·生物应用·

超分辨成像技术在神经科学研究中的应用

金锡敏[a] 马吉楠[a] 吕媛媛[a] 梁星光[a,b*]

（浙江大学医学院附属第一医院 a.中心实验室；b.临床药学部，杭州 310000）

【摘要】 超分辨成像技术是神经科学研究领域论证相关生理和病理学分子现象、变化过程和功能调控的重要技术手段，它突破了传统光学显微镜的衍射极限，使科学家能够在纳米尺度研究生物结构和物质细节。各类超分辨成像技术从时空分辨率、三维层析能力、活体成像能力等不同方面助力研究者更好地探索神经科学，从而解析神经突触相关结构以及神经递质受体的纳米级分布和动态变化，并为进一步研究神经退行性疾病提供关键细节。本文总结了近年来超分辨成像技术的阶段性发展以及不同技术的优势与局限，着重介绍了超分辨成像技术在神经系统超微结构成像、活体动物成像、脑部深度成像以及神经退行性疾病、药物开发等相关研究中的应用，旨在为其在神经科学研究中的高效、合理应用提供参考。

【关键词】 超分辨成像；神经科学；活体成像；神经退行性疾病

【中图分类号】 O436; R741 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11876/mimt202504009

The application of super-resolution imaging technology in neuroscience research

*Jin Ximin[a], Ma Jinan[a], Lyu Yuanyuan[a], Liang Xingguang[a,b *]*

(a. Central Lab; b. Department of Clinical Pharmacy, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310000, China)

【Abstract】 Super-resolution imaging technology is an important technical means for demonstrating related physiological and pathological molecular phenomena, change processes and functional regulation in the field of neuroscience research. It breaks through the diffraction limit of traditional optical microscopes, enabling scientists to study biological structures and material details at the nanoscale. Various super-resolution technologies assist researchers in better exploring neuroscience from different aspects such as spatiotemporal resolution, three-dimensional tomography capabilities, and in vivo imaging capabilities, thereby analyzing the nanoscale distribution and dynamic changes of synaptic structures and neurotransmitter receptors, and providing key details for further research on neurodegenerative diseases. This article summarizes the phased development of super-resolution imaging technology in recent years, as well as the advantages and limitations of different technologies. It particularly introduces the application of super-resolution imaging technology in ultra-microstructure imaging of the nervous system, imaging of living animals, deep imaging of the brain, and related research on neurodegenerative diseases and drug development. It aims to provide references for their efficient and reasonable application in neuroscience research.

【Key words】 Super-resolution imaging; Neuroscience; In vivo imaging; Neurodegenerative diseases

传统的光学显微成像技术由于光学衍射现象的存在，其横向分辨率往往止步于 200 nm，已无法满足现代医学研究对超微结构及其动态变化过程的高分辨观察要求，限制了对生理、病理过程及相关分子机制的深入研究和探索。近年来，各种超分辨成像技术的开发和应用，为医学和生命科学领域的研

