



(21)申请号 201710087701.7

(22)申请日 2017.02.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106975083 A

(43)申请公布日 2017.07.25

(73)专利权人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路  
1037号

(72)发明人 张超 朱葑

(74)专利代理机构 北京众达德权知识产权代理  
有限公司 11570

代理人 刘杰

(51)Int.Cl.

A61K 49/00(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 106390138 A,2017.02.15,

张洋.“颅骨光透明实现穿颅皮层血管与血流成像”.《华中科技大学博士学位论文》.2014,第1-119页.

Kazuki Tainaka等.“Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling”.《Annu. Rev. Cell Dev. Biol.》.2016,(第32期),第9.1-9.30页.

Bin Yang等.“Single-Cell Phenotyping within Transparent Intact Tissue through Whole-Body Clearing”.《Cell》.2014,(第158期),第945-958页.

审查员 鲁众阳

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种颅骨光透明试剂及可逆颅骨组织光透明方法

(57)摘要

本发明公开了一种颅骨光透明试剂及可逆颅骨组织光透明方法,属于生物成像技术领域。所述光透明试剂包括第一溶液和第二溶液;其中:所述第一溶液为质量浓度25%-30%的酰胺类有机化合物及其衍生物的醇溶液;所述第二溶液包括阴离子表面活性剂水溶液和水溶性促渗剂;其中,阴离子表面活性剂水溶液的质量浓度为15%-20%,水溶性促渗剂的用量为第二溶液总体积的5%-10%。通过先后在颅骨表面滴加第一溶液和第二溶液,即可实现颅骨组织的光透明化,可用于光学显微成像系统进行成像。本发明建立无损、非侵入的透明颅窗,实现了皮层微脉管系统的高分辨成像,操作简单,成像质量高,可多次重复成像。

1. 一种颅骨光透明试剂,其特征在于,包括第一溶液和第二溶液;其中:  
所述第一溶液为质量浓度25%-30%的酰胺类有机化合物及其衍生物的醇溶液;  
所述第二溶液包括阴离子表面活性剂水溶液和水溶性促渗剂;其中,所述阴离子表面活性剂水溶液的质量浓度为15%-20%,所述水溶性促渗剂的用量为所述第二溶液总体积的5%-10%;  
所述酰胺类有机化合物及其衍生物为碳酰胺或丙二酰脲;  
所述醇为乙醇;  
所述阴离子表面活性剂为十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠或十二烷基苯磺酸钠中的一种;  
所述水溶性促渗剂为二甲基亚砷或丙酮。
2. 如权利要求1所述的颅骨光透明试剂,其特征在于,所述乙醇的体积浓度为75%。

## 一种颅骨光透明试剂及可逆颅骨组织光透明方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物成像技术领域,特别涉及一种颅骨光透明试剂及可逆颅骨组织光透明方法。

### 背景技术

[0002] 皮层血管网络的观察与监测是研究大脑皮层微脉管结构与功能的重要途径。近年来,光学成像技术的发展以及各种标记技术的出现,使得活体水平下观测皮层脉管形态结构与血液动力学参数的变化成为可能。通过对皮层微脉管系统的实时、在体的观察与操纵,有望揭示皮层微脉管生长、发育以及微循环内稳态调节的生物学规律,解释相关脑疾病发生发展的过程以及发病机制,并有利于发展有效治疗方法。

[0003] 然而,皮层上方颅骨的混浊特性严重制约了光学成像技术在穿颅活体皮层血管、血流成像中的应用。目前研究者发展出多种颅窗技术用于实现高分辨的皮层微脉管成像,例如:开颅玻璃颅窗,磨薄颅窗,磨薄加固颅窗等,但是这些技术仍然存在诸多问题。例如开颅手术不可避免的会带来负面影响,极大地限制了在体水平下皮层微脉管系统结构与功能的研究;磨薄颅窗的成像次数有限,且成像质量会受到颅窗质量的影响;而磨薄加固颅窗的手术操作则极为困难。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种颅骨光透明试剂及可逆颅骨组织光透明方法,建立了无损、非侵入的透明颅窗,实现了皮层微脉管系统的高分辨成像,操作简单,成像质量高,可多次重复成像。

