

组织透明化技术的发展及其在神经退行性疾病中的应用*

谷沛霖^{1,2}, 沈建磊³, 诸颖⁴, 李江⁴, 王丽华^{4Δ}

1. 中国科学院上海应用物理研究所 中国科学院界面物理与技术重点实验室(上海 201800); 2. 中国科学院大学(北京 100049);
3. 上海交通大学化学化工学院(上海 200240); 4. 中国科学院上海高等研究院基础交叉研究中心 张江实验室(上海 201210)

【摘要】 现代组织透明化技术使细胞群的高分辨率成像和组织结构的三维重建成为可能, 我们通过组织透明化技术可以获得更完整的脑部三维结构以及脑组织各个组分的空间联系。在过去的十年里, 科学家们对组织透明化技术进行了大量的开发与改进, 这些方法目前被广泛的运用在神经科学的研究中, 使我们在复杂的神经网络中得到重要的信息。同时, 组织透明化技术也会为神经退行性疾病的干细胞治疗和神经再生提供研究工具。在这篇综述中, 我们主要回顾了一下目前主要的组织透明化技术的种类以及优缺点, 并且总结了一下这些技术在神经退行性疾病研究中的应用以及独特的优势, 此外我们还探讨了未来组织透明化技术的发展要求, 配套设备的完善以及在干细胞治疗和再生医学中作为研究工具的潜力。

【关键词】 组织透明化技术 神经退行性疾病 再生医学

Development in Tissue Clearing Technology and Its Application in Neurodegenerative Diseases GU Pei-lin^{1,2}, SHEN Jian-lei³, ZHU Ying⁴, LI Jiang⁴, WANG Li-hua^{4Δ}. 1. CAS Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 4. The Interdisciplinary Research Center, Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China

Δ Corresponding author, E-mail: wanglihua@zjlab.org.cn

【Abstract】 Modern tissue clearing techniques have made it possible to have high-resolution imaging of cell populations and three-dimensional reconstruction of tissue structures, and we are able to obtain more complete three-dimensional brain structures and spatial connections between the various components of brain tissues through tissue clearing techniques. Over the past decade, scientists have developed and improved a number of tissue clearing techniques that are now widely used in neuroscience research, allowing us to extract important information from complex neural networks. Moreover, tissue clearing technology also provides research tools for the stem cell therapy and neurogeneration of neurodegenerative diseases. In this paper, we reviewed the major types of existing tissue clearing techniques and their respective strengths and weaknesses. We summarized the application of these techniques in neurodegenerative disease research and their unique merits. In addition, we explored the development requirements of tissue clearing technology, improvements in the supporting equipment, and its potential to be used as research tools for stem cell therapy and regenerative medicine in the future.

【Key words】 Tissue clearing technology Neurodegenerative diseases Regenerative medicine

神经退行性疾病包括阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)、帕金森病(Parkinson disease, PD)、亨廷顿病(Huntington disease, HD)、肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)和额颞叶痴呆(frontotemporal dementia, FTD)等, 这类疾病影响着全球数百万人, 造成巨大的社会和经济负担。尽管全球科学

家围绕神经退行性疾病进行了深入的研究, 但是当前仍没有有效的疗法可以治愈或阻止其发展。因此, 如何深入了解发病时脑部的结构, 功能及其病理改变是发展有效的治疗策略所必需解决的问题。

脑血管是一个解剖和组织学上非均匀三维交通网络, 可以传输血细胞、营养物质、氧气、代谢废物、信号分子等^[1]。对于脑部神经网络及相关分子的分析可以提供对脑循环及脑血管结构的基本认识, 也可以帮助理解多种神经退行性疾病的发生并对其进行诊断和治疗。因此, 获得精细全面的脑部神经网络及相关分子的图谱具

* 国家自然科学基金专项项目(No. 82050005)、中国科学院重大科技基础设施开放研究项目(No. 21775157)和上海市科委仪器项目(No. 19142202400)资助

