

超分辨显微成像技术在活体大脑成像中的应用

高露, 高贝贝, 王富*

上海交通大学生物医学工程学院, 上海 200240

摘要 超分辨显微成像技术是生物医学领域的重要成像工具,它通过突破光学衍射的极限,以纳米级尺度解析大脑神经元的结构,其在活体大脑成像中的应用对于神经科学的发展具有重要影响。由于组织光散射、生物相容性、成像系统兼容性等因素,超分辨显微成像技术在活体大脑成像的深度、速度、时间等方面都受到限制。基于传统的双光子显微成像策略,本文介绍了目前应用于活体大脑成像的受激发射损耗显微成像和结构光照明显微成像的研究进展,分析了它们存在的困难和挑战,最后总结了应对挑战的思路并对未来的发展进行了展望。

关键词 医用光学; 超分辨显微成像; 活体成像; 大脑成像; 双光子显微成像; 受激发射损耗显微成像; 结构光照明显微成像

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.2007301

1 引言

哺乳动物的高级认知功能主要由大脑皮层参与。神经与精神类脑疾病以及多种因素引起的脑损伤给患者带来了极大痛苦,然而目前脑疾病的治愈率很低,归根结底是人们对脑功能和脑疾病的理解十分有限。在大脑的科学研究中,除了对大脑的血管、神经细胞等微观结构成像之外,更重要的是研究神经元的功能活动。光学成像技术为大脑成像提供了一种可实现高时空分辨率的方案,使人们能够在细胞和亚细胞水平上对大脑的结构和功能进行研究。随着组织透明化^[1]、大脑切片成像^[2]等固定样品显微成像技术的出现,对大脑不同深度、不同部位结构的成像成为可能。目前更大的挑战是进一步研究大脑神经元结构与功能之间的联系,这需要在活体水平上对大脑进行成像。哺乳动物的大脑组织较厚,会产生严重的光散射和光吸收,同时还有折射率不匹配引起的相差,这对光学显微成像提出了巨大挑战。随着组织厚度的增加,光的散射愈发严重,成像愈加模糊,因此厚组织的成像变得很困难。值得一提的是,大脑中的突触、离子通道、细胞器等细微结构的成像对于理解神经元信号传递具有重要作用,而这些结构是传统光学显微镜无法分辨的。传统光学显微镜存在光学衍射极限,往往需要通过电子显微镜补充成像细节,从而限制了活体水平的纳米级光学成像。

超分辨显微成像技术的出现使得纳米级的光学成像成为可能,该技术能够分辨大脑中的亚细胞水平结构,为大脑功能的研究提供了新方案。然而,分辨率的

提升不仅增加了成像系统的复杂性,还面临着活体大脑光学成像的挑战。

本文首先介绍了目前用于活体大脑成像的方法;接着总结了当前应用于活体大脑成像的超分辨技术,包括受激发射损耗(STED)显微成像和结构光照明成像(SIM)两类,并进一步选择成像速度、成像深度、成像时间、荧光探针、动物的状态这 5 个主要参数,分别从成像指标和实验设计两方面展开分析,提出应对挑战的思路,为科研人员进行活体动物大脑成像提供参考;最后展望了超分辨显微成像技术在活体大脑成像中的发展前景。

2 活体大脑成像方法

大脑是一个十分复杂的神经网络^[3],大脑皮层作为大脑的外层结构,是神经元胞体集中分布的区域,在生物的运动控制、感觉体验和记忆等功能中起着关键作用。大脑皮层按神经元特征分布可以划分为 6 层^[4],即,从靠近软脑膜的最外层 L1 到靠近白质的最内层 L6。不同动物的大脑皮层厚度各不相同,体积较大的大脑皮层往往具有较厚的皮质,如人类的大脑皮层厚度约为 2~4 mm^[5],小鼠的大脑皮层接近 1 mm^[6]。尽管大脑皮层可以被分割为不同的功能区域(如视觉区、听觉区和触觉区等)^[7],但其作用机制仍然十分神秘。目前的研究显示,大脑皮层的功能活动与神经元之间的连接、动作电位的传递、突触活动以及各种蛋白和分子的活动相关。例如:神经元兴奋时,其细胞膜电位会发生变化^[8],可以通过膜片钳技术来记

录神经元的动作电位,同时,神经元内钙离子的浓度也会突然增加,可以通过对神经元的钙离子成像来研究神经元的放电过程。此外,突触的结构变化与学习记忆等功能密切相关,反映了神经元结构的可塑性,可用于动物疾病(如阿尔茨海默病)模型的建立^[9]。对大脑皮层成像,不仅能直观地呈现神经网络的结构,还能结合动物行为研究大脑的功能活动,为治疗人类脑部疾病做出贡献,因此是研究大脑的重要方法。

在活体水平进行大脑成像有许多不同的方式,如磁共振成像(MRI)、计算机断层扫描成像(CT)、核素成像和光学成像。其中,除了CT主要用于结构成像外,MRI、核素和光学成像都可用于功能成像。尽管MRI、CT和核素成像没有深度限制,但MRI在人大脑成像时的空间分辨率最高为亚毫米级^[10],CT用于小动物体内成像时可以达到接近微米级的分辨率^[11],用于小动物的核素成像最高只能达到亚毫米级的空间分辨率^[12];只有光学成像具有微米甚至纳米级的超高分辨率,能够对大脑中的神经元树突棘等微观结构成像。光学成像的原理主要是通过荧光探针来标记大脑中的突触、神经元细胞和血管等结构,并用一定波长的激光激发荧光探针,实现高时空分辨率成像,进而研究神经元活动与大脑功能之间的联系。例如,通过漫反射光学成像或激光散斑成像^[13]研究脑血管的血流动力学,通过钙离子荧光探针GCaMP6研究神经元的放电过程^[14]。光学成像逐渐成为活体大脑成像的主要方案。然而,相比于其他成像技术,由于组织对光的吸收和散射,活体大脑光学成像的深度只能达到1~2 mm^[15],从而使得许多光学显微成像技术在活体成像中受到限制。特别是在活体水平进行大脑成像时,不仅需要处理大脑头皮、颅骨和硬脑膜等组织的干扰,还需要维持动物的生命活动。此外,光学成像系统的结构进一步限制了许多光学成像技术的应用,例如,光片显微镜^[16]虽然能够实现较高的时空分辨率(主要用于小体积的固定样本),却难以用于活体动物(如小鼠)的大脑成像。

多光子成像技术以其高组织穿透性和光学切片特性被广泛应用于厚组织成像,这也是目前活体大脑光学成像的主要策略。传统的基于单光子吸收的光学显微技术,通常只能达到100 μm 的成像深度,而基于非线性光学的多光子显微技术(MPM),如双光子激发荧光扫描显微成像(2PLSM),通常以波长在近红外一区(700~1000 nm)的光为激发光,具有更高的组织穿透性,能够达到将近1 mm的成像深度^[17]。2PLSM主要利用双光子吸收这种非线性吸收效应^[18],如图1(a)所示,分子同时吸收两个光子发生能量跃迁,具体的原理和实现细节可参考Denk等^[19]的描述。与单光子吸收不同,非线性吸收只在焦平面上产生荧光,因此,

MPM天然具有“光切片”特性,不仅减小了离焦荧光的光漂白作用,提高了成像的信噪比,还降低了对组织的光毒性。MPM在活体动物大脑成像中被广泛应用^[20],它能够对大脑中的血管^[21]、小胶质细胞^[22]和神经元活动^[15,23]成像,进而实现对大脑活动的研究^[24]。对于一些组织本身具有透明性的模型,如斑马鱼(胚胎)、线虫等,组织对光的散射较小,通常用琼脂糖固定后即可直接进行活体成像^[25];而对于体积较大的哺乳动物,如小鼠、猫和猴子等,其大脑体积更大、组织更厚,并且被头骨和毛皮保护,往往需要在其头部开颅窗^[26],打开颅骨并固定一个成像窗口,进而在活体水平上观察动物大脑的神经活动。

MPM自提出以来已经在成像速度、成像深度和成像性能等方面取得了显著进展。引入电可调透镜^[27]、声光透镜^[28]等快速变焦镜头,通过移动轴向焦点实现快速轴向扫描,能够以低激发光功率实现高速信号采集,有望实现长期、稳定的活体成像^[29-30]。此外,运用多路复用技术^[23]或者利用空间光调制器^[31]可以实现快速多焦点成像。例如,通过分束器、反射镜和凹面镜等搭建多路复用激光束产生装置,通过调节不同激光束的时间延迟,可以同时采集 z 轴上不同焦平面的信号,再通过对信号解复用,就可以获取每个焦平面的信息,实现快速的体积成像^[32-33]。2PLSM已经实现了对至少9.5 mm²视野内神经元活动的成像^[34]。此外,增加激发光的波长还能进一步增加成像深度。例如:采用波长为1064 nm的激发光,通过2PLSM可以非侵入性地观察到小鼠大脑1.5 mm深度处的海马齿状回颗粒细胞^[6],如图1(b)、(c)、(e)所示;采用波长为1280 nm的激发光,对小鼠大脑皮层血管进行2PLSM成像,成像深度可达到1.6 mm^[35],如图1(f)所示。此外,三光子成像技术引入了波长更长的激发光,可以进一步减小离焦平面的干扰,获得更高的信噪比和成像深度,对小鼠大脑实现了高分辨率、高穿透深度成像^[36-37],具有极广阔的应用前景。

