·技术进展·

活细胞全景超分辨显微成像技术与应用

刘嘉慧[1,2] 杨燕青[3,4] 陈飞[3] 李艳莉[3] 王艺江[3] 冯邱锴[3] 秦玉岭[1*] 施可彬[3,5]

［1.南通大学公共卫生学院，南通 226000；2.南通市中西医结合医院检验科，南通 226000；
3.北京大学长三角光电科学研究院，南通 226000；4.澄观光学科技（南通）有限公司，南通 226000；
5.人工微结构和介观物理国家重点实验室，北京大学物理学院，北京 100871］

【摘要】 目的 基于活细胞全景超分辨显微镜，辅以基于人工智能的图像分割算法构建活细胞全生命周期的动态观测方法。**方法** 以非洲绿猴肾上皮细胞（COS-7）为模型，通过活细胞全景超分辨显微镜对其有丝分裂过程、亚细胞器互作过程、细胞间通讯过程进行全景动态观测。利用光学衍射层析成像技术实现了对活细胞亚细胞器的动态追踪，通过转盘共聚焦技术实现了分子水平的特异性验证，通过基于人工智能的数据分割算法实现了对亚细胞器的定性分割和定量分析。**结果** 与传统荧光成像技术相比，光学衍射层析成像技术避免了或者减轻了光毒性、光漂白以及其他人为干扰，实现了活细胞的原生态动态观测。**结论** 这种创新的双模态联合成像策略形成了“结构—功能”互补的研究范式，不仅突破了传统单一成像技术的局限性，更为细胞互作、细胞器互作机制研究提供了全新的多维动态观测手段。

【关键词】 无标记成像；超分辨成像；转盘共聚焦；数据分割；人工智能

【中图分类号】 O435; Q246 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.11876/mimt202504007

Live-cell panoramic super-resolution microscopy: techniques and applications

Liu Jiahui[1,2], Yang Yanqing[3,4], Chen Fei[3], Li Yanli[3], Wang Yijiang[3], Feng Qiukai[3], Qin Yuling[1], Shi kebin[3,5]*

［*1. School of Public Health, Nantong University, Nantong 226000, China; 2. Laboratory Department, Nantong Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Nantong 226000, China; 3. Peking University Yangtze Delta Institute of Optoelectronics, Nantong 226000, China; 4. Pellucid Optics Technology (Nantong) Co., Ltd., Nantong 226000, China; 5. State Key Laboratory for Artificial Microstructure and Mesoscopic Physics, School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China*］

【Abstract】 Objective Based on live-cell panoramic super-resolution microscopy, complemented by AI-based image segmentation algorithms, we are developing methods for dynamically observing the entire life cycle of living cells. **Methods** Using COS-7 as a model, the mitotic process, subcellular organelle interactions, and intercellular communication were dynamically observed in panorama through live-cell panoramic super-resolution microscopy. Optical diffraction tomography (ODT) was employed to enable dynamic tracking of subcellular organelles in living cells, while spinning disk confocal microscopy provided molecular-level specificity validation. Furthermore, AI-based segmentation algorithms were implemented to accomplish qualitative segmentation and quantitative analysis of subcellular organelles. **Results** The system avoids or mitigates phototoxicity, photobleaching, and other artificial interference associated with traditional fluorescence imaging, enabling native-state dynamic observation of living cells. **Conclusion** The dual-modality joint imaging establishes a “structure-function complementarity” research paradigm. This innovative fusion strategy not only overcomes the limitations of traditional single-modality imaging

基金项目：国家重点研发计划（2022YFF0712500，2023YFF0722600）

第一作者：刘嘉慧，女，本科，工程师，研究方向：近红外二区活体成像，无标记超分辨显微成像技术与应用

通信作者：秦玉岭，男，博士研究生，教授，研究方向：用多组学手段研究肿瘤细胞异质性，用多色免疫组织成像技术描绘肿瘤组织微环境空间组学信息，研发单细胞和数字化微流控芯片用于多重痕量生物标志物分析

techniques but also provides a novel multidimensional dynamic observation approach for investigating cell–cell interactions and organelle–organelle interaction mechanisms.

