

分类号: R78

单位代码: 10335

密 级: \_\_\_\_\_

学 号: 11718022

# 浙江大学

## 博士学位论文



中文论文题目: 内侧前额叶皮层不同类型神经元  
在社会竞争行为中的功能研究

英文论文题目: Functions of distinct medial prefrontal cortex  
neuron subpopulations in social competition

申请人姓名: 张超逸

指导教师: 胡海岚

专业名称: 神经生物学

研究方向: 社会行为的神经环路基础

所在学院: 医学院

论文提交日期: 2022年3月

内侧前额叶皮层不同类型神经元在社会竞争行为中的功能研究



论文作者签名: 张超逸

指导教师签名: 胡海兵

论文评阅人 1: \_\_\_\_\_ 双向隐名

评阅人 2: \_\_\_\_\_ 双向隐名

评阅人 3: \_\_\_\_\_ 双向隐名

评阅人 4: \_\_\_\_\_ 双向隐名

评阅人 5: \_\_\_\_\_ 双向隐名

答辩委员会主席: 甘文标 教授 (深圳湾实验室)

委员 1: 李 涛 教授 (杭州市第七人民医院)

委员 2: 邱 爽 教授 (浙江大学)

委员 3: 陈家东 研究员 (浙江大学)

委员 4: 胡玉正 研究员 (浙江大学)

答辩日期: 2022 年 05 月 25 日



## 致 谢

吾生有涯，而知无涯，这是我在图书馆完成毕业论文时最大的感受。但这没有影响我对图书馆的感激和喜爱。假如世界上真的有天堂，我觉得应该是图书馆的模样，它安静，它整洁，它有我想要了解的一切。2016-2022，我六年的博士生涯最后在这里沉淀。尽管我的所学是其中的沧海一粟，我的研究也可能只是其中的某个注脚，但在追寻知识的过程中，我充实了自己人生。

我首先要感谢胡海岚教授这六年的悉心指导，遇见胡老师是我最大的幸运。学术上，她开阔的眼界，缜密的逻辑，渊博的学识，让我如沐春风；生活上，节俭的习惯，自律的品质，高雅的情操，也让我耳濡目染，处处向高尚的她看齐。她的严谨和一丝不苟，一直督促着我变得更好，让我更加严格要求自己。当年初出茅庐的我做事莽撞，是她不曾放弃我，一步一步将我塑造。怀念一起打球跑步的日子，怀念在校园里散步，大家一起头脑风暴的场景。我想，很少会有老师像她一样，会花如此多的时间陪伴着学生的成长。

感谢朱鸿师姐，是她给我们的合作课题打下了坚实的基础，让我少走了很多弯路。也是她在我刚进实验室时，教我做动物实验和数据分析。我这几年的成长，离不开她对我的指导。感谢倪哲一师弟，是他帮助我做了很多的数据分析工作，也让我从一个编程小白，掌握了一些基本的编程语言；他还陪我度过了我最艰难的一段时光，没有他就不会有文章的顺利发表；那些一起改文章的夜晚，仍历历在目。感谢辛秋红师姐，她不仅教会了我在体电生理记录技术，还在我最需要的时候，帮助我分担了诸多的实验任务；她井井有条的实验记录和积极向上的生活态度，让我受益匪浅。

感谢我的女友王诗琦在那些艰难的日子里给我的鼓励和支持，让我感受被爱是一件多么幸福的事。那些孤独寒冷的夜里，是她的歌声治愈了我。读博的生活很苦，但有她在就很甜。她的绘画技术也很棒，我的封面故事图就出自她手。她的优秀和努力，也一直激励着我努力变得更好，我相信我们会有个光明的未来。

感谢北京大学的程和平院士，让我有机会接触到最前沿的微型双光子成像技术。我在北大实验期间，他给予我体贴的关照；我在南京做报告时，他给予我充分的肯定和鼓励。他渊博的学识和谦和的态度，让我真心觉得高山仰止。感谢吴润龙博士，是他帮助我完成了课题中双光子成像部分的大部分工作，还传授了我一些光学知识及图像处理技巧。还要感谢超维景公司和南京脑观象台的那些伙伴：赵

婷老师，张珏老师，郭颖，李西睿，吴钧杰，曾冯庆阳，杨红燕等。感谢他们对我的帮助，在北京和南京做实验的那段日子，令人难忘！

感谢李浩洪老师，高志华老师，马欢老师和杨艳老师在文章修改期间对我提供的指导和意见。特别是杨艳老师对我的论文初稿进行了细致的审阅，提了很多中肯的建议。感谢答辩委员会的甘文标老师，李涛老师，邱爽老师，陈家东老师，还有胡玉正老师对我提供的帮助，以及对我的学位论文和答辩表现给予的肯定。

感谢章晓辉老师，于翔老师，许晓鸿老师，还有何苗老师提供的转基因实验鼠，让我们能探究大脑中那些种类各异的中间神经元。感谢仇子龙老师和高光坪老师提供给我们的病毒质粒，让我们可以自由的操纵大脑中的特定神经元。感谢李毅师兄在光纤记录数据分析上提供的指导和建议。感谢刘玲师姐和向心宽在电生理数据分析上提供的指导。感谢周亭亭师姐，郑柏秀和常家瑞同学在实验过程中对我提供的那些帮助。还要感谢两位国际友人 **Melissa Skibba** 和 **Yan Wu**，是她们帮我一起修改英文论文初稿，在跟她们的交流过程中，也让我的英语能力有了很大的提高。

当然，能够顺利的完成我的研究课题离不开“海岚之家”全体成员的陪伴和支持。感谢勤恳干练的实验室管家熊薇老师，把我们实验室管理的整洁有条理。她还策划了多样的活动，让我们的心更加的凝聚在一起。感谢陈敏师姐，檀毅师兄，姜易昊师兄，李辉师兄，王继华师兄，范郑晓师姐，马爽爽师姐和董一言在日常生活中和学术交流中对我的帮助和提供的人生建议。还要感谢郑迪旸，辛倩倩，苟颖卓，贾晓宁，周安琪，王俊盈，熊洋，吴沛冉，吴佳芮，谭日升，叶明亮，张华峰，李逸飞，许嘉仪等师弟师妹们，是他们的青春活力深深感染着我，让我有一个快乐和谐的环境去学习知识，探索科学。

回想这一路走来，还有很多对我人生轨迹产生重要影响的人。感谢沈颖老师在刚入学时对我的欣赏和支持，带领我踏入脑科学研究的大门。感谢北京生命科学研究所罗敏敏实验室给我提供的暑期实习机会。和蔼可亲爱运动的罗敏敏教授，活泼而敬业的刘志祥师兄，严谨且睿智的李毅师兄和张举恩师兄，虽然只有短短3周的交流，但是足够深刻，是他们对我进行了系统神经科学的启蒙。感谢中科院生物物理所的王晓群老师和李龙师兄，帮助我学习自由活动单光子钙成像技术。特别是李龙师兄，在实验上和未来职业选择上，都给了我提了不少建议。感谢李晓明老师，接受我到他实验室轮转，还有在学生组织工作上对我的帮助。他豁达的教育理念，对我的人生观和生活观都产生了很大的影响。感谢王晓东老师，在学生工作及日常生活中对我的鼓励和支持。他温暖的笑容，总是能激励人心。感

谢沈晨杰，朱正刚，林燊等原浙大神经所优秀的前辈们，是他们的优秀一直激励着我前行。每次与他们的交流，都能给我指引，让我收获良多。

感谢教育学院的胡亮老师，让我体验了给大学生上课的乐趣。在担任《运动与脑》助教的那一个学期，让我对神经科学和教育都有了更深刻的认识。也让我立志将创造、分享与传播知识，作为我人生的主要追求。感谢我的网球教练——虞松坤老师，他真的是一位良师益友；他对我的帮助不仅是在球技上，更多的是在生活上，让我在浙里的求学生活丰富多彩。还要感谢我网球队的队友们；在失意无助时，跟他们打一场球，出一身汗，就能让我得到释放。感谢他们同我在球场并肩作战，一起收获累累战果，让我拥有一个没有遗憾的大学网球生涯。

感谢那些对我的嘉奖和赞美，也要感谢那些批评与打击，一切的一切都在帮助我成为更好的自己。

最后要感谢我的家人一直以来对我的理解和支持，容忍我的任性和固执。我的父母文化程度不高，在乡镇里做着普通的工作，过着平淡的生活。从小到大，他们一直在鞭策我努力学习，将来能出人头地。但是在我读博期间，他们变了。我们的羁绊，开始更多的从“推”往“拉”的方向发展。现在的他们，对我说的更多的是：做不到没关系的，回家吧，家乡的日子过得更舒坦。可能是他们看到了我的痛苦和挣扎；也可能是因为我总是很忙，极少回家；还有可能是他们真的老了。同大部分父母那样，小时候总担心孩子不会飞，当看到孩子起飞了，又担心孩子飞高了，飞远了，不再回来了。其实孩子们一直知道，自己的港湾在哪里。我希望自己早日能有一番事业，好好回家陪伴他们，弥补他们。这段时间，我要非常感谢我的姐姐一直在家乡陪在父母身旁，让我可以在外面自由翱翔。当然还要感谢一路穿越风雨，坚持努力，从未放弃成长的自己！

最后的最后，用一首七绝来总结过去，展望未来：

上下求索路漫漫，日夜操劳心悠悠。

求真务实仁心树，开物前民天下新。

张超逸

2022年5月30日于浙江大学紫金港校区

# 内侧前额叶皮层不同类型神经元在 社会竞争行为中的功能研究

浙江大学医学院      神经生物学

博士研究生:      张超逸

指导教师:      胡海岚 教授

## 摘要

竞争是动物世界最普遍的社会行为之一，也是社会等级这一基本社会组织方式的成因。近年来由于激烈的社会竞争引发的多种精神疾病，日益成为突出的社会性问题。理解社会竞争背后的神经机制，有助于我们理解精神疾病是如何从正常大脑里发生的。前期研究发现，内侧前额叶皮层(Medial prefrontal cortex, mPFC)在控制社会竞争意识、决定竞争成败中具有关键作用。然而关于mPFC内部的不同细胞类型及其形成的皮层微环路在社会竞争中的作用仍不清楚。

在本课题中，我们以小鼠mPFC内部的锥体(Pyramidal, PYR)神经元和三大主要抑制性神经元，即小清蛋白阳性(Parvalbumin, PV)、血管活性肠肽阳性(Vasoactive intestinal polypeptide, VIP)和生长激素抑制素阳性(Somatostatin, SOM)神经元为研究对象，通过光遗传学，化学遗传学，光纤记录钙成像，微型双光子钙成像和在体光标记电生理记录等手段，探究上述四类神经元亚群在mPFC内部的微环路组成，以及其在调控社会竞争行为中的功能。

通过光遗传学和化学遗传学，我们发现激活mPFC中的PYR和VIP神经元，或者抑制PV神经元能让小鼠在钻管测试中表现出更多的推挤行为，等级升高。而抑制VIP神经元，或者激活PV神经元，则会让小鼠在面对社会竞争时变得畏缩不前，等级降低。而SST神经元，无论激活或抑制，都没有明显的行为变化。通过光纤记录钙成像，我们观察到PYR神经元和VIP神经元的活动在推挤行为时升高，而在后

退行为发生时下降。而PV神经元在推挤行为和后退行为发生时都上升。值得注意的是，我们发现VIP神经元的活动变化在推挤时较PYR和PV都更为提前。随后通过微型双光子钙成像和光遗传操纵相结合，我们证明了PV神经元与VIP神经元在mPFC的神经网络调控中分别扮演着抑制性和兴奋性的作用。最后我们利用在体光标记电生理记录进一步探明了VIP神经元、PV神经元与PYR神经元间的连接关系，以及由它们构成的微环路在社会竞争行为中的动态变化：VIP神经元通过抑制PV神经元达到去抑制PYR神经元的作用，从而提高整个mPFC网络的活动使小鼠产生更多积极的竞争行为。而PV神经元在推挤时候的激活是由于PYR神经元为了维持mPFC网络的兴奋-抑制平衡产生的反馈激活。

由此，我们首次提出了由VIP-PV-PYR神经元组成的mPFC去抑制微环路调控社会竞争行为的神经环路模型。此外我们还探讨了此微环路在其他社会等级相关行为中的作用，暗示着不同等级行为可能存在着不一样的微环路机制。综上，本研究加深了对内侧前额叶皮层如何处理社交信息的理解，为理解和解决因社会竞争造成的社交异常提供更多的参考。

关键词：内侧前额叶皮层，社会竞争，微环路，去抑制，VIP神经元，PV神经元



# Functions of distinct medial prefrontal cortex neuron subpopulations in social competition

Zhejiang University School of Medicine: Neurobiology

Ph.D. candidate: Chao-Yi Zhang

Supervisor: Prof. Hai-Lan Hu

## Abstract

Social competition is one of the most pervasive social behaviors in the animal world. It plays a pivotal role in determining individuals' social status, which is associated with the health and quality of life of animals. In recent years, a variety of mental illnesses, which are caused by the increasingly fierce social competition, have become a prominent social problem. Unraveling the neural mechanism underlying social competition will help us understand how mental illness arises from the normal brain. While it is acknowledged that the dorsomedial prefrontal cortex (dmPFC) is essential in regulating social competition, it remains unclear how information is processed within its local networks.

In this project, we focused on the pyramidal (PYR) neurons and other three main types of inhibitory neurons: parvalbumin-(PV), vasoactive intestinal polypeptide- (VIP) and somatostatin-positive (SOM) neurons in the mouse mPFC. Through optogenetics, chemogenetics, fiberphotometry calcium imaging, miniature two-photon microscopy, and *in vivo* opto-tagging electrophysiological recording, we explored the composition of the microcircuits within the mPFC of the above four different neuron subtypes and their functions in regulating social competitive behaviors.

Using optogenetics and chemogenetics, we found that activating PYR and VIP neurons in the mPFC, or inhibiting PV neurons, led to mice exhibiting more pushing

behaviors with elevated social rank in the tube test. Inhibiting VIP neurons, or activating PV neurons, caused mice to retreat, which lowered their social rank. While for SOM neurons, neither activation nor inhibition resulted in significant behavioral changes. Using fiberphotometry recording, we observed that the activities of PYR neurons and VIP neurons were elevated during pushing behaviors and decreased during retreating behaviors. In contrast, activities of PV neurons increased when both pushing and retreating behaviors occurred. Notably, we found that the pushing behavior is associated with sequential calcium activities initiated by VIP and followed by PYR and PV neurons. Subsequently, by combining miniature two-photon calcium imaging and optogenetic manipulation, we demonstrated that PV neurons and VIP neurons play inhibitory and excitatory roles, respectively, in the regulation of mPFC activity. Finally, we further explored the connections between VIP neurons, PV neurons and PYR neurons by using *in vivo* opto-tagging electrophysiological recordings, and the dynamic changes of the microcircuits formed by these neurons in social competition behaviors: VIP neurons inhibited PV neurons, to disinhibit PYR neurons, thereby increasing the activity of the entire mPFC network and ultimately inducing more effortful behavior. The delayed activation of PV neurons implies an embedded feedback tuning to maintain the excitation-inhibitory balance of the mPFC network.

In this study, we outline a diverse and dynamic microcircuit model and uncover a new VIP-PV-PYR disinhibitory pathway which regulates social competition behavior. In addition, we also explored the role of these microcircuits in other social hierarchy behaviors, suggesting that there may be different microcircuit mechanisms for different hierarchical behaviors. In conclusion, this study deepens our understanding of how the medial prefrontal cortex processes social information and provides new insights into social abnormalities linked to social competition.

**Keywords:** mPFC, Social competition, Microcircuits, Disinhibitory, VIP neuron, PV neuron

## 专有名词缩写表

mPFC	Medial prefrontal cortex, 内侧前额叶皮层
dmPFC	Dorsal medial prefrontal cortex, 背内侧前额叶皮层
PL	Prelimbic cortex, 前边缘皮质
Acc	Anterior cingulate cortex, 前扣带回皮质
MD	Medial dorsal thalamus, 丘脑背内侧核
PAG	Periaqueductal grey, 中央导水管周围灰质
BLA	Basal lateral amygdala, 杏仁基底外侧核
VTA	Ventral tegmental area, 腹侧被盖区
DRN	Dorsal raphe nuclei, 中缝背核
GABA	$\gamma$ -aminobutyric, $\gamma$ -氨基丁酸
PYR	Pyramidal, 锥体神经元
PV	Parvalbumin positive, 小清蛋白阳性
VIP	Vasoactive intestinal peptide positive, 血管活性肠肽阳性
SOM/SST	Somatostatin positive, 生长抑素阳性
USV	Ultrasonic vocalization, 超声
Opto-tag	光标记
WS	Wide spike, 宽波神经元
NS	Narrow spike, 窄波神经元
FSI	Fasting spiking interneuron, 高频发放中间神经元
NS-nonFSI	窄波里的非高频发放中间神经元
Inh	Inhibit, 被抑制的神经类群
Inh-Act	Inhibit-activating, 先抑制后激活的神经类群
dAct	Delay activation, 延迟激活的神经类群
CNO	Clozapine N-oxide, 氯氮平一氧化氮

## 目次

致 谢 .....	I
摘 要 .....	IV
Abstract.....	VI
专有名词缩写表 .....	VIII
目 次 .....	IX
1 引言 .....	1
1.1 社会竞争与内侧前额叶皮层.....	1
1.2 内侧前额叶皮层中的微环路.....	2
1.3 mPFC 微环路与社会竞争 .....	3
2 实验材料和方法 .....	4
2.1 实验动物.....	4
2.2 病毒注射以及光纤埋植手术.....	4
2.3 行为学实验.....	7
2.4 免疫组化染色.....	10
2.5 光纤记录实验.....	12
2.6 头部固定的急性在体电生理记录.....	13
2.7 自由活动的慢性在体电生理记录.....	14
2.8 电生理信号分群和光标记神经元鉴定标准.....	15
2.9 神经元放电变化分析.....	16
2.10 微型双光子钙成像结合光遗传操纵实验.....	17
2.11 双光子成像数据处理及分析.....	19
2.12 数据统计分析.....	19
3 实验结果 .....	20
3.1 内侧前额叶皮层不同神经类群对社会竞争行为的影响.....	20
3.2 内侧前额叶皮层神经元在社会竞争过程中的实时反应.....	28

3.3 利用微型化双光子显微镜探究 PV/VIP 对 mPFC 神经网络的影响.....	37
3.4 在体电生理记录进一步解析 mPFC 中不同类群神经元间的关系 .....	42
3.5 PV 神经元和 PYR 神经元在钻管测试中的活动变化.....	52
3.6 mPFC 微环路中不同神经类群的调谐控制社会竞争行为 .....	57
3.7 mPFC 微环路在小鼠求偶超声行为中的功能 .....	58
4 讨论 .....	63
4.1 VIP 神经元的功能 .....	63
4.2 PV 神经元的功能.....	64
4.3 SOM 神经元的功能.....	65
4.4 不同等级行为存在不同的环路调控机制.....	66
4.5 不足与展望.....	66
参考文献 .....	68
5 附图 .....	74
综述 .....	76
内侧前额叶皮层微环路的组成及功能.....	76
前言 .....	77
内侧前额叶皮层的结构及细胞组成 .....	78
中间神经元在微环路中存在的意义 .....	80
中间神经元在微环路中的组织方式 .....	81
mPFC 微环路中不同中间神经元亚群的具体功能.....	84
mPFC 微环路系统失衡与精神疾病.....	91
总结与展望 .....	92
参考文献 .....	93
作者简介 .....	101

# 内侧前额叶皮层不同类型神经元在 社会竞争行为中的功能研究

浙江大学医学院      神经生物学

博 士 研 究 生：      张超逸

指 导 教 师：      胡海岚

## 1 引言

竞争是动物世界最普遍的社会行为之一，也是社会等级这一基本社会组织方式的成因。等级的高低同社会个体自身的健康程度和生活质量都高度相关<sup>[1-4]</sup>。其中等级高的个体享有更大的生存优势，如食物、配偶等；而等级低的个体则面临着更高的健康风险。当今社会，愈演愈烈的社会竞争引发了诸多精神疾病的发生，这日益发展成为一个严重的社会性问题。而决定社会竞争胜负的因素不仅仅局限于个体体型的大小及身体的强壮程度<sup>[5]</sup>，由高级皮层调控的个人精神品质也在其中发挥着重要作用<sup>[6,7]</sup>。了解竞争背后的神经机制，有助于我们了解精神疾病是如何从正常大脑里产生的，为解决因社会竞争而造成的多种精神疾病问题提供更多的诊疗方案。

### 1.1 社会竞争与内侧前额叶皮层

在高级脑区中，内侧前额叶皮层（Medial prefrontal cortex, mPFC）一直被认为是参与社会等级行为调控的关键脑区<sup>[8,9]</sup>。之前的研究发现，mPFC参与了多个跟社会竞争行为相关的高级认知功能的调控，比如不同社会个体的识别<sup>[10]</sup>，基于价值判断的行为决策<sup>[11-14]</sup>，冲突情境下的行动规划等<sup>[15-19]</sup>。另有研究发现，啮齿类动物和灵长类动物的前额叶受损后，会损害他们对社会等级信息的识别，并使它们在群体中的社会等级降低<sup>[20-23]</sup>。在实验室里，小鼠常作为研究社会等级和社会

竞争的主要对象。其中钻管测试 (Tube test), 被认为是检测小鼠社会等级的有效手段。具体流程是利用一个只允许单只小鼠通过的透明塑料小管, 将两只小鼠同时从管子的两端放入, 他们会因为管子的优先通行权而产生竞争。其中先退出管子的被判定为低等级个体, 而后出来的被认定为高等级个体<sup>[24-26]</sup>。之前的研究发现操纵背内侧前额叶皮层 (Dorsal medial prefrontal cortex, dmPFC) 神经元的突触强度, 可以双向的操纵小鼠在钻管测试中的行为表现以及他们的社会等级排名, 从而确定了dmPFC在调控社会竞争行为中的关键地位<sup>[25,27]</sup>。在随后的研究中, 关于dmPFC参与调控社会竞争中输赢相关的行为机制有被分别报道过。其中背内侧丘脑 (Medial dorsal thalamus, MD) 到mPFC的投射介导了胜利者效应<sup>[28,29]</sup>; 而mPFC到中央导水管周围灰质 (Periaqueductal grey, PAG) 的投射则介导了社会挫败效应<sup>[30]</sup>。尽管如此, 关于社会竞争中上游信息如何输入到mPFC, 并在mPFC内部微环路进行加工的过程, 我们仍然知之甚少。

## 1.2 内侧前额叶皮层中的微环路

前额叶皮层功能的正常执行, 一般依赖于微妙的兴奋-抑制平衡。这种微妙的平衡主要由占了皮层神经元大概80%左右的兴奋性锥体神经元 (Pyramidal, PYR) 和另外20%左右的各类中间神经元 (Interneurons, INs) 相互作用调节<sup>[31-34]</sup>。而在中间神经元中, 血管活性肠肽 (Vasoactive intestinal polypeptide, VIP) 阳性神经元, 小清蛋白 (Parvalbumin, PV) 阳性神经元和生长抑素 (Somatostatin, SOM) 阳性神经元是最主要的三类神经元, 大概占了其中的80%<sup>[35,36]</sup>。鉴于转基因小鼠制备技术的成熟, 以及光遗传, 钙成像等神经元操纵和记录技术的蓬勃发展, 关于皮层中间神经元的功能研究被越来越多的报道。这些中间神经元会响应不同的感觉刺激和行为动作<sup>[37-40]</sup>, 同时还会受大脑不同状态以及不同神经调质的影响<sup>[41,42]</sup>。不同的中间神经元, 在皮层内部网络的调控中扮演着不同的角色, 它们控制着神经信号的传导和输出, 从而调控对应的行为<sup>[35,43,44]</sup>。近期, 有一系列精彩的工作报道了小鼠mPFC不同类型中间神经元在参与调控多种不同社会行为中的作用机制。其中包括了社会交往<sup>[45-47]</sup>, 条件性社交恐惧<sup>[48]</sup>, 同种群不同性别的社交识别差异<sup>[49]</sup>,

社交情感状态识别<sup>[50]</sup>等。证明了mPFC中的不同类型中间神经元在多种社交行为中都发挥着重要作用。

### 1.3 mPFC微环路与社会竞争

目前为止,关于不同类群mPFC神经元在社会竞争行为中的功能却还一直没有被探究:比如他们是否会参与社会竞争行为的调控?他们在社会竞争发生时是如何反应的?又是如何相互影响的?

为了解决这些问题,我们建立了细胞类型特异的光遗传操纵手段和化学遗传手段去操纵mPFC中的PYR神经元和其他三类主要的抑制性中间神经元, VIP, PV和SOM神经元。我们发现,激活mPFC中的PYR和VIP神经元或者抑制PV神经元,都能让小鼠在钻管测试中表现出更多的推挤行为,使原本弱势的小鼠获得胜利。而SOM神经元在其中的调控作用不明显。通过光纤记录实时观察这些神经元亚群在社会竞争过程中的荧光钙活动。我们发现,在小鼠的推挤行为中VIP神经元先被激活,紧接着是PYR和PV神经元。为了进一步探索PV和VIP神经元的功能,通过微型双光子钙成像技术结合光遗传操纵验证了PV神经元与VIP神经元在调控mPFC整体活性中的抑制性与兴奋性作用。最后,通过在体电生理记录,我们发现激活PV神经元时,mPFC中90%左右的其他神经元都被强有力地抑制。当激活仅占皮层所有神经元3%左右的VIP神经元,能使得近50%的mPFC神经元被激活。其中,PV神经元较多地被直接抑制或先抑制后激活;而PYR神经元则较多地被VIP神经元延迟激活。最后通过在体电生理光标记技术,我们记录了社会竞争过程中PV神经元单细胞水平的电活动变化,发现其实有部分的PV神经元在推挤起始时被抑制,而后紧跟着一群PV神经元同PYR神经元一起被激活。综上所述,本课题得出了一个内侧前额叶皮层微环路调控社会竞争行为的模型:VIP神经元通过抑制PV神经元达到去抑制PYR神经元的作用,从而调控整个mPFC网络的活动,最终影响社会竞争行为。



## 2 实验材料和方法

### 2.1 实验动物

本课题使用的小鼠品系如下：1) 转基因小鼠PV-IRES-Cre (品系名称: B6;129P2-Pvalb<sup>tm1(cre)Arbr</sup>/J, 来自北京师范大学的章晓辉教授课题组的馈赠, 具体信息可以在Jackson Laboratory查询, Stock No: #008069) 是在小鼠的胚胎干细胞中通过同源重组的方法将IRES-Cre-pA插入到PV的第5外显子的3'UTR序列后构建的<sup>[51,52]</sup>。该品种的小鼠, 在PV启动子驱动下, Cre重组酶会特定的表达在PV阳性神经元内, 所以可用其特异性的标定PV神经元。2) 转基因小鼠SST-IRES-Cre (品系名称: Sst<sup>tm2.1(cre)Zjh</sup>/J, Jackson Laboratory Stock No: #013044, 来自北京大学的于翔教授课题组的馈赠) 的作用机理跟PV-Cre小鼠类似, 可以特异性标记SST神经元 (SST神经元和SOM神经元是同一种神经元的不同称呼)。3) 转基因小鼠VIP-IRES-Cre (品系名称: Vip<sup>tm1(cre)Zjh</sup>/J, Jackson Laboratory Stock No: #013044, 来自中国科学院神经科学研究所的许晓鸿教授课题组的馈赠) 的作用机理跟PV-Cre和SST-Cre小鼠相同, 可以特异性标记VIP神经元。4) 转基因小鼠Ai32 (RCL-ChR2 (H134R) /EYFP) (品系名称: B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor<sup>tm32(CAG-COP4\*H134R/EYFP)Hze</sup>/J, Jackson Laboratory Stock No: #024109) 与含Cre重组酶的细胞结合后, 会表达强效的蓝光 (450-490 nm) 敏感的兴奋性光敏感通道蛋白 (ChR2) 和黄色荧光蛋白 (EYFP) 的融合蛋白, 可以对特定神经元进行荧光标记和光遗传操纵<sup>[53]</sup>。5) 成年 (大于2个月) C57BL/6小鼠购买自斯莱克实验动物有限公司 (上海)。

小鼠的使用和饲养均符合浙江大学动物管理委员会关于动物实验操作和动物福利的要求。未经特别申明, 每笼饲养小鼠数量为4只, 所有小鼠在12小时光照/黑暗环境周期中饲养, 并供有充足的水和食物。

### 2.2 病毒注射以及光纤埋植手术

#### 2.2.1 病毒注射

表一：本课题所使用到的腺相关病毒（AAV）信息表

病毒名称	病毒来源及货号	注射条件
AAV <sub>2/9</sub> -CaMKII $\alpha$ -ChR2 (H134R) -mCherry	UPenn vector core; 中科院神经所仇子龙教授课题组赠予	Titer: $3.41 \times 10^{12}$ v.g./ml; no dilution; 0.2 $\mu$ l for the right dmPFC
AAV <sub>2/9</sub> -EF1a-dflox-hChR2 (H134R) -mCherry	Taitool Bioscience (Shanghai) Cat# S0170-9-H20	Titer: $1 \times 10^{13}$ v.g./ml; dilution: 1:10; 0.2 $\mu$ l per site in bilateral dmPFC
AAV <sub>2/9</sub> -hEF1a-DIO-EYFP-WPRE-pA	Taitool Bioscience (Shanghai) Cat# S0196-9-H50	Titer: $1.30 \times 10^{13}$ v.g./ml; dilution: 1:10, 0.2 $\mu$ l for the right dmPFC
AAV <sub>2/9</sub> -hSyn-double floxed hM4D (Gi) -mCherry	UMass Gao Lab Vector Core 美国马萨诸塞大学高光坪教授赠予	Titer: $1 \times 10^{13}$ v.g./ml; dilution: 1:8; 0.1 $\mu$ l for bilateral dmPFC
AAV <sub>2/9</sub> -hSyn-GCaMP6s	Taitool Bioscience (Shanghai) Cat# XT021	Titer: $2.47 \times 10^{13}$ v.g./ml; dilution: 1:10, 0.2 $\mu$ l for the right dmPFC
AAV <sub>2/9</sub> -Ubi-eGFP	UMass Gao Lab Vector Core 美国马萨诸塞大学高光坪教授赠予	Titer: $2.50 \times 10^{13}$ v.g./ml; dilution: 1:10, 0.2 $\mu$ l for the right dmPFC
AAV <sub>2/9</sub> -CaMKII $\alpha$ -GCaMP6s	Taitool Bioscience (Shanghai) Cat# S0229-9-H20	Titer: $1.23 \times 10^{13}$ v.g./ml; dilution: 1:5; 0.2 $\mu$ l for right dmPFC
AAV <sub>2/9</sub> -CAG-Flex-GCaMP6s	Taitool Bioscience (Shanghai) Cat# S0354-9-H50	Titer: $3.75 \times 10^{12}$ v.g./ml; 0.2 $\mu$ l per site for the right dmPFC of PV-Cre mice and SOM-Cre mice and bilateral dmPFC of VIP-Cre mice
AAV <sub>2/9</sub> -Ef1a-DIO-eNpHR 3.0-mCherry	ObioTechnology (Shanghai) Cat# H4882	Titer: $2.41 \times 10^{13}$ v.g./ml; dilution: 1:10
AAV <sub>2/9</sub> -hSyn-GCaMP6f	Taitool Bioscience (Shanghai) Cat# SO224-9-H20	Titer: $3.4 \times 10^{12}$ v.g./ml; 0.4 $\mu$ l mixture virus (1:1 with Flex-JAWs) for right dmPFC
AAV <sub>2/9</sub> -EF1a-Flex-JAWs-tdTomato-ER2	Taitool Bioscience (Shanghai) Cat# S0221-9-H20	Titer: $4.2 \times 10^{12}$ v.g./ml ; 0.4 $\mu$ l mixture virus (1:1 with hSyn-GCaMP6f) for right dmPFC

小鼠脑立体病毒注射手术。小鼠通过腹腔注射氯胺酮 (Ketamine, 100 mg/kg; 古田药业) 与盐酸噻拉嗪 (Xylazine, 8 mg/kg; Sigma公司) 的混合溶液用于麻醉。将麻醉的小鼠固定在脑立体定位仪的小鼠适配器上(瑞沃德, 深圳, 型号: 68030), 用耳杆尽量对称的夹住小鼠两耳前侧的骨头凹缝, 观察头骨表左右两侧是否水平。然后轻微转动小鼠头部, 确认小鼠头部不会掉落后, 再用镊子分开小鼠的上下齿, 将上齿卡入前固定杆, 慢慢拧紧前固定杆上的压杆, 固定小鼠前侧头骨。固定后小鼠头部后, 用事先消毒过的手术器械, 先剔除小鼠头部的毛发, 用75%的医用酒精轻轻擦拭手术刀剪以及头皮表面。然后用手术剪沿小鼠头部正中线, 从两耳连线前缘一直剪到两眼连线后缘, 如果有出血情况, 及时用医用棉签擦拭, 并用止血海绵止血。暴露整个颅骨后, 我们需要用立体定位仪对小鼠颅骨进行调平。保证小鼠的前囟 (Bregma, 颅骨正中矢状缝与冠状缝的交点) 与后囟 (Lambda, 颅骨正中矢状缝与人字缝的交点) 保持水平, 以及左右水平。误差标准一般为前后高度 $\pm 0.05$  mm, 左右的高度在 $\pm 0.02$  mm。小鼠立体定位的坐标主要参考《小鼠立体定位脑图谱》(Franklin & Paxinos, 3rd edition, 2007) 一书。其中dmPFC的坐标为: ML (medial-lateral, X), 0.4 mm; AP (anterior-posterior, Y), 2.43 mm; DV (dorsal-ventral, Z), -1.2 mm (以硬脑膜表面为0)。具体流程: 通过立体注射仪的玻璃电极找到目标位置的XY坐标, 用手术刀在目标位点做标记, 然后用颅骨钻轻轻钻开颅骨表面, 直至暴露蛛网膜, 用针尖清理骨屑并挑开脑膜。最后用玻璃电极慢慢插入脑组织, 直至到达目标核团深度, 再开始注射, 注射完后, 需要确认玻璃电极液面下降幅度, 确保足量的病毒进入目标脑组织, 然后留针8-10分钟, 等待病毒扩散。需要注意的是, 整个过程需要用生理盐水保持脑表面湿润, 以减少颅骨及脑表面皮肤在愈合时产生过多的组织增生。病毒注射完后或对其进行手术缝合或进行下一步操作——光纤埋植。

### 2.2.1 光纤陶瓷插芯的埋植

将光纤固定在特定的夹持器末端, 然后将夹持器固定到脑立体定位仪上。用手术刀先将颅骨表面划花, 以增加牙科水泥固定的粘合力。将光纤缓慢下降到目标脑区上方300  $\mu\text{m}$ 处。注意: 本课题的光遗传操纵实验中, 用于激活PYR神经元

的普通WT鼠和用于激活VIP神经元的VIP-Cre鼠用的是单侧光纤（纽顿，杭州），而用于光遗传激活PV和SOM神经元的PV-Cre和SST-Cre鼠，用的是双侧光纤（Doric，美国）。而在光纤记录实验中，四种不同类群的神经元用的都是单侧光纤（纽顿，杭州）。此外，针对不同类群神经元在mPFC中的分布特性。我们对光纤的埋植坐标也进行了相应的调整。比如：PV神经元的分布更加靠近深层。所以他的光纤坐标是：AP: 2.43 mm, ML:0.5 mm, DV:0.9 mm。而VIP神经元主要分布在浅层，为了能记录到双侧的VIP神经元钙活动变化，我们的坐标调整为：14度倾角，AP: 2.43 mm, ML:0.71 mm, DV:1.37 mm。将光纤植入到目标脑区后，先涂抹少量的Vetbond胶水（3M公司）在颅骨表面和周围皮肤连接处，待自然风干后，再涂抹牙科水泥（自凝型II型义齿基托树脂粉和溶剂混合），大约15分钟后，胶水和牙科水泥会完全凝固。最后再松开光纤夹持器，将小鼠放置到37°C的加热垫待其慢慢恢复意识，再放回鼠笼。一般情况下，手术后一周会完全恢复健康。一般正式开始动物实验会等病毒表达2-3周之后。

## 2.3 行为学实验

### 2.3.1 钻管测试和行为分析

钻管测试（Tube test）具体可参考我们实验室之前发表的文章<sup>[24]</sup>。简单来说，我们使用一根长30 cm,内径为3 cm的透明有机玻璃管进行实验，这一内径大小只能容许一只成年雄性C57小鼠通过。对每笼小鼠，我们一般选择每天固定的时间段进行钻管测试。在正式比试之前，会进行为期3天的钻管训练，每天10次，分别从左右钻入各5次。正式比赛时，将两只小鼠从管子的两端同时释放，使他们同时到达管子中间，双方会相互推挤以便争取最优通行权，直到一方小鼠先退出管子，比赛结束。测试耗费的时长是从小鼠在管中相遇开始计算，直到其中一方小鼠四足均离开管子为结束。使对方退出管子的小鼠被记为本次测试的胜方，而先退出的被记为负方。每一笼的四只鼠，我们都会进行两两配对，一笼每天进行共计6对的测试。每只小鼠每天的等级排名，按其和同笼三只鼠配对测试时的获胜次数排序。当一笼四只小鼠钻管测试的等级排名连续三天都保持一致时，会被我们认为这一笼鼠具有了稳定的等级结构，可以进行后续的操纵性实验。在管子周围，我们会

安装摄像头（C930c，罗技），每次钻管比试的行为视频都会被我们完整的记录下来。随后比试视频会被我们用Boris软件<sup>[54]</sup>逐帧分析，进行人工的行为注释。我们主要分析小鼠在管子中的3种最主要的竞争表现行为：推挤（Push，小鼠将头往对手下面铲，准备向前），后退（Retreat，大多数情况时小鼠受到对方推挤后，开始往后方移动，少数情况会出现主动后退），抵抗（Resistance，在受对手推挤时，没有表现出后退行为）。我们将推挤和抵抗看作积极应对行为，而后退被认为是消极行为，并对每种行为发生的次数和时长进行统计。

### 2.3.2 钻管测试中针对不同神经类群的光遗传操纵实验

首先，我们对管子进行了改造：在30 cm长的透明有机玻璃管顶端开一道6 mm宽的狭缝，使得头上植入光纤的小鼠可以无障碍的通过。所有的光遗传操纵实验都在小鼠病毒注射3-4周后进行，确保光敏感通道蛋白完全表达。然后在正式实验开始前，同笼的所有小鼠都需要连接光纤适应两天。在给光刺激当天，先进行一轮不给光的钻管测试，确定等级仍然稳定。再选择等级相近的一对鼠进行光遗传钻管测试。具体流程是，在小鼠进管前打开激光器，再释放小鼠进入管内进行正式比试。对于PV神经元和SOM神经元的操纵，我们用的是持续性蓝光（Constant, 473 nm）刺激<sup>[31,55]</sup>，而对于VIP神经元的操纵，我们选择的是20 Hz, 5 ms的蓝光刺激<sup>[34]</sup>。我们会先从低光强开始尝试，如果行为未发生明显变化，我们会逐步增加光强，最大到25 mW。最终起效的光强范围：CaMKIIa::ChR2, 0.23-25 mW; PV::ChR2, 2-21 mW, VIP::ChR2, 1-20 mW, SOM::ChR2, 2-21 mW（光强根据跳线末端测得）。所有给光前的比试视频和给光后的比试视频都会被完整记录和逐帧进行人工行为注释，给光后等级成功变化的个体会被重点分析。

### 2.3.3 钻管测试中针对不同神经类群的药理遗传操纵实验

PV-Cre, VIP-Cre和SOM-Cre的鼠在被注射AAV-DIO-hM4D病毒后会和年龄相仿的WT小鼠凑成4只一笼进行钻管测试，直至建立稳定等级（在转基因鼠数量足够多的时候，则保持同品系的4只一笼）。正式药物注射实验当天，也会先进行一轮正常的钻管测试，确保等级未发生变化。随后选择一只表达了hM4D的转基因鼠，腹腔注射氯氮平一氧化氮（Clozapine N-oxide, CNO; Sigama公司, Cat: # C0832），

30分钟后再同注射了等量的生理盐水的对手进行比试（CNO用生理盐水作为溶剂，其中PV::hM4D小鼠的剂量是1 mg/kg，VIP::hM4D和SOM::hM4D小鼠的剂量是5 mg/kg）。注射药物后，我们分别在0.5小时，1.5小时，6小时，24小时，48小时，72小时这几个时间点分别做钻管测试，比较社会竞争行为和等级变化情况。同样的，所有给药前的比试视频和给药后的比试视频都会被完整记录和逐帧进行人工行为注释，给药后等级成功变化的个体会被重点分析。

### 2.3.3 旷场实验

旷场实验即Open Field Test，可以评价小鼠的运动能力及焦虑情况。实验时，将小鼠放入40 cm X 40 cm X 40 cm大小的旷场中进行10分钟的检测。通过旷场上方的摄像机对小鼠的运动轨迹进行捕捉，并通过Noldus软件进行分析。总的行进距离为小鼠运动能力的指标。中心区域（20 cm X 20 cm）的行进距离则是小鼠焦虑水平的指标。针对特定神经类群的光遗传操纵实验，PV::ChR2小鼠用的是：20 mW，50 Hz, 5 ms的光刺激，VIP::ChR2小鼠用的是：20 mW，20 Hz, 5 ms的光刺激。在10分钟的旷场行为测试中，1分钟给光，1分钟不给光。其中针对不同动物，先给关或先不给光随机选择。最后比较给光和不给光情况下，小鼠总的行进距离和中心区域的行进距离，来检测光遗传操纵特定类群神经元对小鼠运动能力和焦虑水平的影响。

### 2.3.4 求偶超声实验（Ultrasonic vocalization, USV test）

测试的雄性小鼠首先在含有全新垫料的干净笼子中适应10分钟，然后放入超声行为测试箱进行测试。用于超声测试的雌鼠，一般选择3-5月的成熟雌鼠或者给雌鼠注射孕马血清促性腺激素（Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG），会更加容易诱导出超声。一只雌鼠一天内只配对一只被测试的雄鼠。用于记录的超声行为测试箱，通风顺畅，保持昏暗环境，上方有红外摄像头，并配备小动物超声记录仪（Avisoft Ultra Sound Gate 116Hb）。一次测试的记录周期是12分钟，一开始的2分钟是记录没有雌鼠的基线超声水平，随后放入雌鼠，开始10分钟的正式试验。如果前2分钟有被测试的雄鼠有本地超声发出，则更换垫料重新进行适应。实验过程中小鼠可以自由嗅探和追逐雌鼠，由于测试环境不是熟悉环境，所以整

