



同步辐射X射线成像技术在纳米探针细胞成像中的应用

韩金茹^{1,2}, 任文智^{1,3*}, 林杰^{1,3}, 吴爱国^{1,3*}

1. 宁波市生物医学成像探针材料与技术重点实验室, 浙江省生物医学材料技术与应用国际合作基地, 中国科学院磁性材料与器件重点实验室, 宁波慈溪生物医学工程研究所, 浙江省医用植入材料工程研究中心, 中国科学院宁波材料技术与工程研究所, 宁波 315201

2. 中国科学院大学, 北京 101408

3. 先进能源科学与技术广东省实验室, 惠州 516000

*通讯作者, E-mail: renwzh@nimte.ac.cn; aiguo@nimte.ac.cn

收稿日期: 2023-06-21; 接受日期: 2023-09-04; 网络版发表日期: 2023-11-06

国家自然科学基金委(编号: 32025021, 32171359, 31971292, 32111540257, 32311530040)、浙江省科技厅(编号: 2020C03110)和宁波市科技局(编号: 2020Z094, 2023Z189, 2023Z209)资助项目

摘要 纳米探针在肿瘤的高灵敏成像和高效治疗可视化方面具有重要的应用前景。通过细胞原位成像技术揭示纳米探针与细胞间的相互作用将为其临床应用奠定生物学基础。同步辐射X射线成像技术是研究纳米探针细胞原位摄取、胞内代谢及构效关系的重要方法。本文系统总结了基于同步辐射光源X射线成像技术在纳米探针细胞原位成像方面的研究进展, 包括纳米探针的细胞原位成像、亚细胞结构原位成像、细胞原位价态分析、细胞原位定量成像以及细胞原位三维成像。此外, 本文还对可用于纳米探针细胞成像的X射线成像技术的发展趋势进行了探讨。

关键词 纳米探针, 细胞成像, X射线成像, 同步辐射

1 引言

根据国家癌症中心的统计数据, 2016年我国恶性肿瘤新发病例数约406.4万例, 死亡病例数约241.35万例^[1], 近年来纳米技术快速发展, 纳米探针(nanoprobes, NPs)有望实现更安全、高效的肿瘤早期成像与治疗^[2-5]。但目前NPs进入生物系统后, 代谢过程中发生的物理化学变化以及对生物系统造成的影响尚不十分明确, 部分NPs可能从分子水平到组织水平产生与预期相反的作用和效果, 阻碍了其临床转化和发展^[6,7]。

研究NPs与不同生物系统之间的相互作用对于理解其构效关系和进一步应用十分重要^[8-12]。相较于活体或组织器官等较大生物系统, 探究NPs与细胞间相互作用是理解NPs在生物系统中构效关系的生物学基础^[13,14]。

目前, 用于NPs细胞原位成像的技术主要包括电子显微镜^[15], 如透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和扫描电子显微镜; 光学显微镜^[13], 如激光共聚焦显微镜; 基于同步辐射的X射线成像技术^[16], 如X射线荧光成像技术(X-ray fluorescence ima-

引用格式: Han J, Ren W, Lin J, Wu A. Application of synchrotron X-ray imaging technology in cellular imaging of nanoprobes. *Sci Sin Chim*, 2023, 53: 2270-2282, doi: [10.1360/SSC-2023-0109](https://doi.org/10.1360/SSC-2023-0109)

ging, XRF)、扫描透射X射线成像技术(scanning transmission X-ray microscope, STXM)和X射线相干叠层成像(X-ray ptychography, ptychography)等. TEM成像分辨率高,可识别细胞内NPs和细胞超微结构,但TEM对样品厚度要求高,染色和切片过程复杂^[17]. 激光共聚焦显微镜通过连接荧光染料定位NPs和特定细胞结构,该方法成像分辨率较低,受NPs荧光和特异性荧光染料限制难以展示所有细胞结构,同时增加了NPs和胞内化学成分的复杂性^[18,19]. X射线较大的穿透深度使X射线成像技术具有细胞原位成像的潜力,但普通光源亮度较低,相干性较差,无法直接用于细胞成像. 同步辐射光具有高亮度、高准直性、相干性好等特点,基于同步辐射光源的X射线成像技术穿透深度和分辨率大致介于电子显微镜和荧光显微之间,无需染色,制样技术简单,可以在近生理状态下用于NPs细胞原位分析^[20]. X射线成像技术已成为研究NPs细胞生物学效应不可或缺的技术之一.

本文首先简单介绍了NPs和细胞之间相互作用研究中的细胞成像需求,接着总结了用于细胞成像的同步辐射X射线成像技术的成像原理和进展,并列表总结了其中三种主要方法的适用范围和局限性. 随后对同步辐射X射线成像技术在NPs细胞原位成像方面的研究进展进行了系统性总结,包括NPs细胞及亚细胞结构原位二维和三维成像、NPs细胞原位价态分析和NPs细胞原位定量分析. 最后,文章对用于细胞原位成像的X射线成像技术发展趋势进行了展望.

2 同步辐射X射线成像

发现或设计具有特定医学功能的NPs或预测NPs在体内的毒理学效应,即研究NPs与生物系统之间的相互作用,必须适当分析和考虑: (1) NPs在细胞内的物理化学性质(包括尺寸、形状、组成、分布、含量、聚集状态等)^[21,22]; (2) NPs在胞内代谢过程中可能发生的物理化学变化(包括溶解、降解、聚合、生物大分子螯合等)^[23]; (3) NPs引起的细胞状态变化(包括亚细胞结构形貌、数量变化,细胞内生物大分子、元素或微量元素分布或含量变化等)^[24,25]; (4) NPs体积小含量低,难以进行细胞内定量检测和评估^[21]. 但总体而言,可从NPs及其代谢产物(如未降解纳米颗粒、游离离子、大分子螯合物等)、细胞生理状态等方面分

析NPs构效关系及潜在的生物学效应^[6,10,11],即分析NPs在细胞中的分布、含量、价态和形貌变化,分析代谢产物的种类、分布和含量变化,以及分析代谢过程中NPs引起的细胞及亚细胞器的形貌、结构、尺寸变化等方面内容. 同步辐射X射线成像技术是表征以上内容的重要手段,目前用于细胞成像的X射线成像技术根据原理不同主要可分为XRF、透射X射线成像技术(transmission X-ray microscope, TXM)和相干衍射成像技术(coherent diffraction imaging, CDI).

XRF利用X射线通过样品时,内层电子被激发形成自由电子和空穴,外层电子向内层跃迁,根据向外辐射的特征X射线荧光进行成像. 由于特征X射线产生与俄歇效应互相竞争,原子序数<11的元素产生俄歇电子几率高,XRF难以对富含C、O、N的生物样品进行高分辨成像. 而原子序数>14的元素,特征X射线辐射波长和亮度与元素种类和含量相对应^[26],XRF可同时定性定量研究细胞内多种元素情况,检测灵敏度高,元素含量检测限低于1 ppm,可用于研究NPs细胞摄取及其在胞内分布情况^[27,28].

TXM成像对比度源于X射线通过样品时,样品不同位置生物化学成分不同,导致对X射线吸收量不同. 不同元素对X射线的吸收能力不同,由轻元素组成的生物样品对X射线吸收弱,对其成像时质量往往较差. STXM通过逐点扫描成像,成像分辨率受焦平面上形成的微小光斑尺寸影响,随着菲涅耳波带片的发展,光斑尺寸不断减小,分辨率可达到10 nm^[29]. 在软X射线波段,特别是在C的K边(284 eV)和O的K边(540 eV)之间的“水窗”波段,含C、O化合物对光子的吸收比水高一个数量级^[30],可以根据C、O吸收边附近能量的吸收差异对含水或活性生物样品(如细胞)进行成像. STXM将细胞简单地冷冻保存后以近生理状态进行成像,结合特定元素吸收边上下方两个能量的吸收差异(双能对比成像),可对细胞和NPs的形貌或元素同时成像^[31,32].

