

幼年到成年斑马鱼大脑的 OCT 活体三维可视化

毛广娟¹, 林燕萍¹, 陈婷如¹, 张艺晴¹, 邱婷¹, 蓝银涛¹, 向湘¹, 傅洪波¹, 张建^{1,2*}

¹广州医科大学基础医学院生物医学工程系, 广东 广州 511436;

²广州医科大学国家呼吸系统疾病临床医学研究中心呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510120

摘要 作为一种新型的模型动物, 斑马鱼被广泛应用到大脑相关的研究中, 但目前缺乏高分辨率活体评估幼年 (>7 日龄) 到成年阶段斑马鱼大脑的成像技术。利用光学相干层析术 (OCT) 对孵化 21, 45, 100 d 的斑马鱼大脑进行活体成像, 并与切片染色的结果进行对比。结果说明: OCT 的成像深度和分辨率足以显示三个年龄段的斑马鱼大脑, OCT 图像显示的大脑结构特征与切片染色结果匹配较好。二维和三维 OCT 结果都定量显示斑马鱼大脑在 80 d 内显著增大, 但切片染色结果由于组织萎缩, 不能准确地评估大脑发育情况。研究结果表明, OCT 作为一种高效的活体成像工具, 可用于基于斑马鱼的脑发育研究。

关键词 生物技术; 光学相干层析术; 斑马鱼; 脑; 发育

中图分类号 R318.51

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.1207002

OCT *in vivo* Three-Dimensional Visualization of Zebrafish Brains from Juvenile to Adult

Mao Guangjuan¹, Lin Yanping¹, Chen Tingru¹, Zhang Yiqing¹, Qiu Ting¹, Lan Yintao¹,
Xiang Xiang¹, Fu Hongbo¹, Zhang Jian^{1,2*}

¹Department of Biomedical Engineering, School of Basic Medical Science, Guangzhou
Medical University, Guangzhou 511436, Guangdong, China;

²State Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Centre for
Respiratory Disease, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, Guangdong, China

Abstract As a new type of model animal, zebrafish is more and more widely used in the brain-related researches. However, there is a lack of high-resolution imaging technologies for the *in vivo* characterization of the brain of zebrafish from its infancy (>7 days old) to adulthood. In this study, optical coherence tomography (OCT) is used to give *in vivo* imaging of zebrafish brains after hatching 21, 45 and 100 d. The results show that the imaging depth and resolution of OCT are both enough to visualize the whole brain of zebrafish from three age groups, and the brain structural features of OCT images match well with the sectional staining results. Both the 2D and 3D OCT results quantitatively show that the zebrafish brain increases significantly in 80 d, however due to tissue atrophy, the sectional staining results can not accurately or quantitatively evaluate the brain's development. This study shows that OCT can be used as a tool for efficient *in vivo* imaging and used for the brain's development research based on zebrafish.

Key words biotechnology; optical coherence tomography; zebrafish; brain; development

OCIS codes 170.4500; 170.1420

1 引 言

大脑是人体最为复杂的器官, 阿尔茨海默病、帕

金森综合征、癫痫等脑疾病仍严重影响着人类的健康, 对大脑结构和功能的探索是当今科学研究的热点, 各国相继推出了脑研究计划^[1-2]。模型动物在脑

收稿日期: 2020-03-05; 修回日期: 2020-05-26; 录用日期: 2020-07-20

基金项目: 国家自然科学基金(11704082)、广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515011104)、2019年广东省本科高校教学质量与教学改革工程项目(01-408-2007002)

*E-mail: jianzhang@gzhmu.edu.cn

相关研究中起着关键的作用,猴、大小鼠等常见哺乳动物存在体型大、发育慢和成本高等问题,寻找新的模型动物是解决这些问题的捷径。

作为脊椎动物,斑马鱼与人的基因重合度高达85%,且具备相似的器官,近几年已经成为一种广泛认可的新模型动物^[3-6]。幼年斑马鱼体型小且通体透明,适用于光学显微成像^[7-10]。但成年斑马鱼的体长可达3 cm,且表皮由于色素沉积而透明度较差^[11],光学显微成像技术不足以对成年斑马鱼的大脑进行活体成像。因此,目前基于成年斑马鱼的大脑相关研究主要是通过切片染色的方法来观察大脑的结构。但开展切片染色之前必须处死模型动物,这显然对大脑发育研究是不利的。

