

DOI: 10.13376/j.cblls/2014088

文章编号: 1004-0374(2014)06-0626-08



骆清铭, 教授, 博士生导师, 教育部首批“长江学者奖励计划”特聘教授和国家杰出青年基金获得者。骆清铭主要从事生物医学光子学新技术新方法研究, 在原理、方法和仪器技术等方面取得了若干系统性的创新研究成果。主要研究方向: (1) 脑功能与神经活动基本过程的光学成像, 包括人脑功能的近红外光学成像、显微光学切片断层成像获取全脑高分辨图谱及神经连接、培养神经网络长时程活动的光电检测及动力学研究等; (2) 光学分子成像, 包括活体微环境中多分子事件的快速并行检测、多模式活体小动物成像、免疫光学成像等; (3) 基于高分辨结构与功能数据集的系统生物学研究, 主要涉及包括分子、细胞、组织、器官和系统等多层次生物信息的整合与模拟。主持的研究成果入选2011年度“中国科学十大进展”, 曾获2010年度国家自然科学基金二等奖(第1完成人)。

单神经元分辨水平的小鼠全脑网络可视化

龚 辉^{1,2}, 曾绍群^{1,2}, 李安安^{1,2}, 李向宁^{1,2}, 骆清铭^{1,2*}

(1 华中科技大学-武汉光电国家实验室(筹), Britton Chance生物医学光子学研究中心, 武汉 430074;

2 华中科技大学生物医学工程系, 生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘 要: 脑科学是当今国际科技研究的前沿领域。脑是最复杂的器官, 其中尚有诸多重大的基础科学问题有待解决。开展脑科学研究需多学科人员协同攻关, 对于建立新学科将有极大的促进作用, 对于人类健康和社会发展具有巨大的推动作用。简述了神经科学在结构成像方面的基础性需求, 介绍了小鼠全脑可视化发展历程以及近几年的代表性研究, 并展望了全脑可视化研究的发展趋势, 对可能存在的难点予以说明。

关键词: 神经元; 血管; 脑; 微米分辨率; 全脑网络; 可视化

中图分类号: Q427; TB18 **文献标志码:** A

Visible mouse brainwide networks at single neuron resolution

GONG Hui^{1,2}, ZENG Shao-Qun^{1,2}, LI An-An^{1,2}, LI Xiang-Ning^{1,2}, LUO Qingming^{1,2*}

(1 Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics-Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; 2 MoE Key Laboratory for Biomedical Photonics, Department of Biomedical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: The brain remains a mystery to human and there are many fundamental and significant issues to be solved. A collaborative research based on multiple disciplines is essential for the brain study and may result in some new disciplines, which will be of great role in promoting human healthcare and social development. This paper outlines the basic needs of neuroscience in detailed brain structure imaging, introduces the development courses of the mouse brain wide visualization and the representative achievements in recent years. We also discuss the trends in development and difficulties for the visible brain wide networks at single neuron resolution.

Key words: neuron; blood vessel; brain; micrometer resolution; brain wide networks; visible

收稿日期: 2014-05-22

基金项目: 国家自然科学基金创新群体(61121004); 国家自然科学基金项目(91232000); 国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ030260)

*通信作者: E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

1 神经科学的基础性需求

大脑是宇宙间最神奇的物体, 不仅使人们具有正常的行动并产生思想, 也有着多种神经精神类疾病而严重影响人的生活质量。在科学技术进步极大地促进了人类对世界万物认识理解的今天, 被视为所有生物体中最复杂的器官——脑, 其结构和功能的机制仍然是最大的未解之谜。

脑是多种结构并存的器官。人脑由 860 多亿个神经元^[1]、1 000 多亿个胶质细胞以及密布穿插其中的血管, 共同组成极其复杂的神经-血管网络。血管为神经元和胶质细胞输送能量和营养物质, 并且带走废弃物。有研究表明, 如果阻断脑的血液供应, 神经元会在几秒内停止发放动作电位, 在几分钟内, 就会造成不可逆转的神经元坏死。然而, 人们至今对哺乳动物全脑范围内的细胞与血管网络的真实尺度下的空间分布尚不清楚, 对同一个脑内不同位置处的神经元和血管的精细结构尚未进行全面研究。这些组织结构的尺度差别较大, 由于脑内的小细胞和毛细血管的直径约为 2~5 μm ^[2], 典型神经元胞体的直径约为 10~30 μm , 由神经元胞体发出的突起, 其直径仅为亚微米至 1 μm ^[3]。因此, 若要可视化真实的神经元、胶质细胞和血管的三维结构, 图象采集时 xyz 三个方向的分辨率均应小于或等于 1 μm 。本文所述单神经元分辨即指成像体素分辨率为 1 μm 甚至亚微米。

