

6 种光学透明化方法在大鼠脑组织块的透明效果比较

欧毅超^{1#}, 冯展鹏^{1#}, 武广森², 张 源², 包 赞¹, 邱炳辉¹, 刘亚伟¹, 漆松涛^{1*}

(1. 南方医科大学南方医院神经外科, 广州 510515; 2. 南方医科大学第一临床医学院, 广州 510515)

【摘要】 目的 比较 6 种光学透明化方法对大鼠脑组织块的透明效果。**方法** 选取 14 只 SD 大鼠脑分别采用 iDISCO、SeeDB、CUBIC、SCALEVIEW-A2、CLARITY-CUBIC、Passive-CLARITY 的方法进行透明化处理。**结果** 对照组 PBS 透明灰度值为 13.031 ± 0.586 , iDISCO、SeeDB、CUBIC、SCALEVIEW-A2、CLARITY-CUBIC、passive-CLARITY 分别为 6.447 ± 0.574 、 11.690 ± 0.909 、 2.318 ± 0.986 、 8.118 ± 1.026 、 8.591 ± 0.384 、 4.198 ± 0.182 , 除 SeeDB 组外 ($P=0.185$), 其余各组均较 PBS 组差异均有显著性 ($P < 0.01$), CUBIC 分别与各组有显著性差异 ($P < 0.01$)。透明化处理后, iDISCO、SeeDB、CUBIC、SCALEVIEW-A2、CLARITY-CUBIC、Passive-CLARITY 面积改变分别为 $(-30.02 \pm 2.39)\%$ 、 $(19.74 \pm 4.09)\%$ 、 $(14.7 \pm 3.92)\%$ 、 $(10.7 \pm 5.55)\%$ 、 $(23.01 \pm 4.19)\%$ 、 $(66.51 \pm 5.68)\%$, 各组面积改变均较 iDISCO 组、Passive-CLARITY 组有显著性差异 ($P < 0.01$)。**结论** 除 SeeDB 外, 各组方法均能达到透明效果, CUBIC 方法在大鼠脑组织块的透明效果优于其他各组, iDISCO 处理后面积缩小, 而 Passive-CLARITY 处理后变得膨胀。

【关键词】 组织光学透明化技术; 方法比较; 大鼠脑组织

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0007-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.002

Comparison of transparent effects of six different optical clearing methods on rat brain tissues

OU Yichao^{1#}, FENG Zhanpeng^{1#}, WU Guangsen², ZHANG Yuan², BAO Yun¹, QIU Binghui¹, LIU Yawei¹, Qi Songtao^{1*}

(1. Department of Neurosurgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.

2. First Medical School, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

【Abstract】 Objective To compare the transparency efficiency of six different optical clearing method on the rat brain tissues. **Methods** Brain tissue blocks of 14 SD rats were processed with iDISCO, SeeDB, CUBIC, SCALEVIEW-A2, CLARITY-CUBIC, Passive-CLARITY clearing method, respectively. **Results** The gray value of PBS group was 13.031 ± 0.586 , that of iDISCO, SeeDB, CUBIC, SCALEVIEW-A2, CLARITY-CUBIC, passive-CLARITY clearing were 6.447 ± 0.574 , 11.690 ± 0.909 , 2.318 ± 0.986 , 8.118 ± 1.026 , 8.591 ± 0.384 , 4.198 ± 0.182 , respectively. Except the SeeDB group ($P=0.185$), the rest groups showed significant differences compared with the PBS group ($P < 0.01$), and there were significant differences between CUBIC and other groups ($P < 0.01$). After the clearing treatment, the changes of tissue area ratio in the iDISCO, SeeDB, CUBIC, SCALEVIEW-A2, CLARITY-CUBIC, Passive-CLARITY

[基金项目] 广东省省级科技计划项目(2016A020213006); 国家自然科学基金(81372692); 国家科技支撑计划(2014BAI04B01)。

[作者简介] 欧毅超(1991—), 男, 硕士研究生, 专业: 神经外科。E-mail: neurosurgery_oyc@163.com。

冯展鹏(1989—), 男, 博士研究生, 专业: 神经外科。E-mail: 359512405@qq.com。#共同第一作者

[通信作者] 漆松涛(1959—), 男, 教授, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 神经外科。E-mail: qisongtaonfyy@126.com

method were $(-30.02 \pm 2.39)\%$, $(19.74 \pm 4.09)\%$, $(14.7 \pm 3.92)\%$, $(10.7 \pm 5.55)\%$, $(23.01 \pm 4.19)\%$, $(66.51 \pm 5.68)\%$, respectively. Each group showed a significant difference compared with the groups iDISCO and the Passive-CLARITY, $P < 0.01$. **Conclusions** Except the SeeDB method, all the clearing methods can achieve a transparent effect, while CUBIC is better than the other groups applied for rat brain tissues. The tissue block volume is shrunken after iDISCO clearing, and expanded after Passive-CLARITY processing.

