

听觉皮层双耳整合神经元的层响应分布特异性及突触输入调控机制

吴付连¹, 冀旭颖²

1. 广州医科大学附属妇女儿童医疗中心 耳鼻喉科, 广东 广州 511300

2. 南方医科大学 基础医学院 生理学教研室, 广东 广州 510515

摘要: **目的** 探究小鼠初级听觉皮层神经元对不同侧耳纯音刺激的响应特性及兴奋/抑制输入特性。**方法** 采用光遗传学结合在体清醒动物细胞外记录技术, 给予小鼠不同强度和频率纯音组合, 并随机通过对侧耳、同侧耳和双侧耳给声; 同时, 结合离体脑片全细胞记录技术, 探究听觉皮层深层和第四层(L4)神经元的兴奋/抑制输入特性。**结果** A1 L4 神经元对双侧耳刺激表现为增益效应, 而深层神经元则表现为抑制效应。L4 兴奋性神经元接收来自同侧深层的输入时, 以接收兴奋性输入为主。A1 深层兴奋性神经元接收来自对侧输入时, 以接收抑制性输入为主。**结论** 小鼠 A1 神经元对不同侧耳纯音刺激展现出差异化的响应特性, 不同层神经元在接收同侧或对侧输入时, 其兴奋/抑制输入特性存在明显差异。这些发现为深入解析听觉皮层复杂的双耳整合机制提供了新的视角和理论依据。

关键词: 听觉皮层; 兴奋/抑制; 层响应; 纯音; 光遗传学

中图分类号: R764.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-3770(2026)02-0007-11

引用格式: 吴付连, 冀旭颖. 听觉皮层双耳整合神经元的层响应分布特异性及突触输入调控机制[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2026, 40(2): 7-17. WU Fulian, JI Xuying. Layer-specific response distribution characteristics of binaural integration neurons in the auditory cortex and synaptic input regulation mechanism[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2026, 40(2): 7-17.

Layer-specific response distribution characteristics of binaural integration neurons in the auditory cortex and synaptic input regulation mechanism

WU Fulian¹, JI Xuying²

1. Department of Otolaryngology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511300, Guangdong, China

2. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

Abstract: Objective To investigate the response characteristics of neurons in the primary auditory cortex (A1) of mice to pure tone stimuli from different sides of the ear, as well as their excitatory/inhibitory input properties. **Methods** Optogenetics combined with in vivo extracellular recordings in awake mice was used to present pure tone stimuli of varying intensities and frequencies, delivered randomly to the contralateral ear, ipsilateral ear, or both ears. In addition, optogenetics together with in vivo brain slice whole-cell recordings was employed to investigate the excitatory and inhibitory input properties of deep-layer neurons and layer 4 (L4) neurons in the auditory cortex. **Results** A1 L4 neurons exhibited a gain effect in response to bilateral ear stimulation, while deep-layer neurons exhibited an inhibitory effect. When L4 excitatory neurons received input from the ipsilateral deep layers, they primarily received excitatory input. When A1 deep excitatory neurons received input from the contralateral side, they primarily received inhibitory input. **Conclusion** Mouse A1 neurons exhibit distinct response properties to pure tone stimuli from different sides of ear. Neurons in different layers show significant differences in their excitatory/inhibitory input characteristics when receiving inputs from the ipsilateral or contralateral side. These findings provide new insights and theoretical foundations for further understanding the complex binaural integration mechanisms in the auditory cortex.

Key words: Auditory cortex; Excitation/inhibition; Layer response; Pure tone; Optogenetics

收稿日期: 2024-11-28

基金课题: 广东省自然科学基金-面上项目(2024A1515012279, 2017A030313186)

通信作者: 冀旭颖. E-mail: jixuying@163.com

人类与动物能在复杂的声音环境中捕捉关键的声学信息,精确定位声源并理解其内涵,这主要得益于精密的听觉系统传导通路以及高效的双耳听觉信息整合机制。双耳聆听使声音更清晰且便于定位,而单耳则显得模糊且难以确定方位,反映了双耳整合机制的重要性。作为听觉传导通路的首要站点,听觉皮层(auditory cortex, AC)通过整合双耳信号,实现声源定位、语音理解和复杂听觉场景解析,是听觉功能的关键中枢^[1-4]。听觉皮层的双耳听觉信息整合异常可能导致多种临床问题,尤其是在听觉定位、语音理解和复杂听觉场景的解析方面。例如,听觉空间定位障碍可导致个体难以准确判断声源方位,从而影响日常行为中的环境感知能力及安全性^[5]。此外,双耳整合功能的缺陷也可能会干扰语言处理过程,尤其表现为在噪音环境中的语音理解困难。已有研究表明,听觉皮层在双耳信息整合中扮演着至关重要的角色,其功能障碍与一系列神经系统疾病,如听觉处理障碍^[6]及其他神经发育性疾病(如自闭症谱系障碍)^[7-8]密切相关。因此,系统解析听觉皮层在双耳信息整合中的作用机制,不仅有助于深化对大脑复杂听觉信息处理过程及相关神经网络功能的理解,也为听觉处理障碍及相关神经系统疾病的诊断与干预提供了新的理论依据和潜在的研究方向。

近年来,关于听觉皮层双耳整合机制的研究取得了重要进展,越来越多的证据表明其存在明显的层特异性反应特征,并源于复杂的神经网络调控。现有的研究认为,双耳整合主要依赖于两侧耳所接收声信号的差异,尤其是强度差异(interaural level difference, ILD)^[9]和到达时间差异(interaural time difference, ITD)^[10]。这两种双耳输入的物理差异由听觉系统的多个神经核团进行逐层加工,从外周听觉系统(如耳蜗和耳蜗核)到中枢(如上橄榄复合体和下丘脑),最终在大脑皮层实现声音的空间定位^[11-12]。值得注意的是,听觉皮层对双耳输入的反应并非简单的线性叠加,而是受到抑制和增强机制的复杂调控,且在不同皮层层次表现出显著差异。Reale 等^[13]发现,深层与浅层神经元在兴奋性与抑制性输入的强度及空间分布上存在明显不同,其中深层神经元更倾向于整合双耳信号,从而增强在背景噪声中对目标信号的感知。这种差异可以通过神经元的兴奋性和抑制性输入之间的比率(E/I 比值)

体现出来,并最终影响声音信息的感知和处理^[14]。类似地,Shinn-Cunningham 等^[15]发现,双耳整合不仅依赖于听觉皮层内不同层之间的复杂调控机制,还涉及与其他皮层区域的跨区域连接。这些长程连接主要通过胼胝体以及相关皮层下结构实现,从而支持声源定位、语音理解及复杂听觉场景的解析^[16-18]。此外,在双耳信息整合过程中,不同神经元还展现出增益或抑制等多样化的调节效^[19-21]。这些研究提示,听觉中枢在处理双耳信息时存在高度复杂性和层特异性。然而听觉皮层不同层之间的交互作用,以及兴奋性和抑制性输入在双耳信息处理中的确切作用仍有待深入阐明。