脑是最复杂的器官。在哺乳类动物的大脑中, 感知、记忆、情感、思维等等功能的实现, 主要依赖于神经细胞的聚集体或神经网络而非单个神经细胞。大脑的精细解剖结构对于认识和理解脑的功能、探索脑疾病的机理至关重要。在脑中, 一般认为有两种不同的神经连接环路, 即神经元与其周围神经元建立的局部神经环路和神经元与远端脑区中神经元建立的长程神经环路。一个复杂的脑功能往往需要局部神经环路和长程神经环路的协同作用才能完成^[4]。因此, 对脑结构和功能可视化的研究需要在大范围甚至是全脑进行。

脑的复杂性还表现在神经元类型的多样性。不同类型的神经元就如同集成电路中的各种元器件, 若要明确神经环路的真实形态或信息传递的通路, 首先要搞清楚脑内有多少种“元器件”。已有研究表明, 神经系统具有远比其他器官更多的细胞类型, 如肝脏只有 5 种细胞, 而神经系统中仅视网膜处就有 55 种细胞^[5]。脑内究竟有多少种神经元至今仍

是未明确的神经科学基本问题。并且, 由于神经元的精细完整形态可以反映其接受和输出信息的所在位置, 或者说可显示其构建回路的空间覆盖范围, 具体指神经元的胞体, 特别是接受成千上万其他神经元信息输入的树突, 对突触传递、信息整合、神经环路形成和可塑性极其重要, 其结构异常也与神经类疾病的发生密切相关。然而, 脑内不同位置处的神经元究竟有多少突起分支, 其覆盖范围有多大, 复杂度如何等等, 也是未知的神经科学基本问题。因此, 以真实尺度获取不同类型神经元的精细形态, 及其所处脑内的准确位置, 明确神经元类型, 对于神经科学来说是关键的基础性需求。

简而言之, 由于生物体存在着个体差异, 所以理想的目标是对同一个哺乳动物全脑, 结合多种标记技术, 同时获取所有细胞(包括神经元)和血管的精细完整的形态结构, 实现在全脑范围, 以真实尺度构建出感兴趣位置处的神经元和血管的精细形态, 并给出神经连接通路和血管网络的可视化结果。

2 已有小鼠全脑可视化的研究

在 2002 年完成的小鼠基因组测序工作^[6], 证实了小鼠与人类在基因水平上有 80% 以上的同源性, 小鼠作为生命科学和医学研究中哺乳动物类的代表, 有其不可动摇的地位。人脑重约 1 350~1 500 g, 而小鼠脑仅重约 0.4~0.5 g, 其中神经元约有 7 千万个^[1,7]。但即使是小鼠, 各个脑区里的真实的血管-细胞-神经元的精细构筑及相互关系仍不清楚。

一百多年前, Golgi 和 Cajal 发明了高尔基(Golgi)银染法, 并先驱性地将其用于神经元的形态染色和成像, 揭示出脑的组织结构是以神经元类型和连接为基础。由此, 人们不断地尝试用直观的图像和图谱, 从单个神经细胞、神经环路、脑区、全脑等不同层次和水平, 认识和理解脑结构的高度复杂性^[1]。一方面, 利用传统组织学的染色、示踪、切片和光学成像技术, 人们已对如感觉、运动等局部脑区的神经解剖分级和分层连接结构有了较清楚的认识^[8], 也获得了大量的单个或局部神经元精细形态的知识。然而, 由于这种方法主要是手工操作, 将鼠脑以每片厚约 20~50 μm 进行连续切片, 工作量大且难以保证每一张脑片的完整和无形变。更大的问题是, 连续的脑组织由于被切开, 再分别进行贴片、封片和成像等操作, 会导致切片表面上的神经纤维被切断, 无法再进行连续脑片之间的神经突起的追踪与拼接。所以, 传统的组织学切片成像技术主要

