·生物应用·

活体显微成像技术研究进展

俞方菲[1,2] 卢志[1,3] 江劭玮[2] 杨懿[1,4,5,6*]

（1.浙江荷湖科技有限公司，杭州 311113；2.杭州电子科技大学通信工程学院，杭州 310018；
3.清华大学自动化系，北京 100084；4.北京航空航天大学可靠性与系统工程学院，北京 100191；
5.鹏城实验室，深圳 518000；6.北京航空航天大学杭州创新研究院，杭州 310052）

【摘要】 活体显微成像技术作为生命科学研究的核心工具，能够在自然生理环境中实时追踪细胞及分子动态，为解析复杂生物过程提供了前所未有的视角。本文系统阐述共聚焦显微镜、多光子显微镜、光片显微镜和扫描光场显微镜的成像原理、技术特性及局限性，结合肿瘤学、免疫学、神经科学和发育生物学等领域的典型应用案例，横向对比不同技术的适用场景，并基于当前技术瓶颈展望未来发展方向，以期为相关研究提供技术选择参考。

【关键词】 活体显微成像；共聚焦显微镜；多光子显微镜；光片显微镜；扫描光场显微镜

【中图分类号】 R318; TH74 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11876/mimt202504008

Research progress of intravital imaging

Yu Fangfei[1,2], *Lu Zhi*[1,3], *Jiang Shaowei*[2], *Yang Yi*[1,4,5,6*]

(*1.Zhejiang Hehu Technology Co., Ltd., Hangzhou 311113, China; 2.School of Communication Engineering, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, China; 3.Department of Automation, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 4.School of Reliability and Systems Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China; 5.Peng Cheng Laboratory, Shenzhen 518000, China; 6. Hangzhou Innovation Institute of Beihang University, Hangzhou 310052, China*)

【Abstract】 As a pivotal tool in life science research, intravital microscopy facilitates real–time monitoring of cellular and molecular dynamics within their native physiological milieu. This review delves into the imaging mechanisms, strengths, and constraints of confocal microscopy, multi–photon microscopy, light–sheet microscopy, and scanning light–field microscopy. By analyzing representative application cases across disciplines such as oncology, immunology, neuroscience, and developmental biology, it offers a comparative overview of the ideal usage scenarios for these technologies. Furthermore, it addresses current technical hurdles and speculates on future advancements in the field. To provide technical reference for related research.

【Key words】 Intravital imaging; Confocal microscopy; Multi–photon microscopy; Light–sheet microscopy; Scanning light–field microscopy

生命系统的复杂性决定了许多生理和病理过程高度依赖细胞所处的环境。细胞在活体环境中受机械力、化学梯度及细胞间互作的调控，这些共同决定其行为与功能[1-3]。诸如肿瘤转移、神经突触可塑性及免疫细胞归巢等动态过程，仅在活体环境中才可完整呈现真实的时空动态特征[4-6]。然而，传统的离体研究方法往往难以真实反映体内的生理、病理过程，这限制了对复杂生命现象的深入理解。

近年来，活体显微成像技术的快速发展为解决

第一作者：俞方菲，女，博士研究生，研究方向：肿瘤免疫

通信作者：杨懿，女，博士研究生，研究员，研究方向：人工智能算法、复杂系统多源数据融合、系统可靠性预测以及控制理论与应用等

这一问题提供了有力工具。该技术能够在生物体自然生理条件下，以高时空分辨率揭示细胞的动力学行为、形态变化及信号传递过程，为研究者提供了传统方法难以达成的新视角[7-8]。随着光学显微镜技术的不断进步，涌现出共聚焦显微镜、光片显微镜、多光子显微镜及扫描光场显微镜等多种技术，研究人员能够实时动态观察活体样本中的细胞、细胞器及分子事件，这些技术的发展极大地推动了生物医学基础研究的进步。

本文首先概述了用于活体显微成像的几种显微镜的技术原理，并对比分析了不同成像设备在分辨率、光毒性、成像深度及成像速度等方面的性能差异。随后，从生物医学基础研究的几个关键领域出发，列举了活体显微成像技术的应用实例，最后，探讨了现有活体显微成像技术的局限性，并对未来的发展方向进行展望，旨在为从事相关研究的学者提供参考，并为活体显微成像技术的进一步发展提供思路和方向。

1 活体显微成像技术原理及应用对比

1.1 共聚焦显微镜（confocal microscopy, CM）

组织结构的高时空分辨率和多色标记使共聚焦显微镜成为一种有吸引力且广泛使用的生物成像工具。共聚焦显微镜通过激光扫描或多针孔阵列实现高分辨率成像，核心原理是利用针孔（pinhole）过滤非焦平面光线，仅允许焦平面荧光信号通过，从而消除背景噪声，提升图像对比度和清晰度[9]。但是，逐点扫描导致成像速度有限，且长时间照射易引发光漂白和光毒性，不适用于长时间活体追踪；此外，组织穿透深度有限，难以满足深层组织成像需求[10]。尽管存在上述局限，共聚焦显微镜仍是亚细胞结构高分辨成像的首选，在活体动态研究中则多限于短期观察如数分钟内的细胞迁移，或作为其他技术的补充手段。

