

光学显微水平全脑成像方法的研究进展*

李安安¹⁾ 龚辉^{1, 2)**}

¹⁾ 华中科技大学 - 武汉光电国家实验室(筹), 生物医学光子学功能实验室, 武汉 430074;

²⁾ 华中科技大学生物医学工程系, 生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要 在全脑水平研究哺乳动物复杂的脑神经网络是现代脑科学的重要研究目标之一, 但由于缺乏合适的研究方法, 已有的研究还局限于高等动物的局部脑回路或低等动物的脑网络. 为了实现大范围的高分辨三维成像, 近 10 年来, 发展出了一些光学显微成像新方法, 已经或有希望应用于哺乳动物全脑的神经网络成像研究中. 本文对上述方法进行了归纳和比较, 综述了各种成像技术在空间分辨率、探测范围、数据配准和成像速度等方面的性能表现及面临的挑战.

关键词 神经网络, 全脑, 高分辨, 成像, 三维, 光学显微镜

学科分类号 Q33, Q63

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00237

脑是人类和其他高等动物最重要也是最复杂的器官, 它包含数以亿计的神经细胞, 每个神经细胞又通过突触和突起(树突和轴突)与成百上千的神经细胞进行信息传递, 形成高度复杂的神经网络^[1]. 虽然早在 20 世纪 90 年代, 世界多国已将认识脑、保护脑和创造脑列为重大研究计划, 但时至今日, 人类对大脑的认识仍然很有限, 各种脑疾病

给社会带来的负担有增无减. 据世界卫生组织统计, 2006 年神经系统疾病及其后遗症就已经影响了多达十亿人口, 而且呈不断增长态势^[2].

正是由于脑和神经在结构上具有高度复杂性, 以及研究范围需要从微观到宏观(纳米至数厘米)(图 1), 因此对其研究包括了从分子(原子)、突触、突起、细胞、环路(回路)、脑区、系统等不同层

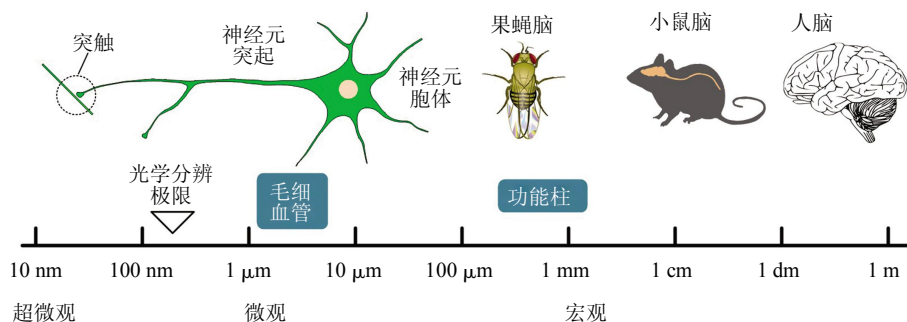


Fig. 1 The different size of the samples and units in brain imaging studies

图 1 脑成像中研究对象的尺度对比图

* 国家自然科学基金仪器专项(30727002, 81127002)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-87792033, E-mail: huigong@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2012-05-14, 接受日期: 2012-05-18

次. 研究层次的选择取决于所要研究的具体问题, 随着层次的深入, 研究对象的复杂程度将指数递增. 但是, 脑功能不是由单个神经元或单一脑区独立产生, 而是神经环路内的神经元集合、皮层柱或者局部脑区交互作用的结构, 即脑研究需要从不同层次水平上来进行^[1]. 目前, 人们只对仅有 302 个神经元的线虫(*C. elegans*)脑网络进行了较完整的研究^[4], 而对于拥有约 25 万个神经元的模式动物果蝇(*Drosophila*)的相关研究还刚刚起步^[5]. 相比之下, 研究高等哺乳动物拥有数以百亿计神经元的复杂脑网络, 对传统技术而言是极大的挑战.

