

光学清除对胶原纤维超微结构的影响

韩 琴, 郭建胜, 吴航军, 张梦寒, 吕银萍, 武灵云

(浙江大学医学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 以甘油光学清除的小鼠皮肤为研究对象, 通过二次谐波(second-harmonic generation, SHG)成像和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)研究光学清除对组织超微结构的影响. SHG 成像结果表明, 甘油处理能够显著增大信号强度并提升成像深度, 证实其可作为一种有效的光学清除剂. 通过 TEM 对比观察常规化学固定与高压冷冻(high-pressure freezing, HPF)固定样品的超微结构, 发现 HPF 能更好地保持组织自然状态. 进一步分析显示, 甘油处理虽使胶原纤维直径减小, 但其排列周期未发生明显变化, 说明光学清除过程未对胶原纤维结构造成损伤. 上述结果表明, 甘油具有高效、安全的光学清除效果, 且在光学清除过程中不会引起组织超微结构的改变. 结合 SHG 无损光学成像技术与 HPF 的超微结构保留能力, 可为相关科学研究提供技术支撑.

关键词: 光学清除; 胶原纤维; 高压冷冻技术; 透射电子显微镜

中图分类号: O657.3; TH742

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2025)04-0222-06

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2025.04.002

CSTR: 32263.14.j.1006-3757.2025.04.002

Effect of Optical Clearing on Ultrastructure of Collagen Fibers

HAN Qin, GUO Jiansheng, WU Hangjun, ZHANG Menghan, LÜ Yinping, WU Lingyun

(Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Taking glycerol-mediated optical clearing of mouse skin as the research subject, the effects of optical clearing on tissue ultrastructure were investigated through second-harmonic generation (SHG) imaging and transmission electron microscope (TEM). The SHG imaging results showed that glycerol treatment can significantly enhance the signal intensity and improve imaging depth, confirming that it is an effective optical clearing agent. By comparing the ultrastructure of samples fixed by conventional chemical fixation and high-pressure freezing (HPF) through TEM, it was found that HPF could better maintain the native ultrastructure of the tissue. Further analysis indicated that although glycerol treatment reduced the diameter of collagen fibers, their D-periodicity did not show significant changes, indicating that the optical clearing process did not cause damage to the collagen fiber structure. The above results indicated that glycerol has an efficient and safe optical clearing effect and does not cause ultrastructural alterations during the optical clearing process. The combination of label-free SHG optical imaging technology and the ultrastructural preservation capacity of HPF can provide technical support for relevant scientific research.

Key words: optical clearing; collagen fiber; high-pressure freezing technique; transmission electron microscope

光学成像技术因无创性、操作简便等显著优势, 在科学研究和临床领域得到了广泛应用. 然而, 生物组织的高散射限制了可见光和近红外光的穿透能力, 影响了光学成像的深度^[1]. 为了克服这一限制,

提高图像质量, 目前主要采取两种措施, 一是使用新开发的光学成像技术, 如多光子显微镜^[2-3]; 二是通过使用高渗透剂来减少组织光学散射. 这种通过物理或化学试剂降低组织浊度和散射的方法被称

收稿日期: 2025-05-12; 修订日期: 2025-06-10

基金项目: 浙江省高校实验室工作研究项目一般项目(YB202446)

作者简介: 韩琴(1990—), 女, 初级实验师, 研究方向为光学成像技术和光电关联技术, E-mail: hanqin@zju.edu.cn

为光学清除(optical clearing, OC)^[4]. 早在 1977 年, Tuchin 在生物组织中使用光学清除技术, 提高了光的穿透深度^[5]. 此后, 光学清除技术在各种组织中的应用得到了广泛研究, 涉及到多种光学清除剂(optical clearing agent, OCA), 如甘油^[6-9]、葡萄糖^[10-11]、聚乙二醇^[12]等. 此外, 促渗透的试剂(丙二醇、氮酮、噻唑酮等)^[13-14]和物理方法(超声^[15]、温度^[16])的应用也取得了重要的进展. 虽然光学清除技术已在科研中得到广泛的应用, 但其作用机理尚未完全阐明, 此前的研究提出了 3 种 OC 机制: 折射率匹配、脱水和组织收缩. 值得注意的是, Yeh 等^[17]在去除表皮后采用甘油研究啮齿类动物皮肤, 提出甘油诱导的胶原可逆解离现象, 可能是除上述 3 种机制外的另一种潜在 OC 作用机制.

