

## CLARITY 技术在小鼠急性肾损伤模型中的应用

明志勇<sup>1,2</sup>, 邬国斌<sup>1</sup>, 赵荫农<sup>1</sup>

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院, 广西南宁 530021;

2. 广西医科大学研究生院, 广西南宁 530021)

**摘要:** **目的** 基于小鼠急性肾损伤模型探讨 CLARITY 技术在病理诊断中应用的价值。 **方法** 将 24 只昆明小鼠随机均分为实验组和对照组, 每组(各 12 只)分别建立左侧输尿管完全梗阻模型, 0 d、2 d、4 d、6 d 后每次取 3 只实验组小鼠进行透明化处理, 对照组行常规 HE 染色。联合应用肉眼观察法、激光共聚焦显微镜观察法和常规显微镜观察法检测肾脏组织的形态学改变。采用 TissueFAXS™ Cytometry 组织细胞定量分析系统对共聚焦显微镜二维图片中的肾小管上皮细胞数量和肾小管管腔面积进行定量分析。 **结果** 肉眼观梗阻侧肾脏, 随着时间延长, 肾体积增大、充血、水肿, 肾盂和输尿管扩张, 肾实质结构逐渐萎缩, 肾盏融合, 肾皮质开始变薄; 实验组和对照组均观察到肾脏梗阻后肾小管上皮细胞扁平化、扩张, 随着梗阻时间延长, 逐渐出现肾小管萎缩消失、组织结构破坏, 典型形态消失, 纤维结缔组织增生, 肾脏出现纤维化; 实验组采用激光共聚焦显微镜扫描发现同一个组织的不同层面肾小管上皮细胞数量和肾小管管腔面积分布明显不同。 **结论** 透明化技术可观察急性肾损伤后肾脏不同组织层面的病理改变, 比 HE 染色的二维层面提供更多的信息, 在病理学和形态学研究领域有较高的应用价值。

**关键词:** CLARITY; 输尿管梗阻; 三维成像; 急性肾损伤

中图分类号: R329.461

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2018)05-0409-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.05.002

### Application of CLARITY technique in a mouse model of acute kidney injury

Ming Zhiyong<sup>1,2</sup>, Wu Guobin<sup>1</sup>, Zhao Yinnong<sup>1</sup>

(1. *Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China;*

2. *Graduate School of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China*)

**Abstract:** **Objective** To explore the value of CLARITY in pathological diagnosis based on acute renal injury in mice models. **Methods** Twenty-four mice from Kunming were randomly divided into the experimental group ( $n = 12$ ) and the control group ( $n = 12$ ). After the complete obstruction of the left ureter models were established for each group, 3 mice were selected from the experimental group each time on the 0, 2nd, 4th, and 6th day and treated by CLARITY technique, and the mice in control group were treated by HE staining. The morphological changes of the kidney tissue were observed by naked eyes, confocal laser scanning microscopy and conventional microscope. The quantity of tubular epithelial cells and lumen area of the tubules in the two-dimensional image of the confocal laser scanning microscopy were quantified by using the TissueFAXS™ Cytometry tissue quantitative analysis system. **Results** As time went on, the naked eye observation showed that the kidney in the obstructed side was enlarged, hyperemia and edema, the renal pelvis and ureter were dilated, the renal parenchyma was atrophied gradually, the renal calyces were fused, and the renal cortex became thinner. In the experimental group and the control group, it was found that the renal tubular epithelial

基金项目: 国家自然科学基金(81460426)

第一作者简介: 明志勇(1992-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 透明化技术应用和肝癌的机制研究, E-mail: 905901560@qq.com

通信作者简介: 赵荫农(1958-), 男, 博士, 主任医师, 硕士研究导师, 研究方向: 肝胆胰脾良恶性肿瘤的临床及基础, E-mail: Yinongzhao@263.net

cells were flattened and dilated after renal obstruction. As the obstruction time prolonged, renal tubular was atrophied and tissues disappeared, the tissue structure was destroyed, the typical morphology disappeared, the fibrotic connective tissues proliferated and the kidney appeared fibrosis. Laser confocal microscopy revealed significant differences in the number of renal tubular epithelial cells and the distribution of renal tubular lumen in different layers of the same tissue. **Conclusion** CLARITY technique can observe the pathological changes of different tissue depth of kidney after acute kidney injury, and it can present more data than the two-dimensional layer of HE staining, and has high application value in the field of pathology and morphology.