作为独特的散射光成像技术,光学相干层析术(OCT)是基于低相干干涉原理并结合共焦扫描模式的一种新型光学成像技术,可对生物组织或其他散射介质内部的微观结构进行高分辨率的断层面析成像^[12-14]。其显著优点包括:远高于白光成像和荧光成像的穿透深度,微米级分辨率的三维成像能力,以及无需标记非接触式无损检测模式^[15-17]。目前OCT已成功应用在心脏内科和眼科的临床诊断中^[18-20]。本课题组前期的研究表明,OCT非常适用于成年斑马鱼的大脑成像^[21-24]。本文利用OCT对幼年(>7日龄)到成年阶段的斑马鱼大脑进行活体三维可视化处理,并将OCT成像结果与切片染色结果进行对比分析,以评估OCT用于大脑发育相关研究的可行性。

2 材料和方法

2.1 OCT成像装置

本文采用一套频域OCT系统(TEL210, Thorlabs, 美国),该OCT系统的结构如图1(a)所示。OCT系统的光源是一个中心波长为1325 nm的超辐射发光二极管(SLD)。该OCT系统以光纤耦合器作为干涉仪,SLD发出的光被光纤耦合器一分为二。其中一路光经准直后进入参考臂,经棱镜反射后沿原路返回光纤,光路中间的衰减器可调节返回的光强,反射棱镜的位置可前后移动,以实现参考臂长度的微调。另一路光则进入样品臂,光路上的XY振镜可对光进行二维扫描,光经过扫描物镜聚焦到样品上。样品臂和参考臂的反射光在光纤耦合器处进行干涉,后进入光谱仪进行分光 and 光电转换,数据被采集系统记录。本文OCT系统在空气中的轴向分辨率约为12 μm ,成像深度大于

7 mm,最高A扫描速率为76 kHz,成像系统的相关测试结果见已发表的研究^[23]。斑马鱼在OCT成像前经过麻醉并被琼脂固定于扫描物镜下方,每条鱼的成像时间小于5 min。另有一个可见光相机处于样品臂X扫描镜的上方,该相机对样品进行拍照以辅助确定扫描成像区域。为了保证较好的成像质量,本文将OCT系统的扫描速度设置为28 kHz,成像深度设置为2 mm。

2.2 斑马鱼样品

实验是在广州医科大学伦理委员会指导下开展的,种鱼引自南方医科大学张译月教授课题组,所有样品鱼是在本实验室自建饲养系统中繁殖的,系统保持水体(28 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 的温度,并给予规律的明暗(14 h/10 h)照明。斑马鱼发育主要分为四个阶段,本文选取孵化后21,45,100 d的野生型斑马鱼用于OCT活体成像。三组体长分别为1,2,3 cm,每个年龄点选三条行为正常的斑马鱼用于研究,斑马鱼的照片如图1(b)所示。

2.3 试剂配制

麻醉剂的配制:将Tricaine(A5040, Sigma, 美国)粉末溶于Holtfreter缓冲液中,制成Tricaine质量分数为0.4%的25 \times 储备液,后取适量储备液稀释为1 \times (Tricaine质量分数为0.01%)的工作液以用于麻醉斑马鱼。琼脂溶液的配制:称取1 g的琼脂粉(广州环凯微生物科技公司)并加入到100 mL的蒸馏水中,充分搅拌混匀,加热至琼脂粉完全溶解,用于固定被麻醉的斑马鱼。

2.4 病理实验

斑马鱼样品完成OCT活体成像后,采用冰水浸泡的方法进行安乐死,然后置于Bouin氏液中固定24 h,再置于流水中冲洗24 h。将经过流水冲洗处理的斑马鱼样品按照标准流程进行脱水处理并被包埋成蜡块。将包埋好的蜡块固定于旋转切片机(RM 2245, Leica, 德国)上,并被切成厚度为4 μm 的薄片。染色前将切片放入60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烤2 h,再按H&E染色标准进行切片,最后利用数字病理玻片扫描仪(CS2, Leica, 德国)对染色后的切片进行图像采集。对斑马鱼头部进行了连续的切片,尽可能多地获取头部的横断面和水平面染色图片,便于后期用于与OCT结果进行对比。

