技术与方法

连续切片三维重构技术在黑腹果蝇中肠超微结构研究中的应用*

王 博[1**] 黄风景[2] 王林燕[1] 罗 军[3] 关 旸[1***]

（1. 浙江中医药大学中医药科学院，杭州 310053；2. 温州医科大学附属第二医院中医科，温州 325027；
3. 浙江丰虹新材料股份有限公司，湖州 313300）

摘 要 【目的】 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中肠超微结构的观察对于其功能的研究具有重要意义。本研究利用扫描电镜及三维重构技术，旨在探究黑腹果蝇中肠超微结构。**【方法】** 解剖野生型黑腹果蝇并取其中肠，经四氧化锇-硫代甲酰二肼-四氧化锇（OTO）方法制备中肠样本后，进行连续切片，并通过扫描电镜对连续切片上的中肠组织超微结构进行观察，利用 Amira 软件对中肠特定结构进行三维重构。**【结果】** 黑腹果蝇中肠超微结构包括浆膜腔屏障、肌层、围食膜、粘液层、肠道微生物、微气管、肠道上皮细胞、肠道干细胞和肠分泌细胞；肠上皮细胞包含细胞核、线粒体、微绒毛和迷路结构。通过三维重构展示了肠道微绒毛，线粒体，肠腔内容物，微气管和迷路。**【结论】** 三维重构能更加精确全面展示中肠超微结构。

关键词 黑腹果蝇；中肠；超微结构；扫描电镜；三维重构

Application of the serial section 3D reconstruction technique to the study of the midgut ultrastructure of *Drosophila melanogaster*

WANG Bo[1**] HUANG Feng-Jing[2] WANG Lin-Yan[1] LUO Jun[3] GUAN Yang[1***]

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;
2. Department of TCM, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China;
3. Zhejiang Fenghong New Material Co., Ltd., Huzhou 313300, China)

Abstract [Objectives] To investigate the ultrastructure of the midgut of *Drosophila melanogaster* using scanning electron microscopy and three-dimensional reconstruction, thereby improving understanding of its function. **[Methods]** Midguts were removed from wild-type *D. melanogaster*, continuously sectioned and prepared for scanning electron microscopy using the osmium tetroxide-thiocarbohydrazide-osmium tetroxide (OTO) method. The ultrastructure of midgut tissue was then observed under a scanning electron microscope. Specific structures of the midgut were reconstructed in 3D with Amira software. **[Results]** Midgut ultrastructure consisted of a serosal barrier, muscle layer, perinatal membrane, mucous layer, intestinal microorganisms, tracheole, intestinal epithelial cells, intestinal stem cells and enteroendocrine cells. Intestinal epithelial cells contain mitochondria, microvilli and basal labyrinths. A three-dimensional reconstruction of the intestinal microvilli, mitochondria, luminal contents, microtrachea and basal labyrinths, was created. **[Conclusion]** 3D reconstruction was an effective way to accurately and comprehensively visualize the ultrastructure of the *D. melanogaster* midgut.

Key words *Drosophila melanogaster*; midgut; ultrastructure; SEM; 3D reconstruction

---

*资助项目 Supported projects：浙江省基础公益研究项目（LGC19C050001）

**第一作者 First author，E-mail：824419396@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：277464437@qq.com

收稿日期 Received：2021-09-19；接受日期 Accepted：2022-05-17

黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中肠具有吸收和消化营养的功能，同时也是抵御病原体及微生物摄入机体的第一道防线（Shanbhag and Tripathi，2009）。尽管黑腹果蝇肠道外观上极其简单，但它却是一个结构复杂并处于动态变化的器官（Capo *et al.*，2019）。肠道细胞以及肠腔内容物具有特定的动态结构特征以及循环模式，并且能在黑腹果蝇整个生命周期中持续重建。由于黑腹果蝇中肠具有单层上皮细胞和有限细胞类型，以及黑腹果蝇和哺乳动物在调控肠道病理生理及再生方面的信号通路高度保守，这使得通过黑腹果蝇探究肠道疾病具有便捷性及合理性等优势（Wong *et al.*，2016）。果蝇肠道解剖学结构包含前肠、中肠和后肠，果蝇中肠包括与肠腔直接接触的围食膜，肠上皮组织由肌肉层包裹，内含大量肠上皮细胞，以及少量中肠干细胞、肠分泌细胞和肠母细胞（Capo *et al.*，2019）。由于果蝇中肠同人类小肠功能类似，主要负责食物的消化和吸收，因此本研究选取中肠作为研究对象。目前虽然有大量关于果蝇肠道干细胞、肠道免疫以及肠道疾病模型的研究，但关于果蝇肠道三维结构的超微展示研究较少（唐旭东等，2010；郝阳光等，2013）。

近年来，随着电镜技术的不断发展，人们逐渐发现仅通过二维图片展示生物组织的超微结构具有局限性，不同切片角度和切片深度可能使同一结构展现出不同形貌，继而影响结果的评判。对生物样品序列切片进行图像采集及处理，能进一步得到特定结构的三维图像（Suga *et al.*，2018），并且三维图像能够更加客观全面和精细的展示超微结构。如 Suga 等（2018）通过连续切片扫描电镜技术对小鼠小脑皮层内皮细胞、颗粒细胞及小胶质细胞的细胞核进行三维重构，继而精确比较了三者核形态的差异；Wacker 等（2015）通过连续切片扫描电镜技术对斑马鱼不同免疫细胞进行了三维重构，从而更好的识别和鉴定不同的细胞类型；Jiang 等（2021）对小鼠肝脏组织三维重构，从三维视角中更好的探究了肝细胞中内质网与其他细胞器之间的关系。鉴于连续切片扫描电镜技术在生物样品超微结构研究中的巨大优势，本研究通过以上方法对黑腹果蝇中肠二维及特定三维层面的超微结构进行展示，旨在为更好的探究黑腹果蝇肠道结构提供一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

