·样本制备·

双光子活体成像样本准备及操作方法研究

柏文娟　王靳　赵文颖　王静*

（上海交通大学医学院上海市免疫学研究所，上海 200025）

【摘要】 双光子活体成像技术能够直观地监测活体的体内动态过程，已成为生命科学研究的重要手段，然而样本准备一直是该技术运用的难点，样本准备直接决定了成像的稳定性和成像质量。鉴于目前关于双光子活体成像的样本准备尚无系统性的介绍，本文结合实验室多年来在活体成像样本准备方面的实践积累，重点介绍肺脏、肠道、脑、肝脏、皮肤等组织的样本准备流程与上机操作要点，旨在为双光子活体成像的样本准备及上机操作提供参考，帮助研究人员掌握双光子活体成像的操作技巧，推进双光子活体成像技术更加广泛的运用。

【关键字】 活体成像；双光子显微镜；细胞动态；细胞互作；显微手术

【中图分类号】 R-331　　【文献标志码】 A　【DOI】 10.11876/mimt202504014

Sample preparation and operating methods for two-photon intravital imaging

Bai Wenjuan, *Wang Jin*, *Zhao Wenying*, *Wang Jing**

(*Shanghai Institute of Immunology*, *Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*, *Shanghai 200025*, *China*)

【Abstract】 Intravital two-photon imaging technology has become an essential tool in life science research due to its ability to intuitively monitor the in vivo dynamic processes of living organisms. However, sample preparation has always been a major challenge in the application of this technology, and it directly determines the stability and quality of imaging. There is currently no systematic introduction to sample preparation for intravital two-photon imaging. Based on the rich practical experience accumulated in the laboratory over the years in the preparation of samples for intravital imaging, we mainly introduce the sample preparation procedures and key points of operation for tissues such as the lung, intestine, brain, liver, and skin. The aim is to provide a reference for sample preparation and operation before intravital two-photon imaging, assist researchers in mastering the operation of intravital two-photon imaging, and promote the broader application of this technology.

【Key words】 Intravital imaging; Two-photon microscope; Cellular dynamics; Cell-cell interaction; Microsurgery

诞生于1990年的双光子显微镜活体成像技术是一种先进的光学成像技术[1]，它基于长波长激发，具有高分辨率、低光毒性和深度成像的特点。双光子活体成像技术可以直观地监测活体的体内动态过程，已越来越多地运用于生命科学的各个领域。

双光子活体成像技术运用的瓶颈是样本准备，由于样本是在体的，而机体有心跳、呼吸和肌肉收缩等生理活动，这些都会影响组织成像的稳定性。不同组织位于机体的不同部位，受影响的程度也各不相同，有的组织本身质地比较柔软，容易产生吸附损伤，因此针对不同的组织需要找到各自能稳定吸附的最小吸力，这样既能最大程度地减少组织损伤又能固定住组织，从而可以得到稳定的高清成像甚至是长时间序列成像。

目前关于双光子活体成像的样本准备尚无系统性的介绍。本文结合实验室多年来在活体成像样本准备方面积累的丰富经验，系统性地总结了肺脏、肠道、肝脏、脑、皮肤等组织的样本准备流程及上机操作要点，旨在为双光子活体成像的样本准备及其操作流程提供参考，帮助研究人员掌握双光子活

基金项目：国家自然科学基金面上项目（82371760）

第一作者：柏文娟，女，博士研究生，实验师，研究方向：主要从事显微成像平台、大型显微镜的管理工作

通信作者：王静，女，博士研究生，研究员，研究方向：运用活体成像研究天然免疫细胞的动态及功能

体成像的具体操作，以克服样本准备难题和优化双光子活体成像技术，推动双光子活体成像技术更加广泛的运用。

1 双光子活体成像的样本准备流程

活体成像的样本准备涉及一系列复杂的手术操作，总的原则是在手术操作过程中伤口要尽量小，并避免出血。不同组织活体成像的第一步都是要把组织暴露出来，便于吸附或者贴附固定观察，其中，肺脏等胸腔部位的组织，需要打开胸腔后气管插管，连接呼吸机维持动物的呼吸；肠道等涉及腹腔的组织需要开腹；脑组织需要制作颅窗；皮下组织需要剪开皮肤。操作过程中需要注意不要碰触成像的组织表面，尽量使组织处于正常生理状态如保持组织的湿润，避免组织损伤。整个过程中由于动物处于麻醉状态，要特别注意把控麻醉的深度，避免因麻醉过浅，动物在成像过程中苏醒挣扎导致成像视野丢失，也要避免麻醉过深导致动物死亡，且要将动物置于加热垫上维持体温。下面详细介绍肺脏、肠道、肝脏、脑、皮肤、皮下脂肪、腹股沟淋巴结、脾脏、肾脏等常规组织活体成像的样本准备流程。本研究动物实验在上海交通大学医学院上海市免疫学研究所进行，经上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会批准（批准号：2021–376）。

