中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2026, 48(4): 952–962
DOI: 10.11844/cjcb.2026.04.0003
CSTR: 32200.14.cjcb.2026.04.0003



吴清清, 中国科学技术大学生命科学与医学部特任研究员、博士生导师, 中国科学技术大学附属第一医院血液和细胞治疗研究所特任研究员。聚焦于利用激光共聚焦显微成像技术等, 解析生理及病理状态下骨髓造血结构变化规律与微环境调控机制。主要工作有: (1) 绘制了从髓系祖细胞到成熟粒/单核–树突状细胞的髓系造血分化空间图, 并揭示了骨髓特异性调控树突状细胞分化的血管结构及分子机理(*Nature*, 2021); (2) 建立了能够对骨髓造血进行系统性成像研究的新方法, 系统性描述了稳态下骨髓造血的组织结构特征与细胞分化行为规律, 并揭示了在失血、感染、G-CSF动员和衰老等情况下, 机体不同骨骼部位骨髓造血结构的变化规律及异质性(*Nature*, 2024)。
https://biomed.ustc.edu.cn/2023/0614/c31899a605938/page.htm

骨髓造血结构成像研究进展

张玉磊[#] 黄冰[#] 吴清清*
(中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230026)

摘要 骨髓作为维持终身造血的核心器官, 其功能精确地受控于一个由多种细胞和分子信号构成的三维微环境, 即造血生态位(niche)。然而, 骨髓深藏于不透明的骨骼内, 这一特点长期以来形成巨大技术壁垒, 阻碍了对其结构与功能的深入解析。近二十年来, 先进荧光显微成像技术的飞跃式发展, 特别是激光共聚焦显微成像、双/多光子活体成像以及光片显微镜等技术的相继应用, 极大地推动了该领域的认知突破。这些技术将人们对骨髓的观察维度从二维静态切片层面, 拓展至三维解剖结构、四维实时动态乃至全器官宏观尺度。该综述旨在系统梳理这一技术演进的历程, 重点阐述各类成像技术如何揭示骨髓造血生态位的细胞异质性、空间组织规律及其在稳态、衰老和疾病中的动态调控机制, 并展望未来多模态技术融合的研究前景。

关键词 骨髓; 造血生态位; 三维成像; 空间异质性; 多模态成像

Recent Advances in Imaging the Structural Organization of Bone Marrow Hematopoiesis

ZHANG Yulei[#], HUANG Bing[#], WU Qingqing*
(*Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China*)

Abstract As the central organ sustaining lifelong hematopoiesis, the bone marrow operates under the precise control of a complex three-dimensional microenvironment composed of diverse cell types and molecular signals—collectively known as the hematopoietic niche. However, its location deep within opaque bone structures

收稿日期: 2025-10-24 接受日期: 2025-12-11
国家自然科学基金面上项目(批准号: 82470114)资助的课题
[#]共同第一作者
*通信作者。Tel: 0551-63601396, E-mail: Wuqingqing@ustc.edu.cn
Received: October 24, 2025 Accepted: December 11, 2025
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82470114)
[#]These authors contributed equally to this work
*Corresponding author. Tel: +86-551-63601396, E-mail: Wuqingqing@ustc.edu.cn

has long posed a major technical barrier to visualizing its architecture and understanding its dynamic functions. Over the past two decades, rapid advances in fluorescence microscopy—particularly the advent of confocal, two-photon and multiphoton intravital imaging, and light-sheet microscopy—have driven a conceptual revolution in bone marrow research. These technologies have enabled a transition from two-dimensional static histology to three-dimensional structural reconstruction, four-dimensional real-time dynamic imaging, and even whole-organ mapping. This review systematically outlines the evolution of these imaging technologies and highlights how they have uncovered the cellular heterogeneity, spatial organization, and dynamic regulation of the bone marrow niche in homeostasis, aging, and disease. Finally, this review discusses emerging opportunities offered by multimodal and integrative imaging approaches to achieve a holistic understanding of bone marrow structure and function.

Keywords bone marrow; hematopoietic niche; three-dimensional imaging; spatial heterogeneity; multimodal imaging

骨髓是成年哺乳动物最主要的造血器官, 其持续生成功能健全的血细胞是维持机体免疫监视、组织修复与气体交换等基本生理功能的先决条件。这一过程由造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)主导, 并受到其所处微环境——造血干细胞生态位(niche)的严密调控[1-2]。对骨髓空间结构的研究可追溯至17世纪, 早期显微镜观察揭示了血液中存在红色和白色“小体”, 这一发现构成人类对红细胞和白细胞的最初形态学认知。随后, 德国科学家EHRLICH借助革命性的苯胺染料染色技术进一步阐明血液由多种细胞成分构成, 奠定了现代血液形态学分类的基础[3]。1868年, 德国病理学家NEUMANN和意大利医生BIZZOZERO通过对骨髓的观察, 提出血细胞起源于骨髓, 并推测存在一种可分化为各类血细胞的祖细胞[4], 为证实后续HSCs的存在奠定了理论基础。此后, 研究逐渐聚焦于HSCs与其造血生态位的相互作用。体外共培养实验证实基质细胞对造血过程具有关键支持作用, 提示体内存在特定的功能单元维持这一过程[5]。19世纪末, 吉姆萨染色法(Giemsa stain)和瑞氏染色法(Wright's stain)的应用使得在骨髓涂片中识别巨核细胞(megakaryocytes)、脂肪细胞(adipocytes)及各阶段血细胞成为可能[6]。石蜡切片技术则提供了骨髓组织的二维静态结构基础图像, 首次使研究者能够在保留组织完整性的前提下观察细胞间的空间关系。研究者通过观察石蜡切片, 描述了以巨噬细胞为核心、周围环绕不同发育阶段血细胞的“造血岛(hematopoietic islands)”, 初步揭示了造血过程并非随机进行, 而是以功能单元的形式进行有序组织和调控[7]。电子显微镜(electron microscope)将观察分辨率提升至亚细胞纳米尺度, 揭示了骨髓内的窦状血管(sinusoids)由连续内皮细胞和不完整基底膜构成, 并清晰地展现了新生血细胞穿越血管屏障(即通过内皮细胞的瞬间通道)进入循环的过程[8]。这些早期的形态学发现共同初步构建了人们对骨髓结构和功能模式的基础认知: 窦状血管是成熟血细胞释放的关键物理通道, 而基质细胞(包括巨噬细胞等)通过物理接触和分泌因子, 对造血过程进行主动调控。

然而, 二维切片是对复杂三维组织结构的平面投影, 无法完整、准确地还原骨髓内高度复杂的三维血管网络结构, 以及细胞和基质的真实空间排列。该方法也无法精准确定造血干细胞(HSCs)相对于骨髓内关键支持细胞(如血管周细胞、内皮细胞、骨细胞等)的真实空间定位和邻近关系, 导致对造血生态位的真实形态认知不足。同时, 这种“静态”成像只能提供时间快照, 难以动态追踪造血细胞在生理或病理状态下的关键生命过程, 例如干细胞的归巢、迁移和分裂等。缺乏对细胞实时行为的观察, 使得研究者难以捕捉造血细胞与微环境细胞之间的动态互作过程, 从而限制了对造血生态位结构和调控机制的深入理解。直至先进荧光显微技术的出现, 这一瓶颈才得以突破, 从而推动骨髓结构与功能研究迈入新时代。

