



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104568553 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410841350. 0

(22) 申请日 2014. 12. 30

(71) 申请人 深圳先进技术研究院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大学
城学苑大道 1068 号

(72) 发明人 郑炜 张洋

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限
公司 11127

代理人 韩蕾

(51) Int. Cl.

G01N 1/30(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

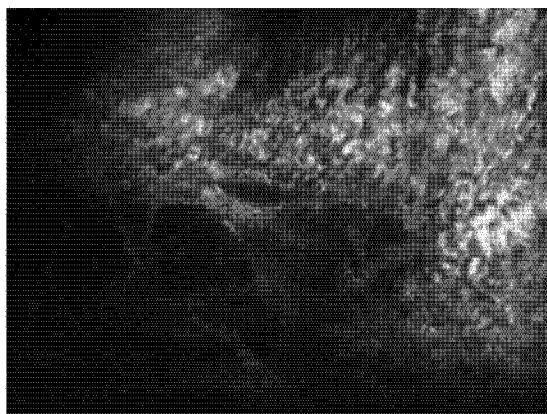
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种组织光透明剂及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种组织光透明剂及其应用,所述组织光透明剂,以其总重量为 100% 计,其包括 30 ~ 70wt% 的果糖、2 ~ 10wt% 的聚乙二醇单辛基苯基醚、5 ~ 25wt% 的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺及余量的水。本发明所述的组织光透明剂不对组织中的胶原蛋白的空间结构产生破坏,能够获得组织的胶原蛋白的二次谐波信号图或荧光信号图,并且所述的组织光透明剂能使成像深度得到极大的提高。



1. 一种组织光透明剂,以其总重量为 100%计,其包括 30 ~ 70wt%的果糖、2 ~ 10wt%的聚乙二醇单辛基苯基醚、5 ~ 25wt%的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺及余量的水。
2. 根据权利要求 1 所述的组织光透明剂,其中,以其总重量为 100%计,其包括 40 ~ 70wt%的果糖、2 ~ 5wt%的聚乙二醇单辛基苯基醚、5 ~ 10wt%的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺及余量的水。
3. 根据权利要求 1 所述的组织光透明剂,以其总重量为 100%计,其为 50wt%的果糖、5wt%的聚乙二醇单辛基苯基醚、10wt%的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺以及余量的水 ;或其为 30wt%的果糖、10wt%的聚乙二醇单辛基苯基醚、25wt%的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺以及余量的水 ;或其为 70wt%的果糖、2wt%的聚乙二醇单辛基苯基醚、5wt%的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺以及余量的水。
4. 权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的组织光透明剂在使组织透明中的应用。
5. 根据权利要求 4 所述的应用,其中使组织透明是为获得该组织的二次谐波信号图和 / 或荧光信号图。
6. 根据权利要求 5 所述的应用,其中,所述的使组织透明是使眼球透明。
7. 根据权利要求 5 所述的应用,其中,所述的使组织透明是使皮肤透明。
8. 一种使组织透明的方法,该方法包括 :
将生物组织浸泡在权利要求 1 ~ 3 中所述组织光透明剂中室温下进行处理,使组织透明。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述组织在组织光透明剂中的处理时间为 10 ~ 30 分钟。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,其中,所述组织为皮肤、大脑、眼球或肌肉。

一种组织光透明剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种组织光透明剂及其应用,具体而言涉及一种能维持组织胶原蛋白空间结构的组织光透明剂及其应用,属于生物光学领域。

背景技术

[0002] 随着现代光学成像技术的发展和各种标记技术的出现,高分辨获取生物组织结构功能信息成为可能,但生物组织的高散射特性严重制约了光学成像技术在生物医学领域中的应用。多光子显微成像技术通过采用近红外光激发生色团,获取荧光或谐波信号,提高成像的深度,但对于散射较大的生物组织,其穿透深度依然十分有限。

