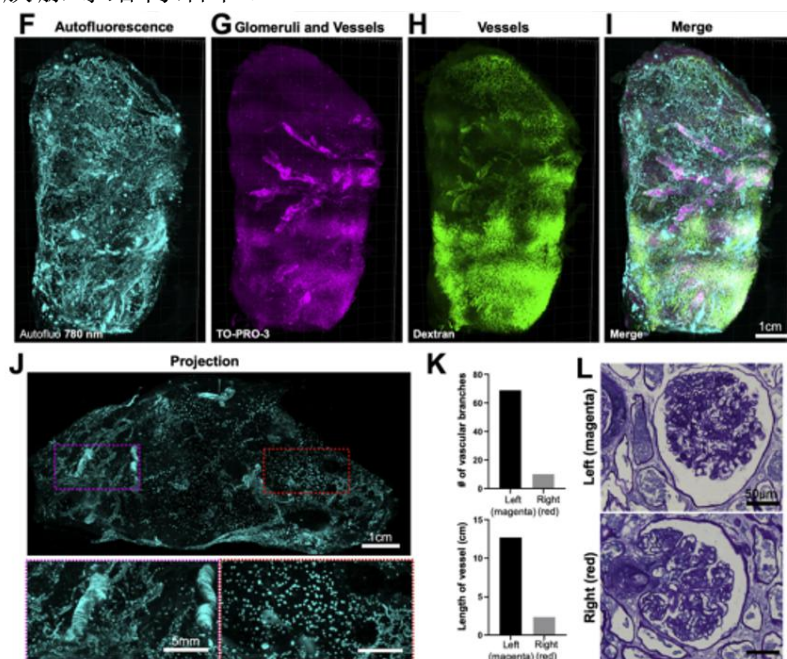


近红外光片显微镜辅助完整人体器官三维重现

本文要点：作者介绍了一种叫 SHANEL(小胶束介导的人体器官高效清除和标记)的方法来使完整的成人组织器官变得透明。同时，通过 SHANEL 清除与近红外光片显微镜的联用，使成像深度达到厘米级，从而进行 3D 组织学研究。作者在细胞分辨率上揭示了完整的人眼、人甲状腺、人肾和转基因猪胰腺等结构细节。



人体器官的结构和功能图谱是各种生物医学研究的重要内容，例如许多国家都启动了自己的“人脑图谱”项目。然而，这些项目在重现人体器官复杂的解剖结构上的进展都十分有限，究其原因，主要是因为缺乏在细胞水平上对人体器官进行成像的可靠技术。传统的磁共振成像(MRI)只能为人体器官提供纵向成像，缺乏细胞分辨率。近红外染料由于其光学特性，相比可见光染料具有成像深度深的优势，配合全新的近红外光片显微镜可以对厘米级的人体器官进行细胞和分子水平的成像，并在后期通过数据处理进行 3D 重现。

SHANEL 是作者开发的一种通过形成小胶束，在大型哺乳动物器官中完全扩散并改善组织网，使生物组织完全透明的方法，用于进一步细胞和分子成像。作者首先实现了在 1.5 个月内使大小为 $12.0 * 7.3 * 5.0$ cm 的猪脑透明，清理后的猪脑大小为 $7.5 * 5.0 * 3.3$ cm，体积缩小率为 30%(图 1A-C)。作者再将 SHANEL 清除法应用于 INS-EGFP(胰岛 β 细胞特异性表达 EGFP 基因)转基因猪胰腺(图