甘油诱导胶原解离的假说一直颇有争议. 虽然二次谐波(second harmonic generation, SHG)成像技术能够无标记地观察胶原纤维的宏观结构变化, 但胶原纤维直径在 20 ~ 200 nm 之间, 超出了光学成像的衍射极限, 需要通过分辨率更高的电子显微镜进行观察. 闻翔^[18]通过常规化学固定法对甘油处理后的胶原纤维结构进行研究, 发现胶原纤维结构与分布没有发生明显的变化, 仅出现胶原直径的改变. 但该研究依赖于化学固定, 众所周知, 化学固定会引起显著的组织扭曲, 包括酶促反应导致的样品损伤和假象^[19]. 作为化学固定的替代方案, 高压冷冻技术(high-pressure freezing, HPF)主要是利用高压(2.1×10^8 Pa 以上)液氮对生物组织在 50 ms 内进行快速冷冻, 可将厚度为 200 μ m 的样品迅速凝结成玻璃态^[20]. 与常规化学固定制样法相比, 该技术具有显著的优势, 可最大限度的保持样品的自然状态和真实结构.

本研究以甘油光学清除处理的小鼠皮肤为研究对象, 采用 SHG 成像结合 HPF 制样技术, 观察光学清除对胶原纤维结构的影响. 光学清除后, 结合 SHG 无损光学成像和 HPF 的超微结构保留能力, 可为相关科学研究提供全新的技术视角.

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

试剂: 无水甘油(国药集团化学试剂有限公司)、试验中所有用水为双蒸水(试验室自制)、2.5% 戊二醛(25% 戊二醛稀释于 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液

配制, TED PELLA 公司)、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司)、醋酸双氧铀(质量分数 4%, 纯水配制, TED PELLA 公司)、钨酸(质量分数 1%, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液配制, TED PELLA 公司)、柠檬酸铅(质量分数 1%, 纯水配制, TED PELLA 公司)、Epon 812 树脂套装(EMS 公司).

试验动物: C57 小鼠来自浙江大学实验动物中心, 通过在腹腔注射戊巴比妥钠(1%, 45 mg/kg)对小鼠进行麻醉. 试验前先剪掉毛发, 用脱毛膏去除剩余绒毛. 麻醉期间小鼠的体温调节机能受到抑制, 试验过程中, 通过使用 37 $^{\circ}$ C 恒温加热垫对小鼠进行保温, 防止体温下降.

仪器: 双光子显微镜(FVMPE-RS, Olympus 公司)、高压冷冻仪(EM ICE, Leica 公司)、冷冻替代仪(EM AFS2, Leica 公司)、超薄切片仪(UC7, Leica 公司)、透射电子显微镜(Tecna G2 Spirit 120 kV, Thermo Fisher Scientific 公司)、1 mL 注射器(海门区洁特实验器材经营部).

1.2 试验方法

1.2.1 甘油光学清除

随机选取小鼠腹部或背部皮肤, 在体试验采用注射器皮下注射 50% 甘油水溶液(体积比)处理一段时间. 离体试验采集皮肤组织后并浸入甘油水溶液中进行浸泡. 光学清除处理后的皮肤组织采用双光子显微镜采集 SHG 信号.

1.2.2 SHG 信号采集

双光子显微镜 Olympus FVMPE-RS, 配备有 Mai Tai™ eHP DeepSee 系列钛蓝宝石飞秒激光器, 物镜 25 x/1.05(XLPLN25XWMP), 工作距离 2 mm. 成像波长 900 nm, 激光功率 10%, 带通滤光片(BA 410~460 nm)检测信号.

1.2.3 常规化学固定样品制备

将光学清除处理后的皮肤组织裁剪为 1 mm³ 的小块, 依次进行如下处理: 2.5% 戊二醛室温固定 1 h, 随后转移至 4 $^{\circ}$ C 过夜; 0.1 mol/L PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min; 1% 钨酸溶液固定 1.5 h; ddH₂O 漂洗 3 次, 每次 10 min; 2% 醋酸铀染色 30 min; 梯度乙醇脱水处理(质量分数分别为 50%、70%、90% 乙醇各 15 min, 100% 乙醇 20 min); 100% 丙酮处理 2 次, 每次 20 min; 包埋剂丙酮混合液(体积比 1:1)处理 2 h; 包埋剂丙酮混合液(体积比 3:1)渗透过夜; 次日加入纯包埋剂渗透、聚合, 对

聚合完成的树脂包埋块进行超薄切片.