1.1 肺组织活体成像的样本准备

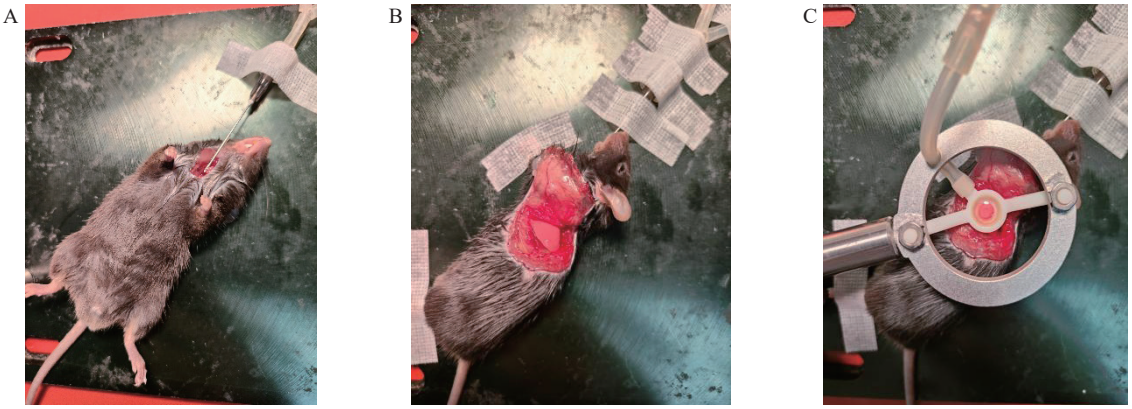
（1）每 20 g 小鼠给予 400 μL体积的 1.25%三溴乙醇，以麻醉小鼠。

（2）涂抹矿物油，颌下皮肤剪开，用眼科镊（规格：长度为 10 cm）钝性分离暴露气管，气管剪开一个小口，将与呼吸机（品牌：瑞沃德，型号：R415，参数设置：潮气量约为 0.3 mL，速度为 120 rpm，呼吸终末正压为 3 cm水柱）连接的气管插管插入小鼠气管内，插入气管深度不要超过 0.5 cm（图 1A）。

（3）调整小鼠右侧卧位于固定器上，固定器置于体温维持仪（品牌：玉研，型号：S–100）上以使小鼠保持温暖，涂抹矿物油，剪开胸廓皮肤，用棉签擦去剪断的毛发，用剪刀剥离皮肤下的肌肉，先剪身体中央侧的肋骨，再沿着肋间隙避开肋间血管剪到另一侧肋骨位置，用电凝笔点击血管后剪去 2 ~ 3 根肋骨，暴露左侧肺部（图 1B）。

（4）采用负压以固定待观察的肺组织[2]（图 1C），使用活体成像器官固定仪（品牌：福盖光学，型号：OF2000），缓慢手动调节旋钮至显示屏幕上的数值是—1.0 kPa，吸附器的吸附头是用树脂材料 3D 定制打印的，如图 1C 所示，中间的观察窗的直径为 4 mm，上面粘贴一片厚度为 0.17 mm的盖玻片，活体成像器官固定仪通过自带的塑料管与吸附头带孔的侧分枝连接，吸附头的另外两个位于一条线上的分枝可用螺丝固定至与固定器连接的 3D 打印的硬性圆环上，以固定吸附头，吸附头侧分枝的孔道位于盖玻片的下方，将吸附头带玻片的观察窗对准靠近肺组织中央的区域，打开活体成像器官固定仪，先把旋钮调为 0，缓慢手动调大旋钮至肺组织吸附到盖玻片下方，再调节旋钮至显示屏幕上的数值为—1.0 kPa时，停止调节旋钮，此时既比较稳定地将肺组织吸附在盖玻片下方也不会损伤肺组织。

（5）尾静脉注射荧光染料进行相应的标记，待上机拍摄。



注：如 A 图所示，将与呼吸机自带塑料管路连接的气管插管通过小鼠气管切口插入小鼠的气管中，插入气管深度不要超过 0.5 cm；如 B 图所示，通过气管插管连接好呼吸机后，才可以打开胸腔，可确保肺部呼吸正常，暴露合适大小的肺组织，既能避免造成不必要的伤口，又可以保障预留吸附头充足的固定空间；如 C 图所示，将树脂吸附头固定在固定器的圆环上，吸附头带孔道的侧支与活体成像器官固定仪连接，手动调节旋钮至合适的负压，将组织稳定地吸附在盖玻片的下方，同时避免过高的吸附力损伤肺组织。

