

李谦, 毕爱玲, 王兴荣, 等. 模型动物神经元钙信号检测技术研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 104-109.
Li Q, Bi AL, Wang XR, et al. Research and development of *in vivo* detection technology for calcium signals in model animal neurons [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 104-109.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.015

模型动物神经元钙信号检测技术研究进展

李谦^{1,2,3,4}, 毕爱玲^{1,2,3,4}, 王兴荣^{1,2,3,4*}, 毕宏生^{1,2,3,4*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250002; 2. 山东中医药大学附属眼科医院, 济南 250002;
3. 山东省中西医结合眼病防治重点实验室, 济南 250002; 4. 山东中医药大学眼科研究所, 济南 250002)

【摘要】 钙是模型动物神经细胞内重要的第二信使, 参与细胞多种功能的调节, 可以产生多种细胞内信号, 这些信号在神经元功能调控及信息传递方面发挥着重要作用。在明确的细胞亚区, 钙信号发挥着高度特异性的功能, 尤其在大脑皮层中更能反映神经元的活性, 因此神经元钙信号的检测对研究大脑皮层功能至关重要。本文综述了模型动物钙信号检测的方法, 目前比较常见的方法包括双光子钙成像技术、深脑显微钙成像技术、光纤记录技术。通过文献回顾分析, 了解了该领域的新进展, 并综述了各种钙信号在体检测技术在模型动物神经元信号分析和神经元可塑性研究的应用及前景。

【关键词】 钙信号; 双光子钙成像技术; 深脑显微钙成像技术; 光纤记录技术

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 01-0104-06

Research and development of *in vivo* detection technology for calcium signals in model animal neurons

LI Qian^{1,2,3,4}, BI Ailing^{1,2,3,4}, WANG Xingrong^{1,2,3,4*}, BI Hongsheng^{1,2,3,4*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, China.
2. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002.
3. Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases, Jinan 250002. 4. Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002)

Corresponding author: WANG Xingrong. E-mail: semwxr@163.com; BI Hongsheng. E-mail: hongshengbi1@163.com

【Abstract】 Calcium is an important messenger in mammalian nerve cells. It mediates a variety of intracellular signal transduction pathways and plays an important role in regulating neuronal functions. Calcium signaling performs its highly specific functions in a defined subregion of the cell, especially in the cortex. Detection of calcium signals in neurons is particularly important to study neuronal functions. In this article, we review the method of detecting calcium signals in model animals. The common method include two-photon calcium imaging technology, deep brain microscopic calcium imaging technology, and optical fiber recording technology. Through a literature review and analysis, new developments in this field are presented. We also discuss the prospects of calcium signal detection to study cortical neuronal signals and plasticity in various animal models.

【基金项目】 国家重点研发计划(2019YFC1710200, 2019YFC1710204)。

Funded by National Key Research and Development Project(2019YFC1710200, 2019YFC1710204)。

【作者简介】 李谦(1994—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病及屈光不正的研究。Email: 1135625057@qq.com

【通信作者】 王兴荣(1962—), 女, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病及屈光不正的研究。Email: semwxr@163.com;

毕宏生(1960—), 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合临床眼科疾病的研究白内障及屈光不正。
Email: hongshengbi1@163.com。

* 共同通信作者

【Keywords】 calcium signals; two-photon calcium imaging; deep brain microscopic calcium imaging; fiber recording technology

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

钙(Ca^{2+})是调节真核细胞重要活动的第二信使,介导去极化信号的传导,并参与突触活动的调控及生物体内多种功能的调节,它对神经元的功能至关重要。当细胞受到外界各种刺激时,细胞外钙离子内流或细胞内内质网钙库的钙离子释放,调控钙离子在神经细胞质膜内外的浓度变化,转化为细胞反应的信号,引起一系列生理反应。细胞内钙离子的测定是研究神经元钙信号的基础。然而在细胞内 Ca^{2+} 浓度比较低,而且变化迅速,加上 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 等其他离子的浓度较高,通常要比它高出 $10^4 \sim 10^6$ 倍,很容易造成较大的干扰,因此,测定细胞内钙离子的浓度比较困难,需要发展灵敏度高、特异性高的钙离子检测技术。

