

第二章 神经解剖方法和皮层结构的基本原理

程康¹ 钟咏梅² Kathleen S. Rockland³ 孙沛⁴

¹Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Center for Brain Science

² 复旦大学

³ Boston University

⁴ 清华大学

kcheng@mailman.riken.go.jp

ymzhong@fudan.edu.cn

rockland@brain.riken.go.jp

peisun@tsinghua.edu.cn

1. 引言

对皮层功能的认识与我们对皮层解剖的了解紧密相关。例如，在法国医生 Paul Broca 描述了其著名的病例“Tan”之后，皮层分区的概念开始被广泛接受。这是因为通过对患者“Tan”的研究，Broca 把说话的能力与额叶的特定区域联系起来。Camillo Golgi 和 Santiago Ramon y Cajal 两位解剖学家采用组织学染色法（Golgi 染色）对神经系统的基本结构进行了研究，尽管所用的方法基本相同，他们各自却得到了明确但截然相反的结论：Golgi 认为轴突形成一个相互联系的网；而 Cajal 却认为轴突的末梢游离在灰质中，并正确地推论这些末梢与其它神经细胞的树突和胞体相联系。这两个学派之间的争论一直持续到 20 世纪前半叶，直到电子显微镜问世，Golgi 的网理论的拥护者们才承认失败。这个经典的事例，清楚地表明现代神经科学的新技术可以极大地促进对脑的感觉和认知过程的研究。

在这一章里，我们将简要地综述几个主要的神经解剖方法，这些方法主要用于研究皮层神经元、功能构筑、神经网络、皮层区域以及它们之间的连接。我们也将简单地讨论一下神经解剖研究如何推进了我们对脑功能结构的基本原理的认识。最后我们将简单介绍连接组学（Connectomics）的概念、相关技术和最新进展。

2. 神经解剖方法

在本章的这一部分，我们将简要地综述一些用于研究不同水平组织的神经结构，包括单个神经元、神经元群、皮层区域间的连接、微环路和功能网的基本技术。我们将比较详细地描述几个重要的方法，并给出一些应用例子以及对其局限性的评价。一些最新发展的技术也将被提及。有关用于研究人及动物的神经解剖学的神经成像技术，即正电子发射断层扫描技术（positron emission tomography, PET）、功能磁共振成像技术（functional magnetic resonance imaging, fMRI）以及光成像技术（optical recordings）的详细内容请参看本书的相关章节。

2.1. 单个神经元

一个典型的神经元由一个细胞体（也称为“胞体”）、轴突和树突组成。树突是从细胞体伸出的细突起，通过突触接受从其它神经元传入的信息。轴突为单一的突起，能传导神经冲动。轴突通过与其它神经元形成突触联系而将自身胞体的信息传出。轴突末梢〔基本上相当于突触小体（synaptic boutons）〕，集中于远端的轴突树（轴突形成的树状结构）上，常形成单一的斑块或在空间上延伸的多个斑块。典型的轴突树直径约为 200 μm ，但依某些因素而定，也可能小至 50 μm 或大到 1.0 mm（图 2-1）。

〔Golgi 法〕 直至近年，最广泛使用的浸染单个神经元的方法是 Golgi 法。此法是 Camillo Golgi 在 1873 年偶然发现的。Golgi 最初打算寻找一种保存和加硬神经组织的方法以便能够在进行薄切片后，在光镜下进行观察。出乎意料的是，这个方法也能导致黑色的银粒在胞体和树突中沉积下来（图 2-2）（详细的 Golgi 方法及其改进法参看 Banks, 1999a）。Golgi 法的确切机制至今仍不清楚，因为利用此法只有一小部分（约 1%）神经元能被银浸染，且无法预知哪些神经元会被染上，而轴突则不易着色。当轴突有髓鞘时，用这种方法不能使之着色。因此，Golgi 法只适于浸染年轻脑组织的轴突。

Golgi 法曾是神经组织学中最常用的方法之一，几乎被用来定义整个学科，现在仍运用于对死后神经组织的研究。然而，由于其结果无法预测，目前 Golgi 法已被其它更新且更易控制的技术所取代。

[细胞内染色] 较新的方法之一是在细胞内注射示踪剂，如 biocytin 、神经生物素（neurobiotin）、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）（Kitai and Bishop, 1981; Bishop and King, 1982; Banks, 1999a）。此法可用于进行电生理记录的神元，能给出所记录神经元的完整形态及其准确的电生理反应特性的资料。胞体、完整的树突树以及至少轴突的近端部分都能被标记上（图 2 — 3）。与 Golgi 法相比较，更细小的分枝（如树突棘）能被更清楚地标记。与此相对，树突棘很难通过 Golgi 法染色形成的颜色很深的银沉积物来清楚地显示。胞内注射可在体内及离体的组织上进行，这种方法已用于对神经元进行功能性地分类，然而，其主要的局限性是很难得到大量的样本。

[电子显微镜] 若要对细胞及亚细胞的微细结构进行观察，则必须使用具有高倍放大功能的电子显微镜（图 2 — 4）（Guillery, 2000; Cowan et al, 2001）。

2.2. 神经元群

在神经结构的组织学水平，神经组织学家们主要关心的问题之一是对神经系统的可辨认的区域（如皮层区及特定的皮层下核团）进行定性和分区。最初，这是根据简单的标准，如神经元的大小、形状和数目、特别是神经元的胞体及近端的树突（即细胞构筑，cytoarchitectonics），以及有髓轴突的密度和排列（即神经纤维构筑，myeloarchitectonics）进行定性的。令人吃惊的是，即便采用这么简单的方法却得到了非常一致的结果和脑图，其中的许多发现至今仍然适用。

[尼氏染色法] 尼氏染色法（依据 1894 年发明此方法的德国组织学家 Franz Nissl 的名字命名）是最普通、常用的浸染神经元群的方法。此法是使碱性染料与细胞内的酸性成分结合，主要使胞体着色，有时近端树突也被染上（Banks, 1999b），可显示组织切片中所有的细胞，包括神经胶质细胞。此法可用于帮助划分皮层下核团及皮层区的界限（图 2 — 5），也常用于测定细胞的数量及密度。

脑结构的早期研究广泛依赖于尼氏染色法，有时也借助髓鞘染色。用这些方法 Brodmann, Vogt, Von Economo 以及其他一些学者在二十世纪早期（Braak, 1980）分别建立了脑皮层“构筑”图的基础。这些脑图被作为脑局部解剖的标准而使用，从而使之频繁、且经常是不加鉴别地被引用。这些脑区划分，如众所周知的 Brodmann 分区（Brodmann, 1909; 参看 Garey, 1994 英译本），已引起相当多的争议甚至受到嘲笑（Bailey and von Bonin, 1951; 也见 Garey, 1994 译者的介绍）。这些早期脑图的最大

问题是主观性较大，因为所作的图大都基于单个标准（细胞构筑，偶尔也与神经纤维构筑相关联）。然而，无可争辩的是 Brodmann 所描述的不同的局部解剖脑区实际上常与重要的脑功能分工相吻合。近十几年来，特别是归功于能显示局部脑活动的功能成像（fMRI 和 PET）的研究，这些经典的脑图又重受青睐，并且显示有很强的相关性。随着自动图像分析（automatic image analysis）的广泛应用，更加客观的研究脑构筑的方法正得以发展（如：Zilles et al., 2001）。一些利用新方法所得到的更新的脑图正出现在最近的图谱中（如：Paxinos et al., 2000）。

[免疫细胞化学] 免疫细胞化学是揭示神经细胞亚群的新方法之一，现在有大量种类繁多、并能够买到的抗体。例如，抗结构蛋白（如神经纤维或微管结合蛋白）的抗体，抗递质（谷氨酸、GABA、多巴胺）或抗神经肽以及抗钙结合蛋白（calbindin, parvalbumin）的抗体，抗突触成分的抗体，以及抗（谷氨酸，GABA、多巴胺）受体的抗体（Jones et al., 1994; Ariano, 1997）。免疫细胞化学法包含一系列的步骤。针对新鲜的组织切片，通过与含有不同浓度的第一抗体、之后是第二抗体（如兔抗 GABA 抗体，及羊抗兔、小鼠抗兔或其它动物抗兔的抗体）进行反应。二抗可带荧光标记，因此最终结果可用荧光显微镜观察。由于荧光标记信号容易褪色，另一方法是用 biotin 标记二抗，经过几个反应步骤后，标记的最初蛋白质（抗原）以棕色或黑色的反应产物显示出来。通过改进方法，对不同抗原的标记可在相同的切片中完成（双标或三标的免疫细胞化学技术）。

[组织化学] 组织化学是使各种各样的成色剂（常为二甲基联苯胺，diaminobenzidine dihydrochloride, DAB）被沉淀作为酶反应的最终产物，从而揭示细胞和突起对某些物质起正反应的一种技术。如乙酰胆碱酯酶反应已被用来确定神经元和/或神经末梢对神经递质乙酰胆碱是否起正反应（即是否含有乙酰胆碱）（Butcher, 1983）。

[细胞色素氧化酶] 细胞色素氧化酶（cytochrome oxidase, CO）是另一种引人注目的酶，是被偶然发现的。在某些脑区，如灵长类 V1 区和 V2 区（图 2 — 6），这种酶的活动能被特殊地标记为斑块形状。虽然 CO 被认为以某种方式与局部代谢的需求相关联，但引起其活动的区域性差异的原因仍然不清楚。CO 是线粒体的标记物，它是电子传递链中最终的酶，催化细胞色素 C 的氧化反应（Silverman and Tootell, 1987; Wong-Riley, 1994）。

2.3. 连接

神经元接受来自成百上千的其它神经元的传入连接，也将传出连接投射到数量相当的神经元。搞清神经元功能的一个关键步骤是将这些连接进行定性。通过各种实验在动物模型上已对连接系统的结构进行了研究。Cajal 和 Golgi 及其他学者，通过对 Golgi 染色组织的仔细分析，已正确地推断出大量的连接。其它早期的方法还包括逆行细胞的退化和 Marchi 技术。逆行细胞退化方法损伤解剖通路的下游（如靶结构），导致发出轴突到损伤区的母细胞（parent cell）的皱缩或死亡。Marchi 技术则损伤解剖通路的上游（即起源结构），引起从这些损伤的起源区发出至靶结构的有髓纤维的退化。

[Nauta 法] 对长距离的连接进行研究的最初方法是由 Nauta 改进的银染法（Nauta and Gyax, 1954），以及在 Nauta 法的基础上进一步改进的一些方法，特别是 Fink 和 Heimer 的改进法（Fink and Heimer, 1967）。这些方法即在动物模型上用烧灼、抽吸或化学药品损伤特定的结构，从而产生退变纤维。由于缺乏从母细胞来的营养供应，一段时间后，从损伤部位来的大量轴突和末梢退变。脑经固定液灌流、薄切片后，组织切片经一系列溶液反应，退变的轴突纤维及其分枝被黑色的银粒染色，能在光镜下从损伤部位至靶结构进行追踪（这个方法与 Marchi 技术相似，但较之更灵敏）。

[顺行和逆行示踪剂] 七十年代，损伤退变方法逐渐被几种更好的方法替代，这些方法的基础是轴浆运输的生理过程。如今在神经解剖实验室常规使用的示踪剂大体可分为两类：顺行示踪剂和逆行示踪剂。顺行示踪剂，如 [^3H] 脯氨酸和麦胚凝集素结合—HRP (wheat germ agglutinin conjugated HRP, WGA-HRP) (Mesulam, 1982)，可被引入部位的胞体和树突摄入，混合进不同的膜蛋白中，并沿轴突被动地运送至末梢，即靶结构。与之相反，逆行示踪剂，如 HRP (Mesulam, 1982)，在引入部位被轴突末梢摄入，被逆行运送至母细胞的胞体，即轴突投射的起源地（图 2—1）。如果注射的 WGA-HRP 用 DAB 或四甲基联苯（tetramethylbenzidine, TMB）作为成色剂进行组织化学反应，则顺行标记的末梢分别显示为棕色和蓝色颗粒。在放射自显影中 {（放射性氚标记的脯氨酸（ ^3H ） proline）可使照片底片或感光乳胶发生感光显影}，末梢存在的部位显示黑色的银粒。这些都是敏感且可靠的技术，用于决定从一个被设定的区或结构（通过在设定区注射入顺行示踪剂）来的投射，和决定哪些区或结构投射到一个被设定的区（通过在设定区注射入逆行示踪剂）。此外，利用这些