试剂：戊二醛（Alfa Aesar），四氧化锇（TEDPELLA. INC），Spon 812 环氧树脂（SPI CHEM），柠檬酸铅（SPICHEM），醋酸双氧铀（TED PELLA. INC）；硝酸铅（国药集团化学试剂有限公司），天冬氨酸（MACKLIN），硫代甲酰二肼（简称 TCH, damas-beta）。

1.2　仪器

场发射扫描电镜（日立，型号，SU8010），超薄切片机（莱卡，型号，EMUC7）。

1.3　供试昆虫

黑腹果蝇为野生型 Oregon R 品系，采用标准玉米糊培养基饲养在平底玻璃试管中，培养温度为 25 ℃，相对湿度为 60%。解剖羽化 3 日龄的黑腹果蝇雌虫取其中肠用于实验。

1.4　实验方法

1.4.1　样品制备　样品采用 OTO 制样方式，具体步骤为：将解剖的中肠组织置于 2.5%戊二醛中 4 ℃固定过夜，加入 2% 四氧化锇和 1.5%铁氰化钾混合液中，并置于冰上固定 1 h，经磷酸缓冲液浸洗，2 次双蒸水浸洗 10 min，加入 1%硫代甲酰二肼 40 ℃孵育 30 min；再经过双蒸水浸洗，加入 2%四氧化锇室温固定 1 h，双蒸水浸洗，并加入 1% 醋酸双氧铀 4 ℃过夜染色；经双蒸水浸洗后，加入 Walton 溶液（0.066 g 的硝酸铅溶于 10 mL 0.03 mol·L^{-1}的天冬氨酸原液）60 ℃孵育 1 h；经双蒸水浸洗，50%、70%、80%和 90%乙醇脱水，每次 10 min，100%乙醇脱水 2 次，每次 10 min，100%丙酮脱水 2 次，每次 10 min，然后将样品置于丙酮与 Spon 812 树脂按 3∶1、1∶1 和 1∶3 混合液中于室温下分别渗透

2、2 和 3 h，再置于纯 Spon 812 树脂渗透过夜后，转移样品至包埋板中，加入 Spon 812 树脂，60 ℃聚合 48 h。

1.4.2 连续切片及扫描电镜成像 超薄切片机切取中肠组织，切片厚度为 50 nm，将切片带收集在硅片上，置于 60 ℃下烘烤 10 min。将硅片用导电碳胶粘在扫描电镜样品台上，置于场发射扫描电镜下观察并采集图像。采集参数为加速电压 2 kV，工作距离为 4 mm，收集背散射电子信号。

1.4.3 图像处理及三维重构 将采集的序列切片图片导入 Amira 软件中，通过 Align 模块对图片进行对中，后通过 extract subvolume 提取对中后的重叠部分；采用 segmentation 模块对每张切片中所需部分（如微绒毛、线粒体等）进行分割；以分割后图片为数据通过 generate surface 和 surface view 模块生成表面网格并进行三维展示（Porrati *et al.*，2018）。

2 结果与分析

2.1 中肠超微结构

黑腹果蝇中肠横切面在低放大倍数下可以分辨肠道壁、肠腔以及肠道内容物（图 1：A），肠腔直径约 100 μm，肠道壁厚度在 10-30 μm 之间。进一步放大可清晰展示肠道超微结构（图 1：B-E）。在肠道最外层的薄膜结构为浆膜腔屏障（Serosal barrier，SB）。浆膜腔屏障内为肠道肌层，肌层包含环肌层（Circular muscle，CM）和纵肌层（Longitudinal muscle，LM）。在肠道肌