近年来,随着实验技术的持续发展,尤其是光遗传学技术的引入,研究者得以通过特定波长的光刺激对神经元活动进行精确、可逆的调控,从而在细胞与环路层面深入解析听觉信息在听觉中枢中的加工与整合机制^[22-24]。基于上述技术优势,本研究将以听觉皮层作为核心研究对象,融合光遗传学技术与在体电生理、离体电生理技术,旨在深入探究听觉皮层双耳整合中层响应分布的差异,并进一步揭示这些差异背后潜在的神经微环路机制。本研究的结果不仅有助于深化对听觉皮层双耳整合信息编码机制的理解,而且可为双耳整合功能异常相关的听觉障碍及认知功能受损的机制研究提供新的理论依据与潜在干预思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所使用的 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠由南方医科大学实验动物中心提供。所有实验动物均在健康状态下随机选取用于实验记录,本研究未设置实验分组对照。实验全过程均在南方医科大学动物保护和利用管理委员会的批准和监督下进行[实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2018-0002;使用许可证号:SYXK(粤)2016-0167;动物伦理审查批准号:L2017207]。年龄为 6~8 周,雌性,体质量约为 16~20 g。

1.2 试验方法

1.2.1 在体膜片钳电生理记录

1.2.1.1 动物手术

小鼠称重后,先给予腹腔注射阿托品(0.25 mg/kg)以减少呼吸道粘液分泌,5 min 后腹腔注射氯胺酮(50 mg/kg)和甲苯噻嗪(10 mg/kg)混合液进行麻

醉。待深度麻醉后,小鼠被置于防震台上。头皮下注射利多卡因局部麻醉后,自前囟至枕骨大孔间做纵向切口,暴露顶骨和颞骨,以无水酒精进行表面去脂。根据小鼠脑图谱,在立体定位仪上标记初级听觉皮层的位置(前囟后 2.3 mm,中线旁开 4.2 mm),并于记录电极对侧半球,后囟旁开 3~4 mm 的颅骨上钻个小孔,将参比电极埋置进去,外面以牙科水泥固定。牙科水泥固定后,于体视显微镜下在听皮层上方钻一小孔,剥离硬脑膜以暴露听皮层。实验过程中保持脑表面湿润。

所有动物手术均在课题组实验室内完成。动物由实验动物中心领取后,在本实验室环境下适应性饲养 3~5 d [12 h 明/12 h 暗光照周期,温度 (23 ± 2) °C,相对湿度 $55\% \pm 10\%$],自由取食与饮水,群笼饲养。

1.2.1.2 记录方法

实验采用在体单细胞贴附式记录方法,通过玻璃微电极(P-97 电极拉制仪控制,电极尖端直径约为 1 μm ,阻抗 5-8 M Ω)进行记录。电极内液:125 K-gluconate,4 MgATP,0.3 GTP,10 phosphocreatine,10 HEPES,1 EGTA,pH 7.2。在手术显微镜下,电极尖端移至皮层表面,施加 3 Psi 正压防阻。通过微电极推进器(Narishige, SM-21)将电极快速推进 100 μm 以冲破硬脑膜,随后调整压力至 0.3 Psi。同时监测电阻变化,电阻增加 50% 及以上表明可能接触细胞,随即撤正压,施负压(约 0.3 Psi)封接细胞,电阻达 15 M Ω ~0.5 G Ω ,实现单细胞贴附。稳定维持数分钟后,给予声音刺激记录。

1.2.1.3 给声刺激

声学刺激由 LabVIEW 软件(National Instruments)编程设计,并通过 Tucker-Davis Technologies System 3(TDT3, Tucker-Davis Technologies, 美国)生成。刺激信号经自由场扬声器(ES1, 频率范围 2~110 kHz)播放。在单耳刺激条件下,扬声器置于与动物的耳朵相距 10 cm 处,另一侧耳道以耳塞封闭;在双耳刺激条件下,扬声器置于距动物鼻尖约 10 cm 处。

实验开始前,使用 1/8 英寸和 1/4 英寸麦克风(Brüel and Kjaer 4138, 4135, 丹麦)及放大器(Brüel and Kjaer 2610, 丹麦)对扬声器输出进行校准。实验所用声强以声压级表示(0 dB SPL 定义为 20 μPa ,简写为 dB),声音刺激频率统一设定为 2 Hz (2 次/s)。在电极下探并搜索目标神经元的过程中,采用白噪声刺激(频率范围 0~50 kHz,强度

70 dB SPL,声长 50 ms)用于探查电极尖端是否接触到声响应神经元。一旦确认获得声响应,在单细胞贴附记录状态下切换为正式实验所用的声刺激序列进行记录。

正式实验声刺激序列如下:纯音,0~70 dB SPL (10 dB SPL 的间隔),线性频率:2~48 kHz (1 kHz 间隔),上升/下降时间为 5 ms,时程为 50 ms,随机给声,每个声音 2 次/s,每个声音重复 3~5 次,定义记录侧为给声同侧,分别进行同侧耳(Ipsilateral)、对侧耳(Contralateral)和双侧耳(Bilateral)给声。

1.2.1.4 在体电生理实验中 A1 的识别和定位

实验中主要记录的区域为初级听觉皮层 A1。目前研究已经确认,A1 的频率拓扑图展示出一定的规律性,从内侧向外侧呈现出特征频率(characteristic frequency, CF)从高到低的递减趋势^[25]。在实验中,通过对记录的神经元进行频率扫描并标记电极位置,根据神经元特征频率的变化即可确定该区域是否为听觉皮层。

1.2.1.5 数据采集与分析

在体细胞外记录获得的原始放电信号采用 MATLAB 7.0 进行离线分析。首先,对单个神经元在每次纯音刺激后的放电进行统计,计算其在刺激时程内的放电次数,并构建神经元的频率-强度声调感受野(frequency-intensity tonal receptive field, TRF)。在此基础上,选取各声强条件下引发神经元放电反应范围最广的频率区间,作为后续定量分析的刺激频率范围。随后,分别统计同侧耳、对侧耳及双侧耳纯音刺激条件下神经元的平均放电次数。为量化双侧耳刺激相对于对侧耳刺激对神经元放电活动的调节效应,计算双侧耳刺激与对侧耳刺激条件下神经元放电次数的比值(双侧/对侧放电数比值),并将该比值作为重要分析指标,用于不同皮层层级之间的比较分析。所有数据的整理、统计分析及可视化处理均在 Excel 2007、OriginPro 7.5、GraphPad Prism 5 和 MATLAB 7.0 等软件中完成。

1.2.2 A1 光遗传病毒注入

选取 6~8 周龄的 C57BL/6J 小鼠($N=8$),小鼠由实验动物中心领取后,在本实验室环境下适应性饲养 3~5 d [12 h 明/12 h 暗光照周期,温度 (23 ± 2) °C,相对湿度 $55\% \pm 10\%$],自由取食与饮水,群笼饲养。随后,以 1.5%~2.0%异氟醚麻醉后,置于立体定位仪(68025, RWD, 深圳, 中国)上,头部倾