[0003] 近年来兴起的生物组织光透明技术,通过向生物组织中引入高渗、高折射的化学试剂能够有效降低生物组织的散射,极大地提高成像的深度。现有技术中采用的最新经典方法包括:(1)、基于四氢呋喃的梯度脱水的方法,其是将生物组织分别浸泡在梯度的四氢呋喃溶液里(如50%、70%、80%、100%的四氢呋喃的水溶液)1小时,然后分别浸泡在二氯甲烷和二苯醚里(分别为45分钟和大于1小时),使组织变得透明;(2)、使用尿素溶液的方法,其是将生物组织浸泡在8M的尿素溶液中一个月左右,使组织变得透明;(3)、基于水和凝胶单体结合组织电泳的方法,其是将生物组织先用水和凝胶单体固定1-3天,然后将生物组织放在十二烷基硫酸钠中电泳5-8天,使组织变得透明。

[0004] 此外,US6472216 B1公开了一种光透明剂,其选自如下物质组成的组:二甲基亚砷、泛影酸、乙二胺四乙酸、葡糖胺、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐、泛影酸钠、聚乙二醇及其组合。CN 102749231 A公开了一种骨组织光透明剂,其包括二甲基亚砷、碳酸氢钠,以及下述物质中的至少两种:聚乙二醇-400、水杨酸甲酯、乙二胺四乙酸、二醋碘苯酸钠、甘油、葡萄糖、十二烷基苯磺酸钠、山梨醇和月桂醇,该光透明剂作用于骨组织之后,能使其变得对光透明,并能提高成像深度。CN 103263678 A公开了一种足垫皮肤组织光透明剂,其包含果糖、乙醇、水,以及下述物质中的至少三种:聚乙二醇-400、山梨醇、葡萄糖、丙二醇、甘油、十二烷基苯磺酸钠、二甲基亚砷、噻酮、氮酮、薄荷油和凡士林,该方案的光透明剂作用于足垫皮肤组织之后,能使组织变得对光透明,能提高成像深度。W02013191274 A1中公开了使用果糖溶液能使胚胎、前脑透明化。

[0005] 尽管现有技术提供了多种组织光透明剂,但目前这些技术主要基于胶原解离的基本原理,会导致胶原蛋白的空间结构被破坏,内源信号减弱甚至消失,极大影响了胶原蛋白光学二次谐波成像的效果。此外,现有技术所公开的光透明剂及其应用方法耗时长;光透明剂的组合物比较复杂。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的在于开发一种组织光透明剂,其不仅能在短时间内有效降低生物组织散射,使组织透明,还能最大限度的维持胶原蛋白的空间结构,从而使内源性光学强度不受影响;此外,该组合物还能使成像深度得到极大提高。

[0007] 本发明的另一目的,在于提供所述组织光透明剂的应用。

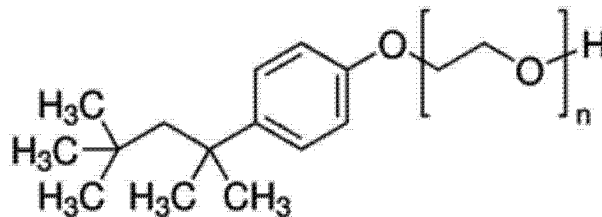
[0008] 为实现本发明目的,一方面,本发明提供一种组织光透明剂,以其总重量为 100% 计,其包括 30 ~ 70wt% 的果糖、2 ~ 10wt% 的聚乙二醇单辛基苯基醚、5 ~ 25wt% 的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺及余量的水。

[0009] 根据本发明的具体实施方式,本发明所述的组织光透明剂中各组分的含量可根据不同生物组织的来源、年龄、体重而变化,可选地,在本发明所述的组织光透明剂中,以其总重量为 100% 计,其包括 40 ~ 70wt% 的果糖、2 ~ 5wt% 的聚乙二醇单辛基苯基醚、5 ~ 10wt% 的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺及余量的水。

