



同步辐射技术在生物成像分析中的应用

诸颖^{1,2†}, 蔡小青^{1†}, 张瑜¹, 张继超¹, 殷大鹏¹, 汤乔伟¹, 王丽华^{1,2*}, 樊春海^{3*}

1. 中国科学院上海高等研究院, 基础交叉研究中心, 上海同步辐射光源, 张江实验室, 上海 201210

2. 上海大学理学院化学系, 材料生物学研究所, 上海 200444

3. 上海交通大学化学化工学院, 上海 200025

†同等贡献

*通讯作者, E-mail: wanglihua@shu.edu.cn; fanchunhai@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2023-05-10; 接受日期: 2023-06-26; 网络版发表日期: 2023-11-06

国家重点研发计划(编号: 2022YFA1603600)、国家自然科学基金(编号: 22022410, 82050005)、上海市2022年度“科技创新行动计划”基础研究领域项目(编号: 22JC1401203)和中科院青年创新促进会(编号: 2016236)资助项目

摘要 生物学的发展对传统的研究方法提出了挑战, 其深入研究依赖于方法学的发展. 同步辐射光源具有高亮度、高准直、宽频谱等性质, 在从细胞到生物体的多尺度生物学研究中具有独特的优势. 本文结合本实验室以及国内外的研究工作, 详细介绍了同步辐射相关技术包括X射线显微CT成像(Micro-CT)、纳米CT全场成像(TXM)、扫描透射软X射线显微成像(STXM)、X射线荧光成像(XRF)等在纳米-生物界面、细胞功能以及脑成像分析等方面的最新进展.

关键词 同步辐射X射线, 纳米-生物界面分析, 细胞功能分析, 脑成像分析

1 引言

成像技术提供了人类认知世界的工具, 1665年罗伯特·虎克用制造出的第一台光学显微镜观察到了植物细胞, 开启了人类对生命科学中显微世界的认识. 19世纪, 电子显微镜的发明实现了对生命体系中各种超微结构的超高分辨成像观测^[1]. 1895年, 德国物理学家伦琴在进行阴极射线管试验时发现了X射线, 并在同一年拍摄了其夫人的手部X射线图像. X射线因其短波长和深穿透可以实现生命体系中多尺度样品的三维高分辨成像, 弥补了现有光学显微镜和电子显微镜成像的不足^[2,3].

1947年, 美国通用电气公司实验室在调试新建成

的70 MeV电子同步加速器时, 首次观察到了同步辐射现象^[4]. 相较于传统光源, 同步辐射光源拥有高亮度、高准直性和高偏振等优势, 并且覆盖了从远红外到X射线波段的连续光谱^[5]. 21世纪, 随着第三代同步辐射光源的建成和开放运行, 基于同步辐射光源的成像分析技术也取得了长足的发展. 例如, 基于吸收衬度和相位衬度的X射线显微CT成像, 分辨率在亚微米到微米量级; 基于椭球聚焦系统和波带片放大系统的纳米CT全场成像, 分辨率在二三十纳米; 基于波带片的扫描透射软X射线成像, 分辨率在三十纳米量级; 基于纳米聚焦探针和微米聚焦探针的X射线荧光成像, 分辨率在数十纳米到微米量级; 新近发展起来的无透镜的X射线相干衍射成像, 分辨率可以达到几个纳米. 这些

引用格式: Zhu Y, Cai XQ, Zhang Y, Zhang JC, Yin DP, Tang QW, Wang LH, Fan CH. Application of synchrotron radiation in biological imaging analysis. *Sci Sin Chim*, 2023, 53: 2196–2207, doi: 10.1360/SSC-2023-0093

模式众多的同步辐射X射线成像分析技术为生物大分子聚集体、细胞器、细胞、组织、动植物个体等不同尺度生命体系的研究提供了强有力的工具^[6]。同时,同步辐射X射线成像分析线站探测器技术不断改进,可以记录更多的数据并且更快地进行数据处理和分析。可以预见,X射线技术在生命科学领域的广泛应用,在未来将为生命科学的研究和发展带来更多的突破和创新。

本文介绍了常见生物成像技术的局限性和生物成像的新需求,阐述了基于同步辐射的生物成像技术在现代生物学分析中的优势,重点综述了本实验室以及国内外相关研究组在应用同步辐射技术开展生物成像分析中的最新进展。

2 常见生物成像技术的局限性及生物成像的新需求

光学显微镜和电镜技术的发展,极大地推动了生物学领域的发展,实现了革命性的研究成果,并仍然起着不可替代的作用。在生命分析领域,光学显微镜用红外、可见光、紫外光等作为光源,是最直接有效的生物样品成像技术。光学显微镜可以实现活细胞动态成像分析,通过绿色荧光蛋白(GFP)和各类荧光染料,实现对细胞生命活动中生物分子、亚细胞结构的实时动态监测^[7]。电子显微镜用电子束取代可见光,具有纳米级甚至埃级空间分辨率,对细胞内各种微小结构的观察尤为适合^[8]。但是两者之间仍然存在成像技术上的空白,生命科学的观察分析在要求高分辨率的同时又要求生物样品的完整性,如纳米材料-生物界面相互作用的分析研究、细胞的生命活动的分析研究。此外,在组织特别是脑成像分析中,光镜和电镜由于穿透深度有限,都需要采用对样品进行切片处理,整个过程费时费力,同时还限制了垂直切片方向的分辨率,导致结构信息的损失,影响最终的研究结果。快速发展的生物学领域对成像技术正在不断提出新的需求:在兼顾分辨率的同时保证生物样品的非破坏性成像。

3 基于同步辐射X射线的生物成像技术

X光的波长介于可见光和电子之间,理论上可以填补二者的空白。近几十年,基于同步辐射X射线的成

像技术快速发展,其相比于光学和电镜成像技术有着不可比拟的优势^[9]:(1)各向同性分辨率,无须减少切片的厚度来提高Z轴的分辨率。X射线微米CT的各向分辨率可以达到亚微米,纳米CT的分辨率可以达到30 nm。(2)X光穿透能力强,可对数毫米厚度的生物样品进行快速三维(3D)成像,且样品制备简单,无须透明化及薄切片处理,可保留组织完整性。(3)不存在光漂白现象,可以对样品进行长时间成像。(4)可开展跨尺度成像,跨越从宏观到微观的多个尺度范围。

目前,基于同步辐射X射线的生物成像分析模式有多种:(1)X射线显微CT成像(Micro-CT),通过不同物质对X射线的吸收和透射性能不同,不同介质对X射线传播速度差异导致的相位改变不同,实现生物医学样品的低剂量、无损、高分辨、动态、三维成像,空间分辨率在亚微米到微米量级^[10]。(2)纳米CT全场成像(TXM),又分软X射线纳米CT和硬X射线纳米CT,通过一次曝光即可获得样品的完整二维投影信息。该方法能够以二三十纳米的分辨率获得完整细胞的三维结构信息^[11]。(3)扫描透射软X射线成像(STXM),用波带片将软X射线聚焦到三十纳米,用逐点扫描方式获得样品的结构成像信息^[12]。通过双能吸收衬度法,能够获得高分辨的细胞内元素分布信息。(4)X射线荧光成像(XRF),用波带片、多层膜劳厄透镜、K-B镜等元件将硬X射线聚焦到十纳米到微米量级并照射在样品上,激发样品中元素的特征X射线荧光,能够同时获得多种元素的分布和定量信息^[13]。(5)X射线相干衍射成像(CDI),以相干X射线为光源,用相位恢复算法对样品的相干衍射图样进行相位恢复和图像重建的成像方法,其理论分辨率仅受到X射线波长的限制,可达原子水平^[14]。

