



评述

以透明脑, 观澄明心——斑马鱼神经功能研究进展

尚春峰*, 穆宇, 杜久林*

中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所, 中国科学院脑科学卓越创新中心, 神经科学国家重点实验室, 上海 200031

* 联系人, E-mail: forestdu@ion.ac.cn; cfshang@ion.ac.cn

收稿日期: 2014-07-28; 接受日期: 2014-10-15

中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDB02040300)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CBA00400)、国家杰出青年科学基金(批准号: 31325011)和上海市优秀学术带头人项目(批准号: 14XD1404100)资助

doi: 10.1360/N052014-00203

摘要 斑马鱼是一种相对新颖的模式脊椎动物, 具有脊椎动物保守的神经系统构造和丰富的行为模式. 近年来随着在体电生理、光学成像、遗传工程等方法建立和完善, 幼龄斑马鱼因其脑部透明、结构简单等特点, 日益成为从突触、神经元、环路到行为等多层次, 在全脑尺度上探究神经系统功能机制的理想动物模型. 本文综述了近年来利用斑马鱼在感觉信息处理、运动控制、学习与神经可塑性等方向上所取得的重要研究进展, 并对新技术的开发提出了展望. 随着研究思路的深化和实验手段的推陈出新, 斑马鱼模式动物必将成为探索脑工作原理之利器, 为神经科学研究带来更多的突破.

关键词斑马鱼
神经系统
视觉
嗅觉
行为
学习
电生理
光学成像

从1毫米长的秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)到30多米长的蓝鲸(*Balaenoptera musculus*), 动物能迅速而灵活地响应环境变化, 做出趋利避害的反应, 这正是神经系统引人入胜之处. 神经系统负责接受和处理各种信息, 评估周围环境和自身状态, 做出有利于机体生存繁衍的行为和认知决策. 对神经系统的研究, 目的是阐明神经元及其组成的神经环路的结构和功能是如何实现复杂的认知和行为的. 经典的实验范式刻画了单个或一小群神经元的活动与动物个体行为之间的关联^[1,2], 并通过操纵性实验探究其因果关系. 然而, 人类大脑中包含数十亿个神经元^[3], 即便是小小的秀丽线虫, 也有302个神经元, 且各自具有独特的结构与联结. 由于行为与认知往往涉及群体神经元、多个脑区的协同工作, 对神经系统功能的研究也就需要大规模、并行记录多个神经元

和脑区的活动, 探究其相互间的结构和功能关联. 因此, 需要选择合适的模式动物, 其神经系统既有足够的代表性和复杂度, 又有适当的可解性, 能够充分利用目前可能的实验手段, 对群体神经元甚至全脑大部分神经元的活动, 在活体甚至清醒的动物上进行实时观察和系统分析, 斑马鱼(*Danio rerio*)就是这样一种理想的选择.

斑马鱼是一种热带硬骨鱼类, 可接受多种外界感觉信息, 具有捕食猎物、逃避天敌以及成群生活等丰富的行为. 与高等脊椎动物类似, 其神经系统包含有端脑、间脑、中脑、小脑、后脑和脊髓等基本结构. 1~2周龄的斑马鱼, 已具有成年动物的多种复杂行为和脑功能, 但其大脑相对较小, 以1周龄为例, 约为300(背腹轴)×500(左右轴)×800(头尾轴) μm^3 , 含有数万个神经元. 在10~20倍物镜下, 可观察其大脑全貌^[4];

引用格式: 尚春峰, 穆宇, 杜久林. 以透明脑, 观澄明心——斑马鱼神经功能研究进展. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 223-236

Shang C F, Mu Y, Du J L. Zebrafish swimming into neuroscience research: a visible mind in a transparent brain. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 223-236, doi: 10.1360/N052014-00203

通过透明的皮肤可清楚分辨单个神经元的形态, 从而可以实现在全脑尺度上对神经元活动进行在体电生理或光学成像记录^[5-7]; 同时, 释放其尾部以观察感觉刺激所引起的运动, 或者通过记录脊神经电活动判断其运动. 此外, 在过去 30 年来的遗传发育研究中已积累了大量的斑马鱼突变体和转基因品系; 日新月异的现代基因工程技术可以编辑特定基因, 使研究者得以标记特定的神经元类型和群体, 记录和操纵其活动. 这些技术和资源的积累为利用斑马鱼开展神经科学研究打下了坚实的基础. 基于此, 在中科院战略性先导科技专项“脑功能联结图谱计划”和美国的脑科学研究计划“创新型神经技术开展大脑研究(brain research through advanced innovative neurotechnologies initiative)”中, 斑马鱼也是一个重要实验模型. 本文将重点介绍近年来利用斑马鱼模型, 神经科学研究所取得的一些重要进展及其所带来的启迪, 并对未来的研究方向和技术创新提出展望.

1 感觉信息加工和处理

生活在复杂多变的自然界中, 接受和处理各种环境信息是动物生存、繁衍所必需的. 近年来, 在斑马鱼视觉和嗅觉系统方面所取得的研究进展, 为揭示感觉信息加工和处理的机制提供了新的线索.

1.1 视觉系统

(1) 视网膜功能. 视网膜是视觉系统接受视觉信号的第一站, 因其简单而清晰的结构一直受到神经科学家的青睐. 由于技术限制, 既往工作多在离体标本上进行. 近年来, 在斑马鱼上的研究工作, 使得研究者有机会窥探活体动物上视网膜信息处理的机制. 双极细胞(bipolar cell, BC)是视网膜神经环路中第二级神经元, 其对光反应特性是视觉信息加工和处理的重要一环. 以前普遍认为双极细胞不产生动作电位, 而是以去极化或超极化的方式来编码视觉信息. Dreosti 等人^[8]在钙指示蛋白 GCaMP2 基础上, 开发了定位到突触前的 SynGCaMP2, 将其特异性地表达在双极细胞中, 在活体斑马鱼上监测这些神经元轴突末端的神经活动. 发现, 不论是给光反应(on response, ON)还是撤光反应(off response, OFF)、瞬时活动还是持续活动, 双极细胞的轴突末都表现出

类似于动作电位的“全或无”式的快速钙活动, 且这种活动受到视觉输入的调节^[9]. 同实验室的 Odermatt 等人^[10]在双极细胞中表达了另一种荧光蛋白 SypHy, 用光学成像方法观察突触递质囊泡在细胞膜上的融合过程. 通过给予不同强度的光刺激并记录相应的突触反应, 他们发现, 不论是呈现给光反应的突触还是撤光反应的突触, 约有 1/2 表现出非线性的特点: 当光刺激强度逐渐增加时, 其反应经过一个极小值和一个极大值后方达到平台期. 分析表明, 这种非线性突触具有更大的动态范围, 可以更为有效地传递视觉信息. 进一步地, Nikolaev 等人^[11]研究了光刺激强度随时间周期性变化时双极细胞活动的适应性, 发现给光反应和撤光反应的突触均可以按照对这种高时间对比度刺激的反应特点分为几种类型, 有活动逐渐增加的, 也有活动逐渐降低的. 其中, 初始反应较强的突触其活动会逐渐降低, 而初始反应较弱的突触其活动则逐渐增强. 活动逐渐增强的突触与无长突细胞(amacrine cell, AC)的突起在空间位置上重叠, 提示后者可能是调节的来源. 光学成像记录无长突细胞对视觉刺激的反应, 发现其活动逐渐降低, 这可能导致分布在同一亚层的双极细胞所接受的反馈性抑制性输入下降, 从而使得双极细胞的反应逐渐增强, 这一推断也得到了药理实验结果的支持. 这一系列工作, 首次在活体动物上揭示了视网膜神经环路处理视觉信息的复杂性和丰富性.