[Key words] optical tissue clearing; comparison; histology; brain; rat

三维结构的研究对阐述组织结构形态学、毗邻组织的解剖关系、细胞分子层面的生理功能有至关重要的作用。然而,因为光散射效应和厚组织片成像困难等原因,在组织学研究时,通常将样品制成薄切片,从平面观察和描述细胞、组织的信息,导致了生物体三维结构的信息缺失。曾有生物学家尝试应用阵列断层扫描技术对切片成像进行三维重建,但耗时耗力,效果有限^[1]。因此研究者们设想在不切片和不损毁组织的前提下,进行组织的立体成像,并且可对同一个样品进行多次成像。首先,限制的客观条件是,组织过厚,一些组织中存在着色素,使组织有颜色。此外,研究者面对最困难的问题是,大多数生物组织为实质不透光,这些特性削弱了组织块成像的清晰度,也是观察深层结构的最大阻碍。

出于各种需求,研究者在 20 世纪末便开展了许多组织透明化的尝试。所有组织透明化技术的关键是如何使光透过样品时与介质的折射率相匹配,以减少光在组织中的不均匀散射。现阶段的方法大致可分为 2 大类:溶剂型和水基型透明化,前者如 BABB、3DISCO、iDISCO^[2]等;后者又分为单纯浸泡法,如 SeeDB^[3]、FRUIT、TDE 等;水化法,如 Scale A2、Scale U2、CUBIC^[4]等;水凝胶嵌入法,如 CLARITY、PACT、PARS 等。以上方法各有利弊,目前,在国内开展组织透明化技术并不多,对这些透明方法的比较报道更鲜有报道。在此,我们分别从各类型中选取较为代表性的方法,iDISCO(immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs)、SeeDB(See Deep Brain)、CUBIC(clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis)、SCALEVIEW-A2、CLARITY-CUBIC(the clear, lipid-exchanged, acrylamide-hybridized rigid, imaging/immunostaining compatible, tissue hydrogel-CUBIC)、Passive CLARITY(passive and the clear, lipid-exchanged, acrylamide-hybridized rigid, imaging/immunostaining compatible, tissue hydrogel),共 6 个方法对大鼠脑组织块透明化的效果进行比较。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 14 只,8~10 周龄,体重 220~240 g,南方医科大学实验动物中心提供[SCXK(粤)2011-0015],大鼠脑组织取材于南方医科大学南方医院进行[SYXK(粤)2015-0056],并通过南方医院实验动物伦理委员会审查[NFYY-2014-88]。

1.2 主要试剂及仪器

生理盐水;PBS 粉末(Fisher 公司,货号 BP399-1);多聚甲醛粉末;甲醇;去离子水;盐酸;氢氧化钠;叠氮钠;30% H_2O_2 ;DMSO;TritonX-100(Sigma 公司);肝素(Sigma 公司,货号 H3393);四氢呋喃(THF,Sigma 公司,货号 186562);二氯甲烷(Sigma 公司,货号 270997);二苄基醚(Sigma 公司,货号 108014);果糖; α -硫代甘油(Sigma 公司);SCALEVIEW-A2 溶液(Olympus 公司);O. C. T.(Sakura 公司);四羟丙基乙二胺(Quadrol,Sigma 公司);尿素(Sigma 公司);三乙醇胺(Solarbio 公司);硅油(Sigma 公司);矿物油(Solarbio 公司);甘油;VA-044 引发剂(WAKO 公司,货号 VA-044);丙烯酰胺(Sigma 公司);双甲叉丙烯酰胺(Sigma 公司);十二烷基硫酸钠(SDS);2,2'-硫代双乙醇(Sigma 公司,货号 166782);硼酸(Sigma 公司,B7901);易氟烷。

涂硅帽玻璃细颈瓶(Thermo Fisher 公司,货号 C326-0020),低尘纸(Kimwipe 公司);真空干燥装置;水平摇床;跷板摇床;试管旋转器;磁力加热搅拌器;恒温箱;pH 计;动物吸入麻醉机。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

14 只 SD 雄性大鼠随机分为 7 组:PBS 组、iDISCO 组、SeeDB 组、CUBIC 组、SCALEVIEW-A2 组、CLARITY-CUBIC 组、Passive CLARITY 组,接受不同的透明化方法。

1.3.2 脑组织块的准备

除 CLARITY-CUBIC 组外,其余 6 组共 12 只 SD 大鼠吸入麻醉后,经心尖灌注含有肝素的生理盐水(200 mg/500 mL),待到大鼠体内血液被置换完全,改用冰冻的 4% 多聚甲醛灌注固定,灌注完成后去除脑部皮肤及骨头取出鼠脑,用大鼠脑模具冠状切修整 2 mm,然后每个鼠脑沿正中矢状线对半切,每只大鼠取前、中、后大脑半球双侧可得 6 个脑组织块,即 12 个组织块每组,在 4℃ 4% 多聚甲醛浸泡保存备用。CLARITY-CUBIC 方法组,先用生理盐水灌注后,再继续灌注水凝胶溶液,约 200 mL 每只(配方见后述),取脑备用。