【Key words】 Label–free imaging; Super–resolution imaging; Spinning–disk confocal microscopy; Data segmentation; Artificial intelligence

光学显微成像技术是人类认知微观世界的重要工具[1]。根据光学显微成像技术是否需要对样品进行荧光标记可将其分为两大类：一是具有特异性的荧光成像技术，如宽场荧光成像、共聚焦显微成像以及结构光照明显微成像、单分子荧光显微成像等[2]；二是具有非特异性的无标记成像技术，如明场显微成像、微分干涉显微成像、数字全息显微成像，以及三维超分辨的光学衍射层析成像[3]。

实现对活细胞的全生命周期动态观测对于细胞生物学研究而言至关重要。传统活细胞显微成像技术因其光毒性、标记依赖性或时空分辨率限制，难以实现长时间、高保真的连续观测，导致动态过程碎片化[4]。与荧光成像技术相比，无标记显微成像技术因其无复杂的制样步骤、无光毒性、无光漂白、可原生态动态监测活细胞的全生命周期变化而在细胞生物学研究中得到广泛应用[5-6]。

光学衍射层析成像技术（optical diffraction tomography, ODT）是一种基于散射反演的三维无标记定量成像方法，通过测量样本在不同照明角度下的散射光场，结合衍射理论重建其三维折射率分布，从而实现高精度的成像[7-8]，其核心原理在于利用光的干涉与衍射特性，通过多角度全息图记录样本的复振幅信息，并基于逆散射算法反推出折射率的空间分布，从而揭示细胞器动态、细胞力学特性等关键生物学信息[9]。

2009年，光学衍射层析成像技术首次被应用于活细胞动态成像，之后基于光学衍射层析成像技术的研究成果如雨后春笋般竞相迸发[10]。光学衍射层析成像技术因其无标记、三维、超分辨特性，可同时观测活细胞的核膜、核仁、线粒体、脂滴、溶酶体、内质网、细胞骨架、黑体等8种以上亚细胞结构而备受生物学家青睐[11-12]。由于其具有非侵入、无标记、超分辨、长时程三维成像等特点，光学衍射层析成像技术被广泛应用于细胞生物学、病理学及药物筛选等研究领域[13-15]。

转盘共聚焦显微技术（spinning disk confocal microscopy, SDCM）通过高速旋转的微米级针孔阵列，革新了传统点扫描共聚焦成像的光学切片机制，成为活细胞动态观测的黄金标准[16]。

转盘共聚焦显微镜是一种基于荧光标记的间接成像技术[17-18]，其本质上依赖于特异性荧光探针标记目标结构，因此仅能观测被标记的特定结构，无法全面反映细胞的非标记结构与整体微环境，缺乏对细胞的全景成像能力。这一局限性使得研究者往往需要结合其他明场成像技术如明场显微成像技术、微分干涉显微成像技术，才能完整解析活细胞的生命活动全貌。

本研究主要基于活细胞全景超分辨显微镜即“光学衍射层析显微成像+转盘共聚焦显微成像”双模态显微成像系统，辅以基于人工智能的图像分割算法，实现对活细胞全生命周期的动态观测，首次实现了在无标记超分辨和荧光超分辨情况下对活细胞进行超高通道数的实时监测。

1 材料与方法

1.1 实验方法

首先，通过双模态显微成像系统对非洲绿猴肾上皮细胞的无标记全景显微图像以及荧光特异性数据进行采集，完成相关数据预处理，提高数据质量。其次，根据不同亚细胞器结构折射率、形态、大小的不同，基于人工智能数据分割算法对活细胞无标记全景图像进行数据分割，实现对细胞、核膜、核仁、脂滴等亚细胞器结构的一键式定性数据分割以及一站式定量数据分析。最后，基于双模态显微成像系统以及人工智能分割算法实现细胞与细胞之间通过隧道纳米管传输脂滴、线粒体、溶酶体等的通讯研究。

