

吊灯样细胞在屏状核内的分布特性及连接模式

邹义 邵一琳[△]

(复旦大学脑科学研究院脑功能与脑疾病全国重点实验室,教育部脑科学前沿科学中心 上海 200032)

【摘要】 目的 探索屏状核内吊灯样细胞的分布、神经支配模式及其所接收的长程输入。方法 通过逻辑取交的方式,以 *Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65* 转基因小鼠对屏状核中的吊灯样细胞进行高效、特异的标记。利用连续切片方法完成对吊灯样细胞在整个屏状核结构内,即从前部到后部的细胞密度和神经支配模式的分析。利用跨突触狂犬病毒逆向示踪技术对屏状核内吊灯样细胞输入性突触前投射神经元展开逆行单突触追踪,揭示屏状核中吊灯样细胞的长程输入模式。通过分层分析和免疫荧光染色,对投射至屏状核内吊灯样细胞的突触前投射神经元细胞类型进行探索。结果 逻辑取交方式(*Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65*)标记结果显示,吊灯样细胞在屏状核内密集分布,其细胞密度从屏状核结构前部至后部逐渐增加;然而被吊灯样细胞支配的细胞占比并未随屏状核前后轴变化而改变,约为 67.72%。逆行单突触示踪结果显示,屏状核内的吊灯样细胞广泛接收来自嗅觉皮层、前额叶皮层、感觉运动皮层以及众多皮层下结构的长程投射。进一步对长程输入神经元的细胞类型进行分析显示,皮层投射至屏状核内吊灯样细胞的神经元主要分布在皮层的第 5 层,少量细胞位于第 2/3 层和第 6 层。而从腹侧苍白球投射至屏状核内吊灯样细胞的神经元主要包括 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能神经元和谷氨酸能神经元。结论 吊灯样细胞在屏状核内分布广泛,且在该区域内的分布模式及投射连接层面有显著的独特性,反映出屏状核结构在前后轴上的潜在差异,以及其连接模式存在细胞特异性。

【关键词】 屏状核; 中间神经元; 吊灯样细胞(AACs); 狂犬病毒逆向示踪; *Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65* 小鼠; 逻辑取交

【中图分类号】 Q421 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2026.01.001

The distribution and connection patterns of axo-axonic cells in the claustrum

ZOU Yi, TAI Yi-lin[△]

(State Key Laboratory of Brain Function and Disorders, Ministry of Education Frontiers Center for Brain Science, Institutes of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the distribution, the innervation pattern, and the long-range input of the axo-axonic cells (AACs) within the claustrum (CLA). **Methods** *Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65* mouse intersectional genetic strategy was applied to specifically label AACs in the CLA. By serial sections, the cell density and innervation patterns of AACs from the anterior to the posterior of CLA were analyzed. The monosynaptic retrograde rabies virus (RV) tracing was employed to unveil the synaptic input pattern of AACs in the CLA, revealing the long-range synaptic input patterns of AACs in the CLA. Finally, the layer analysis and immunofluorescent staining was conducted to explore the cell types of these presynaptic projection neurons. **Results** The result from intersectional strategy (*Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65* mouse) indicated that the AACs were densely distributed in the CLA and the cell

国家自然科学基金面上项目(32371006)

[△]Corresponding author E-mail: taiyilin@fudan.edu.cn

网络首发时间:2026-01-09 17:18:06 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20260109.1428.002>

density of the AACs increased along the anterior-posterior axis, yet the percentage of neurons innervated by the AACs, approximately 67.72%, remained unchanged. Retrograde monosynaptic tracing of long-range input to AACs unveiled a synaptic input pattern from various regions, including olfactory, prefrontal, sensorimotor cortices and numerous subcortical structures. The exploration of the cell types of these presynaptic projection neurons revealed that the neurons projecting from the cortex to the AACs in CLA were mainly distributed in layer 5 of the cortex, with a small number of cells located in layers 2/3 and 6. Additionally, the neurons projecting from the ventral pallidum (VP) to the AACs in CLA mainly included GABAergic neurons and glutamatergic neurons. **Conclusion** The AACs were densely and widely distributed in the CLA with a distinct feature of distribution pattern and projection connectivity, which reflects the potential differences in the structure of the claustrum along the anterior-posterior axis and the cellular specificity of its connection patterns.

【Key words】 claustrum; interneuron; axo-axonic cells (AACs); retrograde rabies tracing; *Unc5b-CreER*; *Nkx2.1-Flp*; *Ai65* mouse; intersectional strategy

* This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (32371006).

屏状核是一个狭长、带状的脑区,位于大脑皮层和皮层下区域之间^[1-2]。由于其连接皮层和皮层下结构的特殊解剖位置,加之其广泛的遍布全脑的投射模式,屏状核长期以来一直被视为参与大脑基本认知进程的关键枢纽^[3-5]。越来越多的证据表明,这个在哺乳动物中高度保守的结构,可能参与执行多种高级功能,且主要依赖于屏状核与大脑其他区域的密集双向连接^[6]。迄今为止,通过传统神经束路追踪技术,研究人员已在多种哺乳动物中系统、深入地研究了屏状核的投射连接模式。结果表明,屏状核与多个皮层区域及皮层下核团形成相互投射^[6-7]。如此独特的结构和解剖特征,使其能够在大脑皮层和皮层下结构之间建立通信,进行快速的信息传递。然而,由于屏状核结构较为狭小冗长,位于大脑深层区域,且缺乏特异性标记物,其细胞组成和突触连接模式规律在很大程度上仍然未知^[4]。

对于缺乏外囊与极外囊等白质结构的物种,如啮齿动物,屏状核的精确定位和边界划分至今仍存在争议^[8]。从解剖位置的角度来看,屏状核位于皮层区域以外,可以较为明确地被归类为皮层下结构。然而,当从发育起源和基因表达谱的角度考虑时,屏状核与大脑皮层表现出显著的相似性^[9]。现有研究揭示了屏状核复杂的发育轨迹,表明其祖细胞来源于内侧神经节隆起(medial ganglionic eminences, MGE)^[10]。这一区域产生了多种细胞群,其中大多迁移至包括大脑皮层和海马体在内的关键区域。屏状核与这些皮层相关区域有着相同

的神经起源,这暗示着两者在早期神经发育过程中可能共享相似的分子调控机制。最近研究发现,一种仅在哺乳动物皮层区域中被区分出来的独特 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能中间神经元——吊灯样细胞,同样存在于屏状核中^[11],这支持了屏状核起源于皮层的假说。吊灯样细胞以其独特的类似吊灯的细胞形态而得名,特异性地支配锥体神经元的轴突起始段(axon initial segments, AIS)^[12-13]。由于AIS是动作电位起始的位点,且单个吊灯样细胞能够支配其附近数百个锥体神经元,因此吊灯样细胞被认为对锥体神经元群体的动作电位发放起着决定性的控制作用,进而调节神经网络活动和信息传递^[14]。

中间神经元在屏状核中发挥着至关重要的功能^[15]。研究表明,屏状核内接收到来自皮层的输入信号,会受到局部相互连接的中间神经元的强烈抑制,从而形成一种特殊的抑制“阀门”机制。这种机制可以允许较强的超过阈值的信号通过,并进一步放大和传播,进而对输入信号的强度进行筛选^[16]。屏状核内部分中间神经元空间相对分布是划分屏状核边界的重要定义标准之一^[17]。然而,以往对屏状核内细胞的分类和连接研究主要聚焦在兴奋性投射神经元上^[18],至于中间神经元,则大部分局限于分别表达小清蛋白(parvalbumin, PV)、生长抑素(somatostatin, SST)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)这3个研究较为充分且数量较为丰富的中间神经元亚类。针对屏状核中吊灯

