

Role of NMDA Receptors Located in Dorsolateral-Pons and Ventrolateral-Pons Neurons in Hering-Breuer Reflex*

Hui Wang

College of Information and Electrical, Shandong University of Science and Technology, Qingdao
Email: wanghui818@gmail.com

Received: Sep. 13th, 2012; revised: Sep. 30th, 2012; accepted: Oct. 8th, 2012

Abstract: Vagal stimulation evokes Hering-Breuer Reflex (HBR), which is characterized by inspiratory inhibition and expiratory prolongation. In this work, the role of NMDA receptors located in dorsolateral-pons and ventrolateral-pons were studied and compared by comparing the strength of this reflex before and after microinjecting D-AP5. Experiments were performed on urethane anesthetized adult rats. The HBR was simulated by electrical stimulation of the central end of cervical vagus nerve. We found that the HBR was strengthened after microinjection D-AP5 into dorsolateral-pons, while weakened after microinjection in ventrolateral-pons. This work shows that NMDA receptor mediated neurotransmissions both in dorsolateral-pons and ventrolateral-pons exert opposite effects on HBR.

Keywords: Hering-Breuer Reflex; Dorsolateral-Pons; Ventrolateral-Pons; Rat

大鼠背侧脑桥及腹侧脑桥神经元 NMDA 受体在黑伯反射中的作用*

汪 慧

山东科技大学信息与电气工程学院, 青岛
Email: wanghui818@gmail.com

收稿日期: 2012 年 9 月 13 日; 修回日期: 2012 年 9 月 30 日; 录用日期: 2012 年 10 月 8 日

摘 要: 黑伯反射又称为肺牵张感受器反射, 是肺牵张感受器兴奋所导致的呼气延长与吸气缩短反应。电刺激迷走神经中枢端可以模拟该反射。我们前期研究发现, 在腹侧脑桥, NMDA 受体介导的递质传递可以对黑伯反射产生调节作用。本研究在前期研究基础上, 以大鼠为实验对象, 通过电刺激其迷走神经中枢端诱导出黑伯反射, 分别向背侧脑桥及腹侧脑桥内微量注射 NMDA 受体阻断剂 D-2-氨基-5-磷酸基戊酸(D-AP5), 观察药物对黑伯反射的调节作用。结果表明, 向背侧脑桥注射 D-AP5 后, 黑伯反射的呼吸抑制效应明显增强, 向腹侧脑桥注射 D-AP5, 黑伯反射的呼吸抑制效应明显削弱。NMDA 受体介导的递质传递在背侧脑桥及腹侧脑桥对黑伯反射发挥方向相反的调节作用。

关键词: 黑伯反射; 背侧脑桥; 腹侧脑桥; 大鼠

1. 引言

黑伯反射又称为肺牵张反射, 是由慢适应肺牵张

感受器兴奋导致的呼气延长及吸气缩短反应^[1], 在促进呼吸时相转换, 防止肺过度扩张方面发挥重要作用。研究表明在某些条件下可以对黑伯反射进行调控。例如, 电刺激或者化学刺激中缝苍白核可以明显削弱黑伯反射, 而且该效应还有短暂记忆^[2]。电刺激

*资助信息: 国家自然科学基金项目(60875068); 中国博士后基金(2011M501153); 青岛市科技局资助项目(10-3-4-2-2-jch)。

腹侧脑桥可以增强黑伯反射而向腹侧脑桥微量注射 NMDA 受体阻断剂 MK-801 及 D-AP5 则会削弱黑伯反射^[3,4]。双侧背侧脑桥损毁或系统注射 MK-801 可以消除黑伯反射的快适应及刺激后反跳现象^[5]。

脑桥是呼吸调整中枢所在地,在呼吸节律的发起、呼吸时相转换以及呼吸运动协调中发挥重要作用。脑桥呼吸调整中枢可以分为背侧脑桥(dl-pons)及腹侧脑桥(vl-pons)。Dl-pons 主要结构是 KF 核及 PB 核。Vl-pons 主要指 A5 区。Dl-pons 与 vl-pons 之间存在密切的双向纤维联系。我们系统观察了大鼠 dl-pons 及 vl-pons 神经元上 NMDA 受体对黑伯反射的影响,为进一步研究脑桥的呼吸调控功能提供新的实验依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠(体重 250~450 克)22 只。所有动物手术过程和饲养方法均符合世界脑研究组织发布的实验动物使用条例。