在早期的大脑皮层神经元的相关研究中,大多数使用了电生理技术来研究神经元的活动,这项技术尚存在许多缺点,尤其在长时程记录神经元活动方面,特别不稳定,细胞记录的位置会随着时间的改变^[1],这可能导致每天记录细胞的不同,极大地影响了信号的稳定性。钙成像是一项相对较新的技术,它可以更好地解决电生理记录的主要弱点。显微成像技术的不断发展,以及新型钙指示剂的应用,使得钙信号检测技术更加成熟^[2]。神经系统钙成像技术的发展是一个长期的过程,这包括合适的钙指示剂的选择,不同的染色加载技术的应用,以及用于体内和体外最先进的钙成像设备的发现。

目前研究发现,双光子钙成像技术已经彻底改变了钙成像领域的研究^[3-4],得到了很大的普及与应用;随着微光学的梯度折射率(GRIN)透镜系统的出现,深脑显微钙成像技术促进了对大脑深层神经活动的可视化,从而大大增加了大脑中可以被观察和监控的神经元的数量^[5];近几年,一种光纤钙信号记录方法也得到了快速发展和应用。本文就模型动物视皮层钙信号检测的方法及其应用进行综述。

1 双光子钙成像技术

双光子钙成像技术已经成为一种在亚细胞水平上探索神经元结构和功能的有效方法。其应用范围从亚细胞成像,如树突、轴突,到神经元或胶质细胞的功能分析。双光子显微镜可以对活体动物

的神经回路进行系统的成像,可以同时记录多个神经元,允许在小鼠皮层上以单细胞分辨率对神经元群进行活体功能成像^[6]。双光子显微镜的光源是一种飞秒激光,它可以发出具有高峰值功率的周期性脉冲序列的红外波段。由于红外光对组织的穿透性较深,因此双光子显微镜非常适合于组织成像。在典型的双光子显微镜中,一束飞秒激光被聚焦到一个有限衍射点上,然后扫描整个目标皮层,皮层被激发后,可以发射出被光电倍增管(PMT)收集的荧光,最终由探测系统收集形成一个图像。由于样品是被激发的,信号是逐点收集的,这种方法克服了散射组织的宽场成像中出现的像素干扰。此外,较长的激发波长相比于单光子激发更能抵抗组织的散射。由于双光子显微镜具有较高的光采集效率、穿透深度和较低的光毒性,因此它通常是共聚焦显微镜在神经元功能成像方面较好的替代物。它使一系列关于啮齿类动物的神经科学的研究成为可能,如分析皮层之间的功能连接、皮层对各种感觉刺激的反应、行为过程中的神经活动、神经血管耦合以及脊柱结构和功能等诸多研究^[7]。

双光子成像允许深入组织观察,能够监测神经元的 Ca^{2+} 变化。使用双光子显微镜在模型动物的研究已经取得了显著进展。Tran等^[8]运用双光子在体成像技术对小鼠皮层进行钙成像,检测到了活跃小鼠星形胶质细胞中频繁的 Ca^{2+} 瞬变。Muir等^[9]使用漂移光栅和格子模式的刺激来研究小鼠初级视觉皮层(V1区)对感觉特征的局部整合,同时用双光子钙成像记录麻醉小鼠V1区II/III层视觉诱发的神经元活动。该成像系统是由Ti:蓝宝石激光发射系统提供波长为830 nm或870 nm的100 fs激光脉冲来测量荧光变化,揭示了小鼠V1区神经元群在移动光栅和格子模式的视觉刺激阶段的视觉特征的整合水平。McClure等^[10]利用双光子钙成像技术成功地在清醒的小鼠上进行测量了V1层数千个II/III层神经元,比较了V1区II/III层神经元在单模态(仅视觉)或多模态(视、听)条件下的取向和漂移光栅的方向表征,最终发现了声音通过调节神经元的方向、方向调节特性以及响应振幅来改善II/III层神经元中视觉刺激的方向和方向表征。