[0005] 一方面,为实现上述目的,本发明提供了一种颅骨光透明试剂,包括第一溶液和第二溶液;其中:

[0006] 所述第一溶液为质量浓度25%-30%的酰胺类有机化合物及其衍生物的醇溶液;

[0007] 所述第二溶液包括阴离子表面活性剂水溶液和水溶性促渗剂;其中,所述阴离子表面活性剂水溶液的质量浓度为15%-20%,所述水溶性促渗剂的用量为所述第二溶液总体积的5%-10%。

[0008] 所述酰胺类有机化合物及其衍生物为碳酰胺或丙二酰脲。

[0009] 所述醇为乙醇;所述乙醇的体积浓度为75%。

[0010] 所述阴离子表面活性剂为磺酸盐型阴离子表面活性剂或硫酸酯类阴离子表面活性剂,优选十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠或十二烷基苯磺酸钠中的一种。

[0011] 所述水溶性促渗剂为砒类或酮类物质,优选二甲基亚砒或丙酮中的一种或两种。

[0012] 另一方面,本发明还提供了一种可逆颅骨组织光透明方法,包括:

[0013] 在颅骨表皮上剪一开口,擦除颅骨表面粘膜并将颅骨表面吹干;

[0014] 将带孔固定片固定在经吹干的颅骨表面;

[0015] 向固定在颅骨表面的所述固定片的孔中滴加第一溶液,10-15min后将所述第一溶

液擦除；其中，所述第一溶液为质量浓度25%–30%的酰胺类有机化合物及其衍生物的醇溶液；

[0016] 向所述固定片的孔中滴加第二溶液，5–8min后即实现颅骨组织的光透明化，可用于光学显微成像系统进行成像；其中，所述第二溶液包括阴离子表面活性剂水溶液和水溶性促渗剂；所述阴离子表面活性剂水溶液的质量浓度为15%–20%，所述水溶性促渗剂的用量为所述第二溶液总体积的5%–10%。

[0017] 所述方法还包括：将所述第二溶液擦除，用生理盐水反复擦洗清理颅骨表面复性，使颅骨恢复原始浑浊状态。

[0018] 所述酰胺类有机化合物及其衍生物为碳酰胺或丙二酰脲。

[0019] 所述醇为乙醇；所述乙醇的体积浓度为75%。

[0020] 所述阴离子表面活性剂为磺酸盐型阴离子表面活性剂或硫酸酯类阴离子表面活性剂，优选十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠或十二烷基苯磺酸钠中的一种；所述水溶性促渗剂为砒类或酮类物质，优选二甲基亚砷或丙酮中的一种或两种。

[0021] 本发明实施例中提供的一个或多个技术方案，至少具有如下技术效果或优点：

[0022] 1、本发明实施例中提供的颅骨光透明试剂，该试剂作用于颅骨组织后，能在短时间内使得组织内部折射率均一化，降低组织散射，从而使得颅骨组织变得对光透明，提高成像深度，为获取皮层微血管结构、血流与血氧的分布信息等提供了新的方法。

[0023] 2、本发明实施例中提供的可逆颅骨组织光透明方法，通过引入化学试剂使组织内部折射率均一化，降低组织散射，使得颅骨组织变得对光透明，从而在短时间内建立一个无损、非侵入的透明颅窗以实现皮层微脉管系统的高分辨成像；该方法在十五分钟内即可使颅骨组织透明，且透明后用生理盐水可以将颅骨组织复性，恢复至原始的浑浊状态；该方法操作简单，透明程度高，成像质量高，生物相容性好，适用性强，可多次重复成像。

## 附图说明

[0024] 图1是本发明实施例提供的可逆颅骨组织光透明方法流程图；

[0025] 图2是本发明实施例1对两个月月龄小鼠实施活体颅骨组织光透明化效果图；其中，图2(a)为透明化前效果图，图2(b)为透明化后效果图；

[0026] 图3是本发明实施例2对八个月月龄小鼠实施活体颅骨组织光透明化效果图；其中，图3(a)为透明化前效果图，图3(b)为透明化后效果图；

[0027] 图4是本发明实施例3对两个月月龄小鼠一周内多次重复实施活体颅骨组织光透明化的结果图；

[0028] 图5是本发明实施例4对两个月月龄小鼠每月实施一次活体颅骨组织光透明化的结果图；

[0029] 图6是本发明实施例5对四个月月龄小鼠实施活体双侧颅顶骨组织光透明化效果图；其中，图6(a)为透明化前效果图，图6(b)为透明化后效果图。

## 具体实施方式

[0030] 本发明实施例提供一种颅骨光透明试剂及可逆颅骨组织光透明方法，建立了无损、非侵入的透明颅窗，实现了皮层微脉管系统的高分辨成像，操作简单，成像质量高，可多