**Key words:** CLARITY; ureteral obstruction; three-dimensional imaging; acute renal injury

CLARITY 是近年来迅速发展的一种将完整生物组织转化为水凝胶-组织杂交体的方法,利用以丙烯酰胺为主要成分的水凝胶固定组织结构里的核酸、神经递质以及蛋白质等,然后用十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)为主要成分的清洗剂去除稳定亲水性的脂质环境,以实现完整组织的透明且更便于光的穿透及大分子渗透。通过抗原抗体特异性结合,荧光标记并检测目的靶分子,激光扫描共聚焦显微镜下观察、构建组织细胞的三维空间结构<sup>[1]</sup>。

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是由多种病因引起的以肾功能急剧下降为其主要特征的一组综合征,临床上单侧输尿管梗阻最常见。近期研究显示,AKI可导致肾脏的不完全修复、慢性炎症的持续及进展性纤维化,最终可导致慢性的器官功能丧失<sup>[2-3]</sup>。2013年,CLARITY由Chung等<sup>[4]</sup>在《Nature》上首次介绍,此后得到快速发展,但主要应用于神经系统方面的研究<sup>[5-6]</sup>。本研究拟以急性输尿管梗阻模型肾组织形态结构变化病理观察为例,探讨CLARITY透明化法相较传统病理组织处理方案在病理诊断中的优势及潜在应用价值。

## 1 材料与方法

1.1 材料 24只8周龄昆明小鼠,体重(40±2)g,购自广西医科大学实验动物中心,于室温20℃~25℃、湿度50%~60%的饲养室喂养,自由摄食和饮水。实验所用手术器械由广西医科大学附属肿瘤医院供应室提供。

40%丙烯酰胺、2%甲叉双丙烯酰胺购自Bio-Rad公司;95%分析纯多聚甲醛、96%分析纯氢氧化钠购买于天津致远化学试剂有限公司;98%热引发剂VA-044购自Wako公司;SDS(98.5%)、硼酸(99.5%)、TritonX100、DAPI购自Sigma公司;Collagen IV抗体购自abcam公司、山羊抗兔IgG(H+L)抗体购自Cell Signaling Technology公司;激光共聚焦显微镜为奥林巴斯公司FV3000型,TissueFAXS™ Cytometry组织细胞定量分析系统归北京华威中仪科技有限公司所有。

水凝胶制备:该过程在冰盒上操作,1L水凝胶(HG)配比如下:40%丙烯酰胺100ml,VA-044 2.5g,2%甲叉双丙烯酰胺25ml,10×PBS 100ml,补双蒸水至1L,分装后置于-20℃冰箱储存备用。清除液的制备:在室温下操作,1L清除液配比如下:SDS 40g、硼酸12.4g,补双蒸水至1L,用10M NaOH调节pH到8.5。

1.2 分组及处理方法 选取24只昆明小鼠,采用随机数字表法将其均分为实验组和对照组,每组各12只,分别建立左侧输尿管完全梗阻模型,实验组使用透明化技术处理,对照组使用HE染色法处理,造模后每组小鼠采用随机数字表法再分为4组,即0d组、2d组、4d组、6d组,取每组的3只动物进行后续实验。

1.3 模型制备 小鼠腹腔注射10%水合氯醛(0.004ml/g)溶液,麻醉满意后取仰卧位固定于操作台,常规消毒铺洞巾。充分游离左侧上段输尿管后并用4-0丝线结扎,逐层关闭切口。

1.4 实验组小鼠灌注 将水凝胶和1×PBS溶液放置在冰盒内,将小鼠充分麻醉后取仰卧位固定四肢,充分暴露心脏后用针头插入左心室,并以血管钳固定,然后在心耳处戳一小孔放血。先以10ml/min的速度推入50ml PBS溶液,通过体内循环排空小鼠血管内血液,再灌注25ml水凝胶溶液。将梗阻侧肾脏迅速浸入10ml水凝胶中,迅速移至4℃冰箱中3d,从而使水凝胶进一步渗透到组织中<sup>[7]</sup>。