个实验过程较少会发生交配行为。超声记录软件和行为录像软件会同步开始，同时记录小鼠的超声发声情况和行为。我们使用USGH软件记录和分析超声，设置的参数是：超声频率范围（Threshold）：50-120 kHz；最大频率变化（Max frequency change）：2 像素；最小叫声持续时间（Min whistle duration）：6 ms；合并时间（Hold time）：20 ms；最小总时长（Min total duration）：0 ms。

**超声测试中的光遗传操纵实验：**连接光纤的雄鼠在测试环境中提前适应光纤10分钟。在加雌鼠的10分钟正式超声测试中，1分钟给光，1分钟不给光。其中针对不同动物，先给关或先不给光随机选择。关于不同类群神经元的光刺激方案与钴管测试保持一致。最后分析给光和不给光时间段内，雄鼠超声发声情况差异。

**超声测试中的药理遗传操纵实验：**在正式测试前，给目标雄鼠注射适量的生理盐水，30分钟后对雄鼠进行第一轮超声测试。这个目的是让小鼠对打针过程有个适应，并且生理盐水的效果可以跟后面的药物组进行对比。2天后，进行正式实验：给被测试的动物腹腔注射CNO（剂量跟钴管测试时保持一致），然后放回笼内，30分钟后进行正式测试。当然也需要提前10分钟拿出来放到测试笼适应。正式测试的雌鼠与2天前生理盐水组的雌鼠保持一致。最后比较给CNO组和给生理盐水组USV的变化情况。

## 2.4 免疫组化染色

本课题所有实验用到的小鼠都会进行免疫组织化学检测，以确认病毒表达情况以及光纤埋植位置是否准确。用于免疫组化检测的小鼠通过腹腔注射1%的戊巴比妥钠（50 mg/kg）进行麻醉。确认小鼠进入深度麻醉状态后（掐尾巴和四肢不再动弹）以30 ml的PBS溶液和30 ml 4%浓度的多聚甲醛（Paraformaldehyde, PFA）溶液进行心脏灌流。经过PFA固定的脑组织用手术器械小心取出，尽量保持完整。再放入4%的PFA溶液里进行后固定1-2小时。最后放入30%浓度的糖水溶液里进行脱水，一般需要24 h，直至脑组织沉底。脱水完成后，小鼠脑组织用包埋剂包埋，之后在冰冻切片机（徕卡生物系统公司）中进行冠状切片，切成40  $\mu\text{m}$ 厚的脑片，置于盛有PBS溶液的六孔板中。一般会切六套脑片，分置于六孔板中，取其中一孔用于后续染色，其他留作备用。染色步骤：1）将脑片放入配置的一抗溶液中（一

抗溶液直接用封闭液配置), 4°C 孵育过夜。然后室温孵育2小时; 2) 用0.01M的PBS漂洗脑片三次, 每次5分钟; 3) 将脑片转移到二抗溶液中, 室温孵育2小时; 4) 脑片转移到Hoechst染色液中染色十分钟; 5) 再用0.01M PBS漂洗脑片三次, 每次5分钟; 6) 用牙签或毛笔小心将脑片贴到载玻片上, 晾干; 7) 用Aqueous mounting median(Sigma公司)进行封片, 以备观察。封闭液的配置: 10%普通山羊血清(NGS), 1%牛血清白蛋白(BSA), 0.3%曲拉通X-100, 稀释于0.01 M PBS, 最后加0.03%的叠氮化钠(NaN<sub>3</sub>)。

表二: 免疫组化所使用的主要抗体信息表

抗体名称	货号及来源	使用条件
Rabbit anti-CaMKII $\alpha$	Abcam Cat# ab52476; RRID: AB_868641	1:1000
Rabbit anti-parvalbumin	Swant Cat#PV27; RRID: AB_2631173	1:5000
Rabbit anti-somatostatin	Peninsula Laboratories LLC Cat# T-4103; RRID: AB_518614	1:1000
Rabbit anti-vasoactive intestinal polypeptide	Immunostar Cat# 20077; RRID: AB_572270	1:300
Chicken anti-GFP	Abcam Cat# ab13970; RRID: AB_300798	1:1000
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11034; RRID: AB_2576217	1:1000
Goat anti-chicken Alexa Fluor 488	Invitrogen Cat# A-11039; RRID: AB_142924	1:1000
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 546	Invitrogen Cat# A-11035; RRID: AB_143051	1:1000
Donkey anti-goat Alexa Fluor 546	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11056	1:1000

由于VIP (Vasoactive intestinal polypeptide) 和SOM (somatostatin) 这两个蛋白通过常规的染色方法效果不好, 所以针对这两个蛋白我们采用了三步法: 1) 将脑片放入用封闭液配制的一抗中, 4°C 孵育48小时, 然后室温孵育2小时; 2) 用PBS漂洗脑片三次, 每次十分钟; 3) 将脑片转移到二抗——连有生物素的羊源兔抗(1:250 稀释; Vector laboratories公司) 中室温孵育2小时; 4) 脑片再转移到交联了Cy3的链霉亲和素 (Cy3-conjugated Streptavidin, 1:1000 稀释, Jackson Immuno



Research公司)的三抗中, 室温孵育2小时; 5) 脑片转移到Hoechst 染色液中染色8 min; 6) 用PBS漂洗脑片两次, 每次10分钟; 7) 脑片用牙签或毛笔贴于载玻片上, 晾干, 最后用Aqueous mounting median (Sigma公司) 进行封片, 以备观察。

本课题所呈现的组织切片荧光图像均由共聚焦显微镜(Nikon A1)拍摄获得。

## 2.5 光纤记录实验

由于神经元钙信号响应速度慢, 所以我对钻管测试的管子又进行了改造。将总体长度扩展到60 cm, 这样能增加小鼠的比赛时间, 记录到更多的竞争性行为。然后我还在管子两侧距离管子末端15 cm处加装一个门, 这样可以等小鼠进入管子中的钙信号先趋于稳定再进行正式比试。注射了GCaMP6相关病毒的小鼠, 待表达3周后, 再开始进行钻管训练。一般训练需要4天的时间。前两天, 同普通钻管测试的训练一样, 小鼠需要每天钻管各10次, 左右各5次。第三天训练, 小鼠换到长管子进行训练, 适应开门的过程。开门时间从1 s慢慢增长的5 s, 直至小鼠完全学会等开门再通过管子(图. 7C)。第四天的训练, 难度继续加大, 将一个25 g左右的物体放在管子中间, 小鼠等待开门后, 需要将物体当作对手推出管子, 左右各完成5次训练。这个训练有助于小鼠产生更多竞争性行为。如果第4天小鼠的完成度不高, 可继续延迟训练时间。一般小鼠能在45 s内将管子里的物体推出管外。正式实验开始后, 将两只鼠同时放入60 cm的管子, 小鼠会在两边的门口等待开门。5 s后同时打开双侧的门, 两只小鼠会往中间走, 开始正式的比试。同样的, 管子正上方和正前方会有摄像头, 将小鼠的行为和钙信号同时记录下来。行为分析同前文描述一致, 通过Boris软件, 对比赛视频进行逐帧分析。所有行为都由人工进行行为注释。由于钙信号迟滞性问题, 两个紧邻行为, 前面的钙反应会对后面行为造成影响。所以最后我们选择了持续时间较长的推挤行为(Winning push)和持续较长时间的后退行为(Losing retreat)作为我们主要的分析对象。

单通道光纤记录系统(千奥星科, 南京)会发出488 nm的激发光, 激光通过光纤打到前额叶皮层表达了GCaMP6的神经元上, 并返回一个荧光值, 通过数模转换器和信号采集卡传输到电脑上的钙信号采集软件上, 采样频率为100 Hz。激发光的光强控制在40  $\mu$ W左右(光纤末端测得), 以减少荧光漂白。行为和钙信号的同

步偶联我们是通过光纤记录系统里面的一个LED红灯，红灯闪烁的同时会发射一个低频脉冲信号被钙信号记录软件记录，同时摄像头会捕捉到红灯闪烁信号。这样我们就可以根据这个时间点，将两组数据的时间对齐。

关于事件相关钙信号（Peri-event time histograms, PETHs）变化的分析，我们将所有行为的起始点设为0点，将行为前-3 - -1 s的钙信号设为基线，其中穿过管子（Walk through tube）这个行为的0点是指小鼠穿过管子正中间的时候。所有记录到的钙信号都通过Z-score进行标准化。在行为相关钙信号是否发生显著变化的分析中，我们使用的是置换检验（Permutation test），对于0.05的置信水平需要至少1000次置换<sup>[56]</sup>。所有得到的P值还会通过FDR（False Discovery Rate）进行多重检验矫正。检验的结果用不同颜色来表征，在事件相关的数据图中红色部分表示该时间段内的数据与基线数据相比统计上显著增加，而蓝色部分表示在该时间段内的数据与基线数据相比显著降低。浅色的阴影表示的则是标准误（SEM）。

变化延迟（Change latency）的定义是从事件起始到钙信号到达 $Z = \pm 2$ （这个阈值一般被统计上认为开始出现显著差异）的时间（图. 11A）。衰减时间（Decay time）的定义是从行为起始到钙信号回落到 $Z = \pm 2$ 的时间（图. 11D）。如果其中某次比试的钙信号未超过 $Z = \pm 2$ 这个阈值，则没有变化延迟和衰减时间的值被记录。如果事件发生后，钙信号回落到 $Z = \pm 2$ 的时间超过4 s，我们直接将最大值设为4 s。

## 2.6 头部固定的急性在体电生理记录

所用小鼠为PV-Cre/VIP-Cre和Ai32（RCL-ChR2（H134R）/EYFP）小鼠杂交后的阳性后代：PV::Ai32和VIP::Ai32。对于光抑制PV神经元的实验鼠PV::eNpHR3.0,则是通过注射AAV<sub>2/9</sub>-Ef1a-DIO-eNpHR3.0-mCherry病毒到PV-Cre小鼠上获得。

小鼠先用5%的异氟烷进行诱导麻醉，麻倒后，再转移到立体定位手术台的小鼠适配器上，接上麻醉面罩用1%-2%的异氟烷维持麻醉状态。然后先剪掉小鼠的头皮，用牙科水泥将一根不锈钢条（用于头部固定）粘到颅骨表面。并在颅骨上钻两个孔，将2个接有地线的颅钉拧到颅骨上。并在目标脑区mPFC上方，钻一个直径为0.5-1 mm大小的颅孔，随后在孔上覆盖上生物亲和性硅胶（Kiwk-Sil, WPI）

保护暴露的脑组织。在正式记录之前，小鼠需要头部固定适应2小时。正式记录开始，同样先用异氟烷进行气麻。然后将小鼠颅骨上方的硅胶揭开，暴露脑组织，然后用手术刀或针头将脑膜挑开，随后将电极固定到立体定位仪上，调整到目标脑区的坐标（AP: 2.43 mm, ML: 0.4-0.6 mm, DV: 1.2-1.6 mm）慢慢插入。该实验所用到的光电极（A1 316-5 mm-25-177-OCM16LP, NeuroNexus）包含16通道的电极结合一根直径105  $\mu\text{m}$ 的光纤，光纤末端距离电极尖端200  $\mu\text{m}$ 。在插入前，我们还会将电极先浸泡到Dil（0.2% 溶于乙醇，碧云天）溶液中2 min，这个会使得电极带有红色荧光，后期组织切片帮助确认所记录的电极位置(图. 21A and 21C)。一次下电极，我们会记录多个点，记录深度从1.2 mm慢慢往下移动到1.6 mm，每次移动200  $\mu\text{m}$ 。

电生理信号的采集使用的是OmniPlex Neural Data Acquisition System (Plexin Inc)。宽场频率采集范围是：0.05-8000 Hz；采样频率：40 kHz；增益（Gain）：5000X。神经元电信号通过300-8000 Hz的滤波通道获得，并设置CMR（Common median reference）作为信号矫正参考。

为了检测光激活特定神经元（PYR/PV/VIP神经元）对mPFC其他神经元的影响，通过跳线将电极的光纤连接到LED激光器（荧博，杭州）。针对CaMKII $\alpha$ ::ChR2小鼠的给光方案是：5 mW（光纤末端）的蓝光（470 nm），20 Hz 5 ms，60个重复；针对PV::Ai32小鼠的给光方案是：2 mW（光纤末端）的蓝光（470 nm），Constant 10 s，20个重复；针对VIP::Ai32小鼠的给光方案是：10 mW（光纤末端）的蓝光（470 nm），20 Hz 5 ms，60个重复；针对PV::eNpHR<sub>3.0</sub>小鼠的给光方案是：8 mW（光纤末端）的黄光（593 nm），1 Hz 10 ms，180个重复。我们在每次光刺激实验的开始和结束都会进行光标记实验，具体光刺激方案是：10 mW（光纤末端）的光强，1 Hz 1 ms，180个重复。

## 2.7 自由活动的慢性在体电生理记录

具体流程可参考之前的文章报道<sup>[28,57,58]</sup>。自制的可移动的光电极，包含16根电极丝（STABLOHM 650, California fine wire）和一个25 mm长直径为100  $\mu\text{m}$  的光纤（荧博，杭州）。将其植入到PV::Ai32小鼠的mPFC，坐标为：AP: 2.43 mm，

ML: 0.5 mm, DV: 1.2 mm, 具体手术流程同上面的描述类似, 也需要在颅骨上额外钻两个空, 拧两颗颅钉, 通过银丝接地。最后用Super Bond (C&B, Sun Medical) 固定电极和颅钉。术后小鼠需进行单笼饲养, 待恢复1-2周后再开始实验。

在正式实验开始前, 小鼠需要佩戴一个假电极进行钻管训练, 使其适应电极重量和记录流程。正式实验时, 被记录的小鼠连接电极, 对手连接一个假电极, 随后进行正式的钻管比试。为了记录到更多的竞争性行为, 在这个实验中我们也使用了60 cm长的管子, 管子上的开槽为12 mm以允许头上佩戴电极的小鼠可以自由穿过管子。同样的, 管子正上方和正前方会有摄像头, 将小鼠的行为和电信号一起记录下来。行为和电信号的同步是通过激光器发射一个1 s的蓝光, 激光信号会通过Master 9系统被数据采集卡记录, 同时闪烁的蓝光会被视频捕捉到。光标记PV神经元在每一次记录开始和结束时进行, 具体给光方案为: 5 mW(光纤末端) 470 nm蓝光, 分别以1 Hz、10 Hz和20 Hz三种频率给1 ms的光刺激, 每种频率重复180次。每次记录完, 通过拧可移动电极上的螺丝, 使电极往下行进, 一般每一次拧一圈, 拧一次电极往下移动62  $\mu\text{m}$ 。

所有记录的行为视频都会被保存下来, 通过Boris软件逐帧分析进行人工行为注释, 行为标注方法同之前的描述保持一致。

## 2.8 电生理信号分群和光标记神经元鉴定标准

利用Offline Spike Sorter (Plexon, Hongkong) 通过主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 得到潜在的神经元放电信号 (Spike)。具体来说, 首先剔除幅值低于100  $\mu\text{V}$  (三倍于噪音波段) 的信号。将记录到的未经挑选的波形的组成成分分析值画在一个三维空间里。我们人为地将组成成分分析值接近的波形划分为不同的聚团。如果一个聚团里的有低于1%的波形的不应期短于2 ms, 并且这个聚团在三维空间中的位置可以与其他聚团明显地区分开, 那么我们就认为这个聚团的波形都是来自于同一个细胞。为了消除不同通道间记录到同一个细胞的可能, 我们用了互相关直方图。具体来说, 如果任意两个神经元的峰值活动性同时发生, 那么这两个神经元中的一个就会被剔除。另外, 只有平均发放频率高于1 Hz的神经元才会被应用于后续分析。

所有被记录到的神经元都会根据他们的波宽 (Peak-trough distance) 和本底发放频率 (Firing rate) 分为宽波神经元 (Wide spike, WS), 窄波神经元 (Narrow spike, NS) 和 高频发放中间神经元 (Fast spiking interneuron, FSI)。其中波宽  $> 400 \mu\text{s}$  的被判定为 WS 神经元; 波宽  $\leq 400 \mu\text{s}$  的被判定为 NS 神经元; NS 神经元中, 发放频率  $> 8 \text{ Hz}$  的判定为 FSI 神经元<sup>[59,60]</sup>。光标记成功的神经元鉴定标准参考的是 SALT (stimuli-associated spike latency test)<sup>[33]</sup>, 具体标准是: 反应延迟 (Spike latency)  $< 5 \text{ ms}$ , 时基误差 (Jitter)  $< 3 \text{ ms}$ , 给光后的发放频率显著高于给光前 ( $p < 0.001$ )。最后的结果是被光标记的 PV 神经元平均延迟在:  $3.61 \pm 0.50 \text{ ms}$ , 平均时基误差在:  $1.43 \pm 0.30 \text{ ms}$ 。而被光标记的 VIP 神经元平均延迟在:  $0.90 \pm 0.28 \text{ ms}$ , 平均时基误差在:  $0.011 \pm 0.0009 \text{ ms}$ 。我们还采用了皮尔森相关性分析 (Pearson's correlation coefficient,  $r$ ) 比较给光前后波形的变化, 只有波形未发生明显改变 ( $r > 0.9$ ) 的信号才用于进一步分析。

## 2.9 神经元放电变化分析

神经元放电变化分析用的是 MATLAB (MathWorks) 程序。在 PV/VIP 神经元的激活实验中, 得到的刺激相关电信号直方图 (Peristimulus Time Histogram, PSTH) 先通过自适应高斯核函数 (Adaptive Gaussian kernel) 进行去卷积处理, 再通过 Z-score 进行标准化处理<sup>[34]</sup>。Z-Score 标准化是根据基底发放 (照光前) 的平均值和标准差进行计算。随后通过配对的 Wilcoxon 符号秩和检验 (Wilcoxon signed-rank test) 对照光期间和照光前相同时间窗的发放频率进行比较。

其中关于 VIP 神经元激活后 3 种不同反应类型的定义: 直接抑制 (Inh) 是只在 0-10 ms 的窗口期, 神经元放电频率相较于基线出现显著的下降; 先抑制后激活 (Inh-Act) 是在 0-10 ms 的窗口期, 神经元放电频率相较于基线出现显著的下降, 后又在 30-45 ms 的窗口期, 神经元放电频率相较于基线出现显著的上升; 延迟激活 (dAct) 是只在 30-45 ms 的窗口期, 神经元放电频率相较于基线出现显著的上升。

在自由活动光标记 PV 神经元 (PV::ChR2) 慢性电生理记录实验里, 神经元的变化是通过配对的 Wilcoxon 符号秩和检验, 对事件 (推挤/后退) 前后 (-0.5 - 0.5 s) 的发放频率和事件前 (-3 - -1.5 s) 的基线发放频率进行比较。针对显著变化时间点

的分析,我们选择了20 ms的滑动时间窗同基线(-3 - -1.5 s)的发放频率进行比较,从-1 s开始往后移动,直到出现显著变化。激活和抑制的判断根据第一次出现显著变化时候相较于基线的发放情况进行定义。所有得到的P值都会通过FDR (False Discovery Rate) 进行多重检验矫正。

## 2.10 微型双光子钙成像结合光遗传操纵实验

1) 病毒注射: 将400  $\mu$ l的混合病毒(AAV<sub>2/9</sub>-hSyn-GCaMP6f 和 AAV<sub>2/9</sub>-EF1a-Flex-JAWs-tdTomato-ER2, 1: 1混匀)注射到小鼠的mPFC。病毒注射流程与前文描绘一致。病毒注射后,缝合头皮。等病毒表达两周后,重新开颅再植入Lens。

2) GRIN Lens埋植: 剪开头皮后,将头皮上的结缔组织用手术刀刮掉,然后将脑袋调平,根据手术注射的坐标,重新钻孔,大概钻一个1.5 mm宽的颅窗。然后开始吸取脑组织,将一个27 G的针头,连接到抽滤泵上,然后将针头用电极夹持器夹住,安装到脑立体定位仪上。重新用针头到Bregma点定0,然后根据坐标移到目标脑区,碰到脑组织后,Z轴定0。然后打开抽吸泵开关,一上一下,慢慢往下走,边吸边加生理盐水。如果吸的过程中出血,马上用湿润的止血海绵堵住洞口止血。吸到皮层下0.7 mm出就可以停止,用止血海绵封住洞口,开始打颅钉。一般打三颗颅钉,位置根据不同脑区进行合适调整,尽量围绕颅孔周围,后期需要用它们加胶水进行初步固定。打完颅钉后,用手术刀,将颅骨表面刮花,增加粗糙度。然后开始利用Lens implant kit (Inscopix)开始埋置GRIN Lens (diameter: 1 mm, length:4 mm, Inscopix)。先将Lens 移到Bregma点重新定0,再移到目标脑区上方,将洞里的止血海绵用镊子取出,慢慢往下移动Lens。再往下移动Lens过程中,边添加生理盐水,边用纸巾(或抽吸泵)将生理盐水吸走,保持Lens下方的液体流动(目的是带走一些杂质及血污)。一开始,由于吸掉了脑组织可以移动快些。后面可以每30 s往下移动0.1 mm,直到Lens到病毒注射脑区上方0.2 mm处。接下来就是用各种胶水去固定Lens: 先用Kwik-sil (WPI)将Lens周围的洞口堵住。然后用Super glue将颅钉和Lens连接固定,这一步可以用牙签蘸牙科水与Super glue混合加速凝固。然后用Vetbond组织胶(3M 公司),覆盖颅骨表面及皮肤连接处。等

组织胶自然风干后, 就可以将Lens夹持器提起, 用Kwik-cast (WPI) 将Lens上表面封好 (防止灰尘沾染)。最后就是用Super Bond (C&B, Sun Medical) 进行最后的固定, 并加装一个用于头部固定的铁片。其中针对PV-Cre的鼠, Lens植入坐标为AP: 2.43 mm, ML:0.5 mm, DV: 1.0 mm。针对VIP-Cre的鼠, Lens植入坐标为: 倾角14°, AP: 2.43 mm, ML:0.71 mm, DV: 1.2 mm。

3) 检测信号: 手术后1-2周后, 开始检测信号。将老鼠头部固定, 放到台式双光子显微镜下检查。然后将物镜镜头对准Lens慢慢往下走, 直到看清楚Lens平面。上下微调, 直到找到最佳成像视野。好的视野应该能看到血管还有神经元的闪烁。如果视野不好 (凝血未散或者没看见神经元闪烁), 可以将防尘垫塞回去, 继续等待手术恢复。

4) 埋置基座 (Baseplate): 如果视野很好, 且看到神经元闪烁, 那就准备埋置Baseplate。提前将Baseplate连上微型化双光子探头, 将镜头对准老鼠头部的Lens, 缓缓往下移动, 找到最佳成像视野之后, 用Super Glue (Loctite公司) 先把Baseplate的四个角固定住, 然后用黑色牙科水泥 (牙科水泥混合碳粉, 可以遮光) 把四个面都封住。

5) 微型双光子成像实验: 实验所用探头是第二代快速扫描高清微型大视场双光子显微镜 (FHIRM-TPM V2.0<sup>[61,62]</sup>, 视野大小 (Field of view): 420 X 420 mm<sup>2</sup>; 分辨率 (Resolution): ~1.13 μm; 工作距离 (Working distance): 1 mm, 超维景公司)。微型显微镜探头通过3颗M2螺丝将探头和小鼠头上的基座固定住。图像数据 (512 × 512 pixels) 由配套的采集软件GINKGO-MTPM (超维景) 以10 Hz的采样频率通过飞秒激光器传输 (物镜端~35 mW, TVS-FL-01, 超维景) 获得。绿色的GCamP6f信号由920 nm的光激发获得, 而红色的tdTomato信号由1030 nm的光激发获得。每次钙成像记录之前都会拍一组500帧的红色tdTomato信号, 用于确定细胞类型及其位置。钙成像和光遗传相结合的实验, 920 nm和635 nm (红色) 的激光 (MRL-III-635L, 长春新产业光电技术, 中国) 同时透过GRIN Lens 照入小鼠mPFC。920 nm用于采集钙信号数据, 635 nm激活抑制型光敏感通道蛋白JAWs, 特异性抑制PV/VIP神经元。其中520/30 滤光片 (FF01-525/30, Semrock Inc, 美国) 用于

GCaMP6f成像和光遗传操纵,605/52 nm 滤光片(ET605/52-M, Chroma Inc., 美国)用tdTomato成像。在光抑制实验中,635 nm激光的光强为5 mW,光刺激方案为:先采集1800帧(180 s)的基线,红光刺激200帧(20 s),停光600帧(60 s),循环10次给光和停光过程,一次记录总共9800帧。

## 2.11 双光子成像数据处理及分析

双光子图像的预处理由北京大学-南京脑观象台的数据处理中心帮助完成。包括进行了图像压缩,运动矫正,神经元胞体识别及钙信号提取,最后的数据分析由自己写的MATLAB代码完成。简单来说,先用严格的分段运动矫正NoRMCorre<sup>[63]</sup>程序减少成像视野由于小鼠运动引起的偏移,再通过STNeuroNet<sup>[64]</sup>程序分别标记红色和绿色的神经元胞体信号(Regions of interest, ROI),最后用Image J (NIH)人工检查所有程序得出的胞体是否为真实神经元信号。我们通过胞体的中心位置,去找到红色信号ROIs对应的绿色信号ROIs,从而帮助我们找到PV/VIP神经元。再用Annular Ring Subtraction (ARS)<sup>[40,65,66]</sup>帮助我们提取所有ROIs的钙信号。所有的钙信号数据通过MATLAB用Z-score进行标准化处理。钙峰(Calcium transients)的检测标准为超过4倍的标准差。关于显著响应神经元的确定是通过Wilcoxon符号秩和检验对给光时间窗和给光前相同时间窗内钙峰数量的配对比较, $p < 0.05$ 才被判定为对光刺激有显著响应的神经元。

## 2.12 数据统计分析

本课题数据统计分析使用的是Prism 8.1 (GraphPad)和MATLAB。在分析行为数据时,检查了病毒的注射位点,光纤植入位点,其中位置不准确的小鼠被剔除分析。如果数据符合正态分布,根据比较的数据是否配对,进行配对或者不配对的Student's t-test。不符合正态分布的数据则采用Mann-Whitney U检验(曼-惠特尼U检验)进行分析。当比较多因素多组间数据时,使用Two-way ANOVA(双因素方差分析)with Bonferroni's post-tests多重检验。 $p < 0.05$ 被认为具有统计学差异,课题中的所有数据如果未特殊注明都以平均值 $\pm$ 标准误(Mean  $\pm$  SEM)来表示。

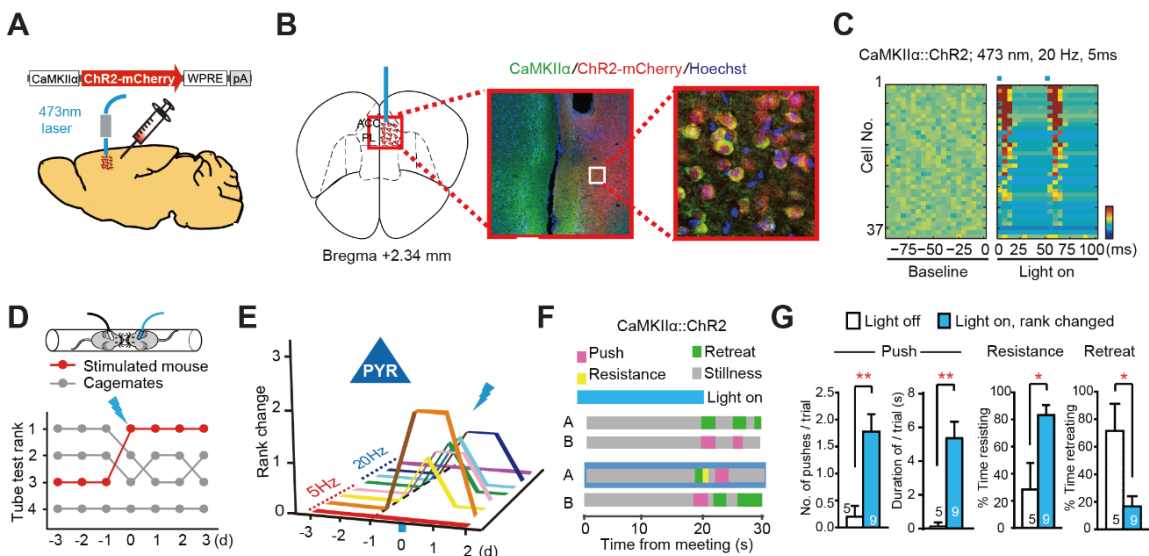


### 3 实验结果

#### 3.1 内侧前额叶皮层不同神经类群对社会竞争行为的影响

##### 3.1.1 光激活mPFC锥体神经元能提高小鼠社会竞争能力

我们实验室之前的研究发现通过光遗传激活小鼠内侧前额叶皮层的神经元能瞬时改变小鼠在钻管测试中的竞争表现，升高他们在群体中的社会等级<sup>[28]</sup>。为了探究mPFC内部不同神经元在其中的贡献程度，我们用光遗传分别激活mPFC内部的不同类群神经元，观察对钻管测试中竞争行为的影响。我们先选择了mPFC中最主要的，占有神经元80%左右的兴奋性锥体（Pyramidal, PYR）神经元进行光遗传操纵。通过立体注射仪将腺相关病毒：AAV-CaMKII $\alpha$ -ChR2-mCherry注射到mPFC（图. 1A），CaMKII $\alpha$ 启动子的AAV病毒将光敏感离子通道蛋白ChR2<sup>[67]</sup>特异性表达在PYR神经元上，使得我们可以通过473 nm的蓝光特异性激活mPFC中的锥体神经元（图. 1B）。通过急性的在体电生理记录，我们发现激活mPFC的PYR神经元能让超过70%的mPFC神经元兴奋（图. 1C）。随后，我们在钻管测试中激活小鼠mPFC中的PYR神经元，观察小鼠的行为变化（图. 1D）。我们发现激活小鼠mPFC的PYR神经元，能让8只中的6只小鼠社会等级升高（图. 1E）。通过对那些光照后等级上升的鼠进行细致的行为视频分析，我们发现激活mPFC中的PYR神经元，能让小鼠表现出更多的推挤（push），抵抗（resistance）等积极竞争行为，更少的出现后退（retreat）等消极行为。



### 图 1. 光遗传学激活mPFC中锥体神经元对钻管测试中行为的影响

(A) CaMKII $\alpha$ ::ChR2病毒的构建, 以及病毒的注射部位和光纤埋植部位示意图。  
(B) 左图: mPFC中病毒注射部位的示意图(包括PL区域和ACC的前部)。右图: CaMKII $\alpha$ 与ChR2-mCherry共表达的免疫染色荧光图。绿色: CaMKII $\alpha$ ; 红色: ChR2-mCherry; 蓝色: Hoechst。比例尺, 中间: 200  $\mu$ m; 右: 20  $\mu$ m。  
(C) 蓝光刺激锥体(PYR)神经元时, 用光电极记录到的mPFC神经元反应, 神经元放电频率用Z-score进行标准化处理。比例尺, Z-score: -20-20。  
(D) 一笼注射了CaMKII $\alpha$ ::ChR2病毒的小鼠每天钻管测试的结果, 其中在第0天等级排3的小鼠接受了急性的光刺激后, 等级开始上升。  
(E) 光刺激PYR神经元后钻管测试中等级变化的总结。每条线代表一只动物。  
(F) 同一对小鼠在给光前和给光时两次钻管测试中的行为注释。注意开始(上)小鼠B在测试中是失败一方, 在光激活内侧前额叶皮层PYR神经元时(下)获胜。  
(G) 等级变化的小鼠在不给光和光激活PYR神经元条件下行为表现的比较。框里的数字是用于统计的钻管测试比赛次数。曼-惠特尼U检验。  
合作者: 朱鸿和辛秋红。

#### 3.1.2 光激活mPFC不同中间神经元对小鼠竞争行为的影响

为了进一步系统性的探究mPFC中不同中间神经元对社会竞争的影响, 我们选取了mPFC中最主要的三大类中间神经元进行光遗传操纵行为测试, 分别是PV, VIP和SOM神经元, 他们约占了皮层中间神经元的80%。我们利用PV-Cre, VIP-Cre和SOM-Cre的转基因鼠<sup>[52]</sup>, 通过与Ai32的小鼠杂交<sup>[53]</sup>或者注射AAV-DIO-ChR2病毒, 使得这些中间神经元特异性的表达光敏感通道蛋白ChR2(图. 2A-2C, 3A, 3E and 3I), 然后在钻管测试中分别激活这些中间元, 观察小鼠行为和等级的变化。我们发现, 激活小鼠mPFC中的PV神经元, 会让小鼠在钻管测试中输掉比赛, 小鼠的社会等级降低(图. 3B and 3C)。随后通过视频行为分析发现, 激活PV神经元后, 小鼠在钻管测试中表现出更多的后退行为, 推挤和抵抗等积极竞争行为显著减少(图. 3D)。当激活小鼠中的VIP神经元时, 小鼠的社会等级升高, 其在钻管测试中, 会表现出更多的推挤, 抵抗等积极竞争行为, 更少的后退行为(图. 3F-3H)。而当激活小鼠中的SOM神经元时, 8只里面只有2只等级下降, 统计不显著(图. 3J and 3K)。我们也做了相应的对照实验, 将病毒里的光敏感通道蛋白(ChR2)替换成黄色荧光蛋白(EYFP)注射到小鼠的mPFC, 光刺激只表达了EYFP的PV神经元和VIP神经元, 对小鼠的行为没有影响(图. 3C and 3G), 因此排除了光照对小鼠的影响。总结一下光遗传激活mPFC的不同中间神经元对小鼠钻管测试的胜负, 即

对他们社会等级的影响：激活PYR神经元和VIP神经元能升高小鼠的社会等级，激活PV神经元则降低小鼠的社会等级，激活SOM神经元对小鼠的社会等级不造成显著影响（图. 3L and 2D）。

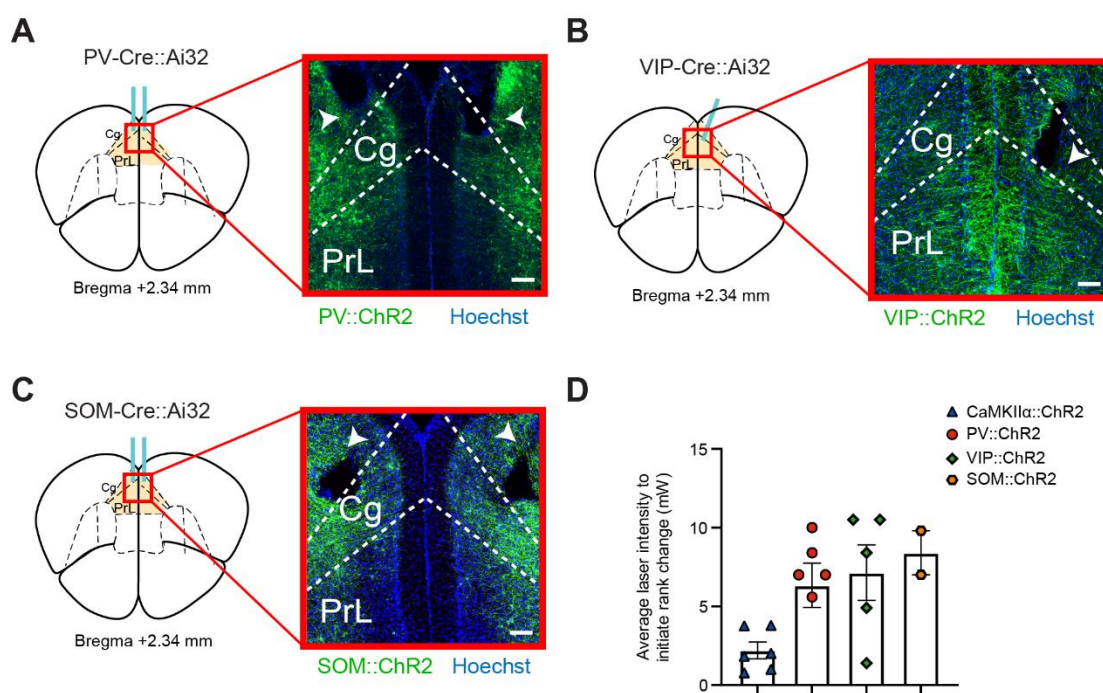


图 2. 细胞类型特异光遗传刺激实验的病毒靶向、光纤埋植位置和平均激光强度 (A, B 和 C) PV::Ai32 (A)、VIP::Ai32 (B) 和 SOM::Ai32 (C) 小鼠的mPFC中光纤埋植 (白色箭头表示) 的示意图。比例尺, 100  $\mu$ m。  
(D) 小鼠发生等级变化的平均激光强度。

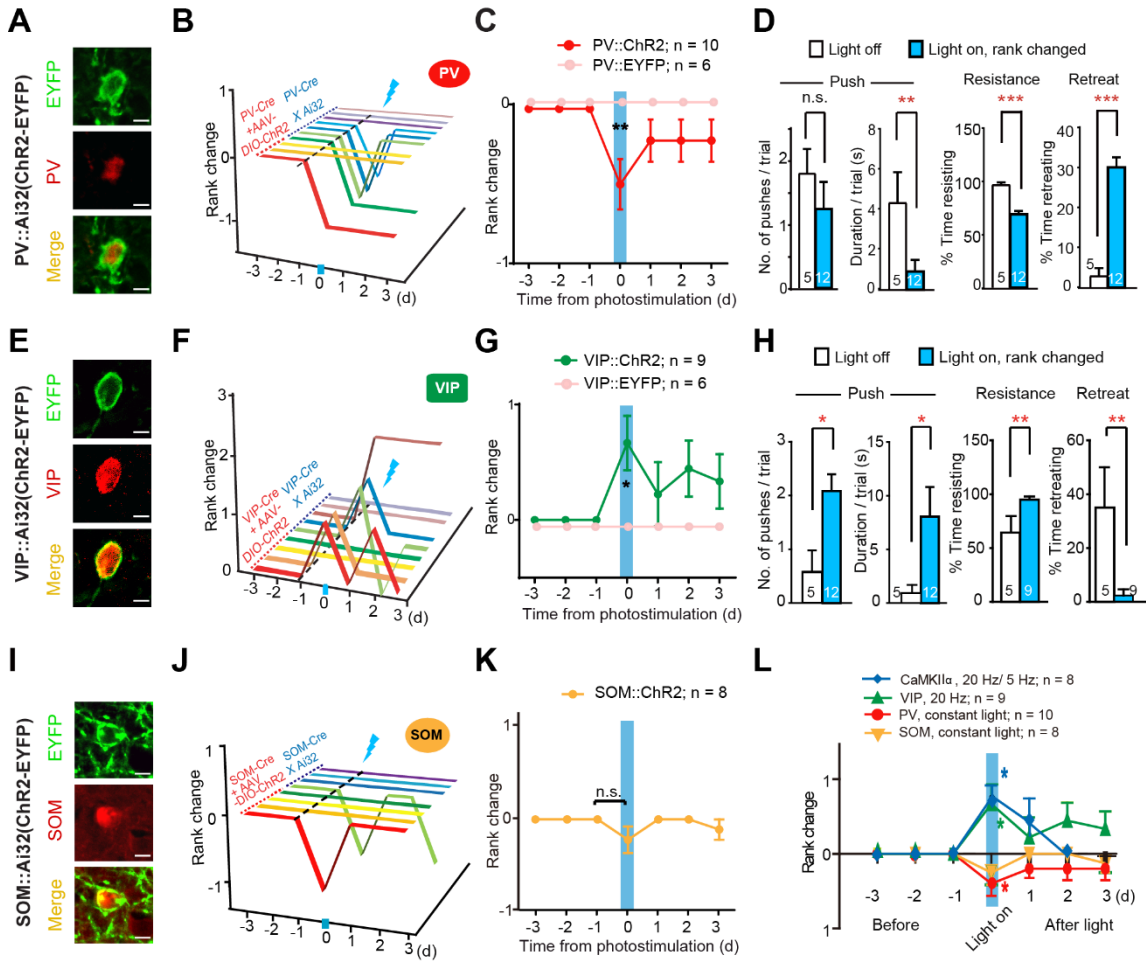


图 3. 光遗传学激活不同mPFC中间神经元对钻管测试中行为的影响

(A, E 和 I) 免疫荧光染色确认 ChR2-EYFP 表达在 PV-Cre::Ai32 (A)、VIP-Cre::Ai32 (E) 或 SOM::Ai32 (I) 小鼠相应细胞类型 PV (A)、VIP (E) 或 SOM (I) 神经元中。比例尺, 10  $\mu$ m。

(B, F 和 J) 光刺激 mPFC 中 PV (B)、VIP (F) 或 SOM 神经元 (J) 后, 小鼠在钻管测试中等级的变化。每条线代表一只动物。在第 0 天进行光刺激。

(C 和 G) 光激活 PV 神经元导致排名下降 (C), 而光激活 VIP 神经元导致排名提升 (G)。双因素方差分析, Bonferroni 多重比较事后检验。

(D 和 H) 等级变化的小鼠在不给光和光激活 PV 神经元 (D) /VIP 神经元 (H) 条件下行为表现的比较。框里的数字是用于统计的钻管测试比赛次数。曼-惠特尼 U 检验

(K) 光遗传学激活 mPFC 中 SOM 神经元后, 小鼠在钻管测试中的平均等级变化。配对的 Wilcoxon 符号秩检验。

(L) 光遗传学激活 mPFC 中不同类型神经元后, 小鼠在钻管测试中的平均等级变化。配对的 Wilcoxon 符号秩检验

所有数据均为均值  $\pm$  标准误, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; n.s., 无显著性差异。合作者: 朱鸿和周亭亭。

