

前包钦格复合体区微量注射氨基酸类药物的呼吸效应^{*}

李川^{**}, 余微, 郑煜

(华西医科大学生理学教研室, 成都 610041)

摘要: 实验选用成年大鼠, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 以膈神经放电为指标, 分别观察了在前包钦格复合体 (pre-Bötzing complex, pre-Böt 复合体) 内微量注射兴奋性氨基酸 (红藻氨酸, KA; L-谷氨酸, Glu) 和抑制性氨基酸 (甘氨酸, Gly; γ -氨基丁酸, GABA) 对呼吸活动的影响。在 pre-Böt 复合体内注射 KA 后, 所有动物首先出现呼吸兴奋效应, 表现为吸气时程 (T_I) 延长, 呼气时程 (T_E) 缩短, 呼吸频率 (RF) 增快; 随后出现呼吸抑制效应, 表现为呼吸停止于呼气状态。Pre-Böt 复合体内注射 Glu, 引起动物 T_E 缩短, 注射 Gly 或 GABA 均引起动物 T_I 缩短。这些结果表明, 成年大鼠 pre-Böt 复合体参与节律性呼吸活动的产生和调控, 它可能是启动和维持吸气过程的中枢结构。

关键词: 前包钦格复合体; 呼吸节律; 兴奋性氨基酸; 抑制性氨基酸; 大鼠

学科分类号: Q474; R332.3

Effects of microinjection of amino acids into pre-Bötzing complex on respiration in adult rats

LI Chuan^{**}, YU Wei, ZHENG Yu

(Department of Physiology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

Abstract: Experiments were performed on sodium pentobarbital anesthetized and bilaterally vagotomized adult SD rats. Microinjection of an excitatory neurotoxin, kainic acid, into pre-Bötzing complex initially lengthened the duration of inspiration, shortened the duration of expiration and increased the respiratory frequency, and subsequently abolished rhythmic respiration. Injection of an excitatory amino acid, L-glutamate, shortened the duration of expiration. Injection of the inhibitory amino acids (either glycine or γ -aminobutyric acid) shortened the duration of inspiration. These results suggest that the pre-Bötzing complex in adult rats plays an important role in neurogenesis and maintenance of rhythmic respiration.

Key words: pre-Bötzing complex (pre-Böt C); respiratory rhythm; excitatory amino acid; inhibitory amino acid; rat

早已证明, 呼吸节律产生于延髓, 但其确切部位至今尚无定论。1991 年, Smith 等^[1]对新生大鼠的离体灌流脑干-脊髓制备进行连续微细切割实验, 观察到只有切除位于面神经后核尾端的疑核头部及其腹外侧区这一局限区域时才出现呼吸节律的停止; 在含有该区的脑片, 可以从舌下神经根记录到呼吸节律样电活动。他们认为该区是新生动物呼吸节律起源的关键部位, 并将其命名为前包钦格复合体 (pre-Bötzing complex, pre-Böt 复合体)。这观点被

随后的研究进一步证实^[2]。然而, 很少有报道 pre-Böt 复合体在成年整体动物呼吸节律产生中的作用。我们用微量注射兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸的方法, 以膈神经放电为指标, 初步探讨了 pre-Böt 复合体在整体成年大鼠呼吸节律的产生和调控中的作用。

1 材料和方法

实验选用健康成年 SD 大鼠 31 只, 雌雄不限,

Received 1999-11-09 Accepted 2000-01-16

^{*} Supported by grants from the State Education Commission of China (No. C293001), WCUMS (No. L1195) and the National Natural Science Foundation of China (No. 39970279).