针对上述成像方法,国内外光源近些年都取得了一系列进展。上海光源成像线站根据动态实验需求,结合压缩感知的CT重构算法,发展了一种基于单色光的动态Micro-CT方法,能在1 s内完成两套成像分辨率6.5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 的CT数据采集^[15]。Wu等^[16]基于此方法在原位高温电磁环境下实现了金属铝微波烧结过程的动态CT成像,提出了新的局部微波等离子体驱动的烧结机制。美国国家同步加速器光源II (NSLS-II)发展了一种快速TXM成像方法,能在1 min内完成空间分辨率优于50 nm的TXM数据采集,将成像时间减少了一个数量级,为样品的高分辨动态研究打下了良好的基础^[17]。

在提升TXM的空间分辨率上, 上海光源^[18]和美国阿贡实验室先进光子源(APS)^[19]等均做了一系列工作, 目前TXM已可实现空间分辨率优于10 nm的三维成像. 美国劳伦斯伯克利实验室ALS光源组建了世界上第一台用于生物成像的软X射线断层扫描显微镜(SXT), 实现了在水窗内通过线性吸收系数(LAC)区分未染色细胞内的细胞核、线粒体、内质网, 甚至脂滴和胰岛素囊泡等结构, 并对全细胞内细胞器进行快速三维重构, 揭示了胰岛 β 细胞中胰岛素分泌的细节^[20]. Ptychography是一种基于衍射的X射线成像方法, 可以对样品进行定量成像, 同时消除成像光学元件带来的分辨率限制, 上海光源将其与STXM结合起来, 发展了具有10 nm空间分辨的软X射线扫描相干衍射成像(ptychographic coherent diffraction imaging, PCDI)方法, 其与传统STXM相比, 辐射剂量更低^[21]. 在合肥光源软X射线成像线站上, 田扬超团队^[22]利用软X射线对Fe元素吸收边成像, 对生物硫化铁纳米颗粒的生物合成及分布进行研究, 并利用合成的FeS开展了生物自组装治疗癌症机制的研究.

4 纳米-生物界面分析

纳米-生物界面相互作用指纳米材料与生物分子、细胞、组织等生物系统之间的相互作用. 其高度异质性以及非平衡的动态生理环境, 使得纳米材料进入生命体系后, 持续与生物体系内的分子、离子等相互作用, 引起表面理化特性改变, 进一步影响其进入细胞的途径、在生物体内的行为及其最终的命运. 因此, 全面了解纳米-生物界面相互作用是纳米材料安全性效应的研究基础, 是纳米材料安全性设计以及纳米产业可持续发展的重要保障, 有助于推动纳米生物学领域的发展. 目前, 纳米材料-生命体系相互作用的检测和分析方法有限, 随着上海光源等各大光源的建成以及实验线站运行水平的日益提高, 同步辐射X射线先进成像技术为纳米-生物界面分析提供了一个强有力、甚至不可替代的工具.

4.1 纳米-细胞界面

基于同步加速器的X射线显微镜可以以纳米分辨率对细胞内的纳米材料进行成像. 因此, 它适合于研究纳米材料的细胞内分布. 例如, 本课题组^[23]利用

STXM, 通过探测碲元素的亚细胞分布, 研究了CdTe/CdS/ZnS核壳结构量子点(QDs)在HeLa细胞内的定位. 结果表明, 量子点主要分布在细胞质中, 并且呈现不均匀的不同强度的点状分布. 其中, 高强度点集中在细胞的核周区域, 这一结果与我们之前在荧光成像研究中的观察结果一致^[24]. 这种水性合成量子点的不均匀分布导致细胞核周围 Cd^{2+} 的局部浓度异常增高, 造成对细胞核的损伤, 这种局部浓度效应是所观察到的CdTe量子点比 CdCl_2 呈现更高的细胞毒性的主要原因. 本课题组^[11]使用同步辐射透射X射线显微镜(TXM)研究了 TiO_2 纳米颗粒在HeLa细胞中的生物分布. 重建的断层扫描图像显示, TiO_2 纳米颗粒主要分布在细胞膜表面(图1), 这与透射电子显微镜观察到的结果相一致. 类似地, 我们利用该技术研究了粒径为1~2 nm金纳米粒子和不同长宽比的单分散金纳米棒在EMT-6细胞内的摄取和分布. TXM成像结果显示, 金颗粒主要分布在细胞质中, 尽管金颗粒很小, 并未发现它们到达细胞核内^[25]. 金纳米棒的长宽比影响其细胞摄取, TXM三维重构结果清晰地呈现了纳米金棒细胞内的三维分布情况^[26].

除了高空间分辨率外, X射线显微镜还具有优异的能量(元素)分辨, 适合于纳米颗粒-离子复合物与细胞的相互作用研究. 本课题组重点研究了纳米金刚石(NDs)-金属离子复合物与细胞之间的相互作用. 在NDs的细胞毒性评估中, 我们发现当细胞暴露于分散在完全细胞培养基中的NDs时, 没有检测到细胞毒性. 然而, 在暴露于分散在无血清培养基中的NDs后, 发现了严重的细胞死亡现象. 因此提出, NDs在无血清培养基中的细胞反应与NDs对钠离子的吸附有关^[27]. 为了验证这一假设, 我们通过同步辐射STXM双能成像技术研究了NDs与钠离子的相互作用^[28], 发现无血清培养基中钠离子大量吸附到NDs上. 随后, 将细胞与分散在含有或不含有血清的细胞培养基中的NDs一起孵育2 h. 使用相同的技术, 我们观察到大量NDs被内化到两种培养基中孵育的细胞中, 无血清培养基中的细胞内钠含量远高于完全培养基. 并且, 在细胞中可以看到钠离子主要附着在NDs上, 说明钠离子以ND-Na复合物的形式进入细胞. 无血清培养基中, 细胞中过量的钠离子诱导渗透压升高, 细胞肿胀, 细胞内钙和活性氧(ROS)水平增加, 从而导致严重的细胞损伤. 然而, 在完全培养基中, 包裹在NDs周围的血清蛋白可有

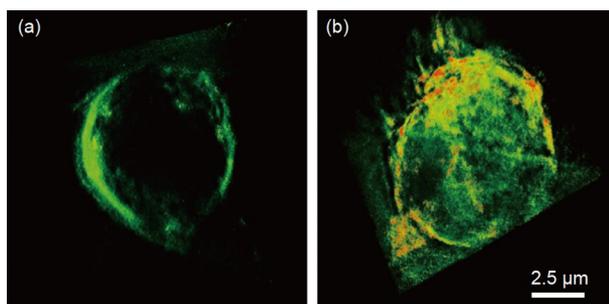


图1 HeLa细胞的三维重构图像^[11]. (a) 对照组细胞; (b) 经过6 h TiO₂孵育的细胞(红色颜色表示钛信号)(网络版彩图)

Figure 1 The three-dimensional (3D) reconstructed tomography images of HeLa cells [11]. (a) Control cells; (b) cells after incubation with TiO₂ NPs for 6 h (red color indicates the Ti signals) (color online).

效地防止钠离子吸附到NDs上, 因此NDs没有表现出细胞毒性^[28]. 进一步地, 我们证明了NDs作为多种金属离子细胞内递送载体的潜力^[29]. 以铜离子Cu²⁺为例, 从细胞的同步辐射双能STXM图像中, 我们发现与单独暴露于Cu²⁺组相比, 暴露于ND-Cu²⁺混合物时, 细胞内Cu²⁺的量显著增加. 并且, NDs-Cu²⁺暴露组细胞内大量的Cu²⁺附着在NDs上, 说明Cu²⁺以ND-Cu²⁺复合物的形式进入细胞. 与此同时, 我们开展了另一个基于同步辐射的微区X射线荧光(μ XRF)分析, 元素图谱显示, 用ND-Cu²⁺混合物处理的细胞中Cu²⁺浓度显著高于单独用Cu²⁺处理的细胞, 并且在单独用NDs处理的细胞内未检测到Cu²⁺信号. STXM和 μ XRF图像都表明, NDs的加入使细胞内的富铜区变得更加集中, 导致铜的相应细胞效应, 如细胞内ROS水平升高, 从而触发细胞毒性.