技术还能得到有关母细胞的位置、数量，有时甚至类型（用逆行示踪剂）及其末梢（用顺行示踪剂）的信息。

[更新的顺行和逆行示踪剂] HRP、WGA-HRP 和其它几种更新的逆行示踪剂（荧光染料，如 fast blue、diamidino yellow 和霍乱毒素的改进型）现在仍然用于神经元间连接的研究。然而，更新的顺行示踪剂 [如 biotin kidney bean lectin, biotinylated dextran amine (BDA), 或 fluoro-ruby (FR)] 已大多替代了放射自显影法。在与称之为 avidin-biotinylated HRP 的复合物进行组织化学反应后，这些示踪剂最后常与 DAB 或其它成色剂反应而被显示 (Kiernan, 1990)。这些新的示踪剂有更高的分辨率，与放射自显影中的银粒斑块相比，能显示更精细的 Golgi 样的整个轴突及其末梢的形态 (图 2 — 7)。

正如要在后面的视觉系统中叙述的那样，这些技术已用来绘制出不同脑区及功能通路的基本连接（如：参阅 Kobbert et al, 2000）。然而，这方面的资料仍然很不完善，并且关于连接的相互作用，无论是结构上的还是功能上的，我们仍知之甚少。

2.4. 微环路

了解不同脑结构的总的传入和传出连接是很重要的，但随之需要追加其它研究以便在突触水平上确定功能微环路。在某些结构中，如视网膜、小脑、脊髓、丘脑感觉核和基底神经节，有相当多详细的有关突触类型、突触后定位的资料（参看如 Shepherd, 1998），但在许多结构中，如联合皮层，这样的资料则很不完整。

在微环路水平上的研究比较困难，原因有几个：第一，须有方法识别突触前传入及其突触后的细胞靶。即便是现在，尽管有大量的标记可供选择，但是一般的实验通常局限于两种或三种标记。第二，微环路依赖于对突触联系的可靠识别，这就需要在高倍放大的电镜下，或用具备特殊控制的共焦显微镜来确认。第三，在许多结构中，微环路或许是可变的而非固定的。如，一个有代表性的神经元估计可以接收多于 6000 个的突触传入 (Peters, 1987; DeFelipe, 1992)，根据外来刺激性质的不同，这个大的连接网的结合和整合也不相同。最近的方法可在脑组织切片上结合进行解剖和生理的研究，以便在微环路水平研究结构和功能的特性 (Gupta et al., 2000; Thomson and Bannister, 2003)。遗憾的是，对长距离连接的研究不适合在脑切片上进行。

2.5. 功能网

神经成像技术，如 PET 和 fMRI，现已被广泛用于绘制人脑的活动图。近年来，这些成像的方法，特别是 fMRI，已用于研究麻醉 (Logothetis et al., 1999) 或清醒行为的猴 (Vanduffel et al., 2001)。在这些技术广泛运用之前，几个与脑活动相关的解剖技术已用来显示大群神经元的活动。这些技术现仍在被使用，且能提供很高的空间分辨率，但是，由于要求对脑组织进行组织学的处理，这些方法对受试者，也就是说动物来讲是有侵害的。

($[^{14}\text{C}]$ -2-脱氧葡萄糖放射自显影法) 在动物模型上，最直接的方法之一是 $[^{14}\text{C}]$ 和 / 或 $[^3\text{H}]$ -2 脱氧葡萄糖放射自显影法 ($[^{14}\text{C}]$ -2-deoxyglucose autoradiography method, 2-DG 方法)。这个技术是由 Sokoloff 和他的同事们在 70 年代 (Kennedy et al., 1976) 发明的。该方法根据成熟神经元不能贮存糖原，因而它们对能量的需求完全依赖于血液葡萄糖的不断供给的原理而建立。2-DG 通过与葡萄糖相同的亲合机制，以竞争的方式被运送至神经元。2-DG 还以与葡萄糖竞争的方式被己糖磷酸激酶磷酸化。但由于它不能以正常的方式被进一步代谢为 6-磷酸果糖，因而在细胞内累积。因为葡萄糖的摄取与神经元的能量消耗直接相联，它也与神经元的代谢活动相关。在系统地引入 2-DG 后，对神经元群的不同刺激导致 2-DG 的不同的累积 (Hand, 1981)。

运用此技术，可以给麻醉动物特定的刺激，如单眼视觉刺激、重复的体感刺激、或单纯的听觉单音。对这些刺激选择性敏感的神经元被料想需要较大量的葡萄糖以支撑其较大的活动。如果给受试动物静脉注射放射性 2-DG，标记物应被有更多反应的神经元摄入，经组织学加工处理之后，这些标记物能被看到。这个技术能提供很好的分辨率，也可与其它的实验技术同时使用 (如 Tootell et al., 1988) (图 2-8)。

[即早期基因] 2-DG 方法日益被其它一些与活动相关的解剖学的标记物所取代。即早期基因 (immediate-early genes) 如 c-fos, jun, 和 zif268 能被特定的刺激“启动” (Morgan and Curran, 1991, 1995)，对这些特定刺激反应的神经元能通过对 mRNA 的原位杂交或通过抗蛋白产物的免疫细胞化学反应而显示出来。与 2-DG 法比较，这些新方法在细胞水平上有更好的分辨率，并且由于该方法建立在免疫细胞化学基础上，不含放射性标签。另一个优点是原位杂交可与免疫细胞化学结合起来运用，从而能比较细胞对两个不同时间的事件的反应 (分别地，对 mRNA 的表达很快，而对蛋白质的表达需要稍长时间；图 2-9) (Chaudhuri et al., 1997; Chaudhuri and Zangenehpour,

2002)。与其它的活动一相关标记物相同，这些方法的缺点是需要非常严格的控制以保证信号确实是与特定的刺激相关，而不是由其它别的原因引起。

2.6. 现代技术

通过运用分子生物学技术，近几年来在仪器和神经解剖技术方法方面有几个引人注目的进步。

[激光扫描共聚焦显微镜] 激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscopy) 通过大幅度改进荧光染料染色图像的分辩率，对免疫组织化学、原位杂交、组织化学、细胞内标记和通路追踪都有积极的影响。这个领域卓越的理论和技术进步是基于 Marvin Minsky 在 1957 年提出的有关共焦光系统的理论。简而言之，此方法是通过位于显微镜轴上的小针孔，从一个置于聚焦照明的扫描平面上的组织切片上获得信号的，可使用激光作为光源获取轮廓鲜明的图像，并且能用共聚焦显微镜特设的图像分析软件进行处理 (Pawley, 1995; Paddock, 1999)。结果能显示清楚的神经元的形态，包括诸如树突棘和突触末梢的细微结构。尽管实际的突触联系需要用电镜加以证实，但利用共聚焦显微镜的资料进行三维重构的颜色图像现在已被广泛使用 (图 2-10)。

[双光子激光扫描显微镜] 另一个较新的技术是非线性光学显微镜技术。该技术依靠脉冲激光与生物样本中的特殊分子的相互作用引起荧光的发射。这样的特殊分子或自然存在于生物样本中，或通过遗传学的方法及其它手段引入。最普遍使用的非线性技术是双光子激光扫描显微镜 (two-photon laser scanning microscopy)，它可几乎同时吸收 (常常是近红外的) 两个光子。双光子激光扫描显微镜的主要优点是光线能较深地穿入生物组织，而且光照本身带来的毒性很小 (Denk et al., 1994)。由于其较深的穿透性，使得在完好的脑中对单个神经元的突起及其活动的成像成为可能，甚至在活体的动物上也可进行高分辨率的光学实验。这样可以尽可能地保留原来的生理条件，并使网络结构完好无损 (Helmchen and Denk, 2002)。

[原位杂交] 原位杂交 (*in situ hybridization*) 可从组织学上探测神经组织中的功能分子和组成分子的基因的表达。Spiegelman 及其合作者在 1964 年描述了在体外实验中分离的 DNA 和 RNA 单链的配对核苷酸序列之间的杂交现象。利用这个现象进行实验的方法是由 Gall and Pardue 在 1969 年首先发明的 (Gall and Pardue, 1969)；此后，这个方法得以迅速改进和发展 (Simmons et al., 1989)。首先制备从 mRNA 来的

探测探针，即互补的寡核苷酸（cDNA 和 cRNA）碎片，并被放射性同位素（ ^{32}P , ^{35}S 和 ^3H ）或非放射性分子（如生物素和地高辛）标记；这些被标记的探针能够“报告”待探测的核苷酸中杂交信号的精确位置。细胞体中的杂交信号能用常规的光镜或荧光显微镜检测。通过原位杂交和免疫组化相结合，在同一组织中能同时探测某一特殊基因的表达和其它基因的蛋白产物。

[基因操作和病毒载体] 基因操作（gene manipulation）对新型的细胞标记方法和通路追踪技术的发展都有较大的贡献。外源性基因，即不是实验动物（本身）具有的基因，被操纵后与此动物本身具有的基因共存时，能被用作“报告者”。如绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP），其基因是从水母（jellyfish）克隆而得到的，就可用于这样的目的（Prasher, 1995）。报告基因能被引入核苷酸序列的一个适当的位置，如靠近一个对某类细胞是特异的启动子区，以便确保只有作为目标的细胞亚群会被 GFP 标记。

各种各样的病毒载体（virus vectors），如 adenovirus, pseudorabies, herpes simplex virus，也可用作外源性基因被引入（Yuste et al., 2000; Yoshihara, 2002）。对基因被改变后的小鼠也能进行重要的功能分析。例如，破坏 NMDAR1（一种基本的 NMDA 受体亚型基因）对于调查 NMDA 中介的突触后活动的重要性是一种很有用的方法（参见 Iwasato et al, 2000）。

2.7 人体神经解剖

由于神经解剖方法大都有侵害性，所以大部分可用的资料都来源于动物模型。若能对人脑进行更多的直接研究会更有意义，因为这些研究可能告诉我们种类间、甚至人与低于人的灵长类动物之间的不同，以及人脑对于语言、抽象计算和其它更高的认知功能的特化（参看 Crick and Jones, 1993）。标准的研究连接的实验，要求注射示踪物质进入活动物的脑中，并对脑进行灌流及组织学处理，这样的实验是不可能在人体上进行的。虽然不是很成功，但已有几个被用于研究死后脑组织的改进方法。

[损伤—退变方法] 其中一个方法是在死后的脑上染退变的神经纤维（仿效早期的损伤—退变技术，如上述的 Nauta 方法），因为死后的脑已受到某些局部的损伤，如在死前的某个时候中风或丧失部分视觉功能。两半球皮层视觉区通过胼胝体的彼此连接就是用这种方法进行研究的（Clarke and Miklossy, 1990）。通过与动物研究

结果 (Zilles and Clarke, 1997) 以及与人的成像研究结果 (Tootell et al., 1998) 比较, 所获得的半球间的连接模式已在一定程度上得到证实。