Δ 通信作者, E-mail: wanglihua@zjlab.org.cn

有重要的意义^[2]。

近年,科学家为了获得完整的全脑神经网络,开发了多种成像技术,其中包括双光子成像、转盘式共聚焦显微镜等^[3-4]。但是这些成像方法主要依赖于先进的成像仪器,而且脑部其他物质包括蛋白质、脂质等会产生一定的自发荧光,这使我们在成像中会看到比较高的背景噪声。因此,科学家利用组织工程的方法开发了多种脑部透明化的方法。通过化学试剂的处理,利用化学工程高分子支撑整个脑部的神经网络,同时利用试剂使脑部透明,实现大脑的透明化,获得全脑神经网络的高分辨成像和精确的脑部活动信息,使我们对大脑的二维局部区域的研究扩展到三维空间^[5]。透明化组织的主要目的是使生物标本透明,以便对感兴趣的标记细胞进行深度的三维可视化成像。特别是在研究AD的脑损伤和神经病理学的过程中,脑透明化方法可有效绘制正常的神经元连通图谱,有助于识别新生的细胞连接和 β -淀粉样蛋白斑(A β)分布,这是AD中的主要病理学标志物^[6]。传统的方法中,透明化试剂会破坏细胞的形态特征^[7],并且利用仅限于薄片^[8]。近年来,脑组织透明化方法主要关注于保持

透明化后组织的结构完整性和荧光团(即荧光标记)的稳定性,大量新开发的透明化技术也可以通过减少化学处理步骤进行优化,从而大大加速了组织处理过程。此外,这些较新的技术正在增强对较厚(> 500 μm)样本和人脑组织的分析能力,从而能够对神经元微结构进行空间分析^[9]。另外,透明化技术也有作为研究神经退行性疾病的干细胞治疗以及神经再生的工具的潜力。

1 脑组织透明化方法

近年来,各种各样的组织透明化方法逐渐被开发使用,不仅可以进行多色成像还可以对复杂组织中的几个特定目标进行成像。除了对荧光蛋白进行成像,这些方法大多还允许对荧光团偶联的蛋白质、抗体、纳米颗粒和原位荧光RNA探针杂交(FISH)进行追踪成像^[10]。本文将详细比较几种组织透明化方法,最近发表的相关综述见文献^[11-12]。在讨论组织透明化对于神经病理学的研究的作用之前,我们将首先简要介绍目前主要的三类组织透明化方法包括疏水性组织透明化、亲水性组织透明化和水凝胶透明化的基本原理及主要优缺点(表1)。

表1 主要组织透明化技术优缺点
Table 1 Strengths and weaknesses of major tissue clearing techniques

Method	Resolution	Permeabilization and delipidation	Preservation of fluorescence	Clearing time
Hydrophobic-based tissue clearing				
BABB	0.5-2 μm	EtOH (Ethanol), DCM (Dichloromethane)	Hours	7 d
iDISCO	0.5-2 μm	Methanol, DCM (Dichloromethane)	Hours	7-14 d
vDISCO	1-2 μm	Tert-Butanol, THF (Tetrahydrofuran) DCM (Dichloromethane)/Triton-X100	Hours-days	5 d
Hydrophilic tissue clearing				
Scale	0.5-2 μm	Urea C, Sorbitol C, DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Days-months	2-5 d
ScaleS	0.5-2 μm	Urea C, Sorbitol C, DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Days-months	2-5 d
CUBIC	0.5-2 μm	CUBIC-L (10% Triton-X100 C, 10% Aminoalcohol)	Days	7-14 d
SeeNet	(6.58 \pm 1.21) μm	SDC (Sodium deoxycholate)	>6 weeks	1 week
Hydrogel-based tissue clearing				
CLARITY	0.5-2 μm	4% SDS (Sodium dodecylsulfate)	Temperature-dependent: preserved at 37 $^{\circ}\text{C}$	1-3 weeks
PARS	1-30 μm	8% SDS (Sodium dodecylsulfate)	3 months	1-4 d
PACT	0.5-12 μm	8% SDS (Sodium dodecylsulfate)	3 months	1-4 d

BABB: Benzyl alcohol/benzyl benzoate; iDISCO: Immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs; vDISCO: Ultimate three-dimensional imaging of solvent-cleared organs; Scale: Aqueous reagent that renders biological samples optically transparent; ScaleS: Sorbitol-based optical clearing; CUBIC: Clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis; SeeNet: 3D visualization and molecular characterization of the entire vascular network; CLARITY: Clear lipid-exchanged acrylamide-hybridized rigid imaging/immunostaining/*in situ* hybridization-compatible tissue hydrogel; PARS: Perfusion-assisted agent release *in situ*; PACT: Passive clarity technique.