样细胞的研究进展相对缓慢,相关研究非常有限^[19]。直到最近,有研究利用遗传标记技术,明确揭示了屏状核中吊灯样细胞的存在,并对这些细胞的形态特征进行了描述^[11]。这些研究主要停留在形态学层面,对于吊灯样细胞在屏状核内的分布情况、与其他脑区的连接模式等涉及较少。

本研究中,我们通过逻辑取交的方式,以 *Unc5b-CreER;Nkx2.1-Flp;Ai65* 转基因小鼠,对屏状核中的吊灯样细胞进行高效、特异的标记,全面描述了屏状核内吊灯样细胞的分布和神经支配模式,并对其所接收的长程输入进行了深入的研究。

材料和方法

实验材料

动物 本研究中所有动物实验均严格遵照复旦大学《动物研究与使用指南》进行,通过复旦大学基础医学院伦理委员会审批(批准号:20230301-117)。所有小鼠均饲养于清洁级动物房内,温度控制在 20℃~24℃,相对湿度为 40%~60%,并严格遵循 12 h 光照/黑暗循环,提供自由获取的食物和水,以确保最佳的动物健康状态。本研究中将出生后第 1 天(P1)定义为出生日期,使用的小鼠年龄在 P30~P63。所有实验程序均同时纳入雄性和雌性小鼠。本实验主要使用的转基因小鼠品系 *Unc5b-CreER* 和 *Nkx2.1-Flp* 由美国杜克大学医学院的 Z. J. Huang 教授提供, *Rosa26-loxpSTOPlox-pftrtSTOPftrt-TdTomato* (Ai65) 购自美国 Jackson 实验室;三者杂交后得到 *Unc5b-CreER;Nkx2.1-Flp;Ai65* 转基因小鼠模型。本研究中所有转基因小鼠均为杂合子。

抗体 实验中所涉及的一抗试剂主要包括:兔抗-RFP(1:10 000,美国 Rockland 公司);鸡抗-GFP(1:10 000,美国 Aves Labs 公司);豚鼠抗-VGAT(1:500,英国 Synaptic Systems 公司);小鼠 IgG2a 抗锚蛋白 G(1:500,美国 Millipore 公司);小鼠 IgG1 抗-VACHT(囊泡乙酰胆碱转运蛋白)(1:2 000,美国 Neuromab 公司);兔抗谷氨酸盐(1:2 000,美国 Sigma 公司);兔抗-GABA(1:2 000,美国 Millipore 公司)。

实验中所涉及的二抗试剂均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,主要包括:Alexa Fluor (AF) 488 山羊抗小鼠 IgG1(1:1 000);AF 488 山羊抗小鼠

IgG2a(1:1 000);AF 488 山羊抗豚鼠(1:1 000);DyLight 488 山羊抗鸡(1:1 000);AF 555 山羊抗兔(1:2 000);AF 555 山羊抗小鼠 IgG1(1:1 000);AF 555 山羊抗小鼠 IgG2a(1:2 000);AF 647 山羊抗小鼠 IgG2a(1:1 000);AF 647 山羊抗小鼠 IgG1(1:1 000)。

病毒 实验中所涉及的病毒均购自深圳布林凯斯生物技术有限公司,种类及滴度如下:AAV-EF1 α -DIO-N2cG (5.9×10^{12} $\mu\text{g}/\text{mL}$);AAV-EF1 α -DIO-T2A-TVA (5.9×10^{12} $\mu\text{g}/\text{mL}$);CVS-EnvA- ΔG -tdtomato (7.0×10^8 $\mu\text{g}/\text{mL}$);AAV2/9-hSyn-EGFP (1.2×10^{13} $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

实验方法

他莫西芬诱导表达 将他莫西芬超声溶解于玉米油,浓度达到 20 g/L,储存于 4℃,制备后 1 个月内使用。他莫西芬以每 20 g 体质量 2 mg 的剂量进行腹腔注射。为了对吊灯样细胞进行密集标记,向 *Unc5b-CreER;Nkx2.1-Flp;Ai65* 小鼠连续注射 5 天他莫西芬,充分表达 14 天后,灌注、取脑。在跨突触逆行追踪实验中,感染了 Cre 依赖的 AAV-DIO-TVA 的 *Unc5b-CreER* 小鼠在手术后第 2 天(分别为 P30 和 P32)同样用他莫西芬诱导,充分表达后进行下一步实验。

小鼠灌注、取脑及振荡切片 小鼠吸入异氟烷(3%)进行麻醉,使用注射器以稳定的流速心脏灌注约 25 mL 的 PBS,完成后继续以相同方式灌注约 20 mL 的 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)。心脏灌注完成后,完整取出整个大脑,置于含 4% PFA 的 50 mL 离心管中。将离心管置于 4℃ 环境下过夜放置。次日将 PFA 吸出,加入适量的 30% 蔗糖溶液进行过夜的沉糖操作。

取出鼠脑,用振动切片(Leica,VT1000S,德国 Wetzlar 公司)冠状切片,厚度 50 μm 。切片过程中,将切下的脑片按切片的先后顺序,依次放入预先装有 PBS 的 12 孔板中。完成收集后,将 12 孔板置于 4℃ 的环境中保存。当进行连续切片时,预备 3 块 12 孔板并编号。从嗅球到小脑,将切下脑片按顺序依次收入。

免疫荧光染色 向 48 孔板内每孔中加入 200 μL 含有 10% 正常山羊血清(normal goat serum, NGS)和 0.3% Triton X-100 的封闭液及一抗,混匀。将脑片移至 48 孔板内,室温摇床孵育过夜。完成后取出脑片,放在 6 孔板中,加入适当 PBS,于摇床上清洗

30 min。清洗结束后,向48孔板每孔中加入200 μL 含有二抗的溶液,放入脑片。将48孔板放置在摇床上,在室温条件下遮光染色2 h。染色完成后,取出脑片,放在6孔板中,加入适当DAPI-PBS混合溶液,于摇床上染色15 min。随后取出脑片,更换6孔板,加入适当PBS,对脑片清洗30 min。清洗后,将脑片贴于载玻片,用封片剂覆盖并盖好盖玻片。

脑立体定位注射 利用异氟烷(1.5%浓度与氧气混合,强度1.0 L/min)对小鼠麻醉,将其大脑平稳固定到小鼠适配器上。将小鼠颅骨充分暴露,利用立体定位仪调整小鼠颅骨的位置,使前后方向和左右方向均达到水平状态。根据脑图谱确定注射位点。屏状核注射位点前后方向,A/P:1.34 mm;内外侧方向,M/L: ± 2.25 mm;背腹方向,D/V:-3.6 mm。腹侧苍白球注射位点前后方向,A/P:0.26 mm;内外侧方向,M/L: ± 1.50 mm;背腹方向,D/V:-5.25 mm。在目标脑区上方钻孔,将玻璃电极吸取适量的病毒,并移至目标脑区。到达目标深度后,保持玻璃电极静止3 min,开始缓慢注射病毒。注射完成后,再次保持玻璃电极停留在原位7 min。随后拔出玻璃电极,取下小鼠适配器,清理小鼠颅骨表面。缝合小鼠头皮切口,待小鼠完全苏醒且恢复自主活动能力后,将其放回鼠笼内。