1.2 仪器与试剂

成像设备：活细胞全景超分辨显微镜（生产企业：澄观光学科技（南通）有限公司，型号：MH–AssemView）；共聚焦小皿（Cellvis，D35–10–0–N）；线粒体染料 MitoTracker™ Green FM (Thermo Fisher

Scientific，M7514)；溶酶体染料 LysoTracker™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific，L12492)；非洲绿猴肾上皮细胞（COS–7）购自武汉普诺赛生命科技有限公司；COS–7细胞专用培养基（Pricella，CM–0069）。

1.3 细胞培养

取出融合度达 80% ~ 90%的细胞培养瓶，吸弃旧培养基后用预温磷酸盐缓冲液（phosphate–buffered saline, PBS）洗涤2次以去除血清残留。加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶–EDTA消化液，37 ℃孵育 1 ~ 2 min至细胞变圆脱落，立即加入 2 mL含血清完全培养基终止消化，吹打形成单细胞悬液后 1 000 rpm 离心 3 min。弃上清液，用新鲜完全培养基重悬细胞调整细胞浓度。将细胞悬液轻柔接种至 35 mm共聚焦玻璃底培养皿中，十字法晃动使细胞均匀分布后置于37° C、5% CO_2培养箱静置培养。24 h后用于光学衍射层析成像或者荧光染色处理。成像之前可更换为无酚红培养基以减少自发荧光干扰。

1.4 细胞染色

将生长至 60% ~ 70%融合度的细胞用预温 PBS 洗涤后更换为无血清培养基，依次加入 200 nM MitoTracker™ Green FM避光孵育 30 min标记线粒体，50 nM LysoTracker™ Deep Red避光孵育 60 min 标记溶酶体，每次染色后均用 PBS洗涤 3次。再使用 488/520 nm（线粒体）和 561/590 nm（溶酶体）的激发/发射波长进行转盘共聚焦显微镜观察。

1.5 活细胞全景超分辨成像以及数据处理

本研究的双模态活细胞全景超分辨图像均由活细胞全景超分辨显微镜采集获取。该系统配备活细胞工作站，可为活细胞成像过程提供5% CO_2浓度、37 ℃恒温培养环境。所获取的活细胞全景图像为tiff格式，可通过配套的数据分割以及追踪软件进行核膜、核仁、脂滴等亚细胞器结构的定性分割和定量追踪。

2 结果与讨论

2.1 非洲绿猴肾上皮细胞（COS–7）有丝分裂全过程动态观测

由于光学衍射层析成像技术无需对细胞进行染色，因此对活细胞的光毒性极低，非常适合对活细胞进行超长时程的原生态动态观测[19–20]。本研究对非洲绿猴肾上皮细胞（COS–7）进行了无标记活细胞三维长时程成像，观测 COS–7发生有丝分裂过程中各种亚细胞器结构的动态变化，成像总时间为 960 min，数据采集间隔时间为 5 min。

图 1展示了光学衍射层析成像系统记录非洲绿猴肾上皮细胞（COS–7）发生有丝分裂的全过程。通过无标记超分辨全景图像，我们可以清楚地观察到活细胞有丝分裂是一个高度协调的动态过程。有丝分裂前期，染色体会发生凝缩，染色质纤维在凝聚蛋白的作用下发生螺旋化，形成染色体结构，姐妹染色单体通过黏连蛋白环状复合体紧密相连，X形结构清晰可见，纺锤体启动重组，核结构发生解体（图 1A、图 1B）；有丝分裂中期，可清晰地观察到赤道板的形成，所有染色体在纺锤体张力平衡下排列成赤道板，染色体达到最大程度的凝缩（图 1C—图 1F）；有丝分裂后期，纺锤体不断延长，染色体发生解凝，恢复核质区隔（图 1G）；有丝分裂末期，细胞重构核结构，胞质完成分离（图 1H）[21]。

