大脑神经联接图谱的研究进展

孙乐^{1,2*}, 杜久林^{1,2*}

1. 中国科学院神经科学研究所, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 神经科学国家重点实验室, 上海 200031;

2. 中国科学院大学未来技术学院, 北京 100049

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

收稿日期: 2017-09-12; 接受日期: 2017-12-11; 网络版发表日期: 2018-03-09

摘要 脑科学旨在阐明神经系统结构和功能, 揭示大脑工作的神经机制. 由于大脑中神经元数量庞大, 神经元形态和功能种类多样, 神经元之间的结构与功能联接错综复杂, 使得研究脑工作原理尤其挑战. 因而, 在全脑尺度上绘制神经元之间的联接, 即神经联接图谱, 揭示大脑各脑区、核团、神经元之间的功能和结构联系, 是全面理解脑工作原理的基础. 近几年, 多维度多模态成像、神经环路示踪与功能调控、图像处理等技术的进步, 推动了神经联接图谱研究的迅速发展, 使人们得以在局部脑区乃至全脑尺度上观察神经元的形态、联接与活动. 本文总结近年来宏观、介观、微观脑神经联接图谱相关技术的进步和神经环路结构与功能研究的进展, 对脑联接图谱研究领域面临的挑战与发展趋势加以探讨, 并提出斑马鱼(*Danio rerio*)是目前在全脑尺度上阐释脑结构和功能神经联接图谱的理想动物模型.

关键词 宏观脑联接图谱, 介观脑联接图谱, 微观脑联接图谱, 神经联接, 神经环路, 成像, 重构, 大数据, 斑马鱼

从秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)神经系统的302个神经元, 幼年斑马鱼(*Danio rerio*)的十万个神经元, 到人脑的上千亿个神经元, 神经元之间繁多而复杂的联接造就了大脑结构与功能上极大的复杂性^[1]. 近年来, 人们逐渐认识到, 解析神经元之间的突触联接网络是认识大脑生物学功能的基础. 2005年, Sporns等人^[2]第一次提出“脑联接组学(connectome)”(亦称脑联接图谱)的概念, 并将其定义为“脑中各种成分与突触联接网络的完整结构”. 根据观测尺度的不同, 脑联接图谱研究大致分为3个层次: 宏观联接图谱(macroscopic connectome), 其分辨率在毫米级以上, 研究不同脑灰质区域之间的联接; 介观联接图谱(mesosopic connectome), 其分辨率在微米级至亚微米级, 研究不

同类型神经元之间的联接; 微观联接图谱(microscopic connectome), 其分辨率在纳米级, 在突触水平上对神经元之间的联接进行研究(表1)^[3]. 根据研究内容不同, 脑联接图谱又可分为结构联接图谱和功能联接图谱, 前者注重神经元之间解剖结构上的联系, 后者则主要关注脑区、神经元活动之间的功能关联.

1 脑联接图谱的研究历史

1873年, 意大利科学家Golgi发明铬酸钾-浸银法, 第一次实现了对脑组织中神经元的稀疏标记, 并在显微镜下观察到神经元的完整结构. 西班牙科学家Cajal利用Golgi染色法, 对脑组织中不同类型神经元的形态

引用格式: 孙乐, 杜久林. 大脑神经联接图谱的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 253–265

Sun L, Du J L. Progress in brain neural connectomics (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 253–265, doi: 10.1360/N052017-00215

表 1 宏观、介观、微观神经联接图谱研究的比较

	宏观联接图谱	介观联接图谱	微观联接图谱
分辨率	毫米级	微米至亚微米级	纳米级
检测水平	脑区联接	神经元联接	突触联接
主要成像手段	DWI/DTI fMRI	共聚焦/双光子/光片 等光学显微镜; 病毒介导的环路追踪技术	电子显微镜 超分辨光学显微镜
优势	无创、可在体成像; 可应用于人脑研究	可进行在体神经环路追踪; 可进行较大尺度成像	可揭示神经元精细结构联接信息
问题与挑战	时空分辨率低; 间接信号成像, 受数学模型影响大	分辨率达不到突触水平	大数据的存储和重构等方法尚不成熟; 没有功能信息

进行了观察与描绘, 于1888年提出神经元学说(the neuron doctrine), 即神经系统由独立的神经元组成, 神经元与神经元或效应细胞之间通过接触进行信号传递, 从而奠定了联接组学的初始理论基础. 1897年, 英国生理学家Sherrington提出了“突触”(synapse)的概念, 并对精细突触结构进行了观察, 对Cajal的理论作了进一步充实. 1986年, White等人^[4]第一次用电子显微镜重构了线虫的全部302个神经元及其间的数千个突触连接, 成为早期联接组学研究的里程碑. 近年来, 各种光学与电子成像技术、分析方法的飞速进步, 极大地推动了不同空间尺度上脑联接图谱研究的发展.

2 神经结构联接图谱

2.1 宏观神经结构联接图谱

宏观神经结构联接图谱研究主要使用弥散加权成像(diffusion-weighted imaging, DWI)和弥散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI). DWI是基于核磁共振的成像技术, 成像原理基于脑组织微结构(神经纤维)对组织中水分子的自由弥散具有阻碍作用的现象, 通过敏感地检测组织中水分子的弥散情况, 建立数学模型进行计算, 进而得到神经元轴突的投射方向. DTI是一种特殊的DWI技术, 采集三维的水分子弥散状态并使用弥散张量模型进行计算, 因而更适用于神经纤维束追踪(tractography). 目前仅有上述两种技术可以用于在体、无创检测脑白质束走向(表1). DWI/DTI的优势在于大空间尺度、无创性白质纤维束追踪, 对一些大的神经纤维束的成像具有相对好的可靠性^[5]. 但作为脑结构图谱绘制的成像手段, DWI/DTI有两方面的局限性. 首先, 其成像的空间分辨率较低(毫米级别); 其次, 该方法是通过间接手段获得神经纤维的走行信

息, 采集到的是成千上万轴突相互交缠走行对水分子弥散的整体影响, 而同一水分子弥散图案其实可对应多种神经束走行的可能, 因而测算出的神经纤维束联接存在一定的“假阳性”与“假阴性”情况^[5,6].

2.2 介观神经结构联接图谱

大脑中的神经元通常具有非常复杂的形态, 例如, 其轴突往往会大范围投射到许多脑区(图1), 这是神经元接受上游上千个神经元的输入、同时将输入传输到下游的上千个神经元的结构基础. 介观结构联接图谱研究关注单神经元轴突投射及其与其他神经元之间的联接, 常用研究手段为使用带有荧光标记的跨突触示踪剂(trans-synaptic tracer)对特定脑区神经元进行标记, 随后用激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)或双光子荧光显微镜(two-photon excitation microscopy, TPEM)等光学显微镜观察单个神经元轴突的解剖学投射路径和上下游神经元, 获得神经元之间的突触联接关系. 近年来各种成像技术、病毒示踪剂和数据处理方法发展迅速, 如显微光学切片断层成像系统(micro-optical sectioning tomography, MOST), 能够实现小鼠(*Mus musculus*)全脑的快速成像与重构^[7,8]; 基于腺病毒(adeno-associated virus, AAV)、狂犬病毒(rabies virus, RV)、伪狂犬病毒(pseudorabies, PR)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)等顺行或逆行病毒的跨单级或多级突触示踪剂的发展, 使得研究者们能够直观地观察特定种类神经元的输入与输出, 解析精细的神经环路特征(表1)^[9].