[0010] 根据本发明的具体实施方式,本发明所述的组织光透明剂中,以其总重量为 100% 计,其为 50wt% 的果糖、5wt% 的聚乙二醇单辛基苯基醚、10wt% 的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺以及余量的水;或其为 30wt% 的果糖、10wt% 的聚乙二醇单辛基苯基醚、25wt% 的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺以及余量的水;或其为 70wt% 的果糖、2wt% 的聚乙二醇单辛基苯基醚、5wt% 的 N, N, N', N' - 四 (2- 羟基丙基) 乙二胺以及余量的水。

[0011] 本发明中所述的聚乙二醇单辛基苯基醚 (octylphenylpolyethylene glycol), 其通用名为曲拉通 X-100 (triton X-100) 为商购产品,可通过 J&K、Alfa 或 Sigma-Aldrich 等试剂公司购买得到,其具有如下结构式:

[0012]



[0013] 其中, n 为 9 ~ 10。

[0014] 本发明中的曲拉通 X-100 通常为化学纯试剂,也可直接购买使用其水溶液产品,将其中水溶液中水的用量计入本发明组合物中即可。

[0015] 本发明所述的组织光透明剂通过将其中的各组分简单的混合后水浴锅加热至 40 ~ 60°C 溶解 2 ~ 3 小时,直至溶液变得澄清透亮即可。

[0016] 本发明所述的组织光透明剂能使组织透明化,能使组织内部折射率均一化,降低组织散射,使组织变得透明,为获得组织的生物学信息提供一种新的方法。因此,本发明所述的组织光透明剂能够替代现有技术中的光透明剂应用于组织成像技术中。本发明的组织光透明剂具有使组织透明耗时时间短,操作简便,在大约 10 ~ 30min 内即可使组织透明化的特点,较使用梯度四氢呋喃溶液、尿素溶液等方法,时间大大缩短;另外,本发明的组织光透明剂的成分简单,仅仅是三种成分的水溶液。

[0017] 因此,另一方面,本发明提供了所述的组织光透明剂在使组织透明中的应用。

[0018] 根据本发明的具体实施方式,在本发明所述的应用中,其中使组织透明是为获得该组织的二次谐波信号图和 / 或荧光信号。主要是该组织中的胶原蛋白的二次谐波信号图或荧光信号。

[0019] 本发明之所以能够组织中的二次谐波图,主要是因为本发明所述的组织光透明剂不会对组织的胶原蛋白的空间结构产生破坏,例如真皮中的胶原蛋白、眼球中的小梁网、动

脉血管壁外层膜中的胶原蛋白等。本发明的组织光透明剂中的各组分共同作用才会产生不破坏胶原蛋白空间结构的效果,其对生物组织中胶原蛋白的破坏非常小,几乎可以忽略,生物组织的内源性光学信号较强,成像质量较好。本发明证实单用果糖溶液同样会使组织中的胶原蛋白解离。

[0020] 根据本发明的具体实施方式,在本发明所述的应用中,其中,所述的使组织透明是使眼球透明。眼球中测定的二次谐波信号图主要是眼球中的小梁网的二次谐波信号图。现有技术很难获得眼球小梁网的二次谐波图,一方面主要是由于现有技术中的光透明剂会对其产生破坏,另一方面,在于小梁网的上方的角膜和巩膜散射很大且小梁网深度相对较深(深度通常在 $150 \sim 200 \mu\text{m}$ 左右)。本发明所述的组织光透明剂可以在解决角膜和巩膜高散射的同时,保持胶原纤维的完整性,成像深度可达到 $150 \mu\text{m}$ 以上,在本发明的一具体实施例中,本发明获得了眼球在 $170 \mu\text{m}$ 深度的二次谐波图,表明本发明的组织光透明剂极大加深了成像深度。

[0021] 根据本发明的具体实施方式,在本发明所述的应用中,其中,所述的使组织透明是使皮肤透明。在本发明的一具体实施方式中,本发明测定了皮肤的二次谐波信号图以及皮肤下血管的荧光信号图,皮肤下的血管一般位于皮肤下 $420 \mu\text{m}$ 左右,进一步表明本发明的组织光透明剂极大加深了成像深度。