斜 70°。手术暴露颞骨和顶骨,于后凶旁 0.3 mm、前凶方向 2 mm 处钻孔,挑破硬脑膜暴露听觉皮层。根据既往技术经验^[26],取腺相关病毒 rAAV2/9-CaMKIIa-hChR2(H134R)-GFP-WPRE-hGH(武汉枢密脑科学技术有限公司, $t \geq 10^{13}$ vg/ml)置于针尖直径为 10~20 μm 的斜角玻璃电极中(504949, WPI, 美国),利用微量进样泵(Nanoliter 2010/2T, WPI, 美国)以 10 nl/min 的速率缓慢注入 A1 区 500 μm 深处,总注射体积为 40 nl。注射完成后,保持电极在原位停留 5 min,以促进病毒在组织中的充分扩散,随后缓慢撤出电极。手术结束后,对切口进行缝合,并局部涂抹红霉素软膏,小鼠返回笼内进行术后恢复与饲养。

rAAV2/9-CaMKIIa-hChR2(H134R)-GFP-WPRE-hGH 是一种在光遗传学研究中广泛应用的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体。该病毒载体通过 CaMKIIa 启动子特异性地在注射区域的兴奋性神经元中表达,从而使神经元膜表面表达光敏感阳离子通道视紫红质蛋白(channelrhodopsin-2, ChR2)。当波长为 470 nm 的蓝光照射时,ChR2 会开启,允许 Na^+ 和 Ca^{2+} 流入神经元,进而引发去极化并激活神经元。此外 ChR2 的表达通过绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)进行标记,便于在显微镜下可视化。经过约 4 周的 AAV 病毒表达,ChR2 将在突触终末区域表现出来。此时通过 470 nm 蓝光激发可以激活注射区域的神经元突触终末。如果注射区域与记录区域之间存在神经回路,便能在记录区域观察到神经元的电活动,从而实现对特定神经回路的精确光遗传学操控和功能解析^[27-33]。

1.2.3 离体膜片钳电生理记录

1.2.3.1 脑片制备

病毒注射四周后的小鼠通过腹腔注射 20% 乌拉坦(1.2 mg/g)进行深度麻醉。随后,迅速对小鼠断头并取出全脑,置于冰水混合(0~4)°C 的切片液中,成分如下(单位: mmol): 60 NaCl, 3 KCl, 1.25 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 NaHCO_3 , 115 蔗糖, 10 葡萄糖, 7 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 CaCl_2 , pH 为 7.35~7.45)。1 Kmin 后使用震荡切片机(Leica VT1200, 德国)制备含有 A1 的脑片,厚度为 380~450 μm 。随后将脑片迅速转移至 37 K°C 人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)中,成分为(单位: mmol): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 26 KNaH-

CO_3 , 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 CaCl_2 , 0.5 Ascorbic acid, 2 Sodium Pyruvate, 10 Glucose, pH 调节至 7.3~7.4, 渗透压为 310 mOsm。实验全程持续给予 95% 氧气和 5% 二氧化碳的混合气。孵育 30 min 后转移至室温条件下备用并进行后续电生理记录。

1.2.3.2 离体电生理实验中 A1 的识别和确定

实验前,首先通过“小鼠立体定位脑图谱”确定听觉皮层的矢状切面位置;然后,以海马的位置为参照,通过数字读取器(SD Instrument DR1000)测量 A1 的纵向深度和横向距离,从而对 A1 实现三维空间标记和定位^[34]。

1.2.3.3 离体电生理记录

将含有 A1 的脑片转移至记录槽内,以 32 °C 的 ACSF 循环并持续通入氧气。实验全程于正置红外显微镜(Eclipse FN1, 尼康,日本)下进行。在正式记录前,于 4X 物镜下使用 470 nm 蓝色激发荧光信号,对脑片中 ChR2(channelrhodopsin-2)表达情况进行检测,仅选择在 A1 区域内准确表达 ChR2 的脑片用于后续电生理记录。

玻璃电极(Sutter 公司,美国)通过电极拉制仪(P-97, Sutter Instrument, 美国)控制,尖端直径约为 1 μm , 阻抗 6~9 M Ω 。电极内液成分为(单位: mmol): 140 K-gluconate, 9 HEPE, 5 EGTA, 4.5 MgCl_2 , 4.4 Phosphocreatine disodium salt hydrate, 4 Mg-ATP, 0.3 GTP。记录方式为全细胞记录模式:首先给予记录电极微小的正压,通过电极操作仪(MP-285, Sutter Instrument, 美国)缓慢地将电极移动至目标神经元胞体表面,撤去正压形成高阻封接(>1 G Ω),破膜后形成全细胞记录。将膜电位钳制于 -70 mV, 给予 470 nm 蓝光刺激(刺激强度为 15 mW/mm², 时程为 5 ms)时,钳制于 0 mV 时,记录抑制性突触后电流(inhibitory postsynaptic current, IPSC)。实验中使用 EPC 800 放大器、AXON 1322A 数模转换器以及 Clampex10.0 采集数据。设定滤波为 2 kHz, 采样率为 10 kHz。

根据实验设计,记录对象选定为兴奋性椎体神经元。其判定标准包括胞体体积较大(直径约 20 μm)且细胞形态呈典型锥形结构。依据既往研究对 A1 的皮层分层标准,各层深度范围定义如下: L1 为 0~150 μm ; L2/3 为 150~350 μm ; L4 为 350~500 μm ; L5 为 500~750 μm ; L6 为 750~1 000 μm ^[34-35]。在实验过程中,通过读数计来精确判断并记录每个

目标神经元的位置和深度。

1.3 统计学处理

对于蓝光刺激所诱发的反应,使用 Clampfit 软件对其进行分析,分析参数为突触后反应的峰幅度。所有数据来源于 8 只实验动物,共计 15 个脑片。所有连续型数据在统计分析前均首先采用 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;不符合正态分布的数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。同一神经元在不同记录条件下获得的配对数据采用配对 t 检验(非正态分布时采用 Wilcoxon 符号秩检验);多组独立样本比较在满足正态分布及方差齐性前提下,采用单因素方差分析(one-way

ANOVA),两两比较采用 LSD- t 检验。统计分析 with 图形绘制在 Excel 2007、OriginPro 7.5、GraphPad Prism 5 及 MATLAB 7.0 中完成。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 听觉皮层神经元对于不同侧纯音刺激的响应特性

首先,采用在体清醒动物细胞外电生理记录方法,在随机呈现条件下,给予小鼠不同强度和频率的纯音组合,刺激方式包括对侧耳、同侧耳和双侧耳(详见方法部分)。结果展示了 AC 神经元对短纯音刺激的反应即 TRF,见图 1。

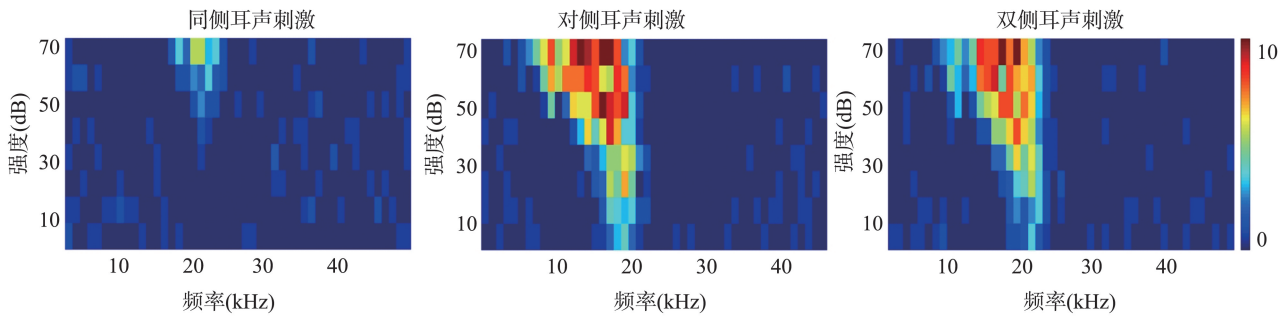


图 1 同侧耳、对侧耳和双侧耳声刺激的 TRF 示例
Figure 1 Examples of TRFs evoked by ipsilateral, contralateral, and binaural auditory stimulation