2.2. 动物模型制备

用 30%的氨基甲酸乙酯(1.5 g/kg)腹腔麻醉。皮下注射阿托品(0.1 mg/kg)减少呼吸道内腺体分泌。气管插管,在动物腹侧颈部游离并切断双侧迷走神经及右侧 C5 膈神经。将神经在背侧暴露并浸润于液体石蜡中。分离股动脉及股静脉用于监测血压及静脉给药。三碘季铵酚(Sigma 公司,初始计量 1 mg/kg i.v,每小时补充初始剂量的 40%~50%)肌松,用小动物呼吸机(AVS-1 Ventilator System)给予人工通气。实验过程中,CO₂ 监测仪(Gemini Respiratory Gas Analyzer, CWE Inc.)持续监测终末呼出气 CO₂ 分压并使其维持在 5%~5.5%。肛门温度计监测动物的体温。根据大鼠脑图谱^[6],将动物的头部以俯卧位固定于立体定位仪上,使前囟高于后囟约 1.5 mm 以便于电极插入。切开后囟附近的皮肤及其他组织,暴露颅骨,在后囟附近耳尖水平中线矢状缝一侧用电钻钻开一直径约 5 mm 的孔,去掉硬脑膜,暴露脑组织。所有暴露组织用液体石蜡覆盖。膈神经置于双极银丝电极,放电经 CyberAmp380 生物放大器放大后引入 NI-DAQ 数据采集卡(NI 公司,美国),通过 Labview 软件采样(10 kHz)记录。同时膈神经放电输入积分仪。

2.3. 微量注射

2.3.1 注射药物

NMDA 受体阻断剂 D-2-氨基-5-磷酸基戊酸(D-AP5),为美国 Sigma 公司产品,溶于人工脑脊液(ACSF),稀释至 10 mM,注射剂量为 20~50 nl。

2.3.2. 注射部位及方法

为确定最佳注射位置,首先使用钨丝微电极(尖端直径 1~3 μm,电阻 0.5~1.0 MΩ)刺激 dl-pons(前囟后 9.5~10 mm,中线旁开 2.2~2.4 mm,背侧表面深入 7.7~8.2 mm)及 vl-pons(前囟后 9.5~10 mm,中线旁开 2.2~2.4 mm,背侧表面深入 9.2~9.7 mm),出现呼吸抑制效应确定注药位点。电刺激由电刺激器(Master-8,以色列)经过隔离器(ISO-Flex)提供。刺激参数:强度 20~50 μA,频率 80 Hz。退出钨丝微电极,将灌注药物的玻璃微管垂直固定在微电极推进器上,调整其位置,使尖端垂直正对注射部位,缓慢插入电刺激引起呼吸抑制效应的区域。使用 PPM-2 微量注射系统(NeurophoreBH-2)压力注射 D-AP5。通过手术显微镜目镜测微尺观察玻璃微管内液面的移动,计算注射药物的剂量。向 dl-pons 及 vl-pons 内以相同速度注射同等剂量、PH 值和渗透压的人工脑脊液作为空白对照,以排除注射速度、浓度、PH 值、渗透压对实验结果的影响。在 dl-pons 及 vl-pons 以外的区域(电刺激不引起呼吸抑制效应)微量注射 D-AP5 作区域对照。

2.4. 实验分组

背侧脑桥及腹侧脑桥实验均为 5 只大鼠。以背侧脑桥为例,微量注射 D-AP5 之前这 5 只大鼠的黑伯反射为前对照组;微量注射 D-AP5 之后 2 分钟再次在这 5 只大鼠上诱导出黑伯反射,此为实验组;微量注射后 60~90 分钟,在这 5 只大鼠上诱导出黑伯反射为后对照组。

前对照组:给予迷走神经中枢端长时程(1 分钟)电刺激模拟黑伯反射,在刺激同时记录膈神经放电,观察放电积分幅度、频率、呼吸时间及吸气时间。

实验组:向 dl-pons 及 vl-pons 分别微量注射 D-AP5 20~50 nl,再次刺激迷走神经模拟黑伯反射,刺激同时记录膈神经放电,观察放电积分幅度、频率、呼吸时间及吸气时间。