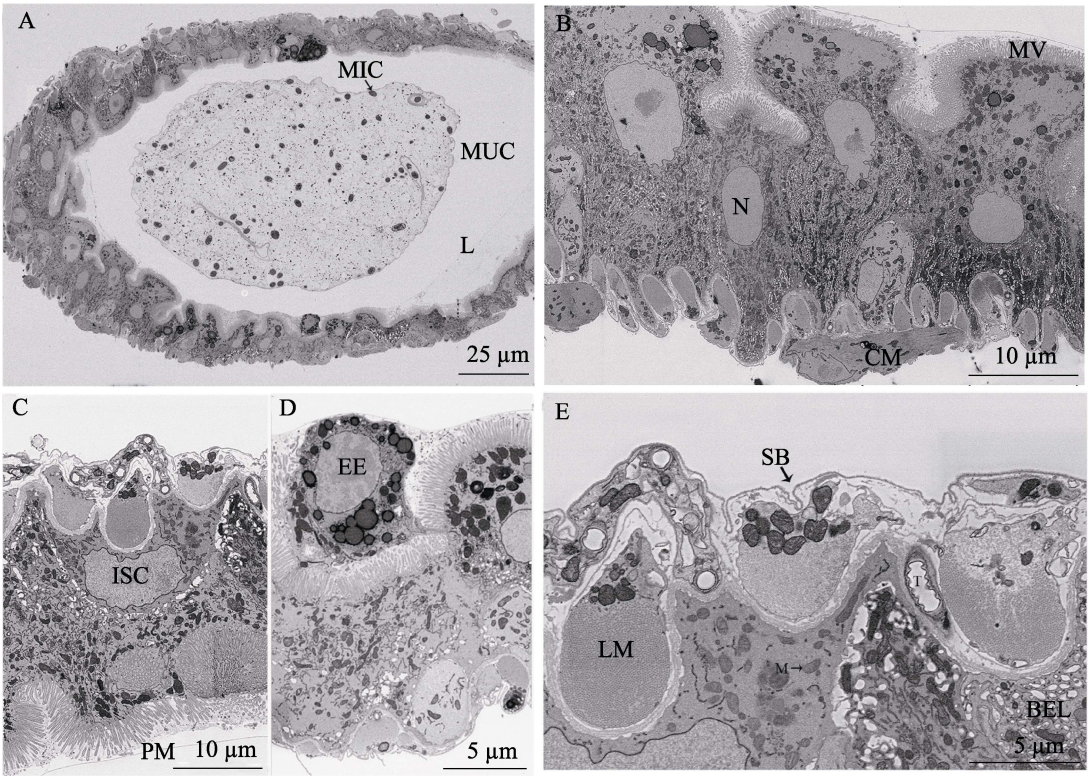

图 1 中肠超微结构

Fig. 1 The ultrastructure of midgut

A-E. 不同放大倍数下的超微结构。L：肠腔；MIC：微生物；MUC：粘液层；CM：环肌层；LM：纵肌层；MV：微绒毛；N：细胞核；PM：围食膜；SB：浆膜腔屏障；T：微气管；M：线粒体；BEL：迷路；ISC：肠道干细胞；EE：肠分泌细胞。

A-E. The ultrastructure under different magnification. L: Lumen; MIC: Microorganism; MUC: Mucus; CM: Circular muscle; LM: Longitudinal muscle; MV: Microvilli; N: Nucleus; PM: Peritrophic membrane; SB: Serosal barrier; T: Tracheole; M: Mitochondria; BEL: Basal extracellular labyrinth; ISC: Intestinal stem cells; EE: Enteroendocrine cell.

层附近，穿插有微气管（Tracheole，T）的结构。而在肠道基底处存在大量迷路结构（Basal extracellular labyrinth，BEL），它们与液体的吸收有关。肠道上皮细胞（Epithelial cells，EC）为肠道壁的主要组成，肠上皮细胞表面有排列整齐的肠道微绒毛（Microvilli，MV），以及内部丰富的线粒体（Mitochondria，M）。而少数肠道干细胞穿插在肠道上皮细胞之间，且位于肠道基底部，没有绒毛结构。同样在肠上皮细胞之间存在肠分泌细胞（Enteroendocrine cells，EE），该类细胞内部存在大量囊泡。在肠腔内靠近绒毛部分存在极薄的围食膜（Peritrophic membrane，PM）结构，而肠腔内具有粘液层（Mucus，MUC），里面可看到部分肠道微生物（Microorganism，MIC）和食物细小残渣。

2.2　中肠结构三维重构

2.2.1　肠道微绒毛三维展示　肠道微绒毛是位于肠上皮细胞表面的绒毛状突起。图 2（A）和图 2（C）为肠道组织不同序列切片，图 2（B）红色区域展示分割后的肠道微绒毛，图 2（D）为肠道微绒毛三维展示图。从图 2 中可以对一部分区域内的肠道微绒毛疏密程度和微绒毛长度进行清楚的观察，其中肠道微绒毛由于分布区域的不同呈现出不同的长度，较短的肠胃绒毛大约 0.5 μm，而较长的肠微绒毛约 5 μm。

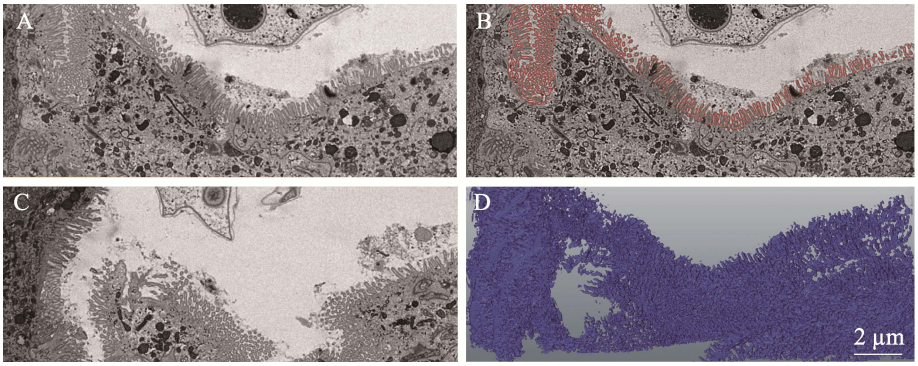

图 2　肠道微绒毛超微结构及三维展示

Fig. 2　The ultrastructure and three-dimensional display of intestinal microvilli

A，C. 不同序列切片；B. 展示微绒毛（红色）分割区域；D. 微绒毛三维展示。

A，C. Different serial slice; B. Show microvilli (red) segmentation region; D. Three-dimensional display of intestinal microvilli.