1.3.3 透明方法试剂的配备

iDISCO 法所需配备的试剂有:50% 甲醇(1 体积无水甲醇与 1 体积 0.01 mmol/L PBS 混合);80% 甲醇(4 体积无水甲醇与 1 体积 0.01 mmol/L PBS 混合);100% 甲醇;5% H_2O_2 /20% DMSO/甲醇(1 体积 30% H_2O_2 与 1 体积 DMSO 与 4 体积甲醇混合);20% DMSO/甲醇(1 体积 DMSO 与 4 体积无水甲醇混合);0.2% PBST (1 体积 TritonX-100 与 500 体积 0.01 mmol/L PBS 混合);50% 四氢呋喃/ H_2O (1 体积四氢呋喃与 1 体积双蒸水混合);80% 四氢呋喃/ H_2O (4 体积四氢呋喃与 1 体积去离子水混合);100% 四氢呋喃 (THF);二氯甲烷 (DCM);二苯基醚 (DBE)。以上溶液室温保存。

SeeDB 法所需配备的试剂有:20% 果糖(4 g 果糖加去离子水至 20 mL);40% 果糖(8 g 果糖加去离子水至 20 mL);60% 果糖(12 g 果糖加去离子水至 20 mL);80% 果糖(16 g 果糖加去离子水至 20 mL);100% 果糖(20 g 果糖加去离子水至 20 mL; SeeDB 溶液(20.25 g 果糖加 5 mL 去离子水);SeeDB37(27 g 果糖加 5 mL 去离子水)以上每份 20 mL 溶液均需加入 100 μ L α -硫代甘油以避免梅拉德反应。以上溶液配备后短期内使用。

CUBIC 法所需配备的试剂有:80% Quadrol (125 g 去离子水加入 500 g Quadrol,加热混合);ScaleCUBIC-1(也称为 reagent-1,将 125 g 尿素与 156 g 80% Quadrol 在 144 g 去离子水中加热搅拌,充分溶解后冷却至室温,再加入 75 g TrionX-100 同时搅拌,使用真空泵排气处理 30 min,压力调至 0.1 MPa,配成 500 g reagent-1 溶液);1/2 reagent-1 (reagent-1 与去离子水 1:1 混合);ScaleCUBIC-2 (也称为 reagent-2,将 25 g 蔗糖与 12.5 g 尿素在 7.5

g 去离子水中加热搅拌,充分溶解后冷却至室温,再加入 5 g 三乙醇胺同时搅拌,使用真空泵排气处理 30 min,压力调至 0.1 MPa,配成 50 g reagent-2 溶液);1/2 reagent-2(reagent-2 与 0.01 mmol/L PBS 溶液 1:1 混合);浸泡混合油(1:1 混合矿物油与硅油)。以上溶液均可室温存放,若出现强烈尿素气味时应重配溶液。

SCALEVIEW-A2 法所需配备的试剂有:SCALEVIEW-A2 溶液为商品制品;20% 蔗糖(100 g 蔗糖溶解至 500 mL 0.01 mmol/L PBS 中)。

CLARITY-CUBIC 法所需配备的试剂有:4℃ 16% PFA 溶液;VA-044 溶液(125 mg VA-044 引发剂溶解在 26.25 mL 去离子水,4℃ 保存);4℃ 40% 丙烯酰胺溶液;4℃ 2% 双甲叉丙烯酰胺溶液;0.1 mmol/L PBS 溶液;水凝胶溶液(将 26.25 mL VA-044 溶液、16% PFA 12.5 mL、40% 丙烯酰胺 5 mL、2% 双甲叉丙烯酰胺 1.25 mL、0.1 mmol/L PBS 5 mL 在冰上混合,配成 50 mL 溶液);CUBIC 透明液(将 3.85 g 尿素、3.85 g 四羟丙基乙二胺在 5.38 mL 去离子水中加热搅拌混匀,充分溶解冷却室温后加入 2.31 g TritonX-100,配成 10 g 溶液);85% 甘油。以上溶液均需 4℃ 保存。

Passive CLARITY 法所需配备的试剂有:水凝胶溶液(各成分的终浓度:0.01 mmol/L PBS,4% PFA,4% 丙烯酰胺,0.05% 双甲叉丙烯酰胺,0.25% VA-044 引发剂);透明液(各成分的终浓度:硼酸 200 mmol/L,4% SDS),以上溶液均需 4℃ 保存。

1.3.4 透明化方法的步骤

iDISCO^[2](甲醇处理法):(1) 甲醇预处理:取 4% PFA 固定的脑片,经 PBS 漂洗 2 次,每次 1 h,然后分别经 50% 甲醇、80% 甲醇、100% 甲醇梯度浸泡各 1 h,更换 100% 甲醇浸泡 1 h,再经 5% H_2O_2 /20% DMSO/甲醇混合溶液漂白,4℃ 过夜。第二天,更换 100% 甲醇漂洗 2 次,每次 1 h,再换 20% DMSO/甲醇混合溶液漂洗 2 次,每次 1 h,接着依次更换 80% 甲醇、50% 甲醇、PBS 漂洗,每次 1 h,使用 PBS 再次漂洗 1 h,最后放入 0.2% PBST 漂洗 2 次,每次 1 h 后备用。(2) 组织透明化:经预处理的脑片,分别放入 50% THF 10 mL 的玻璃瓶中,室温过夜。第二天,更换 80% THF/ H_2O 混合溶液 10 mL 孵育 1 h 后,更换 100% THF 10 mL 孵育 2 次,每次 1 h,最后用 Kimwipe 纸轻拭干残留液体后,放入装满 DCM 的玻璃瓶中孵育。样品沉底后再放入 DBE