^{**} Corresponding author. Tel : 86-28-5501277 ; Fax : 86-28-5583252 ; E-mail : chuan-li99@hotmail.com

体重 250 ~ 400 g。动物用 1.5% 戊巴比妥钠(30 ~ 40 mg/kg)腹腔注射麻醉。气管插管,切断双侧颈迷走神经。大鼠头部向腹侧屈曲 20°,腹位固定,维持直肠温度于 37 ~ 38°C。记录膈神经传出放电和股动脉血压。膈神经放电及其积分、动脉血压和直肠温度均由 RM-6000 型多道生理记录仪(日本 Kohden)监视或记录,同时将膈神经放电和动脉血压输入磁带记录仪(日本 Kohden, RMG-5304)记录,以便实验结束后进一步分析处理。

实验分为 pre-Böt 复合体药物注射组($n = 23$)、pre-Böt 复合体生理盐水(NS)注射对照组($n = 3$)和面神经核红藻氨酸(KA)注射对照组($n = 5$)。注射的药物包括 2.34 mmol/L KA(Sigma), pH 7.4; 1 mol/L L-谷氨酸钠(Glu)(Sigma), pH 7.4; 2 mol/L 甘氨酸(Gly)(Fluka), pH 4.0; 2 mol/L γ -氨基丁酸(GABA)(Fluka), pH 4.0。从背侧开颅,暴露延髓背表面。Pre-Böt 复合体注射部位为脑前 1.8 mm,中线旁开 2.2 mm,延髓背侧表面向下 2.9 mm。注射采用尖端外径为 40 μ m 的玻璃微管,注射量为 0.1 μ l/侧,1 min 注完,注药后原位留置玻璃微管 3 min,然后退出。注药前 30 s、注药过程中和注药后 5 min 内连续记录,以后每 5 min 记录 1 次,注药 30 min 后每 10 min 记录 1 次,每次记录时间为 30 s,注药后观察时间为 60 min。各药液中均含有 2% 溴胺天蓝,以便实验结束后确定注射的部位。

实验结束后,取脑置于 10% 福尔马林溶液中浸泡 48 h 以上,连续冰冻切片,厚 100 μ m,中性红染色,根据蓝点鉴定注射的部位。分析指标包括:各时段膈神经放电的吸气时程(T_I)、呼气时程(T_E)、呼吸频率(RF)以及动脉血压。将这些指标的变化率[(注药后观察值 - 注药前对照值)/注药前对照值 $\times$ 100%]与对照组变化率进行 t 检验,变化率均以($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)%表示,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 注射部位

根据蓝点的位置,注射区位于 pre-Böt 复合体区和面神经核内者计入资料分析。Pre-Böt 复合体注射区位于面神经后核尾端的疑核头部及其腹外侧区,如图 1 所示。

