

活性氧族对延髓面神经后核内侧区呼吸节律的调控作用

何国军¹, 吴中海^{1*}, 胡德辉¹, 千智斌¹, 王晓华²

(1. 南方医科大学生理学教研室, 广州 510515; 2. 福州总医院 476 临床部, 福州 350002)

[摘要] **目的:**探讨活性氧族(reactive oxygen species, ROS)在延髓面神经后核内侧区(the medial area of nucleus retrofacialis, mNRF)对呼吸节律调控的作用。**方法:**仿 Suzue 方法制作新生大鼠含有舌下神经根及 mNRF 的离体延髓脑片标本, 以吸附电极记录舌下神经根呼吸节律性放电活动(respiratory rhythmic activity, RRA)作为呼吸活动的指标, 采用全细胞膜片钳记录模式在 mNRF 同步记录呼吸神经元。分别观察特丁基氢过氧化物(t-butyl hydroperoxide, tBHP)、 α -硫辛酸(α -lipoic acid, α -LA)对 mNRF 呼吸起步神经元及 RRA 的影响。**结果:**tBHP 可显著使呼吸周期缩短、幅度增加, α -LA 使呼吸周期延长、幅度降低; 同时 α -LA 可使 Cd^{2+} 非敏感性呼吸起步神经元动作电位周期显著延长, 幅度降低, 对 Cd^{2+} 敏感性呼吸起步神经元无显著影响; voltage steps 和 ramps 表明 α -LA 可抑制 Cd^{2+} 非敏感性起步神经元的短暂性和持久性的钠电流。**结论:**ROS 对 RRA、 Cd^{2+} 非敏感性起步神经元具有兴奋性作用, 是通过调节钠电流而起作用的。

[关键词] 呼吸中枢; 延髓面神经后核内侧区; 活性氧; 呼吸节律

[中图分类号] R 332.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0254-07

Role of reactive oxygen species in regulation of respiratory rhythm in medial area of nucleus retrofacialis

HE Guo-jun¹, WU Zhong-hai^{1*}, HU De-hui¹, QIAN Zhi-bin¹, WANG Xiao-hua² (1. Department of Physiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. No. 476 Clinical Department, General Hospital, PLA Fuzhou Military Area Command, Fuzhou 350002)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the role of reactive oxygen species (ROS, i. e., H_2O_2 and O_2^-) in regulation of respiratory rhythm in the medial area of nucleus retrofacialis (mNRF). **Methods:** Medullary slices of neonatal SD rats, including hypoglossal nerve (XII n) and mNRF, were made according to Suzue's method. Simultaneous recording of the XII n respiratory rhythmic activity (RRA) with suction electrode and the respiratory neuronal discharge were performed with whole cell patch in the mNRF on the brainstem slice *in vitro*. The effect of t-butyl hydroperoxide (tBHP) and α -lipoic acid (α -LA) on the respiratory pacemaker neurons and respiratory rhythm in the mNRF were observed. **Results:** tBHP significantly decreased respiratory cycle (RC) and increased respiratory amplitude; α -LA significantly increased RC and decreased its amplitude. Meanwhile, α -LA significantly prolonged the action potential of the respiratory cadmium-insensitive pacemaker neurons and reduced its amplitude, but it had no significant effect on the cadmium-sensitive respiratory pacemaker neurons. Voltage steps and ramps showed that α -LA inhibited both the transient and persistent sodium current of cadmium-insensitive pacemaker neurons. **Conclusion:** ROS has an excitatory effect on the respiratory rhythm and the cadmium-insensitive respiratory pacemaker neurons through modulating sodium current.

[KEY WORDS] respiratory center; the medial area of nucleus retrofacialis; reactive oxygen species; respiratory rhythm

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 254-260]

节律性呼吸是维持生命的基本条件, 大量研究表明基本呼吸节律产生于延髓, 但对于基本呼吸中枢的确切位置仍有一定的争议^[1-4]。1991 年, Smith 等提出, 产生基本呼吸节律的关键部位为位于延髓头段和中段腹侧呼吸组之间的前包氏复合体(pre-Böttinger complex, pre-BötC)^[2]。本实验室以往的研究表明, 在延髓面神经后核内侧区(the medial area of nucleus retrofacialis, mNRF)被阻滞或电毁损以后, 呼吸节律性电活动消除, 提示 mNRF 可能是基本节律性呼吸发生的部位^[3, 5-8]。

H_2O_2 、 O_2^- , 是有毒性作用的小分子, 能够导致多种退行性疾病^[9]。然而, 近来发现微量的 ROS 对细胞是有益的, 能够通过氧化还原通路调节生长因子和细胞因子的生理功能^[10]。Greene 等^[11]在肾小球膜

活性氧族(reactive oxygen species ROS), 包括

[基金项目] 国家自然科学基金(30570670); 广东省自然科学基金(5004714). Supported by National Natural Science Foundation of China(30570670) and Natural Science Foundation of Guangdong Province(5004714).

