

斑马鱼幼鱼光暗偏好的特性与相关基因 及神经环路研究

完成人
拜亦名

指导小组成员

郭苏 教授

目 录

摘要	1
Abstract	2
一、前 言	3
1.1 研究背景	3
1.1.1 斑马鱼的光暗偏好行为学模型	3
1.1.2 视黑质蛋白与光暗偏好行为	3
1.1.3 产生促肾上腺皮质激素释放激素神经元在光暗偏好中可能起调 节作用	3
1.1.4 长期不可预测随机刺激对光暗偏好的影响	4
1.1.5 声音作为短期压力刺激对斑马鱼幼鱼的影响	4
1.2 研究意义与思路	5
二、材料与方法	7
2.1 实验动物	7
2.1.1 斑马鱼 AB 野生型品系	7
2.1.2 斑马鱼 CRH-GFF:UAS-NTRmcherry 转基因品系	7
2.1.3 斑马鱼 <i>Opn4a</i> 基因纯合突变品系	7
2.2 实验试剂	7
2.3 实验仪器	9
2.3.1 斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试装置	9

2.3.2 荧光显微镜	10
2.3.3 压力刺激相关仪器	10
2.4 实验软件	11
2.5 实验方法	11
2.5.1 斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试	11
2.5.2 Cortisol Assay	12
2.5.3 BCA Protein Assay	13
2.5.4 压力刺激方法	13
2.5.5 药理学实验方法	16
2.5.6 CRH-producing neurons 损毁方法(MTZ/NTR 系统特异性细胞损伤)	16
2.5.7 斑马鱼养殖方法	16
三、研究结果	17
3.1 <i>Opn4a</i> 纯合突变对斑马鱼幼鱼光暗偏好行为的影响	17
3.2 产 CRH 神经细胞与斑马鱼幼鱼面对压力刺激时的光暗偏好行为变化相 关	18
3.3 长期不可预测随机刺激(Chronic Unpredictable Stress, CUS)对斑马鱼光 暗偏好的影响	19
3.4 不同强度的短期热刺激对斑马鱼幼鱼光暗偏好以及皮质醇水平的影响	21
3.5 声音刺激对斑马鱼幼鱼光暗偏好的影响	22
3.6 药理学验证斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型与压力、焦虑的相关	

性	25
四、讨 论	27
参考文献	29
致谢	31

摘 要

斑马鱼对于光暗有着偏好，幼鱼趋光而成鱼趋暗。斑马鱼的光暗偏好被认为与焦虑相关，是一个颇有潜力的行为学测试模型。斑马鱼幼鱼具有简单、透明的大脑，且体型小，易操作，成本低，可适用于高通量筛选。所以在斑马鱼幼鱼中建立和完善光暗偏好这一行为学模型具有相当高的应用价值。为了探究斑马鱼幼鱼光暗偏好行为背后的基因及神经环路调控机制，并研究斑马鱼幼鱼光暗偏好行为与压力以及焦虑之间的关系，本研究运用自行搭建的斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试装置，和不同的压力刺激方式，对斑马鱼 AB 野生型、*Opn4a* 基因纯合突变品系以及 CRH-NTR 转基因品系进行行为学和生理学实验。实验证明了除 *Opn4a* 需要改良实验进行进一步研究外，产 CRH 神经细胞在斑马鱼幼鱼光暗偏好中确实起重要作用；长期不可预测随机刺激和声音刺激均能引起斑马鱼幼鱼光暗偏好行为的改变；不同强度的压力刺激均能引起光暗偏好行为的显著变化。最后通过药理学实验，运用抗焦虑药物，实验验证了斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型和压力以及焦虑之间的关联性。斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型的验证和建立，标志着一种利用行为学变化的新的基因筛选和药物筛选的方法的诞生，该模型作为一种焦虑模型具有广泛而巨大的应用潜力。

关键词：

光暗偏好，行为学模型，压力，焦虑

Abstract

Zebrafish have innate light/dark preference. Larval zebrafish prefer light, while adults prefer dark environment. The light/dark preference in adult zebrafish is widely considered to be anxiety-associated, and has been used as a behavioral test model. Larval zebrafish have a simple and transparent brain, and possess the advantages of small body, easy manipulation and low cost, which are suitable for high-throughput screening. There is enormous application prospect to establish and develop the light/dark preference behavioral test model in larval zebrafish. To study the regulatory mechanisms of genes and neuronal circuits underlying the light/dark preference in larval zebrafish, behavioral and physiological experiments were conducted on zebrafish AB-Wild Type line, *Opn4a* homologous mutant line and CRH-NTR transgenic line, with the newly-established light/dark preference behavioral test set-up for larval zebrafish, and various stress treatment methods. While the role of *Opn4a* is not clear and more experiments are required, our findings showed that CRH-producing neurons do play an important role in light/dark preference in larval zebrafish; chronic unpredictable stress and sound stimulus both significantly increased dark avoidance; heat stress with different intensities also significantly enhanced dark avoidance. In the pharmacological experiment, anxiolytic drugs were used and the results suggest that the light/dark preference behavioral test model in larval zebrafish is related to stress and anxiety. The establishment and validation of the light/dark preference behavioral test model in larval zebrafish signifies the birth of a new kind of gene or drug screening method according to behavioral changes. The light/dark preference in larval zebrafish has a high potential to help elucidate the cellular and molecular mechanisms of anxiety and provide potential leads for novel and more efficacious therapeutics.

Keywords,

Light/dark preference, Behavioral model, Stress, Anxiety

一、前言

1.1 研究背景

1.1.1 斑马鱼的光暗偏好行为学模型

斑马鱼是一种具有光暗偏好(Light/Dark Preference, or scototaxis)的动物^[1-13]，成鱼生性趋暗避光^[1, 4, 8]，而幼鱼生性趋光避暗^[2, 11-13]，在斑马鱼发育过程中存在着光暗偏好逆转的现象。在诸多报道中均指出，斑马鱼的光暗偏好行为与恐惧或焦虑情绪有关，斑马鱼成鱼若呈现更显著的避光行为，或斑马鱼幼鱼呈现更显著的趋光行为，则被认为是存在上升的焦虑水平。运用促焦虑药物或抗焦虑药物均可影响斑马鱼成鱼和幼鱼的光暗偏好程度。^[1-4, 7-12] 在小鼠中，明暗箱是一种评估小鼠焦虑样行为的经典行为学测试模型，相类似的，在近些年，光暗偏好测试也逐渐运用在了斑马鱼中，用于评估斑马鱼的焦虑样行为。^[1-4, 7-12] 该行为学模型目前较多用在斑马鱼成鱼上，而在斑马鱼幼鱼中的应用并不多，且斑马鱼幼鱼的光暗偏好测试尚不成熟，缺乏足够的理论基础与应用基础。斑马鱼幼鱼具有简单、透明的大脑，且体型小，易操作，成本低，适用于高通量筛选。所以在斑马鱼幼鱼中建立和完善光暗偏好这一行为学模型具有相当高的应用价值。

1.1.2 视黑质蛋白与光暗偏好行为

视黑质蛋白(melanopsin)是一种存在于自感光视网膜神经节细胞(intrinsic photosensitive retinal ganglion cells, ipRGCs)中的视蛋白，目前在小鼠的研究中发现与光节律、瞳孔反射、视觉成像、情绪和避光行为相关。^[14-16] 视黑质蛋白在小鼠和人类中由 *Opn4* 编码^[14, 16]，而在斑马鱼中则由 *Opn4.1*、*Opn4a*、*Opn4b*、*Opn4xa*、*Opn4xb* 编码五种视黑质蛋白。其中 *Opn4a* 与小鼠的 *Opn4* 的氨基酸相似度超过 80%^[15]。视黑质蛋白同时与光暗偏好以及情绪密切相关，所以其在斑马鱼幼鱼的光暗偏好行为中可能存在着重要的作用。

1.1.3 产生促肾上腺皮质激素释放激素神经元在光暗偏好中可能起调节作用

促肾上腺皮质激素释放因子(Corticotropin-releasing factor, CRF)，或称促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin-releasing hormone, CRH)，是动物面对压力刺激时由下丘脑释放的一种激素，激活下丘脑-垂体-肾上腺轴

(Hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA axis),使肾上腺释放皮质醇,从而调节机体应对压力刺激,调控恐惧和焦虑情绪。在小鼠中,长期压力刺激会通过中央杏仁核影响 CRH 释放。位于下丘脑室旁核的产生 CRH 的神经元(CRH-producing neurons, or CRF-producing neurons)能够通过产生 CRH 来调节 HPA 轴从而调节压力相关的生理和行为。^[17-20] 有研究指出,单个 CRH cell 的反应大小与压力强度共变化,且随着压力强度的加大,会有更多之前未激活的 CRH neurons 被激活招募,从而引起更强的压力反应(包括生理与行为)。^[21] CRH 与压力相关行为之间存在强关联性,所以 CRH neurons 很有可能在斑马鱼幼鱼的光暗偏好行为背后起着关键作用。在前一阶段研究中我们发现,给予斑马鱼幼鱼不同的短期压力刺激后,部分压力刺激(热刺激、冷刺激以及紫外光照射)能够显著加强斑马鱼幼鱼的避暗趋光行为,而部分压力刺激(冷刺激、紫外光照射以及机械扰动)能够显著提高斑马鱼幼鱼的皮质醇水平。其中热刺激只能产生行为学变化,不能产生生理学变化;机械扰动只能产生生理学变化,不能产生行为学变化;冷刺激和紫外光照射能同时引起两者变化;短期社会隔离作为一种压力刺激不能引起任何一种变化。生理学变化与行为学变化既有交叉性,也有不一致性。我们猜测可能 CRH-producing neurons 支配的下游在调节生理和行为上存在分工,从而在不同压力强度下,能引起的生理学反应和行为学反应不同,导致会有两者反应的不一致性。