除了纳米毒性, 同步辐射X射线显微成像技术也可用于细胞水平的纳米医药研究. 我们研制了用于化疗药物递送的海藻酸钠功能化NDs (fNDs)载体, 选择顺铂(DDP)作为模型药物. 同步辐射 μ XRF成像结果显示, fNDs能够增强药物在肿瘤细胞中的积累和保留时间, 而且fNDs-DDP复合药物在细胞内具有缓释效应, 其与肿瘤细胞作用一段时间之后依然可以持续发挥细胞杀伤效果, 提高了治疗效果和药物安全性^[30]. 超顺磁性氧化铁纳米颗粒(SPIOs)作为磁共振成像造影剂在生物医学研究和临床应用中得到了广泛的应用, 但人们对SPIOs在细胞, 尤其是干细胞中的代谢过程了解较少. 苏州纳米所王强斌课题组^[31]应用同步辐射XRF成像和X射线吸收谱(XAS)技术, 原位研究了

Fe₃O₄和Fe₃O₄@SiO₂磁性纳米粒子在人脊髓间充质干细胞(hMSCs)中的命运. 结果显示, 包覆SiO₂外壳的Fe₃O₄@SiO₂纳米颗粒在hMSCs干细胞中表现出更高的稳定性, 该研究有助于设计更安全有效的干细胞追踪SPIOs. 另一项纳米医药研究围绕中国研究者发现的白血病特效药三氧化二砷展开. 我们发现, 在应用砷剂药物对实体瘤开展治疗时效果不理想, 砷剂在实体瘤细胞中自噬水平较高, 与凋亡形成拮抗, 阻碍了实体瘤细胞进入程序性死亡. 为了解决这个难题, 我们提出了一种将NDs与砷剂联用的方案, 并在肝脏肿瘤的治疗中展示出很好的效果. 这种联合治疗方案在肝原位肿瘤小鼠模型上的结果显示, 肿瘤缩小达91%, 而单用砷剂药物的对照组仅缩小28%. 同步辐射 μ XRF技术直观地揭示, 有无NDs存在情况下砷元素在肿瘤细胞/组织中的分布和浓度不变, 为证明NDs和砷剂药物在肿瘤组织/细胞中相互分离, 在功能上靶向不同的细胞途径, 即自噬与凋亡, 且纳米金刚石本身不是药物载体提供了关键证据^[32].

4.2 纳米-活体界面

在纳米-活体界面研究中, 同步辐射XRF技术提供了亚微米的空间分辨率和ppb (part per billion, μ g/L)级的元素检测灵敏度^[33], 可便利地表征纳米材料在动植物体内的行为和最终命运^[34]. 例如, 本课题组^[35]检测了气管内滴注20 nm TiO₂颗粒在小鼠体内的分布和肺毒性, 结果显示该纳米颗粒主要保留在肺部, 并逐渐代谢清除, 但3个月后肺内仍有少量纳米TiO₂残留. 不同的气管内灌注方法会影响纳米TiO₂从肺部的清除速度, 同时, 纳米颗粒的存在也会干扰K、Ca、Fe、Cu和Zn等组织原生元素在肺部的自然分布. XRF技术为研究金属纳米材料和原生金属元素在组织和器官中的作用和分布提供了有效的方法, 并能进一步辅助揭示纳米材料的纳米毒性机制. 在另一项纳米-动物界面作用的研究中, 我们将纳米碳黑(CBs)和金属离子混合形成复合物, 作为细颗粒物(PM2.5)的模型材料, 以微米级的分辨率对该复合物造成肺组织内金属及重要生命元素分布的变化进行研究^[36]. 在小鼠气管内灌注模型中, 吸附在CBs上的过量金属促成了肺部毒性效应, 自噬和溶酶体功能障碍是CBs和金属协同肺部毒性效应的主要原因, 同步成像技术为揭示PM2.5毒性机制提供了关键证据.

在纳米-植物界面的研究中,我们以油菜为模型,利用同步辐射XRF成像方法追踪了Au元素和植物体内营养元素(K、Ca、Fe、Zn等)在油菜茎和叶片中的分布和含量变化^[37],直观揭示了纳米金(AuNPs)在植物组织中的积累和传输过程.结果显示,AuNPs不会影响油菜种子的发芽和幼苗的生长,它能够在植物组织中有效运输,且不会干扰金属营养元素在植物组织中的自然分布.AuNPs对油菜幼苗生长的温和影响,提示其可被用做植物中的基因传递载体.

除了纳米毒性,同步辐射X射线显微成像技术也可应用于动物水平的纳米医药研究.在NDs-ATO联合治疗的研究中,我们发现NDs的加入有效抑制了肝、脾和肠中砷剂引起的癌症转移,其抑制效力与NDs在不同器官中的生物分布密切相关^[38].从治疗开始的135~174天,NDs联合治疗将ATO治疗小鼠的存活率从0%提高到100%,并且20%的小鼠存活率超过10个月.通过利用同步辐射XRF成像和电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)技术研究给药后小鼠体内砷元素的水平,发现ND₅和ATO共处理对各组织中砷的浓度没有显著影响(图2),ND₅没有改变ATO在组织中的生物利用度,这避免了As在体内的积累.同步辐射X射线成像技术为揭示这种纳米颗粒介导的抗肿瘤转移新策略提供了关键证据.

此外,同步辐射X射线技术也广泛应用于生物医学成像和癌症放射治疗领域^[39].例如,澳大利亚光源的研究人员在成像和医学光束线站设计并安装了一套全面的放射治疗装置,以推动图像引导的同步辐射微束放射疗法在不同类型肿瘤治疗中的发展^[40,41].

5 细胞功能分析

亚细胞结构多处于10 nm~1 μm尺度,如重要的细胞器核糖体直径仅有25 nm;细胞内多种生物大分子尺度多处于1~100 nm,蛋白质分子及复合物则更是在10 nm以下,这要求分析技术满足纳米空间分辨.同步辐射的X射线显微镜具有内在的高分辨和强穿透能力,可以对完整细胞进行纳米分辨成像.值得指出的是,现代细胞生物学研究更关注细胞内多种生物分子的定位、分布及其相互作用,也就是细胞的功能分析(不同于传统的细胞“结构”分析).

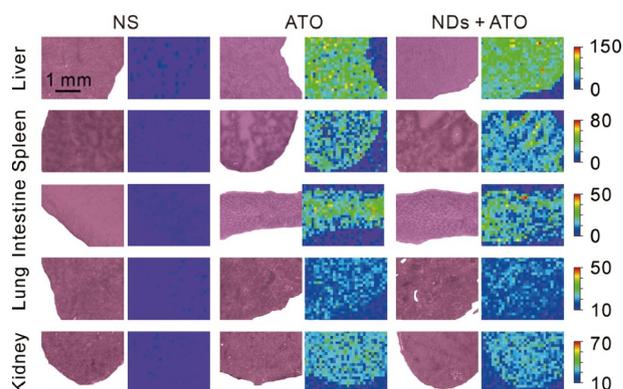


图2 NDs介导的生物分布依赖性抗转移作用在ATO治疗中的研究.裸鼠携带HepG2肿瘤,每天静脉注射ATO或ND-ATO混合物,连续五天.同步辐射XRF技术检测主要组织中的砷分布^[38](网络版彩图)

Figure 2 ND-mediated biodistribution-dependent anti-metastasis in ATO-based therapy. HepG2 tumor-bearing nude mice were administered ATO or NDs-ATO mixture intravenously (i.v.) daily for five consecutive days. Arsenic distribution in major tissues by XRF ^[38] (color online).

