DOI:10.16016/j.1000-5404.201511067

内嗅皮层-海马投射末梢基于光纤技术的钙活动记录

卢 建[1],金文均[1],覃 涵[2],谌小维[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部脑研究中心[1];430074 武汉,华中科技大学武汉光电国家实验室[2])

[摘要] **目的** 运用光纤探测系统建立轴突末梢 Ca^{2+} 活动的光学记录方法,并初步探究麻醉和自由活动状态下小鼠皮层-海马通路的活动规律。**方法** 向 8~10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠内侧内嗅皮层(medial entorhinal cortex,MEC)浅层(Ⅱ层)注射神经元特异并携带 Ca^{2+} 荧光指示蛋白基因的腺相关病毒(AAV-Syn-GCaMP5G),继续饲养 1 个月后将光纤植入到海马齿状回(dentate gyrus, DG)分子层上沿,记录麻醉和自由活动状态下轴突末梢的 Ca^{2+} 活动;相同方法记录 AAV-Syn-增强绿色荧光蛋白(eGFP)小鼠作为对照。向 MEC 浅层注射河豚毒素(tetrodotoxin, TTX),同步记录轴突末梢 Ca^{2+} 活动,注射人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)作为对照。**结果** 内嗅皮层Ⅱ层神经元投射至海马 DG 的轴突纤维密集表达 GCaMP5G。在麻醉和自由活动的小鼠中均能稳定记录到轴突末梢 Ca^{2+} 信号,eGFP 对照小鼠未记录到类似 Ca^{2+} 信号。MEC 浅层注射 TTX 后,轴突末梢 Ca^{2+} 信号 100 s 内最高幅度降至注射前的 12.6%。与 ACSF 比较,TTX 对轴突末梢 Ca^{2+} 活动有明显阻断作用($P<0.01$)。内嗅皮层投射至 DG 的轴突末梢处 Ca^{2+} 活动在麻醉状态下以一定节律同步发放,自由活动状态下则表现为无节律非同步发放,且 Ca^{2+} 信号幅度有所增强。**结论** 通过 GCaMP5G 特异标记了内侧内嗅皮层Ⅱ层投射至 DG 的轴突纤维,并运用光纤探测系统建立了长远投射轴突末梢 Ca^{2+} 活动的光学记录方法。与麻醉状态相比,自由活动状态下内嗅-海马通路呈现更强的 Ca^{2+} 活动发放。

[关键词] 内嗅皮层;海马;光纤;钙活动;轴突末梢;GCaMP5G
[中图法分类号] R319; R329.25; R338.26 [文献标志码] A

Optical fiber-based recording of Ca^{2+} activity dynamics of entorhinal-hippocampal projections in mice

Lu Jian[1], Jin Wenjun[1], Qin Han[2], Chen Xiaowei[1]([1]Brain Research Center, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, [2]Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province, 430074, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a method of recording Ca^{2+} activity at axonal terminals of neural projection and then study the activity pattern of the pathway from the entorhinal cortex to the hippocampus of mice under anesthetized and freely behaving conditions. **Methods** AAV-Syn-GCaMP5G was injected into the medial entorhinal cortex (MEC) superficial layer of male C57BL/6 mice at age of 8~10 weeks. In 1 month later, optical fiber was implanted onto the stratum moleculare of dentate gyrus (DG) to record Ca^{2+} activity at the axonal terminals under both anesthetized and freely behaving conditions. The AAV-Syn-eGFP injected mice were recorded as the control group. Ca^{2+} activity dynamics at the axon terminal sites were compared before and after tetrodotoxin (TTX) was injected into the MEC superficial layers of the anesthetized mice. The mice in the control group were injected with artificial cerebrospinal fluid (ACSF). **Results** The axonal fibers projecting from the entorhinal cortex to DG were densely labeled by GCaMP5G. Ca^{2+} signals from the axonal terminals can be recorded steadily under both anesthetized and freely behaving conditions by using optical fiber photometry. However, no signals were detected in eGFP-labeled mice. After injecting TTX into