[Carbocyanine dyes] 第二个能用于死后组织的示踪方法是 carbocyanine dyes。这种染料是亲脂性的, 并能沿纤维通过扩散 (顺行和逆行两个方向) 被动运送。DiI 已用于证实内部连接的一些研究中。例如, 根据 DiI 标记的内部连接的不同模式, Galuske 等人认为与语言处理有关的人的左右脑颞叶皮层的柱状结构在两半球之间是非对称的 (Galuske et al., 2000)。遗憾的是在固定过的灵长类组织中, 即使花几周或几个月的时间, DiI 也只能扩散相对来说比较短的距离 ($< 5.0\text{ mm}$; Burkhalter et al., 1993)。因此, 如果没有新的改进, 这种方法并不适用于对长的外部连接的研究。

[Golgi 法] 此外, Golgi 法也能运用于人脑组织的研究。但正如用于动物研究那样, 此法的主要问题是其比较随机的作用方式 (不能预测结果); 尤其是对于长距离连接的研究利用此法难以得到令人满意的结果。

[细胞色素氧化酶] 在神经元群水平, 细胞色素氧化酶 (CO) 能用来揭示人的视皮层中与功能相关的斑块和眼优势柱 (Horton and Hedley-Whyte, 1984)。在绘制眼优势柱时, 这些作者使用了死前多年一支眼球被摘除的病人的死后脑。单眼眼球的摘除导致与该眼对应的功能柱的代谢率降低。利用此原理, 与两眼对应的功能柱能被不同地染上色。

[免疫细胞化学] 与上述连接研究的较大的局限性比较, 免疫细胞化学技术已成功地运用于人脑组织的研究中。虽然在组织固定前相当长的死后耽搁 (几小时范围) 是不太理想的 (参看 Preuss and Coleman, 2002), 但正如在动物组织上使用的那样, 各种抗体 (如抗神经纤维、抗递质及抗各种受体的抗体) 已常用于人脑组织。另一可供选择的是外科活检材料。这个方法已较成功地使用 (如 Gonzalez-Albo and DeFelipe, 2000), 但必须非常小心地看待结果, 因为这些材料极可能已有病理变化。

[电镜] 电镜已运用于死后人的组织或活检标本。虽然仍然存在着同样的组织保存不太理想的问题, 但通过与灌流的动物标本进行对比, 也提供了一些有用的结果。

[受体放射自显影术] 利用死后的组织, 能对各种受体所在的层和区域的分布进行研究。受体结合的位置能通过带放射活性标记的配体而看到, 如用 [^3H] kainate 标记谷氨酸 kainate 受体或者用 [^3H] pirenzepine 标记毒碱型 M1 受体。受体 (分布) 构筑图能与细胞和神经纤维构筑图进行对照, 能更正确地对应区域及区域间的界限进行划分 (Amunts and Zilles, 2001)。

[神经成像技术] 在过去十年里，随着无损害的神经成像技术，特别是 fMRI 技术的发展，我们对人脑的功能特化和功能网的研究已取得迅速进展。虽然对这些脑活动的研究结果必须加以小心地解释，但将人的损伤研究结果与实验动物研究的结果进行对比，许多从神经成像技术得到的结果已被证实。一种更新的 MRI 技术，即 diffusion-weighted tensor imaging (DTI) 技术，已在几个实验室运用，可在活的动物及人体上研究大通路连接。这些技术及其运用的例子在本书的其它章节有更详细的描述。

3. 脑皮层区域

脑皮层由多个脑区构成，能用几个不同的标准（如细胞构筑、神经纤维构筑、受体构筑、解剖连接、不同类型细胞的分布、拓扑图（区域映射图）结构和细胞反应的性质等）进行区分。皮层区可粗略地分为初级和非初级区。初级区通过丘脑中的特殊感觉核与外周部位（视网膜、耳蜗或皮肤）密切地联系，它们具有特化的细胞类型。这些细胞有较小的感受野和相对特殊的反应性质。初级皮层区按照可辨认的有规律排列的拓扑图而组织，形成如视网膜区域映射图，耳蜗区域映射图以及就感觉皮层而言的皮肤区域映射图。初级皮层的局部损伤会导致特异于感觉通路的和在空间上有局限的损伤，如损伤视皮层导致视野盲点，正如损伤外周视网膜或视神经所导致的结果那样。

非初级皮层也有可辨认的结构和生理特征，但一般不易确定。与外部世界相关的结构图组织得不是很有条理，或许它们是通过其它的标准而非拓扑图的标准进行组织的。非初级皮层以一个简单感觉种类、或是以几个感觉种类为主。早的或中间的感觉区直接或通过较少数目的突触“交接”与初级区相连接。高级感觉区与初级区之间的连接则比较间接。在这些脑区的神经元有更多的抽象反应性质，如与空间结构有关（在顶叶的某些区），或与记忆相关的功能有关（在额叶和颞叶皮层的某些区）。这些脑区也被称为联合皮层，传统上认为它们对不同刺激和概念的整合或联合有重要作用。

3.1. 细胞类型

皮层区主要由锥体神经元（pyramidal neuron）构成。除第一层外，锥体神经元的细胞体分布于其它各层。锥体神经元的特征是其顶树突呈放射状直达软脑膜表面，典

型的锥体神经元的细胞体呈圆锥形。其它的树突，即基树突从胞体的基部呈放射状发出。通常锥体神经元的所有树突都带有棘（相当于突触后位点）。顶树突和基树突的起始部位有时或许缺乏树突棘；但除少数例外（DeFelipe and Farinas, 1992），这些树突棘大量覆盖于初级树突的较远端部分，以及第二级、第三级的树突分枝上。锥体神经元轴突的特点是从胞体的基部发出，或从靠近胞体的基树突中的一根上发出，然后朝着白质垂直地下降，常常发出水平或细柔的回返分枝（图 2 — 1）。所有的锥体神经元都是兴奋性的，且大部分通过轴突突起向外投射至其它皮层或皮层下结构。锥体神经元看上去非常相似，但若仔细检测，基于连接、树突与轴突的形态、生物物理发放特性（Angulo et al., 2003）以及各种分子标记物的分布（Feldman, 1984）的不同，它们能被进一步分为若干亚种。

在所有的脑皮层区大约 20 % 的神经元是局部回路（local circuit）或中间神经元（interneuron）。这些神经元如篮状细胞（basket cell）、双花束样细胞（double bouquet cell）和吊灯状细胞（chandelier cell）都用 GABA 作为神经递质，并主要起抑制作用。它们构成 6-12 个较粗略的亚型，每一亚型都有不同的树、轴突形态、不同的突触靶、和不同的肽内含物；Fairen et al., 1984）。最近，基于中间神经元的发放性质与其它标准的相关性，一些研究者提出了更多的亚型（Gupta et al., 2000）。抑制性中间神经元与锥体神经元群以及其它的中间神经元相互作用，但我们才刚刚开始对这些作用的重要方式有所了解。

单个神经元可具有某些显著的特殊性质。对单个神经元的生理记录显示，不同的神经元对声音、颜色、运动方向，以及对实体，如脸，有不同的特殊选择性。然而，一般而言，在哺乳类动物的脑中，功能被认为主要依赖于神经元的聚集体或神经网络而不是单个神经元。这些聚集体在皮层中组成水平走向（平行于脑表面）的层状结构和垂直走向（垂直于脑表面）的柱状结构。

3. 2. 层状结构（Lamination）

大脑皮层区通常被认为是一个 6 层结构（图 2 — 5）。不同的层含有比例不同的小、中、大神经元，并且这个比例随脑区的不同而相同。正如将在后面更详细描述的那样，不同的层有不同的连接方式。第 1 层和第 4 层只接受传入连接，而其余层的神经元都或多或少地投射至不同的外部靶（除第 1 层和第 4 层外，其它层既接受也发出投射）。每一层都有不同的微环境，这是由于不同的层有不同的解剖连接、受体密度

以及其它的一些分子。此外，许多物质，如神经营养因子对不同的层也有不同的效应。然而，必须记住层并不是僵化的、可清楚分开的结构。树突几乎总是限于其母细胞所在之层，并且大多数锥体神经元都具有一个从主轴突分出的由内部轴突侧枝组成的复杂系统。这些因素允许层与层之间，以及层内部（或脑区内）的相互作用的大联合（见下）。

3.3. 柱状结构（columnar organization）

新皮层的一个基本特征是柱状结构。在生理学上，柱被定义为贯穿皮层所有的层并具有相似的神经元（反应）特性的结构，如众所周知的啮齿类动物的体感皮层的桶状区（barrel field）和猴的初级视皮层的眼优势柱（ocular dominance column）。同一柱中的神经元共同具有某些不变的以及生理学上动态的性质，在此基础上它们还可具有其它的一些特性。不同的柱，特别是那些有共同反应特性的柱，由短距离的水平连接相互连结。这些连接常延伸 2.0-3.0 mm，有时也可从胞体伸出长达 5 mm。柱状结构允许柱内的神经元间歇性地反复地形成对刺激物反应的选择性，因此几种选择性能共同表达在新皮层的两维表面上。

虽然垂直结构的重要性得到了普遍公认，但其许多方面仍不是很清楚。不同动物种类间以及同种动物不同脑区间的大柱（macrocolumn）的直径一般比较一致，大约 0.3-1.0 mm。但若从不同的角度观察，甚至在某些脑区内大柱的尺寸也有所不同 (Rockland, 1998; DeFelipe et al., 2003)，如眼优势柱在中央凹表征区就要稍微大一些 (Horton and Hocking, 1996)。按照某些研究者的观点（如参见 Mountcastle, 2003），皮层的大柱由许多小柱（minicolumn）形成。小柱的直径约为 60 μm ，含约 80—200 个神经元，包括约 20% 的 GABA 能神经元（图 2—11）。有几个结构的确在这个大小范围内，但仍然不能确定这些结构是否形成某种均一“单元”的组成部分，或本身就是有多重空间尺度的结构（Rockland, 1998; Jones, 2000）。

Lorente de No (1938) 对 Golgi 染色切片进行仔细分析后，在解剖的基础上强调了垂直结构的重要性；但有关新皮层柱状结构的电生理的证据首先来自 Mountcastle 及其同事们对麻醉猫体感皮层的单神经元的研究（Mountcastle, 1957）。若将微电极垂直于软脑膜表面插入皮层，在每一层遇到的神经元都具有相似的性质；若将电极平行于软脑膜表面穿过皮层的垂直轴，那么在 0.3-0.5 mm 大小的组织区段内记录到的神经元的性质也基本相同。明显的转变可从有相同性质的一个区段到相邻的有不同性质的区

段观察到。这些观察使得 Mountcastle (1957) 提出了这样的假设：位于细窄的垂直的柱或圆柱体（从第 2 层延伸至第 6 层）中的神经元组成一个基本的结构单元，即柱。

当柱状结构的假设最早被提出时，传统的皮层层状结构的概念仍占优势，而且对于每一细胞层的功能特化的建议经常被提出。在 Mountcastle 最初的观察中，他强调的柱的假设是基于神经元的早期重复性反应，并提及如考虑神经元的后期放电的话，结构的模式也许不同，某些特定的动态变化或许源于柱周围的抑制活动。这些无法用当时使用的解剖方法来揭示。最近的发现似乎提示柱内上层和下层有所不同（Hirsch et al., 2002; Monier et al., 2003），因而有必要对柱状结构进行再检测和更细致的改进。

六十年代，一些研究者特别是 Hubel 和 Wiesel 对哺乳动物视皮层的结构和功能进行了广泛研究，并取得了了不起的成就。Hubel 和 Wiesel 首先在猫（Hubel and Wiesel, 1962），然后在猴（Hubel and Wiesel, 1968）上确立了柱状结构。初级视皮层的柱状结构可以通过眼优势柱、视网膜区域定位（受膝状体传入连接的影响）、以及方位特化（由丘脑和皮层内加工形成）的神经元的性质来确定。初级视觉皮层的神经元主要被来自处在视野的特殊位置上的左眼或右眼的传入信号所驱动。若将电极垂直于软脑膜表面插下入皮层，遇到的神经元的性质是不变的；若将电极沿切线（平行于软脑膜表面）穿过皮层，遇到的神经元的眼优势、视网膜区域表征以及方位选择性会有规律地发生变化。方位选择性随电极穿过的部位改变而逐渐改变；一个完整的连续表达 180° 方位变化的序列（最初称为方位超柱 hypercolumn）在皮层上大约覆盖 0.5-0.75 mm 的距离（图 2-12）（有关方位选择性请参看 Schummers et al., 2002; Monier et al., 2003）。