1D-F)。通过该方法可以很容易地评估胰岛内单细胞或细胞群的胰岛 β 细胞的三维分布，从而能够量化胰岛体积和显示胰岛的异质性（图 1G-L）。

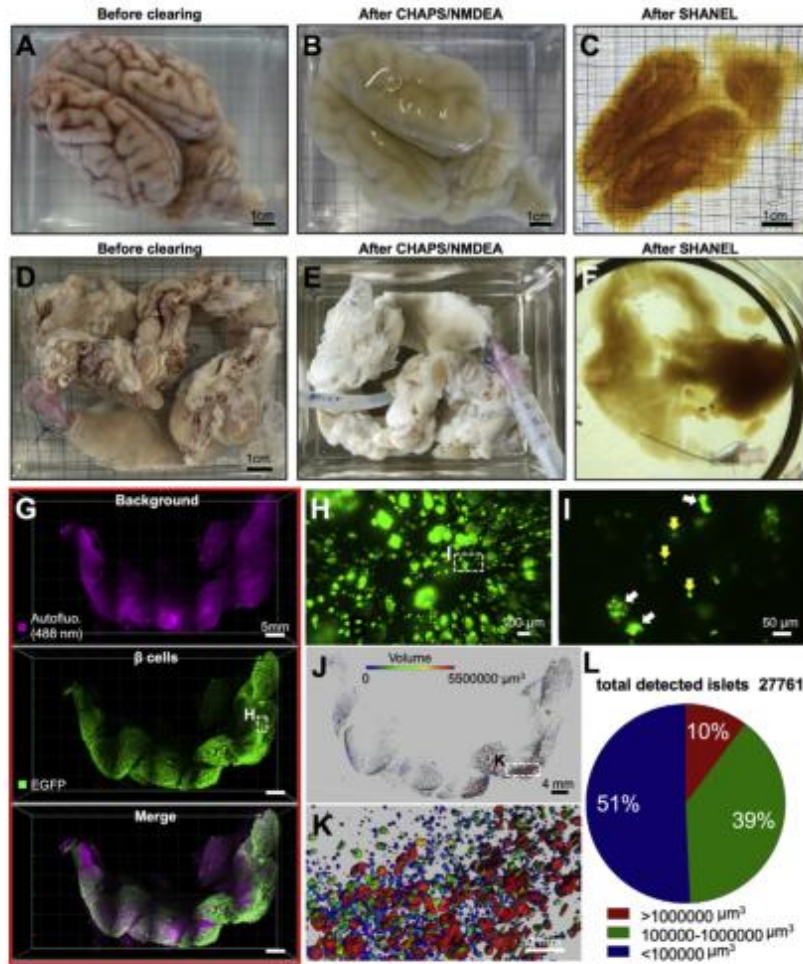


图 2.成年猪脑和胰腺的 Shanel 清扫

(A)-(C) 成年猪脑和胰腺的 Shanel 清扫

(D)-(F) 成年猪胰腺的 Shanel 清扫

(G) 光片显微镜成像的 B 细胞胰岛的三维分布。

(H) (G)中标记的区域的高倍率视图。

(I) (H)中标记的标记的区域的高倍镜视图

(J 和 K) 胰岛内 B 细胞体积的节段性三维分布。(J)中的标记区域在(K)中以高倍率显示。(L)

对检测到的小岛总数进行量化，并按其体积进行分类

在对猪脑和猪胰腺进行完整成像后，作者的下一个目标是对完整人脑进行成像。由于活体基因标记和荧光染料示踪不适用于死后人体组织的研究，因此对人体器官的细胞和分子成像需要死后使用染料和抗体进行染色。然而，抗体标记技术在组织学中被限制在 50 μ m 厚度，若先行清扫则最大成像深度为 1 毫米，这主要是由于组织的弱通透性和抗体在组织内扩散缓慢。作者首先建立了一个压力驱动的泵送系统，使所有的清洗剂 and 细胞核标记染料通过四条动脉循环到达人脑的所有部位。作者用 SHANEL 清扫法对 92 岁女性捐赠者的完整人脑进行透明化处理（图 2A-B）。然后用 IBA1(离子化钙结合分子 1)抗体标记小胶质细胞(图 2C-2J)和 PI(碘化丙啶)标记细胞核。作者观察到与白质相比，灰质中的小胶质细胞大多更大，分支更多。接下来，作者使用 TH（酪氨酸羟化酶）抗体免疫标记神经元结构、用 PI 标记细胞核（图 2K-2N）。作者能够在 1.8*1.8*1.5cm 的人脑切片上观察到特异性标记的轴突延伸（图 2K-2N）。