次重复成像。

[0031] 一方面,为实现上述目的,本发明实施例提供了一种颅骨光透明试剂,包括第一溶液和第二溶液;其中:

[0032] 所述第一溶液为质量浓度25%-30%的酰胺类有机化合物及其衍生物的醇溶液;

[0033] 所述第二溶液包括阴离子表面活性剂水溶液和水溶性促渗剂;其中,所述阴离子表面活性剂水溶液的质量浓度为15%-20%,所述水溶性促渗剂的用量为所述第二溶液总体积的5%-10%。

[0034] 其中,酰胺类有机化合物及其衍生物的作用是在颅骨内会产生水合效应,可以在一定程度上疏松致密的颅骨组织,并加速醇类分子的渗透,从而在短时间内帮助实现颅骨组织透明化的目的;25%-30%的浓度范围可以确保在常温下不析出条件下最快实现颅骨组织透明化的目的,若浓度偏小,则透明化速度减慢。而醇的作用是将颅骨内胶原进行解离,且高浓度醇也具有脱水作用,初步达到透明化的目的。

[0035] 阴离子表面活性剂水溶液的作用是将第二溶液与颅骨之间折射率进行匹配,最终达到颅骨组织透明化的目的,其浓度的选择是依据室温下阴离子表面活性剂的最大溶解度确定;水溶性促渗剂的作用是加速阴离子表面活性剂分子的渗透,达到快速均匀透明颅骨组织的目的。

[0036] 本实施例中,所述酰胺类有机化合物及其衍生物为碳酰胺或丙二酰脲,无毒且生物相容性好。本发明实施例中的碳酰胺或丙二酰脲购自国药集团化学试剂有限公司,纯度95%以上。

[0037] 本实施例中,所述醇为乙醇;所述乙醇的体积浓度为75%。

[0038] 本实施例中,所述阴离子表面活性剂为无毒的磺酸盐型阴离子表面活性剂或硫酸酯类阴离子表面活性剂,优选十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠或十二烷基苯磺酸钠中的一种。

[0039] 本实施例中,所述水溶性促渗剂为无毒或低毒的砒类或酮类物质,优选二甲基亚砒或丙酮中的一种或两种。因二甲基亚砒或丙酮是有较弱的接触性毒性,故其浓度不宜过高,以避免对机体造成损伤。

[0040] 通过上述内容可以看出,所述颅骨光透明试剂作用于颅骨组织后,通过第一溶液疏松致密的骨组织,洗脱部分高折射率的无机钙盐,并使颅骨组织表面胶原解离,最终使颅骨折射率降低;通过第二溶液使颅骨与第二溶液的折射率匹配,达到透明的目的;实现在短时间内使得组织内部折射率均一化,降低组织散射,从而使得颅骨组织变得对光透明,提高成像深度,为获取皮层微血管结构、血流与血氧的分布信息等提供了新的方法。

[0041] 另一方面,基于同一发明构思,针对宽场成像的成像需求,基于颅骨组织的组成成分,本发明实施例还提供了一种使用所述颅骨光透明试剂在活体水平上进行的可逆颅骨组织光透明方法,如图1所示,包括:

[0042] 步骤S110:在颅骨表皮上剪一开口,擦除颅骨表面粘膜并将颅骨表面吹干;

[0043] 所述步骤S110在实施过程中,具体做法是:将活体生物(例如:小鼠、大鼠等)麻醉后将其头部毛发刮除,用眼科剪在颅骨表皮上剪一2cm长的开口,再用湿润的棉球擦除颅骨表面的粘膜,用压缩空气将颅骨表面吹干。