2.2.2　肠上皮细胞线粒体三维展示　肠道上皮细胞内包含大量线粒体（图 3），其中线粒体形状包括圆形及椭圆形等，随机选取上皮细胞细胞核附近的线粒体进行三维重构及展示（图 3：D），结果表明线粒体包含线状及圆球状等，且不同线粒体的形态和长度存在一定差异，其中大多数线粒体长度主要集中在 500 nm 到 1 200 nm 之间。

2.2.3　肠腔内容物三维展示　肠腔内包含真菌，真菌四周的深色区域推测为粘液层，内含消化液用于分解食物残渣（图 4：A），而粘液层外围被一层较细的线状结构所包绕，该结构为围食膜。对腔内红色方框区域进行三维重构及展示，结果表明酵母菌直径在 5-8 μm，蓝色的粘液层完全包绕在酵母菌附近，而黄色的围食膜紧贴在粘液层表面。

2.2.4　微气管三维展示　肠道壁表面附着的微气管是直径大约在 3 μm 左右的空芯管状结构，内壁为锯齿形状，而外表面较为光滑（图 5：A），三维结构表面该微气管为笔直无分叉结构，锯齿状粗糙内壁与二维图像中的内壁相同。

2.2.5　迷路三维展示　迷路为基底细胞域的巨大的膜旋回结构（图 6：A，B），图 6（D）为迷路的三维展示。

3　讨论

随着电镜技术的不断发展和扫描电镜性能

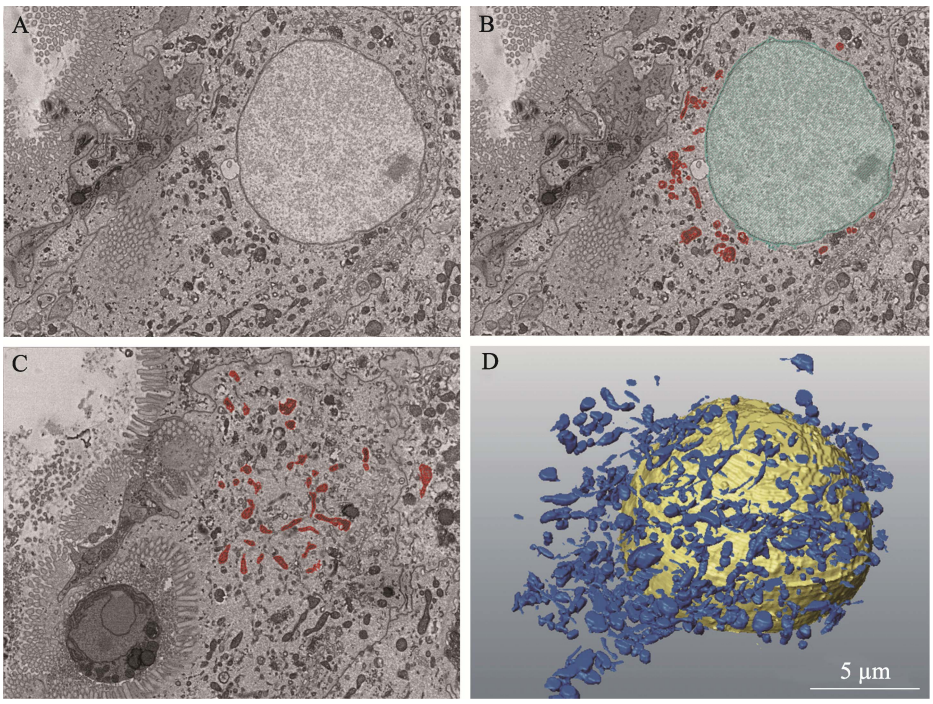

图 3　肠上皮细胞线粒体及三维展示

Fig. 3　Three-dimensional display of mitochondrial and nuclear in intestinal epithelial cells

A, C. 不同序列切片二维展示；B. 展示线粒体（红色）和细胞核（绿色）分割区域；D. 线粒体及细胞核三维展示。

A, C. Two-dimensional display of different serial slice; B. Show mitochondrial (red) and nuclear (green) segmentation region; D. Three-dimensional display of mitochondrial and nuclear.

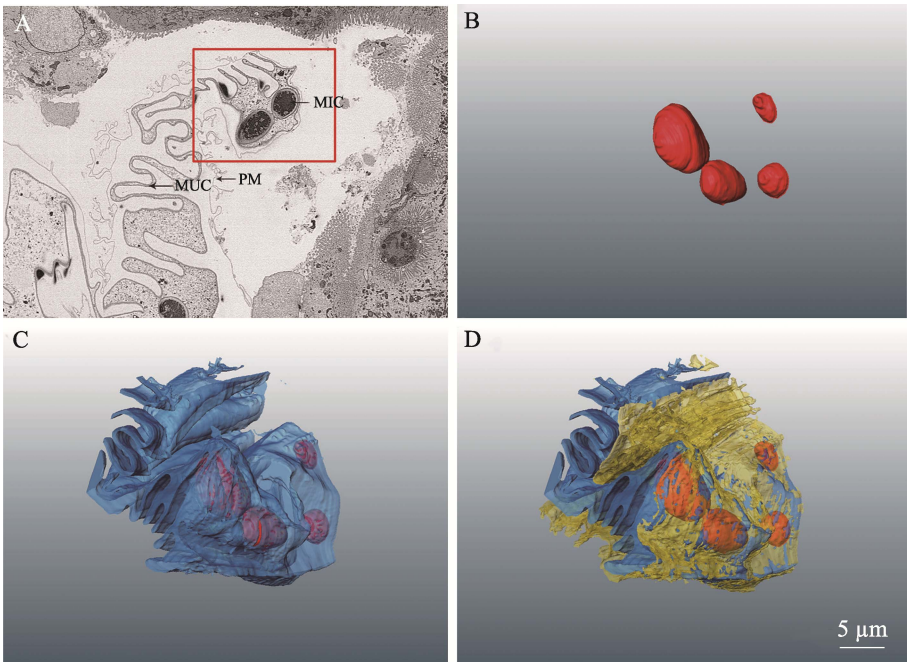

图 4　肠腔内容物三维展示

Fig. 4　Three-dimensional display of intestinal contents

A. 肠道内容物二维展示；B. 微生物三维展示；C. 微生物和粘液层三维展示；D.微生物、粘液层和围食膜三维展示。

A. Two-dimensional display of intestinal contents; B. Three-dimensional display of microorganisms; C. Three-dimensional display of microorganisms and mucus; D. Three-dimensional display of microorganisms, mucus layer and peritrophic membrane.