### 3.1.3 光激活PV/VIP神经元不改变小鼠的焦虑水平和运动能力

之前有研究报道，小鼠内侧前额叶皮层的中间神经元跟恐惧和焦虑行为相关 [48,68,69]。为了探究是不是因为光激活中间神经元引起恐惧和焦虑，从而影响社会竞争中的表现，我们借助旷场测试进行验证。在10分钟的旷场测试中，分别对小鼠mPFC中的PV神经元和VIP神经元进行1 min ON- 1 min OFF 的光刺激（图. 4A）。结果显示无论是激活小鼠的PV神经元（图. 4B）或是VIP神经元（图. 4C），对小鼠的运动能力和焦虑水平都没有显著影响。因此，我们排除了社会竞争表现变化是因为焦虑造成的可能性。

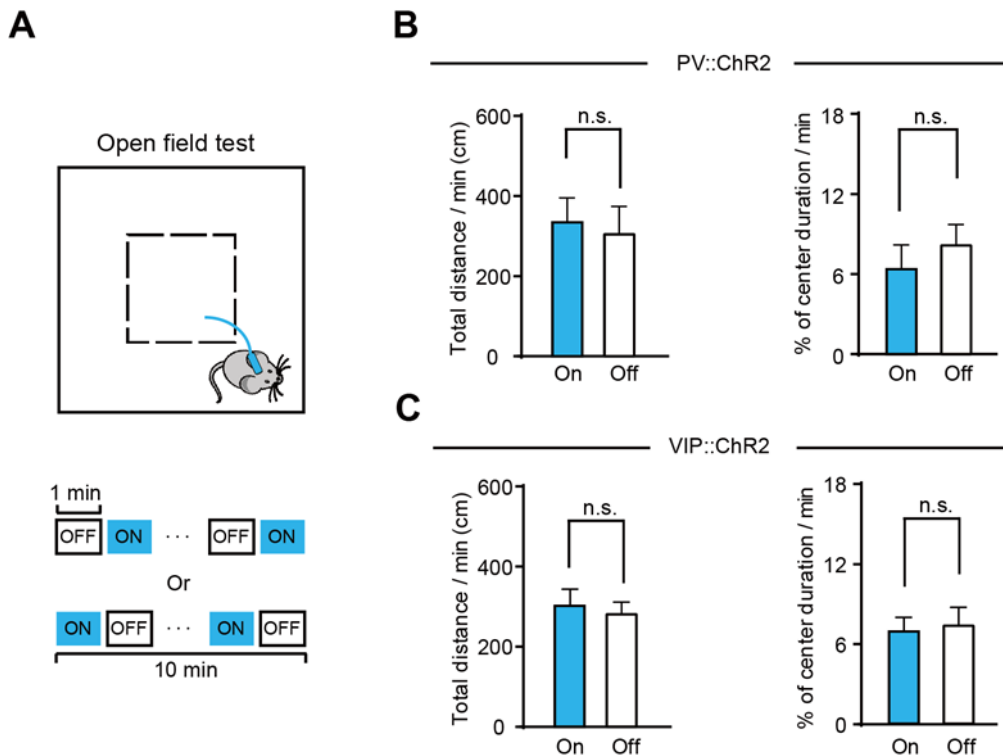


图 4. 光激活mPFC中的PV或VIP神经元不影响运动和焦虑水平

(A) 旷场测试 (OFT) 和间歇性光刺激方案的示意图。

(B) 在光刺激PV神经元时，光照和无光照的时间段内每分钟的总运动距离（左）和中央区域停留时间（右）比例。n = 8只老鼠。配对t检验。

(C) 在光刺激VIP神经元时，光照和无光照的时间段内每分钟的总运动距离（左）和中央区域停留时间（右）比例。n = 8只老鼠。配对t检验。

所有数据均为均值±标准误，n.s.，无显著性差异。

数据来源：朱鸿

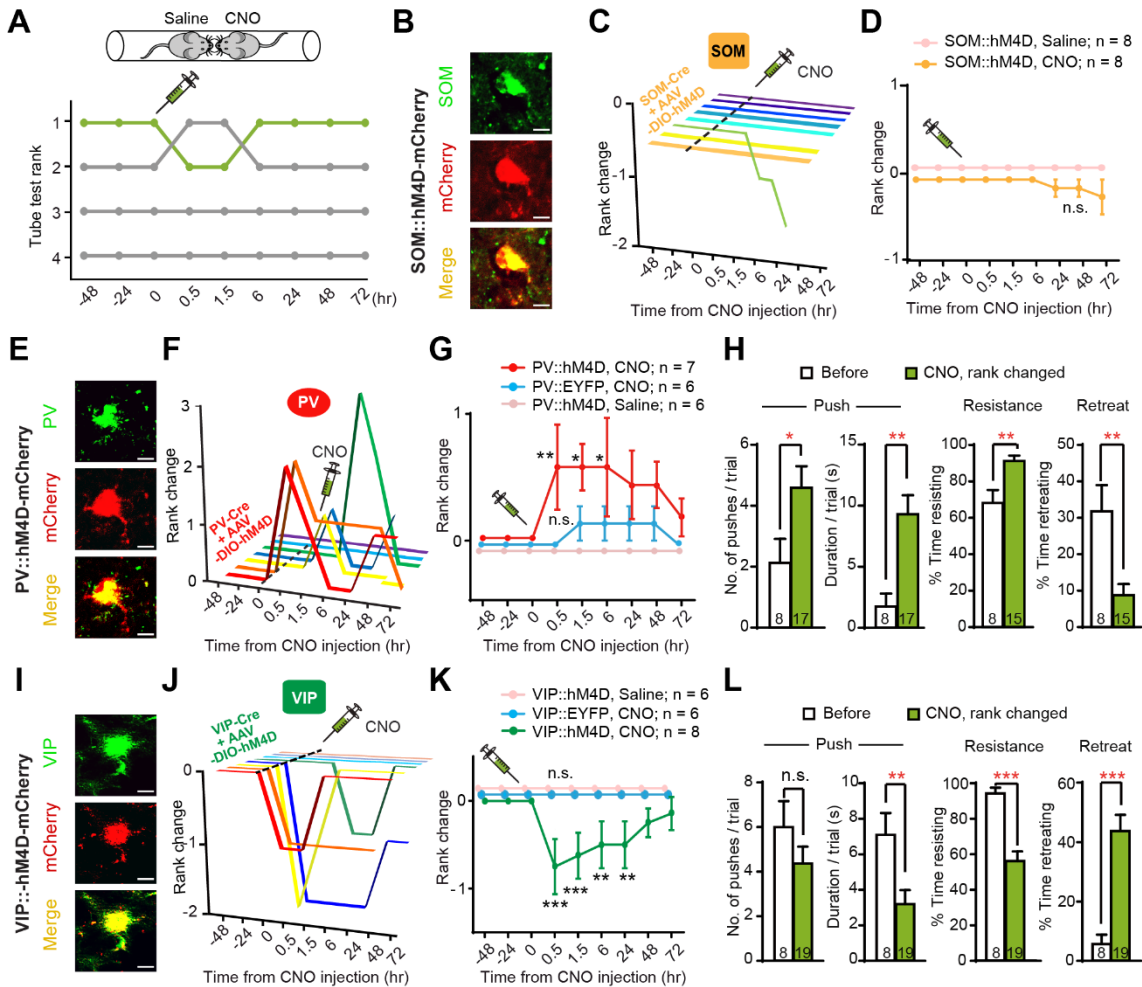


图 5. 化学遗传学抑制 mPFC 中不同中间神经元，对钻管测试中行为的影响

(A) 一笼注射 VIP::hM4D 病毒的小鼠实验期间钻管测试的结果，其中在第 0 时等级排 1 的小鼠腹腔注射 CNO，半小时后等级开始下降。

(B, E 和 I) 免疫荧光染色确认 hM4D-mCherry 表达在 SOM-Cre::Ai32 (B)、PV-Cre::Ai32 (E) 或 VIP::Ai32 (I) 小鼠相应细胞类型 SOM (B)、PV (E) 或 VIP (I) 神经元中。比例尺，10  $\mu\text{m}$ 。

(C, F 和 J) 化学遗传抑制 mPFC 中 PV (B)、VIP (F) 或 SOM 神经元 (J) 后，小鼠在钻管测试中等级的变化。每条线代表一只动物。在第 0 时腹腔注射 CNO。

(D, G 和 K) SOM::hM4D (D)、PV::hM4D (G) 或 VIP::hM4D (K) 小鼠注射 CNO 或生理盐水后的平均等级变化。双因素方差分析；事后 Bonferroni 多重比较检验。

(H 和 L) 等级变化的小鼠在注射 CNO 抑制 PV (H) 和 VIP (L) 神经元前后钻管测试中行为表现的比较。框里的数字是用于统计的钻管测试比赛次数。曼-惠特尼 U 检验。

所有数据均为均值 $\pm$ 标准误，\* $p < 0.05$ ；\*\* $p < 0.01$ ；\*\*\* $p < 0.001$ ；n.s.，无显著性差异。合作者：朱鸿和周亭亭。

### 3.1.4 药理遗传抑制不同中间神经元对小鼠社会竞争行为的影响

为了进一步证实内侧前额叶皮层中这些不同中间神经元在社会竞争行为中的调控作用。我们接着测试了抑制这些不同中间神经元对钻管测试中竞争行为的影响(图. 5A)。为了实现双侧脑区全面的抑制,我们选择了药物遗传学的神经操纵方法<sup>[70]</sup>。通过SOM-Cre, PV-Cre和VIP-Cre的转基因鼠,双侧mPFC注射AAV-DIO-hM4D-mCherry病毒(图. 5B, 5E, 5I and 6A-6C)。通过腹腔注射hM4D受体的人工配体CNO,表达hM4D的神经元与CNO结合后会被抑制。等级稳定后的小鼠,选择其中一只注射CNO,它的对手注射Saline(生理盐水)作为对照,然后分别在注射药物后的0.5 h, 1.5 h, 6 h, 24 h, 48 h和72 h分别做一次钻管测试,记录等级和行为的改变。我们发现抑制mPFC中的SOM神经元对小鼠的社会竞争行为仍然没有显著的影响,8只小鼠里面只有一只出现等级下降情况(图. 5C and 5D)。而抑制PV神经元后,我们发现小鼠的社会等级从0.5小时开始上升(图. 5F and 5G)。视频行为分析显示,抑制PV神经元后小鼠表现出更多推挤,抵抗等积极竞争行为,而消极后退行为显著减少(图. 5K)。而当抑制小鼠mPFC中的VIP神经元,我们发现8只小鼠里有5只的社会等级降低(图. 5J and 5K)。通过视频行为分析发现,他们在面对对手时会出现更多的后退行为,而推挤和抵抗等积极竞争行为显著降低(图. 5L)。为了排除药物注射的影响,我们做了将CNO换成Saline注射的对照实验,结果对小鼠的社会等级和竞争行为都没有显著影响(图. 5D, 5G and 5K)。为了排除病毒注射的影响,我们将AAV-DIO-hM4d病毒替换成AAV-DIO-EYFP注射到小鼠的双侧mPFC,然后按之前同样的流程进行实验。给小鼠注射与之前等量的CNO后进行钻管测试,结果显示,这不会对小鼠的行为产生显著影响(图. 5G and 5K)。由此,我们可以确定mPFC中的PV和VIP神经元在社会竞争行为调控中都扮演着重要角色,且他们的作用是相反的。而SOM神经元,在社会竞争行为中的调控作用则相对较弱。

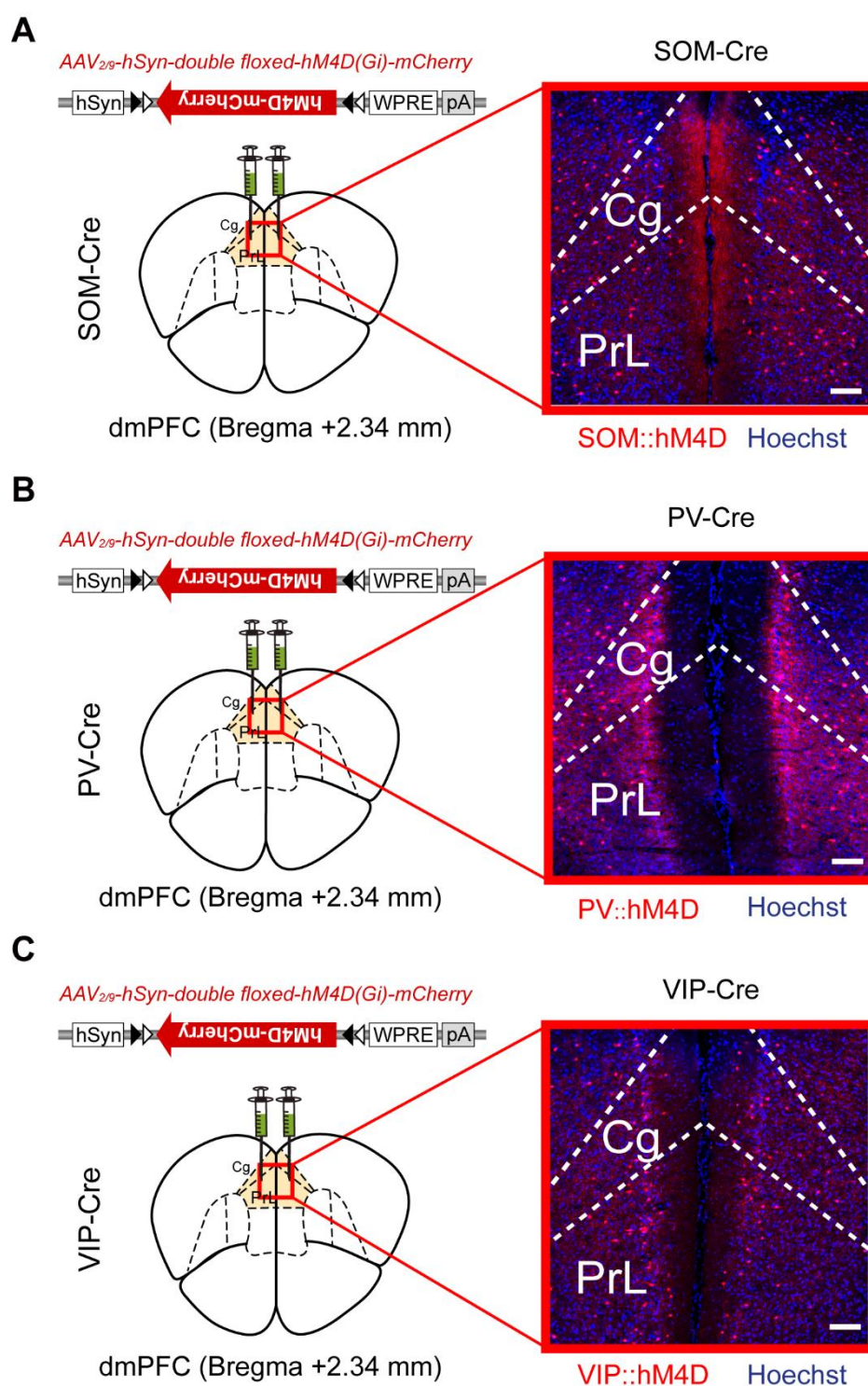


图 6. 细胞类型特异化学遗传抑制实验中 mPFC 的病毒注射情况

(A, B 和 C) SOM-Cre (A)、PV-Cre (B) 和 VIP-Cre 小鼠 (C) 中的病毒的构建、病毒注射部位和病毒表达示意图。比例尺, 100  $\mu$ m。



## 3.2 内侧前额叶皮层神经元在社会竞争过程中的实时反应

### 3.2.1 内侧前额叶皮层神经元在钻管测试中的整体钙信号变化

在确立mPFC中不同神经类群对社会竞争行为的影响后,我们下一步希望能看到这些神经元在小鼠钻管测试中实时的活动变化,以帮助我们了解他们具体是如何参与到社会竞争行为调控的。我们选择了光纤记录系统<sup>[71,72]</sup>来记录小鼠前额叶神经元的活动变化(图. 7A)。通过注射AAV-hSyn-GCaMP6s病毒标记mPFC所有的神经元。hSyn的启动子,能让小鼠前额叶所有的神经细胞都表达钙离子指示剂GCaMP6s<sup>[66]</sup>(GCaMP6是一种基于GFP改造的会因为细胞钙离子浓度变化产生荧光亮度变化的绿色荧光蛋白变构体。细胞越活跃,钙离子浓度则越高,荧光亮度就越亮)。通过插入到内侧前额叶皮层上方的光纤,使得我们可以根据光纤检测到的荧光亮度变化来反应mPFC整体神经元的活动变化(图. 7B, 8A and 8B)。由于钙信号反应相较于神经电活动慢,使得它时间分辨率上存在一定的时滞性:即两个紧挨着的行为,后一个行为的钙反应会受到前面行为的影响。为了更好的偶联小鼠行为和钙信号间的关系,我对传统的钻管测试进行了改造,将30 cm的管子换成60 cm的管子,并在管子两端15 cm处加了可以提拉的门(具体细节见实验方法)。管子两端的门,能帮助我们得到小鼠正式比试前更平稳的钙信号;更长的管子,能增长小鼠的比试时间,帮助我们得到数量更多、持续时间更长的竞争性行为。小鼠会先经过一段时间的钻管训练,等到完全熟悉开门-比试这个过程,再开始正式记录(图. 7C)。小鼠的行为和钙信号会被同时记录,通过对行为视频进行逐帧的人工注释,再进行更深入的相关性分析。首先,我们发现小鼠单独穿过管子时,mPFC神经元的钙反应没有出现较大的波动(图. 7D and 7E)。随后,我们选择了钻管测试中最典型的推挤(Push)和后退(Retreat)这两个社会竞争行为进行进一步的分析。我们发现mPFC神经元表达GFP的小鼠在推挤时,不会出现显著的荧光变化,排除了剧烈运动对基底荧光亮度的影响(图.7F and 7G)。而当mPFC神经元上表达了GCaMP6f的小鼠在做出推挤行为时,mPFC的钙信号有了显著的上升(The average signal peak(Z-score)=  $4.0 \pm 0.7$  (mean  $\pm$  SEM),  $p < 0.05$ , permutation test,  $n = 55$  trials from 7 mice; 图. 7H and 7J)。而当小鼠在后退时,mPFC的整体神

神经元的钙信号则有个轻微的下陷 (The average signal trough (Z-score) =  $-1.8 \pm 0.6$  (mean  $\pm$  SEM),  $p < 0.05$ , permutation test,  $n = 42$  trials from 7 mice; 图.7I and 7J)。

这意味着小鼠dmPFC的大部分神经元会在小鼠做出积极的竞争行为时被激活，而在做出消极的后退行为时被抑制。

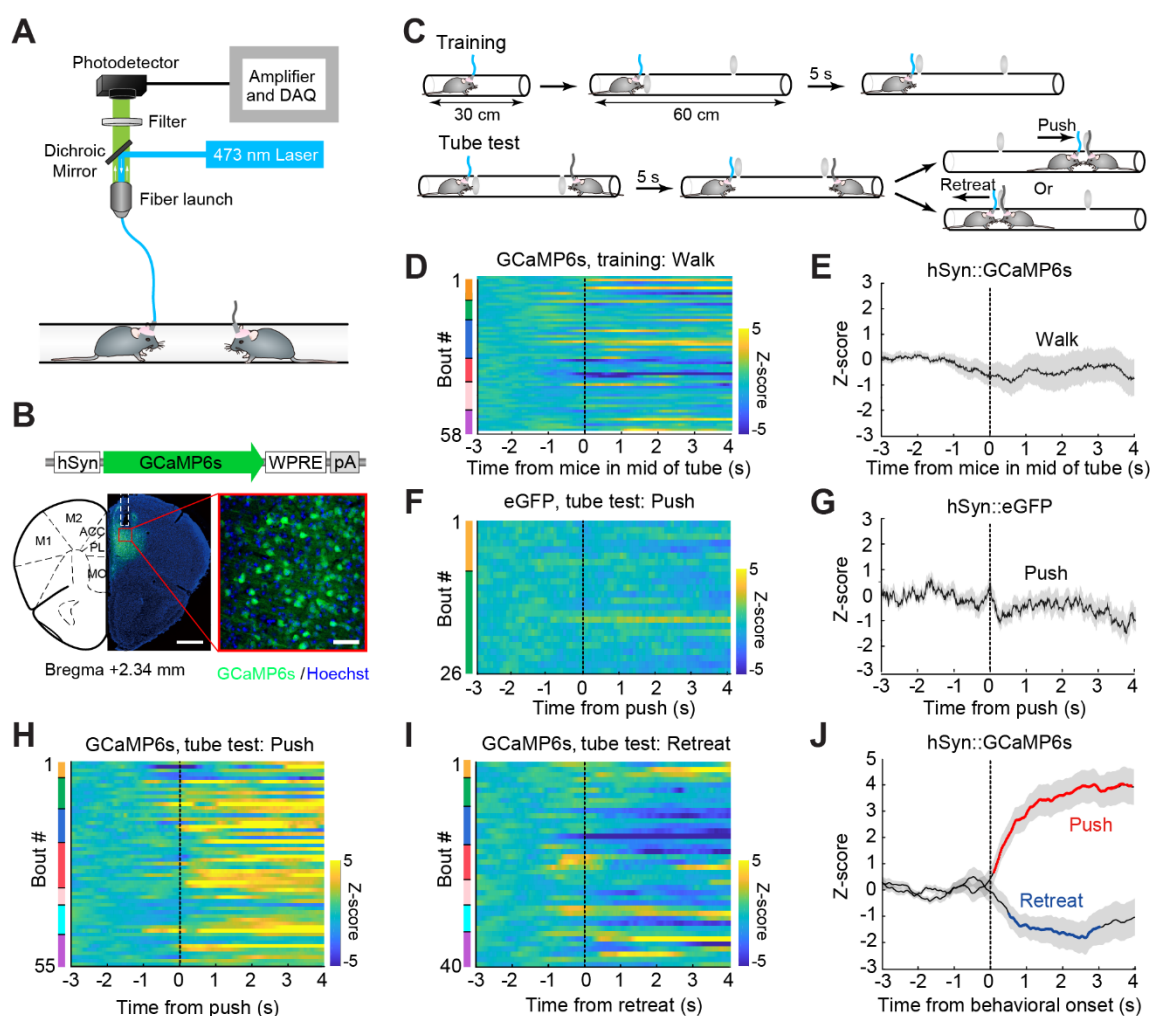


图 7. 钻管测试中 mPFC 神经元的实时钙反应

(A) 光纤记录实验的模式图。

(B) hSyn::GCaMP6s 病毒的构建、注射部位和光纤埋植部位示意图。比例尺：500  $\mu$ m (左) 和 50  $\mu$ m (右)。

(C) 经过改进的钻管测试：钻管训练 (上) 和正式测试 (下)。详细信息，请参阅实验方法。

(D 和 E) 小鼠穿过管子时 mPFC 的钙信号经 Z-score 标准化后的热图 (D) 和事件相关钙信号变化曲线图 (E)。0 点为小鼠通过管子中间的时间。在热图中，左侧

的不同色条代表不同的老鼠。数据共来自 6 只小鼠，总计 58 次试验。

(F 和 G) mPFC 神经元表达 eGFP 对照病毒的小鼠在推挤行为中的钙信号经 Z-score 标准化后的热图 (F) 和事件相关钙信号变化曲线图 (G)。0 点是小鼠推挤行为开始的时间点。数据共来自 2 只小鼠，总计 26 次试验。

(H 和 I) mPFC 神经元表达 GCaMP6s 病毒的小鼠在推挤行为 (H, 7 只小鼠的 55 次试验) 和后退行为 (I, 7 只小鼠的 42 次试验) 中的钙信号经 Z-score 标准化后的热图。0 点是小鼠开始推挤或后退行为的时间点。

(J) 在推挤 (红色) 和后退 (蓝色) 行为中, mPFC 钙信号经 Z-score 标准化后的事件相关钙信号变化曲线图。实线表示平均值, 阴影区域表示标准误。颜色高亮线段表示与基线相比具有统计学意义的钙信号增加或减少 ( $p < 0.05$ ; 置换检验)。

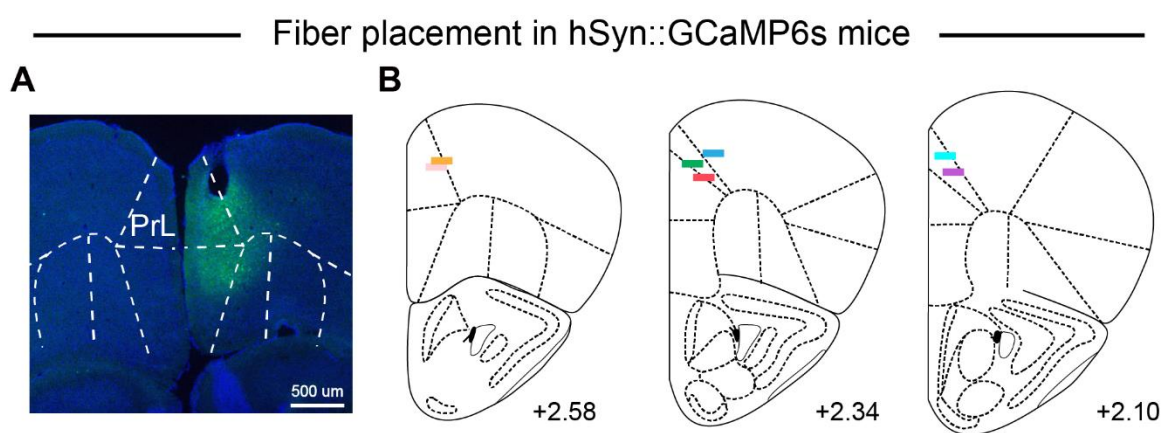


图 8. 表达了 hSyn::GCaMP6s 病毒小鼠的光纤位置检查

(A) 1 号小鼠 (对应图 7 的黄色) 实验结束后的脑组织切片, 检查 mPFC 中光纤埋植位置和病毒表达情况。白色虚线是 mPFC 亚区的边界; 绿色: GCaMP6s; 蓝色, Hoechst。

(B) 所有用于数据统计的 hSyn::GCaMP6s 小鼠的光纤埋植位置。不同的颜色条代表不同的小鼠, 与图 7 对应。

### 3.2.2 内侧前额叶皮层不同类群神经元在钻管测试中的钙信号变化

为了进一步探究 mPFC 微环路中不同类群神经元在社会竞争发生时的实时反应, 我们接下来又分别对 mPFC 中 PYR 神经元, PV 神经元和 VIP 神经元分别做了光纤记录。我们利用含 CaMKII $\alpha$  启动子的 AAV-CaMKII $\alpha$ -GCaMP6s 注射到野生型 (WT) 小鼠的 mPFC 里, 来记录 mPFC 中 PYR 神经元的钙反应, 通过 VIP-Cre 和 PV-Cre 结合 AAV-Flex-GCaMP6s, 使得我们可以特异性观察 VIP 神经元和 PV 神经元在小鼠钻管测试中的反应 (图. 9A, 9C and 9E)。我们先做了免疫荧光染色, 以确认 GCaMP6s

确实表达在我们的目标神经元上(图. 9B, 9D and 9F)。随后对这些表达了GCaMP6s的小鼠分别进行钻管测试, 记录mPFC不同神经类群在钻管测试中的反应。首先, 我们观察到PYR神经元在钻管测试中的钙反应与mPFC整体神经元活动类似, 在发生推挤行为时候, 钙信号上升 ( $Z\text{-score} = 4.86 \pm 1.34$ ,  $n = 40$  trials from 5 mice; 图. 10A and 10C), 而在后退行为发生时, 钙信号下降 ( $Z\text{-score} = 1.48 \pm 0.39$ ,  $n = 39$  trials from 4 mice; 图. 10B and 10C)。VIP神经元的钙信号与PYR神经元的比较类似, 也是在推挤行为发生时上升 ( $Z\text{-score} = 2.45 \pm 0.8$ ,  $n = 34$  trials from 4 mice; 图. 10D and 10F), 在后退行为发生时下降 ( $Z\text{-score} = -2.12 \pm 0.33$ ,  $n = 38$  trials from 6 mice; 图. 10E and 10F), 但是在变化时序上有些不同。而PV神经元在推挤行为 ( $Z\text{-score} = 4.56 \pm 0.94$ ,  $n = 41$  trials from 8 mice; 图. 10G and 10I) 和后退行为 ( $Z\text{-score} = 3.62 \pm 0.78$ ,  $n = 37$  trials from 6 mice; 图. 10H and 10I) 发生时, 钙信号都出现了显著上升(图. 10I)。

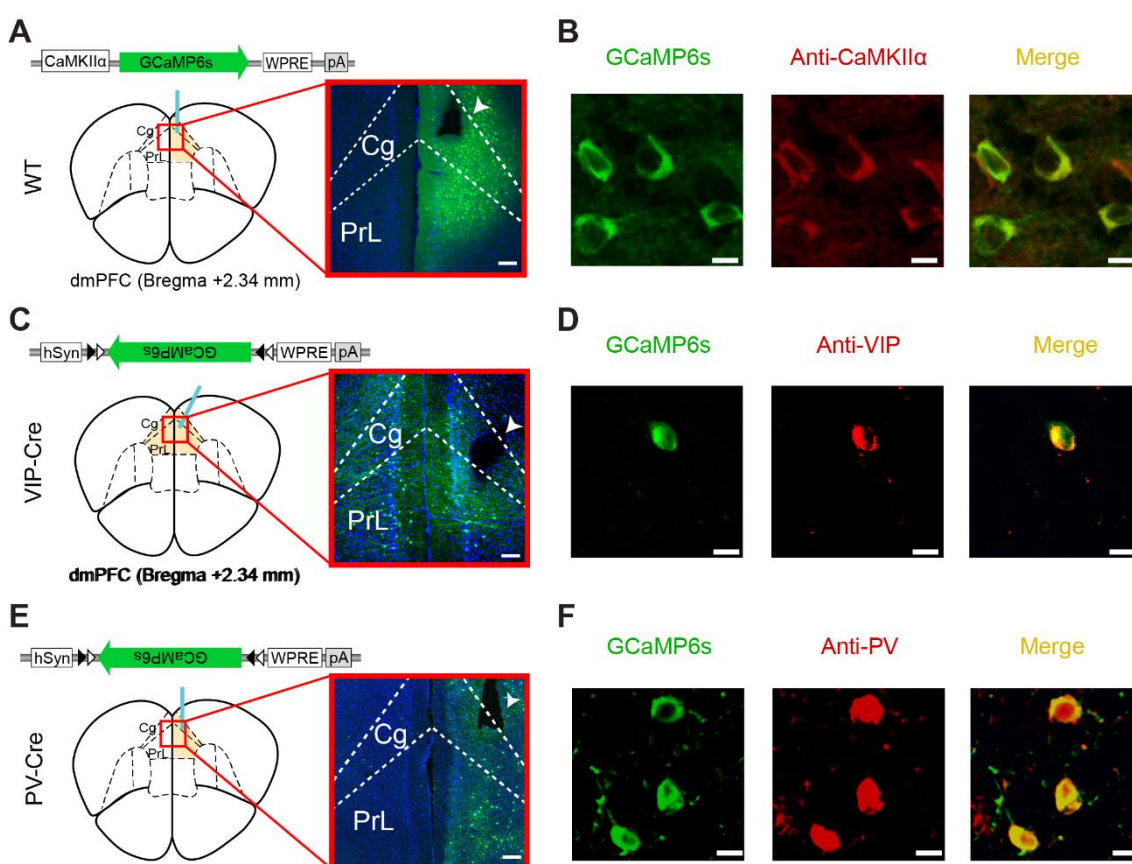


图 9. 光纤记录实验中在不同细胞类型神经元上特异性表达 GCaMP6s

(A, C 和 E) 野生型 (WT) (A)、VIP-Cre (C) 和 PV-Cre (E) 小鼠中的病毒构建、病毒注射部位和光纤埋植位置。白色箭头表示 mPFC 中的光纤埋植位置。比例尺, 100  $\mu\text{m}$ 。

(B, D 和 F) 免疫荧光染色确认PYR (B)、VIP (D) 和PV (F) 神经元中特异性表达GCaMP6s。比例尺, 10  $\mu\text{m}$ 。

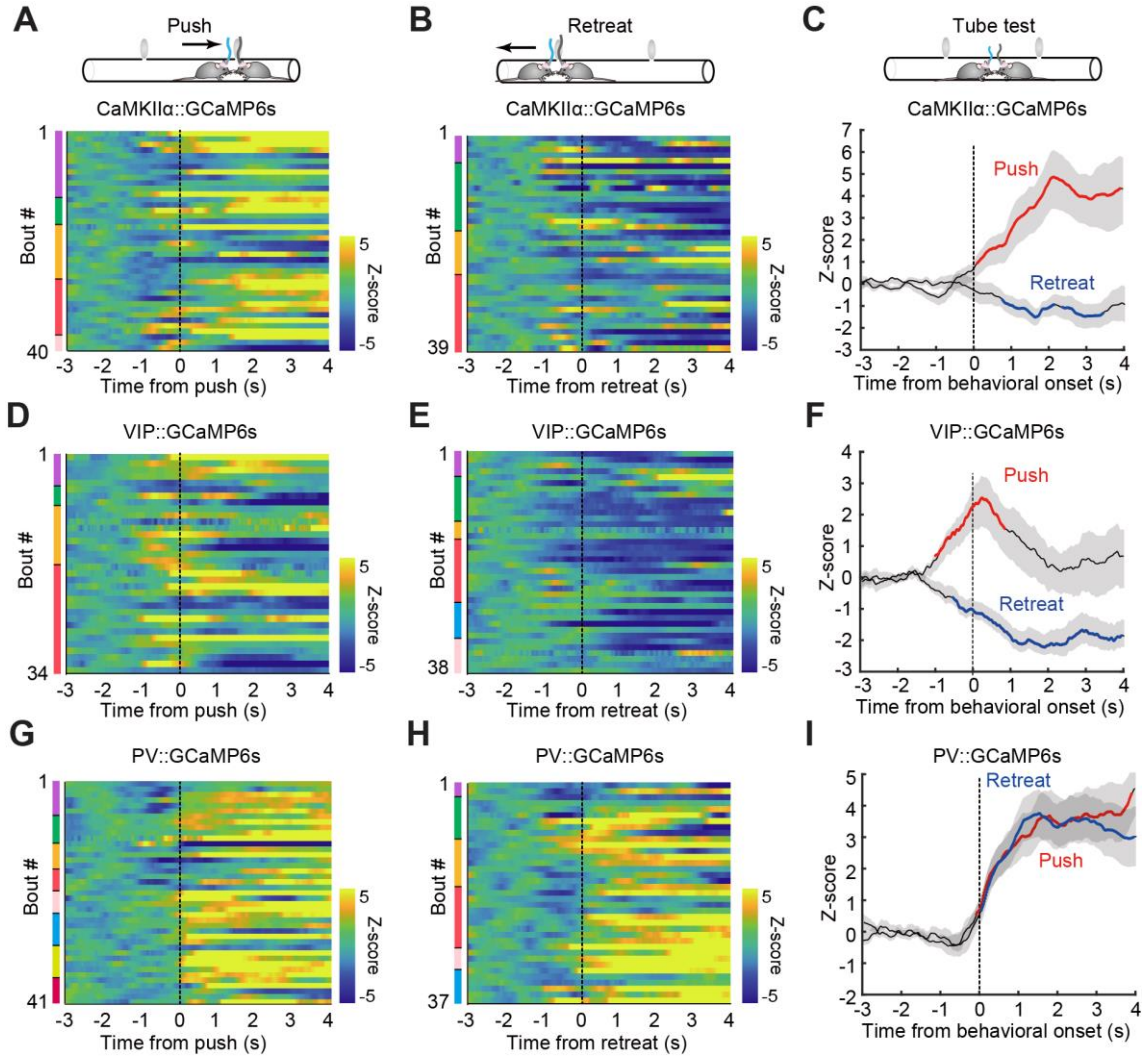


图 10. mPFC 中不同神经元类型在推挤和后退行为中的钙信号动力学变化

(A, D 和 G) mPFC 中 PYR (A, 5 只小鼠的 40 次试验)、VIP (D, 4 只小鼠的 34 次试验) 和 PV (G, 8 只小鼠 41 次试验) 在推挤行为中的钙信号经 Z-score 标准化后的热图。左侧的色条代表不同的小鼠。0 点是小鼠开始推挤行为的时间点。

(B, E 和 H) mPFC 中 PYR (B, 4 只小鼠的 39 次试验)、VIP (E, 6 只小鼠的 38 次试验) 和 PV (H, 6 只小鼠的 37 次试验) 在推挤行为中的钙信号经 Z-score 标准化后的热图。左侧的色条代表不同的小鼠。0 点是小鼠开始后退行为的时间点。

(C, F 和 I) mPFC 中的 PYR (C)、VIP (F) 和 PV (I) 神经元在推挤 (红色) 和后退 (蓝色) 行为中的钙信号经 Z-score 标准化后的事件相关钙信号变化曲线图。实线表示平均值, 阴影区域表示标准误。颜色高亮线段表示与基线相比具有统计学意义的荧光增加或减少 ( $p < 0.05$ ; 置换检验)。

### 3.2.3 内侧前额叶皮层不同类群神经元钙信号变化的时序差异

我们注意到虽然VIP神经元的钙信号跟PYR神经元的钙信号一样都是在推挤的时候上升, 后退的时候下降, 但是在变化时序上有些不同。为了进一步比较不同类群神经元钙信号在不同行为发生时, 钙信号动态变化的差异, 我们对其进行了更深入的分析。我们分别去统计了PYR神经元, VIP神经元和PV神经元在推挤行为和后退行为发生时钙信号的变化延迟 (Change latency, 图. 11A) 和衰减时长 (Decay time, 图. 11D) 这两个参数 (具体细节详见实验方法) (图. 11A-11F)。然后我们把这三种不同类群神经元的钙信号根据行为放在一起比较。我们发现在推挤行为中, VIP神经元的钙信号在推挤发生前就开始上升, 显著提前于PV神经元和PYR神经元, 而且它衰减的也更快 (图. 11G)。但在后退行为中, 这三种神经元的钙信号没有观察到显著的动态差异 (图. 11H)。综上, 这三种神经元的钙信号变化趋势, 同我们之前行为操纵的结果都比较一致, 除了PV神经元在推挤和后退行为中都出现上升这一点让我们比较困惑。此外, 我们注意到VIP神经元在推挤行为中提前激活的变化特点, 暗示着VIP神经元可能在引发mPFC微环路处理社会竞争相关信息并诱发推挤行为中扮演着重要角色。

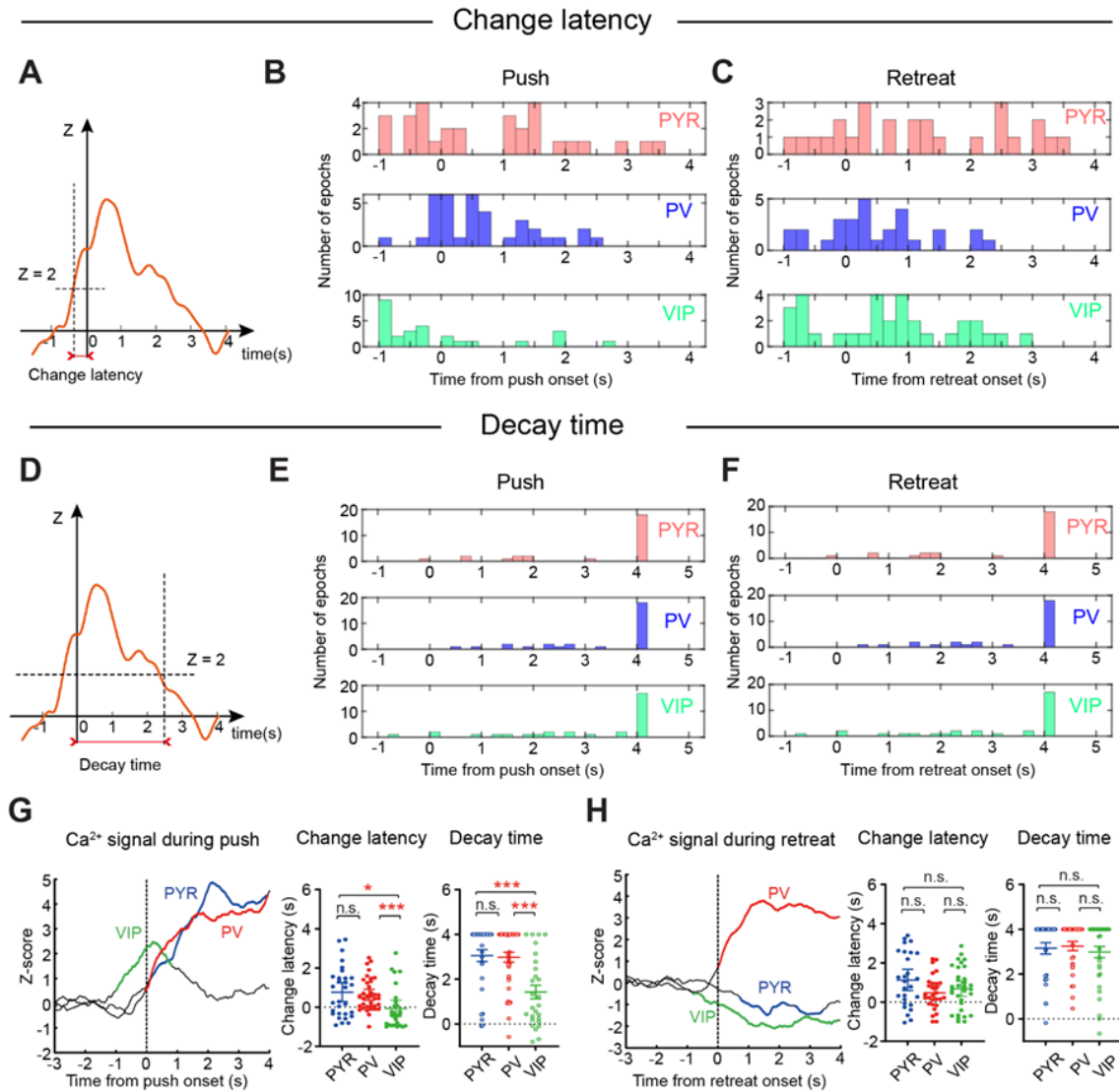


图 11. 钻管测试中不同神经类群钙信号的变化延迟和衰减时间

(A 和 D) 变化延迟 (A) 和衰减时间 (D) 定义的说明。图为一条典型的VIP神经元在推挤过程中的钙信号变化曲线。垂直和水平虚线分别表示钙信号达到阈值 ( $Z = \pm 2$ , 统计上对应  $p < 0.05$ ) (A) 或返回阈值 ( $Z = \pm 2$ ) (D) 的时间和 Z-score 值。红色双箭头表示得到的变化延迟 (A) 和衰减时间 (D) 的统计时间窗。如果 Z-score 未达到阈值, 则不计算变化延迟和衰减时间。如果衰减时间超过 4 s, 则被计为 4 s。