1.1.4 长期不可预测随机刺激对光暗偏好的影响

长期压力刺激(Chronic Stress),尤其是长期不可预测随机刺激(Chronic Unpredictable Stress, CUS),若施加于斑马鱼幼鱼发育阶段,将会产生长期的大脑形态改变,乃至认知和情绪行为改变。^[22] 有研究指出 CUS 能提高幼鱼的焦虑水平,提高 CRF 释放以及皮质醇水平,影响光暗偏好的逆转。^[23, 24] 在前一阶段的研究中我们同样进行了相关实验,并初步观察到了 CUS 对光暗偏好逆转的阻碍,在本项研究中将进一步对该结论进行验证。

1.1.5 声音作为短期压力刺激对斑马鱼幼鱼的影响

声音刺激(acoustic stimulus)会引起斑马鱼的惊吓反应。^[25-30] 5dpf (days post

fertilization, dpf)左右的斑马鱼幼鱼在受到声音刺激后会产生一种称为短延时 C 形启动(short-latency C-start, SLC)的行为,这一行为反应模式会保持到成年。有研究指出,过于频繁(即给予刺激间隔过小)的声音刺激会使斑马鱼对刺激产生适应,从而不会产生 SLC。^[27, 29] 所以若要试图通过声音刺激来使斑马鱼产生焦虑样情绪,刺激强度应在反应阈之上,同时刺激间隔不应过小。考虑到行为学摄影的要求,强度不应太大而引起水面晃动。^[25-30] 声音刺激是否会引起斑马鱼幼鱼产生焦虑情绪,或者影响光暗偏好,目前尚未得到充分的研究。我将在考虑诸多因素的前提下,探索适用于光暗偏好行为学实验的声音刺激方式。

1.2 研究意义与思路

斑马鱼对于光暗有着偏好,幼鱼趋光而成鱼趋暗。斑马鱼的光暗偏好被认为与焦虑相关,是一个颇有潜力的行为学测试模型。斑马鱼幼鱼具有简单、透明的大脑,且体型小,易操作,成本低,可适用于高通量筛选。所以在斑马鱼幼鱼中建立和完善光暗偏好这一行为学模型具有相当高的应用价值。

在前一阶段的研究中,我们搭建了一套测试斑马鱼幼鱼光暗偏好的装置,并给予斑马鱼幼鱼不同的短期压力刺激,发现部分压力刺激(热刺激、冷刺激以及紫外光照射)能够显著加强斑马鱼幼鱼的避暗趋光行为,而部分压力刺激(冷刺激、紫外光照射以及机械扰动)能够显著提高斑马鱼幼鱼的皮质醇水平。其中热刺激只能产生行为学变化,不能产生生理学变化;机械扰动只能产生生理学变化,不能产生行为学变化;冷刺激和紫外光照射能同时引起两者变化;短期社会隔离作为一种压力刺激不能引起任何一种变化。生理学变化与行为学变化既有交叉性,也有不一致性。这些结果说明光暗偏好行为与皮质醇水平调控之间存在关联性,而在面对压力刺激时,光暗偏好这一行为背后存在着未知的神经环路调控机制。本研究在前一阶段研究的基础上,针对斑马鱼发育过程中幼鱼趋光到成鱼趋暗的逆转现象,与感光性和情绪调节均相关的自感光视网膜神经节细胞(ipRGCs)中存在的视黑质蛋白编码基因之一 *Opn4a*, 与皮质醇水平密切相关的 CRF-producing neurons 进行研究,试图进一步揭示斑马鱼幼鱼光暗偏好行为背后的大脑调控机制,并加入了声音刺激作为短期压力刺激的一种来测试是否会影响光暗偏好,最后通过药理学实验试图初步建立斑马鱼幼鱼光暗偏好行为与焦虑之间的联系,从

而完善斑马鱼幼鱼光暗偏好模型的理论基础与应用基础。

该模型的完善与成熟，以及相关机制的阐明，将对于焦虑等情绪疾病的药物高通量筛选方法、焦虑样行为的研究等具有积极推动作用，并对动物行为背后大脑调节机制的研究具有参考意义。不同的感觉输入是如何被动物大脑整合处理，并最终体现在行为以及生理改变上的，对于这一问题的解答，本项研究将会是具有价值的一步。

二、材料与方法

2.1 实验动物

2.1.1 斑马鱼 AB 野生型品系

在本研究中使用的斑马鱼野生型为 AB 品系，养殖于美国加利福尼亚大学旧金山分校(University of California, San Francisco, California, U.S.A)郭苏教授实验室，养殖过程符合美国实验动物使用与管理委员会(The Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)规定。鱼卵在斑马鱼配种的第二日早晨 10:00-11:30 收集，收集鱼卵当天计为受精后第 0 天(0 days post fertilization, 0dpf)。在 0dpf 至 2dpf 期间，斑马鱼胚胎需处于 28 摄氏度培养箱环境中，并在 3dpf 时从培养箱中取出，开始适应养鱼房自动调节的正常光照周期。从 7dpf 开始，给斑马鱼幼鱼喂食适量草履虫(paramecium)。

2.1.2 斑马鱼 CRH-GFF:UAS-NTRmcherry 转基因品系

斑马鱼 CRH-GFF: UAS-NTRmcherry 转基因品系在斑马鱼 CRH-producing neurons 中特异性表达硝基还原酶(NTR)和 mcherry 荧光蛋白，可通过荧光显微镜筛选得到 mcherry 阳性的鱼，然后将 mcherry 阳性的斑马鱼置于一定浓度的甲硝哒唑(metronidazole, MTZ)溶液中。硝基还原酶在被 NADH 或 NADPH 还原后可与 MTZ 结合，使原本无毒的 MTZ 转变为细胞毒性物质，从而特异性损毁表达 NTR 的细胞（即损毁 CRH-producing neurons）。

2.1.3 斑马鱼 *Opn4a* 基因纯合突变品系

与苏州大学王晗教授实验室合作，获取了斑马鱼 *Opn4a* 基因纯合突变品系。该品系是苏州大学王晗教授实验室在斑马鱼 AB 野生型中经由 CRISPR 基因敲除技术敲除 *Opn4a* 基因得到的纯合突变品系，对研究由 *Opn* 基因编码的视黑质蛋白的功能具有重要意义。

2.2 实验试剂

2.2.1 MS-222

MS-222，化学名称为间氨基苯甲酸乙酯，又名三卡因(Tricaine)，常用实验用鱼麻醉剂。Tricaine powder 来自 Sigma，400mg 溶于 97.9mL 水中，2.1mL Tris-Cl 调整 pH 至 7.0

2.2.2 Blue Egg Water (BEW)

Blue Egg Water 用于斑马鱼鱼卵养殖。

CaSO ₄	0.12g
Instant Ocean Salts(from Aquatic Eco-systems)	0.2g
Methylene blue	30ul /1L H ₂ O

2.2.3 1%DMSO 溶液

DMSO	1mL
Blue Egg Water	99mL

2.2.4 Metronidazole(MTZ)溶液(4.5mM)

Metronidazole	92.4mg
DMSO	1mL
Blue Egg Water	119mL

2.2.5 Chlordiazepoxide 溶液(100uM)

氯氮卓(Chlordiazepoxide)，抗焦虑药物。

Chlordiazepoxide	13.4mg
Blue Egg Water	400mL

2.2.6 Buspirone 溶液(72uM)

丁螺环酮(Buspirone)，抗焦虑药物。

Buspirone	12.2mg
Blue Egg Water	400mL

2.2.7 PBS(磷酸盐缓冲液)

137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 用 HCl 调节 pH 至 7.4。

2.2.8 Cortisol EIA kit (Cayman CHEMICAL)

皮质醇 EIA 试剂盒购自 Cayman CHEMICAL。-80 摄氏度储存。

2.2.9 BCA Protein Assay Kit (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo SIENTIFIC)

BCA 蛋白含量测试试剂盒为 Pierce® BCA Protein Assay Kit，购自 Thermo SIENTIFIC。除了标准液储存于 4 摄氏度冰箱外，其余试剂常温避光保存。

2.3 实验仪器

2.3.1 斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试装置

两个白炽台灯；

一个灯箱(STRATAGENE)；

黑白条纹板：由可透红外光的丙烯塑料制成，ACRYLITE IR acrylic 11460；
两个正方形的光暗偏好测试盒：由四个独立的正方形容器紧密拼接而成，每个正方形容器大小为长 4cm x 宽 4cm x 高 1.5cm，每个容器两侧分别贴有不透光的白色和黑色胶带。由于幼鱼贴近容器壁时难以被追踪软件识别，所以每个容器四周都放置了由可透红外光线的丙烯塑料制成的 Insert 挡板，从而阻止幼鱼贴近容器壁。Insert 是通过 CorelDraw 平面设计软件设计，并由激光切割器(Universal Laser Systems VersaLaser 3.50)切割制造而成的；
两台被三角支架分别固定于两个光暗偏好测试盒正上方的红外摄像机(Panasonic CCTV camera Model No.WV-BP334)。