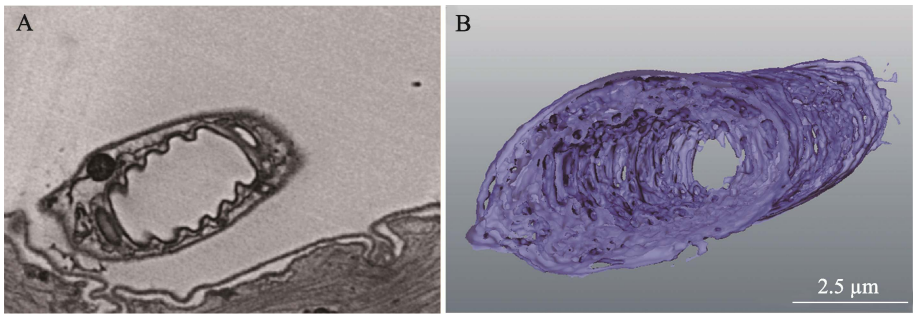

图 5　微气管三维展示

Fig. 5　Three-dimensional display of tracheole

A. 微气管二维展示；B. 微气管三维展示。

A. Two-dimensional display of tracheole; B. Three-dimensional display of tracheole.

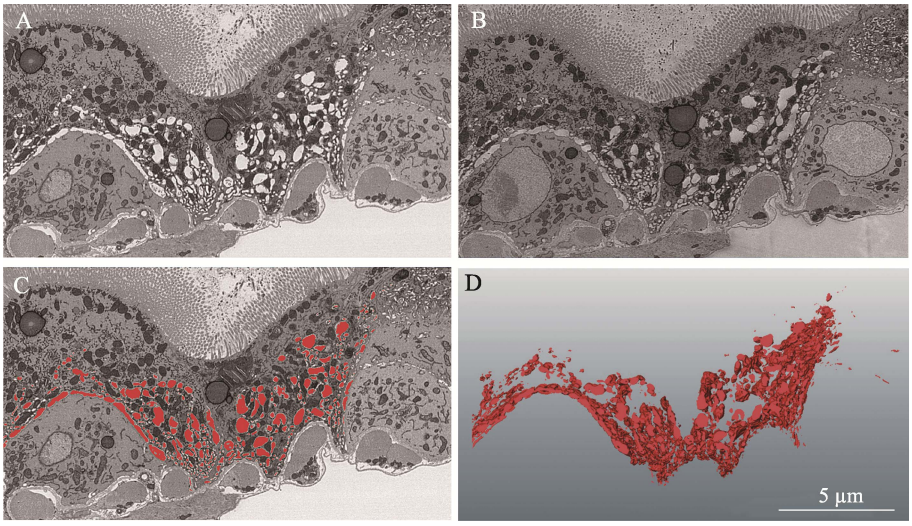

图 6　迷路三维展示

Fig. 6　Three-dimensional display of basal extracellular labyrinth

A，B. 不同序列切片二维展示；C. 显示迷路（红色）分割区域；D. 迷路三维展示。

A, B. Two-dimensional display of different serial slice; C. Show basal extracellular labyrinth (red) segmentation region; D. Three-dimensional display of basal extracellular labyrinth.

的不断提升，通过扫描电镜收集生物样品超薄切片背散射电子信号，可以得到类似透射电镜成像效果的图像，并且通过扫描电镜进行图像采集更便于后续三维重构（谢礼等，2020），因此本研究采用连续切片扫描电镜的方法对黑腹果蝇中肠进行超微结构观察及部分结构三维重构。本研究中采用的 OTO 制样方法较常规电镜制样方式而言，额外加入的 TCH 能提高生物样品衬度并减少了采集过程中的荷点现象；而在四氧化锇中加入的铁氰化钾能有效保持细胞骨架和细胞质膜的结构；另外 OTO 制样中所用的天冬氨酸铅较常规制样方法中的柠檬酸铅渗透速率慢，更利于超微结构的保存（丁明孝等，2021）。

生物组织超微结构的观察对于其功能的研究和病理诊断意义重大，而三维图像较二维能更加客观及全面的反应超微结构的真实信息。由于目前尚未有关黑腹果蝇雌雄成虫肠道超微结构差异性方面的报道，而羽化 3 日龄的黑腹果蝇肠道已发育完全，且该阶段成虫活力旺盛，因此本研究中选取了羽化 3 日雌性成虫，并对中肠超微结构进行观察及鉴定。结果表明黑腹果蝇中肠最外层为浆膜腔屏障，该结构广泛存在于体腔和包括肠道和心脏在内的多个器官表面，它能保护生物体内各重要器官间的无摩擦运动（Felix,