CDI利用X射线经过样品时相干X射线的相位和振幅受到影响,进而形成二维衍射图样,结合合适的(迭代)重建算法恢复相位和振幅信息后成像,从而对吸收对比度差异较小的生物样品细节进行高分辨成像^[33,34]. CDI无需透镜成像,成像分辨率不受透镜限制,且有多种成像方法. 其中ptychography将STXM和CDI的优点结合,具有超高分辨率,是一种优异的成像扩

展方法. 该方法沿预定轨迹进行二维扫描, 同时记录扫描位置衍射模式, 数据收集后通过相位检索算法对图像进行重构, 可用于较大细胞的高分辨成像^[35].

基于以上成像原理, 同步辐射X射线成像技术有多种成像方法可用于NPs细胞成像, 如通过旋转样品台, 结合不同算法重构二维投影图像, 获得NPs在细胞及亚细胞结构中的三维分布; 结合X射线吸收光谱技术(X-ray absorption spectroscopy, XAS), 对NPs中元素种类含量及价态变化进行分析; 结合冷冻低温技术去除背景噪声, 提高成像分辨率, 呈现细胞近生理状态情况; 结合全场或扫描成像方法用于不同尺寸样品成像, 提高成像效率或扩大成像范围. 即X射线成像技术可从硬X射线或软X射线波段成像、常温或低温成像、扫描或全场成像、二维或三维重构成像等方面分为多种成像方法. 不同成像方法具有不同优势, 如研究NPs的细胞摄取, 可利用ptychography在大视场高分辨率条件下进行细胞原位二维或三维成像, 区分NPs和细胞结构, 分析NPs的分布和聚集情况^[36]; 研究NPs的胞内代谢, 可利用XRF或STXM双能成像识别元素种类, 确定元素分布, 定量元素浓度, 结合XAS光谱吸收信息分析胞内元素种类及化学价态, 获取细胞内特定种类元素、价态、含量、分布等信息, 分析NPs胞内物理化学反应过程中形貌和价态变化、生成的代谢产物、代谢时反应速率等内容; 研究诊疗过程中细胞的生理状态, 可利用STXM或ptychography对细胞或NPs结构形貌进行成像, 利用XRF或STXM双能成像对细

胞不同位置的天然元素或微量元素种类含量进行成像, 确定NPs构效关系. 表1总结列举了适于细胞成像的三种X射线成像方法的分辨率、制样方法、适用范围等内容.

3 NPs细胞原位同步辐射X射线成像

基于同步辐射X射线成像技术的多种成像方法可以满足NPs和细胞间相互作用研究的大部分需求. 结合不同成像方法的适用范围和实际成像需求, 灵活选择成像方法十分必要. 下文将结合成像及分析不同需求和X射线表征方法适用范围, 从NPs细胞原位成像、NPs亚细胞结构原位成像、NPs细胞原位价态分析、NPs细胞原位定量成像、以及NPs细胞原位三维成像等五个方面进行系统性介绍.

3.1 NPs细胞原位成像

NPs在细胞中原位成像主要用于表征NPs的细胞摄取、NPs在亚细胞结构中的分布、胞内生物大分子分布可视化(NPs偶联抗体后作为成像试剂), 但从细胞到亚细胞结构乃至生物大分子和纳米颗粒之间尺寸存在数量级的差异, 同时成像并且对以上内容进行区分需要高分辨率和大视场范围. 同步辐射X射线成像技术对细胞进行原位成像主要通过使用不同成像方法满足以上要求.

NPs细胞原位成像用于研究NPs在细胞和亚细胞

表1 用于纳米探针细胞原位成像的同步辐射X射线成像技术

Table 1 Synchrotron radiation X-ray imaging technology for *in situ* cellular imaging of nanoprobe

X射线成像技术	分辨率	制样方法	适用范围及优点	局限性
XRF	≥10 nm	低温冷冻固定或化学固定	(1) 二维或三维成像 (2) 纳米探针和细胞元素分布 (3) 纳米探针和细胞元素定量 (4) 结合XAS分析元素价态变化 (5) XRF探针定位亚细胞结构	(1) 难以校正自吸收效应 (2) 难以直接对细胞形貌成像 (3) 制样方法影响微量元素成像和定量
STXM	≥10 nm	低温冷冻固定或化学固定	(1) 二维或三维成像 (2) 纳米探针元素分布 (3) 对含碳氧氮元素的细胞形貌成像分辨率较高	(1) 三维成像数据收集时间长, 自动对焦或优化扫描路径 (2) 三维重构时考虑辐射剂量避免样品辐射损伤 (3) 制样方法影响成像分辨率
ptychography	≥1 nm	低温冷冻固定或化学固定	(1) 二维或三维成像 (2) 纳米探针和亚细胞结构形貌成像 (3) 超高分辨率 (4) 大视场范围	(1) 三维成像数据收集时间长, 自动对焦或扫描路径优化 (2) 三维重构时考虑辐射剂量避免样品辐射损伤 (3) 制样方法影响成像分辨率

结构中的摄取和分布. Chen等^[37]通过XRF成像研究了HeLa细胞摄取 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TiO}_2$ 纳米复合材料. 在低分辨率大视场下(图1A)观察到HeLa细胞个体摄取NPs水平具有较大差异, 二次制样选定细胞进行高分辨成像(图1B), 发现细胞分裂时NPs会聚集在细胞分裂动力桥处(白色箭头所示). XRF细胞原位成像无法对富含轻元素的细胞结构进行识别, 限制了其应用. STXM在软X射线波段工作时可以在较高分辨率条件下观察细胞结构. Yao等^[31]对摄取 $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$ NPs后的巨噬细胞切片制样, 使用STXM双能对比成像方法和XRF方法对细胞切片中的钆元素分布分别成像(图1C), 其中STXM双能对比成像对细胞核及附近元素成像效果提高, 并且可同时对细胞形貌进行成像.

为进一步提高成像分辨率和扩大视场范围, Guo等^[36]通过ptychography对大尺寸小鼠乳腺癌细胞4T1 ($>60\ \mu\text{m}$)进行成像(图1D), 该方法二维空间分辨率为17 nm, 在无需染色的情况下可识别胞内单颗金纳米颗粒(50 nm), 定量溶酶体中NPs聚集体的颗粒数量, 可清楚观察细胞边缘丝状结构、细胞核等亚细胞结构, 同时该方法扩大了成像视场范围, 可实现NPs在大型哺乳动物细胞中的原位成像.

除了在细胞和亚细胞结构水平成像, 还可以将NPs与抗体偶联, 实现对胞内生物大分子的分布可视化. Yuan等^[38]使用金纳米颗粒偶联抗体标记了肿瘤细胞内表皮生长因子受体EGFR, 并在 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TiO}_2$ NPs表面修饰了靶向EGFR和非靶向的多肽, 使用XRF成