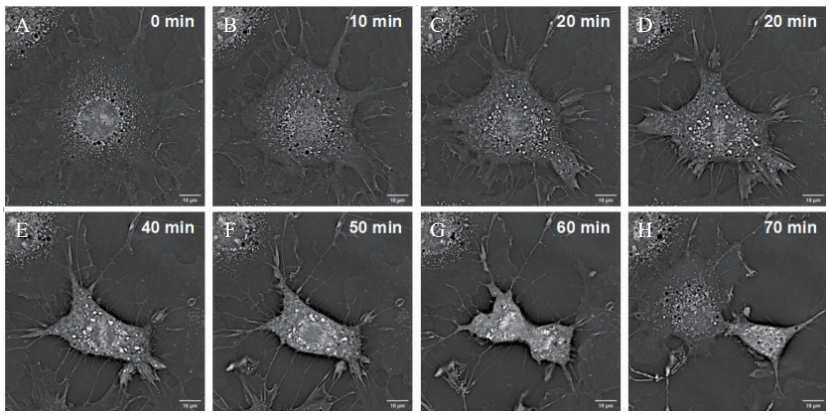


图 1 光学衍射层析成像系统记录的非洲绿猴肾上皮细胞（COS–7）有丝分裂全过程 A、B为有丝分裂前期；C—F为有丝分裂中期；G为有丝分裂后期；H为有丝分裂末期

2.2 亚细胞器互作研究

通过光学衍射层析模态对活细胞中线粒体动态的快速长时程成像，本研究发现线粒体会在形状、位置、行为及功能上因与其他细胞器相互作用而发生改变，如图2所示。与细胞核相关的线粒体沿细胞核排布，且随核膜一起变化形状。这种局域的线粒体可能辅助了核内一些重要的过程如信使核糖核酸（messenger RNA，mRNA）向核外的输运过程等。黑体也会与线粒体发生相互作用，其与线粒体接触后可观察到线粒体的形状改变。在某些情况下，黑体也存在拖拽线粒体随之移动的行为。脂滴和线粒体很难有长时程的接触。脂滴与线粒体接触后，很快被推离线粒体，同时两者形态上均无明显变化。虽然以上相互作用的具体过程与相应代谢功能还有待研究，但这些相互作用足以表明线粒体在细胞新陈代谢过程中发挥着为各种不同细胞器提供能量的重要作用。相较于荧光成像易引发光损伤的局限，光学衍射层析成像技术凭借其低光毒性优势，成功记录到传统方法难以观测的微弱相互作用事件，为解析亚细胞器动态网络的时空编码规律提供了革新性的研究范式[22-23]。