狂犬病病毒逆向示踪及AAV2/9-hSyn-EGFP-WPRE-pA病毒注射 狂犬病病毒逆向示踪实验主体包括两个阶段。第一阶段:在P28向*Unc5b-CreER*小鼠屏状核区域注射包含AAV-EF1 α -DIO-N2cG (5.9×10^{12} $\mu\text{g}/\text{mL}$)和AAV-EF1 α -DIO-T2A-TVA (5.8×10^{12} $\mu\text{g}/\text{mL}$)的混合制剂70 nL,立体定位操作流程同上,2天后进行他莫西芬诱导,随后等待21天。第二阶段:在第一阶段病毒充分表达后,再向同一位点注射100 nL的CVS-EnvA- ΔG -tdTomato病毒,待7天后细胞被标记较为完全,对小鼠进行灌流、取脑等一系列操作。

腹侧苍白球AAV2/9-hSyn-EGFP-WPRE-pA病毒示踪实验 选择在P28向*Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65*小鼠腹侧苍白球区域注射AAV2/9-hSyn-EGFP-WPRE-pA (1.2×10^{13} $\mu\text{g}/\text{mL}$)病毒50 nL。立体定位操作流程同上。2天后进行他莫西芬诱导,随后等待7天使病毒充分表达,对小鼠进行灌流、取脑、切片等一系列操作。

图像采集与分析 图像通过研究型玻片扫描

仪VS200,日本奥林巴斯公司)和AX共聚焦激光扫描显微镜(日本尼康公司)采集。所有图像均使用Fiji软件(<https://fiji.sc/>)进行处理和分析。细胞密度通过Fiji软件计算的细胞数量除以屏状核面积得出。为了确定屏状核中被吊灯样细胞支配的细胞百分比,我们使用共聚焦激光扫描显微镜60 \times 油镜,采用Z轴扫描模式覆盖整个AIS和附着的轴突末端,最佳深度间隔为0.55 mm。如果一个AIS上连续附着有两个及以上来自吊灯样细胞的红色荧光蛋白阳性轴突末端,我们将其定义为“被支配”。通过屏状核内被支配细胞的比例(被支配的AIS数目/AIS总数目),评估吊灯样细胞的神经支配状况。

统计学分析 使用GraphPad Prism 9软件进行统计分析和数据绘图,图表均使用Illustrator软件制作。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据之间的比较采用非配对双尾Students's *t*检验,多组数据采用ANOVA方差统计分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

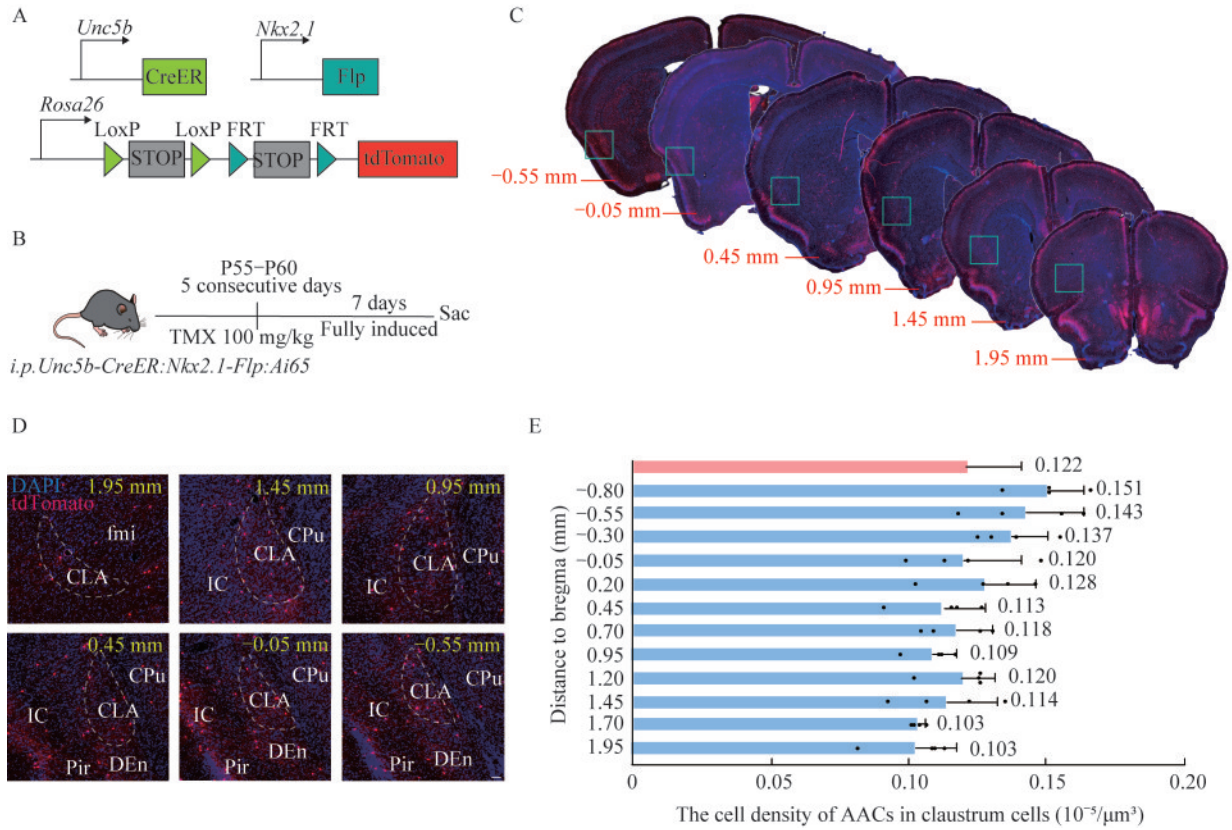
结 果

吊灯样细胞在屏状核内有着密集分布 本实验使用了两种小鼠品系:基因敲入小鼠品系*Unc5b-2A-Cre^{ERT2}*(以下简称*Unc5b-CreER*)和*Nkx2.1-Flp*(图1A)。通过将*Unc5b-CreER*和*Nkx2.1-Flp*杂交,我们成功在吊灯样细胞中特异性表达Cre和Flp两种重组酶。将*Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp*与双重重组酶依赖的报告基因小鼠品系*Ai65*相结合,实现了在吊灯样细胞中特异性表达红色荧光蛋白tdTomato,进而对多个脑区中吊灯样细胞进行了高效且特异性标记。为了确保密集标记,我们从小鼠出生后第55天(P55)到第60天(P60)连续5天每天对其腹腔注射他莫西芬进行诱导。1周后,待荧光蛋白充分表达,处死小鼠,并对脑切片进行染色和分析,以显示吊灯样细胞在全脑,包括屏状核内的分布情况(图1B)。

在*Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65*小鼠模型的帮助下,我们发现,吊灯样细胞广泛分布于大脑的皮层以及部分皮层下结构中,包括新皮层、海马结构、岛叶皮层、梨状皮层和杏仁核等区域,这一标记方法在整个大脑前后范围内对吊灯样细胞的标记效果保持一致(图1C)。吊灯样细胞在屏状核的整个结构中呈现出较为密集分布状态(图1D),平

均细胞密度约为 $0.122 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^3$ 。此外,我们发现屏状核内吊灯样细胞的细胞密度存在一定结构差

异,呈现出从前端到后端呈现逐渐递增的趋势(图 1E)。



A: Strategy of intersectional labeling (tdTomato) of the AACs; B: Induction process using TMX; C: Serial and equally spaced images revealing distribution of AACs across multitudinous cerebral cortex; D: The serially selected images revealing the distribution of AACs in the claustrum. Scale bar: 50 μm . E: The cell density of AACs within the claustrum from anterior to posterior ($n=48$ brain slices, 4 mice).