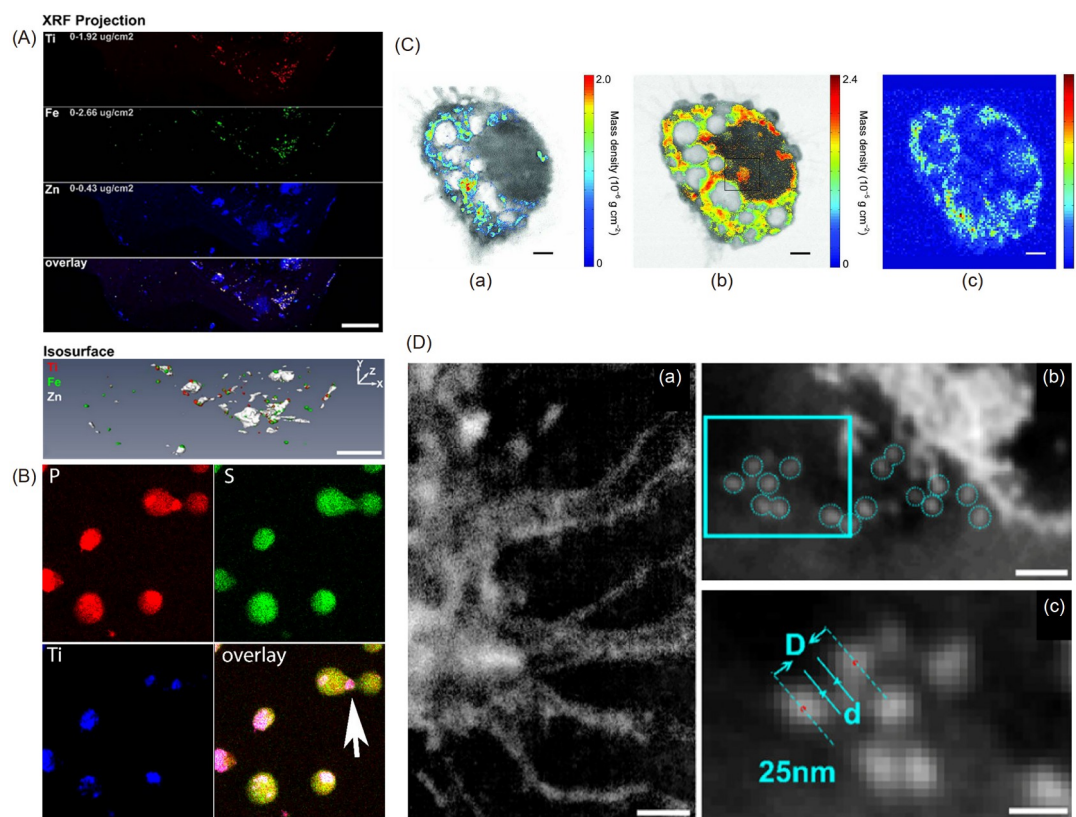


图 1 用于NPs细胞原位成像的X射线成像方法. (A) 低分辨率大视场下样品的2D XRF投影和3D重构; (B) 选择区域高分辨率二次成像细胞中元素分布^[37]; (C) 50 nm厚细胞切片中 $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$ NPs分布, 包括STXM三维重构后NPs分布(左), STXM垂直方向二维投影中NPs分布(中), 和XRF成像细胞切片中钆元素分布(右)^[31]. (D) Ptychography高分辨成像4T1细胞边缘丝状结构(a)和胞内Au NPs (b), 放大后胞内分散的单颗NPs (c)^[38] (网络版彩图)

Figure 1 X-ray imaging methods for NPs *in-situ* cellular imaging. (A) 2D XRF projection under low resolution and large field of view. (B) 3D reconstruction of elements under high resolution in selected regions. Panels A and B adapted with permission from Ref. [37]. (C) The distribution of $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$ NPs in 50 nm cell sections, including the distribution of NPs after STXM 3D reconstruction (left), the distribution of NPs in STXM vertical two-dimensional projection (middle), and the distribution of gadolinium in XRF imaging (right). Adapted with permission from Ref. [31]. (D) Images of cell filamentous structures edge (a) and intracellular Au NPs (b) using Ptychography, and (c) intracellular dispersed single Au NPs. Adapted with permission from Ref. [38]. Copyright 2021 American Chemical Society (color online).

像方法对Au (定位EGFR)、Ti (定位NPs)、Zn (定位细胞核)等元素成像,发现靶向组的三种元素对比非靶向组在分布上有较为明显的重合,表明了X射线成像技术对蛋白或生物大分子、NPs、亚细胞结构同时成像的潜力. X射线成像技术的不同方法优势不同,可选择合适的成像方法实现NPs细胞原位成像.

3.2 NPs亚细胞结构原位成像

NPs亚细胞结构定位成像包括NPs识别和亚细胞结构识别以及确定两者相对位置三个方面. X射线成像技术主要通过表征形貌、识别特征元素两种方式对NPs和亚细胞结构进行区分,结合三维成像重构特征可进一步确定两者空间相对位置,是分析NPs的靶向性和作用位点的基础.

一方面, X射线成像技术可以通过对特征元素成像区分亚细胞结构和纳米颗粒. 细胞中主要元素(P、S、Cl)和微量元素(如K、Ca、Mn、Fe、Cu、Zn、Se、Pb)在不同亚细胞结构的分布具有差异,比如细胞

核中通常Zn、Cu、Ca、Cl元素含量高^[28,39], 线粒体一般富含Mn、Zn元素^[28], 高尔基体中Zn、Cu元素含量较为明显^[40], 细胞结构中P、S元素含量较为丰富^[41], 细胞质中Cl、K通常分布较多^[28,41,42]. 另外, 细胞类型不同或细胞生理状态不同元素分布也有所差异. XRF可对多种元素同时成像, 进而确定NPs和亚细胞结构的相对位置. 本团队^[43]通过XRF技术识别Hf元素和Zn元素, 如图2a所示, 确定了基于七甲基菁染料Hf-HI-4COOH配位聚合物NPs的核靶向性并验证了细胞核耐热性差的特征, 表明靶向肿瘤细胞核的NPs具有温和光热治疗(<50°C)的潜力.

XRF二维特征荧光分布图像获得的是沿整个细胞厚度方向元素信号的总和^[44], 可根据细胞器中元素含量的差异区分不同亚细胞结构, 对于尺寸较大、元素特征明显的细胞核、细胞质可以较好地显示其位置, 但对于分布在三维空间中较小细胞器的轮廓往往难以通过XRF精确绘制(如线粒体和高尔基体), 样品切片后也往往会导致特征荧光信号强度降低而难以识

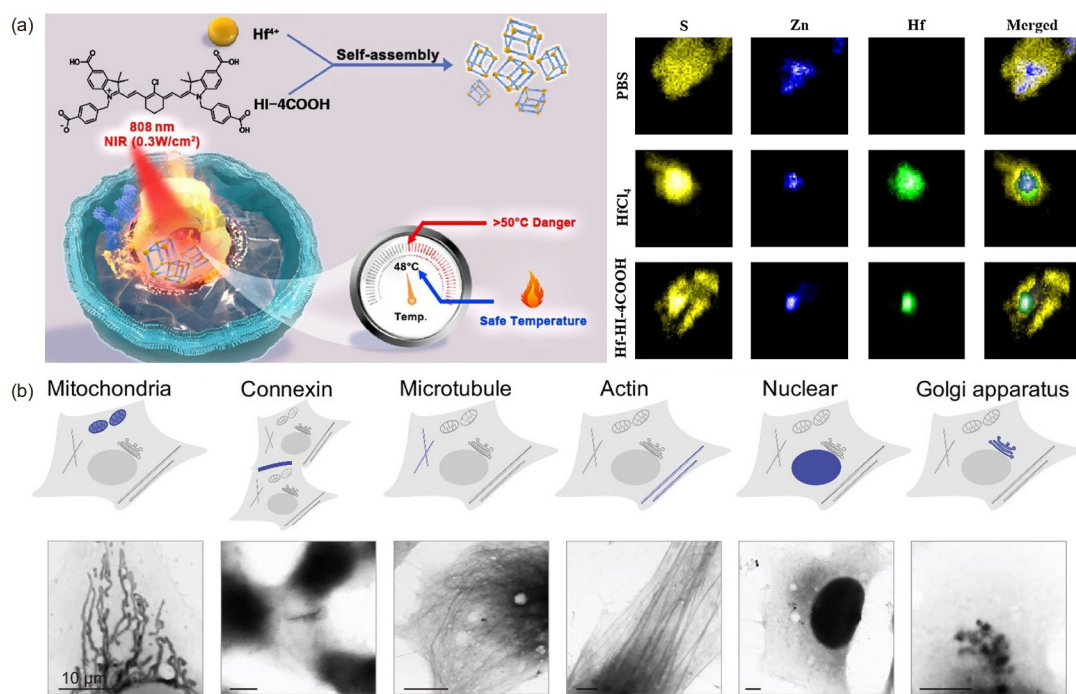


图 2 用于NPs亚细胞结构原位成像的不同X射线成像方法. (a) Hf-HI-4COOH探针合成及核靶向温和光热治疗示意图和XRF成像效果^[43]. (b) 基因转染后酶促聚合物形成, 增强特定亚细胞结构STXM成像对比度^[45] (网络版彩图)

Figure 2 Subcellular structures imaging of NPs using different X-ray imaging methods. (a) Schematic diagram of Hf-HI-4COOH NPs synthesis and nuclear-targeted mild photothermal therapy and the XRF imaging effect of NPs. Adapted with permission from Ref. [43]. Copyright 2023 Elsevier. (b) Enzymatic polymer formation increase after gene transfection to enhance the STXM imaging contrast of specific subcellular structures. Adapted with permission from Ref. [45]. Copyright 2020 Oxford University Press (color online).