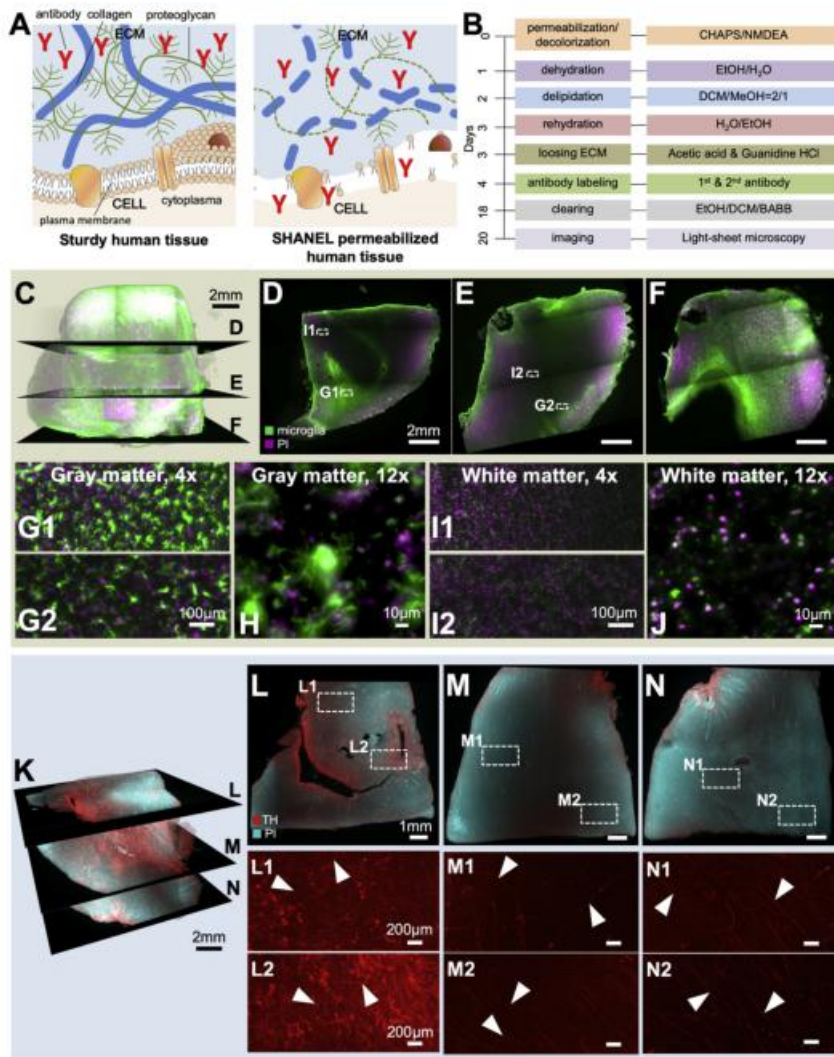


图 2. 光片显微镜拍摄的人脑组织

(A-B) SHANEL 清扫处理人脑。

(C-F) IBA1 (绿色) 标记和 PI (洋红) 标记。小胶质细胞密度和形态的差异在整个灰质(G 和 H)和白质(I 和 J)都很明显。

接下来,作者将 SHANEL 技术和光片显微镜进一步应用到人体肾脏的整体成像。目前肾脏捐赠者严重短缺,其中很大一部分患者等待肾移植,等待时间可能长达数年,移植费用可能高达 50 万美元。了解人类肾脏的 3D 结构对于利用 3D 生物打印技术制造人造肾脏非常有价值。作者用 SHANEL 组织学方法实现了肾脏的完全透明,通过肾动脉灌注 TRITC-dextran 和 TO-PRO3 染料,标记全肾的血管和致密的细胞结构。图中清楚显示了主要的肾动脉、段动脉的二级分支和叶间动脉(图 3A-C)。通过光片显微镜,我们可以显示大体积(1.2 * 1.2 * 0.45 cm)肾皮质内血管和肾小球的三维分布,并追踪单个传入小动脉及其相应的肾小球(图 3D-F)。经皮质剖面计数,皮质带宽度约为 2742 ± 665 mm,肾小球卡尺直径为 221 ± 37 mm,传入小动脉直径为 71 ± 28 mm(图 3G)。