[作者简介] 何国军, 博士生, 主治医师。

E-mail: neuromed@163.com

* Corresponding author. E-mail: wzh@fimmu.com

细胞中发现,5-HT_{2A}受体的激活可以使 ROS 及细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated protein kinase,ERK)表达增加,蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)抑制剂、抗氧化剂可消除上述作用,认为 ROS 为 PKC 下游产物,5-HT_{2A}受体通过产生氧化产物传递信号起作用。Brandes 等^[12]通过狗的在体研究发现:5-HT 可以使吸气性舌下运动神经元(inspiratory hypoglossal motoneurons,IHMNs)放电频率显著增加,而 5-HT_{2A}受体阻断剂 ketanserin 可显著抑制 5-HT 的作用,认为 5-HT 调节 IHMNs 活动是通过 5-HT_{2A}受体作用的。Pena 等^[13]发现内源性的 5-HT_{2A}受体激动剂盐酸 2,5-二甲氧基-4-碘苯基丙烷(*R*-[2]-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride,DOI)增加呼吸频率,阻断 5-HT_{2A}受体可以使呼吸频率、幅度下降,呼吸节律不规则,在细胞水平上发现,阻断 5-HT_{2A}受体使所有依赖于 Na⁺电流的起步神经元动作电位释放减少,依赖于 Ca²⁺电流的起步神经元不受影响,PKC 激活可抑制 5-HT_{2A}受体阻断剂的作用,认为内源性激活 5-HT_{2A}受体调节呼吸和 PKC 通路调节钠电导有关。

目前国内外尚无关于 ROS 对呼吸节律、呼吸起步神经元作用(如自发放电、兴奋性、离子通道等)的研究报道。基于以上的研究,我们推测:ROS 对呼吸节律、依赖于 Na⁺电流的起步神经元具有兴奋性作用,可能是通过调节 Na⁺电流而起作用的。为证明上述推测,我们在 mNRF 进行了下述工作。

1 材料和方法

1.1 脑片制备 实验用新生 SD 大鼠(P1~3 d),雌雄不拘,仿 Suzue 方法^[14]首先制作离体延髓-脊髓标本,经乙醚深麻醉后,迅速在延髓-脑桥之间横断脑干,去除颅骨及脑桥以上的脑组织,剪开延髓背侧颅骨,小心分离至 C₁~C₂段颈髓,完整保留舌下神经。整个过程均在持续充以 95% O₂和 5% CO₂的改良 Krebs 液(mmol/L:NaCl 124,KCl 5,CaCl₂ 2,MgSO₄ 1.3,NaHCO₃ 26,葡萄糖 30;通以 95% O₂和 5% CO₂平衡 1 h 以上)中进行,3 min 内完成标本制作。迅速将标本移至切片槽内,头端向上,背面倾斜 20°朝向刀刃,自前 700 μm 至后 100 μm 切下延髓脑片(约 800 μm,含舌下神经根)。该脑片结构中主要包含面神经后核内侧区,腹侧呼吸组以及背侧呼吸组的一部分。迅速将脑片移至灌流槽内,以改良的 Krebs 液 4~6 ml/min 持续灌流,pH 值 7.35~7.45,

温度 27~29℃。

1.2 使用试剂 NaCl、KCl、CaCl₂、MgSO₄、NaHCO₃、glucose、CsCl、氯化四乙铵(tetraethylammonium chloride,TEA-Cl,钾通道阻断剂)、乙二醇二乙醚二胺四乙酸(ethylene glycol tetra-acetate,EGTA)、MgCl₂、Na₂ATP、HEPES、MK801(NMDA 受体阻断剂)、CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione,非 NMDA 受体阻断剂)、strychnine(甘氨酸受体阻断剂)、荷包牡丹碱(bicuculline-free base,GABA_A受体阻断剂)、镉(cadmium,Cd)、河豚毒素(tetrodotoxin,TTX)、二甲基亚砷(dimethylsulfoxide,DMSO,用以溶 CNQX)、特丁基氢过氧化物(*t*-butyl hydroperoxide,tBHP,氧化剂)、 α -硫辛酸(α -lipoic acid, α -LA,抗氧化剂)。除 TTX(来自中国河北水产研究所)外,其余试剂均来源于 Sigma 公司,实验用双蒸水由南方医科大学中心实验室提供。

1.3 主要仪器 微电极控制器(美国 SUTER P-97,Sutter Instrument),倒置显微镜(OLYMPUS),微操纵器(SD Instrument),Axopatch200B 膜片钳放大器(Axon Instruments),FZG-81 型直流前置放大器(上海嘉龙教学仪器厂),DIGITA1320 实验数据采集系统(Axon Instruments),pClamp9.2 软件(Axon Instruments)。

1.4 实验方法

1.4.1 呼吸节律放电记录 用内含银丝的吸附电极通以负压吸引舌下神经根,信号放大 2 000 倍,滤波:低频 1.5 kHz、高频 250 Hz,将神经电信号(RR-DA)经由 FZG-81 型直流前置放大器直接输入 DIGITA1320 实验数据采集系统。用以作记录呼吸神经元监测指标(图 1)。