1.2.4 HPF 样品制备

将组织浸入冷冻保护剂(1-Hexadecen)中,小心地装入 HPF 样品盘 A 中,同时将样品盘 B 盖子浸入冷冻保护剂中,并覆盖在样品盘 A 的顶部.最后推入高压冷冻仪进行高压冷冻处理.

将保存在液氮中已固定的样品转移至冷冻替代仪中进行冷冻替代,随后将样品载体浸入含 1% 的醋酸丙酮溶液中.具体操作流程如表 1 所列:

表 1 冷冻替代程序
Table 1 Freezing substitution program

步骤	起始温度/℃	终点温度/℃	持续时间/h
1	-108	-108	1
2	-108	-90	2
3	-90	-90	60
4	-90	-60	15
5	-60	-60	24
6	-60	-30	15
7	-30	-30	15
8	-30	-0	3

4℃下用丙酮洗涤 3 次,每次 30 min;室温下用丙酮洗涤 2 次,每次 30 min.树脂丙酮溶液梯度渗透,丙酮/Epon 812 树脂混合液渗透 8 h(体积比 7:3),丙酮/Epon 812 树脂混合液(体积比 3:7)渗透 12 h,纯 Epon 812 树脂渗透 2 次,每次 12 h.将 Epon 812 树脂块在 60℃烘箱中聚合 2 天,随后对聚合完成的树脂块进行超薄切片.

1.2.5 超薄切片

使用超薄切片机(Leica UC7)对已聚合的树脂块进行修整,去除样品四周多余的树脂以暴露样品,然后切取厚度为 70 nm 的超薄切片.切片使用醋酸双氧铀和柠檬酸铅分别染色 30 min 和 5 min,染色后水洗晾干进行 TEM 观察.

1.2.6 TEM 数据采集

染色后晾干的切片置于 TEM(Tecnai G2 Spirit 120 kV)中进行成像,成像加速电压为 120 kV,放大 30 000 倍,通过 CCD 相机进行观察和拍照.

2 结果与讨论

2.1 甘油溶液光学清除效果

为了验证甘油溶液的光学清除效果,分别用水

和 50% 甘油溶液对同一皮肤区域孵育处理 30 min.随后使用双光子显微进行 Z 轴扫描(Z-stack),采集 SHG 信号.利用 Image J 软件对 SHG 图像进行处理,生成最大亮度投影图[图 1(a)~(b)],并测定胶原纤维的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI),以比较甘油处理前后 SHG 信号的差异.随机选取小鼠皮肤的多个位点($n=3$)进行成像,并测量其成像深度,以评估甘油光学清除处理对组织成像深度的影响.数据以均值±标准误差(Mean±SE)表示,采用 Origin 软件进行统计分析并绘制图表,结果如图 1(c)所示.

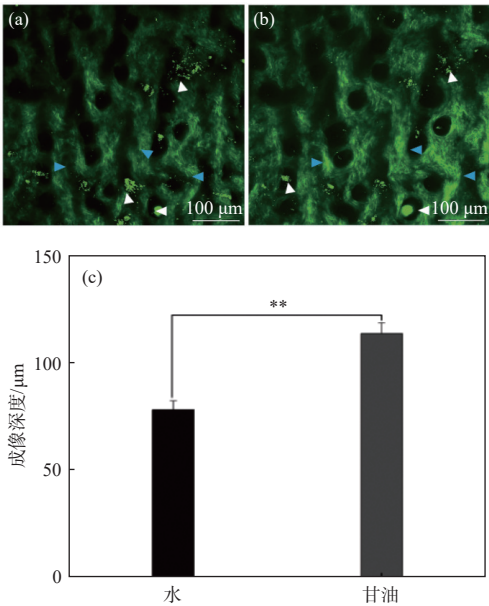


图 1 甘油光学清除效果
(a) 水孵育, (b) 甘油孵育, (c) 平均成像深度对比
Fig. 1 Optical clearing effect of glycerol
(a) water incubation, (b) glycerol incubation, (c) comparison of average imaging depth

由 SHG 信号图[图 1(a)~(b)]可见自发荧光信号(白色三角所示)和胶原纤维的 SHG 信号(蓝色三角).通过对比发现,将水替换为甘油溶液后,胶原纤维的 SHG 信号亮度显著增强. Image J 测定结果显示,水孵育组的 MFI 为 993,而甘油孵育组的 MFI 为 1 202. SHG 信号亮度的增强和 MFI 的增大说明甘油孵育能有效提高胶原纤维 SHG 的信号强度.通过对水和甘油溶液孵育后的胶原纤维成像深度进行统计,结果如图 1(c)所示,甘油孵育后胶原纤维的成像深度显著优于水孵育,较水孵育提升了 45.5%,且两者间存在显著性差异(** $p<0.01$). SHG

信号强度的增强及成像深度的提升均证实甘油溶液是一种有效的光学清除试剂. 这主要是因为甘油溶液通过折射率匹配, 能有效减少组织散射, 从而提高光在组织中的穿透深度^[21].