通过二维平面上的观察结果来推测三维的结构,因此定量分析结果偏差较大。传统神经解剖学中,可视化研究的代表性成就是借助于尼氏(Nissl)等染色技术并结合传统光学显微镜成像,Paxinos和Franklin著述的《小鼠脑立体定位图谱》^[9],以及Dong著述的《Allen小鼠脑图谱》^[10]。这些小鼠脑图谱清晰地显示了解剖学结构的图像,建立了脑的三维定位坐标系,并对脑区和核团的解剖学结构进行了命名和描述,在神经科学研究中已广泛用于指导脑区或核团定位。这两个图谱存在的共性问题分辨率较低,所绘制图谱的冠状面图像间隔均超过100 μm,提供的矢状面和水平面的图像则更少了。

另一方面,以磁共振成像(MRI)为代表,有多家单位开展了小鼠全脑图谱绘制的工作。为了尽可能清晰地识别小鼠脑内的结构,成像的磁场强度多采用7 T^[11]甚至更高的17.6 T^[12]以获取高分辨图像。目前MRI小鼠脑图谱的最高分辨率为各向同性21.5 μm/voxel^[13]。MRI脑图谱被广泛用于比较不同品系小鼠或病理小鼠脑解剖与形态的异同或异常^[14-15],并且能为蛋白质组和基因表达分布等大脑功能数据提供一个统一的空间共定位框架^[16]。

与基于二维切片的传统组织学小鼠脑图谱相比,MRI脑图谱在三维空间中重建出了鼠脑及其内部的多个脑区及核团的形态,同时可以对图谱进行任意角度的虚拟切片,从而使得用户可以将图片从任意角度准确地配准到正确的解剖学位置上^[12]。此外,由于MRI数据便于采集,容易获取多个鼠脑的MRI全脑数据,因此出现了一些基于多个MRI数据集绘制的平均脑图谱^[11-12,16-17]与概率脑图谱^[12],对于消除个体差异性,展现鼠脑的普遍特征,具有一定的参考意义。

然而,由于MRI成像的分辨率还只是宏观水平,无法区分单个细胞,基于MRI数据构建的小鼠脑图谱存在着难以准确精细地划分脑区或核团的局限性。目前MRI小鼠脑图谱中划分的脑区与核团个数最多仅为62个^[17],在引入了相同分辨率等级的组织学数据辅助后,也只能划分出70个^[18]。

在小鼠脑血管成像研究方面,Kleinfeld团队开发了全光组织学成像仪,先用双光子显微镜对脑块表面成像,再用激光将已成像组织进行消融,以此实现z方向层析成像的深度控制^[19]。随后该团队使用荧光凝胶灌注小鼠脑血管,结合蔗糖脱水来研究增加鼠脑的透明度,利用双光子成像系统,对矢状面和冠状面脑片的多个区域进行深度范围脑皮层的

成像。单个成像区域的大小约为0.3 mm³,其分辨率可以达到1 μm,由此得到局部脑块内毛细血管水平的血管网,并对血管分布密度进行了定量统计^[20]。基于上述技术和方法,目前该团队展示的结果范围约为1 × 1 × 2 mm³,同时给出了包含脑表面血管、穿入血管及毛细血管层次的血管网数据,并可以区分穿入血管是动脉还是静脉^[21]。由于该研究的样本制备、成像和血管分割等步骤都采用手工完成,对于大样本研究将面临脑部深处组织高分辨成像、图像配准、非常耗时等难题,目前还未见全脑大范围的结果报道。

与此同时,Kabani团队用CT结合造影剂对小鼠脑血管进行成像,实现了全脑范围内各向同性20 μm分辨率的血管成像。同时,为了提供脑血管的空间位置信息,利用7T的MRI对鼠脑进行脑轮廓和脑区的结构成像,其分辨率为各向同性32 μm^[22],分割出62个脑区和核团^[17]。并且,基于已有的解剖学知识,对小鼠脑血管数据采取手工分割的方式,将多只小鼠脑血管数据三维矢量化,分析血管的共性分布。基于该技术和方法,得到了目前为止第一套三维小鼠全脑血管图谱,并对血管进行了分级标注^[22]。然而受成像分辨率所限,重建的血管主要为大血管,小血管的重建质量还不够高。

简而言之,近几十年发展的光学成像技术(如共聚焦和双光子)虽然能分辨单个神经元和血管的精细结构,但受限于光的散射和吸收,成像深度有限,其研究仍然局限于脑皮层局部区域。现有的三维组织水平成像技术,如CT和MRI,由于分辨率低,无法分辨毛细血管和单个细胞。