5.1 遗传标记

绿色荧光蛋白(GFP)是由钱永健等发展的荧光成像遗传编码探针,GFP及其衍生物的发展是分析细胞内重要蛋白质定位、分布和相互作用的重要工具^[42,43].我们基于同步X射线显微技术,将经过基因改造的过氧化物酶(APEX2)用作X射线遗传编码探针.在哺乳动物细胞中,带有APEX2标签的特定蛋白质表达后,APEX2可以原位催化二氨基联苯胺(DAB)单体形成X射线显微镜下可见的聚合物,从而实现成像(图3)^[44].使用新探针APEX2,研究者能够以25~30 nm的超高空间分辨率观察到细胞内多种蛋白质分子和亚细胞结构,其成像能力优于EGFP标记的荧光共聚焦显微镜,二者的半峰全宽(FWHM)分别为20~30 nm和超过200 nm.此外,X射线标签具有优越的光稳定性,可以长时间观察细胞内和细胞间发生的分子事件.而利用X射线的高能量分辨性质,还可以实现对细胞内多种蛋白质的同时观测.美国加州大学洛杉矶分校Gu教授^[45]指出,X-ray“GFP”技术建立了一个高通用性的同步辐射细胞功能成像平台.该工作在国际上率先实现了X射线遗传标记探针“0”的突破.

5.2 纳米探针标记

2001年,加州大学旧金山分校Larabell教授等^[46]使

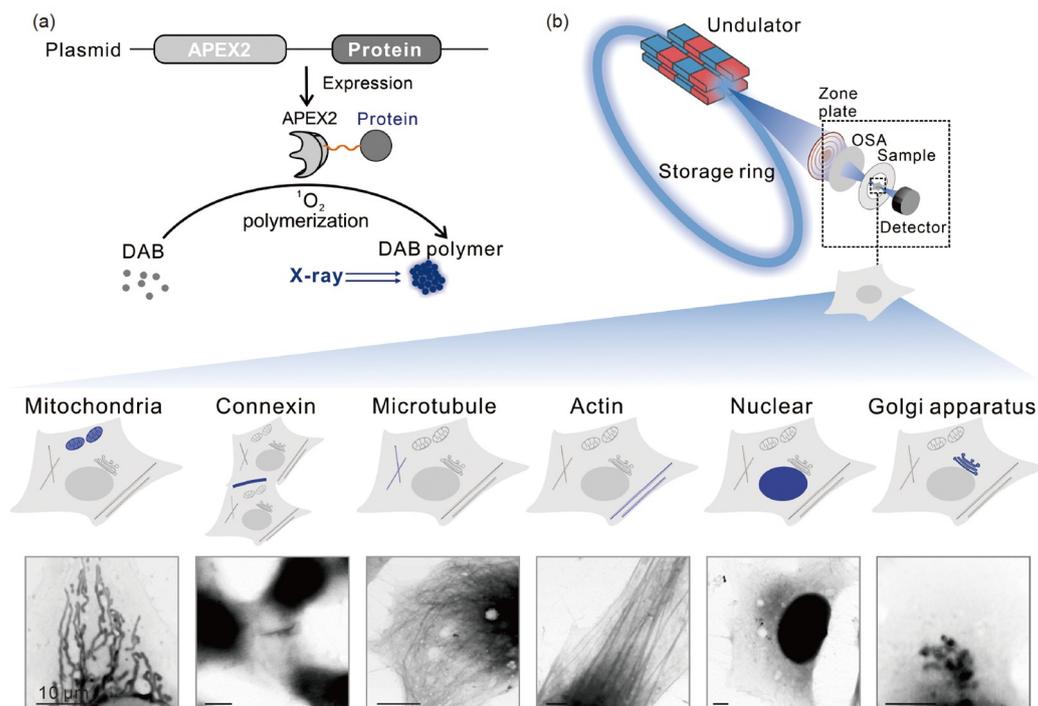


图3 X射线成像遗传编码探针对细胞内特定蛋白质的内源标记和原位纳米分辨成像^[44] (网络版彩图)

Figure 3 Genetically encoded X-ray cellular imaging for nanoscale protein localization ^[44] (color online).

用粒径为1.4 nm的金纳米颗粒连接抗体,使其能够通过Triton通透的细胞质膜,靶向标记细胞质和细胞核中的蛋白,再诱导银离子还原包覆于探针表面增强X射线成像信号.在517 eV能量,使用X射线显微镜在50 nm的分辨率下获得了细胞内蛋白定位的二维分布信息.之后,西北大学Woloschak教授团队^[47]发展了TiO₂-寡核苷酸纳米复合材料作为X射线探针,通过使用XRF技术对Ti元素成像,以此观察探针上寡核苷酸在细胞内的定位. Larabell等^[48]报道了TiO₂-链霉亲和素偶联纳米结构能够靶向标记生物素孵育的细胞微管,并且,通过联用Au纳米探针,应用双能STXM成像能够获得两种不同靶标蛋白的细胞内分布. X射线显微镜能对三维结构的二维投影以数十纳米分辨率成像,但三维分辨率却远低于这一水平,仅有~400 nm^[49]. 双能STXM相衬成像与等斜率重建算法的结合提高了同步辐射X射线三维成像能力^[50]. 基于此,中国科学院国家纳米科学中心赵宇亮团队^[51]构建了一种白蛋白-多肽(BSA-CV)生物矿化的AuGd@BSA-CV纳米探针,能够靶向定位于细胞膜上的整合素,该探针同时具有荧光和同步辐射X射线吸收信号. 中国科学院国家纳

米科学中心陈春英团队^[52]将这一探针和HEL细胞孵育,通过STXM双能相衬成像在Gd元素吸收边前(1174.0 eV)和吸收边(1179.3 eV)能量下获得不同投影,使用等斜率断层重建算法重建以及元素定量计算准确地获得了单细胞上整合素的三维分布及定量信息. 此外, Wang等^[53]以白蛋白铁纳米颗粒Fe@BSA为模板,将荧光基团FITC和HER2蛋白靶向短肽KL6修饰至其表面,得到探针Fe@BFC. Zhang等^[54]利用该探针通过硬X射线纳米CT技术获得了HER2在乳腺癌细胞上的二维分布.

5.3 大尺寸细胞无标记成像分析

在细胞生命活动的功能分析中,通过各种标记技术处理的细胞样品虽然能够增强对比度,却不利于对原始细胞自然结构的成像分析. 在同步辐射硬X射线波段,纳米颗粒的吸收衬度随其原子序数的增大而增加,而无标记细胞对X射线的相位改变能力很强. 因此硬X射线通过吸收和相位相衬技术能够对纳米药物等在细胞内的功能和命运进行原位分析^[55]. 陈春英团队^[56]利用纳米锰佐剂构建了新冠病毒RBD抗原自组

装纳米疫苗, 为了理解其摄取过程和免疫调控路线, 通过同步辐射硬X射线纳米CT技术对树突状细胞中RBD和锰的时空分布进行成像, 结果显示, 纳米锰佐剂可以被树突状细胞摄取并随时间积累, 验证了该纳米疫苗细胞内抗原呈递和激活特异性免疫的可能性. 该研究获得的完整单细胞及纳米颗粒的无标记同步辐射三维成像能够清晰分辨细胞核、核仁、核膜、细胞质膜等细胞原始结构, 直观展示出纳米颗粒在细胞内的自然分布, 为大尺寸细胞内的纳米颗粒功能分析提供了新的技术支撑.

6 脑成像分析

近年来, 在大脑中神经元、血管和金属元素等的成像分析中, 同步辐射X射线成像技术为其打开了新思路. 同步辐射X射线的高分辨、深穿透等一系列性质, 使得其对神经元细胞和脑组织块的研究具有独特的优势.