后对照组:微量注射后 60~90 min,待膈神经放

电恢复到前对照水平再次电刺激迷走神经中枢端，刺激同时记录膈神经放电，观察放电积分幅度、频率、呼吸时间及吸气时间。

2.5. 组织学定位

实验完毕后，注射部位通直流电(100 μ A, 正极 30 S)做损伤标记。静脉注射致死剂量氨基甲酸乙酯处死动物，灌注后取脑，4%多聚甲醛固定 48 小时，振动切片机切片，1%甲酚紫染色，显微镜下鉴定注射位点。

2.6. 统计学处理

用自编 Matlab 软件测量膈神经放电幅度(AMP)、吸气时间(Ti)、呼气时间(Te)。以 $60/(\text{呼气时间}+\text{吸气时间})$ 为某呼吸周期的瞬时呼吸频率(f)。取迷走神经刺激前对照组(1 min)内的平均膈神经放电幅度、平均吸气时间、平均呼气时间、平均瞬时呼吸频率为各个呼吸参数的基线值。以基线值为标准对各个呼吸周期的 AMP, Ti, Te, f 进行标准化。以 Ti 为例：标准化 Ti = $[(\text{Ti} - \text{Ti 基线值}) \div \text{Ti 基线值}] + 1$ 。

为方便统计分析，将黑伯反射分为三个阶段：

第一阶段(stage-1)：迷走神经刺激开始后第一个呼吸周期。其瞬时呼吸频率(f)作为该阶段呼吸频率，测量该周期 Ti, Te。在此基础上统计实验组该阶段平均 Ti, Te, f 的测量值(绝对值)及其标准化值。

第二阶段(stage-2)：1 分钟迷走神经刺激的后 30 秒。计算该时段内所有呼吸周期的平均 Ti, Te, f，在此基础上统计实验组该阶段平均 Ti, Te, f 的测量值(绝对值)及其标准化值。

第三阶段(stage-3)：迷走神经刺激结束后的前 5 个呼吸周期。计算这 5 个呼吸周期的 Ti, Te, f 平均值。在此基础上统计实验组该阶段平均 Ti, Te, f 的测量值(绝对值)及标准化值。

采用 Student's t 检验，以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3. 结果

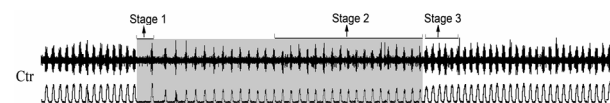
3.1. 长时程高频刺激迷走神经模拟黑伯反射的呼吸抑制效应(图 1)

长时程高频持续电刺激迷走神经中枢端可以模拟黑伯反射，首先出现的是强度依赖性的呼吸暂停、膈神经放电停止于呼气相，随着刺激的延续，节律性

膈神经放电重新出现，呼吸频率逐渐加快向基线水平恢复但仍然低于基线水平。刺激停止后出现短暂的呼吸频率加快并高于刺激前基线水平，该现象主要由呼气时间缩短引起，称为刺激后反跳效应(PR)。

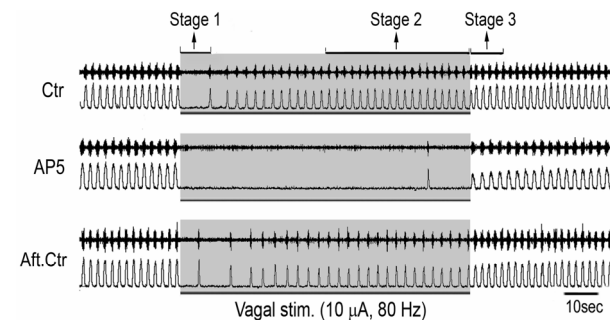
3.2. 向背侧脑桥微量注射 D-AP5 可以增强黑伯反射的呼吸抑制效应(图 2)

背侧脑桥内微量注射 D-AP5 2 分钟后，电刺激迷走神经中枢端诱导黑伯反射，与注射前的前对照组比较，黑伯反射呼吸抑制程度明显增强。第一阶段呼气时间延长程度由 $420.55\% \pm 0.74\%$ 增加至 $821.17\% \pm 0.79\%$ ，吸气时间缩短程度由 $41.4\% \pm 0.16\%$ 增加至 $83\% \pm 0.04\%$ ，呼吸频率降低程度由 $55.29\% \pm 0.14\%$ 增加至 $80.14\% \pm 0.08\%$ 。第二阶段呼气时间延长程度由 $29.08\% \pm 0.03\%$ 增加至 $45.57\% \pm 0.13\%$ ，吸气时间缩短程度由 $40.4\% \pm 0.07\%$ 增加至 $69.2\% \pm 0.14\%$ ，呼吸频率降低程度由 $9.42\% \pm 0.02\%$ 增加至 $55.94\% \pm 0.22\%$ 。第三阶段“反跳”被削弱。反跳呼吸频率增加由 9.8%