1.5 实验组透明化处理 ①将1.4中肾脏标本置于37℃温箱,24h后剥离肾脏周围凝固胶;②切取1mm薄片标本,放清除液里2周;③PBST液清洗24h;④IV型胶原蛋白抗体(1:200稀释)37℃摇床孵育24h;⑤PBST液清洗1d,山羊抗兔二抗(1:500稀释)37℃摇床孵育12h;⑥PBST液清洗1d,避光容器中,加入DAPI工作液(10μg/ml)孵育过夜;⑦80%甘油封闭24h;⑧激光共聚焦显微镜调整激发波长360nm,将样品置于载物台上采用其进行观测。实时观测结束后,以5μm的层厚扫描Z轴,对样品作光学切片式逐层扫描并三维图像重建。

1.6 对照组 HE 染色 将梗阻侧肾脏组织脱水包埋制片。HE 染色具体操作方法:①切片在烤箱 60℃ 烘烤 1 h 后入二甲苯脱蜡 3 次,时间 10 min/次;②梯度乙醇依次脱去二甲苯,乙醇浓度从无水乙醇-95%乙醇-85%乙醇-75%乙醇-65%乙醇,时间 5 min/次;③移入蒸馏水中 10 min;④苏木素浸泡 10 min,流水冲洗 3 min;⑤经 1% 盐酸酒精分化,流水洗 3 s;⑥移入伊红液中浸染 15 s,流水冲洗 3 min;⑦晾干后中性树脂封片,光学显微镜下观察。

1.7 定量分析 利用 TissueFAXS™ Cytometry 组织细胞定量分析系统对实验组激光共聚焦显微镜二维图片中的肾小管上皮细胞数量和肾小管管腔面积进行定量分析。

2 结果

2.1 大体结构改变 左侧输尿管完全梗阻后肉眼观察 0 d(术后 0 h)两侧肾体积无异常,表面无充血水肿;2 d 梗阻侧肾体积增大,颜色淡红,肾盂和输尿管无明显扩张;4 d 时肾盂和输尿管扩张明显,肾体积继续增大,表面充血、水肿;6 d 时肾实质结构逐渐萎缩,肾盂融合,肾皮质开始变薄;对侧肾脏肉眼观无明显改变,见图 1。



图 1 左侧输尿管完全梗阻后双侧肾脏变化

注:Obstructed kidneys 指梗阻侧肾脏,Contralateral kidneys 指对侧肾脏

2.2 实验组经过透明化技术处理后三维病理学改变分析 共聚焦结果显示 0 d 两侧肾脏结构清晰,肾小球结构完整,小管管径正常,无扩张;2 d 时梗阻侧肾脏肾小球结构基本正常,肾小管上皮细胞肿胀,扁平化、扩张,小管结构出现小部分紊乱,肾脏三维结构大体存在;4 d 可见肾小管上皮细胞肿胀变性严重,肾小管和集合管扩张明显,部分肾小管萎缩消失,纤维结缔组织增生,结构辨认不清;6 d 绝大多数肾小管萎缩消失,可见明显的条索状纤维样结构,正常肾脏结构破坏不可辨,见图 2、图 3。