1.1 疏水性组织透明化

1.1.1 苯甲醇-苯甲酸苄酯(BABB)透明技术 脑组织透明化的初次问世可以追溯到2007年,研究者使用苯甲醇和苯甲酸苄酯(benzyl alcohol/benzyl benzoate, BABB)的混合物透明化小鼠大脑,开发了BABB透明技术,获得

了小鼠脑神经网络^[13],成功使小鼠脑部透明化,观察到了标记绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的神经元细胞,与之前的全脑成像采用的电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)和核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)的方法相比,首次实

现了单细胞分辨率的全脑观察。通过脑部的透明化,研究者观察到了标记GFP的单个神经元和脑部的天然荧光体,同时重构了海马体中的树突细胞。但在技术方面还是存在很多的限制——需要成像媒介,透明化不完全,依然存在很高背景,而且此技术使用的透明媒介会使荧光标记迅速消失,因此不适合多次观察等。

1.1.2 iDISCO和vDISCO 全组织包埋免疫标记的三维成像技术(immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs, iDISCO)是一个简单、快速,可进行整体免疫标记的稳定、可扩展的廉价方法。iDISCO可以进行深层组织结构的体积成像^[14]。研究者认为GFP标记手段并不是非用不可的手段,通过整体的免疫标记替代表达的GFP在实现成像功能的同时可以进行更多的信息观察,而且通过整体的适应性调整改进了现有的免疫标记技术,实现了最佳信噪比和最大深度的脑部成像。研究者还调研了其他的透明化方法,筛选了更加稳定和快速的免疫标记抗体^[15]。这使得研究人员开发的iDISCO具有更好的免疫染色相容性。

虽然透明化方法可以对透明化后的整个啮齿动物尸体进行透明化分析,可以提供动物健康或疾病的整体生物信息,但对组织内部荧光蛋白信号的成像和量化仍然是一个挑战^[16]。在这里,研究者开发了基于纳米体的全身免疫标记技术(vDISCO),一种压力驱动的全身免疫标记技术,可以增强蛋白的荧光信号高达两个数量级。这使我们能够穿过完整的透明小鼠的高自发荧光组织包括骨骼、皮肤对细胞层面的细节进行成像和量化。通过这种方法研究者第一次看到了成年老鼠全身的神经元分布和连接,评估了全身中枢神经系统的损伤效应,还发现人体躯干的外周神经末梢变性。此外,vDISCO方法还可以显示出在中风时颅骨骨髓和脑膜之间的血管连接很短,同时脑膜会被免疫细胞填满^[17-21]。因此,vDISCO方法能够支持我们更全面的研究中枢神经系统和身体其他部分的神经联系。

1.2 亲水性组织透明化

1.2.1 Scale 和 ScaleS 2011年提出的基于尿素的透明技术(Scale)可以在更短的时间完成组织的透明化,同时相比于其他试剂透明化的效果更好^[22],可以有效的防止荧光的淬灭。这种试剂的使用综合考虑了多方面的因素,包括折射率、pH等,组织透明化效果更好,成像分辨率更高,更重要的是,这种试剂用于非脑组织的透明化效果亦佳。

2015年,在Scale的基础上,他们综合鸡尾酒透明(CUBIC)和PARS技术,考量了PH值和折射率的同时提高

了透明化速度,减少了Scale技术处理过后产生的组织脆弱以及组织体积增大的问题,形成了优化版的Scale——ScaleS^[23]。在透明化的同时进行免疫组化染色,告别了染色后组织透明化不理想和透明化后染色时间太长的弊端。使用这种技术可以迅速透明化组织,最短数小时就可达到效果。ScaleS方法通过减少光在原位的散射来促进深层组织的生物成像。既保持了组织的完整性同时还满足多尺度高分辨率成像的要求,可以实现更精确的信号重建。相较于其他的透明化试剂含有可能破坏组织结构的化学成分,重复的解剖取材和荧光信号的不稳定,这种基于山梨醇的光学透明化方法,为免疫化学标记和三维信号呈现提供了稳定的组织结构和生物标志物活性。在AD模型中,ScaleS允许对老年和患病的大脑进行光学重建,包括绘制淀粉样斑块、神经元和小胶质细胞的三维网络图,并且可以通过连续荧光和电子显微镜对单个斑块进行多尺度跟踪。对从AD患者中提取的人类临床样本进行了z轴上淀粉样斑块的发病机制的分析。

1.2.2 CUBIC 2014年,日本科学家开发了一种简单、高效、可扩展的智能透明化系统和计算分析方法CUBIC,使单光子快速全脑成像成为可能^[24]。这种方法可以应用于不同荧光蛋白的全脑标记成像和成人脑组织免疫染色及其影像学研究。CUBIC从灵长类脑成像到亚细胞结构成像如轴突和树突棘都有很好的成像效果和分辨率^[25]。为了进行个体间的比较,研究者还开发全脑细胞核反义标记法和图像分析方法。CUBIC具有跟踪基因表达的能力,同时可以达到单细胞的分辨率,开发的智能分析系统,可以实现了对图像的优化分析以及信息提取。