双光子钙成像在体检测技术在阿尔茨海默病

(AD)小鼠模型的研究中也得到了巨大的应用,推动了对疾病发病的认识和治疗机制的研究。近年来,尤其海马在体双光子钙成像检测技术是可以一种直接评估阿尔茨海默病病理情况的有效方法。海马体,位于丘脑和内侧颞叶之间,具有记忆存储、空间定位、以及情绪调节等功能,同时也是阿尔茨海默病最先产生病变的地方。Busche^[11]通过双光子显微镜和荧光钙指示剂对小鼠海马体成像,发现小鼠皮质和海马体神经元的淀粉样蛋白依赖性异常亢进是原发性神经元损伤的结果,这是以前的体外分析很难做到的。该方法为研究 AD 的发病机制及治疗策略提供了一种理想的体内功能测定方法^[12]。

神经元树突在神经元信号传导过程中可以同时计算电信号和化学信号,并将信号传向胞体,这一过程对大脑的信息处理和交流至关重要。分析神经元树突上的信号最常用的方法之一是成像细胞内 Ca^{2+} 浓度的动态变化^[13]。双光子显微镜的快速发展和荧光 Ca^{2+} 指标的改进使我们能够更好地在体外和体内条件下研究树突信号。Ding 等^[14]利用双光子钙成像和细胞内药理学操作,在体内同时监测到了绒猴大脑视觉识别神经元的胞内电信号和来自树突的 Ca^{2+} 化学信号。Birkner 等^[6]使用双光子显微镜超短激光脉冲进行成像,并结合新型荧光钙指示剂 Cal-590 进行深度标记的方法,成功在小鼠皮层的神经元群进行活体功能成像,证明了稳定皮层的深层记录并不局限于麻醉的动物,而在清醒的、有行为活动的老鼠中也是可行的。该方法是对传统双光子显微镜的成像的优化,大大地增强了双光子成像的穿透深度。

双光子显微镜的改进及其与钙成像技术的结合,使我们能够利用人工合成或基因工程编码的钙指示剂来测量深层神经元群的活性,在神经科学研究领域中应用广泛,极大地促进了脑科学的研究和发展。

2 深脑显微钙成像技术

深脑显微钙成像技术是一种轻量级的成像系统,通过微型荧光显微镜系统观察自由行为的动物大脑深处的神经活动,并可以记录数周内自由移动的动物视皮层上的神经元钙信号,这对于理解认知功能背后的神经编码机制具有重要意义。微型荧光显微镜系统由微型显微镜主体、数据采集控制器

和带换向器的数据传输电缆组成。该系统允许在小鼠的大脑深部区域进行 Ca^{2+} 成像,可以在自由移动的动物视皮层上实现跨越 $0 \sim 0.5 \text{ mm}^2$ 区域的高速细胞成像,同时跟踪跨越 9 个小脑微区的大于 200 个浦肯野神经元 Ca^{2+} 的峰值^[15]。与台式显微镜相比,微型显微镜的主要优点是头戴式和低成本^[16]。Ghosh 等^[15]首次发现了带有荧光灯光源的微型显微镜,该显微镜体积小,重量轻,易于安装在小鼠头上,用于研究自由运动动物的复杂行为。