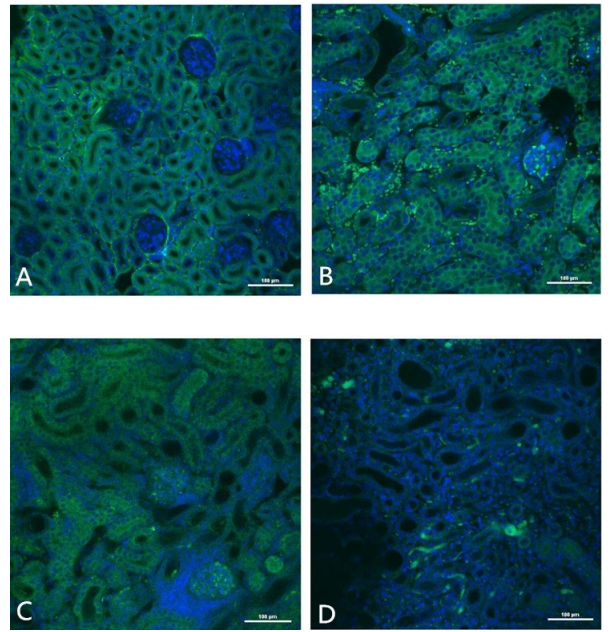


图 2 激光共聚焦显微镜下梗阻侧肾脏二维结构(200×)  
注:A、B、C、D 分别代表 0 d、2 d、4 d、6 d 实验组梗阻侧肾脏变化

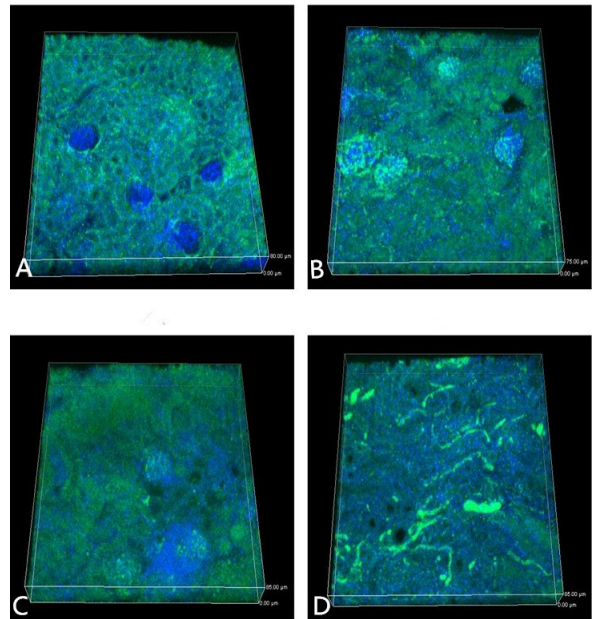


图 3 激光共聚焦显微镜下梗阻侧肾脏三维空间结构(200×)  
注:A、B、C、D 分别代表 0 d、2 d、4 d、6 d 实验组梗阻侧肾脏变化

2.3 对照组 HE 染色法示病理学改变 HE 染色显示 0 d 肾脏结构清晰,肾小球结构完整,小管管径正常,无扩张;2 d 时梗阻侧肾脏肾小球结构基本正常,部分肾小管扩张;4 d 可见肾小管上皮细胞肿胀变性,肾小管和集合管扩张明显,部分肾小管萎缩消失,结构辨认不清;6 d 绝大多数肾小管萎缩消失,可见明显的

条索状纤维样结构,见图 4。

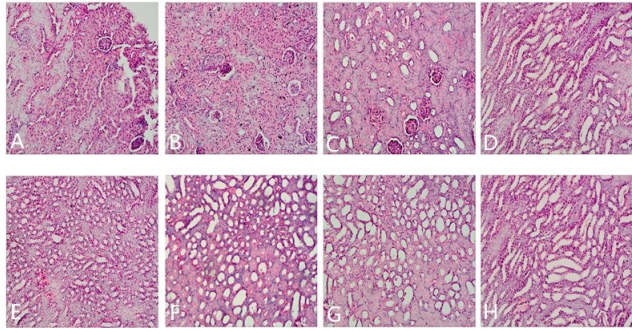


图 4 HE 染色病理图片(100×)

注:A、B、C、D 分别代表 0 d、2 d、4 d、6 d 对照组梗阻侧肾小球变化,E、F、G、H 分别代表 0 d、2 d、4 d、6 d 对照组梗阻侧肾小管变化

2.4 定量分析结果 TissueFAXS™ Cytometry 组织细胞定量分析系统对实验组利用激光共聚焦显微镜扫描得到二维图片中的肾小管上皮细胞数量和肾小管管腔面积进行定量分析,发现同一个组织的不同层面肾小管上皮细胞数量和肾小管管腔面积分布明显不同,见图 5、图 6。