两个白炽台灯分别放置于装置两侧，为整个装置提供弥散光。
黑白条纹板粘贴在灯箱上，于黑白条纹板上放置两个光暗偏好测试盒，调整位置，使两个光暗偏好测试盒中的共八个正方形容器均被平分为光、暗两个区域。
红外摄像机用三角支架固定在光暗偏好测试盒正上方，调整好焦距与亮度，每台红外摄像机负责录制一个光暗偏好测试盒(每个光暗偏好测试盒有四个正方形容器，每个容器内放一条幼鱼，共四条)。
每个正方形容器内放 10mL Blue Egg Water，水深控制在 5mm，从而尽量让鱼作水平移动而非上下移动，便于行为学观察。

2.3.2 荧光显微镜(Leica MZFLIII)

2.3.3 压力刺激相关仪器

2.3.3.1 热刺激(Heat Stimulus, HS)

两个水浴锅：一个控制温度在 33 摄氏度，一个控制温度在 50 摄氏度；
水银温度计

2.3.3.2 机械扰动(Mechanical Disturbance, MD)

两台磁力搅拌仪：VWR-Hotplate/Stirrer 和 CORNING STIRRER/Hotplate；
两个小型搅拌子(mini stir-bar)

2.3.3.3 声音刺激(Sound Stimulus, SS)

两台小型音箱(speaker)及 PC 连接线;

笔记本电脑(安装有 Matlab 2012b)。

2.3.3.4 紫外光照射(UV light, UV)

紫外灯(SPECTROLINE MODEL ENF-280C): 波长与强度设定为 365nm,
1.9-2.0mW。

2.3.3.5 冷刺激(Cold Stimulus)

塑料冰桶;

50mL 塑料管;

水银温度计。

2.4 实验软件

2.4.1 动物行为追踪分析软件

Noldus Ethovision XT 5.0

2.4.2 视频录制软件

Noldus MPEG Recorder 2.1

2.4.3 数据统计分析软件

Graphpad Prism 5.0;

Microsoft Excel 2010

2.4.4 Matlab 2012b

调整声音刺激的声音参数以及控制声音发放的程序文件为 Sound12.m, 由 Dr.Wei Zhang (from Yuh Nung Jan's Lab, UCSF) 提供。

2.5 实验方法

2.5.1 斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试

在行为学实验前一天将斑马鱼幼鱼按照实验需求分成若干条每皿, 培养皿为 35mm 的 Petri dish, 皿中的 Blue Egg Water 为 7mm。

实验当天, 将待接受测试的组的培养皿带至行为室(Behavior Room), 放置于蓝色背景的实验桌上 10 分钟, 作为对新环境的适应(habituation)。

适应阶段结束后，若是压力刺激实验，则在给予压力刺激后立即用塑料吸管转移斑马鱼幼鱼到光暗偏好测试盒的正方形容器内，在容器中央位置放置，每个容器一条；若无压力刺激，则直接转移。整个过程需小心迅速，避免对鱼造成过多扰动，避免伤害到鱼体。

所有鱼均转移到测试盒的容器内之后，点击 Noldus MPEG Recorder 2.1 上的 START Recording 按钮开始录制，录制时长为 8 分钟。录制结束后，将录制完成的视频保存于闪盘(flash disk)中。

每次录制之间均需更换容器内的 Blue Egg Water，以避免前次实验对之后实验的干扰。

录制的视频用 Noldus Ethovision XT 5.0 进行运动轨迹追踪分析，生成运动轨迹图，以及各种参数和行为学数据。

数据经由 Excel 整合与整理，再由 Graphpad Prism 5.0 进行统计分析，最后生成图表和统计结果。

2.5.2 Cortisol Assay

用于检测皮质醇水平的幼鱼在行为学实验前一天分皿时分为六条鱼每皿。

在行为学实验当天，若为压力刺激实验，则和用于行为学实验的鱼一同接受压力刺激，随后在行为组的鱼进行行为学测试的同时将用于皮质醇水平检测的每皿中的六条鱼用冰 PBS 缓冲液(ice-cold PBS)收集到一个 1.5mL Eppendorf 管中，随后将 Eppendorf 管放入置于干冰上的冰盒内冰冻保存。管内 PBS 体积不超过 50uL。所有样品都收集完毕后，将冰盒放进-80 摄氏度冰箱内保藏。

在第二天，将冰盒从-80 摄氏度冰箱中取出，放在冰桶上解冻。解冻完全后，加入约 150uL 的 ice-cold PBS 使总体积达到 200uL。随后用 handheld homogenizer (VWR Pellet Mixer #47747-370)将样品打碎并匀浆 30 秒至 1 分钟。

在匀浆完全后，每管取出 20uL 匀浆液放入新的 1.5mL Eppendorf 管中，保存在-20 摄氏度冰箱中，之后将用于总蛋白含量的检测。

加入 1400uL 乙酸乙酯(Ethyl Acetate)到剩下的匀浆液中，并在 Vortex 上震荡 30 秒混匀，7000G 离心 15 分钟。

离心结束后转移有机层到新的 1.5mL Eppendorf 管中，将所有管子做好标记并开盖，放置于通风橱(fume hood)中过夜，等待 Ethyl Acetate 挥发。

在第三天，将 200uL EIA 缓冲液（将 Cortisol EIA kit 中的 10mL 10x EIA stock 与 90mL milliQ water 混合均匀，配制成 100mL EIA buffer）加入已挥发完全的管中进行重悬。

用 EIA buffer 重悬试剂盒中的 AchE tracer, Cortisol EIA monoclonal antibody, 以及标准样，并配制标准曲线。

按照试剂盒 Protocol 将 Tracer、Antibody 和样品/标准样加入试剂盒提供的 96 孔板中，塑料膜封好，4 摄氏度过夜。

在第四天，重悬试剂盒中的 Ellman's reagent，并配制 wash buffer。

吸尽 96 孔板中的原有溶液，用 wash buffer 洗五次，每孔用 200uL。每一次加入 wash buffer 后都需要放在 shaker 上摇 2 分钟。

在最后一次洗涤结束后，每孔中加入 200uL Ellman's reagent, 在 TA 孔中加入 5uL tracer，随后用塑料膜封好，放在 shaker 上摇≤60 分钟。（不能超过 60 分钟）

最后将 96 孔板放入 microplate reader 中进行读取(405nm)，将数据通过互联网发至自己邮箱。

2.5.3 BCA Protein Assay

将之前分装的 20uL 的样品解冻，加入 80uL ice-cold PBS 混匀，形成 1:5 的 Dilution。从 4 摄氏度冰箱中取出 Albumin 标准样，配制标准曲线。

将 1mL BCA Reagent B 加入到 50mL BCA Reagent A 中，充分混匀，制备成 Working Reagent(WR)。

将 25uL 的标准样/样品加入到 96 孔板中，每个孔中再加入 200uL 的 WR 液。用不透光的膜覆盖好后，放在 shaker 上摇 30 秒。随后放入 37 摄氏度培养箱中放置 30 秒。

最后将 96 孔板放入 microplate reader 中进行读取(560nm)，将数据通过互联网发至自己邮箱。

2.5.4 压力刺激方法

2.5.4.1 短期热刺激(5min/10min/15min)

在实验开始前一小时，用设定温度为 50 摄氏度的水浴锅预热若干管 50mL Blue Egg Water。

实验开始时，分别加入 10mL 50 摄氏度的 Blue Egg Water 到有幼鱼的皿中。由于皿中原先有 7mL 28 摄氏度的 Blue Egg Water，加入 10mL 50 摄氏度的 Blue Egg Water 后，就能形成 17mL 33 摄氏度的偏热环境。加完 10mL 50 摄氏度的 Blue Egg Water 后，将皿放置在设定温度为 33 摄氏度的水浴锅中，以保持温度。

本研究使用的短期热刺激时间为 5 分钟、10 分钟和 15 分钟。

2.5.4.2 机械搅动

先将搅拌子放入皿中，再将皿放在磁力搅拌仪上。

磁力搅拌仪参数设定为 400rpm，5min。

2.5.4.3 声音刺激

先将幼鱼转移入测试盒的容器中，于视频录制的同时，在特定时间点开始给声音刺激。整个测试过程为 21 分钟：前 8 分钟为 Pre-stimulus 时期(Pre-ss)，中间 5 分钟为 Sound Stimulus 时期(ss)，最后 8 分钟为 Post-stimulus 时期(Post-ss)。Post-ss 时期又分为前后两个区段，第一个区段是刺激结束后的前 4 分钟，即 Post-stimulus period 1，或称为 Post-ss/first 4min；第二个区段是刺激结束后的后 4 分钟，即 Post-stimulus period 2，或称为 Post-ss/second 4min。具体实验的流程如图 1 所示。

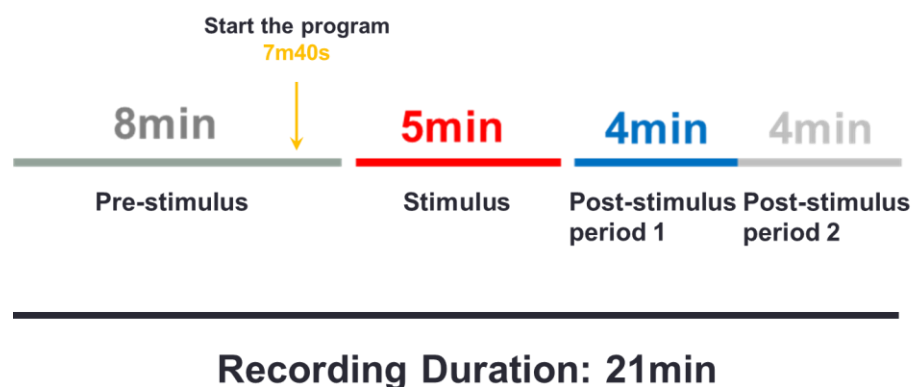


图 1. 声音刺激的实验流程。整个测试过程为 21 分钟：前 8 分钟为 Pre-stimulus 时期(Pre-ss)，中间 5 分钟为 Sound Stimulus 时期(ss)，最后 8 分钟为 Post-stimulus 时期(Post-ss)。Post-ss 时期又分为前后两个区段，第一个区段是刺激结束后的前 4 分钟，即 Post-stimulus period 1，或称为 Post-ss/first 4min；第二个区段是刺激结束后的后 4 分钟，即 Post-stimulus period 2，或称为 Post-ss/second 4min。