目前,MPM只能实现单细胞水平的分辨率,比如观察小鼠大脑小胶质细胞^[38]和神经元细胞^[39]中的钙活动,很难进一步分辨神经网络中的亚细胞结构,如突触^[40]。活体动物大脑成像的一个重要研究内容是这些亚细胞结构的形态变化,因为它们能够为神经的连接等功能活动提供直接证据^[41]。例如,大脑组织中的突触、离子通道、细胞器等微结构的成像对于理解神经元信号传递具有关键作用,而这些结构是传统光学显微镜无法分辨的。传统光学显微镜存在光学衍射极限,往往需要通过电子显微镜补充成像细节。要在活体水平观察大脑神经元突触^[42]等细微结构,在活体环境中解析大脑的工作机制,通常需要结合超分辨显微成像技术。

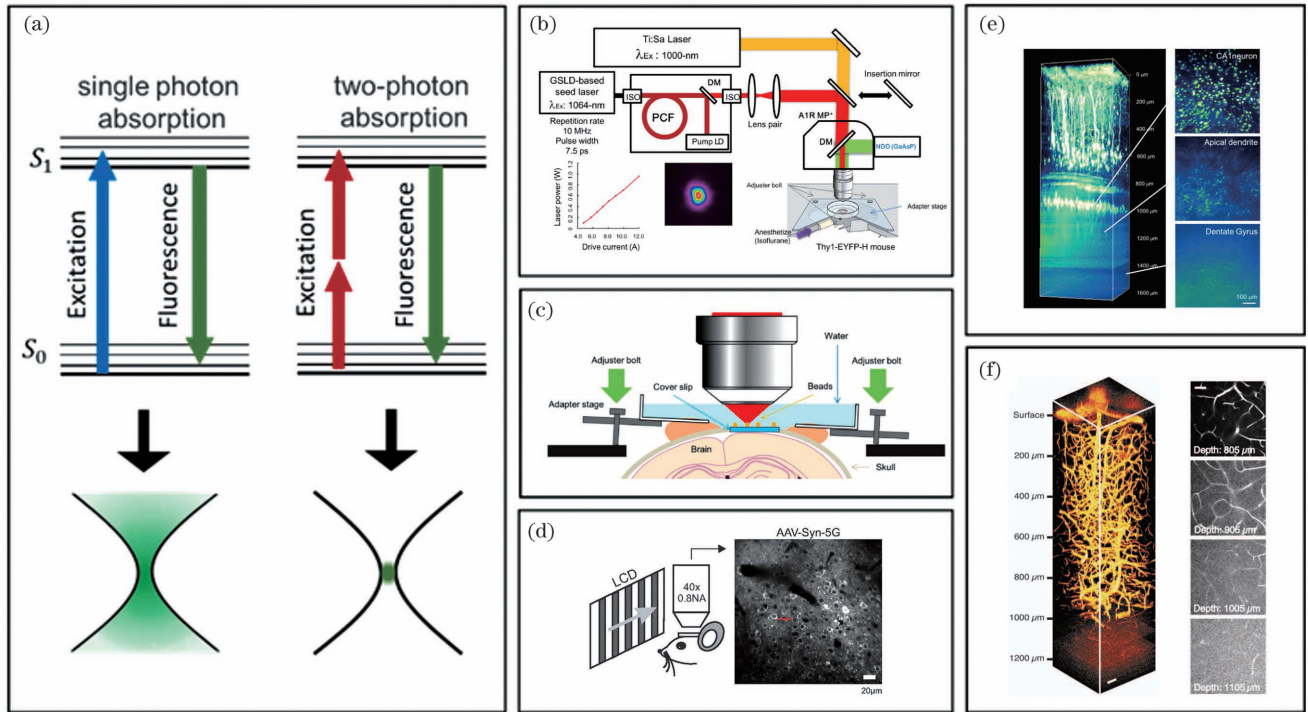


图1 2PLSM的成像原理及其在活体大脑成像中的应用。(a)单光子吸收和双光子吸收的Jablonski图及激发光的空间分布；(b)一种基于增益开关半导体激光器的小鼠大脑内2PLSM成像的原理^[6]；(c)小鼠颅窗的安装示意图^[6]；(d)刺激小鼠视觉,诱发其大脑皮层活动并进行2PLSM成像^[24]；(e)使用波长为1064 nm的增益激发光对成年小鼠大脑皮层和海马神经元进行2PLSM成像^[6]；(f)使用波长为1280 nm的激发光对小鼠大脑皮层血管进行2PLSM成像^[35],比例尺:50 μm

Fig. 1 Principle of two-photon excitation fluorescence scanning microscopy (2PLSM) and its applications in living brain imaging. (a) Jablonski diagram of single photon absorption and two-photon absorption and spatial distribution of their stimulated luminescence; (b) principle of 2PLSM imaging in mouse brain based on gain switched semiconductor laser diode^[6]; (c) installation diagram of cranial window in mouse; (d) 2PLSM imaging of cortical activity induced by visual stimulation in mouse^[24]; (e) 2PLSM imaging of cortical and hippocampal neurons in an adult mouse under gain excitation with a wavelength of 1064 nm^[6]; (f) 2PLSM imaging of cerebral cortical blood vessels in a mouse under excitation light with a wavelength of 1280 nm^[35], scaled bar: 50 μm

3 超分辨显微成像技术在活体动物大脑成像中的研究进展

近十几年来发展的超分辨荧光显微成像技术主要分为两类^[43-45]:一类是基于光斑调控,如STED和SIM;另一类是基于单分子定位,如随机光学重构显微成像(STORM)和光活化定位显微成像(PALM)。其中,基于单分子定位的成像技术往往通过牺牲时间分辨率来获取空间分辨率,需要采集成千上万帧图像来合成单幅图像,相比于直接成像更难应用于需要监测实时动态变化的活体成像。尽管也有单分子定位成像在活斑马鱼胚胎上取得成功的报道^[46],但该技术很少有在活体大脑成像方面的应用。单分子定位超分辨成像技术的详尽资料可参考文献^[47]。此外,还有一些适用于特殊场景的超分辨显微成像技术,如全内反射成像,该技术只能对贴近盖玻片0.2 μm 厚度内的区域成像^[44],无法对厚组织或是活体进行成像。

超分辨显微成像技术远不止这些,由于篇幅有限,感兴趣的读者可参考关于超分辨成像的相关综述论文^[43-44,48]。

表1统计了当前应用于活体动物大脑成像的超分辨成像技术,并分别从分辨率(xy 表示横向, z 表示轴向)、成像深度、视野/帧率、荧光探针和成像部位等几方面进行了比较^[49-60]。目前,绝大多数超分辨显微成像技术在离体组织或者活细胞水平上具有重要的应用价值,但由于组织光散射、光毒性和成像效率等的限制,很难进一步将其拓展到活体动物上^[61-62]。目前应用于活体成像的超分辨技术主要是STED、可逆饱和光学荧光跃迁(RESOFT)和SIM^[41,45,62]。尽管RESOFT能以更低的光照强度实现STED效果,但其成像主要依赖于可逆光转换荧光蛋白,成像速度较慢,还没有进一步应用到较大体型的动物上^[63-64]。因此,这里主要介绍STED和SIM这两种超分辨技术在活体大脑成像中的研究进展。

表1 应用于活体动物大脑成像的超分辨成像技术的比较

Table 1 Comparison of various super-resolution imaging techniques applied to living brain imaging

