

活细胞中亚细胞器的超分辨结构特征

王冠晨^{1,2}, 陈同生^{1,2,3*}¹华南师范大学生物光子学研究院,教育部激光生命科学重点实验室,广东 广州 510631;²华南师范大学生物光子学研究院,广东省激光生命科学重点实验室,广东 广州 510631;³师大瑞利光电科技(清远)有限公司,广东 清远 511517

摘要 亚细胞器是细胞的重要组成单位,其形态结构与动力学特性直接反映了细胞的生理状态。21 世纪初新兴的结构光照明显微技术、受激发射损耗显微技术和单分子定位成像技术等超分辨显微成像技术,巧妙地绕过了光学衍射极限对成像分辨率的限制,目前已被广泛应用于活细胞亚细胞器精细结构的观察及其动力学过程的监测上。本文首先介绍了上述三种超分辨显微成像技术的基本原理和特点,然后介绍了活细胞中细胞核、细胞骨架、线粒体、内质网等亚细胞器的超分辨精细结构和动力学特性,最后讨论了亚细胞器超分辨精细结构成像与机器学习、图像处理相结合的发展潜力。

关键词 生物光学;超分辨显微术;荧光显微镜;亚细胞器精细结构;机器学习

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.2007203

1 引 言

17 世纪,光学显微镜的发明使人们第一次看见了细胞,为观察细胞形态、揭示生命奥秘奠定了基础。直至今日,形态学观察依旧是细胞生物学领域最常用的研究方法。随着细胞生物学的发展,科学家越来越注重对几十纳米尺度的微结构进行观察与分析,尤其是在内部结构完整的活体标本上观察亚细胞器的精细结构特征。超分辨显微成像(SRM)技术不仅突破了约半个发射光波长的光学经典衍射极限^[1],使得细胞结构的超分辨光学显微成像具有了以前只能通过电子显微镜(EM)才能达到的细节水平,而且在样品保存、成像灵活性和目标特异性方面保留了光学显微镜的优势^[2]。

目前,常见的 SRM 技术有三大类^[3]:1)基于空间频谱扩展的宽场成像方法,代表性技术是结构光照明显微(SIM);2)基于点扩散函数(PSF)压缩的激光扫描成像方法,代表性技术是受激发射损耗(STED)显微;3)基于单分子定位的显微成像方法(SMLM),代表性技术是随机光学重建显微(STORM)和光激活定位显微(PALM)。这三种技术在成像空间分辨率、时间分辨率、对生物样品的光损伤等方面各有优缺点。新型的最小光子流量技术(MINFLUX)综合了三类成像技术的优势,充分利用光子特性,实现了约 1 nm 的定位精度以及约 6 nm 的成像精度,但其系统复杂,成像视场非常小^[3-5]。

SRM 技术现已被广泛应用于研究活细胞中亚细胞器的精细结构和动力学,如研究活细胞细胞核的精细结构特征^[6-11],研究细胞骨架的超微结构及动力学^[12-15],研究线粒体嵴^[16]、线粒体与内质网的相互作用过程^[17-18]。2019 年,Yao 等^[6]使用 SIM 技术在活 HeLa、HEK293、HFF 和 H9 等人类细胞中观察到了核仁的超微结构。2015 年,D'Este 等^[12]将双色 STED 技术与 SiR-Actin 荧光探针相结合,成功验证了活海马体神经元树突及轴突中普遍存在的周期性细胞骨架结构,并阐明了肌动蛋白在维持神经元极性中的作用。2018 年,Huang 等^[16]通过自主搭建的 Hessian-SIM 系统成功观察到了线粒体嵴的精细结构以及融合孔在囊泡胞吐过程中的扩大。2021 年,Qiao 等^[18]提出了 DFCAN-SIM 技术及 DFGAN-SIM 技术,并将其应用于观察线粒体与内质网的相互作用过程,结果发现内质网-线粒体接触点不仅普遍存在,而且与线粒体的分裂、融合事件息息相关。

本文首先介绍 SIM、STED 和 SMLM 三种超分辨显微成像技术的基本原理和特点,然后介绍活细胞中细胞核、细胞骨架、线粒体、内质网等亚细胞器的超分辨精细结构和动力学特性,最后讨论亚细胞器超分辨精细结构与机器学习、图像处理相结合的发展潜力。

2 三大类超分辨显微成像技术

SIM 是一种基于莫尔效应的成像技术。该技术

收稿日期:2022-03-17;修回日期:2022-04-24;录用日期:2022-05-03

基金项目:国家自然科学基金(61875056,62135003)、广州市科技计划项目(2019B090905005)

通信作者:*chentsh@senu.edu.cn

使用空间编码的结构光对样品进行照明,以此将样品部分超出衍射极限的高频信息调制到低频,从而使得后续可以通过解析低频条纹得到其所包含的高频信息,重构出样品的超分辨图像^[5,19]。该技术不需要特殊的荧光标记,所需照明光强较低,对样品的光漂白和光损伤小,而且成像速度快,适用于活细胞成像,尤其适用于活细胞的长时程成像^[20]。受移频原理的限制,线性 SIM 分辨率的提高不会超过原有成像系统分辨率的 2 倍^[5],一般在 100 nm 左右。目前,通过全内反射荧光(TIRF)照明、掠入射、优化重构算法等方法, SIM 成像技术能够在保留 SIM 活细胞成像优势的同时,实现优于 100 nm 分辨率的活细胞动态超分辨成像。例如,基于掠入射结构照明的 GI-SIM 技术可以实现 97 nm 的分辨率^[17],基于 Hessian 矩阵的 Hessian-SIM 技术可以实现 88 nm 的分辨率^[16],基于稀疏解卷积算法的 Sparse-SIM 可以实现 60 nm 的分辨率^[21]。基于点频谱优化的高保真 SIM 算法(HiFi-SIM)克服了常规 SIM 算法易产生重构伪影且光学层切能力差的缺点,对于不同质量的原始数据,均能获得具有极少伪影和良好光学层切的高质量超分辨图像^[22]。基于空频域混合式重建算法的 JSFR-SIM 不仅没有损失图像质量,而且重建速度比传统的 Wiener-SIM 提高了 80 倍^[23]。

