

【基础研究】

通信作者:千智斌(1974-),男,河南武陟人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:延髓呼吸中枢病变机制;E-mail:qianzhibin@126.com。

perfused $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 ACSF ($P < 0.05$); the TI, RC and IA of RRDA of medulla slices after being perfused $10, 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 ACSF were significantly bigger than after being perfused $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 ACSF ($P < 0.05$); there was no statistic difference in the TI, RC and IA of RRDA of medulla slices after being perfused $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 ACSF and $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 ACSF ($P > 0.05$). There was no statistic difference in the TI, RC and IA of RRDA of medulla slices before and after being perfused $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 ACSF ($P > 0.05$); the TI, RC of RRDA of medulla slices after being perfused $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 ACSF was significantly bigger than before and after being perfused $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 ACSF ($P < 0.05$), there was no statistic difference in IA of RRDA of medulla slices before and after being perfused $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 ACSF ($P > 0.05$); the TI, RC and IA of RRDA of medulla slices after being perfused $10, 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 ACSF were significantly shorter than after being perfused $1, 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 ACSF ($P < 0.05$); there was no statistic difference in the TI, RC and IA of RRDA of medulla slices after being perfused $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 ACSF and $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 ACSF ($P > 0.05$). **Conclusion** 5HT_{2C} receptor has positive regulation role on RRDA of medulla slice of neonatal rat.

Key words: 5-hydroxytryptamine 2C receptor; neonatal rat; medullary slice; rhythmic respiratory discharge activity

延髓呼吸中枢是哺乳动物基本节律性呼吸产生部位,对机体的存活起着至关重要的作用^[1]。位于延髓腹侧的面神经后核内侧区(medial area of nucleus reticularis, mNRF)在节律性呼吸发生中起关键作用,是延髓基本节律性呼吸的起源部位^[2-3]。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是体内重要的小分子生物活性物质,是一种经典而非常重要的神经递质^[4]。在体内,5-HT由色氨酸在色氨酸羟化酶作用下转化为5-羟色氨酸,后在5-羟色氨酸脱羧酶的催化作用下生成5-HT,5-HT的代谢是由单胺氧化酶作用下代谢为5-羟色醛和5-羟吲哚乙酸后经肾脏排出体外。与5-HT结合发挥调节作用的受体称为5-HT受体,5-HT_{2C}受体是其中一类亚型,是经典的7次跨膜G-蛋白偶联受体,其蛋白质分子N端位于细胞膜外部,C端位于细胞膜内侧。5-HT_{2C}受体与递质结合后经Gq蛋白途径改变及磷脂酶C、磷脂酶A₂活性将递质的信息传至细胞内发挥生理作用^[5]。为深入研究延髓呼吸中枢基本节律性呼吸放电(rhythmic respiratory discharge activity, RRDA)的产生、调节机制和5-HT_{2C}受体在其中的作用,作者记录新生大鼠离体延髓脑片RRDA并使用5-HT_{2C}受体激动剂和拮抗剂作用于脑片,观察5-HT_{2C}受体对新生大鼠延髓离体脑片RRDA的调节作用。

1 材料与方

1.1 实验动物 成年 Sprague-Dawley 大鼠 12 只,体质量(240.37 ± 36.84)g,购自河南省实验动物中心(许可证号:SCXK 豫 2012-0002),常规饲养,雄雌比例 1:2 合笼,使用其产下的 2 日龄新生大鼠 18 只进行本研究,体质量(6.79 ± 1.53)g,雌雄不拘。

1.2 试剂和仪器 5-HT_{2C}受体特异性激动剂 MK212 和特异性阻断剂 RS102221(美国 Sigma-Aldrich 公司);人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)所用试剂均为国产分析纯,配方如下: NaCl $129.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgSO₄

$1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KH₂PO₄ $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl₂ $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaHCO₃ $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glucose $28.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 99.99% 纯度的体积分数 95% O₂ + 体积分数 5% CO₂ 混合气(河南源正科技公司)。BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟电子科技有限公司);245 L 电冰箱(河南新飞电器集团公司);CY-12C 测氧仪(上海拓隆仪器设备有限公司);40 L 压力气瓶(中国航空工业集团公司第 134 厂);FZG-81 直流前置放大器(上海嘉龙教学仪器厂);YP1002 电子天平(上海越平科学仪器设备有限公司);立体显微镜(济南八一光学仪器厂)。