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2015CB759500)
[通信作者] 谌小维,E-mail: xiaowei_chen@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160131.1127.011.html(2016-01-31)

the superficial layers of MEC, the maximum amplitude of Ca^{2+} signals within 100 s from axonal terminals descended to 12.6% of Ca^{2+} signals recorded before injection. Compared with the ACSF-injected mice, TTX significantly decreased Ca^{2+} activity at the axon terminals ($P<0.01$). The Ca^{2+} activity from the axonal terminals in the hippocampus exhibited unsynchronized pattern and higher amplitude in freely behaving condition as compared with the rhythmic-synchronized pattern under anesthetized condition. **Conclusion** Utilizing specific labeling of neuronal projection with GCaMP5G and optical fiber photometry, Ca^{2+} signals from the axonal terminal sites of long-range projections can be recorded reliably under both anesthetized and freely behaving conditions. The Ca^{2+} activity from the axonal terminals of entorhinal-hippocampal projections may exhibit higher level of dynamics in freely behaving mice.

[**Key words**] entorhinal cortex; hippocampus; optical fiber; Ca^{2+} activity; axon terminal; GCaMP5G

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2015CB759500). Corresponding author: Chen Xiaowei, E-mail: xiaowei_chen@tmmu.edu.cn

内嗅皮层(entorhinal cortex,EC)与海马(Hippocampus,HPC)对于高级认知功能如空间学习记忆和空间定位等起着重要作用。1971 年,O'Keefe 等[1]在海马 CA1 区发现了在特定位置高频放电的位置细胞(place cells)。2005 年 Moser 实验室在内侧内嗅皮层(MEC)发现了网格细胞(grid cells)[2],并在后续研究中又发现了空间定位相关的头朝向细胞(head direction cells)[3]、边界细胞(border cells)[4]以及速率细胞(speed cells)[5]。这些研究有力地推动了对于大脑空间认知功能的解析。然而,内嗅皮层-海马的连接通路对于空间信息的编码和处理目前尚缺乏相关报道。Solstad 等[6]采用数学模型模拟网格细胞与位置细胞连接的研究认为:多个具有不同发放模式的网格细胞线性加和可以形成与位置细胞类似的发放模式。而实际的连接模式及信息传递、处理模式还有待进一步实验论证。

病毒感染标记是目前在活体上进行群体神经细胞标记及功能研究的普遍使用方法。GCaMP 作为一种基因编码的 Ca^{2+} 荧光指示蛋白,最早由 Junichi Nakai 等[7]开发并很快在神经科学领域广泛应用。之后根据研究的需要开发了系列功能不同的产品如 GCaMP2[8-9]、GCaMP3[10]、GCaMP5[11]、GCaMP6[12]、GCaMP6slow[13-14]、GCaMP6fast[15]等。病毒感染神经元后进行大量扩增并表达 Ca^{2+} 荧光指示蛋白,再随胞内运输逐渐分布至神经元内各个部位:胞体,树突,轴突等。当神经元兴奋时,Ca^{2+} 荧光指示蛋白与游离 Ca^{2+} 结合后改变自身构象而发出绿色荧光,荧光强度与胞内游离 Ca^{2+} 浓度呈正相关,因此荧光强度的变化能够反映神经元的 Ca^{2+} 活动。

与其他研究方法如电生理记录、金属电极记录和新近发展的双光子钙成像技术等相比较,光纤探测系统有其独特的优势,已建立了基本记录方法[16]并推广应用[17-18]。它可以记录自由活动动物深部脑区[17]以及不同脑区纤维连接通路[18]的 Ca^{2+} 活动,因而能在更自然的生理状态下研究大脑的系列高级功能,具有广阔的应用前景。

因此,本研究利用 AAV-Syn-GCaMP5G 病毒标记内侧内嗅皮层Ⅱ层神经元胞体及投射至海马 DG 区的轴突纤维,建立基于光纤探测系统的轴突末梢光学记录方法,并初步探讨内嗅皮层-海马通路在不同生理状态下的活动规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂与仪器设备