声音刺激的参数如下

频率：1000Hz

强度：~75dB

持续时间：0.5s

间隔：20s（由于间隔是 20s，所以开始程序时间为 7 分 40 秒，这样第一个刺激将会准时出现在第 8 分钟）

次数：15 次（3 次/min x 5min）

音箱放置在测试盒后侧，距离测试盒 2cm 处。具体实验布局如图 2 所示。

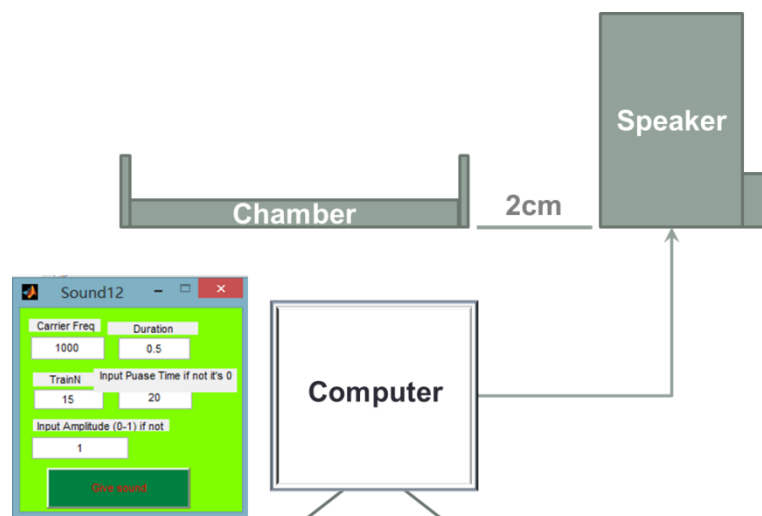


图 2. 声音刺激实验的布局。由 Matlab 上的 Sound12.m 程序调节声音刺激参数以及控制其发放，音箱放置在测试盒后侧，距测试盒 2cm 处。

2.5.4.4 紫外光照射

将皿放置于紫外灯下，并用白纸覆盖皿和紫外灯，关闭房间光源。

紫外灯照射 5 分钟。

2.5.4.5 短期冷刺激

在实验前一天，将若干管 50mL Blue Egg Water 放入 4 摄氏度冰箱中预冷。实验当天转移至冰桶（0 摄氏度）中保持温度。

实验开始时，分别加入 10mL 0 摄氏度的 Blue Egg Water 到有幼鱼的皿中。由于皿中原先有 7mL 28 摄氏度的 Blue Egg Water，加入 10mL 0 摄氏度的 Blue Egg Water 后，就能形成 17mL 18 摄氏度的偏冷环境。

加入 0 摄氏度的 Blue Egg Water 后，保持 5 分钟。

2.5.6 药理学实验方法

事先配制两瓶 400mL 浓度分别为 72uM 和 100uM 的抗焦虑药物 Buspirone 溶液和 Chlordiazepoxide 溶液（均溶于 BEW 中）。药物用量需登记在册，且用完后需将药物存放在安全避光的锁柜中。

在实验开始前一小时，将斑马鱼幼鱼转移至含药物的 BEW 中，药物处理一小时。测试盒的容器中的 10mL BEW 中也应含有药物。

2.5.7 CRH-producing neurons 损毁方法(MTZ/NTR 系统特异性细胞损伤)

CRH-GFF:UAS-NTRmcherry 品系交配得到鱼卵，3dpf 时在荧光显微镜下观察斑马鱼幼鱼大脑或心脏处是否有 mcherry 红色荧光，筛选出 mcherry 阳性的鱼。在 4dpf，将 mcherry 阳性的鱼用 4.5mM MTZ 处理，同时用 1%DMSO 溶液处理其余 mcherry 阳性/阴性的鱼作为对照。在 6dpf 时将所有鱼转移回 BEW，并分皿，为第二天（即 7dpf）的行为学实验做准备。

2.5.8 斑马鱼养殖方法

交配(cross): 每个鱼缸(tank)内放一条雄鱼和一条雌鱼。

收集鱼卵(collect embryos): cross 的第二天早晨 10:00-11:30 收集鱼卵，当天计为 0dpf。

分皿(sort): 收集到的鱼卵一般有 500 颗以上，将这些鱼卵分为 ≤ 40 embryos/dish，清除 BEW 中的杂质。将皿放置于 28 摄氏度培养箱中。

清除死卵和杂质: 1dpf 时，用玻璃吸管吸取清除皿中的死卵和杂质。

转移至正常光照周期: 3dpf 时将皿从 28 摄氏度培养箱中取出，使其开始适应鱼房的正常光照周期。

喂食: 从 7dpf 开始给斑马鱼幼鱼喂食草履虫(paramecium)。

从 14dpf 开始可以逐渐喂食草履虫+明虾(brine shrimp)。
当鱼肚逐渐变为红色时，说明鱼已经主要以明虾为食，这时需将鱼缸接入系统，进入系统水的循环。最后制作标签和条形码，将鱼的信息登入到实验室的斑马鱼数据库中。

三、研究结果

3.1 *Opn4a* 纯合突变对斑马鱼幼鱼光暗偏好行为的影响

本研究的模型对斑马鱼幼鱼光暗偏好行为的量化，采用的是选择系数(Choice Index, CI)。选择系数的定义为斑马鱼在暗区时间与亮区时间之差和总时间的比，即：

$$\text{Choice Index} = \frac{\text{Duration in dark} - \text{Duration in light}}{\text{Duration in dark} + \text{Duration in light}}$$

本研究对斑马鱼 AB 野生型品系和 *Opn4a* 纯合突变品系在 7dpf、11dpf、16dpf、21dpf 及 26dpf 五个时间点进行光暗偏好测试。结果显示斑马鱼 AB 野生型品系和 *Opn4a* 纯合突变品系在 26 天内选择系数的绝对值均呈下降趋势；AB 野生型品系在 26 天内没有逆转现象，即没有转变成趋暗避光；*Opn4a* 纯合突变品系在 26dpf 时出现逆转现象。结果如图 3 所示。

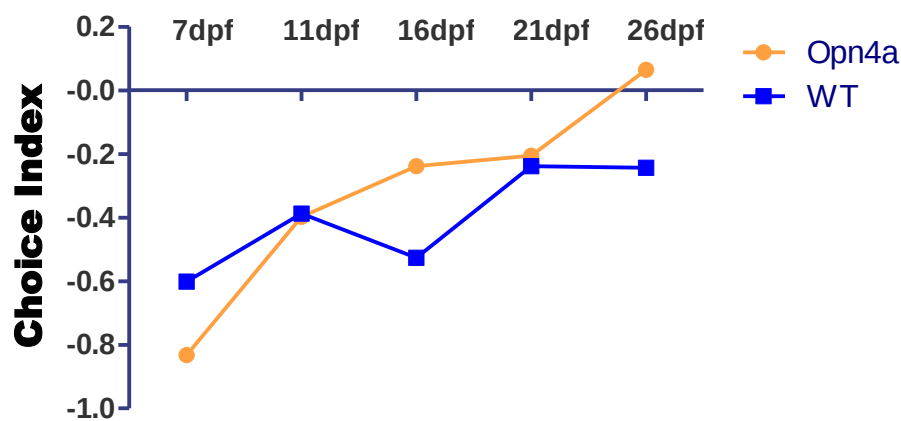


图 3. 斑马鱼 AB 野生型品系和 *Opn4a* 纯合突变品系 26 天内选择系数变化趋势图。纵坐标为 Choice Index，横坐标为天数。橙线为 *Opn4a* 纯合突变品系，蓝线为斑马鱼 AB 野生型品系。

对该实验数据进行 Two-way ANOVA 统计分析,以了解基因(*Opn4a*)和时间(Time)两个因素对斑马鱼幼鱼 26 天光暗偏好变化的影响。结果显示,基因 *Opn4a* 的影响不显著 ($F=0.79$, $p=0.5328$); 基因和时间之间的交叉影响不显著 ($F=0.42$, $p=0.5166$); 只有时间的影响显著 ($F=3.72$, $p=0.0079$)。该结果说明随着斑马鱼的发育,斑马鱼幼鱼的趋光性随时间逐渐减弱,而基因 *Opn4a* 的作用并不明显。