别^[31]. XRF在根据天然元素分布差异来识别亚细胞结构方面具有局限性, 可引入靶向亚细胞结构的高原子序数XRF探针, 增强亚细胞结构XRF信号强度. 如McRae等^[40]使用超小Au NPs结合二抗后对线粒体或高尔基体进行标记和识别, 同时对高尔基体XRF探针元素(Au)和生物天然元素(Zn、Fe、Cu、Ca)进行成像, 发现引入Au NPs后高尔基体的成像效果有所提高. 据此, XRF可对NPs (不含XRF探针成像元素)和XRF探针同时特异性成像, 进而确定纳米颗粒在亚细胞结构中的分布, 该方法避免了光漂白、检测灵敏度低、环境因素影响量子产率或发射光谱、不同荧光染料发射波长与激发波长重叠的特异性成像难等问题.

另一方面, X射线成像技术可通过直接观察形貌区分亚细胞结构和NPs. 如ptychography分辨率可达17 nm, 在NPs识别方面具有较大优势. 该方法可从形貌区分细胞核以及NPs聚集的溶酶体和囊泡结构, 但对较小或较复杂的线粒体、高尔基体等其他亚细胞结构较难区分, 难以判定NPs与这些亚细胞结构的相对位置^[36]. 对此, Kong等^[45]开发了一种基因编码的标签系统用于增强特定亚细胞结构(如细胞核、高尔基体、微管、微丝)的成像对比度(图2b), 即通过转染使过氧化物酶高表达, 进一步原位催化3,3'-二氨基联苯胺(DAB)生成聚合物, 该聚合物较其单体对X射线的吸收能力增强, 最终以30 nm的超高分辨率对特定亚细胞结构进行了成像. 该方法可避免外源性探针染色时由于交叉反应导致的较差的特异性, 但尚未见其用于NPs与细胞相互作用研究的报道.

另外, 还可以通过三维成像进一步确定亚细胞结构和NPs相对位置. 由于不同细胞器的化学成分有所差异, 不同细胞器在成像时线性吸收系数具有特异性^[46]. 二维投影重构时可根据这一特性将三维图像分割成具有相似线性吸收系数的亚体区域, 如Jiang等^[34]对较小尺寸的酵母细胞进行了3D重构并识别了酵母细胞的细胞核、内质网、液泡、线粒体等细胞器. Cao等^[47]构建了外周血单核细胞、嗜中性粒细胞、血小板的三维结构, 并确定了细胞核、其他细胞器和MoS₂ NPs的相对位置.

3.3 NPs细胞原位价态分析

NPs被细胞摄入后可能溶解成游离离子、代谢为金属配合物或与其他生物大分子结合, 或者直接被排

出细胞. 分析胞内NPs所含元素的价态变化及生成的代谢产物种类是深入理解NPs细胞原位物理化学反应和研究细胞生理状态变化的基础. X射线成像方法可通过高分辨率形貌成像区分元素的不同氧化态, 或利用XAS光谱学近边缘X射线吸收精细结构(X-ray absorption near edge structure, NEXAFS)光谱, 结合标准物质图谱进行线性组合拟合分析, 确定细胞内代谢物质的种类及对应元素的价态变化情况.

高对比度成像通过衬度不同表示NPs所处不同的氧化态, 如图3a所示, Gallagher-Jones等^[48]通过ptychography方法, 在对比度形态图像中识别胞内Fe₃O₄@SiO₂ NPs中氧化铁纳米核心的两种氧化态(浅灰色壳层为SiO₂, 黑色和白色核心表示核心不同氧化态). 目前通过成像识别NPs氧化态的研究非常有限, 且该研究并未指明图中不同衬度核心对应价态, 元素价态变化主要是结合XAS进行分析. 如Tian等^[49]揭示了Fe₃O₄ NPs在人间充质干细胞中代谢、分布和化学形态的变化过程(图3b), 大部分Fe₃O₄ NPs前三天在胞内化学形态未发生变化, 逐渐被排出细胞, 而Fe₃O₄@SiO₂培养14天后部分转化为铁蛋白(图3c).

3.4 NPs细胞原位定量成像

基于NPs细胞原位定位、亚细胞结构定位、价态变化等研究内容, 对NPs细胞原位定量将有助于获得NPs的细胞摄入量、亚细胞结构分布差异、胞内代谢速率等更丰富的构效信息, 并且往往需要结合多种方法共同成像和分析. 由于细胞体积小, 胞内元素含量低, 不同亚细胞结构中元素含量差异小, XRF检测限低至0.1 ppm量级, 适合用于NPs细胞原位定量成像和分析, 但成像时应注意样品制备过程的合理和规范, 避免定量时因样品处理不同产生较大差异.

XRF可通过成像和根据特征荧光强度确定NPs分布和含量, 但无法区分包含该元素的物质种类. XAS可以用于研究胞内元素价态变化, 确定物质化学结构信息和物质相对变化含量, 但难以直接确定所研究物质的分布情况. XRF结合XAS可用于分析胞内NPs和代谢产物的物理化学变化、含量变化和胞内分布情况, 研究NPs形貌、表面修饰物对溶解速率的影响, 以及生成的代谢产物种类. 如图4a所示, Guo等^[50]量化分析了不同形状银纳米材料(包括纳米盘、纳米球、纳米棒、纳米线)在细胞内的生物转化情况, 发现Ag ND