[0044] 步骤S120:将带孔固定片固定在经吹干的颅骨表面;

[0045] 在步骤S120中,所述带孔固定片具有通孔,用胶水将其粘于颅骨表面并与颅骨表面紧密贴合,带孔固定片用于容纳溶液,使溶液聚积在颅骨表面并与颅骨表面相互作用,防止溶液流动扩散。

[0046] 步骤S130:向固定在颅骨表面的所述固定片的孔中滴加第一溶液,10-15min后将所述第一溶液擦除;其中,所述第一溶液为质量浓度25%-30%的酰胺类有机化合物及其衍生物的醇溶液;该步骤的作用为疏松致密的骨组织,洗脱部分高折射率的无机钙盐,并使颅骨组织表面胶原解离,最终使颅骨折射率降低。

[0047] 其中,所述酰胺类有机化合物及其衍生物为碳酰胺或丙二酰脲。所述醇为乙醇;优选的,所述乙醇的体积浓度为75%。

[0048] 在步骤S130中,可用脱脂棉球不断摩擦颅骨表面以加速透明化过程。

[0049] 步骤S140:向所述固定片的孔中滴加第二溶液,5-8min后即实现颅骨组织的光透明化,可用于光学显微成像系统进行成像;其中,所述第二溶液包括阴离子表面活性剂水溶液和水溶性促渗剂;所述阴离子表面活性剂水溶液的质量浓度为15%-20%,所述水溶性促渗剂的用量为所述第二溶液总体积的5%-10%,该步骤的作用是使颅骨与第二溶液的折射率匹配,达到透明的目的。

[0050] 其中,所述阴离子表面活性剂为磺酸盐型阴离子表面活性剂或硫酸酯类阴离子表面活性剂,优选十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠或十二烷基苯磺酸钠中的一种;所述水溶性促渗剂为砒类或酮类物质,优选二甲基亚砒或丙酮中的一种或两种。

[0051] 所述光学显微成像系统为宽场成像系统,如:激光散斑成像,高光谱成像系统等。

[0052] 进一步地,在成像实验结束后,本实施例还包括步骤S150:将所述第二溶液擦除,用生理盐水反复擦洗清理颅骨表面复性,使颅骨恢复原始浑浊状态。

[0053] 通过上述内容可以看出,本发明实施例通过先后向颅骨表面滴加第一溶液和第二溶液,与颅骨组织相互作用,使组织内部折射率均一化,降低组织散射,使得颅骨组织变得对光透明,从而在短时间内建立一个无损、非侵入的透明颅窗以实现皮层微脉管系统的高分辨成像,克服了因颅骨高散射特性导致成像质量不高、深度不深的问题;该方法在十五分钟内即可使颅骨组织透明,且透明后用生理盐水可以将颅骨组织复性,恢复至原始的浑浊状态。该方法操作简单,透明程度高,成像质量高,生物相容性好,适用性强,可多次重复成像。

[0054] 以下通过实施例对本发明作更详细的描述。这些实施例仅是对本发明最佳实施方式的描述,并不对本发明的范围有任何的限制。

[0055] 实施例1

[0056] 步骤1,将两月龄雄性Balb/c小鼠麻醉后,用刀片刮除小鼠头部毛发,用眼科剪从双眼到双耳之间剪开一个两厘米长开口,再用湿润的棉球轻轻擦除颅骨表面的黏膜后,用压缩空气将颅骨表面吹干;

[0057] 步骤2,将一个铝制带孔固定片用502胶水固定在小鼠单侧颅骨表面,等待5-8min胶水凝固后将小鼠移放于小鼠定位器上并对其头部进行固定;

[0058] 步骤3,在颅骨表面滴加第一溶液,反应10min后用棉球擦除;其中,所述第一溶液由质量-体积比为30g:70mL的碳酰胺与乙醇混合组成;乙醇的浓度为75%;

[0059] 步骤4,在颅骨表面滴加第二溶液,反应5min后即实现颅骨组织的光透明化;其中,

所述第二溶液由质量浓度为18%的十二烷基磺酸钠水溶液和丙酮混合组成;所述丙酮的体积为第二溶液总体积的10%。

[0060] 步骤5,将光透明化的生物组织用激光散斑及高光谱双模成像系统进行成像处理。成像实验结束后,将第二溶液擦除,用生理盐水反复擦洗清理颅骨表面即可复性,使颅骨恢复原始浑浊状态。