近年来,新兴的自定义设计的 GRIN 透镜系统,利用其折射率的内部变化来引导光线从记录点来回照射。GRIN 透镜通常与微型头戴显微镜配合使用,GRIN 镜头的长度大小可以定制,具有更大的视野和更宽的焦距。在与 GRIN 透镜相结合后,微型显微镜成像系统可以记录数百个大脑深层区域的神经元的钙活动长达数月。这些透镜可以用来观察位于大脑深部区域(如下丘脑)中带有基因标记的神经元活动,从而大大增加了大脑监测的神经元的数量,有助于解码特定行为背后的神经表征。Zhang 等^[17]在微型显微镜成像的基础上结合 GRIN 透镜系统,成功对行为动物大脑深部神经元进行钙成像。该系统从微型显微镜的设计、GRIN 透镜植入的手术过程、微型显微镜在小鼠头部的安装以及数据采集与分析进行改造。其原理是利用表达钙离子指示剂(GCaMP6)的病毒来标记靶脑区域,在目标大脑区域上方植入一个 GRIN 透镜,在小鼠手术恢复后,将微型镜安装在小鼠头部上方,最后将自由活动老鼠的神经元活动记录下来。Ziv 等^[18]在反复探索熟悉环境的自由活动小鼠身上,使用集成显微透镜系统进行钙成像,在数周内跟踪了数千个 CA1 锥体细胞 Ca^{2+} 动态变化。Barretto 等^[19]利用复合双透镜梯度折射率(GRIN)微透镜,追踪了成年小鼠的 CA1 海马锥体神经元树突,发现这些树突具有极高的稳定性,而且它们的结构改变非常罕见。Rehani 等^[20]利用微型内窥镜成像系统,将 GRIN 透镜植入大脑深处,成功地对自由活动小鼠纹状体胆碱能间神经元钙活动进行成像,揭示了胆碱能中间神经元神经纤维网的活动模式。

Sato 等^[21]开发了一种快速的双光子变焦显微内窥镜系统,该系统具有 GRIN 透镜和显微内窥镜,能够以较高的扫描速度对老鼠体内背侧海马 CA1 和杏仁核区域的神经元活动进行钙成像。通过在小鼠海马和杏仁核中呈现不同的神经元网络活动

的多平面模式,证明了它在体内成像中的作用。这种多焦点显微内窥镜系统为目前的单平面深部脑成像方法增加了一个新的维度。

该系统提供了直接进入大脑深部目标区域的途径。大脑皮层下的区域,如海马、丘脑和下丘脑,甚至精细的结构,如 CA1 海马中的树突棘,都可以成像^[22],是目前对大脑中任何深度的神经回路活动进行可靠的细胞分辨率成像最有前途的技术。因此可以用于研究脑内的皮层动态变化和信交流,从而阐明大脑信息编码的神经元机制。

3 光纤记录技术

光纤记录技术,又称为光纤光度检测,是近几年兴起的一种利用光纤记录钙信号的方法。可以通过灵活的轻型光纤传导来实时监测自由活动动物大脑深处的神经元活性变化。因其操作简单、方便且允许检测特定细胞类型的神经元活动得到了广泛应用^[23]。当受到外界行为刺激时,神经细胞会产生一系列活动导致细胞内钙水平的升高,进而提高 GCaMP 等荧光指示剂的荧光强度。该系统通过一根细的多模光纤进入大脑,然后通过同一根光纤收集发射信号。荧光通过埋植在特定脑区的光纤陶瓷插芯导出,光电倍增管可以灵敏的检测其信号,并将其转换为电信号。电信号放大滤波后,被计算机光纤记录系统采集到,进一步分析研究神经元活动和行为的相关性。因为这些光纤质量很轻,可以弯曲,动物可以不受阻碍地移动,从而将神经元活动与动物的特定行为联系起来。这对于理解特定神经元群在指挥或响应某个动作或刺激时所扮演的角色至关重要^[24]。

光纤记录可以长时程稳定检测神经元活性,Zhang 等^[25]成功采用了光纤记录技术检测小鼠在自由运动过程中初级运动皮层和初级视觉皮层(M1 和 V1)第 5 层的 Ca^{2+} 信号。这种方法通过微量注射携带钙离子浓度指示蛋白的荧光指示剂(常用 GCaMP 荧光指示剂)到特定脑区,利用指示剂的荧光强度变化将神经元中钙离子的浓度变化表现出来,通常可以检测到脑区神经元钙活动的范围大约 300 ~ 500 μm 。Stroh 等^[26]同样应用光纤记录技术证明了视觉诱发刺激产生的 Ca^{2+} 波首先发生在视觉皮层。Cui 等^[27]设计了一套光纤系统来测量荧光生物传感器在自由活动的小鼠大脑深部结构中表达的强度、发射光谱和寿命,当与钙依赖选择性表达