为深入探究双侧耳声刺激与对侧耳声刺激之间的关系,对二者刺激下神经元的放电数进行了定量对比分析。结果显示,双侧耳声刺激和对侧耳声刺激所引发的神经元放电反应呈现出显著的线性相关关系。对侧耳刺激条件下神经元的放电数为 5.3 ± 2.7 ($n = 61$),双侧耳刺激条件下为 4.2 ± 2.3 ($n = 61$);经线性拟合后, R^2 高达 0.978。这一结果充分表明,二者之间存在紧密的关联性,这意味着在处理来自双侧和对侧的声刺激时,AC 神经元的反应模式呈现出高度一致的线性关系。见图 2。

为了深入探讨这种相关性在 AC 不同层级之间的差异,统计了不同皮层深度神经元的放电数比值,即双侧耳声刺激放电数/对侧耳声刺激放电数。结果显示,L4 层的神经元表现出显著较高的放电数比值,且多数比值 > 1 (1.39 ± 0.44 , $n = 24$),这一数据说明,在双侧耳声刺激下,L4 层神经元的放电活动增强,呈现出增益效应。相比之下,其他层神经元放电数比值均 < 1 ,具体数值为:L2/3:

(0.94 ± 0.45 , $n = 9$); L5: (0.85 ± 0.17 , $n = 21$); L6: (0.84 ± 0.13 , $n = 27$),表明在双侧声刺激条件下,这些神经元的放电活动减弱,即出现抑制效应。因此可以推测,这种增益或抑制调节作用可能是皮层下或者皮层其他层神经元通过同侧投射,继续向上加工与调节的结果。见图 3。

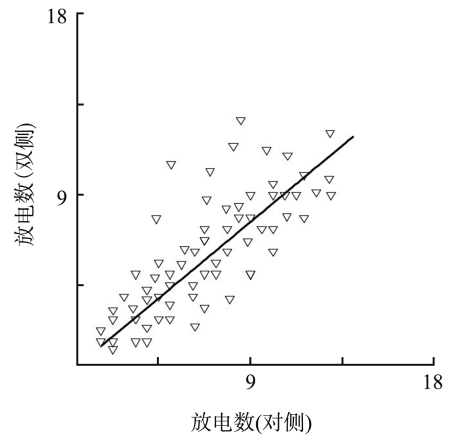
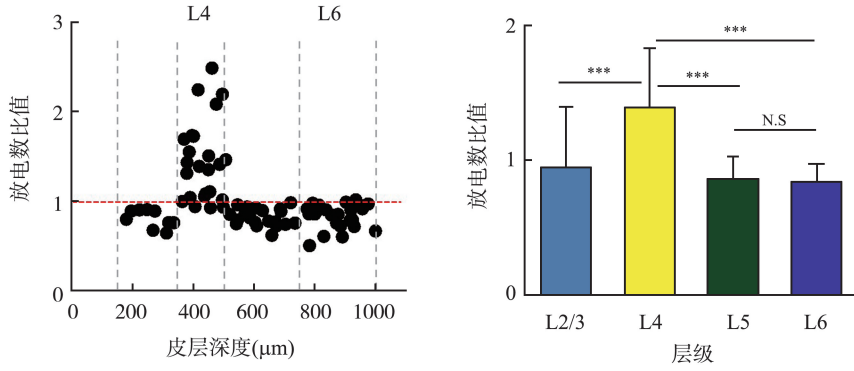


图 2 双侧耳和对侧耳纯音刺激放电数的线性拟合
Figure 2 Linear fit of spike counts in response to bilateral ear and contralateral ear pure tone stimulation



注: $F=23.180, P<0.001, **P<0.001, L4$ 与 $L2/3; **P<0.001, L4$ 与 $L5; **P<0.001, L4$ 与 $L6$ 。

图 3 双侧/对侧声刺激放电数比值在不同皮层深度下的分布差异

Figure 3 Differences in layer response distribution for pure tone stimuli from different sides

2.2 光遗传病毒在 A1 的注入和表达

既往研究表明,对侧 AC 可借助胼胝体投射来调控同侧 AC 的神经活动^[36-39],该通路被认为是双耳信息整合的潜在神经机制之一。结合本研究中 AC 神经元在双耳整合过程中呈现的层特异性响应分布,上述现象可能与 A1 深层神经元的功能参与密切相关。在此背景下,本课题组对侧 A1 深层神经元可能通过胼胝体传入信号,调节同侧 A1 层内及跨层的投射联系。

为了验证这一假设,于 C57BL/6J 小鼠的左侧初级听觉皮层(A1)深层注入腺相关病毒(rAAV2/9-CaMKIIa-hChR2(H134R)-GFP-WPRE-hGH,具体方法详见前文),通过绿色荧光标记,可观察到病毒的表达区域及其扩散面积正常,且注射位置准确无误。4 周后,在对侧 A1 区域的突触终末处,可以成功检测到病毒的表达,其中 ChR2 的绿色荧光信号清晰可见。这些脑片将用于后续的离体电生理实验。见图 4。

2.3 A1 深层兴奋性神经元接收对侧 A1 输入的兴奋/抑制特性

基于既往离体电生理实验结果显示,听觉皮层深层神经元在双侧耳声刺激条件下呈现抑制性反应,本研究进一步重点探究该类神经元接收来自对侧听觉皮层输入的突触特性。在病毒表达 4 周后,制备右侧 A1 脑片并进行离体电生理记录。记录对象为深层兴奋性锥体神经元,通过给予 470 nm 蓝光刺激,分别将膜电位钳制在 -70 mV 和 0 mV,以记录其 EPSC 和 IPSC 反应(具体实验方法见前文)。实验中,病毒注射于左侧 A1,而在表达 4 周后于右侧 A1 记录深层兴奋性锥体神经元的光诱发突触反应,实验示意图 5。

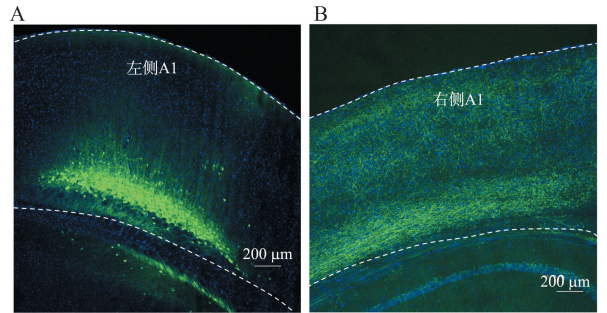


图 4 光遗传学腺相关病毒的注入和表达

A:共聚焦显微镜下观察到病毒注入左侧 A1 深层;

