

二次谐波用于透明化皮肤的在体成像方法

韩琴¹, 吴航军¹

(1.浙江大学冷冻电镜中心, 杭州 310058)

摘要: 皮肤是人体重要的器官, 免疫荧光标记是常用的研究方法, 该方法存在标记流程长、光毒性和荧光淬灭的缺点。使用二次谐波成像, 无需荧光标记且对胶原纤维结构改变高度敏感, 是一种适合皮肤病理研究的方法。结合二次谐波的在体成像方法, 可直接对皮肤原位成像, 所得结果具有明显的生理意义和参考价值。

关键词: 二次谐波; 在体成像; 透明化; 皮肤

中图分类号: Q-334

文献标识码:

A method for in vivo imaging of transparent skin Using Second harmonic generation

Han Qin¹, Wu HangJun¹

(1.Center of Cryo-Electron Microscopy, Zhejiang University, Hang Zhou 310058, China)

Abstract: Skin is an important organ and is usually studied by immunofluorescence, which has some shortcomings such as long labeling process, phototoxicity and fluorescence quenching. The use of second harmonic imaging, which does not require fluorescent labeling and is highly sensitive to structural changes of collagen fibers, is a suitable method for the study of skin pathology. Combined with the second harmonic in vivo imaging, the skin can be directly imaged in situ, and the results have physiological significance and reference value.

Keywords: Second harmonic generation; In-vivo imaging; optical clearing; skin

1 背景

皮肤作为人体的第一道防线和最大的器官，参与全身的功能活动，以维持机体和外界自然环境的对立统一；皮肤能接受外界的各种刺激并通过反射调节使机体更好地适应外界环境的各种变化，具有十分重要的生理作用。光学显微镜以优越的亚微米级的分辨率，常被用于皮肤组织的微观结构研究^[1]，其中免疫荧光技术因特异性强等优点而在皮肤相关研究中被广泛使用。常规免疫荧光需经过复杂的荧光标记流程，荧光成像会产生光毒性且长时间激光照射容易引起荧光淬灭。二次谐波产生（Second Harmonic generation, SHG）成像技术能弥补免疫荧光技术的缺点。

SHG 是一个相干二阶非线性光学过程，信号仅在非中心对称的样品中才存在^[2-4]，成像无需荧光标记且信号对结构改变高度敏感。生物组织中的结构蛋白如胶原蛋白、肌球蛋白、微管等可通过 SHG 直接无标记成像。皮肤组织中含有丰富的胶原纤维，许多皮肤疾病会引起胶原纤维结构改变，使用对结构改变高度敏感的 SHG 观察不同皮肤层的形态学变化来进行组织病理学诊断。

由于生物组织对可见光和近红外光的强烈散射和吸收作用，光学显微镜对组织的成像深度受到极大限制^[1,5,6]。为了提升成像深度和图像质量，通常采用光学清除（OC）的方法来降低光散射^[6-8]。皮肤是高度散射介质，需通过光学清除来提高成像深度。1997 年，Tuchin 首次利用组织浸没的方法研究了皮肤组织的光学清除^[9]，此后皮肤组织经常被用作光学清除的机理及透明化试剂的研究。

皮肤透明化研究多集中于离体组织开展，本文提供一种在体成像的研究方法，利用二次谐波信号研究透明化处理皮肤信息，为皮肤相关的研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验动物: Balb/c-nu 裸鼠 (6 周), 所有涉及动物的实验都遵从浙江大学实验动物管理相关制度。

实验试剂: 甘油购自国药集团化学试剂有限公司, 戊巴比妥钠获赠于程大晓博士处。

实验耗材: 2ml 离心管、50ml 离心管、枪头、1ml 注射器购自海门市亿禾实验器材经营部。

2.2 实验仪器

移液器 (大龙, 中国)、双光子显微镜 (FVMPE-RS, Olympus 公司, 日本)、自制小动物成像固定装置。

2.2 实验方法

1) 小鼠麻醉

小鼠经腹腔注射戊巴比妥钠 (1%, 40mg/kg) 进行麻醉。等待小鼠麻醉成功后, 腹部朝上, 放置在自制的固定器上。麻醉期间小鼠的体温调节机能受到抑制, 在成像过程中, 通过 37°C 恒温加热垫, 对小鼠进行保温, 防止体温下降。