STED 显微术利用受激发射效应和非线性效应来减小荧光发光面积,从而提高分辨率。该技术需使用两束照明光,首先激发光的照射使得衍射斑范围内的荧光分子被激发,形成正常的衍射极限焦斑,之后中心强度为零的中空形圆环状损耗光的照射使得激发光斑外围的电子以受激发射的方式回到基态,只剩下激发光中心区域的荧光分子发光,从而减小了有效荧光光斑的面积^[24]。典型 STED 显微系统的分辨率约为 50 nm^[25]。Yang 等^[26]利用新型线粒体染料 MitoESq-635 实现了 35.2 nm 线粒体的 STED 长时程观察,Man 等^[27]研发的有机纳米粒子辅助的低功率 STED 可达到 25 nm 的分辨率, Ye 等^[28]利用钙钛矿量子点探针实现了 20.6 nm 的超高 STED 分辨率。但是当损耗光的功率过高时,样品中的荧光团会存在过快光漂白的现象,活细胞也会产生严重的光损伤,不利于活细胞的超分辨成像。

荧光分子探针的光开关效应是实现 SMLM 显微术的基础^[3]。单个荧光分子持续发光时,发光强度会出现随机涨落的现象,即荧光闪烁。SMLM 技术通过改变外部条件来控制荧光分子在荧光态和非荧光态之间的转换,进而实现荧光分子的稀疏激发^[29]。重复采集多帧图像,将所有定位点通过图像重建算法叠加,便可重构出样品的超分辨图像。SMLM 技术对实验设备的要求不高,但却可以达到较高的分辨率水平(约为 20 nm,甚至小于 10 nm);但由于其需要特殊的荧光分子进行标记且时间分辨率低,因此其在活细胞成像方

面存在限制。例如,使用常用的 Alexa Fluor 647 染料标记特定细胞结构时需要构造缺氧环境,但这种缺氧环境会使活细胞快速凋亡^[2]。SMLM 技术每重构出一幅超分辨图像至少需要采集几万帧原始图像^[2],活细胞的内部结构会在过长的成像过程中逐渐裂解,重构图像的真实性有待考究。2012 年,Zhu 等^[30]提出的基于压缩感知的高密度算法 CSSTORM 将重构一幅超分辨图像的原始数据减少到了 169 帧。

3 活细胞中亚细胞器的超分辨结构特征

3.1 细胞核

细胞核是真核细胞内最大和最重要的细胞器,也是细胞遗传与代谢的调控中心。细胞核主要由核被膜、核纤层、染色质、核仁及核体组成。核被膜由与内质网相连的双层膜脂、核孔复合物(NPC)组成。内核膜与外核膜的厚度相同,两者之间存在核周间隙。核纤层由核纤层蛋白组成,纤维直径与中间丝类似^[31]。核纤层在核内与核基质连接,在核外与中间纤维相连,构成了贯穿于细胞核和细胞质的统一网架结构体系,可起到结构支撑、调节基因表达等功能。

2016 年,Chagin 等^[11]通过三维 SIM 技术对哺乳动物体细胞中的复制灶(RF)在整个 DNA 合成期(S 期)的单个复制子进行了光学解析。三维 SIM 显微图像显示:S 期早期复制模型呈现为许多大小均匀的核内小灶;中期复制灶定位在核与核仁外围,并以核仁周围灶环作为主要标志;晚期复制灶可见更大的复制域,而且存在亮 RF 簇以及许多仍存在于核周的小灶。2022 年,Zhao 等^[21]在根据生物结构稀疏性和连续性的相关先验知识开发的反卷积算法的基础上,提出了稀疏结构照明显微镜(Sparse-SIM),其分辨率可达约 60 nm,Zhao 等采用该显微镜对活 COS-7 细胞中由核孔蛋白形成的环形核孔进行了解析。图 1(a)显示了活 COS-7 细胞中使用 Nup98-GFP 标记的环形核孔,环形核孔边缘清晰,核孔之间分离良好。图 1(b)显示了 12 min 内活 COS-7 细胞核孔形状的动态变化,该变化可能是由核膜上的单个 NPC 重新定向到焦平面或远离焦平面引起的。

2012 年,Mitchell-Jordan 等^[32]利用 STED 技术直接对哺乳动物细胞中的 H3 蛋白进行成像,在 40~70 nm 尺度上揭示了染色质的结构域特征。2016 年,Otsuka 等^[33]采用 STED 技术捕获了在人体细胞中组装 NPC 所涉及的不同步骤的图像,揭示了细胞核生长过程中新出现的 NPC 的组装过程以及不同组装时期 NPC 含有不同的核蛋白成分。2020 年,Pellicci 等^[34]利用 SPLIT-STED 技术对活细胞完整细胞核中核纤层蛋白 Lamin-A 进行了成像。

Wombacher 等^[8]及 Lukinavicius 等^[9]也分别使用 STORM 技术研究了活 HeLa 细胞核和活 U2OS 细胞核中 H2B 蛋白的分布情况。2019 年,Lu 等^[10]将

多色 STORM 技术与自发闪烁染料 HMSiR 结合,对活 HeLa 细胞核膜上的 NPC 分布进行了成像,并观察到了 NPC 簇中的精细结构。

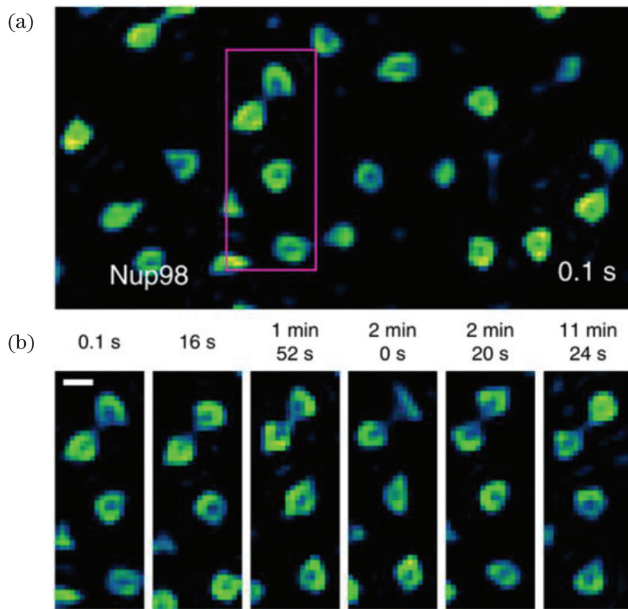


图 1 Sparse-SIM 解析核孔蛋白的动态过程^[21]。(a)活 COS-7 细胞中 Nup98-GFP 标记的动态环状核孔的 Sparse-SIM 图像;(b)品红色方框在 6 个时间点下的放大图像