基因编码的钙离子指示剂(GECIs)相结合时,该系统可用于测量执行复杂行为任务的小鼠特定细胞群的平均神经活动,并记录了执行杠杆压迫操作任务的小鼠中与钙峰值相关的荧光变化。大脑梨状皮层是重要的嗅觉中枢,主要参与嗅觉信息的学习和编码,并接受强烈的 5-羟色胺能(5-HT)神经支配,但梨状皮层如何受 5-HT 的调节在很大程度上仍是未知的。Wang 等^[28]利用钙光纤光度检测技术和光遗传学技术研究了 5-HT 如何影响前梨状皮层(the anterior piriform cortex, aPC)锥体神经元的活性,发现了 5-HT 通过 5-HT_{2C}受体、磷脂酶 C 和钙激活钾(BK)通道直接降低锥体神经元的兴奋性。此外,内源性血清素能减弱 aPC 锥体神经元中气味引起的钙反应。这些发现确定了 aPC 的 5-羟色胺能的调节机制,并阐明了其潜在作用。中脑腹侧被盖区(VTA)多巴胺能神经元在高度觉醒的各种依赖行为中起着关键作用,然而,VTA 多巴胺能神经元在觉醒调节中的作用尚未被完全了解。Eban 等^[29]使用光纤光度检测技术记录了自由活动小鼠的钙活性,发现了 VTA 多巴胺能神经元的不同投射对觉醒有不同的调节作用,揭示了 VTA 多巴胺能回路在维持清醒状态和与动物行为学相关的睡眠相关行为中的基本作用。

光纤质量很轻,高度灵活,不需要对动物进行固定,而且直径相对较小是收集深层脑组织荧光信号的极佳选择。该技术不仅适用于同一动物大脑不同区域神经元活动的记录,也适用于不同模型动物的记录。因此,可以广泛应用于自由运动的模型动物的行为学研究。

4 钙离子荧光指示剂的发展与应用

近年来,钙成像技术在研究在体神经元方面变得越来越重要,而钙离子荧光指示剂的发展与应用起到了巨大的推动作用。带有荧光示踪剂的钙成像技术为监测神经元动作电位提供了一种光学方法。目前普遍作为微电极记录的补充,来测量神经元在体内的活动,这种方法为小型模型动物大脑神经元群活动的重建开辟了道路。

最早用于监测细胞钙信号动力学的钙指示剂是生物荧光钙结合光蛋白。随着技术的发展,更加灵敏和通用的钙荧光指示剂被发现,钙离子的结合引起分子构象的变化,从而导致荧光的强度变化。第一代钙荧光指示剂由 Indo-1, Fura-2, Quin-2, 和

Fluo-3 等组成。其中, Fura-2 是当时比较常用的一种钙螯合剂与荧光团的结合物, 其发射的荧光强度随钙离子浓度的变化而变化, 可以达到较高的空间分辨率^[30]。但因其时间分辨率较低, 组织分布不均匀等缺点逐渐被代替。现在最广泛使用的荧光指示剂是 GCaMP, 它是一种新型基因编码的钙离子指示剂(GECIs), 含有一种绿色荧光蛋白(GFP), 可以与钙调蛋白和一种来自平滑肌肌球蛋白轻链激酶(RS20)的肽融合。钙离子诱导钙调蛋白与 RS20 结合, 增加其结合的 GFP 分子的荧光^[31]。由于细胞内的钙水平会随着动作电位的激发而升高, 导致钙自然流入细胞, 当细胞内有足够的钙时, 钙与钙指示剂结合不到一秒钟, 就能改变连接两个结构域的 GFP 蛋白的构象, 从而诱导荧光增强^[32]。因此可以作为一种测量钙信号的指标。Chen 等^[33]利用慢病毒(AAV)将 GCaMP 变异基因导入小鼠视觉皮层神经元, 通过体内成像检测到了单个树突棘神经细胞内的钙瞬变。随着基因编码的钙指示剂(GECIs)光学技术的最新进展, 已经有可能将这些荧光指示剂达到特定的神经元亚群中, 并监测这些神经元的荧光变化, 可以实现体内实时监控的细胞和分子活动^[34]。所以, 这是用于研究脑皮层神经元的一种非常好的记录方法。