基金项目：浙江省自然科学基金探索类项目（LY21H090012）

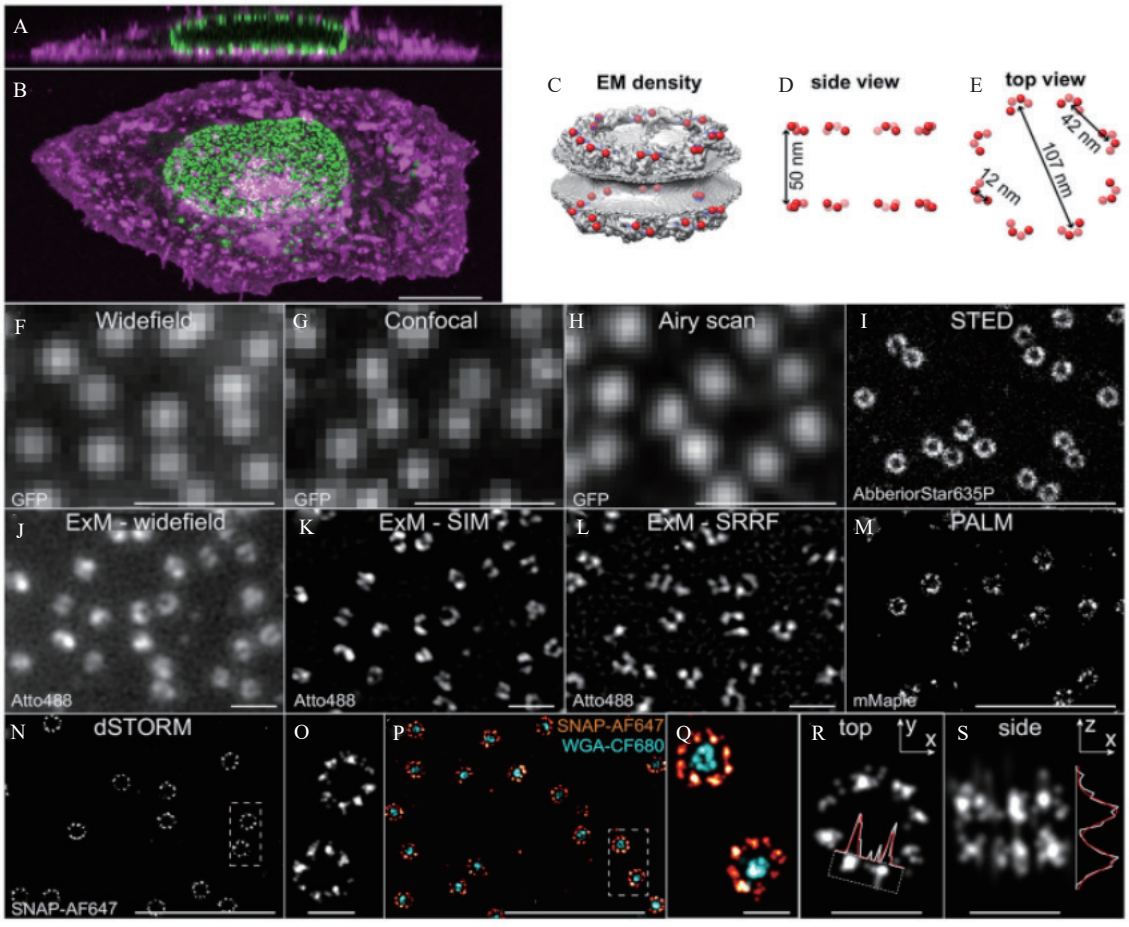
第一作者：金锡敏，男，硕士研究生，助理实验师，研究方向：细胞自噬

通信作者：梁星光，男，博士研究生，高级实验师，研究方向：荧光探针开发及其生物学应用

究带来了新的技术契机。在神经科学领域，超分辨成像技术自诞生以来就被广泛应用于相关研究。例如，树突棘和突触的生成及其变化、神经细胞中细胞器的生理和病理状态记录、蛋白质异常聚集等病理结构对神经细胞的影响，可结合多种超分辨成像技术的特点单独或综合应用，达到高效、有力、客观论证相关科学问题的效果。本综述从超分辨成像技术的原理入手，对比了不同超分辨成像技术的优势和局限性，着重介绍了各类超分辨成像技术在神经科学基础研究中的阶段性进展及其在神经退行性疾病研究中的应用，旨在为推动该技术在神经科学研究中的应用提供参考。

1 超分辨成像技术介绍

随着电镜以及原子力显微镜等技术的出现，成像技术分辨率的上限达到了纳米尺度。但是这些技术对样品的破坏性较大，并不适合生物样本和活细胞的观测，各种模态的超分辨成像技术应运而生，能够达到的极限分辨率也存在较大差异[1]，见图1。目前主流的超分辨成像技术有3种：受激辐射损耗显微技术（stimulated emission depletion microscopy, STED）、结构光照明显微技术（structured illumination microscopy, SIM）、单分子定位显微成像技术（single molecule localization microscopy, SMLM）[2]。



注：STED为受激辐射损耗显微技术；SIM为结构光照明显微技术；SRRF–Stream为全新的实时超分辨显微技术；PALM为光激活定位显微镜技术；dSTORM为直接随机光学重建显微技术。

图1 各类成像技术分辨率对比[1] A、B为使用共聚焦拍摄表达Nup96–GFP细胞系的*x*-*z*图像与*x*-*y*图像；C—E为核孔复合体的电子密度图像，红色为Nup96蛋白（D为侧视图，E为俯视图）；F—Q为不同成像技术拍摄核孔复合体得到的图像（F为宽场显微镜，G为共聚焦显微镜，H为使用Airyscan的共聚焦显微镜，I为STED显微镜，J为宽场显微镜结合膨胀显微成像技术，K为SIM显微镜结合膨胀显微成像技术，L为SRRF–Stream显微镜结合膨胀显微成像技术，M为PALM显微成像技术，N、O为dSTORM显微成像技术单色成像，P、Q为dSTORM显微成像技术双色成像）；R、S为将核孔复合体作为目标来测定成像技术在*x*, *y*平面和*z*轴上的分辨率

STED通过改变激发光的模式抑制位于激发中心外围的的荧光发射，当激发态荧光团遇到与激发态和基态能量差匹配的光子时，可以通过受激发射将其带回到基态。SIM使用空间编码的结构光场来代替均匀光场进行照明，产生低频的莫尔条纹，再解析莫尔条纹获取其中包含的高频信息。SMLM通过特殊的荧光标记方式得到荧光闪烁样本，利用荧光分子稀疏发光来减小衍射现象对于分辨率的影响，用时间分辨率换取空间分辨率。SMLM中最常见的是光激活定位显微镜技术（photoactivation localization microscopy, PALM）和随机光学重建显微技术（stochastic optical reconstruction microscopy, STORM）[1]。

各种超分辨成像技术存在各自的优势与局限，见表1。因其不同的技术特色导致其有各自适配的应用场景，例如，SIM在分辨率上不及STED和SMLM，但具有最快的成像速度，而SMLM有最高的分辨率但成像速度最慢。SIM最适合活细胞的长时间成像，而STED较适用于活细胞短时间成像和活体组织深层成像，SMLM则相对不适合活体成像[2-4]。

表1 主流超分辨成像技术的优势与局限

项目	STED	SIM	SMLM
技术原理	受激发射损耗改变PSF	结构照明法形成莫尔条纹	分批采集荧光闪烁信号
分辨率	40 nm	80～100 nm	5～10 nm
成像速度	较快	最快	最慢
光毒性	较高	最低	最高
制样要求	无特殊要求	无特殊要求	需让样本进行荧光闪烁
算法要求	无特殊要求	需进行算法重构	需进行算法重构
染料要求	需使用STED染料	无特殊要求	能荧光闪烁的特殊分子
适用样本	固定标本、活细胞	固定标本、活细胞	固定标本、活细胞