B:病毒在对侧 A1 突触终末的表达

Figure 4 Injection and expression of optogenetic adeno-associated virus

A: Virus injection observed in the deep layers of the left A1 under confocal microscopy; B: Expression of the virus in synaptic terminals of the contralateral A1

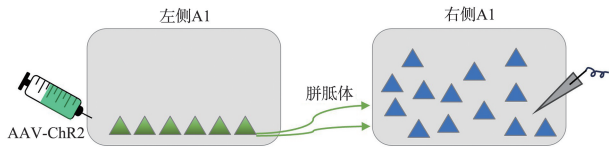


图 5 离体电生理记录方法示意图

Figure 5 Schematic diagram of in vitro electrophysiological recording methods

实验结果显示,不同深层神经元接收的 EPSC 和 IPSC 幅度存在显著差异。为了量化其接收兴奋性或抑制性输入程度,对 EPSC 幅度与 IPSC 幅度的比值(E/I 比值)进行统计分析。根据 E/I 比值的不同,可以将神经元分为 3 类:① I 类神经元的 E/I 比值 ≤ 1 ,其 EPSC 幅度明显小于 IPSC 幅度[EPSC: (187.34 ± 59.62) pA; IPSC: (272.35 ± 73.21) pA,经 Shapiro-Wilk 正态性检验后采用配对 t 检验, $P<0.001$],该类神经元以接收对侧的抑制性输入为主;② II 类神经元的 E/I 比值 > 1 ,其 EPSC 幅度显著大于 IPSC 幅度[EPSC: (204.85 ± 68.30) pA; IPSC:

(168.71 ± 62.94) pA, 采用配对 t 检验, $P < 0.001$], 该类神经元以接收对侧的兴奋性输入为主; ③ III 类则未记录到明显的突触后反应。在记录的 52 个神经元中, 三种反应类型均被观察到。结果显示, 深层神经元在接收对侧听觉皮层输入时, 表现

出不同的兴奋性与抑制性突触输入比例。其中, 第一类神经元数量最多, 表明该类型在所记录的神经元群体中占比较高, 其特征以接收对侧抑制性输入为主。这一结果表明, A1 深层神经元更倾向于接收来自对侧的抑制性突触输入。见图 6。

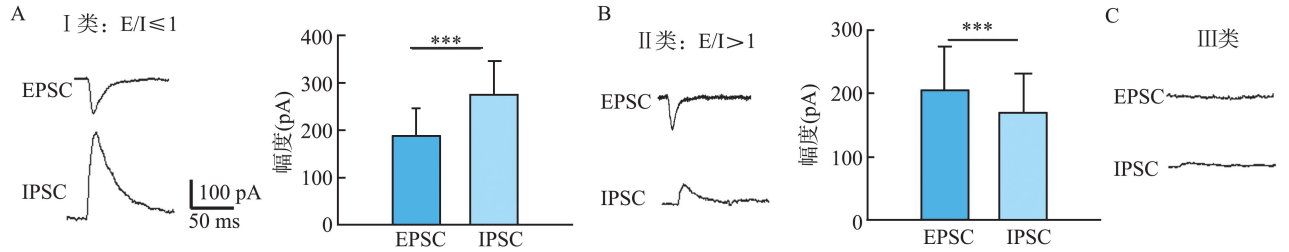


图 6 A1 深层兴奋性神经元接收对侧投射的兴奋/抑制输入特性

A: 左侧, I 类神经元的反应示例; 右侧, EPSC 和 IPSC 幅度比较; B: 左侧, II 类神经元的反应示例; 右侧, EPSC 和 IPSC 幅度比较; C: III 类神经元的反应示例

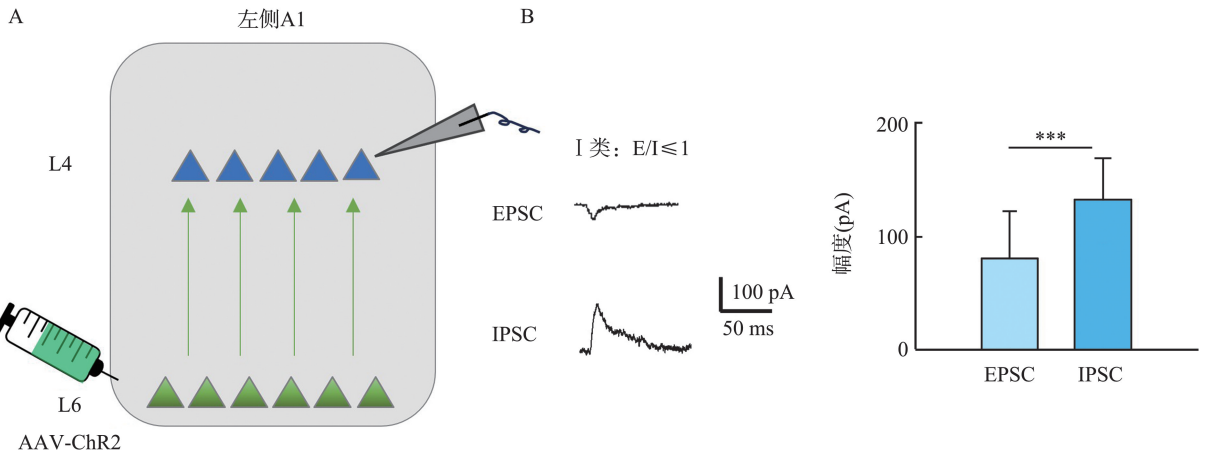
Figure 6 A1 deep excitatory neurons receive excitatory/inhibitory input characteristics from contralateral projections

A: Left, Response example of Type I neurons; Right, Comparison of EPSC and IPSC amplitudes; B: Left, Response example of Type II neurons; Right, Comparison of EPSC and IPSC amplitudes; C: Response example of Type III neurons

2.4 A1 L4 兴奋性神经元接收同侧深层输入的兴奋/抑制特性

随后对 L4 神经元接收同侧深层输入的特性进行探究。实验设计如图 7A 所示, 病毒注入到 A1 深层, 4 周后, 记录 L4 兴奋性椎体神经元的 EPSC 和 IPSC。通过对 E/I 比值进行分析, 结果发现神经元可以划分为 3 类。如图 7B、C、D 所示, I 类神经元的 E/I 比值 ≤ 1 , 其 EPSC 幅度明显小于 IPSC 幅度 [EPSC: (80.25 ± 42.30) pA; IPSC: (132.87 ± 35.66) pA, 经 Shapiro-Wilk 正态性检验后采用配对 t 检验, $P < 0.001$], 该类神经元以接收同侧抑制性输入为主。II 类神经元的 E/I 比值 > 1 , EPSC 幅度明显大于 IPSC 幅度

[EPSC: (231.46 ± 27.85) pA; IPSC: (90.51 ± 30.24) pA, 经 Shapiro-Wilk 正态性检验后采用配对 t 检验, $P < 0.001$], 该类神经元以接收同侧兴奋性输入为主。III 类则未记录到明显的突触后反应。在记录的 48 个神经元中, 三种反应类型均被观察到。表明 L4 神经元在接收同侧深层听觉皮层输入时, 表现出不同的兴奋性与抑制性突触输入比例。其中 II 类神经元数量最多, 共有 28 个, 表明该类型在所记录的神经元群体中占比较高, 其特征是以接收同侧兴奋性输入为主。这一结果表明, A1 L4 神经元更倾向于接收来自同侧深层的兴奋性突触输入。



