

双光子钙成像技术在模型动物视皮层 II / III 层神经元功能研究中的应用

李 谦¹, 毕爱玲^{1,2}, 刘德政¹, 毕宏生^{1,2}, 王兴荣^{1,2}

引用: 李谦, 毕爱玲, 刘德政, 等. 双光子钙成像技术在模型动物视皮层 II / III 层神经元功能研究中的应用. 国际眼科杂志 2020; 20(9):1529-1532

基金项目: 国家重点研发计划 (No.2019YFC1710200)

作者单位: ¹(250014) 中国山东省济南市, 山东中医药大学; ²(250002) 中国山东省济南市, 山东省中西医结合眼病防治重点实验室 山东省高校中西医结合眼病防治技术(强化)重点实验室 山东中医药大学眼科研究所 山东中医药大学附属眼科医院

作者简介: 李谦, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病及屈光不正。

通讯作者: 王兴荣, 硕士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病、屈光不正、角膜病、玻璃体视网膜疾病及眼外伤。

semwxr@163.com

收稿日期: 2019-10-23 修回日期: 2020-08-03

摘要

钙离子是哺乳动物神经细胞内的重要信使, 可以介导多种细胞内信号转导通路, 在调控神经元的功能方面发挥关键作用。钙信号在明确的细胞亚区发挥其高度特异性的功能, 特别是在大脑视皮层中更能反映神经元的活性, 因此对神经元进行钙信号的检测对研究视皮层功能尤其重要。双光子显微镜在皮层浅层区域钙信号检测方面具有独特优势。本文综述了双光子在体检测技术在模型动物视皮层 II / III 层神经元功能研究中的应用。

关键词: 视皮层; II / III 层; 钙信号; 双光子钙成像技术

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.9.12

Roles of two-photon calcium imaging technology for visual cortex II / III layer neurons in model animals

Qian Li¹, Ai-Ling Bi^{1,2}, De-Zheng Liu¹, Hong-Sheng Bi^{1,2}, Xing-Rong Wang^{1,2}

Foundation item: National Key Research and Development Project (No.2019YFC1710200)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ²Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese, Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese; Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Xing-Rong Wang. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province,

China; Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese, Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese; Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China. semwxr@163.com

Received:2019-10-23 Accepted:2020-08-03

Abstract

• Calcium is an important messenger in the mammalian nerve cells which mediates a variety of intracellular signal transduction pathways and plays critical roles in regulating the neuronal functions. Calcium signaling exerts its highly specific function in a defined sub-region of the cell, especially in the visual cortex of the brain. Detection of calcium signals in neurons is particularly important for the studying of neuronal function. The two-photon microscope has a unique advantage in the detection of calcium signal in the superficial cortex. In this paper, the application of two-photon in the *in vivo* detection of the visual cortical II / III layer of model animals are reviewed.

• KEYWORDS: visual cortex; II / III layer; calcium signal; two-photon calcium imaging

Citation: Li Q, Bi AL, Liu DZ, et al. Roles of two-photon calcium imaging technology for visual cortex II / III layer neurons in model animals. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(9):1529-1532

0 引言

钙离子 (Ca^{2+}) 是细胞内重要的信号分子, 生物体内多种功能的调节都需要 Ca^{2+} 的参与。 Ca^{2+} 在调控细胞突触可塑性、发育、学习记忆等方面也发挥着重要作用^[1]。在神经系统中, 钙信号从神经诱导到神经细胞增殖、迁移和分化的发展过程中起着重要作用, 高度复杂的神经元使得 Ca^{2+} 的多功能特性得以体现^[2]。因此, 发展精确的 Ca^{2+} 检测技术对研究神经元功能至关重要。

传统上, 细胞内 Ca^{2+} 检测方法主要是电生理技术, 这项技术尚存在一些缺点, 尤其在长时间记录细胞活动方面, 电生理记录使用的电极会随着时间改变位置, 称为电极漂移^[3], 这可能导致不同时间记录不同的细胞, 极大地影响了信号记录。双光子钙成像可以更好地解决电生理记录的主要弱点。随着显微成像技术的不断进步, 加上更强大的钙指示剂的发现和使用, 使得双光子钙成像技术更加成熟、有效^[4]。