3.2 产 CRH 神经细胞与斑马鱼幼鱼面对压力刺激时的光暗偏好行为变化相关

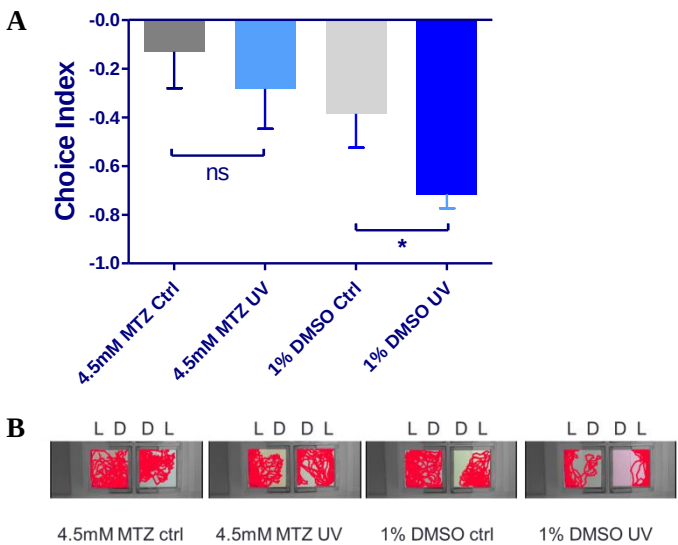


图 4. 产 CRH 神经细胞在斑马鱼幼鱼面对紫外光照射时引起的趋光性增强中起重要作用。(A)4.5mM MTZ 处理过后的斑马鱼幼鱼在紫外光照射后趋光性没有显著变化, $F=1.185$, $p=0.5098$; 而对照组中, 1%DMSO 处理过后的斑马鱼幼鱼在紫外光照射后趋光性被显著增强, $F=3.693$, $p=0.0232$ (*)。Student t-tests (two tailed, unpaired), ns, no significance; (B)运动轨迹图。L, Light Zone, D, Dark Zone

7dpf 时, 本研究对产 CRH 神经细胞已损毁(经 4.5mM MTZ 处理)的斑马鱼幼鱼进行五分钟紫外线照射,发现没有引起任何显著的光暗偏好的变化($F=1.185$, $p=0.5098$); 而对对照组(经 1%DMSO 处理)的斑马鱼幼鱼进行紫外线照射,则发现了显著的趋光性的增强($F=3.693$, $p=0.0232$)。结果如图 4 所示。

同时, 本研究还对该实验的斑马鱼幼鱼进行了皮质醇水平的检测。皮质醇水平(Cortisol Level)定义为样品皮质醇含量与样品总蛋白量之比, 即:

$$\text{Cortisol Level} = [\text{Cortisol}] / [\text{Protein}]$$

结果显示, 产 CRH 神经细胞已损毁的斑马鱼幼鱼在五分钟紫外线照射后皮质醇水平没有任何显著变化 ($F=1.602$, $p=0.5154$); 而作为对照组的经 1%DMSO 处

理的斑马鱼幼鱼在五分钟紫外线照射后，皮质醇水平显著升高（ $F=1.247$ ， $p=0.0001$ ）。结果如图 5 所示。

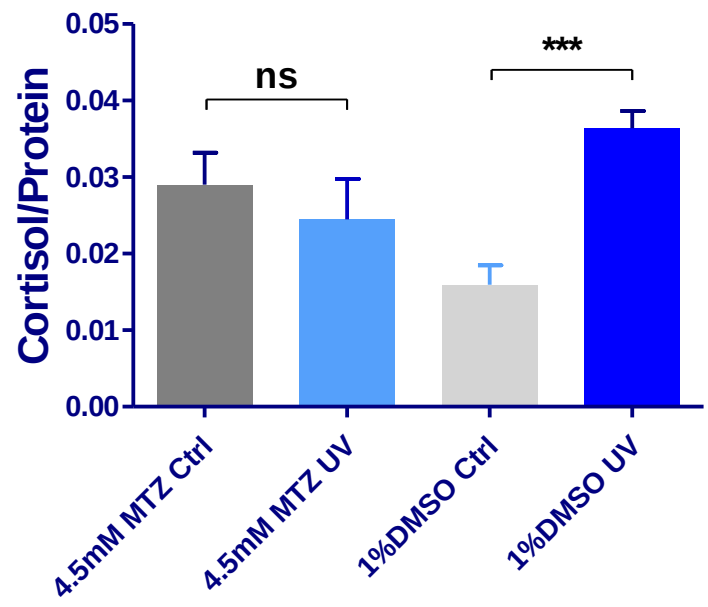


图 5. 产 CRH 神经细胞在斑马鱼幼鱼面对紫外光照射时引起的皮质醇水平升高中起重要作用。4.5mM MTZ 处理过后的斑马鱼幼鱼在紫外光照射后皮质醇水平没有显著变化， $F=1.602$ ， $p=0.5154$ ；而对照组中，1%DMSO 处理过后的斑马鱼幼鱼在紫外光照射后皮质醇水平显著升高， $F=1.247$ ， $p=0.0001$ (***). Student t-tests (two tailed, unpaired), ns, no significance

上述结果表明，斑马鱼幼鱼在面对压力刺激（紫外光照射）时，趋光性显著增强，皮质醇水平显著升高。趋光性和皮质醇水平的同步变化，说明趋光性与皮质醇水平之间存在联系，而产 CRH 神经细胞在两个变化过程中均起重要作用。

3.3 长期不可预测随机刺激(Chronic Unpredictable Stress, CUS)对斑马鱼光暗偏好的影响

本研究将幼鱼分为对照组和实验组两组。对照组在无压力干扰和刺激的环境下正常生长至 11dpf，而实验组从 6dpf 开始到 11dpf 每天接受一种压力刺激，刺激类型和顺序随机，具体实验中压力刺激类型和顺序如表 1 所示。

Day	1 (6dpf)	2 (7dpf)	3 (8dpf)	4 (9dpf)	5 (10dpf)
Stressor	Cold Stimulus	Mechanical Disturbance	Sound Stimulus	UV light	Heat Stimulus

表 1. 6dpf-11dpf 采用的长期不可预测随机刺激的类型和顺序。第一天为短期冷刺激（5min）；第二天为机械扰动（400rpm，5min）；第三天为声音刺激（1000Hz，~75dB，Duration:0.5s，Interval:20s，TrainN:15）；第四天为紫外光照射（365nm，1.9-2.0mW，5min）；第五天为短期热刺激（5min）。

在 6dpf 时，对照组和实验组均接受光暗偏好行为学测试，实验组接受测试的时间在当天给予压力刺激之前。

在 11dpf 时，对照组和实验组再次接受光暗偏好行为学测试。

结果显示，实验组幼鱼经历了 5 天的 CUS 刺激后，趋光性得到了显著的增强（ $F=2.503$ ， $p=0.0323$ ）；而对照组幼鱼趋光性则没有显著的改变（ $F=2.545$ ， $p=0.1947$ ）。结果如图 6 所示。

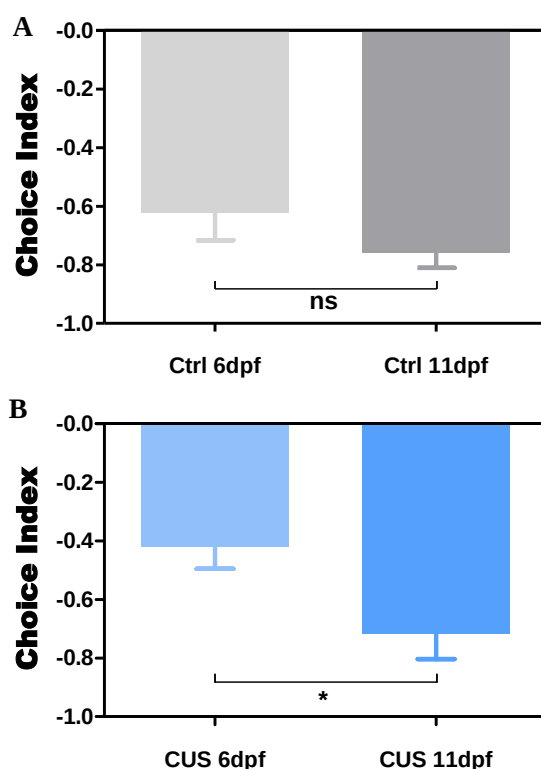


图 6. 长期不可预测随机刺激（CUS）对斑马鱼幼鱼光暗偏好的影响。(A)对照组的幼鱼从 6dpf 至 11dpf 趋光性没有显著的变化， $F=2.545$ ， $p=0.1947$ ；(B)接受持续 5 天 CUS 的实验组幼鱼在 11dpf 呈现出相较于 6pf 的显著增强的趋光性， $F=2.503$ ， $p=0.0323$ (*)。Student t-tests (two tailed, unpaired), ns, no significance

该结果说明，长期不可预测刺激可以显著增强斑马鱼幼鱼的趋光性。这可能是长期不可预测刺激阻碍斑马鱼幼鱼发育过程中光暗偏好逆转的原因。

3.4 不同强度的短期热刺激对斑马鱼幼鱼光暗偏好以及皮质醇水平的影响

本研究在 7dpf 时，对各组幼鱼分别施加了 5 分钟、10 分钟和 15 分钟三种时间长度的短期热刺激（33 摄氏度）。通过 One-way ANOVA 统计分析，结果显示 5 分钟、10 分钟以及 15 分钟的短期热刺激均能引起幼鱼趋光性显著增强，表现在选择系数绝对值显著升高（ $F=6.773$, $p=0.0010$, Dunnett's Multiple Comparison Test: Ctrl vs Heat 5min, **; Ctrl vs Heat 10min, **; Ctrl vs Heat 15min, **），以及从亮区到暗区的跨越次数显著减少（ $F=11.42$, $p<0.0001$, Dunnett's Multiple Comparison Test: Ctrl vs Heat 5min, ***; Ctrl vs Heat 10min, ***; Ctrl vs Heat 15min, ***）。结果如图 7 所示。