相较而言, 在各种模式动物中, 小鼠局部脑区的介观结构联接图谱已有较多研究, 其图谱绘制以3个项目最具代表性: Allen脑科学研究所(Allen Institute for

图 1 神经元轴突的全脑投射

A: 斑马鱼后脑单个神经调质细胞的轴突全脑投射(绿色). 红色标记该神经元的胞体(张昌梅、陈玮钰、杜久林等人, 未发表结果); B: 小鼠初级运动皮层神经元(绿色、紫色)和初级视觉皮层神经元(黄色、蓝色)的轴突长程投射(引自[7])

Brain Science, AIBS)的小鼠大脑联接图谱工程(Allen Mouse Brain Connectivity Atlas Project)、冷泉港实验室(the cold spring harbor laboratory, CSHL)的小鼠大脑结构工程(Mouse Brain Architecture Project), 以及南加州大学(University of Southern California, USC)的小鼠联接组项目(Mouse Connectome Project). 三者研究思路相似, 但使用的示踪剂种类和成像方法有所差异^[10]. 2014年, USC的Dong团队^[11]通过双重共注射纤维束示踪(double co-injection tract tracing)方法, 标记了600条神经通路, 手动重构了240个脑皮层间联接, 并将皮层分为4个躯体运动感觉、2个内侧和2个外侧亚网络. 随后, 该团队又在此基础上对小鼠皮层-纹状体投射(cortico-striatal projectome)进行了更全面、详尽的描述. 他们将尾壳核(caudoputamen)分成29个区域, 使用顺行与逆行病毒示踪剂加以标记, 并在分离综合征(disconnection syndrome)的小鼠模型中标示出皮层-纹状体的联接缺陷, 提示该系统可用于皮层-纹状体投射障碍的模式动物的特定环路标记^[12]. 2014年, AIBS的Zeng团队^[13]结合高速双光子显微镜成像和自动震动切片技术, 建立连续双光子层析成像(serial two-photon

tomography, STP tomography)系统, 利用载有EGFP的AAV病毒作为顺行示踪剂进行全神经元表达, 在18.5 h内即可完成全脑范围成像, 成像水平分辨率为0.35 μm , 轴向分辨率为100 μm , 单脑数据量约750 GB. 该团队用高通量方法绘制了当时最为全面的脊椎动物脑联接图谱, 建立了脑结构联接与神经环路功能关系之间的桥梁.

相较于上述传统研究手段, 2010年华中科技大学骆清铭研究团队^[8]开发的MOST系统为一种更大尺度、更精细的成像与重构手段, MOST集切片、染色、成像与重构为一体, 可在240 h内完成1 μm 厚度切片的小鼠全脑成像, 第一次绘制了神经元分辨率的小鼠全脑图谱. 其后, 该团队^[14]又开发了全脑定位系统(brain-wide positioning system, BPS), 实现了在全脑尺度上包含多种类型神经元的轴突投射研究.

2.3 微观神经结构联接图谱

突触是神经元之间信息交流的结构单元, 微观联接图谱研究借助更高分辨率(纳米水平)的成像手段, 以获得突触内成分、蛋白组成等更为精细的结构信

息。传统的神经元突触结构成像技术为电子显微镜成像,但近年来日臻成熟的生物与光学成像技术也使光学显微镜下对突触结构的观察成为可能。微观联接图谱的主要研究过程包括样品固定、连续超薄切片、显微成像、图像重构等,进而可获得包括神经元形态、轴突投射、突触联接等信息的数据库,从中提取神经元联接特征,由此推测局部脑区、神经元类型的功能基础(表1)。

(1) 基于光学显微镜的成像技术进展。光学衍射现象限制了光学成像系统的空间分辨率。近年来,超分辨成像技术的发展,使光学成像的分辨率大为提高;加之生物染色与荧光标记技术的进展,光学成像在突触联接图谱绘制中发挥越来越重要的作用。Micheva与Smith^[15]在2007年开发了阵列断层成像(array tomography)技术,通过对超薄连续组织切片的反复多次免疫荧光染色和成像,大大提高了成像的轴向分辨率。在2010年,他们利用该技术实现了对突触蛋白的荧光成像^[16],为解析突触蛋白质组与神经环路结构提供了一个新的思路。此外,Feinberg等人^[17]在2008年开发了GRASP (GFP reconstitution across synaptic partners)方法,实现了活体线虫神经系统的突触标记。GRASP工作原理是在突触前膜与后膜分别表达绿色荧光蛋白GFP的两个互补片段,当二者融合时,两个细胞膜接触处即可出现GFP荧光。2012年, Kim等人^[18]对GRASP技术进行了改进,开发了mGRASP (mammalian GRASP),并对小鼠海马和丘脑皮层区长程环路与局部微环路的突触分布进行了在体观察。其后, Feng等人^[19]开发了mGRASP标记突触的自动化检测方法,能够准确地检测突触分布。GRASP/mGRASP技术使光学显微镜下对活体动物神经环路中突触联接的快速、准确成像成为了可能。2007年Lichtman团队^[20]开发了Brainbow方法,利用Cre-lox重组酶随机切除串联在一起的若干种荧光蛋白基因,使小鼠神经元中的荧光蛋白随机性表达,进而实现了小鼠脑中相邻神经元的差异性着色。Brainbow方法可在光学成像系统下,将相邻的不同神经元及其精细的轴突区分出来,进而对神经元之间的相互作用进行在体观察。尽管受光学成像分辨率和数据处理能力的限制,加之大脑中神经元轴突投射极为丰富,上述方法对于神经联接的密集重构仍有所局限,但作为相对高通量的突触观察手段,这些技术可作为联系介观与微观神经联接图谱之间的桥梁。

近十多年来,超分辨光学显微成像(super-resolution microscopy)技术迅速发展,分辨率可达100 nm以内。结合神经元与突触相关染色方法,超分辨光学成像技术能够对神经元种类、突触类型加以区分,进而对神经联接特征进行分析^[21]。超分辨光学成像技术根据工作原理可分为两类:(i) 基于特定模式照明的超高分辨率成像,包括结构光照明显微技术(structured-illumination microscope, SIM)、受激发射损耗显微术(stimulated emission depletion microscopy, STED)等;(ii) 基于单分子定位的超高分辨率成像,包括光激活定位显微技术(photoactivated localization microscopy, PALM)、随机光学重构显微镜(stochastic optic construction microscopy, STORM)、荧光激活定位显微技术(fluorescent photoactivated localization microscopy, FPALM)等。