3 21世纪以来的代表性研究

随着基因组计划的完成,生命科学界更加迫切地意识到已有神经科学的知识非常匮乏,无论是对脑的基础认知还是针对临床需求的研究。有多家单位纷纷联合起来,希望借助于标记技术,致力于系统性构建介观水平(mesosopic scale)的全脑神经连接地图,以填补宏观全脑与微观神经回路研究之间的空白^[23]。由于荧光蛋白可以特异性地标记所需类型的神经元,而且融合的XFP蛋白不影响结合蛋白的生物学功能,因此,神经科学研究者对脑网络与功能的研究主要借助于荧光蛋白进行标记定位,以识别包括神经树突和轴突在内的各种感兴趣的生物结构^[24]。本文简述三个具有代表性的研究技术及其应用。

3.1 光片照明显微成像与光透明

光片照明显微成像技术使用光束薄片从样品侧面进行激发荧光, 并通过显微物镜与探测器在垂直于光片的方向上获取照明层面的荧光图像, 从而实现荧光样品的三维层析成像。与共聚焦及双光子显微成像技术相比, 光片照明显微成像采用层析的面照明取代了传统的点扫描成像方式, 因此, 它具有更高的成像速率、更高的信噪比以及更低的光漂白毒性效应等优点。光透明技术主要是通过化学方法, 使生物组织内各成分之间的折射率相互匹配, 从而降低组织的散射影响, 提高光在组织中的穿透能力, 使生物组织变得“透明”, 获得更好的光学成像深度。

光片照明的概念由 Siedentopf 等在 1903 年提出, 最初被应用于散射光成像。2004 年, Huisken 等^[25]首次将光片照明显微镜应用在荧光成像领域, 对活体胚胎进行了长时间的三维成像, 证明了其在发育生物学研究领域的巨大潜力。2007 年, Dodt 等^[26]结合化学光透明技术, 并将照明方式改进成双侧照明, 首次利用光片照明显微镜实现对完整鼠脑样本进行快速成像, 将其应用拓展至神经生物学领域。由于在生物组织中的强散射特性, 光片照明显微镜对全脑进行成像的效果极其依赖于组织光透明效果, 所以近几年多个研究小组倾力于发展新的光透明技术。如, 2011 年, Hama 等^[27]率先提出基于尿素的水溶性透明试剂—Scale。他们利用该方法使得小鼠全脑组织变得透明, 并结合共聚焦及双光子成像系统能够获得鼠脑更深处神经元及血管分布信息。2012 年, Erturk 等^[28]经多年探索, 发展了一种基于有机溶剂的透明成像方法——3DISCO, 结合光片照明成像技术, 获得了小鼠全脑无损神经连接的三维重建结果。该方法可应用于中枢神经系统神经退行病变及再生的相关研究, 包括脊髓损伤后胶质细胞响应及再生修复的探究。在最近的研究中, 亲水性的透明剂被证明可以有效地降低对荧光蛋白的损伤, 其中 CUBIC 技术结合光片照明显微镜, 对成年 GFP-M 小鼠脑及生后 3 d 的猕猴脑实现了快速的全脑成像^[29]。2013 年, Deisseroth 研究小组发展了一种基于水合凝胶结合组织电泳去除脑组织中脂类物质, 使得全脑透明的新方法——CLARITY, 并结合单光子成像系统对小鼠鼠脑、人脑 500 μm 脑块进行了细胞及亚细胞水平的成像^[30]。该方法可用于获取成年小鼠全脑细胞水平的神经结构及大组织块的多重分子标记, 但因

其电泳设备的特殊性 & 光学参数的局限性, 该方法难以用于多样本的对比和平行实验^[29]。需说明的是, 受物镜的工作距离及照明光片厚度的均匀性的限制, 光片照明显微镜对于鼠脑成像的 x-y 方向的分辨率只有数微米 (故其文中称之为细胞或亚细胞分辨), 还难以对大样本实现体素 1 μm 分辨率的成像。

3.2 双光子序列断层成像

双光子序列断层成像 (serial two-photon tomography, STP) 是一种将双光子显微成像和组织切片相结合的方案, 用于实现小鼠全脑的荧光成像。双光子显微成像作为一种重要的荧光显微光学成像技术, 可以对百微米下的组织进行微米分辨成像。为了能够获取大组织样品的三维成像, 2007 年, MIT 的 Ragan 等^[31]报道了将双光子显微成像技术与移动样品 (通过多视野成像扩大 x-y 方向的成像视野) 和机械切削 (增加 z 方向成像范围) 相结合的方法。该方法使用石蜡包埋组织样品, 并采用铣削加工的方式, 在用双光子对样品表面以下一定厚度处的组织进行成像后, 铣去表面已成像的部分。为了提高双光子成像速度, 采用基于多边形扫描器的双光子显微成像实现方法, 最高可以达到每秒 30 帧的成像速度。采用这一方法, 演示了小鼠心脏的亚细胞分辨三维成像结果。

