

DOI: 10.13376/j.cbls/2018147

文章编号: 1004-0374(2018)11-1221-07

非洲爪蟾在神经系统疾病研究中的应用

丁楠季莎, 高娟妹, 洪金炜, 沈万华*

(杭州师范大学浙江省器官发育与再生技术研究重点实验室, 杭州 310036)

摘要: 在生物医学研究领域, 使用合适的动物模型研究大脑运行机制和疾病机理至关重要。作为经典的脊椎动物模型, 非洲爪蟾在研究神经环路构建和功能以及神经疾病的分子机制中具有一定优势。因为非洲爪蟾的胚胎发育过程与人类器官形成过程相似, 同时, 神经系统疾病往往与神经系统功能异常和发育缺陷有关, 所以一些人类疾病在基因和形态上的功能机制可以通过非洲爪蟾的胚胎发育模型进行在体研究, 且神经前体细胞的增殖分化以及视觉刺激依赖的神经环路稳态和功能研究已经相对成熟。目前, 该模型已经在癫痫和自闭症及表观遗传调控等相关疾病的研究上得到了应用。该文将分别介绍非洲爪蟾蝌蚪模型在环境毒物诱发疾病、神经发育障碍以及表观遗传疾病机制研究领域的最新进展。

关键词: 非洲爪蟾; 模式生物; 发育障碍; 表观遗传

中图分类号: Q423; Q89; R322.8; R741 **文献标志码:** A

Using *Xenopus* as an animal model to study neurological diseases

DING Nan-Ji-Sha, GAO Juan-Mei, HONG Jin-Wei, SHEN Wan-Hua*

(Zhejiang Key Laboratory of Organ Development and Regeneration,
Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: It is very important to use appropriate animal models to study the mechanism of brain function and disease mechanism in the field of biomedical research. As a classical vertebrate animal model, *Xenopus* has many advantages in studying the construction and function of neural circuits and the molecular mechanism of neurological diseases. For some human diseases, the genetic and morphological mechanisms can be studied *in vivo* through the embryo development model of *Xenopus* which is similar to that of human beings. Furthermore, the nervous system diseases are often associated with abnormal functional and developmental defects of the nervous system. It is relatively mature for the study of proliferation and differentiation of progenitor cells and the visual experience-dependent neural circuit homeostasis and function in the developing central nervous system. At present, the model has been used in epilepsy, autism, epigenetic regulation related diseases. This review will introduce the latest advances in the field of environmental toxicants induced diseases, neurodevelopmental disorders, and epigenetic diseases using *Xenopus* tadpole model.

Key words: *Xenopus laevis*; animal model; developmental disorder; epigenetics

神经元通过突触连接组成高度复杂的神经网络, 是人类感知、思想和情绪形成的基础。然而, 当大脑发育过程中出现问题就会引起发育障碍等神经类疾病, 危及人们的健康和生活。迄今为止, 对于诸如自闭症、癫痫和精神分裂症等神经发育障碍引起的疾病还没有彻底的治愈方法, 而且, 这些疾病的致病原因及机制研究还不是很清楚。因此, 选择合适的模式动物从细胞、分子、环路和行为等多

层次进行研究, 可以更全面地了解相关致病基因的功能和内在机制, 从而为相关疾病的机制研究和药物筛选提供重要参考数据。

收稿日期: 2018-04-20; 修回日期: 2018-05-17

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2017R423063); 国家自然科学基金面上项目(31271176); 浙江省自然科学基金项目(LY17C090007)