(2) 基于电子显微镜的成像技术进展。现阶段,电子显微镜仍是唯一在突触分辨率水平上对脑组织进行精细而完整重构的成像技术。目前电子显微镜图像采集技术主要分为两类:基于透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)和扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)。TEM的工作原理是通过检测透射过样品的电子得到样品的结构信息,因此透射电子显微镜成像的样品为超薄切片;而SEM通过检测打在样品表面后散射向各个方向的电子来获取图像,因此用于扫描电子显微镜成像的样品可为薄片或未经切片处理的包埋组织块。TEM的侧向分辨率略高于SEM,但两者空间分辨率均可达到纳米级别,满足突触水平的神经环路重构的要求。两者成像的轴向分辨率由样品切片的厚度决定,因而通过改进切片技术,减小切片厚度有重要价值^[22]。

现阶段应用于神经环路重构的电子显微镜成像方法主要有连续切片透射电子显微镜(serial section TEM, ssTEM)、自动收集带扫描电子显微镜(automated tape-collecting ultra-microtome SEM, ATUM-SEM)、连续块面扫描电子显微镜(serial block-face SEM, SBF-SEM)和聚焦离子束扫描电子显微镜(focused ion beam SEM, FIB-SEM)^[22]。ssTEM的样品处理需手工切片并用网格收集,随后用透射电子显微镜成像,其侧向分辨率一般为2~4 nm,成像速度可达到每秒5~8百万像素。但手工切片所能达到的最小切片厚度为40~50 nm,切片数量受限(最多几千张),且存在

后续捞片难度大、手工工作量较大、难以避免操作失误等局限. 哈佛大学Lichtman团队^[23]开发的ATUM-SEM采取自动化切片与收集的方式, 切片厚度稳定在30 nm左右, 自动收集带上的切片样品经处理后在硅片上保存, 用于后续扫描电子显微镜成像. ssTEM与ATUM-SEM的切片、收片、成像过程均不会对组织样品造成破坏, 为无损性成像方法. 德国马普研究所Winfried Denk开发的SBF-SEM扫描电子显微镜腔室中配有显微镜薄片切片机, 每次切片后用扫描离子束对块面(block-face)进行成像, 成像野可达0.5 mm×0.5 mm以上, 侧向分辨率6~10 nm, 切片厚度可达20~30 nm, 可稳定地切数千张切片, 成像速度约每秒0.5~2百万像素. FIB-SEM采用镱离子束切割组织, 切片厚度可薄至5 nm, 侧向分辨率小于5 nm, 成像速度每秒0.1~0.5百万像素, 但成像野小于0.1 mm×0.1 mm.

上述对组织块的损伤性成像方法可避免切片褶皱、丢失的影响, 减小切片厚度, 提高轴向分辨率, 且图像配准容易, 进而提高成像与数据分析质量. 相对于损伤性成像方法, 无损性成像方法能够反复成像, 成像范围更广, 可使用多台电子显微镜成像以加快成像速度. 因此, 要根据实际实验的需要, 选择具体的成像方法^[24]. 用于神经网络重构的成像手段的发展趋势为分辨率与成像速度提高、图像采集自动化、图像配准精度增加, 因而样品制备、超薄切片、电子显微镜成像等技术的完善有重要意义.

(3) 电子显微镜图像重构方法的进展. 相较于成像过程, 电子显微镜图像采集后的配准与重构所需要的时间与工作量更多, 是脑联接图谱绘制工作面临的更大挑战. 传统的电子显微镜重构方法为手工校对, 所需人工时间投入非常多. 随着成像分辨率的提高, 1 mm³脑组织产生的数据量甚至可达PB (petabyte)级别^[25]. 同时, 相较于稀疏重构(sparse reconstruction), 对神经组织的密集重构(dense reconstruction)能够获得局部神经环路更丰富的信息, 但也将带来更大的数据量. 这对开发新的计算方法、建立更有效的模型提出了更高的要求^[22,24].

利用电子显微镜图像重构突触联接网络的主要环节包括神经突起追踪、突触识别、神经元种类识别等. 近年来, 多个研究团队对重构算法进行了改进. 2011年, 德国马普认知与脑科学研究所的Helmstaedter等人^[26]采取“骨架化(skeletonization)”的策略, 通过在其

开发的KNOSSOS (可视化注释软件)上, 人工反复手动追踪神经突起, 实现了对神经网络快速、可靠的重构与标记, 比传统的手工标记方法快50倍. 其后, 该团队^[27]在此基础上, 开发了webKnossos方法, 引入“飞行模式”(flight mode), 大大加快了注释者对神经突的重构速度. Wanner等人^[28]开发了CORE算法, 能自动筛出需人工追踪的位点从而减少手动输入, 从而提高了重构效率. 在突触识别方面, Dorkenwald等人^[29]利用卷积神经网络开发了SyConn系统, 能够根据已获得的神突骨架数据进行神经元的轴突、树突、树突棘、突触等亚细胞结构的鉴定与分类, 继而鉴定神经元类别、重构神经元联接网络. 该方法的优势在于, 借助CNN, 用尽可能少的人工训练数据即可实现超微信息的提取, 从而实现了高效率、低出错率的电子显微镜数据重构, 极大地降低了对人工监督的需要. 此外, SynEM方法也实现了自动化、高准确率的结构识别^[30]. 另外一种策略为“众包”(crowd-sourcing)与人工智能相结合, 如普林斯顿大学Seung团队^[31]开发了EyeWire游戏系统, 将神经元3D重构转化为在连续电子显微镜切片图像中的神经突起着色操作, 即使非专业人士经过简单的训练也可参与神经突起的追踪任务.

(4) 其他相关神经联接追踪方法的进展. 值得一提的是, 不同于传统的显微镜成像手段, Zador团队^[32]开发了基于测序的多通路分析(multiplexed analysis of projections by sequencing, MAPseq)方法, 即利用RNA测序技术在单细胞水平绘制大脑联接图谱. 他们用序列随机的小片段RNA作为“条码”(barcodes), 将其与MAPP-nλ (由mGRASP前体修饰而来, 可将条码和GFP拖至突触前膜)、GFP和病毒载体整合, 注射到蓝斑核(locus coeruleus, LC), 对其中不同神经元进行随机“标注”, 其后检测靶脑区神经元的条码RNA序列, 从而对神经元的投射进行定位. 通过该方法, 他们发现, 不同蓝斑神经元的投射路径各异. 该方法利用了随机序列小片段RNA的多样性产生多样的“条码”, 实现了对神经元投射的快速、低人工投入和高通量的检测.