传统技术无法解决突起水平分辨和全脑范围探测的矛盾. 在宏观水平, 磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)被视为脑成像的“金标准”, 但对厘米大小的组织样本只能实现 50 μm 的分辨能力, 磁场强度、梯度场强度、成像时间、线圈灵敏度等都是制约分辨率的客观因素^[6-7]. 目前, 已有一些小组开始用 MRI 研究大脑的细胞构筑和大脑白质纤维束^[8-9]. 在微观水平, 电子显微镜(electron microscope, EM)是显示脑组织精细结构的有力工具, 其分辨率可达到 1 nm^[10]. 但是, 电子显微镜难以进行全脑的探测, 据估算, 仅成像 1 mm³ 的样本就需 1 万人年工作量^[11]. 光学显微镜(light microscope)的分辨率介于 MRI 和 EM 之间, 几乎可以观察到所有的神经元突起, 而且适用于光

学成像的神经标记技术非常丰富, 对研究完整大脑的构筑和连接而言, 光学显微成像技术更具有可行性和普适性. 但是, 传统的宽场光学显微镜不具备三维层析能力, 又因组织对光吸收和散射的影响, 成像深度受到限制^[12].

为了解决高分辨率与大探测范围不可兼得的问题, 近 10 几年来发展出了一些新的光学显微成像方法, 他们采用了不同的思路去提高轴向分辨能力和拓展探测深度. 本文也将以此为主线, 结合数据配准和成像速度等指标, 对不同方法加以归纳和比较.

1 基于切片的显微成像

普通宽场显微镜在焦点前后都能形成清晰的像, 不能直接获得微米轴向分辨的层析图像, 而借助切片能有效地消除焦平面外的信号干扰, 如图 2 所示. 切片技术是组织学研究中常用的方法, 但传统切片技术存在以下不足: 对大块组织切片的厚度难以低于 10 μm ^[13-15]; 机械加工会带来数据配准和数据损失的问题^[16]; 对切片的收集、标记和成像需要大量人工操作. 美国 Allen 脑科学研究所投入 4100 万美元, 采用传统的组织切片方法, 用了 4 年时间开发了一套反映基因表达分布的脑图集, 其切片的间隔仅为 225 μm ^[17].

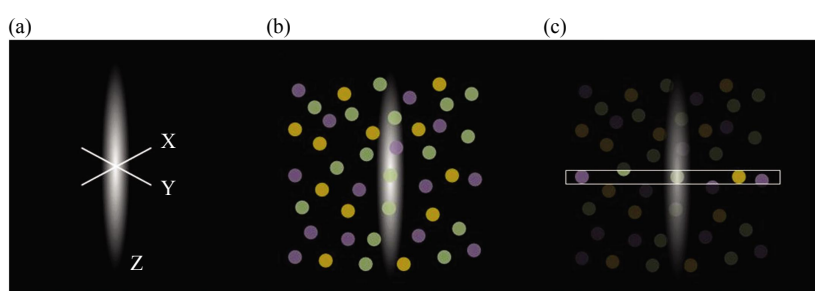


Fig. 2 Principle scheme of axial resolution improvement using mechanical slicing

图 2 通过切片改善轴向分辨率的原理图

(a)为显微镜的点扩散函数. (b)轴向分辨率由点扩展函数(PSF)决定. (c)轴向分辨率由切片厚度决定.

通过借鉴电镜样本制备中常用的树脂包埋和金刚石超薄切片技术, 能够有效地降低切片厚度到 0.1 μm 以下(远小于物镜景深), 直接决定了成像系统的轴向分辨率. 一些单位基于这个方法开发了自动化的超薄切片系统, 比如斯坦福大学的 ATomo(array tomography)和哈佛大学的 ATLUM(automatic

tape-collecting lathe ultramicrotome)^[18-19]. 它们都能够自动化地获得连续切片, 再利用半自动或自动的方法收集切片, 建立“切片库”用于显微成像. 这类方法的探测范围受到金刚石刀刃宽度的限制, 切片的变形所带来的数据配准问题也依然存在. 而且在整个过程中, 切片的装裱、标记、成像仍需大量

手工操作. 据统计, 即使是 ATomo, 若以 $1\ \mu\text{m}$ 精度获取小鼠全脑连续断层图像, 至少需要几年时间^[20].