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)凭借其卓越的光学切片能力和多色荧光成像优势, 率先将骨髓研究推进了三维观测层面。将荧光报告小鼠和特异性抗体标记相结合, LSCM实现了在保留组织完整性的前提下, 对特定细胞群体的高分辨率三维定位, 为深入研究细胞间

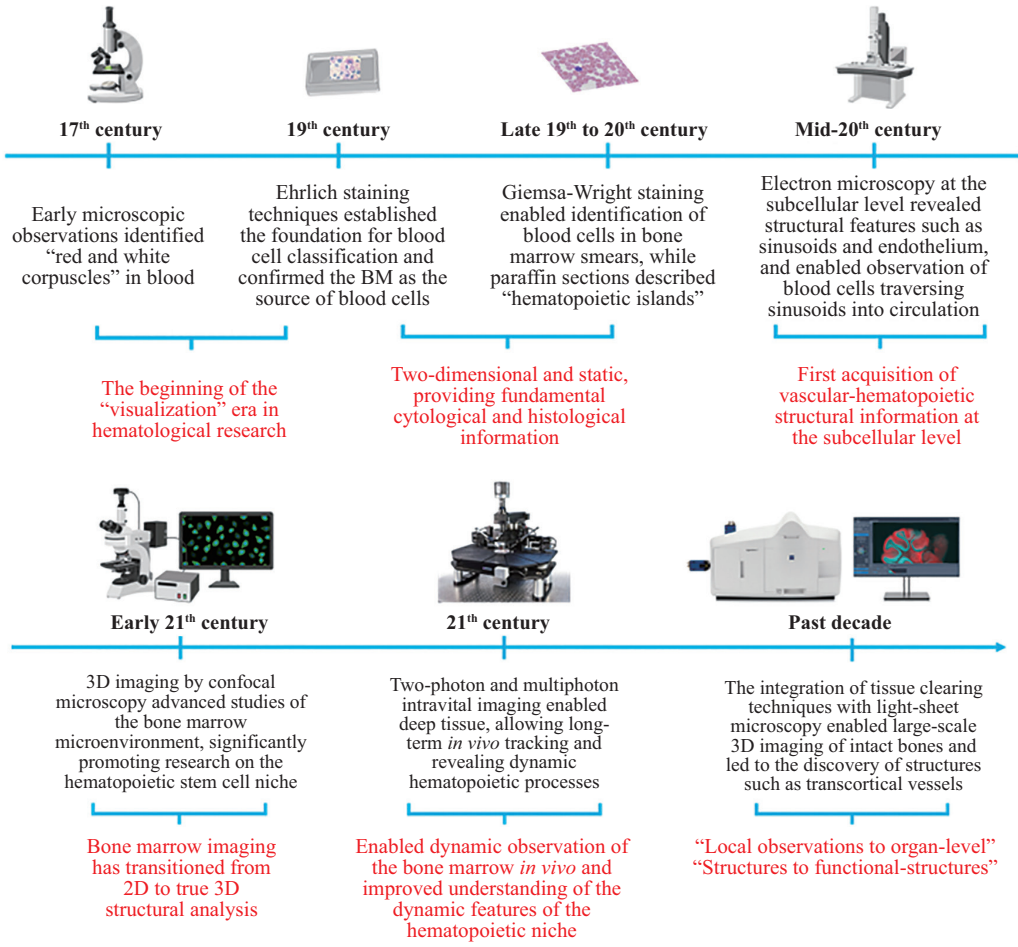


图1 造血系统成像研究发展脉络示意图

Fig.1 Hematopoietic imaging research timeline

的相互作用提供了有力工具[9]。双光子激发显微镜(two-photon excitation microscopy, 2PM)和多光子激发显微镜(multiphoton excitation microscopy, MPM)则利用近红外长波长激光激发，获得了深度穿透(>150 μm)和低光损伤的独特优势，能够对活体动物颅顶骨或股骨开窗区域的骨髓进行长达数小时乃至数日的实时成像，从而动态观察细胞行为和微环境变化[10-11]。组织透明化(tissue clearing)与光片荧光显微镜(light sheet fluorescence microscopy, LSFM)的协同应用，则为获得全器官尺度的宏观认知提供了关键技术。该策略首先将整根骨骼处理成光学透明的样本，以最大程度地减少光散射，再利用LSFM极快的成像速度和全局照明的优势，进行全景三维扫描，从而在整体水平上解析骨髓的结构和功能。这一"宏观成像"方法带来了许多颠覆性的解剖学发现，例如跨皮质血管(transcortical vessels, TCVs)的发现[12]。

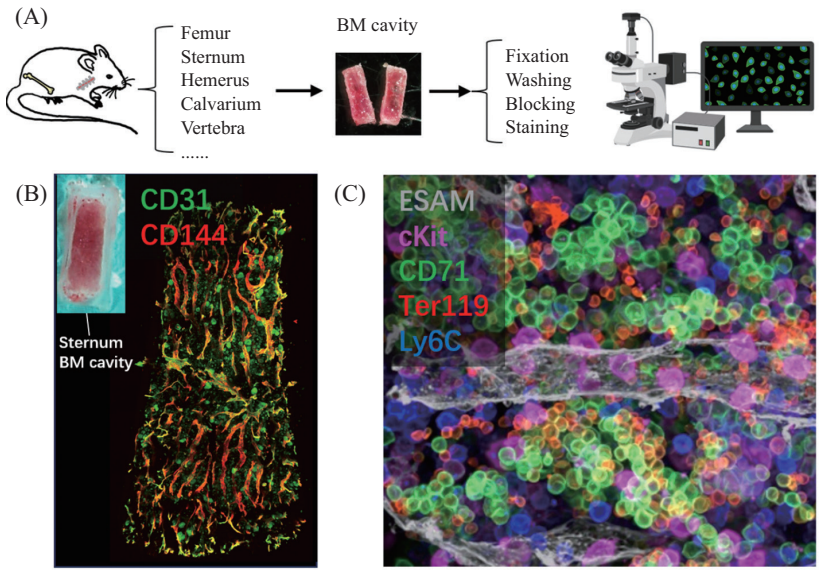
本文对以骨髓与造血研究为主的成像研究发展脉络进行简要总结(图1)，并将着重介绍当前应用于解析骨髓造血结构与功能的主要光学成像方法，包括激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)、双/多光子激发显微镜(2PM/MPM)以及组织透明化与光片荧光显微镜(LSFM)等技术。另外，本文将探讨这些方法在揭示骨髓微环境的细胞异质性、空间组织及其复杂动态调控机制方面的作用。

1 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)成像技术

为了能够在保留组织结构完整性的前提下解析细胞的时空分布特征，显微成像技术成为研究骨髓微环境的重要工具。传统的光学显微镜采用场光源，其成像容易受到邻近点荧光信号的干扰，导致图像边缘不清晰[13]。而激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)通过激光束经照明针孔形成点光源，对样本焦平面的每一点进行扫描，激发样本中的荧光分子。荧光经分色镜聚焦于检测针孔，该针孔确保只有焦平面