溶液中至透明(抽真空排出气体后,静置 2 h 左右),然后在 DBE 溶液中室温保存。

SeeDB^[3](标准法):取 4% PFA 固定后的脑片, PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,每个组织块分别依次置入 20 mL 的 20% 果糖、40% 果糖、60% 果糖孵育各 4 ~ 8 h,再置入 80% 果糖、100% 果糖 20 mL 孵育各 12 h,最后置入 20 mL SeeDB 溶液孵育 24 h,不超过 48 h。然后放置入 SeeDB37 溶液,37℃ 孵育 24 h。以上孵育过程均需在试管旋转器上或翘板摇床上进行。最后将组织块浸泡在水或者在 30% 甘油中观察。

CUBIC^[4](简单浸泡法):取 4% PFA 固定的脑片,经 PBS 漂洗 2 次,每次 2 h 以清洗残余的 PFA,脑组织块分别置入 8 ~ 10 mL 的 1/2 reagent-1 溶液,在 37℃ 摇荡浸泡,3 ~ 6 h 后弃液,马上换等量 reagent-1 溶液于 37℃ 下浸泡过夜。翌日,换等量的 reagent-1 在同等条件中浸泡,之后以每 2 d 更换一次 reagent-1。待第 7 天结束,终止透明进程,换 PBS 漂洗 3 次,每次 2 h 后,在 PBS 中浸泡过夜。第二天,弃剩少量 PBS,放入真空箱中抽真空 30 min 以去除气体。完成后将脑组织块置入 5 mL 1/2 reagent-2 溶液,37℃ 浸泡 6 ~ 24 h,至组织块沉底后换 5 mL reagent-2 溶液,37℃ 过夜。翌日,再换一次 5 mL reagent-2 溶液备用。以上步骤均使用跷板摇床孵育、漂洗。观察前用 Kimwipe 去除残余溶液,浸泡至混合油溶液中 10 min 至 1 h。

SCALEVIEW-A2^[5]:取 4% PFA 固定的脑片,放入 20% 蔗糖中,37℃ 浸泡 24 h,再用 OCT 混合物包裹后放入 - 80℃ 冰箱。翌日,取出并待融化后用 PBS 漂洗干净,重新用 4% PFA 室温固定 20 min。然后用 15 mL SCALEVIEW-A2 分别浸泡脑组织块,

每天换一次液,持续 7 d,孵育过程均需在摇床上进行。最后泡在新鲜 SCALEVIEW-A2 溶液中观察。

CLARITY-CUBIC^[6]:取经水凝胶灌注的脑组织,分别置入 15 mL 水凝胶中,4℃ 过夜。翌日,弃 10 mL 水凝胶溶液,将剩余的 5 mL 液体与组织块倒入 5 mL 管中,加水凝胶至略高出瓶口,再用封口膜封好放入 37℃ 烘箱过夜。翌日,取出凝固的水凝胶与脑组织块,用 Kimwipe 轻拭去除残余的水凝胶,再用 PBS 漂洗 4 次共 24 h 后,放入 5 mL CUBIC 透明液中,在 37℃ 烘箱中振荡孵育 3 d 后,再用 PBST 漂洗 6 次共 24 h 以备用。最后浸泡至混合油溶液中观察。

Passive CLARITY^[7]:取 4% PFA 固定的脑片,分别置入 40 mL 水凝胶溶液中,在 4℃ 摇床中孵育 7 d。(1)聚合反应步骤:孵育完毕,去除 20 mL 水凝胶后,将样品与溶液置于真空箱内,抽真空 30 min 后,在 37℃ 水浴锅里进行 3 h 的聚合反应,完成后用 Kimwipe 轻拭干净。(2)去脂反应:每个聚合样品置入 40 mL 透明液中,45℃ 烘箱振荡孵育,前 7 天每天换液一次。以后在 40℃ 烘箱震荡孵育,每 2 ~ 3 d 换液一次,至透明,耗时 4 ~ 6 周。

以上 6 种方法实验流程见图 1。

1.4 统计学方法

每组鼠脑在透明流程开始、结束时,分别使用徕卡体视镜 8 倍镜进行采集图像,然后用 Image Pro Plus 软件计算各组透明前后的脑面积,并用(透明处理后面积 - 处理前面积)/处理前面积表示。用 Quantity One 软件计算各组透明度灰度值,用 SPSS 22 进行统计学分析,计量资料采用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经检验数据均符合正态分布且方差齐。采用卡方 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