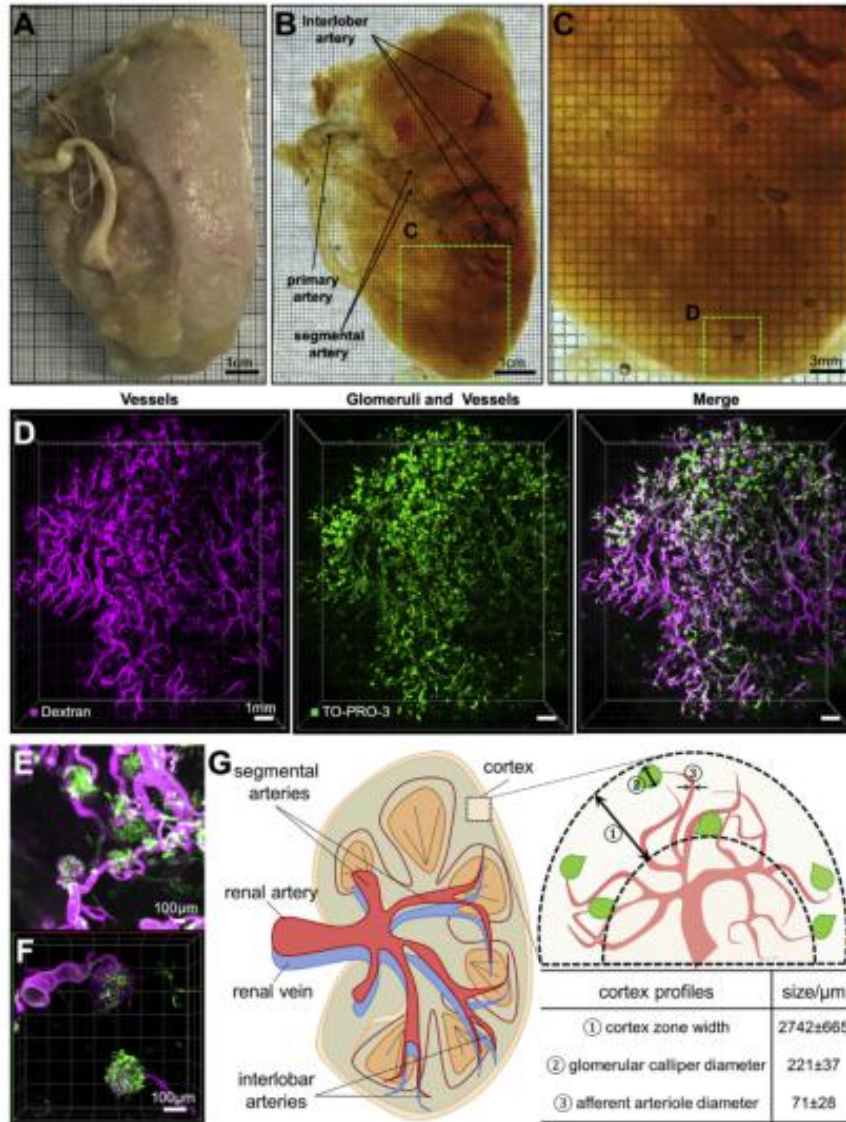


图 3.人肾的细胞学研究

(A-C) SHANEL 清扫肾脏

(D) 用光片显微镜对(C)所示的肾皮质区域的血管和肾小球进行三维重建。

(E-F) 高倍率光片显微镜(E)和共聚焦显微镜(F)图像显示了传入小动脉(洋红色)和肾小球(绿色)的结构细节。

(G) 3D 重建的人体肾脏解剖和皮质剖面。

为了能够对完整的人体肾脏成像，作者使用了一台具有平台运动功能和大的样品容纳室(大小为 25*9*7 厘米)的光片显微镜(图 4A-E)。我们对一位 93 岁捐献者的肾脏(11.*6.5*5 厘米)进行了端到端扫描(图 4F-I)。在 780nm 自荧光通道，作者观察到很大一部分肾皮质中的血管结构显著减少(图 4J 和 4K)，这在 dextran 通道中也很明显(图 4H)。切片的 PAS 染色，