发出的荧光能被检测器捕获, 来自焦平面上下方的荧光则被阻挡, 从而实现对焦平面的区分并显著提升*z*轴的分辨率[9]。LSCM具有高对比度、高分辨率和高灵敏度的特点, 能够同时观测多重荧光, 并可通过获取一系列光学切片构建三维图像。1987年, Bio-Rad公司推出了世界上第一台商业化的共聚焦显微镜MRC-500。随后, 在20世纪90年代, Leica、Zeiss等公司相继推出新型共聚焦显微镜, 如Leica TCS系列, 在其中引入了声光调制器和高速扫描技术, 显著提升了成像速度和分辨率。这一技术进步使得LSCM在生物荧光成像中更加高效, 尤其在骨髓研究中得到了广泛应用。LSCM在骨髓微环境研究中的应用具有显著优势。首先, 其高分辨率和高对比度使得研究者能够清晰地观察到骨髓中不同类型细胞的空间分布与相互作用[14]。例如, LSCM可以精确地定位HSCs在骨髓微环境中的位置, 并追踪其在分化过程中的动态变化。其次, LSCM的多重荧光成像能力使得研究者能够同时标记和分析多种细胞类型及其分子标志物, 从而更全面地理解骨髓微环境的复杂性[15]。此外, 通过获取一系列光学切片, LSCM能够重建骨髓组织的三维结构, 为研究骨髓微环境的立体结构提供重要工具。例如, 本课题组利用LSCM结合原位荧光标记或转基因报告小鼠, 实现了对小鼠股骨、胸骨、肱骨、颅盖骨和脊柱骨等多种骨组织中骨髓干、祖细胞和主要谱系造血细胞以及血管等微环境结构的三维高分辨率成像, 为解析骨髓造血立体组织构架提供了关键信息, 同时也为后续多模态成像研究提供了重要基础[16-17](图2)。

近二十年来, 我们对骨髓微环境的认知经历了一场从“均质支持基质”到“高度结构化动态生态系统”的范式革命。这场革命的核心驱动力是LSCM技术的不断进步, 它与多重荧光染色及荧光报告小鼠模型相结合, 使我们能够前所未有地深入探索骨髓的复杂空间结构, 为理解造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)的生命活动及其在衰老和疾病中的变化提供了坚实的视觉证据。随着淋巴细胞活化信号分子家族(signaling lymphocytic activation molecule family, SLAMF)等HSPC特异性标记物的不断发现[16-21], 以及共聚焦成像技术的日益精进, 我们对造血生态位的理解得以不断更新与深化。研究表明, HSCs并非仅局限于传统的骨内膜(endosteal)区域, 而是广泛分布于血管周围(perivascular)区域, 尤其是窦状血管周围[19,21-22]。其中一项出色的研究应用了新型的骨髓光学透明化技术和造血干细胞(HSCs)荧光报告小鼠模型, 实现了对厚达600 μm骨髓样本的深度三维成像, 发现了骨髓中绝



A: 利用激光扫描共聚焦显微镜进行骨髓成像流程图; B: 通过激光扫描共聚焦显微镜显示小鼠胸骨血管网络结构; C: 激光扫描共聚焦显微镜显示小鼠骨髓内红系造血细胞在窦状血管周围分布。

A: workflow of bone marrow imaging using LSCM; B: visualization of the vascular network structure in the mouse sternum using LSCM; C: imaging with LSCM reveals erythroid hematopoietic cells around sinusoids in the mouse bone marrow.

图2 利用激光扫描共聚焦显微镜进行骨髓成像

Fig.2 Bone marrow imaging by LSCM

大多数(约85%) HSCs, 无论是处于分裂期(Ki-67$^+$)还是静止期(Ki-67$^-$), 都主要定位在窦状血管周围(距离<10 μm)[19]。这一发现在一定程度上挑战了过去认为静息态HSCs与活化状态的HSCs占据不同空间生态位的经典假说, 表明了窦状血管周围是一个功能异质性的、整合的HSCs生态位。HSCs向各血细胞谱系分化的过程同样在血管周围进行。我们近期建立的免疫荧光成像策略, 能够在骨髓原位同时识别并可视化不同类型及不同分化层级的造血干、祖细胞。长周期造血干细胞(long-term hematopoietic stem cells, LT-HSCs)分化产生的下游干、祖细胞可进行长距离迁移, 前往骨髓中其他造血生态位继续分化。各系祖细胞会定植于不同类型的血管周围区域, 形成成熟的造血集落并产生相应谱系的血细胞。在失血、感染或骨髓动员等应激条件下, 骨髓的基本造血空间格局并不被重塑, 而各系造血集落的数量与产血能力可根据不同条件得以及时调节, 以适应不同的紧急造血需求; 在应激解除后, 各系造血集落可在较短时间内恢复稳态。在衰老过程中, 尽管骨髓血管结构变得更为紊乱, 但基础的造血空间布局仍然得以保持。各系祖细胞依旧在不同血管区域形成造血集落, 同时每个造血集落的产血能力下降, 且淋系造血能力较髓系下降更为显著[16]。