初级视皮层 (又称纹状皮层或者视觉第一区, 即 V1

区)是哺乳动物视觉系统编码视觉刺激,处理视觉信息的主要区域,其中视皮层 II/III 层主要是输出投射到更高级的皮层,II/III 层神经元的功能特性在视觉信号通路中起到了关键作用。虽然前人对初级视皮层单个神经元的功能特性进行了深入的研究,但对于视皮层神经元在编码视觉刺激,处理视觉信息方面的功能研究,人们知之甚少。综合以上信息,采用双光子钙成像系统检测视皮层 II/III 层神经元钙活动的情况,可以更好地检测视皮层神经元活性变化,为探索视皮层处理和编码视觉信息的功能机制奠定基础。

1 双光子钙成像技术的特点

双光子钙成像技术近年来已成为分析神经元功能的一种常用方法^[5]。目前在体成像技术缺乏反映单个细胞反应特性的能力,而双光子成像检测钙信号技术可克服这一限制。使用双光子显微镜进行体内钙成像,可以同时监测局部区域中数百个神经元的活动^[6]。现在已经被广泛应用于视皮层功能的研究,Ohki 等^[7]通过 Ca^{2+} 荧光指示剂标记了数千个视皮层神经元,然后在视皮层下,用双光子显微镜成像了视皮层神经元群的活动。双光子显微镜系统主要由激光发射器、光束扩展器、二向色镜、物镜、探测系统、数据采集系统组成。主要流程是激光发射器发出激光,经过光束扩展器的调整被转换成对称均匀的平行光束,光束透过二向色镜,经过物镜汇聚到视皮层目标区域,激发后的视皮层目标区域发出相应荧光,再通过二向色镜反射到探测系统,最终探测到的信号由数据采集系统收集(图 1^[5])。其成像原理是当视皮层神经元受到视觉刺激时,细胞内的 Ca^{2+} 水平会上升,通过利用 Ca^{2+} 敏感的荧光指示剂,如 GCaMP 系列和小分子 Ca^{2+} 指示剂 Fluo-2 等,在摄像机传感器下可以标记相关活动的神经元。这种技术具有穿透性强、空间分辨率高、组织损伤小等技术优势,可以在活体动物中进行长时程动态检测,在视觉神经科学领域中得到广泛的应用。

这项技术可在特定细胞群中表达荧光蛋白,制备转基因小鼠,被广泛应用于双光子荧光(TPF)显微镜下的活体脑研究。也可通过对活体小鼠局部注射具有荧光效应的标记物,用双光子显微镜清晰地对活体小鼠脑皮质局部神经元进行成像^[8]。携带 Ca^{2+} 荧光指示剂的神经元可以使双光子成像系统同时检测目标区域内多个神经元的峰值活动^[3,9]。体内双光子 Ca^{2+} 成像相对于多个电极记录的优势在于其空间分辨率更高,可精确地对神经元进行定位,有助于确定其微结构的功能^[7]。并且能够在一个局部区域内检测视皮层神经元的功能结构,为大脑皮层的实验研究开辟了一个新的领域。

2 双光子钙成像技术在视皮层 II/III 层神经元功能研究中的应用

2.1 双光子钙成像技术在研究视皮层 II/III 层神经元纤维投射的连接性与功能性的应用

神经元连接是大脑信息处理的前提,而视皮层神经元连接性与功能性之间的关系是处理视觉信息,理解视觉通路的基础。有研究者通过电生理技术记录了视皮层上多个荧光标记神经元的突触连接,表明了相邻锥体神经元之间的突触连接是不均匀的,取决于细胞类型、电生理特性等因素^[10-11]。事实上,即使在分布相对均匀的视皮层神经元群中,连接性也不是均匀