Method	Resolution /nm	Depth / μm	Field of view	Probe	Sample	Ref.
STED	$\sim 115(xy)$			GFP	NSM neurons of living <i>Caenorhabditis elegans</i>	[49]
	$\sim 70(xy)$	10–15		Thy1-EYFP	Molecular layer in the somatosensory cortex of a living mouse	[50]
	43–70(xy)	~ 40		Lifeact-EYFP	Dendritic filamentous (F-) actin cytoskeleton in the visual cortex of a living mouse	[51]
	$\sim 80(xy)$	~ 6		Lifeact-mNeptune2	Actin filaments in the cortex of a living mouse	[52]
	$\sim 84(xy)$			PSD95-EGFP	PSD95 in the visual cortex of a living mouse	[53]
	$\sim 70(xy)$	~ 25		PSD95-HaloTag	PSD95 in the visual cortex of a living mouse	[54]
	$\sim 66\text{--}89(xy)$	5–20		Synaptophysin-EGFP, Myr-rsEGFP2-LDLR, PSD95-FingR-Citrine	Synaptic vesicles, dendritic membrane, and PSD95 in the visual cortex of a living mouse	[55]
	$\sim 96(xy)$	15–35		Thy1-GFP-M	Spine synapses in the motor cortex of a living mouse	[56]
2P-STED	$147 \pm 8(xy)$, $1218 \pm 24(z)$	5–20	$10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (~ 1 frame/s)	Thy1-GFP-M, Thy1-YFP-H	CA1 area of the hippocampus of a living mouse	[57]
3D-2P-STED	Subdiffraction-limit (xyz)	~ 76	$20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ (0.1 frame/s)	ATTO590	Dendritic spines of a living mouse	[58]
SIM	$190 \pm 11(xy)$	25–50	– (9.3 frame/s)	Thy1-GFP	Dendrites and synapses of a living mouse	[59]
2P-SIM	$\sim 119(xy)$	~ 120	$21 \mu\text{m} \times 21 \mu\text{m}$ (3.5 frame/s)	Thy1-EGFP	Dendritic spines of a living mouse	[60]

3.1 STED

STED 成像的基本原理为:使用两束组合激光进行成像,其中一束激光被聚焦成正常的衍射极限焦斑,使焦斑内的荧光分子处于激发态,另一束波长较长的激光(通常位于发光材料发射光谱的红外末端,称为“退激发光”或“STED 光”)使激发态的电子以受激发射损耗的方式回到基态,并发出一个与 STED 光波长相同的光子。如图 2(a)所示,由于 STED 光是相位调制后中心为零点的甜甜圈形状的光斑,因此 STED 光的中心没有退激发现象。将激发光与退激发光斑重叠,只允许位于 STED 零点位置的荧光物质发光,可以提高分辨率。

STED 最突出的一个优势是可以直接进行光学成像^[45]。相比于 PALM 和 STORM 等需要图像重建的超分辨成像技术,STED 具有“所见即所得”的特点,能够反映更真实的成像结果。同时,STED 是基于激光扫描共聚焦成像的技术,减小了离焦平面荧光的干扰,具有“光切片”特性。此外,目前已有多种荧光探针可以实现 STED,从而极大地拓展了其应用范围。

德国科学家 Hell 及其团队成员在 1994 年提出

STED 成像技术后,进行了一系列活体成像尝试^[49]。他们首先采用该技术在活的多细胞生物体(秀丽隐杆线虫)上以 115 nm 左右的分辨率实现了神经分泌运动神经元的超分辨成像,接着又进一步成功地将该技术应用到脊椎动物身上,以至少 70 nm 的横向分辨率记录了成年小鼠躯体感觉皮层的树突棘活动[如图 2(b)所示]^[50]以及视觉皮层的树突丝状肌动蛋白细胞骨架的形态变化^[51]。之后,STED 被更多地应用到小鼠的大脑成像中,包括对视觉皮层中 PSD95 支架蛋白^[53–54]和肌动蛋白丝^[52]的成像。此外,在 STED 显微镜中引入开关激光器和可光切换荧光探针后,通过切换不同的通道进行时间序列成像,可以实现多标记的 STED 成像,可同时对小鼠大脑视觉皮层神经元的突触小泡、树突膜和 PSD95 支架蛋白成像^[55]。最近,Steffens 等^[56]的一个研究进一步推动了 STED 在长期活体成像中的发展,他们通过长时程成像,即以 3~4 d 的间隔对小鼠大脑的神经元树突棘成像,实现了长达 28 d 的体内树突监测,如图 2(e)所示。STED 成像技术自首次用于解析神经元树突棘等传统光学显微镜无法分辨的细微结构之后,逐渐成为活体大脑神经

元树突棘成像的主要方法,详细的实验流程和操作可参考 Stefan W. Hell 团队编写的实验指南^[65]。

常规的 STED 显微镜采用的是可见光激发,因此在穿透深度方面还存在不足。结合多光子成像技术是一种可能的解决方案,该方案通过长波长激发来降低对生物组织的光毒性。例如, Pfeiffer 等^[57]采用结合 2PLSM 和 STED 的 2P-STED 成像技术,同时引入长工作距离(2.8 mm)的物镜,对小鼠大脑海马体 CA1 区的椎体神经元进行了体内成像,实现了约 147 nm 的横向分辨率,如图 2(d)所示。此外,在 2P-STED 的基础上结合自适应光学(AO)等相差校正技术,可以减小 STED 光斑在组织中的畸变,对活小鼠大脑内深达 76 μm 的部位实现三维超分辨(亚衍射极限分辨率)成像^[58],如图 2(c)所示。然而,受到组织对光散射的干扰,深层组织成像仍然面临严峻挑战,目前报道的基于 2P-STED 的活体成像的深度基本上没有超过

100 μm ,空间分辨率也不理想,没有完全发挥出 2PLSM 和 STED 各自的优势,并且大部分的成像视野比较小。此外,STED 成像的分辨率依赖于 STED 光的强度^[66],相比于其他成像技术,该技术的最大问题是光漂白和光毒性较强。一种解决方案是引入时间门控监测的 STED 成像技术(*g*-STED)^[67],即通过延时探测的方式去除短寿命的受激辐射光,以更低的 STED 光功率实现相同的分辨率。还有一种解决方案是选择荧光寿命长、光稳定性好或饱和强度低的荧光探针。例如,一种增强型的方酸菁变体染料能在低功率 STED 光下完成受激辐射,研究人员已经利用该染料在活细胞中以 35.2 nm 的分辨率对线粒体内膜进行了 50 min 的延时成像^[68]。此外,一些稀土掺杂的纳米粒子具有独特的上转换特性,能够实现低功率的 STED 成像,有利于实现长期超分辨显微监测^[69]。

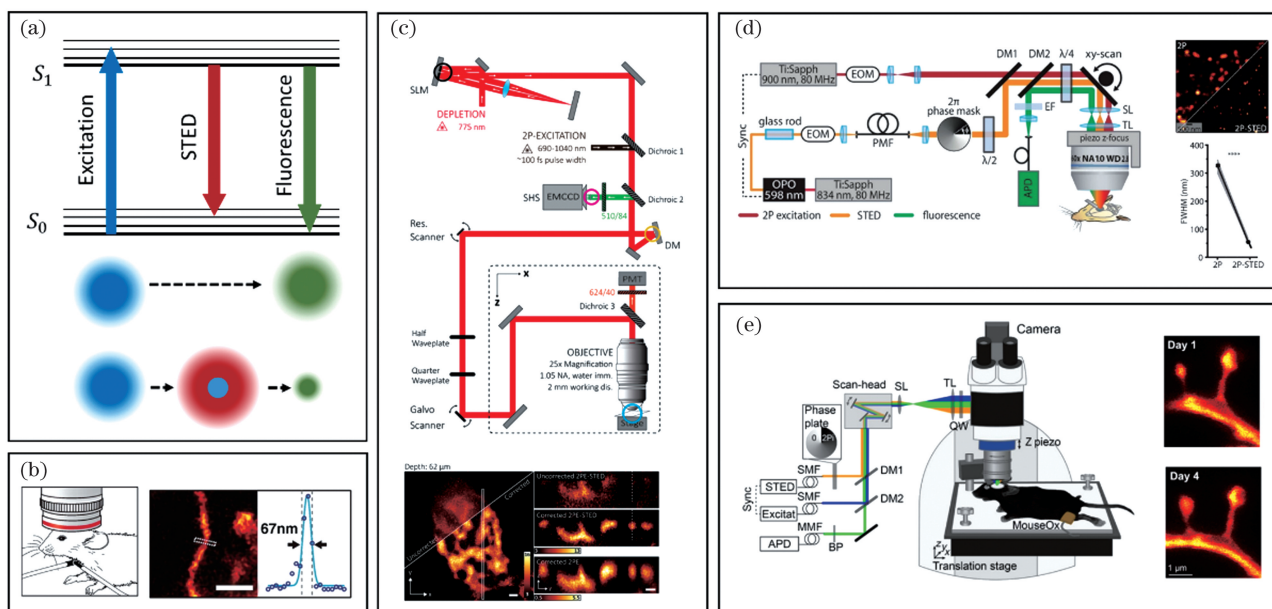


图 2 STED 成像的原理及其在活体大脑成像中的应用。(a)STED 的 Jablonski 图以及激发光斑、STED 光斑和发射光斑示意图;(b)STED 技术在小鼠大脑成像中的应用^[50];(c)含相差校正的三维双光子 STED(3D-2P-STED)成像技术的原理^[58];(d)对活小鼠大脑进行 2P-STED 成像的原理以及 2P-STED 与 2PLSM 成像效果的比较^[57];(e)对活小鼠大脑皮质层进行可重复超分辨 STED 成像^[56]