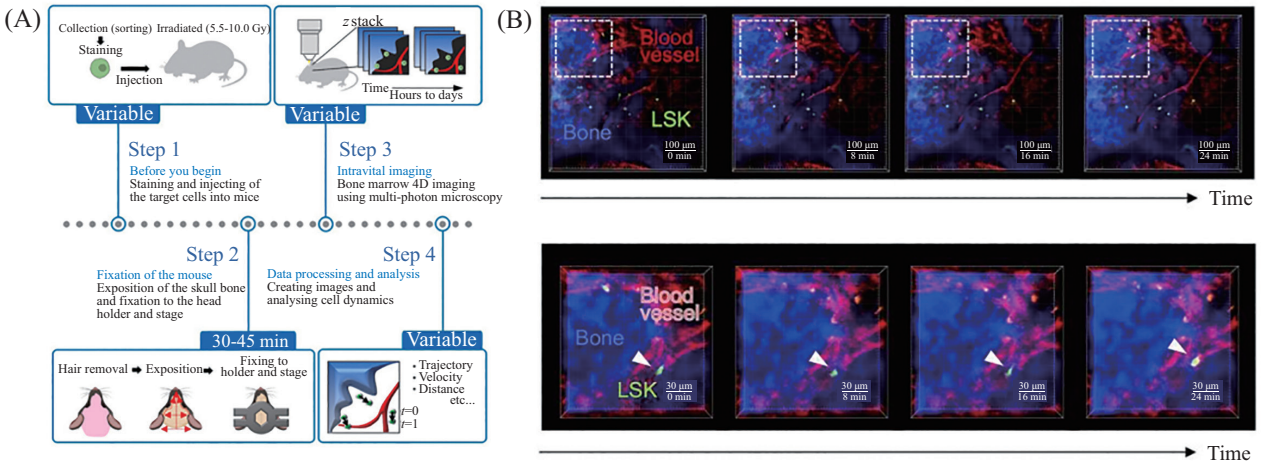
相较而言, 骨髓中的造血细胞较易于分离成单细胞悬液, 研究者进而利用流式细胞术或单细胞测序等技术开展研究。而血管内皮细胞、基质细胞等组成造血生态位的微环境细胞类型则较难分离成单个细胞, 以用于研究, 因此, 对于造血生态位的解析更加有赖于组织原位成像技术的发展。LSCM对骨髓中的血管进行原位成像显示, 骨髓血管并非单一网络, 而是由多种具有不同功能的血管亚群构成的[23-25]。其中位于骨骺端区域(metaphysis)的一类特殊毛细血管——H型毛细血管, 以高表达CD31和Endomucin为特征, 通过与骨祖细胞(osteoprogenitors)相互作用, 在骨的形成与修复中发挥关键作用[15]。骨髓血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)与血管周细胞(perivascular cells)通过分泌趋化因子(如CXCL12)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)等关键因子, 为HSCs的自我更新与多向分化提供重要支持[26-28]。随着年龄增长, 骨髓血管系统发生一系列不利改变: H型毛细血管减少、小动脉比例下降、血管通透性增加, 以及Jagged1、CXCL12等因子表达水平降低。这些变化削弱了HSCs的功能, 导致了年龄相关的造血与免疫功能衰退[29-31]。相对而言, 颅骨骨髓表现出独特的抗衰老特性, 其血管系统保持健康并持续扩张, 从而支持终生造血[32]。在多种生理与病理情形下, 骨髓脂肪细胞被认为对造血具有负性调控作用[33-34]。然而, 先进的骨髓荧光成像技术结合谱系示踪(lineage tracing)研究, 揭示了化疗后造血系统再生的一种关键机制: 化疗导致骨髓脂肪细胞显著增加, 这些脂肪细胞不仅可作为SCF的重要来源, 直接助力造血恢复[35], 而且具有可塑性, 能够去分化(dedifferentiate)成为LepR$^+$造血支持细胞。研究进一步通过遗传手段阻断脂肪细胞的脂解作用进而抑制其去分化, 结果显示这会显著损害造血系统的再生能力, 证实脂肪细胞向支持细胞的转化是促进造血恢复的重要途径[36]。由此, 我们对骨髓脂肪细胞的传统认知发生了根本性改变: 脂肪细胞不再是被动地充当能量储存库, 而是在应激条件(如化疗、衰老等)下积极地转化为一种多功能细胞群, 参与并协调造血系统的损伤修复与稳态重建。这一发现深刻地揭示了造血生态位的动态可塑性。

尽管LSCM在解析固定骨髓切片的三维(3D)解剖结构方面取得了重要成果, 但其固有局限已指明未来研究的技术挑战, 即难以实现对骨髓生态位的深层结构和动态过程的观察。随着样本厚度增加, LSCM易面临信号衰减和扫描时间延长的瓶颈, 这导致难以获得稳定且高质量的深层图像。此外, 其采用的高强度激光极易导致光漂白和光毒性, 不仅会干扰成像信号, 更可能损害活细胞的功能, 严重限制了我们利用LSCM在细胞长时程动态观察中的应用。由于LSCM的穿透深度通常局限于100 μm, 因此该技术难以实现深层活体骨髓成像。因此, 要全面理解造血干细胞(HSCs)与其生态位之间的动态互作与实时“对话”, 研究者必须超越当前基于静态“地图”的成像范式, 积极引入能够实现深层、长时程活体成像的先进技术。此外, LSCM高分辨率和多通道成像所产生的海量数据, 对计算资源提出了更高的要求。要实现准确且高效的细胞识别、三维(3D)重构及定量分析, 必须依托基于对大量高质量成像数据的深度学习和高级计算分析方法。因此, 为使得LSCM得到广泛应用并充分释放其潜能, 亟需建立并优化高效、自动化且精准的数据分析与处理方法。

2 双/多光子激发显微镜(2PM/MPM)成像技术

骨髓是一个高度动态的生态系统, 细胞间的相互作用、迁移行为与命运决定过程瞬息万变。传统依赖固定组织的单一时间点观测模式难以捕捉这些关键的动态过程, 也无法准确判断某一细胞是稳定驻留于其“生态位”还是短暂途经某一区域——这一局限性长期以来制约着对骨髓造血功能的深入理解。为突破传统成像技术的局限, 双光子激发显微镜(2PM)迅速成为活体组织成像研究的革命性工具, 其优势主要体现在以下三个方面。首先, 2PM采用的近红外(NIR, 波长约700~1 100 nm)激光, 在组织中的散射程度更低, 能够穿透较厚骨质和深层组织。经颅顶或股骨开窗/薄化处理后, 2PM能够实现在活体小鼠中对深度≥150 μm的骨髓组织进行清晰成像, 突破了共聚焦显微镜的穿透极限。其次, 双光子激发是一种非线性过程, 仅在激光焦点处产生荧光, 焦外区域几乎不吸收能量, 显著降低光毒性, 使得对同一细胞群进行数小时至数天的连续或重复观察成为可能, 特别适用于研究造血干细胞(HSCs)的迁移与分裂等缓慢动态过程[37]。最后, 由于信号仅来源于焦点位置, 2PM天然具备“光学切片”能力, 无需针孔过滤即可生成低背景、高细节的三维图像, 能够精确解析单个细胞的形态、定位及其与邻近细胞的物理接触作用。例如SUDO等[38]利用2PM经小鼠颅顶骨对移植入小鼠骨髓的富集造血干、祖细胞的LSK($Lin^-Sca\text{-}1^+c\text{-}Kit^+$)细胞进行活体成像, 并将实验方案和成像方法进行了细致的优化与描述(图3)。

基于体内双光子成像技术, 研究人员能够在细胞分辨率上测定小动脉与窦状血管的血流模式、速度及壁剪切应力, 并通过捕捉红细胞运动同时观察静脉注射造血干/祖细胞(HSPC)的归巢动力学[39]。然而, 针对稳态HSPC的原位标记仍受限于标记策略。一项巧妙的双重遗传标记策略将报告基因标记限定于一部分最静止的长期造血干细胞(LT-HSCs), 结果显示: LT-HSCs既邻近窦状血管, 又靠近骨内膜表面; 而多能祖细胞(multipotent progenitors, MPPs)则与骨内膜的距离差异较大, 且更易与过渡带血管相关。值得注意的是, LT-HSCs并非分布于骨髓中最深的缺氧区, 而是处于与MPPs相近的低氧环境中。体内时间推移成像显示, 在稳态下LT-HSCs的运动性有限; 然而, 当被激活时, 其行为呈现高度异质性: 部分细胞呈现高迁移活性, 而另一些则在空间受限的区域内发生克隆性扩增[21]。活体成像技术在终末分化阶段也揭示了关键的细胞互作现象。例如, 体内显微镜观察发现, 中性粒细胞会通过“扯动”血管内巨核细胞伸出的前血小板丝(proplatelets)来调控血小板生成。中性粒细胞依赖CXCR4-CXCL12信号引导迁移至窦状血管周围的巨核细胞附近, 并主动牵拉巨核细胞的前血小板丝结构, 通过活性氧触发肌球蛋白轻链与细胞外调节蛋白激酶(ERK)的激活, 从而加速前血小板的生成并维持稳态下血小板持续释放。值得注意的是, 在心肌梗死后, 这一“扯动”过程可导致大量年轻网织血小板的释放, 增加复发性缺血风



A: 使用双光子激发显微镜对活体小鼠骨髓细胞进行成像的图形摘要; B: 小鼠活体骨髓造血干、祖细胞三维时间序列成像。

A: graphical abstract for imaging bone marrow cells in living mice using two-photon excitation microscopy; B: intravital time-lapse 3D imaging of LSK cells.