[0061] 本实施例对两个月月龄小鼠实施活体颅骨组织透明化前及透明化后的效果图分别见图2(a)和图2(b)。

[0062] 实施例2

[0063] 步骤1,将八月龄雄性Balb/c小鼠麻醉后,用刀片刮除小鼠头部毛发,用眼科剪从双眼到双耳之间剪开一个两厘米长开口,再用湿润的棉球轻轻擦除颅骨表面的黏膜后,用压缩空气将颅骨表面吹干;

[0064] 步骤2,将一个铝制带孔固定片用502胶水固定在小鼠单侧颅骨表面,等待5-8min胶水凝固后将小鼠移放于小鼠定位器上并对其头部进行固定;

[0065] 步骤3,在颅骨表面滴加第一溶液,反应15min后用棉球擦除,该过程中用脱脂棉球不断摩擦颅骨表面以加速透明化过程;其中,所述第一溶液由质量-体积比为25g:75mL的碳酸酞胺与乙醇混合组成;乙醇的浓度为75%;

[0066] 步骤4,在颅骨表面滴加第二溶液,反应8min后即实现颅骨组织的光透明化;其中,所述第二溶液由质量浓度为20%的十二烷基苯磺酸钠水溶液和丙酮混合组成;所述丙酮的体积为第二溶液总体积的5%。

[0067] 步骤5,将光透明化的生物组织用激光散斑及高光谱双模成像系统进行成像处理。成像实验结束后,将第二溶液擦除,用生理盐水反复擦洗清理颅骨表面即可复性,使颅骨恢复原始浑浊状态。

[0068] 本实施例对八个月月龄小鼠实施活体颅骨组织透明化前及透明化后的效果图分别见图3(a)和图3(b)。

[0069] 实施例3

[0070] 步骤1,将两月龄雄性Balb/c小鼠麻醉后,用刀片刮除小鼠头部毛发,用眼科剪从双眼到双耳之间剪开一个两厘米长开口,再用湿润的棉球轻轻擦除颅骨表面的黏膜后,用压缩空气将颅骨表面吹干;

[0071] 步骤2,将一个铝制带孔固定片用502胶水固定在小鼠单侧颅骨表面,等待5-8min胶水凝固后将小鼠移放于小鼠定位器上并对其头部进行固定;

[0072] 步骤3,在颅骨表面滴加第一溶液,反应12min后用棉球擦除;其中,所述第一溶液由质量-体积比为28:72的丙二酞脲与乙醇混合组成;乙醇的浓度为75%;

[0073] 步骤4,在颅骨表面滴加第二溶液,反应6min后即实现颅骨组织的光透明化;其中,所述第二溶液由质量浓度为15%的十二烷基磺酸钠水溶液和二甲基亚砷混合组成;所述二甲基亚砷的体积为第二溶液总体积的10%。

[0074] 步骤5,将光透明化的生物组织用激光散斑及高光谱双模成像系统进行成像处理。成像实验结束后,将第二溶液擦除,用生理盐水反复擦洗清理颅骨表面即可复性,使颅骨恢复原始浑浊状态。

[0075] 步骤6,用5-0尼龙线缝合伤口后,在伤口处涂少量抗生素,将手术后小鼠放置于体

温维持仪上恢复,待其苏醒后放回饲养笼中单只饲养;

[0076] 步骤7,第一次透明后的第三天,第五天及第七天再重复操作步骤1至步骤6,以实现短期多次重复观察实验,多次重复透明化的效果图见图3。

[0077] 实施例4

[0078] 步骤1,将两月龄雄性Balb/c小鼠麻醉后,用刀片刮除小鼠头部毛发,用眼科剪从双眼到双耳之间剪开一个两厘米长开口,再用湿润的棉球轻轻擦除颅骨表面的黏膜后,用压缩空气将颅骨表面吹干;

[0079] 步骤2,将一个铝制带孔固定片用502胶水固定在小鼠单侧颅骨表面,等待5-8min胶水凝固后将小鼠移放于小鼠定位器上并对其头部进行固定;