眼优势柱系统是皮层内拥有不同功能构筑的最清晰明了的例子之一。眼优势柱的电生理结果随后用许多解剖学的方法进一步得以证实。将 [³H] 脯氨酸注射入猕猴的一只眼导致标记物从丘脑外侧膝状体（LGN）到初级视皮层的第 4C 层的跨神经元运送。轴突末梢在皮层内形成斑块，当观察与脑表面平行的切片时，可见其形成非常有特征的条纹。被标记和未被标记的条纹，分别对应于注射眼和未注射眼的末梢野，交替出现在第 4 层，并且它们的宽度几乎相等（约 0.3-0.5 mm; Wiesel et al., 1974）。将顺行示踪剂注射入 LGN 中的接受单只眼传入的层也能产生眼优势柱。利用 2-DG 方法（Kennedy et al., 1976）可观察到穿过所有层的板片状的眼优势柱。这些板片状的柱是直接的丘脑皮层传入与皮层内连接交融在一起后产生的结果。

眼优势柱和方位柱（orientation column）也可用光学成像方法看到。利用此法，方位柱的几何形状被揭示得更加详细，并且其与眼优势柱的关系也更清楚地显示出来（如 Frostig et al., 1990; Blasdel, 1992 a, b; Obermayer and Blasdel, 1993）。此技术显示方位柱在同一方位方向上形成约 0.5-1.0 mm 的板片，并且大约 0.6 mm 重复一次 180° 方位选择性的（顺时针或逆时针）旋转。这些线性区域，对应于 Hubel 和 Wiesel 观察到的经典图像约占皮层表面的 50%，它们多半位于眼优势柱的边缘，与眼优势柱几乎成直角交叉。在这些用光成像技术获得的更新的图像中，非线性区域，包括在“纸风车”（pinwheel，请见下面说明）中心的“奇点”（singularity）也能鉴别出。奇点是当其周围的方位选择性连续地发生 180° 变化时（这样的方位柱图呈放射状分布，看上去就如纸风车）产生的点状的不连续区域。奇点常位于眼优势柱的中心（图 2 — 1 2，C）。

一些研究显示在联合皮层区也有一定程度的柱状结构。与初级感觉皮层区相比较，在联合皮层内有关柱的确定参数是在皮层内加工系统中形成的神经元性质，而非直接的与传入连结的解剖模式。在联合皮层，动态和可塑性成分显得更加明显。

在一系列的电生理、解剖和光学成像研究中，Keiji Tanaka 及其同事们在猕猴的颞下皮层的 TE 区发现并详细阐述了对物体的视觉特征有选择性的柱（Tanaka, 1996, 2003）。TE 区位于腹侧视觉皮层通路，含有对物体的中度复杂的视觉特征有选择性反应的神经元。当一个电极垂直于脑皮层（TE）表面插入皮层时，遇到的神经元多对相似的（虽然不必是同一的）刺激产生反应，因而形成直径约为 0.5 mm 的“物体柱”（object column）。相互位置靠得比较近的神经元常常对同样的刺激起反应；而当电极平行于皮层表面穿过皮层时，可以证实表征相似的物体视觉特征的柱能在多个位置重复出现。从 V4 区和 TEO 区来的传入环路的解剖证据支持这种对 TE 区柱状结构的解释。正如在初级视皮层那样，TE 区的柱状结构也可用光成像与单细胞记录结合的方法显示。当一张脸的不同侧面像作为刺激被显示时，由每个侧面像诱发的活动被集中于直径约 0.3-0.4 mm 的小斑点内（可以用电生理方法证实斑点内的神经元对脸的刺激产生反应）。被不同侧面像激活的斑点局部重叠，而且有趣的是它们在一个直径约为 0.8 mm 的范围内有规律地移动（Wang et al., 1996）。这些光成像的结果提示表征不同但相关特征（如在不同的视角，不同的距离，以及不同的明暗度下观测相同的物体）的柱可以在 TE 区相互重叠，并在总体上构成一个较大尺度的、连续的功能单位（图 2 — 1 3）。

4. 皮层连接

锥体神经元有较长的投射至相距数毫米或数厘米的靶的轴突。正因为如此，单个神经元被嵌入一个复杂的内部连接和外部连接的网中。皮层连接不是“点对点”的，而具有明显的发散和会聚的构筑特征。一个典型的锥体神经元发散传出到其它几百甚至几千个神经元；相反，同一神经元可接受超过 6000 的会聚传入。这些传入有几个来源，但主要（约 80 %）来自附近的锥体神经元或非锥体神经元。按照“稀少连接性”的原则，人们相信锥体神经元与其它任何一个锥体神经元仅有 1-2 个突触联系。吊灯状或篮状中间神经元能与同一突触后细胞形成 10-20 个突触，这个突触数量被认为是比较大的（DeFelipe and Farinas, 1992, p. 569 ; Somogyi et al., 1998）。

皮层所有的区都接受为数众多的内部和外部的连接。我们对大部分皮层区的基本连接已有所了解。如初级视皮层与视觉丘脑紧密连接，但除了皮层区外，它也接受其它二十个皮层下结构来的直接传入（Tigges and Tigges, 1985）。联合皮层间的连接甚至更多。在下面的部分里，我们将描述几个重要的皮层连接系统，即丘脑与皮层的连接（丘脑皮层连接，thalamocortical connection）、皮层区内的连接（内部连接，intrinsic connection），以及联结几个皮层区的连接（外部皮层皮层连接，extrinsic corticocortical connection）。

4.1. 丘脑—皮层连接

丘脑是一个比较大的并含有多个亚核团的皮层下结构。这些核团与不同的皮层区形成交互连接。特殊的丘脑感觉核接收从外周感觉器官来的传入连接，然后投射至初级感觉皮层区。例如，从视网膜到初级视皮层的视觉信息就是通过丘脑中的外侧膝状体进行中转的。不用说，这些结构不是被动的中转站，神经系统的加工过程甚至在皮层下水平就已经开始了。

丘脑皮层连接是外部传入到初级感觉皮层的一个主要来源；它们对神经元形成特异的反应是必不可少的。也就是说，可以用电生理记录的方法证实，通过自然发生或实验有意损伤而消除丘脑传入会导致初级皮层区丧失对视觉、听觉或体感觉的反应性。然而，令人难以理解的是丘脑皮层连接仅占有所有传入的很小一部分（< 10 %）（Thomson and Bannister, 2003）。

丘脑皮层连接具有不同的亚感觉道的性质，这主要是源于特异于感觉道的丘脑核内的不同的层。在皮层内这些连接常常终止于不同的层并具有不同的轴突树形态。在初级视皮层内，源于外膝体小细胞层并终止于 4C β 和 4A 层的膝状体皮层轴突与颜色和形状的知觉有关，并有相对小的末梢树（直径约为 0.25 mm）。对比之下，其它的源于外膝体大细胞层并终止于 4C α 和 4B 层的轴突与刺激的运动知觉有关，并有相对大的末梢树（Blasdel and Lund, 1983）。这两类轴突可认为是视网膜上视锥与视杆细胞系统的延伸，它们分别与高分辨率或高敏感性有关。就这种情况而言，小末梢树或许对比较高的分辨率有影响，而大末梢树（大概借助于大量的皮层神经元）或许能取得更大的敏感性。视觉信息进一步被中转至 2、3 层，然而至 V2 区时，这两个系统的分离继续存在于不同的可以用细胞色素氧化酶法染色分开的小区间里。小细胞和大细胞的分离持续于 V1 之后，并被认为是物体与颜色视觉（腹侧通路）和空间视觉（背侧通路）的皮层通路的特异性的基础（Felleman and Van Essen, 1991; Merigan and Maunsell; 1993, Lennie, 1998; Sincich and Horton, 2002）。

一般而言，到灵长类第 4 层的丘脑皮层投射源于 parvalbumin 阳性的丘脑神经元，它们以特异于层和区的方式非常有规则地排列在一起。另一个 calbindin 阳性的丘脑皮层神经元系统也已被确认，这些神经元以发散的方式投射至皮层的表面层，甚至延伸越过用细胞构筑法定义的脑区的边界（Jones, 1998）。（注意 parvalbumin 或 calbindin 阳性的丘脑皮层神经元并不是抑制性的，它们与含有这些钙结合蛋白的皮层中间神经元不同，参看如 Steriade et al., 1997, p. 127）。

4.2 内部连接

内部连接也称为水平连接，指那些不在白质中穿行并典型地与母神经元留在同一皮层区内的轴突。当母神经元位于靠近另一皮层区的边界时，内部连接的轴突或许在同一区内和/或跨过界限在另一区内分枝，但不进入白质。大部分的内部连接由锥体神经元轴突的大量回返侧枝形成。一些大的蓝状细胞有时也有从胞体伸出长达 1.0 - 1.5 mm 的轴突（Kisvarday et al., 1993），但大多数中间神经元仅提供非常局部的抑制性连接。

在早期视觉皮层，内部（以及外部）连接与 CO 斑点系统有关。这些斑点为直径约为 1.5 mm 的不规则圆形体，对应于代谢活动比较高的区域。它们主要位于 2、3 层，并沿眼优势柱的中心部位分布（图 2—6）。

借助 CO 组织化学及光成像技术并结合使用敏感的示踪剂如 biocytin 和 BDA 来显示轴突末梢的分布，一些实验已揭示了内部连接结构与 CO 斑点间的关系。例如，有报道显示一个位于第 3 层的水平投射的锥体神经元可平行于皮层表面延伸达 6 mm，并发出末梢丛支配对应于同一只眼的 CO 斑点或斑间区域（Gilbert, 1992）（图 2—14）。Malach 及其同事们也证实了源于同一方位选择性领域的末梢丛倾向于终止在有相同方位选择性的柱中（Malach et al., 1993）。类似地，在 V2 区富含 CO 的宽带或窄带也通过内部连接与相象的条带相联系（Malach et al., 1994）。内部连接被认为在调节不能用传统的感受野来解释的大范围知觉的动态变化时是重要的（Allman et al., 1985）。阐明内部连接功能意义的研究仍是系统神经科学里最活跃的研究领域之一。

4.3 皮层—皮层连接

外部连接，或皮层—皮层连接，将位于不同皮层区的神经元相互连接在一起。敏感的逆行和顺行示踪剂在七十年代的发展使得确定母投射神经元（主要为兴奋性锥体神经元）及其末梢树在各层的分布成为可能。根据这些标准，已区分出三大类皮层皮层连接，即前馈连接（feedforward connection）、反馈连接（feedback connection）和侧向连接（lateral connection）。这些连接在许多系统，特别是在早期视觉区已研究得很详细（Salin and Bullier, 1995）。前馈投射由某一区（如 V1 区）的第 3 层神经元发出，终止于一较高区（如 V2 区）的第 4 层。大多数反馈投射的神经元位于某一区（如 V2 区）的第 6 层，并且就目前所知，不与前馈投射神经元相重叠；它们绝大多数终止于一较早区（如 V1 区）的第一层，但也终止于较深层，特别是第 5、6 层。侧连接主要源于第 3、5 层，并以柱状方式终止于皮层的所有层（Rockland and Pandya, 1979）（图 2—15）。

此外，半球间的连接，也称为胼胝体连接，在猕猴的大多数皮层区源于浅颗粒层（或在某些联合区源于第 3、5 层）（Van Essen et al., 1982）。胼胝体连接有同位连接和异位连接两种，前者是至对侧半球的对应区（如 V2 到 V2）；而后者，密度较