(5) 各种模式动物的微观脑联接图谱研究进展. 迄今, 秀丽线虫仍是唯一一个在突触水平上神经网络被完全电子显微镜重构出的模式生物. 现阶段, 受到成像技术与数据处理能力的限制, 果蝇(*Drosophila*

melanogaster)、斑马鱼、小鼠等模式动物的微观联接组学的研究仍局限于局部脑区或特定投射, 非人灵长类动物还尚未涉足。

线虫微观神经联接图谱. 1986年, White等人^[4]用电子显微镜重构了秀丽线虫神经系统. 2011年, Varshney等人^[33]绘制了线虫的缝隙连接和化学突触图谱. 2012年, Jarrell等人^[34]绘制了控制雄性线虫交配行为的完整神经元联接图谱, 并通过数学建模的方法, 分析雄虫交配网络的空间特征, 进而分析交配过程中的决策机制; 他们发现每对神经元之间形成突触连接的概率由基因序列决定, 而这些突触形成概率的变化会引起结构联接组的改变, 进行影响神经网络的功能与线虫的行为. 2013年, Bumbarger等人^[35]通过比较线虫和虫塔寄生虫(*Pristionchus pacificus*)咽部神经系统(pharyngeal nervous system)的突触联接谱发现, 突触联接方式的差异导致了二者捕食行为的不同. 神经元功能方面, Hobert团队^[36,37]通过荧光标记线虫神经系统中表达乙酰胆碱和GABA代谢与转运相关蛋白的神经元, 分别绘制了乙酰胆碱能和GABA能神经系统, 并在转录水平证实了胆碱能和GABA能神经环路结构与功能的调控机制。

果蝇微观神经联接图谱. 果蝇全脑约有十万个神经元, 有着丰富的行为范式, 是一个适合开展全脑联接图谱绘制的无脊椎模型动物. 近几年, 果蝇脑联接组学研究发展迅速, 其中HHMI Janelia研究中心的FlyEM与FlyTEM团队旨在绘制果蝇的全脑微观联接图谱, 目前已完成了包括视髓质^[38,39]、嗅小球(olfactory glomerulus)^[40]、蕈状体(mushroom body)^[41,42]等多个脑区微观结构的解析, 从中鉴定了新的突触联接类型和有功能意义的神经环路。

由于电子显微镜得到的图像仅有电子密度信息, 因而难以明确形态和位置不具特异性的神经元的类型. 近些年兴起的一种方法, 是利用启动子驱动内源表达辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)或抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APEX)等催化DAB转化为嗜钼酸多聚体, 以增加感兴趣结构的电子显微镜衬度, 从而实现在电子显微镜图像中对特定类型神经元的标记^[43]. Sanes团队^[44]用此遗传学方法, 分别标记了果蝇和小鼠视网膜上的不同细胞类型, 由于增强了标记神经元与背景的对比度, 从而大大加快了成像与重构速度. 用过氧化物酶标记特定类型细胞

的方法对于电子显微镜下鉴定神经环路中神经元类型、挖掘不同类型神经元之间的联接规律, 以及光学显微镜与电子显微镜图像关联研究等具有重要意义。

斑马鱼微观神经联接图谱. 就目前研究方法而言, 幼年斑马鱼是唯一一个可以在全脑尺度上解析神经结构和功能联接的脊椎动物. 5~6日龄的幼年斑马鱼全脑约有十万个神经元, 其脑组织透明, 适于活体动物上进行全脑结构和功能成像. Wanner等人^[28]对斑马鱼幼鱼嗅球约98%的神经元进行密集电子显微镜重构, 并标记不同亚类神经元的全部突触(大于1000个). 通过对嗅球中小球(glomerulus)之间的中间神经元投射的分析, 发现接受相同嗅觉感觉神经元输入的小球受到重叠的中间神经元亚类支配, 说明小球间的中间神经元投射受到小球属性的影响. 哈佛大学Engert团队^[45]近期发布了斑马鱼的全脑电子显微镜成像数据库NEURODATA, 对5.5日龄的斑马鱼幼鱼进行了全脑及肌肉、心脏等部分非神经组织的连续切片和多次不同空间分辨率的透射电子显微镜成像, 并对由髓鞘包绕的2589个、总长39.9 cm的轴突节段进行了重构, 其中834个轴突可回溯到神经元胞体. 此外, 他们重构了斑马鱼左右两侧各22个网状脊髓束神经元的轴突, 并对其进行了对称性分析, 进一步印证该ssEM数据库可用于斑马鱼幼鱼的全脑神经元重构, 提出多次对样品进行不同尺度、不同分辨率的电子显微镜成像是一种在成像时间和数据存储上较为高效的微观联接图谱研究策略. 然而, 由于受限于重构技术, 该工作没有进行全脑神经突触联接的重构; 同时由于该工作种的电子显微镜图像中没有神经元类型的标记信息, 无法对该神经重构数据进行功能解读. 但该工作从方法学角度上, 证明了对斑马鱼幼鱼进行全脑电子显微镜成像的可行性。

小鼠微观神经联接图谱. 小鼠微观联接图谱研究主要聚焦于视觉系统, 包括视网膜^[31,46]、外侧膝状体^[47]、视皮层^[48,49]. 其中Denk团队^[31]与Seung团队^[46]分别重构了小鼠视网膜中的方向选择性神经节细胞(direction-selective ganglion cell, DSGCs)和星型无长突细胞(starburst amacrine cell, SAC)之间、SAC与双极细胞(bipolar cell, BC)之间的突触联接, 阐明了视网膜方向选择性与上述细胞之间联接特异性的相关性. Helmstaedter等人^[50]对小鼠视网膜内网状层(inner plexiform layer)的114 $\mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$ 区域中950个神经元及其间的全

部突触联接进行了密集重构, 据此验证了已报道的10种双极细胞类别, 同时发现了一种新型双极细胞, 揭示了视网膜神经节细胞检测局部运动信息的结构基础. Reid团队^[49]在清醒小鼠接受不同视觉刺激时对视皮层进行双光子钙成像, 鉴定出对特定视觉刺激有反应的神经元; 随后以血管为路标, 将光学成像图像与大尺度电子显微镜成像相关联, 并对神经元与突触结构进行三维微观重构, 据此将神经网络突触水平的结构与功能联系起来.

3 神经功能联接图谱

与结构联接相对应, 脑功能联接图谱关注不同脑区、不同神经元之间活动的相关性, 其基于的原理为: 有长程神经轴突投射联系的脑区或神经元之间, 其活动具有一定程度的同步性. 研究中, 常用核磁共振成像或光学显微镜下钙离子成像等手段获得不同脑区、不同种类神经元之间的活动规律, 推测自发或刺激诱发的神经活动有显著同步性或依赖性的脑区、神经元之间具有功能联接. 进一步结合脑区或神经元的空间位置、与其他脑区或神经元功能联接的强弱等信息, 可获知特定脑区或神经元的功能.