*通信作者: E-mail: shen@hznu.edu.cn

非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 作为一种脊椎动物模型, 与小鼠和斑马鱼相比, 在生物医学的研究上有显著的优势。成体爪蟾的寿命可以达到 15 年。通过注射人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 进行体外排卵受精, 受精卵在室温条件下发育成 43 期的蝌蚪只需要一周的时间, 各器官发育过程都可以进行活体观察; 蛙卵的形态较大, 适合进行显微操作和胚胎移植。到目前为止, 非洲爪蟾已被应用于 DNA 损伤应答、细胞凋亡、免疫和炎症反应以及再生和可塑性的研究。在神经发育的各个阶段, 包括神经细胞增殖分化、轴突生成、突触传递以及环路可塑性等方面都进行了较为详细的研究, 这对理解神经系统疾病机制打下了坚实基础。与哺乳动物神经环路相比, 虽然蝌蚪的中枢神经系统结构相对简单, 但两者同源性强。在蝌蚪的视觉信号通路中, 视网膜神经节细胞 (RGC) 的轴突投射到视顶盖大脑对侧, 顶盖结构与哺乳动物的上丘是同源的。视网膜神经节细胞的轴突在 39 期 (受精后 4~5 d) 投射到视顶盖, 在 44~45 期发育成完整的神经环路, 并在 49 期逐渐成熟。RGC 作为突触前神经元, 通过释放谷氨酸神经递质作用于视顶盖神经元上的 AMPA 受体和 NMDA 受体, 这和大多数哺乳动物的视觉信号通路是一样的^[1]。

非洲爪蟾的皮肤色素突变后成为白化的非洲爪蟾 (*Albino Xenopus laevis*), 因为整个身体皮肤透明, 通过荧光蛋白标记的单个神经元可以直接在显微镜下进行长期连续的神经元轴突和树突的在体成像观察。通过细胞延时成像技术可以详细描述神经活动影响视顶盖放射状胶质细胞的结构和功能^[2], 通过运用三维重构软件可以活体追踪^[3]和测量一段时间内神经元的在体发育和可塑性变化^[4]。此外, 蝌蚪视顶盖很容易进行在体钙成像实验^[5], 甚至可以在活体内完整地获得稳定的钙成像记录数据^[6-8], 极大地丰富了在体研究神经细胞群体活动的研究手段。

改变蝌蚪发育过程中目的基因的表达水平主要有两种方法: 首先, 通过电穿孔将 mRNA 注入早期胚胎; 其次, 通过显微注射技术将吗啉寡核苷酸 (morpholino oligonucleotide, MO) 转入到发育中的蝌蚪视顶盖大脑细胞内^[9], 进一步研究基因在生物体内的表达和功能。此外, 蝌蚪的血脑屏障通透性较高, 只需要在蝌蚪培养液中加入药物, 就可以实现对神经系统的给药^[1], 避免了哺乳动物脑室注射的复杂过程。另外, 非洲爪蟾蝌蚪体积小, 可以直接放在显微镜下进行在体电生理记录^[10], 从而研究大

脑发育过程中神经环路的形成和功能^[1]、突触的发育和可塑性变化机制^[11]。通过相应的视觉诱导实验检测蝌蚪行为^[12-14], 可以研究中枢神经环路的结构和功能^[10]、定向反射^[15]以及社会行为^[16-17]。使用生物正交非天然氨基酸标记 (BONCAT)^[13]和荧光非天然氨基酸标记 (FUNCAT)^[18]在体选择性标记中枢神经系统的新生蛋白, 结合蛋白测序技术筛选和可塑性变化相关的新生蛋白。总之, 非洲爪蟾作为常用的脊椎动物模型, 结合使用现代生命科学研究技术, 可以在体比较同一个体或同一细胞在刺激前后的变化, 从而在分子、细胞和行为学水平上全方位解读实验所产生的证据, 增加实验结果的灵敏性、重复性和可靠性。

1 环境毒物对蝌蚪发育的影响

在动物发育过程中, 神经环路对环境化学物质特别敏感。例如, 一定剂量的甲基汞会对胚胎的中枢神经系统产生神经毒害作用, 但是对成体的中枢神经系统却没有影响^[19]。同样, 发育中的幼体大鼠暴露在铅环境通常会导致神经系统损伤, 而成熟的大鼠大脑暴露于相同剂量的铅环境时则不受影响^[20]。因此, 对成人中枢神经无害的化学物质可能对发育中的大脑有害, 非洲爪蟾模式动物已经成为研究环境化合物对发育中大脑影响的理想模型。