2) 透明化处理

甘油在皮肤研究中公认的生物安全性极高的试剂, 也是皮肤透明化常用的试剂。本研究中透明化选用 50% (V/V) 的甘油水溶液进行处理。在细胞培养皿中加入透明化试剂, 细胞培养皿底部的小孔使得试剂与皮肤直接接触, 完成透明化过程。

3) SHG 信号采集

SHG 信号在双光子显微镜上进行采集。选用 25 倍物镜 (Olympus, XPLN25XWMP 25x/1.05, WD=2mm) 采集 SHG 信号图像, 激发波长 860nm, 激光强度 14.3%, PMT 电压 500V, 图像尺寸 1024x1024 pixels, 扫描速度为 2us/pixel, 接收波段 410-460nm。

时间序列成像: 采集间隔为 1 分钟, 连续拍摄 20 分钟。

3 结果与分析

针对活体成像中因呼吸、心跳导致的焦面不稳定的情况，本文采用自制的成像固定装置来稳定焦面（见图 1）。该装置以一定的重力控制呼吸和心跳引起的组织活动范围，从而减少焦面位移。实验过程中，为了控制焦面稳定而又不会对小鼠造成损伤，按需调节两侧的固定螺丝。



图 1 自制固定装置

3.1 实验装置的稳定性

图 2 展示了利用麻醉后小鼠皮肤的 SHG 信号验证自制成像固定装置的焦面稳定性能。

采用时间序列扫描，连续采集了 20min。

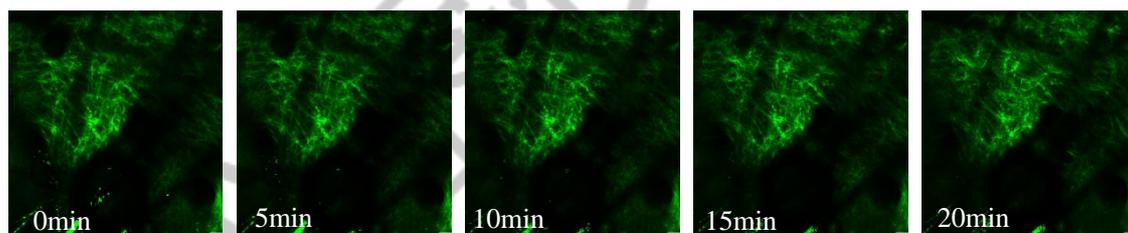


图 2 焦面稳定性验证 (Bra=50 μm)

从 0-20 分钟的成像结果可以看出，在连续拍摄过程中，成像位置的信号强度及其勾勒出的位置、形状，几乎无变化，表明自制的成像装置能长时间稳定成像。成像焦面的稳定一直是活体成像中无法避免的问题，通过自制的成像装置，可以很好的活体成像中解决焦面不稳定的问题，该装置非常适用于活体成像。