小，则投射至接收同侧连接的相同脑区的所有或部分区域。胼胝体连接的轴突末梢的层分布似乎与半球内的皮层皮层连接的末梢层分布相同（Kennedy et al., 1986）。

然而，应该强调的是皮层皮层连接的分类是一个复杂而基本上未解决的问题（参看 Crick and Koch, 2003）。造成这种现状的部分原因是对锥体细胞的精细分类的研究远远落后于对中间神经元的分类的研究，也落后于对丘脑皮层连接的研究。在猴的视觉系统，对膝状体皮层连接的确切分类基于母细胞在外膝体中所在的层，它们的生理反应特性，它们终止在 V1 区的亚层靶以及它们在 V1 区的末梢树的大小。如此确证的资料则难以从长距离的皮层皮层连接中得到。就皮层皮层连接的研究而言，我们通常只有单独的有关起源细胞或它们的轴突末梢的资料，但缺少同时包含两者的资料。

再者，甚至皮层皮层连接起源的层和末梢的分布实际上也要比上面简单描述的复杂得多。有关它们的知识一直在不断地更新。利用更敏感的示踪剂如荧光染料、BDA、PHA-L 或 biocytin，最新的研究已揭示，大部分的皮层皮层连接不仅源于第 3 层（前馈）或第 6 层（反馈）的神经元，而且源于其它层的神经元。例如，投射至猕猴 MT/V5 区的不光只是 V1 区 4B 层的神经元，还包括来自第 6 层的 Meynert 神经元（Shipp and Zeki, 1989）。从 V1 到 V2 的前馈连接除了主要来自 V1 的上层外，也有部分来自第 5 层的神经元（Kennedy and Bullier, 1985）。在 V1，第 3 层及 4B 层的神经元均投射至 V2（Rockland, 1992）（图 2 — 1 6）。

至于轴突末梢的层的分布形式，一旦用高分辨率的示踪剂进行分析，结果也要比最初意识到的更为复杂。例如，从 V1 区投射至 MT/V5 区的神经元的末梢主要分布于第 3~4 层，但也出现于第 6 层（Rockland, 1989）投射至 V4 区的 V2 区神经元的末梢多见于第 3、4 层，但也分布于其它各层（Rockland, 2002）（图 2 — 1 7）。在颞下皮层，从 TEO 区投射至 TE 区的末梢分布主要为柱状，支配几乎所有的层（Saleem et al., 1993）（图 2 — 1 8）。换句话说，反馈和前馈连接的“互补”形式仅仅是粗略的。我们或许需要考虑其它的可供选择的解释，例如梯度倾向性。一些研究者提出了一个“距离规则”，即脑内毗邻或相互靠近的区之间趋向于有更稠密的连接，并有更多的层参与这些连接（Kennedy and Bullier, 1985; Salin and Bullier, 1995; Rockland, 1997）。

有关皮层皮层连接的另一主要原则是脑区间的交互连接。然而在猕猴，常有不遵循这条规则的例外。在已确认的猕猴同一半球内视觉皮层区间的 300 多个连接中，大约 20 % 的连接是单方向的（Felleman and Van Essen, 1991; Young, 1992）。例如，V1

区仅发出前馈投射至附近的几个区，包括 V2、V3 和 V4 区，但它接受的反馈投射却来自更多的区，包括颞下皮层的 TEO 和 TE 区（Rockland and Van Hoesen, 1994; Rockland and Drash, 1996）。反馈连接一般也比前馈连接更发散，并倾向于在靶区内延伸较大的范围（Salin and Bullier, 1995; Rockland, 2002）。用单个轴突重构和/或逆行示踪剂双标记的方法显示一部分神经元可以通过发出分枝投射至多个脑区（Kennedy and Bullier, 1985; Rockland and Van Hoesen, 1994; Rockland and Drash, 1996; Cheng et al., 1997）

4.4 等级排列

将皮层皮层连接分为三类的分法已被用来以等级方式排列皮层区。在视觉系统，V1 区处在“最低”水平，而外纹状视皮层区和联合皮层区则处在“较高”水平。皮层区等级顺序的构成规则是：一个区在某一给定的“水平”接受从较低水平区来的前馈连接，发出反馈连接到这些同样的较低水平的区，并与处在同样水平的区交换侧连接（Felleman and Van Essen, 1991）。交互的前馈和反馈连接是建立脑区的等级顺序的重要线索。等级观念与存在多个皮层区，以及从低水平区到高水平区反应性质的逐步复杂化是一致的。它已被用作系统阐述功能结构的一种快捷的方式。

尽管这样一个有顺序的结构很诱人，但这个等级系统不能完全说明一些最近的观察结果。例如，虽然皮层区常常交互连接在一起（如上所述），但它们也通过其它方式，包括通过大的皮层—皮层下一皮层环以及投射轴突侧枝到两个或更多的脑区而相互作用。一些神经元的单个轴突从 TE 区投射至嗅周皮层/TG 区，同时也投射至杏仁核/纹状体（Cheng et al., 1997）（图 2—19）；另一些单个轴突则发出反馈投射至 TEO 和 V4 区，到 V4、V2、和 V1 区，或者到 V4、V3、V2 和 V1 区（Rockland and Drash, 1996）（图 2—20）。此外，任何所给出的连接系统都不完全相同。从解剖角度看，不同连接由不同直径的轴突形成，因而相应地具有不同的传导速度。因此，在一个区内或在相互连接的几个区内，对一个实验刺激生理实验可以给出一个范围很广的反应潜伏期。这些实验显示沿着一组相互连接的（有等级的）皮层区，平均在每一站约有 10 ms 的延迟。但这样的报道并不代表一切。如在视皮层系统，当 50 % 左右的 V1 区神经元对一个刺激发生反应时，43 % 的 V2 区的神经元也同时对同一刺激起反应（Nowak and Bullier, 1997）。事实上，一些 TE 区的神经元对刺激的反应或许比 V1 区里的一些神经元还要早。这些脑区内的反应差异的功能意义刚开始在人体上

通过结合心理物理学和神经成像〔事件相关电位（ERPs）或脑磁图（MEG）〕的研究得到初步理解。

从现代的观点来看，基于一成不变的有等级顺序的连接模式似乎过于僵化。最近有许多研究着眼于寻找一些方法来表征和考察非线性网络效应。一些模型已为功能神经成像而提出，但一般说来也与脑区间的相互作用相关，包括那些基于回归法的模型以及基于结构方程式的模型（Friston, 2002）。

5. 连接组学

连接组学（connectomics）的研究目标是理解和分析全脑的神经连接。连接组学英文单词的前半部 connect-，是指神经环路的连接，后半部-omics 是指全面和详细的分析。连接组学的概念类似于基因组学（genomics）或蛋白质组学（proteomics）。最近十几年，受到欧洲 Human Brain Project 和美国奥巴马政府和国立健康研究所（NIH）的积极推动，连接组学得以快速发展，已经成为新的热点研究领域。

5.1. 整体目标和发展历史

连接组学的整体目标是要理解人类大脑的全部神经环路及连接。要实现这一目标，除了在生物学层面上的广泛和深入研究，还需要有新技术上的突破，包括新的显微镜成像技术、新的示踪或标记技术、新的转基因方法和新的计算机分析软件。需要指出的是，连接组学有可能会成为一个全新的、独立的研究领域，因为传统意义上的神经科学主要集中在单个或一些神经元的结构和功能上，而连接组学是在更大范围和尺度上，对于整体神经网络的探索。在某种程度上，连接组学与神经科学的关系，类似于基因组学和基因学的关系（Shibata et al., 2015）。

在 1980 年代的中期，线虫（*Caenorhabditis elegans*）的连接组学通过手工方式被首次绘制出来（White et al., 1986）。通过电子显微镜（electron microscopy），研究者得到线虫系列切片的显微图像，然后通过手工方式对这些显微图像进行重建（reconstruction）。线虫大约有 300 个神经元，是连接组学的理想模型动物。实际上，这项工作从 1970 年代就已经开始，研究者们付出了极大的努力来完成这项工作，花费了将近十年的时间。由于大鼠约有 7500 万个神经元，人类约有 1000 亿个神经元，要探索这些更为复杂和发达大脑的连接组学，就必须发展出新的研究方法和技术。

5.2. 主要方法和技术

实际上，连接组学有不同的空间尺度，主要可以分为微观（microscale）、介观（mesoscale）和宏观（Macroscale）三个水平，对应分别是突触（synapse）、细胞和脑区间的神经连接，常用的影像技术分别为电子显微镜、光学显微镜（light microscopy）和磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）。在不同的空间尺度，遇到的挑战和困难也不尽相同，下面我们对最近发展出的一些新方法和技术做简要介绍。

5.2.1. 微观层面

在微观层面，突触是神经元与神经元之间传递信息的桥梁。微观连接组学的主要目标是构建神经组织的三维结构，并在树突和轴突水平上描绘局部的神经连接和环路。电子显微镜的放大倍数一般在几万到几十万倍之间，可以观察到突触、突触小泡（vesicles）、突触突起（buttons）、纤毛（cilia）、线粒体（mitochondria）、内质网（endoplasmic reticulum）、核糖体（ribosomes）、髓鞘质（myelin）等众多的微细结构和组织，是微观连接组学的主要工具。由于电子很难穿透水、空气和其它物质，电子显微镜一般需要在真空条件下，对非常薄（~100 纳米）的组织切片进行观察。

传统上，对于神经组织的三维重建主要采用连续切片透射电子显微镜（serial section transmission electron microscopy, SSTEM）方法，通过染色、固定、切片、覆盖等操作，该方法可以对非常薄的连续切片进行成像，并在三维水平上重构。后续的改进方法包括连续切片扫描电子显微镜（serial block-face scanning electron microscopy, SBFSEM）、连续切片电子断层扫描（serial section electron tomography, SSET）、聚焦离子束连续切片扫描电子显微镜（focused ion beam scanning electron microscopy, FIBSEM）等（Shibata et al., 2015）。

由于电子显微镜的成像一般只集中于突触前和突触后的微小间隙区域，为了探明连接组学，我们还需要知道提供这些突触背后的神经元及其类型。针对这个问题，目前研究者已经发展出了许多的标记工具和成像程序，例如通用突触编码标记电子显微镜影像技术（genetically encoded synaptic marker for electron microscopy, GESEM）、双向联合注射病毒追踪技术（double co-injection viral tracing）、免疫标记增强溶剂清除

器官三维成像技术（immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs, iDISCO）等（Cazemier et al., 2016）。

5.2.2. 介观层面

在介观层面，连接组学的主要任务是研究不同类型细胞的神经连接，探讨神经结构和功能之间的对应关系，并构建微观连接组学和宏观连接组学之间的桥梁（Zeng, 2018），主要成像工具包括普通宽场（wide field）、共焦（con-focal）、双光子（two-photon）光学显微镜等。一般来讲，神经连接不是随机而是细胞类型特异的，即相同类型的细胞倾向于具有更多的神经连接。在大脑中，大约有数百种以上的神经细胞，仅凭借形态和空间关系来定义它们之间的神经连接非常具有挑战性，而如果能区分出不同类型的神经元就可以大大简化重构任务。这里我们简单介绍一下采用荧光蛋白标记不同类型神经元的脑彩虹技术（brainbow）。

当分子吸收能量达到激发态后，它们会在较短时间内再回复到比较稳定的基态，通过发光的方式释放出能量并产生荧光。但是在细胞中，一般没有那么多能发出各色荧光的物质，需要靠人为引入荧光标记，其中绿色荧光蛋白（fluorescent proteins, FP）是最为经典的一个，研究者后续还开发出蓝色、青色、黄色和红色等不同颜色的荧光蛋白。日裔科学家下村脩（Osamu Shimomura）、美国科学家马丁·沙尔菲（Martin Chalfie）和华裔科学家钱永健（Roger Y Tsien）三人由于相关的研究工作而共同获得了 2008 年的诺贝尔化学奖。