6.1 脑内金属元素成像及分析

金属元素在大脑中发挥了重要的生理和病理学作用. 例如, 在神经退行性疾病中, 对Fe、Ca、Zn等多种金属元素进行定量或定性的分析将有助于阐明发病机制^[57,58]. Colvin等^[59]通过同步辐射XRF技术实现了对大鼠海马原代神经元细胞中金属含量及分布的研究, 发现了Ca、Fe和Zn在齿状回和CA1区的高浓度分布以及Mn在CA1区的高浓度分布.

XRF技术结合合适的探针, 还可以实现对脑组织块中的特定神经元成像. 我们发展了一种以赤藓红B (Erythrosine B)和免疫球蛋白G (IgG)为基础的双模态探针, 并通过XRF实现了对黑质致密区(SNC)和腹侧被盖区(VTA)中多巴胺能神经元的成像^[60]. 其中XRF的信号来源于赤藓红B, 其分子中含有四个碘原子, 具有较强的X射线吸收. 该探针具有荧光成像和XRF成像的双模态成像能力, 为通过XRF区分不同类型的神经元细胞提供了新思路.

6.2 神经元及血管成像

同步辐射X射线具有深穿透的特性, 这使得对毫米到厘米及较厚脑组织块的完整成像成为可能. 2011年, 胡宇光课题组^[61]通过同步辐射Micro-CT对高尔基

染色法处理的神经元进行成像分析, 发现了reeler小鼠(一种大脑皮质发育畸形小鼠)中浦肯野细胞三维分形维数的减少. 随后, 该课题组进一步优化成像线站的参数, 发展了神经元的加速X射线成像(accelerated X-ray observation of neurons, AXON)策略, 实现了最快成像速度达 1 mm^3 组织/min的快速三维成像, 且各向同性分辨率达到 $0.3 \mu\text{m}$, 这也是同分辨率下目前最快的三维成像技术^[9,62]. 近期, 通过“AXON”策略, 胡宇光课题组^[63,64]已实现了对果蝇全身和小鼠脑成像, 并对其轴突和树突等结构进行成像(图4a, b).

在同步辐射X射线神经元成像方面, 我们通过优化染色过程中的各项参数, 建立了一种适用于完整全脑组织的快速高尔基染色新方法. 该染色方法对多种模式动物具有普适性, 并与同步辐射X射线Micro-CT具有高匹配度, 通过此方法染色的神经元在同步辐射X射线下具有优秀的成像效果. 近期, 我们获取了斑马鱼、小鼠、大鼠、兔和猪脑组织的X射线三维成像结果. 更重要的是, 同步辐射Micro-CT成像具有在灵长类动物以及人脑的介观神经联接图谱的绘制中提供技术支持的潜力. 但目前适用于同步辐射X射线的全脑成像策略较缺乏, 我们发展了大体积脑组织的同步辐射Micro-CT成像策略, 成功实现对小鼠脑和猪脑部分脑区的大范围成像.

同步辐射X射线相衬成像(XPCI)可利用软组织对X射线相位信息的响应获得良好的X射线对比度, 从而实现脑组织的无标记成像^[67]. Töpperwien等^[68]通过XPCI技术实现了对无标记的人小脑的成像, 成功从数据集中重建了分子层和颗粒层的细胞, 并自动提取了浦肯野细胞的结构. 而在此基础上提出的X射线纳米全息层析成像(XNH)则拥有更高的各向同性分辨率, 目前通过XNH已实现了对人脑组织的各向同性 25 nm 分辨率的无标记成像, 并可清晰分辨浦肯野细胞和锥体细胞的亚细胞结构^[69-73]. 结合10组部分重叠的XNH扫描, 研究者们还实现了对果蝇肌肉到中枢神经系统的单根运动轴突成像^[74].

无标记成像的另一优势在于易实现对多结构的成像. 早在20世纪80年代, 同步辐射技术就已经被用于研究人类的心血管. 时至今日, 小鼠和大鼠等模式动物的在体或离体血管也得以在同步辐射上实现成像, 但这些结果大多都是基于碘造影剂(图4c)^[65,75-78]. 通过XPCI可实现对神经元系统和血管系

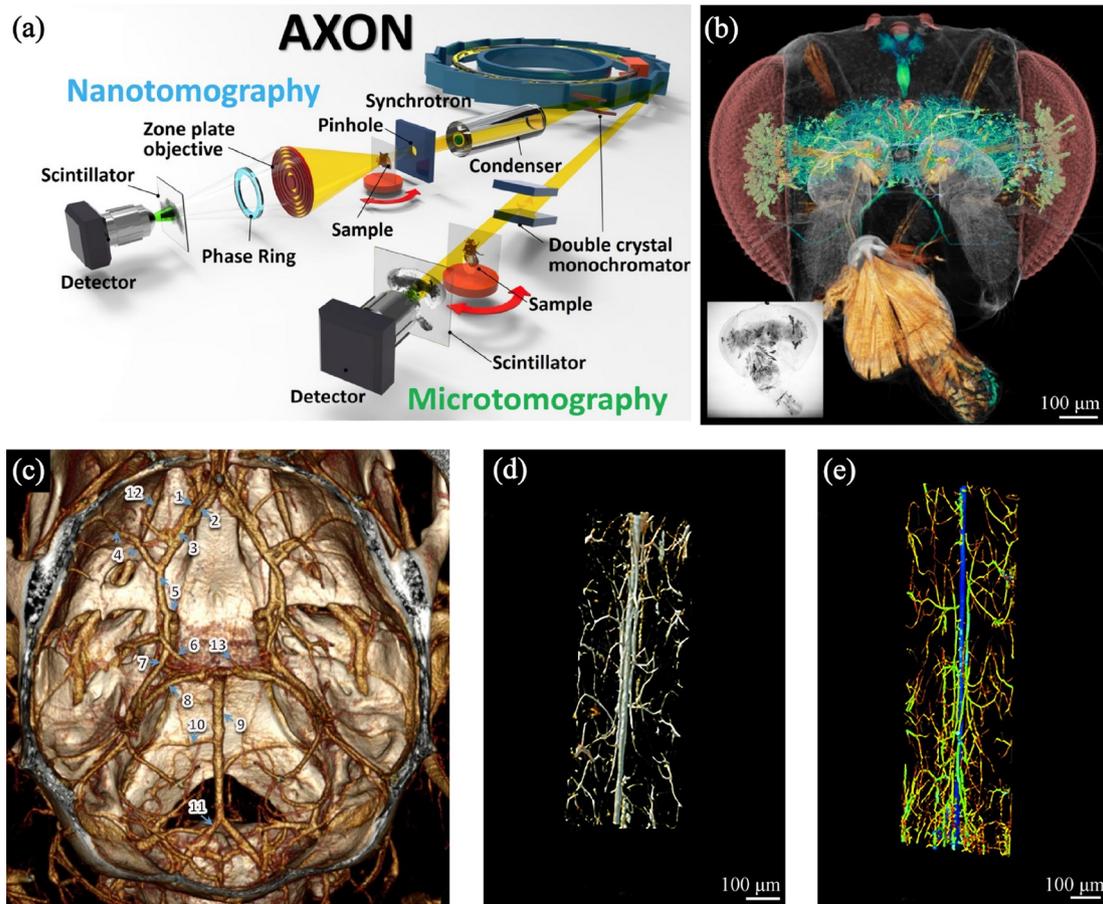


图 4 神经元与血管的同步辐射X射线成像。(a) 两种用于AXON的同步辐射线站示意图；(b) 果蝇神经元的高分辨率断层扫描重建图像^[9]；(c) 小鼠大脑血管系统的三维体积重建图像^[65]；(d) 在纵向虚拟组织切片中提取的三维微血管网络；(e) 基于不同血管直径渲染的脊椎血管三维清晰框架^[66] (网络版彩图)

Figure 4 Synchrotron-based X-ray imaging of neurons and blood vessels. (a) Schematic picture of the two types of synchrotron beamlines used for AXON; (b) high-resolution tomographic reconstruction image of neurons of *Drosophila* [9]; (c) volume-rendered 3D image of the cerebral vasculature in mice [65]; (d) the 3D micro-vascular network extracted from longitudinal virtual tissue sections; (e) a clear framework for 3D characteristic labeling of the spinal cord vasculature based on the different diameters of the vessels [66] (color online).