非洲爪蟾模型常被用于测定环境化学物质的毒性和致畸作用, 在胚胎毒理学领域不断得到应用^[21]。相关研究表明, 蝌蚪到成蛙的变态完全取决于甲状腺激素 (TH)^[22], 而最常见的环境污染物就是 TH 抑制剂, 同时, 它也是一类内分泌干扰剂。如果 TH 分泌在蝌蚪发育过程中被抑制, 那么它的变态过程就会停止, 反之, 如果蝌蚪变态前被暴露于 TH 环境中则变态反应会提前发生^[23]。由于变态反应很明显, 因此, 实验过程中可以利用这一现象去测试化学品的毒性作用^[17]。TH 的作用对象是大脑, TH 活性的变化会导致神经系统发育缺陷^[24], 但这一过程不如形变, 如尾部缺失、肢芽形成和肺的发育等现象明显, 神经系统发育时产生的紊乱很细微, 如突触修饰、干细胞增殖分化和神经元结构功能改变^[25]。qRT-PCR 结果表明, TH 抑制剂甲硫咪唑和高氯酸盐会显著影响 54 期蝌蚪脑组织神经元上 TH 受体的表达水平^[26]。cDNA 芯片和实时定量 PCR 结果表明, 高氯酸盐会显著增加神经细胞 mRNA 的表达^[23], 如 β 淀粉样前体蛋白的 mRNA, 是阿尔兹海默病产生的原因之一; 编码髓鞘碱性蛋白和

髓鞘脂质蛋白的 mRNA, 这两个蛋白都是产生髓鞘和促进动作电位传导的主要组成部分。这些高氯酸盐诱导的 mRNA 增加可能对发育中的蝌蚪大脑产生影响, 但其产生的具体机制仍不清楚。

活体成像和电生理等实验技术的应用, 使蝌蚪逐渐成为一个研究环境化学物质影响神经系统发育的强大在体模型。例如, 长期将美洲豹蛙蝌蚪视顶盖神经元暴露在微量的铅中会减少 RGC 的轴突分支面积以及轴突的分支数。而暴露在高浓度的铅环境下, 会减弱 RGC 轴突和树突顶盖之间的突触传递^[20]。2012年, 非洲爪蟾模型已经被用来研究亚致死浓度的甲基异噻唑啉酮 (MIT; 一种杀菌剂, 在洗发水等化妆品中比较常见) 对神经系统各方面功能的影响^[27]。例如, MIT 暴露后的蝌蚪减少了视顶盖依赖的视觉诱导行为, 表明视神经通路中的突触传递或视顶盖之间的突触连接自我精细修整没有全部完成^[12]。MIT 处理后的神经元内在兴奋性和突触强度并没有发生变化, 表明慢性 MIT 处理会影响整个神经环路, 而不只是在单细胞水平。此外, 非洲爪蟾模型也被用于研究二甲苯 (PX) 对大脑发育和视觉行为的影响^[28]。二甲苯及其衍生物是工业中广泛使用的原料, 用亚致死浓度的 PX 处理爪蟾蝌蚪发现, 随着 PX 浓度的增加, 发育的畸形率显著增加, 视顶盖神经细胞凋亡的数量也急剧增加。长期暴露在 PX 中会导致蝌蚪的逃避行为出现严重缺陷, 同时, 会显著增加视顶盖中 H4K12 的乙酰化和 H3K9 的二甲基化水平。引人注目的是, PX 和 D-葡萄糖醛酸 (GA) 的共同孵育减少了凋亡细胞的数量, 并拯救了蝌蚪逃避行为指数的降低, 抑制了视顶盖中由 PX 引起的凋亡细胞数量增加^[28]。这些结果表明, 表观遗传调控在 PX 参与的凋亡和动物行为中起着关键作用。总的来说, 这些研究表明, 非洲爪蟾蝌蚪可以用于检测单个神经细胞结构和功能的精细变化, 也可以在神经环路和行为学水平研究化合物对中枢神经系统的作用。这些技术具有广泛的市场应用前景, 可以用于大规模检测化合物的毒副作用, 也可以为临床和靶向药物的筛选应用提供重要参考信息。

2 用于研究癫痫发作的蝌蚪模型

除了环境毒素外, 大脑的癫痫活动特别容易影响中枢神经环路的发育。数据表明, 几种不同类型的惊厥药, GABA 受体拮抗剂 (戊四唑、木防己苦毒素和荷包牡丹碱)、谷氨酸受体激动剂 (红藻氨