图中阴影部分显示的是刺激迷走神经 1 分钟期间的膈神经放电情况。首先出现的是呼吸暂停、膈神经放电停止于呼气相，随着刺激的延续，节律性膈神经放电重新出现，呼吸频率逐渐加快向基线水平恢复但仍然低于基线水平。刺激停止后出现短暂的呼吸频率加快并高于刺激前基线水平，即反跳现象。

Figure 1. Hering-Breuer reflex induced by stimulating vagus nerve
图 1. 刺激迷走神经引起黑伯反射



图中阴影部分显示的是刺激迷走神经 1 分钟期间的膈神经放电情况。Ctr: 电刺激迷走神经模拟黑伯反射，此为前对照。上线为原始膈神经放电，下线为膈神经放电积分。AP5: 背侧脑桥微量注射 D-AP5 后再刺激迷走神经诱导黑伯反射，膈神经放电的呼吸抑制效应明显增强。Aft.Ctr: 微量注射后，待膈神经放电恢复到注药前水平，再电刺激迷走神经诱导黑伯反射，此为后对照。

Figure 2. Microinjection of D-AP5 into dl-pons enhance the inhibitory effect of Hering-Breuer reflex
图 2 dl-pons 微量注射 D-AP5 增强迷走神经刺激引起的黑伯反射的呼吸抑制效应

$\pm 0.06\%$ 下降至 $7.18\% \pm 0.07\%$ 。以上对比, 变化均有显著性($n = 5, P < 0.05$)。

3.3. 向腹侧脑桥微量注射 D-AP5 可以削弱黑伯反射的呼吸抑制效应(图 3)

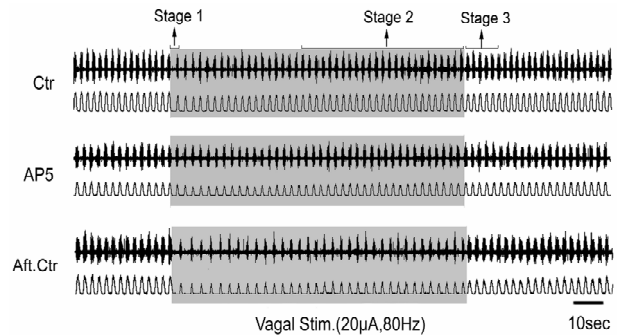
腹侧脑桥内微量注射 D-AP5 2 分钟后, 电刺激迷走神经中枢端诱导黑伯反射, 与注射前的前对照组比较, 黑伯反射呼吸抑制程度明显削弱。第一阶段呼气时间延长程度由 $247.28\% \pm 0.71\%$ 缩短至 $66.49\% \pm 0.18\%$, 呼吸频率降低程度由 $60.63\% \pm 0.08\%$ 降低至 $28.19 \pm 0.08\%$ 。第二阶段呼气时间延长程度由 $29.76 \pm 0.05\%$ 缩短至 $18.75\% \pm 0.049\%$, 呼吸频率降低程度由 $15.51\% \pm 0.03\%$ 减小至 $8.54\% \pm 0.03\%$ 。第三阶段“反跳”被削弱。反跳呼吸频率增加由 $8.4\% \pm 0.016\%$ 下降至 $5.09\% \pm 0.02\%$ 。以上对比, 变化均有显著性($n = 5, P < 0.05$)。

4. 讨论

黑伯反射又称为肺牵张感受器反射, 是慢适应肺牵张感受器(SAR)兴奋所导致的呼气延长与吸气缩短反应。SAR 的传入纤维加入迷走神经, 为 $A_{\alpha-\beta}$ 类纤维。进入延髓后终止于孤束核(NTS)的内侧和腹外侧亚核^[7,8]。NTS 是黑伯反射的二级中继神经元所在部位。SAR 二级中继神经元轴突投射到背侧脑桥呼吸调整中枢和延髓腹外侧腹侧呼吸神经元群^[9-12]。可见黑伯反射中枢部分至少存在两条独立的信息传递路线: 一是经 NTS 至延髓腹外侧腹侧呼吸神经元群的直接路线, 二是经脑桥呼吸调整中枢再到延髓腹外侧腹侧呼吸神经元群的间接路线。前者介导黑伯反射的即刻效应, 即呼气延长与吸气缩短反应; 后者介导黑伯反射的习惯化和去敏感化。