Zhang 等人^[12,13]采用在体电生理记录方法, 系统地分析了视网膜视神经节细胞的功能发育. 运用全细胞膜片钳记录方法, 作者细致测量了神经节细胞在不同发育阶段的氯离子平衡电位(E_{Cl^-}), 即抑制性突触输入的反转电位, 并考察了其和对光反应之间的关系. 发现 E_{Cl^-} 在发育过程中逐渐向超极化方向偏移, 从而使得抑制性神经递质伽马氨基丁酸(γ -Aminobutyric acid, GABA)引起的反应由发育早期的兴奋性向发育晚期的抑制性转变, 这种转变的时间节点与神经节细胞对光反应的出现有很好的对应关系^[12]. 作者进一步地在同时具有 ON 和 OFF 反应的神经节细胞上, 检验了不同亚细胞部位的 E_{Cl^-} 差异^[13]. 通过记录不同树突以及胞体部位的反应, 测量局部 E_{Cl^-} , 发现在 ON 反应和 OFF 反应的树突之间、以及树突与胞体之间, 均存在 E_{Cl^-} 的差异, 而这种差异主要由钾离子-氯离子共转运体 2(K^+/Cl^- co-transporter, KCC2)的差异表达所造成. 这些工作为神经节细胞

的形态发育研究提供了功能解释.

(2) 视觉朝向选择型和方向选择型的神经环路机制. 为了实现有效的信息编码, 很多神经细胞会选择性地对感觉输入的某一特征(比如运动信息)作出反应, 这一过程称为特征检测(feature detection). 既往的研究已报道了很多特征检测神经元, 但由于实验手段的限制, 其环路机制的研究进展缓慢. 光学成像方法可以同时观察成像区域内群体神经元的形态和活动, 有助于阐释特征检测的环路机制. 斑马鱼的视觉中枢即视顶盖(optic tectum)位于斑马鱼中脑背部, 接受神经节细胞的轴突投射, 并将信息传递至下游的多个脑区, 在视觉相关行为中起关键作用. 一方面, 视顶盖中有为数众多的神经元其视觉反应具有方向选择性或朝向选择性^[14]; 另一方面, 视顶盖空间位置和相对清晰的投射结构便于光学成像, 因此, 该脑区很适合研究特征检测的神经环路机制.

根据投射关系, 可以推测视顶盖神经元的方向选择性和朝向选择性有2个可能的来源: 来自投射神经元神经节细胞, 或来自视顶盖内部的抑制性突触^[15]. 这两种机制目前都得到了实验支持. Meyer实验室在神经节细胞中特异表达定位于突触前的SynGCaMP3, 从而得以观察视顶盖区所接受的这些投射的神经活动, 发现具有不同方向选择性和朝向选择性的突触输入在空间上相互分离^[16]. 这样, 分别接受这些输入的视顶盖神经元就会产生方向选择性和朝向选择性. 该研究还发现, 大多数突触前的活动都偏好垂直或水平的朝向, 和上偏后、下偏后或向前的运动方向, 这可能与斑马鱼生活的视觉环境与行为特性有关. 该实验室进一步研究了视顶盖内部环路对于方向和朝向选择性的贡献^[17], 发现顶盖神经元按偏好方向可以分为上、下、前、后4类, 其中对向后运动的偏好明显偏离神经节细胞的反应性质, 提示顶盖内神经环路对方向信息进行了进一步地处理. 此外, 还研究了视觉剥夺对神经节细胞投射的影响, 发现黑暗环境饲养改变了神经节细胞在视顶盖投射的朝向选择性分布, 而方向选择性则不受影响^[18].

Ramdyal和Engert^[15]的工作表明, 局部抑制性突触传递对于视顶盖神经元的方向选择性是必要的, 且这些神经元所接受的抑制性输入确实具有方向选择性^[19]. 当用运动光条刺激斑马鱼时, 阈下反应中的

抑制性成分较兴奋性成分具有更强的方向选择性, 其方向偏好性与细胞阈上反应(即动作电位反应)的相反. 此外, 对于神经元偏好的方向, 抑制性突触输入的潜伏期更长; 而对于相反方向的刺激, 抑制性突触输入的潜伏期更短. 该工作提示视顶盖神经元通过不对称方式接受邻近中间神经元的抑制性输入, 从而获得方向选择性.

Gabriel等人^[20]通过遗传学操作得到了特异标记不同神经节细胞的若干斑马鱼品系, 光学成像记录发现其中2个品系各自特异标记视顶盖中一类抑制性神经元, 这2种类型神经元分别偏好自头至尾和自尾至头方向的运动刺激. 由于这2类神经元的树突在视顶盖中的分布存在明显的层次差异, 联系Meyer实验室的工作, 提示它们可能通过接受不同的视网膜输入获得了各自的方向选择性. 作者进一步发现这2类神经元接受的突触输入本身具有方向选择性, 其中兴奋性成分的选择性与细胞动作电位反应的选择性相同, 抑制性成分则偏好相反的方向. 这些工作表明, 发育过程中产生的特定投射关系使得顶盖神经元从前一级输入获得方向选择性; 进一步, 视顶盖来源的具有方向选择性的抑制性输入使得顶盖神经元的选择性更为显著.

(3) 视觉捕食行为的机制. 斑马鱼视觉行为的一个主要功能是在捕食过程中识别并追踪猎物. Bianco等人^[21]用不同大小的运动光点作为视觉刺激, 发现1度视角的光点可以引起自由游动的斑马鱼汇聚双眼并朝向光点游动, 类似于草履虫诱发的捕食行为. Trivedi和Bollmann^[22]通过闭环的方式观察到了类似的现象, 进一步支持了用这类人工刺激研究斑马鱼捕食行为神经机制的合理性. 视顶盖向运动脑区发出的投射主要位于深部, 与捕食行为相关. Del Bene等人^[23]采用不同宽度的运动光条作为刺激, 发现相对于视角16°及以上的宽光条, 窄小的刺激在该处引起的反应更强. 与此不同的是, 接受神经节输入的顶盖浅层区域缺乏对光条宽度的选择性, 提示顶盖内的神经信息处理对于深部纤维的偏好性至关重要. 结合遗传筛选的手段, 作者发现顶盖表层中有一群中间神经元表现出相反的偏好性, 对于16°以上的运动光条有着更强的反应, 提示这群神经元的抑制性输入可能造就了顶盖深部活动的选择性. 进一步, 去除或抑制这些神经元的活动, 可使顶盖深部的神经活动失去选择性, 并降低了斑马鱼的捕食能力.

这些工作显示, 具有生态学意义的视觉刺激, 与恰当的实验设计相结合, 可以在实验室中利用斑马鱼研究复杂行为的环路机制。

(4) 小胶质细胞对视觉功能的调节. 神经元的特性和功能塑造于自身膜特性和环路联结, 同时也受到神经系统中其它细胞的影响. 小胶质细胞(microglia)是中枢神经系统中重要的免疫效应细胞, 激活态的小胶质细胞参与一系列免疫反应及组织修复过程^[24-26]. 长期以来, 人们主要利用各种动物疾病模型或细胞培养系统, 研究激活态小胶质细胞的病理相关功能. 例如, 在被细菌脂多糖激活后, 小胶质细胞是如何参与到炎症反应的. 然而, 小胶质细胞的功能绝不仅在于参与免疫反应. 正常生理状态下, 小胶质细胞处于静息状态, 尽管它们不再吞噬任何细胞或组织, 却一直以非常高的频率不断地伸缩细胞突起^[27,28]. 这种静息态小胶质细胞的动态特性, 引发了人们对其正常生理功能的深入思考. 但由于实验标本的限制, 人们对静息态小胶质细胞的生理功能知之甚少. Li 等人^[5]以斑马鱼为模式动物, 发现了静息态小胶质细胞和神经元之间存在双向的功能调节. 作者同时对小胶质细胞形态变化和神经元活动进行长时程在体记录, 发现神经元活动升高后, 小胶质细胞向神经元靠近并与其胞体形成紧密接触, 形成接触后神经元活动降低, 这两组现象之间存在相关性. 进而, 人为局部增强神经元活动, 发现可以吸引小胶质细胞的突起靠拢并促进紧密接触的形成, 进而削弱被接触神经元的自发性电活动以及视觉反应. 该工作证明了神经元活动可以调控静息态小胶质细胞的运动, 并首次揭示了小胶质细胞对神经元活动的稳态调节, 为神经-免疫交叉领域提供了新的研究视角.