2.2 Pre-Böt 复合体区注射 KA、Glu、Gly、GABA 的呼吸效应

2.2.1 注射 KA 的效应 7 只大鼠单侧注射 KA 后 10 min 内,动物均出现了 T_I 的延长,在不同的时

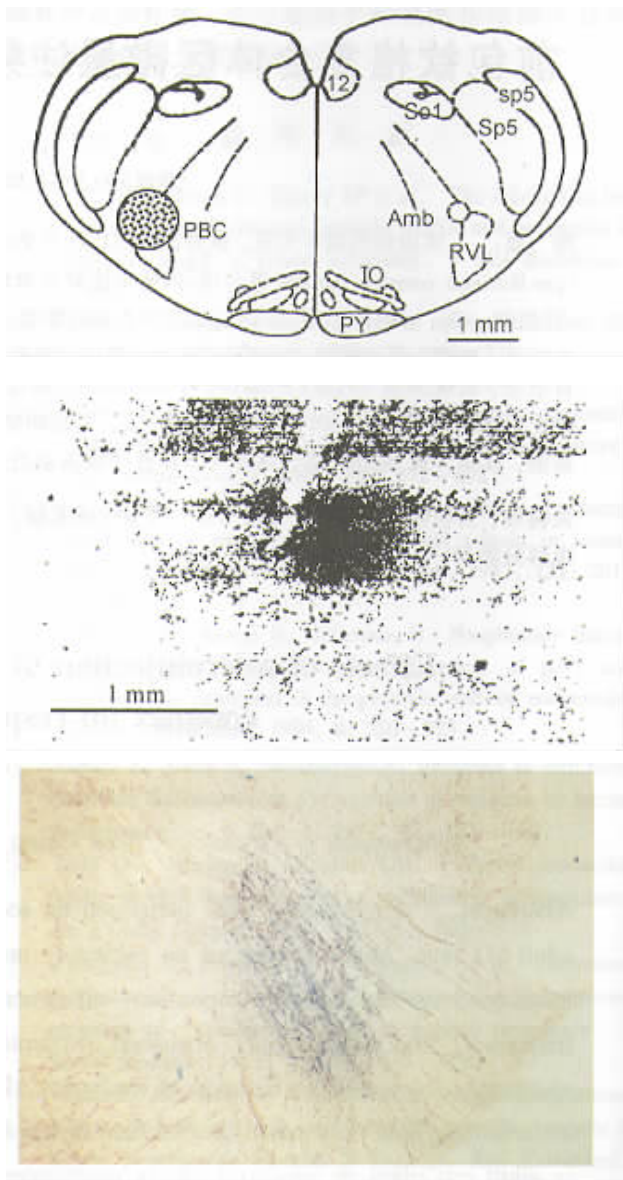


图 1. pre-Böt 复合体及其邻近结构示意图(上)和 pre-Böt 复合体药物注射区显微照片(下)

Fig.1. A diagram of the pre-Bötzinger complex area and its surrounding structures (upper) and a microphotograph of the injection site of the pre-Bötzinger complex area (lower). Amb: ambiguous nucleus; IO: inferior olive; PY: pyramidal tract; RVL: rostroventrolateral reticular nucleus; Sol: solitary tract; Sp5: spinal trigeminal nucleus; sp5: spinal trigeminal tract; 12: hypoglossal nucleus.

间段(后同),延长的程度为(24.7 ± 9.6)% ~ (30.4 ± 8.7)%(图 2, 3);全部动物均出现 T_E 缩短,缩短的程度为(54.9 ± 3.4)% ~ (64.9 ± 5.8)%(图 2, 4);RF 增快(19.4 ± 5.8)% ~ (31.4 ± 5.2)%。以上这些变化与 NS 对照组相比,均有显著性差异($P < 0.05$)。单侧注射 KA 后,7 只动物中有 2 只在注射药物后 10 min 左右出现呼吸紊乱,表现为膈神经放电节律和幅度不规则,25 min 后呼吸停止于呼气相

(图 2); 另外 5 只动物未出现呼吸紊乱或停止。在单侧注药后呼吸未停止的 5 只动物的另一侧 pre-Böt 复合体注射 KA 10 ~ 20 min 后, 全部动物呼吸停止于呼气相。

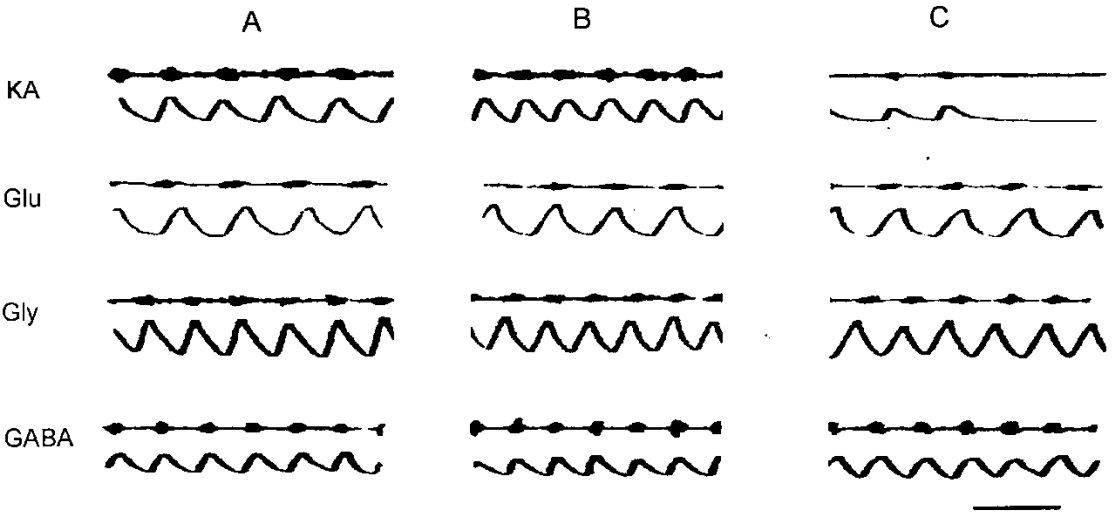


图 2. pre-Böt 复合体内注射 KA、Glu、Gly 和 GABA 对膈神经放电的影响
Fig.2. Effects of microinjection of KA , Glu , Gly and GABA into the pre-Bötzing complex on phrenic nerve discharge. A. Before injection. B and C. 5 or 30 min after KA injection , respectively ; 15 and 30 min after Glu injection ; 10 and 30 min after Gly injection ; 3 and 20 min later for GABA injection. In each panel , the upper line indicates raw phrenic discharges and the lower one indicates the integrated phrenic activities.