图 1 肺组织活体成像的样本准备 A 为小鼠气管插管；B 为暴露肺组织；C 为肺组织的固定

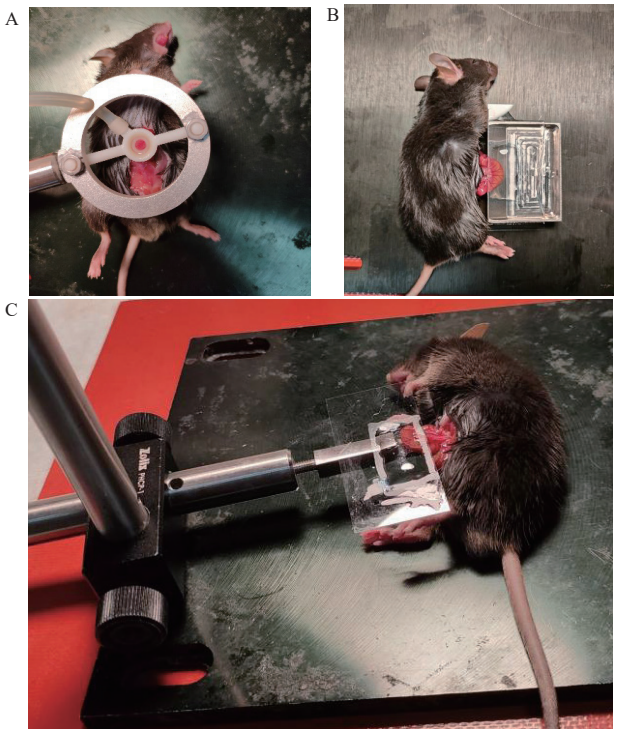
1.2 肠组织活体成像的样本准备

（1）给予小鼠0.25 mg洛哌丁胺，灌胃体积100 μL，以抑制成像拍摄过程中的肠道蠕动。

（2）每20 g小鼠给予400 μL体积的1.25%三溴乙醇，以麻醉小鼠。

（3）剪开腹腔，用蘸取磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline, PBS）的棉签轻轻拨动暴露待观察的肠段，避免撕扯肠系膜导致出血，可采用负压（−0.7 kPa）吸附的方法[3]（图2A）或者盖玻片贴附的方法（图2B、图2C）以固定待观察的肠段，固定器置于加热垫上以使小鼠保持温暖。

（4）尾静脉注射荧光染料进行相应的标记，待上机拍摄。



注：如A图所示，剪开腹腔暴露出肠组织，将固定在固定器圆环上的树脂吸附头的带孔道的侧支与活体成像器官固定仪连接，手动调节旋钮至合适的负压，将肠组织稳定地吸附在盖玻片的下方；如B图所示，剪开腹腔暴露出肠组织，小鼠处侧卧位，将肠组织放置在充满生理盐水的定制刚性小皿的边缘缓坡上，缓坡从皿边缘延伸到皿底部中央，用0.17 mm厚度的盖玻片搭在小皿边上，利用水的张力将玻片稳定地固定在皿上；如C图所示，剪开腹腔暴露出肠组织，小鼠处侧卧位，将肠组织放置在定制的刚性杆臂的凹槽内，用0.17 mm厚度的盖玻片搭在杆臂上，利用玻片的重力将其稳定地固定在肠组织上方。

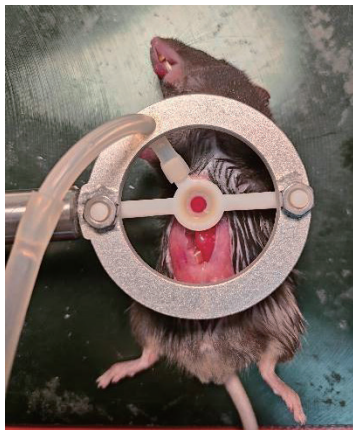
图2 肠组织活体成像的样本准备 A为采用负压吸附法的肠组织固定；B为采用盖玻片贴附法的肠组织固定方法一；C为采用盖玻片贴附法的肠组织固定方法二

1.3 肝组织活体成像的样本准备

（1）每20 g小鼠给予400 μL体积的1.25%三溴乙醇，以麻醉小鼠。

（2）腹部涂抹矿物油，剪开腹部皮肤，剪开腹腔，用蘸取PBS的棉签轻轻拨动肝组织的背面暴露待观察的区域，采用负压（−0.6 kPa）吸附的方法以固定待观察的肝组织（图3），固定器置于加热垫上以使小鼠保持温暖。