注：STED为受激辐射损耗显微技术；SIM为结构光照明显微技术；SMLM为单分子定位显微成像技术；PSF为点扩散函数。

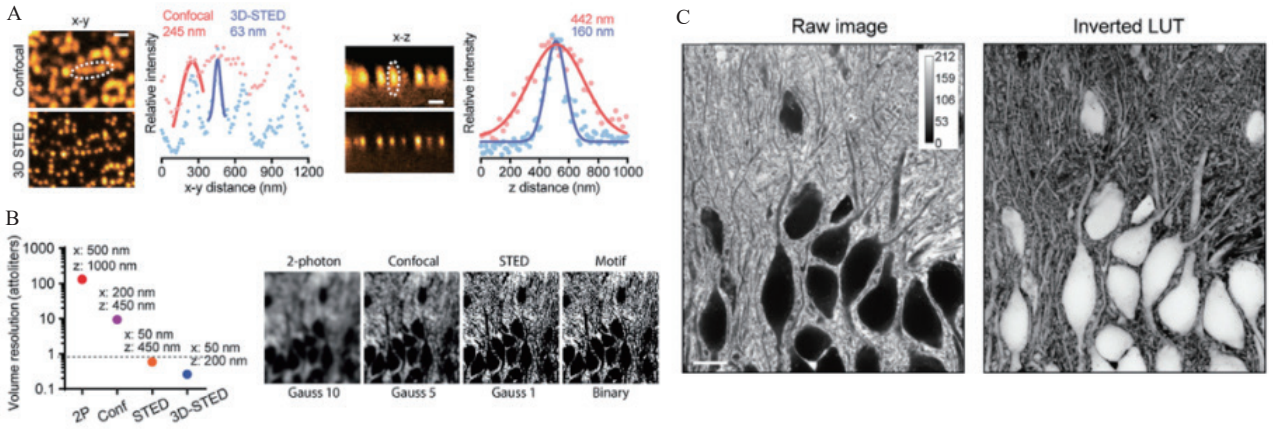
2 超分辨成像技术在神经科学研究中的应用

2.1 神经系统超微结构成像

树突棘是树突分枝上的棘状突起，是神经元间形成突触的主要部位。部分树突棘的大小位于衍射极限范围内，再加上高密度分布的树突结构，使得其结构细节的研究较为困难[5]。深入了解树突棘以及突触的结构，需要在满足纳米尺度的分辨率的同时也能实现活体记录，其中应用最为广泛的是STED。早在2008年，STED显微镜的发明者Stefan W. Hell就开始将其用于神经科学研究。其团队的Westphal等[6]对分离的活体神经元中突触囊泡的运动进行了时间序列成像。不仅如此，其团队的Nägerl等[7]还解析了树突棘颈的宽度和树突棘头的曲率，并展现了突触顶端的形状和结构。2011年，STED首次实现了活细胞中双色荧光成像[8-9]，随后在同年实现了活体脑组织中的双色荧光成像[10]。

2014年该技术实现了3D–STED双色成像[11]，并于2018年被应用于脑切片成像（图2）[12]，2021年被推广到活体小鼠成像[13]。由于3D–STED在轴向平面的常规分辨率只能达到150 nm左右，导致轴向平面的分析存在局限性，因此，一些可提高图像分辨率的分析插件被用于辅助分析，如辅助分析树突棘在超分辨成像中的空间几何形状[14]。

Stefan W. Hell团队通过结合STED与SMLM，进一步开发了最小光子通量（minimal photon fluxes, MINFLUX）荧光显微技术。MINFLUX技术可实现更高的空间和时间分辨率，且需要的荧光光子更少[15]。2023年通过对驱动蛋白追踪的技术优化，实现了空间定位精度达到2 nm、时间精度达到亚毫秒的动态追踪[16-17]。随后，该团队于2024年使用MINFLUX技术，在神经突触结构中实现了驱动蛋白kinesin–1的动态监测[18]，在活体神经元中实现了动力蛋白dynein的动态监测[19]。



注：STED为受激辐射损耗显微技术；PSF为点扩散函数。

图2 使用3D–STED进行细胞外液标记的超分辨阴影成像[12] A为使用40 nm荧光微球测量共聚焦和3D–STED在横向和轴向上的PSF；B为计算不同成像模式（双光子、共聚焦、STED、3D–STED）的三维分辨率以及空间滤波的影响；C为使用3D–STED采集的CA1区海马神经元椎体的原始图像（左侧）和逆转图像（右侧）

2.2 活体动物成像

STED独特的三维层析能力可实现更深的成像，在活体动物成像中具有优势。Stefan W. Hell团队[20–21]首先尝试了活体超分辨成像，他们记录了活体小鼠的树突棘活动和树突丝状肌动蛋白的形态变化，并在活体小鼠大脑视觉皮层成像了树突棘形态的动态变化。Wijetunge等[22]还通过超分辨成像技术，发现小鼠树突棘结构的头部会随年龄增长而变小，而树突棘的颈部则会变宽、变小的精细变化。

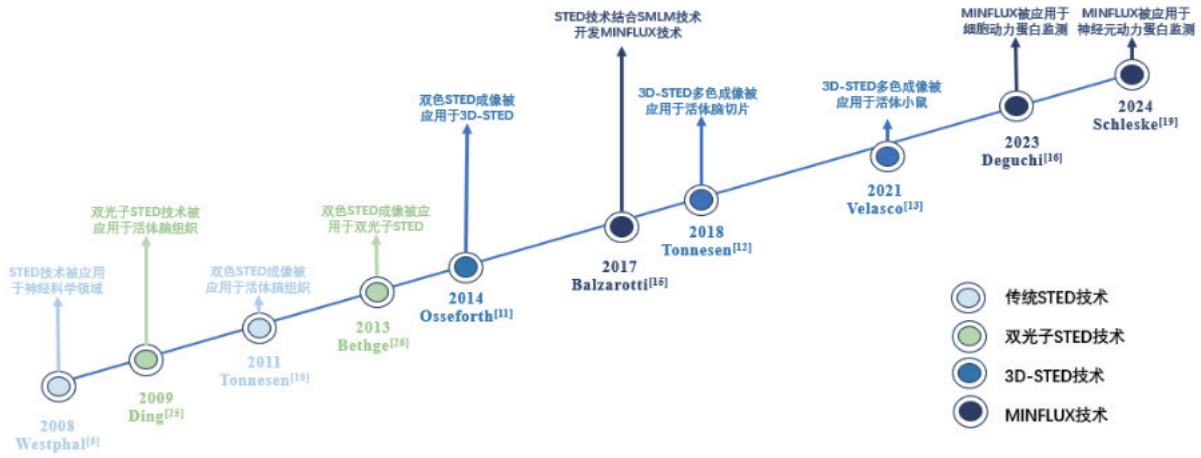
Willig等[23]将STED与开关激光器及样本表达的可逆光开关荧光蛋白结合，实现了小鼠大脑视觉皮层神经元的多通道、时间序列、超分辨成像。Steffens等[24]对小鼠大脑神经元树突棘进行长时程活体成像，实现了长达28 d的体内树突棘监测，丰富了STED在长期活体成像中的应用案例。

2.3 大脑结构深部成像

由于STED的激光穿透能力相对有限，于是研究人员通过结合双光子技术，有效地加强了穿透能力。2009年，Ding等[25]首次报道了活体脑组织的双光子受激辐射损耗显微技术（two–photon excitation STED, 2P–STED）成像，实现了在深层组织样品中对突触顶端形态的观测。随后Bethge[26]在2013年实现了双色的2P–STED成像。Pfeiffer等[27]采用2P–STED，对小鼠大脑海马体CA1区的椎体神经元进行了活体成像。

此外，Velasco等[13]在2P–STED的基础上，结合自适应光学等相差校正技术，减小了STED光斑在活体组织中的畸变，在活体小鼠大脑中深达76 μm的部位实现了三维超分辨成像，然而受到活体组织对光散射的干扰，深层组织成像仍然存在不可避免的局限性。