2.5 数据测量和分析

二维OCT图像是采集系统生成的,斑马鱼头部的三维OCT图像是利用Image J软件重建的。斑马鱼大脑的面积是利用Image J软件测量的,

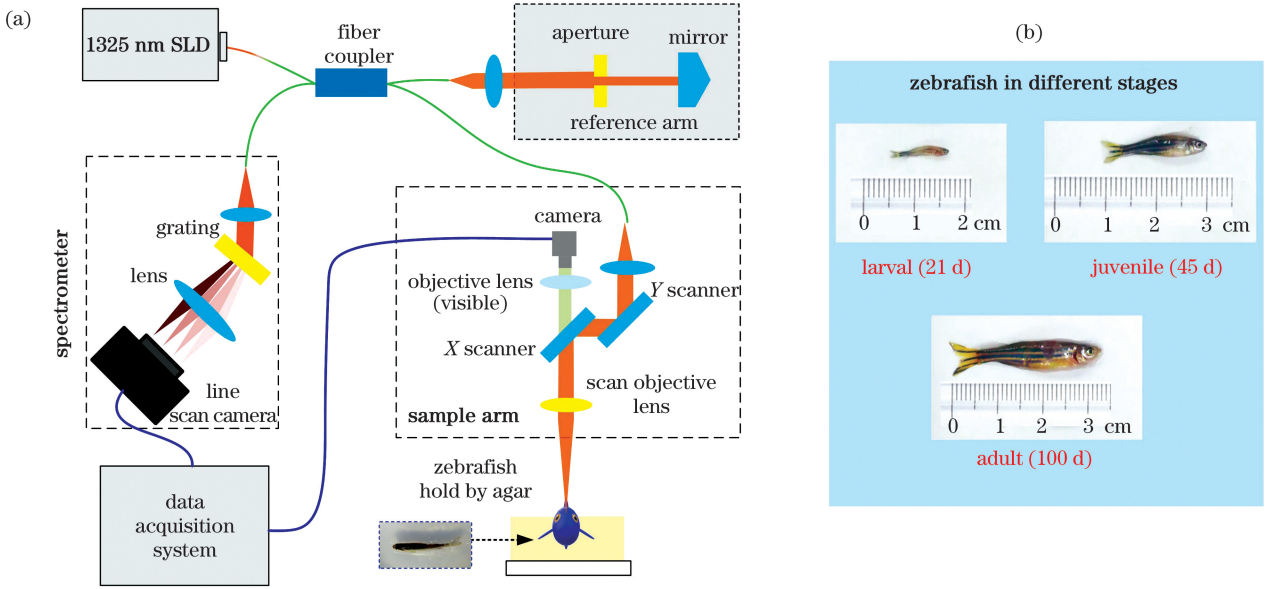


图 1 OCT 系统和斑马鱼样品。(a)OCT 装置图以及凝胶固定的斑马鱼照片；(b)三个年龄段的斑马鱼样品照片
Fig. 1 OCT system and zebrafish samples. (a) Schematic of OCT setup and photograph of zebrafish hold by agar;
(b) photograph of zebrafish samples from three age groups

MATLAB 软件用于二维 OCT 图像的分割和斑马鱼大脑体积的测量。对同年龄段三个斑马鱼进行测量,在获取大脑面积和体积数据后,使用 Origin 软件求取平均值和标准差。

3 实验结果

3.1 不同日龄斑马鱼头部的 OCT 成像

如图 2(a)所示,OCT 沿红线对斑马鱼头部进行 B 扫描。得益于快的扫描速率,OCT 可以在较短的时间内对斑马鱼的头部进行成像。根据连续获取的 B 扫描 OCT 图像,进一步利用软件重建为三维图像,如图 2(b)所示。由于皮肤和颅骨覆盖整个斑马鱼的头部,因此需要进一步对三维 OCT 图像进行虚拟分割。图 2(c)显示的是对三个年龄段斑马鱼的三维 OCT 图像进行冠状面、矢状面和水平面分割的结果。基于虚拟分割的结果可以发现,颅骨的图像强度较高,这与其光散射系数大相吻合。颅骨之下存在着支撑结构,这部分区域的信号强度低,呈现为黑色。大脑形态清晰,日龄 21 d 的斑马鱼脑部图像呈现均匀的高亮特征,相比之下日龄 45 d 和 100 d 的斑马鱼脑存在明暗不同的区域,这种差异是与脑发育有关的。