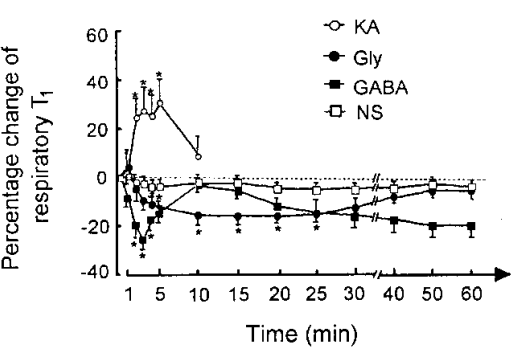


图 3. pre-Böt 复合体内注射 KA、Gly 和 GABA 对吸气时程的影响
Fig.3. Effects of microinjection of KA , Gly and GABA into the pre-Bötzing complex on duration of inspiration(T_1). * $P < 0.05$.

2.2.2 注射 Glu 的效应 在 5 只大鼠单侧注射 Glu 后 10 min, 动物出现 T_E 缩短, 缩短的程度为 $(16.1 \pm 5.0)\% \sim (20.4 \pm 6.8)\%$, 与 NS 对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 20 min 后逐渐恢复(图 2, 4)。注射 Glu 后, T_1 和 RF 无明显变化 ($P > 0.05$)。

2.2.3 注射 Gly 的效应 在 6 只大鼠单侧注射 Gly 后 4 min 开始, 全部动物出现 T_1 的缩短, 缩短程度为 $(9.6 \pm 2.6)\% \sim (16.2 \pm 3.6)\%$, 与 NS 对照组相比有显著性 ($P < 0.05$), 25 min 后逐渐恢复(图 2, 3)。注射 Gly 后, T_E 和 RF 无显著性变化 ($P >$

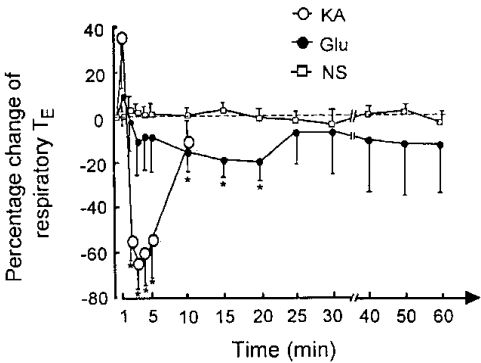


图 4. pre-Böt 复合体内注射 KA 和 Glu 对呼气时程的影响
Fig.4. Effects of microinjection of KA and Glu into the pre-Bötzing complex on duration of expiration(T_E). * $P < 0.05$.

0.05)。

2.2.4 注射 GABA 的效应 在 5 只大鼠单侧注射 GABA 后 2 min 开始, 全部动物出现 T_1 缩短, 缩短程度为 $(17.5 \pm 5.6)\% \sim (25.6 \pm 5.9)\%$, 与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 5 min 后逐渐恢复(图 2, 3)。注射 GABA 后, T_E 和 RF 无明显变化 ($P > 0.05$)。在 pre-Böt 复合体内注射药物后呼吸各指标的变化总结如表 1。除注射 KA 引起呼吸停止的动物动脉血压随之逐渐降低外, 其余各药物注射组动物的动脉血压均未发生明显变化 ($P > 0.05$)。

表 1. pre-Böt 复合体内微量注射 KA、Glu、Gly 和 GABA 的呼吸效应总结表

Table 1. Summary of the effects of microinjection of KA, Glu, Gly and GABA into pre-Böt complex on respiration

Drugs	T _I	T _E	RF
KA	↑	↓	↑
Glu	—	↓	—
Gly	↓	—	—
GABA	↓	—	—

↑ : increase ; ↓ : decrease ; — : no significant change.