本研究采用电刺激迷走神经中枢端的方法模拟黑伯反射。尽管迷走神经中含有不同功能的纤维, 在本研究刺激参数下被兴奋的主要是 A 类纤维。另外在 SD 大鼠, 肺牵张感受器主要是 SAR, 且在 NTS, 快适应感受器(RAR)中继神经元受到 SAR 中继神经元的抑制^[13,14]。本实验室以往的研究显示, 持续肺扩张导致的黑伯反射与我们电刺激颈迷走神经中枢端所诱发的黑伯反射几乎完全相同。

1923 年 Lumsden 发现脑桥呼吸调整中枢^[15], 其



图中阴影部分显示的是刺激迷走神经 1 分钟期间的膈神经放电情况。Ctr: 电刺激迷走神经模拟黑伯反射, 此为前对照。上线为原始膈神经放电, 下线为膈神经放电积分。AP5: 腹侧脑桥微量注射 D-AP5 后再刺激迷走神经诱导黑伯反射, 膈神经放电的呼吸抑制效应明显减弱。Aft.Ctr: 微量注射后, 待膈神经放电恢复到注药前水平, 再电刺激迷走神经引导出黑伯反射, 此为后对照。

Figure 3. Microinjection of D-AP5 into vl-pons weakens the inhibitory effect of Hering-Breuer reflex
图 3 vl-pons 微量注射 D-AP5 削弱迷走神经刺激引起的黑伯反射的呼吸抑制效应

最基本的功能是促进呼吸时相转换, 尤其是吸气相向呼气相的转换^[16-18]。该功能与黑伯反射互补。当呼吸调整中枢与黑伯反射均失效的时候, 呼吸时相转换失败, 出现长吸呼吸模式^[19-22]。另有研究表明, 呼吸调整中枢与黑伯反射形成自动防险保障机制^[23]。背侧脑桥的功能之一是代偿黑伯反射的吸气切断作用^[22]。在黑伯反射正常发挥作用时 SAR 传入到达背侧脑桥并抑制其活动。此时背侧脑桥处于“去敏感化”状态。当黑伯反射被切断后 SAR 传入不能到达背侧脑桥, 背侧脑桥脱抑制兴奋发挥易化吸气切断的作用, 从而代偿黑伯反射的功能。本研究发现背侧脑桥还能反馈调节黑伯反射的强度, 表明在生理状态下背侧脑桥与黑伯反射相互制约, 使呼吸时相的控制更加稳定且具有可塑性。

本实验还发现背侧脑桥与腹侧脑桥神经元上的 NMDA 受体介导的神经递质传递对黑伯反射发挥相反的调节作用。这是一个新的发现。背侧脑桥和腹侧脑桥都属于呼吸调整中枢, 它们之间有密切的双向纤维投射。腹侧脑桥 42% 的神经元可被电刺激背侧脑桥所兴奋^[24]。然而腹侧脑桥不是背侧脑桥的下游中继站, 因为只有少数发自背侧脑桥的下行投射纤维终止于腹侧脑桥。背侧脑桥对腹侧脑桥的支配是通过下行纤维通过该区域时的分枝来实现的(结果尚未发表)。可见腹侧脑桥是一独立结构。以往研究表明, 腹侧脑桥对呼吸的调节功能与背侧脑桥相似。例如, 兴奋腹

侧脑桥可以导致呼气时间延长、吸气时间缩短；在切断迷走神经的大鼠，局部损毁或阻断其腹侧脑桥导致长吸呼吸^[25]。然而，它们对黑伯反射的调控作用却是相反的，其具体机制目前并不清楚。

综上所述，黑伯反射受控于脑桥呼吸调整中枢两个既相互独立又相互联系的亚结构。这种功能调控模式极大的增加了该反射的稳定性和可塑性，使呼吸时相的转换更为平稳，也加强了呼吸节律的稳定性和可塑性。

参考文献 (References)