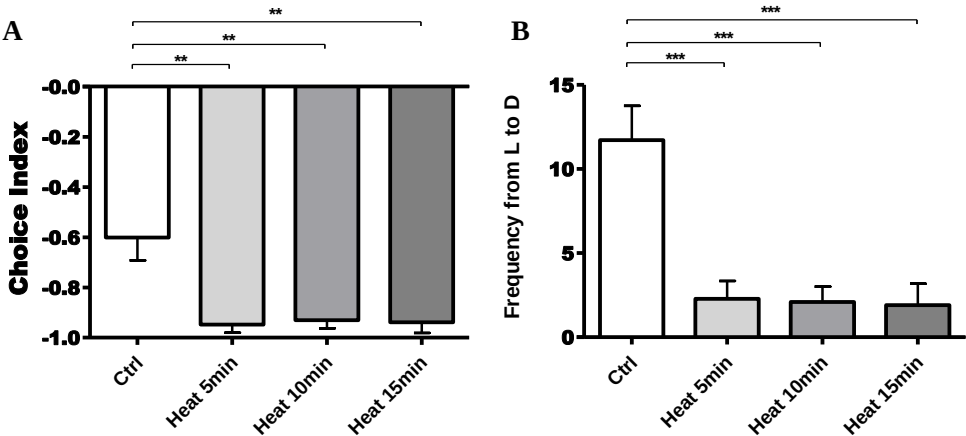


图 7. 不同强度的短期热刺激对斑马鱼幼鱼光暗偏好的影响。(A) 5min、10min 和 15min 的短期热刺激均能引起幼鱼选择系数绝对值显著升高，偏向-1，即趋光性显著增强， $F=6.773$, $p=0.0010$, Dunnett's Multiple Comparison Test: Ctrl vs Heat 5min, **; Ctrl vs Heat 10min, **; Ctrl vs Heat 15min, **; (B) 5min、10min 和 15min 的短期热刺激均能使幼鱼从亮区进入暗区的次数显著减少， $F=11.42$, $p<0.0001$, Dunnett's Multiple Comparison Test: Ctrl vs Heat 5min, ***; Ctrl vs Heat 10min, ***; Ctrl vs Heat 15min, ***。One-way ANOVA

同时，本研究还对各组幼鱼进行了皮质醇水平检测。结果显示接受 5min 热刺激的幼鱼皮质醇水平显著升高（ $F=2.161$, $p=0.0361$ ），而 10min 和 15min 热刺激则没有显著升高幼鱼的皮质醇水平（ $F=4.975$, $p=0.1978$; $F=5.855$, $p=0.1322$ ）。结果如图 8 所示。

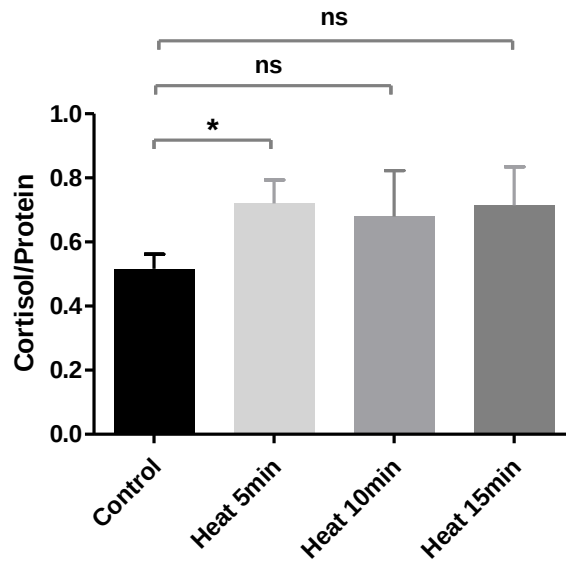


图 8. 不同强度短期热刺激对斑马鱼幼鱼皮质醇水平的影响。5min 热刺激能够引起幼鱼皮质醇水平的显著升高, $F=2.161$, $p=0.0361(*)$; 而 10min 和 15min 均不能引起幼鱼皮质醇水平显著升高, $F=4.975$, $p=0.1978$; $F=5.855$, $p=0.1322$ 。Student t-tests (two tailed, unpaired), ns, no significance

上述结果说明,一定范围内不同强度的短期热刺激均能引起斑马鱼幼鱼趋光性的显著增强,而皮质醇水平的升高则随着给予刺激的时长增长而逐渐变得不显著。这表明不同强度的压力刺激均能引起显著的行为学变化,而生理学变化则可能因为幼鱼对压力刺激的适应而逐渐变得不显著。面对压力刺激,行为学变化相较生理学变化更明显,且更难因适应而恢复。

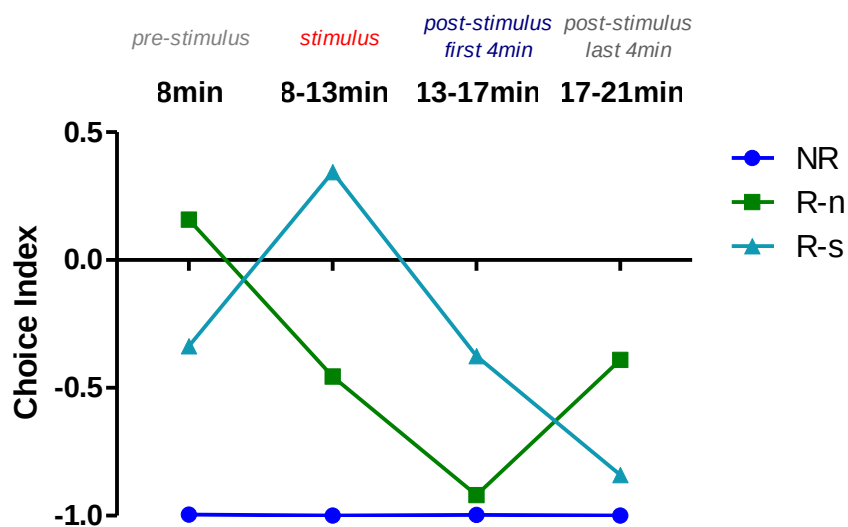
3.5 声音刺激对斑马鱼幼鱼光暗偏好的影响

在本研究中,总共有 24 条鱼(8dpf)接受了光暗偏好的测试。其中有 4 条幼鱼无法被软件识别,所以有效记录的条数为 20 条。根据面对声音刺激的不同反应,本研究将 20 条幼鱼分成了 6 种反应类型:无反应(Non Response, NR),常规反应(Normal Response, R-n),慢反应(Slow Response, R-s),快速恢复反应(Quick-recover Response, R-Qr),超慢反应(Very slow Response, R-vs)以及非常规反应(Abnormal Response, AR)。具体分类细节如表 2 所示。

Non Response (NR)	没有反应，保持原先状态不变。共 5 条
Normal Response (R-n)	在 ss 时期开始呈现 dark avoidance，随后在 Post-ss period 1 时期呈现更强的 dark avoidance，最后于 Post-ss period 2 时期开始恢复。共 6 条
Slow Response (R-s)	在 ss 时期没有明显 dark avoidance，随后在 Post-ss 时期的 8 分钟内逐渐呈现增强的 dark avoidance。共 4 条
Quick-recover Response (R-Qr)	在 ss 时期呈现 dark avoidance，但从 Post-ss period 1 时期开始就逐渐恢复。共 1 条
Very slow Response (R-vs)	直到 Post-ss period 2 时期才开始略有呈现 dark avoidance。共 1 条
Abnormal Response (AR)	在接受声音刺激后反而呈现 light avoidance 共 3 条

表 2. 斑马鱼幼鱼面对声音刺激的不同反应类型。无反应(Non Response, NR)，常规反应(Normal Response, R-n)，慢反应(Slow Response, R-s)，快速恢复反应(Quick-recover Response, R-Qr)，超慢反应(Very slow Response, R-vs)以及非常规反应(Abnormal Response, AR)。共六种反应类型。

以每个类型中具代表性的个体为例，如图 9 所示。



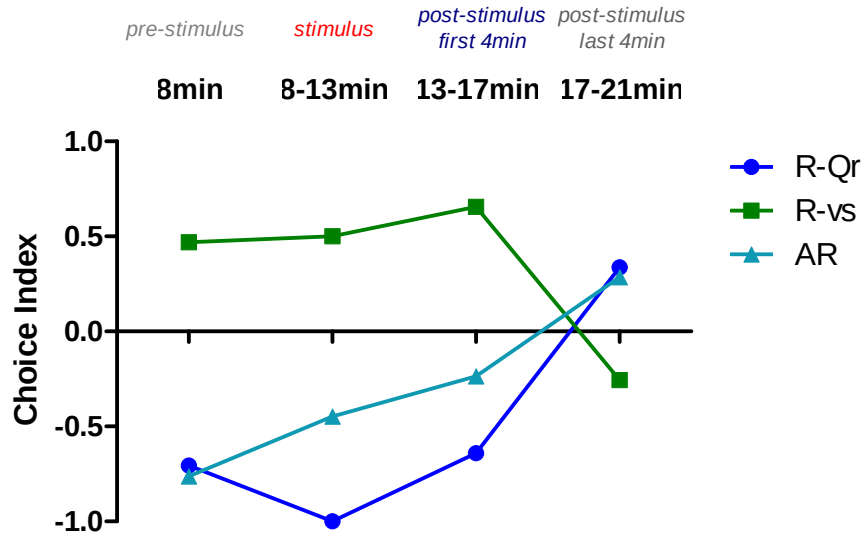


图 9. 斑马鱼幼鱼面对声音刺激的不同反应类型 (图示)。

在能引起反应的 15 条中 (除去 NR 的 5 条), 有 12 条在接受声音刺激后被引起了 dark avoidance, 比例达到 80%。12 条中, 除去一条前 17min 均处于 light avoidance 状态的 R-vs 类型的个体, 剩余 11 条幼鱼在刺激后的前 4 分钟内的趋光性相较刺激前的 8 分钟显著提高 ($F=2.283$, $p=0.0324$)。其中 R-n 类型的幼鱼在刺激后的前 4 分钟内的趋光性相较刺激前的 8 分钟也显著提高 ($F=2.611$, $p=0.0158$)。结果如图 10 所示。R-n 类型的幼鱼在 21 分钟记录期间的运动轨迹如图 11 所示。