由于石蜡包埋会淬灭组织荧光, 在上述方法的基础上, Ragan 等^[32]以振动切片代替铣削加工方法, 改石蜡包埋样本为琼脂包埋样本, 以高速扫描镜代替多边形扫描器, 提出了 STP 方法, 相关工作于 2012 年发表于 *Nature Methods*。上述改进减少了包埋过程对组织荧光和变形的影响。文中演示了转基因荧光小鼠及进行了顺行或逆行注射示踪标记的小鼠全脑 STP 三维荧光成像结果。其成像的 x-y 方向分辨率分别为 0.5 μm 和 1 μm , z 方向采样由振动切片过程控制, 每间隔 50 μm 采集一张鼠脑冠状断面图像。

随后, Allen 脑科学研究所使用 AAV 病毒 EGFP 标记特定脑区和细胞类型的轴突投射, 再用 STP 方法以 0.35 μm 的 x-y 方向分辨率和 100 μm 的 z 方向分辨率, 对标记小鼠的全脑进行成像, 获得了 Allen 小鼠脑连接图谱^[33]。加拿大的 Gleave 等^[34]使用 STP 作为其中一种光学成像方法, 以 z 方向每 100 μm 采集一张冠状面图像, 获得了免疫染色小鼠脑的三维光学图像。

STP 方法的优点是将光学切片与机械切片相结合, 用光学切片获得轴向分辨, 用机械的振动切片

拓展纵向探测范围,引入振动切片降低了对组织包埋的要求。作为一种自动成像方法,简化了传统的先进行一定厚度的组织连续切片,再对切片进行光学成像和配准这一繁琐和耗时的数据采集过程。然而,其典型应用通常为进行z方向数十至百微米厚度的间隔断面成像,相应地图像重建体素分辨率只能是100 μm 的组织学水平。如要开展确认神经元类型、单个神经元树突和轴突精细形态追踪,则必须进行全脑z方向微米甚至亚微米的精细层析成像。使用STP方法则意味着显著增加数据获取的时间,其样本包埋方法和成像系统的长时间稳定性还有待证明。

3.3 显微光学切片断层成像系列技术

华中科技大学骆清铭教授及其研究团队经过八年的努力,建立了可对数厘米大小样本获得亚微米分辨的精细结构三维成像方法和技术。利用自主发明的反射式切片成像技术和全自动精密组织切削技术,研制出显微光学切片断层成像系统(micro optical sectioning tomography, MOST),该系统具有连续自动快速获取数据、图像无需额外配准、稳定性强和精确性高的特点。结合发明的小鼠全脑高尔基染色和树脂包埋方法,利用MOST系统在国际上首次成功获得分辨率为体素1 μm 的小鼠全脑连续三维结构图谱^[35]。

考虑到高尔基染色虽能显示单个神经元的完整精细形态,但具有染色随机的缺点。结合前期建立的MOST技术,该团队又发明了新颖的可保持荧光表达强度并避免鼠脑内荧光蛋白淬灭的树脂包埋样本方法,研制出能够全自动长时间稳定的适合于各色荧光标记的荧光显微光学切片断层成像系统(fluorescence MOST, fMOST)^[36-38],建立了数字化的图像重建、配准与标识等数据处理流程。利用这种前所未有的荧光小鼠全脑高分辨率成像的技术,获得了分辨率为1 μm 的荧光蛋白转基因小鼠全脑的三维数据集,首次在全脑大范围实现了长距离轴突投射通路不间断地追踪。该研究获得了国际同行的高度关注^[8]。

为了以真实尺度获取小鼠脑内所有细胞和血管的精细完整的形态结构,该团队改进了传统的用于细胞构筑研究的金标准——尼氏染色法,实现了同时标记同一只小鼠全脑的细胞和血管的结构。运用MOST成像系统,以1 μm 体素分辨率,成功地采集了多只完整小鼠脑细胞和血管的图像^[39]。基于尼氏染色的特点和MOST技术的三维高分辨优势,