- [1] E. S. Schelegle, J. F. Green. An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. *Respiration Physiology*, 2001, 125: 17-31.
- [2] Y. Li, G. Song, C. Ying, et al. Modulation of the Hering-Breuer reflex by Raphe Pallidus in rabbits. *Neuroscience Letters*, 2006, 397: 259-262.
- [3] H. Wang, H. Zhang, G. Song, et al. Modulation of Hering-Breuer reflex by ventrolateral pons. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 605: 387-392.
- [4] 汪慧, 于书彦, 张衡. 大鼠腹侧脑桥神经元 NMDA 受体和 GABA 受体在黑伯反射中的作用[J]. *山东医药*, 2011, 51(20): 13-14.
- [5] M. S. Siniaia, D. L. Young and C. S. Poon. Habituation and desensitization of the Hering-Breuer reflex in rat. *Journal of Physiology (London)*, 2000, 523(2): 479-491.
- [6] G. Paxinos, C. Watson. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Edition, New York: Academic Press, 2007: 456.
- [7] A. J. Berger, D. B. Averill. Projection of single pulmonary stretch receptors to solitary tract region. *Journal of Neurophysiology*, 1983, 49(3): 819-830.
- [8] A. J. Berger, T. E. Dick. Connectivity of slowly adapting pulmonary stretch receptors with dorsal medullary respiratory neurons. *Journal of Neurophysiology*, 1987, 58(6): 1259-1274.
- [9] K. Ezure, K. Otake, J. Lipski, et al. Efferent projections of pulmonary rapidly adapting receptor relay neurons in the cat. *Brain Research*, 1991, 564(2): 268-278.
- [10] K. Ezure, I. Tanaka. Pump neurons of the nucleus of the solitary tract project widely to the medulla. *Neuroscience Letters*, 1996, 215(2): 123-126.
- [11] K. Ezure, I. Tanaka. Identification of deflation-sensitive inspiratory neurons in the dorsal respiratory group of the rat. *Brain Research*, 2000, 883(1): 22-30.
- [12] K. Otake, Y. Nakamura, I. Tanaka, et al. Morphology of pulmonary rapidly adapting receptor relay neurons in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 2001, 430(4): 458-470.
- [13] K. Ezure, I. Tanaka. Lung inflation inhibits rapidly adapting receptor relay neurons in the rat. *NeuroReport*, 2000, 11(8): 1709-1712.
- [14] K. Ezure, I. Tanaka. GABA, in some cases together with glycine, is used as the inhibitory transmitter by pump cells in the Hering-Breuer reflex pathway of the rat. *Neuroscience*, 2004, 127(2): 409-417.
- [15] T. Lumsden. Observations on the respiratory centres in the cat. *Journal of Physiology (London)*, 1923, 57: 153-160.
- [16] M. I. Cohen. Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation. *Journal of Physiology (London)*, 1971, 217: 133-158.
- [17] C. Von Euler. Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern. In: A. P. Fishman, N. S. Cherniack, J. G. Widdicombe and S. R. Geiger, Eds., *Handbook of Physiology*, Bethesda: American Physiological Society, 1986, 2(3): 1-67.
- [18] W. Wang, M. L. Fung and W. M. St. John. Pontine regulation of ventilatory activity in the adult rat. *Journal of Applied Physiology*, 1993, 74: 2801-2811.
- [19] M. L. Fung, W. Wang and W. M. St. John. Involvement of pontine NMDA receptors in inspiratory termination in rat. *Respiration Physiology*, 1994, 96: 177-188.
- [20] S. F. Morrison, S. L. Cravo and H. M. Wilfehrt. Pontine lesions produce apneusis in the rat. *Brain Research*, 1994, 652: 83-86.
- [21] M. B. Harris, W. K. Milsom. Apneusis follows disruption of NMDA-type glutamate receptors in vagotomized ground squirrel. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2003, 134: 191-207.
- [22] M. S. Siniaia, D. L. Young and C. S. Poon. Habituation and desensitization of the Hering-Breuer reflex in rat. *Journal of Physiology (London)*, 2000, 523(2): 479-491.
- [23] J. Jodkowski, S. K. Coles and T. E. Dick. A "pneumotaxic centre" in rats. *Neuroscience Letters*, 1994, 172(1-2): 67-72.
- [24] M. D. Milner, J. P. Lara and M. P. L. de Miguel. A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetized rat. *Brain Research*, 2003, 982(1): 108-118.
- [25] J. Jodkowski, S. K. Coles and T. E. Dick. Prolongation in expiration evoked from ventrolateral pons of adult rats. *Applied Physiology*, 1997, 82(2): 377-381.