通过基因编辑和重组技术，研究者可以将不同荧光蛋白（XFP）对应的基因片段转入细胞，让它们与目标蛋白共同表达，从而实现对细胞以及细胞中的特定结构进行标记的目的。为了将数量庞大、错综复杂的神经细胞彼此区分开，研究者使用特定的 Cre 重组酶，在酶的帮助下，细胞就可以随机地表达出各种不同的颜色，然后经过计算机分析和标记，Brainbow 可以产生超过 100 种可分辨的颜色（Livet et al., 2007）。

5.2.3. 宏观层面

在宏观层面，磁共振成像有非侵入、可长时程追踪的特点，同时还可以对从啮齿到哺乳类等多种动物的大脑进行扫描。扩散磁共振成像（diffusion MRI）可以通过测量白质神经纤维束的空间走向来描述脑区间的神经连接，其中主要有扩散张量成像（diffusion tensor imaging, DTI）和扩散张量纤维束成像（diffusion tensor tractography）

两种常用的技术。此外，采用网络分析（network analysis），同时结合功能连接技术（例如静息态功能磁共振扫描，resting state fMRI），磁共振成像还可以揭示大范围神经信息沟通和构筑方面的规律（Glasser et al., 2016）。

5.3. 未来发展方向

首先，连接组学亟需不断提高各种成像技术的空间和时间分辨率及空间覆盖范围（Economo et al., 2016），同时要提高程序的自动化程度，面对海量数据，后期的分析也要更为智能化（Lee et al., 2019; Lichtman, Pfister, & Shavit, 2016）。其次，计算机建模和模拟也是连接组学的重要组成部分，未来面临的挑战巨大（Markram et al., 2015）。第三，在连接组学基础上对结构和功能关系进行深入探讨，将为理解人类认知、情绪、脑发育和老化、脑疾病等的神经基础提供新的思路。最后，微观、介观和宏观三个水平上连接组学的整合，连接组学的跨物种比较，也都是未来研究的方向（Ecker et al., 2017; Kennedy, Van Essen, & Christen, 2016）。

6. 结语

在这一章里，我们简单地综述了几种主要的神经解剖方法并讨论了在不同水平上对脑结构的了解怎样影响了我们对脑功能的认识。对皮层结构和功能之间的相互关系的不断阐明将帮助我们找到对复杂的行为，如视知觉，运动计划，或认知过程，如记忆，语言和注意负责的皮层回路和系统。

致谢

作者谨向以下各位致以诚挚的感谢：Walther Akemann 博士提供了图 2 - 3，Noritaka Ichinohe 博士和 Hiroko Katsuno 女士提供了图 2 - 4 和 2 - 10，Adrian Edward Knight 先生和 Daniel Potapov 先生在照片的准备过程中给予了许多帮助。

参考文献

Allman J, Miezin F, McGuinness E. (1985) Stimulus specific responses from beyond the classical receptive field: neurophysiological mechanisms for local-global comparisons in visual neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 8: 407-430.

- Amunts K, Zilles K. (2001) Advances in cytoarchitectonic mapping of the human cerebral cortex. *Neuroimaging Clinics of North America*, 11: 151-169.
- Angulo MC, Staiger JF, Rossier J, Audinat E. (2003). Distinct local circuits between neocortical pyramidal cells and fast-spiking interneurons in young adult rats. *Journal of Neurophysiology*, 89: 943-953.
- Ariano MA. (1997) Distribution of dopamine receptors. In Neve KA, Neve RL. (eds.), *The Dopamine Receptors*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 77-103.
- Bailey P, von Bonin G. (1951). *The Isocortex of Man*. Urbana: University of Illinois Press.
- Banks RW. (1999a) Cytological staining methods. In Windhorst U, Johansson H. (eds.), *Modern Techniques in Neuroscience Research*. Berlin: Springer, 1-26.
- Banks RW. (1999b) Histological staining methods. In Windhorst U, Johansson H. (eds.), *Modern Techniques in Neuroscience Research*. Berlin: Springer, 437-458.
- Bishop GA, King JS. (1982) Intracellular horseradish peroxidase injections for tracing neural connections. In Mesulam MM. (ed.), *Tracing neural connections with horseradish peroxidase*. New York: John Wiley & Sons, 185-247.
- Blasdel GG. (1992a) Differential imaging of ocular dominance and orientation selectivity in monkey striate cortex. *Journal of Neuroscience*, 12: 3115-3138.
- Blasdel GG. (1992b) Orientation selectivity, preference, and continuity in monkey striate cortex. *Journal of Neuroscience*, 12: 3139-3161.
- Blasdel GG, Lund JS. (1983) Termination of afferent axons in macaque striate cortex. *Journal of Neuroscience*, 3: 1389-1413.
- Braak H. (1980) *Architectonics of the Human Telencephalic Cortex*. Berlin: Springer.
- Brodmann K. (1909) *Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Leipzig: Johann Ambrosius Barth. [English edition: Garey LJ. (1994) *Brodmann's 'Localisation in the Cerebral Cortex'*. London: Smith-Gordon.]
- Burkhalter A, Bernardo KL, Charles V. (1993) Development of local circuits in human visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 13: 1916-1931.
- Butcher LL. (1983) Acetylcholinesterase histochemistry. In Björklund A, Hökfelt T. (eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Volume 1. Methods in Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier Science, 1-49.
- Cazemier JL, Clascá F and Tiesinga PHE (2016) Connectomic Analysis of Brain Networks: Novel Techniques and Future Directions. *Front. Neuroanat.* 10:110.

- Chaudhuri A, Nissanov J, Larocque S, Rioux L. (1997) Dual activity maps in primate visual cortex produced by different temporal patterns of zif268 mRNA and protein expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 2671-2677.
- Chaudhuri A, Zangenehpour S. (2002) Molecular activity maps of sensory function. In Kaczmarek L, Robertson HJ. (eds.), *Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and Dysfunction*, Volume 19. Amsterdam: Elsevier Science, 103.
- Cheng K, Saleem KS, Tanaka K. (1997) Organization of corticostriatal and corticoamygdalar projections arising from the anterior inferotemporal area TE of the macaque monkey: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Journal of Neuroscience*, 17: 7902-7925.
- Clarke S, Miklossy J. (1990) Occipital cortex in man: Organization of callosal connections, related myelo- and cytoarchitecture, and putative boundaries of functional visual areas. *Journal of Comparative Neurology*, 298: 188-214.
- Cowan WM, Sudhof TC, Stevens CF. (2001) *Synapses*. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press.
- Crick F, Jones E. (1993) Backwardness of human neuroanatomy. *Nature*, 361: 109-110.
- Crick F, Koch C. (2003) A framework for consciousness. *Nature Neuroscience*, 6: 119-126.
- Denk W, Delaney KR, Gelperin A, Kleinfeld D, Strowbridge BW, Tank DW, Yuste R. (1994) Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*, 54: 151-162.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI. (2003) Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *Journal of Neurocytology*, in press.
- DeFelipe J, Farinas I. (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*, 39: 563-607.
- Economo MN, Clack NC, Lavis LD, Gerfen CR, Svoboda K, Myers G, Chandrashekar J. 2016. A platform for brain- wide imaging and reconstruction of individual neurons. *eLife* 5:e10566.
- Ecker JR, Geschwind DH, Kriegstein AR, Ngai J, Osten P, Polioudakis D, Regev A, Sestan N, Wickersham IR, Zeng H. (2017) The BRAIN Initiative Cell Census Consortium: Lessons Learned toward Generating a Comprehensive Brain Cell Atlas. *Neuron*. 96: 542-557.

- Fairen A, DeFelipe J, Regidor J. (1984) Nonpyramidal neurons: General account. In Peters A, Jones EG. (eds.), *Cerebral Cortex. Volume 1. Cellular components of the cerebral cortex.* New York: Plenum Press, 201-253.
- Feldman ML. (1984) Morphology of the neocortical pyramidal neuron. In Peters A, Jones EG. (eds.), *Cerebral Cortex. Volume 1. Cellular components of the cerebral cortex.* New York: Plenum Press, 123-200.
- Felleman DJ, Van Essen DC. (1991) Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 1: 1-47.
- Fink RP, Heimer L. (1967) Two methods for selective impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system. *Brain Research*, 4: 369-374.
- Friston K. (2002) Beyond phrenology: what can neuroimaging tell us about distributed circuitry? *Annual Review of Neuroscience*, 25: 221-250.
- Frostig RD, Lieke E, Ts'o DY, Grinvald A. (1990) Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 6082-6086.
- Gall JG, Pardue ML. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 63: 378-383.
- Galuske RAW, Schlote W, Bratzke H, Singer W. (2000) Interhemispheric asymmetries of the modular structure in human temporal cortex. *Science*, 289: 1946-1949.
- Garey LJ. (1994) Brodmann's 'Localisation in the Cerebral Cortex.' London: Smith-Gordon.
- Gilbert CD. (1992) Horizontal integration and cortical dynamics. *Neuron*, 9: 1-13.
- Glasser, M., Coalson, T., Robinson, E. et al. (2016) A multi-modal parcellation of human cerebral cortex. *Nature* 536: 171-178.
- Gonzalez-Albo MC, DeFelipe J. (2000) Colocalization of glutamate ionotropic receptor subunits in the human temporal neocortex. *Cerebral Cortex*, 10: 621-631.
- Gupta A, Wang Y, Markrem H. (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science*, 287: 273-278.
- Guillery RW. (2000) Early electron microscopic observations of synaptic structures in the cerebral cortex; A view of the contributions made by George Gray. *Trends in Neuroscience*, 23: 594-598.
- Hand PJ. (1981) The 2-deoxyglucose method. In Heimer L, Robards MJ. (eds.), *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods.* New York: Plenum Press, 511-538.

- Helmchen F, Denk W. (2002) New developments in multiphoton microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, 12: 593-601.
- Hirsch JA, Martinez LM, Alonso JM, Desai K, Pillai C, Pierre C. (2002) Synaptic physiology of the flow of information in the cat's visual cortex in vivo. *Journal of Physiology*, 540: 335-350.
- Horton JC, Hedley-Whyte ET. (1984) Mapping of cytochrome oxidase patches and ocular dominance columns in human visual cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B; Biological Sciences*, 304: 255-272.
- Horton JC, Hocking DR. (1996) Intrinsic variability of ocular dominance column periodicity in normal macaque monkeys. *Journal of Neuroscience*, 16: 7228-7339.
- Hubel DH, Wiesel TN. (1962) Receptive field, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *Journal of Physiology*, 160: 106-154.
- Hubel DH, Wiesel TN. (1968) Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *Journal of Physiology*, 195: 215-243.
- Iwasato T, Datwani A, Wolf AM, Nishiyama H, Taguchi Y, Tonegawa S, Knopfel T, Erzurumlu RS, Itoharu S. (2000) Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature*, 406: 726-731.
- Jones EG. (1998) Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience*, 85: 331-345.
- Jones EG. (2000) Microcolumns in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 5019-5021.
- Jones EG, Hendry SHC, DeFelipe J, Benson DL. (1994) GABA neurons and their role in activity-dependent plasticity of adult primate visual cortex. In Peters A, Rockland KS. (eds.), *Cerebral Cortex*, Volume 10. New York: Plenum Press, 61-140.
- Kennedy C, Des Rosiers MH, Sakurada O, Shinohara M, Reivich M, Jehle JW, Sokoloff L. (1976) Metabolic mapping of the primary visual system of the monkey by means of the autoradiographic [^{14}C] deoxyglucose technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73: 4230-4234.
- Kennedy H, Bullier J. (1985) A double-labeling investigation of the afferent connectivity to cortical areas V1 and V2 of the macaque monkey. *Journal of Neuroscience*, 5: 2815-2830.
- Kennedy H, Dehay C, Bullier J. (1986) Organization of callosal connections of visual areas C1 and V2 in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 247: 398-415.