酸)、毒蕈碱受体激动剂 (毛果芸香碱) 和钾离子通道抑制剂 (4-氨基吡啶) 都可以引起癫痫样行为^[29]。具体表现为蝌蚪静止不动, 而游动时速度会突然加快, 并出现头部的横向运动, 最后由于单侧轴向肌肉强烈收缩引起 C 型收缩癫痫发作行为。PTZ 处理蝌蚪时, 场电位记录视顶盖大脑, 可以检测出高频的癫痫样电活动, 抗癫痫药物丙戊酸钠可以完全阻断电活动的增加。该模型的优点是, 在电生理学或影像学实验过程中, 可以用琼脂固定肌松剂处理后的蝌蚪, 从而可以在不使用麻醉剂的情况下对癫痫的发作进行活体研究^[29]。

2011年, Bell 等^[30]连续两次使用 PTZ 诱导蝌蚪癫痫发作并发现, 第一次 PTZ 诱导的癫痫发作增加了蝌蚪体内多胺的产生, 从而增加抑制性递质 GABA 的产生和释放, 使得蝌蚪不易发生癫痫, 内源性多胺对癫痫发作可以产生神经保护作用。此外, 把蝌蚪暴露在视觉条件刺激下, 会导致视顶盖 GABA 水平的升高, 这为研究 GABA 如何调节神经环路的稳定和动态平衡提供了很好的在体动物模型^[31]。

3 研究自闭症谱系障碍的蝌蚪模型

自闭症谱系障碍 (ASD) 是一种愈发常见的神经系统发育障碍症, 也称作“广泛性发育障碍”, 发病原因复杂, 可能是由基因遗传变异或环境危害引起的, 如产前感染、激素和致畸剂暴露^[32-33]。研究发现, 40 多个基因的突变可以增加 ASD 的患病率, 但这些突变不完全是外显的, 单个基因突变不是产生 ASD 的充分因素^[34-35]。此外, 自闭症的症状不仅表现在语言、社会交往和物品依恋等高等认知水平上, 而且 ASD 的病因与神经系统功能和发育有很大关系, 包括突触可塑性变化^[36-38]、兴奋/抑制的平衡^[39-41]、神经环路和神经元-胶质细胞的相互作用^[33]、轴突导向和树突生长改变引起的突触连接减弱或过度增强^[42-43]。这些现象表明, ASD 可能是发育异常引起的反应^[44], 因此, 也可以使用不能产生 ASD 的动物模型, 如灵长类^[35, 45]、哺乳动物^[43-44]、两栖类^[46-47]、鸟类^[48]和昆虫^[49]来研究 ASD 的发生发展机制^[45]。

一个好的动物模型应该能在细胞和神经网络水平观察 ASD 引起的神经发育失调变化, 蝌蚪的优点之一就是可以在单个神经元中进行基因过表达或敲低, 这样可以很容易地区分 ASD 相关基因突变是引起细胞自主性变化还是导致神经网络水平变

化。例如,当野生型 *MeCP2* 基因在非洲爪蟾视顶盖神经元过度表达时^[50],会造成神经元长出更少但更长分支的树突^[51]。因此,对于非洲爪蟾、啮齿动物以及人来说,由 *MeCP2* 基因突变引起的神经网络连接变化是 ASD 大脑神经环路异常的重要原因^[43]。这也说明非洲爪蟾和人类之间的关键转录因子是十分保守的,通过研究非洲爪蟾的 *MeCP2* 基因功能,可以进一步推测 *MeCP2* 基因在更高级哺乳动物中的作用^[52]。

到目前为止,与 ASD 有关的人类基因还没有被全部确认和研究^[53]。所有与 ASD 相关的遗传疾病中,使用非洲爪蟾模型研究最多的一种疾病就是与 *FMR1* 单一基因失活有关的脆性 X 染色体综合征^[54]。爪蟾基因组中 *fmr1* 的同源基因 (*fmrp* 和 *fmr1p*) 比人类 (*FMRP*、*FXR1P* 和 *FXR2P*) 少,每个基因的亚型也更少^[55]。即便如此,人类 FMRP 蛋白和 FXRP 蛋白的抗体也可以识别非洲爪蟾的同源基因^[55-56],而且,非洲爪蟾 *fmrp* 和 *fmr1p* 基因表达敲低产生的表型可以被人类 *FMRP* 和 *FXRP* 基因过表达所拯救^[54]。在蝌蚪的胚胎发育期,调控 *FMR1* 基因会扰乱蝌蚪的正常体节形成^[57],因此,观察 *FMR1* 基因对人体神经环路发育影响具有非常重要的意义。另外,神经黏附分子 *neuroligins* 和 *neurexin* 与 *shank*^[58] 和 *PSD-95* 是非洲爪蟾和哺乳动物高度同源的两类蛋白质^[59],是和人类自闭症患者高度相关的突变基因^[41,60],在非洲爪蟾模式生物中都已经进行了细致的研究。