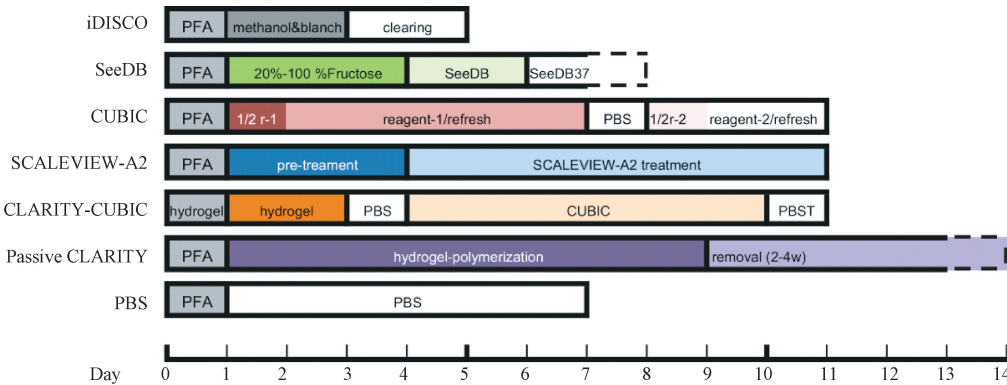


图 1 几种组织光学透明方法的实验流程图

Fig. 1 Schematic flow chart of clearing process by different tissue optical clearing protocols for rat brain tissues

2 结果

2.1 不同方法透明大鼠脑组织成像

如图 2 所示, PBS 处理的脑组织块前后无明显的改变。iDISCO 方法处理的脑组织块变得透明、匀称、背后标格清晰对称无偏差, 略成毛玻璃样。SeeDB 方法处理的组织与之前比较略有透光, 背后标格不清晰。CUBIC 方法的处理相对其他各组最透明透光, 皮层基本和背景一致, 胼胝体和白质纤维可肉眼观察到, 边缘略不平整。SCALEVIEW-A2 透明液处理的组织略透明, 皮质可隐约看到背后的标格, 而白质基本不透光。而 CLARITY-CUBIC 与 Passive-CLARITY 均有水凝胶在表面, 脑组织相对透光, 可见背后网格。

2.2 不同透明方法处理的脑组织块大小改变及透明效果评估

透明度用灰度值 (INT) 表示, PBS 为 13.031 ± 0.586 , iDISCO 为 6.447 ± 0.574 , SeeDB 为 11.690 ± 0.909 , CUBIC 为 2.318 ± 0.986 , SCALEVIEW-A2 为 8.118 ± 1.026 , CLARITY-CUBIC 为 8.591 ± 0.384 , Passive-CLARITY 为 4.198 ± 0.182 ; 与 PBS 组比较, 除了 SeeDB 组差异无显著性外 ($P = 0.185$), 其余各组均较 PBS 组有显著性差异 ($P < 0.01$)。使用 LSD 法比较, iDISCO 分别与 SeeDB、CUBIC 有显著性差异 ($P < 0.01$), SeeDB 分别与 CUBIC、SCALEVIEW-A2、CLARITY-CUBIC、Passive-CLARITY 有显著性差异 ($P < 0.01$), CUBIC 分别与 SCALEVIEW-A2、CLARITY-CUBIC、Passive-CLARITY 有显著性差异 ($P < 0.01$)。

(图 3A)

经透明化处理后, iDISCO 组面积改变为 $(-30.02 \pm 2.39)\%$, SeeDB 为 $(19.74 \pm 4.09)\%$, CUBIC 为 $(14.7 \pm 3.92)\%$, SCALEVIEW-A2 为 $(10.7 \pm 5.55)\%$, CLARITY-CUBIC 为 $(23.01 \pm 4.19)\%$, Passive-CLARITY 为 $(66.51 \pm 5.68)\%$, 各组面积改变均较 iDISCO 组、Passive-CLARITY 组有显著性差异 ($P < 0.01$)。(图 3B)

3 讨论

本研究讨论了不同组织透明化方法的效果。现有的组织透明化方法大概可分为 2 大类: 溶剂型与水基型透明化, 前者由 1914 年 Spalteholz^[8] 的方法改进而来, 常用的方法有 BABB、3DISCO、iDISCO 等, 其中 iDISCO 为 3DISCO 的改良, 同时适用于组织的免疫荧光染色。简而言之, 溶剂型透明化有主要两个步骤: 第一步是用脂溶剂脱水, 第二步用不同的脂溶剂匹配已经脂剂脱水组织折光率, 使之一致, 达到透明化效果^[9-11]。水基型透明化方法又可分为 (1) 简单沉浸法; (2) 水化法; (3) 水凝胶嵌入法等。此透明法主要是围绕以下核心机制: (1) 被动沉浸在溶液中直至折射率与组织匹配; (2) 水化反应后去除脂质, 以降低折射率, 或者 (3) 主动或被动去除脂质后, 沉浸在折光率匹配的介质中 (refractive index matched solution, RIMs)。简单沉浸法包括: Sucrose、FocusClear、ClearT^[12]、ClearT2、SeeDB、FRUIT、TDE^[13] 等, 水化法包括: Scale A2、Scale U2、CUBIC, 以及商品化的 SCALEVIEW-A2 等。水凝胶