Fig. 2 Principle of stimulated emission depletion (STED) microscopy and its applications in living brain imaging. (a) Jablonski diagram of STED and schematics of excitation, STED, and emission spots; (b) application of STED in mouse brain imaging^[50]; (c) principle of three dimensional two-photon STED (3D-2P-STED) microscopy with aberration correction^[58]; (d) schematic of 2P-STED imaging of mouse brain *in vivo* and imaging comparison of 2P-STED and 2PLSM^[57]; (e) repetitive super-resolution imaging of mouse brain cortex using STED microscopy^[56]

3.2 SIM

SIM 是一种基于莫尔效应的成像技术,如图 3(a)所示。照明图案与样品图案的叠加产生莫尔条纹,而莫尔条纹比原始的叠加图案更容易被观察到,同时又包含叠加图案的信息,因此,根据观察到的莫尔条纹图案和已知的照明图案能够计算出原始的样品图案^[70]。也就是说,通过光栅照明图案,使样品的图像在频域空间发生位移,结合几个不同方向和相位的图像就可以

获取两倍于正常大小的频域信息,相当于增加了高频的细节信息^[71]。一般通过 9 帧原始图像就可以重建出一幅超分辨图像,图像分辨率提升至原来的两倍。

与其他超分辨显微成像技术相比,SIM 在空间分辨率上的提升有限,但 SIM 操作简单,最大限度地利用了荧光分子,大大降低了照明功率,能实现长期活体成像,在活细胞和活体成像领域占据了重要地位,用途十分广泛。

目前, SIM 在活体大脑成像方面的应用还不多, 但 SIM 在成像分辨率、成像速度和长期成像等方面为活体成像提供了一个较为平衡的方案, 具有较广阔的发展前景。一种应用方案是将 SIM 用于对神经元突触进行高速成像。简单来说就是采用自适应光学(AO)对样品进行相差校正, 通过具有亚衍射尺寸的荧光珠来评估照明参数(用于 SIM 图像重建), 再通过相位上采样和图像配准来减小大脑运动造成的影响。研究人员利用该方案在小鼠和斑马鱼大脑(深度 25~50 μm)上实现了 9.3 frame/s 的高速成像^[59], 横向分辨率约为 190 nm, 如图 3(b)所示。还有一种方案是通过 2PLSM 来提高 SIM 的成像深度。例如, 通过电光调制器(调制光束强度)和 xy 共振扫描组件来构建 SIM 的照明条件, 再结合 2PLSM 技术对小鼠大脑皮质神经元进行高速成像(成像频率约为 3.5 Hz), 可以达到 120 μm 的成像深度, 分辨率可达 119 nm^[60]。此外, 将 SIM 与其他成像技术结合也有意想不到的效果, 例如, 在 SIM 显微镜中引入光片显微镜组成光片结构照明显微镜(OS-SIM), 再通过自适应光学校正样

品和测量过程引入的相差, 可以实现高速、高分辨率的体内成像, 甚至能够解析神经元突触等亚细胞结构^[72], 如图 3(c)所示。

值得注意的是, 目前报道的应用在活体动物大脑成像中的 SIM 还是最传统的, 而实际上, SIM 已经发展出了许多分辨率更高的变体, 比如饱和 SIM(SSIM)、饱和耗尽非线性 SIM(SDNL-SIM)^[73] 以及模式激活 SIM(PANL-SIM)^[16,74], 其中的 PANL-SIM 可以实现约 50 nm 的二维分辨率, 甚至可以实现三维亚衍射分辨率成像, 如图 3(d)所示。非线性 SIM(NL-SIM)目前还没有应用到体内成像的原因可能与 RESOLFT 相同, 需要使用特殊的荧光探针, 如光可切换荧光团, 需要进行基因修饰和转染, 这在很大程度上限制了 NL-SIM 的应用。

4 超分辨成像技术在活体动物大脑成像中面临的挑战

相比于固定样品, 活体大脑成像会受到诸多限制, 不仅要考虑成像系统与生物的兼容性, 还要克服生物

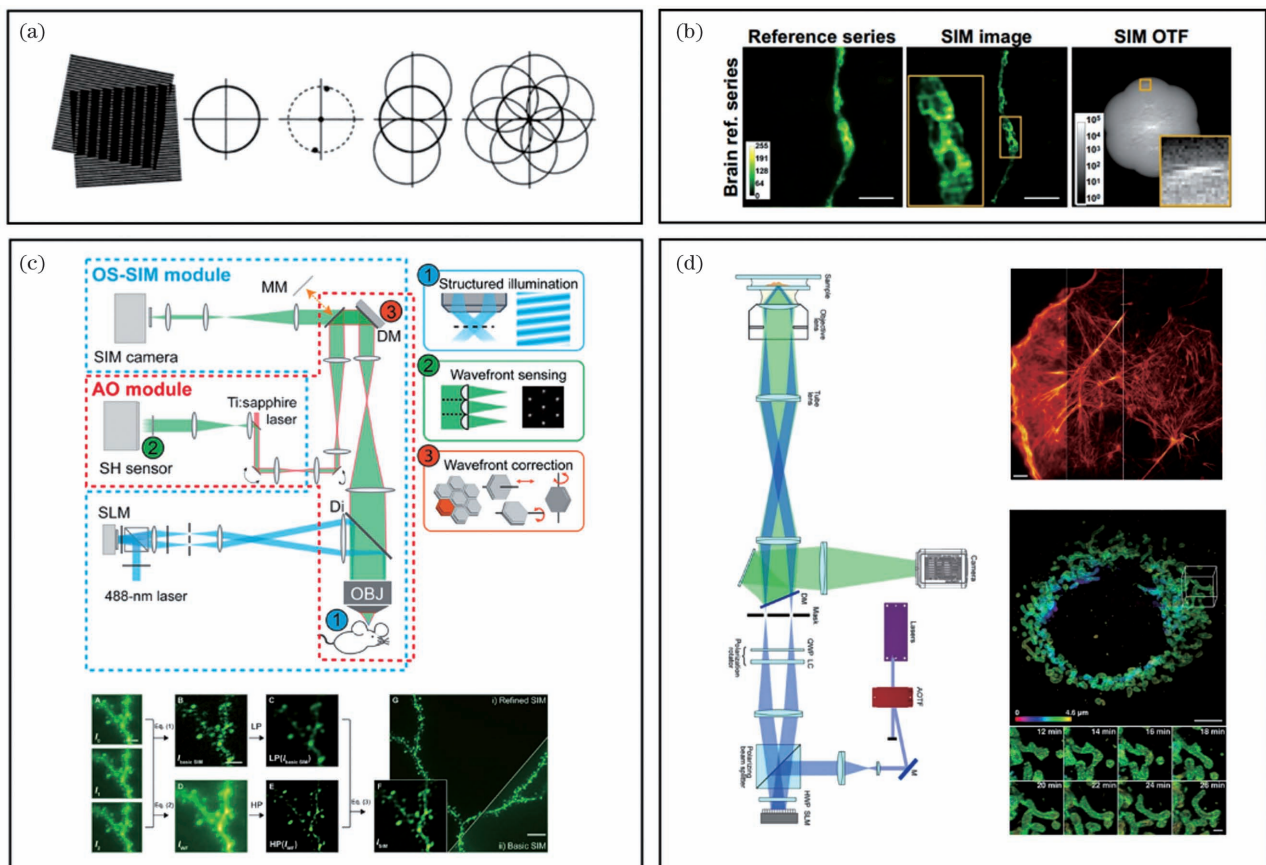


图 3 SIM 的成像原理及其在活体大脑成像中的应用。(a) SIM 的成像原理^[70]; (b) 自适应光学 SIM(AO-SIM)在活体大脑成像中的应用^[59]; (c) 一种含自适应光学的光片结构照明显微镜(OS-SIM)的简化示意图及其成像效果^[72]; (d) 模式激活非线性 SIM(PANL-SIM)的成像原理以及成像效果^[74]

Fig. 3 Principle of structure illumination microscopy (SIM) and its applications in living brain imaging. (a) Principle of SIM^[70]; (b) application of adaptive optics SIM (AO-SIM) in living brain imaging^[59]; (c) schematic of optical slice SIM (OS-SIM) with adaptive optics (AO) and its imaging results^[72]; (d) principle of patterned activation nonlinear SIM (PANL-SIM) and its imaging results^[74]