3.2 透明化处理中 SHG 信号的变化

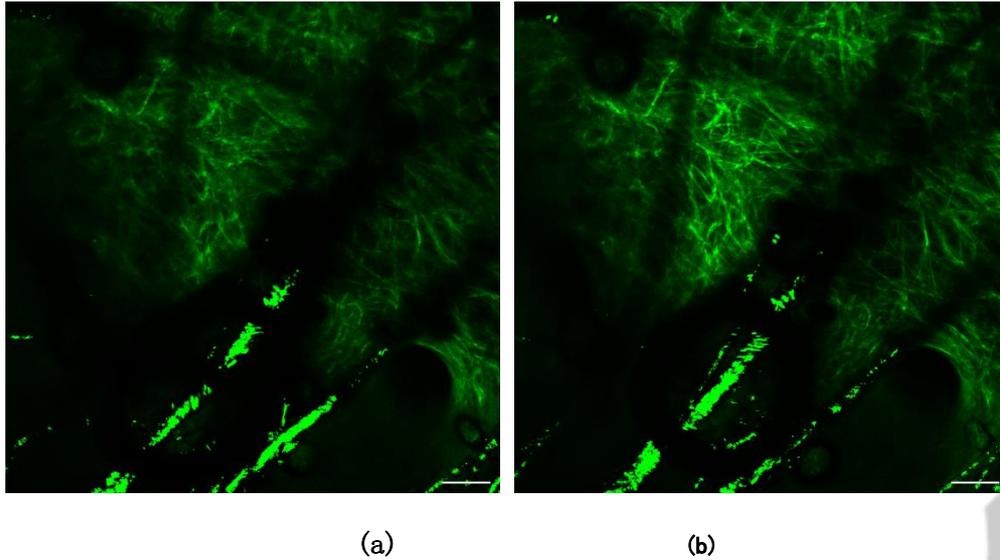


图3 透明化处理前 (a) 和透明化处理 n 后 (b) 胶原纤维 SHG 信号 (Bra=50 μm)

透明化处理选用甘油水溶液。试剂更换为甘油溶液后，甘油逐渐像皮肤组织中渗透，实现透明化效果。对图 3 (a) 和(b)对比可知，同一位置的 SHG 信号得到明显增强。用 ImageJ 测定处理前平均荧光强度为 10600.103，透明化处理 10 分钟后平均荧光强度为 11914.448。SHG 信号得到增强，可能是由于表皮层折射率分布更均匀，这与之前的研究结果一致^[1]。

4 结论

本文介绍了结合 SHG 信号的在体皮肤成像方法，该方法能够稳定的采集皮肤 SHG 信号。结合 SHG 对皮肤胶原结构改变的敏感性，可根据 SHG 信号的变化，实时观察、动态分析皮肤样本经处理后发生的改变。该方法适用于其他引起 SHG 信号改变的，如肿瘤学等相关研究，在后续研究中，我们将进一步探索和改进，扩展该技术的应用。

参考文献：

[1]CAMPAGNOLA P J, CLARK H A, MOHLER W A, et al. Second-harmonic imaging

microscopy of living cells [J]. J Biomed Opt, 2001, 6(3): 277-286.

[2]CICCHI R, PAVONE F S, MASSI D, et al. Contrast and depth enhancement in two-photon

microscopy of human skin by use of optical clearing agents [J]. *Opt Express*, 2005, 13(7): 2337-2344.

[3]KEIKHOSRAVI A, BREFDELDT J S, SAGAR M A K, et al. Second-harmonic generation imaging of cancer [J]. *Method Cell Biol*, 2014, 123:531-546.

[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]. *Sci Rep-Uk*, 2021, 11(1): 1-13.

[5]MAJZADEH A, WU Z, LUI H, et al. Investigation of optically cleared human skin in combined multiphoton and reflectance confocal microscopy; proceedings of the Optics in the Life Sciences, Vancouver, F 2015 [C]. Optica Publishing Group.

[6]RYLANDER C G, STUMPP O F, MILNER T E, et al. Dehydration mechanism of optical clearing in tissue [J]. *J Biomed Opt*, 2006, 11(4).

[7]TRAN R J, SLY K L, CONBOY J C. Applications of Surface Second Harmonic Generation in Biological Sensing [J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2017, 10(1):387-414.

[8]TUCHIN V, MAKSIMOVA I, ZIMNYAKOV D, et al. Light propagation in tissues with controlled optical properties [J]. *Journal of Biomedical Optics* , 1997, 2(4):401-417.

[9]YEH A T, CHOI B, NELSON J S, et al. Reversible dissociation of collagen in tissues [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 121(6): 1332-1335.