1.2.3 SeeNet 2019年12月,研究者为了观察大脑中的血管连接,开发了脑血管网络3D成像技术(SeeNet),SeeNet采用灌注多功能交联剂,温控聚合混合水凝胶进行血管铸型的组织透明化,可以用于观察血管连接。SeeNet能够实现全脑可视化的单微血管水平的脑生物标记成像。此外,SeeNet揭示了迄今为止,尚未发现的连接大脑和海马血管的血管通路,因此可作为评价脑血管连通性的潜在工具。SeeNet速度快,成本低,而且很容易被野生型和转基因小鼠所接受。SeeNet将实现分子级别的大规模脑血管追踪成像,从而促进我们了解脑血管网络的物质运输和信息交流^[26]。

1.3 水凝胶组织透明化

1.3.1 CLARITY 2013年,CHUNG课题组提出利用水凝胶作为骨架支撑整个脑部的神经网络,基于洗涤剂的脱脂作用(CLARITY)是一种能够将完整的生物组织转换为纳米多孔水凝胶-杂交形式(亲水聚合物的三维网络)

的技术^[27]。CLARITY可以实现多次的免疫组化染色,不会互相影响,同时使用的凝胶剂不会影响荧光,具有更好的应用价值,甚至可应用于未切片的人体组织,为神经精神病学研究提供多种可能^[28-30]。但这种方法也存在一定的问题:首先这种方法需要近一个月的样本处理时间,步骤繁琐,耗时长;其次,方法复杂不简便,还需要昂贵的设备和试剂,极大的限制了其在生物医学及脑神经科学中的应用。

1.3.2 PARS和PACT 通过降低凝胶密度和交联程度可以提高探针的组织渗透率和穿透深度,但是凝胶结构的弱化会导致组织信息的丢失,为了均衡这两种需求,研究者开发了CLARITY的变体随机电转运(PACT)技术。PACT技术可以在不损害组织完整性的情况下加速分子标记,提高探针组织渗透率和穿透深度,避免了降低凝胶密度而导致的组织信息丢失。通过随机电传输转运的各种分子(例如抗体、染料和洗涤剂)可以随电泳驱动在组织结构中进行随机扩散,通过这种方式可以快速将它们传递到密集的组织凝胶中,在2~3 d内实现均匀透明化并实现小鼠器官的完整染色,相对于之前长达数周乃至数月的被动扩散方法极大的提高了透明化及染色速度^[31-32]。

为了使水凝胶透明化的方法进一步适用于全身透明化。GRADINARU和他的同事开发了灌注辅助剂原位释放透明化技术(PARS),使啮齿动物身体透明,从而获得目标器官的中央神经和周围神经图^[33]。GRADINARU及其同事意识到,循环系统(血管)可以用来运送透明化试剂和探针,而不是依靠对于大型器官或整个生物体来说染色速度极慢的被动扩散。基于这种PARS方法可以用于骨骼的透明化,另外还可以在保留荧光标记的同时放大单细胞进行可视化研究。

2 脑组织透明化技术在神经退行性疾病研究中的应用

每一种神经退行性疾病都会影响特定的大脑回路,但是不同的疾病也有几个共同的病理生理特征,包括因蛋白质聚集体的积累形成的神经病变等。AD的神经病理学有淀粉样蛋白聚集和高磷酸化的tau蛋白引起的细胞外淀粉样斑块沉积和神经内神经纤维缠结(NFT); α -突触核蛋白内含物,称为路易小体,在PD患者中发现;突变型亨廷顿蛋白(mHTT)聚集在HD患者中发现;TARDNA结合蛋白43(TDP-43)的聚集物在ALS和FTD大脑中发现^[34]。其中一些病变(如淀粉样斑块沉积、路易小体和TDP-43聚集物)存在于多种疾病中,表明不同的疾病可能有相同的分子机制。但是,不同的神经退行性疾病也