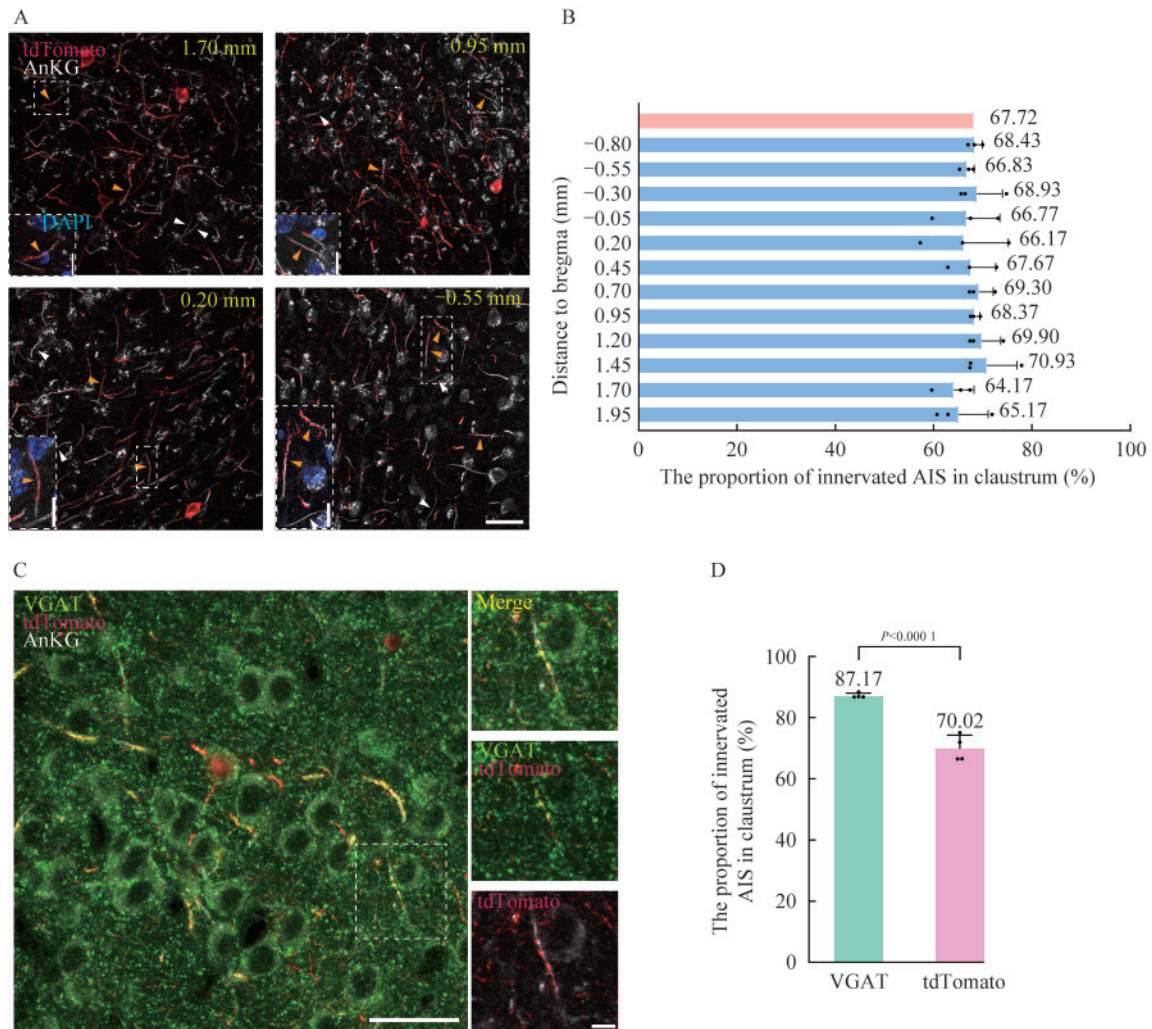
图 1 转基因模型 *Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp: Ai65* 揭示屏状核中吊灯样细胞的分布情况

Fig 1 Distribution of AACs in the claustrum revealed by *Unc5b-CreER: Nkx2.1-Flp: Ai65*

屏状核中吊灯样细胞的支配模式 为了进一步探究屏状核内吊灯样细胞的输出情况,我们通过密集诱导,即连续 5 天对 *Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp: Ai65* 小鼠以 2 mg/20 g 体质量的剂量腹腔注射浓度为 20 mg/mL 的他莫西芬,在 *Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp: Ai65* 小鼠大脑内广泛特异地标记了吊灯样细胞。同时,使用针对 AIS 的标志物 ankyrin-G (AnkG) 进行免疫荧光染色,从而标记出屏状核中的 AIS 结构。我们发现,屏状核内 AIS 的走向较为杂乱且相互交织,这可能是由于该区域的兴奋性神经元会向多个区域进行投射(图 2A)。屏状核中大约 67.72% 的 AIS 受到了支配,与吊灯样细胞的细胞密度从屏状核前部到后部逐渐增加的情况不同,被支配的 AIS 的比例在前后轴上并没有显著的差异,这表明屏状核不同亚区域内的吊灯样细胞在解

剖学特征上可能存在细微差异(图 2B)。

对屏状核区域内的 γ -氨基丁酸能神经突触的标志物——GABA 囊泡转运体 (vesicular GABA transporter, VGAT) 进行免疫荧光染色的结果发现,几乎所有由 tdTomato 红色荧光蛋白标记的突触末梢“cartridges”结构都含有 VGAT 信号(图 2C),这表明所标记的套索样结构具有抑制性特征。与此同时,我们观察到 87.17% 的 AIS 与多个 VGAT 阳性斑点存在共标记现象,这意味着 87.17% 的 AIS 受到 GABA 能突触支配(图 2D)。这一比例显著高于由 *CreER:Nkx2.1-Flp: Ai65* 小鼠品系所标记的被吊灯样细胞支配的 AIS 的比例,表明屏状核内可能如同其他脑区一样,在 AIS 存在其他的 GABA 能输入来源,或者 *Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp: Ai65* 小鼠品系未能标记出屏状核内所有的吊灯样细胞。



A: The serially selected images showing the AISs innervated by AACs cartridges in the CLA. Scale bar: 30 μ m; 10 μ m in the inset. B: Percentage of AISs innervated by AACs from anterior to posterior CLA ($n=3$ mice). C: Immunofluorescence staining against VGAT (green), AnKG (white), and tdTomato in the CLA; Scale bar: 30 μ m; 5 μ m in the inset. D: The percentage of AISs innervated by VGAT and AACs. ($n=4$ mice, $P<0.0001$, unpaired t -test).