[0022] 另一方面,本发明还提供了一种使组织透明的方法,该方法包括:将生物组织浸泡在所述组织光透明剂中室温下进行处理,使组织透明。其中,所述的室温是指 $0 \sim 40^\circ\text{C}$ 。在本发明的具体实施方式中,可将生物样本在4%的多聚甲醛里固定后,用PBS冲洗,然后将固定好的生物样品浸泡在质量分数为30%果糖、10%曲拉通、25%四乙二胺配置成水溶液或质量分数为70%果糖、2%曲拉通、5%四乙二胺配置成水溶液中,即可使组织变得透明。

[0023] 本发明的方法中,所述组织在组织光透明剂中的处理时间为 $10 \sim 30$ 分钟,相比于现有技术,可大大缩短使皮肤、大脑、眼球、肌肉等富含胶原纤维的生物组织透明的时间。

[0024] 综上所述,相较于现有技术中的光透明剂,本发明所述的光透明剂具有如下有益的技术效果:

[0025] (1)、本发明所述的组织光透明剂在使组织透明时,能最大限度的维持胶原蛋白的空间结构,从而使内源性光学强度不受影响,使组织的光学二次谐波信号或荧光信号不减弱。对内源性光学信号成像获取深层组织结构功能信息有重大的意义。

[0026] (2)、本发明所述的组织光透明剂使成像深度得到了极大的提高。

[0027] (3)、使用本发明所述的组合物使组织透明的时间大大缩短,操作简便。

附图说明

[0028] 图 1A 为实施例 1 得到的皮肤的二次谐波信号图;

[0029] 图 1B 为实施例 1 得到的皮肤下的血管荧光信号图;

[0030] 图 1C 为对比例 1 得到的皮肤的二次谐波信号图;

[0031] 图 2 为实施例 2 眼球采用光透明剂处理前后的对比图;

[0032] 图 3 为实施例 2 眼球在 $0, 30, 60, 90, 120, 150 \mu\text{m}$ 深度处的二次谐波信号图;

[0033] 图 4 为实施例 3 眼球在 $170 \mu\text{m}$ 深度处的二次谐波信号图。

具体实施方式

[0034] 为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解,现结合具体实例及附图对本发明的技术方案进行以下详细说明,应理解这些实例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0035] 实施例 1

[0036] SD 大鼠 (200g) 腹腔注射 1% 的戊巴比妥 2ml 后颈椎脱臼处死,用脱毛膏将大鼠的毛发清除,用生理盐水清洗大鼠的皮肤后用剪刀取下背部的皮肤,用手术刀将皮下脂肪清除干净。用磷酸缓冲液将大鼠皮肤清洗干净后浸泡于质量分数分别为 30% 的果糖、10% 的聚乙二醇单辛基苯基醚 (Sigma-Aldrich 试剂, $n = 9 \sim 10$) 以及 25% N, N, N', N' - 四 (2-羟基丙基) 乙二胺组成的光透明剂水溶液中, 15-20 分钟后皮肤变得透明。将透明好的皮肤展平,用双光子荧光显微镜获取皮肤深度约在 $120 \mu\text{m}$ 处的二次谐波信号图 (其中激发波长为 900nm, 接收波长为 360 ~ 540nm), 得到图 1A。用双光子荧光显微镜获取皮肤血管的荧光信号图 (其中激发波长为 780nm, 接收波长为 360 ~ 540nm), 得到图 1B。如图 1A 所示,可以看出真皮的胶原纤维一根根清晰可见,胶原蛋白完全没有溶解。从图 1B 中可以看出透明后透过皮肤可以看到皮下血管的荧光信号,该深度在 $420 \mu\text{m}$ 左右,远超双光子显微镜在正常皮肤的穿透深度。