综上所述，超分辨成像技术因其技术特性在神经领域得到了快速发展与应用，其中STED技术因其技术特性得到了最广泛的应用。STED技术自2008年起被应用于神经科学领域的基础研究后，持续发展出了双色STED、双光子STED、3D–STED、MINFLUX等各有特色的技术变体，并在神经系统超微结构成像、活体动物成像、大脑结构深部成像中得到了突破性的应用，见图3。



注：STED为受激辐射损耗显微技术；SMLM为单分子定位显微成像技术；MINFLUX为最小光子通量荧光显微技术。

图 3 超分辨成像技术在神经科学研究中应用的阶段性进展

3 超分辨成像技术在神经退行性疾病研究中的应用

3.1 可视化帕金森病（Parkinson's disease, PD）相关α–突触核蛋白（α–synuclein, α–syn）的异常聚集及其动力学变化

病理性α–syn在中脑黑质的淀粉样聚集是PD等突触核蛋白病的典型病理标志之一[28]。Nugent等[29]利用双色STORM成像，在体外和神经母细胞瘤细胞系中对α–syn原纤维的形成及向两侧延伸生长的过程进行了动态记录，并证实不同原纤维在生长速率上存在显著异质性，为明确α–syn相关PD的发病机制提供了有力的实验依据。Shrivastava等[30]通过PALM/STORM，在神经元中实现了质膜上外源性寡聚体与α–syn原纤维相互作用的可视化，为探索在细胞表面α–syn组装的伴侣蛋白提供了支持。Moors等[31]利用STED，明确了PD患者脑部组织各种翻译后修饰的α–syn在不同脑区的亚细胞分布特征，为路易小体形态发生的调节机制提供了新的见解。Zhao等[32]也通过STED，在大鼠皮层神经元中发现介导囊泡与靶膜融合的突触体相关蛋白23和突触蛋白4可通过多种囊泡途径调控α–syn的分泌，揭示了α–syn在细胞间传递的潜在机制。

3.2 动态示踪阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）相关病理性标志蛋白变化

β–淀粉样蛋白（amyloid β–protein, Aβ）斑块形成和tau蛋白缠结是与AD密切相关的病理性标志[33–34]，考察Aβ和tau蛋白的异常聚集及其动力学变化，对于明确AD的发病机制至关重要。Esbjörner等[35]通过荧光寿命成像结合STORM，在神经母细胞瘤细胞中发现β–淀粉样蛋白1–42（Aβ1–42）聚集体的形成速度显著快于β–淀粉样蛋白1–40（Aβ1–40），这有助于了解胞内Aβ促进AD发展的病理机制。Zhang等[36]利用STED，对AD患者、轻度认知障碍患者脑脊液中的相关聚集体进行检测，发现STED能够识别脑脊液中高、低分子量的Aβ和Tau蛋白聚集体，并通过量化聚集体的数量和粒径来区分患者。结果显示，聚集体的数量和大小与认知障碍的严重程度呈正相关，为疾病进展的评估提供了新的监测手段。Iulita等[37]通过SIM，在AD大鼠模型的脑切片中间神经元中观察Aβ及其前体蛋白，发现原先弥漫的Aβ转位至胞内囊泡，明确了病理过程中Aβ的亚细胞定位。Yu等[38]也通过STED和STORM，发现在神经元中Aβ主要存在于200 ~ 600 nm的囊泡结构中，且这些囊泡分布在和树突棘相连的突触前区域而非突触后区域，进一步明确了AD病理过程中Aβ在神经元中的分布特征。

Michel等[39]通过荧光寿命成像结合双色STORM，对神经母细胞瘤细胞中的tau蛋白进行动态示踪，观察到神经细胞摄取单体tau蛋白后，tau蛋白发生聚集并感染邻近细胞，为tau蛋白传播的

病理机制提供了强有力的证据。Chen等[40]还利用荧光寿命成像结合SIM，实现了神经母细胞瘤细胞内tau聚集和成簇的超分辨荧光寿命成像，同时具备了高通量和可定量的特性。这种荧光寿命定量结合SIM成像定性的双技术模态，为患者治疗过程和药物筛选过程提供了有效的监测手段。超分辨成像技术在神经退行性疾病相关病理结构研究中的代表性应用见表2。

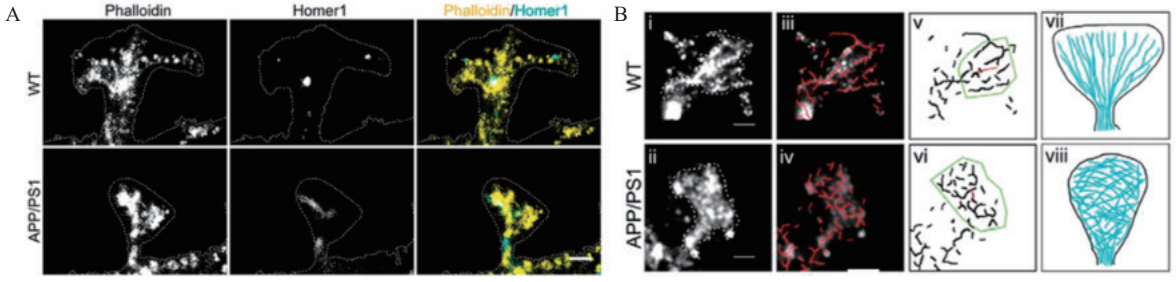
表2 超分辨成像技术在神经退行性疾病相关病理结构研究中的代表性应用

相关疾病	使用的成像技术	研究样本	主要研究对象
PD	STORM	体外培养神经元	外源性寡聚体、α-syn原纤维[30]
		体外催化模型	α-syn原纤维的形成和生长[29]
	STED	PD患者脑组织	α-syn的亚细胞分布特征[31]
		大鼠皮层神经元	α-syn蛋白的分泌[32]
AD	STORM	AD患者神经元	Aβ聚集[35]
	SIM	AD大鼠模型	Aβ亚细胞水平定位[37]
		AD患者、轻度认知障碍患者的脑脊液	脑脊液中Aβ聚集体的数量和大小[36]
	荧光寿命成像结合双色STORM	体外培养神经元	tau蛋白摄取与聚集[39]
	荧光寿命成像结合SIM	体外培养细胞系	tau蛋白聚集与成簇[40]
	STORM、STED	体外培养海马神经元	Aβ在突触前后的定位[38]