1.3 离体延髓脑片标本制作 乙醚吸入法将大鼠深度麻醉后在颈中部断头,鼠头置于冰 ACSF 中降温和清洗 5~10 s 后,放入盛有足量经体积分数 95% O₂ 和体积分数 5% CO₂ 混合气充分饱和并持续通混合气 0℃ ACSF 的自制解剖槽中。在解剖槽内液面下小心剪去鼠头皮肤和肌肉,避免触碰颅骨,从颈椎朝向头端剪开椎管并向头端延伸,直至完整去除顶颅骨暴露完整的脑组织。去除大脑皮层和小脑,用手术刀片割断颅底脑神经,即游离出延髓-脊髓,注意完整保留舌下神经根。迅速将标本头端向上移至切片槽内,腹侧面朝向刀刃,刀刃朝向头端倾斜 20°,在距前 600 μm 至距后 100 μm 间切下厚约 850 μm 的延髓脑片(含舌下神经根),将脑片置于灌流槽内,用 ACSF 以 $5 \sim 7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 持续灌流脑片,温度保持在 27~29℃。使用微电极操纵器夹持的吸附电极负压吸附舌下神经根,将舌下神经根产生的 RRDA 经直流前置放大器放大后输入 BL-420 生物信号采集和处理系统进行记录、分析和处理^[6]。

1.4 处理方式及观察指标 (1)使用空白 ACSF 灌流脑片 60 min,分别在 15、30、45、60 min 时统计分析 RRDA 的吸气时程(inspiratory time, TI)、呼吸周期(respiratory cycle, RC)和放电积分幅度(integral amplitude, IA);(2)稳定记录到 RRDA 后,分别使用含 1、5、10、20 μmol·L⁻¹ MK212 的 ACSF 灌流脑

片,每个浓度灌流 10 min,统计分析不同浓度 MK212 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时 RRDA 的 TI、RC 和 IA 变化情况;(3)稳定记录到 RRDA 后,分别使用 1、5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片,每个浓度灌流 10 min,统计分析不同浓度 RS102221 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时 RRDA 的 TI、RC 和 IA 变化情况。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用重复测量方差分析进行检验,在方差分析差异有统计学意义的情况下应用 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 空白 ACSF 灌流脑片在不同时间点 RRDA 情况比较 结果见表 1。15、30、45、60 min 时 RRDA 的 TI、IA、RC 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 空白 ACSF 对不同时间 RRDA 作用情况比较
Tab.1 Roles of blank ACSF to RRDA in different time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

灌流脑片时间点	TI	IA	RC
15 min	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
30 min	102.86 \pm 5.23	101.48 \pm 4.52	99.07 \pm 5.05
45 min	98.99 \pm 4.26	97.79 \pm 5.33	101.67 \pm 4.84
60 min	97.32 \pm 5.02	96.33 \pm 6.39	103.32 \pm 6.19
F	0.217	0.488	0.237
P	0.823	0.749	0.815

2.2 不同浓度 MK212 的 ACSF 灌流脑片对 RRDA 的作用 结果见表 2。1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片后 RRDA 的 TI、IA 和 RC 与给药前比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片后 RRDA 表现为 TI 延长、IA 增加、RC 缩短,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片后 RRDA 表现较 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片后 TI 进一步延长、IA 进一步增加、RC 进一步缩短,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);但 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片后与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片后比较,RRDA 的 TI、IA、RC 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 不同浓度 MK212 的 ACSF 灌流脑片对 RRDA 的作用
Tab.2 Roles of different concentration of MK212 to RRDA in perfuse slices ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

浓度	TI	IA	RC
给药前	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	101.32 \pm 4.85	100.48 \pm 5.19	99.48 \pm 5.20
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	107.33 \pm 5.49 ^a	108.57 \pm 5.93 ^a	96.34 \pm 5.16 ^a
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	113.08 \pm 4.67 ^{ab}	115.32 \pm 4.18 ^{ab}	89.94 \pm 5.92 ^{ab}
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	114.25 \pm 5.44 ^{ab}	117.69 \pm 5.82 ^{ab}	88.81 \pm 5.64 ^{ab}
F	17.466	25.521	9.087
P	0.000	0.000	0.000