3.2 比较 OCT 断层结果与切片染色结果

病理学切片染色多从冠状面和水平面两个视角观察斑马鱼大脑结构,因此本文从三维 OCT 图像中提取了冠状面和水平面的 OCT 断层结果。图 3 显示

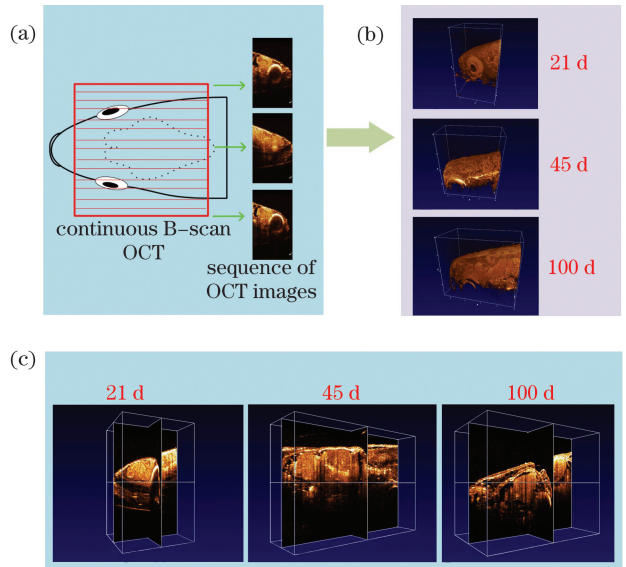


图 2 斑马鱼头部的 OCT 活体成像。(a)连续的 B 扫描 OCT 图像；(b)重建的三维 OCT 图像；(c)三维 OCT 图像的虚拟分割结果

Fig. 2 OCT *in vivo* imaging of zebrafish head. (a) Continuous B-scan OCT images; (b) constructed three-dimensional OCT images; (c) virtual segmentation results of three-dimensional OCT images

的是冠状面的 OCT 图和切片染色图,其中绿色虚线标注的是大脑的前部、中部和后部。从图 3 中可见斑马鱼大脑为轴对称结构。由于颅骨薄,日龄 21 d 斑马鱼的 OCT 图像显示,大脑对比度较高;切片染色图显

示,细胞核密集的区域被苏木素染为深蓝色,在中脑和后脑 OCT 图像中对应区域的信号强度相对较弱。日龄 45 d 的斑马鱼脑结构最显著的特点是空腔的出现,其在后脑的 OCT 图和病理图中都清晰可见,前脑

中间出现明显的分界。如蓝色箭头所示,由于表皮和颅骨厚度的增加,日龄 100 d 的斑马鱼大脑图像对比度有所降低,中脑区域形成了面积较大的低信号强度区域,大脑与颅骨之间的边界更加明显。

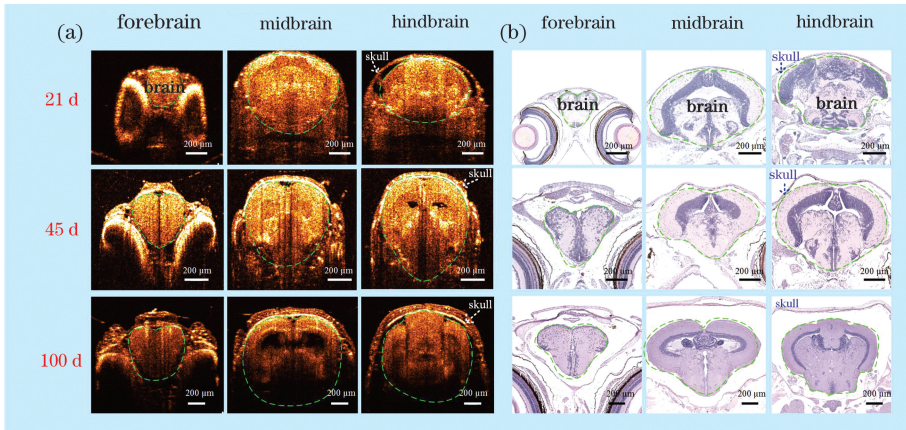


图 3 三个年龄段斑马鱼大脑的冠状面图像。(a) OCT 图;(b)切片染色图

Fig. 3 Coronal views of images of zebrafish brains from three age groups. (a) OCT images; (b) sectional staining images