注：PD为帕金森病；STORM为随机光学重建显微技术；α-syn为α-突触核蛋白；STED为受激辐射损耗显微技术；AD为阿尔茨海默病；Aβ为β-淀粉样蛋白；SIM为结构光照明显微技术。

3.3 检测AD相关蛋白分布

在AD早期，神经元往往会出现突触功能障碍和树突棘丧失等异常。如图4所示，Kommaddi等[41]通过STORM，在AD小鼠模型中发现丝状肌动蛋白（filamentous actin, F-actin）在树突棘内的结构变化及后续神经元纤维排列严重紊乱的现象，证实了F-actin在树突棘中起到稳定作用。在AD患者的尸检样本中，也发现了类似的F-actin病理变化，其稳定性与患者的记忆功能水平呈正相关。该研究为进一步探索AD患者早期树突棘内结构的病理改变提供了实验支撑。



注：SMLM为单分子定位显微成像技术；AD为阿尔茨海默病；F-actin为丝状肌动蛋白。

图4 超分辨成像技术在神经退行性疾病动物模型中的应用[41] A为SMLM观察AD小鼠模型中的F-actin解聚；B为SMLM观察分析AD小鼠模型中的神经元结构病理改变

γ-分泌酶在AD病理进展中扮演着重要角色。Schedin-Weiss等[42]通过STED和STORM，在2～6 nm分辨率水平发现在小鼠海马神经元中γ-分泌酶定位于突触前和突触后区室，且γ-分泌酶在突触后膜的突触间隙以及N-甲基-D-天冬氨酸受体（N-methyl-D-aspartic acid receptors, NMDARs）附近富集，其在突触前后的表达与突触的成熟呈正相关。该研究对γ-分泌酶实现了高精度的亚细胞定位，有助于进一步了解其在AD病理进展中的重要作用。

桥连整合因子1（bridging integrator 1, BIN1）可与胞内tau蛋白相互作用并减少胞外tau蛋白的摄取[43]。De Rossi等[44]通过STED，以33 nm的分辨率发现在AD转基因小鼠模型中淀粉样沉淀的邻

近区域存在BIN1异常累积的病理现象。接着，该团队人员采用STORM，在20 nm的分辨率水平明确了BIN1主要定位于兴奋性突触前神经末梢，并通过STED发现SNARE相关蛋白及参与内吞作用的突触前蛋白簇密度降低，进而影响突触的正常功能[43]。Schürmann等[45]则通过SIM，在小鼠神经元中分析了BIN1与多种相关蛋白的定位情况。这些研究通过不同的超分辨成像技术示踪了BIN1的定位情况，有助于研究者进一步揭示BIN1在AD进展中的功能。

脑源性神经营养因子（brain–derived neurotrophic factor, BDNF）在神经元损伤后修复、防止神经细胞退行性病变等诸多方面发挥作用[46]。BDNF运输异常是诱发AD等神经退行性疾病的潜在风险因素。Scaramuzzino等[47]通过STED，在体外培养的皮层神经元中发现，钙调神经磷酸酶可使亨廷顿蛋白（huntingtin, HTT）去磷酸化，从而干扰BDNF运输，HTT蛋白的异常可能导致亨廷顿舞蹈症（Huntington’s disease, HD）。该研究揭示了钙调神经磷酸酶对BDNF运输的调控机制，有助于探索BDNF在神经退行性疾病中的作用。超分辨成像技术在AD相关蛋白研究中的应用见表3。

表3 超分辨成像技术在AD相关蛋白研究中的应用

相关疾病	使用的成像技术	研究样本	主要研究对象
AD	STORM	AD小鼠模型	F–actin解聚[41]
	STED	AD转基因小鼠模型	BIN1的异常累积[44]
	SIM	体外培养神经元	BIN1的定位[45]
	STORM、STED	小鼠海马神经元	γ–分泌酶分布[42]
		条件性敲除BIN1的小鼠模型	BIN1功能和突触中蛋白质精确排列的重要性[43]
AD/HD	电镜、STED	HTT基因突变小鼠模型	BDNF的运输[47]

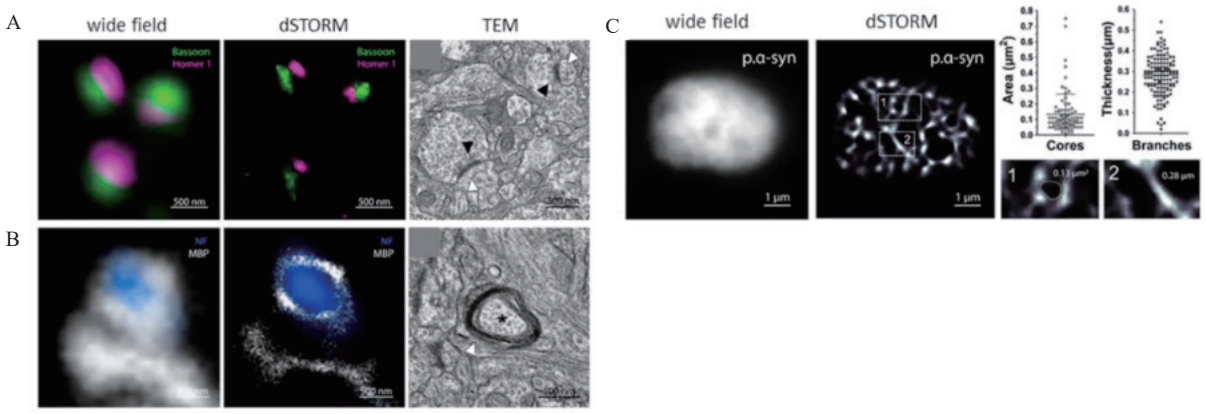
注：AD为阿尔茨海默病；STORM为随机光学重建显微技术；F–actin为丝状肌动蛋白；STED为受激辐射损耗显微技术；BIN1为桥连整合因子1；SIM为结构光照明显微技术；HD为亨廷顿舞蹈症；HTT为亨廷顿蛋白；BDNF为脑源性神经营养因子。