图2 屏状核中的轴突起始段受到 γ -氨基丁酸能突触的输入支配的比例

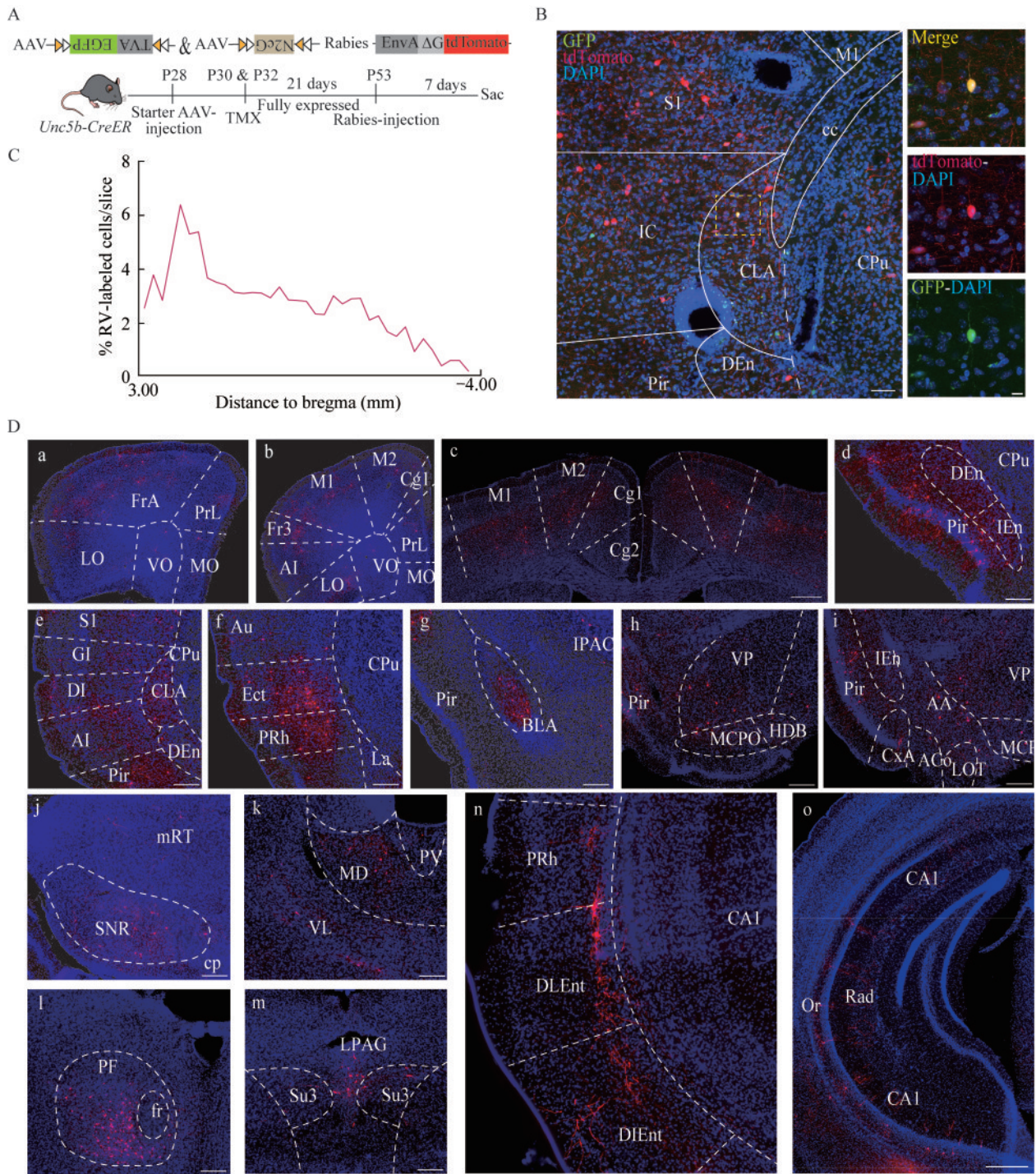
Fig 2 Percentage of AISs innervated by GABAergic input in the CLA

屏状核内吊灯样细胞的长程投射输入模式

将包膜糖蛋白A(envelope glycoprotein A, EnvA)假型化且缺失糖蛋白的狂犬病毒注射到 *Unc5b-CreER* 转基因小鼠品系的屏状核中(图3A)。为了提高注射的准确性,我们选择了屏状核中部背侧(前后轴位置:AP 1.34 mm,内外侧轴位置:ML 2.25 mm,背腹侧轴位置:DV -3.60 mm)进行注射。这一位点处在屏状核横切面较大的区域,可降低病毒扩散至其他脑区的风险。经过2次连续注射,狂犬病毒各个组成部分在屏状核内的目标细胞中成功表达并完成装配,并促使tdTomato在突触前神经元中实现逆行跨突触表达。起始细胞同时被依

赖于Cre重组酶的AAV辅助病毒和含有EnvA的狂犬病毒感染,会同时表达与TVA融合的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)以及蛋白外壳携带的红色荧光蛋白tdTomato,通过红绿双重标记可以清晰地识别这些起始细胞。结果发现双标记起始细胞的数量相对较少,并且大多数都局限在屏状核的边界内,这表明了注射的准确性(图3B)。

对全脑范围内被标记的投射至屏状核的突触前细胞进行全面统计分析。结果显示,突触前细胞广泛分布于大脑皮层和皮层下区域,主要集中在大脑皮层的前部区域,从前部至后部,标记到的投射



A: Schematic and procedure of presynaptic neurons tracing from AACs in claustrum. B: Injection sites of the retrograde rabies virus. Neurons were co-infected with the AAV helper virus (in green) and rabies virus (in red). Scale bar: 30 μ m on the left; 10 μ m on the right. C: The number of labeled cells gradually decreases along the anterior-posterior axis in the claustrum ($n=111$ brain slices, 3 mice). D: Cortical and subcortical presynaptic inputs to the AACs in the claustrum. a-f: Presynaptic neurons in prefrontal (a and b), cingulate (b and c), sensorimotor (c and f), olfactory (d) and insular (e) cortices. g-o: Presynaptic neurons labeled in other main brain regions, including BLA (g), VP (h), anterior amygdaloid area (i), substantia nigra (j), thalamus (k-l), periaqueductal gray (m) and hippocampus(n-o). Scale bar: 400 μ m for a-c; 200 μ m for d-m; 300 μ m for n-o.

图3 利用狂犬病病毒逆行示踪揭示屏状核内吊灯样细胞的输入情况

Fig 3 The input pattern of AACs in the claustrum revealed by retrograde rabies tracing

细胞呈递减趋势(图3C)。在这些区域中,同侧半球的标记细胞数量显著高于对侧半球,并且同侧的细胞广泛分布于皮层和皮层下结构,而对侧的细胞则主要局限于皮层区域(表1)。

表1 狂犬病毒逆行标记的突触前细胞在同侧半球和对侧半球分布数量的差异

Tab 1 The differences in the distribution of presynaptic cells retrogradely labeled by the rabies virus between the ipsilateral and contralateral cerebral hemispheres

| Cortical | Ipsilateral (cells) | Contralateral (cells) | Subcortical | Ipsilateral (cells) | Contralateral (cells) |
|----------|---------------------|-----------------------|-------------|---------------------|-----------------------|
| M2 | 375 | 246 | BLA | 327 | 96 |
| AI | 537 | 207 | CM | 102 | 0 |
| En | 369 | 174 | MPA | 21 | 0 |
| AO | 246 | 159 | CLA | 486 | 0 |
| S1 | 807 | 144 | PLH | 45 | 0 |
| LO | 462 | 141 | PMD | 24 | 0 |
| VO | 309 | 126 | PF | 192 | 0 |
| PrL | 186 | 123 | PV | 87 | 0 |
| FrA | 390 | 102 | Re | 111 | 0 |
| M1 | 450 | 270 | RM | 24 | 0 |
| Cg1 | 168 | 93 | PAG | 48 | 0 |
| S2 | 600 | 69 | LOT | 75 | 0 |
| Cg2 | 75 | 45 | SNR | 78 | 0 |
| DI | 210 | 45 | EA | 93 | 0 |
| PRh | 129 | 36 | MD | 141 | 0 |
| GI | 201 | 30 | AM | 81 | 0 |
| MO | 165 | 27 | AA | 150 | 0 |
| TeA | 78 | 0 | VM | 69 | 0 |
| V2 | 27 | 0 | VP | 138 | 0 |
| Pir | 1518 | 0 | ACo | 105 | 0 |
| Au | 48 | 0 | ZI | 33 | 0 |
| Tu | 75 | 0 | CA1 | 282 | 0 |
| VTT | 75 | 0 | CA2 | 12 | 0 |
| DTT | 111 | 0 | | | |
| RSD | 24 | 0 | | | |
| Ect | 111 | 0 | | | |
| Ent | 45 | 0 | | | |
| Fr3 | 78 | 0 | | | |
| RSG | 33 | 0 | | | |