Fig. 1 Dynamic process of nucleoporins resolved by Sparse-SIM^[21]. (a) Sparse-SIM image of dynamic ring-shaped nuclear pores labeled with Nup98-GFP in live COS-7 cell; (b) magenta box in (a) is enlarged and shown at six time points

3.2 细胞骨架

细胞骨架主要包括微管(MT)、微丝(MF)和中间丝(IF)三种结构组分。微管几乎存在于所有真核细胞中,是由微管蛋白二聚体组装而成的长管状亚细胞器结构。微丝又称肌动蛋白丝,具有直径小、堆积密度高^[14]的特点,其与不同的微丝结合蛋白结合可以形成不同的微丝空间结构,实现不同的功能。中间丝存在于绝大多数动物细胞内,其组成成分比微丝、微管复杂得多;不同来源的组织细胞表达不同类型的中间丝蛋白。

2009 年,基于 TIRF 的高速 SIM 技术被用于果蝇 S2 细胞中微管及其动力学特性的监测^[35]。2011 年,Shao 等^[36]利用三维 SIM 技术对果蝇 S2 细胞中的微管进行成像,清晰地观察到了果蝇 S2 细胞中微管呈现出的包裹状网状结构,该结构的分布较为稀疏。2022 年,Wang 等^[23]提出了 JSFR-SIM 技术,并采用该技术对活 COS-7 细胞微管进行了跟踪成像,结果显示: COS-7 细胞边界附近的微管网络呈尖锐而清晰的丝状结构,微管和微管末端的聚合或解聚事件清晰可见。2021 年,Qiao 等^[37]对线粒体和溶酶体进行了双色 caGAN-SIM 成像,观察到了溶酶体在微管牵引下发生的形变事件,以及溶酶体沿微管的运动过程。这说明细胞骨架可能会促进细胞器的形态变化。Li 研究

小组^[17,38]也一直在基于 SIM 超分辨成像技术对细胞内细胞器和细胞骨架的相互作用进行研究。

2012 年,庄小威研究小组^[14]采用散光成像与双物镜方案相结合的 STORM 技术观察了固定 BS-C-1 细胞和活 BS-C-1 细胞中的单个微丝,揭示了微丝骨架的三维超微结构。活 BS-C-1 细胞的微丝骨架如图 2 所示。从图 2 中可以清楚地分辨出两个厚度很小且垂直分离的微丝层,即腹侧层(ventral)和背侧层(dorsal),而且这两层之间的间隔并不均匀,并呈现出了高度不同的空间组织结构。在固定的 BS-C-1 细胞中还可以进一步观察到背侧层呈均匀致密的网状结构,腹侧层呈较低纤维密度的网状结构,成像效果更为清晰。

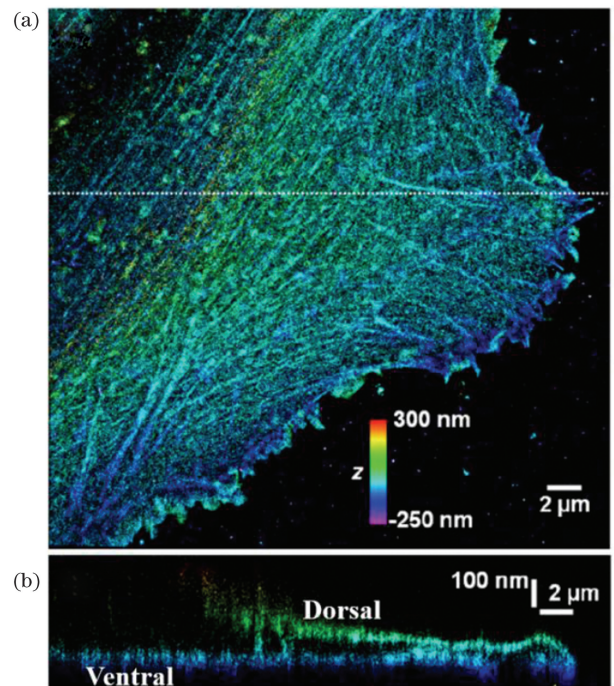


图 2 活 BS-C-1 细胞中肌动蛋白细胞骨架的双物镜 STORM 图像^[14]。(a)双物镜 STORM 图像;(b)沿着(a)中所示点线的垂直横截面

Fig. 2 Dual-objective STORM images of actin cytoskeleton in live BS-C-1 cell^[14]. (a) Dual-objective STORM image; (b) vertical cross-section of image along dot line in (a)

2014 年,Lukinavičius 等^[15]将远红外荧光探针与 STED 技术相结合,对活细胞中的肌动蛋白和微管蛋白进行荧光成像,揭示了中心体的九重对称性以及大鼠神经元轴突中肌动蛋白的空间组织。中心体是由 9 个围绕着中心粒建立的三联体微管组成的桶状结构。在该组 STED 荧光成像结果中可以观察到中心粒外围组织的相邻荧光强度极大值之间存在着极角,且可测得该极角在人和小鼠细胞中分别为 $39^\circ \pm 13^\circ$ 和 $38^\circ \pm 9^\circ$,与中心粒的九重对称性一致。2015 年,D'Este 等^[12]将双色 STED 技术与 SiR-Actin 荧光探针相结合,进一步证明了活海马体神经元树突及轴突中普遍存在着相似的周期性细胞骨架结构,即肌动蛋