3.1 宏观神经功能联接图谱

研究宏观神经功能联接主要基于功能核磁共振成像(functional MRI, fMRI), 通过检测脑血流情况来反映各个脑区的神经元活动. 1995年, Biswal等人^[51]提出静息态功能磁共振(resting-state fMRI, R-fMRI), 即在受试者处于静息状态时进行图像采集. 另一种方法为任务态功能磁共振(task fMRI, T-fMRI), 即受试者执行一系列任务时进行成像, 相互联系的脑区在执行同一任务时会有活动上的相关性^[52]. Glasser等人^[53]根据皮层结构、功能、联接和分布(topography), 用fMRI手段进行脑功能分区, 在双侧脑半球各自描绘了180个脑区, 其中97个为新定义的脑区, 83个为已报道的脑区, 并利用机器学习方法, 实现了脑区的自动化分割和鉴定. 与DWI/DTI相似, fMRI也是一种神经活动的间接测量手段, 即通过脑血流与血氧饱和度信号表征脑区活动状态, 且时间与空间分辨率均较低; 但其具有大尺度、无创性进行功能成像的优势, 可观察全脑活动与联接信息, 并进行高级认知功能相关的研究^[5].

3.2 介观神经功能联接图谱

介观神经功能联接组学研究主要依赖于钙成像、pERK、电压探针成像等方法, 获得不同脑区、不同类型神经元活动在时间和空间上的相关性, 具有细胞分辨率. 其中, 共聚焦和双光子钙成像方法一直是开展这个方面研究的主要手段. 近年来, 光片成像(light-sheet imaging)、光场成像(light-field imaging)等技术在小型模式动物(尤其是斑马鱼)脑功能成像中得到迅速发展^[54,55], 而光遗传学(optogenetics)等神经活动操纵技术与光学成像技术相结合, 也逐渐成为绘制脑区、神经元群体之间功能联接的重要手段^[56].

由于神经元电活动十分迅速(毫秒级), 因而获取精细的神经元活动信息要求更灵敏的钙离子探针和更快的成像速度. 不同于共聚焦和双光子显微镜的点扫描模式, 光片照明荧光显微镜(light-sheet fluorescence microscopy, LSFM)利用一束光从侧面照明来激发荧光样品进行成像, 在侧向空间分辨率相对不变的同时, 将图像获取速度提高至传统的点扫描成像模式的数百至上千倍. 由于LSFM具有在体、快速的优势, 近年来尤其在斑马鱼的长时间、大空间尺度上记录脑神经元活动中得到了广泛应用^[55,57-59]. 特别地, 由于斑马鱼幼鱼体积小、全脑透明, 光片成像系统能够在细胞分辨率上, 对其进行快速全脑神经活动成像^[57]. 通过分析不同行为范式或不同外界刺激下斑马鱼全脑神经元反应的差异, 从中获得特定脑区、特定种类神经元的功能信息. 此外, 将光片成像与光遗传学手段相结合, 也可通过分析不同脑区或神经元之间活动的时间与空间依赖性, 获得局部脑区或神经元之间的功能联接情况. LSFM的成像方式要求激发样品的光片与样品成像层面处于共平面关系, 一旦二者的空间关系被打破, 成像质量与空间分辨率即会受到显著影响; 因而LSFM对更大空间尺度、动态变化样本的成像受到限制. 针对这一问题, Keller团队^[60]开发了基于AutoPilot系统的自适应光片照明(adaptive light-sheet imaging), 通过对动态生物样本的实时、自动光学调节, 提高了光片成像的空间分辨率, 拓展了LSFM在动态生物样本成像中的应用. 此外, Lu等人^[61]将“贝塞尔组件(Bessel module)”与双光子光片显微镜(two-photon light-sheet microscopy, 2PLSM)相结合, 形成一轴向延长的贝塞尔焦点, 通过两纬平扫即可实现三维成像, 进而显著提

高2PLSM的成像速率,减小了数据量。作者还发现,利用低数值孔径贝塞尔焦点(low-NA Bessel foci),可将侧向分辨率维持在亚微米级别(突触结构可辨)的同时,对突触棘钙活动成像的时间分辨率可达30 Hz;并对果蝇、幼年斑马鱼、小鼠和雪貂(*Mustela putorius furo*)等模式动物进行神经元与突触钙成像,均有较高时间分辨率。尽管该方法的轴向分辨率较低,但对于神经元稀疏标记的样本有很好的成像速度,在清醒动物上进行在体成像具有优势。

近年来,已有多个团队^[62-65]绘制了线虫、果蝇、斑马鱼等的全脑活动图谱,其中Mann等人^[65]根据果蝇静息状态下的全神经元活动,对各脑区的功能联接进行定量,从而得出脑偏侧性的网络特征。根据不同外界刺激下的全脑活动图谱,也可提取诸如线虫运动、斑马鱼视动反应(optomotor response)等行为范式背后的神经环路基础^[62-64]。值得注意的是,仅有神经元的钙活动信息只能表示功能联接,而不能反映神经元之间的结构联接。基于此,Baier团队^[56]开发了Optobow系统,能够实现对稀疏标记的神经元之间的结构和功能联的同时观察。

4 神经联接图谱研究的意义与面临的挑战

与其他组织器官相比,神经元形态多样而复杂、种类繁多、联接错综复杂、形成多种多样的局部环路^[66],因此从繁杂的神经联接中提取大脑实现功能的基本规律有着至关重要的意义。自2013年以来,美、欧、日等国家和地区相继开展国家战略层次的大型脑研究计划,即将开启的“中国脑计划”也将脑功能的神经环路基础作为研究核心,提出大规模绘制介观脑联接图谱,探索大脑中的“微环路”对于人们理解脑功能、防治脑疾病、开发类脑智能有着重要意义^[67]。正如在基因组学的基础上衍生了转录组学与蛋白质组学,尽管脑联接组学不能完全回答脑工作原理这一问题,但细胞与亚细胞水平全脑结构与功能联接图谱的确立,仍是认识脑功能原理必须跨出的关键一步。

4.1 脑联接图谱研究的意义

(1) 鉴定神经元类型。结合突触前/后的联接信息对神经元进行分类,进而鉴定已有神经元种类,发现新的神经元类型。纳米水平的成像使研究者们能够辨识

神经元精细结构、神经元之间的突触联接。因而,可以结合分子标记、结构形态特征和输入与输出信息,对神经元进行进一步分类,并分析不同类别神经元之间的联接特性^[38]。此外,通过对脑组织的密集重构也可鉴定新的神经元类型^[50]。

(2) 寻找微观结构的神经网络规律。近年来,电子显微镜与超分辨光学显微镜等成像技术的进步,推动了脑微观联接图谱绘制的进展,通过电子显微镜成像及对所得图像的三维重构,以及通过光学显微镜与电子显微镜关联赋予神经元以类别信息等手段,能够帮助研究者们更好地鉴定不同类型神经元之间的投射方式及神经网络联接形式,探寻大脑微观结构上的组织规律。在后续研究中,可进一步与功能联接信息相结合,从而为神经环路的功能研究提供更为精细的结构基础。在神经元之间的联接之外,神经元与其他细胞之间的相互作用也有十分重要的生理意义。例如,中国科学院神经科学研究所杜久林研究团队^[68]发现,斑马鱼脑中神经元活动影响小胶质细胞的运动行为,而小胶质细胞反过来通过其动态突起包裹神经元,从而调节神经元对外界刺激的突触反应。因而通过对神经组织的密集重构,也可获得大脑中神经元与非神经元细胞之间互作的结构基础。