1996），此外它作为天然屏障还能够阻止炎症和恶性病变的扩散，该结构的观察对于肠道生理病理状况的评判具有一定意义（Vancamelbeke and Vermeire，2017）。在电镜下可观察到肠道肌层由肌纤维组成，其中最外层较薄的纵肌层，具有收缩和延展肠道的作用，继而引起肠道长短变化，通过物理的作用促使食物朝着一个方向移动。而内层较厚的环状肌，具有横向收缩肠道的作用，继而促进分解较大的食物颗粒。此外它还通过阻断更近端来阻止食物向错误的方向移动。肠道中这两类肌肉协同工作，将食物从近端转移至远端，通过观察肌层结构的分布及完整性可用于研究肠动力学等（Sandborn *et al.*，1967）。中肠干细胞可分裂为肠道上皮细胞，用于维持肠道稳态，肠道干细胞的研究可用于探究其增殖和分化机制（郝阳光等，2013）。

肠道微绒毛是上皮细胞中细胞膜小突起，可增加细胞表面积，并具有吸收、分泌、细胞粘附和机械传导等功能（Van Dussen *et al.*，2018）。每个微绒毛包含一束交联肌动蛋白丝，是构成微绒毛的核心结构（Mooseker and Tilney，1975）。肠道微绒毛是评判肠道健康与否及吸收能力的重要指标，因此观察肠道微绒毛疏密程度以及微绒毛长度等具有一定意义。如过去有研究表明重金属镉会引起黑腹果蝇肠道微绒毛缺失（楼哲丰等，2013）。虽然肠道二维结构的观察对实验具有重要参考价值，但较三维结构却存在一定随机性或片面性。在本研究中我们发现图 1（A）和图 1（C）虽然为同一样品，然而由于切片层面的不同，展示得到结果也不相同。在图 1（A）中可以观察到肠微绒毛紧密整齐的排列，然而在图 1（C）中可以看到部分区域绒毛稀疏、变短甚至脱落；此外由于黑腹果蝇肠道极细，不能像如小鼠等肠道较大的动物那样通过扫描电镜进行肠道绒毛的观察（张献彩和张雷，2011），因此对连续切片进行大样本量观察并进行三维重构，可以更加准确的用于结果分析。

线粒体广泛存在于各类细胞当中，它参与细胞能量的产生，调控细胞活动相关信号通路：如凋亡，Ga^{2+}信号，氧化还原平衡等（马志华等，2021）。此外线粒体可参与维持肠道干细胞稳态，线粒体功能障碍可能和肠道肿瘤的发生相关（Berger *et al.*，2016）。在线粒体动力学中提出线粒体形态的转变（分裂或融合）与部分细胞功能息息相关。例如线粒体融合会导致线粒体膜通透性降低，抗氧化能力增强，ROS 产生的减少，线粒体自噬降低及细胞凋亡水平的降低，而线粒体分裂会引起相反的效应（Picard *et al.*，2013），因此线粒体形态学研究具有重要意义。过去在研究线粒体融合及分裂时通常采用 Western blot 方法对融合及分裂相关蛋白进行定量检测，或通过透射电镜进行线粒体形态观察并计算线粒体长宽比例（Ma *et al.*，2019）。然而由于受切片角度和切片位置的影响，线粒体二维图像不能真实反映其形态，因此三维结构的研究对于评判线粒体形态更加直观准确。

黑腹果蝇肠道内腔除包含大量微生物和食物颗粒外，还存在包含消化液的粘液层及围食膜。围食膜是由几丁质聚合分子和蛋白质组成的半透性膜状结构，是昆虫上皮细胞和食物之间的物理屏障。它能够防御病原微生物，以及有害物质和细菌毒素等与上皮细胞接触。当围食膜完整性的破坏，乃至厚度改变会导致宿主肠道防御水平的降低（Hayakawa *et al.*，2004; 姚志超等，2018）。本研究观察肠道内腔发现粘液层并非散乱分布且具有特定形态特征，围食膜处在最外层完全包绕粘液层，而粘液层又包裹着微生物（图 4：A）；三维重构进一步展现出三者之间具有特定的层次关系，并形成了相对封闭完整的环境（图 4：D）。以上关于肠道微生物分布和围食膜形态学指标的观察，对于研究肠道菌群，肠道免疫及防御机制具有一定意义。

肠道微气管属于昆虫气管系统，它具有输送氧气的功能，为管状结构且以网络形式分布。该结构类似哺乳动物血管系统（甘雅玲和龚佩瑜，2001）。最近有研究表明微气管处于动态变化中，当肠道氧化损伤或感染等会导致微气管重塑，使得微气管分支增多，从而导致肠道干细胞的激增（Tamamouna *et al.*，2021）。本研究尚未观察到分支的微气管，这可能是由于供试昆虫为健康野生型黑腹果蝇，或是由于观察区域的局限性而没有发现分支型微气管，但研究微气管三维结构对

于了解它形态的动态变化依然具有一定意义。在本研究中还对基底细胞迷路结构进行了三维重构。迷路是基底细胞区域的巨大的膜旋回，由基底质膜的内折和相邻细胞的交错基底脊组成，两者均导致上皮细胞基底外侧表面积的增加。膜迷路包括堆叠型、条带型以及空腔型，迷路的扩张会导致水再吸收的增强（Fukudome，2001；Hayes *et al.*，2019）。通过对迷路三维重构，可以进一步测定迷路结构的体积，这对于研究肠道水吸收具有一定意义。