（3）尾静脉注射荧光染料进行相应的标记，待上机拍摄。



注：剪开腹腔暴露出肝组织，将固定在固定器圆环上的树脂吸附头的带孔道的侧支与活体成像器官固定仪连接，手动调节旋钮至合适的负压，将肝组织稳定地吸附在盖玻片的下方。

图3 肝组织运用双光子显微镜成像的样本准备

肝组织也可以使用倒置的荧光显微镜进行观察，可利用小鼠自身体重稳定肝脏[2,4]，且由于肝脏质地较软，非常容易产生吸附损伤，相较于双光子活体成像，共聚焦显微成像更适合肝脏的活体成像，其样本准备及上机操作方法如下。

（1）每20 g小鼠给予400 μL体积的1.25%三溴乙醇，以麻醉小鼠。

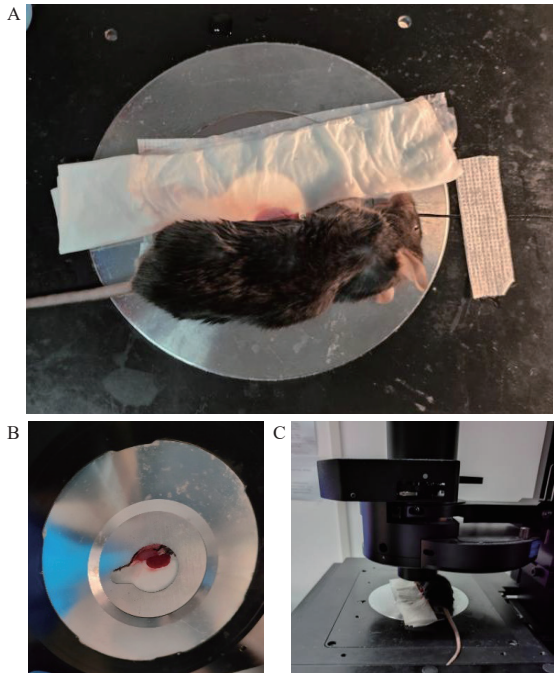
（2）腹部涂抹矿物油，剪去腹部皮肤，用电凝笔去除腹膜，胸部剑突骨系一根手术线以方便牵拉，使肝脏更好地远离身体的位置，从而减少受心脏呼吸的影响，以便更稳定地被固定住。

（3）小鼠暴露的肠组织包裹PBS浸润的纱布右侧卧位于固定器上，用蘸取PBS的棉签轻轻拨动肝组织的背面，暴露待观察的区域于固定器中央的盖玻片上（棉签勿接触待观察的那一面肝组织），用PBS浸润的无尘纸覆盖于肝表面，目的是保持肝脏的湿润，以及利用肝脏自身的重量结合湿纸的重量和吸附力使

肝组织更稳定地固定在盖玻片上（图 4A、图 4B），在小鼠身上盖上加热垫以使小鼠保持温暖。

（4）尾静脉注射荧光染料进行相应的标记，将固定器放置于共聚焦显微镜的载物台上，于倒置的空气镜下拍摄（图 4C）。

同理，皮下肿瘤活体成像的样本准备和上机操作与肝组织基本相同，需要注意的是要剪开包裹肿瘤的皮肤以暴露肿瘤组织。



注：如 A 图所示，剪开腹腔暴露出肝组织，小鼠处侧卧位，将肝组织贴附在显微镜配套钢板的中央观察孔的厚度为 0.17 mm的盖玻片上，牵拉系在小鼠胸部剑突骨上的 4–0 手术线以调整肝组织的位置使其更好地远离小鼠身体，利用肝脏自身的重量结合湿纸的重量和吸附力使肝组织更稳定地固定在盖玻片上；如 C 图所示，将肝组织贴附固定好的小鼠放置在共聚焦显微镜的载物台上，若长时间拍摄可在小鼠身上放置一块小型体温维持垫或者棉球。

图 4 肝组织运用共聚焦显微镜成像的样本准备以及上机操作 A 为正面视角下肝组织的贴附固定；B 为底部视角下肝组织的贴附固定；C 为肝组织共聚焦显微镜活体成像的上机操作