图3 利用双光子激发显微镜进行小鼠骨髓活体成像(根据参考文献[38]修改)

Fig.3 Intravital bone imaging using two-photon excitation microscopy (modified from reference [38])

险；而阻断中性粒细胞的扯动则能使血小板生成恢复正常，并减轻心肌梗死后的复发性血栓及静脉血栓负荷，提示这一过程可能成为潜在的抗血栓干预策略[40]。

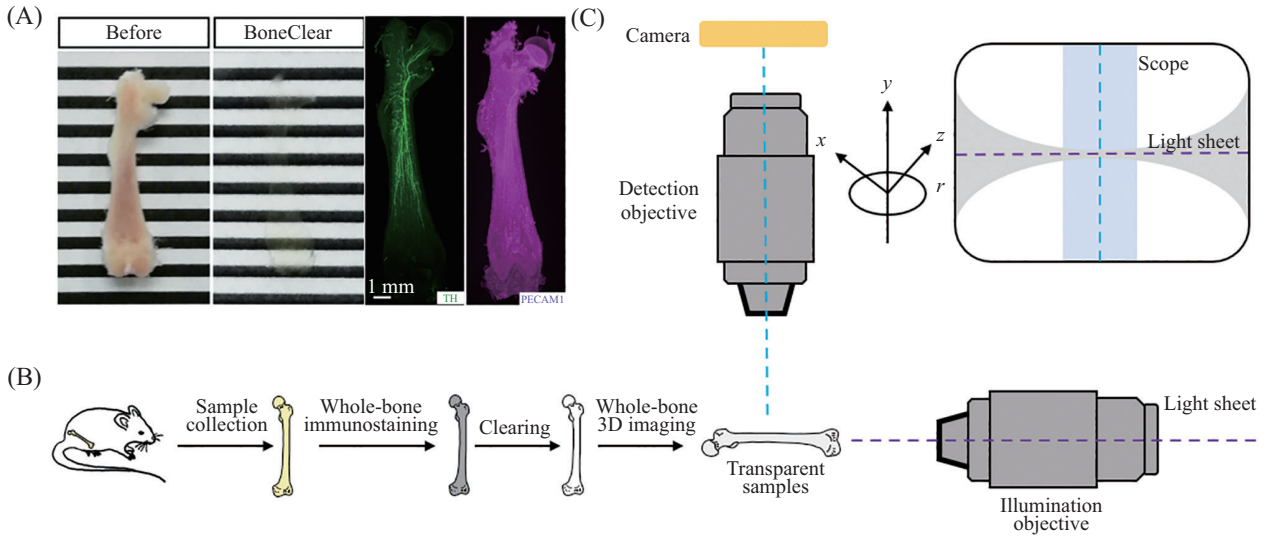
除2PM外，多光子成像技术的另一重要分支——三光子激发显微镜(three-photon excitation microscopy, 3PM)也逐渐用于骨髓造血结构的解析。3PM代表了多光子成像技术在深层组织可视化能力上的重要飞跃。3PM通常使用1 300~1 700 nm的长波长激发光，通过三光子吸收实现焦点限定的非线性激发。长波长光具有更低的散射，同时三光子激发过程能够进一步减弱焦外背景信号。因此相较于2PM, 3PM在高度散射的骨组织中具备更优的信噪比与成像深度。研究人员利用3PM的深度穿透能力，并结合其第三谐波产生(third harmonics generation, THG)信号进行无标记成像。THG成像依赖于组织中周期性分子结构和折射率异质性的变化，能够敏感地反映细胞内如内质网等富含蛋白质的细胞器分布，从而可作为单细胞蛋白质合成活性的有效标记。通过这一技术，研究者能够在活体、深层组织中精确地关联浆细胞(plasma cells)的运动状态与功能活性，从而揭示其在免疫应答和骨髓微环境中的动态调节机制[41]。此外，3PM结合荧光报告小鼠模型，可实现对完整胫骨中B淋巴细胞谱系的深层动力学观测[42]。尽管3PM在骨髓深度成像方面展现出巨大潜力，但其广泛应用和性能提升仍面临诸多挑战。首先，生物安全性挑战：高峰值功率带来的热效应可能导致局部组织损伤或细胞功能紊乱等；其次，效率与速度的限制：尽管3PM穿透深度大，但其信号收集效率较低，需要更长的像素驻留时间，这些使得3PM难以捕捉骨髓中快速发生的动态生物学事件；此外，3PM对激光器的要求极高，整个系统运行成本高且光路设计复杂。

为实现对同一骨髓区域的长期、重复性原位观测，研究者开发了骨髓纵向活体成像(longitudinal intravital imaging of the bone marrow, LIMB)系统——一种将微型梯度折射率透镜装入生物相容性植入物并固定于小鼠股骨的多光子内窥镜系统。LIMB可在数月内对骨髓深处的同一群细胞与血管进行高分辨率反复成像，揭示骨愈合及稳态维持过程中广泛且持久的血管可塑性，为解析造血生态位的长期动态变化提供前所未有的视角[11]。

总之，以2PM和3PM为代表的先进成像技术，结合组织透明化和活体植入(如LIMB系统)等工程化手段，成功地将骨髓这一曾经难以触及的“黑匣子”转变为可进行直观、实时、动态观测的生态系统。这些技术不仅极大地拓展了我们对骨髓造血细胞空间定位、生态位结构及其异质性的理解，更加开启了在活体动物中实时追踪细胞行为、验证基因功能以及评估药物反应的全新研究阶段。然而，尽管活体成像技术展现出巨大的潜力，但其在深层组织成像穿透深度、成像光毒性控制、特异性标记技术以及海量数据的高效处理等方面，仍面临诸多挑战。未来，只有通过多模态技术融合和持续技术突破，才能更有效地推动骨髓造血这一领域在基础研究与临床应用中的深入发展。