斑马鱼大脑的水平面图像如图 4 所示。可以看出,三个年龄段的斑马鱼大脑结构存在着显著的不同,21 d 斑马鱼大脑结构紧凑,45 d 的时候已经出现

分化,到 100 d 的时候大脑形成了明显的分区。样品缩水导致切片染色图与 OCT 图像略有失配,但总的来讲 OCT 图像可以媲美切片染色结果。

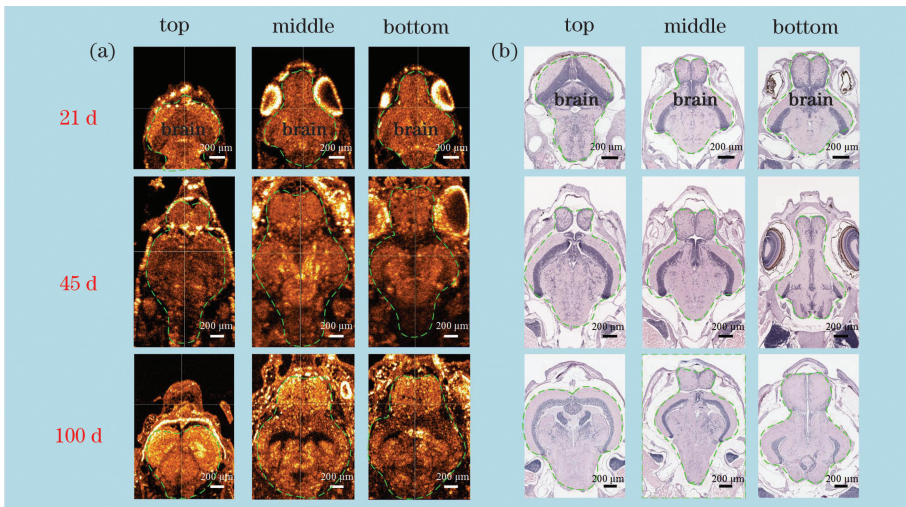


图 4 三个年龄段斑马鱼大脑的水平面图像。(a) OCT 图;(b)切片染色图

Fig. 4 Horizontal views of images of zebrafish brains from three age groups. (a) OCT images; (b) sectional staining images

3.3 测量不同日龄斑马鱼大脑的体积

大脑体积是评价脑发育程度的一个重要指标,利用图像分割方法,将脑组织从颅骨和其他组织的包围中剥离出来,结果图 5(a)所示。对重建的大脑三维图像进行体积测量,并对测量的脑体积数据求平均值和标准差,结果如图 5(b)所示。对比发现,日龄 100 d 的斑马鱼相比日龄 21 d 的斑马鱼,在

80 d 的发育期内大脑体积增大了约 5 倍。这个定量结果进一步说明,孵化后的斑马鱼在到达成年之前,大脑发育迅速。

4 讨 论

与哺乳动物类似,斑马鱼大脑位于颅骨的下方,斑马鱼的大脑尺寸会从幼年阶段的几十微米增大到

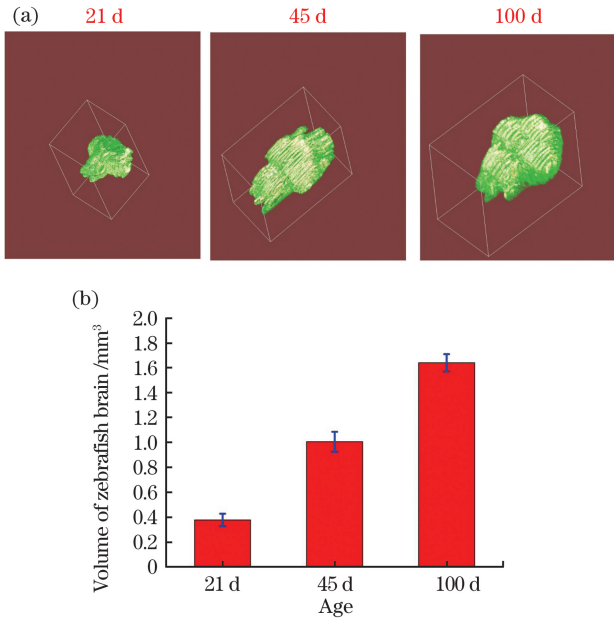


图 5 测量斑马鱼大脑的体积。(a)斑马鱼大脑的三维图像;(b)大脑体积测量结果

Fig. 5 Measured brain volume of zebrafish. (a) Three dimensional images of zebrafish brains; (b) measured results of brain volume