1.4 脑组织活体成像的样本准备

（1）每 20 g 小鼠给予 400 μL体积的 1.25%三溴乙醇，以麻醉小鼠。

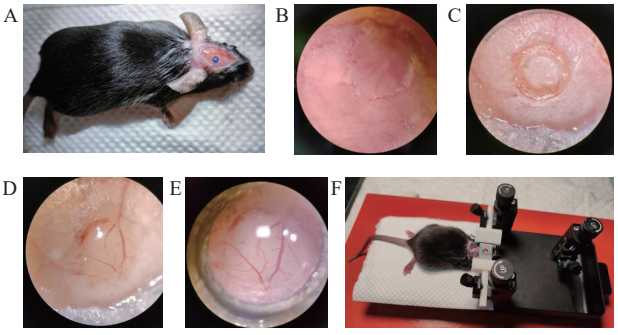
（2）使用聚维酮碘消毒手术区域。将小鼠放在手术台上，使用加热垫维持体温。

（3）剃除颅顶毛发，用脱毛膏进一步脱除颅顶毛发，消毒后剪开皮肤，暴露颅骨，刮去待观察区域颅骨表面筋膜组织，用记号笔标记好要打磨的区域（图 5A）。

（4）若是磨薄颅骨成像，则在体视显微镜（品牌：奥林巴斯，型号：SZ61）下用微型无线颅钻（品牌：瑞沃德，型号：87001）轻柔、缓慢地磨薄整个目标区域（图 5B），磨好后撒上氧化锡粉末，用硅胶条轻柔研磨，使磨薄区域平滑，用人工脑脊髓液冲洗掉氧化锡[5]。用 502 胶水将定制头板的中央观察孔对准磨薄区域固定在颅骨上。

（5）若是揭开颅骨成像，则在体视显微镜下沿着目标区域轻柔、缓慢地打磨一圈，打磨至如图 5C 所示的程度，持精细镊（规格：长度为 14 cm）与颅窗表面成 30° 夹角将颅骨片慢慢地揭开（图 5D），滴加人工脑脊髓液保持组织湿润。用 502 胶水将头板的中央观察孔对准暴露的脑组织固定在颅骨上（图 5E）。在暴露和固定过程中，保持组织湿润，避免干燥或损伤。

（6）将小鼠脑定位适配器（品牌：瑞沃德，型号：68030）放置于加热垫上，将固定着头板的小鼠固定在小鼠脑定位适配器上，在头板中央观察孔的周围用免疫组化笔画一个圆圈，然后在圆圈内滴加人工脑脊髓液，尾静脉注射标记的荧光染料，待上机拍摄（图 5F）。



注：如 A 图所示，用记号笔画小于观察窗直径的圆圈；如 B 图所示，在体视显微镜下，将标记的圆圈内颅骨全部打薄，待颅骨下面的血管清晰可见即可停止打磨，注意慢慢打磨不要磨穿颅骨以免损伤脑组织；如 C 图所示，在体视显微镜下，沿着标记的圆圈轻柔、缓慢地打磨一圈，待颅骨下面的一圈血管清晰可见即可停止打磨；如 D 图所示，持精细镊与颅窗表面成 30° 夹角将颅骨片慢慢地揭开，滴加人工脑脊髓液保持组织湿润；如 E 图所示，用 502 胶水将定制头板的中央观察孔对准暴露的脑组织固定在颅骨上，保持组织湿润，避免干燥或损伤；如 F 图所示，将固定在小鼠颅骨上的头板插入 3D 打印的带插孔的树脂材料上，树脂材料上设计有杆，将杆固定在小鼠脑定位适配器上。

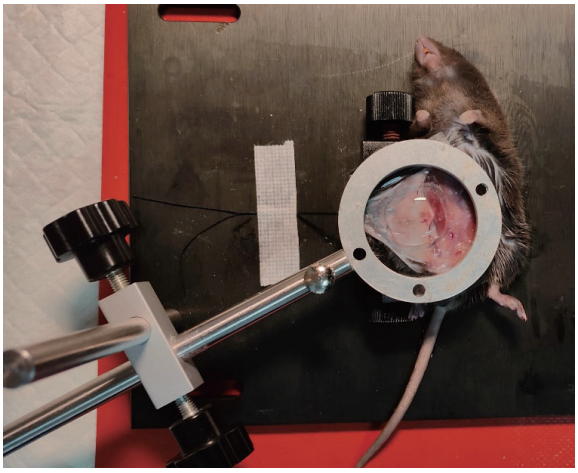
图 5 脑组织活体成像的样本准备 A 为暴露颅骨，标记目标区域；B 为磨薄颅骨成像的打磨方式；C 为揭开颅骨成像的打磨方式；D 为揭开颅骨，暴露脑组织；E 为脑组织的头板固定；F 为头板与小鼠脑定位适配器的连接

1.5 皮肤、皮下脂肪、腹股沟淋巴结组织活体成像的样本准备

（1）每20 g小鼠给予400 μL体积的1.25%三溴乙醇，以麻醉小鼠。

（2）剪开腹部皮肤，在皮肤上穿一根线以方便牵拉皮肤，将皮肤铺在有一定高度的平整的固定器上，用线将皮肤牵拉平整，轻轻用眼科镊剥离覆盖在淋巴结上的皮下脂肪以暴露淋巴结，采用盖玻片贴附的方法（图6）以固定待观察的皮肤、皮下脂肪、腹股沟淋巴结，固定器置于加热垫上以使小鼠保持温暖。