(B 和 C) PYR (上)、PV (中) 和VIP (下) 神经元在推挤 (B) 和后退 (C) 行为中钙信号的变化延迟分布直方图。

(E 和 F) PYR (上)、PV (中) 和VIP (下) 神经元在推挤 (E) 和后退 (F) 行为中钙信号的衰减时间分布直方图。

(G) mPFC 不同类型神经元在推挤行为中 (左) 的钙信号。彩色线段表示钙信号与基线相比具有统计学意义。不同神经元类群在推挤行为中钙信号的变化延迟 (中)

和衰减时间（右）表明它们存在动力学上的差异，VIP反应更提前，衰减也更快。曼-惠特尼U检验。

(H) mPFC不同类型神经元在后退行为中（左）的钙信号。彩色线段表示钙信号与基线相比具有统计学意义。不同神经元类群在后退行为中钙信号的变化延迟（中）和衰减时间（右）不存在显著差异。曼-惠特尼U检验。

所有数据均为均值±标准误, \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; n.s., 无显著性差异。

### 3.2.4 内侧前额叶皮层的SOM神经元在钻管测试中的钙信号变化

尽管SOM神经元的激活和抑制都没有对小鼠在钻管测试中的社会等级和竞争表现产生显著影响。但是作为皮层中最主要的抑制性中间神经元之一，它在钻管测试中的实时钙反应又会是什么样呢？同样的，通过在SOM-Cre小鼠的mPFC注射AAV-Flex-GCaMP6s（图. 12A），使得mPFC的SOM神经元特异性表达GCaMP6s（图. 12B），再进行钻管测试。我们发现SOM神经元的钙信号在推挤行为和后退行为中都上升（图. 12C-12E）。这一点跟PV神经元非常类似，但是它的信号幅度比PV神经元低（Push: SOM ( $Z\text{-score}_{\text{peak}} = 2.78$ ) vs PV ( $Z\text{-score}_{\text{peak}} = 4.56$ )；Retreat: SOM ( $Z\text{-score}_{\text{peak}} = 2.84$ ) vs PV ( $Z\text{-score}_{\text{peak}} = 3.62$ )）。同时，我们也分析了SOM神经元的变化延迟和衰减时长。SOM神经元的钙信号在推挤行为中的上升也滞后于VIP神经元，但是与PV神经元和PYR神经元之间没有显著差异。而在后退行为中，这四种神经元的钙信号在时序动态上都没有显著差异。



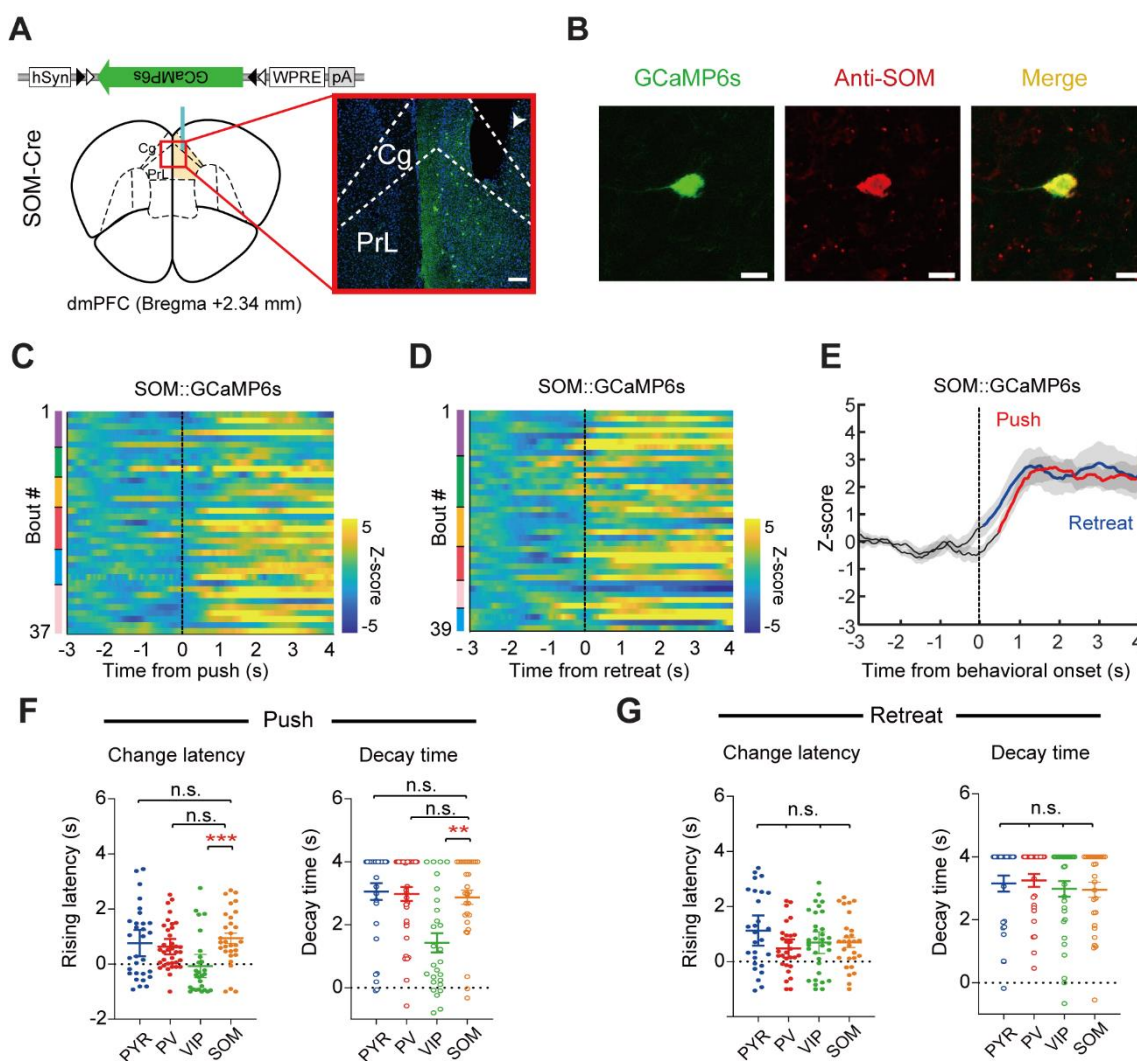


图 12. mPFC中SOM神经元在钻管测试中的钙反应

(A) SOM-Cre小鼠中注射的GCaMP6s病毒构建、病毒注射部位和光纤埋植位置。比例尺，100  $\mu\text{m}$ 。

(B) 免疫荧光染色确认GCaMP6s在SOM神经元中的表达特异性。比例尺，10  $\mu\text{m}$ 。

(C and D) mPFC的SOM神经元在推挤 (C, 6只小鼠的37次试验) 和撤退 (D, 6只小鼠的39次试验) 行为中的钙信号经Z-score标准化后的热图。左侧的色条代表不同的小鼠。0点是小鼠开始推挤或后退行为的时间点。

(E) SOM神经元在推挤 (红色) 和后退 (蓝色) 行为中，钙信号经Z-score标准化后的事件相关钙信号变化曲线图。实线表示平均值，阴影区域表示标准误。颜色高亮线段表示与基线相比具有统计学意义的荧光增加或减少 ( $p < 0.05$ ; 置换检验)。

(F) 推挤行为中钙信号的变化延迟 (左) 和衰减时间 (右)。曼-惠特尼U检验。

(G) 后退行为中钙信号的变化延迟 (左) 和衰减时间 (右)。曼-惠特尼U检验。

所有数据均为均值 $\pm$ 标准误，\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; n.s., 无显著性差异。

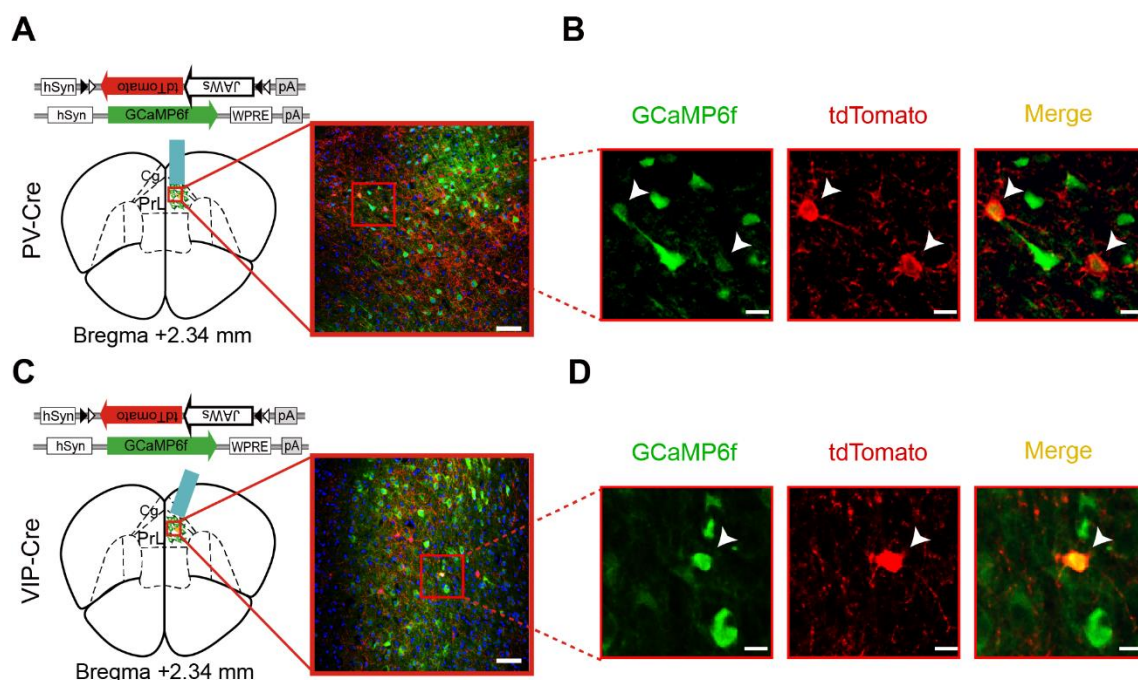


图 13. 用于微型双光子显微钙成像小鼠中的GCaMP6f和JAWs的表达

(A and C) PV-Cre (A) 和VIP-Cre (C) 小鼠mPFC中注射病毒的构建和GRIN Lens 植入位点。比例尺，50 $\mu$ m。

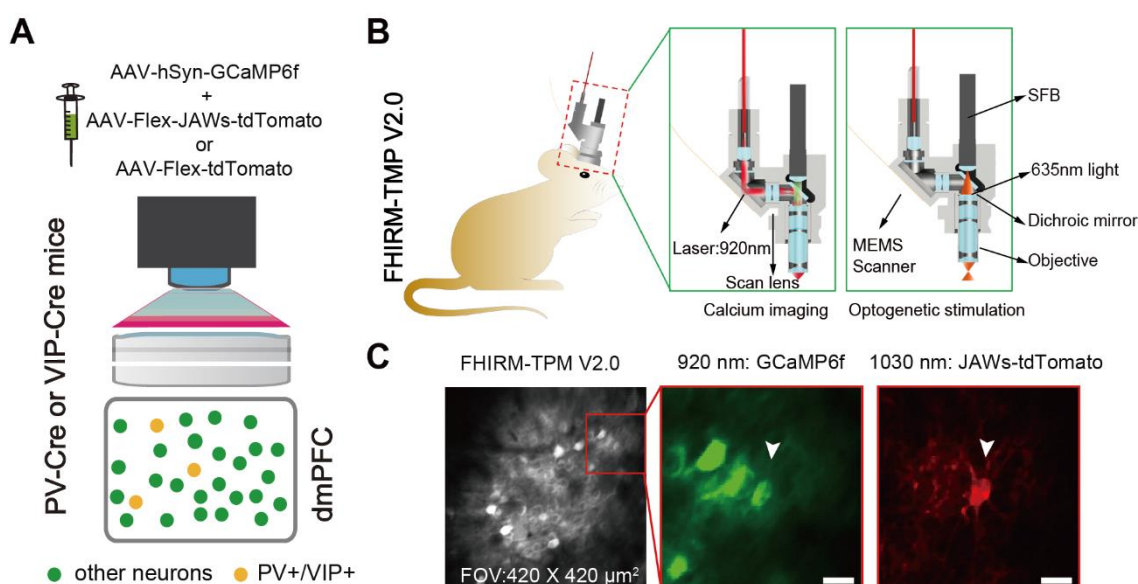
(B and D) 免疫荧光染色显示PV-Cre (B) 和VIP-Cre (D) 小鼠中GCaMP6f和JAWs-tdTomato (由白色箭头表示) 的共定位。比例尺，10  $\mu$ m。

### 3.3 利用微型化双光子显微镜探究PV/VIP对mPFC神经网络的影响

#### 3.3.1 微型化双光子整合光遗传及双色成像

鉴于mPFC中的PV神经元和VIP神经元在钻管测试中钙信号反应的显著差别，以及神经元操纵对钻管测试中竞争行为的相反作用，我们开始思考这两群神经元在对mPFC整体的神经活动调控中会有着怎样的影响？借助北京大学程和平院士团队开发的快速高分辨微型化双光子显微镜 (Fast high-resolution miniature two-photon microscopy, FHIRM-TPM V2.0)<sup>[61,62]</sup>与渐变折射率透镜 (Gradient-Index, GRIN Lens) 相结合，我们可以观察动物活动状态下，深部脑区单细胞分辨率的神经活动变化。为了观察mPFC中PV/VIP神经元对其周围其他神经元的影响，我设计了一个实验：通过向PV-Cre和VIP-Cre小鼠的mPFC同时注射两种病毒：AAV-hSyn-GCaMP6f和AAV-Flex-JAWs-tdTomato，使得mPFC所有的神经元都携带

上钙离子指示剂GCaMP6f, 而其中的PV/VIP神经元在表达GCaMP6f的同时, 还会表达635 nm (红光) 激发的抑制性光敏感通道蛋白JAWs<sup>[73]</sup>和红色荧光蛋白tdTomato (图. 13A-13D)。我们可以通过红色荧光蛋白找到PV/VIP神经元的位置, 然后通过钙成像观察光遗传抑制它们的时候, PV/VIP神经元本身以及其周围其他神经元的钙信号变化 (图. 14A)。为此, 程和平团队的吴润龙博士对微型双光子系统进行了升级, 加入了光遗传操纵模块和双色成像模块 (图. 14B) (具体细节见实验方法)。我们先通过1030 nm波长的激光寻找表达了tdTomato的PV/VIP神经元, 在同一个视野 (Field of view, FOV) 下, 再通过920 nm波长的激光做钙成像记录, 采集镜头下所有表达GCaMP6f的神经元的荧光亮度变化 (图. 14C)。



**图 14. 微型双光子钙成像实验的病毒注射策略以及 FHIRM-TMP V2.0 系统**

(A) 病毒注射策略和双色成像示意图。绿色圆圈代表仅表达 GCaMP6f 的神经元, 黄色圆圈代表同时表达 GCaMP6f 和 JAWs-tdTomato 的神经元。详细信息, 请参阅方法。

(B) 快速高分辨率微型双光子显微镜第 2 版 (FHIRM-TMP V2.0) 系统示意图 (Zong et al., 2021)。详细信息, 请参阅方法。

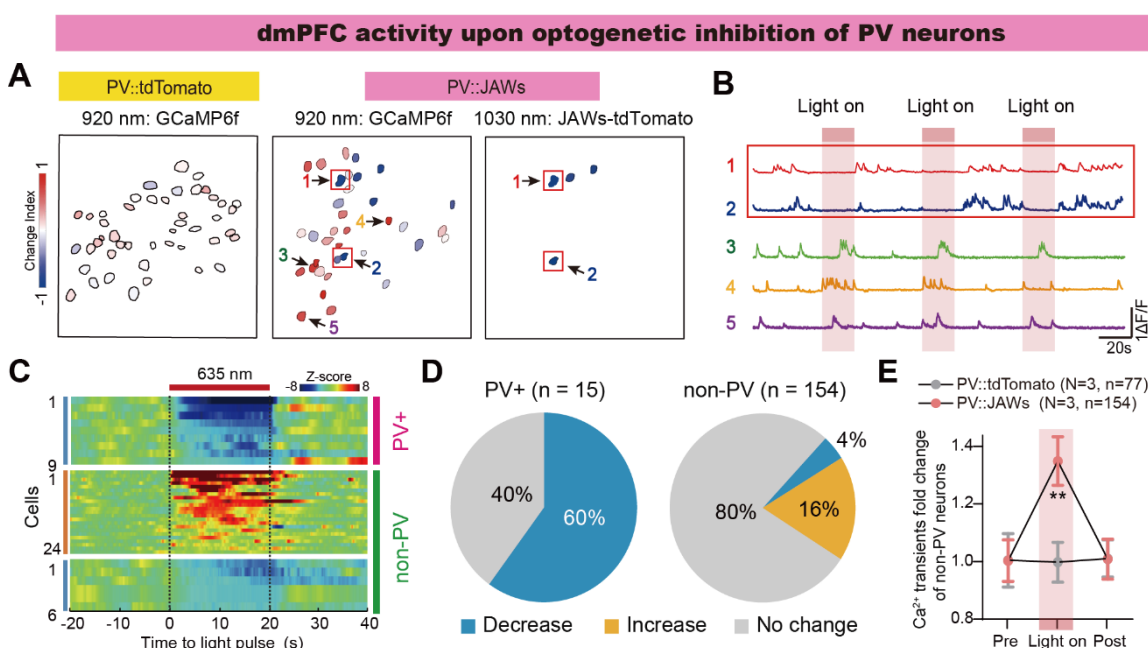
(C) 920 nm 绿色通道记录钙活动 (左和中); 1030 nm 红色通道帮助确定表达 JAWs 的神经元 (右)。白色箭头表示同时表达 GCaMP6f 和 JAWs-tdTomato 的神经元。比例尺, 20  $\mu\text{m}$ 。

合作者: 吴润龙 (北京大学)。

### 3.3.2 抑制PV/VIP神经元对mPFC整体网络活动的影响

具体记录流程是先采集180 s的基线荧光发放情况，然后持续照射635 nm的红光20 s，停光60 s，然后继续给20 s的光照，重复10个循环，最后分析给光(Light on)和不给光(Light off)这两种情况下，mPFC神经元钙信号的变化。在整个钙成像记录前后，我们都会采集60 s的红色荧光信号，以帮助确认视野里PV/VIP神经元的位置。

我们先分析了光遗传抑制PV神经元后，对mPFC整体网络的影响。其中有9% (15/169 neurons from 3 mice) 的神经元会共表达GCaMP6f和JAWs-tdTomato，他们就是PV神经元(如图. 15A中的Neuron 1 和Neuron 2)。这些PV神经元中有60%在红光照射时会被显著抑制(图. 15B, 15C and 15D)。而在其他只表达了GCaMP6f的154个非PV (Non-PV) 神经元中(大部分是PYR神经元)，有16%的神经元被显著激活，另外有4%的神经元被显著抑制(图. 15C and 15D)。我们也统计了mPFC所有神经元钙事件(Calcium transients)和整体荧光亮度( $\Delta F/F$ )的变化。在光遗传抑制PV神经元时，mPFC整体网络被显著的激活(图. 15E and 17A)。我们也做了将病毒里的JAWs-tdtomato替换成tdTomato的对照实验。红光激活只表达了tdTomato的PV神经元，mPFC所有的神经元均为未出现显著变化(图. 15A and 15E)。



**图 15. 抑制PV神经元对mPFC神经网络活动的影响**

(A) 635 nm光激活抑制性光敏感通道蛋白JAWs后, PV::tdTomato (左) 和 PV::JAWs (中和右) 小鼠在920 nm (左、中) 和1030 nm (右) 通道下的神经元钙反应变化情况。细胞的颜色亮度代表了钙信号的变化程度; 增加 (红色) 或减少 (蓝色)。变化指数 (Change index) 的定义为 (光照-光停) / (光照+光停); >0 表示激活, <0表示抑制。

(B) (A) 中标记的神经元的钙信号变化曲线。请注意, 神经元1和2是假定的PV神经元, 因为它们同时表达了GCaMP6f和JAWs, 它们在照光期间被抑制。神经元3-5是假定的非PV神经元, 因为它们仅表达GCaMP6f。

(C) 热图显示的是在JAWs介导的光抑制期间, 钙信号发生显著变化的PV和非PV神经元的平均反应。

(D) 在JAWs介导的光抑制条件下, 钙信号发生显著变化的PV和非PV神经元的比例。配对的Wilcoxon符号秩检验,  $p < 0.05$ 。

(E) 光抑制PV神经元期间, 非PV神经元钙瞬变事件的总变化。双因素方差分析,  $**P < 0.01$ 。N代表小鼠数量; n表示神经元的数量。

接下来我们又用同样的方法检测了抑制VIP神经元对mPFC神经网络活动的影响。我们发现4.6% (6 /129 neurons from 2 mice) 的神经元会共表达GCaMP6f和JAWs-tdTomato, 他们就是VIP神经元 (如图. 16A中的Neuron 1和Neuron 2) 。其中67%的神经元在红光照射时会被显著抑制 (图. 16B, 16C and 16D) 。而在其他只表达了GCaMP6f的123个非VIP (Non-VIP) 神经元中 (大部分是PYR神经元), 有3%的神经元被显著激活, 另外有13%的神经元被显著抑制 (图. 16C and 16D) 。光遗传抑制VIP神经元, mPFC整体网络被显著的抑制 (图. 16E and 17B) 。我们同样做了将病毒里的JAWs-tdtomato直接替换成tdTomato的对照实验。红光激活只表达了tdTomato的VIP神经元, mPFC所有的神经元也均未出现显著变化 (图. 16A and 16E) 。总的来说, 这些数据表明PV神经元对mPFC整体网络活动调控是负向的, 而VIP神经元对mPFC整体网络的调控是正向的 (图. 17C) 。

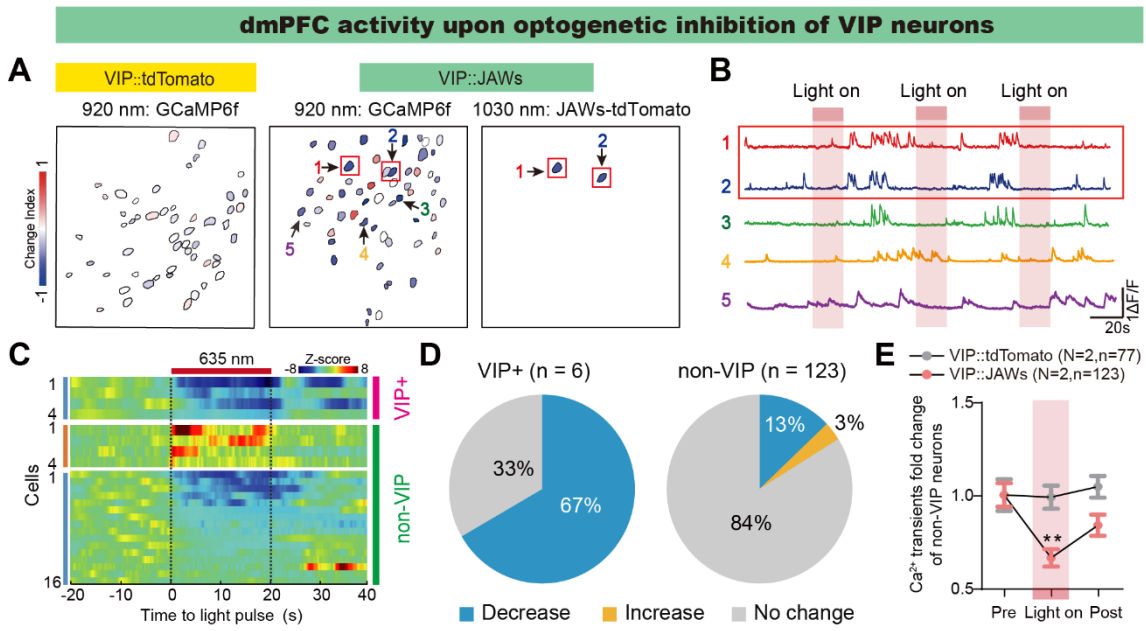


图 16. 抑制VIP神经元对mPFC神经网络活动的影响

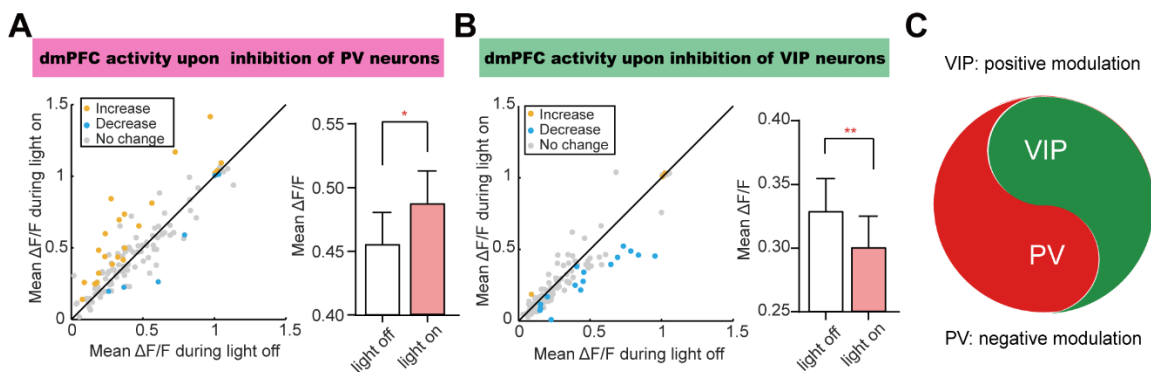
(A) 635 nm光刺激激活抑制性光敏感通道蛋白JAWs后，VIP::tdTomato（左）和VIP::JAWs（中和右）小鼠在920 nm（左、中）和1030 nm（右）通道下的神经元钙反应变化情况。细胞的颜色亮度编码了钙信号的变化；增加（红色）或减少（蓝色）。变化指数（Change index）的定义为（光照-光停）/（光照+光停）；>0表示激活，<0表示抑制。

(B) (A) 中标记的神经元的钙信号变化曲线。请注意，神经元1和2是假定的VIP神经元，因为它们同时表达了GCaMP6f和JAWs。它们在照光期间被抑制。神经元3-5是假定的非VIP神经元，因为它们仅表达GCaMP6f。

(C) 热图显示的是在JAWs介导的光抑制期间，钙信号发生显著变化的VIP和非VIP神经元的平均反应。

(D) 在JAWs介导的光抑制条件下，钙信号发生显著变化的VIP和非VIP神经元的比例。配对的Wilcoxon符号秩检验， $p < 0.05$ 。

(E) 光抑制VIP神经元期间，非VIP神经元钙瞬变事件的总变化。双因素方差分析，\*\* $P < 0.01$ 。N代表小鼠数量；n表示神经元的数量。



### 图 17. mPFC神经元的钙信号在PV和VIP神经元被抑制后的变化

(A 和 B) 左: 来自PV::JAWs小鼠(A)和来自VIP::JAWs小鼠(B)在光照时期, 所有非PV神经元(n=154)和非VIP神经元(n=123)的的荧光信号( $\Delta F/F$ )散点图。每个点代表一个神经元钙信号的平均变化值。彩色圆圈表示显示钙信号显著增加(橙色)或减少(蓝色)的神经元(配对的Wilcoxon符号秩检验,  $p < 0.05$ )。右图: 光遗传抑制PV(A)和VIP(B)神经元后所有非PV神经元(n=154)和非VIP神经元(n=123)的平均荧光信号( $\Delta F/F$ )总变化。配对Wilcoxon符号秩检验。(C) PV神经元和VIP神经元对mPFC整体网络调节作用的总结。所有数据均为均值 $\pm$ 标准误, \*\* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.01$ 。

## 3.4 在体电生理记录进一步解析mPFC中不同类群神经元间的关系

为了以更高的时空分辨率去探究mPFC微环路中不同神经元间的作用关系。我们通过急性的在体电生理记录, 在清醒的小鼠上观察光遗传激活PV/VIP对mPFC其他神经元放电模式的影响。如前文所述, 我们将PV-Cre/VIP-Cre的小鼠和Ai32小鼠杂交, 得到的PV::Ai32和VIP::Ai32小鼠, 它们会分别在PV神经元和VIP神经元上直接表达兴奋性光敏感通道蛋白ChR2。然后我们直接将小鼠头部固定, 植入一根16通道的光电极, 待小鼠恢复清醒后, 进行结合光遗传的在体电生理记录<sup>[74]</sup>(图. 18A, 19A and 21A-21D)。我们先通过光标记实验找到潜在的PV/VIP神经元(电生理光标记实验, 是利用表达了ChR2的神经元会对激光刺激有即时的, 高度吻合的响应, 从而帮助我们确认记录到的神经元即我们刺激的目标神经元)。根据记录到的神经元的电生理特性, 我们将他们大致分为三类: 宽波(Wide spike, WS)神经元, 窄波(Narrow spike, NS)神经元和低频窄波(Fast spiking Interneuron, FSI)神经元(具体细节见实验方法)。其中WS神经元一般被认为是兴奋性的PYR神经元, NS神经元一般被认为是抑制性的中间神经元(Interneurons), 而NS中高频发放的FSI神经元一般是PV神经元<sup>[48,74,75]</sup>。

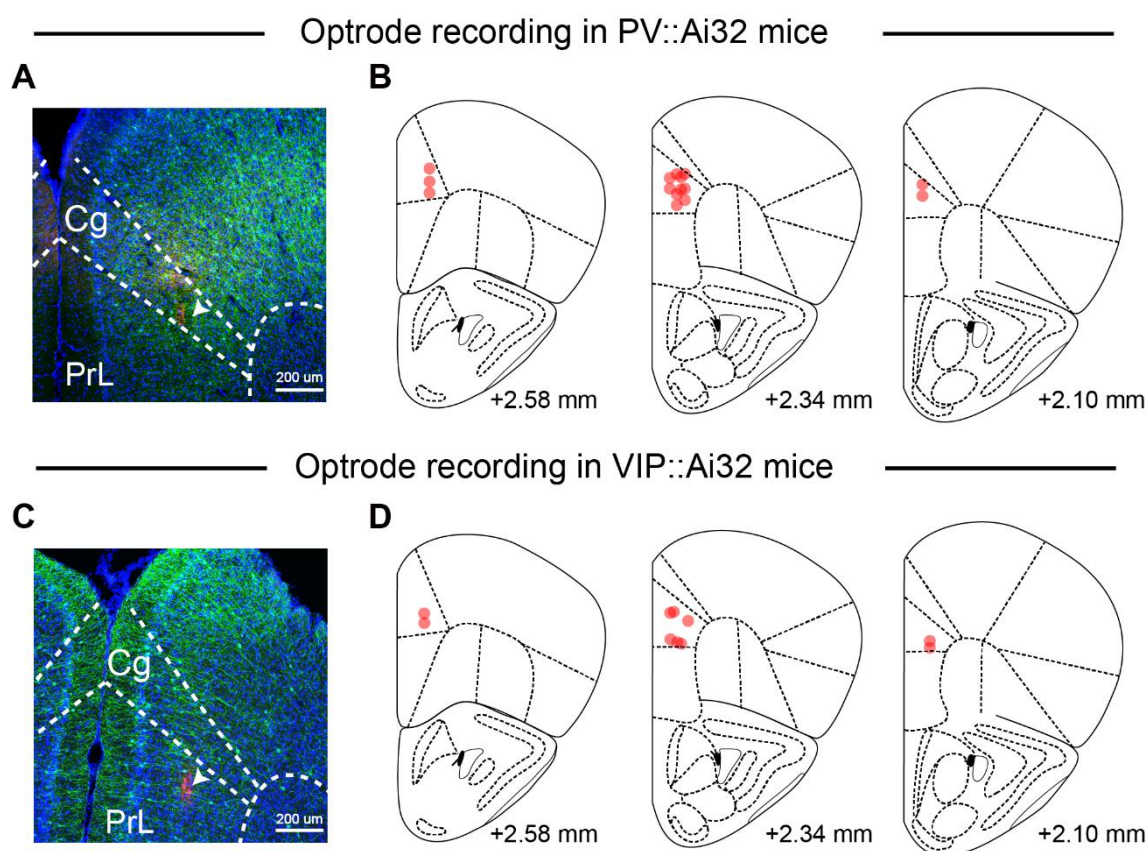


图 18. 用于光电极记录实验的光电极埋植位点检测图

(A 和 C) 典型的 PV::Ai32 (A) 和 VIP::Ai32 (C) 小鼠 mPFC 组织切片图。箭头表示用红色荧光染料 Dil 标记的光电极位置。Cg: 扣带回; PrL, 前边缘皮层。

(B 和 D) 所有记录的 PV::Ai32 (B) 和 VIP::Ai32 (D) 小鼠中光电极的埋植位置。

### 3.4.1 激活 PV 神经元对 mPFC 整体网络的影响

我们先对 PV::Ai32 的小鼠进行记录 (图. 18A, 18B and 19A)。首先对 PV 神经元进行了光标记, 然后给持续 10 s 的蓝光刺激来模拟光遗传激活 PV 神经元对小鼠钻管测试中竞争行为的影响。我们总共记录到 201 个神经元, 其中 6 个是光标记的 PV (Tagged PV) 神经元, PV 神经元对蓝光刺激有很好的响应, 它的基底发放频率很高, 而且它的波形非常窄 (图. 19B and 19C)。此外, 我们还记录到 139 个 WS 神经元和 55 个 NS 神经元, 在 55 个 NS 神经元里有 16 个是 FSI 神经元。然后我们比较了光激活 (Light on) PV 神经元和不照光 (Light off) 时所有被记录到的神经元的电生理反应变化。我们发现, 光激活 mPFC 中的 PV 神经元后, 其中 92% 的 WS 神经元 (128



of 139 neurons) 都被显著的抑制了, 还有72%的NS-nonFSI神经元和31%的FSI神经元也被抑制了(图. 19D-19G)。这些结果说明PV神经元对mPFC整体网络有很强的抑制作用, 它不仅仅会抑制PYR神经元, 还会抑制其他的中间神经元, 甚至自己内部也会相互抑制。

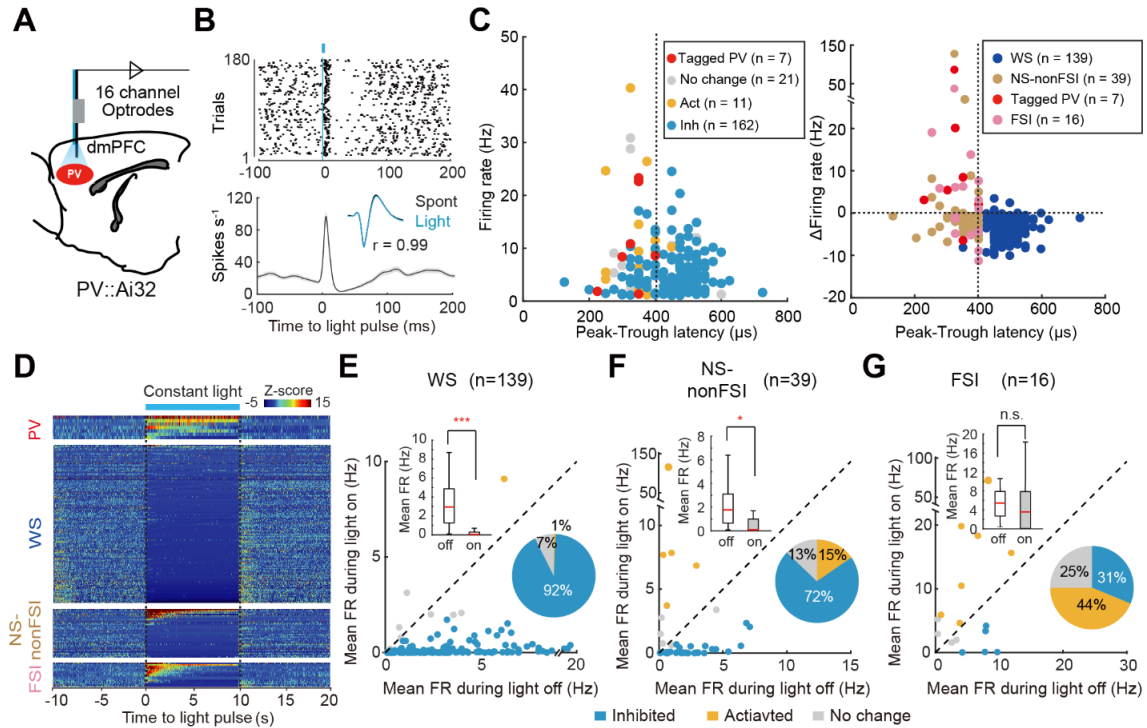


图 19. 激活PV神经元对mPFC神经活动的影响

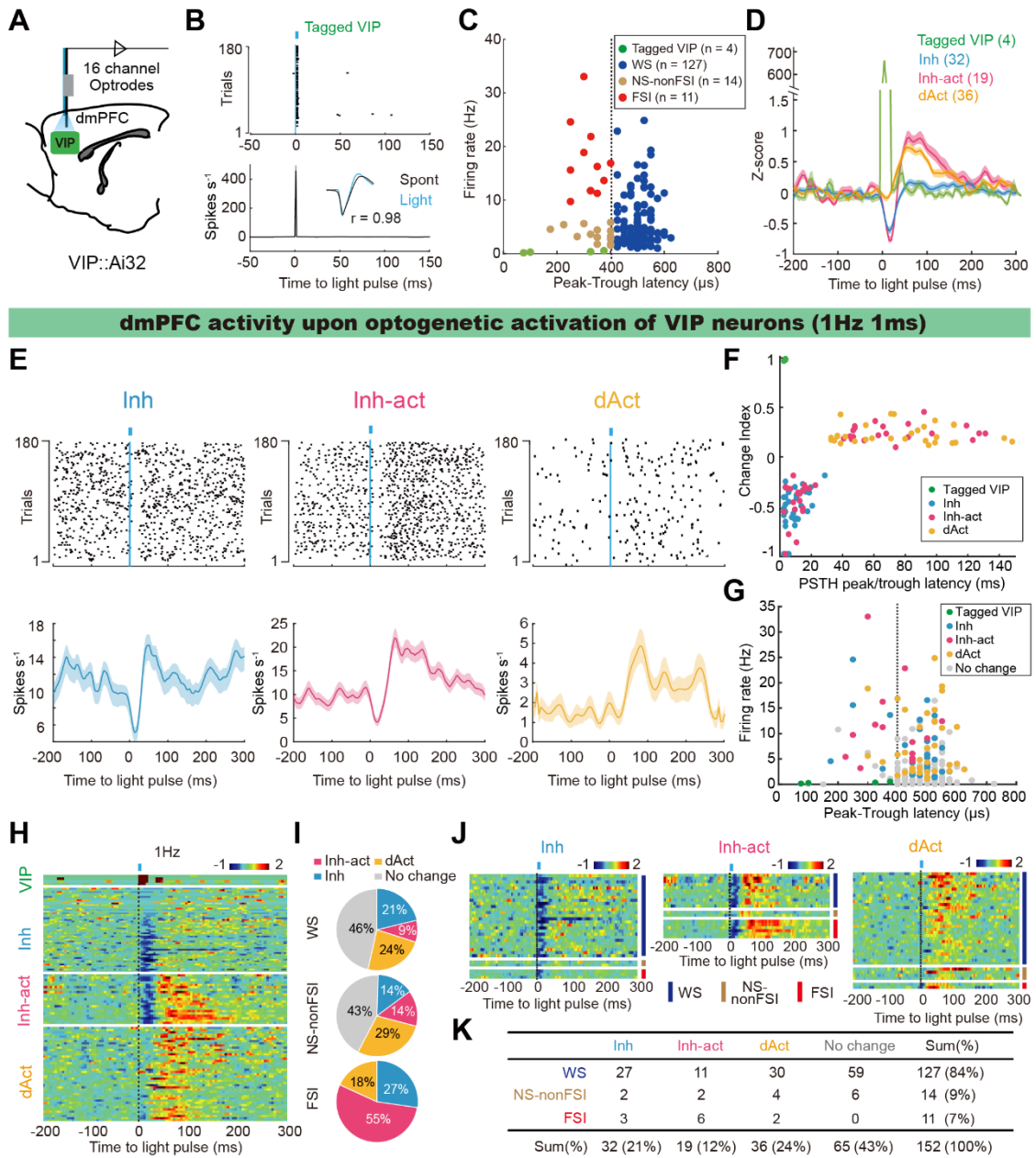
(A) PV-Cre::Ai32小鼠进行头部固定的在体光电极记录示意图。  
 (B) 栅格图(上)显示一个典型的光标记成功的PV神经元发放变化和它的事件相关变化曲线图(下)。插图: 光诱发的动作电位波形(蓝色)与自发的(黑色)相似。皮尔逊相关系数,  $r = 0.99$ 。  
 (C) 左: 所有记录到的神经元根据基底放电频率与其动作电位波峰到波谷时间绘制的分布图。彩色圆圈表示在10秒持续照光和不照光期间出现显著变化的神经元。蓝色, 抑制; 橙色, 激活; 灰色, 没有变化。右图: 根据所有记录到的神经元光刺激后产生的发放频率变化与其动作电位波峰到波谷的时间绘制的分布图。不同颜色表示不同的细胞类型。蓝色, WS(宽波神经元); 棕色, NS-nonFSI(窄波非高频发放中间神经元); 红色, 光标记的PV; 粉红色, FSI(高频发放中间神经元)。  
 (D) 所有记录到的神经元在10 s持续蓝光照射前后的发放频率根据Z-score标准化后的热图。包括标记的PV神经元和WS、NS-nonFSI和FSI神经元, 每个类群根据发放频率从高到底排序。  
 (E-G) WS (E)、NS-nonFSI (F) 和FSI (G) 神经元在10秒持续照光和不照光期