注:与给药前和 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较^a $P < 0.05$;与 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 不同浓度 RS102221 的 ACSF 灌流脑片对 RRDA 的作用 结果见表 3。1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片后 RRDA 的 TI、IA 和 RC 与给药前比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片后 RRDA 较 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和给药前表现为 TI 缩短、RC 延长,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),IA 差异无统计学意义 ($P < 0.05$);10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片后 RRDA 表现较 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片后 TI 缩短、IA 减少、RC 延长,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);但 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片后与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片后比较,RRDA 的 TI、IA、RC 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 不同浓度 RS102221 的 ACSF 灌流脑片对 RRDA 的作用
Tab.3 Roles of different concentration of RS102221 to RRDA in perfuse slices ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

浓度	TI	IA	RC
给药前	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	99.23 \pm 5.87	100.73 \pm 5.53	98.67 \pm 4.77
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	95.67 \pm 4.75 ^a	97.68 \pm 4.92	103.60 \pm 4.24 ^a
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	82.37 \pm 4.56 ^{ab}	89.54 \pm 5.49 ^{ab}	110.09 \pm 4.67 ^{ab}
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	83.47 \pm 5.39 ^{ab}	88.36 \pm 5.83 ^{ab}	109.41 \pm 5.05 ^{ab}
F	18.564	14.269	11.782
P	0.000	0.000	0.001

注:与给药前和 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较^a $P < 0.05$;与 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究内容是在离体延髓脑片上进行,一直以来,离体脑片在记忆、发育和神经网络功能等方面被广泛应用,比在体实验有明显的优势。首先,减少了对整个机体各方面的影响,提高分析其自身功能和特征的精确度;其次,脑组织的机械稳定性在记录过程中显著提高,保证了场电位和膜片钳等电生理记录方法,能够使用分子生物学方法分析电生理方法记录的神经元;再者,方便在培养液或灌流液中加入递质、药物、生长因子等物质以期精确控制细胞外液成分。所以,本研究使用的离体延髓脑片适用于研究呼吸节律的产生和调节机制^[7-8]。

本研究结果显示,空白 ACSF 灌流脑片 15、30、45、60 min 时,RRDA 的 TI、IA、RC 比较差异均无统计学意义,表明 RRDA 在实验过程中无衰减,设计该实验模型稳定可靠。本研究在每个浓度下灌流 10 min,选取 8 min 这个时间点分析 RRDA,是因为通过预实验对 5、8 min 时的 RRDA 进行比较发现,这 2 个时间点的 RRDA 无差异,证明在 8 min 时 MK212 和 RS102221 对 RRDA 已达到稳定效果。本研究结果

显示, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时 RRDA 的 TI、IA 和 RC 与给药前比较差异均无统计学意义, 即对 RRDA 无兴奋作用; $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时 RRDA 表现为 TI 延长、IA 增加、RC 缩短, 差异均有统计学意义, 即对 RRDA 产生兴奋作用; $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时 RRDA 表现为 TI 进一步延长、IA 进一步增加、RC 进一步缩短, 差异有统计学意义, 即对 RRDA 兴奋作用进一步增强; 但 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时比较, RRDA 的 TI、IA、RC 差异均无统计学意义, 即 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时对 RRDA 的兴奋作用与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当。以上实验结果说明, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK212 是对 RRDA 的最适浓度, 这时的神经元细胞膜受体已被完全激活。本研究结果还显示, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时 RRDA 的 TI、IA 和 RC 与给药前比较差异均无统计学意义, 即对 RRDA 无抑制作用; $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时 RRDA 表现为 TI 缩短、RC 延长, 差异有统计学意义, IA 差异无统计学意义, 即仅对 RRDA 的 TI 产生抑制作用, 缩短吸气时程; $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时 RRDA 表现为 TI 缩短、IA 减少、RC 缩短, 差异均有统计学意义, 即对 RRDA 产生全面抑制作用; 但 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时比较, RRDA 的 TI、IA、RC 差异均无统计学意义, 即 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RS102221 的 ACSF 灌流脑片 8 min 时对 RRDA 的抑制作用与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当。以上实验结果说明, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RS102221 对 RRDA 达到最大效果, 在该浓度下, 细胞膜 5-HT_{2C} 受体与 RS102221 结合达到最大状态, 再增加 RS102221 浓度对 RRDA 的抑制效果不再增加, 即达到饱和浓度。激活 5-HT_{2C} 受体对 RRDA 有兴奋作用、阻断 5-HT_{2C} 受体对 RRDA 有抑制作用的实验结果说明, 延髓呼吸中枢神经元细胞膜上存在 5-HT_{2C} 受体正性调节呼吸神经元的活动, 在局部存在 5-HT 能神经元释放 5-HT 调节该部位神经元活性^[9]。有研究发现, 在中枢神经系统嗅球部位增加 5-HT 能够提高突触活性, 延髓部位神经元细胞膜上的 5-HT_{2C} 受体也可能循此途径增加神经元兴奋性起到兴奋效果^[10]。在延髓部位呼吸运动是高等生物生命必需的生理活动, 起源于延髓的 RRDA 是呼吸