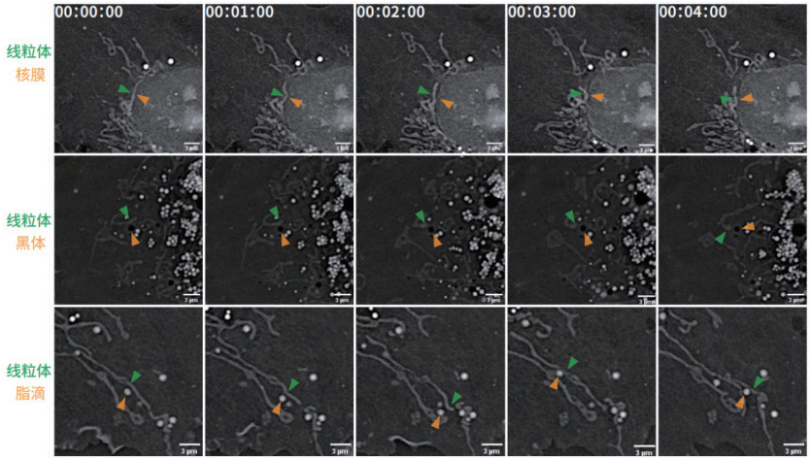
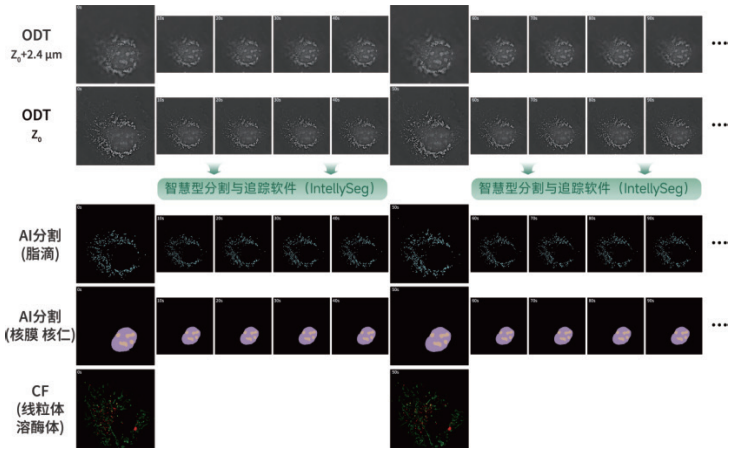


图2 非洲绿猴肾上皮细胞（COS-7）的线粒体与核膜、黑体以及脂滴的互作过程

此外，本研究通过ODT拍摄了非洲绿猴肾上皮细胞（COS-7）全景图，清晰观测到细胞膜、核膜、核仁、脂滴、线粒体、溶酶体、黑体、细胞伪足等8种以上亚细胞器结构，并通过自研的智慧型数据分割与追踪软件IntellySeg对核膜、核仁、脂滴3种亚细胞器结构进行了定性分割与定量追踪分析，通过转盘共聚焦系统Nova-SD验证了线粒体和溶酶体结构，如图3所示。为了减少荧光成像产生的光毒性和光漂白，本研究将无标记成像与转盘共聚焦成像的拍摄比例设置为5:1，实现了超高通道数的活细胞全景超长时程成像。