无论是过表达或敲低 Nlg-1 的表达水平,都会影响蝌蚪视顶盖神经元树突的发育生长,表现为视顶盖神经元不能和 RGC 轴突建立新突触,树突丝状伪足动态活性增强,树突分支呈现出未成熟的形态^[59]。此外,通过重建丝状伪足的动态变化,使用蝌蚪活体大脑实时成像技术^[4],并结合遗传操作^[61]以及电生理记录^[13-14,62],从而全面解析目标蛋白的作用及其对突触功能和神经网络形成的调节机制。

我们还可以利用非洲爪蟾模型研究 ASD 大脑和免疫激活之间的联系^[63]。尽管在 ASD 患者中观察到了胶质细胞激活和炎症细胞因子水平的增加,但是这些现象的因果关系仍不清楚。当蝌蚪长期暴露于白细胞介素 (IL-1 β /IL-6) 或肿瘤坏死因子 (TNF α) 中时,电生理记录到视顶盖神经元的突触连接加强,AMPA/NMDA 比例显示突触更成熟;从行为上看,动物感觉处理异常,更容易引起 ASD 产生^[64],这

些结果表明,免疫激活本身可以诱导 ASD 的部分表型。

4 在表观遗传调控相关疾病中的应用

随着人口的老龄化,迟发性神经退行性疾病,如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、亨廷顿病 (Huntington's disease, HD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 已经成为严重的社会问题。这类疾病的发病机制复杂。最近研究发现,表观遗传调控在其发生、发展过程中起作用,通过组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 和组蛋白乙酰化酶 (HAT) 对组蛋白进行修饰调节基因的转录活性。一些类别的 HDAC 有望成为神经退行性疾病治疗的药物靶点。研究发现,HDAC1 和 HDAC2 在爪蟾发育 34 期主要位于线粒体和细胞核中,在进一步的大脑发育之后主要局限于细胞核。HDAC3 在早期发育过程中广泛存在于线粒体、细胞核和细胞质中,45 期时主要分布在细胞核内,而 HDAC8 在视顶盖发育早期广泛分布在线粒体、细胞核和细胞质中^[65-66]。在视顶盖发育早期,组蛋白乙酰化酶 H4K12 的活性仍然很低。使用广谱 HDAC 抑制剂 (TSA) 或特异性的 I 型 HDAC 抑制剂 MGCD0103,会引起 34 期线粒体的数量减少^[67]。这些结果表明, I 型 HDACs 的亚细胞分布与非洲爪蟾视顶盖发育之间的联系,但调节神经环路构建和神经疾病的具体机制还不清楚。在非洲爪蟾神经系统发育过程中,HDAC1 和 HDAC3 参与视觉经验依赖的放射状胶质细胞增殖调控^[65-66]。在治疗神经退行性疾病的过程中,组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDACis) 可以增强突触可塑性,改善记忆损伤^[10]。另外,HDACis 还可以作为抗癌药物进行研究,但是 I/II 期临床试验表明,HDAC 的非特异性抑制将会产生多种副作用。由此,在临床上对于 HDACis 的正确使用,关键是要从 HDAC 蛋白家族成员中找到专一性药物靶点,减少非特异性副反应。

5 结语

综上所述,这些结果充分证明了利用非洲爪蟾蝌蚪模型可以从分子、细胞、环路和行为层面对神经系统功能及相关疾病进行全面的科学研究。其在活体研究和单细胞观察方面的独特优势使非洲爪蟾蝌蚪成为研究大脑发育过程中引起的神经系统疾病的重要模型,但是,因为非洲爪蟾是四倍体,每个基因有四个拷贝,与二倍体基因组相比,遗传操作相对困难。目前,随着转基因技术的发展,转基