1.2 嗅觉系统

嗅觉负责收集和处理长距离的化学信息, 参与斑马鱼的觅食、求偶、逃生乃至洄游等重要行为.

(1) 嗅球信息编码. Friedrich 从 20 世纪 90 年代中期开始利用斑马鱼研究神经系统的功能, 其工作主要集中在嗅球感觉信息的编码^[29-32]. 环境中的感觉信息丰富多样, 并且经常发生连续的变化. 动物的感知一方面能区别不同刺激对象, 实现模式之间的去相关; 另一方面又能够在复杂多变的背景噪声中保持稳定性, 从不同的呈现方式中识别出同一对象,

实现反应模式的均等化, 这就是类型感知(categorical perception)^[33,34]. Niessing 和 Friedrich^[35]利用斑马鱼嗅球研究了这一现象. 他们观察成年斑马鱼嗅球的主要神经元僧帽细胞(mitral cell)对氨基酸嗅觉刺激的反应. 当施加单一一种类的氨基酸时, 僧帽细胞群体活动对刺激浓度的逐渐改变并不敏感, 始终呈现一致的稳态反应. 把 2 种不同的氨基酸进行混合, 并且逐渐改变其混合比例, 僧帽细胞群体的稳态反应在某一混合比例附近突然发生切换. 这一发现表明, 嗅觉处理的早期区域嗅球中即存在类型感知. 进一步分析揭示, 稳态反应的突然变化是由一小部分僧帽细胞实现的, 提示嗅球可通过不同僧帽细胞活动之间的组合实现对外界众多嗅觉对象的类型感知, 这吻合于嗅觉编码多种化学信息的特点. 在此基础上, 该实验室研究了类型感知的环路机制. Wiechert 建立的理论框架, 把高维空间中的模式去相关严格对应到神经元和神经环路的性质上, 发现神经元反应的非线性特性辅以神经元间交互连接的放大作用, 就可以在随机网络中实现模式去相关; 相应地, 对嗅球中联结图谱的测绘则支持该脑区可能应用了这种机制^[36]. 对于类型感知的另一方面, 模式均等化, 同实验室的 Zhu 等人^[37]研究了嗅球中表达启动子 *dlx4/6* 的一类中间神经元的作用, 发现这些神经元除了发出抑制性化学突触到僧帽细胞, 还通过电耦合通道与后者发生联系. 当接受氨基酸刺激时, *dlx4/6* 中间神经元自身产生兴奋性反应, 且随刺激浓度线性增加. 当刺激强度较低时, 反应为阈下水平, 不能产生抑制性突触传递, 但可以通过电耦合把兴奋性活动传递到僧帽细胞, 从而增强后者的活动. 当刺激强度较高时, *dlx4/6* 神经元产生阈上反应, 发放动作电位, 在僧帽细胞上产生抑制性突触输入, 这种抑制性作用超过电耦合的兴奋性作用, 从而降低僧帽细胞的活动. 通过这种机制, *dlx4/6* 神经元降低了僧帽细胞对高、低浓度嗅觉刺激所引起反应的差异, 实现了反应模式的均等化, 也扩大了信息传递的动态范围.

(2) 高级脑区的嗅觉信息处理.

(i) 前脑的嗅觉信息处理. 斑马鱼嗅球主要投射至背侧前脑后部(Dp)、缰核和后侧结节^[38], 其中前 2 个脑区在近年来得到了较多关注. 嗅球中主要的输出神经元是僧帽细胞, 这些细胞的嗅觉反应在 20 Hz 附近存在同步活动, 可能代表了一种时域编码形式. 当被某一刺激激活的神经元在空间上呈弥散

分布时, 则可以通过这种同步活动组织起来. 但是该动态特征跟嗅觉刺激的特征之间并没有明显的关联, 其功能意义不清楚. 为了阐明这种同步活动在信息传递中的作用, Blumhagen 等人^[39]选择性地驱动任意一组僧帽细胞的同步活动, 调节它们之间同步性的强弱, 同时记录 Dp 神经元的活动. 发现, Dp 神经元的确受到僧帽细胞活动的支配, 但是仅限于低频范围, 20 Hz 的活动不论同步性多强, 都不能传递到 Dp 神经元, 也不影响其对食物的嗅觉反应. 进一步的实验表明, 低频活动和嗅觉重要信息提取中表现出的选择性, 源自 Dp 神经元膜的被动特性.

(ii) 缰核的嗅觉信息处理. 斑马鱼嗅觉另一个重要的投射脑区是缰核(habenula). 该核团被认为与边缘系统关系密切, 但是感觉信息如何支配其活动并不清楚. 近年来斑马鱼上的几项工作对这个问题进行了探讨. 从嗅球到缰核的投射, 都终止于右侧缰核^[40]. 右侧缰核与左侧缰核在大小、神经联系和化学分子表达上都存在很大差异. Dreosti 等人^[41]通过发育早期的药理学操作获得左、右缰核形态反转的斑马鱼. 在这些斑马鱼上, 嗅觉输入依然投射到“右侧形态”的缰核, 相应地视觉输入则投射到“左侧形态”的缰核, 彼此空间位置发生了反转, 提示缰核中左、右不对称的神经联结对于斑马鱼的感觉行为有重要意义. Jeti 等人^[42]在神经元水平上研究了缰核环路中嗅觉信息的表征, 通过变换多种嗅觉刺激, 发现该处神经元可以根据对这些刺激的微弱选择性分为若干组, 每组神经元在空间上聚集成簇. 当没有嗅觉刺激时, 这些神经元的自发活动表现出组内神经元之间的相似性. Krishnan 等人^[43]的工作则研究了缰核神经元对同一刺激以不同浓度出现时的反应情况. 发现施加胆酸刺激时, 左、右缰核的腹侧部分反应显著, 背侧部分则表现出左、右不对称性, 与前述报道一致. 当改变胆酸浓度时, 缰核的反应强度随刺激强度增加, 但没有明显的模式均等化现象. 这些工作揭示了缰核结构与信息处理的复杂性, 提示进一步明确其细胞类型与突触联结的差异, 对于理解缰核功能有着重要意义.

(iii) 对伤害性物质的嗅觉反应. 鱼类的嗅觉行为中, 对伤害性物质的研究是一个由来已久的课题^[44-46]. 这种物质来自于破损皮肤的提取物, 能诱发鱼类多种强烈的恐惧反应, 但其主要成分一直不清楚. Mathuru 等人^[47]使用生化分馏方法从中得到了

多糖软骨素, 发现这一成分可以有效地诱导斑马鱼冲窜、降速、下潜等主要恐惧反应. 进一步的光学记录发现多糖软骨素可以在嗅球的背内侧后部引起反应, 为进一步了解恐惧反应的神经机制提供了线索.

1.3 跨模态的感觉信息整合

在自然环境中, 与动物生存繁衍相关的感觉对象复杂多变, 远不是运动光条或者单一气味所能代表的, 通常还处在更具动态性的背景中, 这就需要动物个体尽可能多地收集信息以便恰当地进行识别与编码, 跨模态的多感觉整合(multisensory integration)就是其中一种策略^[48]. 已知斑马鱼的嗅觉可以调节其视觉功能, 这种作用甚至在嗅球和视网膜的层次就已出现^[49]. Esposti 等人^[50]详细研究了其中的机制. 通过对在体斑马鱼视网膜活动进行光学成像, 在给予视觉刺激的同时施加食物刺激蛋氨酸, 发现叠加的食物刺激能够降低视网膜中 OFF 通路对视觉刺激强度和时间的对比度变化的反应, 同时提高其敏感性, 但对 ON 通路没有明显影响. 这种调节作用由多巴胺能神经调质信号所介导. 这与人报道的形态学结果相一致: 嗅球到视网膜的终端神经(terminal nerve)投射到含有多巴胺的内网状层.