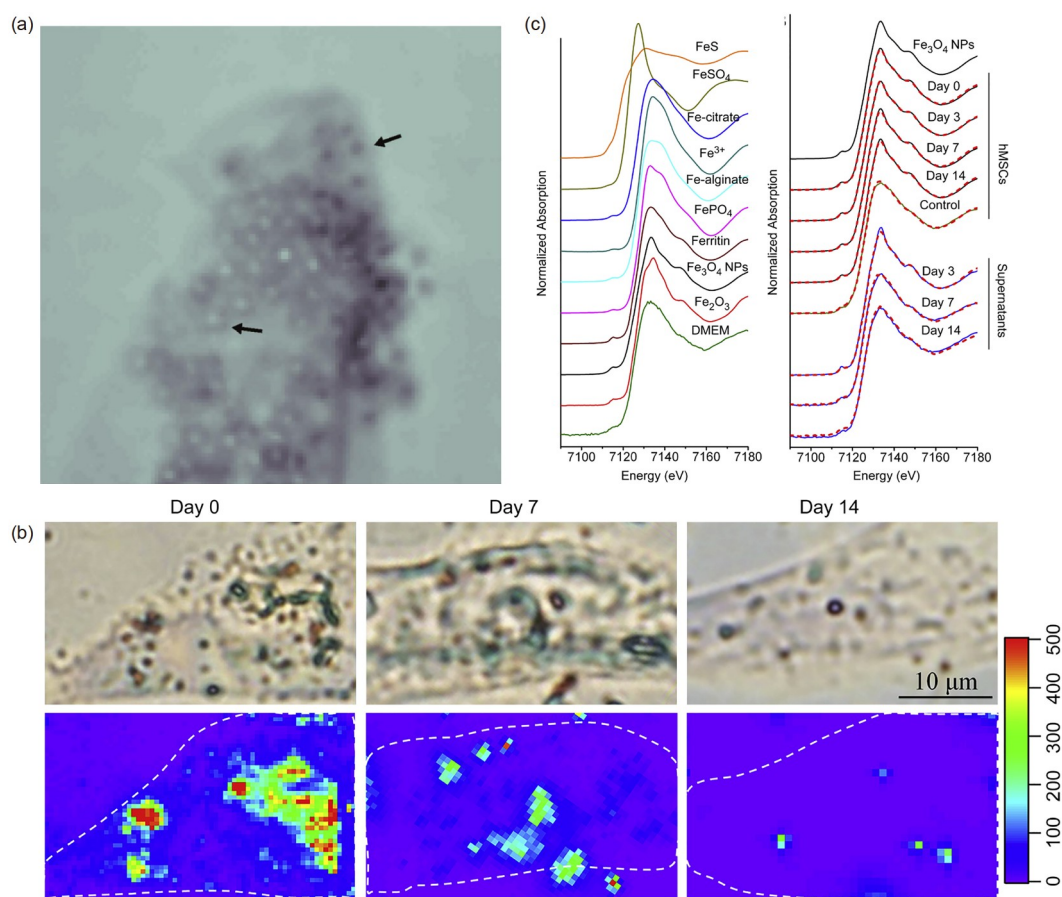


图 3 NPs细胞原位价态分析. (a) 黑色箭头表示的NPs两种不同氧化态(浅色和深色), 浅灰色环形为二氧化硅外壳^[48]. (b) Fe₃O₄ NPs与细胞培养不同时间后细胞中Fe的XRF图像. (c) 不同标准样品Fe的 K-edge XANES光谱(左), 以及NPs孵育不同时间后细胞和上清液中Fe的K-edge XANES光谱(右)^[49] (网络版彩图)

Figure 3 Valence state analysis of NPs in cells. (a) The two different oxidation states of nanoparticles (light and dark) that are indicated by black arrows. The silica shell of the nanoparticles is also visible as a light grey annulus. Adapted with permission from Ref. [48]. Copyright 2017 The Author. (b) XRF mapping of Fe in cells at different culture time. (c) Fe K-edge XANES spectra of Fe-containing references (left), and Fe K-edge XANES spectra of cells and the culture medium supernatants that cultured with fresh media for different times (right). Adapted with permission from Ref. [49]. Copyright 2023 Elsevier (color online).

(纳米盘)在胞内转化效率最高, 经图谱拟合后发现近40%的Ag转化为Ag-半胱氨酸等Ag-硫化合物, 而其他形状的银纳米材料转化效率较低, 在胞内形状并未发生较大改变(图4b). Veronesi等^[51]则确定了相较于聚乙烯吡咯烷酮(PVP), Ag NPs表面修饰柠檬酸盐时胞内溶解速度更快, 摄取48 h后溶解率约77%^[52], 并主要以Ag-金属硫蛋白复合体的形式分布在整个细胞中。

由于成像分辨率较低, XRF结合XAS难以从亚细胞结构水平精确分析NPs代谢情况. 对此, Suárez等^[52]结合XRF和TEM技术, 对Ag NPs进行了细胞原位高分辨率定位成像和低检测限定量分析, 表明Ag NPs首先

在溶酶体中溶解, 以一价银离子的形式移出溶酶体, 并在细胞核中发现含银硫醇盐类物质存在. 并且Suárez等^[44]还测得了Ag NPs溶解后其他亚细胞结构如线粒体内Ag元素浓度平均为280 ppm, 胞质溶胶内为160 ppm, 均大于其在细胞核中的浓度. 对比传统多模态成像方法STXM结合能谱分析中仅溶酶体中显示Ag元素分布, 该方法灵敏度和分辨率都大大提高, 确定了Ag NPs及代谢产物在亚细胞水平上的定量分布。

此外, 定量分析需要注意样品制备过程. X射线成像大部分方法样品制备比较简单, 将细胞在氮化硅基底上固定(冷冻固定或化学固定)后或固定脱水后即可

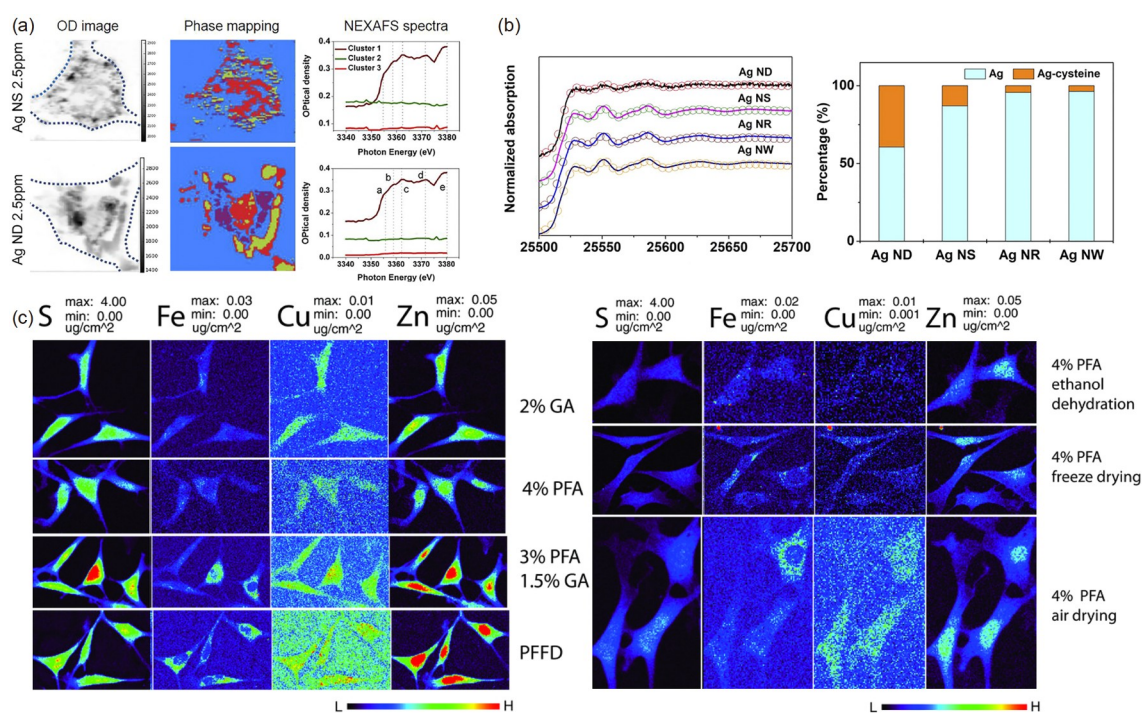


图 4 NPs细胞原位定量成像及制样对元素定量的影响. (a) STXM成像细胞内Ag ND (纳米盘)和Ag NS (纳米颗粒). (b) 细胞的Ag K-edge XANES光谱(左), LCF分析所得Ag组分(右)^[50]. (c) 不同固定方法(左)和不同脱水干燥(右)制备样品后成像^[55] (各元素的XFM元素图像具有相同的最大值和最小值) (网络版彩图)

Figure 4 Quantitative imaging of NPs in cells and sample preparation effects. (a) STXM images of Ag ND and Ag NS in cells. (b) Ag K-edge XANES spectra of cells (left), and the fractions of the Ag species obtained by LCF analysis (right). Panels (a) and (b) adapted with permission from Ref. [50]. (c) The comparison of images by different fixation procedures (left) and different dehydration and drying procedures (right). XFM elemental images for each element are presented with the same maximum and minimum values. Adapted with permission from Ref. [55] (color online).

进行成像^[25,34,48,53,54]. 低温制样尤其是快速冷冻后在低温下成像,可使样本中尽量形成无定形冰,将细胞损伤降至最小,有利于细胞内部精细结构的保持,并最大限度地展示近生理状态下的生物图像. 在胞内元素定量检测时,由于细胞内元素含量较低,不同的制样方法对元素含量检测有较大影响. Jin等^[55]以小鼠胚胎成纤维细胞为例对细胞进行不同处理后,比较胞内元素含量成像区别,表明在多数重要生物元素保存方面,快速冷冻比化学固定效果更好. 必须进行化学固定时,3%多聚甲醛和1.5%戊二醛的组合对S、Fe、Cu、Zn的保存效果较好(图4c),并且化学固定后如需脱水处理,空气干燥比不同浓度乙醇溶液逐级脱水以及冷冻干燥更为合适.

