白质和 RNA(Ribonucleic Acid)的快速标记。最后,还需要更加先进的成像和数据分析工具来拓宽组织光透明方法的应用。

7 结束语

组织光透明技术作为一种新型的组织学技术,它的出现极大地丰富了组织学研究的手段,实现了细胞水平的三维成像,为组织学的研究翻开了新的篇章。目前光透明技术开始逐渐应用于骨组织,实现了从细胞水平观察骨组织一些独特而必要的生理过程,如造血、生长和重建,也实现了对骨组织中某些细胞的可视化和量化,让我们对骨组织有了更加清晰的认识。相信这只是一个开始,组织光透明技术会不断地发展,在不久的将来,会为我们提供骨组织以及其他组织更加全面的信息,并能逐渐运用于临床诊疗,满足临床医学的需求。

参 考 文 献

- [1] Griffith J F, Genant H K. New imaging modalities in bone[J]. *Current Rheumatology Reports*, 2011, 13(3): 241-250.
- [2] Brenner A I, Koshy J, Morey J, et al. The bone scan[J]. *Seminars in Nuclear Medicine*, 2012, 42(1): 11-26.
- [3] Ventura M, Boerman O C, de Korte C, et al. Preclinical imaging in bone tissue engineering[J]. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2014, 20(6): 578-595.
- [4] Oh S W, Harris J A, Ng L, et al. A mesoscale connectome of the mouse brain[J]. *Nature*, 2014, 508(7495): 207-214.
- [5] Ntziachristos V. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(8): 603-614.
- [6] Ragan T, Kadiri L R, Venkataraju K U, et al. Serial two-photon tomography for automated *ex vivo* mouse brain imaging[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(3): 255-258.
- [7] Keller P J, Ahrens M B. Visualizing whole-brain activity and development at the single-cell level using light-sheet microscopy[J]. *Neuron*, 2015, 85(3): 462-483.
- [8] Yu T T, Zhu D. Review of tissue optical clearing methods for imaging whole organs[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207007. 俞婷婷, 朱丹. 整体器官的光透明成像方法综述[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207007.
- [9] Ueda H R, Ertürk A, Chung K, et al. Tissue clearing and its applications in neuroscience[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2020, 21(2): 61-79.
- [10] Wan P, Zhu J T, Xu J Y, et al. Evaluation of seven optical clearing methods in mouse brain[J]. *Neurophotonics*, 2018, 5(3): 035007.
- [11] Zhao Q, Wei H, He Y, et al. Evaluation of ultrasound and glucose synergy effect on the optical clearing and light penetration for human colon tissue using SD-OCT[J]. *Journal of Biophotonics*, 2014, 7(11/12): 938-947.
- [12] Zhao Q L, Li L, Li Q, et al. Concentration dependence of optical clearing on the enhancement of laser-scanning optical-resolution photoacoustic microscopy imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(3): 036019.
- [13] Zhao Q, Dai C, Fan S, et al. Synergistic efficacy of salicylic acid with a penetration enhancer on human skin monitored by OCT and diffuse reflectance spectroscopy[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34954.
- [14] Greenbaum A, Chan K Y, Dobrova T, et al. Bone CLARITY: clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(387): eaah6518.
- [15] Jing D, Zhang S, Luo W, et al. Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method[J]. *Cell Research*, 2018, 28(8): 803-818.
- [16] Cai R, Pan C, Ghasemigharagoz A, et al. Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull-meninges connections[J]. *Nature Neuroscience*, 2019, 22(2): 317-327.
- [17] Zhu D, Larin K V, Luo Q, et al. Recent progress in tissue optical clearing[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2013, 7(5): 732-757.
- [18] Wang J, Zhang Y, Xu T H, et al. An innovative transparent cranial window based on skull optical clearing[J]. *Laser Physics Letters*, 2012, 9(6): 469-473.
- [19] Zhang Y, Zhang C, Zhong X W, et al. Quantitative evaluation of SOCS-induced optical clearing efficiency of skull[J]. *Quantitative Imaging in Medicine and*