组织对光的光散射,最重要的是需要降低激发光、荧光探针等对生物组织的影响。因此,活体动物大脑成像对光照、染料、设备和成像系统等都有更高的要求,特别是在活体水平研究动物时还需要考虑动物的状态。超分辨成像技术为空间分辨率提供了上升空间,但也同样面临上述问题,甚至还带来了新的挑战。需要注意的是,光学成像很难在成像分辨率、成像速度、成像深度和成像时间上同时得到改善,而超分辨成像技术的引入也会限制其余的成像指标。因此,这里主要总结了5个超分辨成像技术在活体大脑成像中需要克服的难题,包括成像速度、成像深度、成像时间、荧光探针和动物状态。其中,成像速度、成像深度和成像是成像指标方面的挑战,荧光探针和动物状态则是由实验需求决定的选择性指标。需要强调的一点是,这里没有将成像的空间分辨率列入讨论范围,但这并不意味着它不是一个需要考虑的因素。相反,空间分辨率是成像领域永恒的追求,从横向分辨率到轴向分辨率都有许多可扩展的内容,但限于篇幅,这里不再展开讨论,感兴趣的读者可参考关于三维超分辨显微成像技术的综述论文^[75]。

4.1 成像速度

活体动物成像比固定样品成像对成像速度的要求更高,特别是涉及对神经元活动成像时^[60],需要足够的成像速度来捕捉神经元的变化。成像速度越慢,系统对运动伪影越敏感,实时成像就很可能仅限于缓慢变化的对象。

硬件设备是成像速度的一个主要影响因素,如扫描器件的扫描速度、探测器的探测效率和相机的帧速率等都会直接影响到成像速度^[60]。此外,系统的成像原理是决定成像速度的另一个因素,如基于单分子定位的超分辨成像技术就需要消耗大量的时间用于图像采集和重建,在成像速度上做出了较大牺牲。

此外,成像速度需要平衡成像范围和图像质量,这对于STED这种基于点扫描的成像技术来说尤为明显,因为它需要牺牲成像视野或图像大小来获取更高的成像速度^[61,76],在小视场或者小体积的快速超分辨成像方面更具潜力。一种提高成像速度的思路是在不牺牲分辨率的条件下对多个观察点同时采样,即大规模并行采样^[77]。比如,通过正交叠加的两束干涉条纹构成图案化的STED光,用EMCCD相机采集信号,可以实现高达2000倍的并行化成像^[78],视野直径可达20 μm ,横向分辨率近30 nm,并且成像速度仅受相机帧速率的限制。目前,应用于活体大脑成像的超分辨成像技术,可以通过2P-SIM实现较快的大视野成像,比如,可以对21 $\mu\text{m} \times 21 \mu\text{m}$ 大小的视野以3.5 Hz的频率成像^[60]。

值得一提的是,一些新型的成像技术实现了大视野或大体积高速成像。例如,一种实时、超大规模、高分辨率的成像平台,通过将样本成像平面放大到一个

更大的球面,结合多个平面传感器,获得了10 mm \times 12 mm的超大视场,并能以4~5 Hz的视频频率对小鼠全脑进行微米级分辨率成像^[79]。

4.2 成像深度

目前,超分辨成像技术主要是对活体动物的大脑皮层成像,对于一些更深的结构(如海马体)进行成像仍然存在巨大挑战。限制光学显微成像深度的两个主要因素是相差和光散射^[80]。

相差是光线在经过不同折射率结构后发生的相位变化,可以通过自适应光学来校正。随着成像深度的增加,组织、细胞和细胞器等会产生越来越复杂和严重的相差,导致成像模糊和畸变,因此,相差校正的作用愈加重要。自适应光学技术主要通过动态可重构光学元件(如可变形镜或液晶空间光调制器)来校正像差,这一技术最初在天文学上获得巨大成功,直接应用到显微成像也具有良好的效果。自适应光学已经在STED和SIM等超分辨成像技术中展现出了较好的相差校正效果,其自适应、自校正特性有望在未来发挥更大的作用^[60,80]。

光散射是困扰厚组织和活体成像的一大难题。随着成像深度的增加,组织对光的吸收和散射作用导致光信号衰减。其中,近红外波段的激发光可以减少组织的光吸收,降低生物组织的自发荧光,从而减少背景信号。红光(600~700 nm)和近红外光被称为细胞和组织的“光学窗口”,在这个范围内,组织和细胞对光的吸收较弱,不仅能降低组织的光损伤,还能提高光的穿透深度。除了增加激发光的波长外,其他多光子技术也能提供解决问题的方案。例如:三光子显微镜在1320 nm高能激发脉冲下的成像深度可达大鼠大脑皮层下方1.1 mm^[37];在1700 nm激发光作用下,三光子显微镜能对小鼠大脑1.2 mm深度处的神经元甚至是1.4 mm深度处的血管成像^[36]。需要注意的是,三光子显微镜需要数量级更高的脉冲能量来达到与2PLSM相同的荧光信号强度^[15]。光散射实际上才是最大的困扰,它来源于生物组织的不均匀折射率以及细胞中线粒体、内质网等尺寸接近可见光或近红外光波长的结构,并且其在时间和空间分布上的变化很快,很难像相差一样进行校正。

除了采用自适应光学或多光子激发等来提高组织深处的成像效果外,一种更直接的方法是使用具有侵入性的内窥镜显微镜^[81-82]。比如,将带有梯度折射率透镜(微型棒状透镜)的显微内窥镜直接植入小鼠大脑内部,对大脑深处的神经元进行成像^[83]。由于内窥镜被植入并且固定,因此这种成像方式突破了成像深度的限制,但往往具有较大的手术风险,并且内窥镜无法横向移动,成像视野受限^[84]。

4.3 成像时间

限制成像时间的因素主要包括两方面,一方面是激发光对组织和荧光分子的影响,另一方面是成像系

统的数据处理能力。

长时间的激光辐照不仅会引起荧光分子的光漂白,也会对生物组织产生光毒性^[45],这是荧光成像普遍存在的问题。通过降低激光强度、减少曝光时间、降低曝光频率^[56]或采用近红外波段的激发光都可以减轻激光对组织或荧光分子带来的不良影响,实现长期成像。但通常降低激光强度也会减弱荧光信号,使得成像的信噪比降低,影响成像效果。这对 STED 成像来说也是一个挑战,因为它比其他超分辨成像技术需要更强的激发光。尽管 RESOLFT 显微镜提供了一种低光强度的 STED 实现方案(借助可逆转换的荧光蛋白,只需要与激光共聚焦扫描相当的激光强度)^[85],但荧光探针和成像速度也限制了它在活体成像中的应用。

超分辨成像比传统光学成像的数据量更大,需要更大的图像尺寸来保证足够高的图像分辨率,而延时成像则进一步增加了数据处理的负担。随着成像尺寸、成像体积和成像分辨率的增加,系统的图像处理性能逐渐成为长时间成像需要考虑的内容。此外,长时间成像还需要关注伤口愈合给成像窗口带来的影响,可能会使成像变得模糊^[48]。

4.4 荧光探针

荧光探针可以说是决定所有荧光成像技术的最主要因素,并逐渐成为各种成像技术的主要限制因素。一方面,各种超分辨荧光成像技术源于荧光探针的独特性质,如受激辐射特性和光开关特性推动了 STED、STORM 等超分辨技术的发展,而新的突破可能仍需要从荧光探针上入手;另一方面,荧光探针的发光效率、稳定性、激发光和发射光直接决定了成像的效果^[80]。在进行多通道成像时,需要选择适当的探针,以避免串色。此外,在活体成像中,探针的生物相容性和靶向性等也是影响成像的重要因素。如果检测到非特异性、假阳性信号或是荧光探针与生物体相容性差,则任何已实现的分辨率都将变得毫无意义。

对活体动物大脑的成像主要是利用细胞钙离子荧光探针^[86]来研究大脑神经元的活动。常见的探针有钙离子敏感染料和基于基因编码的钙离子探针,后者能长期稳定地表达,更适合用于对动物的神经动力学进行长期成像研究。目前,在活体大脑成像中应用最广泛的 GCaMP 蛋白就是一种基于基因编码的钙离子探针,它包含增强型绿色荧光蛋白(EGFP),并且已经发展出了很多变体,如发红光的 RCaMP。除此之外,一些新型的纳米探针也具有较大的应用潜力。比如,一种具有聚集诱导发光(AIE)特性的纳米颗粒已经被用作三光子显微镜的荧光探针,并已被成功应用到活小鼠的大脑成像中^[87]。还有一种阳离子修饰的碳量子点(CQD)探针,其兼具小分子染料的紧凑尺寸、光稳定性和生物屏障穿透性等特点,已被成功应用于细胞分裂的 STED 成像。毫无疑问,开发量子产率更

高、稳定性更好的荧光探针能给这一领域带来新的突破。

4.5 动物状态

目前,应用于活体动物大脑成像的超分辨技术主要针对的是已麻醉的动物和固定头部的清醒动物。由于麻醉可能会对动物的脑功能产生影响,因此通常选择对清醒状态的小鼠进行研究。需要注意的是,动物的呼吸和心跳等活动可能会带来运动伪影,可以结合图像配准等图像处理方法来减轻呼吸和心跳等的影响^[59,88-89],如图 4(a)、(b)所示。