2.3 对照组

2.3.1 面神经核内注射 KA 对照组 在 5 只大鼠单侧面神经核内注射 KA 后 2 ~ 5 min 出现 T_I 延长, 延长程度为 (62.3 ± 13.5)% ~ (77.3 ± 20.9)% ; 注药后 10 ~ 25 min 出现 T_E 延长, 延长的程度为 (43.0 ± 13.1)% ~ (56.6 ± 16.6)% ; 注药后 2 ~ 20 min 出现 RF 减慢, 减慢的程度为 (12.5 ± 3.1)% ~ (21.7 ± 5.0)% ; 注药后 2 ~ 30 min 还出现膈神经放电幅度增高。这些变化与 NS 对照组相比, 差异有显著性(*P* < 0.05)。双侧面神经核注射 KA 对呼吸的影响与单侧注射的类似。无论单侧或双侧注射, 动物的节律性呼吸活动均未停止, 动脉血压亦无明显变化(*P* > 0.05)。

2.3.2 Pre-Böt 复合体内注射 NS 对照组 在 3 只大鼠单侧 pre-Böt 复合体注射 NS (pH 7.4)后, 与注药前相比 T_I、T_E、RF 和动脉血压均无明显变化(*P* > 0.05)。

3 讨论

目前认为, 延髓 pre-Böt 复合体是新生动物呼吸节律起源的关键部位^[1, 2]; 在成年整体猫可能亦存在具有类似作用的 pre-Böt 复合体^[3~5]。我们在本研究中观察到, 微量注射兴奋性神经毒素 KA 毁损成年整体大鼠 pre-Böt 复合体后, 动物的节律性呼吸活动出现不可逆性停止, 而损毁面神经核后未出现呼吸停止, 提示 pre-Böt 复合体在成年整体大鼠呼吸节律的产生中也起着特异性的作用。因此, 尽管在动物生长发育过程中, 产生呼吸节律的机制会发生一些重要变化^[6], 但是对于不同种系的新生和成年哺乳动物, pre-Böt 复合体是呼吸节律起源的关键部位可能具有普遍意义。

据文献报道, 在成年大鼠 pre-Böt 复合体微量注

射 Glu 或 N-甲基 D-门冬氨酸(NMDA)可引起膈神经的背景放电和放电节律增加^[7]; 在成年猫, 该区微量注射 DL-同型半光氨酸可引起呼吸兴奋效应, 表现为膈神经呈紧张性放电, 或在此基础上, 节律性放电的幅度增高和频率加快^[8]; 同样在成年猫, 微量注射 GABA_A 受体阻断剂荷包牡丹碱可引起长吸式呼吸, 注射甘氨酸受体阻断剂土的宁可引起呼吸频率加快^[5]。这些现象均表明, pre-Böt 复合体区神经元的活动在成年动物呼吸节律的产生和调控中具有重要作用。在本研究中, pre-Böt 复合体微量注射兴奋性氨基酸或抑制性氨基酸可改变大鼠呼吸时程, 对动脉血压无明显影响, 表明呼吸活动的变化不是动脉血压变化的继发结果。我们观察到, 注射兴奋性氨基酸可引起 T_E 缩短和 T_I 延长, 而注射抑制性氨基酸可引起 T_I 缩短, 提示 pre-Böt 复合体可能是启动和维持吸气过程的重要中枢结构。T_I 或 T_E 缩短而呼吸频率无明显变化, 可能是因为呼吸周期比 T_I 或 T_E 长, 所以单独的 T_I 或 T_E 缩短不足以引起呼吸频率出现具有统计学意义的增快; 也可能与所注射药物的剂量较小有关。