另一类基于“边切片边成像”的数据采集成像方法可以很好地解决 ATomo 等问题, 包括华中科技大学的 MOST (micro-optical sectioning tomography) 和德克萨斯 A&M 大学的 KESM (knife-edge scanning microscopy)^[21-22]. “边切片边成像”指的是在切片的同时对新产生的样本薄片进行成像, 而不需要在收集和装裱切片后成像. 薄切片在脱离样本块表面的瞬间因水阻力和惯性将紧贴刀面滑行, 切片的运动状态和形态在未远离刀刃时十分稳定, 可直接进行成像. “切片时成像”的设计具有很多优点, 包括天然的数据配准 (inherent registration)、全自动化和厘米量级的探测范围. 与 KESM 相比, MOST 系统采用落射式照明等特殊设计, 系统结构更为简单、稳定和有效, 在国际上首次获取了突起水平完整小鼠全脑的断层数据集, 成像总耗时仅为 242 h, 体素分辨率达到了 $0.3\ \mu\text{m} \times 0.3\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, 在不需配准的情况下即可重建出连续的神元网络^[21].

虽然上述方法通过结合超薄切片技术可获得极高的轴向分辨率和成像深度, 但树脂包埋荧光标记大样本至今仍然是公认的难题, 限制了这类成像方法的应用范围^[23].

2 基于激光扫描显微镜

共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscopy) 是经典的三维成像技术, 它与双光子显微镜 (two-photon laser scanning microscopy) 都属于激光扫描显微镜^[24-25]. 这类技术只允许在焦平面上的组织有足够的能量激发荧光, 可直接获得微米水平的轴向分辨能力, 所以又被称为光切片显微镜 (optical sectioning microscopy)^[24]. 直接对样本块进行成像, 可以避免使用超薄切片时存在的问题, 如荧光标记组织的树脂包埋和数据配准问题. 激光扫描显微镜的主要问题是探测深度不足, 其中共聚焦显微镜的探测深度只有 $50\ \mu\text{m}$. 双光子显微镜因采用了穿透能力更强的红外光作为光源, 其成像深度可以达到 $500\sim 750\ \mu\text{m}$, 但实际只能在百微米深度范围内获得高质量图像^[12, 26].

光透明技术 (optical clearing of tissue) 是一种可提高光学显微镜探测深度的有效方法^[27]. 当组织透明化以后, 可减弱因光散射和光吸收对成像质量的影响, 显微镜的探测深度可成倍增加. 台湾清华大

学的江安世教授使用自创的透明剂配合共聚焦显微镜, 对果蝇的脑网络进行了系统性的研究^[5]. 2011年, *Nature Neuroscience* 杂志报道了对完整鼠脑进行透明化处理的新技术 sca/e, 将光透明剂的研究推向了一个新的高度^[28]. 但是, 组织的光透明是相对的, 对于整个大脑, 特别是较大个体成年动物的大脑进行光透明的难度依然存在^[29].

利用机械加工的方法反复去除已成像的表层组织, 可以无限拓展光学显微镜探测深度. 新西兰奥克兰大学将精密铣床和共聚焦显微镜相结合, 对几厘米大的心脏组织进行了精细的三维成像^[6]. 美国麻省理工学院利用超薄切片机加工琼脂包埋的心脏组织, 再利用双光子显微镜对加工面以下的浅层组织成像^[30]. 2012年, 美国 TissueVision 公司与一些研究单位合作建立了连续双光子断层成像系统 (serial two-photon tomography, STP), 宣称其能够对荧光蛋白标记的完整鼠脑进行快速的断层扫描成像, 但其所提供的数据还是间隔采样和不完整的^[23].

机械加工仍然会带来不同程度的组织形变, 为此, 美国加州大学圣迭戈分校尝试使用高功率脉冲激光来消融顶层脑组织, 称为全光学的组织学方法 (all optical histology, AOH)^[31]. 该方法每次可以消融 $100\sim 150\ \mu\text{m}$ 厚的表层组织, 所获断面的表面粗糙度达到 $1\ \mu\text{m}$ 左右, 与常用机械加工方法的精度相当. AOH 对成像对象的要求较低, 其对象甚至可以是颅腔内的新鲜脑组织. 但目前, AOH 仅获得了毫米大小的脑组织断层图像.

基于激光扫描显微镜的方法还存在一些共性的问题: 轴向分辨能力远差于横向分辨能力, 最好也只能达到 $1\ \mu\text{m}$ 左右; 由于采用点扫描方式, 成像速度受到限制; 常用的机械式扫描器缺乏长时间稳定工作的能力; 光漂白效应显著.

