

光遗传技术在神经系统疾病动物模型中的应用

周 瑞, 秦 川

(中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 光遗传技术是 Boyden 等科学家在 2005 发明的利用激光照射实现精准控制神经元活动的神经调控技术, 该技术是基因工程, 生物医学工程等的完美结合。自发明以来被广泛应用于帕金森氏病、情感神经环路等研究中。2011 年, 该技术入选 *Nature Methods* 杂志 2010 年度方法。本文对光遗传技术的新进展以及在疾病模型研究中的应用做简要综述。

【关键词】 光遗传技术; 神经精神疾病; 模型, 动物

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2017) 02-0074-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.02.014

Optogenetics and research progress in animal models of brain diseases

ZHOU Rui, QIN Chuan

(Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC) & Institute of Medical Laboratory
Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Optogenetics is a technology invented by Boyden in 2005 that allows targeted, fast control of precisely defined events in neural system. It was widely used in Parkinson disease and emotional neural circuit studies. Optogenetics was selected by *Nature Methods* for method of the year 2010. This paper reviews on the research advances and applications of optogenetics.

【Key words】 Optogenetics; Neuropsychiatric diseases; Models, animal

帕金森氏病、抑郁症、焦虑症、阿兹海默症等神经精神类疾病严重危害人类身体健康, 并且导致沉重的医疗负担。然而科学家对于此类疾病的发病以及治疗依然知之甚少。精准调控神经回路的技术, 对于我们深入理解这类疾病是有很大帮助的。光遗传学手段是一种深入大脑内部神经回路层面的研究手段, 用于探明大脑在神经精神疾病病理生理的神经回路基础。这是传统研究手段所不能达到的高度。

近年来, 光遗传技术发展迅速并且被广泛引用

于离体脑片或者清醒动物的神经细胞活动精准调控上。现对光遗传技术在解析各种动物神经精神疾病模型的诸如恐惧、焦虑、抑郁、精神分裂等疾病的神经回路基础的应用做简要综述。

1 光遗传技术新进展

近年来研究者在运用光遗传技术过程中, 不断改进发展新的光导入方法、光敏感蛋白靶向表达策略、转基因动物品系等方面, 使得使用该技术更加便利并且极大拓展了应用范围。

【基金项目】 中瑞国际科技合作项目(编号: 2015DFG32230)。

【作者简介】 周瑞(1988-), 博士后, 研究方向: 神经退行性疾病的干预。E-mail: zhourui@cnilas.org。

【通讯作者】 秦川, 研究员, 博士生导师, 研究方向为实验病理学。E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

光遗传技术与脑影像技术结合,使得传统功能核磁与新技术相得益彰。现在,光遗传融合功能核磁成像能进一步解释利用传统脑功能核磁技术验证的假说^[1](局灶兴奋性神经元活动增强导致 BOLD 信号升高),更重要的是可以显示光遗传操纵的全脑效应。鉴于众多的神经精神疾病的发病可能都有全脑效应,光遗传功能核磁联合,对于发掘和确定光刺激特定细胞亚型导致的全脑效应或者远端投射关系尤为重要。

目前,利用光遗传刺激结合脑功能核磁成像技术,在大脑精细环路解析研究中,已经取得实质性进展^[2, 3]。这些研究有助于解释皮质特定层在皮质信息流传递的作用,并且可以描绘来源于不同皮质层或者不同亚细胞定位的突触传递网络。这些丰富的信息为研究疾病状态下大脑神经回路或者大脑连接组的改变奠定了基础。

1.1 光效应工具-视蛋白的改进

传统的光遗传工具蛋白,主要兴奋神经元视蛋白-紫红质通道蛋白 2 (ChR2)^[4],抑制神经元通道蛋白盐细菌视紫红质 (NpHR)^[5, 6]和光敏感质子泵^[5, 7]。除此之外,改进型光遗传工具蛋白不断推出,包括超快速光敏感离子通道家族^[8](ChETA family),可以用于激发 200 Hz 以上的超快速神经元发放行为。

尽管光遗传技术可以实现激光照射后特定神经元的动作电位锁时相发放,但是这对于解析神经元编码效应是不够的。视蛋白嵌合受体 (OptoXRs)^[9]在细胞内可以参与到 G 蛋白偶联受体通路的视蛋白,利用该光敏感受体蛋白可以实现对清醒动物靶细胞的光诱发 G 蛋白偶联级联生化反应。可以对神经细胞的阈下电位进行操控,并且不直接依赖动作电位发放。另外,还有介导神经元细胞兴奋且抑制双向效应的视蛋白。