因非洲爪蟾也已实现, 如在视网膜神经节细胞中表达显性抑制的 TrkB (BDNF 的受体)^[68]。然而, 因为爪蟾基因组有四份拷贝, 很难完全抑制目的基因的表达。所以, 研究人员一般通过显性失活来有效抑制内源基因的功能^[69], 但是这种操作是非特异性的。因此, RNA 干扰 (RNAi) 和吗啉寡核苷酸已经成为敲低非洲爪蟾目的基因的常用方法^[70-71]。从遗传学上来讲, 二倍体热带爪蟾可以成为一个更好的脊椎动物模型, 热带爪蟾更易于染色体的遗传操作。另外, 热带爪蟾拥有非洲爪蟾模型的所有优点, 因此具有更大的研究优势, 是未来实验的优先选择模型。

[参 考 文 献]

- [1] Straka H, Simmers J. *Xenopus laevis*: an ideal experimental model for studying the developmental dynamics of neural network assembly and sensory-motor computations. *Dev Neurobiol*, 2012, 72: 649-63
- [2] Tremblay M, Fugere V, Tsui J, et al. Regulation of radial glial motility by visual experience. *J Neurosci*, 2009, 29: 14066-76
- [3] Liu XF, Tari PK, Haas K. PKM zeta restricts dendritic arbor growth by filopodial and branch stabilization within the intact and awake developing brain. *J Neurosci*, 2009, 29: 12229-35
- [4] Hossain S, Hewapathirane DS, Haas K. Dynamic morphometrics reveals contributions of dendritic growth cones and filopodia to dendritogenesis in the intact and awake embryonic brain. *Dev Neurobiol*, 2012, 72: 615-27
- [5] Tao HW, Zhang LI, Engert F, et al. Emergence of input specificity of ltp during development of retinotectal connections *in vivo*. *Neuron*, 2001, 31: 569-80
- [6] Chen SX, Cherry A, Tari PK, et al. The transcription factor MEF2 directs developmental visually driven functional and structural metaplasticity. *Cell*, 2012, 151: 41-55
- [7] Podgorski K, Dunfield D, Haas K. Functional clustering drives encoding improvement in a developing brain network during awake visual learning. *PLoS Biol*, 2012, 10: e1001236
- [8] Imaizumi K, Shih JY, Farris HE. Global hyper-synchronous spontaneous activity in the developing optic tectum. *Sci Rep*, 2013, 3: 1552
- [9] Demarque M, Spitzer NC. Activity-dependent expression of Lmx1b regulates specification of serotonergic neurons modulating swimming behavior. *Neuron*, 2010, 67: 321-34
- [10] Ruan H, Gao J, Qi X, et al. Visual experience dependent regulation of neuronal structure and function by histone deacetylase 1 in developing *Xenopus tectum in vivo*. *Dev Neurobiol*, 2017, 77: 947-62
- [11] Pratt KG, Khakhalin AS. Modeling human neurodevelopmental disorders in the *Xenopus* tadpole: from mechanisms to therapeutic targets. *Dis Model Mech*, 2013, 6: 1057-65
- [12] Dong W, Lee RH, Xu H, et al. Visual avoidance in *Xenopus* tadpoles is correlated with the maturation of visual responses in the optic tectum. *J Neurophysiol*, 2009, 101: 803-15
- [13] Shen W, Liu HH, Schiapparelli L, et al. Acute synthesis of CPEB is required for plasticity of visual avoidance behavior in *Xenopus*. *Cell Rep*, 2014, 6: 737-47
- [14] Shen W, McKeown CR, Demas JA, et al. Inhibition to excitation ratio regulates visual system responses and behavior *in vivo*. *J Neurophysiol*, 2011, 106: 2285-302
- [15] Wong RO, Ghosh A. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3: 803-12
- [16] Villinger J, Waldman B. Social discrimination by quantitative assessment of immunogenetic similarity. *Proc Biol Sci*, 2012, 279: 4368-74
- [17] Lorenz C, Contardo-Jara V, Pflugmacher S, et al. The synthetic gestagen levonorgestrel impairs metamorphosis in *Xenopus laevis* by disruption of the thyroid system. *Toxicol Sci*, 2011, 123: 94-102
- [18] Liu HH, McClatchy DB, Schiapparelli L, et al. Role of the visual experience-dependent nascent proteome in neuronal plasticity. *Elife*, 2018, 7: e33420
- [19] Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, et al. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull*, 2001, 55: 197-203
- [20] Cline HT, Witte S, Jones KW. Low lead levels stunt neuronal growth in a reversible manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9915-20
- [21] Ruthazer ES, Li J, Cline HT. Stabilization of axon branch dynamics by synaptic maturation. *J Neurosci*, 2006, 26: 3594-603
- [22] Damjanovski S, Amano T, Li Q, et al. Role of ECM remodeling in thyroid hormone-dependent apoptosis during anuran metamorphosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 926: 180-91
- [23] Helbing CC, Bailey CM, Ji L, et al. Identification of gene expression indicators for thyroid axis disruption in a *Xenopus laevis* metamorphosis screening assay. Part 1. Effects on the brain. *Aquat Toxicol*, 2007, 82: 227-41
- [24] Zoeller RT, Crofton KM. Thyroid hormone action in fetal brain development and potential for disruption by environmental chemicals. *Neurotoxicology*, 2000, 21: 935-45
- [25] Thompson CK, Cline HT. Thyroid hormone acts locally to increase neurogenesis, neuronal differentiation, and dendritic arbor elaboration in the tadpole visual system. *J Neurosci*, 2016, 36: 10356-75
- [26] Zhang F, Degitz SJ, Holcombe GW, et al. Evaluation of gene expression endpoints in the context of a *Xenopus laevis* metamorphosis-based bioassay to detect thyroid hormone disruptors. *Aquat Toxicol*, 2006, 76: 24-36
- [27] Spawn A, Aizenman CD. Abnormal visual processing and increased seizure susceptibility result from developmental exposure to the biocide methylothiazolinone. *Neuroscience*, 2012, 205: 194-204
- [28] Gao J, Ruan H, Qi X, et al. Increased apoptosis and abnormal visual behavior by histone modifications with