2.2 光学清除胶原纤维结构观察

2.2.1 光学显微镜观察

利用胶原纤维的 SHG 信号, 观察皮肤组织在甘油溶液光学透明化过程中宏观结构的变化. 在 0、10、30、60 min 的甘油溶液孵育时间点, 分别采集皮肤胶原纤维的 SHG 信号(图 2). 通过 Image J 软件测量胶原纤维的 MFI, 比较不同孵育时间下 MFI 的

变化, 数据以 Mean ± SE表示, 结果如表 2 所列. 根据图 2 SHG 信号分析结果可知, 当甘油孵育时间在 30 min 内时, 样品的荧光强度保持相对稳定. 当孵育时间延长至 60 min 时, 荧光强度呈现下降趋势. 结合表 2 的统计数据表明, 在初始阶段(孵育时间小于 30 min), SHG 信号强度随孵育时间的延长而略有增强, 但当孵育时间达到 60 min 时, 信号强度出现衰减. 这一变化可能与甘油在组织中的渗透动力学有关, 过长的孵育时间可能会导致组织内甘油浓度因扩散作用而被稀释, 进而引起局部折射率降低, 最终导致 SHG 信号下降.

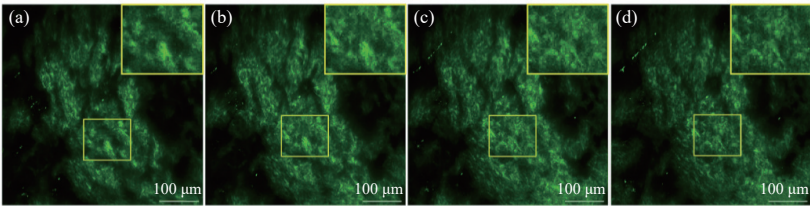


图 2 不同甘油孵育时间下胶原纤维的 SHG 信号
(a) 0 min, (b) 10 min, (c) 30 min, (d) 60 min

Fig. 2 SHG signals of collagen fibers with different glycerol incubation times

表 2 不同甘油孵育时间下的 MFI
Table 2 MFI with different glycerol incubation times

孵育时间/min	MFI (Mean ± SE)
0	94.13 ± 9.61
10	104.10 ± 7.18
30	108.00 ± 5.56
60	90.12 ± 4.21

此外, 如图 2 黄色框标注区域及其放大图像所示, 随着甘油孵育时间的延长, SHG 信号的分布发生变化. 在初始阶段(0 min 和 10 min), 信号呈现局部聚集特征, 但随着孵育时间的延长(30 min 和 60 min), 信号逐渐转变为均匀弥散分布. 这一变化表明, SHG 信号的散射特性发生改变, 可能是甘油渗透影响组织的微观结构, 需要对组织的超微结构进行研究.

2.2.2 电子显微镜观察

胶原纤维的直径范围通常为 20 ~ 200 nm, 超出光学显微镜的分辨极限(~200 nm), 因此需要借助 TEM 对其超微结构进行高分辨率表征. 本研究采用两种制样方法, 分别为常规化学固定法和 HPF 固定

法, 比较不同制样方法对胶原纤维超微结构的影响, 如图 3 所示.

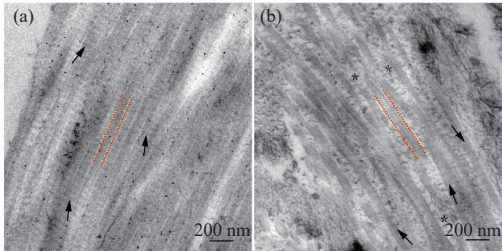


图 3 不同制样方法对胶原纤维结构的影响
(a) 常规化学固定制样, (b) 高压冷冻制样

Fig. 3 Effect of different sample preparation methods on structure of collagen fibers

(a) conventional chemical fixation, (b) high-pressure freezing

TEM 图像可观察到组成胶原纤维的胶原原纤维结构, 如图 3 红色虚线标示. 在两种不同的制样方法下, 胶原原纤维均保持线性排列模式, 并呈现典型的明暗相间的周期性横纹结构(黑色箭头标示). 这一结果表明, 两种制样方法均能保留胶原原纤维的基本超微结构.