3.4 检测神经退行性疾病患者脑组织中相关蛋白分子

超分辨成像技术目前也被用来检测患者脑组织中蛋白分子含量的变化。Nishikawa等[48]通过SIM，检测了AD患者脑组织中tau蛋白的分子含量，除了过度磷酸化的tau蛋白外，还鉴定到了筏状微结构域的标志物，并与细胞周期蛋白依赖性激酶5（cyclin–dependent kinase 5, CDK5）共定位，证明了携带tau蛋白激酶的囊泡可能参与tau蛋白的修饰和神经纤维缠结的形成，有助于研究者进一步探索AD患者神经纤维缠结的形成机制。Welikovitch等[49]通过SIM，在暂未发生痴呆的AD患者脑组织中发现了可溶性Aβ均匀分布在大脑脆弱区域神经元胞质的病理现象，且早于过度磷酸化的tau蛋白和Aβ斑块出现。该研究表明神经元内Aβ的逐渐累积可能是AD早期的触发因素。

Querol–Vilaseca等[50]将STED和阵列断层扫描相结合，在散发性和遗传性AD患者脑组织中检测到了100 nm量级的非原纤维Aβ结构，揭示了AD患者的淀粉样斑块具有致密的核心区（~0.022 μm^3）和含有不同大小可溶性Aβ的外周晕圈结构（~0.003 μm^3）。Benda等[51]则通过STED，对AD患者脑组织的tau蛋白纤维的集束及排列进行检测，并对tau蛋白纤维和突触棘的结构关系进行研究。这些研究通过STED，对Aβ和tau蛋白纤维的超微结构进行了解析，有助于深入阐明AD的发病机制。

对病理结构更精细的探索则需要依赖SMLM。Codron等[52]通过STORM，在神经退行性疾病患者的脑组织中，对神经元轴突和突触的结构进行解析，如图5所示。STORM重构的神经元结构与电子显微镜获得的超微结构相近，同时揭示了AD患者脑部的Aβ和tau蛋白的原纤维纳米结构。而PD患者脑部的路易小体则呈现出环状结构并伴随网状的α–syn。该研究通过SMLM对神经退行性疾病的超微结构进行解析，有助于进一步了解神经退行性疾病中病理蛋白的相互作用及揭示疾病的异质性。超分辨成像技术在检测神经退行性疾病患者脑组织中相关蛋白分子中的应用见表4。



注：SMLM为单分子定位显微成像技术；AD为阿尔茨海默病；PD为帕金森病。

图5 超分辨成像技术检测神经退行性疾病患者脑组织病理性蛋白和结构[52] A为SMLM成像AD患者脑部中央突触；B为SMLM成像AD患者脑部轴突神经丝；C为SMLM成像PD患者脑部中路易小体

表4 超分辨成像技术在检测神经退行性疾病患者脑组织中相关蛋白分子中的应用

相关疾病	使用的成像技术	研究样本	主要研究对象
AD	SIM	AD患者脑组织	tau蛋白纤维的分子含量[48]
		暂未发生痴呆的AD患者脑组织	可溶性Aβ的分布[49]
	STED	AD患者脑组织	tau蛋白纤维的集束与排列[51]
	STED结合阵列断层扫描	散发性和遗传性AD患者脑组织	淀粉样斑块致密的核心区域和外周晕圈结构[50]
	STORM	AD患者脑组织	Aβ和tau蛋白的原纤维纳米结构[52]
PD	STORM	PD患者的脑切片	路易小体环状结构并伴随网状的α–syn蛋白[52]

注：AD为阿尔茨海默病；SIM为结构光照明显微技术；Aβ为β–淀粉样蛋白；STED为受激辐射损耗显微技术；STORM为随机光学重建显微技术；PD为帕金森病；α–syn为α–突触核蛋白。

3.5 神经系统相关疾病的药物开发

SIM由于其快速成像和低光毒性的特性，目前已被应用于神经系统相关疾病的药物开发。Hilt等[53]通过SIM，在体外培养的人类神经元细胞中验证了一种自旋标记的劝（双功能抗淀粉样蛋白）能够阻断Aβ的积累，并下调其氧化应激水平。该研究支持了双功能抗淀粉样蛋白在抵消内源性和外源性Aβ构象毒性方面的作用，为小分子药物的开发提供了更多的可能性。在超分辨成像技术的帮助下，研究人员设计了一种直径约为4.7 nm的膦酸钙纳米载体（calcium phosphate nanoparticles, CPNPs），能够有效抑制Aβ的聚集，且CPNPs具有非常优异的光物理性能，适用于超分辨成像技术来进行精确定位[54]。该研究为AD药物的设计提供了新的思路。

4 总结与讨论

综上，超分辨成像技术在神经科学研究相关结构和功能成像中发挥着重要作用。各种超分辨成像技术各具优势，需结合应用场景和技术特色灵活运用，才能达到最佳成像效果。STED兼顾成像分辨率和速度优势，涵盖大部分成像需求，并且具有三维层析能力，相对其他超分辨成像技术可实现更深的成像，应用相对广泛。但STED的成像质量依赖于激光能量强度，其使用的染料在波长上也有要求，因此在光毒性、染料稳定性、新型染料量子产率等方面，仍需要优化和开发。SMLM可在生物细胞、组织等样本中，基于算法提供纳米尺度分辨率的成像解析，可用于观察一些对分辨率要求较高的结构并进行解析。SIM则凭借其低光毒性、成像速度相对较快等特性，适用于长时程、活细胞成像，可用于对光照敏感细胞如神经元的成像研究。MINFLUX技术将光学分辨率提高到了纳米级别，MINFLUX技术已被成功应用于检测活体神经细胞的动力蛋白等研究，但受其易用性和成像速度等因素限制，还有待进一步开发和推广。

在神经科学研究中，活体组织的深层成像对揭示相关生理和病理过程的表型和功能特征至关

重要。由于传统双光子技术能够实现深层组织成像，但分辨率较低，因此结合 STED与双光子的2P–STED是目前成像最深的超分辨成像技术。SIM也能够结合双光子技术，但是由于该技术通过电光调制器来改变入射结构光的相位和角度，再用双轴振镜对样品进行逐点扫描，因此相较于STED—双光子联用，SIM—双光子联用成像速度虽然较快，但分辨率有限。另外，活体组织对光散射的干扰依旧是深层组织超分辨成像亟需解决的问题。尽管目前也有组织透明化技术、体电镜技术，可实现更深层的组织成像，却无法实现活体成像。因此，对于活体脑部成像，2P–STED依旧不可替代。相信未来各类成像技术的不断开发和联用，能够推动神经科学领域的基础研究和临床转化。