对清醒状态动物大脑活动的研究分为两种形式:一种是固定动物的头部,另一种是允许动物自由运动。如:将小鼠头部固定,使其在球形跑步机上运动,以研究小鼠在清醒状态下的神经元活动^[90];将发光二极管、微型镜头、滤光片等元件集成在一个微型显微镜中,不仅可以结合内窥镜对活体动物大脑更深处的位置进行成像^[83-84,86],如图 4(c)、(d)所示,还能用于监测自由运动小鼠的神经元活动^[91]。这两种形式都可能为神经科学研究提供有价值的信息。但相比于固定头部,自由运动的小动物更难实现大脑的活体超分辨成像,目前还没有相关报道。除此之外,通过波前测量和校正有望对动物大脑实现无创的光学测量,直接透过颅骨对大脑深层组织进行成像^[88,92]。

5 结束语

在活体水平研究大脑的结构变化是大脑功能研究的重要内容。在超分辨显微成像技术出现之前,以 2PLSM 为主的多光子成像技术是活体大脑成像的主要策略,其采用的是近红外波段的激发光,不仅减少了组织对光的吸收,降低了组织的光损伤和光毒性,还增加了成像深度,同时具有高信噪比的优势。然而,传统的光学成像无法满足对大脑超分辨成像的需求。STED 和 SIM 在超分辨成像技术中脱颖而出,成为研究活体大脑成像的新方向。STED 成像技术具有突出的横向分辨率和“所见即所得”的优势,在小鼠大脑的活体成像中取得了一定成果,然而其较强的退激发光所带来的光毒性是其实际应用的最大限制,同时,其基于点扫描的成像方式也限制了其在大体积高速成像方面的应用。SIM 成像技术则几乎相反,其最大的优势是低光照强度和高荧光利用率,很适合用于长期的活体成像,但其在空间分辨率上还有待提升。2PLSM 在成像效果上获得了一定程度的提升,但其成像深度仍然较浅,没有发挥出多光子成像技术的优势。

目前,超分辨荧光显微成像在活体大脑成像的应用上面临几个重要挑战,包括成像速度、成像深度、成像时间、荧光探针和动物状态。其中,成像速度与成像体积相互制衡,成像深度因为组织的光散射而受到限制,成像时间又由成像系统决定,荧光探针的选择将影响成像系统、成像效果和实验设计,动物状态则进一步

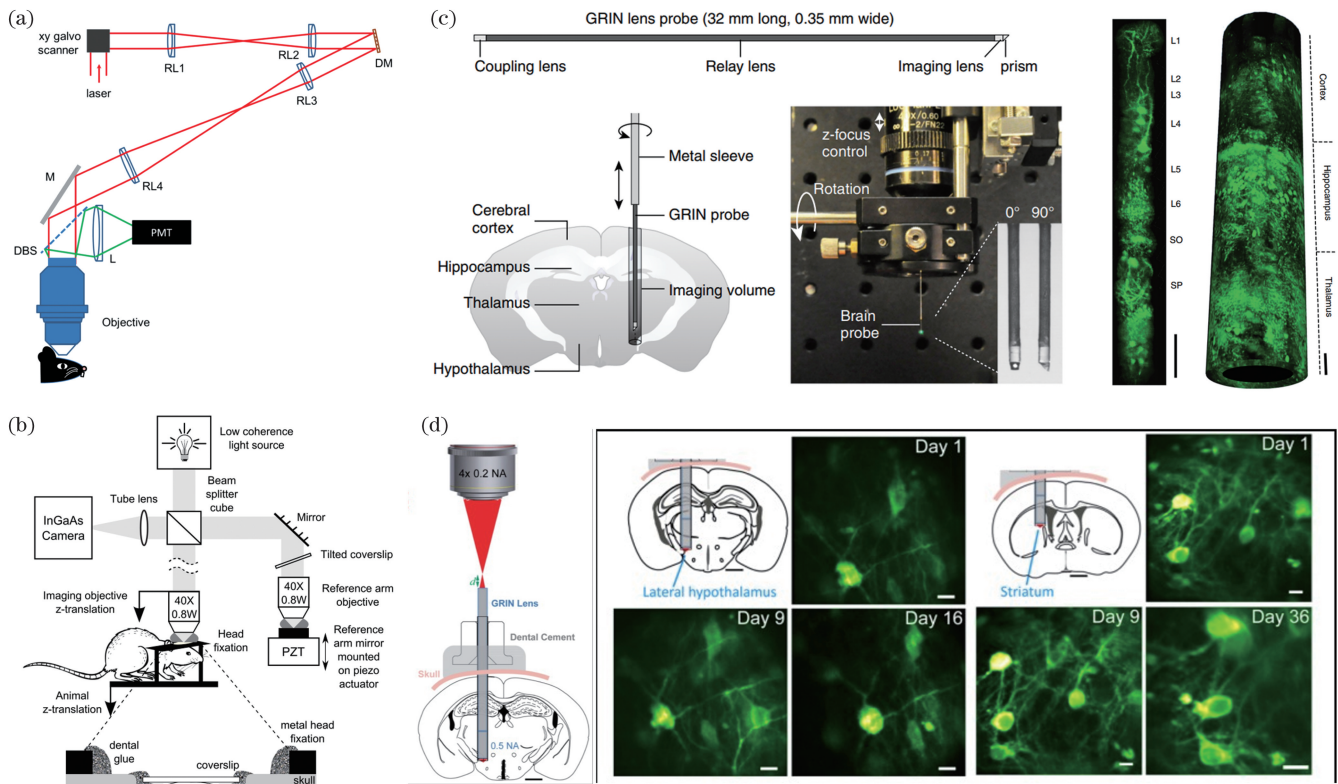


图4 对清醒状态小鼠大脑活动的实验研究。(a)基于2PLSM的清醒状态小鼠大脑活动成像系统设计^[88];(b)基于光学相干断层扫描(OCT)的麻醉状态小鼠大脑活动成像系统设计^[89];(c)用于活体小鼠大脑深部成像的微型内窥镜设计及成像效果^[84];(d)用于固定小鼠头部并对清醒状态下小鼠进行成像的装置设计以及成像效果^[83]

Fig. 4 Experiments of brain activity in awake mouse. (a) Setup of an imaging system for brain activity in awake mouse based on 2PLSM^[88]; (b) setup of an imaging system for brain activity in anesthesia mouse based on optical coherence tomography (OCT)^[89]; (c) design and imaging of micro endoscope for deep imaging of the brain in a live mouse^[84]; (d) system and imaging for head-fixed awake mouse^[83]

影响成像信噪比及成像时间。这几个因素与成像系统的设计、荧光探针的选择和动物实验密切相关,需要根据具体的实验需求做出取舍,以最大限度地发挥成像系统的性能。例如,实时的神经元突触或其他生命活动成像首先需要较高的成像速度,大脑深层的组织结构成像则需要尽可能地提升成像深度,长期的大脑活动延时成像则需要以成像时间为主。此外,还需要考虑荧光探针的选择和动物的生存状态对成像效果的影响,应选择合适的探针和动物实验。需要注意的是,尽管应用了超分辨成像技术,但超分辨荧光显微成像的空间分辨率仍然是其应用面临的一个挑战。受组织光散射的影响,活体成像并没有发挥出这些技术的理论水平^[44]。

尽管目前还没有兼具时空分辨率、成像深度、成像体积和成像时间的成像系统,但通过选择合适的成像方式、成像设置和荧光探针等组合,可以最大限度地发挥系统的成像性能。除了对成像系统和荧光探针等前期的成像方案进行优化外,后期的一些超分辨算法等图像处理工作也是一个重要的可以提升成像效果的措施。最近报道的一种应用于活细胞超分辨成像技术的稀疏解卷积算法就进一步提高了成像系统的时空分辨

率;Zhao等基于该算法,采用稀疏结构照明显微镜(Sparse-SIM)以564 Hz的频率实现了约60 nm的分辨率^[93]。此外,对大脑活动的研究也不仅仅局限于结构成像,通过结合其他监测内容,如电生理活动,能进一步建立神经元功能与结构之间的联系^[30,42]。

超分辨荧光显微成像技术使得以纳米级分辨率解析大脑神经元结构成为可能,能够用于研究突触、树突棘等亚细胞结构与大脑功能的关系,对于神经科学的研究具有重要意义。这项技术在活体大脑成像领域的应用还处于发展阶段,还面临许多挑战。未来,结合新的荧光探针、不同的超分辨成像技术和图像处理算法,有望实现更好的成像效果,有助于人们对活体大脑进行更深入的探索。

参 考 文 献

- [1] Hama H, Kurokawa H, Kawano H, et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain [J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14 (11): 1481-1488.
- [2] Li A N, Gong H, Zhang B, et al. Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse brain [J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1404-1408.
- [3] Denève S, Alemi A, Bourdoukan R. The brain as an efficient and robust adaptive learner [J]. *Neuron*, 2017, 94(5): 969-977.