（3）尾静脉注射荧光染料进行相应的标记，待上机拍摄。



注：剪开腹部皮肤暴露出腹股沟淋巴结，同时淋巴结附近的皮下脂肪和皮肤也已暴露出来，在小鼠身侧放置一个平整的高度适合的铁块，将腹股沟淋巴结、皮下脂肪和皮肤区域放置在铁块上，在剪开皮肤的边缘用手术针线穿上一根4–0的对折线，牵拉线以展平和固定住皮肤，在固定器圆环的底部粘贴一片厚度为0.17 mm的盖玻片，将固定器圆环底部的玻片轻轻地贴附在皮肤上，在待观察的腹股沟淋巴结、皮下脂肪和皮肤区域的玻片上方用组化笔画一个圆圈，滴加膦酸盐缓冲液保水，以待水镜介入观察。

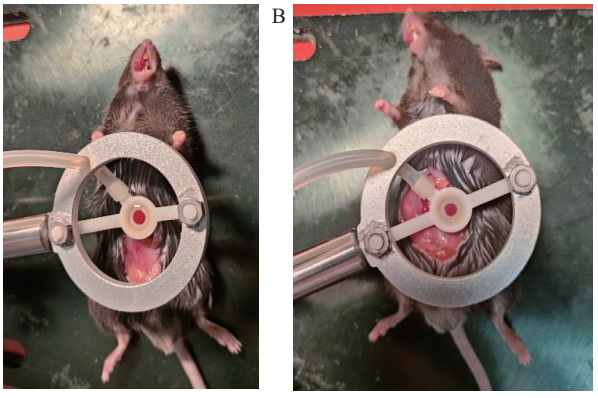
图6 皮肤、皮下脂肪、腹股沟淋巴结组织活体成像的样本准备

1.6 脾脏、肾脏组织活体成像的样本准备

（1）每20 g小鼠给予400 μL体积的1.25%三溴乙醇，以麻醉小鼠。

（2）腹部涂抹矿物油，剪开腹部皮肤，剪开腹腔，用蘸取PBS的棉签轻轻拨动脾脏和肾脏的背面暴露待观察的区域，采用负压（—1.0 kPa）吸附的方法以固定待观察的组织[6]（图7A、图7B），固定器置于加热垫上以使小鼠保持温暖。

（3）尾静脉注射荧光染料进行相应的标记，待上机拍摄。



注：如A图所示，剪开腹腔暴露出脾脏组织，将固定在固定器圆环上的树脂吸附头的带孔道的侧支与活体成像器官固定仪连接，手动调节旋钮至合适的负压将脾脏组织稳定地吸附在盖玻片的下方；如B图所示，剪开腹腔暴露出肾脏组织，将固定在固定器圆环上的树脂吸附头的带孔道的侧支与活体成像器官固定仪连接，手动调节旋钮至合适的负压，将肾脏组织稳定地吸附在盖玻片的下方。

图7 脾脏、肾脏组织活体成像的样本准备 A为脾脏组织的固定；B为肾脏组织的固定

1.7 总结

理论上，只要组织在小鼠活着麻醉的状态下可以暴露出来，并且能够以吸附或者贴附的方式固定住，都可以进行活体成像。成像的深度以及成像的稳定性取决于组织本身的特点。此外，增强吸附操作的稳定性有助于提高成像的稳定性，有利于拍摄出视野内不抖动的稳定的图像或者视频。如果能够保证手术操作创伤小，维持小鼠长期麻醉的状态，则可以进行长时程的活体成像。手术创伤小、可缝合愈合或者留置观察窗的方法则可以用于同一小鼠较长时间、划分不同时间点的活体成像。

2 双光子显微镜的上机拍摄

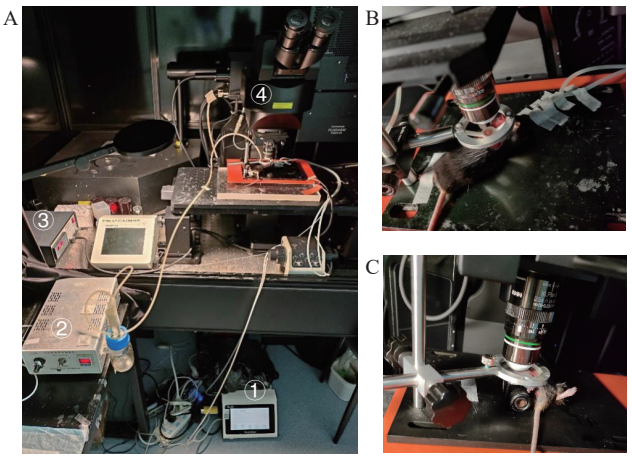
活体成像的样本准备好后，连同加热垫和固定装置一起转移至双光子显微镜（品牌：奥林巴斯，型号：FVMPE–RS）的载物台上（图 8A），注意转移过程中固定装置上连接着的管子和线路要避免牵拉扯掉，保证平稳安全转移好后，根据固定装置的高度调整载物台的高度，接下来可以进行上机拍摄操作，具体的步骤如下。