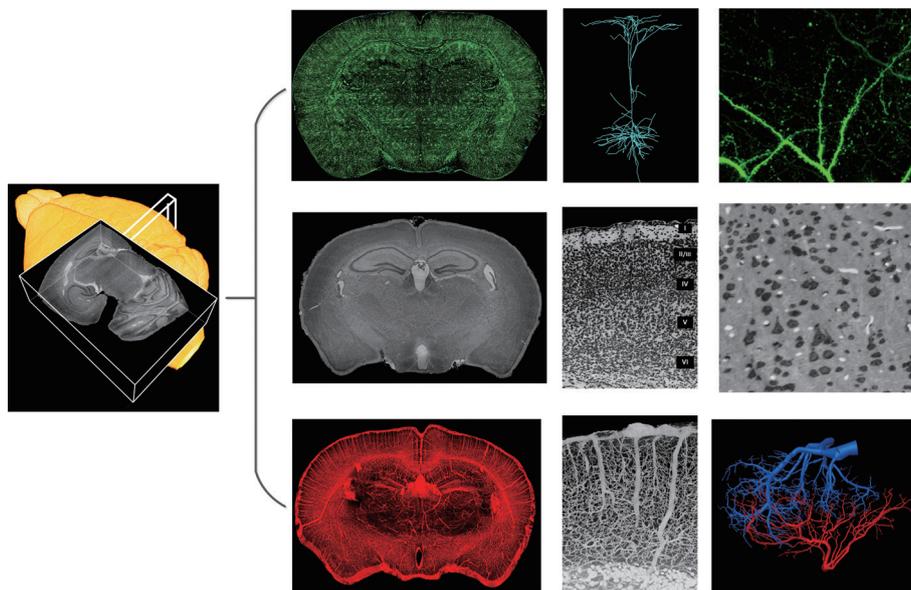
所获取的小鼠全脑数据集具有能显示所有细胞和血管(包括毛细血管)空间位置与形态结构的特点。研究小组还利用自主研发的软件实现了细胞和血管共定位的定量分析方法,发现细胞到血管的最近距离与血管长度密度之间存在鲁棒的线性相关,而与细胞个数密度无关。

利用MOST系列技术与方法,能够以前所未有的单神经元分辨率,可对脑内任一感兴趣区域,三维呈现小鼠完整脑内神经元-细胞-血管的精细形态,并且数据集具有天然配准特点,结果如图1所示。MOST系列技术具有高精度、长时间稳定性、高通量数据获取的优势,可用于神经科学重要基础知识所需的神经元类型、神经回路、血管网络、3D精细脑图谱等,及脑发育与疾病探究需对多个样本大范围观察神经元与血管精细形态和位置变化的研究。其缺点是所用样本均为离体的,切片成像后的样本由于已碎裂,难以再收集进行复染对照研究。

4 展望

随着神经科学研究的方兴未艾及对神经科学基本问题的强烈需求,为了能架起连接微观分子与宏观全脑研究之间的重要桥梁,有越来越多学科的研究人员与神经科学家们共同努力,如上所述已在介观分辨率水平取得了可喜的突破,对小鼠全脑研究建立了可行有效的研究途径。在此基础上,以小鼠脑为对象,进一步实现对神经回路中更微观结构“突触-信息传递、交换以及计算所在位置”的快速成像,以及明确神经元的类型、神经回路的精细结构及其在脑内的投射分布通路等将成为重要的研究目标。与此同时,由于小鼠为低等动物,其研究结果对于理解脑疾病和药物研发作用有限,所以更为重要和急迫的是开展对灵长类动物脑的神经回路精细结构的获取工作。为达成以上研究目标,需从样本标记方法、成像技术、大数据处理与管理等方面进行系统性多学科的协同攻关研究。

由于轴突直径仅有1 μm ,其结构特征是又细又长,突触的直径仅有300 nm^[40]。在成像过程中,被标记神经元胞体发出的光强相比于轴突和突触发出的光强,就如同天空中的太阳和星星。所以,为了实现对轴突末梢和突触的成像,样本标记与成像技术需要共同努力,以新思路和新方法,进一步解决更高空间分辨率、高成像信噪比、高成像通量等关键技术问题。随着分子遗传学和基因重组技术的发展,已有Xu和Sudhof^[41]利用荧光蛋白的表达量,