- [4] Balaram P, Kaas J H. Towards a unified scheme of cortical lamination for primary visual cortex across primates: insights from NeuN and VGLUT2 immunoreactivity[J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2014, 8: 81.
- [5] Roberts P A. *Neuroanatomy*[M]. New York: Springer, 1992.
- [6] Kawakami R, Sawada K, Kusama Y, et al. *In vivo* two-photon imaging of mouse hippocampal neurons in dentate gyrus using a light source based on a high-peak power gain-switched laser diode[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(3): 891-901.
- [7] Lodato S, Arlotta P. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2015, 31: 699-720.
- [8] Roland P E. Space-time dynamics of membrane currents evolve to shape excitation, spiking, and inhibition in the cortex at small and large scales[J]. *Neuron*, 2017, 94(5): 934-942.
- [9] Zou C Y, Shi Y, Ohli J, et al. Neuroinflammation impairs adaptive structural plasticity of dendritic spines in a preclinical model of Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathologica*, 2016, 131(2): 235-246.
- [10] Dumoulin S O, Fracasso A, van der Zwaag W, et al. Ultra-high field MRI: advancing systems neuroscience towards mesoscopic human brain function[J]. *NeuroImage*, 2018, 168: 345-357.
- [11] Ritman E L. Molecular imaging in small animals: roles for micro-CT[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002, 39: 116-124.
- [12] Franc B L, Acton P D, Mari C, et al. Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation[J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2008, 49(10): 1651-1663.
- [13] Pan H C, Liao L D, Lo Y C, et al. Neurovascular function recovery after focal ischemic stroke by enhancing cerebral collateral circulation via peripheral stimulation-mediated interarterial anastomosis[J]. *Neurophotonics*, 2017, 4(3): 035003.
- [14] Mao D, Neumann A R, Sun J J, et al. Hippocampus-dependent emergence of spatial sequence coding in retrosplenial cortex[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(31): 8015-8018.
- [15] Lecoq J, Orlova N, Grewe B F. Wide. fast. deep: recent advances in multiphoton microscopy of *in vivo* neuronal activity[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2019, 39(46): 9042-9052.
- [16] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. *Science*, 2014, 346(6208): 1257998.
- [17] Theer P, Hasan M T, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(12): 1022-1024.
- [18] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [19] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [20] Garaschuk O, Milos R I, Konnerth A. Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging *in vivo*[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 380-386.
- [21] Zhang H Q, Xie W S, Chen M, et al. Aggregation-induced emission nanoparticles for *in vivo* three-photon fluorescence microscopic rat brain angiography[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2019, 12(6): 1950012.
- [22] Nimmerjahn A. Two-photon imaging of microglia in the mouse cortex *in vivo*[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012, 2012(5): 069294.
- [23] Yang W J, Yuste R. *In vivo* imaging of neural activity[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 349-359.
- [24] Akerboom J, Chen T W, Wardill T J, et al. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2012, 32(40): 13819-13840.
- [25] Endlich N, Simon O, Göpferich A, et al. Two-photon microscopy reveals stationary podocytes in living zebrafish larvae[J]. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2014, 25(4): 681-686.
- [26] de Niz M, Nacer A, Frischknecht F. Intravital microscopy: imaging host-parasite interactions in the brain[J]. *Cellular Microbiology*, 2019, 21(5): e13024.
- [27] Grewe B F, Voigt F F, van't Hoff M, et al. Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(7): 2035-2046.
- [28] Kaplan A, Friedman N, Davidson N. Acousto-optic lens with very fast focus scanning[J]. *Optics Letters*, 2001, 26(14): 1078-1080.
- [29] Chen X, Leischner U, Varga Z, et al. LOTOS-based two-photon calcium imaging of dendritic spines *in vivo*[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(10): 1818-1829.
- [30] Ding R, Liao X, Li J, et al. Targeted patching and dendritic Ca²⁺ imaging in nonhuman primate brain *in vivo*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 2873.
- [31] Yang W J, Miller J E K, Carrillo-Reid L, et al. Simultaneous multi-plane imaging of neural circuits[J]. *Neuron*, 2016, 89(2): 269-284.
- [32] Cheng A, Gonçalves J T, Golshani P, et al. Simultaneous two-photon calcium imaging at different depths with spatiotemporal multiplexing[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(2): 139-142.
- [33] Amir W, Carriles R, Hoover E E, et al. Simultaneous imaging of multiple focal planes using a two-photon scanning microscope[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(12): 1731-1733.
- [34] Stirman J N, Smith I T, Kudenov M W, et al. Wide field-of-view, multi-region, two-photon imaging of neuronal activity in the mammalian brain[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(8): 857-862.
- [35] Kobat D, Horton N G, Xu C. *In vivo* two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(10): 106014.
- [36] Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(3): 205-209.
- [37] Kliontchnikov A, Wallace D J, Frosz M H, et al. Three-photon head-mounted microscope for imaging deep cortical layers in freely moving rats[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(5): 509-513.
- [38] Olmedillas del Moral M, Asavapanumas N, Uzcátegui N L, et al. Healthy brain aging modifies microglial calcium signaling *in vivo*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3): 589.
- [39] Ohki K, Chung S, Ch'ng Y H, et al. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex[J]. *Nature*, 2005, 433(7026): 597-603.
- [40] Ter Veer M J T, Pfeiffer T, Nägerl U V. Two-photon STED microscopy for nanoscale imaging of neural morphology *in vivo*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1663: 45-64.
- [41] Huang S H, Irawati N, Chien Y F, et al. Optical volumetric brain imaging: speed, depth, and resolution enhancement[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2021, 54(32): 323002.
- [42] Takasaki K, Sabatini B L. Super-resolution 2-photon microscopy reveals that the morphology of each dendritic spine correlates with diffusive but not synaptic properties[J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2014, 8: 29.
- [43] Sigal Y M, Zhou R B, Zhuang X W. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 880-887.
- [44] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [45] Calovi S, Soria F N, Tønnesen J. Super-resolution STED microscopy in live brain tissue[J]. *Neurobiology of Disease*, 2021, 156: 105420.