有着其独特的神经回路特征^[35],因此我们需要在包含多个脑区的全脑尺度上大尺度上对不同疾病的神经回路进行研究。

通过组织透明化方法,我们可以在大尺度上获得跨越多个脑区的完整神经网络,同时可以对透明化组织进行免疫染色以及生物标记,观察疾病相关的标志物的形成以及分布,实现了在大空间尺度上评估了多个大脑区域的神经病理学研究。最近的研究将组织透明化方法应用于评估这些神经病理学特征的人的大脑样本和转基因小鼠的大脑模型。HUANG和他的同事使用荧光硫磺素对 $A\beta$ 斑块进行荧光染色。结合荧光标记的凝集素以及BABB组织透明化方法观察整个小鼠大脑^[35],展示了敲除了孤儿受体的AD小鼠模型,淀粉样沉积斑块的数量和体积明显降低^[36]。HAMA等^[23]人利用他们的原始技术(即ScaleS),并创造AbScale-用于 $A\beta$ 斑块的深层免疫标记。使用图像和定量分析,在AD小鼠模型中发现大部分 $A\beta$ 斑块分布在大脑皮层中,而在其他脑区没有发现 $A\beta$ 斑块分布。与其他组织透明化方法如:CUBIC, 3DISCO, 和PACT相比,ScaleS保存了大脑超微结构,可以使用电子显微镜检测后突触的密度和突触膜。最近的一项研究使用了改良的高尔基染色,结合硫磺素和CUBIC技术实现了对小鼠脑 $A\beta$ 中的神经元形态的精细观察^[37]。

水凝胶组织透明化技术也被用于人类AD脑标本中 $A\beta$ 和NFT的可视化研究^[38],PD小鼠的黑质纹状体轴突碎片模型^[39]和PD疾病的人类路易小体的病理学大脑观察^[40],可以进行依赖抗体标记检测的神经病理学观察和特定细胞类型的染色观察等多种场景,并且支持共聚焦显微镜对组织观察。可以展现 $A\beta$ 的稀疏积累和多样的三维结构,包括聚集以及弥散的沉积物,而且发现tau蛋白的积累和神经炎的形成是息息相关的,这些都可以用共聚焦显微镜这种简便的成像方式来观察。iDISCO结合抗体标记以及刚果红染色在APP^{swe}/PSEN1E9、3xTg-AD转基因小鼠和人脑中用于揭示tau蛋白病理学以及 $A\beta$ 沉积^[7]。研究人员还发展了基于细胞自动检测以及对图像中斑块统计量化的计算流水线,可以进一步反应脑部成分变化的特征,并可以快速量化大脑不同区域的斑块。iDISCO+^[41], iDISCO的改进版,在内嗅皮质(EC)-tau转基因小鼠中成功的实现了全脑免疫标记和tau蛋白时空演变的三维成像的研究,不仅在内嗅皮质和海马区而且还有新皮质区,揭示了年龄依赖性tau蛋白病理特征,这在传统的组织学研究方法中是做不到的。

最近,通过保护者(SHIELD)组织透明化技术^[42]发现六月龄的5xFAD(AD)老鼠,通过听觉和视觉的刺激可以

有效降低淀粉样沉积斑块的体积和数量($A\beta$ 免疫标记方法),揭示了感官刺激可以作用于广泛的脑皮质区,这通过组织切片是无法做到的^[43]。

基于戊二醛^[44]的全脑免疫标记与组织透明化技术(SWITCH)也被用于5xFAD老鼠脑部淀粉样沉积的病理学过程的观察,而且可以发现 $A\beta$ 在亚皮质的聚集以及随着电生理情况改变带来的区域性聚集^[45]。最后,研究人员提出了一种新的渗透和透明化方法小胶束介导的人体器官透明化和标记技术(SHANEL),允许使用常规抗体,并用于检测淀粉样斑块在被刚果红衍生物甲氧基标记的厘米级别厚度的人脑^[46]。因此,目前我们可以通过组织透明化技术结合全脑免疫标提供了可以高分辨率的检测厚组织样本的能力,为研究人员提供了发现可能导致不同神经系统行为的分子机制的机会,为分子追踪提供可能。并且可以实现对多种神经退行性疾病的发生发展的机制进行研究,满足大空间多标记的观察与研究,实现了单个细胞可视化观察同时观察到细胞间的连接以及空间上的相互作用。总体而言,研究人员应该继续使用组织透明化技术来深入分析人类死后组织的病理变化,动物模型的老化,神经退行性行为 and 神经评估;这些研究可能产生对疾病发展以及病理特征的前所未有的新理解 and 治疗的潜在靶点。