1.1.1 实验动物 C57BL/6 小鼠,30 只,雄性,8~10 周龄,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 AAV-Syn-GCaMP5G(AAV-腺相关病毒,Syn-携带神经元轴突末梢囊泡蛋白基因的启动子,GCaMP5G-携带钙调蛋白的绿色荧光蛋白)、AAV-Syn-增强型绿色荧光蛋白(eGFP)(上海纽恩),TTX(美国 Sigma),人工脑脊液(ACSF,自制,各成分来源:美国 Sigma),2% 利多卡因(美国 Sigma),异氟烷(深圳瑞沃德),美洛昔康(Metacam,德国),1% 戊巴比妥钠(Sigma),4% 多聚甲醛(PFA,Sigma)。

1.1.3 仪器设备 光纤探测系统(北京博锐),光纤(直径 200 μm,美国 Thorlab),小动物麻醉机(深圳瑞沃德),小鼠单臂数显立体定位仪(深圳瑞沃德),微量注射泵(美国 Wpiinc),P97 电极拉制仪(美国 SUTTER),CM-1900 冰冻切片机(德国 Leica),LSM-700 激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss)。

1.2 病毒注射与感染标记

1.5% 异氟烷/氧气持续麻醉小鼠,将其固定于立体定位仪上,头部皮下注射 0.1 mL 2% 利多卡因后将头部毛发剪掉。沿中线剪开头皮,将颅骨表面软组织清理干净,暴露头侧前囟及尾侧人字缝等一大片颅骨。颅骨表面定位 MEC Ⅱ层:参照小鼠图谱前囟(Bregma)

至人字点(Lambda)距离 4.2 mm,Lambda 点向左旁开 3.12 mm 为标准,实际旁开则以 Bregma-Lambda 实际距离/4.2 mm 的比值进行校正。再前后平移至人字缝上,并以此为起点,向尾侧后退 0.2 mm 为开颅点。实施开颅,孔径约 0.5 mm,颅骨钻磨颅骨至接近皮层表面。用注射器针尖将孔底的一小片颅骨挑除,暴露硬脑膜。用拉制好的玻璃微电极吸取 500 nL 病毒,尾端连接橡胶管后固定于立体定位仪 Z 轴夹持器上,调低 Z 轴使玻璃电极尖端穿破硬脑膜下至内嗅皮层(以皮层表面为起点,深度 2.10 mm),停 5 min 后用微量注射泵以 50 nL/min 的速度注射病毒,注射量为 200~300 nL。注射完成,电极停留 5~10 min 后缓慢退出。清理注射位点及周围的杂物并缝合头皮。停止麻醉,待小鼠清醒后放回饲养笼,连续 3 d 腹腔注射青霉素(20 万 U/mL) 0.1 mL/只,并通过饮水喂食美洛昔康。注射病毒后继续饲养 1 个月左右,待病毒感染神经元并充分表达 Ca^{2+} 荧光指示蛋白(GCaMP5G)后可进行光纤记录实验。

1.3 光纤探测系统设计与工作原理

本实验所用光纤探测系统的元件主要包括:473 nm AOM 激光器、雪崩光-电二极管(APD)探测器与光纤耦合器、二向色镜、光栅、滤光片、聚焦透镜等。位于外部的光纤,其头端与光纤探测系统的光路端口相连,尾端作为探头埋植入小鼠海马 DG 区分子层上沿。光纤将激光器发出的 473 nm 蓝色激光传至被标记的轴突末梢,激发与 Ca^{2+} 结合的绿色荧光蛋白,同时将荧光蛋白发出的绿色荧光(509 nm)传至 APD 探测器,再转换为电信号传至数据采集卡,以数字信号形式呈现并存储。光纤探测系统及光纤记录小鼠 Ca^{2+} 活动实验如图 1 所示。