多模成像样品处理时则需要考虑更多因素,如结合TEM成像分析时需要将细胞进行切片,切片厚度需适中,350 nm左右可能较为合适,过厚影响TEM成像分辨率,过薄则影响XRF信号检测^[28]. 另外TEM对生

物样本成像时需要进一步染色操作以增强样品对比度,如OsO₄不仅可以对细胞膜染色,用于区分不同亚细胞结构,同时该染色过程对含Fe、Cu、Ag等金属离子的胞内复合物完整性的保持至关重要^[44]. 但需注意染色试剂中是否含有影响待分析元素的物质,如OsO₄染色时会导致Os与Zn的XRF信号的重叠,检测细胞内Zn元素含量变化时需要使用单宁酸等物质染色,避免该元素含量无法测定^[28]. X射线成像技术制样过程较为简单,但在应用中应结合实际需求,灵活调整制样方法.

3.5 NPs细胞原位三维成像

X射线成像技术可通过收集二维层析数据进行三维重构,确定NPs与细胞和亚细胞结构三维空间的相对位置. 与二维成像类似,三维成像同样要求对大型哺乳动物细胞进行高分辨三维成像. 并且由于三维重构需要多张二维投影数据,成像效率不仅明显降低,

还大大增加了辐射剂量对样品损伤,不利于细胞原位三维重构技术的应用推广。

三维成像通常通过旋转样品台或沿光轴移动等方法收集二维投影数据,利用细胞器特异性线性吸收系数(化学成分不同导致),将图像中具有相似化学成分的亚体区域进行分割,实现包含亚细胞结构和NPs分布特征的细胞三维图像^[54]。大部分X射线成像方法都可以进行三维成像,如图5A所示,Yao等^[31]利用STXM双能对比成像方法实现了巨噬细胞结构和NPs的三维成像,发现NPs仅分布在巨噬细胞吞噬囊泡中,其他细胞器中均未观察到NPs。双能对比成像结合层析成像时,虽然分辨率较高,但样品台每次旋转和能量改变后都需要图像对准和重新聚焦,在多个能量下采集更

加耗时,成像效率大大降低。Ma等^[56]使用了一种扩展到STXM上的新型三维重建方法(图5B),即焦堆成像,通过沿光轴以固定步长移动样品而不旋转,结合双能对比成像采集一系列二维投影,3D重构效率大大提高,但该方法尚未见用于细胞成像的报道。

本团队前期合成了一种表面修饰肿瘤抗原卵清蛋白(OVA)的超小粒径 Fe_3O_4 探针材料(Fe_3O_4 -OVA),并将其用于纳米免疫增强剂激活免疫系统,刺激活化骨髓来源的树突状细胞(BMDCs)并进一步激活巨噬细胞(RAW264.7),进而有效抑制肿瘤肺转移。我们利用软X射线三维成像分析了表面修饰不同含量OVA的 Fe_3O_4 的胞内摄取情况,图5C结果表明, Fe_3O_4 和 Fe_3O_4 -OVA都可以很容易地渗透到两种不同细胞中,进而有效抑

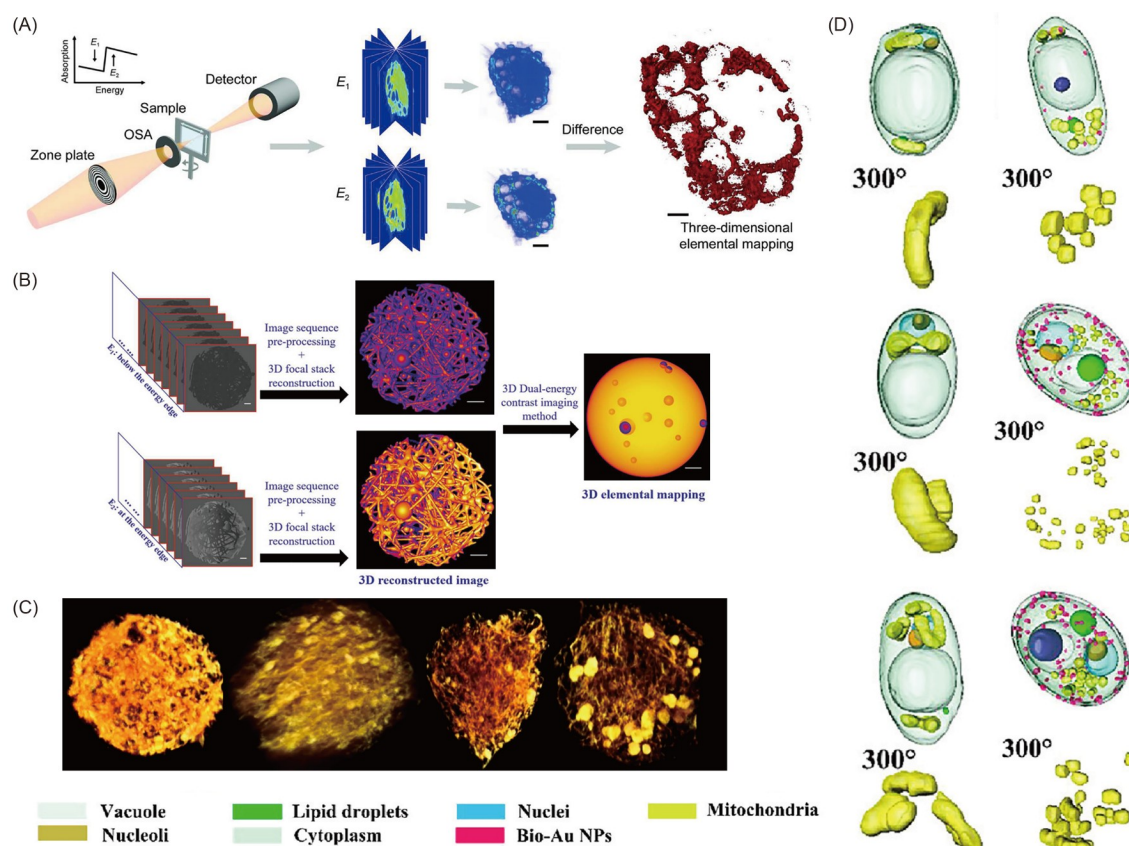


图 5 NPs细胞三维成像。(A) 双能成像技术原理图^[31]。(B) 三维双能焦堆(FS)重建方法示意图^[56]。比例尺: 500 nm。(C) BMDCs与PBS、Fe-O-2、Fe-O-1、 Fe_3O_4 共孵育后细胞软X射线三维图像^[57]。(D) 金离子诱导线粒体(黄色)在数量和超微结构方面的改变(左侧不施加金离子影响)^[49] (网络版彩图)

Figure 5 NPs cell 3D imaging. (A) Schematic layout of the dual-energy imaging technique. Adapted with permission from Ref. [31]. Copyright 2011 Oxford University Press. (B) Schematic layout of the 3D dual-energy focal stacks (FS) reconstruction method. Scale bar: 500 nm. Adapted with permission from Ref. [56]. (C) 3D soft X-ray images of cells after co-incubation of BMDCs with PBS, Fe-O-2, Fe-O-1 and Fe_3O_4 . Adapted with permission from Ref. [57]. (D) Gold ion-induced alterations of mitochondria (yellow) in terms of amount and ultrastructure. Adapted with permission from Ref. [49]. Copyright 2023 American Chemical Society (color online).