除了光诱发效应不同,对不同波长激光敏感的视蛋白也被开发出来,例如,长波长激光敏感视蛋白家族 (C1V1)^[10]。这些新型的视蛋白的发明,极大的拓展了光遗传应用的范围,以及提高光遗传技术的易用性。

此外,光遗传技术的特异性不仅局限于神经元亚型,改进的方法用基因技术限制视蛋白在细胞内的空间位置,使其表达于胞体和附近的神经元树突上。空间限制视蛋白表达可以揭示那些胞体位于突触后细胞的树突附近的神经元的突触连接^[11]。

1.2 光遗传工具转基因动物的创制

目前已经有大量的针对不同神经元亚型特异的 Cre 工具小鼠品系被开发出来^[12]。感染细胞并且用于表达光视蛋白的腺相关病毒 (AAV) 中有 loxp 组件。在这些 Cre 工具小鼠注射相应腺相关病毒 (AAV) 后,视蛋白在脑中表达特异性与 Cre 的特异性一致。然而,目前仍缺少相应的光遗传 Cre 工具大鼠。鉴于,大鼠在行为学研究以及神经电生理研究方面的便利性。加快光遗传工具大鼠研发的进展是非常有必要的。

2 光遗传学技术行为学研究的应用

光遗传技术的出现使得传统的动物行为学研究方法发生了翻天覆地的变化。基于神经元胞体或者纤维投射特异性的光调控策略,包括调控时间窗选择的便利,重新定义了动物行为学实验设计。例如,相较于经典的药理学操控神经细胞技术,光遗传操控的可逆性极大的缩短给药洗脱带来的时间花费,之前持续几天的实验现在可以一次实验完成。高架迷宫配合光遗传学操控,可以进行自身对照试验(有光,无光),极大的缩短实验周期和动物用量^[13]。类似的,传统的条件位置偏好实验通常需要 3 d,包括习惯日、条件刺激日和测试日。传统条件位置偏好实验,必须将动物限制在一个隔间给予非条件刺激(药物、或者电击),然后再限制在另一隔间给予对照刺激。只有在测试日才能有行为学位置偏好结果得出。光遗传技术的出现极大简化了此实验的操作以及增加了实验结果的可分析性,从而得到更多的信息。在条件刺激日,把动物放入位置偏好检测箱,在动物进入指定隔间内给予光刺激。这样使得量化动物的位置偏好性成为可能^[14]。更进一步的,光刺激的参数(占空比、刺激频率、刺激周期、刺激强度)可以根据动物位置而改变。这使得在一个实验周期内可以得到更优化的刺激参数,这是传统药理学方法无法比拟的。由于光遗传操控具有时间精确性,使得研究动物行为学操作中关键时间窗脑区功能成为可能。例如,动物进行 T 字形迷宫时,做出左右选择的时间点。

虽然,光遗传操控技术有以上的诸多优点,但也有一些局限性及注意事项。首先,是光照热效应,当使用高强度照射时,光纤末端的热效应是不可忽视的。这里产生的热量不仅仅影响神经元活性,甚至有可能导致细胞死亡。应用光遗传技术必

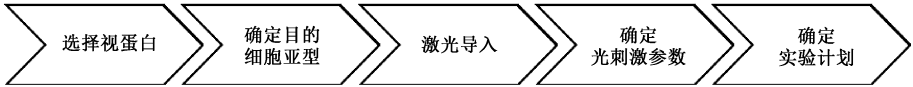


图 1 载体光遗传实验设计流程

Fig. 1 Flowchart of designing optogenetics experiments

须经常关注激光光源的稳定性,以及光照射效应区是否准确,以及光照射范围。

另一局限性是,长期过高表达视蛋白导致的细胞毒性。针对特定细胞,在细胞膜表面表达微生物视蛋白,不能超过细胞所能承受的极限。必须设置对照,检查表达视蛋白的表达是否影响细胞状态。影响细胞状态的因素还包括光照射强度、病毒滴度、注射剂量、载体、感染细胞类型、动物种属等。除此之外,设计光遗传实验,还必须将一过性影响细胞膜内外离子平衡导致后延效应考虑在内。