此外，近年来涌现出各种可提升成像分辨率的技术手段。例如，膨胀显微成像技术依赖可膨胀聚合物网络，通过共价结合将位于样品内的特定标签直接锚定到聚合物网络上，进而产生物理放大来提升光学分辨率，并且能够与多种光学显微镜联用。各显微镜厂家也通过优化算法或检测器等硬件来提升分辨率，例如，蔡司公司通过优化检测器并结合算法，开发出Airyscan 2技术；莱卡公司通过优化信噪比并结合反卷积算法，开发出Lightning技术；安道尔公司利用荧光信号在空间和时间上的径向波动特性，开发出SRRF–Stream实时超分辨技术。然而这些技术提升分辨率有限，往往只能达到100 nm左右，限制了其在超分辨领域的应用。

除光学显微成像技术外，近年来体电镜技术在成像尺度、速度、分辨率和应用范围等方面发展迅速，在神经科学研究中的应用也显著增长。体电镜技术通过在纳米尺度进行三维扫描，可实现多种模式生物的脑图谱绘制，助力神经系统连接组学等研究。尽管体电镜技术存在无法检测荧光标记蛋白、无法活体成像等问题，但其优越的大体积三维成像能力及纳米级分辨率，与光学显微成像技术形成了较好的互补。电镜技术与光学成像技术的联用，被越来越广泛地应用于解决更深层次的科学问题。尽管如此，受限于各自技术特性以及样品制备的差异，体电镜技术与光学超分辨技术的联用，仍存在诸多限制，需要实现技术突破。相信未来随着体电镜技术与光学超分辨技术的不断开发，将为其在神经科学领域的应用带来更多的可能性。

[参 考 文 献]

[1] Thevathasan J V, Kahnwald M, Cieśli ń ski K, et al. Nuclear pores as versatile reference standards for quantitative superresolution microscopy [J]. Nat Methods, 2019, 16: 1045–1053.

[2] 陈婕, 刘文娟, 徐兆超. 多种超分辨荧光成像技术比较和进展评述 [J]. 色谱, 2021, 39(10): 1055–1064.

[3] Gong J, Jin Z, Chen H, et al. Super–resolution fluorescence microscopic imaging in pathogenesis and drug treatment of neurological disease [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2023, 196: 114791.

[4] Zou W, Yang L, Lu H, et al. Application of super–resolution microscopy in mitochondria–dynamic diseases [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2023, 200: 115043.

[5] Werner C, Sauer M, Geis C. Super–resolving microscopy in neuroscience [J]. Chem Rev, 2021, 121(19): 11971–12015.

[6] Westphal V, Rizzoli S O, Lauterbach M A, et al. Video–rate far–field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement [J]. Science, 2008, 320(5873): 246–249.

[7] Nägerl U V, Willig K I, Hein B, et al. Live–cell imaging of dendritic spines by STED microscopy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(48): 18982–18987.

[8] Pellett P A, Sun X, Gould T J, et al. Two–color STED microscopy in living cells [J]. Biomed Opt Express, 2011, 2(8): 2364–2371.

[9] Willig K I, Stiel A C, Brakemann T, et al. Dual–label STED nanoscopy of living cells using photochromism [J]. Nano Lett, 2011, 11(9): 3970–3973.

[10] Tønnesen J, Nadrigny F, Willig K I, et al. Two–color STED microscopy of living synapses using a single laser–beam pair [J]. Biophys J, 2011, 101(10): 2545–2552.

[11] Osseforth C, Moffitt J R, Schermelleh L, et al. Simultaneous dual–color 3D STED microscopy [J]. Opt Express, 2014, 22(6): 7028–7039.

[12] Tønnesen J, Inavalli V V G K, Nägerl U V. Super–resolution imaging of the extracellular space in living brain tissue [J]. Cell, 2018, 172(5): 1108–1121.

[13] Velasco M G M, Zhang M, Antonello J, et al. 3D super–resolution deep–tissue imaging in living mice [J]. Optica, 2021, 8(4): 442–450.

[14] Calovi S, Soria F N, Tønnesen J. Super–resolution STED microscopy in live brain tissue [J]. Neurobiol Dis, 2021, 156: 105420.

[15] Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, et al. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes [J]. Science, 2017, 355(6325): 606–612.

[16] Deguchi T, Iwanski M K, Schentarra E M, et al. Direct observation of motor protein stepping in living cells using MINFLUX [J]. Science, 2023, 379(6636): 1010–1015.

[17] Wirth J O, Scheiderer L, Engelhardt T, et al. MINFLUX dissects the unimpeded walking of kinesin–1 [J]. Science, 2023, 379(6636): 1004–1010.

[18] Wirth J O, Schentarra E M, Scheiderer L, et al. Uncovering kinesin dynamics in neurites with MINFLUX [J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 661.

[19] Schleske J M, Hubrich J, Wirth J O, et al. MINFLUX reveals dynein stepping in live neurons [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, 121(38): e2412241121.