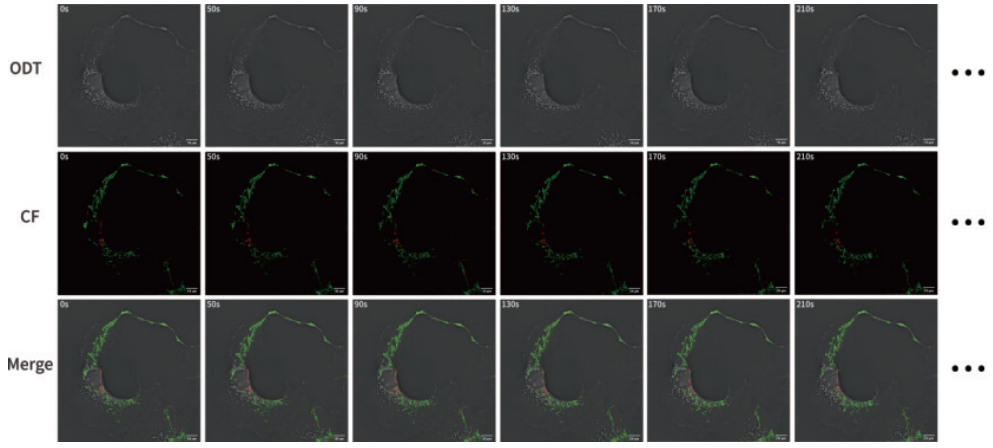


注：ODT为光学衍射层析成像技术；AI为人工智能；CF为转盘共聚焦成像技术；绿色表示线粒体；红色表示溶酶体；白色表示脂滴。

图3 人工智能软件辅助下双模态显微成像系统动态观测COS-7细胞各种亚细胞器互作过程

2.3 隧道纳米管传输亚细胞器结构研究

隧道纳米管（tunneling nanotubes, TNTs）是由细胞膜延伸形成的亚微米级管状通道（直径 50 ~ 800 nm），通过动态连接邻近或远端细胞，实现跨细胞物质与信息的精准传递。本研究利用ODT拍摄了 TNTs的整体形貌以及里面的多种亚细胞器结构如线粒体、脂滴、溶酶体，并通过转盘共聚焦验证了TNTs里面的亚细胞器结构如线粒体、脂滴、溶酶体，如图4所示。这种多模态成像策略的协同应用，不仅克服了传统荧光显微术的光漂白难题，更通过ODT的折射率定量功能，首次揭示了 TNTs内部存在纳米级物质的传输与交互，为理解细胞间通讯的物质交换规律提供了全新视角。



注：ODT为光学衍射层析成像技术；CF为转盘共聚焦成像技术；Merge为双模态联合成像；绿色表示线粒体；红色表示溶酶体；白色表示脂滴。

图 4 双模态显微成像系统拍摄的细胞间通过隧道纳米管通讯的过程

3 结语

本研究首次将“光学衍射层析显微成像+转盘共聚焦显微成像”双模态显微成像系统成功应用于细胞生物学研究领域。ODT模态凭借其亚细胞级空间分辨率和毫秒级时间分辨率，在完全无标记、无光毒性的条件下，实现了对活细胞有丝分裂过程的实时全景动态观测，以及多种细胞器三维动态互作过程的长时间连续观测[24]。通过先进的深度学习数据分割算法，该系统可直接从ODT折射率图像中定性识别核膜、核仁及脂滴等关键亚细胞器结构，无需额外荧光标记即可完成多细胞器同步追踪，显著降低了传统多色荧光成像带来的光毒性效应。与此同时，SDCM模态通过分子特异性标记，为ODT获取的无标记结构信息提供了准确的生物分子标定依据，二者协同工作形成了“结构—功能”互补的研究范式。这种创新的双模态联合成像策略不仅突破了传统单一成像技术的局限性，更为细胞器互作机制研究提供了全新的多维动态观测手段。

未来，该双模态显微成像技术有望在以下几个方向实现突破性发展[25–26]：首先，通过结合人工智能辅助的图像分析算法，可进一步提升无标记成像对亚细胞结构的识别精度和种类，实现对更多细胞器如线粒体、溶酶体等的自动识别与追踪；其次，将该系统与超分辨显微技术相结合，有望突破衍射极限，在纳米尺度解析细胞器互作的精细动态过程；再者，开发高通量版本的双模态成像平台，将推动其在药物筛选和精准医疗中的应用。此外，该技术还可拓展至类器官和活体显微成像研究，为发育生物学和肿瘤微环境研究提供新的研究工具。随着光学技术和计算方法的不断创新，这种双模态联合成像必将为生命科学研究带来更多突破性发现。

[参 考 文 献]

[1] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub–diffraction–limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy(STORM)[J]. Nature Methods, 2006, 3: 793–796.

[2] Zheng G, Shen C, Jiang S, et al. Concept, implementations and applications of Fourier ptychography[J]. Nature Reviews Physics, 2021, 3: 207–223.

[3] Ginat D T, Gupta R. Advances in computed tomography

imaging technology［J］. Annual Review of Biomedical Engineering, 2014, 16: 431–453.

［4］ Descloux A, Grußmayer K S, Bostan E, et al. Combined multiplane phase retrieval and super–resolution optical fluctuation imaging for 4D cell microscopy［J］. Nature Photonics, 2018, 12: 165–172.

［5］ 魏婉雪,何苗,徐坚,等.一种大视野快速光学衍射层析成像技术［J］.中国激光, 2023, 50(3): 0307109.