白丝周期性排列成孤立的环包裹在树突和轴突的周围。

3.3 线粒体

线粒体是一种高度动态的细胞器,其动态特征包括运动导致的空间分布的变化以及由融合和分裂介导的形态、体积与数目的变化等。虽然线粒体的形态和大小随着细胞的生命活动而发生很大变化,但线粒体的基本结构均是由内外两层单位膜封闭包裹而成的。线粒体的外膜平展,起界膜作用,内膜向内折叠延伸形成嵴。在不同的真核生物中,线粒体嵴的形态也不同,比如动物细胞中常见“袋状嵴”,而植物细胞线粒体中存在“管状嵴”。

2012年,Shim等^[39]采用MitoTracker Red标记活BS-C-1细胞线粒体膜并进行了STORM成像,清晰地观察到了线粒体裂变和融合的动力学过程,并观察到了裂变前和融合后连接相邻线粒体的精细结

构——细长管状中间体。2020年,Chen等^[40]选择性标记线粒体外膜上的VDPs,得到了活HeLa细胞线粒体超精细结构的STORM图像,并监测了线粒体在不同时间点的动力学过程。

2009年,Hirvonen等^[41]利用SIM技术实现了对活COS-1细胞内线粒体的动力学观察。2018年,Huang等^[16]自主搭建了适用于活细胞长时间超分辨成像的Hessian-SIM系统,成功观察到了线粒体融合和分裂过程中线粒体嵴的变化以及单个非融合线粒体中的嵴间合并现象,如图3所示。2018年,Guo等^[17]采用多色成像技术及其新提出的GI-SIM技术对内质网-线粒体接触点处的线粒体裂变和融合事件进行了观察。2022年,Wang等^[23]采用JSFR-SIM技术对活COS-7细胞线粒体动力学进行成像,清晰地观察到了一个线粒体延伸管状尖端与另一个线粒体接触后立即向相反方向撤退的现象。

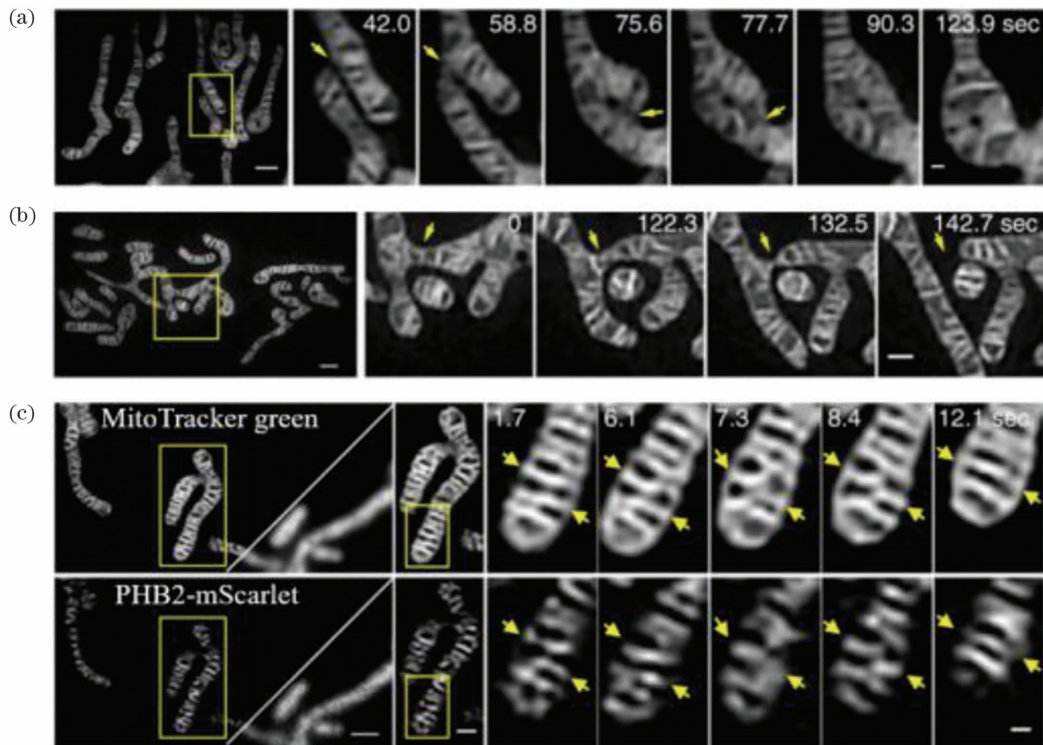


图3 Hessian-SIM下活细胞线粒体嵴结构的动态变化^[16]。(a)两个线粒体的融合;(b)一个线粒体的分裂;(c)单个非融合线粒体中的嵴间融合

Fig. 3 Dynamics of mitochondrial cristae structures in live cells under Hessian-SIM^[16]. (a) Fusion of two mitochondria; (b) fission of one mitochondrion; (c) inter-cristae mergence in single non-fusion mitochondrion

2019年,Wang等^[42]利用MitoPB Yellow探针进行了活细胞线粒体动力学过程的STED超分辨成像和监测,观察到了不同生理状态下线粒体嵴结构的动态变化。2020年,Yang等^[26]利用MitoESq-635染料对活HeLa细胞线粒体融合和裂变过程中嵴的形态进行了STED超分辨成像和监测。分裂过程如图4(a)中白色箭头所示,细长的线粒体首先形成气泡结构,然后嵴在这些气泡内快速生长,最终线粒体分裂成多个具有丰富且不断变化的内部嵴结构的单个小线粒体。

融合过程如图4(b)中的白色虚线框区域所示,线粒体最初呈现为典型的线结构,之后嵴开始快速形成和生长,并与更大的区域合并。图4(c)箭头所指区域中的杆状线粒体随着新形成的嵴扩展并融合成一个气泡状的大线粒体。