[0037] 对比例 1

[0038] SD 大鼠 (200g) 腹腔注射 1% 的戊巴比妥 2ml 后颈椎脱臼处死,用脱毛膏将大鼠的毛发清除,用生理盐水清洗大鼠的皮肤后用剪刀取下背部的皮肤,用手术刀将皮下脂肪清除干净。用磷酸缓冲液将大鼠皮肤清洗干净后浸泡于质量分数为 75% 的果糖溶液中,8 小时皮肤变得透明。用双光子荧光显微镜获取皮肤深度约在 $120 \mu\text{m}$ 处的 (其中激发波长为 900nm, 接收波长为 360 ~ 540nm), 得到图 1C, 如图 1C 所示可以看出胶原纤维信号已经不可见,胶原蛋白完全溶解了。

[0039] 实施例 2

[0040] SD 大鼠 (200g) 腹腔注射 1% 的戊巴比妥 2ml 后颈椎脱臼处死,用镊子与剪刀小心的将眼球完整取出,用磷酸缓冲液清洗眼球上残留的血液后,放置于 4% 的多聚甲醛固定 24h,取出后用磷酸缓冲液冲洗。将准备好的眼球浸泡在质量分数分别为 70% 的果糖、2% 的聚乙二醇单辛基苯基醚 (Sigma-Aldrich 试剂, $n = 9 \sim 10$) 以及 5% N, N, N', N' - 四 (2-羟基丙基) 乙二胺组成的光透明剂水溶液中, 15 ~ 20 分钟后眼球变得透明,如图 2 所示,其中图 2 中左图为处理前的眼球,右图为处理后的透明眼球。用双光子荧光显微镜获取眼球在不同深度处的二次谐波信号图 (其中激发波长为 900nm, 接收波长为 360 ~ 540nm), 如图 3 所示,其中,图 3 为 0、30、60、90、120 及 $150 \mu\text{m}$ 深度的二次谐波信号图,从图 3 中可以看出二次谐波信号清晰可见。

[0041] 实施例 3

[0042] SD 大鼠 (200g) 腹腔注射 1% 的戊巴比妥 2ml 后颈椎脱臼处死,用镊子与剪刀小心的将眼球完整取出,用磷酸缓冲液清洗眼球上残留的血液后,放置于 4% 的多聚甲醛固定 24h,取出后用磷酸缓冲液冲洗。将准备好的眼球浸泡在质量分数分别为 50% 的果糖、5% 的聚乙二醇单辛基苯基醚 (Sigma-Aldrich 试剂, $n = 9 \sim 10$) 以及 10% N, N, N', N' - 四 (2-羟基丙基) 乙二胺组成的光透明剂水溶液中, 15 ~ 20 分钟后眼球变得透明,用双光子

荧光显微镜获取眼球在 170 μm 深度处的二次谐波信号图（其中激发波长为 900nm, 接收波长为 360 ~ 540nm), 得到图 4。从图 4 中可以看出眼球在 170 μm 处的二次谐波信号清晰可见。将采用上述方法得到的不同深度的图像叠加即可得到小梁网的三维信息, 为小梁网的重新构建提供了良好的依据。

[0043] 综上所述, 可以看出本发明组织光透明剂能够使组织透明时, 能最大限度的维持胶原蛋白的空间结构, 使内源性光学强度不受影响, 使胶原蛋白的光学二次谐波信号不减弱。成像深度也得到了极大的提高。