制皮下和转移瘤的形成^[57]。此外, Dang等^[25]使用低温软X射线断层成像(cryogenic soft X-ray tomography, cryo-SXT)对酵母细胞中生物源金属聚集体分布和亚细胞结构形貌进行了高分辨三维成像(图5D), 观察到Au离子环境下酵母细胞中细胞器稳态破坏, 包括液泡扭曲折叠、线粒体断裂、脂滴极度膨胀、大量囊泡形成, 以及Au纳米颗粒的胞内形成, 确定了Au离子和Au纳米颗粒两种物质与细胞间的相互作用。cryo-SXT是一种无需任何化学预处理在近生理条件下成像的方法, 该方法空间分辨率高、灵敏度和穿透性良好, 能够快速重构三维细胞超微结构。

另外需要注意的是, 三维成像中收集二维投影数据时样品偶尔会产生无法消除的损伤或伪影, 该现象可能是辐射剂量较大损伤样品, 或者长时间数据收集过程中细胞内发生相对小的运动导致。为保证成像质量, 一方面需要通过控制辐射剂量以减少样品的辐射损伤^[58]; 另一方面, 在采集过程中, 特别是使用高分辨技术进行长时间数据采集时, 成像前需进行合适的固定, 包括化学固定和低温固定, 化学固定可能对细胞精细结构或内容物造成损伤, 采用快速冷冻固定可以保留细胞结构的完整性和生物大分子的稳定性^[59]。

4 总结与展望

本文总结了用于NPs细胞原位成像的主要同步辐射X射线成像方法, 并从NPs细胞原位二维和三维分布、亚细胞结构分布、胞内NPs价态变化和定量分析

等方面对不同成像方法的研究进展进行了总结, 有助于深入理解NPs的细胞内代谢过程与构效关系, 为进一步设计具有生物医学功能的NPs以及实现其临床应用奠定了生物学基础。

在多种成像方法中, (1) 二维形貌成像方面, 逐步向大视场、高分辨率方向发展, 目前ptychography已达到对大型哺乳动物细胞内单颗纳米粒子识别的效果; (2) NPs亚细胞结构定位方面, 主要通过识别亚细胞结构和NPs的形貌、元素分布, 或结合两者三维相对位置进行定位, 发展了多种X射线探针以实现亚细胞结构(乃至胞内大分子物质)和元素的成像识别; (3) 胞内NPs价态变化分析方面, 大部分研究主要通过结合XAS, 利用标准物质XAS图谱拟合分析代谢产物种类及元素价态变化情况; (4) NPs胞内定量方面, XRF或STXM结合XAS可分析NPs胞内物理化学变化, 进一步确定NPs的代谢产物及代谢速率等信息, 但该过程需注意样品制备过程的优化和标准化; (5) 三维成像方面, 要求对亚细胞结构的高分辨识别和三维结构快速重构, 目前通过cryo-SXT可实现, 但成像时需注意辐射剂量和样品制备等问题。

同步辐射X射线成像技术具有高灵敏度、多元素探测、样品制备简便、无损分析、适于含水生物样品检测、无需真空环境等优势, 已成为研究NPs材料与生物体系相互作用的重要手段, 同步辐射光源的进一步发展^[60]有助于深刻理解分析NPs的生物学效应, 进而拓宽同步辐射X射线成像技术在生物医学领域的应用范围。

致谢 感谢国家同步辐射实验室软X射线成像线站(2021-HLS-PT-004282)和上海光源硬X射线微聚焦线站BL15U(2018-SSRFZD-000182)的支持

参考文献

- 1 Zheng R, Zhang S, Sun K. *Chin J Oncol*, 2023, 45: 212–220 (in Chinese) [郑荣寿, 张思维, 孙可欣. 中华肿瘤杂志, 2023, 45: 212–220]
- 2 Yao C, Yang F, Sun L, Ma Y, Stanciu SG, Li Z, Liu C, Akakuru OU, Xu L, Hampp N, Lu H, Wu A. *Nano Today*, 2020, 35: 100967
- 3 Jiang Z, Yuan B, Qiu N, Wang Y, Sun L, Wei Z, Li Y, Zheng J, Jin Y, Li Y, Du S, Li J, Wu A. *Nano-Micro Lett*, 2019, 11: 61
- 4 Tang T, Chang B, Zhang M, Sun T. *Nanoscale Horiz*, 2021, 6: 634–650
- 5 Shen C, Jiang T, Lou Q, Zhao W, Lv C, Zheng G, Liu H, Li P, Dai L, Liu K, Zang J, Wang F, Dong L, Qu S, Cheng Z, Shan C. *SmartMat*, 2022, 3: 269–285
- 6 Garcés M, Cáceres L, Chiappetta D, Magnani N, Evelson P. *New J Chem*, 2021, 45: 14328–14344
- 7 Sun Z, Jiang Y, Stenzel M. *SmartMat*, 2021, 2: 127–130
- 8 Gao Y, Zhai H, She X, Si H. *Curr Topics Med Chem*, 2020, 20: 2506–2517

- 9 Hohagen M, Guggenberger P, Kiss E, Kählig H, Marko D, Del Favero G, Kleitz F. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 623: 962–973
- 10 Brandelli A. *Food Sci Hum Wellness*, 2020, 9: 8–20
- 11 Gehr P. *Colloids Surfs B-Biointerfaces*, 2018, 172: 395–399
- 12 Guo B, Liu G, Wei H, Qiu J, Zhuang J, Zhang X, Zheng M, Li W, Zhang H, Hu C, Lei B, Liu Y. *SmartMat*, 2022, 3: 208–225
- 13 Vtyurina N, Åberg C, Salvati A. *Nanoscale*, 2021, 13: 10436–10446
- 14 Niu F, Wang DC, Lu J, Wu W, Wang X. *J Cell Mol Med*, 2016, 20: 1789–1795
- 15 He K, Shokuhfar T, Shahbazian-Yassar R. *J Phys-Condens Matter*, 2019, 31: 103001
- 16 Cao M, Zhang K, Zhang S, Wang Y, Chen C. *ACS Cent Sci*, 2022, 8: 1063–1080
- 17 Manaph N P A, Ltaief SM, Nour-Eldine W, Ponraj J, Agcaoili J, Mansour S, Al-Shammari AR. *Micron*, 2023, 173: 103517
- 18 Hickey SM, Ung B, Bader C, Brooks R, Lazniewska J, Johnson IRD, Sorvina A, Logan J, Martini C, Moore CR, Karageorgos L, Sweetman MJ, Brooks DA. *Cells*, 2021, 11: 35
- 19 Zhang J, Jia Y, Xing X, Qin M, Wu Z, Zhong Y, Liu L, Sun S, Li P, Wang H, Zhao G. *SmartMat*, 2021, 2: 554–566
- 20 Lai B, Maser J, Vogt S, Cai Z, Legnini D. *Microsc Microanal*, 2003, 9: 1482–1483
- 21 Chen C, Li YF, Qu Y, Chai Z, Zhao Y. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 8266–8303
- 22 Foroozandeh P, Aziz AA. *Nanoscale Res Lett*, 2018, 13: 1–2
- 23 Wang G, Huang P, Wang L, Chen X, Zhou Y, Huang W, Yan D. *SmartMat*, 2022, 3: 522–531
- 24 Zhang XQ, Xu X, Bertrand N, Pridgen E, Swami A, Farokhzad OC. *Adv Drug Deliver Rev*, 2012, 64: 1363–1384
- 25 Dang Z, Tao X Y, Guan Y, Wu Z, Xiong Y, Liu G, Tian Y, Tian L-J. *ACS Nano*, 2023, 17: 9069–9081
- 26 Ma L D, Yang F J. *Introduction to Synchronous Radiation Applications*. Shanghai: Fudan University Press, 2001. 202 (in Chinese) [马礼敦, 杨福家. 同步辐射应用概论. 上海: 复旦大学出版社, 2001. 202]
- 27 Schanne G, Henry L, Ong HC, Sonogyi A, Medjoubi K, Delsuc N, Policar C, Garcia F, Bertrand HC. *Inorg Chem Front*, 2021, 8: 3905–3915
- 28 Kashiv Y, Austin Li JR, Lai B, Rose V, Vogt S, El-Muayed M. *Sci Rep*, 2016, 6: 21437
- 29 Chao W, Kim J, Rekawa S, Fischer P, Anderson EH. *Opt Express*, 2009, 17: 17669–17677
- 30 Maser , Osanna , Wang , Jacobsen , Kirz , Spector , Winn , Tennant . *J Microsc*, 2000, 197: 68–79
- 31 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
- 32 McDermott G, Fox DM, Epperly L, Wetzler M, Barron AE, Le Gros MA, Larabell CA. *BioEssays*, 2012, 34: 320–327
- 33 Endrizzi M. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect A*, 2018, 878: 88–98
- 34 Jiang H, Song C, Chen CC, Xu R, Raines KS, Fahimian BP, Lu CH, Lee TK, Nakashima A, Urano J, Ishikawa T, Tamanoi F, Miao J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 11234–11239
- 35 Miao J, Ishikawa T, Robinson IK, Murnane MM. *Science*, 2015, 348: 530–535
- 36 Guo A, Zhang J, Wang Y, Fan J, He B, Wang J, Tai R, Liang XJ, Jiang H. *Anal Chem*, 2021, 93: 5201–5210
- 37 Chen S, Lastra RO, Paunesku T, Antipova O, Li L, Deng J, Luo Y, Wanzer MB, Popovic J, Li Y, Glasco AD, Jacobsen C, Vogt S, Woloschak GE. *Cancers*, 2021, 13: 4497
- 38 Yuan Y, Chen S, Paunesku T, Gleber SC, Liu WC, Doty CB, Mak R, Deng J, Jin Q, Lai B, Brister K, Flachenecker C, Jacobsen C, Vogt S, Woloschak GE. *ACS Nano*, 2013, 7: 10502–10517
- 39 Sanchez-Cano C, Romero-Canelón I, Yang Y, Hands-Portman IJ, Bohic S, Cloetens P, Sadler PJ. *Chem Eur J*, 2017, 23: 2512–2516
- 40 McRae R, Lai B, Vogt S, Fahrni CJ. *J Struct Biol*, 2006, 155: 22–29
- 41 De Samber B, De Rycke R, De Bruyne M, Kienhuis M, Sandblad L, Bohic S, Cloetens P, Urban C, Polerecky L, Vincze L. *Anal Chim Acta*, 2020, 1106: 22–32
- 42 Fus F, Yang Y, Lee HZS, Top S, Carriere M, Bouron A, Pacureanu A, da Silva JC, Salmain M, Vessièrès A, Cloetens P, Jaouen G, Bohic S. *Angew Chem*, 2019, 131: 3499–3503
- 43 Jiang Z, Yuan B, Wang Y, Wei Z, Sun S, Akakuru OU, Li Y, Li J, Wu A. *Nano Today*, 2020, 34: 100910
- 44 Suárez V T, Gallet B, Chevallet M, Jouneau PH, Tucoulou R, Veronesi G, Deniaud A. *J Struct Biol*, 2021, 213: 107766
- 45 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
- 46 Zhang C, Wu Z, Dang Z, Tian L, Guan Y, Liu G, Tian Y. *Micromachines*, 2023, 14: 326