1.2 光片显微镜（light-sheet microscopy, LSM)

光片显微镜使用片状激光照亮焦平面，正交方向检测荧光信号，从而减少样本暴露时间，允许更快的成像速度和更长的成像时间，同时保持图像质量，其大视场有助于识别细胞和组织之间在发育过程中的相互作用[11-12]。光片显微镜在分析斑马鱼胚胎等透明样品的活体成像方面具有优势，能够进行无损观察、快速成像和长时程观察。研究证实，同等信噪比下光片显微镜的成像速度比共聚焦显微镜快10倍，且不会引发共聚焦显微镜常见的DNA损伤[13]。但是，光片显微镜的成像分辨率受限于光片的厚度和样品的散射特性，若样本不透明或散射严重，则会导致激发光片照明面不均匀，严重影响图像质量。

1.3 多光子显微镜（multi-photon microscopy, MPM)

多光子显微镜利用双光子或多光子激发，通过长波长激光穿透深层组织（可达毫米级），实现活体组织内动态成像[14]，但点扫描特性依然限制了成像速度，使其无法捕获快速的细胞运动，且大视场成像能力有限，难以同时观察多个细胞群体在较大空间范围内的协同动态行为。多光子成像的优势是可产生非线性光学效应，包括二次谐波（second harmonic generation, SHG）和三次谐波（triple harmonic generation, THG）。与通过荧光基团生成信号相比，SHG和THG信号的生成可实现无标记成像，而不会产生漂白。这些无标记特征已被广泛用于肌肉、皮肤、大脑和口腔粘膜中细胞和组织结构的可视化[15-18]。

1.4 扫描光场显微镜（scanning light filed microscopy, sLFM）

扫描光场显微镜是近年来为满足活体显微成像需求而发展起来的新型成像技术。该系统通过微透镜阵列同步采集样本的多视角图像，结合物理先验模型和深度学习算法实现高效的三维结构重建[19-20]。将扫描光场成像与数字自适应光学相结合，可构建新颖的数字自适应光学扫描光场层析成像（digital adaptive optics scanning light-field mutual iterative tomography, DAOSLIMIT）框架，在活体成像中实现前所未有的空间与时间分辨率[21-22]，进一步通过物理—计算协同设计，实现共聚焦的光学切片能力与扫描光场显微镜的优势结合，为免疫互作、神经活动等活体动态研究提供了高保真、低损伤的成像工具[23]。由于扫描光场显微镜具有高分辨率、快速成像以及低光毒性的特点，其应用场景广泛，能动态追踪多种生物过程。不过目前的扫描光场显微镜多基于单光子体系构建，因此，成像深

度受限，且三维重建过程对计算硬件和算法优化提出了较高要求。常见活体显微成像设备性能对比见表 1。尽管所有设备均能在活体状态下实现亚细胞级别的分辨率，然而在实际观察时，不同活体样本的散射特性、动态变化以及对光的敏感度等因素，都会对设备的性能造成限制。

表 1 常见活体显微成像设备性能对比

设备	最高活体分辨率	光毒性	活体成像深度	成像速度	核心优势	主要局限	典型应用
共聚焦显微镜	亚细胞级	较高（焦点外仍有激发，易导致光漂白和样本损伤）	100 ~ 200 μm	较慢（点扫描模式，需逐点逐行采集，三维成像需叠加多层 Z–stack）	高空间分辨率，适合精细结构观察（如细胞器形态）	光毒性高、速度慢、穿透浅	小鼠肺部[24]、肾脏[25]、乳腺肿瘤[26]、脑缺血[27]活体共聚焦显微成像
光片显微镜	亚细胞级	低（仅照明焦平面，能量分散，光漂白和损伤风险低）	<100 μm	较快（面照明+垂直探测，三维成像速度较快）	高速+低损伤，适合透明样本动态发育过程观察（如胚胎发生）	依赖样本透明度，高散射组织成像质量差	斑马鱼肿瘤异种移植[28]、胚胎[12,29–30]、心脏[31]活体光片显微成像
多光子显微镜	亚细胞级	中等（仅焦点处激发，焦点外无能量沉积，光毒性降低）	300 ~ 1 700 μm	中等（点扫描，但可通过共振扫描有限地提升速度）	深穿透+低损伤，适合厚组织活体长时间成像	分辨率低，设备昂贵，需专业操作	小鼠颅骨[32]、神经胶质瘤[33]、乳腺肿瘤[34]、皮肤损伤[35]、胫骨[36]活体多光子显微成像
扫描光场显微镜	亚细胞级	低（同时激发并探测整个三维体，光毒性显著降低）	100 ~ 200 μm	快（同时获取三维信息，计算成像）	高速三维成像，兼顾高速动态捕捉与空间分辨率	穿透深度有限，计算成像需要硬件和算法的支持	小鼠肝脏[19,21]、脾脏[21]、神经元[37]、淋巴结[37]，斑马鱼肿瘤异种移植[21]，果蝇神经元[19,21]，人脑类器官[21]活体扫描光场显微成像