- [46] Gabor K A, Kim D, Kim C H, et al. Nanoscale imaging of caveolin-1 membrane domains *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117225.
- [47] 杨建宇, 董浩, 邢福临, 等. 单分子定位超分辨成像技术进展及应用 [J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(12): 1200001. Yang J Y, Dong H, Xing F L, et al. Single-molecule localization super-resolution microscopy and its applications [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(12): 1200001.
- [48] Hell S W, Sahl S J, Bates M, et al. The 2015 super-resolution microscopy roadmap [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2015, 48(44): 443001.
- [49] Rankin B R, Moneron G, Wurm C A, et al. Nanoscopy in a living multicellular organism expressing GFP [J]. *Biophysical Journal*, 2011, 100(12): L63-L65.
- [50] Berning S, Willig K I, Steffens H, et al. Nanoscopy in a living mouse brain [J]. *Science*, 2012, 335(6068): 551.
- [51] Willig K I, Steffens H, Gregor C, et al. Nanoscopy of filamentous actin in cortical dendrites of a living mouse [J]. *Biophysical Journal*, 2014, 106(1): L01-L03.
- [52] Wegner W, Ilgen P, Gregor C, et al. *In vivo* mouse and live cell STED microscopy of neuronal actin plasticity using far-red emitting fluorescent proteins [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11781.
- [53] Wegner W, Mott A C, Grant S G N, et al. *In vivo* STED microscopy visualizes PSD95 sub-structures and morphological changes over several hours in the mouse visual cortex [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 219.
- [54] Masch J M, Steffens H, Fischer J, et al. Robust nanoscopy of a synaptic protein in living mice by organic-fluorophore labeling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(34): E8047-E8056.
- [55] 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 Reports*, 2021, 35(9): 109192.
- [56] Steffens H, Mott A C, Li S Y, et al. Stable but not rigid: chronic *in vivo* STED nanoscopy reveals extensive remodeling of spines, indicating multiple drivers of plasticity [J]. *Science Advances*, 2021, 7(24): eabf2806.
- [57] 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.
- [58] Velasco M G M, Zhang M Y, Antonello J, et al. 3D super-resolution deep-tissue imaging in living mice [J]. *Optica*, 2021, 8(4): 442-450.
- [59] Turcotte R, Liang Y J, Tanimoto M, et al. Dynamic super-resolution structured illumination imaging in the living brain [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(19): 9586-9591.
- [60] Urban B E, Xiao L, Chen S Y, et al. *In vivo* superresolution imaging of neuronal structure in the mouse brain [J]. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 2018, 65(1): 232-238.
- [61] Chitnis A, Dalle Nogare D. Time-lapse imaging beyond the diffraction limit [J]. *Methods*, 2018, 150: 32-41.
- [62] Jing Y Y, Zhang C S, Yu B, et al. Super-resolution microscopy: shedding new light on *in vivo* imaging [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 746900.
- [63] Testa I, Urban N T, Jakobs S, et al. Nanoscopy of living brain slices with low light levels [J]. *Neuron*, 2012, 75(6): 992-1000.
- [64] Dreier J, Castello M, Coceano G, et al. Smart scanning for low-illumination and fast RESOLFT nanoscopy *in vivo* [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 556.
- [65] Steffens H, Wegner W, Willig K I. *In vivo* STED microscopy: a roadmap to nanoscale imaging in the living mouse [J]. *Methods*, 2020, 174: 42-48.
- [66] Harke B, Keller J, Ullal C K, et al. Resolution scaling in STED microscopy [J]. *Optics Express*, 2008, 16(6): 4154-4162.
- [67] Hernández I C, Buttafava M, Boso G, et al. Gated STED microscopy with time-gated single-photon avalanche diode [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(6): 2258-2267.
- [68] Yang X, Yang Z, Wu Z, et al. Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe [J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3699.
- [69] Liu Y, Lu Y, Yang X, et al. Amplified stimulated emission in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy [J]. *Nature*, 2017, 543(7644): 229-233.
- [70] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [71] 赵天宇, 汪召军, 冯坤, 等. 高速超分辨结构光照明显微镜的关键技术及应用 [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.
- [72] Li Z W, Zhang Q R, Chou S W, et al. Fast widefield imaging of neuronal structure and function with optical sectioning *in vivo* [J]. *Science Advances*, 2020, 6(19): eaaz3870.
- [73] 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.
- [74] 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.
- [75] 王潇, 徐世杰, 刘鑫, 等. 三维超分辨显微成像技术的研究进展及展望 [J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(22): 2200001. Wang X, Tu S J, Liu X, et al. Advance and prospect for three-dimensional super-resolution microscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(22): 2200001.
- [76] 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.
- [77] Yang B, Przybilla F, Mestre M, et al. Large parallelization of STED nanoscopy using optical lattices [J]. *Optics Express*, 2014, 22(5): 5581-5589.
- [78] Bergemann F, Alber L, Sahl S J, et al. 2000-fold parallelized dual-color STED fluorescence nanoscopy [J]. *Optics Express*, 2015, 23(1): 211-223.
- [79] Fan J, Suo J, Wu J, et al. Video-rate imaging of biological dynamics at centimetre scale and micrometre resolution [J]. *Nature Photonics*, 2019, 13(11): 809-816.
- [80] Ji N. The practical and fundamental limits of optical imaging in mammalian brains [J]. *Neuron*, 2014, 83(6): 1242-1245.
- [81] Ghosh K K, Burns L D, Cocker E D, et al. Miniaturized integration of a fluorescence microscope [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 871-878.
- [82] Yanny K, Antipa N, Liberti W, et al. Miniscope3D: optimized single-shot miniature 3D fluorescence microscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 171.
- [83] Bocarsly M E, Jiang W C, Wang C, et al. Minimally invasive microendoscopy system for *in vivo* functional imaging of deep nuclei in the mouse brain [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(11): 4546-4556.
- [84] Kim J K, Choi J W, Yun S H A. 350- μm side-view optical probe for imaging the murine brain *in vivo* from the cortex to the hypothalamus [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(5): 050502.
- [85] Ratz M, Testa I, Hell S W, et al. CRISPR/Cas9-mediated endogenous protein tagging for RESOLFT super-resolution microscopy of living human cells [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9592.
- [86] Hamel E J O, Grewe B F, Parker J G, et al. Cellular level brain

- imaging in behaving mammals: an engineering approach [J]. *Neuron*, 2015, 86(1): 140-159.
- [87] Li D Y, Zhang H Q, Streich L L, et al. AIE-nanoparticle assisted ultra-deep three-photon microscopy in the *in vivo* mouse brain under 1300 nm excitation [J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2021, 5(7): 3201-3208.
- [88] Kong L J, Cui M. *In vivo* fluorescence microscopy via iterative multi-photon adaptive compensation technique [J]. *Optics Express*, 2014, 22(20): 23786-23794.
- [89] Binding J, Arous J B, Léger J F, et al. Brain refractive index measured *in vivo* with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy [J]. *Optics Express*, 2011, 19(6): 4833-4847.
- [90] Dombek D A, Khabbaz A N, Collman F, et al. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice [J]. *Neuron*, 2007, 56(1): 43-57.
- [91] Zong W, Wu R, Li M, et al. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(7): 713-719.
- [92] Park J H, Sun W, Cui M. High-resolution *in vivo* imaging of mouse brain through the intact skull [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(30): 9236-9241.
- [93] Zhao W, Zhao S, Li L, et al. Sparse deconvolution improves the resolution of live-cell super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2021: 1-12.

Applications of Super-Resolution Microscopy Techniques in Living Brain Imaging

Gao Lu, Gao Beibei, Wang Fu

School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract

Significance The mammalian brain is a complex and essential organ involving complex processes like memory, cognition, and feeling, and is linked to various mental diseases. However, our knowledge and research of this part are limited, and the research on the brain will be a long-term exploration. Currently, the brain imaging of living animals can intuitively display the morphological changes in the brain during life activities, allowing researchers to study the functional activities of the brain, which is vital for understanding the structure and function of the brain. Owing to the thick brain tissue, brain imaging *in vivo* is affected by factors such as light scattering, light absorption, and aberration, which hinders the optical imaging of the deep structure of the brain. Similarly, the resolution of the general optical microscope cannot exceed 200 nm due to an optical diffraction limit, and it cannot distinguish the subtle structures such as neuronal synapses in the brain nor analyze the structures that play a vital role in brain functional activities.

The multiphoton imaging technology was used in the past to improve imaging depth. This technology uses a nonlinear excitation effect and often utilizes near-infrared excitation, which can stimulate short-wavelength fluorescence signals with long-wavelength lasers. With low scattering and the absorption of the near-infrared light of the tissue, it can attain a high penetration depth and reduce the background interference of the tissue. It is an important method for thick tissue imaging. Additionally, multiphoton imaging only stimulates fluorescence at the focal plane, which has the natural characteristic of “light slicing”, which decreases the signal interference of the defocus plane and tissue stimulation damage. Therefore, the multiphoton imaging technology is suitable for imaging the brain *in vivo*. Nevertheless, the diffraction limit remains a major concern for this technology.

Introducing the super-resolution imaging technology makes nano-optical imaging possible. The super-resolution microscopic imaging technology is applied to the *in vivo* imaging of the brain, which can dictate the delicate features like neuronal synapses and then study the functional activities of the brain at the *in vivo* level. Meanwhile, based on the traditional multiphoton imaging technology, introducing the super-resolution microscopic imaging technology, combined with the benefits of penetration depth and spatial resolution, can enhance the *in vivo* imaging ability of the brain, which is beneficial in the fields such as neuroscience and brain disease research.

Progress First, the super-resolution imaging technologies used in brain imaging, stimulated emission depletion (STED) and structure illumination microscopy (SIM), are summarized (Table 1). Currently, the STED imaging technology is the main living animal brain imaging technology (Fig. 2). Hell's research group applied STED to the imaging of neuronal dendritic spines or actin filaments in the mouse cerebral cortex and achieved a lateral resolution exceeding 70 nm. However, there are few reported SIM imaging technologies. Although the spatial resolution of SIM is essentially limited to 100 nm, its excellent imaging depth also has potential. Additionally, both super-resolution technologies have been tried to combine with the two-photon imaging technology. Although they have improved the imaging depth to a certain extent, the depth has not exceeded 120 nm, which does not achieve the desired effect of two-photon imaging. Moreover, according to the research status, the main challenges faced by the super-resolution imaging technology in living brain imaging are analyzed and discussed, and the five aspects of imaging speed, imaging depth, imaging time, fluorescent probe, and

animal state are summarized. Furthermore, the application of the super-resolution imaging technology still needs to make efforts in spatial resolution. Finally, suggestions for solving these problems are presented.

Conclusion and Prospect The super-resolution imaging technology can break through the optical diffraction limit and be applied to living brain imaging. It is of great importance to study the structure and function of the brain at the nano level. Presently, STED and SIM are two main application technologies, and good progress has been made in combination with two-photon imaging. Presently, applying the super-resolution microscopic imaging technology in living brain imaging is not common, and it still faces many challenges. To make the best use of the super-resolution imaging technology, appropriate imaging technology, fluorescent probe, and experimental object should be selected based on the experiment requirements, and the imaging depth, imaging speed, and imaging time should be stable. The super-resolution microscopic imaging technology has great potential and its application and development will enhance the research of brain imaging in living animals.

Key words medical optics; super-resolution microscopy; *in vivo* imaging; brain imaging; two-photon microscopy; stimulated emission depletion microscopy; structure illumination microscopy