间的平均放电频率变化散点图。彩色圆圈表示光照后放电频率出现显著增加（橙色）或减少（蓝色）的神经元。里面的饼图显示了照光期间神经元放电频率出现显著增加，降低或不变的比例。柱状图比较了所有神经元在照光和不照光期间的放电频率变化。柱状图中的数据均为中位数 $\pm$  1.5倍四分位距。配对的Wilcoxon符号秩检验。

所有数据均为均值 $\pm$ 标准误，\*\* $p < 0.01$ ；\*\*\* $p < 0.001$ ；n.s.，无显著性差异。

### 3.4.2 激活VIP神经元对mPFC整体网络的影响

随后，我们又记录了光遗传激活VIP神经元对mPFC其他神经元电生理特性变化的影响（图. 18C, 18D and 20A）。同样的，我们先使用1 Hz, 1 ms的光刺激去标记VIP神经元，再进行模拟行为操纵的光刺激。我们总共记录到了156个神经元，其中有4个是被光标记的VIP（Tagged VIP）神经元，还有127个WS神经元，14个NS-nonFSI神经元和11个FSI神经元（图. 20B, 20C and 20D）。有趣的是，我们在以1 Hz, 1 ms的光刺激VIP神经元时，观察到了mPFC的其他神经元产生了多种不同的反应特性。根据之前的研究报道<sup>[34]</sup>，我们根据他们的反应特性分了三群：直接抑制（Inh），先抑制后激活（Inh-act）和延迟激活（dAct）（图. 20E, 20F and 20G）。其中的大部分抑制反应都发生的很快（最强抑制时间： $8.2 \pm 0.8$  ms），像是VIP神经元通过单突触连接产生的直接抑制效应。而激活的时间伴随着更长的延迟（最强激活时间： $74.3 \pm 4.4$  ms），持续的时间也更长，这比较符合双突触或者多突触的传导特性（图. 20F）。然后我们根据记录到的神经元的反应特性和其本身的电生理特征进行了两两配对比较。我们注意到，光遗传激活VIP神经元，其中WS神经元较多的是被延迟激活，但也存在一定数量的直接抑制。而FSI神经元中较多的是被先抑制后激活和直接抑制（图. 20H-20K）。



**图 20. 激活VIP神经元对mPFC神经活动的影响**

(A) VIP-Cre::Ai32小鼠进行头部固定的在体光电极记录示意图。

(B) 栅格图(上)显示一个典型的光标记成功的VIP神经元发放变化和它的事件相关变化曲线图(下)。插图:光诱发的动作电位波形(蓝色)与自发的(黑色)相似。皮尔逊相关系数,  $r = 0.98$ 。

(C) 光标记的VIP(绿色)、WS(蓝色)、NS-nonFSI(棕色)和FSI(红色)神经元的基底放电频率与其动作电位波峰到波谷的时间关系分布图。

(D) 光标记的VIP(绿色)、Inh(抑制,蓝色)、Inh-act(抑制-激活,洋红色)和dAct(延迟激活,橙色)神经元的事件相关变化曲线图。阴影区域为标准误。神

神经元分群是根据1 Hz 1 ms光刺激方案中它们的响应特性。具体分类方法可参见实验方法。

(E) 使用1 Hz的光刺激方案激活VIP神经元时, Inh (左)、Inh-act (中) 和dAct (右)组中典型神经元发放变化的栅格图(上)和它的事件相关变化曲线图(下)。阴影区域为标准误。

(F) 1 Hz激活VIP时, 四个神经类群的变化指数与事件相关变化曲线图中波峰(激活)-波谷(抑制)时间的比较。光标记的VIP (绿色)、Inh (蓝色)、Inh-act (洋红色)和dAct (橙色)。变化指数定义为发放频率(光照-光停)/(光照+光停), 因此 >0表示激活, <0表示抑制。

(G) 1 Hz激活VIP时, 所有记录到的神经元根据基底放电频率与其动作电位波峰到波谷时间绘制的分布图。不同颜色代表不同神经类群。光标记的VIP (绿色)、Inh (蓝色)、Inh-act (洋红色)、dAct (橙色)和No change (灰色)。

(H) 所有记录到的神经元在1 Hz 1 ms蓝光刺激VIP神经元前后的发放频率根据Z-score标准化后的热图。垂直虚线表示蓝光激发的时间。

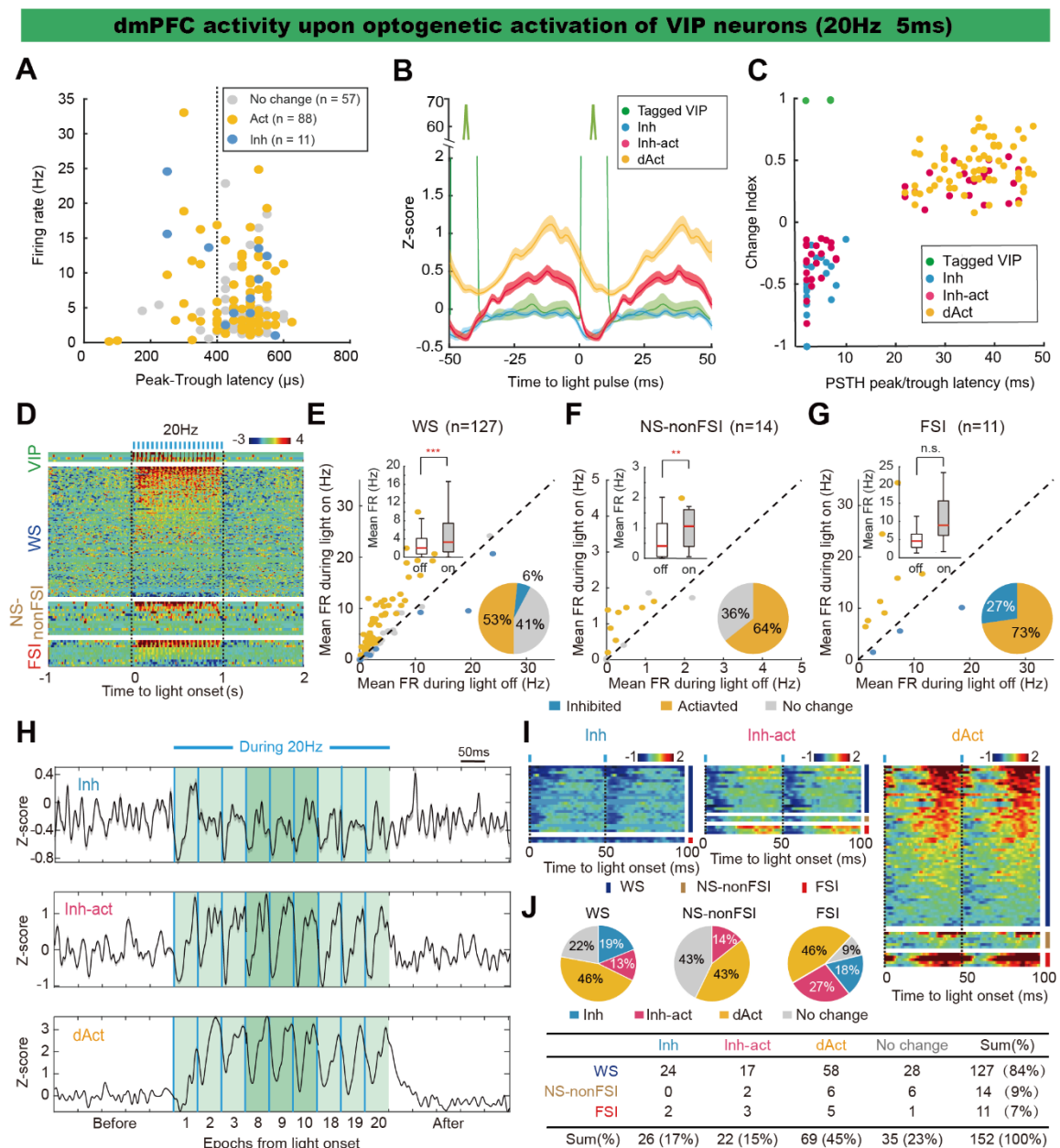
(I) 饼图显示了1 Hz 光刺激条件下, WS (上)、NS-nonFSI (中)和FSI (下)神经元中, 出现Inh (蓝色)、Inh-act (洋红色)、dAct (橙色)和No change (灰色)神经元的百分比。

(J) WS (上, 蓝色)、NS-nonFSI (中, 棕色)和FSI (下, 红色)神经元中, Inh (左)、Inh-act (中)和dAct (右)类型的发放频率根据Z-score标准化后的热图。

(K) 所有记录到的mPFC神经元在1 Hz 1 ms光激活VIP神经元时的反应变化总结表。

接着我们分析了行为中操纵VIP神经元成功引起行为变化的高频光刺激方案的效应(图. 21A-21C)。我们发现持续1 s, 20 Hz, 5 ms的光刺激引起了53%的WS神经元显著激活, 另有6%被抑制, WS神经元的平均发放频率增加了60%左右(图. 21D and 21E)。而在NS-nonFSI神经元和FSI神经元中也出现了更多被激活的神经元(图. 21D, 21F and 21G)。为了探究高频刺激是如何引起激活神经元比例增加的, 我们将1 s的光照时间窗放大(图. 21H)。我们发现每次光照后, 那些激活的神经元里有些会出现先抑制, 但是更多的是延迟激活。与前面情况相类似的, 抑制发生在单突触连接时间内(最强抑制时间:  $3.7 \pm 0.3$  ms), 而激活更像是多突触传递产生的效应(最强激活时间:  $36.5 \pm 0.8$  ms)。我们又将神经元反应分为直接抑制, 先抑制后激活, 延迟抑制这三种, 并根据电生理特征进行了两两比对。尽管对mPFC整体神经网络效应都是激活, 20 Hz的刺激相较于1 Hz的刺激, 不响应(no change)的神经元数量大大减少(20 Hz: 23% vs 1 Hz: 43%), 并出现了更多的延迟激活神经元(20 Hz: 45% vs 1 Hz: 24%)(图. 21I and 21J)。这意味着

行为操纵时的VIP光遗传刺激方案，大大增强了mPFC整体网络的活性。同时，我们也注意到仍存在一定数量的FSI神经元被抑制（图. 21G）。根据之前的研究报道<sup>[34]</sup>以及结合之前行为操纵和记录的结果，我们猜测这些被抑制的PV神经元可能介导了VIP神经元对PYR神经元的去抑制作用，VIP神经元抑制PV神经元，通过解除PV神经元对PYR神经元的抑制，激活了PYR神经元，从而引发整个网络的神经活动增强。



### 图 21. 高频刺激VIP神经元对mPFC神经活动的影响

(A) 当VIP神经元受到20 Hz光刺激时,所有记录到的神经元的基底放电频率与其动作电位波峰到波谷的时间关系分布图。彩色圆圈表示光刺激后,放电频率出现显著变化的神经元。灰色,没有变化;黄色,激活;蓝色,抑制。

(B) 1s (20 Hz, 5 ms) 光刺激条件下,光标记的VIP (绿色)、Inh (蓝色)、Inh-act (洋红色) 和dAct (橙色) 神经元时间相关变化曲线。阴影区域为标准误。

(C) 20 Hz激活VIP时,四个神经类群的变化指数与事件相关变化曲线图中波峰(激活)-波谷(抑制)时间的比较。光标记的VIP (绿色)、Inh (蓝色)、Inh-act (洋红色) 和dAct (橙色)。

(D) 所有记录到的神经元在1 s (20 Hz 5 ms) 蓝光刺激VIP神经元前后的发放频率根据Z-score标准化后的热图。垂直虚线表示蓝光激发的时间。

(E-G) WS (E)、NS-nonFSI (F) 和FSI (G) 神经元在1 s (20 Hz 5 ms) 照光和不照光期间的平均放电频率变化散点图。彩色圆圈表示光照后放电频率出现显著增加(橙色)或减少(蓝色)的神经元。里面的饼图显示了照光期间神经元放电频率出现显著增加,降低或不变的比例。柱状图比较了所有神经元在照光和不照光期间的放电频率变化。柱状图中的数据均为中位数 $\pm$ 1.5倍四分位距。配对的Wilcoxon符号秩检验。

(H) 在20 Hz 5 m光刺激前后,Inh (上)、Inh-act (中) 和dAct (下) 神经元的事件相关变化曲线图。中间背景高亮部分显示的不同神经类群在开始 (epoch 1-3)、中间 (epoch 8-10) 和结束 (epoch 18-20) 期间的变化。垂直的蓝线表示LED蓝光激发的时间。

(I) WS (上, 蓝色)、NS-nonFSI (中, 棕色) 和FSI (下, 红色) 神经元中, Inh (左)、Inh-act (中) 和dAct (右) 类型的发放频率根据Z-score标准化后的热图。

(J) 所有记录到的mPFC神经元在20 Hz 5 ms光激活VIP神经元时的反应变化总结表。

所有数据均为均值 $\pm$ 标准误, \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; n.s., 无显著性差异。

合作者: 倪哲一。

### 3.4.3 瞬时抑制mPFC中PV神经元能激活PYR神经元

为了验证PV是否有可能参与介导VIP神经元对PYR神经元的去抑制效应。我们尝试通过光遗传瞬时抑制PV神经元(模拟VIP神经元的抑制效果), 观察对mPFC整体网络的影响。通过往PV-Cre小鼠mPFC注射病毒: AAV<sub>2/9</sub>-Efla-DIO-eNpHR3.0-mCherry, 使得mPFC中的PV神经元特异性表达抑制性光敏感通道蛋白eNpHR3.0, 然后植入光电极进行电生理记录(图. 22A)。前文提到, VIP神经元的抑制效应类似于单突触的效应——持续时间比较短, 所以我们选择了10 ms的瞬时黄光抑制。我们总共记录到188个神经元, 其中171个WS神经元, 10个NS-nonFSI神经元和7个FSI神经元(图. 22B)。因为光抑制不像光激活那样方

便定义光标记的神经元，所以我们这次没有区分光标记的PV神经元。通过分析我们发现，NS神经元(NS-nonFSI神经元 + FSI神经元)的整体反应是先抑制后激活，而WS神经元的整体反应是激活（图. 22C and 22D），其中52%被显著激活，23%被显著抑制（图. 22E）。WS神经元的整体发放频率也相较于照光前显著增加（图. 22F）。综上，我们确认了短暂抑制PV神经元可以激活PYR神经元。这让我们更加相信PV神经元在参与介导VIP神经元对PYR神经元的去抑制中扮演着重要角色。

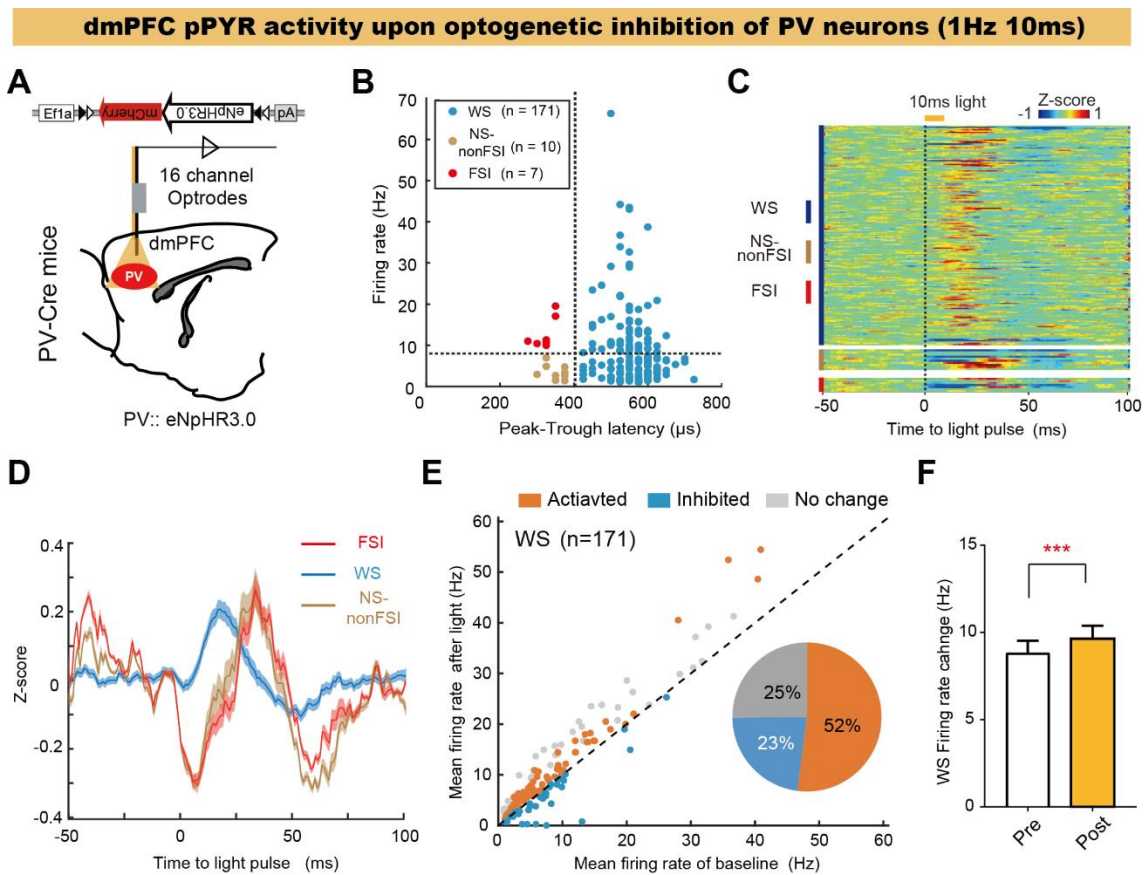


图 22. 瞬时抑制PV神经元能诱发mPFC中锥体神经元的瞬时激活

(A) 病毒的构建及其在PV-Cre小鼠mPFC中的表达位置和光电极记录示意图。  
 (B) 所有记录的WS（蓝色）、NS-nonFSI（棕色）和FSI（红色）神经元的基底放电频率与其动作电位波峰到波谷的时间关系分布图。  
 (C) 10 ms黄光刺激mPFC的PV神经元后，WS（上，蓝色）、NS-nonFSI（中，棕色）和FSI（下，红色）神经元的发放频率根据Z-score标准化后的热图。垂直虚线表示蓝光激发的时间。  
 (D) FSI（红色）神经元、NS-nonFSI（棕色）和WS（蓝色）的事件相关平均发放频率变化曲线图。阴影区域为标准误。  
 (E) WS神经元的基底放电频率与其动作电位波峰到波谷的时间关系分布图。虚线表示1:1关系。饼图显示52%的WS神经元被显著激活，23%被显著抑制，25%无变化。  
 (F) WS神经元的基底放电频率在光刺激前后的变化。\*\*\*表示显著差异。

(E) WS神经元在10 ms光照前 (-50ms-0) 和光照后 (10-30ms) 平均发放频率变化的散点图。彩色圆圈表示神经元放电频率出现明显增加(橙色)或减少(蓝色)。饼图显示在光刺激后显著抑制(蓝色)、激活(橙色)或未改变(灰色)的神经元的百分比。

(F)柱状图显示了所有WS神经元在10 ms照光前后平均发放的变化。配对Wilcoxon符号秩检验。所有数据均为均值±标准误, \*\*\* $p < 0.001$ 。

合作者: 辛秋红。

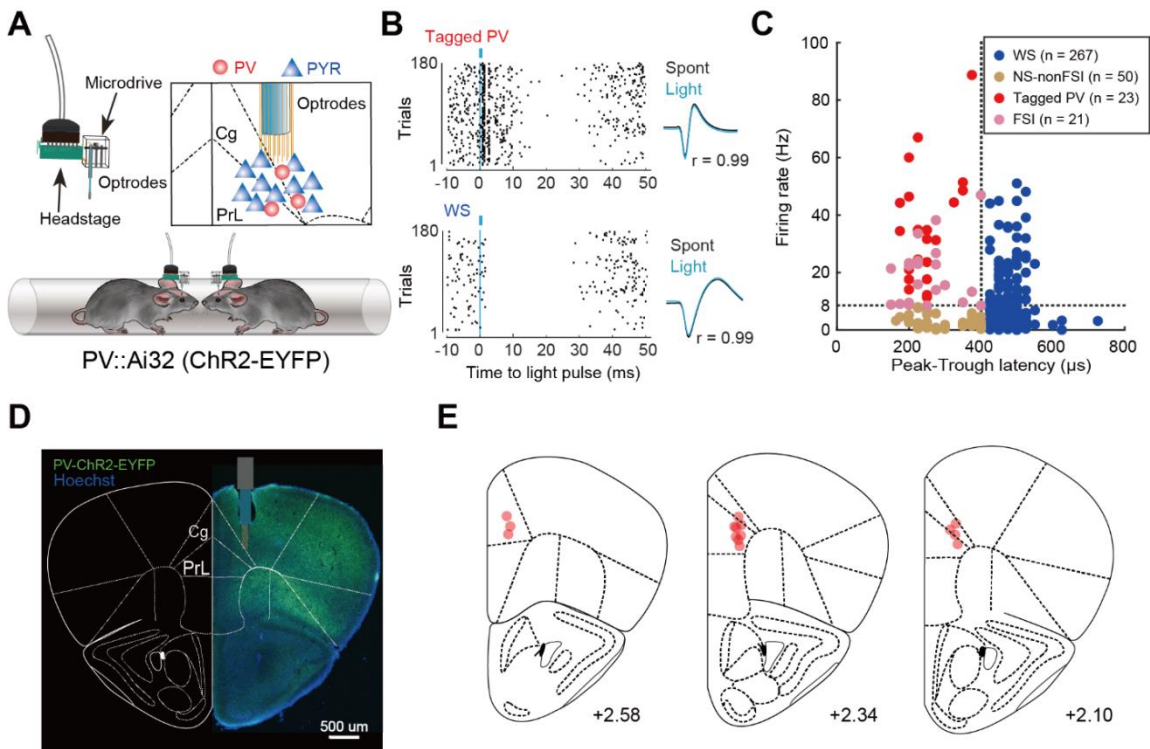


图 23. 在体电生理记录光标记PV神经元在钻管测试期间的反应

(A) 可移动的16通道光电极插入PV::ChR2小鼠mPFC的V/VI层, 记录钻管测试中深层PV神经元的放电情况。

(B) 左: 同一电极记录到的典型光标记的PV(上)和WS(宽波, 下)神经元的放电变化栅格图。右图: PV神经元(上)和WS神经元(下)的光诱导的动作电位波形(蓝色)与自发动作电位波形(黑色)相似。皮尔逊相关性, 上:  $r = 0.99$ ; 下:  $r = 0.99$ 。

(C) 光标记的PV(红色)、WS(蓝色)、NS-nonFSI(棕色)和FSI(粉红色)神经元的基底放电频率与其动作电位波峰到波谷的时间关系分布图。

(D) 典型的PV::Ai32小鼠脑组织切片, 在mPFC中植入了可移动的光电极的位置示意图。

(E) 所有用于记录的PV::Ai32小鼠中光电极尖端的位置检查。



### 3.5 PV神经元和PYR神经元在钻管测试中的活动变化

如果我们上述的假设完全成立:VIP神经元通过抑制PV神经元激活PYR神经元,使小鼠在钻管测试中表现出更多推挤的积极竞争行为。但在钻管测试光纤记录实验中,PV神经元的钙信号在推挤和后退行为中都出现了上升,这一结果与我们的假设相悖。考虑到VIP神经元对PV神经元的抑制时间比较短(10 ms - 20 ms),而钙信号的反应比较慢。我们猜测可能是因为钙信号时间分辨率不够高,导致在小鼠的推挤行为中没有检测到PV神经元的抑制。为了能够用更高的时间分辨率记录小鼠钻管测试中PV神经元和PYR神经元的动态变化,我们使用可移动光电极植入PV::Ai32的小鼠mPFC,通过光标记法找到PV神经元,再通过电生理特性分出PYR神经元,然后分析这两群神经元在钻管测试中的电活动变化(图. 23A-23E)。因为有研究报告,VIP神经元更多的抑制皮层Layer 5/6的PV神经元<sup>[76]</sup>,而mPFC中Layer 5/6的PYR神经元也是向皮层下组织释放行动命令的主要输出,所以我们将电极植入mPFC的深层,主要记录mPFC的Layer 5/6中神经元的变化。

#### 3.5.1 PV神经元和PYR神经元在推挤行为中的动态变化

我们总共记录了361个神经元,其中有23个光标记的PV神经元,267个WS神经元,50个NS-nonFSI神经元和21个FSI神经元。然后将光标记的PV神经元和记录到的FSI神经元合在一起当作假定的PV神经元(pPV),总共有44个,占了所有记录到的神经元的12.2%(图. 24A)。WS神经元被认为是假定的PYR神经元(pPYR),占了所有记录到神经元的74%(图. 24D)。通过对小鼠钻管测试中行为的逐帧分析,我们先分析了推挤行为时PV神经元和PYR神经元的反应变化。我们发现在推挤行为发生时(-0.5 - 0.5 s),有39%的PV神经元的发放增加,20%的PV神经元发放降低,他们的反应存在明显的异质性(图. 24A-24C)。在PYR神经元上也发现了类似的现象:19%的PYR神经元发放增加,18%的PYR神经元发放减少(图. 24D-24F)。为了找到他们发放时序上的差异,我们比较了那些发生显著变化的神经元开始出现显著变化的时间点(图. 25A)。我们发现推挤行为中被抑制的PV神经元(pPV-Inh)先于那些被激活的PYR神经元(pPYR-Act)发生变化(图. 25B, 25C and 25E)。我们也比较了推挤行为中被激活的PV神经元(pPV-Act),他们的变

化时间点跟推挤行为中被激活的PYR神经元 (pPYR-Act) 接近, 都在推挤抑制的PV神经元 (pPV-Inh) 之后 (图. 25B, 25D and 25E)。综上, 我们发现PV神经元和PYR神经元的反应在推挤行为中都存在着明显的异质性, 而且确实存在着一群在推挤行为发生时被抑制的PV神经元, 它们的抑制比PYR神经元的激活更加提前。而它们可能就是我们在光纤记录中未观察到的参与了VIP神经元对PYR神经元去抑制调节的PV神经元。

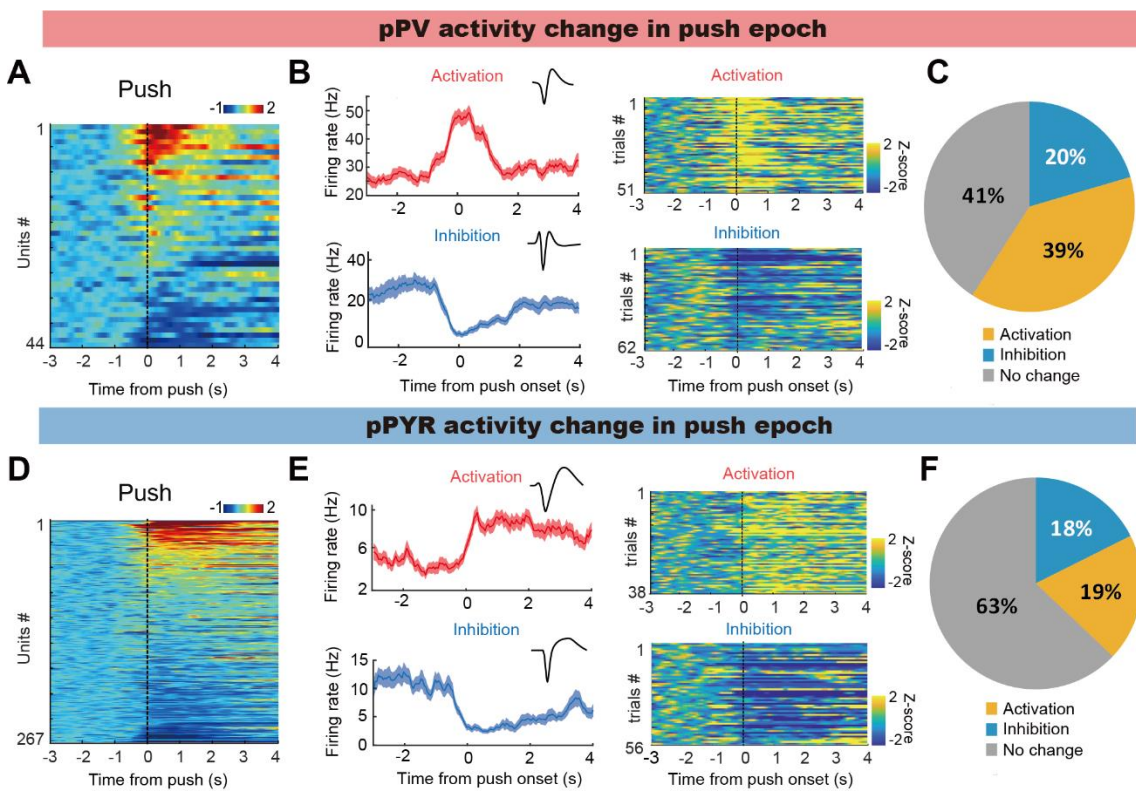


图 24. PV和PYR神经元在钻管测试推挤行为中存在异质反应

(A 和 D) 所有记录的pPV神经元 (10只小鼠的44个神经元) 和pPYR神经元 (10只小鼠的267个神经元) 的发放频率根据Z-score标准化后的热图。0点为推挤行为开始时间。

(B 和 E) 两个典型的pPV (B) 和pPYR (E) 神经元的活动, 上: 在推挤行为中激活, 下: 在推挤行为中被抑制。左, 典型神经元的事件相关发放频率变化曲线图。阴影区域为标准误。插入的曲线: 典型神经元的波形特征。右, 典型神经元的发放频率根据Z-score标准化后的热图。每条线代表一次钻管测试。

(C 和 F) pPV (C) 和pPYR (F) 神经元在推挤行为中放电频率出现显著变化的比例。

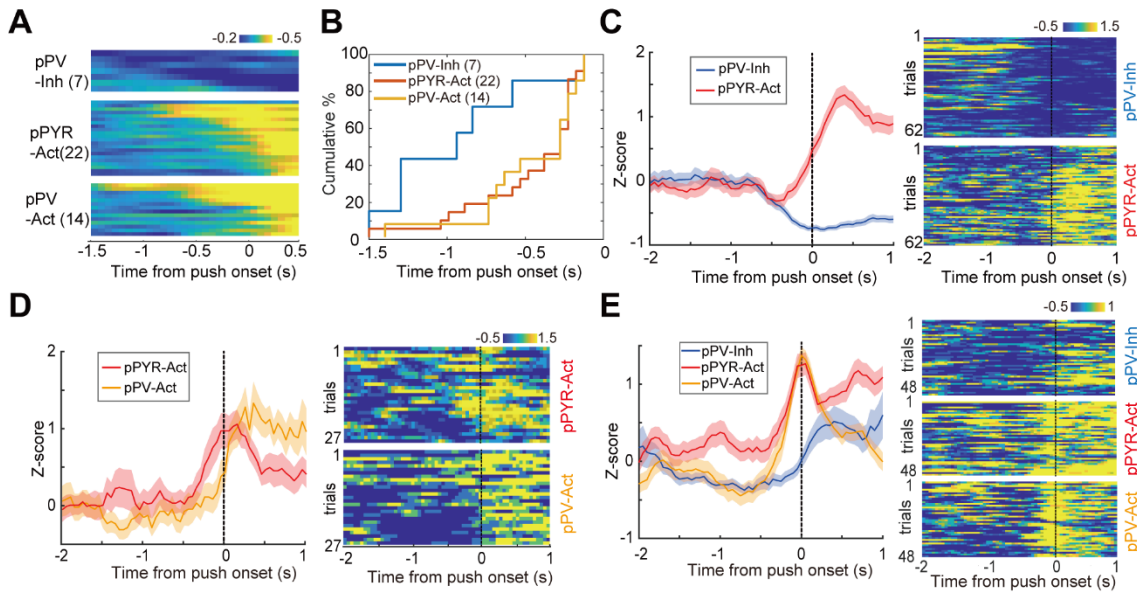


图 25. PV和PYR神经元在钻管测试推挤行为中的动态变化

(A) 推挤行为中抑制的pPV (pPV-Inh)、推挤行为中激活的pPV (pPV-Act) 和推挤行为中激活的pPYR (pPYR-Act) 神经元的发放频率根据Z-score标准化后的热图。按其第一次出现显著变化的时间点排序。

(B) pPV-Inh、pPV-Act和pPYR-Act神经元在推挤行为前后的第一出现显著变化时间累积分布曲线 (pPV-Inh vs pPYR-Act,  $P = 0.03$ ; pPV-Inh vs pPV-Act,  $P = 0.02$ ; pPV-Act与pPYR-Act,  $P = 0.63$ ; Kolmogorov-Smirno两样本检验)。

(C、D 和 E) 分别来自同一个电极记录位点的：一对pPV-Inh和pPYR-Act神经元 (C)、一对pPYR-Act和pPV-Act神经元 (D) 和pPV-Inh、pPYR-Act和pPV-Act神经元 (E) 在推挤行为中的发电变化。左，神经元的事件相关发放频率变化曲线图。阴影区域为标准误。右，神经元的发放频率根据Z-score标准化后的热图。注意，(C) 中pPV-Inh的抑制早于pPYR-Act神经元的激活；在 (E) 中，pPV-Act神经元在推挤之前有抑制的趋势 ( $p = 0.054$ )。

合作者：倪哲一。

### 3.5.2 PV神经元和PYR神经元在后退行为中的活动变化

我们也分析了后退行为中PV神经元和PYR神经元的反应变化。我们发现在后退行为发生时 (-0.5 - 0.5 s)，PYR神经元的反应也存在异质性，其中19%的神经元被激活，8%的神经元被抑制 (图. 26A and 26B)。出乎我们意料的是，PV神经元在后退行为发生时有34%的激活，而没有一个被显著抑制的神经元 (图. 26C and 26D)。随后，我们将所有记录到的神经元分别在推挤行为和后退行为中的反应变化合在一起分析。我们发现，有些PV神经元在推挤行为中下降，而在后退行为中

上升（图. 27A），而有些PV神经元在推挤和后退行为中都上升（图. 27B）。有些PYR神经元在推挤时上升，在后退行为时下降（图. 27C），也有些PYR神经元在推挤和后退行为中都上升（图. 27D）。总的来看，不同神经类群对于不同行为的编码程度是复杂且多样的（图. 27E-27H）。但我们发现，PV神经元在对后退行为中的贡献度远比在推挤行为中高（图. 27I），尽管我们之前光纤记录的结果看到PV神经元的钙活动在推挤和后退行为中都是上升的。

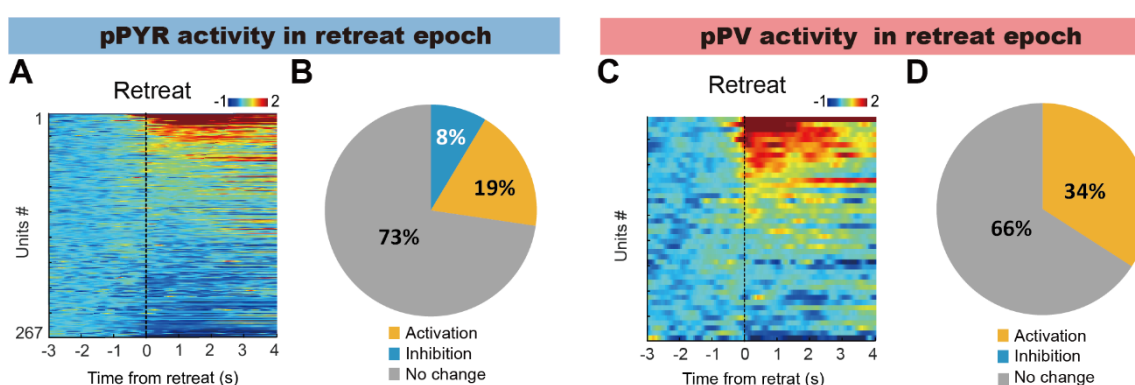


图 26. PV和PYR神经元在钻管测试后退行为中的编码差异

(A 和 C) 所有记录的pPV神经元（10只小鼠的44个神经元）和pPYR神经元（10只小鼠的267个神经元）的发放频率根据Z-score标准化后的热图。0点为后退行为开始时间。

(B 和 D) pPV (C) 和pPYR (F) 神经元在后退行为中放电频率出现显著变化的比例。

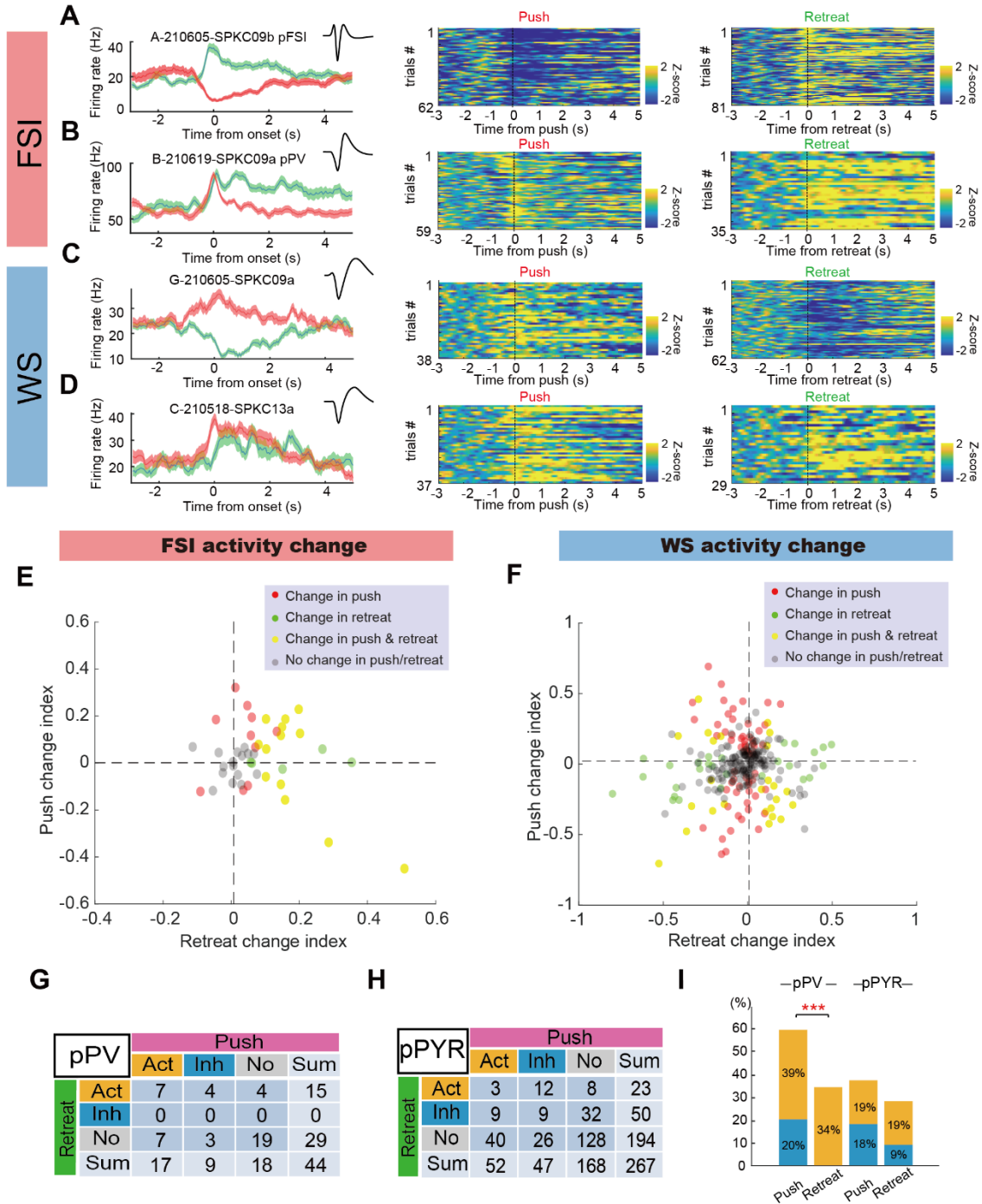


图 27. 钻管测试中PV和PYR神经元在推挤和后退行为中的变化比较

(A 和 C) 典型的pPV (A) 和pPYR (C) 神经元活动，它们在推挤（红色）行为和后退（绿色）行为中具有相反变化。左，典型神经元的事件相关发放频率变化曲线图。阴影区域为标准误。插入的曲线：典型神经元的波形特征。右，典型神经元的发放频率根据Z-score标准化后的热图。每条线代表一次钻管测试。

(B 和 D) 典型的pPV (B) 和pPYR (D) 神经元活动，它们在推挤（红色）行

为和后退（绿色）行为中具有相同变化。左，典型神经元的事件相关发放频率变化曲线图。阴影区域为标准误。插入的曲线：神经元的波形特征。右，典型神经元的发放频率根据Z-score标准化后的热图。每条线代表一次钻管测试。

(E 和 F) 在钻管测试期间，pPV (E) 和pPYR (F) 神经元在推挤和后退行为中活动变化的散点图。变化指数定义为 (行为期间-基线) / (行为期间+基线) 的发放频率。红圈，在推挤行为中发生变化；绿色圆圈，在后退行为中发生变化；黄色圆圈，在推挤和后退行为中都发生了变化；灰色圆圈，没有变化。

(G 和 H) pPV (G) 和pPYR (H) 神经元在推挤或后退行为发生时变化数量的总结。

(I) 与推挤行为相比，pPV神经元在后退行为中更兴奋。卡方检验，\*\*\* $p < 0.001$ 。

### 3.6 mPFC微环路中不同神经类群的调谐控制社会竞争行为

基于以上所有结果，以及前人研究中搜集到的证据，我们得出了一个mPFC微环路调控社会竞争行为的模型。在基底状态下，PV神经元的活性较高，它对其他神经元会有一个本底的抑制。在推挤行为中，VIP神经元先被激活，给予PV神经元和PYR神经元一个短暂的抑制。被抑制后的PV神经元会解除对PYR神经元的抑制，PYR神经元显著激活后会使小鼠产生推挤行为，同时激活的PYR神经元还会激活其周围的PV神经元，从而维持整体网络的兴奋-抑制平衡<sup>[77]</sup>。最终通过PV神经元强大的抑制作用使整个网络回到基底水平(图. 28A)<sup>[78,79]</sup>。在后退行为中，由于mPFC上游输入抑制VIP神经元或通过直接激活PV神经元，使得整个mPFC的网络都被抑制，尤其是PYR神经元被强烈抑制后，使得小鼠表现出更多的后退行为。最后由于PV神经元间的相互抑制，使得整个网络恢复到基底水平(图. 28B)<sup>[80,81]</sup>。正是基于mPFC中的VIP神经元和PV神经元这两个中间神经元与PYR神经元组成的微环路内部的精细调谐，控制着社会竞争行为中小鼠的竞争状态。