2 活体显微成像技术在生物医学研究中的应用进展

2.1 活体显微成像技术在免疫学中的应用

免疫应答的有效性依赖免疫细胞的迁移、识别和效应功能的精准时空协调，活体显微成像技术为揭示免疫细胞的精细行为和免疫反应的动态过程提供了强大的工具。巨噬细胞向肌成纤维细胞转分化（macrophage–to–myofibroblast transdifferentiation, MMT）的关键标志是胶原蛋白的产生，利用双光子显微镜可实时监测这一转化过程，为 MMT 的体内研究提供可视化证据[38]。在适应性免疫研究方面，扫描光场显微镜技术实现了突破性进展，该技术能够同时追踪小鼠腹股沟淋巴结内多个生发中心的动态形成过程，并以高时空分辨率记录 T 细胞在不同生发中心间的迁移轨迹，为理解 T 细胞依赖的免疫应答提供了重要数据支持[37]。在免疫相关器官损伤研究中，活体显微成像技术揭示了顺铂诱导急性肾损伤（acute kidney injury, AKI）的早期免疫学特征，发现肾小管周围微循环障碍先于传统生物标志物出现，并证实中性粒细胞通过 CD11b 依赖的非机械阻塞机制影响微循环，这一发现为 AKI 的免疫干预提供了新思路[25]。Nieswandt 团队[24]利用负压吸窗技术克服呼吸运动干扰，在小鼠肺部实现动态显微成像，揭示了血小板糖蛋白 VI（GlycoproteinVI, GPVI）是维持血小板与中性粒细胞稳定互作，促进中性粒细胞黏附、迁移及簇状聚集的关键分子，为靶向 GPVI 治疗急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征提供了直接可视化证据。神经免疫学研究也受益于先进的成像技术。晶格光片显微镜在斑马鱼模型中清晰展现了施万细胞与感觉神经元在神经损伤修复过程中的免疫学相互作用，包括施万细胞的快速活化、对轴突再生的免疫调控等关键事件，深化了我们对神经免疫调节机制的理解[39]。

2.2 活体显微成像技术在肿瘤学中的应用

肿瘤的发生发展是多阶段、多细胞参与的复杂过程，涉及肿瘤细胞增殖、血管生成、侵袭转移

及免疫逃逸等多个环节[40]。活体显微成像技术的应用为研究这一动态过程提供了重要工具，使研究人员能够直观观察肿瘤细胞在肌肉、淋巴结、肺、脑、肝和骨等不同组织中的转移过程，包括循环肿瘤细胞的捕获、外渗、存活和增殖等关键步骤。然而，现有技术仍存在一定局限性。例如，转盘共聚焦显微镜虽能对小鼠乳腺肿瘤进行活体成像，观察不同阶段的骨髓细胞动态，但其成像范围通常局限于早期肿瘤组织。对于体积较大的肿瘤或更深层的肿瘤区域，活体成像技术往往难以覆盖，此时仍需依赖肿瘤切片的免疫组织化学染色或流式细胞术等传统方法进行补充分析[26]。在成像技术方面，双光子显微镜在哺乳动物肿瘤模型中展现出独特优势。例如，该技术通过高分辨率成像提供了直接证据，表明双膦酸盐类药物在骨骼外肿瘤中的主要靶点是肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages, TAMs）而非肿瘤细胞本身，这一发现为早期癌症患者的辅助治疗策略提供了重要理论依据[34]。类似地，陈昕教授团队[33]通过双光子活体成像验证了聚焦超声联合微泡（focused ultrasound-microbubbles, FUS-MB）可以增强药物穿透血脑屏障深入胶质瘤中心的递送效率，能显著提高胶质瘤组织中药物的浓度，有效抑制肿瘤生长并延长小鼠生存期，为脑胶质瘤靶向治疗提供了新方法。此外，斑马鱼肿瘤异种移植模型因其透明性和易于基因操作的特点，成为研究肿瘤血管生成的理想模型，扫描光场显微镜的应用进一步提升了该模型的解析能力，能够清晰捕捉肿瘤细胞团块在斑马鱼血管系统中的动态行为。研究发现，肿瘤细胞间通过接触依赖的方式形成回缩纤维和迁移体样囊泡结构，这些结构对维持肿瘤细胞簇的稳定性具有重要作用，揭示了循环肿瘤细胞行为的复杂性[21]。光片显微镜技术的引入使得在患者特异性斑马鱼异种移植模型中实时评估胶质母细胞瘤（glioblastoma, GBM）的生长成为可能。这一技术不仅实现了高通量成像，还建立了一种可用于患者间比较的GBM体内研究模型，为个性化治疗策略的开发提供了新思路[28]。