近年来有一些关于黑腹果蝇体内组织结构和空间关系的研究。如通过微计算机断层扫描研究交配前后果蝇生殖系统的变化（Mattei *et al.*，2015），通过 SBF-SEM 揭示了黑腹果蝇心包肾细胞的 3D 超微结构（Kawasaki *et al.*，2019）。然而关于黑腹果蝇肠道三维超微的结构鲜有报道。甚至对于其他昆虫肠道超微结构的研究也主要集中在二维层面上。如绝大多数昆虫中肠超微结构同黑腹果蝇类似，如特有的围食膜结构。对于肠微绒毛结构则普遍存在于各类昆虫乃至哺乳动物肠道结构中，但本研究中观察到的微气管系统和迷路结构在其他昆虫中鲜有报道。相反有报道称合哑蝉 *Karenia caelatata* 中肠上皮细胞包含大量分泌颗粒，黄粉虫 *Tenebrio molitor* Linnaeus 成虫中肠上皮细胞附近发现少量多泡体，以上结构均和肠分泌相关，但在黑腹果蝇上皮细胞中却未发现（钟海英等，2020）。相反黑腹果蝇特有的肠分泌细胞具有类似分泌颗粒或多泡体的功能，它通过感知肠道内环境中各种物质的变化做出反应，例如释放激素或酶等。但关于褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 包括肠道在内的内部三维结构的研究较为深入，三维重构揭示它的中肠包含前囊和中肠袢结构，其中中肠袢为狭窄卷曲的细管结构，在中肠内部覆盖有致密的肠微绒毛，尤其是在狭窄的肠袢区（Wang *et al.*，2021）。

综上所述，通过连续切片扫描电镜三维重构技术对黑腹果蝇中肠线粒体、微绒毛、膜迷路、气孔等结构三维展示，对于其功能的研究意义重大，这是常规电镜二维观察无法替代的。并且该方法具有能够长期保存样品，重复成像以及测试成本低等特点。该方法对于后续研究黑腹果蝇中枢神经中的神经回路等不同结构具有一定参考价值。

参考文献 (References)

Berger E, Rath E, Yuan D, Waldschmitt N, Khaloian S, Allgäuer M, Staszewski O, Lobner EM, Schöttl T, Giesbertz P, Coleman OI, Prinz M, Weber A, Gerhard M, Klingenspor M, Janssen KP, Heikenwalder M, Haller D, 2016. Mitochondrial function controls intestinal epithelial stemness and proliferation. *Nature Communications*, 7 (1): 13171.

Capo F, Wilson A, Cara FD, 2019. The intestine of *Drosophila melanogaster*: An emerging versatile model system to study intestinal epithelial homeostasis and host-microbial interactions in humans. *Microorganisms*, 7(9): 336.

Ding MX, Liang FX, Hong J, Li BQ, Wang SX, Zhu P, 2021. Electron Microscope in Life Sciences. Beijing: Higher Education Press. 179–180. [丁明孝, 梁凤霞, 洪健, 李伯勤, 王素霞, 朱平, 2021. 生命科学中的电子显微镜技术. 北京: 高等教育出版社. 179–180.]

Felix B, 1996. Membrane function and structure. *Bioscience*, 12(5): 379–380.

Fukudome H, 2001. A combined sem and tem study on the basal labyrinth of the collecting duct in the rat kidney. *Archives of Histology & Cytology*, 64(3): 339–351.

Gan YL, Gong PY, 2001. Ultrastrucutures of tracheae systems of insects. Insects and Environment -Proceedings of the 2001 Academic Annual Meeting of the Chinese Entomological Society. 3–5. [甘雅玲, 龚佩瑜, 2001. 几种昆虫气管系统的超微结构. 昆虫与环境——中国昆虫学会 2001 年学术年会论文集. 3–5.]

Hao YG, Zhang WY, Jing LH, 2013. Innate immune response of *Drosophila* intestinal tract. *Immunological Jounal*, 29(9): 813–817. [郝阳光, 张玮钰, 金丽华, 2012. 果蝇肠道免疫的研究进展. 免疫学杂志, 29(9): 813–817.]

Hayakawa T, Shitomi Y, Miyamoto K, Hori H, 2004. GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori*. *FEBS Letter*, 576(3): 331–335.

Hayes MJ, Burgoyne T, Wavre-Shapton ST, Tolmachova T, Seabra MC, Futter CE, 2019. Remodeling of the basal labyrinth of retinal pigment epithelial cells with osmotic challenge, age, and disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(7): 2515–2524.

Jiang Y, Li L, Chen X, Liu J, Yuan J, Xie Q, Han H, 2021. Three-dimensional ATUM-SEM reconstruction and analysis of hepatic endoplasmic reticulum-organelle interactions. *J. Mol. Cell Biol.*, 13(9): 636–645.

Kawasaki Y, Matsumoto A, Miyaki T, Kinoshita M, Kakuta S, Sakai T, Ichimura K, 2019. Three-dimensional architecture of pericardial nephrocytes in *Drosophila melanogaster* revealed by FIB/SEM tomography. *Cell & Tissue Research*, 378(2): 289–300.

Lou ZF, Cao QJ, Feng YQ, Cai HM, Duan YB, Zhang Y, 2013. Research on effects of cadmium induced intestinal epithelial cell injury and regulation on intestinal stem cells regeneration and differentiation in *Drosophila* mid-gut. *Chinese Journal of Cell Biology*, 35(5): 602–608. [楼哲丰, 曹琼洁, 冯钰淇, 蔡慧敏, 段银波, 张岩, 2013. 镉对果蝇肠道上皮细胞损伤和调控中肠干细胞增殖、分化机制的研究. 中国细胞生物学学报, 35(5): 602–608.]