- exposure to para-xylene in developing *Xenopus*. *Neuroscience*, 2016, 331: 177-85
- [29] Hewapathirane DS, Dunfield D, Yen W, et al. *In vivo* imaging of seizure activity in a novel developmental seizure model. *Exp Neurol*, 2008, 211: 480-8
- [30] Bell MR, Belarde JA, Johnson HF, et al. A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 505-12
- [31] Miraucourt LS, Silva JS, Burgos K, et al. GABA expression and regulation by sensory experience in the developing visual system. *PLoS One*, 2012, 7: e29086
- [32] Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, et al. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health*, 2007, 28: 235-58
- [33] Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 341-55
- [34] Lichtenstein P, Carlstrom E, Rastam M, et al. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *Am J Psychiatry*, 2010, 167: 1357-63
- [35] Neale BM, Kou Y, Liu L, et al. Patterns and rates of exonic *de novo* mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, 2012, 485: 242-5
- [36] Krey JF, Dolmetsch RE. Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca²⁺ signaling. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, 17: 112-9
- [37] Markram K, Rinaldi T, La Mendola D, et al. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33: 901-12
- [38] Bhakar AL, Dolen G, Bear MF. The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci*, 2012, 35: 417-43
- [39] Perry W, Minassian A, Lopez B, et al. Sensorimotor gating deficits in adults with autism. *Biol Psychiatry*, 2007, 61: 482-6
- [40] Markram K, Markram H. The intense world theory - a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front Hum Neurosci*, 2010, 4: 224
- [41] Marin O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13: 107-20
- [42] Rinaldi T, Silberberg G, Markram H. Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cereb Cortex*, 2008, 18: 763-70
- [43] Geschwind DH. Advances in autism. *Annu Rev Med*, 2009, 60: 367-80
- [44] Peca J, Feng G. Cellular and synaptic network defects in autism. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22: 866-72
- [45] Patterson PH. Modeling autistic features in animals. *Pediatr Res*, 2011, 69: 34R-40R
- [46] Kabashi E, Brustein E, Champagne N, et al. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812: 335-45
- [47] James EJ, Gu J, Ramirez-Vizcarrondo CM, et al. Valproate-induced neurodevelopmental deficits in *Xenopus laevis* tadpoles. *J Neurosci*, 2015, 35: 3218-29
- [48] Panaitof SC. A songbird animal model for dissecting the genetic bases of autism spectrum disorder. *Dis Markers*, 2012, 33: 241-9
- [49] Gatto CL, Broadie K. Drosophila modeling of heritable neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol*, 2011, 21: 834-41
- [50] Samaco RC, Neul JL. Complexities of Rett syndrome and MeCP2. *J Neurosci*, 2011, 31: 7951-9
- [51] Marshak S, Meynard MM, De Vries YA, et al. Cell-autonomous alterations in dendritic arbor morphology and connectivity induced by overexpression of MeCP2 in *Xenopus* central neurons *in vivo*. *PLoS One*, 2012, 7: e33153
- [52] Stancheva I, Collins AL, Van den Veyver IB, et al. A mutant form of MeCP2 protein associated with human Rett syndrome cannot be displaced from methylated DNA by notch in *Xenopus* embryos. *Mol Cell*, 2003, 12: 425-35
- [53] Hellsten U, Harland RM, Gilchrist MJ, et al. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, 2010, 328: 633-6
- [54] Faulkner RL, Wishard TJ, Thompson CK, et al. FMRP regulates neurogenesis *in vivo* in *Xenopus laevis* tadpoles. *eNeuro*, 2015, 2: e0055
- [55] Huot ME, Bisson N, Davidovic L, et al. The RNA-binding protein fragile X-related 1 regulates somite formation in *Xenopus laevis*. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 4350-61
- [56] Blondin L, van 't Padje S, Severijnen LA, et al. Two members of the *Fxr* gene family, *Fmr1* and *Fxr1*, are differentially expressed in *Xenopus tropicalis*. *Int J Dev Biol*, 2005, 49: 437-41
- [57] Huot ME, Bisson N, Moss T, et al. Manipulating the fragile X mental retardation proteins in the frog. *Results Probl Cell Differ*, 2012, 54: 165-79
- [58] Gessert S, Schmeisser MJ, Tao S, et al. The spatio-temporal expression of ProSAP/shank family members and their interaction partner LAPSER1 during *Xenopus laevis* development. *Dev Dyn*, 2011, 240: 1528-36
- [59] Chen SX, Tari PK, She K, et al. Neurexin-neurologin cell adhesion complexes contribute to synaptotropic dendritogenesis via growth stabilization mechanisms *in vivo*. *Neuron*, 2010, 67: 967-83
- [60] Feng J, Schroer R, Yan J, et al. High frequency of neurexin 1 β signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett*, 2006, 409: 10-3
- [61] Bestman JE, Cline HT. The RNA binding protein CPEB regulates dendrite morphogenesis and neuronal circuit assembly *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20494-9
- [62] Pratt KG, Aizenman CD. Homeostatic regulation of intrinsic excitability and synaptic transmission in a developing visual circuit. *J Neurosci*, 2007, 27: 8268-77
- [63] Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron*, 2009, 64: 61-78
- [64] Lee RH, Mills EA, Schwartz N, et al. Neurodevelopmental effects of chronic exposure to elevated levels of pro-inflammatory cytokines in a developing visual system. *Neural Dev*, 2010, 5: 2