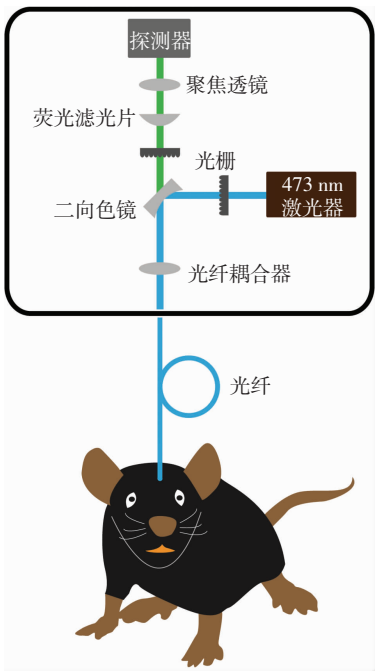


图 1 光纤探测系统记录小鼠 Ca^{2+} 活动模式图

1.4 麻醉状态下记录轴突末梢的 Ca^{2+} 活动

小鼠注射 AAV 病毒约 1 个月,GCaMP5G 在神经元内的表达积累至一定水平,即可用于光纤记录实验。参照病毒注射的步骤实施开颅手术,并用 3% 双氧水将颅骨表面的组织彻底清理。调平颅骨左右两侧,将头侧调至较尾侧高约 0.5 mm。在颅骨表面定位光纤的记录位点(Lambda 点向前 2.05 mm,中线旁开 2.0 mm)。开颅,孔径 0.6~0.8 mm,挑除孔底颅骨薄片与硬脑膜。将光纤置于皮层表面定为零点,然后使用液压微操将光纤缓慢插入脑内,光纤探测系统同时记录基线变化。深度至 1.75~1.90 mm 到达 DG 区分子层上沿,探测到 Ca^{2+} 信号(其信噪比不能低于 5%)后,可将光纤停于该位点,异氟烷/氧气体积分数稳定在 1.5%,持续记录轴突末梢 Ca^{2+} 信号 20~30 min。

1.5 清醒自由状态下记录轴突末梢的 Ca^{2+} 活动

麻醉状态下轴突末梢 Ca^{2+} 活动记录完毕后,用牙科水泥将光纤固定于颅骨表面,停止麻醉,待小鼠清醒后将其转入饲养盆中,并给予食物和水。等待其麻醉完全失效后(>2 h)可开始记录。小鼠恢复 1~2 d 后,记录其在圆盆中自由活动时轴突末梢的 Ca^{2+} 活动,同时用高清摄像机同步采集行为学数据,持续记录 30~60 min。

1.6 eGFP 标记动物轴突末梢处的记录

选用另外一种仅带绿色荧光蛋白基因的病毒 AAV-Syn-eGFP 按相同的方法注射至 MEC 浅层,等待相同的表达时间后进行光纤记录实验。光纤埋植方法和位置与 GCaMP5G 标记小鼠相同,分别记录麻醉和清醒自由状态下的基线变化。

1.7 MEC 浅层注射 TTX、ACSF 并同步记录轴突末梢 Ca^{2+} 活动变化

参照前述方法记录投射至 DG 分子层的轴突末梢的 Ca^{2+} 活动,用牙科水泥将光纤固定于颅骨表面,牙科水泥不覆盖病毒注射位点。玻璃电极吸取 800 nL TTX(10 μmol/L),将电极下至与病毒注射深度相同的位点。麻醉状态下记录轴突末梢的 Ca^{2+} 信号 20~30 min 作为前对照。再将 400~600 nL TTX 在 30~60 s 内缓慢注射至 MEC 浅层,并持续记录轴突末梢 Ca^{2+} 信号变化。采用完全相同的方法注射 ACSF 作为对照。每组各记录 5 只小鼠。

1.8 病毒表达的形态学鉴定

待光纤记录实验完毕,腹腔注射 0.25 ml 1% 戊巴比妥钠溶液将小鼠麻醉后实施 PFA 心脏灌流固定,脑组织用 30% 蔗糖-PBS 脱水后冰冻切片。分别选取 5~10 张 MEC 神经元胞体及海马内轴突末梢表达 GCaMP5G 的脑片,封片后用激光共聚焦显微镜采集形态学图像。

1.9　统计学分析

取注射药物前后 100 s 内 Ca^{2+} 信号幅度(Δf/f)的最大值,按每只小鼠注射药物前的 Ca^{2+} 信号幅度最大值作归一化处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件进行独立样本非参数检验。