2.1 在体光遗传实验设计原则

设计光遗传实验,探究疾病状态下特定行为的神经回路时,有一些基本规则参照(图 1)。选择视蛋白时需要权衡不同蛋白的优缺点。例如,视蛋白的光敏感性与其开闭动力学呈现反比^[8]。光效应的体积越大,时间精确性越差等。根据实验目的,选择适的视蛋白是非常重要的。

另外,针对特异性细胞或者组织的靶向策略也非常重要。最为常用的策略是依赖于病毒注射位置的特异性,也就是说视蛋白只表达于注射位置附近而病毒感染本身没有选择性。而某些具有顺行感染能力病毒^[12],蛋白不仅可以表达在细胞胞体,还可能沿着神经纤维到达纤维末端,从而实现光照射投射末端,操控细胞胞体。目前最为常用的病毒载体为慢病毒与腺相关病毒载体,并且也有多种针对野生型动物的启动子供选择^[12]。新型的病毒载体包括人类单纯疱疹病毒载体,狂犬病毒载体以其逆行感染能力也同样受到关注。逆行感染使得研究者可以实现针对某一特定脑区结构全部传入端的光遗传控制。但是,这些病毒载体由于其毒性较大,应用受到限制。

由于某些启动子序列过长,无法包装在病毒载体内。依赖 Cre 重组酶技术的视蛋白特异表达策略被开发出来。第一次利用成功应用此策略的是酪氨酸脱羧酶特异性细胞表达重组酶 Cre 小鼠(TH::Cre);小清蛋白特异性细胞表达重组酶 Cre 小鼠(PV::Cre)^[15]。随后越来越多的基于此种策略的转基因动物被创制出来^[16],甚至有脑内特定亚群细

胞内预先表达视蛋白转基因动物问世。通过病毒识别细胞外表达受体来确定细胞特异性的策略也被开发出来^[17, 18]。

激光定点导入脑内在整个光遗传技术中也是非常重要的。包括急性光纤插入(光纤通过导向套管直接插入脑内)^[19, 20];慢性植入式光纤(光纤头植入于脑内,颅骨外保留一个接头与光纤跳线相连接)^[12]。急性插入式光纤的好处是可以在插入光纤位置给予药物,但是由于光纤较脆有可能导致光纤断裂在套管内。慢性植入式光纤虽然不能配合药理学操作,但是可以在脑内保留多日,从而提供多次重复实验得到更多的数据^[12]。可采用的光源有激光二极管,以及发光二极管(LED),这两种光源各有利弊。视蛋白开始正常表达,并且光导入到脑内目标位置,光照参数就可以确定了。确定光照参数需要考虑到热效应、光散射和目标细胞的电生理特性等。在解释实验结果之前,要确认进行的光遗传操控,对于细胞的效应是确定而有效的,以排除由于技术本身带来的不确定因素。

2.2 有关恐惧焦虑的神经回路研究

据统计,焦虑性情绪障碍,包括焦虑病、惊恐性障碍、创伤后应激障碍和恐怖症等的焦虑性情绪疾病的发病率是 28%。尽管焦虑性情绪障碍发病很广泛,但是针对这种精神类疾病的治疗手段却很缺乏。

所谓焦虑情绪是对一个潜在危险的过分担心和恐惧^[21]。在啮齿类动物利用光遗传方法研究得到的结果显示,杏仁核特定的突触联系可以快速并且可逆的调节清醒自由活动动物的基础焦虑水平^[13]。研究者将视蛋白表达于整个神经细胞包括胞体以及轴突末端,在轴突末端给予光刺激即可导致轴突去极化。这个研究还利用倾斜的导管来实现光照只照射到从一个脑区到另一个脑区的轴突投射。实验结果显示,选择性激活由基底外侧杏仁核到内侧杏仁核的兴奋性投射导致抗焦虑效应。这与非选择性刺激基底外侧杏仁核兴奋性神经元胞体导致的促焦虑效应截然不同。可以确定的是,基底外侧杏仁核神经元的投射终点不仅有杏仁核

的中央外侧、中央内侧核团还包括伏隔核、前额叶皮层、终纹床核等许多其他核团,对于焦虑样行为导致的效应也不尽相同。因此,投射特异性光遗传操控使得研究者有能力解析杏仁核内部焦虑产生的精细通路。此外,光刺激表达有超极化基底外侧核杏仁核到内侧杏仁核通路时,产生促焦虑效应。也就是说这个细胞投射通路对于焦虑样情绪有双向调制作用。