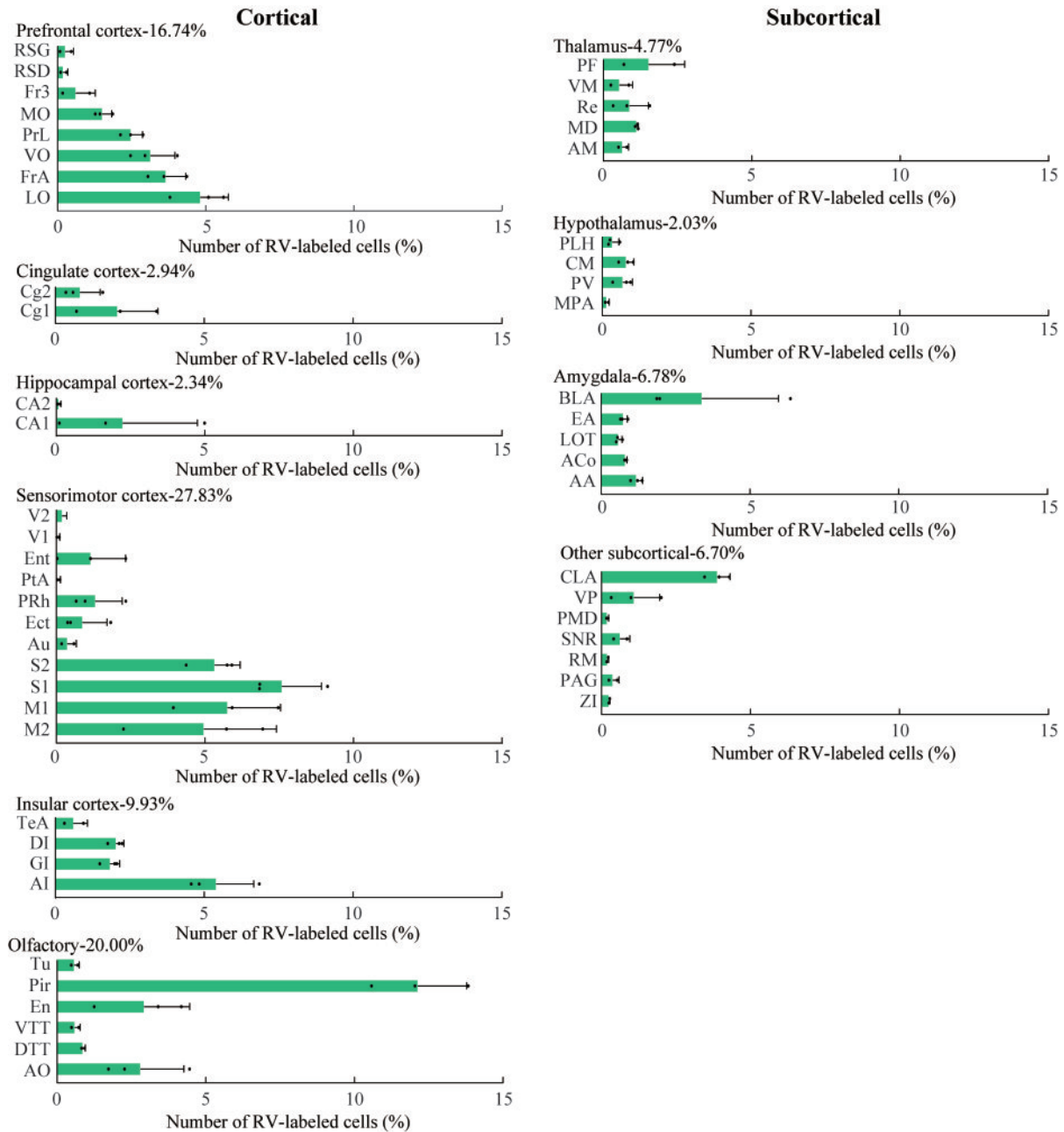
The numbers of cells presented are the calculated mean values derived from three experimental groups.

我们在梨状皮层(piriform cortex, Pir, 占比12.25%)、初级躯体感觉皮层(primary somatosensory cortex, S1, 占比7.61%)、次级躯体感

觉皮层(secondary somatosensory cortex, S2, 占比5.34%)、初级运动皮层(primary motor cortex, M1, 占比5.34%)、次级运动皮层(secondary motor cortex, M2, 占比4.98%)以及岛叶皮层(agranular insular cortex, AI, 占比5.78%)中观察到了密集红色荧光蛋白标记的细胞簇(图3D:a~e, 图4)。研究发现,相较于屏状核内吊灯样细胞,屏状核总体神经元接收来自前额叶区域(Cg1、Cg2和PrL)投射的比例相对较高。本研究结果表明,在梨状皮层及其相关的嗅觉皮层中,标记的突触前细胞分布最为密集,并且所占比例远高于投射至屏状核内神经元总体的突触前细胞所占比例,提示梨状皮层可能是屏状核内吊灯样细胞最大的投射输入。

与此同时,我们在皮层下结构中检测到了突触前细胞,这些结构包括腹侧苍白球(ventral pallidum, VP)、视前大细胞核(magnocellular preoptic nucleus, MCPO)、黑质网状部(substantia nigra reticulata, SNR)、丘脑背内侧核(mediodorsal thalamus, MD)、丘脑束旁核(parafascicular thalamic nucleus, PF)以及中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray, PAG)。此外,在鼻外皮层(ectornal cortex, Ect)、鼻周回皮层(perirhinal cortex, PRh)、背外侧内嗅皮层(dorsolateral entorhinal cortex, DLEnt)以及海马CA1区等区域也发现了标记细胞(图3D:f~o, 图4)。

将皮层区域总的突触前输入神经元数量按照各分层进行划分,计算出每个皮层层次的平均突触前神经元数量所占比例。结果显示,在同侧和对侧两个大脑半球皮层中,标记细胞主要集中在第5层,有少量细胞分布在第2/3层和第6层,而第4层中基本未发现标记细胞(图5A)。基于此,我们首先向*Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65*小鼠腹侧苍白球区域(前后轴位置:AP 0.26 mm,内外侧轴位置:ML 1.50 mm,背腹侧轴位置:DV -5.25 mm)注射了AAV2/9-hSyn-EGFP-WPRE-pA病毒,用以标记该区域内的投射神经元(图5B)。经诱导表达,我们观察到在屏状核内tdTomato标记的吊灯样细胞周围,环绕着由腹侧苍白球投射神经元发出并且表达绿色荧光蛋白的轴突(图5C),这充分证明了这些来自腹侧苍白球的投射神经元确实对屏状核内的吊灯样细胞形成了支配。运用免疫荧光染色对腹侧苍白球内标记的突触前细胞进行了分类鉴定,结果显



Error bars show the standard error of the mean.