[0080] 步骤3,在颅骨表面滴加第一溶液,反应10min后用棉球擦除;其中,所述第一溶液由质量-体积比为26:74碳酰胺与乙醇混合组成;乙醇的浓度为75%;

[0081] 步骤4,在颅骨表面滴加第二溶液,反应5min后即实现颅骨组织的光透明化;其中,所述第二溶液由质量浓度为16%的十二烷基硫酸钠水溶液和丙酮及二甲基亚砷混合组成;所述丙酮和二甲基亚砷的总体积为第二溶液总体积的8%。

[0082] 步骤5,将光透明化的生物组织用激光散斑及高光谱双模成像系统进行成像处理。成像实验结束后,将第二溶液擦除,用生理盐水反复擦洗清理颅骨表面即可复性,使颅骨恢复原始浑浊状态。

[0083] 步骤6,用5-0尼龙线缝合伤口后,在伤口处涂少量抗生素。将手术后小鼠放置于体温维持仪上恢复,待其苏醒后放回饲养笼中单只饲养;

[0084] 步骤7,第一次透明后的第二个月,第三个月,第四个月,第五个月和第六个月时再重复操作步骤1至步骤6,以实现长期多次重复观察实验,透明化的效果图见图5。

[0085] 实施例5

[0086] 步骤1,将四月龄雄性Balb/c小鼠麻醉后,用刀片刮除小鼠头部毛发,用眼科剪将双眼到双耳之间头皮完全剪去,再用湿润的棉球轻轻擦除颅骨表面的黏膜后,用压缩空气将颅骨表面吹干;

[0087] 步骤2,将一个铝制带孔固定片用502胶水固定在小鼠双侧颅骨表面,等待10-15min胶水凝固后将小鼠移放于小鼠定位器上并对其头部进行固定;

[0088] 步骤3,在颅骨表面滴加第一溶液,反应15min后用棉球擦除;其中,所述第一溶液由质量-体积比为30:70的碳酰胺与乙醇混合组成;乙醇的浓度为75%;

[0089] 步骤4,在颅骨表面滴加第二溶液,反应5min后即实现颅骨组织的光透明化;其中,所述第二溶液由质量浓度为20%的十二烷基磺酸钠水溶液和丙酮混合组成;所述丙酮的体积为第二溶液总体积的7%。

[0090] 步骤5,将光透明化的生物组织用激光散斑及高光谱双模成像系统进行成像处理。成像实验结束后,将第二溶液擦除,用生理盐水反复擦洗清理颅骨表面即可复性,使颅骨恢复原始浑浊状态。

[0091] 本实施例对四个月月龄小鼠实施活体双侧颅骨组织透明化前及透明化后的效果图分别见图6(a)和图6(b)。

[0092] 通过上述内容可以看出,本发明实施例中的可逆颅骨组织光透明方法,该方法工艺简单,安全无副作用,对八月龄以内小鼠颅骨均有较好的透明效果;其透明范围可视具体



情况来调整,最大透明范围为双侧颅顶骨,故该方法结合光学成像系统可用于全皮层范围微脉管结构及功能的监测;该方法在短时间及长时间内均能满足多次成像的需求,对皮层血管结构无影响,且不会引发任何炎症反应,应用范围广。

[0093] 最后所应说明的是,以上具体实施方式仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照实例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