3.4 内质网

内质网(ER)是真核细胞中最普遍且形态多变的细胞器之一,是由封闭的管状或扁平囊状膜系统与其包被的腔形成的互相连通的三维网络结构。扁平囊状

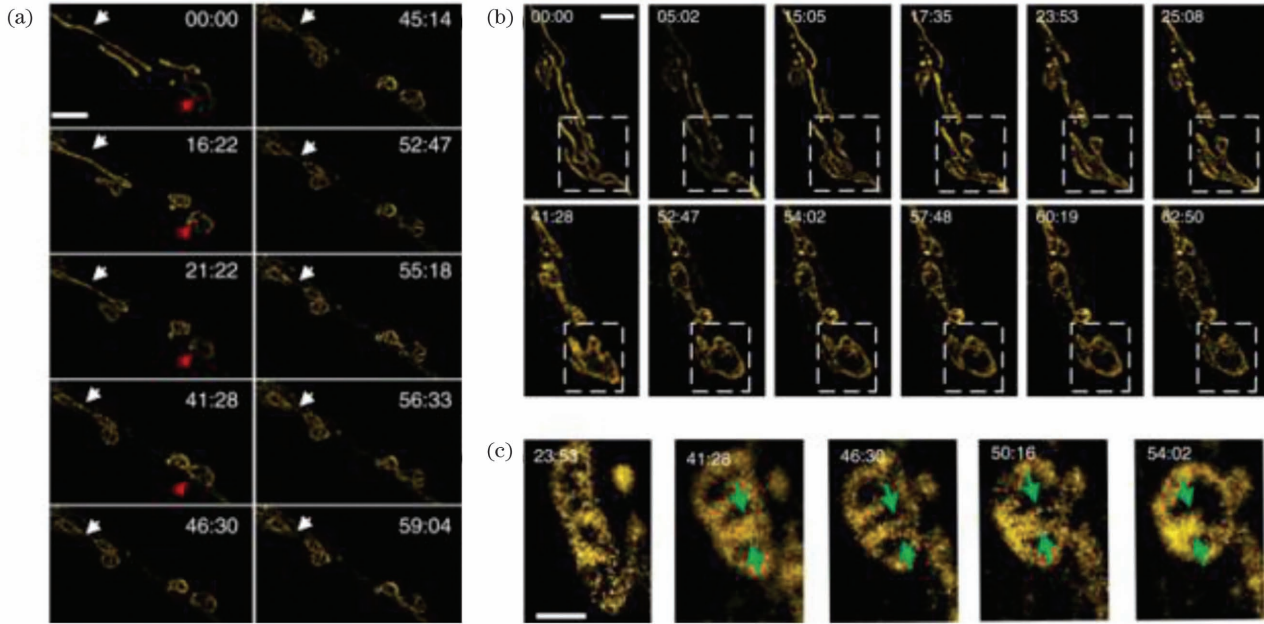


图 4 线粒体裂变和融合过程的 STED 图像^[26]。(a)线粒体分裂过程的 STED 成像时序图;(b)线粒体定量图像显示融合过程中嵴的动态变化;(c)从线状到气泡状的嵴动力学

Fig. 4 STED images of mitochondrial fission and fusion process^[26]. (a) Time-lapse STED imaging of mitochondrial fission; (b) quantitative images of mitochondria revealing cristae dynamics during fusion; (c) cristae dynamics from line shape to bubble shape

内质网一般位于核膜周围,大部分是有核糖体附着的糙面内质网,是膜蛋白和分泌蛋白的合成加工场所。管状内质网一般没有核糖体附着,属于光面内质网,主要发挥脂质合成、信号转导、与其他细胞器相互作用等功能。

2012年,Shim等^[39]采用ER-Tracker Red标记内质网膜并对其进行STORM动态成像,清晰地观察到

了内质网错综复杂的小管和薄片网状结构[如图5(a)所示]以及内质网重塑的形态变化[如图5(b)~(c)所示]。在图5(b)~(c)中可以观察到延伸的内质网小管,新延伸的小管比旧小管更细。2017年,Georgiades等^[43]利用STORM技术对内质网进行成像并对内质网小管的长度和直径进行了定量分析,验证了内质网的网络结构具有半灵活性的高度动态性。

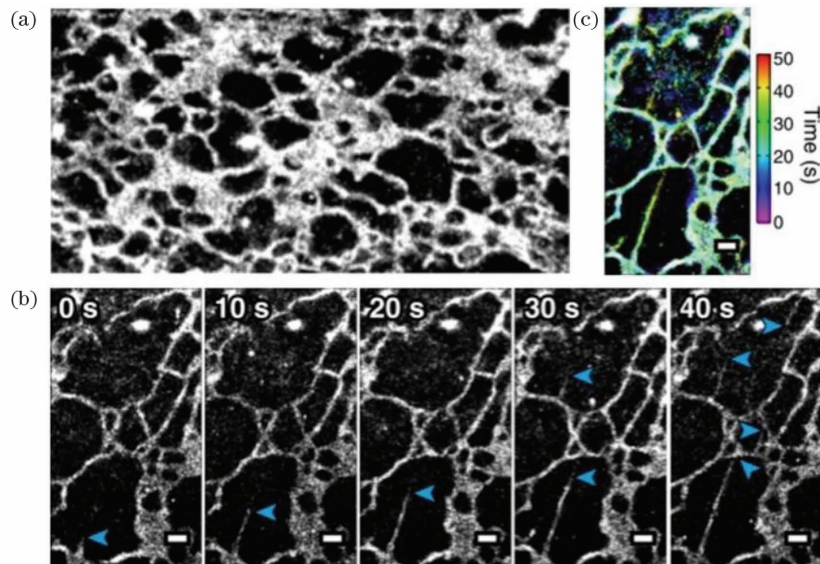


图 5 活细胞中内质网的 STORM 图像^[39]。(a)在 BS-C-1 细胞中用 ER-Tracker Red 标记的内质网;(b)10 s STORM 快照的时间序列;(c)包含(b)中所有快照的合成图像,每个定位根据右侧的颜色图按出现时间着色

Fig. 5 STORM images of endoplasmic reticulum (ER) in live cells^[39]. (a) ER labeled with ER-Tracker Red in BS-C-1 cell; (b) time-series of 10 s STORM snapshots; (c) composite image containing all snapshots in (b) with each localization colored by its time of appearance according to the color map on the right

2018 年,Guo 等^[17]利用 GI-SIM 技术以 266 frame/s 的采集速率得到了活 COS-7 细胞内质网的超分辨结构,并观察到内质网大部分呈管状矩阵,同时他们对内质网收缩部位的形成与消失以及管状内质网的重塑过程进行了监测。