[20] Berning S, Willig K I, Steffens H, et al. Nanoscopy in a living

mouse brain [J]. Science, 2012, 335(6068): 551.
[21] Willig K I, Steffens H, Gregor C, et al. Nanoscopy of filamentous actin in cortical dendrites of a living mouse [J]. Biophys J, 2014, 106(1): L01–L03.
[22] Wijetunge L S, Angibaud J, Frick A, et al. Stimulated emission depletion (STED) microscopy reveals nanoscale defects in the developmental trajectory of dendritic spine morphogenesis in a mouse model of fragile X syndrome [J]. J Neurosci, 2014, 34(18): 6405–6412.
[23] Willig K I, Wegner W, Müller A, et al. Multi–label in vivo STED microscopy by parallelized switching of reversibly switchable fluorescent proteins [J]. Cell Rep, 2021, 35(9): 109192.
[24] Steffens H, Mott A C, Li S, et al. Stable but not rigid: chronic in vivo STED nanoscopy reveals extensive remodeling of spines, indicating multiple drivers of plasticity [J]. Sci Adv, 2021, 7(24): eabf2806.
[25] Ding J B, Takasaki K T, Sabatini B L. Supraresolution imaging in brain slices using stimulated–emission depletion two–photon laser scanning microscopy [J]. Neuron, 2009, 63(4): 429–437.
[26] Bethge P, Chéreau R, Avignone E, et al. Two–photon excitation STED microscopy in two colors in acute brain slices [J]. Biophys J, 2013, 104(4): 778–785.
[27] Pfeiffer T, Poll S, Bancelin S, et al. Chronic 2P–STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo [J]. eLife, 2018, 7: e34700.
[28] Goedert M, Spillantini M G, Del Tredici K, et al. 100 years of Lewy pathology [J]. Nat Rev Neurol, 2013, 9(1): 13–24.
[29] Nugent E, Kaminski C F, Kaminski Schierle G S. Super–resolution imaging of alpha–synuclein polymorphisms and their potential role in neurodegeneration [J]. Integr Biol (Camb), 2017, 9(3): 206–210.
[30] Shrivastava A N, Redeker V, Fritz N, et al. α–synuclein assemblies sequester neuronal α 3–Na+/K +–ATPase and impair Na+ gradient [J]. EMBO J, 2015, 34(19): 2408–2423.
[31] Moors T E, Maat C A, Niedieker D, et al. The subcellular arrangement of alpha–synuclein proteoforms in the Parkinson's disease brain as revealed by multicolor STED microscopy [J]. Acta Neuropathol, 2021, 142(3): 423–448.
[32] Zhao X, Guan Y, Liu F, et al. SNARE proteins mediate alpha–synuclein secretion via multiple vesicular pathways [J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(1): 405–419.
[33] Mawuenyega K G, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS beta–amyloid in Alzheimer's disease [J]. Science, 2010, 330(6012): 1774.
[34] Hansson O. Biomarkers for neurodegenerative diseases [J]. Nat Med, 2021, 27(6): 954–963.
[35] Esbjörner E K, Chan F, Rees E, et al. Direct observations of amyloid β self–assembly in live cells provide insights into differences in the kinetics of Aβ(1–40) and Aβ(1–42) aggregation [J]. Chem Biol, 2014, 21(6): 732–742.
[36] Zhang W I, Antonios G, Rabano A, et al. Super–resolution microscopy of cerebrospinal fluid biomarkers as a tool for Alzheimer's disease diagnostics [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 46(4): 1007–1020.
[37] Iulita M F, Allard S, Richter L, et al. Intracellular Aβ pathology and early cognitive impairments in a transgenic rat overexpressing human amyloid precursor protein: a multidimensional study [J]. Acta Neuropathol Commun, 2014, 2: 61.
[38] Yu Y, Jans D C, Winblad B, et al. Neuronal Aβ42 is enriched in small vesicles at the presynaptic side of synapses [J]. Life Sci Alliance, 2018, 1(3): e201800028.
[39] Michel C H, Kumar S, Pinotsi D, et al. Extracellular monomeric tau protein is sufficient to initiate the spread of tau protein pathology [J]. J Biol Chem, 2014, 289(2): 956–967.
[40] Chen W, Young L J, Lu M, et al. Fluorescence self–quenching from reporter dyes informs on the structural properties of amyloid clusters formed in vitro and in cells [J]. Nano Lett, 2017, 17(1): 143–149.
[41] Kommaddi R P, Das D, Karunakaran S, et al. Aβ mediates F–actin disassembly in dendritic spines leading to cognitive deficits in Alzheimer's disease [J]. J Neurosci, 2018, 38(5): 1085–1099.
[42] Schedin–Weiss S, Caesar I, Winblad B, et al. Super–resolution microscopy reveals γ–secretase at both sides of the neuronal synapse [J]. Acta Neuropathol Commun, 2016, 4: 29.
[43] De Rossi P, Nomura T, Andrew R J, et al. Neuronal BIN1 regulates presynaptic neurotransmitter release and memory consolidation [J]. Cell Rep, 2020, 30(10): 3520–3535.
[44] De Rossi P, Andrew R J, Musial T F, et al. Aberrant accrual of BIN1 near Alzheimer's disease amyloid deposits in transgenic models [J]. Brain Pathol, 2019, 29(4): 485–501.
[45] Schürmann B, Bermingham D P, Kopeikina K J, et al. A novel role for the late–onset Alzheimer's disease (LOAD)–associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling [J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(9): 2000–2016.
[46] Wang C S, Kavalali E T, Monteggia L M. BDNF signaling in context: from synaptic regulation to psychiatric disorders [J]. Cell, 2022, 185(1): 62–76.
[47] Scaramuzzino C, Cuoc E C, Pla P, et al. Calcineurin and huntingtin form a calcium–sensing machinery that directs neurotrophic signals to the nucleus [J]. Sci Adv, 2022, 8(1): eabj8812.
[48] Nishikawa T, Takahashi T, Nakamori M, et al. The identification of raft–derived tau–associated vesicles that are incorporated into immature tangles and paired helical filaments [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2016, 42(7): 639–653.
[49] Welikovitch L A, Do Carmo S, Maglóczky Z, et al. Evidence of intraneuronal Aβ accumulation preceding tau pathology in the entorhinal cortex [J]. Acta Neuropathol, 2018, 136(6): 901–917.
[50] Querol–Vilaseca M, Colom–Cadena M, Pegueroles J, et al. Nanoscale structure of amyloid–β plaques in Alzheimer's disease [J]. Sci Rep, 2019, 9: 5181.
[51] Benda A, Aitken H, Davies D S, et al. STED imaging of tau filaments in Alzheimer's disease cortical grey matter [J]. J Struct Biol, 2016, 195(3): 345–352.
[52] Codron P, Letournel F, Marty S, et al. STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) reveals the nanoscale organization of pathological aggregates in human brain [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2021, 47(1): 127–142.
[53] Hilt S, Altman R, Kálai T, et al. A bifunctional anti–amyloid blocks oxidative stress and the accumulation of intraneuronal amyloid–beta [J]. Molecules, 2018, 23(8): 2010.
[54] Ye Z, Wei L, Li Y, et al. Efficient modulation of β–amyloid peptide fibrillation with polymer nanoparticles revealed by super–resolution optical microscopy [J]. Anal Chem, 2019, 91(13): 8582–8590.