2.3 有关成瘾回路的研究应用

药物成瘾是以对某一种药物强烈渴求,并且不计后果获取该药物为特点的一种慢性,顽固反复的神经疾病^[22]。研究人员推测药物成瘾是由于脑内奖赏通路被挟持导致,所以,对于奖赏通路的深入理解是研究药物成瘾的关键^[23, 24]。尽管我们已经知道中脑多巴胺能系统和伏隔核在脑内奖赏过程以及其他成瘾相关行为起着重要作用^[25]。我们对于成瘾的形成机制或者介导成瘾行为的神经编码却知之甚少。

靶向视蛋白基因表达策略的发明激发了研究者对于研究成瘾机制探究的兴趣。利用上文提到的依赖 Cre 重组酶技术的视蛋白特异表达策略,高度选择性的重组酶 Cre 依赖的病毒载体被开发出来^[16],视蛋白只表达于 Cre 阳性的细胞内,并且重组酶 Cre 只在多巴胺能神经元中表达。在这个研究中,阵发性非强直性刺激腹侧被盖核团多巴胺能神经元导致伏隔核的多巴胺能效应足够维持条件位置偏爱。光遗传结合条件位置偏爱行为学测量使得研究者确定了伏隔核不同部分对于奖赏依赖样行为起到的不同作用。伏隔核中表达不同多巴胺能受体亚型神经元的激活的对于可卡因位置偏爱行为的效应是不同的。激活表达 I 型多巴胺能受体的神经元易化可卡因位置偏爱、而激活表达 II 型受体的神经元抑制可卡因位置偏爱^[26]。除此之外,伏隔核中胆碱能神经元在可卡因位置偏爱行为中也起到关键作用^[27],并且激活伏隔核神经元内 G 蛋白偶联受体通路同样促进条件位置偏爱(CPP)。

进一步研究奖赏寻求相关行为,研究者开展了一系列对大脑“奖赏”编码的研究,也就是说光刺激特定脑区或者特定通路,观察动物有无寻求行为。这样的实验设计以动物的颅内自刺激或者自给药模型为基础^[28]。尽管,这样的实验设计为“奖赏”完全来自中枢提供了强有力的证据,但是由于脑内的神经元的异质性,人们对于维持自刺激行为特定

神经元亚型或者神经投射的了解依然非常有限。最近,有研究结果显示,介导维持自刺激行为的特定神经元类型。选择性激活由基底外侧杏仁核团到伏隔核的兴奋性投射,动物出现强烈的自刺激行为,而激活神经元胞体无此效应^[29]。此外,介导自刺激行为的基底外侧杏仁核-伏隔核投射依赖于 I 型多巴胺能投射^[29]。腹侧被盖区的多巴胺能神经元同样是光照自刺激的一个靶点。总而言之,这些研究揭示了维持对药物依赖病理状态过程中,特定神经元或者特定投射的工作模式。

光遗传学工具有望证明一些以往基于间接证据得到的假说。例如,腹侧被盖区 GABA 能神经元对多巴胺能神经元的抑制受到阿片类药物的干扰,从而成为研究成瘾的新的目标^[30]。利用现有转基因动物品系,研究者可以直接操控腹侧背盖区 GABA 能神经元并且同时观察动物享乐以及物质寻求行为。以往的经典电生理研究得到结果已经粗略的勾勒出皮质边缘系统在奖赏寻求相关的发生、位置、消退中起作用,这些结果恰恰为光遗传研究其特定内在因果性奠定基础。

电生理研究成瘾的工作基础是药理学操控特定回路的行为学效应。因此,随着光遗传技术的成熟,包括神经活动状态以及神经化学信号的高速获取、必将成瘾行为研究带入一个新的高度^[31]。

2.4 光遗传在脑神经系统疾病神经回路研究中的应用

一些神经系统疾病诸如帕金森疾病^[32, 33]、癫痫^[34, 35]、神经源性致盲^[36]、睡眠障碍^[37]的基础问题,有望利用光遗传技术得到解决。光遗传技术使得人们对于脑内运动通路的理解更为加深。基底节通过直接间接通路的平衡来调节运动,直接通路易化运动,间接通路抑制运动^[38]。视蛋白特异性表达策略,使得选择性激活两种通路成为可能^[32],研究结果直接证明了帕金森直接间接通路假说。