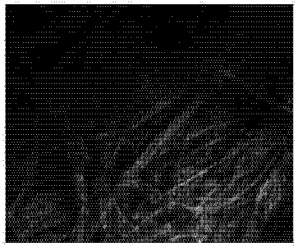


图 1A

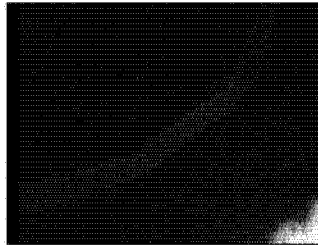


图 1B

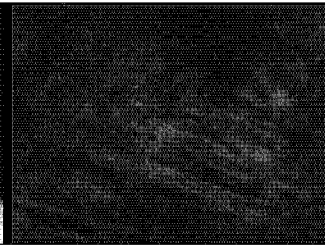


图 1C

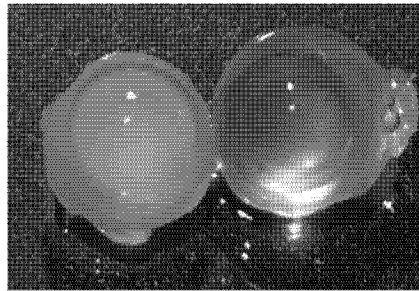


图 2

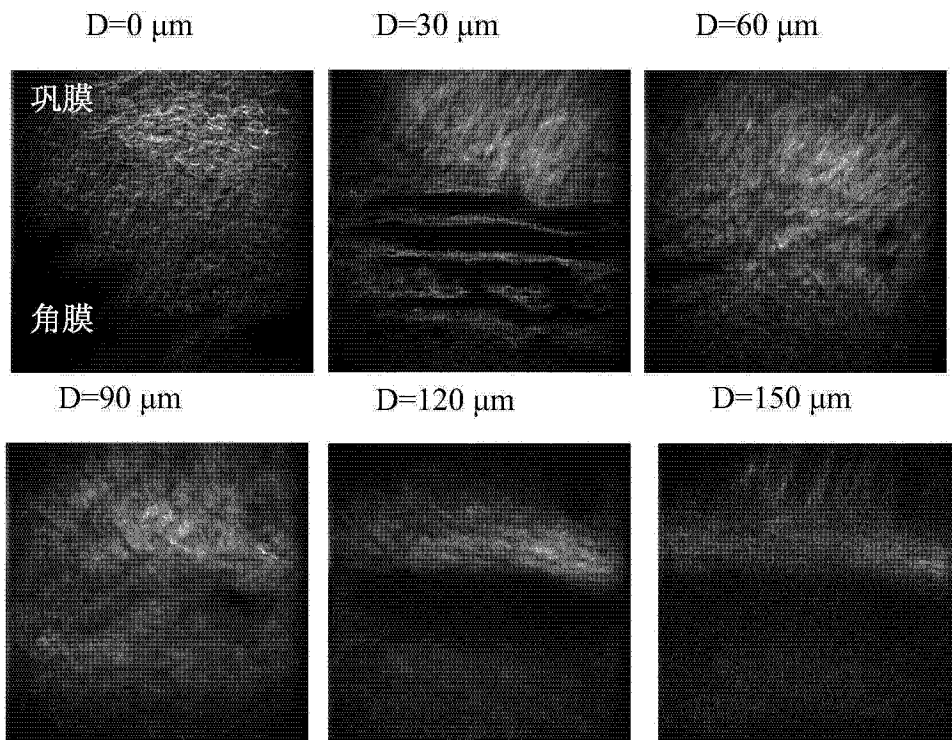


图 3

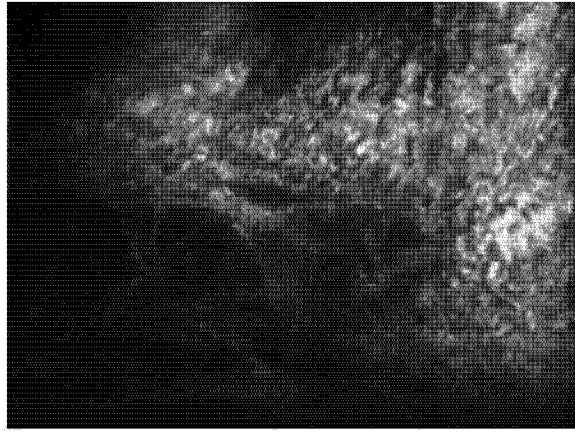


图 4