(3) 建立结构、分子组成与功能之间的联系。通过在光学显微镜下观察荧光标记的特定类型神经元,并将其与电子显微镜图像相对应,能够获得微观重构出的神经元的功能信息^[48,49]。近期中国科学技术大学学者发展了单神经元质谱技术,实现了单神经元代谢信息的检测^[69]。若将静态的微观结构和物质代谢信息,与动态的电生理、光学钙成像等功能研究相结合,对于理解脑工作原理具有非常重要的意义。

(4) 在整体层面理解神经环路特征与脑计算原理。以前神经环路的研究大多局限于局部脑区或少数环路,但大脑如何整合并处理各种输入信息,进而产生行为的机制尚未阐明。脑联接图谱的研究能够帮助研究者们明确脑中“神经信息流”的通路,检测目前已有神经计算模型的有效性和类脑性。更重要的是,它能够将大脑工作机制的认识提升到整体层面,而非局限于局部脑区或少数不同神经元类型^[70]。通过结构和功能神经联接图谱的研究,可以获得大脑结构组织规律和神经信号加工原理,为从脑结构和脑功能上模拟脑、发展类脑智能,奠定坚实的基础。

4.2 脑图谱研究面临的挑战

(1) 如何提高神经联接图谱成像与重构速度. 在追求更高的时间与空间分辨率的过程中, 各种显微与其他高分辨成像技术的应用, 会产生巨大的数据量, 这也给脑联接图谱研究带来了前所未有的“大数据”的挑战, 包括图像的采集, 以及更为耗时、需要高人工投入的数据重构与解析^[71], 这迫切需要交叉学科的融合, 建立高度自动化、高准确率的图像配准、分割、追踪、可视化等技术.

(2) 如何突破脑区研究的局限性. 现有微观联接图谱研究还只能局限于局部脑区, 而难以进行全脑尺度的研究. 除线虫的全神经系统联接图谱外, 目前已报道的斑马鱼嗅球、小鼠视网膜、小鼠视皮层等皆为局部脑区的部分神经元联接^[28,49,50], 其不足之处为会丢失部分神经元的联接信息, 特别是长程投射的输入和输出, 无法从全脑层面理解神经网络的工作原理. 美国于2016年启动的一项号称媲美阿波罗登月计划的项目的——皮层网络的机器智能计划(machine intelligence from cortical networks, MICrONS), 计划对1 mm³的小鼠视觉皮层进行脑图谱的研究, 获取其计算方式; 由于1 mm³约占整个小鼠大脑的千分之一, 该计划的一个主要问题是其研究脑区范围的局限性.

(3) 如何建立结构和功能图谱的关联性. 脑图谱研究在结构与功能两方面还不能有机衔接, 如何解读结构图谱的神经功能意义还有待探索. 目前已有工作将光学显微镜下的功能成像与大尺度电子显微镜成像结合以实现对有特定功能神经元的神经研究^[49], 以及对于结构、分布有较特异的神经元的光学显微镜电子显微镜关联成像^[72]. 但涵盖更精细神经元类别信息、更丰富神经元活动信息的研究仍有待展开.

上述挑战对一系列交叉学科技术提出了更高的要求, 诸如快速的成像技术和对获得数据的高效、准确重构, 以及开发新的计算方法帮助研究者们从繁杂的联接图谱中提取对神经元、局部脑区乃至全脑最有价值的信息, 并根据其阐释大脑的工作原理等^[73]. 现阶段, 在电子显微镜图像重构中, 神经网络与深度学习得到了较为广泛的应用, 如现已开发出来的骨架化神经突追踪手段、“众包”(crowd-sourcing)与深度学习相

结合的神经元结构识别、神经网络自动重构等电子显微镜大数据处理方法, 能够在相当程度上加快图像重构速度^[50,74]. 但即便如此, 斑马鱼等小型脊椎动物的全脑突触水平的重构和小鼠、猕猴(*Macaca mulatta*)等更高等脊椎动物的大尺度微观脑联接图谱研究的数据量, 仍然超出目前已有的数据处理能力, 更快速、更高效的成像、重构与分析技术和研究策略仍亟待发展, 这需要不同学科共同努力^[75].

在“大数据”的挑战面前, 斑马鱼这一相对新颖的模式动物, 在全脑结构与功能联接图谱研究中有着独特的优势. 斑马鱼幼鱼是近些年神经科学领域蓬勃发展的模式动物, 具有丰富的感觉与行为模式, 已有多个实验室先后建立了多种行为范式, 包括捕食^[76]、逃跑^[77]、亮偏好^[78]、视动反应^[79]、逆流^[80]等行为, 并初步勾勒了其相应的神经环路基础及其调节机制. 突触分辨率的全脑微观联接图谱能够对已发现的神经环路提供更精细的细节, 并有助于抽提出脑结构组织一般性的规律. 斑马鱼具有脊椎动物保守的神经系统构造, 5~8日龄的幼鱼脑体积仅有约0.5×0.5×0.3 mm³(仅为美国MICrONS计划中1 mm³小鼠脑区大小的1/13), 全脑仅有十万个左右的神经元, 分别约低于人脑和鼠脑6个和3个数量级. 相较于哺乳动物大脑, 斑马鱼大脑结构相对简单而又有一定的复杂度. 在现有的成像技术与数据处理能力下, 斑马鱼幼鱼“微小”的脑尺寸带来了其全脑尺度介观和微观联接图谱相对“可解”的优势. 同时, 斑马鱼幼鱼全脑透明, 便于在生理、清醒状态下进行细胞水平的全脑结构与功能成像. 近年来, 用于神经元结构标记和功能研究的的各种荧光染料、内源表达荧光蛋白、顺行与逆行病毒载体, 以及检测神经元活动的钙离子荧光探针、电压敏感探针等工具, 在斑马鱼全脑成像中的应用更为得心应手. 同时, 斑马鱼幼鱼神经功能研究相关的技术发展迅速, 如基因敲入^[81]、在体电生理记录^[82,83]、全脑钙成像^[57]、多巴胺检测^[84], 以及光遗传学^[56]等神经活动调控技术已日臻成熟. 基于上述技术手段, 可将突触水平的全脑微观结构联接与全脑群体神经元活动、神经元类型、行为发生等相关联, 在全脑尺度上解读神经联接图谱的结构、功能和行为意义.