图4 皮层及皮层下各个脑区对屏状核内吊灯样细胞的突触前神经元输入的量化统计

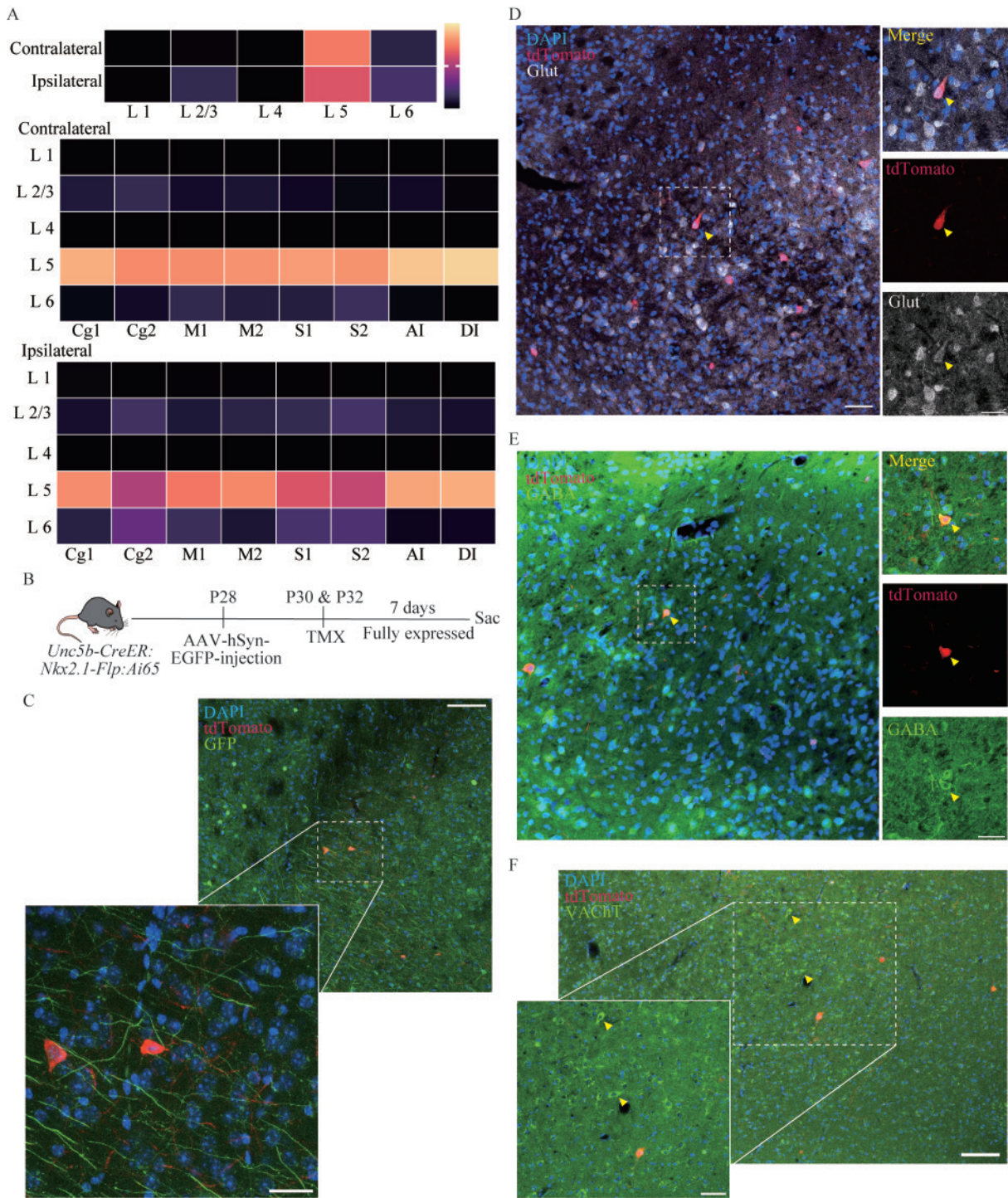
Fig 4 Detailed overview of inputs from presynaptic neurons to the AACs in the CLA from each of the brain structures

示,腹侧苍白球内投射至屏状核中吊灯样细胞的神经元类型包括 GABA 能神经元和谷氨酸能神经元,未标记到胆碱能细胞(图 5D~F)。

讨 论

尽管有研究证实屏状核是连接多个皮层和皮层下区域的枢纽^[6,20],但针对屏状核内中间神经元

的研究仍然较为有限^[21]。我们的研究结果进一步丰富了对屏状核内中间神经元多样性的认识。传统上,表达小清蛋白的神经元被认为包括快速放电的篮状细胞和一部分表达小清蛋白的吊灯样细胞^[13,22],但由于技术方法的限制,区分篮状细胞和吊灯样细胞存在一定挑战。本研究中,我们采用 *Unc5b-CreER:Nkx2.1-Flp:Ai65* 转基因策略特异性高效标记吊灯样细胞。该方法能够可靠地区分吊



A: The laminar origin of cortical presynaptic neurons to the AACs in the claustrum. The color scale bar presents the range between 0 and 1. B: The procedure for injecting the AAV2/9-hSyn-EGFP-WPRE-pA virus and TMX induction. C: Axons originating from the VP were distributed around the AACs in the claustrum. Scale bar: 100 μ m; 30 μ m in the inset. D-F: Immunofluorescent staining revealing the cell types of the neurons in the ventral pallidum that project to the axo-axonic cells in the claustrum. Glutamatergic cells (white, D) and GABAergic cells (green, E) in the ventral pallidum labeled with tdTomato (Scale bar: 70 μ m; 30 μ m in the inset), cholinergic cells (green, F) not labeled with tdTomato (Scale bar: 100 μ m; 50 μ m in the inset).

图5 皮层及皮层下结构投射至屏状核内吊灯样细胞的神经元细胞类型探究

Fig 5 Exploration of the cell types of neurons that project to the AACs in the CLA from the cortex and subcortical structures

吊灯样细胞与篮状细胞,使中间神经元的分类更加清晰。我们的研究结果也显示,屏状核内吊灯样细胞的细胞密度存在结构差异,沿前后轴从前至后呈逐渐增加的趋势,这为屏状核前部和后部的解剖学区划分和功能差异提供了潜在的指导和理论基础。

我们通过量化吊灯样细胞轴突末端独特的纽扣状“cartridge”结构与AIS的附着情况,确定了吊灯样细胞在屏状核内的支配情况。按照文献报道的方法^[11],通过连续5天腹腔注射他莫西芬诱导,对吊灯样细胞进行了密集标记,获得的支配率为67.72%,并且没有结构前后差异。然而,通过对GABA能神经元的蛋白囊泡转运体进行免疫荧光染色,我们发现屏状核内87.17%的AIS上附着有转运蛋白VGAT,受到GABA能神经元的支配。VGAT染色具有广谱性,能更全面地显示GABA能神经元整体的支配情况。因此,比例差异提示,屏状核内的AIS上存在其他可能的GABA能输入来源^[23]。尽管我们采用了密集标记方法,标记过程仍然存在局限性和遗漏。此外,可能存在不表达*Unc5b*的吊灯样细胞亚群,无法被我们的遗传学策略标记。这些因素导致标记上并且统计到的支配比例相对较低。我们注意到,VGAT染色显示的87.17%的比例与目前报道的屏状核内兴奋性神经元的比例(85%~88%)相似^[24-26]。提示屏状核内大多数兴奋性神经元的AIS接受GABA能支配。然而,这些信号是否均来自吊灯样细胞仍有待进一步研究。