3 组织透明化与光片成像技术

为克服传统显微成像技术在骨髓研究中的成像深度不足和光毒性显著等限制，组织透明化与光片荧光显微镜(LSFM)的协同应用应运而生，成为该领域革命性的技术组合[43-44]。组织透明化通过化学处理使不透明的骨组织实现光学通透，而LSFM则以其极快的成像速度、极低的光损伤和对大体积样本的全局三维成像能力，成为解析透明化骨骼的首选技术。LSFM通过侧面光片照明和垂直方向探测，实现了高效的“光学切片”，能够快速构建毫米乃至厘米级别样本的高分辨率三维数据集(图4)[45]。针对骨骼这种致密且难处理的组织，研究者已开发出两大主流的透明化策略。溶剂型方法(如TESOS)通过组织脱水，随后使用高折射率的有机溶剂进行浸润匹配，能够实现极高的组织透明度和快速的处理周期。这使得溶剂型方法特别适合进行大尺度、跨器官的宏观结构追踪，例如绘制神经元的长距离投射[46]。然而，其主要缺点是会导致组织样本显著收缩，且可能猝灭(quenching)对溶剂敏感的荧光蛋白(如GFP)等。水溶性方法(如MarShie)采取了不同的策略：它首先通过水凝胶灌注来固定组织的原有结构，然后进行温和的脱脂处理。尽管这类方法通常耗时较长，但其核心优势在于能够最大限度地保持组织的原始形态和各类荧光蛋白(包括GFP等对溶剂敏感的蛋白)的信号强度。因此，水溶性方法是进行精细结构和亚细胞级高保真成像的理想选择。例如，MarShie方法已被成功应用于观察骨钻孔损伤后的$CX3CR1^{+}$



A: 透明化前后的股骨图像与通过光片显微镜显示的股骨神经和血管结构(根据参考文献[45]修改); B: 小鼠股骨透明化样本制备流程图; C: 光片显微镜光路结构与成像原理示意图。

A: images of the femur before and after tissue clearing, along with visualization of femoral nerve and vascular structures using light-sheet microscopy (modified from reference [45]); B: flowchart of femur clearing sample preparation in mice; C: schematic diagram of the optical path configuration and imaging principle of light-sheet microscopy.

图4 利用光片显微镜进行骨髓成像

Fig.4 Bone marrow imaging using light-sheet microscopy

树突状细胞与血管系统的原位动态相互作用, 清晰地揭示了损伤修复过程中的细胞行为[47]。

这一技术革命催生了一系列颠覆性的科学发现, 彻底更新了我们对骨骼生物学的传统认知。长期以来, 学界认为血液只能通过少数滋养动脉等大血管进出骨髓[48]。然而, 研究人员通过对完整透明化长骨进行光片显微镜全景成像, 首次发现并描绘了一个前所未知的、由成百上千条毛细血管组成的庞大网络, 这些血管被命名为“跨皮质血管”(transcortical vessels, TCVs)。它们像“隧道”一样直接贯穿坚硬的皮质骨, 连接骨外膜和骨髓腔。TCVs被证明是血液和免疫细胞进出骨髓的主力通道[12]。这一发现不仅重绘了骨骼的“循环地图”, 更重要的是, 它为理解骨髓细胞的快速动员(例如感染和应激状态下的免疫细胞释放)以及肿瘤细胞的骨转移等关键病理生理过程提供了全新的机制视角。

骨髓曾被认为是少数缺乏淋巴引流的“免疫豁免”器官之一, 这一长达百年的传统观念同样被组织透明化与LSFM所打破。利用Lyve1和Prox1等淋巴管特异性荧光报告小鼠, 研究人员首次在完整骨骼的三维图像中, 明确证实了骨髓内部存在一个功能性的、活跃的淋巴管网络。进一步研究揭示, 这个淋巴系统在骨折等损伤后的再生过程中会显著增生, 并与造血干细胞(HSCs)及骨骼干细胞(skeletal stem cells, SSCs)发生关键的信号交互。这一发现不仅改变了骨髓是“免疫豁免”器官的认知, 而且证实了骨髓淋巴管网络在调控免疫应答和组织修复中扮演着至关重要的角色, 为理解骨髓微环境的动态免疫和再生机制开辟了新路径[49]。

组织透明化与LSFM的协同应用, 使原本封闭且难以观察的骨骼得以转化为可进行全景式、高分辨率解析的“透明窗口”。这一技术范式不仅促成了TCVs、骨内淋巴管等全新解剖结构的发现, 也开启了在全器官尺度上系统性研究骨骼在发育、稳态、衰老、再生及疾病(如肿瘤骨转移)中细胞行为与结构重塑的新时代。然而, 组织透明化技术并非完美无缺。组织固定、脱水/脱脂、水凝胶包埋等步骤即便经过精细优化, 仍可能不同程度地改变组织微观结构和分子特性。例如, 溶剂型透明化往往引起显著组织收缩, 改变细胞真实间距与体积; 水溶性方法也可能导致组织轻微溶胀。此外, 化学处理还可能影响特定抗原表位, 导致免疫染色效率下降甚至出现假阴性。因此, 尽管透明化技术带来了前所未有的解析能力, 但其对微观结构与分子保真度的潜在影响仍需谨慎评估, 以确保研究结果的准确性和可信度。

在数据层面, 除了固有的可靠性问题外, LSFM

的高速采集特性会在短时间内生成TB乃至PB量级的超大规模三维数据, 尤其在透明化骨骼的全器官成像中, 数据处理几乎成为研究流程中最复杂的环节之一。大体积重建需要对数千张图像进行拼接(stitching)、漂移校正(drift correction)与尺度统一, 而骨髓中高度复杂的基质结构、密集的血管网络及异质性极高的血细胞群体, 使得自动分割与结构识别面临巨大的算法挑战。此外, LSFM成像获得的数据常被用于构建骨骼与骨髓的“标准坐标系”和“解剖图谱”, 这要求图像配准算法需具备更高的多样本归一化及跨个体空间映射能力, 对传统配准算法提出了更高的精度和效率要求。深度学习技术在解决这些复杂的分割和配准等问题中展现出显著潜力, 但其成功实施对数据规模、计算资源以及模型泛化能力的需求远超传统图像处理方法。因此, 在LSFM的应用研究中, 如何高效管理、分析并挖掘超大规模空间数据, 已成为与成像硬件开发本身同等重要的核心技术挑战。

4 挑战与展望

尽管以LSCM、MPM和LSFM为代表的先进成像技术已经将骨髓研究推向三维乃至四维的可视化时代, 但要全面揭示这一复杂生态系统的奥秘, 我们仍面临若干严峻的技术挑战。这些挑战不仅明确了当前研究的边界, 也勾勒出了未来发展的方向。

第一, 现有成像策略在空间与时间维度上仍存在固有局限。静态成像技术(如 LSCM与LSFM)能够提供精细的三维结构图谱, 但其本质上是时间的“冻结”, 难以捕捉细胞迁移、分裂及瞬时相互作用等动态过程。此外, 透明化及化学处理可能引入结构伪影, 影响结果的真实性。相比之下, 双/三光子激发显微镜(2PM/3PM)虽能实现时间维度、追踪动态行为, 但其成像视野与穿透深度有限(骨髓中通常<300 μm), 难以呈现器官尺度的整体动态; 同时, 手术开窗的侵入性可能干扰组织稳态, 从而影响对实验结果的解读。第二, 研究结论高度依赖实验工具的精确性。荧光报告小鼠广泛用于标记特定细胞类型, 但任何外源驱动的表达模式都无法完全重现内源基因的真实时空动态; Cre工具鼠的异位表达或沉默更是潜在的干扰因素。此外, 所有成像策略都面临超大规模、高维度图像数据的处理瓶颈。如何从TB至PB级的体积数据中无偏差地提取定量信息, 仍需开发复杂且定制化的图像分析算法, 其难度和耗时常常不亚于实验本身。第三, 实现从“观察现象”到“解析因果”的跃迁仍然是关键挑战。成像技术的核心优势在于揭示空间关系和动态模式, 但本质上更擅长呈现相关性(如细胞A总是邻近细胞B)。要证明因果性(如细胞A的信号驱动了细胞B的行为改变), 单靠成像远远不够, 必须与基因编辑、光遗传学、药物干预等功能操作深度整合, 才能完成从“看到什么”到“为什么发生”的认知飞跃。