（1）打开仪器硬件，包括汞灯、控制器、激光器、扫描单元等。

（2）打开拍摄软件，在软件中打开激光器，根据要观察的荧光通道信息调节激光器的波长以及合理分配激光器。由于主激光器的功率大于副激光器，如果只拍摄 1 ~ 2 个荧光染料如 AF488 和 AF594，可共用一个激光器激发，推荐优先使用主激光器，可使用较低的激光强度激发较强的荧光信号。由于双光子显微镜是长波长激发，不是固定波长的激光器，针对要拍摄的荧光染料可进行不同激发波长的摸索，比如拍摄荧光染料 AF488 和 AF594，激发波长可在 920 ~ 980 nm之间进行摸索；拍摄荧光染料 AF647 可在 1 050 ~ 1 200 nm之间摸索；拍摄荧光染料 AF405 可在 780 ~ 820 nm之间摸索，拍摄二次谐波可在 800 ~ 950 nm之间摸索。

（3）如果是负压吸附固定的方法，在适配镜玻片上面的圆圈内滴加 PBS（图 8B），如果是盖玻片贴附固定的方法，在待观察组织上方的盖玻片上用免疫组化笔画一个圆圈，然后在圆圈内滴加 PBS（图 8C），将 25 倍水镜的镜头下降直至浸入到圆圈内的 PBS 中，然后通过在汞灯目镜下反向调节 z 轴以找到焦面，避免调焦过程中镜头压撞固定器。

（4）在拍摄软件上预览观察视野，调节激光强度参数，合适的参数既可以激发较强的荧光信号又可以避免光毒性，设置好采集的 z 轴厚度以及拍摄时间，选择合适的采集图像分辨率进行拍摄，分辨率越高采集速度越慢，合适的采集分辨率能够平衡采集速度和图像分辨率。



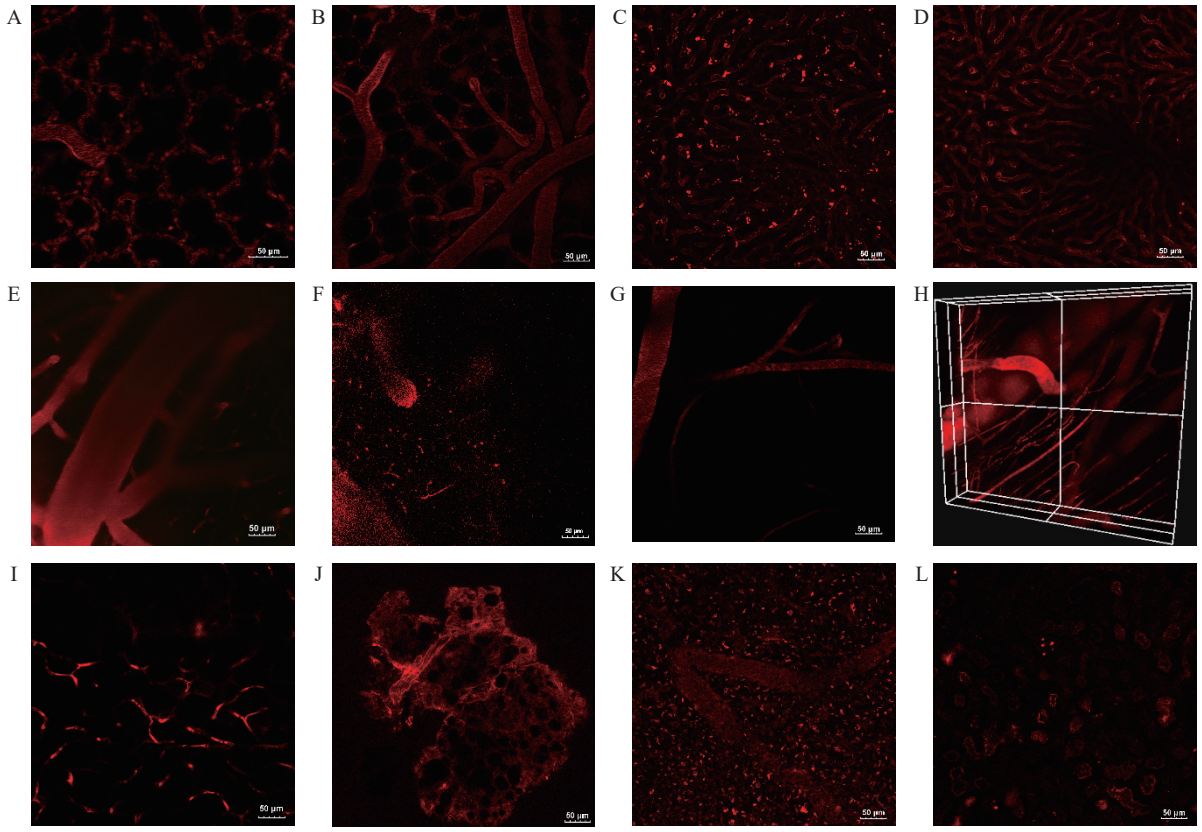
注：如 A 图所示，设备各自随仪器配置的管路线之间不要相互缠绕，就近双光子显微镜放置即可，放置位置的原则是既可以保障在实验操作台上进行小鼠手术操作时各管路线足够长，又可以保障上机操作时转移到显微镜载物台上时各管路线也足够长；如 B 图所示，将肺组织负压吸附固定后，连同固定器以及固定器下面的加热垫一同转移至显微镜的载物台上，25 倍水镜对准固定器圆环中央的观察窗，在观察窗盖玻片的上方滴加 PBS，下降镜头至 PBS 中即可调焦后进行成像；如 C 图所示，将腹股沟淋巴结组织贴附固定后，连同固定器以及固定器下面的加热垫一同转移至显微镜的载物台上，25 倍水镜对准固定器圆环底部盖玻片上的组化笔画的圆圈，在圆圈内滴加 PBS，下降镜头至 PBS 中，后续可调焦后进行成像。