常规化学固定法制备的样品, 胶原原纤维排列非常紧密, 在有纤维的区域, 纤维间间隙几乎完全

消失[图 3(a)]. 相比之下, HPF 有效保留了胶原原纤维间的天然间隙结构, 间隙中可见电子密度较高的着色物质[图 3(b), *标示], 推测为保留完好的蛋白聚糖等基质成分^[22]. 这一结果证实了 HPF 技术能够更真实地维持胶原纤维-基质复合体超微结构, 显著减少常规化学固定导致的蛋白质交联人工假象及脂质/糖胺聚糖抽提的效应.

基于不同制样方法的结果, 考虑到 HPF 对胶原纤维结构的保留能力, 本研究进一步将组织分为在体-水孵育、在体-甘油孵育、离体-水孵育和离体-甘油孵育 4 组, 通过 HPF 方法进行制样, 观察组织胶原纤维结构的变化情况, 结果如图 4 所示.

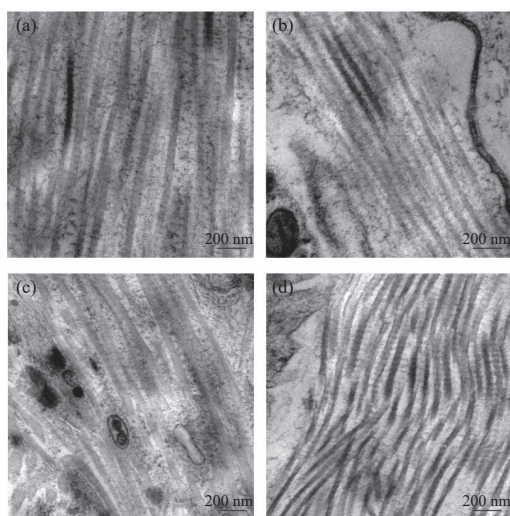


图 4 不同处理方法对胶原纤维结构的影响

(a) 在体-水孵育, (b) 在体-甘油孵育, (c) 离体-水孵育, (d) 离体-甘油孵育

Fig. 4 Effects of different treatment methods on structure of collagen fibers

(a) in vivo water incubation, (b) in vivo glycerol incubation, (c) in vitro water incubation, (d) in vitro glycerol incubation

如图 4 所示, 经不同方法处理后, 胶原原纤维仍保留线性排列的纤维状结构, 且所有组别均呈现典型的胶原纤维横纹. 这一结果表明, 光学清除处理并未破坏胶原纤维的基本超微结构. 但是甘油孵育组的横纹对比度更高, 这可能与甘油的脱水效应增强电子密度差异有关.

通过 Image J 软件对图像进行定量分析(图 5), 结果显示所有经甘油处理的胶原原纤维直径均显著减小($***p < 0.001$), 这一结果与甘油溶液的脱水效应相符, 且离体处理组的直径减小幅度(降低约

26.3%)明显大于在体组(降低约 19.0%), 这可能是因为离体条件下组织块与过量甘油溶液直接接触导致持续脱水. 而在体试验下组织液对甘油的稀释作用减缓了脱水进程.

由图 4 和图 5 结果可知, 经甘油处理后的胶原纤维直径会有所下降, 但纤维超微结构的排列周期未发生明显变化, 这证实光学清除过程不会引起组织超微结构的改变.

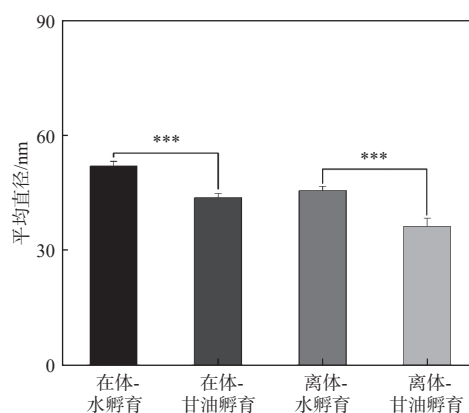


图 5 胶原纤维直径对比图

Fig. 5 Diameter distribution of collagen fibers

3 结论

本研究采用 SHG 成像技术结合 HPF 制样, 证实光学清除处理在提高光学成像深度的同时, 能有效保留胶原纤维的超微结构. 尽管光学清除处理后纤维直径略有减小, 但折射率匹配与脱水作用并未导致其超微结构改变. SHG 无损光学成像与 HPF 的超微结构保留能力的结合, 可为纤维化疾病、肿瘤侵袭及再生医学等研究提供重要的技术支撑.