2.3 活体显微成像技术在神经科学领域的应用

神经科学研究中，神经元的电活动、突触传递以及神经环路的动态变化是理解大脑功能的关键。神经系统的复杂性要求成像技术兼具单细胞分辨率和全脑尺度的观测能力。活体显微成像技术通过不断突破分辨率与视野的限制，推动了神经科学从分子到环路的多层次研究。三光子显微镜的发展将成像深度拓展至1.7 mm，通过1 650 nm波长激发红色荧光蛋白标记的小胶质细胞，能够在1 100 μm的深度量化小胶质细胞过程的动力学，这一深度是以往技术难以达到的，拓宽了对胶质细胞在大脑深层活动的观察范围[41]。在成像速度方面，传统双光子显微镜的逐点扫描方式存在固有局限。相比之下，扫描光场显微镜通过先进的计算重建算法将成像帧率提升至数百赫兹，为捕捉神经冲动等瞬时电生理活动提供了理想工具[21]。随着研究需求从亚细胞结构向器官层面的扩展，最新研发的扫描光场显微镜已能在8.0 mm × 6.0 mm × 0.4 mm的小鼠皮层体积内实现单细胞分辨率成像，支持同时监测数万个神经元的网络活动，为皮层神经网络研究开辟了新途径[37]。特别值得关注的是头戴式显微镜技术的兴起。这种创新性的成像设备能够对自由活动的小鼠进行长期稳定的神经活动监测，实现了在自然行为状态下对皮层神经元动态互作的高分辨率观察。这种技术将神经活动研究与行为学观察有机结合，为理解认知和行为背后的神经机制提供了前所未有的研究窗口[42]。

2.4 活体显微成像技术在发育与再生领域的应用

发育生物学研究高度依赖对胚胎早期发育过程的连续动态追踪。斑马鱼因其胚胎透明、发育周期短且遗传操作便捷等优势，已成为该领域研究的理想模式生物。在技术应用方面，光片荧光显微镜（light sheet fluorescence microscope, LSFM）凭借其优异的光学层析能力和低光毒性，成为研究斑马鱼胚胎发育过程及发育毒性评估的重要工具[29,43]。通过将光片显微镜与自适应光学技术相结合，研究者已能实现对斑马鱼胚胎中亚细胞结构动态变化的三维高时空分辨率成像，这为深入研究细胞周期中细胞器的动态行为提供了新的技术手段[44]。扫描光场显微镜在斑马鱼尾鳍损伤模型中可实现对免疫细胞向损伤部位迁移和聚集过程长达48 h的监测，为研究免疫反应的动态过程提供了高效手段[20]。

而在皮肤损伤修复研究中，双光子活体成像技术的应用揭示了白三烯 B4（leukotriene B4, LTB4）和整合素在中性粒细胞募集与群集过程中的关键调控作用，为理解炎症反应的分子机制提供了重要线索[35]。肝脏再生研究方面，多光子活体成像技术取得了突破性发现。研究者通过该技术观察到肝脏损伤后存在一种新型的膜联蛋白 A2 阳性（annexin A2+, ANXA2+）迁移性肝细胞亚群，这类细胞在伤口闭合过程中发挥关键作用[45]。值得注意的是，成像数据显示伤口闭合过程先于肝细胞增殖发生，这一发现凸显了 ANXA2+ 在肝脏再生中的重要作用。在该研究中，成像参数设置为每 10 min 采集 1 次数据。相比之下，扫描光场显微镜的高速成像能力使其能够在肝脏活体成像中以高时间分辨率（本实验设置为每隔 18 s 采集 1 个三维体）进行三维数据采集。其同时具备的极低光毒性和光漂白特性，有效保障了在此高频采样条件下成像结果的可靠性，避免了光损伤和光漂白的影响，这为更快速地捕捉生物学过程提供了技术保障[46]。通过活体显微成像技术从多种组织中获取的图像示例见图 1。