［6］ 穆书奇,董大山,施可彬.无标记光学成像技术［J］.激光与光电子学进展, 2022, 59(12): 1200001.

［7］ 杨泽文,张璐,吕宁,等.生物折射率三维无标记定量成像研究进展［J］.中国激光, 2022, 49(5): 0507201.

［8］ Milestones in optical microscopy［J］. Nature Cell Biology, 2009, 11: 1165.

［9］ Berning S, Willig K I, Steffens H, et al. Nanoscopy in a living mouse brain［J］. Science, 2012, 335(6068): 551.

［10］Shapiro D A, Yu Y S, Tyliszczak T, et al. Chemical composition mapping with nanometre resolution by soft X–ray microscopy［J］. Nature Photonics, 2014, 8: 765–769.

［11］Cotte Y, Toy F, Jourdain P, et al. Marker–free phase nanoscopy［J］. Nature Photonics, 2013, 7: 113–117.

［12］Wang Z, Millet L, Mir M, et al. Spatial light interference microscopy (SLIM)［J］. Optics Express, 2011, 19(2): 1016–1026.

［13］Kim Y, Shim H, Kim K, et al. Common–path diffraction optical tomography for investigation of three–dimensional structures and dynamics of biological cells［J］. Optics Express, 2015, 22(9): 10398–10407.

［14］Kim T, Zhou R J, Mir M, et al. White–light diffraction tomography of unlabelled live cells［J］. Nature Photonics, 2014, 8: 256–263.

［15］Debailleul M, Georges V, Simon B, et al. High–resolution three–dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples［J］. Optics Letters, 2009, 34(1): 79–81.

［16］Dong D, Huang X, Li L, et al. Super–resolution fluorescence–assisted diffraction computational tomography reveals the three–dimensional landscape of the cellular organelle interactome［J］. Light: Science & Applications, 2020, 9: 11.

［17］Curd A, Cleasby A, Makowska K, et al. Construction of an instant structured illumination microscope［J］. Methods, 2015, 88: 37–47.

［18］Mu S, Yang Y, Li J, et al. Three dimension refractive index characterization for photonic waveguides［J］. Journal of Lightwave Technology, 2022, 40(8): 2474–2480.

［19］Bailleul J, Simon B, Debailleul M, et al. Tomographic diffractive microscopy: towards high–resolution 3–D real–time data acquisition, image reconstruction and display of unlabeled samples［J］. Optics Communications, 2018, 422: 28–37.

［20］刘颖,杨亚良,岳献.光学相干层析血管造影术及其在眼科学中的应用［J］.激光与光电子学进展, 2020, 57(18): 180002.

［21］Tahara T, Takahashi Y, Arai Y. Image–quality improvement in space–bandwidth capacity–enhanced digital holography［J］. Optical Engineering, 2014, 53(11): 112313.

［22］Hugonnet H, Kim Y W, Lee M, et al. Multiscale label–free volumetric holographic histopathology of thick–tissue slides with subcellular resolution［J］. Advanced Photonics, 2021, 3(2): 026004.

［23］Zhang B H, Xu H L, Chen J, et al. Highly specific and label–free histological identification of microcrystals in fresh human gout tissues with stimulated Raman scattering［J］. Theranostics, 2021, 11(7): 3074–3088.

［24］Kamilov U S, Liu D, Mansour H, et al. A recursive born approach to nonlinear inverse scattering［J］. IEEE Signal Processing Letters, 2016, 23(8): 1052–1056.

［25］Sung Y, Choi W, Lue N, et al. Stain–free quantification of chromosomes in live cells using regularized tomographic phase microscopy［J］. PLoS One, 2012, 7(11): e49502.

［26］Kim K, Yoon H, Diez–Silva M, et al. High–resolution three dimensional imaging of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography［J］. Journal of Biomedical Optics, 2014, 19(1): 011005.