3 脑组织透明化技术在干细胞治疗以及再生医学中的潜力

干细胞治疗在AD的临床前模型中有着很好的应用前景,但仍需进一步的研究才能解决多方面的实际问题和理论问题。例如,我们仍然不确定将这些细胞输注到大脑的最佳方法。AD的复杂性,在疾病的发展过程中没有多个层次的病理变化,导致难以优化单一细胞类型的治疗,以扭转所有的认知和行为症状。这是潜在的细胞疗法面临的主要障碍之一。研究人员也认为,目前关于大脑神经再生的研究,包括他们进行的这项研究,都存在一个问题。这些研究全都是通过一些标志物来间接的检查神经发生,这可能无法可靠的证明有新的神经元生成^[47]。希望能有更为准确可靠的研究方法被开发出来。因此,通过组织透明化技术我们可以得到完整的大脑神经网络获得更全面的信息,帮助我们进行干细胞追踪、评价以及神经元变化的观察。

4 总结与展望

对生物体脑部进行全细胞分析和神经网络观察是生物医学领域的主要挑战之一。组织透明技术结合光学成

像和图像处理技术,能够将整个脑部快速透明并进行结构和细胞分析,为在生命科学中应用先进的光学技术提供了一个非常有前景的解决方案。组织透明化技术在过去几年的惊人发展但其仍然有很多改进的空间。最近的一些综述阐述了组织化学需要提供更优化的技术方案以及更加优良不会影响成像效果以及组织完整性的透明化试剂,需要开发更适合全脑成像以及透明化后观察的光学显微镜,得到更高分辨率和清晰度的图像,增强这种方法的适应性。同时在固定样品观测中应提高当前分辨率和可观测的生物分子的范围(即脂类、糖类等)、修饰(乙酰化、甲基化、苏木酰化等)和变化过程(核酸蛋白相互作用、物质合成、降解和聚合等)^[48]。另一方面,在生物机械系统容积成像中的应用以及使用三维人脸重建模型(large scale facial model, LSFM)的生物微器件实现体外三维重构和亚细胞成像都需要高度可控的实验条件。获得图像之后需要发展强大的计算工具,实现对数据的分析,统计以及可视化处理,并且完善神经病理学分析软件与获得的数据图像分析有机结合,建立标准化的数据格式以及共享平台,提高数据处理速度以及大数据的分析,建立大脑功能以及细胞组学信息库^[49]。为了结合其他结构和功能成像技术(如正电子发射断层摄影术(PET)、功能磁共振成像(fMRI)、多光子显微镜、光学超分辨率成像、冷冻电镜和冷冻电子断层摄影术等)需要建立适应性的组织清理技术以及对其的扩展。如何实现完整的大空间尺度的成像用来评估大脑的相关功能,仍然是当代神经科学最具挑战性的任务之一^[50]。目前组织透明化技术及其扩展技术已经被广泛的应用于神经退行性疾病的研究,而且被神经科学领域广泛的认可。相信在不久的将来我们可以获得更多神经科学相关的信息,用于疾病的治疗以及神经活动的探索。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] MIYAWAKI T, MORIKAWA S, SUSAKI E A, *et al.* Visualization and molecular characterization of whole-brain vascular networks with capillary resolution. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 1104 [2021-03-29]. <https://www.nature.com/articles/s41467-020-14786-z.pdf>. doi: 10.1038/s41467-020-14786-z.
- [2] LICHTMAN J W, DENK W. The big and the small: Challenges of imaging the brain's circuits. *Science*, 2011, 334(6056): 618-623.
- [3] KRAMER C K, SHAW L J, CHANDRASHEKHAR Y. Progress in cardiovascular imaging. *Jacc-Cardiovasc Imag*, 2018, 11(12): 1883-1914.
- [4] GRABHER B J. Brain imaging quality assurance: how to acquire the best