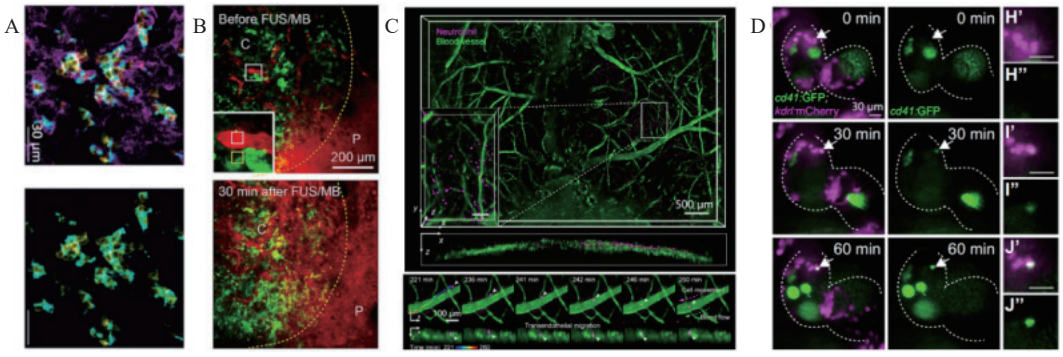


图 1 通过活体显微成像技术从多种组织中获取的图像示例 A 为小鼠急性肺损伤区域共聚焦成像，其中，青色为血小板，黄色为中性粒，洋红色为血管[24]；B 为小鼠神经胶质瘤区域双光子成像，其中，红色为荧光蛋白（Texas–Red）偶联的 DNA 八面体（药物），绿色为绿色荧光蛋白（GFP）偶联的人恶性胶质瘤细胞[33]；C 为小鼠急性脑损伤区域扫描光场显微镜成像，其中，洋红色为中性粒细胞（neutrophil），绿色为大脑血管（blood vessel）[37]；D 为斑马鱼心脏光片显微镜成像，其中，洋红色为红色荧光蛋白（mCherry）偶联的心内膜细胞标记 *kdrl*（kinase insert domain receptor like），绿色为绿色荧光蛋白（GFP）偶联的造血标志物 CD41[31]

3 活体显微成像技术的未来发展方向

活体显微成像技术能够获取大量细胞运动的时序动态信息，包括细胞的迁徙路径、速度、转弯频率和趋化指数等关键参数。然而，传统分析方法耗时较长，难以满足高效研究的需求。近年来，AI 驱动算法的出现为该领域带来了突破性进展，通过自动细胞追踪与行为分析，能够显著提升数据挖掘效率，为细胞运动规律的研究提供更高效的研究工具[47–48]。未来，若能将 AI 驱动算法与活体成像技术有机结合，不仅可以大幅提高图像处理和分析的效率，还能帮助研究人员更准确、便捷地识别细胞类型、分析细胞行为，并揭示细胞间的复杂相互作用，从而为生物医学研究带来更深入的见解。

单一的成像技术往往难以兼顾分辨率、穿透深度和成像速度。因此，未来活体显微成像技术的发展将朝着多模态融合的方向迈进。通过整合不同成像技术的优势，能够实现更全面、更深入的活体成像效果[49–50]。例如，双光子光片显微镜技术结合了双光子激发和光片照明的优势，已经在胚胎的活体成像中展现出了巨大潜力，能够以亚细胞分辨率解析细胞的详细结构和动态行为[51]。此外，将双光子显微镜的深部成像能力与扫描光场显微镜的大范围成像优势相整合，可以兼顾高分辨率、大范围和深部成像的需求，为研究生物体内复杂的细胞和组织结构提供更有力的支持[52]。

活体显微成像技术的发展不仅依赖于显微镜技术的进步，还需要更多相关生物学技术的协同进步。模式动物的发展为生命科学基础研究提供了不可或缺的工具，通过模拟人类疾病和生理过程，极大地推动了对生物机制的理解、基因功能的解析以及药物研发的进程[53–56]。斑马鱼模型因其胚胎透明、发育迅速、基因操作简便，广泛用于胚胎

发育、心血管疾病及肿瘤转移研究；小鼠模型则因与人类基因相似度高、疾病模型丰富，成为研究肿瘤、神经退行性疾病和免疫反应的首选模型；类器官模型能够更好地模拟人体器官的三维结构和功能，适用于研究器官发育、药物筛选和疾病机制。不同临床前模型各有优势，合理选择模型对于活体显微成像技术的应用至关重要。此外，光学窗口的开发和活体透明化技术的进步显著降低了活体成像对模式动物的侵入性，并扩大了对体内组织研究的可及性[57-61]。荧光探针的发展也是活体显微成像技术进步的重要组成部分。通过新型报告基因模型系统与创新成像技术相结合，如今已能够以多重方式可视化更多类型的信息，不仅局限于细胞迁移或增殖，还可进一步观察到分子信号或代谢动力学[62-64]。然而，目前显微镜成像通道的数量有限，导致样品一次可标记的荧光分子数量较少，无法深入分析细胞表型。因此，将活体成像技术与其他组学分析手段如RNA测序（RNA sequencing, RNA-seq）、DNA测序（DNA sequencing, DNA-seq）、利用转座酶研究染色质可进入性的高通量测序技术（assay for transposase-accessible chromatin with high throughput sequencing, ATAC-seq）等相整合，是一个极具潜力的发展方向。

活体成像技术在生物医学领域的研究不仅推动了基础生物医学的进步[65-68]，也极大地促进了临床医学的发展。相关研究为临床诊断提供了新的有效标志物，加速了对新药机制的理解和临床转化[6,69-70]。此外，类器官培养与成像技术的结合，为测试免疫疗法的疗效提供了强大的工具，有力推进了临床精准医疗的发展[71-72]。同时，随着多光子显微镜技术的发展，无标记非线性光学成像技术使得临床活体成像成为可能，尤其在皮肤科领域展现出广阔的应用前景[73-74]。作为一种非侵入性光学检测方法，双光子成像无需荧光染料，通过双光子激发荧光（two-photon excited fluorescence, TPEF）和SHG实现高分辨率成像，具有更高的成像精度、更深的组织穿透能力以及更小的光损伤和光毒性等优势。随着技术的不断小型化和性能提升，多光子成像有望在更多临床领域发挥重要作用，为疾病的早期诊断和治疗提供有力支持。