统的同时成像,并具有较好的区分效果,目前小鼠和大鼠的血管与神经元系统的同时成像均得以实现^[66,78,79]。此外,通过XPCI还可实现植入脑区与植入设备的同时成像^[80]。

随着同步辐射光源的飞速发展,2020年1月,同步辐射神经科学亚太联盟(Synchrotrons for Neuroscience-an Asia-Pacific Strategic Enterprise, SYNAPSE)成立,旨在绘制全世界首幅人全脑介观X射线联接图谱^[81],赵振堂、胡钧和樊春海为联盟执委。目前,基于第四代同步辐射光源的分层相位层析成像(hierarchical phase-contrast tomography, Hip-CT)也已问世,其可在多尺度下对人脑组织进行成像^[10,82]。因

此,同步辐射X射线成像技术可为脑科学研究提供重要的技术支持。

7 总结与展望

迄今,本课题组以及国内外诸多团队在应用同步辐射技术开展生物成像分析领域取得了显著的成果。在纳米-生物界面分析研究中,实现了纳米-细胞/亚细胞界面、纳米-动/植物组织等多种界面的追踪,为纳米安全性研究、纳米药物输送以及纳米装置的开发提供了重要保障;在细胞功能分析研究中,实现了细胞表面/内部多种生物分子的定位、分布分析,结合完整单

细胞的无标记三维结构成像分析, 为现代细胞生物学研究提供了强有力的工具; 在脑成像分析研究中, 实现了大尺度脑组织厚样品中神经元与血管的成像分析, 未来还将在人全脑介观联接图谱的绘制中发挥不可替代的作用。但是, 仍然存在一些亟待解决的科学问题。(1) 辐射剂量: 生命体系含有碳、氮、氧等轻元素, 对X射线的辐射非常敏感, 目前通过冷冻样品可以使生物样品最接近生理状态, 未来应通过进一步改进实验装置加上算法的改进减少实验数据的收集以降低辐射剂量, 从而最大程度保持生物样品的自然形貌及完整性。(2) 成像分辨率: 在细胞功能分析中, 亚细胞结构多处于10 nm~1 μm尺度, 细胞内生物大分子尺度多处于1~100 nm, 这要求分析技术满足纳米空间分辨。未来对波带片的加工工艺提出更为苛刻的要求, 应进一步减小波带片最外环的宽度以实现更高的空间分辨能力。此外, 上海光源成像线站新近发展起来的X射线相干衍射成像(coherent diffraction imaging, CDI)方法摆脱了由成像元件所带来的对成像分辨率的限制, 目

前成像分辨率已达到8 nm, 并有进一步提升的空间, 可以很好地满足细胞功能分析的需求。(3) 图像处理速度: 在生物样品成像尤其是脑成像分析中, 往往获得海量数据(TB级), 这对数据处理提出了挑战。Amira等软件中提供的LDA (large data access)格式转化为TB级的数据处理提供了极大的便利。未来在保留信号框架前提下最大程度去除冗余信息的算法若能得到进一步的发展, 将能大幅度加快大尺寸生物样品诸如全脑的数据处理速度。

值得指出的是, 与商业化的激光共聚焦、电子显微镜等相比, 依托于大科学装置的同步辐射分析技术机时有限, 一定程度上限制了同步辐射技术在生命分析中的应用。随着上海光源二期建设的推进, 北京新光源、合肥新光源、武汉光源以及南方光源的建成和对外开放, 从成像线站数量到实验条件都将有长足的进步, 各种基于大科学装置的成像分析技术也将不断发展和完善, 未来一定能够为现代生物学研究提供更多更可靠的技术保障。

致谢 感谢上海同步辐射光源(SSRF)的同步辐射机时支持, 感谢SSRF的08U (BL08U1)、15U和13HB的工作人员对本综述中展示工作在测试过程中的协助以及提供的支持和帮助。

参考文献

- 1 Yip KM, Fischer N, Paknia E, Chari A, Stark H. *Nature*, 2020, 587: 157–161
- 2 Loconte V, Singla J, Li A, Chen JH, Ekman A, McDermott G, Sali A, Le Gros M, White KL, Larabell CA. *Structure*, 2022, 30: 510–521.e3
- 3 Jacobsen C, Kirz J. *Nat Struct Mol Biol*, 1998, 5: 650–653
- 4 Codling K. *Rep Prog Phys*, 1973, 36: 541–624
- 5 Xu H, Zhao Z. *Nucl Sci Tech*, 2008, 19: 1–6
- 6 Li YF, Zhao J, Qu Y, Gao Y, Guo Z, Liu Z, Zhao Y, Chen C. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2015, 11: 1531–1549
- 7 Wu Y, Han X, Su Y, Glidewell M, Daniels JS, Liu J, Sengupta T, Rey-Suarez I, Fischer R, Patel A, Combs C, Sun J, Wu X, Christensen R, Smith C, Bao L, Sun Y, Duncan LH, Chen J, Pommier Y, Shi YB, Murphy E, Roy S, Upadhyaya A, Colón-Ramos D, La Riviere P, Shroff H. *Nature*, 2021, 600: 279–284
- 8 Nakane T, Kotecha A, Sente A, McMullan G, Masiulis S, Brown PMGE, Grigoras IT, Malinauskaitė L, Malinauskas T, Miehlung J, Uchański T, Yu L, Karia D, Pechnikova EV, de Jong E, Keizer J, Bischoff M, McCormack J, Tiemeijer P, Hardwick SW, Chirgadze DY, Murshudov G, Aricescu AR, Scheres SHW. *Nature*, 2020, 587: 152–156
- 9 Chin AL, Yang SM, Chen HH, Li MT, Lee TT, Chen YJ, Lee TK, Petibois C, Cai X, Low CM, Tan FCK, Teo A, Tok ES, Ong EBL, Lin YY, Lin IJ, Tseng YC, Chen NY, Shih CT, Lim JH, Lim J, Je JH, Kohmura Y, Ishikawa T, Margaritondo G, Chiang AS, Hwu Y. *Chin J Phys*, 2020, 65: 24–32
- 10 Walsh CL, Tafforeau P, Wagner WL, Jafree DJ, Bellier A, Werlein C, Kühnel MP, Boller E, Walker-Samuel S, Robertus JL, Long DA, Jacob J, Marussi S, Brown E, Holroyd N, Jonigk DD, Ackermann M, Lee PD. *Nat Methods*, 2021, 18: 1532–1541
- 11 Zhang J, Cai X, Zhang Y, Li X, Li W, Tian Y, Li A, Yu X, Fan C, Huang Q. *Anal Methods*, 2013, 5: 6611
- 12 Xue C, Wang Y, Guo Z, Wu Y, Zhen X, Chen M, Chen J, Xue S, Peng Z, Lu Q, Tai R. *Rev Sci Instrum*, 2010, 81: 103502