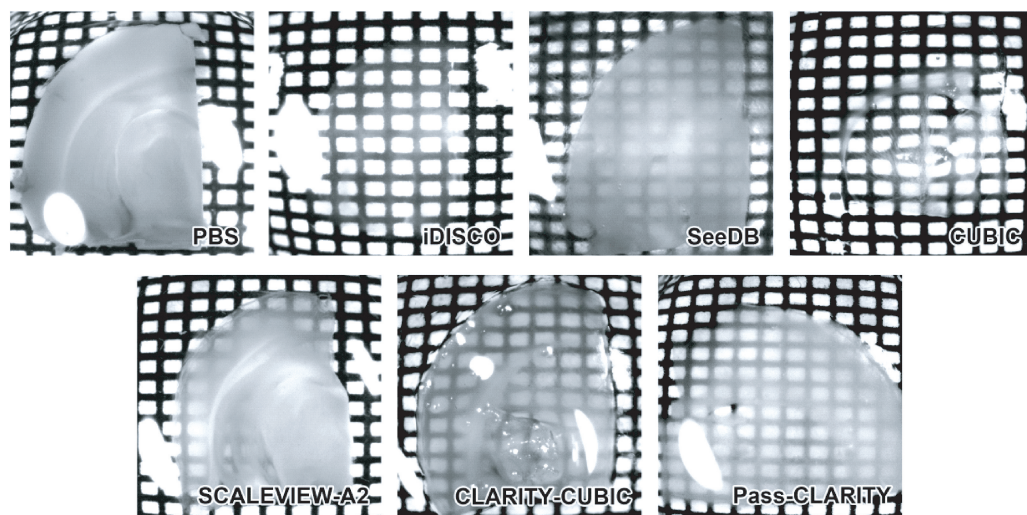
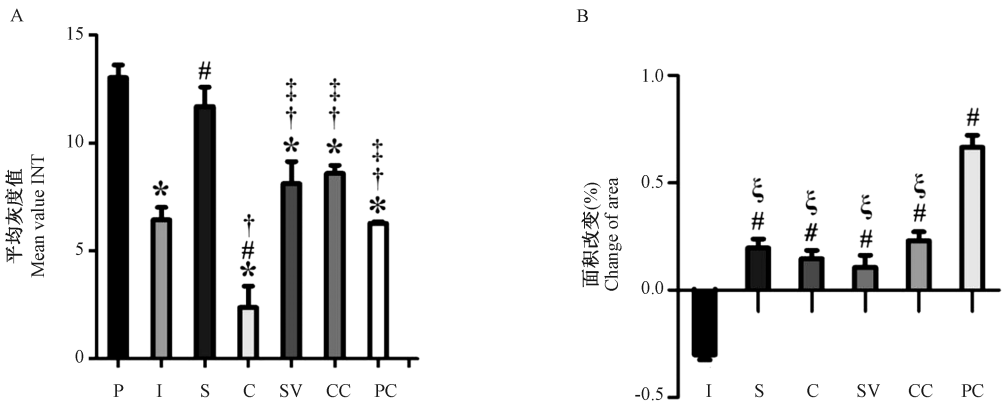


图 2 脑组织块经不同透明化方法处理后在光镜下观察

Fig. 2 Rat brain tissue blocks treated with different clearing methods observed under the light microscope



注:A: 不同方法的处理后组织透明度灰度值比较;B: 不同方法的处理后面积改变比较。P: PBS 组; I: iDISCO 组; S: SeeDB 组; C: CUBIC 组; SV: SCALEVIEW-A2 组; CC: CLARITY -CUBIC 组; PC: passive clarity 组。与 PBS 组比较, * $P < 0.01$; iDISCO 组比较, # $P < 0.01$; SeeDB 组比较, † $P < 0.01$; CUBIC 组比较, ‡ $P < 0.01$; Passive-CLARITY 组比较, § $P < 0.01$ 。

图3 不同透明化方法处理大鼠脑组织块的透明度灰度值与面积改变

Note. A: INT index. B: Changes of area after different treatments. P: PBS group. I: iDISCO group. S: SeeDB group. C: CUBIC group. SV: SCALEVIEW-A2 group. CC: CLARITY-CUBIC group. PC: passive CLARITY group. Compared with the PBS group, * $P < 0.01$. Compared with the iDISCO group, # $P < 0.01$. Compared with the SeeDB group, † $P < 0.01$. Compared with the CUBIC group, ‡ $P < 0.01$. Compared with the Passive-CLARITY group, § $P < 0.01$.

Fig.3 The INT index and area changes after processing with different optical tissue clearing methods on rat brain tissue blocks

法包括有始创的 CLARITY^[14-15], 和后续的 PACT/PARS-CLARITY, Passive-CLARITY, 还有改良的 CLARITY-CUBIC 方法等, 近几年以水凝胶法开发的新透明化方法不断增多。在本次实验中, 以透明周期、透明效果、透明后组织面积改变等指标进行研究, 对四类的组织透明化方法进行比较。