除了觅食, 还需躲避天敌, 动物才能维持生存繁衍. 斑马鱼逃跑行为中研究较多的是听觉刺激诱发的 C 形快速逃跑行为(fast-start C-shape escape)^[51], Fetcho 团队^[52,53]的经典工作探明了其环路机制, 但是在更复杂环境下的逃跑行为尚不清楚. Mu 等人^[6]发现, 在听觉信号之前施加闪光刺激, 使动物处于一种警觉状态, 可以显著提高幼年斑马鱼的逃跑概率. 采用相同刺激, 在活体斑马鱼上进行的电生理记录研究了其中的环路机制, 发现闪光刺激对听神经活动和听神经到运动命令神经元 Mauthner 细胞的突触传递两方面进行调节, 从而有效地增强了 Mauthner 细胞的听觉反应, 提高了 C 形逃跑的灵敏度和准确性. 有意思的是, 闪光刺激的这一作用也是由多巴胺能投射所介导的, 激光损毁含有多巴胺能神经元的后侧下丘脑可阻断这一作用. 这类由调质系统介导的跨模态整合可能代表了一种普遍的规律, 神经调质系统通过相对粗疏但灵敏的方式感受机体内、外环境的变化, 进而相应地对感觉-运动通路多个环节的神经信号传递进行调节, 使得动物有选择性地处理和响应一些更有生存意义的刺激, 从而更好地适应

环境,有利于生存和进化。

2 运动控制的规则

2.1 运动相关神经网络的构筑

Fetcho 是斑马鱼神经系统生理功能研究的先驱之一。他的实验室率先在斑马鱼上实现了神经活动的光学和电生理记录,阐明了后脑 Mauthner 细胞及同源神经元在介导机械刺激诱发的 C 形逃跑中的作用^[52,53]。近年来,他们和其他实验室合作通过结合光遗传学、电生理学、药理学等手段,研究了运动前神经元群在运动控制中的募集和组织过程。McLean 和 Fetcho 在参与控制运动的脊髓兴奋性中间神经元内表达可以光转化的荧光蛋白 Kaede,并在斑马鱼出生后逐日进行光转化,这样在光转化前、后分化出的中间神经元呈现不同颜色。通过这种方式,他们发现,在发育过程中,控制大幅度快速运动的神经元分化早于控制慢运动的神经元。相应地,幼年斑马鱼的游动更早表现出快速成分,在电生理上也更早地记录到控制快速运动的神经元^[54]。

进一步的工作详细研究了后脑运动控制神经环路的结构和功能空间排布。Kinkhabwala 等人^[55]在谷氨酸能兴奋性神经元和甘氨酸能抑制性神经元中分别表达红色和绿色荧光蛋白,并用免疫组化方法观察到若干重要转录因子在这 2 类神经元中的特异表达。在冠状截面上,谷氨酸能神经元和甘氨酸能神经元从中线向外呈矢状交错排列,形成若干平行于背腹轴的条带,每个条带上表达特定的转录因子。通过对若干细胞形态的三维重构,发现同一条带中的神经元树突与轴突具有类似的形态和投射方向,同一条带神经元存在腹先背后的分化顺序。进一步测量细胞的膜被动特性,发现同一条带内神经元的输入阻抗、轴突长度、所介导的运动速度均线性依赖于该神经元所处的背腹位置:腹侧神经元轴突更长,输入阻抗更低,自然能更快地传导神经冲动,与介导的更高运动速度相一致。Koyama 等人^[56]鉴定了不同中间神经元在 Mauthner 细胞介导的逃跑行为中的作用。此前在金鱼上的工作发现,逃跑环路附近有多种中间神经元,它们以不同方式影响 Mauthner 细胞的活动。在绿色荧光蛋白标记甘氨酸能中间神经元的转基因斑马鱼上,Koyama 等人^[56]根据突触联结位置差异,局部电转红色染料以标记不同群体的中间神经

元,并成对记录所标记的中间神经元和 Mauthner 细胞,确认其突触联结类型。发现同一冠状截面上不同条带内,其神经元分别从特定方面调节 Mauthner 细胞的活动。该系列工作从发育、形态、结构到功能对运动控制神经网络进行了全景式细致描绘。

2.2 运动神经元的激活顺序

脊髓运动神经元是控制肌肉、产生游动的最后一级神经元。Bagnall 和 McLean^[57]利用在体膜片钳记录,在毫秒级的精细时间尺度上,分析支配某一体节肌肉的运动神经元彼此间活动的同步性。前人研究已知分别控制左、右侧肌肉是动物游动所必需的。他们发现,控制同一体节肌肉的运动神经元,根据所控制肌肉的左、右及背、腹位置可分为 4 组,只有同组神经元才接受同步的突触输入(兴奋性和抑制性皆如此),即这 4 组肌肉可以被分别控制,背、腹侧肌肉的分别控制对于斑马鱼调整身体姿势至关重要。

Marina 实验室利用从成鱼脑分离出的脑干和脊髓标本,发现同一功能柱内的运动神经元按照所支配的肌肉类型分为 4 群,当刺激运动神经诱发运动时,这 4 群神经元会按照从腹到背的顺序,在从低频到高频的运动中渐次激活。从腹侧到背侧,神经元胞体逐渐增大,这一顺序符合肌肉激活的大小原则:较小的运动神经元控制较弱的肌肉,在收缩力由弱渐强时更早被激活^[58]。这个在离体标本上观察到的现象,被 Menelaou 和 McLean^[59]在活体幼年斑马鱼上的实验所证实。他们不仅发现这些运动神经元存在从腹侧到背侧的激活顺序,还发现沿此方向存在内在节律性逐渐降低、外来驱动逐渐增强的趋势,结合 Koyama 等人的工作^[56],提示斑马鱼运动受到复杂而严密的神经网络调控。

2.3 运动信息的编码方式

神经编码的一个基本问题是,神经信息是由一小群神经元独立编码(即稀疏编码),还是依靠大量神经元的活动的不同模式来编码(即群体编码)? Engert 实验室的系列工作研究了编码不同运动的神经元在空间上如何排布这一基本问题。Douglass 等人^[60]用光遗传学的手段研究了斑马鱼后脑把躯体感觉转换为运动输出的神经元,通过光遗传学刺激诱发这些神经元的动作电位发放,发现单个神经元上的少数几个动作电位即可诱发逃跑行为,提示可能存在稀疏

编码方式. Huang 等人^[61]用视觉刺激诱导了斑马鱼的趋光反应、视动反应和暗场下大幅转向行为, 仔细分析了其运动过程中各时相的位移、转向等参数. 损毁后脑腹内侧向脊髓投射的神经元, 在各种运动中都会特异地抑制转向行为, 并且增加向前游动的行为, 提示这些神经元负责普适性地把前向运动转化为转向. Orger 等人^[62]利用视动(optomotor)模型研究了负责不同行为的神经元是如何分布的. 他们给予斑马鱼幼鱼以全场的运动光栅刺激, 通过反馈控制使斑马鱼始终感受到同一方向的刺激, 从而诱发稳定的转向行为. 结果发现, 斑马鱼轨迹依赖于光栅方向和鱼体轴的夹角. 利用双光子成像技术, 记录后脑向脊髓投射的绝大部分神经元的活动, 发现有不同的神经元分别与前游、左后转、右后转等运动相关, 这些神经元在空间上彼此分隔. 这一发现支持了稀疏编码机制.

关于运动神经元活动的有序结构是如何出现的, Warp 等人^[63]进行了发育方面的研究. 通过记录脊髓运动神经元群体的活动模式, 发现在受精后 18~20 h 有一个迅速的转变, 从零星散布的慢发放模式过渡到同侧神经元间正相关、对侧神经元间反相关的快发放模式. 进一步地, 光遗传学实验考察了细胞活动之间的关联. 在受精 20 h 后, 抑制某一运动神经元会造成同侧邻近的运动神经元活动降低, 提示它们之间联系的加强. 如果用光刺激抑制转变之前的零星发放, 则会影响之后有序模式的建立.