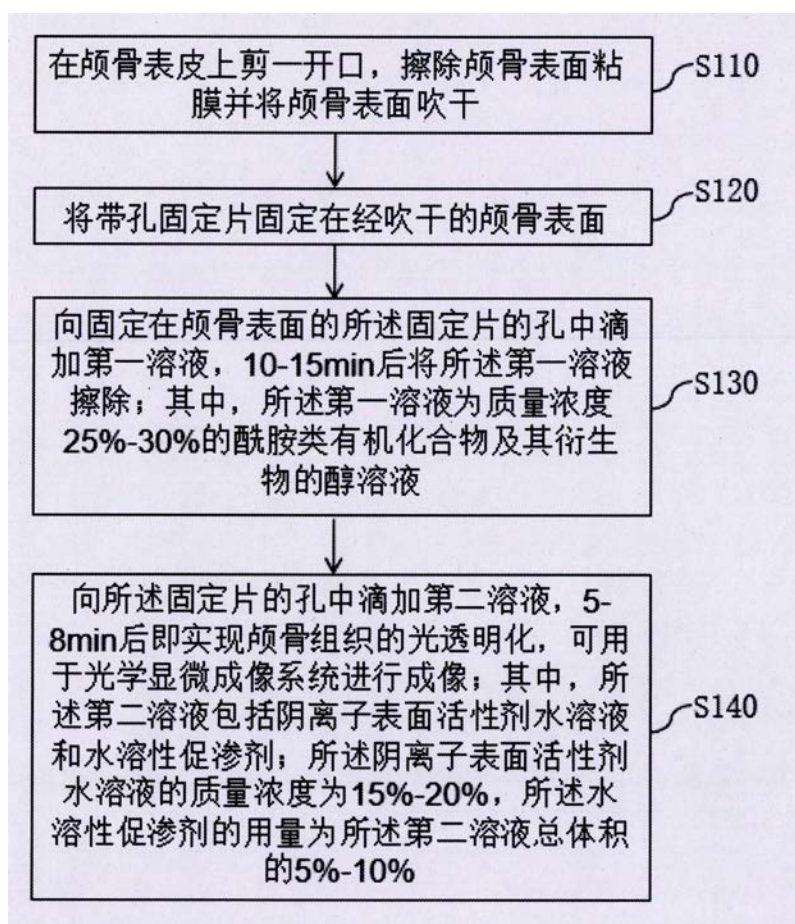


图1

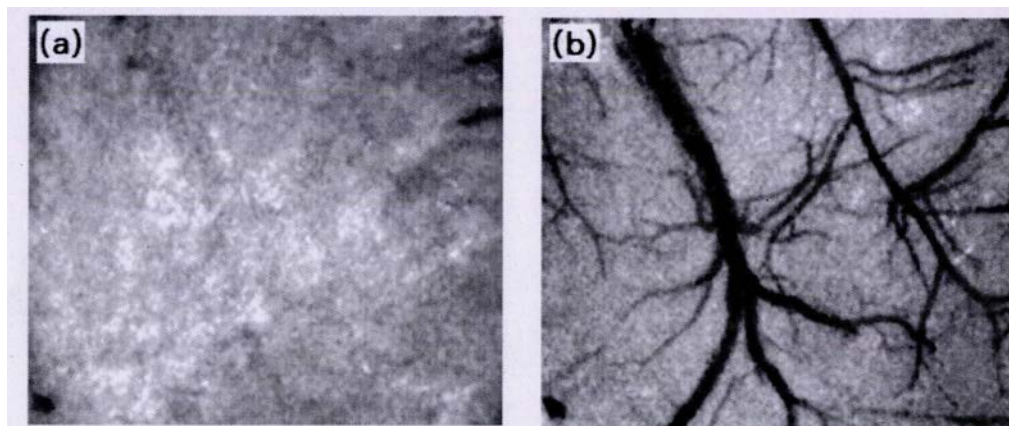


图2

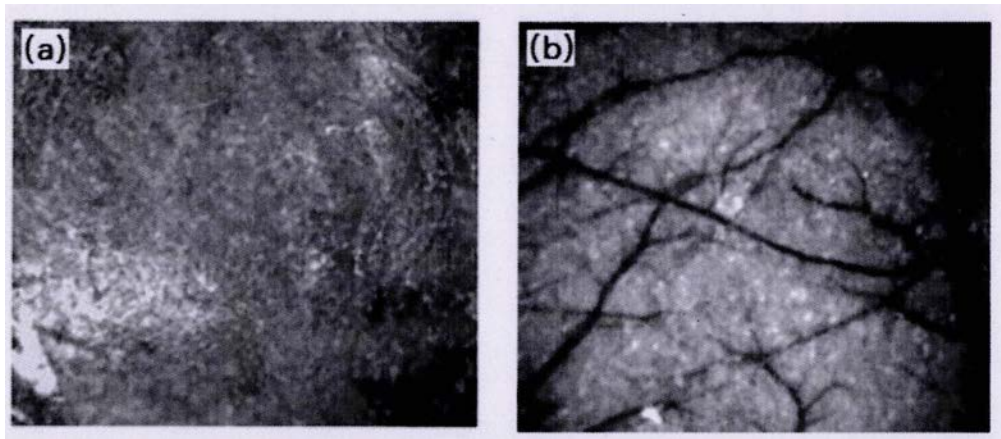


图3