因此, 没有任何单一技术是完备的(三种主要显微成像技术多维度对比见表1)。骨髓成像研究的未来必然依赖多模态、多尺度的融合, 利用三大技术各自的优势, 弥补各自的固有局限, 实现跨尺度的信息整合, 构建远超当前维度的综合认知框架。此外, 骨髓研究不只满足于单纯的形态学观察, 而是以多模态整合为核心, 实现从现象到机制、从基础到临床的飞跃。未来的研究范式将是一种系统性的集成策略, 需包括以下几个方面。(1) 空间定位与宏观解析: 利用LSFM对透明化骨骼进行快速、全局扫描, 绘制高保真的宏观三维“静态地图”, 用于识别病理发生或HSCs富集的关键解剖区域或疾病热点; (2) 实时行为与因果追踪: 通过2PM/3PM对这些确定的微观区域进行高分辨率、长时程的动态成像, 以捕捉细胞在体内的真实行为; (3) 分子机制注释: 通过结合空间多组学技术(如空间转录组学), 为动态图谱中的每一类细胞赋予深度分子注释(转录组、蛋白组、代谢组), 将形态与功能直接关联; (4) 机制验证与功能干预: 通过遗传学工具(如Cre工具鼠、基因编辑等)或药物干预完成机制验证, 实现从“观察现象”到“解析因果”的认知跃迁。通过这一整合式技术策略, 我们有望构建首个从单分子到全器官、从结构到功能的四维(3D空间+时间)骨髓图谱。最终, 活体成像与多模态数据整合将为临床应用提供革命性的理论与技术支持, 助力基础研究向临床转化以及精准干预策略的建立。

参考文献 (References)

[1] COMAZZETTO S, SHEN B, MORRISON S J. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow [J]. Dev Cell, 2021, 56(13): 1848-60.

[2] PINHO S, FRENETTE P S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(5): 303-20.

[3] DOYLE D. William Hewson (1739-74): the father of haematology [J]. Br J Haematol, 2006, 133(4): 375-81.

表1 三种显微成像技术在研究骨髓结构方面的多维度对比

Table 1 Multidimensional comparison of three microscopic imaging techniques in the study of bone marrow structure

维度 Dimension	激光扫描共聚焦显微镜 Laser scanning confocal microscopy	双光子激发显微镜 Two-photon excitation microscopy	光片荧光显微镜 Light-sheet fluorescence microscopy
Basic principle	Point-by-point laser scanning with a pinhole to reject out-of-focus light, improving optical sectioning	Near-infrared two-photon absorption; excitation occurs only at the focal point	Oblique illumination with a thin light sheet; excitation confined to a single plane and collected orthogonally
Excitation wavelength	Visible light (400-700 nm)	Near-infrared (700-1 100 nm)	Visible to near-infrared (depending on the light source)
Photobleaching & phototoxicity	High (whole-volume scanning)	Low (restricted to focal excitation)	Very low (only the illuminated plane is exposed)
Penetration depth	~100 μm (limited by tissue scattering)	~500-800 μm (enhanced tissue penetration)	Depends on tissue clearing; can reach hundreds of microns to millimeters
Spatial resolution	~200 nm (x, y), ~500 nm (z)	Comparable to confocal, with slightly lower axial resolution	Slightly lower than confocal, but can be improved via multi-angle reconstruction
Temporal resolution	Slow (point scanning)	Moderate (point scanning)	Fast (plane-based acquisition)
3D imaging capability	Excellent (serial optical sectioning)	Excellent (serial optical sectioning)	Outstanding (rapid volumetric acquisition)
Sample requirements	Fixed sections or thin transparent tissues	Live or thick tissues (deep imaging)	Typically requires optical clearing
Data volume	Moderate	Moderate to high	Very large (requires high storage and computing resources)
Instrument cost & complexity	Relatively low; mature and user-friendly	High; requires complex laser systems	Very high, demanding optical alignment and sample preparation
Suitable sample types	Thin tissue sections, cell cultures	Thick tissues, *in vivo* imaging	Large intact tissues, developmental models, small animals
Research applications	Static structural analysis of bone marrow microenvironment	Dynamic tracking of hematopoietic processes *in vivo*	Whole-organ 3D reconstruction after tissue clearing
Bone marrow microenvironment visualization	Visualization of local cellular and stromal structures	Intravital imaging via cranial or bone marrow windows	3D reconstruction of cleared bone marrow tissues
Cell-niche interactions	Suitable for spatial distribution and morphological analysis at the micrometer scale	Real-time monitoring of cellular behaviors	Visualization of spatial distribution at a macroscopic scale
Bone tissue constraints	Mineralized bone causes strong light scattering and signal attenuation	Near-infrared improves penetration, but signal still attenuated by dense bone	Requires tissue clearing; enables reconstruction of overall architecture
Quantitative analysis capability	High-resolution structural quantification; limited for large-scale statistics	Time-series data suitable for dynamic analysis	Enables large-scale 3D quantitative analysis
Intravital imaging potential	Not suitable	Excellent	Not suitable

[4] COLLER B S. Blood at 70: its roots in the history of hematology and its birth [J]. Blood, 2015, 126(24): 2548-60.

[5] DEXTER T M, ALLEN T D, LAJTHA L G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro* [J]. J Cell Physiol, 1977, 91(3): 335-44.

[6] JUAN JOSÉ BARCIA M. The Giemsa stain: its history and applications [J], Int J Surg Pathol, 2007, 15(3): 292-6.

[7] NAITO K, TAMAHASHI N, CHIBA T, et al. The microvasculature of the human bone-marrow correlated with the distribution of hematopoietic-cells: a computer-assisted 3-D reconstruction study [J]. Tohoku J Exp Med, 1992, 166(4): 439-50.

[8] PEASE D C. An electron microscopic study of red bone marrow [J]. Blood, 1956, 11(6): 501-26.

[9] ELLIOTT A D. Confocal microscopy: principles and modern practices [J]. Curr Protoc Cytom, 2020, 92(1): e68.

[10] LE V H, LEE S, LEE S, et al. *In vivo* longitudinal visualization of bone marrow engraftment process in mouse calvaria using two-photon microscopy [J]. Sci Rep, 2017, 7: 44097.