3 光切片照明类

光切片照明是另一种可产生轴向分辨的技术思路. 它利用柱透镜等整形器件将激发光压缩成只有微米厚度的“光切片”, 并从侧面射入样本, 而不是通常意义上的落射照明或透射照明. 这种照明方式的特殊性在于, 只有探测物镜焦平面上的组织被激发荧光, 降低了背景荧光对成像的干扰, 获得轴向分辨能力. 使用“光切片”照明方式的显微成像装置被称为光切片显微镜 (light-sheet microscopy), 它们通常只能对透明的样品成像^[32].

对于较小的生物样本, 特别是早期的胚胎组

织, 其自身具有透明的特性, 成为光切片显微镜最早的应用领域. 2004 年, 德国 EMBL 实验室开发了 SPIM 系统, 可以对青鳉胚胎和果蝇胚胎实现快速的三维成像^[33]. 2009 年, EMBL 实验室又开发了更加强大的 DSLM 系统, 能够以 $1\ \mu\text{m}$ 的光学切片厚度对斑马鱼胚胎发育过程实现高分辨的动态记录^[34]. 因为使用光切片照明, SPIM 和 DSLM 均降低了对生物样品造成的光损伤, 使样品组织可继续生长发育, 使之相对于其他技术具有明显优势^[35].

对较大的不透明生物样本, 光切片照明技术也有应用. 结合了光透明技术, 德国的马克斯普朗克研究所开发的超级显微镜技术(ultramicroscopy, UM)成功地实现了完整鼠脑、昆虫和胚胎的三维荧光成像^[29]. 当成像对象较小、成像位置较浅时, 如果蝇脑或局部的脑组织, UM 可以获得 $0.5\ \mu\text{m}$ 的横向分辨能力和 $2\ \mu\text{m}$ 的轴向分辨能力. 但当成像对象为完整的小鼠脑时, UM 必须使用低数值孔径的物镜来获得足够的成像范围, 空间分辨率只能达到 $10\ \mu\text{m}$. 此外, UM 的轴向分辨率在同一深度下分布不均匀, 而且分辨率会沿深度方向退化^[36].

光切片照明类成像技术可以方便地在探测范围和探测精度间做出权衡, 甚至可以牺牲上述两项指标以换取极高的时间分辨率. 由于高数值孔径和大工作距离的物镜难以获得, 以及组织透明技术的限制, 这类技术对完整鼠脑进行成像时, 暂时无法获得较高的空间分辨能力.

4 计算机三维重建类

另一些方法不再关注如何阻止焦平面外的光线进入探测器, 而是自然地、直接将物镜收集到的荧光信号采集, 再通过计算机对采集数据进行重建, 同样可以获得可观的轴向分辨能力. 这些技术虽然尚未用于完整脑的高分辨成像, 但潜力巨大.

反卷积三维显微术是研究得最早, 并已商业化的成熟技术. 它将荧光显微镜定义为线性和无偏移的数学模型, 在已知成像系统的点扩散函数(point spread function, PSF)的前提下, 通过反卷积运算消除焦平面外的杂散光干扰^[37]. 国内的研究人员早已利用这种技术研究了活体细胞中分泌囊泡的三维空间分布^[38]. 反卷积技术相对于共聚焦显微镜的优势在于使用了低强度激发光, 降低了光漂白效应. 但反卷积技术对背景荧光较强, 信号较密集样本的成像效果并不好, 而且会耗费大量的时间用于数据后处理.

结构光照明显微术(structured illuminated microscopy)是在 1997 年由 Neil 等^[39]提出. 它通过给传统荧光显微镜加上结构光调制器, 在同一个成像位置获得多个不同相位的结构光照明图像, 再利用软件重建出仅含焦平面荧光信号的断层图像. 结构光照明技术可获得能与共聚焦显微镜媲美的轴向分辨率和显著的速度提升, 而相比反卷积技术, 它又能避免大量繁琐的计算. 2005 年新西兰奥克兰大学开发了一套结构光显微镜(structured light microscopy, SLM), 尝试对小鼠的肺脏进行了完整的三维结构成像, 但未展示成像结果^[40].