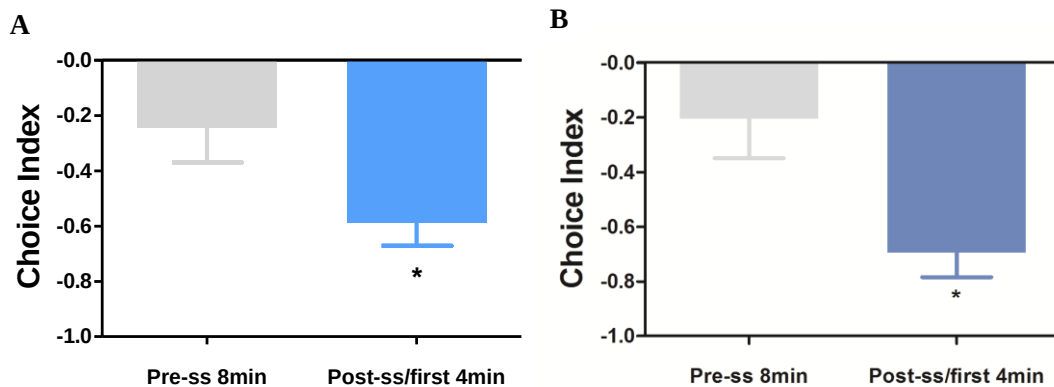


图 10. 声音刺激对斑马鱼幼鱼光暗偏好的影响。(A)能被引起 dark avoidance 的幼鱼 (除去 R-vs) 在刺激后的前 4 分钟内的趋光性相较刺激前的 8 分钟显著提高, $F=2.283$, $p=0.0324$ (*); (B) R-n 类型的幼鱼在刺激后的前 4 分钟内的趋光性相较刺激前的 8 分钟显著提高, $F=2.611$, $p=0.0158$ (*). Student t-tests (two tailed, unpaired)

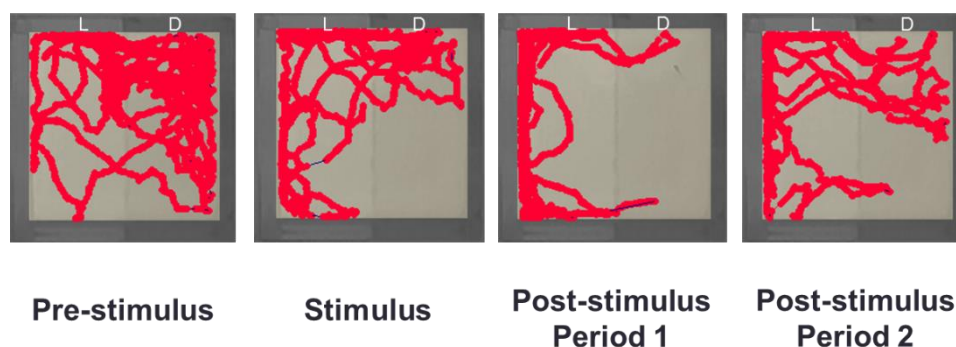


图 11. R-n 类型的幼鱼在 21 分钟记录期间的运动轨迹图。该图为一 R-n 类型的幼鱼在 21 分钟记录期间内的运动轨迹，从图中可以看出接受到声音刺激时该幼鱼即显现出增强的趋光性，在刺激结束后的前 4 分钟，趋光性进一步增强，而在随后时间里光暗偏好逐渐恢复。L，Light Zone，D，Dark Zone。

上述结果表明，声音刺激能够引起大部分斑马鱼幼鱼趋光性的增强。然而我们仍需要探索一种能够引起所有，或绝大部分斑马鱼幼鱼产生显著趋光性增强反应的刺激强度（或声音刺激参数）。

3.6 药理学验证斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型与压力、焦虑的相关性

本研究采用两种抗焦虑药物 Chlordiazepoxide 和 Buspirone，从药理学角度试图验证斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型与压力以及焦虑之间存在关联性。具体实验进行方式见表 3。

	Chlordiazepoxide	Buspirone	Heat Stress
Control	-	-	-
HS Only	-	-	+
Chlordiazepoxide Only	+	-	-
Chlordiazepoxide+HS	+	-	+
Buspirone Only	-	+	-
Buspirone+HS	-	+	+

表 3. 药理学实验进行方式。总共六组实验。+，施加该条件，-，不施加该条件。7dpf

结果显示，给予了抗焦虑药物 Chlordiazepoxide 的幼鱼在被给予 5min 短期热刺激后趋光性并没有被增强 ($F=4.989$, $p=0.9779$)，而对照组在被给予 5min 短期热刺激后趋光性被显著增强 ($F=2.279$, $p=0.0482$)；抗焦虑药物 Buspirone 则引起了幼鱼强烈的趋暗性 ($F=4.110$, $p=0.0007$)，在被给予 5min 短期热刺激后相较只加 Buspirone 的对照组没有引起任何改变 ($F=1.916$, $p=0.7918$)。结果如图 12 所示。

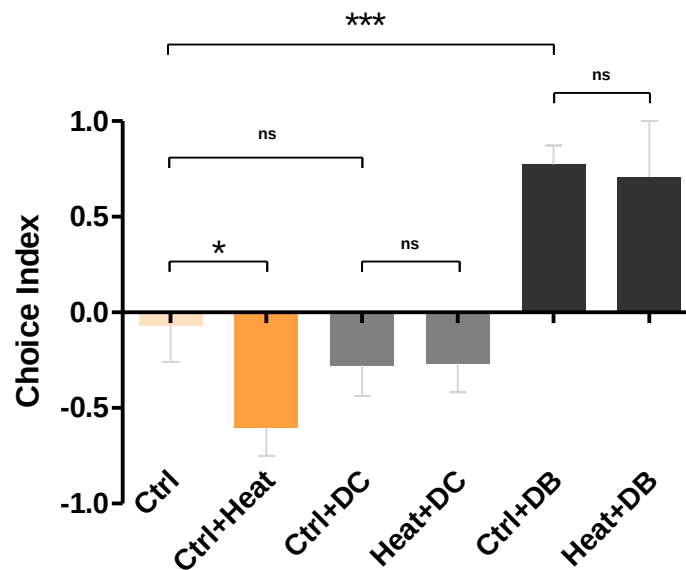


图 12. 抗焦虑药物处理的幼鱼面对短期热刺激的光暗偏好行为变化。没有经过药物处理的对照组在接受 5min 短期热刺激后趋光性显著增强, $F=2.279$, $p=0.0482$ (*)；给予了抗焦虑药物 Chlordiazepoxide 的幼鱼在被给予 5min 短期热刺激后趋光性没有显著变化, $F=4.989$, $p=0.9779$ ；抗焦虑药物 Buspirone 则引起了幼鱼强烈的趋暗性, $F=4.110$, $p=0.0007$ (***); 给予了抗焦虑药物 Buspirone 的幼鱼在被给予 5min 短期热刺激后趋光性没有显著变化, $F=1.916$, $p=0.7918$ 。Student t-tests (two tailed, unpaired), ns, no significance

Ctrl: Control Group; Ctrl + Heat: HS Only Group; Ctrl + DC: Chlordiazepoxide Only Group; Heat + DC: Chlordiazepoxide + HS Group; Ctrl + DB: Buspirone Only Group;

Heat + DB: Buspirone + HS Group

上述结果表明，斑马鱼幼鱼面对压力刺激时引起的光暗偏好的改变与焦虑情绪之间存在相关性。

四、讨 论

本研究首先探讨了 *Opn4a* 基因是否参与调控斑马鱼幼鱼的光暗偏好行为。*Opn4a* 编码的视黑质蛋白是一种存在于自感光神经节细胞中的视蛋白，功能包括感光、成像、情绪调节和昼夜节律调节等等，也有研究发现它与学习记忆有关^[14]。这样一种既有感光功能，又参与大脑高级功能（情绪与记忆）的视蛋白很有可能是了解斑马鱼幼鱼光暗偏好行为和焦虑之间关系的关键，是整个调控环路研究的重要切入口。本研究通过实验发现斑马鱼幼鱼趋光性随着时间逐渐减弱，且 *Opn4a* 纯合突变的品系比 AB 野生型更早进入趋暗阶段。但是实验中 *Opn4a* 对斑马鱼幼鱼光暗偏好行为的作用并不突出，其原因很可能是由于不同个体发育速度不同，光暗偏好逆转的时间点可能相互之间存在巨大差异，所以在长时间观察的实验中只能得到大致趋势，而无法得到有说服力的结果。对于 *Opn4a* 的研究除了需要更多的实验数据，还需要考虑使所有实验对象的发育速度保持同步的方法，方法可能有挑选大小相近个体，保持每缸中鱼的条数相同，喂食同等量草履虫等等。

本研究通过实验证明 CRH-producing neurons 确实在斑马鱼幼鱼面对压力刺激时光暗偏好变化以及皮质醇水平变化中起重要作用。结果说明斑马鱼幼鱼面对压力刺激时引起的行为学和生理学反应都需要 CRH-producing neurons 的参与和调节。光暗偏好行为变化和皮质醇水平变化的同步在一定程度上说明了两者的关联性。本研究证实了 CRH-producing neurons 是压力和生理行为改变之间的中间调节环节。