在本研究中, 溶剂型 iDISCO 方法可在 1 周内完成, 水基型中单纯沉浸 (SeeDB) 及水化法 (SCALEVIEW-A2、CUBIC) 透明周期在 1~2 周之间, 而 passive CLARITY 方法则需耗时 4~6 周。透明周期不同的主要原因在于透明原理的差异。溶剂型 iDISCO 法是通过脂溶剂脱水后, 继而利用脂溶剂匹配已脱水的组织块, 使其达到折光率一致, 针对性强, 耗时短。水基型透明法中单纯沉浸 (SeeDB) 及水化法 (SCALEVIEW-A2、CUBIC) 是通过被动沉浸在溶液或者水化去脂, 以降低折射率, 最后浸泡在折光率相匹配的介质中达到透明效果, 用时约在 1~2 周。而 Passive-CLARITY 及 CLARITY-CUBIC 方法都是基于水凝胶嵌入 CLARITY^[15] 方法改进而来。CLARITY 方法的局限性在于电泳仪的使用, 与一般的蛋白电泳仪不同, 主动电泳去脂有特殊的要求, 电泳的电压把握不好便会破坏组织, 时间过短或过长会导致透明不彻底和过度膨胀, 技术的操控性是所有透明化中最难开展的, 所以本实验并无对此法进行探

讨, 而是选择了水凝胶的被动透明 (Passive-CLARITY) 和改良法 (CLARITY-CUBIC)。CLARITY-CUBIC 法在组织经过水凝胶灌注之后, 通过高浓度的洗涤剂去除组织中脂质, 从而缩短了组织透明的时间, 但这也导致了大量蛋白丢失的问题。而在 Passive CLARITY 方法中, 脑组织在经过水凝胶嵌入、聚合反应后, 使用被动去脂的方法 (8% SDS 洗涤剂等), 达到透明化的效果。这种去脂方法较为温和, 对组织样品蛋白的破坏较小, 但是耗时较长。

通过对组织透明化后的灰度分析, 我们发现透明效果最好的是 CUBIC 法, 其次为 iDISCO 及 Passive-CLARITY 法, SCALEVIEW-A2 及 CLARITY-CUBIC 法的透明效果尚可, 而 SeeDB 在本研究中未能实现透明效果。水基型水化-透明化 CUBIC 法是通过水化反应, 对样品去脂同时降低折射率。使用尿素用以穿透和变性组织, 水合作用减少了总体折光率降至 1.38, 最后利用混合油 (1:1 混合矿物油与硅油) 匹配折光率到达很好的透明效果^[4]。同为水化法的 SCALEVIEW-A2 是一步法透明, 且 SCALEVIEW-A2 溶液较稀, 折光率较小, 可能透明效果较 CUBIC 差的因素之一。溶剂型 iDISCO 法通过脂溶性溶液脱水常会使折光率大于 1.5 (远高于脂性溶液与水), 在脂性脱水后紧接着浸泡另一组脂性溶液, 并且选择的溶液具有均匀嵌合到组织中

的特性,以达到透明效果^[2]。Passive CLARITY 亦可以到达较好的透明效果,但是耗时长。而单纯沉浸的 SeeDB 法通过组织样品置入一系列水溶液,包括可溶的,高折射率的化学剂使之逐渐透明,主要试剂有蔗糖、果糖、甘油、2,2'-硫二甘醇(TDE)、甲酰胺等。这种被动透明方法相对其他透明方法效果较差,在本实验中也证实了这一点,灰度值分析与 PBS 组差异无显著性,所以此方法较适宜用在相对较薄的小样品中。

组织透明化产生的初衷是为了立体地观察组织的三维结构,但是我们发现在组织透明化的过程中,脑组织会出现皱缩或者膨胀的现象,这种形态的变化可能会改变组织内部原本的三维结构,不利于后续研究,因此本研究中探讨了不同透明化方法后组织面积改变的差异。我们发现溶剂型 iDISCO 法处理后组织皱缩,而经水基型透明化法后组织均出现不同程度的膨胀,其中 Passive-CLARITY 法膨胀最为明显。这是因为溶剂型透明法通过脂溶性溶液脱水导致组织皱缩,得到高折光率的透明组织样品。在我们的研究中测量出 iDISCO 是几种方法中缩小最明显的(平均缩小了 30%),组织也变得硬实,但是透明效果的稳定性很好,组间差异无显著性。而水基型透明法中是基于水环境中透明的,因此组织会出现不同程度的膨胀,其中水凝胶嵌入法的组织膨胀较为明显,由于 CUBIC 法改进使用两步法来透明组织,中间有一步 PBS 目的便是为了减少组织的膨大,第二步透明使用了高浓度的蔗糖,脱水的同时加速透明进程。因此 CLARITY-CUBIC 法膨胀率较 Passive-CLARITY 法明显减少($P < 0.01$)。

在本次研究中,最优良的透明效果为 CUBIC,虽然用时较长,但是效果稳定,组织变形小,试剂毒性小,也容易配制。而 iDISCO 也不失为备用的方法。

透明组织只是透明化成像技术的第一步,整个技术还需要探讨以下问题:(1)适用于带荧光蛋白标签的脑组织或者免疫荧光染色的方法。根据现有的研究,溶剂型透明 3DISCO 与 iDISCO 的报道是荧光会在几天内淬灭^[16]。水基型中简单沉浸法(如 SeeDB)最大的优点是保持各种组织的荧光的兼容性,包括了脂性标记染料如神经示踪剂 Dil 等。水化法中有报道 Scale A2 及 CUBIC 溶液中含有高浓度的尿素及 Triton 用于去脂和洗涤,这过程