多项研究表明,屏状核与全脑多个皮层和皮层下区域存在广泛连接^[8]。然而,目前尚不清楚屏状核内的中间神经元是广泛接收来自全脑的长程投射,还是仅接收特定脑区的输入。本研究中,我们利用狂犬病毒逆向示踪技术精确标记了投射到并支配屏状核内吊灯样细胞的神经元,结果显示,投射到吊灯样细胞的神经元分布在梨状皮层、岛叶皮层、基底外侧杏仁核等多个皮层和皮层下区域,并且主要集中在同侧端脑的前部。这表明屏状核内的吊灯样细胞可能广泛接收来自不同区域的输入,且具有一定的优先性、偏好性。本研究结果中,标记细胞分布最密集的区域是梨状皮层及其相关的嗅觉皮层,提示梨状皮层可能是屏状核内吊灯样细胞的主要信息输入源。在先前的研究中,前额叶皮层区域是屏状核连接最为稠密的区域^[6]。我们的

发现不仅凸显了屏状核内吊灯样细胞信号输入模式的独特性,还提示吊灯样细胞在屏状核内可能发挥高度专门化和特异的作用。

综上所述,本研究从一个全新的视角对屏状核进行了详细研究,特别聚焦于其中一类独特的GABA能中间神经元:吊灯样细胞。这种针对性的研究方法有效填补了先前屏状核中间神经元研究的空白。通过展示吊灯样细胞在屏状核前后轴上的分布和支配情况,揭示了屏状核内潜在的解剖学差异,增进了对吊灯样细胞特性和屏状核结构特征的理解。此外,关于屏状核内吊灯样细胞所接收长程投射的研究结果呈现出独特的输入模式,提示了吊灯样细胞在屏状核内可能发挥独特且重要的作用。

作者贡献声明 邹义 实验设计和执行,数据收集和分析,论文撰写。邵一琳 实验设计指导,结果分析指导,论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] NORIMOTO H, FENK LA, LI HH, *et al.* A claustrum in reptiles and its role in slow-wave sleep [J]. *Nature*, 2020, 578(7795):413-418.
- [2] HAIN D, GALLEGO-FLORES T, KLINKMANN M, *et al.* Molecular diversity and evolution of neuron types in the amniote brain [J]. *Science*, 2020, 377(6610): eabp8202.
- [3] CRICK FC, KOCH C. What is the function of the claustrum? [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1458):1271-1279.
- [4] TEREM A, GONZALES BJ, PERETZ-RIVLIN N, *et al.* Claustral neurons projecting to frontal cortex mediate contextual association of reward [J]. *Curr Biol*, 2020, 30(18):3522-3532.e6.
- [5] ATLAN G, TEREM A, PERETZ-RIVLIN N, *et al.* The claustrum supports resilience to distraction [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(17):2752-2762.e7.
- [6] WANG Q, WANG Y, KUO HC, *et al.* Regional and cell-type-specific afferent and efferent projections of the mouse claustrum [J]. *Cell Reports*, 2023, 42(2):112118.
- [7] SUÁREZ R, PAOLINO A, FENLON LR, *et al.* A pan-mammalian map of interhemispheric brain connections predates the evolution of the corpus callosum [J]. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A*, 2018, 115(38):9622-9627.
- [8] WANG Q, NG L, HARRIS JA, *et al.* Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse[J]. *J Comp Neurol*, 2017, 525(6):1317-1346.
- [9] WATAKABE A, OHSAWA S, ICHINOHE N, *et al.* Characterization of claustral neurons by comparative gene expression profiling and dye-injection analyses [J]. *Front Syst Neurosci*, 2014, 8:98.
- [10] OSHIMA K, YOSHINAGA S, KITAZAWA A, *et al.* A unique “reversed” migration of neurons in the developing claustrum[J]. *J Neurosci*, 2023, 43(5):693-708.
- [11] RAUDALES R, KIM G, KELLY SM, *et al.* Specific and comprehensive genetic targeting reveals brain-wide distribution and synaptic input patterns of GABAergic axo-axonic interneurons[J]. *eLife*, 2024, 13:RP93481.
- [12] SOMOGYI P. A specific ‘axo-axonal’ interneuron in the visual cortex of the rat[J]. *Brain Res*, 1977, 136(2):345-350.
- [13] SOMOGYI P, FREUND TF, COWEY A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey[J]. *Neuroscience*, 1982, 7(11):2577-2607.
- [14] HOWARD A, TAMAS G, SOLTESZ I. Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells [J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(6):310-316.
- [15] WHITE MG, MATHUR BN. Frontal cortical control of posterior sensory and association cortices through the claustrum[J]. *Brain Struct Funct*, 2018, 223(6):2999-3006.
- [16] MADDEN MB, STEWART BW, WHITE MG, *et al.* A role for the claustrum in cognitive control[J]. *Trends Cogn Sci*, 2022, 26(12):1133-1152.
- [17] REAL MÁ, DÁVILA JC, GUIRADO S. Expression of calcium-binding proteins in the mouse claustrum [J]. *J Chem Neuroanat*, 2003, 25(3):151-160.
- [18] FAGET L, ORIOL L, LEE WC, *et al.* Ventral pallidum GABA and glutamate neurons drive approach and avoidance through distinct modulation of VTA cell types [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):4233.
- [19] INDA MC, DEFELIPE J, MUÑOZ A. Morphology and distribution of chandelier cell axon terminals in the mouse cerebral cortex and claustramygdaloid complex [J]. *Cerebral Cortex*, 2008, 19(1):41-54.
- [20] MILARDI D, BRAMANTI P, MILAZZO C, *et al.* Cortical and subcortical connections of the human claustrum revealed *in vivo* by constrained spherical deconvolution tractography[J]. *Cereb Cortex*, 2015, 25(2):406-414.
- [21] GRAF M, NAIR A, WONG KLL, *et al.* Identification of mouse claustral neuron types based on their intrinsic electrical properties[J]. *eNeuro*, 2020, 7(4):ENEURO.0216-20.2020.
- [22] DEFELIPE J, GONZÁLEZ-ALBO MDC. Chandelier cell axons are immunoreactive for GAT-1 in the human neocortex[J]. *NeuroReport*, 1998, 9(3):467-470.
- [23] GOUR A, BOERGENS KM, HEIKE N, *et al.* Postnatal connectomic development of inhibition in mouse barrel cortex[J]. *Science*, 2021, 371(6528):eabb4534.
- [24] BRAAK H, BRAAK E. Neuronal types in the claustrum of man[J]. *Anat Embryol*, 1982, 163(4):447-460.
- [25] LEVAY S, SHERK H. The visual claustrum of the cat. I. Structure and connections[J]. *J Neurosci*, 1981, 1(9):956-980.
- [26] SPAHN B, BRAAK H. Percentage of projection neurons and various types of interneurons in the human claustrum [J]. *Acta Anat (Basel)*, 1985, 122(4):245-248.

(收稿日期:2025-03-28; 编辑:王蔚)