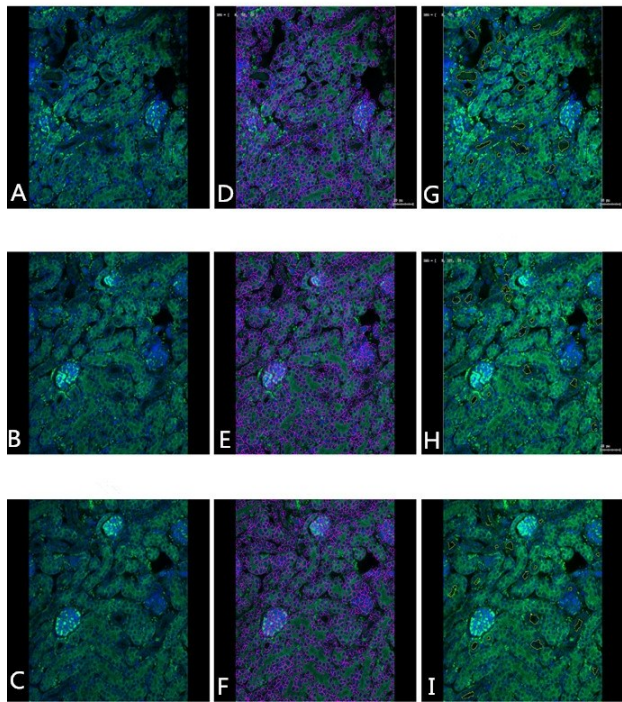


图 5 定量分析结果(200×)

注:A、B、C 为激光共聚焦显微镜扫描同一组织的 3 个不同层面图片,D、E、F 分别为肾小管上皮细胞胞核标识图,G、H、I 分别为肾小管管腔内经标识图

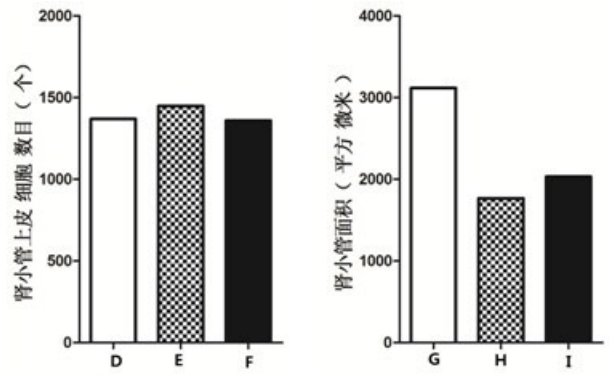


图 6 共聚焦扫描不同层面得到不同信息

### 3 讨论

CLARITY 技术从 2013 年首次被报道之后,其应用领域主要为脑和神经结构、功能及相关疾病机制方面<sup>[5-6,8-9]</sup>,其主要原因可能为脑组织里的脂质成分较容易被 SDS 为主要成分的清洗剂去除,从而使组织器官变得透明。目前有文献报道<sup>[10]</sup>表明 1000 μm 的深度已经足够展示组织局部的三维层面结构,于是我们选择小鼠肾脏 1 mm 切片进行研究。组织切片经透明化处理,特异性抗体荧光标记肾脏基底膜 IV 型胶原蛋白,于共聚焦显微镜下对样品作光学切片式逐层扫描并三维图像重建。

本实验通过连续动态的形态学水平观察发现,急性肾损伤早期表现为肾小管上皮细胞扁平化、扩张,随着梗阻时间延长,逐渐出现肾小管萎缩消失、结构辨认不清,纤维结缔组织增生,肾脏出现纤维化。国内外大量研究亦表明<sup>[11-13]</sup>,输尿管梗阻所致的急性肾损伤,前期形态学改变主要表现为肾小管管腔扩大、肾间质炎性细胞浸润、肾小球仅有轻微肿胀;后期才出现纤维组织广泛增生以及肾小球的进行性减少,肾功能完全丧失。本实验从透明化后在激光共聚焦显微镜下观察以及 HE 染色常规镜下观察均亦证明此结论。

目前,病理诊断是现代医学界中疾病病理学检查的“金标准”,而传统 HE 染色法是石蜡切片技术中最为常用的染色方法之一。通过 HE 染色图像来观察、分析和推断组织在三维空间的真实分布情况是困难的,且单凭平面图像做判断将会丢失组织的真实结构信息。而在多数病理组织中,不同组织层面的病理改变并不一致。本实验中激光共聚焦扫描同一组织不同深度层面的结果证实了这种差异,即在急性肾损伤的肾组织中肾小管的形态结构改变在不同部位是非均一化的。共聚焦扫描三维重构分析能提供不同位置的信息,较单纯石蜡切片做二维 HE 染色分析能提供更丰