4 结语

活体显微成像技术的发展历程，是光学原理、工程技术与生物学需求深度融合的典范。从共聚焦的光学切片到扫描光场的计算重建，每一次技术革新都解锁了新的生物学问题。扫描光场显微镜凭借高速、低光毒性、高分辨的特性，正在重塑活体成像的研究范式，尤其在长时间动态追踪领域展现出不可替代的优势。然而，每种技术均有其适用边界：共聚焦仍是亚细胞结构的金标准，双光子适合深层组织，光片显微镜则在透明样本中独树一帜。未来，活体显微成像将向着“智能化、多模态、临床化”的方向发展，人工智能与计算光学的结合将突破数据处理瓶颈，多技术融合将实现从分子到器官的跨尺度解析。活体显微成像技术的这些进展，不仅将深化我们对生命动态过程的理解，更将为疾病诊断、药物研发和再生医学提供革命性工具。

[参 考 文 献]

[1] Su J, Song Y, Zhu Z, et al. Cell–cell communication: new insights and clinical implications [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9: 196.

[2] Zhu Y, Chen J, Chen C, et al. Deciphering mechanical cues in the microenvironment: from non-malignant settings to tumor progression [J]. Biomarker Research, 2025, 13(1): 11.

[3] Mempel T R, Lill J K, Altenburger L M. How chemokines organize the tumour microenvironment [J]. Nature Reviews Cancer, 2024, 24(1): 28-50.

[4] Pittet M J, Weissleder R. Intravital imaging [J]. Cell, 2011, 147(5): 983-991.

[5] Stephens D J, Allan V J. Light microscopy techniques for live cell imaging [J]. Science, 2003, 300(5616): 82-86.

[6] Entenberg D, Oktay M H, Condeelis J S. Intravital imaging to study cancer progression and metastasis [J]. Nature Reviews Cancer, 2023, 23: 25-42.

[7] Peng X, Wang Y, Zhang J, et al. Intravital imaging of the functions of immune cells in the tumor microenvironment during immunotherapy [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1288273.

[8] Honda M, Kadohisa M, Yoshii D, et al. Intravital imaging of immune responses in intestinal inflammation [J]. Inflammation and Regeneration, 2023, 43: 9.

[9] White J G, Amos W B, Fordham M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy [J]. The Journal of cell biology, 1987, 105(1): 41-48.

[10] Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto F H, et al. Introduction to confocal microscopy [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2012, 132(12): 1-5.