2020 年,Zhu 等^[44]对细胞进行饥饿处理后,利用新型探针 TpsPym 在 STED 技术下同时特异性标记线粒体和内质网,然后通过荧光强度对二者加以区分,实现了内质网和线粒体相互作用的三维动态过程的实时监测。在饥饿导致的经典自噬细胞死亡过程中,细胞质区域的内质网覆盖面积逐渐减少,而 ER-Mito 接触面积先保持不变,30 min 后急剧增大。

本节着重介绍了活细胞中 4 种亚细胞器的超分辨结构特征。染色质作为遗传信息储存与表达的载体,是细胞核的核心成分。DNA 与组蛋白是染色质的基本组成部分。SIM 技术常用于显示染色质的结构域和复制灶,STED 技术和 SMLM 技术常应用于观察组蛋白在活细胞核中的分布,可视化染色质的结构特征。除此之外,NPC 也是细胞核在超分辨视角下的研究重点,三种超分辨技术均在 NPC 结构模型和分布情况的研究方面有所应用。SIM 技术较早地被应用于活细胞中细胞骨架的超分辨形态研究,目前被广泛用于研究细胞骨架与其他细胞器的相互作用。相较于 SIM 技术,STED 技术和 SMLM 技术较多地用于研究细胞骨架更精细的结构特征。线粒体的直径通常接近传统光学显微镜的分辨率极限,人们经常需要观察分析线粒体中膜蛋白的分布。相较于传统的光学显微技术,常规二维 SIM^[41]技术和三维 SIM^[36]技术能够将分辨率提高约两倍,可用于成像活细胞中的线粒体网络,但用于研究线粒体中膜蛋白的分布略显吃力。与 SIM 技术及 STED 技术相比,SMLM 技术更早地被用于活细胞线粒体膜蛋白成像以及可视化活细胞中线粒体的动力学过程。随着 SIM 技术成像分辨率的不断提高,其在线粒体膜蛋白成像中的应用越来越广泛。内质网的超分辨成像主要集中于研究内质网的重塑以及内质网与其他细胞器的相互作用,而且更倾向于长时程成像,对保持细胞活性的能力要求较高。

4 结 论

亚细胞器是细胞内的特定结构,其形态和形变能够直接反映细胞的生理状态,提供机体组织和器官的生理信息。最初的光学显微镜实现了对亚细胞器形态结构的初步探索,后来的电子显微镜的兴起则推动了对亚细胞器结构的更精细观察。现在,日益成熟的超分辨显微技术使研究人员能够在保持细胞活性的条件下对亚细胞器的纳米级精细结构进行观察,进一步揭示亚细胞器在活细胞中的作用。

本文首先介绍了三种主流技术的基本原理,分析了每种技术的优缺点;然后着重介绍了活细胞中的细

胞核、细胞骨架、线粒体、内质网在三大超分辨显微技术视角下的精细结构和动力学过程。活细胞超分辨显微技术对细胞核的研究主要着眼于 NPC 精细结构成像以及可视化染色质的超微结构,对细胞骨架的研究主要着眼于观察细胞骨架的三维超微结构以及细胞骨架与其他细胞器的相互作用,对线粒体的研究主要着眼于监测线粒体的分裂与融合过程以及嵴的重塑现象,对内质网的研究主要着眼于内质网的二维及三维动力学过程。

超分辨显微成像技术极大地方便了对细胞行为和活动的观察,相信在不久的将来会看到更多应用这些技术对亚细胞器精细结构进行观察的研究报道。随着超分辨显微成像技术空间分辨率和时间分辨率的提高,亚细胞器超分辨图像的数量及其囊括的信息量爆炸式增长,使得计算机辅助分析亚细胞器超分辨图像成为新的需要。深度机器学习已经被广泛应用于图像分类^[45-46]、图像分割^[47]、目标跟踪^[48]、增强显微^[18]等领域。运用深度学习算法对亚细胞器超分辨荧光图像进行信息提取,帮助研究人员对成像数据进行分析 and 理解是细胞图像处理技术发展的必然趋势。同时,基于深度学习的亚细胞器超分辨图像分析也面临着公开数据量少、数据样本集不够规范,以及工程领域通用算法模型难以高度适配细胞生物学领域的超分辨图像信息处理任务等问题^[49]。虽然现在基于亚细胞器精细结构的图像分析还不足够成熟和普及,但该方向结合了最新的“人工智能+”理念,符合细胞生物学向纳米级图像分析领域发展的趋势,必将成为细胞生物学领域研究人员探索生命奥秘的重要途径。

参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung[J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.
- [2] 张娇,何勤,武泽凯,等.超分辨显微成像技术在活细胞成像中的应用与发展[J].生物化学与生物物理进展,2021,48(11): 1301-1315.
Zhang J, He Q, Wu Z K, et al. Application and development of super-resolution microscopy in live cell imaging[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2021, 48(11): 1301-1315.
- [3] 安莎,但旦,于湘华,等.单分子定位超分辨显微成像技术研究进展及展望(特邀综述)[J].光子学报,2020,49(9): 0918001.
An S, Dan D, Yu X H, et al. Progress and prospect of research on single-molecule localization super-resolution microscopy (invited review) [J]. Acta Photonica Sinica, 2020, 49(9): 0918001.
- [4] 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.
- [5] 赵天宇,汪召军,冯坤,等.高速超分辨结构光照明显微的关键技术及应用[J].激光与光电子学进展,2020,57(24): 240001.
Zhao T Y, Wang Z J, Feng K, et al. High-speed structured illumination microscopy and its applications [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(24): 240001.
- [6] Yao R W, Xu G, Wang Y, et al. Nascent pre-rRNA sorting via phase separation drives the assembly of dense fibrillar components in the human nucleolus[J]. Molecular Cell, 2019,