5 总结

不同的生物学问题将决定选择不同的研究方法, 各种方法最终将相互补充, 共同揭示动物行为的神经机制。双光子钙成像技术可以特异性记录大量神经元, 但仅限于麻醉或头部受限的小鼠皮层浅层区域^[35-36], 并且在头部固定下, 一定的束缚会对研究造成影响。基于 GRIN 透镜系统的微型显微镜对动物运动的限制比较小, 且能在脑区深部进行成像, 是一种解决双光子成像问题比较好的方法。但由于成像装置价格昂贵, 手术难度较大^[15, 18], 并且植入的 GRIN 透镜直径较大(通常 ≥ 1 mm), 可能会造成严重的组织损伤, 组织损伤预计是探头直径的二次函数, 因此, 即使成像探头的直径稍微减小, 也可能导致组织损伤^[27]。目前基于光纤的钙信号检测技术随着钙荧光指示剂的发展日趋成熟, 但由于其空间分辨率效果差, 信号不特异, 不能反映单个神经元活性, 记录过程中形成的光漂白和光毒性比较大等缺点, 使其应用受到一定限制。

6 前景

未来几年, 另一个重要的领域很可能会大力扩展, 那就是在清醒、行为正常的动物身上, 对特定类型的皮层神经元进行钙成像。这些研究将不会局限于大鼠, 但很可能会扩展到其他模型, 如雪貂, 猫, 尤其是灵长类动物。一个影响越来越大的应用领域将是在各种神经元疾病研究中使用钙成像技术来详细分析疾病的生物学机制^[37]。期待着钙成像技术的进一步发展, 相信未来 3D 成像和用于自由移动动物的微型化设备的设计将成为可能。随着医学技术的发展, 钙信号检测技术日新月异, 极大地促进了神经元细胞结构与功能的研究和发展, 在神经系统乃至神经科学领域中有更加深入的应用。

参 考 文 献(References)

- [1] Stringer C, Pachitariu M, Steinmetz NA, et al. Inhibitory control of correlated intrinsic variability in cortical networks [J]. *Elife*, 2016, 5: e19695.
- [2] Xu Q, Dong X. Calcium imaging approaches in investigation of pain mechanism in the spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2019, 317: 129-132.
- [3] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nat Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [4] Svoboda K, Yasuda R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience [J]. *Neuron*, 2006, 50(6): 823-839.
- [5] Resendez SL, Jennings JH, Ung RL, et al. Visualization of cortical, subcortical and deep brain neural circuit dynamics during naturalistic mammalian behavior with head-mounted microscopes and chronically implanted lenses [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(3): 566-597.
- [6] Birkner A, Tischbirek CH, Konnerth A. Improved deep two-photon calcium imaging *in vivo* [J]. *Cell Calcium*, 2017, 64: 29-35.
- [7] Yang W, Yuste R. *In vivo* imaging of neural activity [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 349-359.
- [8] Tran CH, Gordon GR. Acute two-photon imaging of the neurovascular unit in the cortex of active mice [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 11.
- [9] Muir DR, Roth MM, Helmchen F, et al. Model-based analysis of pattern motion processing in mouse primary visual cortex [J]. *Front Neural Circuits*, 2015, 9: 38.
- [10] McClure JP Jr, Polack PO. Pure tones modulate the representation of orientation and direction in the primary visual cortex [J]. *J Neurophysiol*, 2019, 121(6): 2202-2214.
- [11] Busche MA. *In vivo* two-photon calcium imaging of hippocampal neurons in alzheimer mouse models [J]. *Methods Mol Biol*,