会导致蛋白质大量降解(24%~41%)和降低荧光水平^[4]。水凝胶嵌入法通过应用水凝胶替代细胞骨架结构,充分与组织细胞组分,包括蛋白质、神经递质、DNA 等生物信息物质结合,因此在后续的荧光标记应用中更具优势。(2)透明化技术可应用的组织类别。目前透明化技术主要应用在神经系统中,有报道水凝胶 CLARITY 法可以应用在小鼠外周胃、小肠、心、肺、肾甚至肿瘤组织等,另外,在一些研究中可能需要对肌肉、骨头、脑组织等结构的联合观察,这些可应用动物全身透明化的方法值得深入探讨。(3)图像的捕捉,也是很关键的因素,目前有共聚焦、双光子显微镜和光层扫描显微镜(light-sheet microscope LSFM)^[17-20],主要是物镜的工作距离和时间、扫描深度等技术问题影响成像深度和体积,目前来说,LSFM 成像是透明化组织最理想的拍摄工具。(4)折光率匹配问题,原理上主要是球面光行差造成的成像减少,原因是物镜与组织内各种折光率不匹配^[21]。(5)透明液的获取及处理,如 iDISCO 法很多试剂是有毒的,也可以溶解物镜的胶聚合物,弃液需要严格按照当地健康和安全法规执行

毫无疑问,不久的将来,将会发明和改进更多的透明化和成像的方法,随着这些技术的发展,商业化试剂也会更加稳定高效,适用于各种物镜和显微镜。另外也会促进新的适用于透明化的抗体、荧光蛋白保护剂、RIMs 等大规模的应用,使得透明化成像技术成为形态学研究的一个必备的方法。

通过本次比较实验我们可知,除 SeeDB 外, iDISCO 法、CUBIC 法、SCALEVIEW-A2 法、CLARITY-CUBIC 法、passive CLARITY 法均能达到透明效果,CUBIC 方法在大鼠脑组织块的透明效果优于其他各组,用时也相对适中, iDISCO 处理后面积缩小较为明显,透明效果次之,但时间最短,可作为备选方案。其余的,SCALEVIEW-A2 虽然步骤最简单,但效果欠佳, CLARITY-CUBIC 和 passive-CLARITY 法均使用水凝胶,对脑组织中部的观察影响不大,如果研究关注的正好是边缘部位,此时因有水凝胶的残留,可能会影响观察,同时, Passive-CLARITY 经过长期处理后膨胀最为明显。本研究初步探讨了各种透明法的效果和特征,为后续的光透明化三维成像提供了一些实践经验,因此,仍有必要进一步比较探讨不同透明化方法的适用范围和成像效果。

参考文献:

- [1] Micheva KD, Smith SJ. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits [J]. *Neuron*, 2007, 55(1): 25–36.
- [2] Renier N, Wu Z, Simon DJ, et al. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging [J]. *Cell*, 2014, 159(4): 896–910.
- [3] Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction [J]. *Nature Neurosci*, 2013, 16(8): 1154–1161.
- [4] Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, et al. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(11): 1709–1727.
- [5] Hama H, Kurokawa H, Kawano H, et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain [J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(11): 1481–1488.
- [6] Liang H, Schofield E, Paxinos G. Imaging serotonergic fibers in the mouse spinal cord using the CLARITY/CUBIC technique [J]. *J Vis Exp*, 2016, (108): 53673.
- [7] Roberts DG, Johnsonbaugh HB, Spence RD, et al. Optical clearing of the mouse central nervous system using passive CLARITY [J]. *J Vis Exp*, 2016, (112).
- [8] Spalteholz W. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang [M]. 1914.
- [9] Becker K, Jahrling N, Saghaei S, et al. Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33916.
- [10] Peters W. Methoden zur Herstellung von Aufhellungspräparaten [J]. *Zoologischer anzeiger*, 1961, 167: 233–240.
- [11] Erturk A, Becker K, Jahrling N, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(11): 1983–1995.
- [12] Kuwajima T, Sitko AA, Bhansali P, et al. Clear T: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue[J]. *Development*, 2013, 140(6): 1364–1368.
- [13] Staudt T, Lang M C, Medda R, et al. 2,2'-Thiodiethanol: A new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy [J]. *Microsc Res Techn*, 2007, 70(1): 1–9.
- [14] Tomer R, Ye L, Hsueh B, et al. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(7): 1682–1697.
- [15] Chung K, Wallace J, Kim S, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems [J]. *Nature*, 2013, 497(7449): 332–337.
- [16] Ertürk A, Mauch C P, Hellal F, et al. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury [J]. *Nat Med*, 2011, 18(1): 166–171.
- [17] Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope [J]. *Scanning*, 1988, 4(10): 128–138.
- [18] Theer P, Denk W. On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy [J]. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 2006, 23(12): 3139–3149.
- [19] Theer P, Hasan MT, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier [J]. *Optics Letters*, 2003, 28(12): 1022–1024.
- [20] Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain [J]. *Nat Methods*, 2007, 4(4): 331.
- [21] Hell S, Reiner G, Cremer C, et al. Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index [J]. 1993, 169(3): 391–405.

[收稿日期]2017–10–20