- 76(5): 767-783.
- [7] Ricci M A, Manzo C, García-Parajo M F, et al. Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes *in vivo* [J]. *Cell*, 2015, 160(6): 1145-1158.
- [8] Wombacher R, Heidebreder M, van de Linde S, et al. Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(9): 717-719.
- [9] Lukinavičius G, Umezawa K, Olivier N, et al. A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins [J]. *Nature Chemistry*, 2013, 5(2): 132-139.
- [10] Lu C H, Tang W C, Liu Y T, et al. Lightsheet localization microscopy enables fast, large-scale, and three-dimensional super-resolution imaging [J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 177.
- [11] Chagin V O, Casas-Delucchi C S, Reinhart M, et al. 4D visualization of replication foci in mammalian cells corresponding to individual replicons [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11231.
- [12] D'Este E, Kamin D, Göttfert F, et al. STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons [J]. *Cell Reports*, 2015, 10(8): 1246-1251.
- [13] Tachibana R, Kamiya M, Morozumi A, et al. Design of spontaneously blinking fluorophores for live-cell super-resolution imaging based on quantum-chemical calculations [J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(86): 13173-13176.
- [14] Xu K, Babcock H P, Zhuang X W. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 185-188.
- [15] Lukinavičius G, Reymond L, D'Este E, et al. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(7): 731-733.
- [16] Huang X S, Fan J C, Li L J, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 451-459.
- [17] Guo Y T, Li D, Zhang S W, et al. Visualizing intracellular organelle and cytoskeletal interactions at nanoscale resolution on millisecond timescales [J]. *Cell*, 2018, 175(5): 1430-1442.
- [18] Qiao C, Li D, Guo Y T, et al. Evaluation and development of deep neural networks for image super-resolution in optical microscopy [J]. *Nature Methods*, 2021, 18(2): 194-202.
- [19] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [20] 郝翔, 杨青, 匡翠方, 等. 光学移频超分辨成像技术进展 [J]. *光学学报*, 2021, 41(1): 0111001.
- Hao X, Yang Q, Kuang C F, et al. Optical super-resolution imaging based on frequency shift [J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(1): 0111001.
- [21] Zhao W S, Zhao S Q, Li L J, et al. Sparse deconvolution improves the resolution of live-cell super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(4): 606-617.
- [22] Wen G, Li S M, Wang L B, et al. High-fidelity structured illumination microscopy by point-spread-function engineering [J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 70.
- [23] Wang Z J, Zhao T Y, Hao H W, et al. High-speed image reconstruction for optically sectioned, super-resolution structured illumination microscopy [J]. *Advanced Photonics*, 2022, 4: 026003.
- [24] 王佳林, 严伟, 张佳, 等. 受激辐射损耗超分辨显微成像系统研究的新进展 [J]. *物理学报*, 2020, 69(10): 108702.
- Wang J L, Yan W, Zhang J, et al. New advances in the research of stimulated emission depletion super-resolution microscopy [J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(10): 108702.
- [25] 李帅, 匡翠方, 丁志华, 等. 受激发射损耗显微术(STED)的机理及进展研究 [J]. *激光生物学报*, 2013, 22(2): 103-113.
- Li S, Kuang C F, Ding Z H, et al. A review on concept and development of stimulated emission depletion microscopy (STED) [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2013, 22(2): 103-113.
- [26] Yang X S, Yang Z G, Wu Z Y, et al. Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe [J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3699.
- [27] Man Z W, Cui H T, Lv Z, et al. Organic nanoparticles-assisted low-power STED nanoscopy [J]. *Nano Letters*, 2021, 21(8): 3487-3494.
- [28] Ye S, Yan W, Zhao M J, et al. Low-saturation-intensity, high-photostability, and high-resolution STED nanoscopy assisted by CsPbBr₃ quantum dots [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(23): 1800167.
- [29] 宗艾伦, 周迎生. STORM 和 STED 显微成像技术特点的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 115-118.
- Zong A L, Zhou Y S. Comparison of the characteristics of STORM and STED micro-imaging techniques [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2019, 27(1): 115-118.
- [30] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, et al. Faster STORM using compressed sensing [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 721-723.
- [31] Dechat T, Adam S A, Taimen P, et al. Nuclear lamins [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(11): a000547.
- [32] Mitchell-Jordan S, Chen H D, Franklin S, et al. Features of endogenous cardiomyocyte chromatin revealed by super-resolution STED microscopy [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012, 53(4): 552-558.
- [33] Otsuka S, Bui K H, Schorb M, et al. Nuclear pore assembly proceeds by an inside-out extrusion of the nuclear envelope [J]. *eLife*, 2016, 5: e19071.
- [34] Pelici S, Tortarolo G, Vicidomini G, et al. Improving SPLIT-STED super-resolution imaging with tunable depletion and excitation power [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2020, 53(23): 234003.
- [35] Kner P, Chhun B B, Griffis E R, et al. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 339-342.
- [36] Shao L, Kner P, Rego E H, et al. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1044-1046.
- [37] Qiao C, Chen X Y, Zhang S W, et al. 3D structured illumination microscopy via channel attention generative adversarial network [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2021, 27(4): 6801711.
- [38] Li D, Shao L, Chen B C, et al. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics [J]. *Science*, 2015, 349(6251): aab3500.
- [39] Shim S H, Xia C L, Zhong G S, et al. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(35): 13978-13983.
- [40] Chen B L, Gong W J, Yang Z G, et al. STORM imaging of mitochondrial dynamics using a vicinal-dithiol-proteins-targeted probe [J]. *Biomaterials*, 2020, 243: 119938.
- [41] Hirvonen L M, Wicker K, Mandula O, et al. Structured illumination microscopy of a living cell [J]. *European Biophysics Journal: EBJ*, 2009, 38(6): 807-812.
- [42] Wang C G, Taki M, Sato Y, et al. A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(32): 15817-15822.
- [43] Georgiades P, Allan V J, Wright G D, et al. The flexibility and dynamics of the tubules in the endoplasmic reticulum [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 16474.
- [44] Zhu F F, Yang Z H, Wang F, et al. 4-dimensional observation

- ER-mitochondria interaction in living cells under nanoscopy by a stable pyridium salt as biosensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 305: 127492.
- [45] Godinez W J, Hossain I, Lazic S E, et al. A multi-scale convolutional neural network for phenotyping high-content cellular images[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(13): 2010-2019.
- [46] Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, et al. Intelligent image-activated cell sorting[J]. *Cell*, 2018, 175(1): 266-276.
- [47] Falk T, Mai D, Bensch R, et al. U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(1): 67-70.
- [48] Kimmel J C, Chang A Y, Brack A S, et al. Inferring cell state by quantitative motility analysis reveals a dynamic state system and broken detailed balance[J]. *PLoS Computational Biology*, 2018, 14(1): e1005927.
- [49] 杨培伟, 周余红, 邢岗, 等. 卷积神经网络在生物医学图像上的应用进展[J]. *计算机工程与应用*, 2021, 57(7): 44-58.
- Yang P W, Zhou Y H, Xing G, et al. Applications of convolutional neural network in biomedical image[J]. *Computer Engineering and Applications*, 2021, 57(7): 44-58.