本研究还提出了长期不可预测随机刺激阻碍斑马鱼幼鱼光暗偏好逆转的一个可能原因。在接受了长期不可预测随机刺激后，斑马鱼幼鱼的趋光性得到了显著增强，这就可能会导致光暗偏好逆转的时间点的推后，从而阻碍斑马鱼幼鱼正常的光暗偏好的逆转。目前仍需要有更多的实验来探究长期不可预测随机刺激对斑马鱼幼鱼生理以及大脑形态的影响，从而了解长期不可预测随机刺激是否能在斑马鱼幼鱼中引起焦虑情绪，是否会引起大脑形态的改变，以及这些作用在成年后是否还存在影响。长期不可预测随机刺激如果被证实能够引起斑马鱼幼鱼的焦虑情

绪,那么也将能够再次有力证实长期不可预测随机刺激影响的光暗偏好行为与焦虑情绪之间的关联性。

本研究还从药理学角度出发,运用抗焦虑药物,证实了斑马鱼幼鱼面对压力刺激时的光暗偏好行为改变和焦虑有相关性,为我们自主搭建的斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型增加了可信度,在“压力-光暗偏好-焦虑”之间建立了联系,说明运用斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型可以反映测试对象是否存在焦虑情绪,该模型具有巨大的应用潜力。

本研究对斑马鱼幼鱼施加不同强度的压力刺激,发现随着压力强度的增加,幼鱼均表现出显著的趋光性增强,而皮质醇水平的升高则逐渐失去显著性。这表明不同强度的压力刺激均能引起显著的行为学变化,而生理学变化则可能因为幼鱼对压力刺激的适应而逐渐变得不显著。面对压力刺激,行为学变化相较生理学变化更明显,且更难因适应而恢复。另外,本研究还尝试加入声音刺激作为短期压力刺激的一种,来测试是否能引起光暗偏好的改变。实验证明声音刺激可以引起光暗偏好的改变。若斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型能在日后的实验中得到长期反复的验证,上述实验可以说明声音刺激能够引起斑马鱼幼鱼的焦虑情绪,而不只是惊吓反应。

本研究的主要目的是探究斑马鱼幼鱼光暗偏好行为背后的调控机制和主要调控环节,并利用诸多实验充分验证斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型作为一种焦虑模型的可信度和可行性。从得到的实验结果来看,除了 *Opn4a* 需要改良实验进行进一步研究外, *CRH-producing neurons* 在斑马鱼幼鱼光暗偏好中确实起重要作用,而且斑马鱼幼鱼光暗偏好行为与压力,以及焦虑之间确实存在关联性。斑马鱼幼鱼光暗偏好行为学测试模型的验证和建立,标志着一种利用行为学变化的新的基因筛选和药物筛选的方法的诞生。光暗偏好行为的研究,也是回答“不同的感觉输入是如何被动物大脑整合处理并最终体现在行为以及生理改变上”这一问题的新的切入点,有助于我们深入了解感觉输入和大脑高级功能之间的联系。

参考文献

1. Chen, F., et al., Effects of lorazepam and WAY-200070 in larval zebrafish light/dark choice test. *Neuropharmacology*. (2015)95, 226-233.
2. Mansur, B.M., et al., Effects of the number of subjects on the dark/light preference of Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. (2014)11(6), 560-566.
3. Stewart, A., et al., Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology*. (2012)62(1), 135-143.
4. Colwill, R.M. and R. Creton, Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. *Rev Neurosci*. (2011)22(1), 63-73.
5. Clark, K.J., N.J. Boczek and S.C. Ekker, Stressing zebrafish for behavioral genetics. *Rev Neurosci*. (2011)22(1), 49-62.
6. Stephenson, J.F., K.E. Whitlock and J.C. Partridge, Zebrafish preference for light or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation. *Zebrafish*. (2011)8(1), 17-22.
7. Maximino, C., et al., Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (2011)35(2), 624-631.
8. Steenbergen, P.J., M.K. Richardson and D.L. Champagne, Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. *Behav Brain Res*. (2011)222(1), 15-25.
9. Mathur, P. and S. Guo, Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behav Brain Res*. (2011)219(2), 234-239.
10. Cachat, J., et al., Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc*. (2010)5(11), 1786-1799.
11. Maximino, C., et al., Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behav Brain Res*. (2010)210(1), 1-7.
12. Maximino, C., et al., Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc*. (2010)5(2), 209-216.
13. Serra, E.L., C.C. Medalha and R. Mattioli, Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz J Med Biol Res*. (1999)32(12), 1551-1553.
14. LeGates, T.A., et al., Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature*. (2012)491(7425), 594-598.
15. Matos-Cruz, V., et al., Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. *PLoS One*. (2011)6(9), e25111.
16. Schmidt, T.M., S.K. Chen and S. Hattar, Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci*. (2011)34(11), 572-580.
17. Joels, M. and T.Z. Baram, The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. (2009)10(6), 459-466.
18. Lupien, S.J., et al., Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*. (2009)10(6), 434-445.

19. Ulrich-Lai, Y.M. and J.P. Herman, Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* (2009)10(6), 397-409.
20. Feder, A., E.J. Nestler and D.S. Charney, Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci.* (2009)10(6), 446-457.
21. Vom, B.C., et al., The Severity of Acute Stress Is Represented by Increased Synchronous Activity and Recruitment of Hypothalamic CRH Neurons. *J Neurosci.* (2016)36(11), 3350-3362.
22. Hollis, F., C. Isgor and M. Kabbaj, The consequences of adolescent chronic unpredictable stress exposure on brain and behavior. *Neuroscience.* (2013)249, 232-241.
23. Chakravarty, S., et al., Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction. *PLoS One.* (2013)8(5), e63302.
24. Piato, A.L., et al., Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (2011)35(2), 561-567.
25. Wolman, M.A., et al., A genome-wide screen identifies PAPP-AA-mediated IGFR signaling as a novel regulator of habituation learning. *Neuron.* (2015)85(6), 1200-1211.
26. Bhandiwad, A.A., et al., Auditory sensitivity of larval zebrafish (*Danio rerio*) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. *J Exp Biol.* (2013)216(Pt 18), 3504-3513.
27. Wolman, M.A., et al., Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2011)108(37), 15468-15473.
28. Best, J.D., et al., Non-associative learning in larval zebrafish. *Neuropsychopharmacology.* (2008)33(5), 1206-1215.
29. Burgess, H.A. and M. Granato, Sensorimotor gating in larval zebrafish. *J Neurosci.* (2007)27(18), 4984-4994.
30. Bang, P.I., et al., High-throughput behavioral screening method for detecting auditory response defects in zebrafish. *J Neurosci Methods.* (2002)118(2), 177-187.

致谢

历时三个月，从确定研究问题和方向，到制定研究计划，再到进行实验，直至最后完成实验，写就毕业论文，在整个过程中我的导师郭苏教授无微不至的关怀和耐心细致的指导是我这篇毕业论文完成的最主要也是最重要的助力。感谢郭苏教授无私的付出和教诲，以及提供给了我前往美国加利福尼亚大学旧金山分校进行实验的宝贵的机会。在此也要感谢拔尖人才培养计划，复旦大学遗传工程国家重点实验室，以及复旦大学生命科学学院“学生学术科技创新行动支持计划”项目对我在复旦大学期间进行科研的能力培养，鼎力帮助和资金支持。

毕业论文的完成，不仅需要个人的努力，更离不开身边人的帮助和支持。在此，我对在 UCSF 工作期间耐心帮助我，指导我，传授给我实验技术的 Dr. Mahendra Wagle (from Su's Lab, UCSF); 提供给我声音刺激 Matlab 程序以及音箱的 Dr. Wei Zhang (From Jan's Lab); 与我们开展合作，提供 *Opn4a* 纯合突变品系的苏州大学的王晗教授表示衷心感谢。

另外，我还要对复旦大学郭苏教授课题组、UCSF Su's Lab 的同伴们表示衷心感谢，在工作中，他们给了我许多帮助和支持；在生活中，他们是我的坚强支撑，是我可信赖的朋友。

我要对我大学期间的朋友、我的室友表示感谢，他们在我大学四年里与我共同面对困难，共享喜怒哀乐，一同成长，互相帮助。没有他们，我的大学生活将会黯然无色，孤独寂寥。

我要对我的父母说一声“谢谢”。二十多年来，他们不计回报的爱与付出保障了“我”这个个体的健康成长和最终成型。现在本科即将毕业，很荣幸获得“复旦

大学优秀毕业生”称号的我，相信已经向他们交出了一份令他们满意的答卷。凭借清风展雏翅，磨砺羽翼游云间，我即将离开他们的港湾，前往更为广阔的世界继续追求属于我的梦想，唯有更自信地起飞，才能让他们放宽操劳了二十多年的心。

我知道，科学研究的道路是不容易的，有时候是孤独的。它也是窄门，在这头看不清那头，在那头充满着未知，许多人拾级而上，但并不是所有人都勇于跨过。我知道只有去探索，去追寻，去发现，才能在过程中逐渐获得跨过去的勇气，正如只有迈开第一步，人才能向前走，只有向前走，才能有第二步、第三步。当我选择走上科研这条路时，我已经拥有了无畏的希望。

我相信，这篇毕业论文不只是一个结束，更是一个开始。

我相信，路在脚下，光明也在脚下。

共勉。

感谢今生相会，听凭离别难免。

诸君，有缘再见。