- 47 Cao M, Cai R, Zhao L, Guo M, Wang L, Wang Y, Zhang L, Wang X, Yao H, Xie C, Cong Y, Guan Y, Tao X, Wang Y, Xu S, Liu Y, Zhao Y, Chen C. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 708–716
- 48 Gallagher-Jones M, Dias CSB, Pryor Jr. A, Bouchmella K, Zhao L, Lo YH, Cardoso MB, Shapiro D, Rodriguez J, Miao J. *Sci Rep*, 2017, 7: 4757
- 49 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
- 50 Guo Z, Zhang P, Chakraborty S, Chetwynd AJ, Abdolapur Monikh F, Stark C, Ali-Boucetta H, Wilson S, Lynch I, Valsami-Jones E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2105245118
- 51 Veronesi G, Deniaud A, Gallon T, Jouneau PH, Villanova J, Delangle P, Carrière M, Kieffer I, Charbonnier P, Mintz E, Michaud-Soret I. *Nanoscale*, 2016, 8: 17012–17021
- 52 Suárez V T, Karepina E, Chevallet M, Gallet B, Cottet-Rousselle C, Charbonnier P, Moriscot C, Michaud-Soret I, Bal W, Fuchs A, Tucoulou R, Jouneau PH, Veronesi G, Deniaud A. *Environ Sci-Nano*, 2020, 7: 1373–1387
- 53 Kimura T, Takeo Y, Sakurai K, Furuya N, Egawa S, Yamaguchi G, Matsuzawa Y, Kume T, Mimura H, Shimura M, Ohashi H, Matsuda I, Harada Y. *Opt Express*, 2022, 30: 26220–26228
- 54 Deng J, Lo YH, Gallagher-Jones M, Chen S, Pryor Jr A, Jin Q, Hong YP, Nashed YSG, Vogt S, Miao J, Jacobsen C. *Sci Adv*, 2018, 4: eaau4548
- 55 Jin Q, Paunesku T, Lai B, Gleber S, Chen SI, Finney L, Vine D, Vogt S, Woloschak G, Jacobsen C. *J Microsc*, 2017, 265: 81–93
- 56 Ma L, Xu Z, Guo Z, Watts B, Lin J, Zhang X, Tai R. *J Synchrotron Rad*, 2021, 28: 924–929
- 57 Luo L, Iqbal MZ, Liu C, Xing J, Akakuru OU, Fang Q, Li Z, Dai Y, Li A, Guan Y, Wu A. *Biomaterials*, 2019, 223: 119464
- 58 Lühl L, Andrianov K, Dierks H, Haidl A, Dehlinger A, Heine M, Heeren J, Nisius T, Wilhein T, Kanngießer B. *J Synchrotron Rad*, 2019, 26: 430–438
- 59 Yang Y, Bohic S, Fus F, Pacureanu A, da Silva JC, Salome M, Cloetens P. *Microsc Microanal*, 2018, 24: 402–403
- 60 Sayers Z, Avşar B, Cholak E, Karmous I. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2017, 1861: 3671–3685

Application of synchrotron X-ray imaging technology in cellular imaging of nanoprobe

Jinru Han^{1,2}, Wenzhi Ren^{1,3*}, Jie Lin^{1,3}, Aiguo Wu^{1,3*}

¹ Ningbo Key Laboratory of Biomedical Imaging Probe Materials and Technology, Zhejiang International Cooperation Base of Biomedical Materials Technology and Application, Chinese Academy of Sciences (CAS) Key Laboratory of Magnetic Materials and Devices, Ningbo Cixi Institute of Biomedical Engineering, Zhejiang Engineering Research Center for Biomedical Materials, Ningbo Institute of Materials Technology and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315201, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

³ Advanced Energy Science and Technology Guangdong Laboratory, Huizhou 516000, China

*Corresponding authors (email: renwzh@nimte.ac.cn; aiguo@nimte.ac.cn)

Abstract: Nanoprobes hold significant potential for highly sensitive tumor imaging and efficient therapeutic visualization. Cellular *in-situ* imaging techniques can reveal the interactions between nanoprobes and cells, thus establishing a biological basis for their clinical applications. Synchrotron X-ray imaging technology emerges as a pivotal method for investigating the nanoprobes' cellular *in-situ* uptake, metabolism, and structure-function relationships. This review systematically summarizes the research progress in *in-situ* cellular imaging of nanoprobes using synchrotron radiation-based X-ray imaging techniques. It encompasses nanoprobes' cellular *in-situ* imaging, subcellular structural *in-situ* imaging, *in-situ* cellular oxidation state analysis, *in-situ* cellular quantitative imaging, and *in-situ* cellular three-dimensional imaging. Moreover, this review discusses the future development trends in X-ray imaging technology applicable to cellular imaging of nanoprobes.

Keywords: nanoprobes, cell imaging, X-ray imaging, synchrotron radiation

doi: [10.1360/SSC-2023-0109](https://doi.org/10.1360/SSC-2023-0109)