[11] Wan Y, McDole K, Keller P J. Light–sheet microscopy and its potential for understanding developmental processes [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2019, 35: 655–681.
[12] Ding Y, Ma J, Langenbacher A D, et al. Multiscale light–sheet for rapid imaging of cardiopulmonary system [J]. JCI Insight, 2018, 3(16): e121396.
[13] Chow D J X, Schartner E P, Corsetti S, et al. Quantifying DNA damage following light sheet and confocal imaging of the mammalian embryo [J]. Scientific Reports, 2024, 14: 20760.
[14] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two–photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. Science, 1990, 248(4951): 73–76.
[15] Campagnola P J, Loew L M. Second–harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms [J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1356–1360.
[16] James D S, Campagnola P J. Recent advancements in optical harmonic generation microscopy: applications and perspectives [J]. BME Frontiers, 2021: 3973857.
[17] Hennessy N, Simms C. Skeletal muscle extracellular matrix structure under applied deformation observed using second harmonic generation microscopy [J]. Acta Biomaterialia, 2023, 172: 135–146.
[18] Seeger M, Karlas A, Soliman D, et al. Multimodal optoacoustic and multiphoton microscopy of human carotid atheroma [J]. Photoacoustics, 2016, 4(3): 102–111.
[19] Lu Z, Liu Y, Jin M, et al. Virtual–scanning light–field microscopy for robust snapshot high–resolution volumetric imaging [J]. Nature Methods, 2023, 20(5): 735–746.
[20] Lu Z, Jin M, Chen S, et al. Physics–driven self–supervised learning for fast high–resolution robust 3D reconstruction of light–field microscopy [J]. Nature Methods, 2025, 22(7): 1545–1555.
[21] Wu J, Lu Z, Jiang D, et al. Iterative tomography with digital adaptive optics permits hour–long intravital observation of 3D subcellular dynamics at millisecond scale [J]. Cell, 2021, 184(12): 3318–3332.
[22] Lu Z, Cai Y, Nie Y, et al. A practical guide to scanning light–field microscopy with digital adaptive optics [J]. Nature Protocols, 2022, 17(9): 1953–1979.
[23] Lu Z, Zuo S, Shi M, et al. Long–term intravital subcellular imaging with confocal scanning light–field microscopy [J]. Nature Biotechnology, 2025, 43(4): 569–580.
[24] Burkard P, Schonhart C, Vögtle T, et al. A key role for platelet GPVI in neutrophil recruitment, migration, and NETosis in the early stages of acute lung injury [J]. Blood, 2023, 142(17): 1463–1477.
[25] Park I, Kim S, Um Y W, et al. Intravital imaging of peritubular microcirculation impairment in cisplatin–induced acute kidney injury [J]. JCI Insight, 2025, 10(9): e178689.
[26] Lohela M, Casbon A J, Olow A, et al. Intravital imaging reveals distinct responses of depleting dynamic tumor–associated macrophage and dendritic cell subpopulations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(47): E5086–E5095.
[27] Lee J, Balzraine B, Schweizer A, et al. Neutrophil CRACR2A promotes neutrophil recruitment in sterile inflammation and ischemic stroke [J]. Circulation, 2025, 151(10): 696–715.
[28] Almstedt E, Rosén E, Gloger M, et al. Real–time evaluation of glioblastoma growth in patient–specific zebrafish xenografts [J]. Neuro–Oncology, 2022, 24(5): 726–738.
[29] Eum J, Kwak J, Kim H J, et al. 3D visualization of developmental toxicity of 2,4,6–trinitrotoluene in zebrafish embryogenesis using light–sheet microscopy [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(11): 1925.
[30] Djenoune L, Mahamdeh M, Truong T V, et al. Cilia function as calcium–mediated mechanosensors that instruct left–right asymmetry [J]. Science, 2023, 379(6627): 71–78.
[31] Bornhorst D, Hejjaji A V, Steuter L, et al. The heart is a resident tissue for hematopoietic stem and progenitor cells in zebrafish [J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 7589.
[32] Gaertner F, Ishikawa–Ankerhold H, Stutte S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control homeostasis of megakaryopoiesis [J]. Nature, 2024, 631(8021): 645–653.
[33] Shen Y, Hu M, Li W, et al. Delivery of DNA octahedra enhanced by focused ultrasound with microbubbles for glioma therapy [J]. Journal of Controlled Release, 2022, 350: 158–174.
[34] Junankar S, Shay G, Jurczyluk J, et al. Real–time intravital imaging establishes tumor–associated macrophages as the extraskeletal target of bisphosphonate action in cancer [J]. Cancer Discovery, 2015, 5(1): 35–42.
[35] Lämmermann T, Afonso P V, Angermann B R, et al. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo [J]. Nature, 2013, 498(7454): 371–375.
[36] Bhattacharyya N D, Kyaw W, McDonald M M, et al. Minimally invasive longitudinal intravital imaging of cellular dynamics in intact long bone [J]. Nature Protocols, 2023, 18(12): 3856–3880.
[37] Zhang Y, Wang M, Zhu Q, et al. Long–term mesoscale imaging of 3D intercellular dynamics across a mammalian organ [J]. Cell, 2024, 187(21): 6104–6122.
[38] Li Y, Liu T M. Discovering macrophage functions using in vivo optical imaging techniques [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 502.
[39] Xiao Y, Faucherre A, Pola–Morell L, et al. High–resolution live imaging reveals axon–glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish [J]. Disease Models & Mechanisms, 2015, 8(6): 553–564.
[40] Nguyen D X, Bos P D, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ–specific colonization [J]. Nature Reviews Cancer, 2009, 9: 274–284.
[41] Fuhrmann F, Nebeling F C, Musacchio F, et al. Three–photon in vivo imaging of neurons and glia in the medial prefrontal cortex with sub–cellular resolution [J]. Communications Biology, 2025, 8: 795.
[42] Zhang Y, Yuan L, Zhu Q, et al. A miniaturized mesoscope for the large–scale single–neuron–resolved imaging of neuronal activity in freely behaving mice [J]. Nature Biomedical Engineering, 2024, 8(6): 754–774.
[43] Ki S, Kwon S H, Eum J, et al. 3D light–sheet assay assessing novel valproate–associated cardiotoxicity and folic acid relief in zebrafish embryogenesis [J]. Chemosphere, 2019, 227: 551–560.
[44] Liu T L, Upadhyayula S, Milkie D E, et al. Observing the cell