致谢 感谢中国科学院神经科学研究所尚春峰博士、李福宁对本文的审读和修订, 感谢中国科学院神经科学研究所张昌梅和陈玮钰提供的斑马鱼单神经元轴突投射图。

参考文献

- 1 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
- 2 Sporns O, Tononi G, Kötter R. The human connectome: a structural description of the human brain. *PLoS Comp Biol*, 2005, 1: e42
- 3 Swanson L W, Lichtman J W. From Cajal to connectome and beyond. *Annu Rev Neurosci*, 2016, 39: 197–216
- 4 White J G, Southgate E, Thomson J N, et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*, 1986, 314: 1–340
- 5 Jbabdi S, Sotiropoulos S N, Haber S N, et al. Measuring macroscopic brain connections *in vivo*. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 1546–1555
- 6 Thomas C, Ye F Q, Okan Irfanoglu M, et al. Anatomical accuracy of brain connections derived from diffusion MRI tractography is inherently limited. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 16574–16579
- 7 骆清铭. 脑空间信息学——连接脑科学与类脑人工智能的桥梁. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47: 1015–1024
- 8 Li A, Gong H, Zhang B, et al. Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse brain. *Science*, 2010, 330: 1404–1408
- 9 Callaway E M, Luo L. Monosynaptic circuit tracing with glycoprotein-deleted rabies viruses. *J Neurosci*, 2015, 35: 8979–8985
- 10 Osten P, Margrie T W. Mapping brain circuitry with a light microscope. *Nat Methods*, 2013, 10: 515–523
- 11 Zingg B, Hintiryan H, Gou L, et al. Neural networks of the mouse neocortex. *Cell*, 2014, 156: 1096–1111
- 12 Hintiryan H, Foster N N, Bowman I, et al. The mouse cortico-striatal projectome. *Nat Neurosci*, 2016, 19: 1100–1114
- 13 Oh S W, Harris J A, Ng L, et al. A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 2014, 508: 207–214
- 14 Gong H, Xu D, Yuan J, et al. High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level. *Nat Commun*, 2016, 7: 12142
- 15 Micheva K D, Smith S J. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron*, 2007, 55: 25–36
- 16 Micheva K D, Busse B, Weiler N C, et al. Single-synapse analysis of a diverse synapse population: proteomic imaging methods and markers. *Neuron*, 2010, 68: 639–653
- 17 Feinberg E H, VanHoven M K, Bendesky A, et al. GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron*, 2008, 57: 353–363
- 18 Kim J, Zhao T, Petralia R S, et al. mGRASP enables mapping mammalian synaptic connectivity with light microscopy. *Nat Methods*, 2011, 9: 96–102
- 19 Feng L, Zhao T, Kim J. Improved synapse detection for mGRASP-assisted brain connectivity mapping. *Bioinformatics*, 2012, 28: i25–i31
- 20 Livet J, Weissman T A, Kang H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 2007, 450: 56–62
- 21 Sigal Y M, Speer C M, Babcock H P, et al. Mapping synaptic input fields of neurons with super-resolution imaging. *Cell*, 2015, 163: 493–505
- 22 Briggman K L, Bock D D. Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22: 154–161
- 23 Hayworth K J, Morgan J L, Schalek R, et al. Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits. *Front Neural Circuits*, 2014, 8: 68
- 24 Wanner A A, Kirschmann M A, Genoud C. Challenges of microtome-based serial block-face scanning electron microscopy in neuroscience. *J Microscopy*, 2015, 259: 137–142
- 25 Lichtman J W, Pfister H, Shavit N. The big data challenges of connectomics. *Nat Neurosci*, 2014, 17: 1448–1454
- 26 Helmstaedter M, Briggman K L, Denk W. High-accuracy neurite reconstruction for high-throughput neuroanatomy. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 1081–1088
- 27 Boergens K M, Berning M, Bocklisch T, et al. webKnossos: efficient online 3D data annotation for connectomics. *Nat Meth*, 2017, 14: 691–694
- 28 Wanner A A, Genoud C, Masudi T, et al. Dense EM-based reconstruction of the interglomerular projectome in the zebrafish olfactory bulb. *Nat*

- Neurosci, 2016, 19: 816–825
- 29 Dorkenwald S, Schubert P J, Killinger M F, et al. Automated synaptic connectivity inference for volume electron microscopy. *Nat Methods*, 2017, 14: 435–442
 - 30 Staffler B, Berning M, Boergens K M, et al. SynEM, automated synapse detection for connectomics. *eLife*, 2017, 6: e26414
 - 31 Kim J S, Greene M J, Zlateski A, et al. Space-time wiring specificity supports direction selectivity in the retina. *Nature*, 2014, 509: 331–336
 - 32 Kebschull J M, Garcia da Silva P, Reid A P, et al. High-throughput mapping of single-neuron projections by sequencing of barcoded RNA. *Neuron*, 2016, 91: 975–987
 - 33 Varshney L R, Chen B L, Paniagua E, et al. Structural properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network. *PLoS Comput Biol*, 2011, 7: e1001066
 - 34 Jarrell T A, Wang Y, Bloniarz A E, et al. The connectome of a decision-making neural network. *Science*, 2012, 337: 437–444
 - 35 Bumbarger D J, Riebesell M, Rödelberger C, et al. System-wide rewiring underlies behavioral differences in predatory and bacterial-feeding nematodes. *Cell*, 2013, 152: 109–119
 - 36 Pereira L, Kratsios P, Serrano-Saiz E, et al. A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *eLife*, 2015, 4: e12432
 - 37 Gendrel M, Atlas E G, Hobert O. A cellular and regulatory map of the GABAergic nervous system of *C. elegans*. *eLife*, 2016, 5: e17686
 - 38 Takemura S Y, Bharioke A, Lu Z, et al. A visual motion detection circuit suggested by *Drosophila* connectomics. *Nature*, 2013, 500: 175–181
 - 39 Takemura S, Xu C S, Lu Z, et al. Synaptic circuits and their variations within different columns in the visual system of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 13711–13716
 - 40 Tobin W F, Wilson R I, Lee W C A. Wiring variations that enable and constrain neural computation in a sensory microcircuit. *eLife*, 2017, 6: e24838
 - 41 Eichler K, Li F, Litwin-Kumar A, et al. The complete connectome of a learning and memory centre in an insect brain. *Nature*, 2017, 548: 175–182
 - 42 Takemura S Y, Aso Y, Hige T, et al. A connectome of a learning and memory center in the adult *Drosophila* brain. *eLife*, 2017, 6: e26975
 - 43 Martell J D, Deerinck T J, Sancak Y, et al. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 1143–1148
 - 44 Joesch M, Mankus D, Yamagata M, et al. Reconstruction of genetically identified neurons imaged by serial-section electron microscopy. *eLife*, 2016, 5: e15015
 - 45 Hildebrand D G C, Cicconet M, Torres R M, et al. Whole-brain serial-section electron microscopy in larval zebrafish. *Nature*, 2017, 545: 345–349
 - 46 Briggman K L, Helmstaedter M, Denk W. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature*, 2011, 471: 183–188
 - 47 Morgan J L, Berger D R, Wetzel A W, et al. The fuzzy logic of network connectivity in mouse visual thalamus. *Cell*, 2016, 165: 192–206
 - 48 Bock D D, Lee W C A, Kerlin A M, et al. Network anatomy and *in vivo* physiology of visual cortical neurons. *Nature*, 2011, 471: 177–182
 - 49 Lee W C A, Bonin V, Reed M, et al. Anatomy and function of an excitatory network in the visual cortex. *Nature*, 2016, 532: 370–374
 - 50 Helmstaedter M, Briggman K L, Turaga S C, et al. Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina. *Nature*, 2013, 500: 168–174
 - 51 Biswal B, Zerrin Yetkin F, Haughton V M, et al. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med*, 1995, 34: 537–541
 - 52 Toro R, Fox P T, Paus T. Functional coactivation map of the human brain. *Cereb Cortex*, 2008, 18: 2553–2559
 - 53 Glasser M F, Coalson T S, Robinson E C, et al. A multi-modal parcellation of human cerebral cortex. *Nature*, 2016, 536: 171–178
 - 54 Keller P J, Ahrens M B. Visualizing whole-brain activity and development at the single-cell level using light-sheet microscopy. *Neuron*, 2015, 85: 462–483
 - 55 Cong L, Wang Z, Chai Y, et al. Rapid whole brain imaging of neural activity in freely behaving larval zebrafish (*Danio rerio*). *eLife*, 2017, 6: e28158
 - 56 Förster D, Dal Maschio M, Laurell E, et al. An optogenetic toolbox for unbiased discovery of functionally connected cells in neural circuits. *Nat Commun*, 2017, 8: 116
 - 57 Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, et al. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Meth*, 2013, 10: 413–420
 - 58 Renier N, Adams E L, Kirst C, et al. Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell*, 2016, 165: 1789–