2　结果

2.1　MEC Ⅱ层神经元感染 AAV 病毒后在胞体及轴突末梢表达 GCaMP5G

采用立体定位注射的方式将 AAV-Syn-GCaMP5G 注射至 MEC Ⅱ层,注射方法及位置见图 2。MEC 浅层神经元与海马的纤维连接通路为:Ⅱ层神经元轴突纤维主要投射至海马 DG 区分子层,也有部分投射至 CA3 区;Ⅲ层神经元轴突纤维主要投射至 CA1 区分子层(图 3)。

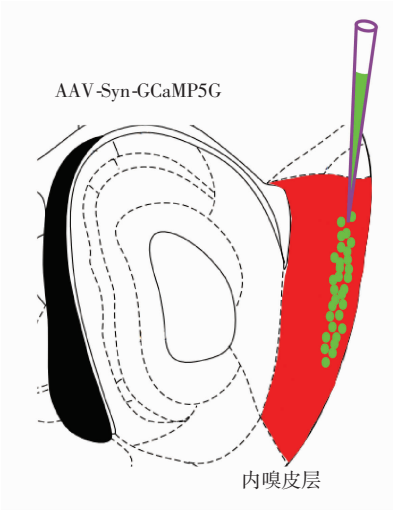


图 2　MEC Ⅱ层病毒注射示意图

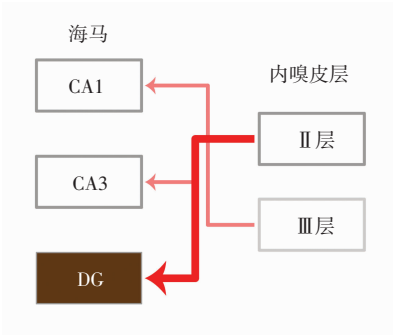
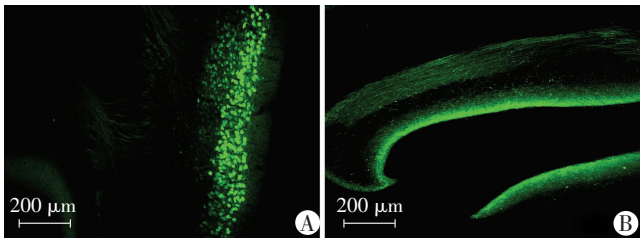


图 3　MEC 与海马的纤维投射关系

向小鼠 MEC Ⅱ层注射病毒后缝合头部伤口使其恢复并继续饲养约 1 个月。病毒感染 MEC 浅层神经元后大量繁殖并持续表达 GCaMP5G。图 4A 显示病毒主要感染 MEC Ⅱ层神经元并高丰度表达 GCaMP5G,Ⅲ层只有少量神经元被标记且 GCaMP5G 的表达量明显低于Ⅱ层神经元。DG 区被标记的轴突纤维数量密集,GCaMP5G 的表达量高。而 CA1 区和 CA3 区被标记的轴突纤维数量及表达量均不及 DG 区(图 4B)。

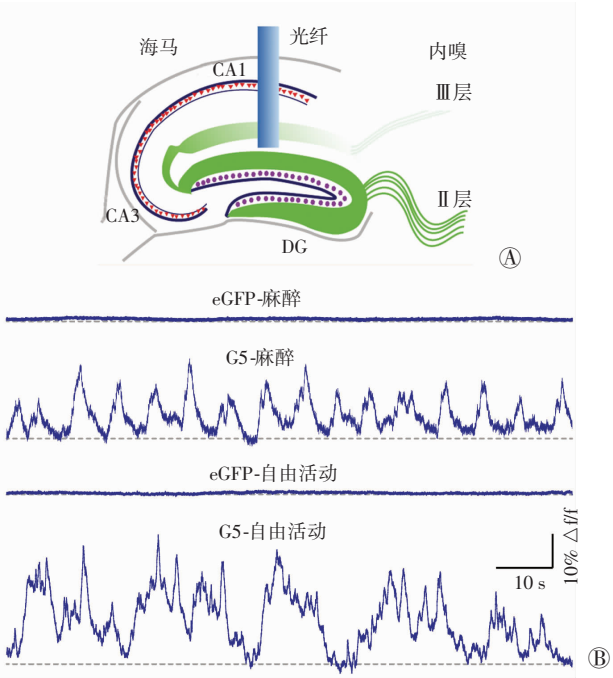


A:AAV 主要感染 MEC Ⅱ层神经元并高丰度表达 GCaMP5G;B:海马 DG 区被标记的轴突纤维数量及 GCaMP5G 表达量均高于 CA1 区、CA3 区