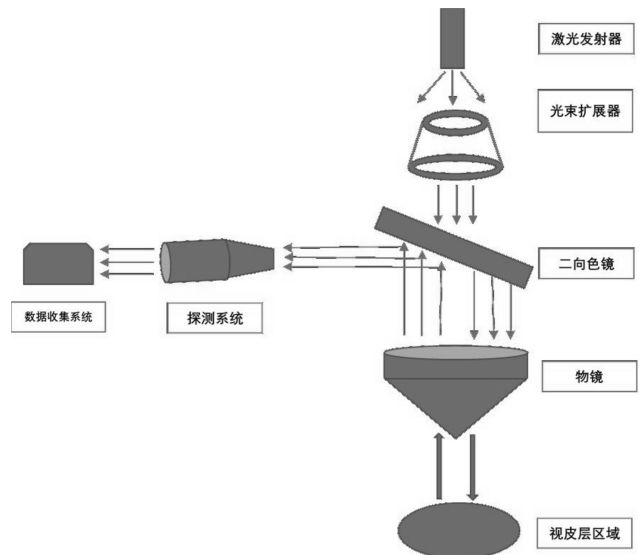


图 1 双光子钙成像技术的装置示意图。

分布的^[12]。虽然这种非随机连接增加了功能相似的神经元形成突触的可能性,但神经元突触在局部皮层回路中的功能特性尚未确定。为了探索连接强度与神经元功能之间的关系,Ko 等^[13]在麻醉小鼠视皮层中注射钙荧光指示剂 OGB-1 AM 和星形胶质细胞标记物 SR101,然后在呈现漂移光栅和自然场景时,使用双光子钙成像在体检测技术记录了小鼠视皮层 II/III 层锥体神经元中与尖峰相关的体细胞钙信号,在研究中对小鼠 V1 区局部连接的功能特异性进行了表征。结果表明,相邻锥体神经元之间的连接不是随机的,视觉刺激驱动神经元更有可能彼此连接,这种可能性随着它们的反应相似程度的增加而增加。当比较自然场景感官输入的反应时,连接和功能之间的关系相对人工漂移光栅刺激更强。Cossell 等^[14]同样通过应用体内双光子钙成像和体外全细胞记录揭示了小鼠初级视皮层 II/III 层锥体神经元之间的连接强度遵从一个简单的规律:反应高度相关的神经元形成强大的连接,而反应不相关或负相关的神经元连接很少,只有微弱的连接。

在哺乳动物视觉系统中,外界视觉信息到达 V1 区,进一步投射到更高层次的视觉皮层区域^[15-16]。其中,前外侧视觉区(AL)和后内侧视觉区(PM)是 V1 神经元投射的两个主要靶区。在视皮层 II/III 层,锥体神经元优先接受共同突触输入的神经元^[17],从而优先对外界视觉刺激做出反应。然而,对于 V1 神经元的长期投射靶区与它们的局部连通性和功能特性之间的关系,我们知之甚少。为了研究 AL 和 PM 投射神经元的特异性连接与它们的视觉反应特性之间的关系,Kim 等^[18]使用双光子钙成像技术记录了清醒小鼠视皮层 II/III 层神经元的活动,通过观察投射到 AL 和 PM 区域的 V1 神经元的局部连接,发现投射到不同目标区域的神经元之间的连接很少见,而且明显少于投射到相同目标区域或随机取样神经元之间的连接。Mark 等^[19]在清醒小鼠上利用双光子钙成像来比较 V1 区和两个下游靶区(AL 和 PM)的视觉反应,进一步研究发现这两个区域几乎完全没有重叠的刺激偏好,AL 神经元对低空间频率,高时间频率或快速移动的刺激反应最好,而 PM 神经元对高空间频率,低时间频率或缓慢移动的刺激反应最好。相比之下,V1 区域是这两个区域的主要输

入源, V1 区域的神经元对广泛的频率和速度非常敏感。此外, PM、AL 和 V1 的神经元群体对刺激方向具有相似的定向选择性。这些结果表明, 较高的视觉区域 AL 和 PM 对处理不同类型的视觉信息具有很强的特异性。双光子钙成像技术的应用可以用来揭示不同细胞类型和其他皮质层区域连接的功能偏差, 这对于理解视觉通路的功能机制是至关重要的。

2.2 双光子钙成像技术在研究不同视觉刺激对视皮层功能影响中的应用 当受到静止或运动模式的视觉刺激时, 视皮层的神经元对视觉刺激的不同基本特征有选择性的反应, 这些反应可以通过其接受域的兴奋区和抑制区的排列来表达。神经元对感官刺激的反应特性已被用来识别它们的接受域, 并在功能上映射到感官系统。在初级视皮层中, 大多数神经元对视觉刺激的特定方向和空间频率具有选择性。Ayzenshtat 等^[20]通过对小鼠初级视皮层 II/III 层神经元群进行双光子钙成像表征了神经元对不同方向和空间频率的响应特性, 发现小鼠初级视皮层神经元的定向选择性与刺激的空间频率高度相关。同时发现小鼠视皮层 II/III 层神经元的接受域在空间上是不对称的, 视觉系统可以利用这种不对称的特性来编码自然场景。