2.4 眼动控制的神经机制

斑马鱼的重要视觉对象, 如食物和天敌等, 多为运动物体. 为了追踪这些对象, 斑马鱼需要保持运动刺激在视网膜上的位置, 这是通过眼动反应(optokinetic response)和视动反应来实现的. 在眼动反应中, 面对运动的光栅, 斑马鱼的眼睛会随之转动. Baier 实验室在全脑大部分神经元中广泛表达 NpHR, 通过逐步抑制不同脑区的活动, 发现第五菱脑节是眼动反应所必需的. 相应的充分性验证也表明激活这个脑区足以引起眼动反应^[64]. 为研究这一行为中感觉信息如何实现到运动信息的编码, Kubo 等人^[65]用光遗传学方法, 发现顶盖前区神经元的活动对于眼动发生是必要的, 人为诱发顶盖前区活动也能诱导出眼动. 作者进而用双光子成像方法记录整个顶盖前区的神经元对于水平转动光栅等刺激的反应,

发现该区域可以根据神经元对刺激的偏好性, 如平动或转动、转动的不同方向、单眼还是双眼输入, 分为空间分离的若干脑区, 并据此提出了一个有待实验证明的神经环路模型.

在眼动过程中, 为实现稳定的视觉追踪, 斑马鱼需要整合眼睛运动的速度信息来估计其当前位置. 位于后脑舌下前置核的神经元, 在每次发生眼动后即改变放电频率到相应的水平, 其后可维持长达数秒的活动平台期. 形态上, 这些神经元的树突接受编码眼动速度信息的输入. 推测该核团有可能实现了眼睛运动信息的整合, 但环路机制尚不清楚. 已有的理论模型间的主要差异在于每次眼动发生后, 整合神经元活动维持的时间常数的异同^[66-68]. 因此, 系统测量舌下前置核神经元群体的活动维持时间常数是明确环路机制的关键. Miri 等人^[69]在清醒的幼年斑马鱼上进行光学记录, 并同时观察其自发眼动, 发现这些神经元的活动维持时间常数存在明显的不一致性, 从而否定了线性吸引子模型的假设. 进一步地, 根据光学记录得到的神经元空间位置信息, 分析了成对神经元活动相关性与空间距离的关系, 发现彼此间距越小的神经元对, 其活动越相似, 维持时间常数也更接近, 从而支持了交互网络模型机制. 神经活动相关性、维持时间常数沿背腹轴和头尾轴的变化则暗示拓扑投射的存在. 参照 Fetcho 实验室的结果^[54-56], 提示发育过程和激活顺序上可能存在对应的差异.

3 学习和神经功能可塑性

无论在发育中还是成年后, 动物需要适应不同的生活环境, 面对同样的刺激需要采取不同的行动, 这就需要对旧有的信息处理机制和行为决策做出调整, 也就是学习过程. 神经系统的结构和功能的可塑性则是学习的神经基础. Schuman 实验室的 2 项工作研究了条件性学习的神经机制. Aizenberg 和 Schuman^[70]把运动光点刺激(条件性刺激)和躯体触碰的机械刺激(非条件性刺激)配对反复施加, 显著增强了单独施加光刺激诱发原本由机械刺激引发的鱼尾摆动的概率. 作者同时观察了斑马鱼小脑的群体神经元活动, 发现分别存在对视觉刺激和机械刺激反应的神经元, 二者在空间上相对分离; 而反复施加配对刺激则显著增强视觉反应, 提示小脑参与这一学

习过程. 激光局部损毁实验则证明, 小脑的作用在于学习而非已获得记忆的存储. 在 Hinz 等人^[71]的后续实验中, 发现斑马鱼幼鱼学会把某个空间位置和同类的存在联系起来, 从而产生对该位置的偏好性. 这种偏好性甚至在较长时间内(36 h)克服了斑马鱼幼鱼的趋光行为, 说明形成了一种长期记忆, 学习过程对蛋白质合成的依赖性也支持了这一结论.

动物更偏向于学习对于个体生存繁衍有重要意义的感觉信息, 逃避风险就是其中一种. 来自 Okamoto 实验室的两项工作研究了恐惧学习的机制. Aoki 等人^[72]发现前脑区域在操作性的主动回避学习中起作用. 在实验中, 成年斑马鱼身处分两半的鱼缸中, 需要在红光闪烁后从原本栖身的一侧转入另一侧以躲避电击伤害. 光学记录结果显示, 前脑背侧部分区域神经元原本对红光无反应, 但在学习完成 24 h 内出现了明显的反应性. 损毁该脑区则影响已学会内容的提取, 但是不妨碍完成新的学习任务, 表明其红光反应可能涉及记忆的提取. 进一步地, 如果学习规则发生转换, 前脑的活动区域相应地发生转移, 提示其中可能存在着功能图谱. 动物的学习能力也受到众多因素的影响. 如果动物事先经受了无法逃避的严重伤害, 则不能学会逃避, 表现出所谓习得性无助. 背侧缰核作为情绪调节的关键脑区, 被认为参与到学习能力的丧失当中. Agetsuma 等人^[73]特异性阻断背侧缰核外侧核(dHb_L)神经元的突触输出, 对斑马鱼的运动能力没有影响. 但是, 在重复进行条件性恐惧学习时, 对照组斑马鱼会从初期的战栗反应转变到学会后的逃跑反应, 而 dHb_L 失活的斑马鱼则一直做出战栗反应, 类似于习得性无助. Lee 等人^[74]在幼年斑马鱼上也发现, 去除缰核神经元活动可以阻断斑马鱼的恐惧学习.

神经可塑性, 即经验依赖的神经环路结构或/和功能修饰, 是动物学习的神经基础, 其在突触层次研究得很深入, 对突触传递长时程增强(long-term potentiation, LTP)的研究尤为详尽. 然而, 由于外周感受器官如视网膜被认为需要把外界环境信息忠实地传递到中枢, 其内部突触传递是否具有可塑性尚无定论. Wei 等人^[7]在活体斑马鱼上研究 LTP 是否存在于发育期的视网膜. 结果发现, 在受精后 3~6 天的斑马鱼上, 高频电脉冲刺激能够在双极细胞到神经节细胞的兴奋性突触上诱导 LTP, 而在 15~20 天的动物上则不能. 通过进一步的功能实验, 作者发现重复

的光刺激也能在同一级突触上诱导 LTP, 并且由电刺激和不同模式的光刺激诱导产生的 LTP 都能有效增加神经节细胞的对光反应. 由此推测, 一方面视网膜和其它脑区一样在发育过程中可能受到感觉经验的影响而产生可塑性变化; 另一方面, 在相对成熟后视网膜环路逐渐失去可塑性能力, 从而稳定地编码视觉信息.

Valente 等人^[75]同样关注发育过程中的学习. 他们发现条件性学习和操作性学习的能力与斑马鱼发育程度有相关性. 在条件性学习中, 斑马鱼需要在视觉刺激与随后出现的电击之间建立联系; 在操纵性学习中, 斑马鱼需要移动自身位置逃避电击. 通过连续训练, 发现成功的条件性学习出现在受精后第 4 周. 从不同批次中选取各个发育阶段的斑马鱼进行操纵性学习, 发现第 3 周是学习成功实现的开始. 考虑到 7 天大的斑马鱼即可进行视觉检测并有行为反应, 该工作提示学习过程中需要多个脑区的协调. 当然, 这一结果也有可能受到了实验范式所限, 未能充分发掘幼年斑马鱼的学习能力. 值得注意的是, 并非所有斑马鱼都在同一时间开始具有学习能力, 有少数个体在 10 天左右即表现出学习能力, 提示可以通过预筛选, 挑选出学习能力强的幼年个体进行相关的神经机制实验.

4 新技术的发展和需求

虽然用斑马鱼作为模型的神经系统功能研究的历史并不长久, 但现有工作已充分显现出其蓬勃生机和潜力. 斑马鱼模型的独特性, 使得研究人员可以综合多种交叉手段, 在全脑尺度上, 在活体甚至清醒的标本上研究脊椎动物基本的感觉-运动与认知过程的突触机制, 剖析其背后完整的神经环路. 这一方面需要充分发挥现有实验手段的潜能, 另一方面也将催生新的研究方法.