[11] REISMANN D, STEFANOWSKI J, GUNTHER R, et al. Longitudinal intravital imaging of the femoral bone marrow reveals plasticity within marrow vasculature [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 2153.

[12] GRUNEBOOM A, HAWWARI I, WEIDNER D, et al. A network of transcortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones [J]. Nat Metab, 2019, 1(2): 236-50.

[13] ZHAO Y, BOWER A J, GRAF B W, et al. Imaging and tracking of bone marrow-derived immune and stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2013, 1052: 57-76.

[14] GOMARIZ A, HELBLING P M, ISRINGHAUSEN S, et al. Quantitative spatial analysis of haematopoiesis-regulating stromal cells in the bone marrow microenvironment by 3D microscopy [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2532.
[15] HOLZWARTH K, KOHLER R, PHILIPSEN L, et al. Multiplexed fluorescence microscopy reveals heterogeneity among stromal cells in mouse bone marrow sections [J]. Cytometry A, 2018, 93(9): 876-88.
[16] WU Q Q, ZHANG J Z, KUMAR S, et al. Resilient anatomy and local plasticity of naive and stress haematopoiesis [J]. Nature, 2024, 627(8005): 839-46.
[17] ZHANG J Z, WU Q Q, JOHNSON C B, et al. *In situ* mapping identifies distinct vascular niches for myelopoiesis [J]. Nature, 2021, 590(7846): 457-62.
[18] KIEL M J, YILMAZ Ö H, IWASHITA T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells [J]. Cell, 2005, 121(7): 1109-21.
[19] ACAR M, KOCHERLAKOTA K S, MURPHY M M, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal [J]. Nature, 2015, 526(7571): 126-30.
[20] CHEN J Y, MIYANISHI M, WANG S K, et al. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche [J]. Nature, 2016, 530(7589): 223-7.
[21] CHRISTODOULOU C, SPENCER J A, YEH S C A, et al. Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells [J]. Nature, 2020, 578(7794): 278-83.
[22] KUNISAKI Y, BRUNS I, SCHEIERMANN C, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence [J]. Nature, 2013, 502(7473): 637-43.
[23] KUSUMBE A P, RAMASAMY S K, ADAMS R H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone [J]. Nature, 2014, 507(7492): 323-8.
[24] LANGEN U H, PITULESCU M E, KIM J M, et al. Cell-matrix signals specify bone endothelial cells during developmental osteogenesis [J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(3): 189-201.
[25] MOHANAKRISHNAN V, SIVARAJ K K, JEONG H W, et al. Specialized post-arterial capillaries facilitate adult bone remodelling [J]. Nat Cell Biol, 2024, 26(12): 2020-34.
[26] DING L, MORRISON S J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches [J]. Nature, 2013, 495(7440): 231-5.
[27] DING L, SAUNDERS T L, ENIKOLOPOV G, et al. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells [J]. Nature, 2012, 481(7382): 457-65.
[28] GREENBAUM A, HSU Y M S, DAY R B, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is. required for haematopoietic stem-cell maintenance [J]. Nature, 2013, 495(7440): 227-30.
[29] HO Y H, DEL TORO R, RIVERA-TORRES J, et al. Remodeling of bone marrow hematopoietic stem cell niches promotes myeloid cell expansion during premature or physiological aging [J]. Cell Stem Cell, 2019, 25(3): 407-18.
[30] KUSUMBE A P, RAMASAMY S K, ITKIN T, et al. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells [J]. Nature, 2016, 532(7599): 380-4.
[31] SACMA M, POSPIECH J, BOGESKA R, et al. Haematopoietic stem cells in perisinusoidal niches are protected from ageing [J]. Nat Cell Bio, 2019, 21(11): 1309-20.
[32] KOH B I, MOHANAKRISHNAN V, JEONG H W, et al. Adult skull bone marrow is an expanding and resilient haematopoietic reservoir [J]. Nature, 2024, 636(8041): 172-81.
[33] NAVEIRAS O, NARDI V, WENZEL P L, FREDERIC F, et al. Bone marrow adipocytes as negative regulators of the hematopoietic microenvironment [J]. Nature, 2010, 460(7252): 259-63.
[34] SATO K, FENG X M, CHEN J C, et al. PPARγ antagonist attenuates mouse immune-mediated bone marrow failure by inhibition of T cell function [J]. Haematologica, 2016, 101(1): 57-67.
[35] ZHOU B O, YU H, YUE R, et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF [J]. Nat Cell Bio, 2017, 19(8): 891-903.
[36] HIRAKAWA H, GAO L F, TAVAKOL D N, et al. Cellular plasticity of the bone marrow niche promotes hematopoietic stem cell regeneration [J]. Nat Genet, 2023, 55(11): 1941-52.
[37] SVOBODA K, YASUDA R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience [J]. Neuron, 2006, 50(6): 823-39.
[38] SUDO T, YAMASHITA E, KIKUTA J, et al. Protocol for live imaging of transferred mouse bone marrow cells by two-photon microscopy [J]. STAR Protoc, 2023, 4(4): 102654.
[39] BIXEL M G, KUSUMBE A P, RAMASAMY S K, et al. Flow dynamics and HSPC homing in bone marrow microvessels [J]. Cell Rep, 2017, 18(7): 1804-16.
[40] PETZOLD T, ZHANG Z, BALLESTEROS I, et al. Neutrophil "plucking" on megakaryocytes drives platelet production and boosts cardiovascular disease [J]. Immunity, 2022, 55(12): 2285-99.
[41] RAKHYMZHAN A, FIEDLER A F, GUNTHER R, et al. Optimized intravital three-photon imaging of intact mouse tibia links plasma cell motility to functional states [J]. iScience, 2024, 27(10): 110985.
[42] BIAS A, FIEDLER A F, GUNTHER R, et al. Protocol to analyze marrow B lineage cell dynamics by *in vivo* three-photon microscopy in intact mouse tibia [J]. STAR Protoc, 2025, 6(2): 103824.
[43] GREENBAUM A, CHAN K Y, DOBREVA T, et al. Bone CLARITY: clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(387): eaah6518.
[44] JING D, ZHANG S W, LUO W J, et al. Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method [J]. Cell Res, 2018, 28(8): 803-18.
[45] WANG Q, LIU K L, YANG L, et al. BoneClear: whole-tissue immunolabeling of the intact mouse bones for 3D imaging of neural anatomy and pathology [J]. Cell Res, 2019, 29(10): 870-2.
[46] YI Y T, LI Y Q, ZHANG S W, et al. Mapping of individual sensory nerve axons from digits to spinal cord with the transparent embedding solvent system [J]. Cell Res, 2024, 34(2): 124-39.
[47] MERTENS T F, LIEBHEIT A T, EHL J, et al. MarShie: a clearing protocol for 3D analysis of single cells throughout the bone marrow at subcellular resolution [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 1764.
[48] SIVARAJ K K, ADAMS R H. Blood vessel formation and function in bone [J]. Development, 2016, 143(15): 2706-15.
[49] BISWAS L, CHEN J Y, DE ANGELIS J, et al. Lymphatic vessels in bone support regeneration after injury [J]. Cell, 2023, 186(2): 382-97.