- Kennedy H, Van Essen DC, Christen Y. (editors) (2016) *Micro-, Meso- and Macro-Connectomics of the Brain*. Cham (CH): Springer
- Kiernan JA. (1990) *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 2nd ed. Oxford: Pergamon.
- Kisvarday ZF, Beaulieu C, Eysel UT. (1993). Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18): implication for lateral disinhibition. *Journal of Comparative Neurology*, 327: 398-415.
- Kitai ST, Bishop GA. (1981) Horseradish peroxidase: intracellular staining of neurons. In Heimer L, Robards MJ. (eds.), *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods*. New York: Plenum, 263-277.
- Kobbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego L, Mey J, Thanos S. (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Progress in Neurobiology*, 62: 327-351.
- Lee K, Turner N, Macrina T, Wu J, Lu R, Seung HS. (2019) Convolutional nets for reconstructing neural circuits from brain images acquired by serial section electron microscopy. *Curr Opin Neurobiol*. 55:188-198.
- Lennie P. (1998) Single units and visual cortical organization. *Perception*, 27: 889-935.
- Lichtman JW, Pfister H, Shavit N. (2014) The big data challenges of connectomics. *Nat Neurosci*. 17: 1448-54.
- Logothetis NK, Guggenberger H, Peled S, Pauls J. (1999) Functional imaging of the monkey brain. *Nature Neuroscience*, 2: 555-562.
- Lorente de No R. (1938) The cerebral cortex: architecture, intracortical connections and motor projections. In Fulton JF. (ed.), *Physiology of the nervous system*. London: The Oxford University Press, 291-339.
- Markram, H, Muller, E, Ramaswamy, S, Reimann, MW, Abdellah, M, Sanchez, CA, et al. (2015). Reconstruction and simulation of neocortical reconstruction and simulation of neocortical microcircuitry. *Cell* 163: 456–492.
- Malach R, Amir Y, Harel M, Grinvald A. (1993) Relationship between intrinsic connections and functional architecture revealed by optical imaging and in vivo targeted biocytin injections in primate striate cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 10469-10473.
- Malach R, Tootell RBH, Malonek D. (1994) Relationship between orientation domains, cytochrome oxidase stripes, and intrinsic horizontal connections in squirrel monkey area V2. *Cerebral Cortex*, 4: 151-165.

- Merigan WH, Maunsell JHR. (1993) How parallel are the primate visual pathways? *Annual Review of Neuroscience*, 16: 369-402.
- Mesulam MM. (1982) Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways – axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In Mesulam MM. (ed.), *Tracing neural connections with horseradish peroxidase*. New York: John Wiley & Sons, 1-151.
- Monier C, Chavane, F, Baudot, P, Graham LJ, Fregnac Y. (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron*, 37: 663-680.
- Morgan JI, Curran T. (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*, 14: 421-451.
- Morgan JI, Curran T. (1995) Immediate-early genes: Ten years on. *Trends in Neuroscience*, 18: 66-67.
- Mountcastle VB. (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of Neurophysiology*, 20: 408-434.
- Mountcastle VB. (2003) Introduction. *Cerebral Cortex*, 13: 2-4.
- Nauta WJH, Gygax PA. (1954) Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system: a modified technic. *Stain Technology*, 29: 91-93.
- Nowak LG, Bullier J. (1997) The timing of information transfer in the visual system. In Peters A, Rockland KS. (eds.), *Cerebral Cortex. Volume 12. Extrastriate Cortex in Primates*. New York: Plenum Press, 205-242.
- Obermayer K, Blasdel GG. (1993) Geometry of orientation and ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Journal of Neuroscience*, 13: 4114-4129.
- Paddock SW. (1999) *Methods in Molecular Biology, Confocal Microscopy Methods and Protocols*. Volume 122. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Pawley JB. (1995) *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd edition. New York: Plenum Press.
- Paxinos G, Huang X-F, Toga AW. (2000) *The Rhesus Monkey Brain*. San Diego: Academic Press.
- Peters A. (1987) Number of neurons and synapses in primary visual cortex. In Jones EG, Peters A. (eds.), *Cerebral Cortex. Volume 6. Further Aspects of Cortical Function, Including Hippocampus*. New York: Plenum Press, 267-294.
- Prasher DC. (1995) Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*, 11: 320-323.

- Preuss TM, Coleman GQ. (2002) Human-specific organization of primary visual cortex: alternating compartments of dense Cat-301 and calbindin immunoreactivity in layer 4A. *Cerebral Cortex*, 12: 671-691.
- Rockland KS. (1989) Bistratified distribution of terminal arbors of individual axons projecting from area V1 to middle temporal area (MT) in the macaque monkeys. *Visual Neuroscience*, 3: 155-170.
- Rockland KS. (1992) Laminar distribution of neurons projecting from area V1 to V2 in macaque and squirrel monkeys. *Cerebral Cortex*, 2: 38-47.
- Rockland KS. (1997) Elements of cortical architecture. Hierarchy revisited. In Peters A, Rockland KS. (eds.), *Cerebral Cortex. Volume 12. Extrastriate Cortex in Primates*. New York: Plenum Press, 243-293.
- Rockland KS. (1998) Complex microstructures of sensory cortical connections. *Current Opinion in Neurobiology*, 8: 545-551.
- Rockland KS. (2002) Visual cortical organization at the single axon level: a beginning. *Neuroscience Research*, 42: 155-166.
- Rockland KS, Drash GW. (1996) Collateralized divergent feedback connections that target multiple cortical areas. *Journal of Comparative Neurology*, 373: 529-548.
- Rockland KS, Pandya DN. (1979) Laminar origins and terminations of cortical connections to the occipital lobe in the rhesus monkey. *Brain Research*, 179: 3-20.
- Rockland KS, Van Hoesen GW. (1994) Direct temporal-occipital feedback connections to striate cortex (V1) in the macaque monkey. *Cerebral Cortex*, 4: 300-313.
- Saleem KS, Tanaka K, Rockland KS. (1993) Specific and columnar projection from area TEO to TE in the macaque inferotemporal cortex. *Cerebral Cortex*, 3: 454-464.
- Salin P-A, Bullier J. (1995) Corticocortical connections in the visual system: structure and function. *Physiological Reviews*, 7: 107-154.
- Schummers J, Marino J, Sur M. (2002) Synaptic integration by V1 neurons depends on location within the orientation map. *Neuron*, 36: 969-978.
- Shepherd GM. (1998) *The Synaptic Organization of the Brain*. Fourth Edition. Oxford, New York and Tokyo: The Oxford University Press.
- Shibata S, Komaki Y, Seki F, Inouye MO, Nagai T, Okano H. (2015) Connectomics: comprehensive approaches for whole-brain mapping. *Microscopy (Oxford)*, 64: 57-67.
- Shipp S, Zeki S. (1989) The organization of connections between areas V5 and V1 in macaque monkey visual cortex. *European Journal of Neuroscience*, 1: 308-331.

- Silverman MS, Tootell RBH. (1987) Modified technique for cytochrome oxidase histochemistry: increased staining intensity and compatibility with 2-deoxyglucose autoradiography. *Journal of Neuroscience Methods*, 19: 1-10.
- Simmons DM, Arriza JL, Swanson LW. (1989) A complete protocol for *in situ* hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radiolabelled single-stranded RNA probes. *Journal of Histotechnology*, 12: 169-181.
- Sincich LC, Horton JC. (2002) Divided by cytochrome oxidase: a map of the projections from V1 to V2 in macaques. *Science*, 295: 1734-1737.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. (1998) Salient features of synaptic organization in the cerebral cortex. *Brain Research Reviews*, 26: 113-135.
- Steriade M, Jones EG, McCormick DA. (1997) *The Thalamus. Volume I. Organization and Function*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Tanaka K. (1996) Inferotemporal cortex and object vision. *Annual Review of Neuroscience*, 19: 109-139.
- Tanaka K. (2003) Columns for complex visual object features in the inferotemporal cortex: clustering of cells with similar but slightly different stimulus selectivities. *Cerebral Cortex*, 13: 90-99.
- Tigges J, Tigges M. (1985) Subcortical sources of direct projections to visual cortex. In Peters A, Jones EG. (eds.), *Cerebral Cortex. Volume 3. Visual Cortex*. New York: Plenum Press, 351-378.
- Thompson AM, Bannister AP. (2003) Interlaminar connections in the neocortex. *Cerebral Cortex*, 13: 5-14.
- Tootell RBH, Hamilton SL, Silverman MS, Switkes E. (1988) Functional anatomy of macaque striate cortex. I. Ocular dominance, binocular interactions, and baseline conditions. *Journal of Neuroscience*, 8: 1500-1530.
- Tootell RBH, Hadjikhani NK, Mendola JD, Marrett S, Dale AM. (1998) From retinotopy to recognition: fMRI in human visual cortex. *Trends in Cognitive Sciences*, 2: 174-183.
- Vanduffel W, Fize D, Mandeville JB, Nelissen K, Van Hecke P, Rosen BR, Tootell RHB, Orban GA. (2001) Visual motion processing investigated using contrast agent-enhanced fMRI in awake behaving monkeys. *Neuron*, 32: 565-577.
- Van Essen DC, Newsome WT, Bixby JL. (1982) The pattern of interhemispheric connections and its relationship to extrastriate visual areas in the macaque monkey. *Journal of Neuroscience*, 2: 265-283.

- Wang G, Tanaka K, Tanifuji M. (1996) Optical imaging of functional organization in the monkey inferotemporal cortex. *Science*, 272: 1665-1668.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 314: 1–340.
- Wiesel TN, Hubel DH, Lam DMK. (1974) Autoradiographic demonstration of ocular dominance columns in the monkey striate cortex by means of transneuronal transport. *Brain Research*, 79: 273-279.
- Wong-Riley MTT. (1994) Primate cortex dynamic metabolic organization and plasticity revealed by cytochrome oxidase. In Peters A, Rockland KS. (eds.), *Cerebral Cortex*, Volume 10. New York: Plenum Press, 141-200.
- Yoshihara Y. (2002) Visualizing selective neural pathways with WGA transgene: combination of neuroanatomy with gene technology. *Neuroscience Research*, 44: 133-140.
- Young MP. (1992) Objective analysis of the topological organization of the primate cortical visual system. *Nature*, 358: 152-155.
- Yuste R, Lanni F, Konnerth A. (2000) (eds.) *Imaging Neurons*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press.
- Zeng HK. (2018) Mesoscale connectomics. *Current Opinion in Neurobiology*. 50:154–162
- Zilles K, Clarke S. (1997) Architecture, connectivity, and transmitter receptors of human extrastriate cortex: Comparison with nonhuman primates. In Peters A, Rockland KS. (eds.), *Cerebral Cortex*. Volume 12. *Extrastriate Cortex in Primates*. New York: Plenum Press, 673-742.
- Zilles K, Palomero-Gallagher N. (2001) Cyto-, myelo-, and receptor architectonics of the human parietal cortex. *Neuroimage*, 14: S8-S20.