猴 V1 区的大部分神经元对特定范围的条形和光栅能做出反应, 并对刺激的方向有着调节作用。V1 神经元的偏好取向和调谐强度各不相同, 对于 V1 神经元是如何通过方向调节的强度来排列的, 以及调节强度的神经元排列是否与方向偏好有关, 仍然存在争议。Ikezo 等^[21]在猕猴 V1 区进行了双光子钙成像, 以检测单细胞水平上局部皮层区域定向调节的能力。在视皮层 II/III 层的神经元群中分别记录了带有钙敏感染料的单个神经元的荧光信号, 发现 II/III 层接近的 V1 神经元具有相同的定向调节强度和定向偏好, 方向调优强度和方向偏好的函数映射是相互关联的。

2.3 双光子钙成像技术在研究视皮层经验依赖可塑性的应用 视觉经验是视皮层神经元结构与功能发育的重要基础。随着视觉经验的改变, 视皮层神经元产生与之相适应的改变, 我们称之为经验依赖可塑性。Hubel 等^[22]通过研究单眼剥夺对猫视觉皮层功能的影响, 证明了视皮层经验依赖可塑性存在一个关键时期^[22]。在视皮层发育的这个关键时期中, 视觉经验某些程度的改变可以诱发视皮层可塑性的显著变化。视皮层神经元对视觉刺激的基本特征有选择性的反应, 这些响应特性是可塑的, 可以通过视觉输入来塑造。目前还不清楚视觉输入的哪一个特定方面有助于定向选择性的可塑性。Wang 等^[23]利用双光子显微镜研究了成年小鼠视皮层定向选择性随视觉经验的变化规律。有研究者进一步研究了定向受限视觉经验对大鼠视觉皮质反应特性的影响, 证明了长期暴露于单一方向可以改变定向偏好, 这种定向受限依赖视皮层经验可塑性^[24]。Kreile 等^[25]将戴有条带状的圆柱形透镜的老鼠饲养在有条带状的笼子里, 条带图案的方向与透镜条带方向相同。在条带饲养后, 用双光子钙成像技术测定视皮层神经元的定向偏好。这使得我们能够在给定视野下对所有神经元进行采样, 包括无反应的神经元, 从而克服了细胞外电生理记录的基本限制。条带饲养 3wk 后, 在小鼠视觉皮层 II/III 层观察到条带饲养后对定向的视觉经验刺激反

应明显增强, 响应性神经元整体比例略有下降, 但这种效应在 II/III 层随深度变化; 响应性在 II/III 层的最上层下降, 但在 II/III 层的下层保持不变。同时, II/III 层神经元的定向倾向明显向经验定向转移, 说明该神经元群体的定向效果具有较大的指导意义。因此, 对于小鼠视觉皮层神经元, 视觉环境可以作为一种指示信号, 以自适应的方式改变单个神经元的定向偏好, 从而改变了初级视觉皮层的神经元反应特性, 证明了指导机制有助于经验依赖的可塑性。

3 展望

近年来, 荧光成像技术在研究神经元方面变得越来越重要。随着基因编码的钙指示剂 (GECIs) 光学技术的最新进展, 双光子显微镜在模型动物视皮层做钙成像研究已经取得了显著进展。这些研究将不仅局限于视皮层总体细胞功能的研究, 还可研究某一特殊类型神经元群体的功能。例如 Carrillo-Reid 等^[26]使用体内双光子钙成像技术记录了清醒小鼠在有/无视觉刺激的情况下初级视觉皮层神经元的活动。Sohya 等^[27]利用双光子钙成像技术证明了视皮层神经元 GABA 在视觉刺激定向选择性的形成过程中发挥重要作用。研究神经网络的可塑性是体内双光子钙成像技术的一个很有前景的应用。例如, 形觉剥夺实验中利用双光子钙成像技术证明了单侧眼睑闭合对小鼠视皮层神经元可塑性有显著影响^[25,28]。双光子荧光显微镜在活体成像技术的发展, 也极大地促进了视皮层神经元细胞结构与功能的研究和发展。

相对于传统的电生理学技术, 钙信号在体检测技术能够长期观察相同细胞, 更大数量的细胞群, 具有实时、高分辨率、高灵敏度等优点, 是当前神经科学领域的研究前沿, 它还将推动光学成像技术在视皮层功能研究的快速发展。