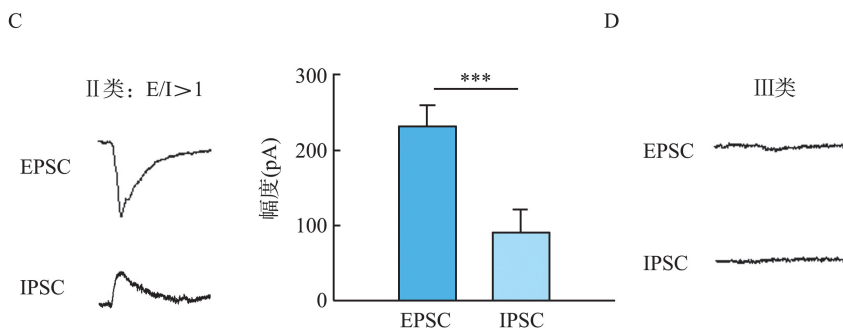


图 7 A1 L4 兴奋性神经元接收同侧深层投射的兴奋/抑制输入特性

A: 离体电生理记录方法示意图; B: 左侧, I 类神经元的反应示例; 右侧, EPSC 和 IPSC 幅度比较; C: 左侧, II 类神经元的反应示例; 右侧, EPSC 和 IPSC 幅度比较; D: III 类神经元的反应示例

Figure 7 Excitatory/inhibitory input properties of A1 L4 excitatory neurons receiving ipsilateral deep-layer projections.

A: Schematic diagram of in vitro electrophysiological recording methods; B: Left, Response example of Type I neurons; Right, Comparison of EPSC and IPSC amplitudes; C: Left, Response example of Type II neurons; Right, Comparison of EPSC and IPSC amplitudes; D: Response example of Type III neurons

3 讨论

听觉皮层,作为听觉信息进入大脑皮层的主要皮层中继结构,在双耳信息的整合过程中发挥关键作用。它不仅接收来自丘脑的上行听觉传入信号^[40],还参与介导不同听觉皮层之间的复杂皮层—皮层投射^[36,41-42],并通过对同侧耳与对侧耳声音信息的精密解析,展现出双侧耳在信息整合上的独特功能与细微差异。正是得益于双耳声刺激出现的时间差与强度差^[43-44],人类才得以实现精准的声源定位^[16]。当听觉皮层的双耳整合功能发生异常时,可能导致多种听觉及言语相关功能障碍,包括声音感知受损、声音辨识能力下降、言语理解能力减弱、学习困难增加以及社交相关焦虑等问题^[45-48]。在进行听觉整合功能评估时,患者往往表现出对声音来源方向的误判、反应速度的迟缓,以及在言语表达中自我回馈机制的受损,如发音不准确、音量调控失常等^[49]。因此探究听觉皮层双耳整合机制的研究,不仅契合现代脑科学的前沿研究热点,而且在听觉及言语相关疾病的诊断中具有重要的临床价值,为确定治疗策略提供了必要的科学指引。

本研究通过采用在体清醒动物的细胞外电生理记录技术,系统分析了 A1 神经元对于双侧以及对侧耳纯音刺激的放电响应特性,并发现双侧刺激与对侧刺激诱发的反应之间存在着显著的高度线性相关性。这一发现支持了听觉皮层神经元具备整合双耳信息的能力。进一步分析发现,L4 神经元在双侧耳声刺激下表现出增益效应,而深层神经元则表现出抑制为主的响应特性。这种层特异性的响应模式,提示听觉皮层在双耳信息加工过程中存在多层次、差异化的调控机制,体现了其在双耳整合功能上

的复杂性与多样性。为了探究这种层特异性响应背后的潜在机制,通过利用神经生物学的前沿技术手段-光遗传病毒技术,在 A1 深层注入腺相关病毒,并通过离体电生理技术记录探查其神经环路机制。结果显示,当 A1 深层的兴奋性神经元接收对侧投射时,存在明显的兴奋性输入(E)/抑制性输入(I)输入特性差异。其中,大部分的神经元以接收对侧抑制性输入为主导,这与本课题组于在体实验中观察到的深层神经元在双侧刺激下的抑制效应不谋而合。此外,还进一步分析了 L4 神经元接收同侧深层投射的 E/I 输入特性。与深层神经元不同,L4 神经元在接收同侧深层投射时,大部分神经元以接收兴奋性输入为主导,这一结果符合本课题组于在体实验中观察到的 L4 神经元所表现出的增益效应。这一发现进一步支持了先前的假设,即 A1 深层神经元可能通过胼胝体的输入来影响 A1 同侧层内的投射联系,从而使得不同层的 A1 在整合双耳信息过程中,其响应表现出层特异性。

综合上述结果,本研究提出,A1 神经元在处理双耳信息时,可能依赖不同层的神经元之间的相互作用与功能分工,实现对声学信息的精细加工和整合。在该框架下,L4 神经元可能构成双耳信息进入皮层的主要输入通道,接收来自双耳的声学信息输入,并通过增益效应将信息传递给上层神经元。相较之下,深层神经元可能通过接收对侧和同侧的抑制性突触输入,对输入的信息进行进一步的精细筛选和动态调节,以确保听觉系统对声音信息的准确感知和处理。

听觉皮层的双耳整合特性为大脑在处理左右耳声学信息时实现空间定位及声源辨识等功能提供了重要的神经基础。此过程不仅依靠两侧听觉皮质通

过胼胝体的跨半球投射,还涉及广泛的神经环路,比如内侧膝状体(medial geniculate body, MGB)到 A1 的投射。MGB 作为听觉信息传递的中继站,其背侧部分(dorsal division of the medial geniculate body, MGBd)主要处理来自耳蜗的听觉信息。MGBd 神经元不仅可以向同侧 A1 投射,还通过胼胝体形成向对侧 A1 的投射,从而在两个听觉皮层之间建立双侧投射路径。这种双侧投射在双耳信息整合中起着至关重要的作用。通过将来自左右耳的听觉信息整合并传递至 A1, MGB 有助于听觉皮层对双耳差异性声学线索的编码,从而支持方向感知与空间定位等高级听觉功能的实现。