光学投影层析成像(optical projection tomography)是一种成像原理类似于 X 射线计算机断层成像(X-ray computed tomography, XCT)的荧光断层成像技术, 自 2000 年诞生以来发展迅速^[41-43]. OPT 从侧面获得旋转样本的一系列投影图像, 再根据 Radon 变换重建出断层图像, 可以对 $1\sim 10\ \text{mm}$ 尺寸的透明样本成像, 这几乎就是小鼠大脑的尺度范围. 但 OPT 的三维空间分辨率仅为 $5\sim 10\ \mu\text{m}$, 将来有可能应用于全脑显微成像.

5 总结与展望

上文列举了 4 类光学显微成像方法, 它们已经应用或有希望应用在全脑水平的高分辨成像中. 表 1 对其中的代表性方法进行了比较.

本文重点讨论的是光学显微成像方法, 而 MRI 和 X-CT 等宏观成像技术也在不断向微观, 甚至是超微观方向发展, 值得关注. 其中, IBM 与斯坦福大学合作开发了一种 MRI 技术, 其空间分辨率达到纳米量级, 它使得 MRI 可以用于分子生物学与纳米科学领域^[44]. Xradia 公司利用其独有的 X 射线聚焦和探测技术, 开发了具有微米分辨的 MicroCT 系统和纳米分辨的 NanoCT 系统, 并成功对亚细胞结构进行了成像^[45].

光学显微镜的分辨能力有限, 为了获得更为微观的信息(如突触连接), 出现了一些可以结合电子显微镜的脑数据集获取技术, 包括前文介绍的 ATomo 和 ATLUM, 还有直接对切面进行成像的 SBF-SEM(serial block-face scanning electron microscopy)^[46]. 虽然电子显微镜被认为是人类连接组计划的重要研究方法, 但是目前具体实施的难度还非常大^[47]. 值得一提的是, 在一些 $> 10\ \text{nm}$ 的微结构成像应用中, 已经可以使用超分辨荧光显微镜(super-resolution fluorescence microscopy)来代替 EM^[48].

Table 1 Micro-optical methods for whole brain imaging

表 1 用于全脑成像的显微光学方法

数据获取方法	成像对象	分辨率 / μm^3		样本尺寸 ²⁾	数据配准	自动化程度	成像方法	是否已获取全脑数据集
		横向	轴向					
Allen 图谱获取方法 ^[17]	切片	0.2	40	全脑	否	手动	明场 / 荧光	是
ATomo ^[18]	切片	0.2	0.05	脑块	否	半自动	明场 / 荧光 / 电镜	否
MOST ^[21]	切片	0.5	0.5~1	全脑	是	自动	明场	是
TPTC ^[30]	包埋块	0.3	0.6	> 6 mm(心脏)	是	自动	荧光	否
STP ^[23]	包埋块	0.2	> 50	全脑	是	自动	荧光	是
AOH ^[31]	包埋块 / 组织块	0.3	1	脑块	是	自动	荧光	否
SPIM ^[33]	组织块	1	6	~1 mm(胚胎)	是	自动	荧光	否
UM ^[29]	透明组织	10	> 10	全脑	是	自动	荧光	是
SIM ^[40]	包埋块	1	10	> 10 mm(肺)	是	自动	明场 / 荧光	否
OPT ^[42]	透明组织	5~10	5~10	1~10 mm	是	自动	明场 / 荧光	否

¹⁾这里的空间分辨率指的是该方法所能得到的最高分辨率。当分辨率随成像对象的尺寸变化时，特指对完整小鼠大脑成像时的分辨率。

轴向分辨率指的是切片的厚度、“切片光”的厚度、象元的轴向尺寸，或实际测得的分辨率。²⁾当该方法可以对全脑进行数据采集，样本尺寸标为“全脑”；当仅适用于毫米尺寸的脑组织时，标记为“脑块”；当还未应用于脑成像时，标记为适用的样本尺寸范围。

综上所述，完整大脑的显微水平成像是一个知识挖掘的过程，成像的分辨率越高、神经元标记的方法越多样、成像模式越多，获得的知识也就越多，实现的过程也就越困难。任何单一的方法获取的脑图像都具有一定的片面性，适用的范围也非常有限，因此需要各种技术彼此互补。目前，基于光学成像的方法最为成熟，特别是在传统组织学方法上发展的切片成像技术，比如华中科技大学的MOST系统，他们已率先获得一系列高分辨率的完整大脑解剖数据集，并不断地丰富拓展。数据集获取之后的另一个难题将是如何对海量的图像进行处理、分析和可视化，使得这些成果能够真正有益于神经元网络的构建和脑功能与疾病的探究中^[49]。