Ma Y, Chen Z, Tao Y, Zhu J, Yang H, Liang W, Ding G, 2019. Increased mitochondrial fission of glomerular podocytes in diabetic nephropathy. *Endocrine Connections*, 8(8): 1206–1212.

Ma ZH, Adilijiang Kari, Abulaiti Abduhar, 2021. Effects of energy metabolism in epithelial cells on mitochondrial pathology in inflammatory bowel disease. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion*, 29(7): 501–506. [马志华, 阿迪力江·喀日, 阿布来提·阿不都哈尔, 2021. 上皮细胞能量代谢对炎症性肠病线粒体的影响. 中国中西医结合消化杂志, 29(7): 501–506.]

Mattei AL, Riccio ML, Avila FW, Wolfner MF, 2015. Integrated 3D view of postmating responses by the *Drosophila melanogaster* female reproductive tract, obtained by micro-computed tomography scanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27): 8475–8480.

Mooseker MS, Tilney LG, 1975. Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 67(3): 725–743.

Picard M, Shirihai OS, Gentil BJ, Burelle Y, 2013. Mitochondrial morphology transitions and functions: Implications for retrograde signaling? *American Journal of Physiology*, 304(6): 393–406.

Porrati F, Grewe D, Seybert A, Frangakis AS, Eltsov M, 2018. FIB SEM imaging properties of *Drosophila melanogaster* tissues embedded in Lowicryl HM20. *Journal of Microscopy*, 273(2): 91–104.

Sandborn EB, Duclos S, Messier PE, Roberge JJ, 1967. Atypical intestinal striated muscle in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Ultrastructure Research*, 18(5): 695–702.

Shanbhag S, Tripathi S, 2009. Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and basetransport in the *Drosophila* midgut. *Journal of Experimental Biology*, 212(11): 1731–1744.

Suga M, Nisioka H, Nakamura M, Suzuki K, Ohta K, 2018. Three dimensional structure analysis of cell nuclei in mice cerebellar cortex using array tomography. *Microscopy and Microanalysis*, 24(S1): 1248–1249.

Tamamouna V, Rahman MM, Petersson M, Charalambous I, Kux K, Mainor H, Bolender V, Isbilir B, Edgar BA, Pitsouli C, 2021. Remodeling of oxygen-transporting tracheoles drives intestinal regeneration and tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, 23(5): 497–510.

Tang XD, Xue J, Mao F, 2010. A review of stem cells of fruit fly intestine. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(3): 435–438. [唐旭东, 薛建, 毛飞, 2010. 果蝇肠道干细胞研究进展. 昆虫知识, 47(3): 435–438.]

Vancamelbeke M, Vermeire S, 2017. The intestinal barrier: A fundamental role in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 11(9): 821–834.

Van Dussen KL, Stojmirović A, Li K, Liu TC, Kimes PK, Muegge BD, Simpson KF, Ciorba MA, Perrigoue JG, Friedman JR, Towne JE, Head RD, Stappenbeck TS, 2018. Abnormal small intestinal epithelial microvilli in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 155(3): 815–828.

Wacker I, Chockley P, Bartels C, Spomer W, Hofmann A, Gengenbach U, Singh S, Thaler M, Grabher C, Schröder RR, 2015. Array tomography: Characterizing FAC-sorted populations of zebrafish immune cells by their 3D ultrastructure. *J. Microsc.*, 259(2): 105–113.

Wang XQ, Guo JS, Li DT, Yu Y, Hagoort J, Moussian B, Zhang CX, 2021. Three-dimensional reconstruction of a whole insect reveals its phloem sap-sucking mechanism at nano-resolution. *eLife*, 10(1): e62875.

Wong ACN, Vanhove AS, Watnick PI, 2016. The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: Lessons from *Drosophila melanogaster*. *Disease Models & Mechanisms*, 9(3): 271–281.

Xie L, Zhen X, Yu MJ, Wang WL, Guo JS, Zhang ZK, Hong J, 2020. Imaging with backscattered electron by scanning electron microscopy for overviewing ultra-structure and for helping structural navigation. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 39(6): 707–714. [谢礼, 郑希, 于梦洁, 王伟兰, 郭建胜, 张仲凯, 洪健, 2020. 利用扫描电镜背散射电子成像进行超微结构大视野观察及辅助定位. 电子显微学报, 39(6): 707–714.]

Yao ZC, Bai S, Zhang HY, 2018. Interactions between insects and microbes. *Acta Microbiologica Sinica*, 338(6): 82–94. [姚志超, 白帅, 张宏宇, 2018. 昆虫肠道防御及微生物稳态维持机制. 微生物学报, 338(6): 82–94.]

Zhang XC, Zhang L, 2011. Observation of small intestinal mucosa of diabetic mice by scanning electron microscope. *Chongqing Medicine*, 40(28): 2815–2816. [张献彩, 张雷, 2011.糖尿病小鼠小肠黏膜扫描电镜的观察. 重庆医学, 40(28): 2815–2816.]

Zhong HY, Zhang YL, Wei C, 2020. Morphology, histology and ultrastructure of the alimentary canal of the adult mute cicada, *Karenia caelatata* (Hemiptera: Cicadidae). *Acta Entomologica Sinica*, 63(4): 421–432. [钟海英, 张雅林, 魏琮, 2020. 合哑蝉成虫消化道形态,组织结构及超微结构. 昆虫学报, 63(4): 421–432.]