Super-Resolution Structural Characteristics of Subcellular Organelles in Living Cells

Wang Guanchen^{1,2}, Chen Tongsheng^{1,2,3*}

¹Key Laboratory of Laser Life Science, Ministry of Education, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China;

²Guangdong Key Laboratory of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China;

³SCNU Qingyuan Institute of Science and Technology Innovation Co., Ltd., Qingyuan 511517, Guangdong, China

Abstract

Significance It is well-known that subcellular organelles are essential components of cells. Their morphological structures and dynamic characteristics directly reflect the physiological state of cells. Scientists have paid significant attention to the observation and analysis of the fine structures of subcellular organelles in living specimens.

The emerging super-resolution microscopy (SRM) techniques in the early 21st century, such as structured illumination microscopy (SIM), stimulated emission depletion (STED), and single-molecule localization microscopy (SMLM), skillfully bypass the limitation of the optical diffraction limit and effectively retain the advantages of optical microscopy. SRM techniques have been widely used in monitoring subcellular organelles in living cells.

Progress This article systematically elaborates and analyzes the super-resolution structure characteristics of subcellular organelles in living cells. First, it briefly introduces the basic principles and fundamental characteristics of the three kinds of SRM techniques, i. e., STED, SIM, and SMLM, and expounds their development status. Second, the super-resolution fine structures and dynamic characteristics of subcellular organelles, such as the nucleus, cytoskeleton, mitochondrion, and endoplasmic reticulum (ER), are presented.

In 2016, Chagin et al. quantitatively measured and analyzed replication foci (RF) in mammalian cells using three-dimensional (3D) SIM. Mitchell-Jordan et al. (2012) directly imaged histone protein H3 in mammalian cells using STED to show the chromatin domain characteristics at the scale of 40–70 nm. Wombacher et al. and Lukinavičius et al. also employed STORM to observe the distribution of histone protein H2B in living HeLa and U2OS cells, respectively. Pelicci et al. (2020) imaged nuclear Lamin-A in intact nuclei of living cells through SPLIT-STED. Otsuka et al. (2016) captured images of different steps involved in assembling the NPC in a human cell. Lu et al. and Zhao et al. also realized the NPC super-resolution fluorescence imaging using different methods.

Gustafsson et al. (2009) employed SIM to monitor the dynamic characteristics and fine structures of microtubules. Additionally, Li Dong et al. further investigated the fine structures of the cytoskeleton based on SIM. Shao et al. (2011) clearly observed that microtubules in *Drosophila* S2 cells showed wrapped reticular structure and were distributed sparsely in these 3D-SIM images. Zhuang Xiaowei et al. (2012) revealed the 3D ultrastructure of the microfilament skeleton using the dual-objective STORM (Fig. 2). D'Este (2015) combined the two-color STED nanoscopy with SiR-Actin to show that the periodic cytoskeleton organization is ubiquity in axons and dendrites of living hippocampal neurons. Lukinavičius et al. (2014) disclosed the ninefold symmetry of the centrosome and the spatial organization of the actin in the axons of rats using STED. Recently, Wang et al. (2022) proposed JSFR-SIM and followed the microtubule motion in live COS-7 cells.

Additionally, Shim et al. (2012) observed the dynamic processes of mitochondrial fission/fusion through the STORM images of the mitochondrial membrane of living BS-C-1 cells. In 2020, the image data, hyperfine structures of mitochondria, and dynamic processes at different time points in living HeLa cells were attainable using STORM. Huang et

al. (2018) successfully found the changes in mitochondrial crista during the fission and fusion of the mitochondrial. They identified the inter-cristae merge in a single non-fusion mitochondrion using the Hessian-SIM system suitable for long-term super-resolution imaging of living cells (Fig. 3). Guo et al. (2018) also combined multicolor imaging technology with the newly proposed GI-SIM to observe the mitochondrial fission/fusion events at the ER-mitochondria contact sites. Wang et al. (2019) and Yang et al. (2020) accomplished the dynamic monitoring of mitochondrial crista using STED (Fig. 4). Recently, Wang et al. (2022) visualized the mitochondrial dynamics of living COS-7 cells through JSFR-SIM. A mitochondrion extended a tubulation tip, made contact with another mitochondrion, and then immediately retreated in the opposite direction.

Furthermore, Shim et al. (2012) successfully realized the STORM dynamic imaging of ER membrane (Fig. 5) and expressly observed the previously obscured details of morphological changes in ER remodeling. Georgiades et al. (2017) quantitatively analyzed the length and diameter of ER tubules using STORM. Guo et al. (2018) employed GI-SIM to obtain the formation and disappearance of ER contraction sites and the reconstruction of ER tubules in living COS-7 cells. Zhu et al. (2020) recently realized the real-time STED monitoring of 3D dynamic interaction between ER and mitochondria.

Finally, the development potential of combining super-resolution imaging with machine learning in exploring the fine structures of subcellular organelles is discussed.

Conclusion and Prospect It is an inevitable trend in cell image processing fields to apply deep learning algorithms in extracting information from subcellular super-resolution fluorescence images and help researchers analyze the image data. To achieve accurate and robust subcellular super-resolution image analysis, it is necessary to solve the problems of insufficient standardization of datasets and poor generalization ability of algorithm models.

Key words bio-optics; super-resolution microscopy; fluorescence microscope; fine structures of subcellular organelles; machine learning