参 考 文 献

- [1] Kandel E R. Nerve Cells and Behavior // Kandel E R, Schwartz J H, Jessell T M. Principles of Neural Science. 4th. New York: McGraw-Hill, 2000
- [2] World Health Organization. Neurological disorders: public health challenges. Geneva: World Health Organization, 2006
- [3] Bohland J W, Wu C, Barbas H, *et al.* A proposal for a coordinated effort for the determination of brainwide neuroanatomical connectivity in model organisms at a mesoscopic scale. PLoS Comput Biol, 2009, **5**(3): e1000334
- [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 Lond B Biol Sci, 1986, **314**(1165): 1-340
- [5] Chiang A S, Lin C Y, Chuang C C, *et al.* Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in *Drosophila* at single-cell resolution. Curr Biol, 2011, **21**(1): 1-11
- [6] Aggarwal M, Zhang J, Miller M I, *et al.* Magnetic resonance imaging and micro-computed tomography combined atlas of developing and adult mouse brains for stereotaxic surgery. Neuroscience, 2009, **162**(4): 1339-1350
- [7] Dorr A E, Lerch J P, Spring S, *et al.* High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. Neuroimage, 2008, **42**(1): 60-69
- [8] Hagmann P, Kurrant M, Gigandet X, *et al.* Mapping human whole-brain structural networks with diffusion MRI. PLoS One. 2007, **2**(7): e597
- [9] Roebroeck A, Galuske R, Formisano E, *et al.* High-resolution diffusion tensor imaging and tractography of the human optic chiasm at 9.4 T. Neuroimage, 2008, **39**(1): 157-168
- [10] Sosinsky G E, Giepmans B N G, Deerinck T J, *et al.* Markers for correlated light and electron microscopy. Method Cell Biol, 2007, **79**: 575-591
- [11] Luo L, Callaway E M, Svoboda K. Genetic dissection of neural circuits. Neuron, 2008, **57**(5): 634-660
- [12] Ntziachristos V. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. Nat Methods, 2010, **7**(8): 12
- [13] Gibb R, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. J Neurosci Methods. 1998, **79**(1): 1-4
- [14] MacKenzie-Graham A, Jones E S, Shattuck D W, *et al.* The informatics of a C57BL/6J mouse brain atlas. Neuroinformatics, 2003, **1**(4): 397-410