运动基础, 延髓呼吸神经元细胞膜起调节作用的受体越多, 神经元功能就越稳定, 这对生物的存活和发展有着保护作用^[11-12]。

延髓离体脑片呼吸神经元细胞膜上存在 5-HT_{2C} 受体, 该部位存在 5-HT 能神经元释放 5-HT, 激活 5-HT_{2C} 受体对延髓呼吸中枢起着正性调节作用。

参考文献:

- [1] JI M L, WU Y H, QIAN Z B. Neurotoxicity of prenatal alcohol exposure on medullary pre-Böttinger complex neurons in neonatal rats [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(7): 1095-1100.
- [2] 姬明丽, 吴云红, 千智斌. 孕期酒精暴露对新生大鼠延髓基本节律性呼吸放电的作用[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(4): 598-601.
- [3] 千智斌, 姬明丽, 吴中海. 5-羟色胺 2A 受体对新生大鼠延髓脑片节律性呼吸放电的调制作用[J]. 新乡医学院学报, 2008, 25(1): 21-23.
- [4] MISHRA A, GOEL R K. Chronic 5-HT₃ receptor antagonism ameliorates seizures and associated memory deficit in pentylenetetrazole-kindled mice [J]. *Neuroscience*, 2016, 339: 319-328.
- [5] SPOIDA K, MASSECK O A, DENNERIS E S, et al. Gq/5-HT_{2C} receptor signals activate a local GABAergic inhibitory feedback circuit to modulate serotonergic firing and anxiety in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(17): 6479-6484.
- [6] 吴云红, 姬明丽, 千智斌. 孕期酒精暴露抑制低氧环境下新生大鼠耗氧量和基本节律性呼吸放电[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(11): 1-7.
- [7] JI G, ZHANG W, MAHIMAINATHAN L, et al. 5-HT_{2C} receptor knockdown in the amygdala inhibits neuropathic pain related plasticity and behaviors [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(6): 1378-1393.
- [8] CORSINI S, TORTORA M, NISTRI A. Nicotinic receptor activation contrasts pathophysiological bursting and neurodegeneration evoked by glutamate uptake block on rat hypoglossal motoneurons [J]. *J Physiol*, 2016, 594(22): 6777-6798.
- [9] GARFIELD A S, DAVIES J R, BURKE L K, et al. Increased alternate splicing of Htr2c in a mouse model for Prader-Willi syndrome leads disruption of 5HT_{2C} receptor mediated appetite [J]. *Mol Brain*, 2016, 9(1): 95-103.
- [10] BRILL J, SHAO Z, PUCHE A C, et al. Serotonin increases synaptic activity in olfactory bulb glomeruli [J]. *J Neurophysiol*, 2016, 115(3): 1208-1219.
- [11] TANI M, KOTANI S, HAYAKAWA C, et al. Effects of a TRPV1 agonist capsaicin on respiratory rhythm generation in brainstem-spinal cord preparation from newborn rats [J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(2): 327-338.
- [12] TREPICCIONE F, GERBER S D, GRAHAMMER F, et al. Renal Atp6ap2/(Pro) renin receptor is required for normal vacuolar H⁺-ATPase function but not for the renin-angiotensin system [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(11): 3320-3330.

(本文编辑: 徐刚珍 英文编辑: 孟 月)