帕金森是一种以运动障碍为主要表现,同时兼有情绪和认知异常的退行性神经疾患^[39]。尽管膝下皮质深部脑刺激治疗抑郁症^[40]、刺激丘脑底核治疗帕金森导致的运动障碍^[41],以及其他靶点的深部脑电刺激治疗取得了一定疗效。但是,其机制的并不完全明确。利用光遗传技术,选择性激活传入丘脑底核 STN 的神经纤维末梢,对于 6-OHDA 致大鼠帕金森模型有显著治疗作用^[42]。这个证据都支持了深部脑刺激疗法中,白质纤维或者轴突通路是电

流效应的直接靶点。电极或者光极对于特定区域传入纤维的效应,导致的较大面积的神经元活动是 DBS 方法调控神经元的基础。这个概念被进一步引入到 DBS 治疗抑郁症领域。不仅如此,以轴突束为靶点的神经调控改善帕金森症状,同样提供了有关神经疾病发病和维持的更多信息。值得注意的是,光遗传同样被应用于干细胞干预帕金森疾病的研究当中^[43]。对于植入的干细胞来源的多巴胺能神经元进行光遗传刺激,异化了移植神经元与受体神经网络发生功能整合。光遗传学技术在神经系统疾病研究,包括机制研究和新型疗法研究越来越受到广泛关注。下丘脑不同亚群的神经元被发现参与摄食行为的调控。光遗传刺激下丘脑腹正中神经元诱发小鼠攻击性行为^[44]。另外,研究者可利用光遗传技术激活视锥细胞重建视觉的,使得扭转视网膜炎色素变性导致失明成为可能^[45],日前,该疗法已经在美国进入临床试验。

光遗传也被应用到阿尔兹海默症地研究当中, Tonegawa^[46]实验室利用小鼠模型来证明失忆症是记忆回想出现障碍。用蛋白合成抑制剂茴香霉素处理小鼠后,它似乎不记得足底电击的痛苦记忆。不过利用光遗传学激发认知过程中激活的细胞,它又能回想起“丢失的”记忆,但这种影响只是暂时的,当光关闭,失忆症又出现。有研究团队证明。阿尔兹海默症患者出现失忆症状也有类似的机制^[47]。

这里,我们总结了近期光遗传技术在神经精神相关疾病研究领域的应用。得益于光遗传技术的精准性,极大地拓展神经回路研究的可能性以及可靠性。尽管,成功应用光遗传的研究工作已经很多,但是诸如非人类灵长类光遗传技术应用仍然在初始阶段,还有许多问题没有解决^[48-50]。光遗传的研究由工具研究转化为科学问题研究的速度越来越快,并且各种面向科研需求为的光遗传方法学研究使得应用光遗传学更为便利和可靠。

虽然开发不同功能与特性的视蛋白速度很快,但有些问题仍然值得关注。例如,作为光敏感离子通道和光敏感离子泵的补充,新型视蛋白融合受体 (OptoXR) 家族有待开发,光敏感结构域有望加载在更多的受体或者胞内信号转导蛋白上,借此,光遗传技术的应用可以被拓展到细胞信号转导通路研究领域^[8]。

另外,光导入体内的方法也需要进一步改进。

目前的光导入方法光照射体积较小限制了光遗传技术在大动物例如非人灵长类的应用。光导入的精确性以及光照频率的时间分辨率也有待提高,只有解决了这些才能实现,针对单个神经元细胞的激活以及神经编码的模拟以及重现。

目前认为,导致各种神经精神类疾病诸如焦虑症、抑郁症、成瘾、精神分裂症和自闭症的原因都是神经回路异常。鉴于神经精神疾病症状的相似性以及不同神经精神疾病在同一个体上共同发病的概率也较高,光遗传提供了一种可以更为精确确定和解释神经回路的方法,实为研究神经精神类疾病的利器。

参考文献:

- [1] Lee J H, Durand R, Gradinaru V, et al. Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring[J]. *Nature*, 2010, 465(7299): 788-792.
- [2] Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, et al. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(5): 663-668.
- [3] Adesnik H, Scanziani M. Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits[J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1155-1160.
- [4] Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(9): 1263-1268.
- [5] Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, et al. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 154-165.
- [6] Zhang F, Wang L P, Brauner M, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry[J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 633-639.
- [7] Chow B Y, Han X, Dobry A S, et al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps[J]. *Nature*, 2010, 463(7277): 98-102.
- [8] Mattis J, Tye K M, Ferenczi E A, et al. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins[J]. *Nat Methods*, 2012, 9(2): 159-172.
- [9] Airan R D, Thompson K R, Fenno L E, et al. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling[J]. *Nature*, 2009, 458(7241): 1025-1029.
- [10] Yizhar O, Fenno L E, Prigge M, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction[J]. *Nature*, 2011, 477(7363): 171-178.
- [11] Baker C A, Elyada Y M, Parra A, et al. Cellular resolution circuit mapping with temporal-focused excitation of soma-targeted channelrhodopsin[J]. *Elife*, 2016, 5.
- [12] Yizhar O, Fenno L E, Davidson T J, et al. Optogenetics in neural systems[J]. *Neuron*, 2011, 71(1): 9-34.

- [13] Tye K M, Prakash R, Kim S Y, et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety [J]. *Nature*, 2011, 471(7338): 358–362.
- [14] Felix-Ortiz A C, Beyeler A, Seo C, et al. BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors [J]. *Neuron*, 2013, 79(4): 658–664.
- [15] Sohal V S, Zhang F, Yizhar O, et al. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance [J]. *Nature*, 2009, 459(7247): 698–702.
- [16] Atasoy D, Aponte Y, Su H H, et al. A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(28): 7025–7030.
- [17] Choi J, Young J A, Callaway E M. Selective viral vector transduction of ErbB4 expressing cortical interneurons in vivo with a viral receptor-ligand bridge protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(38): 16703–16708.
- [18] Li F, Ryu B Y, Krueger R L, et al. Targeted entry via somatostatin receptors using a novel modified retrovirus glycoprotein that delivers genes at levels comparable to those of wild-type viral glycoproteins [J]. *J Virol*, 2012, 86(1): 373–381.
- [19] Aravanis A M, Wang L P, Zhang F, et al. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology [J]. *J Neural Eng*, 2007, 4(3): S143–S156.
- [20] Kravitz A V, Kreitzer A C. Optogenetic manipulation of neural circuitry in vivo [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2011, 21(3): 433–439.
- [21] Lieb R. Anxiety disorders: clinical presentation and epidemiology [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2005(169): 405–432.
- [22] Koob G F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1992, 13(5): 177–184.
- [23] Robinson T E, Berridge K C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1993, 18(3): 247–291.
- [24] Kelley A E, Berridge K C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(9): 3306–3311.
- [25] Berridge K C, Robinson T E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1998, 28(3): 309–369.
- [26] Lobo M K, Covington H R, Chaudhury D, et al. Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward [J]. *Science*, 2010, 330(6002): 385–390.
- [27] Witten I B, Lin S C, Brodsky M, et al. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning [J]. *Science*, 2010, 330(6011): 1677–1681.
- [28] Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain [J]. *J Comp Physiol Psychol*, 1954, 47(6): 419–427.
- [29] Stuber G D, Sparta D R, Stamatakis A M, et al. Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking [J]. *Nature*, 2011, 475(7356): 377–380.
- [30] Lüscher C, Malenka R C. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling [J]. *Neuron*, 2011, 69(4): 650–663.
- [31] Oleson E B, Gentry R N, Chioma V C, et al. Subsecond dopamine release in the nucleus accumbens predicts conditioned punishment and its successful avoidance [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(42): 14804–14808.
- [32] Kravitz A V, Freeze B S, Parker P R, et al. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry [J]. *Nature*, 2010, 466(7306): 622–626.
- [33] Gradinaru V, Mogri M, Thompson K R, et al. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry [J]. *Science*, 2009, 324(5925): 354–359.
- [34] Tonnesen J, Sorensen A T, Deisseroth K, et al. Optogenetic control of epileptiform activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(29): 12162–12167.
- [35] Paz J T, Bryant A S, Peng K, et al. A new mode of corticothalamic transmission revealed in the Gria4(–/–) model of absence epilepsy [J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(9): 1167–1173.
- [36] Szadoczky E, Papp Z, Vitrai J, et al. [Prevalence of mood and anxiety disorders in the Hungarian adult population] [J]. *Orv Hetil*, 2000, 141(1): 17–22.
- [37] Adamantidis A R, Zhang F, Aravanis A M, et al. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons [J]. *Nature*, 2007, 450(7168): 420–424.
- [38] Alexander G E, Crutcher M D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing [J]. *Trends Neurosci*, 1990, 13(7): 266–271.
- [39] Gelb D J, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease [J]. *Arch Neurol*, 1999, 56(1): 33–39.
- [40] Mayberg H S, Lozano A M, Voon V, et al. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression [J]. *Neuron*, 2005, 45(5): 651–660.
- [41] Schneider F, Habel U, Volkmann J, et al. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus enhances emotional processing in Parkinson disease [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2003, 60(3): 296–302.
- [42] Schultz W, Dayan P, Montague P R. A neural substrate of prediction and reward [J]. *Science*, 1997, 275(5306): 1593–1599.
- [43] Byers B, Cord B, Nguyen H N, et al. SNCA triplication Parkinson's patient's iPSC-derived DA neurons accumulate α -synuclein and are susceptible to oxidative stress [J]. *PloS one*, 2011, 6(11): e26159.
- [44] Aponte Y, Atasoy D, Sternson S M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training [J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(3): 351–355.
- [45] Busskamp V, Roska B. Optogenetic approaches to restoring