表 1 斑马鱼活体成像技术的对比^[8, 11, 25-28]

Table 1 Comparison of *in vivo* imaging techniques of zebrafish^[8, 11, 25-28]

Imaging technique	Contrast source	Resolution	Penetration depth	Imaging object	Imaging speed	Label	Cost
Confocal microscopy	Fluorescence	<1 μm	<500 μm	Embryo	Low	Yes	* * *
Light sheet microscopy	Fluorescence	1-10 μm	0.1-5 mm	Embryo and infant	Fast	Yes	* * *
Photoacoustic tomography	Optical absorption	100 μm-1 mm	<10 mm	Adult	Fast	No	* * *
Micro-CT	X-ray attenuation	2-3 mm	No limited	Adult	Medium	No	* * *
MRI	H ⁺ concentration	2-3 mm	No limited	Adult	Low	No	* * * *
OCT	Optical scattering	1-10 μm	2-3 mm	Infant and adult	Fast	No	* *

积, OCT 图像测量结果大于切片染色测量结果; 对于日龄 100 d 的斑马鱼脑面积, OCT 图像测量结果约为切片染色测量结果的 2 倍。观察图 4 可以发现, 在三个年龄段的 OCT 图像中, 脑组织与颅骨之间的距离是很小的, 但是切片染色结果显示, 脑组织与颅骨之间的距离随着日龄的增大而增大。图 6(d)~(e) 是三个年龄段颅骨和脑间距的放大结果, 在放大倍率相同的情况下, 对比三条绿色虚线的长度, 可以更加清晰地看到颅骨和脑组织分离的现象。虽然切片染色结果和 OCT 测量结果都证实斑马鱼

成年阶段的 1 mm 左右。目前, 共聚焦成像、光片显微、光声成像、微计算机断层扫描技术(Micro-CT)、核磁共振成像(MRI)以及 OCT 等技术都被用于斑马鱼的活体成像^[8, 11, 25-28]。表 1 对这些活体成像技术的特点进行了分析, 对比可以发现, 荧光成像的成像深度较小, 光声成像的对比度较低, Micro-CT 和 MRI 的成像分辨率不足且仪器成本高昂。OCT 兼具较高的成像分辨率和较大的成像深度, 在成像范围、成像速度和装置成本方面也有优势, 因此 OCT 非常适用于斑马鱼大脑的活体成像。

目前仍然广泛使用的切片染色技术可以高分辨率地显示大脑的组织结构, 但切片染色存在周期长、需要处死动物等问题。此外, 生物组织会在切片染色过程中发生形变, 这对组织尺寸的测量会产生很大的影响。对图 3 所示的冠状面切片染色结果和 OCT 图像中大脑区域的面积进行了测量, 并同一年龄段三条斑马鱼的面积数据求平均值和标准差, 结果如图 6(a)~(c) 所示。对比可以发现, 对于日龄 21 d 的斑马鱼脑面积, 切片染色结果和 OCT 图像测量结果相差不大; 对于日龄 45 d 的斑马鱼脑面

积, OCT 图像测量结果大于切片染色测量结果; 对于日龄 100 d 的斑马鱼脑面积, OCT 图像测量结果约为切片染色测量结果的 2 倍。观察图 4 可以发现, 在三个年龄段的 OCT 图像中, 脑组织与颅骨之间的距离是很小的, 但是切片染色结果显示, 脑组织与颅骨之间的距离随着日龄的增大而增大。图 6(d)~(e) 是三个年龄段颅骨和脑间距的放大结果, 在放大倍率相同的情况下, 对比三条绿色虚线的长度, 可以更加清晰地看到颅骨和脑组织分离的现象。虽然切片染色结果和 OCT 测量结果都证实斑马鱼