- 13 Kemner KM, Kelly SD, Lai B, Maser J, O'Loughlin EJ, Sholto-Douglas D, Cai Z, Schneegurt MA, Kulpa Jr. CF, Nealson KH. *Science*, 2004, 306: 686–687
- 14 Li T, He B, Zhang X, Fan J, Gao L, Sun Z, Zhang J, Guo A, Pan D, Yin X, Tong Y, Song C, Kohmura Y, Yabashi M, Ishikawa T, Gao X, Jiang H. *Anal Chem*, 2022, 94: 13136–13144
- 15 Chen R, Xu L, Du G, Deng B, Xie H, Xiao T. *J Inst*, 2018, 13: C05006
- 16 Xu F, Liu W, Xiao Y, Dong B, Hu X, Wu X. *Appl Phys Lett*, 2017, 110: 101904
- 17 Ge M, Coburn DS, Nazaretski E, Xu W, Gofron K, Xu H, Yin Z, Lee WK. *Appl Phys Lett*, 2018, 113: 083109
- 18 Tao F, Wang J, Du G, Su B, Zhang L, Hou C, Deng B, Xiao T. *J Synchrotron Rad*, 2023, 30: 815–821
- 19 De Andrade V, Nikitin V, Wojcik M, Deriy A, Bean S, Shu D, Mooney T, Peterson K, Kc P, Li K, Ali S, Fezzaa K, Gürsoy D, Arico C, Ouendi S, Troadec D, Simon P, De Carlo F, Lethien C. *Adv Mater*, 2021, 33: 2008653
- 20 White KL, Singla J, Loconte V, Chen JH, Ekman A, Sun L, Zhang X, Francis JP, Li A, Lin W, Tseng K, McDermott G, Alber F, Sali A, Larabell C, Stevens RC. *Sci Adv*, 2020, 6: eabc8262
- 21 Xu Z, Wang C, Liu H, Tao X, Tai R. *J Phys-Conf Ser*, 2017, 849: 012033
- 22 Dang Z, Guan Y, Wu Z, Tao XY, Xiong Y, Bai HB, Shao CS, Liu G, Huang Q, Tian LJ, Tian YC. *Nanoscale*, 2021, 13: 18977–18986
- 23 Chen N, He Y, Su Y, Li X, Huang Q, Wang H, Zhang X, Tai R, Fan C. *Biomaterials*, 2012, 33: 1238–1244
- 24 Su Y, Hu M, Fan C, He Y, Li Q, Li W, Wang L, Shen P, Huang Q. *Biomaterials*, 2010, 31: 4829–4834
- 25 Cai X, Chen HH, Wang CL, Chen ST, Lai SF, Chien CC, Chen YY, Kempson IM, Hwu Y, Yang CS, Margaritondo G. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401: 809–816
- 26 Cai X, Wang CL, Chen HH, Chien CC, Lai SF, Chen YY, Hua TE, Kempson IM, Hwu Y, Yang CS, Margaritondo G. *Nanotechnology*, 2010, 21: 335604
- 27 Li J, Zhu Y, Li W, Zhang X, Peng Y, Huang Q. *Biomaterials*, 2010, 31: 8410–8418
- 28 Zhu Y, Li W, Zhang Y, Li J, Liang L, Zhang X, Chen N, Sun Y, Chen W, Tai R, Fan C, Huang Q. *Small*, 2012, 8: 1771–1779
- 29 Zhu Y, Zhang Y, Shi G, Yang J, Zhang J, Li W, Li A, Tai R, Fang H, Fan C, Huang Q. *Part Fibre Toxicol*, 2015, 12: 2
- 30 Cui Z, Zhang Y, Zhang J, Kong H, Tang X, Pan L, Xia K, Aldabahi A, Li A, Tai R, Fan C, Zhu Y. *Carbon*, 2016, 97: 78–86
- 31 Tian F, Chen G, Yi P, Zhang J, Li A, Zhang J, Zheng L, Deng Z, Shi Q, Peng R, Wang Q. *Biomaterials*, 2014, 35: 6412–6421
- 32 Cui Z, Zhang Y, Xia K, Yan Q, Kong H, Zhang J, Zuo X, Shi J, Wang L, Zhu Y, Fan C. *Nat Commun*, 2018, 9: 4347
- 33 Fernández-Ruiz R. *X-Ray Spectrometry*, 2022, 51: 279–293
- 34 Fahrni CJ. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11: 121–127
- 35 Zhang J, Li B, Zhang Y, Li A, Yu X, Huang Q, Fan C, Cai X. *Analyst*, 2013, 138: 6511–6516
- 36 Kong H, Xia K, Pan L, Zhang J, Luo Y, Zhang Y, Cui Z, El-Sayed NN, Aldabahi A, Chen N, Li A, Tai R, Fan C, Zhu Y. *Carbon*, 2017, 111: 322–333
- 37 Zhang J, Pan L, Lv M, Aldabahi A, Xie T, Li A, Tai R, Huang Q, Fan C, Zhao Y, Zhu Y. *RSC Adv*, 2015, 5: 73827–73833
- 38 Yan Q, Sun R, Cui Z, Zhang J, Zhang Y, Zhang Q, Zhu S, Wang L, Li Q, Lu M, Zhu Y, Fan C. *Nano Today*, 2022, 47: 101649
- 39 Hall C, Lewis R. *Phil Trans R Soc A*, 2019, 377: 20180240
- 40 Livingstone J, Adam JF, Crosbie JC, Hall CJ, Lye JE, McKinlay J, Pelliccia D, Pouzoulet F, Prezado Y, Stevenson AW, Häusermann D. *J Synchrotron Rad*, 2017, 24: 854–865
- 41 Pelliccia D, Poole CM, Livingstone J, Stevenson AW, Smyth LML, Rogers PAW, Häusermann D, Crosbie JC. *J Synchrotron Rad*, 2016, 23: 566–573
- 42 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. *Science*, 1994, 263: 802–805
- 43 Tsien RY. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509–544
- 44 Kong H, Zhang J, Li J, Wang J, Shin HJ, Tai R, Yan Q, Xia K, Hu J, Wang L, Zhu Y, Fan C. *Natl Sci Rev*, 2020, 7: 1218–1227
- 45 Gao J, Gu Z. *Natl Sci Rev*, 2021, 8: 2–3
- 46 Meyer-Ilse W, Hamamoto D, Nair A, Lelievre SA, Denbeaux G, Johnson L, Pearson AL, Yager D, Legros MA, Larabell CA. *J Microsc*, 2001, 201: 395–403
- 47 Paunesku T, Rajh T, Wiederrecht G, Maser J, Vogt S, Stojićević N, Protić M, Lai B, Oryhon J, Thurnauer M, Woloschak G. *Nat Mater*, 2003, 2: 343–346