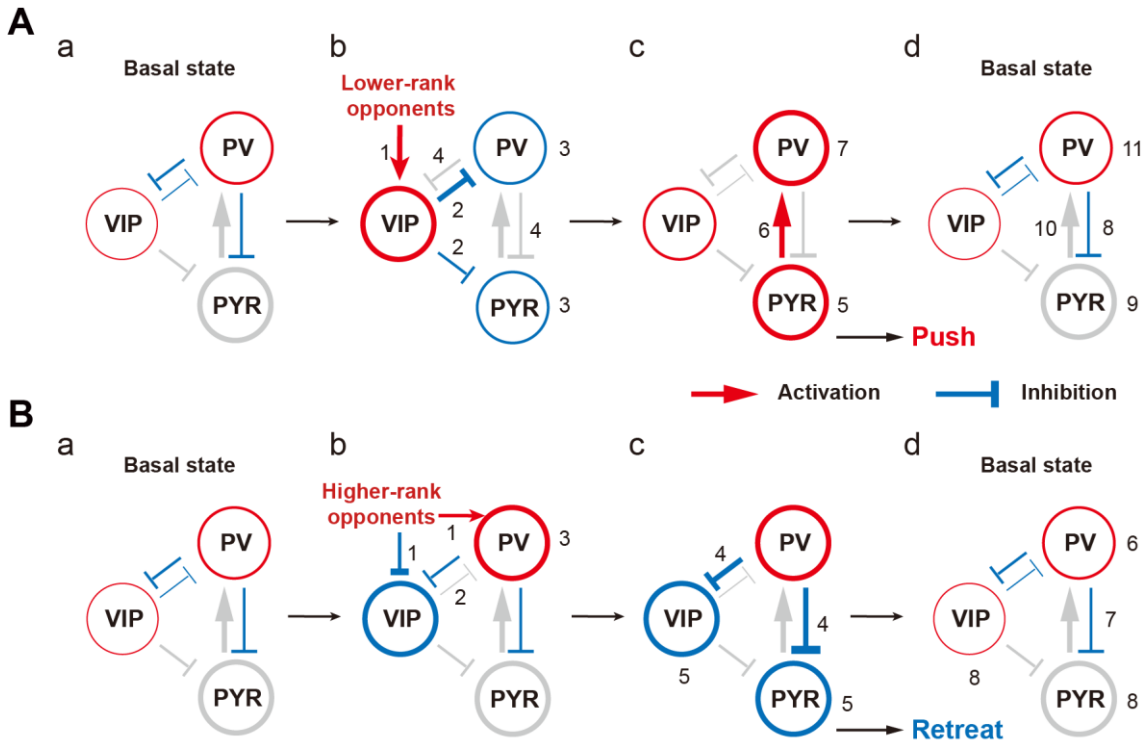


图 28. mPFC微环路调控社会竞争行为的动态模型

在本底状态下，VIP、PV和PYR神经元之间存在兴奋-抑制平衡。PV神经元具有相对较高的本底活动并对其他神经元保持温和的抑制(Aa)。在推挤行为发生过程中，VIP神经元首先被激活，导致PV和PYR神经元的瞬时抑制 (Ab)。PV的抑制导致VIP和PYR的去抑制，其活动增强后将诱发更多积极的推挤行为。PYR的大量激活同时引起周围PV的激活 (Ac)。最终借助PV神经元的反馈抑制使网络恢复到本底的平衡状态 (Ad)。在后退行为发生过程中，由于VIP神经元的抑制或来自其他上游信号的输入，使得PV神经元被激活(Bb)。使得VIP和PYR神经元被强烈抑制(Bc)，这使得小鼠更容易出现消极的后退行为。最终PV神经元之间的互相抑制使整体网络恢复到本底平衡状态(Bd)。箭头上的数字表示事件发生的顺序。红色表示激活，蓝色表示抑制。线条和圆圈的粗细表示激活或抑制的程度。

### 3.7 mPFC微环路在小鼠求偶超声行为中的功能

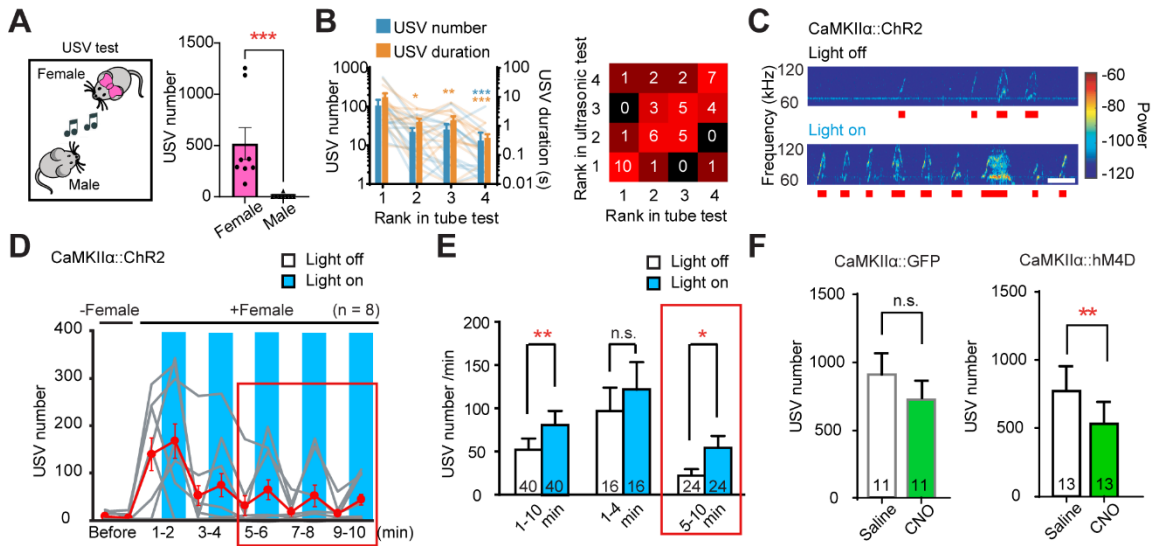
前面的工作证明了mPFC的微环路在调控小鼠钻管测试竞争行为中扮演着重要角色。社会竞争中获胜的鼠代表着拥有更高的社会等级。而社会等级高的表现从多方面可以体现，比如，高等级的雄性个体会有更高的求偶动机<sup>[9,82]</sup>。发声求偶是动物世界中的一个普遍现象。有研究报道，个体求偶超声 (Ultrasonic vocalization, USV) 的表现能力跟社会等级以及繁殖成功率相关<sup>[83,84]</sup>。在啮齿类动物中，雌性

个体也会更喜欢发出更多超声的雄性个体<sup>[85]</sup>。接下来，我们想探究调控小鼠社会竞争行为引发个体等级变化的内侧前额叶微环路，是否也会对其他社会等级行为造成影响。

### 3.7.1 PYR神经元能双向的调控小鼠的求偶超声行为

我们首先证明了相对于雄性个体，雄性小鼠会对雌性个体发出更多的求偶超声（图. 29A）。通过与钻管测试得到的等级结果进行比较，我们发现求偶超声得到的等级结果与钻管测试得到的结果有很好的相关性，即高等级个体会发出更多的求偶超声<sup>[25]</sup>（图. 29B）。随后，我们用光遗传激活mPFC中的PYR神经元，观察对小鼠求偶超声行为的影响。病毒注射和光纤埋植流程跟前文描述一致。在10 min的测试中，我们选择1分钟给光，1分钟不给光的光遗传刺激方案，先给或先不给随机。我们发现，激活小鼠mPFC的PYR神经元能使小鼠发出更多的USV（图. 29C and 29D），而光刺激注射GFP对照病毒小鼠mPFC的PYR神经元，则不会对他们的USV发声造成任何影响（图. 31A and 31B）。在10分钟的测试中，小鼠通常在前4分钟发出更多的USV，而在剩余的6分钟里逐渐减少到较低水平（图. 29D）。通过对不同时间段USV情况进行进一步分析，我们发现激活PYR神经元引发的更多超声主要集中在测试后半段5-10 min，这一段时间USV发声情况本底较低（图. 29E）。随后，我们尝试通过药理遗传抑制mPFC的PYR神经元，观察小鼠求偶超声行为的变化。实验流程是先注射生理盐水（Saline），测试小鼠求偶超声的本底水平。两天后再注射CNO，药物注射半小时（药物起效时间）后进行为期10 min的超声记录。我们发现注射CNO抑制mPFC中的PYR神经元，小鼠的USV数量会明显低于注射Saline的基底水平（图. 29F）。为了排除药物的影响，我们将hm4D换成GFP作为对照，证明注射CNO不会直接引起小鼠USV的发声变化（图. 29F）。综上，我们发现mPFC的PYR神经元也能双向的调控小鼠的求偶超声行为。





**图 29. mPFC中的PYR神经元可以双向的调节小鼠求偶超声行为**

(A) 小鼠求偶超声 (USV) 测试示意图。雄性小鼠对雌性个体会发出比雄性个体更多的超声。曼-惠特尼U检验。

(B) 高等级小鼠会发出更多的求爱超声波。左：柱状图显示小鼠等级和小鼠超声数量和持续时间之间的关系。等级1和等级2-4进行统计比较。Friedman检验，USV数量， $p = 0.0016$ ；USV持续时间， $p = 0.0002$ 。事后进行邓恩多重比较。右：钻管测试等级和USV测试等级之间的相关性。表中数值代表动物数量。Fisher精确检验， $p < 0.0001$ 。

(C) 光激活mPFC中的PYR神经元时，小鼠USV波谱在光照或停光期的变化比较。每条红线表示超声波发声。比例尺，200毫秒。

(D) mPFC PYR神经元在接受间歇性光刺激期间的超声次数变化图。先开和先关的顺序在动物之间是平衡的。红框表示USV数量在光刺激下显著变化的时期。

(E) 光激活mPFC中的PYR神经元显著增加了USV，在超声自然下降的5-10分钟期间效果最为明显。配对的Wilcoxon符号秩检验。框中的数字代表用于分析的测试数量。

(F) 化学遗传学抑制mPFC PYR神经元前后的USV数量比较。左：表达GFP对照病毒的鼠在注射生理盐水和CNO后超声数量的比较。右：表达hM4D病毒的鼠在注射生理盐水和CNO后超声数量的比较。配对的Wilcoxon符号秩检验。每个条形图中的数字显示了小鼠的数量。

所有数据均为均值±标准误，\* $p < 0.05$ ；\*\* $p < 0.01$ ；\*\*\* $p < 0.001$ ；n.s., 无显著性差异。合作者：汪菲和朱鸿

### 3.7.2 PV神经元和VIP神经元在求偶超声行为中的功能

mPFC的PYR神经元能双向的调控小鼠的求偶超声行为，那前额叶皮层微环路中的其他两个重要成分PV神经元和VIP神经元在其中的作用又是什么样的呢？通

过光遗传激活PV神经元，我们发现小鼠的USV数量会减少。特别是在前4分钟，小鼠本底超声较多的时间窗里，而光照PV::GFP的鼠则没有任何影响（图. 30A, 30B, 31C and 31D）。接着，我们又抑制了mPFC中PV神经元，观察对小鼠求偶超声行为的影响。出人意料的是抑制PV神经元的PV::hM4D实验组，跟PV::GFP对照病毒组一样，注射CNO后，相较于注射Saline的小鼠，USV的数量没有发生显著的改变（图. 30C）。我们接着又去做了光遗传激活mPFC中的VIP神经元和药理遗传抑制VIP神经元，它们的结果也都跟它们的GFP对照组一样，对小鼠求偶超声行为没有造成显著的改变（图. 30D-30F, 31E and 31F）。基于以上数据，我们猜测：mPFC微环路对小鼠求偶超声行为和社会竞争行为，有着不一样的调控机制。

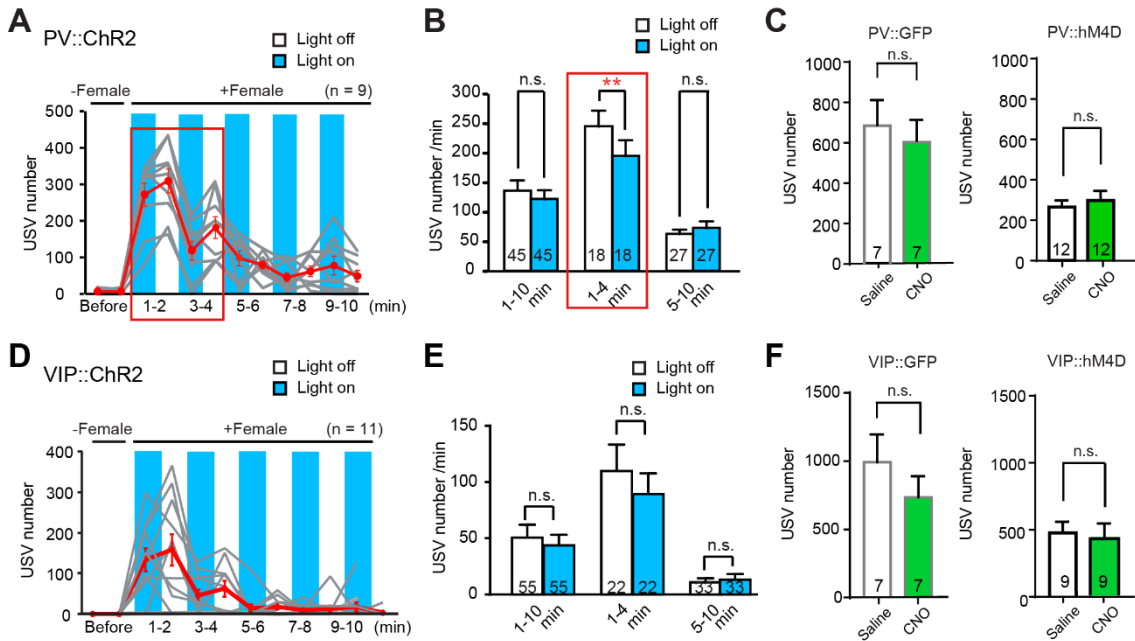


图 30. mPFC中的PV/VIP神经元在求偶超声调节中的作用

(A 和 D) mPFC中的PV (A) 和VIP (D) 神经元在接受间歇性光刺激期间的超声数量变化图。先开和先关的顺序在动物之间是平衡的。红框表示USV数量在光刺激下显著变化的时期。

(B) 光激活mPFC中的PV神经元在超声较多的前4分钟内显著降低了USV数量。配对的Wilcoxon符号秩检验。框中的数字代表用于分析的测试数量。

(E) 光激活mPFC中的VIP神经元在10分钟内都无显著变化。配对的Wilcoxon符号秩检验。框中的数字代表用于分析的测试数量。

(C 和 F) 化学遗传学抑制mPFC中的PV (C) 和VIP (F) 神经元前后的USV数量比较。左：表达GFP对照病毒的鼠在注射生理盐水和CNO后超声数量的比较。右：

表达hM4D病毒的鼠在注射生理盐水和CNO后超声数量的比较。配对的Wilcoxon符号秩检验。每个条形图中的数字显示了小鼠的数量。。  
所有数据均为均值±标准误, \*\* $p < 0.01$ ; n.s., 无显著性差异。

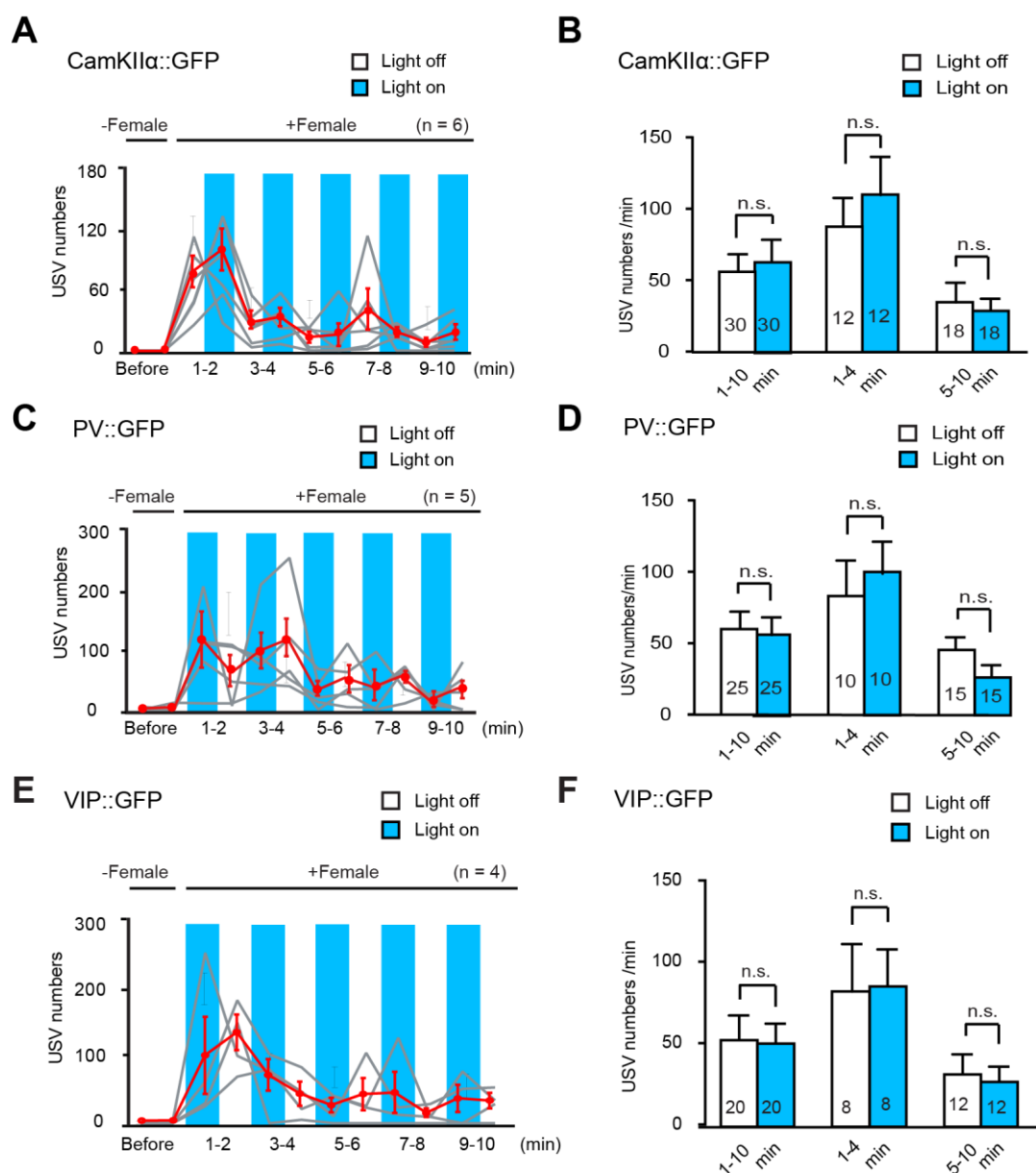


图 31. 在求偶超声测试期间光刺激表达GFP对照病毒小鼠的效应

(A、C 和E) CaMKII $\alpha$ ::GFP (A)、PV::GFP (C) 和VIP::GFP (E) 的小鼠在接受间歇性光刺激期间的超声数量变化图。先开和先关的顺序在动物之间是平衡的。

(B、D 和 F) 光刺激CaMKII $\alpha$ ::GFP (B)、PV::GFP (D) 和VIP::GFP (F) 小鼠的mPFC在求偶超声测试中都没有发生显著变化。配对的Wilcoxon符号秩检验。框中的数字代表用于分析的测试数量。

所有数据均为均值±标准误, n.s., 无显著性差异。

## 4 讨论

本研究中，我们利用转基因鼠，做了细胞类型特异的钙成像，光遗传操纵和药理遗传操纵，探明了mPFC微环路中的不同神经类群在社会竞争行为中所扮演的不同角色。还利用最先进的微型化双光子显微镜以及在体光标记电生理记录等手段进一步解析了mPFC内部不同神经类群间的作用关系及其在社会竞争行为调控中的动态机制。最后我们还比较了mPFC微环路在不同等级相关行为中的调控差异。我们先是发现mPFC中的VIP神经元和PV神经元在调控小鼠竞争行为时，扮演着相反的角色。光纤记录钙成像发现：在推挤行为发生时，VIP神经元先激活，紧跟着是PYR神经元和PV神经元的激活；而在后退行为发生时，PV神经元显著激活，VIP神经元和PYR神经元都被抑制。通过双色微型双光子钙成像技术与光遗传相结合，我们发现了PV神经元负向的调控mPFC的整体网络活性，而VIP神经元则对mPFC的神经网络有着正向的调控。通过在体光标记电生理记录，我们进一步解析了VIP神经元，PV神经元和PYR神经元在mPFC内部以及在不同竞争状态下的动态作用关系。我们首次提出了mPFC中VIP-PV-PYR这样一条去抑制微环路，对小鼠社会竞争行为的动态调控机制：VIP神经元通过抑制PV神经元去抑制PYR神经元，使小鼠在社会竞争中表现出更多的推挤行为；而PV神经元的强烈激活，会抑制mPFC网络中的其他神经元活动，导致小鼠表现出更多的后退行为。而且这条去抑制微环路在对钻管测试中社会竞争行为的调控可能是特异的，它在其他等级相关行为如求偶超声行为中，可能有着不一样的调控机制。

### 4.1 VIP神经元的功能

VIP神经元一直被认为会通过去抑制PYR神经元参与皮层的神经网络调控，这之前在视觉皮层（Visual cortex）<sup>[37]</sup>，听觉皮层（Auditory cortex）<sup>[86]</sup>，杏仁核（Amygdala）<sup>[87]</sup>，包括内侧前额叶皮层（mPFC）<sup>[34]</sup>在内的多个脑区都有被报道过。而且它分别参与了包括恐惧学习<sup>[87,88]</sup>，增强学习<sup>[34]</sup>，视觉信号加工<sup>[37]</sup>，运动表现<sup>[89]</sup>，焦虑行为<sup>[68]</sup>，短期记忆<sup>[31]</sup>，空间奖励学习<sup>[90]</sup>等多种行为的调控。我们的研究证明，VIP神经元还会通过去抑制mPFC中的PYR神经元，参与调控小鼠在社会竞争中的动机相关行为（积极进取或畏缩后退）。我们的钙信号记录结果表明

VIP神经元在推挤行为中比PV神经元和PYR神经元变化的更早、更快。这一结果与被广泛认为的VIP神经元控制皮层信息输入，并起始皮层微环路内部信息加工的假设相符合<sup>[37,42,91,92]</sup>。VIP神经元主要分布在皮层的Layer 2/3，它同时接受感觉丘脑<sup>[92-94]</sup>，皮层长程投射<sup>[42,93,95,96]</sup>，还有基底前脑的乙酰胆碱能投射<sup>[41,95,97,98]</sup>。通过整合来自感觉系统，其他高级皮层的信息，以及多种神经调质的输入，VIP神经元引发mPFC微环路内部的一系列信号级联传递，将更多的PYR神经元从基底抑制中释放，通过mPFC自上而下的控制系统使小鼠在社会竞争中表现出更多积极进取行为，它可能在mPFC微环路系统中真正扮演着“VIP”的角色。

此外，尽管在之前的报道中，VIP神经元主要的作用对象都是其他GABA能中间神经元<sup>[81]</sup>，但是我们的在体电生理记录结果显示，VIP神经元对较多的PYR神经元也会有一部分抑制。这可能是由于之前关于微环路中的不同类型神经元间的作用及连接关系都来自脑片电生理实验的结果，在体情况会比离体情况复杂的多。巧合的是，有课题组近期发现激活视觉皮层的VIP神经元，在激活一群PYR神经元的同时，也会抑制另一群PYR神经元，小鼠整体的视觉任务表现也变得更好。作者提出一个假设：VIP神经元通过“抑制-去抑制”，实现对PYR神经元的“推-拉”调控，即抑制一部分任务不相关神经元，激活更多的神经元去参与目标任务<sup>[89]</sup>。这也非常符合我们观察到的现象。此外，我们还观察到VIP神经元激活后，引起不少PV神经元和PYR神经元产生先抑制后激活的反应，这背后的生理意义是什么？值得接下来更多的思考和实验探究。

## 4.2 PV神经元的功能

是什么神经元参与介导了VIP神经元对PYR神经元的去抑制？之前的大部分研究都认为SOM神经元在其中的调控作用大于PV神经元。在桶状皮层<sup>[93]</sup>，视觉皮层<sup>[37,99]</sup>，还有mPFC<sup>[34]</sup>，都有研究报道VIP神经元会更多的与SOM神经元产生突触联系，尽管PV神经元也是其不能忽视的作用对象。但在我们的行为操纵结果中，SOM神经元没有效果，反而是PV神经元的作用明显。我们的光电极电生理记录结果也更加证实PV神经元是更可能的介导对象。在VIP神经元激活后，我们总共记录到51个被瞬时抑制（抑制发生在10 ms左右，单突触连接）的神经元，包括直接抑制和先

抑制后激活。其中有4个NS-nonFSI神经元，而有9个是FSI神经元。而且我们记录了光标记的PV神经元在竞争行为发生时的发放情况，发现有一群在推挤行为发生前被抑制的PV神经元，这正是VIP神经元钙信号显著上升的时间点，随后紧跟着PYR神经元的发放增强。这些结果更加让我们相信PV神经元是介导VIP神经元参与对PYR神经元的去抑制从而调控社会竞争行为的重要角色。

前面提到关于VIP神经元与SOM神经元的突触联系显著多于PV神经元的结果主要也都来自于体外脑片电生理记录<sup>[34,81,93,95]</sup>，在体情况下可能会有不同。其实也有不少PV神经元参与介导的VIP神经元去抑制环路在多个不同脑区被发现。例如在桶状皮层，激活浅层的VIP神经元，会观察到深层的PV神经元有很强的抑制<sup>[76]</sup>。在杏仁核，VIP神经元与PV神经元和SOM神经元的连接强度则比较接近<sup>[87]</sup>。在mPFC，VIP神经元会抑制25%的PV神经元<sup>[34]</sup>，而且PV神经元的发放频率与VIP神经元的输入成反比<sup>[100]</sup>。在海马体，VIP-PV之间的突触联系会参与调节学习诱导的海马网络可塑性<sup>[101]</sup>。有研究报道VIP神经元主要作用在PV神经元的胞体部分，尽管它们间的突触联系不多，但是它的作用强度却很强<sup>[102]</sup>。而且，由于PV神经元独特的形态学以及电生理特性，它与周围其他神经元会存在着广泛的联系，从而实现对整个网络强有力的抑制<sup>[103,104]</sup>。通过VIP神经元抑制部分PV神经元，就足以引发整体神经网络的剧烈变化。

此外，关于在光纤记录实验中，为什么PV神经元的钙信号在推挤行为发生后大幅上升？这似乎与我们的去抑制假设不符。我们在mPFC微环路工作模型里解释了这一点：PYR神经元激活后，将很快激活周围的PV神经元，以维持网络的内稳态平衡。这种现象其实在很多文献报道里都能找到证据，PV神经元会紧随着PYR神经元的活动而活动，从而维持局部网络的兴奋-抑制平衡<sup>[105-109]</sup>。

### 4.3 SOM神经元的功能

关于SOM神经元，它也是皮层中一群主要的抑制性神经元。有很多文章报道它会在mPFC中通过抑制PYR神经元参与一些高级认知行为<sup>[33,50,110]</sup>。但是在我们的行为操纵实验里，无论是激活还是抑制SOM神经元都没有引起显著的行为变化。而且光纤记录的结果显示，SOM神经元的钙信号尽管与PV神经元类似，在推挤和

后退行为中都上升,但是它的上升幅度比PV神经元小。其中很可能一个原因是,SOM神经元内部存在着明显的异质性。有研究发现,在皮层的不同Layer,SOM神经元扮演的角色会有所不同<sup>[111]</sup>。它会直接抑制锥体神经元<sup>[81,112]</sup>,也会通过抑制其他中间神经元(比如PV神经元)激活锥体神经元<sup>[48,113]</sup>。尽管操纵SOM神经元对小鼠的社会竞争行为没有产生显著的影响,但是我们没有排除它会参与到mPFC微环路对社会竞争行为的调控。我们相信SOM神经元以及本文未提及的一些其他中间神经元也都会参与mPFC微环路的动态变化,从而介导社会竞争行为的调控。

#### 4.4 不同等级行为存在不同的环路调控机制

我们发现mPFC中的PYR神经元,PV神经元和VIP神经元都在社会竞争行为中起着重要的调控作用。而在同样作为社会等级相关行为,跟钻管测试得出的等级关系有极高相关性的求偶超声测试中,只有PYR神经元能做到双向的调控。尽管光照激活PV神经元也能显著降低求偶超声的数量,但是药理遗传抑制PV神经元的操纵对求偶超声行为的影响不显著。这让我们不得不怀疑PV神经元在调控求偶超声行为中的贡献度,毕竟光遗传激活引起的变化无法模拟真实生理情况。而且无论激活或是抑制VIP神经元,对求偶超声行为都没有显著影响。所以我们猜测mPFC微环路中的PV,VIP这两个中间神经元并不像在社会竞争行为中那样,在求偶超声行为中也扮演着重要的调控角色。其中一个可能原因是,mPFC微环路对于不同上游的信息输入有着不同的处理模式。在下丘脑和杏仁核,都有研究报道发现存在不同的神经亚群去编码雄鼠-雄鼠,雄鼠-雌鼠间不同的社交行为<sup>[114,115]</sup>。而mPFC与这两个脑区都存在着紧密的连接关系<sup>[116]</sup>。也有研究报道说雄性小鼠的mPFC对于不同性别的社交对象,会有不同的反应<sup>[49]</sup>。所以我们猜测,mPFC微环路对于不同性质的等级相关行为可能存在着不同的调控机制。

#### 4.5 不足与展望

综上所述,此研究勾勒了一个多元的,动态的微环路模型,发现VIP-PV-PYR这条去抑制通路对社会竞争行为的调控机制,加深了内侧前额叶皮层如何处理社交信息的理解,为治疗因社交异常引发的相关精神疾病提供一定的参考。但其仍存在一定的不足,比如关于不同神经元间的作用关系,在本课题的研究中没有提

供最直接的证据。随着神经科学研究技术的进一步发展，在之后的研究中，可以通过Cre-和Flp-双杂转基因鼠<sup>[117]</sup>，同时标记两种不同的神经类群。这能让我们在操纵一群特定神经元的同时，观察另外一群特定神经元的变化。还可以通过微型双光子的双色成像，同时观察两群不同中间神经元在行为中的作用关系。此外，我们目前主要探讨了mPFC内部不同神经类群对于社会竞争行为的调控，而关于小鼠如何识别不同对手的信息，这些信息又是如何传入到mPFC的，其中强弱对手的信息编码有何不同，都值得我们接下来进行更深入的研究。寻找后退行为发生时激活PV神经元的上游输入，以及推挤行为发生时激活VIP神经元的mPFC上游输入，都能帮助我们更加全面的了解mPFC在调控社会竞争行为中的作用机制。在光电极电生理记录实验中，我们观察到了VIP神经元在调控PYR神经元去抑制过程中有较多有趣的现象。比如“推-拉”调控机制的生理基础及其进化意义等，都值得进一步探究。最后，关于求偶超声行为与社会竞争行为存在不同的微环路调控机制，可能也是关于mPFC上游的不同信息输入引发了mPFC微环路内部不同的处理模式，其中也有很多潜在的机制等待我们去发现。现在，已经有越来越多的学者开始关注社会行为背后的神经机制。相信在不久的将来，关于mPFC在社会行为中的调控机制，会有一个更清晰的图景。



## 参考文献

- [1] Sandi C, Haller J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms[J]. *Nature reviews. Neuroscience*, 2015, 16 (5) : 290-304.
- [2] Sapolsky R M. The influence of social hierarchy on primate health[J]. *Science*, 2005, 308 (5722) : 648-652.
- [3] So N, Franks B, Lim S, et al. A Social Network Approach Reveals Associations between Mouse Social Dominance and Brain Gene Expression[J]. *PLoS One*, 2015, 10 (7) : e0134509.
- [4] Wilson E O. *Sociobiology: the new synthesis*[M]. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 2000.
- [5] Mooney S J, Peragine D E, Hathaway G A, et al. A game of thrones: Neural plasticity in mammalian social hierarchies[J]. *Social Neuroscience*, 2014, 9 (2) : 108-117.
- [6] Fernald R D. Cognitive Skills Needed for Social Hierarchies[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2014, 79: 229-36.
- [7] Zhou T, Sandi C, Hu H. Advances in understanding neural mechanisms of social dominance[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, 49: 99-107.
- [8] Rushworth M F, Mars R B, Sallet J. Are there specialized circuits for social cognition and are they unique to humans?[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2013, 23 (3) : 436-42.
- [9] Wang F, Kessels H W, Hu H. The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy[J]. *Trends in Neurosciences*, 2014, 37 (11) : 674-682.
- [10] Spitzer M, Fischbacher U, Herrnberger B, et al. The neural signature of social norm compliance[J]. *Neuron*, 2007, 56 (1) : 185-96.
- [11] Bailey M R, Simpson E H, Balsam P D. Neural substrates underlying effort, time, and risk-based decision making in motivated behavior[J]. *Neurobiology of learning and memory*, 2016, 133: 233-56.
- [12] Friedman A, Homma D, Gibb L G, et al. A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict[J]. *Cell*, 2015, 161 (6) : p1320-1333.
- [13] Holroyd C B, McClure S M. Hierarchical control over effortful behavior by rodent medial frontal cortex: A computational model[J]. *Psychological review*, 2015, 122 (1) : 54-83.
- [14] Walton M E, Bannerman D M, Rushworth M F. The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making[J]. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2002, 22 (24) : 10996-1003.
- [15] Fujii N, Hihara S, Nagasaka Y, et al. Social state representation in prefrontal cortex[J]. *Soc Neurosci*, 2009, 4 (1) : 73-84.
- [16] Hillman K L, Bilkey D K. Neural encoding of competitive effort in the anterior cingulate cortex[J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15 (9) : 1290-7.
- [17] Hosokawa T, Watanabe M. Prefrontal neurons represent winning and losing during competitive video shooting games between monkeys[J]. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2012, 32 (22) : 7662-71.
- [18] Porter B S, Hillman K L, Bilkey D K. Anterior cingulate cortex encoding of effortful behavior[J]. *J Neurophysiol*, 2019, 121 (2) : 701-714.
- [19] Warden M R, Selimbeyoglu A, Mirzabekov J J, et al. A prefrontal cortex-brainstem neuronal

- projection that controls response to behavioural challenge[J]. *Nature*, 2012, 492 (7429) : 428-432.
- [20] Blair R J, Cipolotti L. Impaired social response reversal. A case of 'acquired sociopathy'[J]. *Brain*, 2000, 123: 1122-41.
- [21] Mah L, Arnold M C, Grafman J. Impairment of social perception associated with lesions of the prefrontal cortex[J]. *Am J Psychiatry*, 2004, 161 (7) : 1247-55.
- [22] Rudebeck P H, Buckley M J, Walton M E, et al. A role for the macaque anterior cingulate gyrus in social valuation[J]. *Science*, 2006, 313 (5791) : 1310-2.
- [23] Rudebeck P H, Walton M E, Millette B H, et al. Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26 (8) : 2315-26.
- [24] Fan Z, Zhu H, Zhou T, et al. Using the tube test to measure social hierarchy in mice[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14 (3) : 819-831.
- [25] Wang F, Zhu J, Zhu H, et al. Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex[J]. *Science*, 2011, 334 (6056) : 693-7.
- [26] Lindzey G, Winston H, Manosevitz M. Social dominance in inbred mouse strains[J]. *Nature*, 1961, 191: 474-6.
- [27] Zhu H, Hu H. Brain's neural switch for social dominance in animals[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61 (1) : 113-114.
- [28] Zhou T, Zhu H, Fan Z, et al. History of winning remodels thalamo-PFC circuit to reinforce social dominance[J]. *Science*, 2017, 357 (6347) : 162-168.
- [29] Nelson A C, Kapoor V, Vaughn E, et al. Molecular and Circuit Architecture of Social Hierarchy[J], 2019: 838664.
- [30] Franklin T B, Silva B A, Perova Z, et al. Prefrontal cortical control of a brainstem social behavior circuit[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20 (2) : 260-270.
- [31] Kamigaki T, Dan Y. Delay activity of specific prefrontal interneuron subtypes modulates memory-guided behavior[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20 (6) : 854-863.
- [32] Kamigaki T. Prefrontal circuit organization for executive control[J]. *Neurosci Res*, 2019, 140: 23-36.
- [33] Kvitsiani D, Ranade S, Hangya B, et al. Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex[J]. *Nature*, 2013, 498 (7454) : 363-6.
- [34] Pi H J, Hangya B, Kvitsiani D, et al. Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control[J]. *Nature*, 2013, 503 (7477) : 521-4.
- [35] Kepecs A, Fishell G. Interneuron cell types are fit to function[J]. *Nature*, 2014, 505 (7483) : 318-26.
- [36] Rudy B, Fishell G, Lee S, et al. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons[J]. *Dev Neurobiol*, 2011, 71 (1) : 45-61.
- [37] Fu Y, Tucciarone J M, Espinosa J S, et al. A cortical circuit for gain control by behavioral state[J]. *Cell*, 2014, 156 (6) : 1139-1152.
- [38] Fu Y, Kaneko M, Tang Y, et al. A cortical disinhibitory circuit for enhancing adult plasticity[J]. *Elife*, 2015, 4: e05558.
- [39] Hattori R, Kuchibhotla K V, Froemke R C, et al. Functions and dysfunctions of neocortical inhibitory neuron subtypes[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20 (9) : 1199-1208.
- [40] Kerlin A M, Andermann M L, Berezovskii V K, et al. Broadly tuned response properties of diverse inhibitory neuron subtypes in mouse visual cortex[J]. *Neuron*, 2010, 67 (5) : 858-71.

- [41] Alitto H J, Dan Y. Cell-type-specific modulation of neocortical activity by basal forebrain input[J]. *Front Syst Neurosci*, 2012, 6: 79.
- [42] Zhang S, Xu M, Kamigaki T, et al. Selective attention. Long-range and local circuits for top-down modulation of visual cortex processing[J]. *Science*, 2014, 345 (6197) : 660-5.
- [43] Huang Z J. Toward a genetic dissection of cortical circuits in the mouse[J]. *Neuron*, 2014, 83 (6) : 1284-302.
- [44] Fishell G, Kepecs A. Interneuron Types as Attractors and Controllers[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2019.
- [45] Bicks L K, Yamamuro K, Flanigan M E, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons require juvenile social experience to establish adult social behavior[J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 1003.
- [46] Cao W, Lin S, Xia Q Q, et al. Gamma Oscillation Dysfunction in mPFC Leads to Social Deficits in Neuroligin 3 R451C Knockin Mice[J]. *Neuron*, 2018, 97 (6) : 1253-1260 e7.
- [47] Yizhar O, Fenno L E, Prigge M, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction[J]. *Nature*, 2011, 477 (7363) : 171-178.
- [48] Xu H, Liu L, Tian Y, et al. A Disinhibitory Microcircuit Mediates Conditioned Social Fear in the Prefrontal Cortex[J]. *Neuron*, 2019, 102 (3) : 668-682 e5.
- [49] Kingsbury L, Huang S, Raam T, et al. Cortical Representations of Conspecific Sex Shape Social Behavior[J]. *Neuron*, 2020.
- [50] Scheggia D, Manago F, Maltese F, et al. Somatostatin interneurons in the prefrontal cortex control affective state discrimination in mice[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23 (1) : 47-60.
- [51] Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, et al. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling[J]. *Plos Biology*, 2005, 3 (5) : e159.
- [52] Taniguchi H, He M, Wu P, et al. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex[J]. *Neuron*, 2011, 71 (6) : 995-1013.
- [53] Madisen L, Mao T, Koch H, et al. A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing[J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15 (5) : 793-802.
- [54] Friard O, Gamba M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, 7 (11) : 1325-1330.
- [55] Yizhar O, Fenno L E, Prigge M, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction[J]. *Nature*, 2011, 477 (7363) : 171-8.
- [56] Li Y, Zhong W, Wang D, et al. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals[J]. *Nature Communications*, 2016, 7 (1) .
- [57] Hua R, Wang X, Chen X, et al. Calretinin Neurons in the Midline Thalamus Modulate Starvation-Induced Arousal[J]. *Curr Biol*, 2018, 28 (24) : 3948-3959 e4.
- [58] Tseng W T, Yen C T, Tsai M L. A bundled microwire array for long-term chronic single-unit recording in deep brain regions of behaving rats[J]. *J Neurosci Methods*, 2011, 201 (2) : 368-76.
- [59] Kim H, Ährlund-Richter S, Wang X, et al. Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention[J]. *Cell*, 2016, 164 (1-2) : 208-218.
- [60] Varga C, Golshani P, Soltesz I. Frequency-invariant temporal ordering of interneuronal discharges during hippocampal oscillations in awake mice[J]. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2012, 109 (40) : E2726-34.
- [61] Zong W, Wu R, Chen S, et al. Miniature two-photon microscopy for enlarged field-of-view, multi-plane and long-term brain imaging[J]. *Nature Methods*, 2021, 18 (1) : 46-49.