- [15] Sidman R L, Angevine J B, Pierce E T. Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord. Cambridge, Mass: Harvard University Press, 1971
- [16] Gerneke D A, Sands G B, Ganesalingam R, *et al.* Surface imaging microscopy using an ultramiller for large volume 3D reconstruction of wax- and resin-embedded tissues. *Microsc Res Techniq*, 2007, **70**(10): 886–894
- [17] Lein E S, Hawrylycz M J, Ao N, *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 2007, **445**(7124):168–176
- [18] Micheva K D, Smith S J. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron*, 2007, **55**(1): 25–36
- [19] Hayworth K J, Kasthuri N, Schalek R, *et al.* Automating the collection of ultrathin serial sections for large volume TEM reconstructions. *Microsc Microanal*, 2006, **12**: 86–87
- [20] Smith S J. Circuit reconstruction tools today. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, **17**(5): 601–608
- [21] 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**(6009): 1404–1408
- [22] Mayerich D, Abbott L, McCormick B. Knife-edge scanning microscopy for imaging and reconstruction of three-dimensional anatomical structures of the mouse brain. *J Microsc*, 2008, **231**(Pt 1): 134–143
- [23] Ragan T, Kadiri L R, Venkataraju K U, *et al.* Serial two-photon tomography for automated *ex vivo* mouse brain imaging. *Nat Methods*, 2012, **9**(3): 255–258
- [24] Conchello J A, Lichtman J W. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*, 2005, **2**(12): 920–931
- [25] Wilt B A, Burns L D, Wei Ho E T, *et al.* Advances in light microscopy for neuroscience. *Annu Rev Neurosci*, 2009, **32**: 435–506
- [26] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2005, **2**(12): 932–940
- [27] Tuchin V V. Optical clearing of tissues and blood using the immersion method. *J Phys D Appl Phys*. 2005, **38**(15): 2497–2518
- [28] Hama H, Kurokawa H, Kawano H, *et al.* Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, 2011, **14**(11): 1481–1488
- [29] Dodt H U, Leischner U, Schierloh A, *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*, 2007, **4**(4): 331–336
- [30] Ragan T, Sylvan J D, Kim K H, *et al.* High-resolution whole organ imaging using two-photon tissue cytometry. *J Biomed Opt*, 2007, **12**(1): 014015
- [31] Tsai P S, Friedman B, Ifarraguerri A I, *et al.* All-optical histology using ultrashort laser pulses. *Neuron*, 2003, **39**(1): 27–41
- [32] Reynaud E G, Krzic U, Greger K, *et al.* Light sheet-based fluorescence microscopy: more dimensions, more photons, and less photodamage. *Hfsp J*, 2008, **2**(5): 266–275
- [33] Huisken J, Swoger J, Del Bene F, *et al.* Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 2004, **305**(5686): 1007–1009
- [34] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, *et al.* Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science*, 2008, **322**(5904): 1065–1069
- [35] Keller P J, Dodt H U. Light sheet microscopy of living or cleared specimens. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, **22**(1): 138–143
- [36] Kalchmair S, Jahrling N, Becker K, *et al.* Image contrast enhancement in confocal ultramicroscopy. *Opt Lett*, 2010, **35**(1): 79–81
- [37] Wallace W, Schaefer L H, Swedlow J R. A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy. *Biotechniques*, 2001, **31**(5): 1076–1078, 1080, 1082 *passim*
- [38] Li D D, Guo X B, Qu A L, *et al.* Use of three-dimensional fluorescence deconvolution microscopy for study of spatial distribution of secretory vesicles in living cells. *Acta biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, **35**(7): 671–676
- [39] Neil M A A, Juskaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Opt Lett*, 1997, **22**(24): 1905–1907
- [40] Kvistedal Y, Tawhai M, Hunter P, *et al.* High resolution 3D imaging of lung tissue using structured light microscopy. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2005, **1**: 193–195
- [41] Hindle F, McCann H, Ozanyan K B. First demonstration of optical fluorescence auto-projection tomography. *Chem Eng J*, 2000, **77**(1–2): 127–135
- [42] Sharpe J, Ahlgren U, Perry P, *et al.* Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science*, 2002, **296**(5567): 541–545
- [43] Sharpe J. Optical projection tomography. *Annu Rev Biomed Eng*, 2004, **6**: 209–228
- [44] Degen C L, Poggio M, Mamin H J, *et al.* Nanoscale magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(5): 1313–1317
- [45] Attwood D. Microscopy: nanotomography comes of age. *Nature*, 2006, **442**(7103): 642–643
- [46] Denk W, Horstmann H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol*, 2004, **2**(11): e329
- [47] Eisenstein M. Neural circuits: Putting neurons on the map. *Nature*, 2009, **461**(7267): 1149–1152
- [48] Huang B. Super-resolution optical microscopy: multiple choices. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, **14**(1): 10–14
- [49] Helmstaedter M, Mitra P P. Computational methods and challenges for large-scale circuit mapping. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, **22**(1): 162–169

Progress on Whole Brain Imaging Methods at The Level of Optical Microscopy*

LI An-An¹⁾, GONG Hui^{1,2)**}

¹⁾ Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Huazhong University of Science and Technology-Wuhan
National Laboratory for Optoelectronics, Wuhan 430074, China;

²⁾ MOE Key Laboratory for Biomedical Photonics, Department of Biomedical Engineering,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract One of the basic goals of modern neuroscience is to study the brain-wide complex neural network of mammals' brain. Because of the technological limitations, the traditional tools can only study the local circuits of the higher animals or the small brain network of the lower animals. Here we review recent efforts to resolve the contradiction between large specimen and high-resolution, and some of them have been applied to image the neural network in mammals' whole brain. We focus on some technology index includes spatial resolution, detection range, data registration and throughput, and also discuss the challenges of the emerging methods.

Key words neuronal network, whole brain, high-resolution, imaging, three-dimensional, optical microscopy

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00237

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30727002, 81127002).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87792033, E-mail: huigong@mail.hust.edu.cn

Received: May 14, 2012 Accepted: May 18, 2012