左侧黄色子图为小鼠全脑三维重建结果。右侧子图从上向下分别为: 第一行从左到右子图分别为高尔基染色小鼠脑冠状面, 显示神经元分布的结果, 及荧光蛋白转基因小鼠脑内单个神经元及局部放大结果图。第二行子图分别为尼氏染色小鼠脑细胞构筑冠状面的结果, 皮层局部区域的细胞分层结果, 厚度为 $1\ \mu\text{m}$ 的原始成像结果图。第三行子图分别为小鼠脑血管构筑冠状面结果, 皮层局部区域的血管结构图, 丘脑内部分动脉(红色)和静脉(蓝色)血管的三维重建结果。

图1 用MOST系列技术获得的小鼠全脑成像结果

定量分析由腺病毒感染的神经元所投射的突触个数。该研究提供一种可以借助于光学显微成像简单快速地获取神经元轴突和突触末梢分布区域的方法。近年来, 为了分析特定神经回路, 利用定点微量注射与遗传学方法相结合的方式已成为热点, 如病毒转染与 Cre 品系小鼠相结合的方法, 进行荧光蛋白的特异性稀疏表达。同时, 跨脑区的神经元投射涉及数以百万的分支和输入, 可通过多色标记对多种细胞和结构进行特异化区分, 同时应用神经回路顺行、逆行特异示踪表达, 包括跨突触传播的病毒和示踪染料的应用, 以分析神经回路的构筑特性。需说明的是, 为减少“太阳”光强的影响, 标记的神经元个数应稀疏, 并且不仅是胞体具有较高的光强, 而且由其发出的突起, 特别是轴突和突触也必须有足够的荧光强度, 荧光表达需有较好的稳定性, 才可能在“太阳”的照耀下实现对“星星”的成像。与之相应, 成像技术需将空间分辨率由体素 $1\ \mu\text{m}$ 进一步提高至百纳米, 发展信噪比更好的层析成像技术。此外, 为实现大样本, 如灵长类动物脑甚至人脑的全脑单神经元分辨率成像, 标记工具需具备快速渗透、长时间稳定的特点, 需发展可用于灵长类更复杂神经回路结构的标记方法。与之相应, 成像技术面对灵长类脑冠状面直径是几十厘米的情

况, 需发展可高通量快速面成像的新技术。

由于脑的高度复杂性, 以单神经元分辨率用 MOST 系列技术采集一个单色标记小鼠脑的数据量都是 TB 级 ($1\ \text{TB}=1\ 024\ \text{GB}$), 单层冠状面图片的数据量是几百兆甚至数 GB。如果进行多色成像或对灵长类动物脑成像, 其数据量更是成倍增长。如此工程化速度地产生大数据, 对于目前现有的数据存储、图像处理与分析、数据管理和共享等方式已带来了全方位的挑战。同时, 由于神经元类型和形态的高度复杂性, 面对已获取的大数据图像, 不可能采用过去手工分割图像的做法, 必须发展新的方法, 以实现自动地对多层次、多类型、多形态、高密度的神经结构和功能图像的数字化处理, 在此基础上实现单神经元分辨的全脑可视化和定量分析的目标。

我们相信脑研究的春天已经到来, 在多学科研究人员协同攻关努力下, 全脑网络可视化的研究成果必将为人类更好地“认识脑、保护脑、创造脑”做出重要贡献。

[参 考 文 献]

- [1] Koch C, Reid RC. Observatories of the mind. *Nature*, 2012, 483(7390): 397-8