- [62] Zong W, Wu R, Li M, et al. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice[J]. *Nature Methods*, 2017, 14 (7) : 713-719.
- [63] Pnevmatikakis E A, Giovannucci A. NoRMCorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data[J]. *J Neurosci Methods*, 2017, 291: 83-94.
- [64] Soltanian-Zadeh S, Sahingur K, Blau S, et al. Fast and robust active neuron segmentation in two-photon calcium imaging using spatiotemporal deep learning[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116 (17) : 8554-8563.
- [65] Pinto L, Dan Y. Cell-Type-Specific Activity in Prefrontal Cortex during Goal-Directed Behavior[J]. *Neuron*, 2015, 87 (2) : 437-450.
- [66] Chen T W, Wardill T J, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity[J]. *Nature*, 2013, 499 (7458) : 295-300.
- [67] Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8 (9) : 1263-8.
- [68] Lee A T, Cunniff M M, See J Z, et al. VIP Interneurons Contribute to Avoidance Behavior by Regulating Information Flow across Hippocampal-Prefrontal Networks[J]. *Neuron*, 2019.
- [69] Courtin J, Chaudun F, Rozeske R R, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression[J]. *Nature*, 2014, 505 (7481) : 92-6.
- [70] Armbruster B N, Li X, Pausch M H, et al. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand[J]. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2007, 104 (12) : 5163-8.
- [71] Flusberg B A, Cocker E D, Piyawattanametha W, et al. Fiber-optic fluorescence imaging[J]. *Nat Methods*, 2005, 2 (12) : 941-50.
- [72] Gunaydin L A, Deisseroth K. Dopaminergic Dynamics Contributing to Social Behavior[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2014, 79: 221-7.
- [73] Chuong A S, Miri M L, Busskamp V, et al. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17 (8) : 1123-9.
- [74] Chen G, Zhang Y, Li X, et al. Distinct Inhibitory Circuits Orchestrate Cortical beta and gamma Band Oscillations[J]. *Neuron*, 2017, 96 (6) : 1403-1418 e6.
- [75] Stark E, Eichler R, Roux L, et al. Inhibition-induced theta resonance in cortical circuits[J]. *Neuron*, 2013, 80 (5) : 1263-76.
- [76] Yu J, Hu H, Agmon A, et al. Recruitment of GABAergic Interneurons in the Barrel Cortex during Active Tactile Behavior[J]. *Neuron*, 2019, 104 (2) : 412-427 e4.
- [77] Douglas R J, Koch C, Mahowald M, et al. Recurrent excitation in neocortical circuits[J]. *Science*, 1995, 269 (5226) : 981-5.
- [78] Ozeki H, Finn I M, Schaffer E S, et al. Inhibitory stabilization of the cortical network underlies visual surround suppression[J]. *Neuron*, 2009, 62 (4) : 578-92.
- [79] Couey J J, Witoelar A, Zhang S J, et al. Recurrent inhibitory circuitry as a mechanism for grid formation[J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16 (3) : 318-324.
- [80] Bacci A, Huguenard J R. Enhancement of spike-timing precision by autaptic transmission in neocortical inhibitory interneurons[J]. *Neuron*, 2006, 49 (1) : 119-30.
- [81] Pfeffer C K, Xue M, He M, et al. Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections

- between molecularly distinct interneurons[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16 (8) : 1068-76.
- [82] D'amato F R. Courtship ultrasonic vocalizations and social status in mice[J]. *Animal Behaviour*, 1991, 41 (5) : 875-885.
- [83] Mcelligott A G, O'Neill K P, Hayden T J. Cumulative long-term investment in vocalization and mating success of fallow bucks, *Dama dama*[J]. *Anim Behav*, 1999, 57 (5) : 1159-1167.
- [84] Nyby J, Dizinno G A, Whitney G. Social status and ultrasonic vocalizations of male mice[J]. *Behav Biol*, 1976, 18 (2) : 285-9.
- [85] Pasch B, George A S, Hamlin H J, et al. Androgens modulate song effort and aggression in Neotropical singing mice[J]. *Horm Behav*, 2011, 59 (1) : 90-7.
- [86] Mesik L, Ma W P, Li L Y, et al. Functional response properties of VIP-expressing inhibitory neurons in mouse visual and auditory cortex[J]. *Front Neural Circuits*, 2015, 9: 22.
- [87] Krabbe S, Paradiso E, D'aquin S, et al. Adaptive disinhibitory gating by VIP interneurons permits associative learning[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22 (11) : 1834-1843.
- [88] Letzkus J J, Wolff S B, Meyer E M, et al. A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex[J]. *Nature*, 2011, 480 (7377) : 331-5.
- [89] Garcia-Junco-Clemente P, Ikrar T, Tring E, et al. An inhibitory pull-push circuit in frontal cortex[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20 (3) : 389-392.
- [90] Turi G F, Li W K, Chavlis S, et al. Vasoactive Intestinal Polypeptide-Expressing Interneurons in the Hippocampus Support Goal-Oriented Spatial Learning[J]. *Neuron*, 2019, 101 (6) : 1150-1165 e8.
- [91] Khan A G, Poort J, Chadwick A, et al. Distinct learning-induced changes in stimulus selectivity and interactions of GABAergic interneuron classes in visual cortex[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21 (6) : 851-859.
- [92] Staiger J F, Zilles K, Freund T F. Innervation of VIP-immunoreactive neurons by the ventroposteromedial thalamic nucleus in the barrel cortex of the rat[J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 1996, 367 (2) : 194-204.
- [93] Lee S, Kruglikov I, Huang Z J, et al. A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16 (11) : 1662-70.
- [94] Wall N R, De La Parra M, Sorokin J M, et al. Brain-Wide Maps of Synaptic Input to Cortical Interneurons[J]. *J Neurosci*, 2016, 36 (14) : 4000-9.
- [95] Ahrlund-Richter S, Xuan Y, Van Lunteren J A, et al. A whole-brain atlas of monosynaptic input targeting four different cell types in the medial prefrontal cortex of the mouse[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22 (4) : 657-668.
- [96] Sun Q, Li X, Ren M, et al. A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex[J]. *Nature Neuroscience*, 2019, 22 (8) : 1357-1370.
- [97] Askew C E, Lopez A J, Wood M A, et al. Nicotine excites VIP interneurons to disinhibit pyramidal neurons in auditory cortex[J]. *Synapse*, 2019, 73 (9) : e22116.
- [98] Pronneke A, Witte M, Mock M, et al. Neuromodulation Leads to a Burst-Tonic Switch in a Subset of VIP Neurons in Mouse Primary Somatosensory (Barrel) Cortex[J]. *Cerebral Cortex*, 2020, 30 (2) : 488-504.
- [99] Keller A J, Dipoppa M, Roth M M, et al. A Disinhibitory Circuit for Contextual Modulation in Primary Visual Cortex[J]. *Neuron*, 2020, 108 (6) : 1181-1193 e8.
- [100] Lagler M, Ozdemir A T, Lagoun S, et al. Divisions of Identified Parvalbumin-Expressing Basket

- Cells during Working Memory-Guided Decision Making[J]. *Neuron*, 2016, 91 (6) : 1390-1401.
- [101] Donato F, Rompani S B, Caroni P. Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning[J]. *Nature*, 2013, 504 (7479) : 272-6.
- [102] Hioki H, Okamoto S, Konno M, et al. Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron[J]. *J Neurosci*, 2013, 33 (2) : 544-55.
- [103] Hu H, Gan J, Jonas P. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin (+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function[J]. *Science*, 2014, 345 (6196) : 1255-1263.
- [104] Packer A M, Yuste R. Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition?[J]. *J Neurosci*, 2011, 31 (37) : 13260-71.
- [105] Anderson J S, Carandini M, Ferster D. Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex[J]. *J Neurophysiol*, 2000, 84 (2) : 909-26.
- [106] Okun M, Lampl I. Instantaneous correlation of excitation and inhibition during ongoing and sensory-evoked activities[J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11 (5) : 535-7.
- [107] Shu Y, Hasenstaub A, McCormick D A. Turning on and off recurrent balanced cortical activity[J]. *Nature*, 2003, 423 (6937) : 288-93.
- [108] Wehr M, Zador A M. Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex[J]. *Nature*, 2003, 426 (6965) : 442-6.
- [109] Xue M, Atallah B V, Scanziani M. Equalizing excitation-inhibition ratios across visual cortical neurons[J]. *Nature*, 2014, 511 (7511) : 596-600.
- [110] Yamamuro K, Bicks L K, Leventhal M B, et al. A prefrontal-paraventricular thalamus circuit requires juvenile social experience to regulate adult sociability in mice[J]. *Nat Neurosci*, 2020.
- [111] Xu H, Jeong H Y, Tremblay R, et al. Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4[J]. *Neuron*, 2013, 77 (1) : 155-67.
- [112] Miao Q, Yao L, Rasch M J, et al. Selective Maturation of Temporal Dynamics of Intracortical Excitatory Transmission at the Critical Period Onset[J]. *Cell Rep*, 2016, 16 (6) : 1677-1689.
- [113] Cummings K A, Clem R L. Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23 (1) : 61-74.
- [114] Li Y, Mathis A, Grewe B F, et al. Neuronal Representation of Social Information in the Medial Amygdala of Awake Behaving Mice[J]. *Cell*, 2017, 171 (5) : 1176-1190 e17.
- [115] Remedios R, Kennedy A, Zelikowsky M, et al. Social behaviour shapes hypothalamic neural ensemble representations of conspecific sex[J]. *Nature*, 2017, 550 (7676) : 388-392.
- [116] Hoover W B, Vertes R P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat[J]. *Brain Structure and Function*, 2007, 212 (2) : 149-179.
- [117] Fenno L E, Ramakrishnan C, Kim Y S, et al. Comprehensive Dual- and Triple-Feature Intersectional Single-Vector Delivery of Diverse Functional Payloads to Cells of Behaving Mammals[J]. *Neuron*, 2020, 107 (5) : 836-853 e11.

### 5 附图

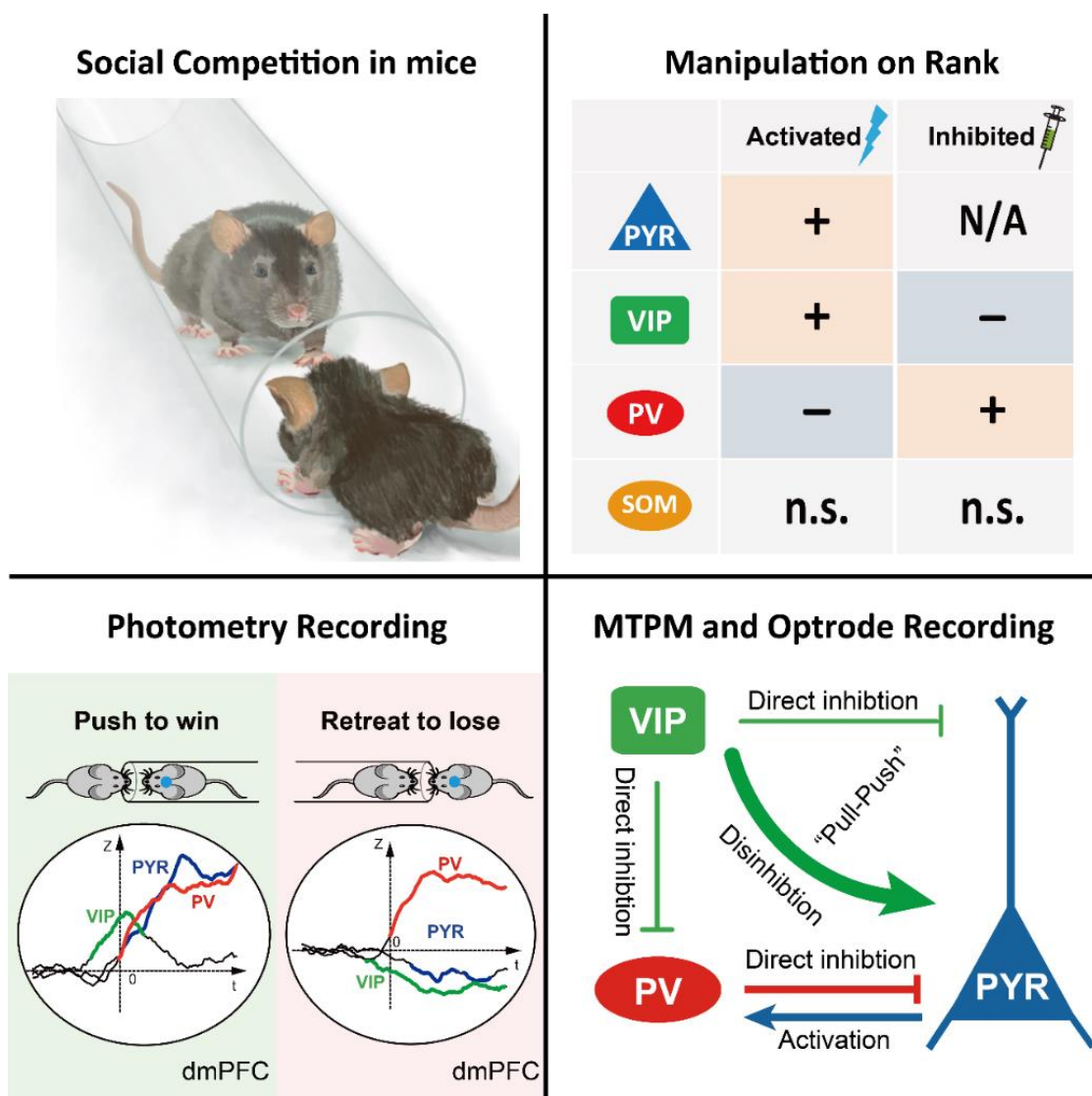


图 32. 图形摘要和研究亮点

- 激活mPFC中的VIP或抑制mPFC中的PV神经元使小鼠在钻管测试中获胜
- 抑制mPFC中的VIP或激活mPFC中的PV神经元使小鼠在钻管测试中失败
- 推挤行为与VIP神经元引发的连续钙活动有关，VIP先升高紧接着PYR和PV
- 微型双光子钙成像和光电极电生理记录揭示了mPFC中VIP-PV-PYR这条去抑制环路在调控社会竞争行为中的作用机制。



图 33. 基于研究故事的艺术创作（张超逸设计，王诗琦绘制）

社会竞争决定了动物在群体中的社会地位，而社会地位则影响着动物的健康和生活质量。这幅画描绘了两只老虎在争夺领地，上方的老虎即将跨过石桥以扩大自己领地，表现出了积极的竞争态势，而下方的老虎面对竞争时，开始露怯。这模拟了我课题研究里小鼠钻管测试中的社会竞争行为。此外，上方的树，红花绿叶，生机勃勃，隐喻着mPFC中VIP神经元激活时更加积极的大脑状态；下方的树，枯枝败叶，死气沉沉隐喻着mPFC中PV神经元激活后更加消极的大脑状态。且今年（2022）是虎年。



## 综述

### 内侧前额叶皮层微环路的组成及功能

#### 摘要

内侧前额叶皮层（Medial prefrontal cortex, mPFC）通过协调处理来自多个脑区的上游信息输入，参与决策、动机、情感等多种高级认知功能。mPFC结构和功能的特异性提示其内部微环路系统可能与初级感觉皮层等其他皮层不同。目前关于初级感觉皮层的微环路结构及功能已经研究的较为深入，但是关于mPFC内部微环路的研究则刚起步。近些年，随着神经操纵及记录技术的发展，在mPFC微环路及功能方面的研究取得了一些进展。本文主要从以下三个方面进行综述：1、mPFC的结构特点及内部中间神经元的分布差异；2、不同中间神经元在微环路中的存在意义及其具体的工作机制；3、mPFC三大主要中间神经元在行为中的功能及它们与精神疾病之间的联系。本文通过系统性的回顾和总结近些年关于mPFC中间神经元的研究进展，旨在为探究mPFC内部微环路结构及功能描绘一个更为清晰的轮廓。

## 前言

内侧前额叶皮层（Medial prefrontal cortex, mPFC）是大脑中的控制中心，扮演着类似计算机“中央处理器”一样的角色。它参与了包括行为决策<sup>[1]</sup>，工作记忆<sup>[2]</sup>，社会认知<sup>[3]</sup>，恐惧<sup>[4]</sup>等多种高级功能。它和背侧丘脑（Medialdorsal thalamus, MD），腹侧海马（Ventral hippocampus, vHPC），还有杏仁基底外侧核（Basal lateral amygdala, BLA）等脑区都有着丰富的互相投射关系（图1）<sup>[5]</sup>。此外，它还接受大量来自神经调质系统的输入，包括腹侧被盖区（Ventral tegmental area, VTA）的多巴胺，蓝斑核（Locus Coeruleus, LC）的去甲肾上腺素，中缝背核（Dorsal raphe nuclei, DRN）的血清素，还有基底前脑（Basal forebrain, BF）的乙酰胆碱等。mPFC作为皮层多种信息输入的整合中心，接收上游多个脑区的兴奋性长程投射，再对它们进行加工处理，然后再投向不同的皮层下组织，向下传达行为输出指令。

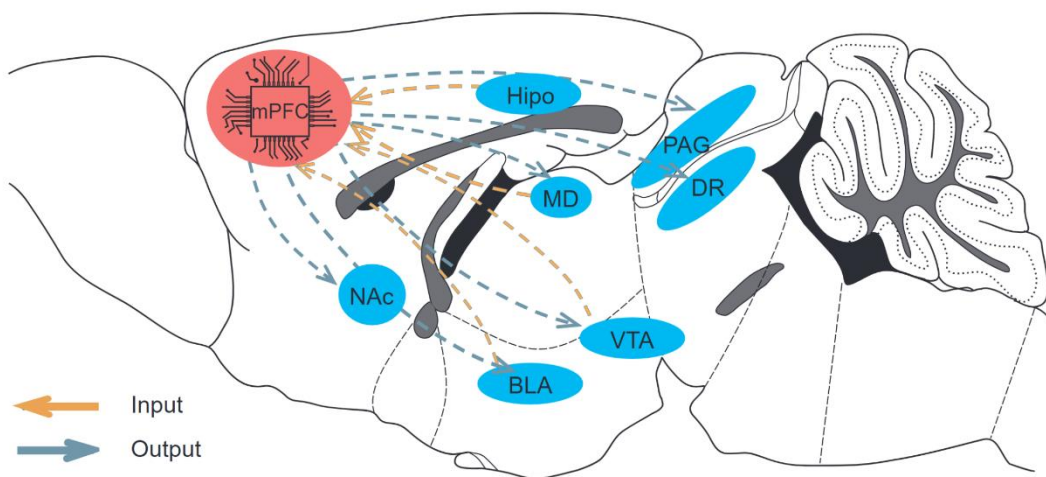


图1. 小鼠脑中mPFC与其他脑区的环路连接

mPFC能够完成对纷繁复杂信息的加工处理，依赖于它独特的结构<sup>[6]</sup>。大量研究提示，小鼠的mPFC与其他初级感觉皮层就存在着多种结构上的不同。首先，小鼠的mPFC不存在其他初级感觉皮层中主要负责接受丘脑投射的Layer 4<sup>[7]</sup>。mPFC

接受的输入从Layer 1 - Layer 6都有, 其中包括行动, 认知, 奖励, 情感在内的多种高级功能信号输入。另外, 其他初级感觉皮层主要由Layer 5/6往皮层下组织投射负责输出, 而mPFC的投射神经元则在Layer 2 - Layer 6都有分布, 而且经常是与其他脑区互投<sup>[7,8]</sup>。这些不同的输入和输出通过内部复杂的微环路系统彼此连接。其中微环路是指脑区内局部神经网络中的不同类群神经元相互调谐, 通过特定的连接方式, 帮助大脑完成复杂的神经信号处理和转导过程。mPFC功能的特异性以及投射网络的复杂性决定了mPFC内部微环路中的中间神经元组成及功能也有可能区别于其他初级感觉皮层。

关于其他初级感觉皮层微环路系统的功能及组成的研究已经比较成熟, 比如视觉皮层, 躯体感觉皮层等。而关于前额叶的功能研究, 以及其内部微环路的结构组成, 仍充满谜团。本文主要针对近期mPFC不同类型中间神经元的特性以及功能研究进行综述总结, 希望能将纷繁复杂的mPFC微环路, 勾勒出一个较为清晰的缩影, 更好的去理解mPFC的组成及功能。因为小鼠遗传工具较为成熟, 近些年关于小鼠mPFC中不同类群神经元功能的探索较多, 故此文的探讨主要局限于小鼠模型, 灵长类的大脑皮层会比小鼠的远远更加复杂, 不在本文比较范围内<sup>[9]</sup>。

## 内侧前额叶皮层的结构及细胞组成

对内侧前额叶皮层脑区的划分, 不同文献有不同的标准, 一般认为小鼠mPFC包括前扣带回皮质 (Anterior cingulate cortex, Acc)、前边缘皮质 (Prelimbic cortex, PL) 和下边缘皮质 (Infralimbic cortex, IL)。有研究报道, 不同的mPFC亚区, 可能会存在功能的不同<sup>[10]</sup>。其中关于PL和Acc这两个区域的研究较多, 所以本文主要总结的是关于PL和Acc的研究, 也有可能涵盖部分IL的结果。

关于mPFC的细胞组成, 来自欧洲蓝脑计划 (Blue Brain Project) 的一项研究通过原位杂交发现小鼠mPFC中大概有82%的兴奋性神经元、17%的抑制性神经元、及1%的神经调质神经元<sup>[11]</sup>。尽管抑制性神经元只占15%-20%左右, 但它们的作用却不能忽视。它们参与维持的兴奋-抑制平衡是皮层执行正常功能的基础。由于这

些抑制性神经元的投射比较局部，所以他们又被称为中间神经元。在皮层中有超过20种形态，分子表达，以及电生理特性各异的GABA能中间神经元<sup>[12]</sup>。而这些GABA能中间神经元根据他们分子表达特异性主要可以分为互相不重叠的三大类群(图2)：小清蛋白阳性(Parvalbumin, PV)，生长激素抑制素阳性(Somatostatin, SST)和5-羟色胺3a受体阳性(5HT3aR)神经元<sup>[13]</sup>。其中5HT3aR阳性神经元又可以细分为血管活性肠肽阳性(Vasoactive intestinal polypeptide, VIP)和非VIP阳性(包括NDNF阳性(Neuron derived neurotrophic factor, NDNF)，Layer 1(L1)神经元等)。所有这些神经元也都存在mPFC里，并且呈现出与其他皮层类似分布特性。

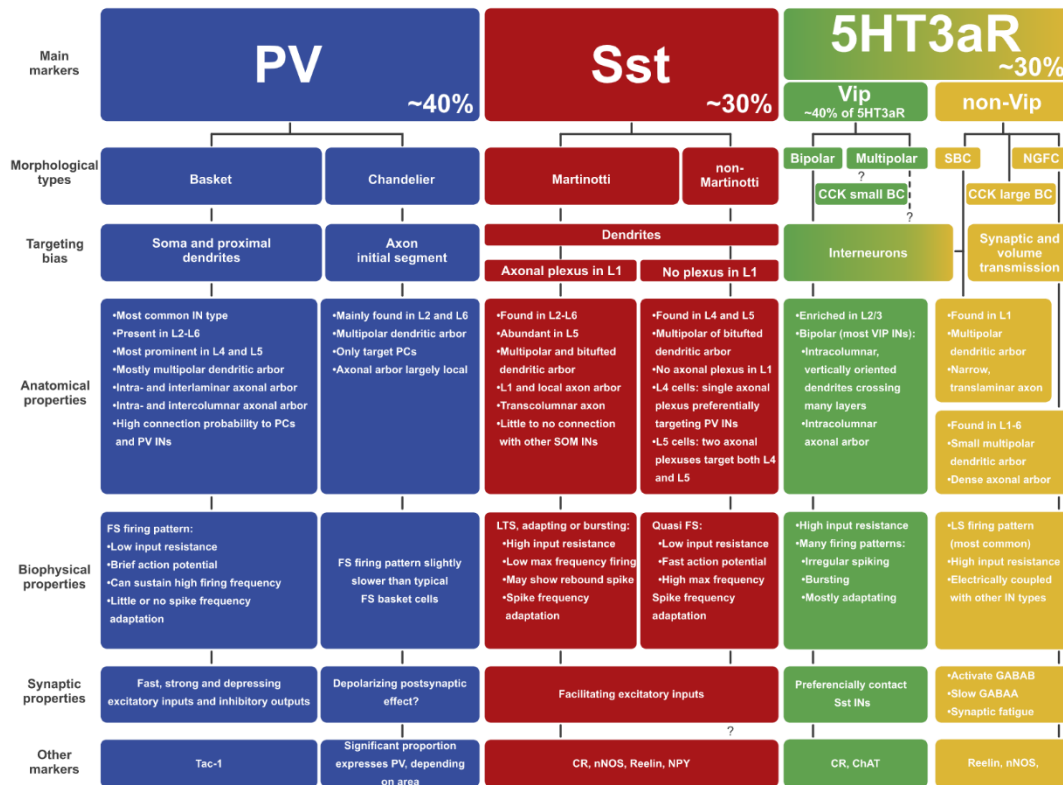


图2. 皮层中间神经元的分群，及其各自的特性<sup>[13]</sup>

这些不同的中间神经元在皮层的分布有一定的特点，比如5HT3aR阳性神经元主要集中在浅层，其中VIP神经元主要分布在Layer 2/3层，而NDNF神经元和L1神经元主要在Layer 1层。其中PV神经元在Layer 2/3和Layer 5/6都有，但更多的集中

在Layer 5/6, SST神经元则比较平均的分布在Layer 2-Layer 6。而且mPFC内部的中间神经元特性会与其他皮层不同。比如说相较于运动皮层M1, mPFC会有更多乙酰胆碱释放, 而主要原因是因为在mPFC的Layer 1存在一群特殊的胆碱乙酰转移酶(Choline acetyltransferase, ChAT)阳性神经元<sup>[14]</sup>。另外有研究发现, mPFC的PV神经元和SST神经元的比例也明显和其他皮层不同。mPFC相较于其他皮层有更多的SST神经元和CCK神经元, 而PV神经元则相对较少<sup>[15,16]</sup>。

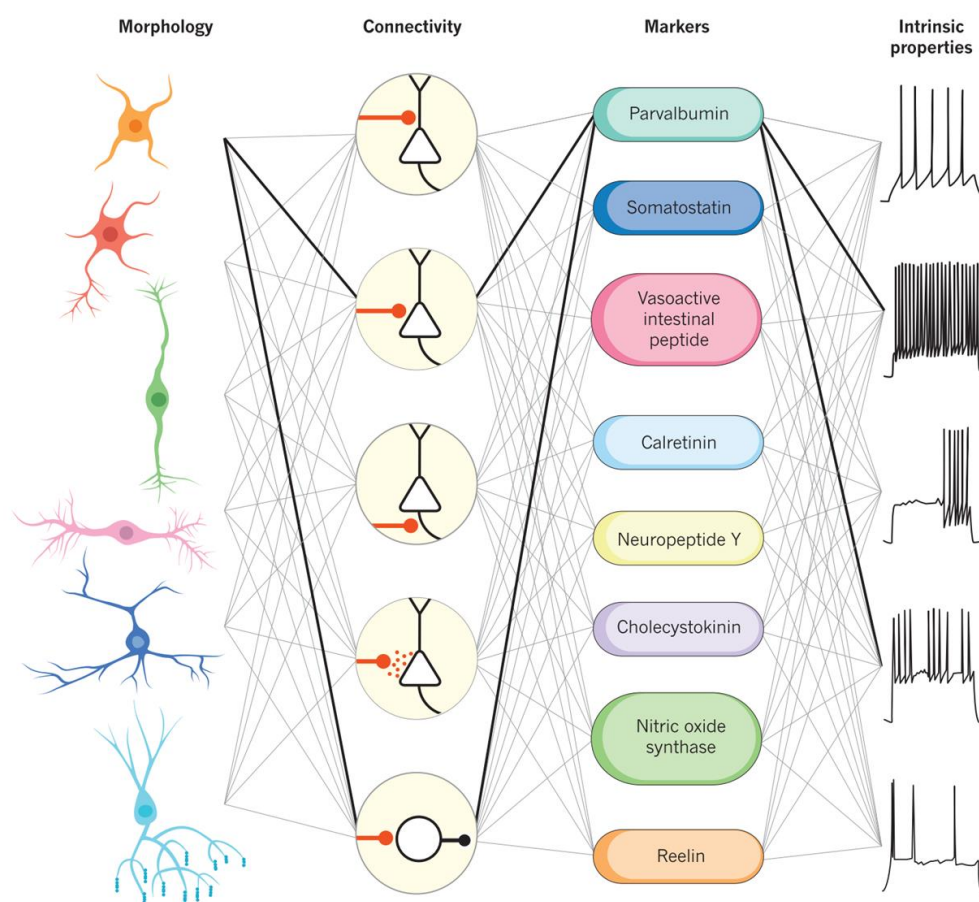


图3. 不同类型中间神经元在形态, 连接, 分子表达及电生理特性上的差异<sup>[17]</sup>

### 中间神经元在微环路中存在的意义

一个复杂网络要维持动态平衡, 需要足够多的元素支撑它的变化。在大脑的神经网络里, 抑制性中间神经元的作用不仅仅是维持皮层网络的兴奋-抑制平衡, 其中的不同亚群因各自不同的形态, 分子表达, 以及电生理的特性(图3), 增加

主神经元（兴奋性）网络内动态变化的丰富性，从而形成更加精细的计算网络，使其适应皮层网络的信息处理及传递<sup>[18,19]</sup>。关于中间神经元在皮层信息处理中的调控机制，目前比较流行的理论是流量控制假说：信息通过兴奋性锥体神经元（Pyramidal, PYR）投射到皮层局部网络进行处理，在皮层内特定环路里的中间神经元，会在某些特定时刻激活，从而控制信息的处理和传输<sup>[17]</sup>。具体如何实现呢？一般来讲，中间神经元的计算模式可以分为运算和时控。

**运算：**长期以来，不同的中间神经元的基本功能一直被认为是执行算术运算，例如减法或除法<sup>[20,21]</sup>。抑制可以通过改变输入-输出的关系，通过影响兴奋性输入的程度为兴奋性锥体神经元最终的发放提供一个增益控制<sup>[20]</sup>。而且，这两个基本运算规则是皮层归一化计算的基本组成模块<sup>[22,23]</sup>，产生了包括分流<sup>[24]</sup>、同步<sup>[25]</sup>、平衡<sup>[26]</sup>抑制等多种增益调节方式，影响环路的最终输出。这些环路计算规则广泛存在于皮层组织中<sup>[22,27,28]</sup>。

**时控：**另外一方面，中间神经元在控制神经活动时间上也发挥着重要作用。复杂网络功能的实现要求神经元不能总是同时激发。这可以通过兴奋与抑制的动态平衡来实现，从而使网络活动在时间上变得更加多样化以及产生更快速的响应<sup>[28]</sup>。事实上，也有很多研究组在皮层记录到了兴奋和抑制之间的精妙平衡，结果与上述模型一致<sup>[29-32]</sup>。抑制一般会紧随着兴奋产生，从而提高兴奋作用的时间精确度<sup>[29,33]</sup>，同时也避免网络同步，造成过度兴奋<sup>[34]</sup>。

## 中间神经元在微环路中的组织方式

上文介绍了中间神经元对整个神经网络实现精细调控的计算机制，而这种精细调控的实现需要中间神经元形成特定的环路连接。中间神经元在微环路中最主要的三种功能连接方式分别是（图4）：前馈抑制（Feedforward inhibition）、反馈抑制（feedback inhibition）和去抑制（disinhibition）。以上的三种连接方式可以同时存在于某些中间神经元中，但受限于连接可能性、突触强度以及网络状态等不同条件的影响，某些神经元可能更倾向于形成某种特定的功能连接。

## 前馈抑制

一个兴奋性的输入，在激活局部的兴奋性神经元时，同时激活了其周围的抑制性神经元，这个抑制性输出又作用到同一个接受兴奋性输入的PYR神经元上。这个过程，被称为前馈抑制。简单来讲，前馈抑制是通过跟踪外源的兴奋性输入，调节网络内部的信息整合，它独立于网络内部的活动状态[35]。很多皮层在接受兴奋性输入时都能观察到一个短暂的双突触的抑制[36]。前馈抑制现象在大脑神经网络中广泛存在。其中大部分研究认为，篮形（Basket）PV神经元是介导前馈抑制的主要中间神经元。PV神经元主要作用在PYR神经元的胞体，结合它高频发放的电生理特性，能提供强效而精准的控制。特别是丘脑到皮层的投射研究中，PV神经元介导的前馈抑制在多个皮层都有被报道，其中MD到mPFC的投射中，就有大量的PV神经元参与介导其中的前馈抑制[37]。

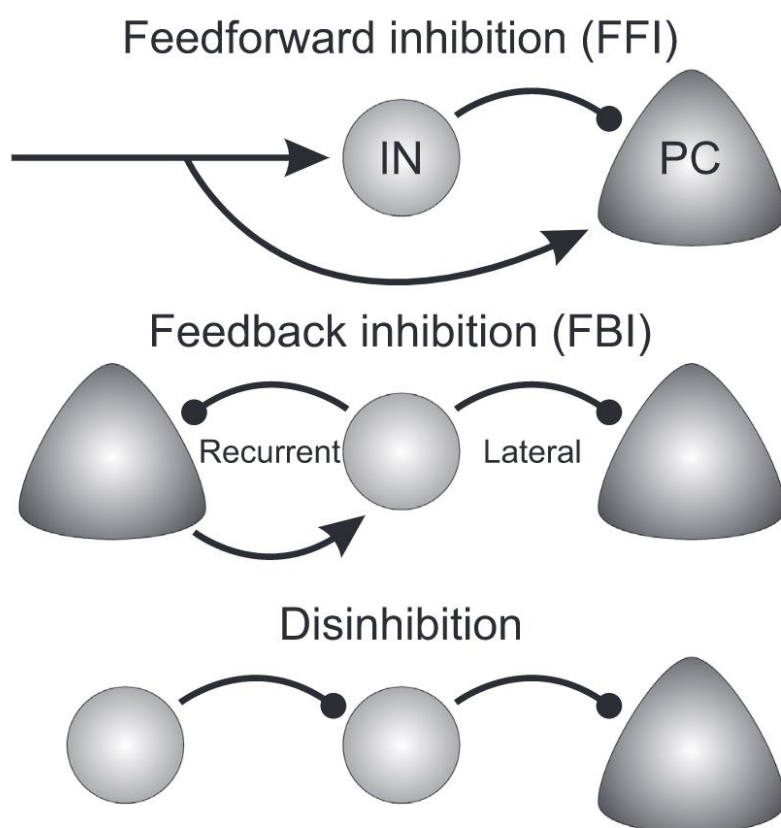


图4.中间神经元参与微环路调节的三种作用方式<sup>[13]</sup>

## 反馈抑制

反馈抑制可以分为两类：回归抑制（**Recurrent inhibition**）和侧向抑制（**Lateral inhibition**）。与前馈抑制不同的是，反馈抑制的兴奋性输入主要来自本地网络的PYR神经元。在回归抑制中，本地的兴奋性PYR神经元激活临近的抑制性中间神经元，产生的抑制作用又反过去影响产生兴奋的PYR神经元。回归抑制的主要作用是减少或防止PYR神经元的过度放电。另一方面，中间神经元在本地网络存在广泛的突触连接<sup>[38,39]</sup>。除了与接受兴奋性输入的PYR有连接，它还会与其他的PYR神经元产生突触联系。有研究显示，中间神经元的轴突会伸展到胞体所在的区域之外，超出功能柱结构或者跨Layer发挥抑制作用都比较常见<sup>[40,41]</sup>。本地的PYR神经元通过中间神经元抑制了周围其他的PYR神经元，这个过程就被称作侧向抑制。这两种反馈抑制帮助皮层实现多种重要的信息处理功能。包括赢者通吃（**Winner take all**，即抑制周围信号，放大主要信号）<sup>[42,43]</sup>，振荡耦合<sup>[44]</sup>，以及内嗅皮层网格场的形成<sup>[45]</sup>等。尽管多数类型的中间神经元都会参与到本地的反馈循环网络，但是根据他们与PYR神经元的连接特性不同，他们在反馈抑制中的贡献权重也有所不同。而目前研究主要还是集中在PV神经元和SST神经元。有研究报道，皮层中的PV神经元和SST神经元功能异常，会导致皮层网络过度同步化，有可能引发癫痫<sup>[46-48]</sup>。

## 去抑制

上个世纪80年代，就有人提出皮层的抑制性神经元不仅向PYR神经元提供直接的抑制作用，还会通过抑制其他抑制性神经元，产生去抑制的效果<sup>[49,50]</sup>。事实上，在皮层信息处理过程中，去抑制的重要性并不比抑制作用弱<sup>[51]</sup>。早期关于去抑制现象的研究，主要来自解剖学上的发现，抑制性神经元之间存在直接的联系。最近，由于电生理记录技术，成像技术和分子遗传学技术等的发展，不仅确定了去抑制连接的存在，还通过操纵手段找到了特定的环路连接<sup>[52]</sup>。来自行为动物的直接证据，更是帮助我们了解到去抑制环路在何种情境下发挥作用，让我们对其存在的意义有了更深入的理解<sup>[53]</sup>。去抑制能为微环路系统提供更精细的调谐，在特定时刻，通过减少皮层内部的抑制作用，从而放大PYR神经元的反应。关于具有



去抑制作用的中间神经元，报道最多的是VIP神经元，同时它也是最早被发现具有去抑制功能的中间神经元。大部分研究认为，在皮层中VIP神经元的主要作用对象是SST神经元和PV神经元<sup>[52,54]</sup>。根据体外脑片记录结果显示，在mPFC中，VIP神经元与SST神经元产生的连接会比PV更多一些<sup>[55,56]</sup>。另外一方面，SST神经元，特别是初级感觉皮层Layer 4的SST神经元，也被较多的报道能够形成去抑制环路参与皮层信息处理和转导<sup>[57,58]</sup>。此外，L1中间神经元<sup>[59,60]</sup>和NDNF神经元<sup>[61]</sup>，最近也被发现会参与去抑制调节。

### mPFC微环路中不同中间神经元亚群的具体功能

神经科学的核心问题之一是探究特定的神经元类型是如何塑造大脑功能，并直接影响动物行为的。近年来随着特定细胞亚群转基因小鼠制备技术<sup>[62,63]</sup>、神经操纵技术<sup>[64,65]</sup>以及神经记录手段<sup>[66-68]</sup>的迅猛发展，我们可以针对特定类群的神经元进行深入研究，了解他们所参与组成的神经环路网络以及他们在网络中所扮演的角色（图5）。mPFC作为皮层中功能最复杂的脑区，关于它的研究一直是近些年的领域热点，其中就有较多涉及到其内部中间神经元的工作发表。mPFC内部的不同中间神经元，因其自身特性的不同，分别参与到了不同行为的调控当中。

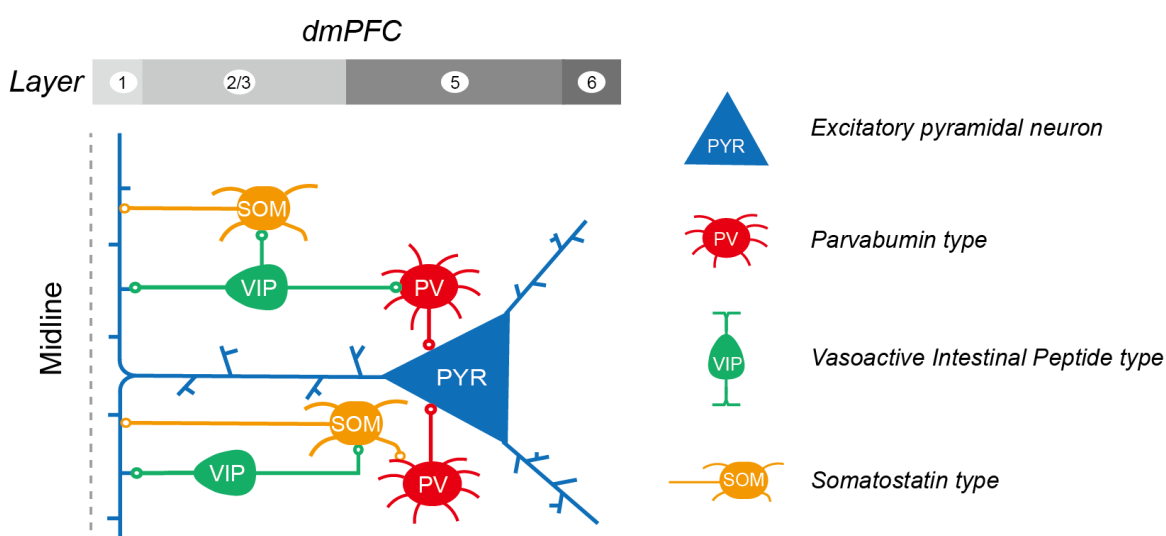


图5. mPFC微环路的主要神经元组成

## PV神经元的特性及功能

PV神经元是皮层中最主要的GABA能中间神经元，约占40%。PV神经元有三大特征：高频快速放电、低输入电阻和低膜电位<sup>[69]</sup>。这种属性组合赋予了它快速发动作电位的能力，动作电位的波形也表现出窄波(Narrow spike)的特征<sup>[68,70]</sup>，这区别于皮层中的所有其他神经元。一项来自海马脑片记录的结果表明，PV神经元接受到94%的兴奋输入，6%的抑制性输入<sup>[71,72]</sup>。而在抑制性输入中，主要又是来自PV神经元内部的互相抑制，因为其内部之间存在大量的电突触(间隙连接)。此外它也存在一些来自于VIP和SST的抑制性输入。PV神经元的树突大多是针状，这可能有助于树突轴上的兴奋性突触产生快速的兴奋性突触后电位，使它能够快速激发<sup>[43]</sup>，所以PV神经元的主要功能是控制临近兴奋性锥体神经元的动作电位发放时间<sup>[29,33]</sup>。皮层中的PV神经元根据形态可以细分为两个亚型，分别是篮形(Basket) PV神经元和吊灯形(Chandelier) PV神经元。由于篮形PV神经元更容易识别，关于它的性质和功能研究相对深入。一项来自电生理记录的数据显示，单个PV神经元几乎会与附近所有的锥体神经元产生突触联系，使得篮形PV神经元可以强有力的控制周围PYR神经元的活动<sup>[39]</sup>。皮层中PV神经元的功能主要参与的是前馈抑制，特别是在丘脑与皮层的投射中有较多报道。丘脑的输入一般会同时作用在皮层的兴奋性神经元和抑制性神经元上。一项经典的研究显示，电刺激丘脑的纤维束，能在皮层的锥体神经元检测到一个直接的兴奋性反应，然后因为临近PV神经元的激活，该神经元又会很快的被超极化<sup>[73,74]</sup>。这种现象在mPFC也有观察到，通过限制兴奋性输入时间窗，这种机制能提高兴奋性神经元的反应时间保真度<sup>[37]</sup>。PV神经元的另一种特性是它的发放会随着兴奋性输入的增加而增加，这为兴奋性神经元的反应提供了增益控制<sup>[75]</sup>。将PYR神经元的反应能力从简单的“0”或“1”的放电模式转变为更广的工作范围，这一特征在处理复杂多模态信息的mPFC中可能是至关重要的。而关于mPFC中吊灯形PV神经元的研究目前相对较少，曾有报道发现吊灯形PV神经元主要作用在mPFC的Layer 2中一群投向杏仁核的锥体神经元，控制着它的输出<sup>[76]</sup>。

mPFC中的PV神经元被发现参与多种行为的调控,包括社会行为、工作记忆、决策和恐惧等。较多的研究指出,mPFC锥体神经元的过度兴奋会导致小鼠社交异常<sup>[77,78]</sup>,这同时也是自闭症的主要表型之一<sup>[79]</sup>。而通过激活mPFC中的PV神经元,能使小鼠恢复到正常的社交水平<sup>[77,78]</sup>。此外,有报道指出PV神经元在小鼠进行积极的社交靠近时会短暂的激活,而激活PV神经元,能促进小鼠进行社交,甚至能逆转因为青少年社交隔离造成的社交异常<sup>[80]</sup>。在另一项关于社交恐惧的研究中,则发现SST神经元活性过度增强,会造成PV神经元的活性降低,使得mPFC中的PYR神经元活动增强,从而造成社交恐惧,使小鼠社交行为减少<sup>[81]</sup>。也有研究表明,小鼠mPFC的PV神经元在小鼠表现出僵立的恐惧状态时发放减少。激活mPFC的PV神经元,能减少小鼠的僵立行为,而抑制这群PV神经元,能重置mPFC与BLA之间的Theta振荡,让小鼠表现出恐惧<sup>[4]</sup>。另一方面,有研究发现条件性敲除*TrkB*的小鼠在衡量社会等级的钻管测试中,会表现出更多的竞争性行为。其原因可能是其中的PV神经元功能异常,导致PYR神经元的活性过度增强<sup>[82]</sup>。与此类似的,在我们的小鼠社会竞争研究中,PV神经元的激活使小鼠表现出更多的后退行为,而抑制PV神经元,则让小鼠更加积极努力,等级升高<sup>[83]</sup>。此外,mPFC中的PV神经元在工作记忆方面也有较多报道。研究显示PV神经元会在处理复杂任务的行为决策期快速发放<sup>[84]</sup>。有报道指出在Go/No Go测试中,PV神经元主要在Go行为中发放增加<sup>[85]</sup>。在寻求奖励行为中,PV神经元在退出奖励区的时候发放显著增加,单细胞记录结果显示PV神经元内部的发放趋势比较一致<sup>[86]</sup>,而激活PV神经元也能消除奖励寻求行为<sup>[87]</sup>。但是在另一项关于大鼠多维延迟响应任务中,针对mPFC中PV神经元的记录则发现,PV神经元内部发放差异大。处于不同层的PV神经元在任务的不同阶段,会有不同的反应<sup>[88]</sup>。我们的研究中,我们发现尽管PV神经元的钙信号在积极推挤行为和消极后退行为中都增加,单细胞电生理记录结果则显示,PV神经元在积极推挤中的反应存在明显的异质性。而在消极后退行为中,mPFC中的PV神经元则出现较为一致的发放增加<sup>[83]</sup>。这提示mPFC的PV神经元,在不同行为情境下,内部功能会出现很大区分。另外一项研究比较了mPFC中的PV神经元在Go/No Go行为测试中各个阶段的钙反应,发现PV神经元在信号识别、行为启动、