图 4　MEC 浅层神经元内 GCaMP5G 的表达

2.2　轴突末梢的 Ca^{2+} 活动记录与 eGFP 对照

植入光纤时,以 Ca^{2+} 信号 Δf/f 值为参考,将光纤缓慢下至 DG 区分子层上沿。图 5A 为光纤在海马内的记录位点示意图。光纤固定后,记录麻醉状态下轴突末梢的 Ca^{2+} 信号,其以一定节律同步发放。停止麻醉待其完全清醒并恢复后,记录小鼠自由活动时轴突末梢的 Ca^{2+} 信号,则呈现无节律的非同步发放,Ca^{2+} 信号发放较为连续且幅度有一定增强。在麻醉状态和自由活动状态下采用相同的方法记录 AAV-Syn-eGFP 标记小鼠,均无类似 Ca^{2+} 信号的基线变化(图 5B)。

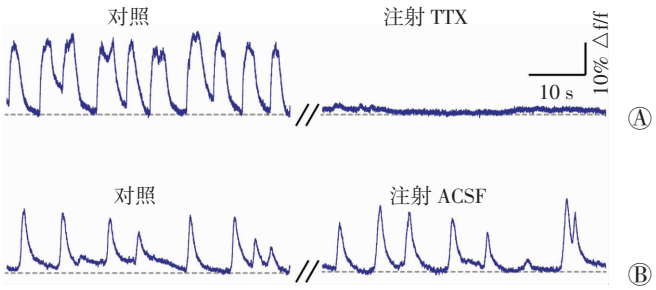


A:光纤植入 DG 分子层上沿记录轴突末梢 Ca^{2+} 活动示意图;B:麻醉与自由活动状态下 GCaMP5G 小鼠轴突末梢 Ca^{2+} 活动及 eGFP 小鼠的基线变化

图 5　MEC Ⅱ层神经元轴突末梢 Ca^{2+} 活动记录与 eGFP 对照

2.3 TTX 抑制轴突末梢的 Ca^{2+} 活动

向 MEC 浅层注射 TTX 并同步记录轴突末梢 Ca^{2+} 信号。从开始注射 TTX 后 15 ~25 s 轴突末梢的 Ca^{2+} 活动被明显阻断(图 6A)。而向 MEC 浅层注射 ACSF 后,海马内轴突末梢 Ca^{2+} 活动并未出现明显变化(图 6B)。与 ACSF(1.27 ±0.14)比较 ,TTX(0.16 ±0.05)对轴突末梢 Ca^{2+} 活动具有明显的阻断作用($P<0.01$, $n=5$)。



A:注射 TTX 后轴突末梢的 Ca^{2+} 活动被有效阻断;B:注射 ACSF 后轴突末梢的 Ca^{2+} 活动无明显变化

图 6 检测 MEC 浅层注射 TTX、ACSF 后对轴突末梢 Ca^{2+} 活动的影响

3 讨论

本研究利用 AAV-Syn-GCaMP5G 特异标记内嗅皮层-海马的纤维连接,然后以光纤探测技术为基础,建立了 MEC Ⅱ 神经元投射至 DG 的轴突末梢 Ca^{2+} 活动记录的方法,并初步研究了麻醉与自由活动状态下该通路的活动情况。