插图说明

图 2 — 1：显示锥体神经元（主要的投射神经元）及两类主要用于研究皮层连接的神经解剖示踪剂（顺行和逆行示踪剂）的示意图。一个典型的神经元由一个细胞体（也称为“胞体”，用实心三角形表示）、轴突和树突构成。锥体神经元含上升的顶树突和环绕胞体的基树突，它们通过突触联系从其它神经元接受传入信息。轴突（常发出侧枝，小箭指示）则通过轴突末梢（基本相当于突触小体，集中于远端的轴突树上）与其它神经元形成突触联系而将胞体自身的信息传出。顺行示踪剂在被引入的结构被胞体摄入，并沿轴突运送至靶结构；与之相反，逆行示踪剂在被引入的部位被轴突末梢摄入，并通过轴突逆行运送至发出投射的母神经元的胞体。

图 2 — 2：用 Golgi 法染色的猕猴颞上沟神经元。（A）中的数字代表皮层的层。（B）和（C）分别为（A）和（B）中点状矩形框部分的高倍放大，树突棘的细节可清楚地见于（C）中（用箭指示）。标尺：A, 200 μm ; B, 50 μm ; C, 20 μm 。

图 2 — 3：小鼠体感皮层第 5 层的一个锥体神经元。这个神经元是在胞内被注射 biocytin 后显示的。（A）中的数字代表皮层的层。此神经元的树突和轴突的细节 [（A）中箭所指部分] 被高倍放大后分别显示于（B）和（C）中。标尺：A, 200 μm ; B and C, 20 μm 。（Walther Akemann 博士提供）。

图 2 — 4：电镜照片显示具有不同突轴后致密物质（用箭头指示）的穿孔突触。穿孔突触被认为表征突触形成和棘分裂过程的一个中间步骤，在某种程度上对长时程增强效应 (LTP) 有影响。标尺：500 nm。（Noritaka Ichinohe 博士和 Hiroko Katsuno 女士提供）。

图 2 — 5：显微照片显示用 Nissl 法染色的猕猴枕叶皮层细胞体。基于细胞结构的标准，皮层的层与层之间，以及初级视觉皮层（V1）和第 2 视觉区（V2）之间的界限能被清楚地划分出来。标尺：1 mm。

图 2 — 6：显微照片显示在猕猴 V1 表层的富含细胞色素氧化酶 (CO) 的斑点（较黑的区域）。标尺：0.5 mm。

图 2 — 7：（A）—（C）用 BDA 顺行标记的一个从猕猴的 TEO 区至 TE 区的轴突树。（A）中的空心箭显示在第 4 层（L. 4）里出现的一个轴突分枝。实心箭代表从低倍（A）到高倍（B，C）放大时相同的位置。（C）中可见柄状末梢（突轴终扣，boutons terminaux，用箭头指示）和珠状末梢（过路突触小体，boutons en passant，用空心箭头指示）。（D）显示将 BDA 注射入猕猴 V1 区后，在 V2 区会聚的末梢野 [在第 4 层（L. 4）]。一些逆行标记的神经元可在第 2、3 层（L.2 和 L.3）中见到。（D）中的箭指示在白质（WM）中的一个轴突干。标尺：A 和 D, 200 μm ; B, 50 μm ; C, 20 μm 。

图 2 — 8： $[^{14}\text{C}]$ -2-脱氧葡萄糖（2-DG）放射自显影照片显示在猕猴 V1 区里（主要是在第 3 层）的眼优势柱。造成这个 2-DG 图样的视觉刺激是显示给一只眼的包含不同方位、不同空间频率的移动的黑白方波光栅。这样的刺激在所有的层均形成摄取比较高的 2-DG 长条带。图中较大的切片是沿平行于平展固定后的 V1 区枕盖而切的，它包含了 V1 区表面积的大约一半。中央凹的表征位于顶点（用星号指示）。右下方的插图显示在垂直于脑表面的切片上眼优势柱的 2-DG 摄取的层状分布。标尺：5 mm。（Tootell et al., 1988, 图 2 经更改）。

图 2 — 9：猕猴 V1 区的额状切片，显示用早早期基因 zif268 mRNA 及蛋白质表达呈现的眼优势柱。图上部：相邻切片的免疫细胞化学（ICC）和原位杂交（ISH）染色。图下部：被勾画出并经上色及数字化叠加后的眼优势柱。对蛋白质起正反应（ICC）与对 mRNA 起正反应（ISH）的区域在单眼剥夺（MD）的条件下明显地重叠，但在双眼交互遮掩（RO）的条件下，这些区域基本上是互补的。标尺：5 mm。（Chaudhuri et al., 1997, 图 1 经改动）。

图 2 — 10：激光扫描共焦显微照片显示用脱磷酸神经纤维（SMI-32）（A）和 wisteria floribunda agglutinin（WFA）（B）染色的猕猴颞上回第 5 层的神经元。（C）是（A）和（B）的重叠。这个对 SMI-32 起正反应的锥体神经元的胞体和近端

树突被用 WFA 标记的神经周围网包绕（A-C 中的箭头指示相同的位置）。神经周围网被假定用作细胞外空间的过量阳离子变化的快速局部缓冲器。标尺：100 μm 。（Noritaka Ichinohe 博士提供）。

图 2 — 1 1：用 Nissl 法染色的人颞叶皮层显微照片。注意第 3、4 层里的细的细胞索（小柱）（用箭指示）。标尺：200 μm 。

图 2 — 1 2：方位选择性模型。（A）Hubel 和 Wiesel 用垂直和平行于脑表面插入皮层的微电极所得到的结果。若将电极垂直于脑表面插入皮层，记录到的神经元方位选择性是不变的〔除 4 A 和 4 C 层外（L4）。4 A 和 4 C 层的神经元缺乏或仅有很微弱的方位选择性〕。若将电极平行于脑表面穿过皮层，记录到的神经元方位选择性将在 0.5-1.0 mm 的间隔里持续旋转。（B）Hubel 和 Wiesel 提出的猕猴 V1 区的“冰块（ice-cube）”模型。这个模型有 4 个要素：1）对来自一只眼的传入和某个方位选择性的区域在软脑膜和白质之间垂直投射。当沿脑表面平行排列时，它们看上去呈平板状；2）表征两只眼的平板互相平行；3）表征不同方位选择性的平板互相平行；4）两组平板（即表征两眼及不同方位选择性的平板）以一定的角度互相交叉。

（C）用光学成像法得到的方位选择性的分布图以及叠加在一起的眼优势柱的边界（I 和 C 分别代表对同侧和对侧眼有选择性的眼优势柱）。等方位线（灰色）以 11.25° 的间隔被画出。黑实线指示眼优势柱的边缘，在那里眼优势基本消失。线段（a-b）显示线性区（linear zone）的一部分，在那里方位选择性沿一个轴呈线性变化，正如（B）中显示的那样。圆圈指示奇点（singularity），它们是 0 维的点状的不连续间断。环绕这些不连续点一周，方位选择性将连续变化 $\pm 180^\circ$ 。空心箭指示一个断裂（fracture），它是一维的不连续间断。通过断裂方位选择性陡然变化。实心箭指示一个鞍形点（saddle point），它是比较小的、两维斑块。在鞍形点里，方位选择性几乎保持不变。这些观察表明方位选择性比最初认为的要复杂得多。标尺：0.5 mm。

{Blasdel et al., 1992b, 图 1 [本图的（A）和（B）]；Obermayer and Blasdel, 1993, 图 5 [本图的（C）] 经改动}。

图 2 — 1 3：猕猴 TE 区柱状结构的模型图。柱的长轴沿皮层表面方向约为 0.8 mm，造成每个柱中的神经元优化反应的物体视觉特征是相似的，但没有必要完全相同。以

这样的方式组织起来的柱被认为对于恒定地表现从不同的视角、不同的距离、和在不同的明暗度下观察到的物体是重要的。（经许可复制 Tanaka, 1996, 图 7）。

图 2 — 1 4：猕猴 V1 区内水平投射锥体神经元的例子。（A）中的神经元位于第 3 层，其轴突平行于皮层表面延伸长达 4 mm 多。图中的树突用从胞体发出的较粗的黑线显示，其上密布树突棘。轴突在表层发出几个末梢丛（用空心箭指示），并投射进入白质。（B）显示另一锥体神经元的轴突。此轴突平行于皮层表面延伸约 6 mm。灰色斑块代表沿眼优势柱（在此例沿垂直走向延伸）排列的 CO 斑点。注意这个神经元的末梢丛大部分支配同一只眼的优势柱（用箭指示）。接受来自这样的轴突传入的神经元能够整合来自皮层上较大区域的信息；这个区域表征的视野面积将比这些神经元的感受野大得多。标尺：A, 100 μ m; B, 1 mm。（Gilbert, 1992, 图 2 经改动）。

图 2 — 1 5：显示猴 17 (V1), 18 (V2), 19 (大致相当于 V4 区) 和 20 区 (TE 区) 的皮层前馈和反馈投射的示意图。前馈投射由 17, 18 和 19 区（用黑箭表示）的第 3 层发出，分别终止于 18, 19 和 20 区的第 4 层；反馈投射则源于 20, 19 和 18 区（用影线箭指示）的第 2/3, 5 和 6 层，并分别终止于 19, 18 和 17 区的第 1 层。然而，应该强调的是，正如图 2 — 1 6 至图 2 — 1 8 所示的那样，最近的研究表明投射神经元起源的层和轴突末梢的层的分布形式实际上相当复杂（Rockland and Pandya, 1979, 图 10 经改动）。

图 2 — 1 6：显微照片显示将 biocytin 注射入猕猴 V2 区后，逆行标记的神经元出现在 V1 区。神经元主要集中于 3A 层，也分布于 4B 层。标尺：200 μ m。（Rockland, 1992, 图 4 经改动）。

图 2 — 1 7：典型的从 V2 区投射至 V4 区的轴突的示意图。加在图的左侧的有少量的锥体神经元样本被用以显示轴突形状与某些可能的突轴后成分的关系。L.3, L.4, L.5: 第 3、4、5 层；WM: 白质。（Rockland, 1992, 图 18 经改动）。

图 2 — 1 8：顺行示踪剂注射入 TEO 区后，被标记的末梢在 TE 区的分布。（A）间隔 1 mm 的连续冠状切片显示覆盖从后（用 a 指示）到前（用 b 指示）的被标记末梢

的分布。(B)显示注射部位以及9张冠状切片的位置。(C)注射部位的高倍放大。

(D)用 Camera-lucida 画出较后部的投射带[(A)中用点线长方形限制的区域被高倍放大显示于(D)中]。从 TEO 区至 TE 区神经元投射的末梢野主要为柱状,支配几乎所有的层。ots, 枕颞沟; amts, 前中颞沟; sts, 颞上沟; WM: 白质。标尺: A, 5 mm; C and D, 0.5 mm。(Saleem et al., 1993, 图3经改动)。

图2—19: Camera-lucida 重构的一个用 PHA-L 标记的轴突。PHA-L 从 TE 区的腹前部(TEav)沿此轴突被顺行转运至杏仁核的内侧基底核(MB)和外嗅皮层(36区)。具有代表性的6张冠状切片的位置显示在脑的腹侧面上(实心圆点指示注射点位置)。数字(包括在本图其它地方的数字)代表切片的编号。6张切片腹侧部的轮廓图显示投射野及重构的末梢丛(ar1—ar6)。这个轴突是由92张连续切片重构而成的(切片厚度, 40 μm)。注意终止于 MB 的分支未侵入其它较深部的杏仁核。L, 外侧核; LB, 外侧基底核; AB, 副基底核; amt, 前中颞沟; rh, 嗅沟; 35, 35区; 36r, 36区嘴侧部(35区和36区共同构成外嗅皮层); IV, 第4层; WM: 白质。(Cheng et al., 1997, 图12经改动)。

图2—20: Camera-lucida 重构的一个用 PHA-L 标记的轴突。PHA-L 从 TE 区的腹内侧部被顺行转运。这个轴突有4个主要的分枝[B1-B4: 其中的3个分枝在白质中由主干发出; 第4个分枝可视为主干的远端持续, 斜上升进入 V1 的灰质中, 然后向背侧延伸, 并向前朝着月状沟(LS)行进]。这些分枝大部分在 V2 区分叉, 但 B1 的远端末梢位于 LS 的深处(在切片轮廓图62中用双箭指示), 或许侵入 V3 区。B3 在轴突主干(在白质中用箭指示)上方缠绕, 朝着软脑膜(PIA)上升, 随后形成一局部末梢丛(用点线长方形限制的区域被高倍放大显示于右上角)。CF, 矩状裂; IOS, 枕下沟; STS, 颞上沟; WM: 白质。其余图解与图2—19同。(Rockland and Drash, 1996, 图5经改动)。