- 48 Ashcroft JM, Gu W, Zhang T, Hughes SM, Hartman KB, Hofmann C, Kanaras AG, Kilcoyne DA, Le Gros M, Yin Y, Alivisatos AP, Larabell CA. *Chem Commun*, 2008, 2471
- 49 de Jonge MD, Holzner C, Baines SB, Twining BS, Ignatyev K, Diaz J, Howard DL, Legnini D, Miceli A, McNulty I, Jacobsen CJ, Vogt S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 15676–15680
- 50 Yao S, Fan J, Chen Z, Zong Y, Zhang J, Sun Z, Zhang L, Tai R, Liu Z, Chen C, Jiang H. *IUCrJ*, 2018, 5: 141–149
- 51 Zhai J, Wang Y, Xu C, Zheng L, Wang M, Feng W, Gao L, Zhao L, Liu R, Gao F, Zhao Y, Chai Z, Gao X. *Anal Chem*, 2015, 87: 2546–2549
- 52 Zhang C, Yao S, Xu C, Chang Y, Zong Y, Zhang K, Zhang X, Zhang L, Chen C, Zhao Y, Jiang H, Gao X, Wang Y. *Anal Chem*, 2021, 93: 1237–1241
- 53 Wang Y, Xu C, Chang Y, Zhao L, Zhang K, Zhao Y, Gao F, Gao X. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 28959–28966
- 54 Zhang C, Zhang K, Cui Y, Guo Y, Wang C, Xu C, Yao Q, Zhao Y, Chen C, Wang Y. *Anal Chem*, 2023, 95: 2129–2133
- 55 Cao M, Zhang K, Zhang S, Wang Y, Chen C. *ACS Cent Sci*, 2022, 8: 1063–1080
- 56 Wang Y, Xie Y, Luo J, Guo M, Hu X, Chen X, Chen Z, Lu X, Mao L, Zhang K, Wei L, Ma Y, Wang R, Zhou J, He C, Zhang Y, Zhang Y, Chen S, Shen L, Chen Y, Qiu N, Liu Y, Cui Y, Liao G, Liu Y, Chen C. *Nano Today*, 2021, 38: 101139
- 57 Pamphlett R, Mak R, Lee J, Buckland ME, Harding AJ, Kum Jew S, Paterson DJ, Jones MWM, Lay PA. *PLoS ONE*, 2020, 15: e0233300
- 58 Pamphlett R, Kum Jew S. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, 1: 81
- 59 Colvin RA, Jin Q, Lai B, Kiedrowski L. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0159582
- 60 Yan M, Zuo T, Zhang J, Wang Y, Zhu Y, Wang L, Zhou Y, Sun Y. *Chem Commun*, 2022, 58: 713–715
- 61 Kim J, Kwon N, Chang S, Kim KT, Lee D, Kim S, Yun SJ, Hwang D, Kim JW, Hwu Y, Margaritondo G, Je JH, Rhyu IJ. *Sci Rep*, 2011, 1: 122
- 62 Chen HH, Yang SM, Yang KE, Chiu CY, Chang CJ, Wang YS, Lee TT, Huang YF, Chen YY, Petibois C, Chang SH, Cai X, Low CM, Tan FCK, Teo A, Tok ES, Lim JH, Je JH, Kohmura Y, Ishikawa T, Margaritondo G, Hwu Y. *J Synchrotron Rad*, 2021, 28: 1662–1668
- 63 Hwu Y, Margaritondo G, Chiang AS. *BMC Biol*, 2017, 15: 122
- 64 Wu HR, Chen ST, Chu YS, Conley R, Bouet N, Chien CC, Chen HH, Lin CH, Tung HT, Chen YS, Margaritondo G, Je JH, Hwu Y. *J Phys D-Appl Phys*, 2012, 45: 242001
- 65 Starosolski Z, Villamizar CA, Rendon D, Paldino MJ, Milewicz DM, Ghaghada KB, Annapragada AV. *Sci Rep*, 2015, 5: 10178
- 66 Hu J, Li P, Yin X, Wu T, Cao Y, Yang Z, Jiang L, Hu S, Lu H. *J Synchrotron Rad*, 2017, 24: 482–489
- 67 Munro PRT, Ignatyev K, Speller RD, Olivo A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13922–13927
- 68 Töpferwien M, van der Meer F, Stadelmann C, Salditt T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 6940–6945
- 69 Da Silva JC, Pacureanu A, Yang Y, Bohic S, Morawe C, Barrett R, Cloetens P. *Optica*, 2017, 4: 492–495
- 70 Hubert M, Pacureanu A, Guilloud C, Yang Y, da Silva JC, Laurencin J, Lefebvre-Joud F, Cloetens P. *Appl Phys Lett*, 2018, 112: 203704
- 71 Vogt N. *Nat Methods*, 2020, 17: 1072
- 72 Khimchenko A, Bikis C, Pacureanu A, Hieber SE, Thalmann P, Deyhle H, Schweighauser G, Hench J, Frank S, Müller-Gerbl M, Schulz G, Cloetens P, Müller B. *Adv Sci*, 2018, 5: 1700694
- 73 Khimchenko A, Pacureanu A, Bikis C, Hieber SE, Thalmann P, Deyhle H, Schweighauser G, Hench J, Frank S, Müller-Gerbl M, Schulz G, Cloetens P, Müller B. *Microsc Microanal*, 2018, 24: 354–355
- 74 Kuan AT, Phelps JS, Thomas LA, Nguyen TM, Han J, Chen CL, Azevedo AW, Tuthill JC, Funke J, Cloetens P, Pacureanu A, Lee WCA. *Nat Neurosci*, 2020, 23: 1637–1643
- 75 Rubenstein E, Hofstadter R, Zeman HD, Thompson AC, Otis JN, Brown GS, Giacomini JC, Gordon HJ, Kernoff RS, Harrison DC, Thomlinson W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 9724–9728
- 76 van Deel E, Ridwan Y, van Vliet JN, Belenkov S, Essers J. *J Vis Exp*, 2016, e53603
- 77 Ashton JR, West JL, Badea CT. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 256
- 78 Gu P, Xu ZH, Cao YZ, Liao SH, Deng QF, Yin XZ, Wang ZL, Chen ZH, Hu XH, Wang H, Li LZ, Liu SX, Ding H, Shi SP, Li HL, Xiao TQ, Xiao B, Zhang MQ. *Neurosci Bull*, 2020, 36: 333–345
- 79 Fratini M, Bukreeva I, Campi G, Brun F, Tromba G, Modregger P, Bucci D, Battaglia G, Spanò R, Mastrogiacomo M, Requardt H, Giove F, Bravin A, Cedola A. *Sci Rep*, 2015, 5: 8514
- 80 Böhm T, Joseph K, Kirsch M, Moroni R, Hilger A, Osenberg M, Manke I, Johnston M, Stieglitz T, Hofmann UG, Haas CA, Thiele S. *Sci Rep*, 2019, 9: 7646

- 81 Stampfl APJ, Liu Z, Hu J, Sawada K, Takano H, Kohmura Y, Ishikawa T, Lim JH, Je JH, Low CM, Teo A, Tok ES, Tan TW, Ban K, Libedinsky C, Tan FCK, Chen KP, Yang AC, Chuang CC, Chen NY, Shih CT, Lee TK, Yang DN, Lai HC, Shuai HH, Cheng CC, Ching YT, Li CW, Chang CC, Lo CC, Chiang AS, Recur B, Petibois C, Cheng CL, Chen HH, Yang SM, Hwu Y, Rojviriya C, Rugmai S, Rujirawat S, Margaritondo G. *Phys Rep*, 2023, 999: 1–60
- 82 Brunet J, Walsh CL, Wagner WL, Bellier A, Werlein C, Marussi S, Jonigk DD, Verleden SE, Ackermann M, Lee PD, Tafforeau P. *Nat Protoc*, 2023, 18: 1441–1461

Application of synchrotron radiation in biological imaging analysis

Ying Zhu^{1,2†}, Xiao-Qing Cai^{1†}, Yu Zhang¹, Ji-Chao Zhang¹, Da-Peng Yin¹, Qiao-Wei Tang¹, Li-Hua Wang^{1,2*}, Chun-Hai Fan^{3*}

¹ The Interdisciplinary Research Center, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Zhangjiang Laboratory, Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210

² Institute of Materiobiology, Department of Chemistry, College of Science, Shanghai University, Shanghai 200444

³ School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025

†These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors (email: wanglihua@sinap.ac.cn; fanchunhai@sjtu.edu.cn)

Abstract: The development of biology has posed challenges to traditional research methods, and its in-depth study relies on the development of methodology. Synchrotron radiation sources are light sources with properties such as high brightness, high collimation, and wide spectral range, which have unique advantages in multi-scale biological research from cells to organisms. This review combines the research work of our laboratory with domestic and foreign research to introduce in detail the latest advances in synchrotron -based technologies, including X-ray micro-CT imaging, nano-CT full-field imaging (TXM), scanning transmission soft X-ray microscopy (STXM), and X-ray fluorescence imaging (XRF), in the fields of nano-bio interfaces, cell functions, and brain imaging analysis.

Keywords: synchrotron-based X-ray, nano-bio interface analysis, cell function analysis, brain imaging analysis

doi: [10.1360/SSC-2023-0093](https://doi.org/10.1360/SSC-2023-0093)