我们采用立体定位注射方法向内嗅皮层浅层注射病毒,使其感染神经元并在胞体、树突及轴突纤维等表达 GCaMP5G。从内嗅皮层病毒感染标记的区域和位于海马内被标记的轴突纤维分布可以知道,我们主要标记了 MEC Ⅱ 层神经元,Ⅲ 层只有少量标记,这与我们的预期相符合,也与之前的报道[19-21]一致。但他们的标记只限于形态学[19]或光遗传学研究[20-21],并没有对该通路的 Ca^{2+} 活动进行记录。Kitamura 等[22]在之前的研究中报道 MEC Ⅱ 层的岛细胞(island cells)会投射至 CA1 的放射层与腔隙-分子层之间。由于受标记精确度所限,虽然本实验不能区分这条连接通路,但我们记录的目标为投射至 DG 的轴突末梢,其确切来源为 MEC Ⅱ 层的海洋细胞(ocean cells)[22],与 MEC Ⅱ 至 CA1 连接通路无关,因而不受任何影响。

光纤相对柔韧、轻便,非常利于在清醒动物上开展实验。并且,它对于记录深部脑区无论是核团[16-17]还是纤维连接[18]都有独特的优势,非其他技术所能替代,在神经科学研究领域有着广阔的应用前景。因此,我们将光纤植入到海马 DG 区分子层上沿,利用光纤探测系统记录 DG 区 MEC Ⅱ 层神经元的轴突纤维 Ca^{2+} 活动,而注射 eGFP 对照病毒的小鼠并无类似 Ca^{2+} 活动,说明我们记录到的确为 Ca^{2+} 活动而非运动伪迹。河豚毒素(TTX)作为经典的 Na^+ 通道阻断剂,能够阻断胞外 Na^+ 快速内流从而有效抑制动作电位产生,抑制神经元活动。因此我们向 MEC 浅层(主要为 Ⅱ 层)注射 TTX 以观察轴突末梢处 Ca^{2+} 活动的变化。位于 DG 区分子层的轴突末梢的 Ca^{2+} 活动被明显阻断,说明该处的 Ca^{2+} 活动确实来自于内嗅皮层浅层神经元。这既印证了我们所标记的内嗅皮层-海马连接通路,也说明轴突末梢 Ca^{2+} 活动光学记录方法的有效性。但由于光纤本身的传递特性及其标记技术精确度的限制,光纤探测系统目前只能记录群体神经元[16-17]或者轴突纤维束[18],而不能记录单个神经元或者单根纤维的 Ca^{2+} 活动,也不能进行成像[23-24]研究。

在麻醉状态下,内嗅皮层-海马轴突纤维末梢的 Ca^{2+} 活动以一定节律同步发放,其节律主要受麻醉状态的影响。而在自由活动状态下则完全不同,该通路的 Ca^{2+} 活动并无明显节律性且呈非同步发放,且 Ca^{2+} 活动发放有所增强。这与其他研究者利用成像技术记录的 MEC 浅层神经元胞体位置的 Ca^{2+} 活动相似[23-24]。而这一系列 Ca^{2+} 活动的发放对于信息的传递、处理及生理意义尚不完全清楚,还有待深入研究。

综上所述,本研究借助 AAV 病毒感染标记了内嗅皮层 Ⅱ 层神经元投射至 DG 的轴突纤维,并利用光纤探测系统成功建立了长距离投射纤维轴突末梢 Ca^{2+} 活动的光学记录方法。初步研究发现:在自由活动状态下内嗅皮层投射至 DG 轴突末梢的 Ca^{2+} 活动呈无节律、非同步、有所增强地发放,与麻醉状态下的同步节律发放明显不同。本研究为后续皮层-海马通路信息传递、处理及其生理意义的深入研究奠定了方法学基础。

参考文献:

[1] O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat [J]. Brain Res, 1971, 34(1): 171 - 175. DOI: 10.1016/0006-8993(71)90358-1

[2] Hafting T, Fyhn M, Molden S, *et al*. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex [J]. Nature, 2005, 436(7052): 801 - 806. DOI: 10.1038/nature03721

[3] Sargolini F, Fyhn M, Hafting T, *et al*. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex [J]. Science, 2006, 312(5774): 758 - 762. DOI: 10.