visual function in retinitis pigmentosa[J]. Curr Opin Neurobiol, 2011, 21(6): 942–946.

[46] Tonegawa S, Liu X, Ramirez S, et al. Memory engram cells have come of age[J]. Neuron, 2015, 87(5): 918–931.

[47] Perkel J P D. Lighting our memories[J]. Biotechniques, 2016, 60(6): 268–272.

[48] Diester I, Kaufman M T, Mogri M, et al. An optogenetic toolbox designed for primates[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(3): 387–397.

[49] Han X, Qian X, Bernstein J G, et al. Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain[J]. Neuron, 2009, 62(2): 191–198.

[50] Berdyeva T K, Reynolds J H. The dawning of primate optogenetics[J]. Neuron, 2009, 62(2): 159–160.

[修回日期]2016–10–31

(上接第 28 页)

[4] 吴思昇, 王簪, 高昌, 等. 实验用斑马鱼主要疾病及其实验动物标准化研究过程面临的主要问题 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(4): 51–55.

[5] Lü A, Hu X, Wang Y, et al. Comparative analysis of the acute response of zebrafish Danio rerio skin to two different bacterial infections [J]. J Aquat Anim Health, 2013, 25(4): 243–51.

[6] 钟女奇, 赵勇, 洪迅, 等. 实验动物细菌检测中的生物安全控制与预防 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(3): 51–54.

[7] Crim MJ, Riley LK. Viral diseases in zebrafish: what is known and unknown [J]. ILAR J, 2012, 53(2): 135–143.

[8] Kent ML, Spitsbergen JM, Matthews JM, et al. Diseases of zebrafish in research facilities [M]. ZIRC, 2012, 4.

[9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京科学出版社, 2001, 106–121.

[10] 杨守明, 王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性 [J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(5): 511–514.

[11] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述 [J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282–288.

[修回日期]2016–06–16

(上接第 58 页)

[8] 杨玉芳, 曾健, 劳山. 黄芪对顺铂肾损害大鼠肾功能及组织病理学的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2013, 30(5): 669–671.

[9] 李传刚, 舒晓宏, 姜妙娜, 等. 大剂量顺铂所致大鼠急性肾损害过程中血浆内皮素-1 与肾功能变化的关系 [J]. 大连医科大学学报, 2008, 30(6): 524–526.

[10] 蒋智, 黄晓玲, 杨红, 等. 超声造影观察兔急性肾衰竭前后肾皮、髓质血流灌注变化 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7(1): 54–57.

[11] 董怡, 王文平, 丁红, 等. 超声造影定量技术评价兔急性肾功能衰竭早期灌注改变 [J]. 中国医学科学院学报, 2008, 30(1): 45–48.

[12] 李伟超, 刘俊平, 王宇, 等. 超声造影技术评价犬急性肾衰竭模型的研究 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2015, 36(2): 9–13.

[13] 申俊, 刘妍, 张金晓, 等. 尿中肾损伤分子 1 水平升高对大鼠早期肾损伤的预测作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(2): 212–218.

[14] 王海燕. 肾脏病学 (第 3 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社. 2009: 440.

[修回日期]2016–07–13