以及结果反馈中都有较大的反应<sup>[89]</sup>。综上所述，PV神经元在维持mPFC的兴奋-抑制平衡和多种高级认知功能的正常执行中都扮演着非常重要的角色。

### SST神经元的特性及功能

SST神经元，有时也被称作SOM神经元，是皮层中第二多的中间神经元，占有GABA能神经元的30%左右<sup>[12]</sup>。虽然它也是PYR神经元抑制性输入的主要来源，但与PV神经元不同的是，SST神经元主要作用在锥体神经元的轴突<sup>[69,90,91]</sup>。它的电生理特性是接受很强的易化兴奋性输入，而伴随相对温和的抑制性输出<sup>[92]</sup>。这些特性使它对兴奋性突触后电位的整合可以呈现出线性的关系，只需单突触的高频释放就足以使它产生抑制功能<sup>[93]</sup>，这也使得长程投射对SST神经元的激活会被不断强化。它的这种电生理特性正好适配它的远端树突抑制功能<sup>[13]</sup>。此外，SST神经元能被毒蕈碱（Muscarinic）去极化。有研究报道，给予毒蕈碱受体激动剂能引起SST神经元长时程的发放<sup>[57,93]</sup>。另外值得一提的是，越来越多的证据表明SST神经元内部存在很高的异质性，在形态、电生理特征，以及分子特性上都有不同亚群被发现。SST神经元根据形态可以分为马丁诺蒂细胞（Martinotti cells）和非马丁诺蒂细胞（non-Martinotti cells）<sup>[91]</sup>。其中马丁诺蒂细胞占其中的大多数，这群细胞主要分布在皮层的Layer 2/3和Layer 5/6，但是他们的轴突会伸到Layer 1，作用到PYR神经元在Layer 1的树突结构。而另一群非马丁诺蒂细胞，则更多的在Layer 4和Layer 5被发现<sup>[13,94]</sup>。有报道认为，这群细胞会作用到Layer 4的PV神经元，起到去抑制的作用<sup>[57,58]</sup>。此外有研究发现，Layer 5的不少SST神经元有着低阈值发放（Low threshold spiking, LTS）特性。LTS细胞在超极化后，会表现出由早期峰和晚期峰组成的三相波形<sup>[94]</sup>。而其他Non-LTS细胞则同PYR神经元一样，以固定频率发放（Regular spiking）或少量的高频发放，同时表现出自适应的特性<sup>[94]</sup>。除了都表达生长抑素，皮层中还有15%-30%的SST神经元会同时表达钙网膜蛋白（Calretinin, CR）<sup>[95]</sup>。最近的单细胞转录组分析的结果，也证明了SST神经元在基因表达上也存在不同的亚型<sup>[96]</sup>。但是关于这些形态、分子，以及电生理特性上的差异目前还没有研究证明它们之间是否存在联系，这些差异可能与SST神经元在皮层信息处理

过程中的功能相适配。有趣的是，mPFC中SST神经元的相对丰度比其他皮层都要多<sup>[15]</sup>，这可能就是为了满足mPFC多样性的任务处理需求。

正由于SST神经元的多样性，其在mPFC中的功能表现也是多样的。曾有报道指出，mPFC中的一群特异性表达Oxytocin受体的SST神经元介导了雌鼠的亲社会行为<sup>[97]</sup>。有意思的是激活雌鼠mPFC中的这群神经元会使促进雌鼠与雄鼠互动，而激活雄鼠mPFC中的这群神经元则会使小鼠表现出焦虑行为<sup>[98]</sup>。除此之外，还有不少研究报道了mPFC中的SST神经元跟社会行为的相关性。比如Scheggia等人发现，抑制mPFC中的SST神经元会影响小鼠对同伴鼠情绪状态的识别，而抑制PV神经元则不影响。激活这群SST神经元，能直接抑制PYR神经元，从而促进小鼠的社交识别<sup>[99]</sup>。Yamamuro等人则发现，青春期社交隔离会导致mPFC中的LTS-SST神经元过度激活，从而抑制了mPFC深层投往丘脑室旁后核（posterior Paraventricular thalamus, pPVT）的投射性神经元造成了成年期的社交异常<sup>[100]</sup>。在另一项关于社交恐惧的研究中，他们发现SST神经元会通过抑制PV神经元，去抑制PYR神经元从而造成社交恐惧<sup>[81]</sup>。与之类似的，另一个研究组也在mPFC中发现，SST神经元会通过抑制PV神经元，激活mPFC整体网络，从而引发恐惧记忆<sup>[101]</sup>。尽管上面提到的工作都是社会行为相关，但可以发现SST神经元在mPFC微环路中，既扮演抑制角色，又扮演去抑制角色。这印证了皮层中的SST神经元异质性高的观点，在mPFC中也是如此。但有一点我们可以确定的是，mPFC的SST神经元和PV神经元一样，主要功能还是发挥抑制作用。因为有研究通过光遗传抑制SST神经元和PV神经元观察mPFC其他神经元的活动变化，发现抑制SST神经元后，有29%的神经元激活，10%的神经元抑制。而抑制PV神经元，有31%的神经元激活，8%的神经元抑制。尽管上述的光遗传操纵结果发现PV和SST神经元对mPFC整体网络的调节程度差不多，但是研究者们发现只有SST神经元参与到了空间工作记忆的调节。他们猜测这可能是因为这群SST神经影响了海马体与mPFC的同步放电<sup>[102]</sup>。另外也有研究通过单细胞电生理记录发现，mPFC中的SST神经元可以根据他们的波形分为宽波（WS-SST）和窄波（NS-SST）。在奖励寻求行为中，NS-SST神经元在小鼠进入奖励区时发放一致减少，而WS-SST神经元内部的发放异质性较大<sup>[86]</sup>。而在另

一个关于奖励相关的行为中发现，吗啡会通过激活SST-PV-PYR这条去抑制通路，提高mPFC网络活性而获得快感<sup>[103]</sup>。但是Pinto等人利用钙成像观察了SST神经元在Go/No Go行为测试中的钙反应，发现SST神经元跟获得奖励或惩罚的关系都不大，反而与运动行为更加相关<sup>[89]</sup>。整体看来，mPFC中SST神经元的功能比较复杂，而这很可能是因为SST内部有较多功能各异的亚群存在。

### VIP神经元的特性及功能

VIP神经元是皮层中第三多的中间神经元亚群，它属于5HT3aR神经元大类。5HT3aR神经元大概占皮层所有中间神经元的30%，而VIP大约占了其中的40%<sup>[13]</sup>。VIP神经元的最大的特点是它主要通过抑制其他中间神经元（如SST和PV神经元）参与皮层的去抑制调节<sup>[17,55]</sup>；但它也会直接抑制一部分的PYR神经元<sup>[55,83,104]</sup>。尽管VIP神经元在皮层各个Layer都有分布，但更多的分布在Layer 2/3<sup>[105]</sup>。大部分VIP神经元的形态呈现出与皮层垂直的双极结构，少量为多极<sup>[106]</sup>。Layer 2/3的双极VIP神经元可以同时接收不同层的信息输入。很多Layer 2/3的VIP神经元的树突会伸到Layer 1，这块区域是接受来自其他皮层和皮层下组织投射的树突聚集地，而它的轴突会以垂直皮层结构的方式拓展到Layer 5/6<sup>[106]</sup>。因为这种形态特点，它也常被叫作双束细胞<sup>[107]</sup>。VIP神经元可以根据其他的分子表达继续细分，其中10%-30%会同时表达胆囊收缩素（cholecystokinin, CCK），50%-70%会表达CR。因VIP/CR+神经元在发育过程中的成熟与迁移都与VIP/CR-的神经元明显不同，所以CR可以作为细分VIP神经元的标准<sup>[108]</sup>。此外，有些VIP神经元还会表达ChAT，其具体功能还是未知。尽管在小鼠和人类上都有报道，乙酰胆碱转运体并不都表达在乙酰胆碱能神经元上<sup>[109]</sup>，但并不清楚这类VIP神经元的共表达是否具有重要的功能意义。关于VIP神经的电生理特征，其最明显的特点是高输入阻抗，使它对于兴奋性输入非常敏感<sup>[110]</sup>。它的发放模式也被认为是非常规放电（Iregular spiking），主要特征是开始一串高频放电，紧随着一些不规则偶发的动作电位产生。但也有少量的VIP神经元存在高频放电，以及自适应放电模式<sup>[111]</sup>。就像其他所有5HT3aR神经元一样，VIP神经元会被5HT3aR激动剂激活<sup>[110]</sup>。此外，还有很多证据表明，来自神经调质

系统的刺激，如中缝背核和基底前脑都可以激活这类神经元<sup>[110,112,113]</sup>，暗示着VIP神经元会在很大程度上受到各种神经调质的调节。

尽管VIP神经元在其他初级感觉皮层中的功能已有较多报道，但是关于其在mPFC中的功能研究近些年才刚刚开始。有研究发现，mPFC中的VIP神经元在小鼠高架十字测试中的开架侧活性相对更高，他们发现抑制这群VIP神经元能通过影响海马与mPFC的信息流，从而降低小鼠的焦虑，使其更愿意到开架侧探索<sup>[114]</sup>。另外有研究报道，mPFC中的CRF神经元（其中41%共表达VIP，32%共表达CR）参与调控多种压力行为。他们发现抑制这群神经元，小鼠在面对压力和困难时，更容易变得消极；而激活这群神经元，小鼠更愿意采取积极的应对措施，对于压力有更高的耐受性<sup>[115]</sup>。我的研究工作也发现激活mPFC中的VIP神经元，会通过抑制PV神经元，去抑制PYR神经元，从而使小鼠在社会竞争中表现出更多的主动推挤行为<sup>[83]</sup>。一项关于mPFC中VIP神经元的电生理记录结果同样发现，VIP神经元会通过抑制SST神经元和PV神经元调节mPFC整体网络活性。它通过去抑制，增强皮层锥体神经元的输入和输出，从而强化学习过程<sup>[52]</sup>。最近的一项研究发现，两群特异的MD神经元，会根据不同的信噪条件，或激活mPFC中的PV神经元帮助筛选信号；或激活VIP神经元放大信号，从而提高小鼠处理复杂任务的准确度<sup>[116]</sup>。此前，Kamigaki等人报道过激活mPFC中的VIP神经元，能提高小鼠在Go/No Go行为中的表现，认为mPFC中的VIP神经元在工作记忆的提取方面也具有重要功能<sup>[85,117]</sup>。而另一项Go/No Go行为的钙成像结果则提示mPFC中VIP神经元的反应与行动的起始也非常相关<sup>[89]</sup>。在我的研究工作中也有类似的发现，mPFC中VIP神经元的钙信号在推挤行为开始前就开始上升，而在行为发生时到达峰值<sup>[83]</sup>。另外，有研究发现小鼠运动时，能提高视觉皮层VIP神经元的活性，从而提高小鼠的视觉反应，而这主要是通过基底前脑的输入，激活VIP的nAChRs实现的<sup>[53]</sup>。事实上，mPFC中的VIP神经元也同其他皮层的一样，受多种神经调质系统的影响<sup>[13]</sup>。结合VIP神经元的各种特性，及以上行为结果的观察和总结，一个普遍的猜测是：VIP神经元作为皮层信息流的门控通道，同时整合长程投射、内部投射、以及神经调质系统的信息输入，控制所在脑区的整体网络状态，从而实现行为的输出调节<sup>[17]</sup>。

## mPFC微环路系统失衡与精神疾病

mPFC中间神经元异常会导致多种精神疾病。其中PV神经元功能异常与多种神经系统疾病和精神疾病相关,包括癫痫<sup>[118]</sup>,精神分裂<sup>[119]</sup>,抑郁症<sup>[120]</sup>,自闭症<sup>[79,121]</sup>和阿尔茨海默症<sup>[122]</sup>等。这些疾病共有的特点是认知失调、社交异常等mPFC功能障碍。前面提到了PV神经元在维持皮层兴奋-抑制平衡中发挥着重大作用,而兴奋-抑制平衡是mPFC功能正常执行的基础。有研究发现PV神经元轴突Nav<sub>1.1</sub>通道的异常跟Dravet症(一种难治性癫痫性脑病)非常相关,他们在此类病人身上发现了Nav<sub>1.1</sub>/SCN1A基因的截短突变。随后研究人员在PV神经元特异性敲除SCN1A基因的老鼠模型上,重现了癫痫的表型。因此,PV神经元中SCN1A基因突变很可能是这个疾病的原因<sup>[123]</sup>。此外,在精神分裂症等认知功能障碍的啮齿类动物模型中,发现mPFC中的PV或GAD67表达减少的现象非常普遍,而这也与人类精神分裂病理过程类似。有报道指出PV神经元上受体酪氨酸激酶ErbB4的表达异常跟精神分裂症有关,而ErbB4基因和神经调节素1(Neuregulin 1, ErbB4配体)基因的突变经常在精神分裂症患者中被发现。研究人员通过特异性敲除小鼠PV神经元的ErbB4基因,也模拟出了精神分裂的表型<sup>[124]</sup>。此外,一项全基因组关联分析(Genome-wide association studies, GWAS)证据显示VIP神经元和乙酰胆碱能系统也和多种精神疾病的发生密切相关。他们发现,尼古丁乙酰胆碱受体的 $\alpha 5$ 亚基( $\alpha 5$ -nAChR)的单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNP)与精神分裂症高度相关。后续的研究发现 $\alpha 5$ -nAChR敲除的小鼠,会表现出精神分裂症状<sup>[125]</sup>。在mPFC中,只有Layer 2/3的VIP神经元表达 $\alpha 5$ -nAChR,而且敲低PL中的 $\alpha 5$ -nAChR会使得VIP神经元活性降低,SST活性增强,并造成类似人类精神分裂症脑前额叶功能退化(hypofrontality)的症状<sup>[126]</sup>。另外,mPFC也被认为参与到情绪相关行为的调控当中,在焦虑症、抑郁症等病人身上,经常能看到mPFC的功能和结构异常<sup>[127]</sup>。在重度抑郁症病人和小鼠模型中,都有观察到皮层GABA能神经元的改变,特别是SST神经元<sup>[128,129]</sup>。而有研究发现快速抗抑郁药——氯胺酮,能通过抑制mPFC中的SST神经元和PV神经元缓解小鼠的抑郁样症状<sup>[130]</sup>。以上这些结果反映了mPFC中



间神经元在维持其正常功能中是不可或缺的，同时也提示了mPFC的中间神经元可能可以作为治疗多种精神疾病的药物靶标。

## 总结与展望

大量关于mPFC中不同类型中间神经元参与多种行为调控及病理发生过程的报道，反映了mPFC微环路系统在维持mPFC功能正常执行上的重要性。不同类型的中间神经元类群根据自身特性，在微环路以及mPFC整体功能调控中分别扮演着不同的角色。PV神经元因其强大的抑制能力，在维持mPFC兴奋-抑制平衡中发挥巨大作用，其参与形成的皮层Gamma振荡也被报道参与多种认知过程<sup>[84,131]</sup>。VIP神经元因其独特的去抑制特性，能帮助mPFC整合和分选多样的信息输入，提高mPFC的任务处理表现。SST神经元参与到了社交、情感、空间学习等多种高级认知功能的调控，但是由于其内部的异质性，还需要更多的研究结果帮助细分它在微环路系统中的角色。其中还有很多其他中间神经元也参与到了mPFC微环路系统的组成，但由于目前研究相对较少，所以没有在本文中被概括。特别是5HT3aR神经元大类中的其他神经元，本文的介绍的还不够详细。最近有研究开始关注5HT3aR神经元中的Layer 1神经元<sup>[61]</sup>。由于Layer 1是皮层信息输入整合及交互的中心，里面几乎又全是抑制性神经元，且其中较多扮演去抑制的角色，因此它内部的组成及功能值得进一步挖掘<sup>[132]</sup>。之前关于皮层中间神经元的研究，主要集中在视觉和躯体感觉皮层，本文提到的很多中间神经元的特性，也是参考了它们在其他皮层中的研究报道。mPFC中的神经元是否完全对应，也有待更多的数据支持。由于mPFC在结构和功能上的独特性，相信其中的中间神经元也会有更多不同的特性等待被发现。

未来随着分子遗传学的进一步发展，以及神经科学技术的革新，期待能将不同中间神经元的功能亚型进行更细致的区分。从形态、分子表达、电生理特性以及上升到其在环路，甚至行为上的功能，找到对应的联系。在行为状态下，同时观察不同类群神经元间的作用关系及其对行为输出的影响，能为我们提供一个更

直接的微环路工作图景，这是将来微环路研究的一个重要方向。最后，我们大部分的科学探索最终都是为了服务人类的健康发展。中间神经元介导疾病发生的机制研究，以及针对中间神经元的诊疗方案的探索和相关药物的研发，都还需要投入更多的努力。

## 参考文献

- [1] Schmitt L I, Wimmer R D, Nakajima M, et al. Thalamic amplification of cortical connectivity sustains attentional control[J]. *Nature*, 2017, 545 (7653) : 219-223.
- [2] Liu D, Gu X, Zhu J, et al. Medial prefrontal activity during delay period contributes to learning of a working memory task[J]. *Science*, 2014, 346 (6208) : 458-63.
- [3] Wang F, Zhu J, Zhu H, et al. Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex[J]. *Science*, 2011, 334 (6056) : 693-7.
- [4] Courtin J, Chaudun F, Rozeske R R, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression[J]. *Nature*, 2014, 505 (7481) : 92-6.
- [5] Hoover W B, Vertes R P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat[J]. *Brain Structure and Function*, 2007, 212 (2) : 149-179.
- [6] Anastasiades P G, Carter A G. Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex[J]. *Trends Neurosci*, 2021, 44 (7) : 550-563.
- [7] Harris K D, Shepherd G M. The neocortical circuit: themes and variations[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18 (2) : 170-81.
- [8] Collins D P, Anastasiades P G, Marlin J J, et al. Reciprocal Circuits Linking the Prefrontal Cortex with Dorsal and Ventral Thalamic Nuclei[J]. *Neuron*, 2018, 98 (2) : 366-379.e4.
- [9] Seamans J K, Lapish C C, Durstewitz D. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology[J]. *Neurotox Res*, 2008, 14 (2-3) : 249-62.
- [10] Zhou T, Zhu H, Fan Z, et al. History of winning remodels thalamo-PFC circuit to reinforce social dominance[J]. *Science*, 2017, 357 (6347) : 162-168.
- [11] Ero C, Gewaltig M O, Keller D, et al. A Cell Atlas for the Mouse Brain[J]. *Front Neuroinform*, 2018, 12: 84.
- [12] Rudy B, Fishell G, Lee S, et al. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons[J]. *Dev Neurobiol*, 2011, 71 (1) : 45-61.
- [13] Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits[J]. *Neuron*, 2016, 91 (2) : 260-92.
- [14] Granger A J, Wang W, Robertson K, et al. Cortical ChAT (+) neurons co-transmit acetylcholine and GABA in a target- and brain-region-specific manner[J]. *Elife*, 2020, 9: 29.
- [15] Kim Y, Yang G R, Pradhan K, et al. Brain-wide Maps Reveal Stereotyped Cell-Type-Based Cortical Architecture and Subcortical Sexual Dimorphism[J]. *Cell*,

- 2017, 171 (2) : 456-469 e22.
- [16] Liu X, Dimidschstein J, Fishell G, et al. Hippocampal inputs engage CCK+ interneurons to mediate endocannabinoid-modulated feed-forward inhibition in the prefrontal cortex[J]. *Elife*, 2020, 9.
- [17] Kepecs A, Fishell G. Interneuron cell types are fit to function[J]. *Nature*, 2014, 505 (7483) : 318-26.
- [18] Buzsaki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks[J]. *Science*, 2004, 304 (5679) : 1926-9.
- [19] Wang X J, Tegner J, Constantinidis C, et al. Division of labor among distinct subtypes of inhibitory neurons in a cortical microcircuit of working memory[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101 (5) : 1368-1373.
- [20] Silver R A. Neuronal arithmetic[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11 (7) : 474-89.
- [21] Holt G R, Koch C. Shunting Inhibition Does Not Have a Divisive Effect on Firing Rates[J]. *Neural Computation*, 1997, 9 (5) : 1001-1013.
- [22] Carandini M, Heeger D J. Normalization as a canonical neural computation[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2012, 13 (1) : 51-62.
- [23] Schwartz O, Simoncelli E P. Natural signal statistics and sensory gain control[J]. *Nature Neuroscience*, 2001, 4 (8) : 819-825.
- [24] Mitchell S J, Silver R A. Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation[J]. *Neuron*, 2003, 38 (3) : 433-45.
- [25] Tiesinga P H, Sejnowski T J. Rapid temporal modulation of synchrony by competition in cortical interneuron networks[J]. *Neural Comput*, 2004, 16 (2) : 251-75.
- [26] Chance F S, Abbott L F, Reyes A D. Gain modulation from background synaptic input[J]. *Neuron*, 2002, 35 (4) : 773-82.
- [27] Nienborg H, Hasenstaub A, Nauhaus I, et al. Contrast dependence and differential contributions from somatostatin- and parvalbumin-expressing neurons to spatial integration in mouse V1[J]. *J Neurosci*, 2013, 33 (27) : 11145-54.
- [28] Van Vreeswijk C, Sompolinsky H. Chaos in neuronal networks with balanced excitatory and inhibitory activity[J]. *Science*, 1996, 274 (5293) : 1724-6.
- [29] Wehr M, Zador A M. Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex[J]. *Nature*, 2003, 426 (6965) : 442-6.
- [30] Haider B. Neocortical Network Activity In Vivo Is Generated through a Dynamic Balance of Excitation and Inhibition[J]. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26 (17) : 4535-4545.
- [31] Haider B, Hausser M, Carandini M. Inhibition dominates sensory responses in the awake cortex[J]. *Nature*, 2013, 493 (7430) : 97-100.
- [32] Okun M, Lampl I. Instantaneous correlation of excitation and inhibition during ongoing and sensory-evoked activities[J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11 (5) : 535-7.
- [33] Pouille F, Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition[J]. *Science*, 2001, 293 (5532) : 1159-63.
- [34] Renart A, De La Rocha J, Bartho P, et al. The asynchronous state in cortical

- circuits[J]. *Science*, 2010, 327 (5965) : 587-90.
- [35] Buzsaki G. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation[J]. *Prog Neurobiol*, 1984, 22 (2) : 131-53.
- [36] Toyama K, Matsunami K, Ono T, et al. An intracellular study of neuronal organization in the visual cortex[J]. *Exp Brain Res*, 1974, 21 (1) : 45-66.
- [37] Delevich K, Tucciarone J, Huang Z J, et al. The mediodorsal thalamus drives feedforward inhibition in the anterior cingulate cortex via parvalbumin interneurons[J]. *J Neurosci*, 2015, 35 (14) : 5743-53.
- [38] Fino E, Yuste R. Dense inhibitory connectivity in neocortex[J]. *Neuron*, 2011, 69 (6) : 1188-203.
- [39] Packer A M, Yuste R. Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition?[J]. *J Neurosci*, 2011, 31 (37) : 13260-71.
- [40] Helmstaedter M, Staiger J F, Sakmann B, et al. Efficient recruitment of layer 2/3 interneurons by layer 4 input in single columns of rat somatosensory cortex[J]. *J Neurosci*, 2008, 28 (33) : 8273-84.
- [41] Katzel D, Zemelman B V, Buetfering C, et al. The columnar and laminar organization of inhibitory connections to neocortical excitatory cells[J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14 (1) : 100-7.
- [42] De Almeida L, Idiart M, Lisman J E. A second function of gamma frequency oscillations: an E%-max winner-take-all mechanism selects which cells fire[J]. *J Neurosci*, 2009, 29 (23) : 7497-503.
- [43] Hu H, Gan J, Jonas P. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin (+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function[J]. *Science*, 2014, 345 (6196) : 1255-263.
- [44] Buzsaki G, Wang X J. Mechanisms of gamma oscillations[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2012, 35: 203-25.
- [45] Couey J J, Witoelar A, Zhang S J, et al. Recurrent inhibitory circuitry as a mechanism for grid formation[J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16 (3) : 318-324.
- [46] Goldberg E M, Coulter D A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14 (5) : 337-49.
- [47] Paz J T, Huguenard J R. Microcircuits and their interactions in epilepsy: is the focus out of focus?[J]. *Nature Neuroscience*, 2015, 18 (3) : 351-359.
- [48] Hunt R F, Girskis K M, Rubenstein J L, et al. GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior[J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16 (6) : 692-+.
- [49] Freund T F, Martin K A, Smith A D, et al. Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axoaxonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex[J]. *J Comp Neurol*, 1983, 221 (3) : 263-78.
- [50] Somogyi P, Kisvarday Z F, Martin K A, et al. Synaptic connections of

- morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat[J]. *Neuroscience*, 1983, 10 (2) : 261-94.
- [51] Kisvarday Z F, Beaulieu C, Eysel UT. Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18): implication for lateral disinhibition[J]. *J Comp Neurol*, 1993, 327 (3) : 398-415.
- [52] Pi H J, Hangya B, Kvitsiani D, et al. Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control[J]. *Nature*, 2013, 503 (7477) : 521-4.
- [53] Fu Y, Tucciarone J M, Espinosa J S, et al. A cortical circuit for gain control by behavioral state[J]. *Cell*, 2014, 156 (6) : 1139-1152.
- [54] Lee S, Kruglikov I, Huang Z J, et al. A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16 (11) : 1662-70.
- [55] Pfeiffer C K, Xue M, He M, et al. Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(8) : 1068-76.
- [56] Ahrlund-Richter S, Xuan Y, Van Lunteren J A, et al. A whole-brain atlas of monosynaptic input targeting four different cell types in the medial prefrontal cortex of the mouse[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22 (4) : 657-668.
- [57] Xu H, Jeong H Y, Tremblay R, et al. Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4[J]. *Neuron*, 2013, 77 (1) : 155-67.
- [58] Munoz W, Tremblay R, Levenstein D, et al. Layer-specific modulation of neocortical dendritic inhibition during active wakefulness[J]. *Science*, 2017, 355(6328) : 954-959.
- [59] Letzkus J J, Wolff S B, Luthi A. Disinhibition, a Circuit Mechanism for Associative Learning and Memory[J]. *Neuron*, 2015, 88 (2) : 264-76.
- [60] Letzkus J J, Wolff S B, Meyer E M, et al. A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex[J]. *Nature*, 2011, 480 (7377) : 331-5.
- [61] Anastasiades P G, Collins D P, Carter A G. Mediodorsal and Ventromedial Thalamus Engage Distinct L1 Circuits in the Prefrontal Cortex[J]. *Neuron*, 2020.
- [62] Taniguchi H, He M, Wu P, et al. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex[J]. *Neuron*, 2011, 71 (6) : 995-1013.
- [63] He M, Tucciarone J, Lee S, et al. Strategies and Tools for Combinatorial Targeting of GABAergic Neurons in Mouse Cerebral Cortex[J]. *Neuron*, 2016, 92 (2) : 555.
- [64] Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8 (9) : 1263-8.
- [65] Deisseroth K. Optogenetics[J]. *Nat Methods*, 2011, 8 (1) : 26-9.
- [66] Chen T W, Wardill T J, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity[J]. *Nature*, 2013, 499 (7458) : 295-300.
- [67] Zhao S, Ting J T, Atallah H E, et al. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function[J]. *Nat Methods*, 2011, 8 (9) : 745-52.

- [68] Roux L, Stark E, Sjulson L, et al. In vivo optogenetic identification and manipulation of GABAergic interneuron subtypes[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2014, 26: 88-95.
- [69] Kawaguchi Y, Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex[J]. *Cerebral Cortex*, 1997, 7 (6) : 476-486.
- [70] Stark E, Eichler R, Roux L, et al. Inhibition-induced theta resonance in cortical circuits[J]. *Neuron*, 2013, 80 (5) : 1263-76.
- [71] Gulyas A I, Megias M, Emri Z, et al. Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus[J]. *J Neurosci*, 1999, 19 (22) : 10082-97.
- [72] Tukker J J, Lasztocki B, Katona L, et al. Distinct dendritic arborization and in vivo firing patterns of parvalbumin-expressing basket cells in the hippocampal area CA3[J]. *J Neurosci*, 2013, 33 (16) : 6809-25.
- [73] Agmon A, Connors B W. Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro[J]. *Neuroscience*, 1991, 41 (2-3) : 365-79.
- [74] Castro-Alamancos M A, Connors B W. Thalamocortical synapses[J]. *Prog Neurobiol*, 1997, 51 (6) : 581-606.
- [75] Isaacson J S, Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity[J]. *Neuron*, 2011, 72 (2) : 231-43.
- [76] Lu J, Tucciarone J, Padilla-Coreano N, et al. Selective inhibitory control of pyramidal neuron ensembles and cortical subnetworks by chandelier cells[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20 (10) : 1377-1383.
- [77] Yizhar O, Fenno L E, Prigge M, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction[J]. *Nature*, 2011, 477 (7363) : 171-178.
- [78] Sun Q, Li X, Li A, et al. Ventral Hippocampal-Prefrontal Interaction Affects Social Behavior via Parvalbumin Positive Neurons in the Medial Prefrontal Cortex[J]. *iScience*, 2020, 23 (3) : 100894.
- [79] Cao W, Lin S, Xia Q Q, et al. Gamma Oscillation Dysfunction in mPFC Leads to Social Deficits in Neuroligin 3 R451C Knockin Mice[J]. *Neuron*, 2018, 97 (6) : 1253-1260 e7.
- [80] Bicks L K, Yamamuro K, Flanigan M E, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons require juvenile social experience to establish adult social behavior[J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 1003.
- [81] Xu H, Liu L, Tian Y, et al. A Disinhibitory Microcircuit Mediates Conditioned Social Fear in the Prefrontal Cortex[J]. *Neuron*, 2019, 102 (3) : 668-682 e5.
- [82] Tan S, Xiao Y, Yin H H, et al. Postnatal TrkB ablation in corticolimbic interneurons induces social dominance in male mice[J]. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2018.
- [83] Zhang C, Zhu H, Ni Z, et al. Dynamics of a disinhibitory prefrontal microcircuit in controlling social competition[J]. *Neuron*, 2021.
- [84] Kim H, Ährlund-Richter S, Wang X, et al. Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention[J]. *Cell*, 2016, 164 (1-2) : 208-218.

- [85] Kamigaki T, Dan Y. Delay activity of specific prefrontal interneuron subtypes modulates memory-guided behavior[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20 (6) : 854-863.
- [86] Kvitsiani D, Ranade S, Hangya B, et al. Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex[J]. *Nature*, 2013, 498 (7454) : 363-6.
- [87] Sparta D R, Hovelso N, Mason A O, et al. Activation of prefrontal cortical parvalbumin interneurons facilitates extinction of reward-seeking behavior[J]. *J Neurosci*, 2014, 34 (10) : 3699-705.
- [88] Lagler M, Ozdemir A T, Lagoun S, et al. Divisions of Identified Parvalbumin-Expressing Basket Cells during Working Memory-Guided Decision Making[J]. *Neuron*, 2016, 91 (6) : 1390-1401.
- [89] Pinto L, Dan Y. Cell-Type-Specific Activity in Prefrontal Cortex during Goal-Directed Behavior[J]. *Neuron*, 2015, 87 (2) : 437-450.
- [90] Dennison-Cavanagh M E, Papadopoulos G, Parnavelas J G. The emergence of the cortical GABAergic neuron: with particular reference to some peptidergic subpopulations[J]. *J Neurocytol*, 1993, 22 (9) : 805-14.
- [91] Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, et al. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat[J]. *J Physiol*, 2004, 561 (Pt 1) : 65-90.
- [92] Pouille F, Scanziani M. Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus[J]. *Nature*, 2004, 429 (6993) : 717-23.
- [93] Kapfer C, Glickfeld L L, Atallah B V, et al. Supralinear increase of recurrent inhibition during sparse activity in the somatosensory cortex[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10 (6) : 743-53.
- [94] Ma Y, Hu H, Berrebi A S, et al. Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice[J]. *J Neurosci*, 2006, 26 (19) : 5069-82.
- [95] Xu X, Roby K D, Callaway E M. Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin[J]. *J Comp Neurol*, 2006, 499 (1) : 144-60.
- [96] Tasic B, Menon V, Nguyen T N, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics[J]. *Nature Neuroscience*, 2016, 19 (2) : 335-346.
- [97] Nakajima M, Gorlich A, Heintz N. Oxytocin modulates female sociosexual behavior through a specific class of prefrontal cortical interneurons[J]. *Cell*, 2014, 159 (2) : 295-305.
- [98] Li K, Nakajima M, Ibanez-Tallon I, et al. A Cortical Circuit for Sexually Dimorphic Oxytocin-Dependent Anxiety Behaviors[J]. *Cell*, 2016, 167 (1) : 60-72 e11.
- [99] Scheggia D, Manago F, Maltese F, et al. Somatostatin interneurons in the prefrontal cortex control affective state discrimination in mice[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23 (1) : 47-60.
- [100] Yamamuro K, Bicks L K, Leventhal M B, et al. A prefrontal-paraventricular thalamus circuit requires juvenile social experience to regulate adult sociability in

- mice[J]. *Nat Neurosci*, 2020.
- [101] Cummings K A, Clem R L. Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23 (1) : 61-74.
- [102] Abbas A I, Sundiang M J M, Henoch B, et al. Somatostatin Interneurons Facilitate Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Prefrontal Spatial Encoding[J]. *Neuron*, 2018, 100 (4) : 926-939 e3.
- [103] Jiang C, Wang X, Le Q, et al. Morphine coordinates SST andPVinterneurons in the prelimbic cortex to disinhibit pyramidal neurons and enhance reward[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26 (4) : 1178-1193.
- [104] Garcia-Junco-Clemente P, Ikrar T, Tring E, et al. An inhibitory pull–push circuit in frontal cortex[J]. *Nature Neuroscience*, 2017, 20 (3) : 389-392.
- [105] Staiger J F, Zilles K, Freund T F. Innervation of VIP-immunoreactive neurons by the ventroposteromedial thalamic nucleus in the barrel cortex of the rat[J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 1996, 367 (2) : 194-204.
- [106] Pronneke A, Scheuer B, Wagener R J, et al. CharacterizingVIPNeurons in the Barrel Cortex of VIPcre/tdTomato Mice Reveals Layer-Specific Differences[J]. *Cereb Cortex*, 2015, 25 (12) : 4854-68.
- [107] Defelipe J, Ballesteros-Yanez I, Inda M C, et al. Double-bouquet cells in the monkey and human cerebral cortex with special reference to areas 17 and 18[J]. *Prog Brain Res*, 2006, 154: 15-32.
- [108] De Marco García N V, Karayannis T, Fishell G. Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes[J]. *Nature*, 2011, 472 (7343) : 351-355.
- [109] Cauli B, Zhou X, Tricoire L, et al. Revisiting enigmatic cortical calretinin-expressing interneurons[J]. *Front Neuroanat*, 2014, 8: 52.
- [110] Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, et al. The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors[J]. *J Neurosci*, 2010, 30 (50) : 16796-808.
- [111] Porter J T, Cauli B, Staiger J F, et al. Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex[J]. *Eur J Neurosci*, 1998, 10 (12) : 3617-28.
- [112] Alitto H J, Dan Y. Cell-type-specific modulation of neocortical activity by basal forebrain input[J]. *Front Syst Neurosci*, 2012, 6: 79.
- [113] Choi J, Callaway E M. Monosynaptic inputs to ErbB4-expressing inhibitory neurons in mouse primary somatosensory cortex[J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2011, 519 (17) : 3402-3414.
- [114] Lee A T, Cunniff M M, See J Z, et al. VIPInterneurons Contribute to Avoidance Behavior by Regulating Information Flow across Hippocampal-Prefrontal Networks[J]. *Neuron*, 2019.
- [115] Chen P, Lou S, Huang Z H, et al. Prefrontal Cortex Corticotropin-Releasing Factor Neurons Control Behavioral Style Selection under Challenging Situations[J].



- Neuron, 2020, 106 (2) : 301-315 e7.
- [116] Mukherjee A, Lam N H, Wimmer R D, et al. Thalamic circuits for independent control of prefrontal signal and noise[J]. Nature, 2021, 600 (7887) : 100-104.
- [117] Kamigaki T. Prefrontal circuit organization for executive control[J]. Neurosci Res, 2019, 140: 23-36.
- [118] Marin O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders[J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13 (2) : 107-20.
- [119] Mukherjee A, Carvalho F, Eliez S, et al. Long-Lasting Rescue of Network and Cognitive Dysfunction in a Genetic Schizophrenia Model[J]. Cell, 2019, 178 (6) : 1387-1402 e14.
- [120] Sauer J F, Struber M, Bartos M. Impaired fast-spiking interneuron function in a genetic mouse model of depression[J]. Elife, 2015, 4.
- [121] Lauber E, Filice F, Schwaller B. Dysregulation of Parvalbumin Expression in the Cntnap2<sup>-/-</sup> Mouse Model of Autism Spectrum Disorder[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 262.
- [122] Xu Y, Zhao M, Han Y, et al. GABAergic Inhibitory Interneuron Deficits in Alzheimer's Disease: Implications for Treatment[J]. Front Neurosci, 2020, 14: 660.
- [123] Han S, Tai C, Westenbroek R E, et al. Autistic-like behaviour in Scn1a<sup>+/-</sup> mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission[J]. Nature, 2012, 489 (7416) : 385-390.
- [124] Wen L, Lu Y S, Zhu X H, et al. Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons[J]. Proc Natl Acad SciUS A, 2010, 107 (3) : 1211-6.
- [125] Koukoulis F, Rooy M, Tziotis D, et al. Nicotine reverses hypofrontality in animal models of addiction and schizophrenia[J]. Nature Medicine, 2017, 23 (3) : 347-354.
- [126] Hill K, Mann L, Laws K R, et al. Hypofrontality in schizophrenia: a meta-analysis of functional imaging studies[J]. Acta Psychiatr Scand, 2004, 110 (4) : 243-56.
- [127] Price R B, Duman R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25 (3) : 530-543.
- [128] Sibille E, Morris H M, Kota R S, et al. GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2011, 14 (6) : 721-34.
- [129] Tripp A, Kota R S, Lewis D A, et al. Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression[J]. Neurobiol Dis, 2011, 42 (1) : 116-24.
- [130] Fogaça M V, Wu M, Li C, et al. Inhibition of GABA interneurons in themPFC is sufficient and necessary for rapid antidepressant responses[J]. Molecular Psychiatry, 2021, 26 (7) : 3277-3291.
- [131] Roux L, Buzsaki G. Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits[J]. Neuropharmacology, 2015, 88: 10-23.
- [132] Schuman B, Dellal S, Pronneke A, et al. Neocortical Layer 1: An Elegant Solution to Top-Down and Bottom-Up Integration[J]. Annu Rev Neurosci, 2021, 44: 221-252.