1126/science.1125572

[4] Solstad T, Boccara C N, Kropff E, *et al*. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex[J]. Science, 2008, 322(5909): 1865 - 1868. DOI: 10.1126/science.1166466

[5] Kropff E, Carmichael J E, Moser M B, *et al*. Speed cells in the medial entorhinal cortex[J]. Nature, 2015, 523(7561): 419 - 424. DOI: 10.1038/nature14622

[6] Solstad T, Moser E I, Einevoll G T. From grid cells to place cells: a mathematical model[J]. Hippocampus, 2006, 16(12): 1026 - 1031. DOI: 10.1002/hipo.20244

[7] Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(2): 137 - 141. DOI: 10.1038/84397

[8] Tallini Y N, Ohkura M, Choi B R, *et al*. Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: Cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(12): 4753 - 4758. DOI: 10.1073/pnas.0509378103

[9] Wang Q, Shui B, Kotlikoff M I, *et al*. Structural basis for calcium sensing by GCaMP2[J]. Structure, 2008, 16(12): 1817 - 1827. DOI: 10.1016/j.str.2008.10.008

[10] Tian L, Hires S A, Mao T, *et al*. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators[J]. Nat Methods, 2009, 6(12): 875 - 881. DOI: 10.1038/nmeth.1398

[11] Akerboom J, Chen T W, Wardill T J, *et al*. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging[J]. J Neurosci, 2012, 32(40): 13819 - 13840. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012

[12] Chen T W, Wardill T J, Sun Y, *et al*. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity[J]. Nature, 2013, 499(7458): 295 - 300. DOI: 10.1038/nature12354

[13] Peron S P, Freeman J, Iyer V, *et al*. A Cellular Resolution Map of Barrel Cortex Activity during Tactile Behavior[J]. Neuron, 2015, 86(3): 783 - 799. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.03.027

[14] Wertz A, Trenholm S, Yonehara K, *et al*. PRESYNAPTIC NETWORKS. Single-cell-initiated monosynaptic tracing reveals layer-specific cortical network modules[J]. Science, 2015, 349(6243): 70 - 74. DOI: 10.1126/science.aab1687

[15] Hinckley C A, Alaynick W A, Gallarda B W, *et al*. Spinal Locomotor Circuits Develop Using Hierarchical Rules Based on Motorneuron Position and Identity[J]. Neuron, 2015, 87(5): 1008 - 1021. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.08.005

[16] Cui G, Jun S B, Jin X, *et al*. Deep brain optical measurements of cell type-specific neural activity in behaving mice[J]. Nat Protoc, 2014, 9(6): 1213 - 1228. DOI: 10.1038/nprot.2014.080

[17] Cui G, Jun S B, Jin X, *et al*. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation[J]. Nature, 2013, 494(7436): 238 - 242. DOI: 10.1038/nature11846

[18] Gunaydin L A, Grosenick L, Finkelstein J C, *et al*. Natural neural projection dynamics underlying social behavior[J]. Cell, 2014, 157(7): 1535 - 1551. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.017

[19] Fyhn M, Molden S, Witter M P, *et al*. Spatial representation in the entorhinal cortex[J]. Science, 2004, 305(5688): 1258 - 1264. DOI: 10.1126/science.1099901

[20] Suh J, Rivest A J, Nakashiba T, *et al*. Entorhinal cortex layer Ⅲ input to the hippocampus is crucial for temporal association memory[J]. Science, 2011, 334(6061): 1415 - 1420. DOI: 10.1126/science.1210125

[21] Zhang S J, Ye J, Miao C, *et al*. Optogenetic dissection of entorhinal-hippocampal functional connectivity[J]. Science, 2013, 340(6128): 1232627. DOI: 10.1126/science.1232627

[22] Kitamura T, Pignatelli M, Suh J, *et al*. Island cells control temporal association memory[J]. Science, 2014, 343(6173): 896 - 901. DOI: 10.1126/science.1244634

[23] Low R J, Gu Y, Tank D W. Cellular resolution optical access to brain regions in fissures: imaging medial prefrontal cortex and grid cells in entorhinal cortex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(52): 18739 - 18744. DOI: 10.1073/pnas.1421753111

[24] Heys J G, Rangarajan K V, Dombeck D A. The functional micro-organization of grid cells revealed by cellular-resolution imaging[J]. Neuron, 2014, 84(5): 1079 - 1090. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.10.048

(**收稿**:2015-11-16;**修回**:2016-01-12)

(编辑 栾 嘉)