- brain images possible. *J Nucl Med Technol*, 2019, 47(1): 13–20.
- [5] ZHAO S, TODOROV M I, CAI R Y, *et al.* Cellular and molecular probing of intact human organs. *Cell*, 2020, 180(4): 796–812.e19[2020-12-20]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.030>.
- [6] LIEBMANN T, RENIER N, BETTAYEB K, *et al.* Three-dimensional study of Alzheimer's disease hallmarks using the iDISCO clearing method. *Cell Rep*, 2016, 16(4): 1138–1152.
- [7] ALNUAMI A A, ZEEDI B, QADRI S M, *et al.* Oxyradical-induced GFP damage and loss of fluorescence. *Int J Biol Macromol*, 2008, 43(2): 182–186.
- [8] HOFMAN F M, TAYLOR C R. Immunohistochemistry. *Curr Protoc Immunol*, 2013, 103: 21.4.1–21.4.26.
- [9] LAI H M, LIU A K L, NG H H M, *et al.* Next generation histology methods for three-dimensional imaging of fresh and archival human brain tissues. *Nat Commun*, 2018, 9: 1066[2021-03-29]. <https://www.nature.com/articles/s41467-018-03359-w>. doi: 10.1038/s41467-018-03359-w.
- [10] UEDA H R, ERTÜRK A, CHUNG K, *et al.* Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21: 61–79[2020-12-20]. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0250-1>.
- [11] RICHARDSON D S, LICHTMAN J W. Clarifying tissue clearing. *Cell*, 2015, 162(2): 246–257.
- [12] PORTER D D L, MORTON P D. Clearing techniques for visualizing the nervous system in development, injury, and disease. *J Neurosci Meth*, 2020, 334: 108594[2021-03-29]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027020300169>. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108594.
- [13] DODT H U, LEISCHNER U, SCHIERLOH A, *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*, 2007, 4(4): 331–336.
- [14] RENIER N, WU Z, SIMON D J, *et al.* iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 2014, 159(4): 896–910.
- [15] ERTUERK A, BECKER K, JAEHRLING N, *et al.* Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*, 2012, 7(11): 1983–1995.
- [16] PAN C C, CAI R Y, QUACQUARELLI F P, *et al.* Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods*, 2016, 13(10): 859–867.
- [17] BELLE M, GODETROY D, DOMINICI C, *et al.* A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep*, 2014, 9(4): 1191–1201.
- [18] ERTURK A, MAUCH C P, HELMAL F, *et al.* Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat Med*, 2012, 18(1): 166–171.
- [19] SUSAKI E A, TAINAKA K, PERRIN D, *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*, 2014, 157(3): 726–739.
- [20] TAINAKA K, KUBOTA S I, SUYAMA T Q, *et al.* Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell*, 2014, 159(4): 911–924.
- [21] 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. *Nat Protoc*, 2015, 10(11): 1860–1896.
- [22] HAMA H, KUROKAWA H, KAWANO H, *et al.* Scale: A chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, 2011, 14(11): 1481–1488.
- [23] HAMA H, HIOKO H, NAMIKI K, *et al.* ScaleS: An optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*, 2015, 18(10): 1518–1529.
- [24] SUASKI E A, TAINAKA K, PERRIN D, *et al.* Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc*, 2015, 10(11): 1709–1727.
- [25] MATSUMOTO K, MITANI T T, HORIGUCHI S A, *et al.* Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling. *Nat Protoc*, 2019, 14(12): 3506–3537.
- [26] KE M T, FUJIMOTO S, IMAI T. SeeDB: A simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*, 2013, 16(8): 1154–1161.
- [27] CHUNG K, WALLACE J, KIM S Y, *et al.* Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 2013, 497(7449): 332–337.
- [28] ANDO K, LABORDE Q, LAZAR A, *et al.* Inside Alzheimer brain with CLARITY: Senile plaques, neurofibrillary tangles and axons in 3-D. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(3): 457–459.
- [29] PHILLIPS J, LAUDE A, LIGHTOWLERS R, *et al.* Development of passive CLARITY and immunofluorescent labelling of multiple proteins in human cerebellum: Understanding mechanisms of neurodegeneration in mitochondrial disease. *Sci Rep*, 2016, 6: 26031[2021-03-29]. <https://www.nature.com/articles/srep26013>. doi: 10.1038/srep26013.
- [30] TOMER R, YE L, HSUEH B, *et al.* Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc*, 2014, 9(7): 1682–1697.
- [31] YANG B, TREWEEK J B, KULKARNI R P, *et al.* Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell*, 2014, 158(4): 945–958.
- [32] HUNG PHUIC N, VAN BROECKHOVEN C, VAN DER ZEE J. ALS genes in the genomic era and their Implications for FTD. *Trends Genet*, 2018, 34(6): 404–423.
- [33] GRADINARU V, TREWEEK J, OVERTON K, *et al.* Hydrogel-tissue chemistry: principles and applications. *Annu Rev Biophys*, 2018, 47: 355–376.
- [34] BRETTSCHNER J, DEL TREDICI K, LEE V M, *et al.* Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(2): 109–120.
- [35] HUANG Y H, SKWAREK-MARUSZEWSKA A, HORRE K, *et al.* Loss of GPR3 reduces the amyloid plaque burden and improves memory in Alzheimer's disease mouse models. *Sci Transl Med*, 2015, 7(309): 309ra164.
- [36] VINTS K, VANDAEL D, BAATSEN P, *et al.* Modernization of Golgi staining techniques for high-resolution, 3-dimensional imaging of individual neurons. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 130[2021-03-29]. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-37377-x>. doi: 10.1038/s41598-018-37377-x.
- [37] NORDSTROM U, BEAUVAIS G, GHOSH A, *et al.* Progressive