in its native state: imaging subcellular dynamics in multicellular organisms [J]. Science, 2018, 360(6386): eaaq1392.
[45] Matchett K P, Wilson-Kanamori J R, Portman J R, et al. Multimodal decoding of human liver regeneration [J]. Nature, 2024, 630(8015): 158-165.
[46] Chen S, Lu Z, Zhao Y, et al. Myeloid-mas signaling modulates pathogenic crosstalk among MYC+CD63+ endothelial cells, MMP12+ macrophages, and monocytes in acetaminophen-induced liver injury [J]. Advanced Science, 2024, 11(16): e2306066.
[47] Mencattini A, Di Giuseppe D, Comes M C, et al. Discovering the hidden messages within cell trajectories using a deep learning approach for in vitro evaluation of cancer drug treatments [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 7653.
[48] Ravindran S. Five ways deep learning has transformed image analysis [J]. Nature, 2022, 609(7928): 864-866.
[49] Karim M M, Sun R, Khajavi B, et al. Multimodal optical coherence tomography and two-photon light sheet fluorescence microscopy for embryo imaging [J]. Journal of Biomedical Optics, 2025, 30(6): 060501.
[50] Harder A, Nagarajan B, Odermatt B, et al. Automatic detector synchronization for long-term imaging using confocal light-sheet microscopy [J]. Microscopy Research and Technique, 2023, 86(2): 125-136.
[51] Saitou T, Imamura T. Extended depth of focus two-photon light-sheet microscopy for in vivo fluorescence imaging of large multicellular organisms at cellular resolution [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(12): 10186.
[52] Zhao Z, Zhou Y, Liu B, et al. Two-photon synthetic aperture microscopy for minimally invasive fast 3D imaging of native subcellular behaviors in deep tissue [J]. Cell, 2023, 186(11): 2475-2491.
[53] MacRae C A, Peterson R T. Zebrafish as a mainstream model for in vivo systems pharmacology and toxicology [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2023, 63: 43-64.
[54] Zhou L, Huang J, Li C, et al. Organoids and organs-on-chips: recent advances, applications in drug development, and regulatory challenges [J]. Med, 2025, 6(4): 100667.
[55] Du X, Jia H, Chang Y, et al. Progress of organoid platform in cardiovascular research [J]. Bioactive Materials, 2024, 40: 88-103.
[56] Wakefield L, Agarwal S, Tanner K. Preclinical models for drug discovery for metastatic disease [J]. Cell, 2023, 186(8): 1792-1813.
[57] Ricard C, Hazart D, Delhomme B, et al. Fast tissue clearing and volume imaging techniques for anatomy [J/OL]. Microscopy Research and Technique, 2025 [2025-06-09]. https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jemt.70013.
[58] Zhao X, Pellow C, Goertz D E. Intravital imaging and cavitation monitoring of antivascular ultrasound in tumor microvasculature [J]. Theranostics, 2023, 13(1): 250-266.
[59] Ahn S, Yoon J Y, Kim P. Intravital imaging of cardiac tissue utilizing tissue-stabilized heart window chamber in live animal model [J]. European Heart Journal Imaging Methods and Practice, 2024, 2(3): qyae062.
[60] Entenberg D, Voiculescu S, Guo P, et al. A permanent window for the murine lung enables high-resolution imaging of cancer metastasis [J]. Nature Methods, 2018, 15(1): 73-80.
[61] Zhu X, Huang Q, Jiang L, et al. Longitudinal intravital imaging of mouse placenta [J]. Science Advances, 2024, 10(12): eadk1278.
[62] Gao X, Xiong Y, Ma H, et al. Visualizing bulk autophagy in vivo by tagging endogenous LC3B [J]. Autophagy, 2025, 21(7): 1591-1607.
[63] Fan X, Zhou Y, Bai W, et al. Intravital imaging of translocated bacteria via fluorogenic labeling of gut microbiota in situ [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2025, 122(13): e2415845122.
[64] Zhanghao K, Li M, Chen X, et al. Fast segmentation and multiplexing imaging of organelles in live cells [J]. Nature Communications, 2025, 16: 2769.
[65] Alieva M, Wezenaar A K L, Wehrens E J, et al. Bridging live-cell imaging and next-generation cancer treatment [J]. Nature Reviews Cancer, 2023, 23(11): 731-745.
[66] Jorch S K, Deppermann C. Intravital imaging allows organ-specific insights into immune functions [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 623906.
[67] Wang H, Li L, Li Y, et al. Intravital imaging of interactions between iNKT and kupffer cells to clear free lipids during steatohepatitis [J]. Theranostics, 2021, 11(5): 2149-2169.
[68] Castanheira F V S, Nguyen R, Willson M, et al. Intravital imaging of three different microvascular beds in SARS-CoV-2-infected mice [J]. Blood Advances, 2023, 7(15): 4170-4181.
[69] Stern M A, Dingledine R, Gross R E, et al. Epilepsy insights revealed by intravital functional optical imaging [J]. Frontiers in Neurology, 2024, 15: 1465232.
[70] Giampetraglia M, Weigelin B. Recent advances in intravital microscopy for preclinical research [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2021, 63: 200-208.
[71] Yang M, Hou S, Chen Y, et al. Emerging insights into intravital imaging, unraveling its role in cancer immunotherapy [J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2025, 74: 100.
[72] Ko J, Hyung S, Cheong S, et al. Revealing the clinical potential of high-resolution organoids [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2024, 207: 115202.
[73] König K, Breunig H G, Batista A, et al. Translation of two-photon microscopy to the clinic: multimodal multiphoton CARS tomography of in vivo human skin [J]. Journal of Biomedical Optics, 2020, 25(1): 014515.
[74] Lentsch G, Baugh E G, Lee B, et al. Research techniques made simple: emerging imaging technologies for noninvasive optical biopsy of human skin [J]. The Journal of investigative dermatology, 2022, 142(5): 1243-1252.