此外,听觉皮层的双耳整合特性还受到皮层内不同类型神经元之间连接模式的显著调控。在 A1 的局部神经网络中,除来自丘脑及皮层外部的传入信号外,还存在广泛而精细的皮层内抑制性调控机制,这些机制在声音处理、信息整合以及空间定位中发挥着关键作用。本课题组在既往的研究中,系统分析了 A1 内不同层不同抑制性神经元对兴奋性神经元的连接模式,包括钙结合蛋白神经元(parvalbumin-expressing neurons, PV),生长抑素表达神经元(somatostatin-expressing neurons, SOM)和血管活性肠肽表达神经元(vasoactive intestinal peptide-expressing neurons, VIP)^[34]。上述抑制性神经元通过各自特异的反馈和前馈回路,对兴奋性神经元的活动进行精细调节,确保信号的选择性和过滤,避免过度反应,从而增强对声音特征的精确识别能力。例如,当 A1 接收到来自左耳和右耳的声音信号时,抑制性神经元能够抑制背景噪声,增强重要的声音特征,从而优化对音源方向和距离的感知。因此,双耳整合不仅仅是简单的信号叠加过程,而是涉及到复杂的神经环路和精细的机制。本研究中,本课题组基于在体电生理实验结果,重点聚焦于两侧听觉皮层间跨胼胝体的投射以及深层神经元对 L4 的投射,旨在揭示双耳整合的潜在突触输入特性。尽管更为广泛的皮层内及皮层下神经环路可能同样参与双耳信息整合,但鉴于本研究的特定目标与技术范围,未对其进行深入系统分析。未来研究将进一步探讨这些神经回路在双耳信息整合中的具体功能,以期为全面理解听觉皮层的双耳整合机制提供新的理论框架与实验依据。

此外,尽管本研究已对听觉皮层 L4 神经元和深层神经元的兴奋抑制输入程度进行了初步分析,但相关机制仍有待进一步系统性研究。后续工作可在不同声学参数条件下(如刺激频率与声强)评估

神经元兴奋—抑制平衡的动态变化,并结合更精细的定量分析手段,解析不同类型神经元之间的相互作用模式,以更全面地刻画听觉皮层的信息处理过程。上述研究方向将有助于深化对听觉皮层双耳整合神经机制的理解,并为后续研究提供重要的实验依据。未来的研究可聚焦于探究这种层特异性响应背后的分子机制和所依赖的神经环路基础,以及这种机制在听觉信息处理中所发挥的具体作用。此外,将该研究策略拓展至其他感觉皮层,有望从跨感觉系统的角度加深对大脑多感官信息处理机制的整体认识。

从潜在临床转化应用的角度来看,本研究对理解听觉及言语沟通障碍的神经基础具有一定参考价值。通过系统解析听觉皮层神经元兴奋性与抑制性突触输入的特征,有助于为相关听觉与言语障碍的病理机制提供更为精细的神经生物学解释,从而为临床干预策略的制定提供理论依据。此外,对听觉皮层信息处理机制的深入认识,亦可能为人工听觉植入装置等神经工程技术的设计与优化提供新的研究思路,促进基础研究成果向临床与工程应用的转化^[50-51]。

参考文献:

- [1] Rock C, Zurita H, Leiby S, et al. Cortical circuits of callosal GABAergic neurons [J]. *Cereb Cortex*, 2018, 28 (4): 1154-1167. doi: 10.1093/cercor/bhx025
- [2] Regev TI, Lipkin B, Boebinger D, et al. Preserved functional organization of human auditory cortex in individuals missing one temporal lobe from infancy [J]. *bioRxiv*, 2023; 2023.01.18.523979. doi: 10.1101/2023.01.18.523979
- [3] Polley DB, Thompson JH, Guo W. Brief hearing loss disrupts binaural integration during two early critical periods of auditory cortex development [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2547. doi: 10.1038/ncomms3547
- [4] Luo BM, Li J, Liu JP, et al. Frequency-dependent plasticity in the temporal association cortex originates from the primary auditory cortex, and is modified by the secondary auditory cortex and the medial geniculate body [J]. *J Neurosci*, 2022, 42 (26): 5254-5267. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1481-21.2022
- [5] Bruneau N, Roux S, Adrien JL, et al. Auditory associative cortex dysfunction in children with autism: evidence from late auditory evoked potentials (N1 wave-T complex) [J]. *Clin Neurophysiol*, 1999, 110 (11): 1927-1934. doi: 10.1016/s1388-2457(99)00149-2
- [6] Gordon N, Ward S. Abnormal response to sound, and central auditory processing disorder [J]. *Dev Med Child*

- Neurol, 1995, 37(7): 645-652. doi: 10.1111/j.1469-8749.1995.tb12053.x
- [7] Ouimet T, Foster NEV, Tryfon A, et al. Auditory-musical processing in autism spectrum disorders: a review of behavioral and brain imaging studies[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1252: 325-331. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06453.x
- [8] Gonçalves AM, Monteiro P. Autism Spectrum Disorder and auditory sensory alterations: a systematic review on the integrity of cognitive and neuronal functions related to auditory processing [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2023, 130(3): 325-408. doi: 10.1007/s00702-023-02595-9
- [9] Hubka P, Schmidt L, Tillein J, et al. Dissociated representation of binaural cues in single-sided deafness: implications for cochlear implantation[J]. *J Neurosci*, 2024, 44(28): e1653232024. doi: 10.1523/jneurosci.1653-23.2024
- [10] Undurraga JA, Luke R, Van Yper L, et al. The neural representation of an auditory spatial cue in the primate cortex[J]. *Curr Biol*, 2024, 34(10): 2162-2174. e5. doi: 10.1016/j.cub.2024.04.034
- [11] Middlebrooks JC, Green DM. Sound localization by human listeners[J]. *Annu Rev Psychol*, 1991, 42: 135-159. doi: 10.1146/annurev.ps.42.020191.001031
- [12] Yamada K, Kaga K, Uno A, et al. Sound lateralization in patients with lesions including the auditory cortex: comparison of interaural time difference (ITD) discrimination and interaural intensity difference (IID) discrimination[J]. *Hear Res*, 1996, 101(1/2): 173-180. doi: 10.1016/s0378-5955(96)00144-x
- [13] Reale RA, Kettner RE. Topography of binaural organization in primary auditory cortex of the cat: effects of changing interaural intensity[J]. *J Neurophysiol*, 1986, 56(3): 663-682. doi: 10.1152/jn.1986.56.3.663
- [14] Su MX, Ren FX, Li N, et al. Alterations of excitation-inhibition balance and brain network dynamics support sensory deprivation theory in presbycusis[J]. *Hum Brain Mapp*, 2024, 45(16): e70067. doi: 10.1002/hbm.70067
- [15] Shinn-Cunningham BG, Best V. Selective attention in normal and impaired hearing[J]. *Trends Amplif*, 2008, 12(4): 283-299. doi: 10.1177/1084713808325306
- [16] Bamiou DE, Sisodiya S, Musiek FE, et al. The role of the interhemispheric pathway in hearing[J]. *Brain Res Rev*, 2007, 56(1): 170-182. doi: 10.1016/j.brainres-rev.2007.07.003
- [17] Poirier P, Lepore F, Provençal C, et al. Binaural noise stimulation of auditory callosal fibers of the cat: responses to interaural time delays[J]. *Exp Brain Res*, 1995, 104(1): 30-40. doi: 10.1007/BF00229853
- [18] Rock C, Apicella AJ. Callosal projections drive neuronal-specific responses in the mouse auditory cortex[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(17): 6703-6713. doi: 10.1523/jneurosci.5049-14.2015
- [19] Kuwada S, Stanford TR, Batra R. Interaural phase-sensitive units in the inferior Colliculus of the unanesthetized rabbit: effects of changing frequency[J]. *J Neurophysiol*, 1987, 57(5): 1338-1360. doi: 10.1152/jn.1987.57.5.1338
- [20] Froemke RC, Merzenich MM, Schreiner CE. A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity[J]. *Nature*, 2007, 450(7168): 425-429. doi: 10.1038/nature06289
- [21] Kuo RI, Wu GK. The generation of direction selectivity in the auditory system[J]. *Neuron*, 2012, 73(5): 1016-1027. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.035
- [22] Hamada HT, Abe Y, Takata N, et al. Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons induces brain-wide activation[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4152. doi: 10.1038/s41467-024-48489-6
- [23] Zhang QR, Wang SX, Chen R. Integrated bioelectronic and optogenetic methods to study brain-body circuits[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(44): 30117-30122. doi: 10.1021/acsnano.4c07256
- [24] Zhao MR, Alleva R, Ma HT, et al. Optogenetic tools for modulating and probing the epileptic network[J]. *Epilepsy Res*, 2015, 116: 15-26. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2015.06.010
- [25] Zhang LI, Bao SW, Merzenich MM. Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2309-2314. doi: 10.1073/pnas.261707398
- [26] Li X, You J, Pan Y, et al. Effective regulation of auditory processing by parvalbumin interneurons in the tail of the striatum [J]. *J Neurosci*, 2024, 44(5): 1171232023. doi: 10.1523/jneurosci.1171-23.2023
- [27] Xiong XR, Liang FX, Zingg B, et al. Auditory cortex controls sound-driven innate defense behaviour through corticofugal projections to inferior Colliculus [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7224. doi: 10.1038/ncomms8224
- [28] Castaneda AN, Huda A, Whitaker IBM, et al. Functional labeling of individualized postsynaptic neurons using optogenetics and trans-Tango in *Drosophila* (FLIPSOT) [J]. *PLoS Genet*, 2024, 20(3): 1011190. doi: 10.1371/journal.pgen.1011190
- [29] LaFosse PK, Zhou ZS, O'Rawe JF, et al. Cellular-resolution optogenetics reveals attenuation-by-suppression in visual cortical neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(45): e2318837121. doi: 10.1073/pnas.2318837121
- [30] LaFosse PK, Zhou ZS, O'Rawe JF, et al. Single-cell