地构建三维立体结果,实现大脑体积的测量。综合以

上讨论,OCT 在评估斑马鱼大脑发育方面有优势。

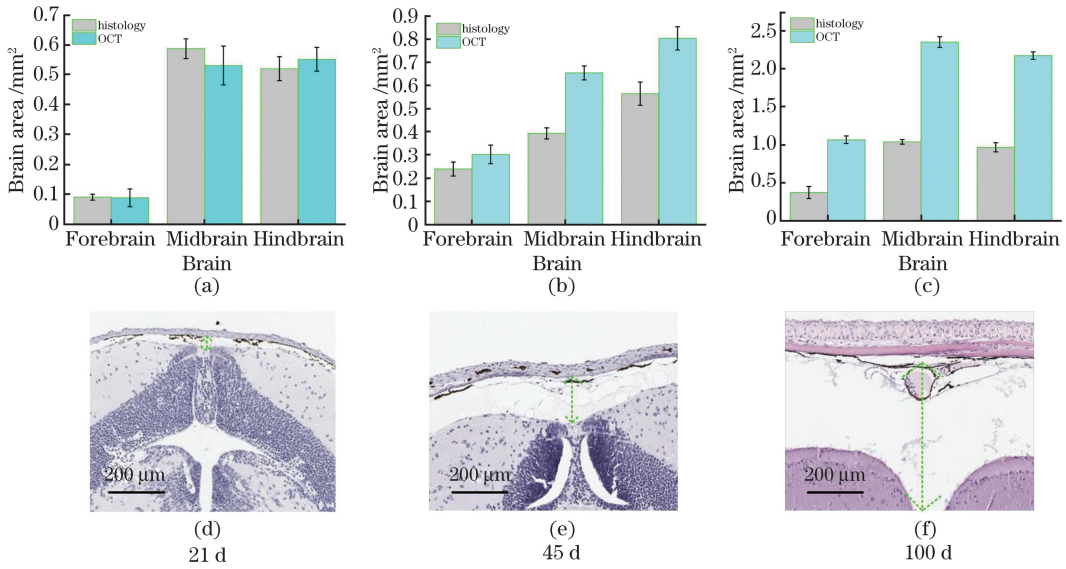


图 6 基于图 4 得到的斑马鱼大脑的面积。(a)~(c)切片染色结果和 OCT 结果的对比;(d)~(f)放大的切片染色结果
Fig. 6 Brain area of zebrafish obtained based on Fig. 4. (a)–(c) Comparison of sectional staining results and OCT results; (d)–(f) enlarged sectional staining results

5 结 论

验证了对孵化后 21, 45, 100 d 斑马鱼大脑进行 OCT 活体三维可视化处理的可能性。OCT 成像结果和切片染色结果共同证实,从幼年到成年阶段,斑马鱼大脑发育迅速。将虚拟分割技术与三维 OCT 图像结合,可从冠状面和水平面多层次显示脑结构,并定量测量脑体积。在图像质量媲美病理结果的同时,OCT 的活体成像和三维成像能力使其具有独特的优势。OCT 作为一种新型大脑活体成像技术,可应用于基于斑马鱼的脑发育和衰退相关的研究中。

参 考 文 献

[1] Li P P, Ma T, Zhang X, et al. Enlightenment for China's brain science innovation from global brain projects[J]. Journal of Tongji University (Medical Science), 2019, 40(4): 397-401.
李萍萍, 马涛, 张鑫, 等. 各国脑计划实施特点对我国脑科学创新的启示[J]. 同济大学学报(医学版), 2019, 40(4): 397-401.

[2] Poo M M, Du J L, Ip N, et al. China brain project: basic neuroscience, brain diseases, and brain-inspired computing[J]. Neuron, 2016, 92(3): 591-596.

[3] Kalueff A V, Stewart A M, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2014, 35(2): 63-75.

[4] Stewart A M, Braubach O, Spitsbergen J, et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside [J]. Trends in Neurosciences, 2014, 37(5): 264-278.

[5] Huang C N, Zhang J J. Research progress on the application of zebrafish in central nervous system diseases [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2018, 26(3): 392-397.
黄春念, 张晶晶. 模式动物斑马鱼在中枢神经系统疾病研究中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 392-397.

[6] Jiang P C, Wei W, Hu F, et al. Study of stripe regeneration of zebrafish based on laser ablation technology[J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207024.
蒋鹏翀, 魏巍, 胡芬, 等. 基于激光消融技术的斑马鱼条纹再生的研究[J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207024.

[7] Zhu Y, Yang G, Li S M, et al. Quantitative polarization imaging of zebrafish muscle structures [J]. Acta Optica Sinica, 2019, 39(8):0811001.
朱雨, 杨光, 李思愚, 等. 斑马鱼肌肉结构的定量偏振成像[J]. 光学学报, 2019, 39(8):0811001.