- Surgery, 2015, 5(1): 136-142.
- [20] Yang X Q, Zhang Y, Zhao K, et al. Skull optical clearing solution for enhancing ultrasonic and photoacoustic imaging [J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 2016, 35(8): 1903-1906.
- [21] Susaki E A, Ueda H R. Whole-body and whole-organ clearing and imaging techniques with single-cell resolution: toward organism-level systems biology in mammals[J]. Cell Chemical Biology, 2016, 23(1): 137-157.
- [22] Tainaka K, Kuno A, Kubota S I, et al. Chemical principles in tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2016, 32(1): 713-741.
- [23] Wen X, Tuchin V V, Luo Q M, et al. Controlling the scattering of intralipid by using optical clearing agents [J]. Physics in Medicine and Biology, 2009, 54(22): 6917-6930.
- [24] Hirshburg J M, Ravikumar K M, Hwang W, et al. Molecular basis for optical clearing of collagenous tissues[J]. Journal of Biomedical Optics, 2010, 15(5): 055002.
- [25] Tanaka Y, Kubota A, Yamato M, et al. Irreversible optical clearing of sclera by dehydration and cross-linking[J]. Biomaterials, 2011, 32(4): 1080-1090.
- [26] Yu T T, Wen X, Luo Q M, et al. Quantitative analysis of dehydration in porcine skin for assessing mechanism of optical clearing [J]. Journal of Biomedical Optics, 2011, 16(9): 095002.
- [27] Gurjarpadhye A A, Vogt W C, Liu Y, et al. Effect of localized mechanical indentation on skin water content evaluated using OCT [J]. International Journal of Biomedical Imaging, 2011, 2011: 817250.
- [28] Yeh A T, Choi B, Nelson J S, et al. Reversible dissociation of collagen in tissues [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2003, 121(6): 1332-1335.
- [29] Hirshburg J, Choi B, J Stuart Nelson M D, et al. Collagen solubility correlates with skin optical clearing[J]. Journal of Biomedical Optics, 2006, 11(4): 040501.
- [30] Jing D, Yi Y, Luo W, et al. Tissue clearing and its application to bone and dental tissues[J]. Journal of Dental Research, 2019, 98(6): 621-631.
- [31] Chen Y G, Liu S J, Liu H J, et al. Coherent Raman scattering unravelling mechanisms underlying skull optical clearing for through-skull brain imaging [J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(15): 9371-9375.
- [32] Acar M, Kocherlakota K S, Murphy M M, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal [J]. Nature, 2015, 526(7571): 126-130.
- [33] Tainaka K, Murakami T C, Susaki E A, et al. Chemical landscape for tissue clearing based on hydrophilic reagents[J]. Cell Reports, 2018, 24(8): 2196-2210.
- [34] Treweek J B, Chan K Y, Flytzanis N C, et al. Whole-body tissue stabilization and selective extractions via tissue-hydrogel hybrids for high-resolution intact circuit mapping and phenotyping[J]. Nature Protocols, 2015, 10(11): 1860-1896.
- [35] Ertürk A, Becker K, Jährling N, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO[J]. Nature Protocols, 2012, 7(11): 1983-1995.
- [36] Renier N, Wu Z H, Simon D J, et al. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging[J]. Cell, 2014, 159(4): 896-910.
- [37] Pan C C, Cai R Y, Quacquarelli F P, et al. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO [J]. Nature Methods, 2016, 13(10): 859-867.
- [38] Murakami T C, Mano T, Saikawa S, et al. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing [J]. Nature Neuroscience, 2018, 21(4): 625-637.
- [39] Tainaka K, Kubota S I, Suyama T Q, et al. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization[J]. Cell, 2014, 159(4): 911-924.
- [40] Kubota S I, Takahashi K, Nishida J, et al. Whole-body profiling of cancer metastasis with single-cell resolution[J]. Cell Reports, 2017, 20(1): 236-250.
- [41] Susaki E A, Shimizu C, Kuno A, et al. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1982.
- [42] Qi Y S, Yu T T, Xu J Y, et al. FDISCO: advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs [J]. Science Advances, 2019, 5(1): eaau8355.
- [43] Zhu J, Yu T, Li Y, et al. MACS: rapid aqueous clearing system for 3D mapping of intact organs[J]. Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 2020, 7(8): 1903185.
- [44] Zhao Y J, Yu T T, Zhang C, et al. Skull optical clearing window for *in vivo* imaging of the mouse cortex at synaptic resolution [J]. Light, Science & Applications, 2018, 7: 17153.
- [45] Zhang C, Feng W, Zhao Y J, et al. A large, switchable optical clearing skull window for

- cerebrovascular imaging [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (10): 2696-2708.
- [46] Li D Y, Zheng Z, Yu T T, et al. Visible-near infrared-II skull optical clearing window for *in vivo* cortical vasculature imaging and targeted manipulation [J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13 (10): e202000142.
- [47] Zhang C, Feng W, Vodovozova E, et al. Photodynamic opening of the blood-brain barrier to high weight molecules and liposomes through an optical clearing skull window [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(10): 4850-4862.
- [48] Zhang C, Feng W, Li Y S, et al. Age differences in photodynamic therapy-mediated opening of the blood-brain barrier through the optical clearing skull window in mice [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2019, 51(7): 625-633.
- [49] Feng W, Zhang C, Yu T T, et al. *In vivo* monitoring blood-brain barrier permeability using spectral imaging through optical clearing skull window [J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(4): e201800330.
- [50] Belle M, Godefroy D, Couly G, et al. Tridimensional visualization and analysis of early human development [J]. *Cell*, 2017, 169(1): 161-173.