图 8 双光子显微镜活体成像的上机操作 A 为肺组织活体成像上机操作时连接着的各种设备：①为呼吸机，②为组织固定真空泵，③为体温维持仪，④为双光子显微镜；B 为肺组织经负压吸附固定后的上机操作；C 为腹股沟淋巴结组织经盖玻片贴附固定后的上机操作

各种正常组织标记血流后无 z 轴厚度的单层活体成像图片如图 9 所示。

3 小结

双光子活体成像技术凭借其深层组织成像优势，在生命科学领域展现出广阔的运用前景。双光子活体成像技术运用的难点是样本准备，本文重点介绍肺脏、肠道、脑、肝脏、皮肤、脾脏、肾脏等组织的样本准备流程与上机操作要点，以期为双光子活体成像的样本准备及上机操作提供参考，帮助研究人员掌握双光子活体成像的操作技巧，推进双光子活体成像技术更加广泛的运用。



注：物镜为25倍水镜，采集分辨率为640×640，无*z*轴厚度采集，标尺为50 μm。

图9 不同组织运用双光子显微镜活体成像的图片 A为肺组织，伊文思蓝标记血流，显示正常肺泡毛细血管网；B为肠组织，异硫氰酸荧光素–葡聚糖标记血流，显示正常肠组织毛细血管网；C、D为肝组织，495–番茄凝集素标记血管，显示正常肝组织毛细血管网，其中，D图是运用共聚焦显微镜活体成像；E、F为脑组织，其中，E图为磨薄颅骨的活体成像，德克萨斯红葡聚糖标记血流，H图为揭开颅骨的活体成像，异硫氰酸荧光素–葡聚糖标记血流，显示正常脑组织毛细血管网；G、H为皮肤组织，伊文思蓝标记血流，其中，H图展示的是有*z*轴厚度的成像图片，为皮肤组织84 μm厚度成像的3D展示，显示正常皮肤组织毛细血管网；I为脂肪组织，伊文思蓝标记血流，显示正常脂肪组织毛细血管网；J为淋巴结组织，伊文思蓝标记血流，显示正常淋巴结组织毛细血管网；K为脾脏组织，德克萨斯红葡聚糖标记血流，显示正常脾脏组织毛细血管网；L为肾脏组织，德克萨斯红葡聚糖标记血流，显示正常肾脏组织毛细血管网

[参 考 文 献]

[1] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two–photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. Science, 1990, 248(4951): 73–76.

[2] Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, et al. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair [J]. Science, 2017, 358(6359): 111–116.

[3] 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.

[4] Kang H, Liu T, Wang Y, et al. Neutrophil–macrophage communication via extracellular vesicle transfer promotes itaconate accumulation and ameliorates cytokine storm syndrome [J]. Cell Mol Immunol, 2024, 21(7): 689–706.

[5] Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, et al. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons [J]. Nature, 1997, 385: 161–165.

[6] Miao N, Wang Z, Wang Q, et al. Oxidized mitochondrial DNA induces gasdermin D oligomerization in systemic lupus erythematosus [J]. Nat Commun, 2023, 14: 872.