- optogenetics reveals attenuation-by-suppression in visual cortical neurons[J]. *bioRxiv*, 2024; 2023.09.13.557650. doi: 10.1101/2023.09.13.557650
- [31] Wang RP, Guo JX, Yao HL, et al. Protocol for near-infrared optogenetics manipulation of neurons and motor behavior in *C. elegans* using emissive upconversion nanoparticles[J]. *STAR Protoc*, 2024, 5(1): 102858. doi: 10.1016/j.xpro.2024.102858
- [32] Liang FX, Xiong XR, Zingg B, et al. Sensory cortical control of a visually induced arrest behavior via cortico-tectal projections[J]. *Neuron*, 2015, 86(3): 755-767. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.048
- [33] Ibrahim LA, Mesik L, Ji XY, et al. Cross-modality sharpening of visual cortical processing through layer-1-mediated inhibition and disinhibition[J]. *Neuron*, 2016, 89(5): 1031-1045. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.027
- [34] Zhong W, Zheng W, Ji X. Spatial distribution of inhibitory innervations of excitatory pyramidal cells by major interneuron subtypes in the auditory cortex[J]. *Bioengineering (Basel)*, 2023, 10(5): 547. doi: 10.3390/bioengineering10050547
- [35] Ji XY, Zingg B, Mesik L, et al. Thalamocortical innervation pattern in mouse auditory and visual cortex: laminar and cell-type specificity[J]. *Cereb Cortex*, 2016, 26(6): 2612-2625. doi: 10.1093/cercor/bhv099
- [36] Aitkin LM, Kudo M, Irvine DR. Connections of the primary auditory cortex in the common marmoset, *Callithrix jacchus jacchus*[J]. *J Comp Neurol*, 1988, 269(2): 235-248. doi: 10.1002/cne.902690208
- [37] Code RA, Winer JA. Columnar organization and reciprocity of commissural connections in cat primary auditory cortex (AI)[J]. *Hear Res*, 1986, 23(3): 205-222. doi: 10.1016/0378-5955(86)90110-3
- [38] Fame RM, MacDonald JL, Macklis JD. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons[J]. *Trends Neurosci*, 2011, 34(1): 41-50. doi: 10.1016/j.tins.2010.10.002
- [39] Jacobson S, Trojanowski JQ. The cells of origin of the corpus callosum in rat, cat and Rhesus monkey[J]. *Brain Res*, 1974, 74(1): 149-155. doi: 10.1016/0006-8993(74)90118-8
- [40] Imig TJ, Adria'n HO. Binaural columns in the primary field (A1) of cat auditory cortex[J]. *Brain Res*, 1977, 138(2): 241-257. doi: 10.1016/0006-8993(77)90743-0
- [41] Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, et al. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(5): 663-668. doi: 10.1038/nn1891
- [42] Zurita H, Feyen PLC, Apicella AJ. Layer 5 callosal parvalbumin-expressing neurons: a distinct functional group of GABAergic neurons[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 53. doi: 10.3389/fncel.2018.00053
- [43] Sammeth CA, Brown AD, Greene NT, et al. Interaural frequency mismatch jointly modulates neural brainstem binaural interaction and behavioral interaural time difference sensitivity in humans[J]. *Hear Res*, 2023, 437: 108839. doi: 10.1016/j.heares.2023.108839
- [44] Brown CA, Yost WA. Spectral overlap and interaural time difference sensitivity: possible role of binaural interference[J]. *J Acoust Soc Am*, 2015, 137(5): EL374-EL380. doi: 10.1121/1.4916798
- [45] Khasawneh RR, Abu-El-Rub E, Alzu'bi A, et al. Corpus callosum anatomical changes in Alzheimer patients and the effect of acetylcholinesterase inhibitors on corpus callosum morphometry[J]. *PLoS One*, 2022, 17(7): e0269082. doi: 10.1371/journal.pone.0269082
- [46] Brodovskaya A, Batabyal T, Shiono S, et al. Distinct roles of rodent thalamus and corpus callosum in seizure generalization[J]. *Ann Neurol*, 2022, 91(5): 682-696. doi: 10.1002/ana.26338
- [47] Lee S, Pyun SB, Choi KW, et al. Shape and volumetric differences in the corpus callosum between patients with major depressive disorder and healthy controls[J]. *Psychiatry Investig*, 2020, 17(9): 941-950. doi: 10.30773/pi.2020.0157
- [48] Wang YJ, Li XH, Zhang C, et al. Selective micro-structural integrity impairment of the isthmus subregion of the corpus callosum in alcohol-dependent males[J]. *BMC Psychiatry*, 2019, 19(1): 96. doi: 10.1186/s12888-019-2079-6
- [49] Gallun FJ. Impaired binaural hearing in adults: a selected review of the literature[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 610957. doi: 10.3389/fnins.2021.610957
- [50] Lorens A, Obrycka A, Skarzynski PH, et al. Benefits of binaural integration in cochlear implant patients with single-sided deafness and residual hearing in the implanted ear[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(3): 265. doi: 10.3390/life11030265
- [51] Obuchi C, Shiroma M, Ogane S, et al. Binaural integration abilities in bilateral cochlear implant user[J]. *J Otol*, 2015, 10(4): 150-153. doi: 10.1016/j.joto.2016.02.001