[8] Randlett O, Wee C L, Naumann E A, et al. Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas [J]. Nature Methods, 2015, 12(11): 1039-1046.

[9] Sun L, Du J L. Progress in brain neural connectomics[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2018, 48(3): 253-265.
孙乐, 杜久林. 大脑神经连接图谱的研究进展[J]. 中

- 国科学:生命科学, 2018, 48(3): 253-265.
- [10] Keller P J, Ahrens M B, Freeman J. Light-sheet imaging for systems neuroscience [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 27-29.
- [11] Kishi S, Uchiyama J, Baughman A M, et al. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence [J]. *Experimental Gerontology*, 2003, 38(7): 777-786.
- [12] Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography [J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- [13] Fercher A F, Drexler W, Hitzenberger C K, et al. Optical coherence tomography—principles and applications [J]. *Reports on Progress in Physics*, 2003, 66(2): 239-303.
- [14] Han T, Qiu J R, Wang D, et al. Optical coherence microscopy and its application [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207004.
韩涛, 邱建榕, 王迪, 等. 光学相干层析显微成像的技术与应用 [J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207004.
- [15] Yaqoob Z, Wu J G, Yang C. Spectral domain optical coherence tomography: a better OCT imaging strategy [J]. *BioTechniques*, 2005, 39(6S): S6-S13.
- [16] Li P, Yang S S, Ding Z H, et al. Research progress in Fourier domain optical coherence tomography [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 0207011.
李培, 杨姗姗, 丁志华, 等. 傅里叶域光学相干层析成像技术的研究进展 [J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 0207011.
- [17] Wei B, Yuan Z L, Tang Z L. Three-dimensional imaging of tumor tissues based on photothermal optical coherence tomography [J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(4): 0411002.
魏波, 袁治灵, 唐志列. 基于光热光学相干层析技术的肿瘤组织三维成像 [J]. *光学学报*, 2020, 40(4): 0411002.
- [18] Pan L H, Zhang X Y, Li Z L, et al. Blood flow measurement with photoacoustic microscopy and optical coherence tomography [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(6): 0607004.
潘柳华, 张向阳, 李中梁, 等. 基于光声-光学相干层析成像的血流测量技术 [J]. *中国激光*, 2018, 45(6): 0607004.
- [19] Jang I K, Bouma B E, Kang D H, et al. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002, 39(4): 604-609.
- [20] Nassif N, Cense B, Park B H, et al. *In vivo* high-resolution video-rate spectral-domain optical coherence tomography of the human retina and optic nerve [J]. *Optics Express*, 2004, 12(3): 367-376.
- [21] Østby Y, Tamnes C K, Fjell A M, et al. Heterogeneity in subcortical brain development: a structural magnetic resonance imaging study of brain maturation from 8 to 30 years [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2009, 29(38): 11772-11782.
- [22] Divakar Rao K, Alex A, Verma Y, et al. Real-time *in vivo* imaging of adult zebrafish brain using optical coherence tomography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2009, 2(5): 288-291.
- [23] Zhang J, Ge W, Yuan Z. *In vivo* three-dimensional characterization of the adult zebrafish brain using a 1325 nm spectral-domain optical coherence tomography system with the 27 frame/s video rate [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(10): 3932-3940.
- [24] Zhang J, Zhang Z W, Ge W, et al. Long-term *in vivo* monitoring of injury induced brain regeneration of the adult zebrafish by using spectral domain optical coherence tomography [J]. *Chinese Optics Letters*, 2016, 14(8): 081702.
- [25] Bai X, Qi Y M, Liang Y Z, et al. Photoacoustic computed tomography with lens-free focused fiber-laser ultrasound sensor [J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(5): 2504-2512.
- [26] Seo E, Lim J, Seo S J, et al. Whole-body imaging of a hypercholesterolemic female zebrafish by using synchrotron X-ray micro-CT [J]. *Zebrafish*, 2015, 12(1): 11-20.
- [27] Merrifield G D, Mullin J, Gallagher L, et al. Rapid and recoverable *in vivo* magnetic resonance imaging of the adult zebrafish at 7T [J]. *Magnetic Resonance Imaging*, 2017, 37: 9-15.
- [28] Lin Y P, Chen T R, Mao G J, et al. Long-term and *in vivo* assessment of A β protein-induced brain atrophy in a zebrafish model by optical coherence tomography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13(7): e202000067.