我们最近在成年大鼠 pre-Böt 复合体记录到各种类型的呼吸神经元, 尤其是与呼吸时相转换有关的前吸气神经元和吸气-呼气跨时相神经元^[9]。Sun 等^[10]在成年大鼠和 Schwarzscher 等^[3]在成年猫的研究中亦观察到类似现象, 并且认为 pre-Böt 复合体中的呼吸神经元大多为延髓本部的中间神经元。大量研究已经证明, 位于 pre-Böt 复合体吻端的 Böt 复合体主要含呼气神经元, 而位于其尾端的吻端腹侧呼吸组(rVRG)主要含吸气神经元, 它们主要投射到脊髓^[11]。我们还观察到, pre-Böt 复合体中呼吸神经元的放电活动可受微电泳 Glu、Gly、GABA 的影响, 其影响可被相应的拮抗剂所阻断^[9, 12]。这些资料表明, pre-Böt 复合体中呼吸神经元的类型、投射和作用都具有一定的特征性, 它们可能是形成呼吸节律的神经元基础, 其活动可受该区兴奋性和抑制性突触传递的影响而发生改变, 进而对呼吸节律产生调节作用。

本研究还观察到面神经核注射 KA 可引起膈神经放电节律和幅度的改变。刘磊等曾报道, 电、化学刺激或化学阻滞家兔面神经核背内侧区可影响呼吸节律和幅度^[13], 表明面神经核区可能参与节律性呼吸活动的调控。郑煜等曾在大鼠观察到双侧面神经核均有神经元投射到延髓头端腹侧呼吸组^[14], 这些投射可能为该核参与呼吸活动的调控提供了形态学基础, 对于其确切关系尚有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K *et al.* Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 1991, **254**: 726 ~ 729.
- [2] Johnson SM, Smith JC, Funk GD *et al.* Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol*, 1994, **72**: 2598 ~ 2608.
- [3] Schwarzacher SW, Smith JC, Richter DW. Pre-Bötzinger complex in the cat. *J Neurophysiol*, 1995, **73**: 1452 ~ 1461.
- [4] Ramirez JM, Schwarzacher SW, Pierrefiche O *et al.* Selective lesioning of the cat pre-Bötzinger complex *in vivo* eliminates breathing but not gasping. *J Physiol*, 1998, **507**: 895 ~ 907.
- [5] Pierrefiche O, Schwarzacher SW, Bischoff AM *et al.* Blockade of synaptic inhibition within the pre-Bötzinger complex in the cat suppresses respiratory rhythm generation *in vivo*. *J Physiol*, 1998, **509**: 245 ~ 254.
- [6] Hilaire G, Duron B. Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiol Rev*, 1999, **79**: 325 ~ 360.
- [7] Chitravanshi VC, Sapru HN. Phrenic nerve responses to chemical stimulation of the subregions of ventral medullary respiratory neuronal group in the rat. *Brain Res*, 1999, **821**: 443 ~ 460.
- [8] Solomon IC, Norman HE, Judith AN. Patterns of phrenic motor output evoked by chemical stimulation of neurons located in the pre-Bötzinger complex *in vivo*. *J Neurophysiol*, 1999, **81**: 1150 ~ 1161.
- [9] Zhang CY (张翠英), Yu W (余微), Zheng Y (郑煜). Discharge patterns of neurons in pre-Bötzinger complex and its responses to glycine in rats. *Chin J Neurosci* (中国神经科学杂志), 1999, **15**: 27 ~ 30 (in Chinese with English abstract).
- [10] Sun QJ, Goodchild AK, Chalmers JP *et al.* Pre-Bötzinger complex and phase-spanning neurons in the adult rat. *Brain Res*, 1998, **809**: 204 ~ 213.
- [11] Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties and neurotransmitters. *Physiol Rev*, 1995, **75**: 1 ~ 45.
- [12] Zhang CY (张翠英), Yu W (余微), Zheng Y (郑煜). Effects of L-glutamic acid and γ -aminobutyric acid and their corresponding antagonists on spontaneous discharges of neurons in pre-Bötzinger complex in rats. *Chin J Neurosci* (中国神经科学杂志), 1998, **14**: 85 ~ 89 (in Chinese with English abstract).
- [13] Liu L, Song G, Lu WY. Studies on the inspiratory generating effect of the dorso-medial area of nucleus facialis. *Respir Physiol*, 1989, **75**: 65 ~ 74.
- [14] Zheng Y, Riche D, Reklings, JC *et al.* Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (rVRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin. *Brain Res*, 1998, **782**: 113 ~ 125.