参考文献:

- [1] Zhu D, Zhang J, Cui H, et al. Short-term and long-term effects of optical clearing agents on blood vessels in chick chorioallantoic membrane[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(2): 021106.
- [2] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [3] Wokosin D L, Centonze V E, Crittenden S, et al. Three-photon excitation fluorescence imaging of biological specimens using an all-solid-state laser[J]. *Bioimaging*, 1996, 4(3): 208-214.

- [4] Lai J H, Liao E Y, Liao Y H, et al. Investigating the optical clearing effects of 50% glycerol in *ex vivo* human skin by harmonic generation microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 329.
- [5] Tuchin V V. Light propagation in tissues with controlled optical properties[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 1997, 2(4): 401-417.
- [6] Adan F, Oyen E M M, Holtackers R J, et al. Topical application of glycerol increases penetration depth of optical coherence tomography in diagnosis of basal cell carcinoma[J]. *Acta Dermato-Venereologica*, 2021, 101(6): adv00474.
- [7] Genina E A, Bashkatov A N, Korobko A A, et al. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(2): 021102.
- [8] Meglinski I V, Bashkatov A N, Genina E A, et al. The enhancement of confocal images of tissues at bulk optical immersion[J]. *Laser Physics*, 2003, 13(1): 65-69.
- [9] Vargas G, Readinger A, Dozier S S, et al. Morphological changes in blood vessels produced by hyperosmotic agents and measured by optical coherence tomography[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, 77(5): 541-549.
- [10] Bashkatov A N, Korolevich A N, Stolnitz M M, et al. Optical clearing of skin tissue produced by application of glucose solution: *in vivo* study[C]// Saratov Fall Meeting 2005: Optical Technologies in Biophysics and Medicine VII: Proc. SPIE 6163. 2006: 27-30.
- [11] Tuchin V V, Bashkatov A N, Genina É A, et al. *In vivo* investigation of the immersion-liquid-induced human skin clearing dynamics[J]. *Technical Physics Letters*, 2001, 27(6): 489-490.
- [12] Liu Y Y, Yang X Q, Zhu D, et al. Optical clearing agents improve photoacoustic imaging in the optical diffusive regime[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(20): 4236-4239.
- [13] Wen X, Jacques S L, Tuchin V V, et al. Enhanced optical clearing of skin *in vivo* and optical coherence tomography in-depth imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(6): 066022.
- [14] Berezin K V, Dvoretzki K N, Chernavina M L, et al. Molecular modeling of immersion optical clearing of biological tissues[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2018, 24(2): 45.
- [15] Zou Y, Wei H J, Yang H Q, et al. Effect of pulsed ultrasonic intensities on glycerol permeability and light penetration depth in human skin *in vivo*[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(10): 1017001.
- [16] Deng Z J, Liu C H, Tao W, et al. Improvement of skin optical clearing efficacy by topical treatment of glycerol at different temperatures[C]// The 9th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (PIBM 2010): Volume 277. Journal of Physics: Conference Series, 2011: 012007.
- [17] 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.
- [18] 闻翔. 皮肤光透明的物理机制与生理机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2012. [WEN Xiang. Physical and physiological mechanisms of skin optical clearing[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012.]
- [19] Kellenberger E, Johansen R, Maeder M, et al. Artefacts and morphological changes during chemical fixation[J]. *Journal of Microscopy*, 1992, 168(2): 181-201.
- [20] Guo J S, Wang G, Tang W, et al. An optimized approach using cryofixation for high-resolution 3D analysis by FIB-SEM[J]. *Journal of Structural Biology*, 2020, 212(1): 107600.
- [21] OLIVEIRA L. The effect of optical clearing in the optical properties of skeletal muscle tissue[D]. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2014.
- [22] Keene D R, Tufa S F. Connective tissue ultrastructure: a direct comparison between conventional specimen preparation and high-pressure freezing/freeze-substitution[J]. *Anatomical Record*, 2020, 303(6): 1514-1526.