参考文献

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(1):11-21
- Toth AB, Shum AK, Prakriya M. Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell Calcium* 2016;59(2-3):124-134
- Stringer C, Pachitariu M, Steinmetz NA, et al. Inhibitory control of correlated intrinsic variability in cortical networks. *Elife* 2016;5:e19695
- Xu Q, Dong X. Calcium imaging approaches in investigation of pain mechanism in the spinal cord. *Exp Neurol* 2019;317:129-132
- Birkner A, Konnerth A. Deep Two-Photon Imaging *In Vivo* with a Red-Shifted Calcium Indicator. *Methods Mol Biol* 2019;1929:15-26
- Ikezo K, Amano M, Nishimoto S, et al. Mapping stimulus feature selectivity in macaque V1 by two-photon Ca^{2+} imaging: Encoding-model analysis of fluorescence responses to natural movies. *Neuroimage* 2018;180(Pt A):312-323
- Ohki K, Chung S, Ch'ng YH, et al. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* 2005;433(7026):597-603
- Huang S, Rompolas P. Two-photon microscopy for intracutaneous imaging of stem cell activity in mice. *Exp Dermatol* 2017;26(5):379-383
- Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, et al. *In vivo* two photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(12):7319-7324
- Brown SP, Hestrin S. Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature* 2009;457(7233):1133-1136
- Holmgren C, Harkany T, Svennenfors B, et al. Pyramidalcell

- communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex. *J Physiol* 2003;551(Pt 1):139-153
- 12 Yoshimura Y, Dantzker JL, Callaway EM. Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. *Nature* 2005;433(7028):868-873
- 13 Ko H, Hofer SB, Pichler B, et al. Functional specificity of local synaptic connections in neocortical networks. *Nature* 2011;473(7345):87-91
- 14 Cossell L, Iacaruso MF, Muir DR, et al. Functional organization of excitatory synaptic strength in primary visual cortex. *Nature* 2015;518(7539):399-403
- 15 Garrett ME, Nauhaus I, Marshel JH, et al. Topography and areal organization of mouse visual cortex. *J Neurosci* 2014;34(37):12587-12600
- 16 Zhuang J, Ng L, Williams D, et al. An extended retinotopic map of mouse cortex. *Elife* 2017;6:e18372
- 17 Morgenstern NA, Bourg J, Petreanu L. Multilaminar networks of cortical neurons integrate common inputs from sensory thalamus. *Nat Neurosci* 2016;19(8):1034-1040
- 18 Kim MH, Znamenskiy P, Iacaruso MF, et al. Segregated Subnetworks of Intracortical Projection Neurons in Primary Visual Cortex. *Neuron* 2018;100(6):1313-1321
- 19 Mark AL, Kerlin AM, Roumis DK, et al. Functional specialization of mouse higher visual cortical areas. *Neuron* 2011;72(6):1025-1039
- 20 Ayzenshtat I, Jackson J, Yuste R, et al. Orientation Tuning Depends on Spatial Frequency in Mouse Visual Cortex. *eNeuro* 2016;3(5):ENEURO.0217-16.2016
- 21 Ikezoe K, Mori Y, Kitamura K, et al. Relationship between the local structure of orientation map and the strength of orientation tuning of neurons in monkey V1: a 2-photon calcium imaging study. *J Neurosci* 2013;33(42):16818-16827
- 22 Hubel DH, Wiesel TN. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol* 1970;206(2):419-436
- 23 Wang KH, Majewska A, Schummers J, et al. *In vivo* two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 2006;126(2):389-402
- 24 Ohashi K, Miyashita M, Tanaka S. Experience-dependent orientation plasticity in the visual cortex of rats chronically exposed to a single orientation. *Neurosci Res* 2007;58(1):86-90
- 25 Kreile AK, Bonhoeffer T, Hübener M. Altered visual experience induces instructive changes of orientation preference in mouse visual cortex. *J Neurosci* 2011;31(39):13911-13920
- 26 Carrillo-Reid L, Miller JE, Hamm JP, et al. Endogenous Sequential Cortical Activity Evoked by Visual Stimuli. *J Neurosci* 2015;35(23):8813-8828
- 27 Sohya K, Kameyama K, Yanagawa Y, et al. GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by *in vivo* functional Ca²⁺ imaging in transgenic mice. *J Neurosci* 2007;27(8):2145-2149
- 28 Mrsic-Flogel TD, Hofer SB, Ohki K, et al. Homeostatic regulation of eye-specific responses in visual cortex during ocular dominance plasticity. *Neuron* 2007;54(6):961-972