1802

- 59 Stefaniuk M, Gualda E J, Pawlowska M, et al. Light-sheet microscopy imaging of a whole cleared rat brain with Thy1-GFP transgene. *Sci Rep*, 2016, 6: 28209
- 60 Royer L A, Lemon W C, Chhetri R K, et al. Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 1267–1278
- 61 Lu R, Sun W, Liang Y, et al. Video-rate volumetric functional imaging of the brain at synaptic resolution. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 620–628
- 62 Kato S, Kaplan H S, Schrödel T, et al. Global brain dynamics embed the motor command sequence of *Caenorhabditis elegans*. *Cell*, 2015, 163: 656–669
- 63 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
- 64 Randlett O, Wee C L, Naumann E A, et al. Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas. *Nat Methods*, 2015, 12: 1039–1046
- 65 Mann K, Gallen C L, Clandinin T R. Whole-Brain calcium imaging reveals an intrinsic functional network in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2017, 27: 2389–2396.e4
- 66 Morgan J L, Lichtman J W. Why not connectomics? *Nat Methods*, 2013, 10: 494–500
- 67 Poo M M, Du J L, Ip N Y, et al. China brain project: basic neuroscience, brain diseases, and brain-inspired computing. *Neuron*, 2016, 92: 591–596
- 68 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
- 69 Zhu H, Zou G, Wang N, et al. Single-neuron identification of chemical constituents, physiological changes, and metabolism using mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 2586–2591
- 70 Mikula S. Progress towards mammalian whole-brain cellular connectomics. *Front Neuroanat*, 2016, 10: 62
- 71 Helmstaedter M. Cellular-resolution connectomics: challenges of dense neural circuit reconstruction. *Nat Methods*, 2013, 10: 501–507
- 72 Vishwanathan A, Daie K, Ramirez A D, et al. Electron microscopic reconstruction of functionally identified cells in a neural integrator. *Curr Biol*, 2017, 27: 2137–2147.e3
- 73 Bargmann C I, Marder E. From the connectome to brain function. *Nat Methods*, 2013, 10: 483–490
- 74 Arganda-Carreras I, Turaga S C, Berger D R, et al. Crowdsourcing the creation of image segmentation algorithms for connectomics. *Front Neuroanat*, 2015, 9: 142
- 75 杜久林, 毕国强, 骆清铭, 等. 脑科学研究新技术. 中国科学院院刊, 2016, 31: 783–792
- 76 Semmelhack J L, Donovan J C, Thiele T R, et al. A dedicated visual pathway for prey detection in larval zebrafish. *eLife*, 2014, 3: e04878
- 77 Yao Y, Li X, Zhang B, et al. Visual cue-discriminative dopaminergic control of visuomotor transformation and behavior selection. *Neuron*, 2016, 89: 598–612
- 78 Zhang B B, Yao Y Y, Zhang H F, et al. Left habenula mediates light-preference behavior in zebrafish via an asymmetrical visual pathway. *Neuron*, 2017, 93: 914–928.e4
- 79 Naumann E A, Fitzgerald J E, Dunn T W, et al. From whole-brain data to functional circuit models: the zebrafish optomotor response. *Cell*, 2016, 167: 947–960.e20
- 80 Oteiza P, Odstreil I, Lauder G, et al. A novel mechanism for mechanosensory-based rheotaxis in larval zebrafish. *Nature*, 2017, 547: 445–448
- 81 Li J, Zhang B, Ren Y, et al. Intron targeting-mediated and endogenous gene integrity-maintaining knockin in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Res*, 2015, 25: 634–637
- 82 Zhang R W, Du J L. *In vivo* whole-cell patch-clamp recording in the zebrafish brain. *Methods Mol Biol*, 2016, 1451: 281–291
- 83 Mu Y, Li X, Zhang B, et al. Visual input modulates audiomotor function via hypothalamic dopaminergic neurons through a cooperative mechanism. *Neuron*, 2012, 75: 688–699
- 84 Shang C, Li X, Yin C, et al. Amperometric monitoring of sensory-evoked dopamine release in awake larval zebrafish. *J Neurosci*, 2015, 35: 15291–15294

Progress in brain neural connectomics

SUN Le^{1,2} & DU JiuLin^{1,2}

1 State Key Laboratory of Neuroscience, CAS Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Institute of Neuroscience, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 School of Future Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

As the most complex system in the universe, the brain is the nature's ultimate territory of human exploration. The vast number of neurons of various cell types and functions, together with their intricate structural and functional connections, pose substantial challenges for understanding the way the brain works. Thus comes the need to map the neuronal "wiring diagrams", i.e. connectomics-exploring the neural connections between brain areas, nuclei, and neurons on the whole-brain scale in a high-throughput manner, which is more and more recognized as the roadmap to understanding the mechanisms of brain functions. Over recent years, advances of multiple-level imaging, neural circuit tracing and activity manipulation, and image processing techniques have greatly propelled the development of neural connectomics, enabling neuroscientists to observe the fine structures, connectivity and functions of neurons on the level of specific brain areas or the entire brain. Here we summarize recent technical advances in macro-, meso-, and micro-connectomics, along with recent work on neural circuit structures and functions. We also discuss the difficulties, challenges and future directions of connectomics studies, and propose that the zebrafish is currently an ideal model for mapping structural and functional neural connectivity on the whole brain scale.

macroscopic connectome, mesoscopic connectome, microscopic connectome, neural connections, neural circuit, imaging techniques, reconstruction, big data, zebrafish

doi: [10.1360/N052017-00215](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052017-00215)