4.1 观察神经活动的探针

前述大量工作已经显示了光学成像方法在斑马鱼研究中的优势和重要性, 这些工作都依赖于钙离子指示剂把神经活动转化为光信号, 尤其是 GCaMP. 通过遗传工程的改造, GCaMP 系列钙指示剂目前已经升级到 GCaMP6, 可以检测到单个动作电位相关的钙信号, 大大超过以前使用较多的 GCaMP3 的灵

敏度^[76]。即便如此,其信号变化的半衰期仍长达数百毫秒,远不能反映神经冲动的毫秒级的信号变化。此外,钙离子浓度变化并不总是与神经活动相关,直接测量电压信号则是更优选择。斑马鱼标本的特点使得在体膜片钳记录包括成对记录并不困难,但面对记录群体神经元活动的要求时,还需要借助光学手段,这就要求开发出把跨膜电位信号直接转变为光学信号的指示剂。最近,斯坦福大学 Lin 实验室和 Schnitzer 实验室分别开发了这样的工具,它们均可以线性地反映从静息膜电位以下到零毫伏的电压信号,并在数百赫兹的频率上跟随膜电位变化^[77,78]。如果能顺利移植到斑马鱼体系中,这种新型工具必然会揭示出神经信息处理的时间细节,使我们得以了解群体神经元信息编码的机制。

对神经环路功能的解析,很重要是基于对其中不同神经元类型的了解,用它们各自的结构和功能特征来解释其生理功能。这一方面需要有恰当的遗传学、化学手段来识别、标记不同类型的神经元,另一方面需要从光学记录中对其进行区别。一种可能就是采用不同频段的荧光信号记录不同类型神经元的活动,Looger 实验室通过对 GCaMP 和荧光蛋白 mRuby 进行改造,得到了蓝色、青色、黄色、红色的钙指示剂,为这个方向的技术发展提供了基础^[79]。

4.2 新兴光学方法的应用

斑马鱼小巧透明的脑非常适合进行全脑尺度上的细胞水平的神经功能成像。前面已经提及多项工作应用激光共聚焦或双光子显微镜,在单个核团甚至全脑实现了这种记录^[43,65,80]。近年来开发的光片照明显微镜(light sheet microscope, 或 selective plan imaging microscope)则为这种策略提供了更好的手段^[81]。通过将激光聚焦至数微米厚的薄片,即所谓光片照明,结合垂直于光片方向上的逐帧采集,可以在最短 10 ms 内采集一个光学层面,其成像速度快于激光共聚焦或双光子成像 2~3 个数量级。如果实现样品相对照明光片和物镜在 Z 轴方向的移动,就能够快速完成三维扫描。由于只有成像层的细胞被照明,从而极大减少了光漂白的影 响。利用此技术, Ahrens 和 Keller 研究组得以在 1.3 s 内完成一次斑马鱼全脑扫描,对斑马鱼大脑 80% 的神经元进行了钙离子成像,获得单细胞分辨率的全脑活动图谱^[4]。Panier 等人^[82]则以 4 Hz 的频率记录了斑马鱼脑中约 25000 个神经

元的活动。该方法的建立大大鼓舞了神经科学家, BRAIN Initiative 计划的倡导者 Yuste 说:“这相当引人瞩目,说明记录动物全脑神经元的活动决非空谈。”^[83]

4.3 遗传学操纵方法

遗传学操纵方法为神经科学研究提供了有力的工具^[84]。斑马鱼可以每周产卵数百颗,且发育快速,很适合于应用遗传学方法。然而,与传统模式生物相比,斑马鱼模式动物的遗传操纵工具与资源尚不够丰富。在最近几年中,随着越来越多研究者的加入,以及基因操纵技术的发展,这一情况已得到极大的改善。传统的斑马鱼遗传操纵多基于正向遗传学(forward genetics)筛选,延续这一趋势,以北京大学张博研究组与林硕研究组、日本国立遗传研究所 Kawakami 实验室为代表,研究者借助 Tol2 转座酶介导的随机插入,利用增强子诱捕和基因诱捕(gene trap)方法将报告荧光蛋白 GFP 与工具分子 GAL4 随机插入到基因组中,经过大量筛选后建立资源库^[85,86]。

正向策略有 2 方面的劣势:(i) 突变存在不定向性,工作量大;(ii) 往往受到功能冗余基因的干扰,不容易获得可观察的突变表型^[87]。因此,最近几年的技术开发逐渐转向反向遗传学(reverse genetics),希望通过操纵特定目标基因来研究其功能。2008 年,研究者利用基于锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)的方法成功敲除了斑马鱼中的靶基因^[88,89],但是靶点选择的局限性使得这一方法推广不易。2011 年,张博研究组与林硕研究组开发了基于转录激活因子类似效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)的基因改造技术,首次在斑马鱼上对内源基因进行了突变^[90]。他们首次在斑马鱼上实现了基因敲入,将编码增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的 DNA 序列精确插入到基因组的靶位点上,并得到了稳定遗传的品系;但由于插入方式和位点的原因,EGFP 不能正常表达^[91]。

最近出现的常间回文重复序列丛集/常间回文重复序列丛集关联蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/CAS9)技术,采用 RNA 而非蛋白质识别切割位点,进一步简化了实验操作,加上该

系统极高的切割效率, 使之得到了极快的发展^[92]. 李佳等人利用并改进了该技术, 已成功地在斑马鱼模型上建立了高效的基因敲入技术, 用于标记多种类型的神经元, 并对其神经活动进行记录和操纵(未发表结果).

4.4 病毒介导的跨突触标记

利用遗传操纵可以特异地观察和操控某一类具有相似基因表达特性的神经元群体, 从而窥视不同神经元类型的反应差异, 进而推断环路机制. 神经环路的关键在于其具体的连接方式. 一方面, 同类型的神经元因为上、下游联系不同其功能必然存在差异; 另一方面, 神经信息的存储也依赖于特定环路中的联结形式. 以往对神经联结的了解依赖于各种局部刺激的功能实验和神经元形态的重构. 近几年来, 在小鼠(*Mus musculus*)模型上已成功建立了利用改造的狂犬病毒进行跨突触标记的技术, 可以在活体动物上追踪神经元的上下游投射关系, 并在特定神经元表达光学记录和光遗传学操纵工具, 对其相应的上、下游联结进行生理记录和操纵^[93]. 杜久林研究组与徐富强研究组的杜旭飞、何晓斌等人(未发表结果), 通过对这一技术的改进, 已初步实现了在斑马鱼系统上的神经环路形态追踪.

5 结语

斑马鱼作为一种新兴的脊椎模式动物, 近年来在神经系统功能研究中的应用呈蓬勃发展之势. 其独特的优势可以充分发挥现有实验手段, 破除以前研究受到的诸多限制, 系统地探究神经科学中一些基本问题. 基本的感觉运动环路的研究已进行得颇为深入, 感觉-运动的转换和认知相关行为方面的研

究则尚在初期. 在研究中应特别注意的是, 之前在高等脊椎动物上的研究多局限于某一脑区, 发挥斑马鱼的研究优势则需要充分考虑复杂网络的协作和全脑尺度上的把握, 而非简单的层级模型, 不宜照搬原有的实验范式. 比如, 从感觉输入到运动输出之间的神经信息加工和处理, 可能受到动物个体内在与外在的多种扰动. 内在因素包括经验、脑状态的改变、个体功能差异、甚或消化、循环和免疫等跨系统的调节; 而外在的可包括昼夜/季节节律、群体或孤立的状态等. 统筹考虑这些因素, 设计简单可行的实验, 充分发挥在体和全脑尺度的研究优势, 斑马鱼模型必将在系统神经科学研究中扮演重要的角色.