- [65] Gao J, Ruan H, Qi X, et al. HDAC3 but not HDAC2 mediates visual experience-dependent radial glia proliferation in the developing *Xenopus* tectum. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 221
- [66] Tao Y, Ruan H, Guo X, et al. HDAC1 regulates the proliferation of radial glial cells in the developing *Xenopus* tectum. *PLoS One*, 2015, 10: e0120118
- [67] Guo X, Ruan H, Li X, et al. Subcellular localization of class I histone deacetylases in the developing *Xenopus* tectum. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 510
- [68] Marshak S, Nikolakopoulou AM, Dirks R, et al. Cell-autonomous TrkB signaling in presynaptic retinal ganglion cells mediates axon arbor growth and synapse maturation during the establishment of retinotectal synaptic connectivity. *J Neurosci*, 2007, 27: 2444-56
- [69] Coen L, Le Blay K, Rowe I, et al. Caspase-9 regulates apoptosis/proliferation balance during metamorphic brain remodeling in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 8502-7
- [70] Sharma P, Cline HT. Visual activity regulates neural progenitor cells in developing *Xenopus* CNS through *musashi1*. *Neuron*, 2010, 68: 442-55
- [71] Shen W, Da Silva JS, He H, et al. Type A GABA-receptor-dependent synaptic transmission sculpts dendritic arbor structure in *Xenopus* tadpoles *in vivo*. *J Neurosci*, 2009, 29: 5032-43