富的信息,是传统病理检测的有力补充。而在较厚的组织上做激光共聚焦扫描离不开透明化技术的支持。

本研究中组织经过透明化技术处理后共聚焦三维重建结构轮廓虽然存在,但清晰度稍差。Liu AK等<sup>[6]</sup>研究表明 CLARITY 技术似乎受到几个因素的限制:首先,不同的试剂匹配对光学透明度和荧光信号的保存有不同的影响,目前所用的试剂配比可能仍非最佳;其次,显微镜物镜的光学特性,特别是不同工作距离对观测深度有影响,目前最先进的长距物镜可达组织内 12 mm 的深度;第三,抗体的渗透深度或许是目前最大的限制。因此,需要进一步确定针对不同抗原的抗体穿透的实际极限和最佳参数(包括稀释倍数和孵育时间),以便彻底研究不同组织结构的成像深度。本课题组前期发现使用自制装置可缩短肝脏切片的清除时间<sup>[14]</sup>,为不同组织器官疾病机理研究增加了进一步研究的可能。CLARITY 是一种应用前景深远的技术,本研究初步表明未来其不仅可用于神经科学领域的研究,也将适用于其他组织<sup>[15]</sup>,特别是在这些组织的病理检测技术革新上。

综上所述,对于单侧输尿管梗阻所引起的急性肾损伤研究而言,HE 染色观察的是二维平面结构,而 CLARITY 技术不仅可以观察到与 HE 染色相同的结果,且通过 CLARITY 技术处理后,利用共聚焦显微镜可观察不同层面的结构表现,在损伤早期就可观察到组织病理结构改变。CLARITY 技术可以将二维提升到三维,这一发现为 CLARITY 技术在病理研究领域进一步应用提供了有力证据。

#### 参考文献:

- [1] 鄢国斌,何剑波,连芳. CLARITY 技术及其在生物学研究中的应用进展[J]. 中国癌症防治杂志,2015,7(2):139-141.
- [2] O'Connell W, Shah J, Mitchell J, et al. Obstruction of the Biliary and Urinary System[J]. Techniques in vascular and interventional radiology,2017,20(4):288-293.
- [3] Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. Kidney Int,2012,81(5):442-448.
- [4] Chung K, Wallace J, Kim SY, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems[J]. Na-

ture,2013,497(7449):332-337.

- [5] Phillips J, Laude A, Lightowers R, et al. Development of passive CLARITY and immunofluorescent labelling of multiple proteins in human cerebellum: understanding mechanisms of neurodegeneration in mitochondrial disease[J]. Scientific reports,2016,6(1):26013.
- [6] Liu AK, Hurry ME, Ng OT, et al. Bringing CLARITY to the human brain: visualization of Lewy pathology in three dimensions[J]. Neuropathology and Applied Neurobiology,2016,42(6):573-587.
- [7] Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, et al. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing[J]. Cell,2014,158(4):945-958.
- [8] Willard AM, Gittis AH. Mapping neural circuits with CLARITY[J]. Elife,2015,9(4):e11409.
- [9] Zheng H, Rinaman L. Simplified CLARITY for visualizing immunofluorescence labeling in the developing rat brain[J]. Brain structure & function,2016,221(4):2375-2383.
- [10] Tomer R, Ye L, Deisseroth K, et al. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues[J]. Nature protocols,2014,9(7):1682-1697.
- [11] Yang J, Liu Y. Delayed administration of hepcytein growth factor reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Integr Physiol,2003,284(2):349-357.
- [12] Frazier KS, Paredes A, Dube P, et al. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation[J]. Vet Pathol,2000,37(4):328-335.
- [13] Klahr S. Nephrology forum: obstructive nephropathy[J]. Kidney Int,1998,54(1):286-300.
- [14] 袁小川,连芳,赵荫农,等. 基于电泳温度提升建立大鼠肝快速透明化模型[J]. 中国生物工程杂志,2017,37(9):65-70.
- [15] Lee H, Park JH, Seo I, et al. Improved application of the electrophoretic tissue clearing technology, CLARITY, to intact solid organs including brain, pancreas, liver, kidney, lung, and intestine[J]. BMC developmental biology,2014(14):48.

收稿日期:2018-09-23;修回日期:2018-10-18