表明两侧的肾小球结构相似(图 4L)。这些数据表明，作为老年人高血压相关变化的典型表现，血管病理可能先于肾小球病理影响到肾脏功能。通过该实验，作者证明了 SHANEL 技术和近红外光片显微镜的联用可以成为研究完整人体器官病理学的新工具，为了解器官在疾病中的进展提供有价值的信息。

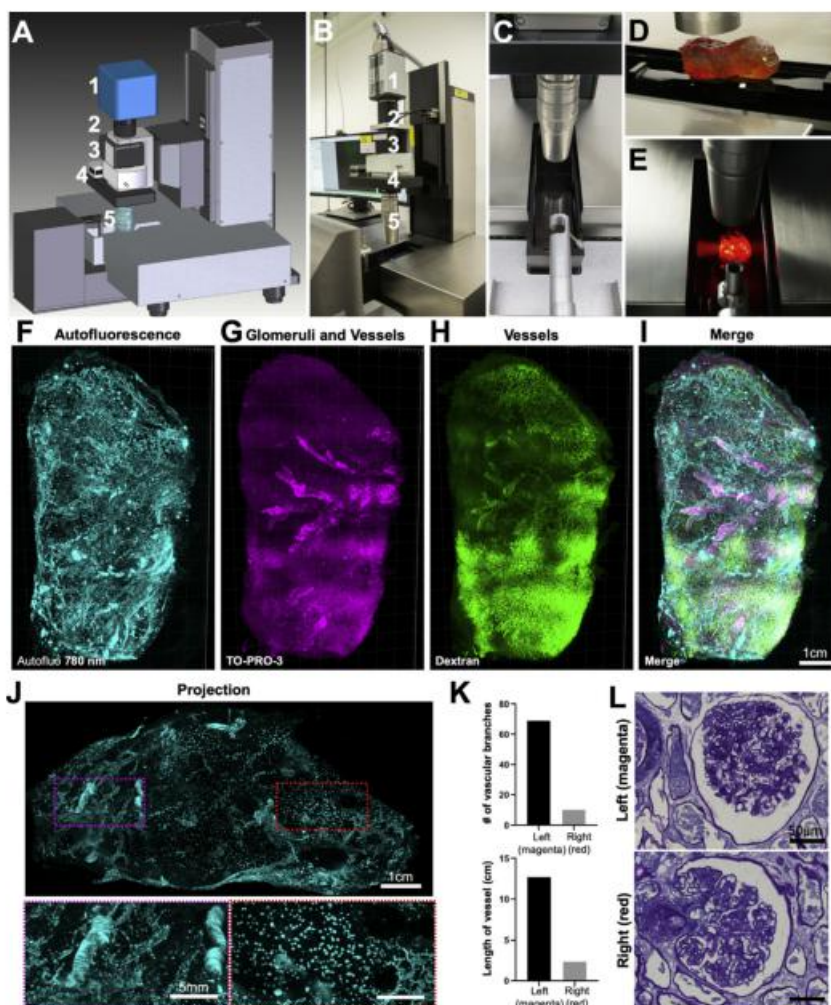


图 4.使用具有样本容纳拓展能力的超显微镜进行全肾脏成像

(A-E) 相机一览

(F-I) 用原型机对成人肾脏进行三维重建。图中显示了 780 nm 处的自发荧光信号(F, 青色), TO-PRO-3 标记的肾小球和血管(G, 品红), dextran 标记的血管(H, 绿色), 以及(F)-(H)在(I)中的合并视图。

参考文献： Shan Zhao, et al. Cellular and Molecular Probing of Intact Human
Organs[J]. Cell,2020