- 2018, 1750: 341–351
- [12] Busche MA, Grienerger C, Keskin AD, et al. Decreased amyloid - β and increased neuronal hyperactivity by immunotherapy in Alzheimer's models [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(12): 1725–1727.
- [13] Grienerger C, Chen X, Konnerth A. Dendritic function *in vivo* [J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(1): 45–54.
- [14] Ding R, Liao X, Li J, et al. Targeted patching and dendritic Ca^{2+} imaging in nonhuman primate brain *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2873.
- [15] Ghosh KK, Burns LD, Cocker ED, et al. Miniaturized integration of a fluorescence microscope [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(10): 871–878.
- [16] Cai DJ, Aharoni D, Shuman T, et al. A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time [J]. *Nature*, 2016, 534(7605): 115–118.
- [17] Zhang L, Liang B, Barbera G, et al. Miniscope GRIN lens system for calcium imaging of neuronal activity from deep brain structures in behaving animals [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2019, 86(1): e56.
- [18] Ziv Y, Burns LD, Cocker ED, et al. Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(3): 264–266.
- [19] Barretto RP, Ko TH, Jung JC, et al. Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy [J]. *Nat Med*, 2011, 17(2): 223–228.
- [20] Rehani R, Atamna Y, Tiroshi L, et al. Activity patterns in the neuropil of striatal cholinergic interneurons in freely moving mice represent their collective spiking dynamics [J]. *eNeuro*, 2019, 6(1): 1–16.
- [21] Sato M, Motegi Y, Yagi S, et al. Fast varifocal two-photon microendoscope for imaging neuronal activity in the deep brain [J]. *Biomed Opt Express*, 2017, 8(9): 4049–4060.
- [22] Attardo A, Fitzgerald JE, Schnitzer MJ. Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus [J]. *Nature*, 2015, 523(7562): 592–596.
- [23] Chen Y, Lin YC, Kuo TW, et al. Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits [J]. *Cell*, 2015, 160(5): 829–841.
- [24] Martianova E, Aronson S, Proulx CD. Multi-fiber photometry to record neural activity in freely-moving animals [J]. *J Vis Exp*, 2019, 152: e60278.
- [25] Zhang Q, Yao J, Guang Y, et al. Locomotion-related population cortical Ca^{2+} transients in freely behaving mice [J]. *Front Neural Circuits*, 2017, 11: 24.
- [26] Stroh A, Adelsberger H, Groh A, et al. Making waves: initiation and propagation of corticothalamic Ca^{2+} waves *in vivo* [J]. *Neuron*, 2013, 77(6): 1136–1150.
- [27] Cui G, Jun SB, 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.
- [28] Wang D, Wang X, Liu P, et al. Serotonergic afferents from the dorsal raphe decrease the excitability of pyramidal neurons in the anterior piriform cortex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(6): 3239–3247.
- [29] Eban RA, Rothschild G, Giardino WJ, et al. VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(10): 1356–1366.
- [30] Zhong C, Schleifenbaum J. Genetically encoded calcium indicators: a new tool in renal hypertension research [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2019, 6: 128.
- [31] Schoenenberger P, O' Neill J, Csicsvari J. Activity-dependent plasticity of hippocampal place maps [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11824.
- [32] Lin MZ, Schnitzer MJ. Genetically encoded indicators of neuronal activity [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19: 1142–1153.
- [33] Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity [J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 295–300.
- [34] Lütcke H, Murayama M, Hahn T, et al. Optical recording of neuronal activity with a genetically encoded calcium indicator in anesthetized and freely moving mice [J]. *Front Neural Circuits*, 2010, 4: 9.
- [35] Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, et al. *In vivo* two-photon calcium imaging of neuronal networks [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(12): 7319–7324.
- [36] Komiyama T, Sato TR, O' Connor DH, et al. Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice [J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1182–1186.
- [37] Rochefort NL, Jia H, Konnerth A. Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine [J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(9): 389–399.