- [2] Muller B, Lang S, Dominiotto M, et al. High-resolution tomographic imaging of microvessels. *Proc SPIE*, 2008, 7078: 70780B
- [3] Snyder EY, Yoon L, Flax JD, et al. Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(21): 11663-8
- [4] Miyamichi K, Amat F, Moussavi F, et al. Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature*, 2011, 472(7342): 191-6
- [5] Masland RH. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(4): 431-6
- [6] Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 2002, 420(6915): 520-62
- [7] Suzana HH. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci*, 2009, 3(31): 1-11
- [8] Osten P, Margrie TW. Mapping brain circuitry with a light microscope. *Nat Methods*, 2013, 10(6): 515-23
- [9] Paxinos G, Franklin KBL. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*[M]. 4th edn. San Diego: Academic Press, 2012
- [10] Dong HW. *Allen Reference Atlas*[M]. 2nd edn. Hoboken New Jersey&Canada: John Wiley & Sons Press, 2011
- [11] Kovačević N, Henderson JT, Chan E, et al. A three-dimensional MRI atlas of the mouse brain with estimates of the average and variability. *Cereb Cortex*, 2005, 15(5): 639-45
- [12] Ma Y, Hof PR, Grant SC, et al. A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy. *Neuroscience*, 2005, 135(4): 1203-15
- [13] Johnson GA, Bedea A, Brandenburg J, et al. Waxholm Space: an image-based reference for coordinating mouse brain research. *Neuroimage*, 2010, 53(2): 365-32
- [14] Bedea A, Johnson GA, Williams RW. Genetic dissection of the mouse brain using high-field magnetic resonance microscopy. *Neuroimage*, 2009, 45(4): 1067-79
- [15] Redwine JM, Kosofsky B, Jacobs RE, et al. Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(3): 1381-6
- [16] Hawrylycz M, Baldock RA, Burger A, et al. Digital atlasing and standardization in the mouse brain. *PLoS Comput Biol*, 2011, 7(2): e1001065
- [17] Dorr AE, Lerch JP, Spring S, et al. High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. *Neuroimage*, 2008, 42(1): 60-9
- [18] MacKenzie-Graham A, Lee EF, Dinov ID, et al. A multimodal, multidimensional atlas of the C57BL/6J mouse brain. *J Anat*, 2004, 204(2): 93-102
- [19] Tsai PS, Friedman B, Ifarraguerri AI, et al. All-optical histology using ultrashort laser pulses. *Neuron*, 2003, 39(1): 27-41
- [20] Tsai PS, Kaufhold JP, Blinder P, et al. Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. *J Neurosci*, 2009, 29(46): 14553-70
- [21] Blinder P, Tsai PS, Kaufhold JP, et al. The cortical angiome: an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow. *Nat Neurosci*, 2013, 16(7): 889-97
- [22] Dorr A, Sled JG, Kabani N. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage*, 2007, 35(4): 1409-23
- [23] Bohland JW, Wu CZ, Barbas H, et al. A proposal for a coordinated effort for the determination of brainwide neuroanatomical connectivity in model organisms at a mesoscopic scale. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(3): e1000334
- [24] Feng GP, Mellor RH, Bernstein M, et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, 2000, 28(1): 41-51
- [25] Huisken J, Swoger J, Del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 2004, 305(5686): 1007-9
- [26] Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, et al. Ultra-microscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*, 2007, 4(4): 331-6
- [27] Hama H, Kurokawa H, Kawano H, et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, 2011, 14(11): 1481-8
- [28] Erturk A, Becker K, Jahrling N, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*, 2012, 7(11): 1983-95
- [29] Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*, 2014, 157(3): 726-39
- [30] Chung K, Wallace J, Kim SY, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 2013, 497(7449): 332-8
- [31] Ragan T, Sylvan JD, Kim KH, et al. High-resolution whole organ imaging using two-photon tissue cytometry. *J Biomed Opt*, 2007, 12(1): 014015
- [32] Ragan T, Kadiri LR, Venkataraju KU, et al. Serial two-photon tomography for automated *ex vivo* mouse brain imaging. *Nat Methods*, 2012, 9(3): 255-8
- [33] Oh SW, Harris JA, Ng L, et al. A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 2014, 508(7495): 207-14
- [34] Gleave JA, Lerch JP, Henkelman RM, et al. A method for 3D immunostaining and optical imaging of the mouse brain demonstrated in neural progenitor cells. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72039
- [35] Li AA, Gong H, Zhang B, et al. Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse

- brain. *Science*, 2010, 330(6009): 1404-8
- [36] Gong H, Zeng SQ, Yan C, et al. Continuously tracing brain-wide long-distance axonal projections in mice at a one-micron voxel resolution. *Neuroimage*, 2013, 74: 87-98
- [37] Zheng T, Yang ZQ, Li AA, et al. Visualization of brain circuits using two-photon fluorescence micro-optical sectioning tomography. *Opt Express*. 2013, 21(8): 9839-50
- [38] Xu DL, Jiang T, Li AA, et al. Fast optical sectioning obtained by structured illumination microscopy using a digital mirror device. *J Biomed Opt*, 2013, 18(6): 060503
- [39] Wu JP, He Y, Yang ZQ, et al. 3D BrainCV: simultaneous visualization and analysis of cells and capillaries in a whole mouse brain with one-micron voxel resolution. *Neuroimage*, 2014, 87: 199-208
- [40] Ribault C, Sekimoto K, Triller A. From the stochasticity of molecular processes to the variability of synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(7): 375-87
- [41] Xu W, Sudhof TC. A neural circuit of memory specificity and generalization. *Science*, 2013, 339(6125): 1290-5