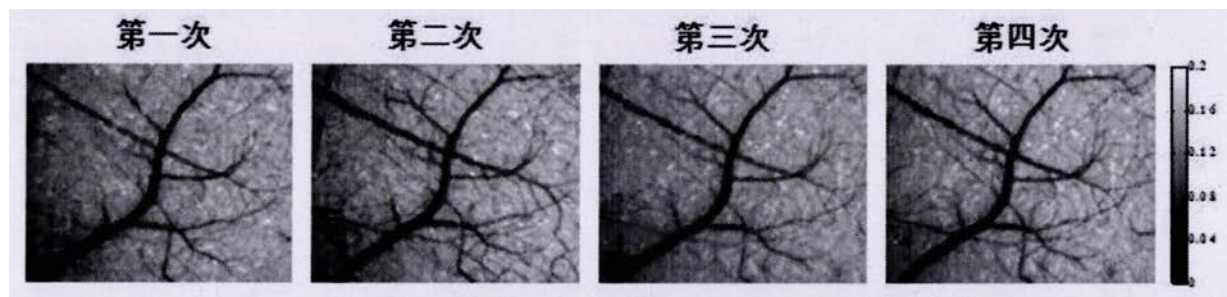


图4

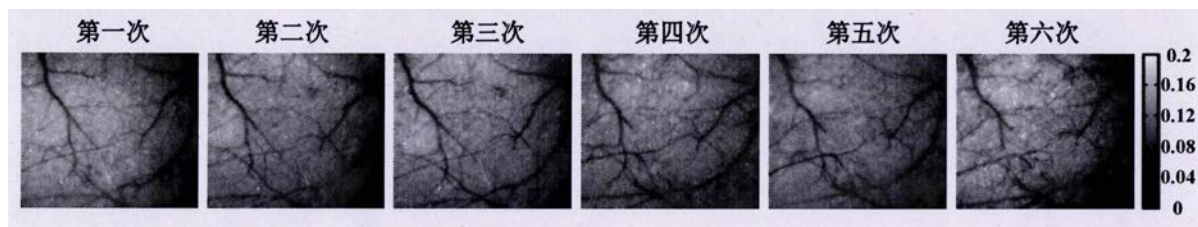


图5

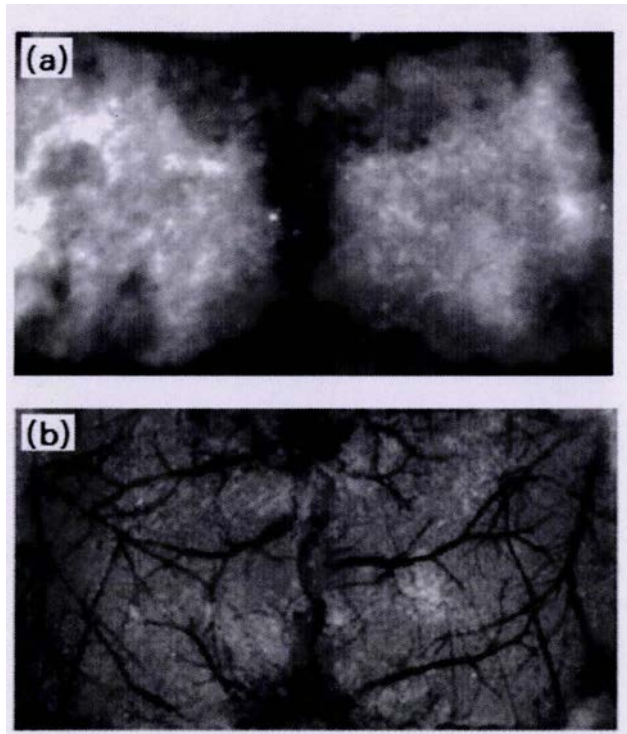


图6