- nigrostriatal terminal dysfunction and degeneration in the engrailed1 heterozygous mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2015, 73: 70–82.
- [38] LIU A K, HURRY M E, NG O T, *et al.* Bringing CLARITY to the human brain: visualization of Lewy pathology in three dimensions. *Neuropath Appl Neuro*, 2016, 42(6): 573–587.
- [39] RENIER N, ADAMS E L, KIRST C, *et al.* Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell*, 2016, 165(7): 1789–1802.
- [40] PARK Y G, SOHN C H, CHEN R, *et al.* Protection of tissue physicochemical properties using polyfunctional crosslinkers. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(1): 73–83.
- [41] MARTORELL A J, PAULSON A L, SUK H J, *et al.* Multi-sensory gamma stimulation ameliorates Alzheimer's-associated pathology and improves cognition. *Cell*, 2019, 177(2): 256–271.
- [42] MURRAY E, CHO J H, GOODWIN D, *et al.* Simple, scalable proteomic imaging for high-dimensional profiling of intact systems. *Cell*, 2015, 163(6): 1500–1514.
- [43] CANTER R G, HUANG W C, CHOI H, *et al.* 3D mapping reveals network-specific amyloid progression and subcortical susceptibility in mice. *Commun Biol*, 2019, 2: 360.
- [44] CHAKRABORTY T, DRISCOLL M K, JEFFERY E, *et al.* Light-sheet microscopy of cleared tissues with isotropic, subcellular resolution. *Nat Methods*, 2019, 16(11): 1109–1113.
- [45] VOIGT F F, KIRSCHENBAUM D, PLATONOVA E, *et al.* The mesoSPIM initiative: Open-source light-sheet microscopes for imaging cleared tissue. *Nat Methods*, 2019, 16(11): 1105–1108.
- [46] ALBERT-SMET I, MARCOS-VIDAL A, VAQUERO J J, *et al.* Applications of light-sheet microscopy in microdevices. *Front Neuroanat*, 2019, 13: 1[2021-03-29]. <https://doi.org/article/cd3ab5e76c6f4d57b0f0c438db9c02b5>. doi: 10.3389/fnana.2019.00001.
- [47] MATTHEW K T, KIANNA M, AHMED D, *et al.* Human hippocampal neurogenesis persists in aged adults and Alzheimer's disease patients. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(1): 7–8.
- [48] 代江兵, 张丽霞, 毛秀海, 等. 蛋白-DNA协同组装构建亚微米级复合结构. *高分子学报*, 2019, 50(4): 359–365.
- [49] HERICHE J K, ALEXANDER S, ELLENBERG J. Integrating imaging and omics: Computational methods and challenges. *Annu Rev Biomed Data Sci*, 2019, 2(1): 175–197.
- [50] KONING R I, KOSTER A J, SHARP T H. Advances in cryo-electron tomography for biology and medicine. *Ann Anat*, 2018, 217: 82–96.

(2020 – 12 – 10收稿, 2021 – 04 – 14修回)

编辑 姜 恬

本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是由教育部主管、四川大学主办的综合性医药类学术刊物,以报道医学相关学科的科研成果为主。主要阅读对象为从事医药卫生工作的科研人员及高等医药院校的师生。2021年起,本刊设有专家笔谈、专家共识、临床指南、医学教育、论著、临床研究及新技术新方法等栏目。

创刊以来,本刊曾荣获各级部门颁发的数次荣誉称号。如全国优秀科技期刊一等奖、国家期刊奖提名奖、国家期刊奖百种重点期刊奖、教育部中国高校精品科技期刊、中国国际影响力优秀学术期刊、中国高校编辑出版质量优秀科技期刊、中国高校百佳科技期刊等。现已被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国科学引文数据库(CSCD)、北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》、中国学术期刊网全文数据库(CNKI)、美国《医学索引》(IM/Medline)、美国《生物学文摘》(BA)、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《文摘与引文数据库》(Scopus)、日本科学技术振兴机构数据库(JST)等检索系统收录。

凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿或具有较强创新性、实用性等的来稿,编辑部将尽量优先发表。欢迎您积极来稿!

本刊在线投稿网址: <http://ykxb.scu.edu.cn/>

地址: 四川省成都市人民南路三段17号《四川大学学报(医学版)》编辑部

邮政编码: 610041

联系电话: (028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

《四川大学学报(医学版)》编辑部