实现脑科学研究计划的核心内容, 基本策略可概括为 3 步: 描述——记录单个神经元的形态和活动、神经元间的联结、群体神经元的活动; 操控——上调或者下调环路中特定神经元的活动, 分析对环路和认知行为的影响; 理解——根据前两个阶段的实验结果建立理论框架, 深化对脑结构和功能的理解. 目前国际范围内, 斑马鱼脑功能研究已有一个很好的开端, 特别是多种活体研究方法已逐步建立和成熟, 这为充分发挥斑马鱼模型的优势来剖析脑功能提供了基础.

这个年轻而蓬勃的研究领域, 尚需规范的理论框架来整合越来越多的研究者的努力. 以斑马鱼神经系统为研究对象的愉悦之处在于, 可同时把握住其小巧的“头”——多种形式的感觉输入, 流线形的“尾”——运动功能输出, 以及“头”、“尾”之间扑朔迷离的神经系统工作原理. 同时, 研究者们将充分利用斑马鱼“透明”神经系统结构, 观察并揭示其功能. 斑马鱼全脑功能的解析对人类智力基础的认识, 将提供新的契机!

致谢 感谢上海中医药大学顾珊焯博士对本文遗传学操纵部分的审读和修订意见. 由于篇幅限制, 本文未能覆盖相关领域的所有文献, 特对其他作者表示歉意.

参考文献

- 1 Barlow H B. Single units and sensation: a neuron doctrine for perceptual psychology? *Perception*, 1972, 1: 371-394
- 2 Parker A J, Newsome W T. Sense and the single neuron: probing the physiology of perception. *Annu Rev Neurosci*, 1998, 21: 227-277
- 3 Azevedo F A, Carvalho L R, Grinberg L T, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically

- scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*, 2009, 513: 532–541
- 4 Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, et al. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Methods*, 2013, 10: 413–420
 - 5 Li Y, Du X F, Liu C S, et al. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity *in vivo*. *Dev Cell*, 2012, 23: 1189–1202
 - 6 Mu Y, Li X Q, Zhang B, et al. Visual input modulates audiomotor function via hypothalamic dopaminergic neurons through a cooperative mechanism. *Neuron*, 2012, 75: 688–699
 - 7 Wei H P, Yao Y Y, Zhang R W, et al. Activity-induced long-term potentiation of excitatory synapses in developing zebrafish retina *in vivo*. *Neuron*, 2012, 75: 479–489
 - 8 Dreosti E, Odermatt B, Dorostkar M M, et al. A genetically encoded reporter of synaptic activity *in vivo*. *Nat Methods*, 2009, 6: 883–889
 - 9 Dreosti E, Esposti F, Baden T, et al. *In vivo* evidence that retinal bipolar cells generate spikes modulated by light. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 951–952
 - 10 Odermatt B, Nikolaev A, Lagnado L. Encoding of luminance and contrast by linear and nonlinear synapses in the retina. *Neuron*, 2012, 73: 758–773
 - 11 Nikolaev A, Leung K M, Odermatt B, et al. Synaptic mechanisms of adaptation and sensitization in the retina. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 934–941
 - 12 Zhang R W, Wei H P, Xia Y M, et al. Development of light response and GABAergic excitation-to-inhibition switch in zebrafish retinal ganglion cells. *J Physiol*, 2010, 588: 2557–2569
 - 13 Zhang R W, Zhang S Y, Du J L. KCC2-dependent subcellular E(Cl) difference of ON-OFF retinal ganglion cells in larval zebrafish. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 103
 - 14 Niell C M, Smith S J. Functional imaging reveals rapid development of visual response properties in the zebrafish tectum. *Neuron*, 2005, 45: 941–951
 - 15 Ramdya P, Engert F. Emergence of binocular functional properties in a monocular neural circuit. *Nat Neurosci*, 2008, 11: 1083–1090
 - 16 Nikolaou N, Lowe A S, Walker A S, et al. Parametric functional maps of visual inputs to the tectum. *Neuron*, 2012, 76: 317–324
 - 17 Hunter P R, Lowe A S, Thompson I D, et al. Emergent properties of the optic tectum revealed by population analysis of direction and orientation selectivity. *J Neurosci*, 2013, 33: 13940–13945
 - 18 Lowe A S, Nikolaou N, Hunter P R, et al. A systems-based dissection of retinal inputs to the zebrafish tectum reveals different rules for different functional classes during development. *J Neurosci*, 2013, 33: 13946–13956
 - 19 Grama A, Engert F. Direction selectivity in the larval zebrafish tectum is mediated by asymmetric inhibition. *Front Neural Circuits*, 2012, 6: 59
 - 20 Gabriel J P, Trivedi C A, Maurer C M, et al. Layer-specific targeting of direction-selective neurons in the zebrafish optic tectum. *Neuron*, 2012, 76: 1147–1160
 - 21 Bianco I H, Kampff A R, Engert F. Prey capture behavior evoked by simple visual stimuli in larval zebrafish. *Front Syst Neurosci*, 2011, 5: 101
 - 22 Trivedi C A, Bollmann J H. Visually driven chaining of elementary swim patterns into a goal-directed motor sequence: a virtual reality study of zebrafish prey capture. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 86–86
 - 23 Del Bene F, Wyart C, Robles E, et al. Filtering of visual information in the tectum by an identified neural circuit. *Science*, 2010, 330: 669–673
 - 24 Graeber M B. Changing face of microglia. *Science*, 2010, 330: 783–788
 - 25 Hanisch U K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 2007, 10: 1387–1394
 - 26 Ransohoff R M, Cardona A E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 2010, 468: 253–262
 - 27 Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 752–758
 - 28 Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science*, 2005, 308: 1314–1318
 - 29 Friedrich R W. Mechanisms of odor discrimination: neurophysiological and behavioral approaches. *Trends Neurosci*, 2006, 29: 40–47
 - 30 Friedrich R W, Hyman S E. Neuronal computations in the olfactory system of zebrafish. *Annu Rev Neurosci*, 2013, 36: 383–402
 - 31 Friedrich R W, Korsching S I. Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron*, 1997, 18: 737–752
 - 32 Friedrich R W, Korsching S I. Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed

- using a voltage-sensitive axon tracer. *J Neurosci*, 1998, 18: 9977–9988
- 33 Freedman D J, Assad J A. A proposed common neural mechanism for categorization and perceptual decisions. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 143–146
- 34 Goldstone R L, Hendrickson A T. Categorical perception. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*, 2010, 1: 69–78
- 35 Niessing J, Friedrich R W. Olfactory pattern classification by discrete neuronal network states. *Nature*, 2010, 465: 47–52
- 36 Wiechert M T, Judkewitz B, Riecke H, et al. Mechanisms of pattern decorrelation by recurrent neuronal circuits. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 1003–1010
- 37 Zhu P, Frank T, Friedrich R W. Equalization of odor representations by a network of electrically coupled inhibitory interneurons. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 1678–1686
- 38 Kermen F, Franco L M, Wyatt C, et al. Neural circuits mediating olfactory-driven behavior in fish. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 62
- 39 Blumhagen F, Zhu P, Shum J, et al. Neuronal filtering of multiplexed odour representations. *Nature*, 2011, 479: 493–498
- 40 Miyasaka N, Arganda-Carreras I, Wakisaka N, et al. Olfactory projectome in the zebrafish forebrain revealed by genetic single-neuron labelling. *Nat Commun*, 2014, 5: 3639
- 41 Dreosti E, Vendrell Llopis N, Carl M, et al. Left-Right Asymmetry is required for the habenulae to respond to both visual and olfactory stimuli. *Curr Biol*, 2014, 24: 440–445
- 42 Jetti S K, Vendrell-Llopis, Yaksi E. Spontaneous activity governs olfactory representations in spatially organized habenular microcircuits. *Curr Biol*, 2014, 24: 434–439
- 43 Krishnan S, Mathuru A S, Kibat C, et al. The right dorsal habenula limits attraction to an odor in zebrafish. *Curr Biol*, 2014, 24: 1167–1175
- 44 Døving K B, Lastein S. The alarm reaction in fishes—odorants, modulations of responses, neural pathways. *Ann NY Acad Sci*, 2009, 1170: 413–423
- 45 Speedie N, Gerlai R. Alarm substance induced behavioral response in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*, 2009, 188: 168–177
- 46 von Frisch K. Über einen schreckstoff der fischhaut und seine biologische bedeutung. *Z Vgl Physiol*, 1942, 29: 49–145
- 47 Mathuru A S, Kibat C, Cheong W F, et al. Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish. *Curr Biol*, 2012, 22: 538–544
- 48 Partan S R, Marler P. Issues in the classification of multimodal communication signals. *Am Nat*, 2005, 166: 231–245
- 49 Zucker C L, Dowling J E. Centrifugal fibres synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina. *Nature*, 1987, 330: 166–168
- 50 Esposti F, Johnston J, Rosa J M, et al. Olfactory stimulation selectively modulates the OFF pathway in the retina of zebrafish. *Neuron*, 2013, 79: 97–110
- 51 Eaton R C, Bombardieri R A, Meyer D L. The Mauthner-initiated startle response in teleost fish. *J Exp Biol*, 1977, 66: 65–81
- 52 Liu K S, Fetcho J R. Laser ablations reveal functional relationships of segmental hindbrain neurons in zebrafish. *Neuron*, 1999, 23: 325–335
- 53 O'Malley D M, Kao Y H, Fetcho J R. Imaging the functional organization of zebrafish hindbrain segments during escape behaviors. *Neuron*, 1996, 17: 1145–1155
- 54 McLean D L, Fetcho J R. Spinal interneurons differentiate sequentially from those driving the fastest swimming movements in larval zebrafish to those driving the slowest ones. *J Neurosci*, 2009, 29: 13566–13577
- 55 Kinkhabwala A, Riley M, Koyama M, et al. A structural and functional ground plan for neurons in the hindbrain of zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 1164–1169
- 56 Koyama M, Kinkhabwala A, Satou C, et al. Mapping a sensory-motor network onto a structural and functional ground plan in the hindbrain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 1170–1175
- 57 Bagnall M W, McLean D L. Modular organization of axial microcircuits in zebrafish. *Science*, 2014, 343: 197–200
- 58 Gabriel J P, Ausborn J, Ampatzis K, et al. Principles governing recruitment of motoneurons during swimming in zebrafish. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 93–99
- 59 Menelaou E, McLean D L. A gradient in endogenous rhythmicity and oscillatory drive matches recruitment order in an axial motor pool. *J Neurosci*, 2012, 32: 10925–10939
- 60 Douglass A D, Kraves S, Deisseroth K, et al. Escape behavior elicited by single, channelrhodopsin-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons. *Curr Biol*, 2008, 18: 1133–1137
- 61 Huang K H, Ahrens M B, Dunn T W, et al. Spinal projection neurons control turning behaviors in zebrafish. *Curr Biol*, 2013, 23: 1566–1573
- 62 Orger M B, Kampff A R, Severi K E, et al. Control of visually guided behavior by distinct populations of spinal projection neurons. *Nat*

- Neurosci, 2008, 11: 327–333
- 63 Warp E, Agarwal G, Wyart C, et al. Emergence of patterned activity in the developing zebrafish spinal cord. *Curr Biol*, 2012, 22: 93–102
- 64 Schoonheim P J, Arrenberg A B, Del Bene F, et al. Optogenetic localization and genetic perturbation of saccade-generating neurons in zebrafish. *J Neurosci*, 2010, 30: 7111–7120
- 65 Kubo F, Hablitzel B, Dal Maschio M, et al. Functional architecture of an optic flow-responsive area that drives horizontal eye movements in zebrafish. *Neuron*, 2014, 81: 1344–1359
- 66 Anastasio T J. The fractional-order dynamics of brainstem vestibulo-oculomotor neurons. *Biol Cybern*, 1994, 72: 69–79
- 67 Goldman M S. Memory without feedback in a neural network. *Neuron*, 2009, 61: 621–634
- 68 Seung H S. How the brain keeps the eyes still. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13339–13344
- 69 Miri A, Daie K, Arrenberg A B, et al. Spatial gradients and multidimensional dynamics in a neural integrator circuit. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 1150–1159
- 70 Aizenberg M, Schuman E M. Cerebellar-dependent learning in larval zebrafish. *J Neurosci*, 2011, 31: 8708–8712
- 71 Hinz F I, Aizenberg M, Tushev G, et al. Protein synthesis-dependent associative long-term memory in larval zebrafish. *J Neurosci*, 2013, 33: 15382–15387
- 72 Aoki T, Kinoshita M, Aoki R, et al. Imaging of neural ensemble for the retrieval of a learned behavioral program. *Neuron*, 2013, 78: 881–894
- 73 Agetsuma M, Aizawa H, Aoki T, et al. The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 1354–1356
- 74 Lee A, Mathuru A S, Teh C, et al. The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish. *Curr Biol*, 2010, 20: 2211–2216
- 75 Valente A, Huang K H, Portugues R, et al. Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish. *Learn Mem*, 2012, 19: 170–177
- 76 Chen T W, Wardill T J, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 2013, 499: 295–300
- 77 Gong Y, Wagner M J, Zhong Li J, et al. Imaging neural spiking in brain tissue using FRET-opsin protein voltage sensors. *Nat Commun*, 2014, 5: 3674–3674
- 78 St-Pierre F, Marshall J D, Yang Y, et al. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nat Neurosci*, 2014, 17: 884–889
- 79 Akerboom J, Garreras Calderón N, Tian L, et al. Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front Mol Neurosci*, 2013, 6: 2
- 80 Portugues R, Feierstein C E, Engert F, et al. Whole-brain activity maps reveal stereotyped, distributed networks for visuomotor behavior. *Neuron*, 2014, 81: 1328–1343
- 81 Huisken J, Swoger J, Del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 2004, 305: 1007–1009
- 82 Panier T, Romano S A, Olive R, et al. Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using selective plane illumination microscopy. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 65
- 83 Baker M. Flashing fish brains filmed in action. *Nature*, 2013, doi: 10.1038/nature.2013.12621
- 84 Crick F. The impact of molecular biology on neuroscience. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1999, 354: 2021–2025
- 85 Wen L, Wei W, Gu W, et al. Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Dev Biol*, 2008, 314: 84–92
- 86 Kawakami K, Shima A. Identification of the *Tol2* transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous *Tol2* element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene*, 1999, 240: 239–244
- 87 Huang P, Zhu Z, Lin S, et al. Reverse genetic approaches in zebrafish. *J Genet Genomics*, 2012, 39: 421–433
- 88 Doyon Y, Mc Cammon J M, Miller J C, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 702–708
- 89 Meng X, Noyes M B, Zhu L J, et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 695–701
- 90 Huang P, Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 699–700
- 91 Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, 10: 329–331
- 92 Auer T O, Durore K, De Cian A, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*, 2014, 24: 142–153
- 93 Luo L, Callaway E M, Svoboda K. Genetic dissection of neural circuits. *Neuron*, 2008, 57: 634–660

Zebrafish Swimming into Neuroscience Research: A Visible Mind in A Transparent Brain

SHANG ChunFeng, MU Yu & DU JiuLin

Institute of Neuroscience, State Key Laboratory of Neuroscience, CAS Center for Excellence in Brain Science, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

Zebrafish is a relatively new vertebrate animal model with a conserved brain architecture and rich repertoire of behaviors. In recent years, we have witnessed the development of multiple approaches tailored for it, including *in vivo* electrophysiology, *in vivo* optical imaging and genetic manipulations. Due to the transparency and simplicity of the brain, larval zebrafish has emerged as an ideal model for dissecting brain functions at a whole-brain scale based on a strategy from synapses, neurons, circuitries to behaviors. In this review, we will summarize the recent important progress of sensory information processing, motor control, and learning and neural plasticity in the zebrafish research field, and pose the requirement for developing novel techniques. Zebrafish will become a sharp “axe” for neuroscience research and bring us more and more surprises in the future.

zebrafish, nervous system, vision, olfaction, behavior, learning, electrophysiology, optical imaging

doi: 10.1360/N052014-00203