1.4.2 膜片钳细胞内记录 记录方式为全细胞膜片钳记录模式,呼吸神经元的依据是根据其所在解剖位置(mNRF 在延髓脑片中线外 1/2 和 2/3 及中线的 1/2 水平横线腹侧所形成的区域)和放电是否与舌下神经根一致所确定(图 1A)。玻璃微电极电阻为 2~3 M Ω ,电极内液(mmol/L)为:CsCl 110,TEA-Cl 30,CaCl₂ 1,EGTA 10,MgCl₂ 2,Na₂ATP 4,HEPES 10(pH 7.2)。信号经 1~2 kHz 低通滤波,减除漏电流。低倍镜下确定 mNRF 后,转到高倍镜下可视状态下,在电压钳状态下封接破膜后,钳制电压为 -60 mV,进行 voltage ramps (-80~20 mV,速率 90 mV/s)和 steps (-80~+20 mV)。继而转到电流钳状态下记录(钳制电流为 0 pA)。

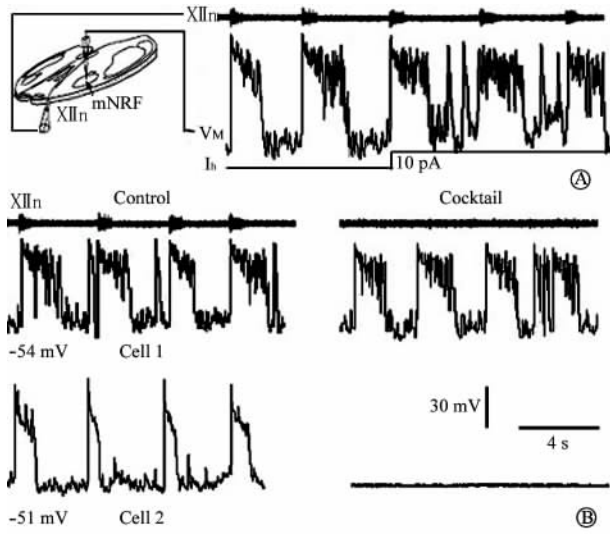


图 1 突触传递的阻断及呼吸起步神经元的确证

Fig 1 Presence and isolation of respiratory pacemaker neurons in medial of nucleus retrofacialis(mNRF)

A: Anatomical landmarks of a slice of neonatal mouse medulla and recording sites for both population activity (hypoglossal nerve, XII n) and whole-cell patch-clamp recordings (V_m); B: Simultaneous recordings XII n and two inspiratory neurons before (left) and after blockade of fast synaptic transmission ("Cocktail"; right). The pacemaker (Cell 1) bursts even when fast synaptic transmission is blocked. The nonpacemaker neurons (Cell 2) falls silent. V_m : membrane potential recording; I_h : holding current. Voltage and time calibration bars apply to all recordings

所有实验记录储存到装有 Clampex 8.2 软件的电脑,进行统计和分析。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,采用配对 t 检验、方差分析。采用 Origin 7.5 软件进行作图。检验标准为 $\alpha=0.05, P<0.05$ 或 $P<0.01$ 为有差异和有显著性差异。

2 结果

2.1 突触的分离及 mNRF 区呼吸起步神经元的确证 用内含银丝的吸附电极通以负压吸引舌下神经根(图 1A)以记录 mNRF RRA,同时作为全细胞膜片钳技术记录单个吸气神经元的依据。呼吸起步神经元的特征是给予去极化电流时会产生异位发放(ectopic burst),我们把这种异位发放作为在 mNRF 记录到的呼吸神经元为起步神经元标准之一^[15](图 1A)。为了进一步证明是否是起步神经元,我们给予了多种受体阻断剂(Cocktail)^[16-17]: NMDA 受体 MK801 10 $\mu\text{mol/L}$ 、非 NMDA 受体 CNQX 20 $\mu\text{mol/L}$ 、甘氨酸受体土的宁 1 $\mu\text{mol/L}$ 、GABA_A受体

荷包牡丹碱 20 $\mu\text{mol/L}$ 以阻断突触间的传递(图 1B),当突触间的传递被 Cocktail 阻断后,起步神经元仍节律性放电(图 1B Cell 1),而非起步神经元则停止节律性放电(图 1B Cell 2)。在实验中我们共记录到 362 个呼吸神经元,其中起步神经元 118 个,非起步神经元 244 个。

2.2 呼吸起步神经元的不同分类 在 Cocktail 灌流下,呼吸起步神经元根据 200 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 能否阻断其放电分为两类,即 Cd 敏感性和 Cd 非敏感性呼吸起步神经元(图 2A)。这两类神经元通过给予去极化(图 1A)和(或)超极化电流证明有电压依赖性发放反应(图 2B)。实验中,我们在记录到的 118 个呼吸起步神经元中,具有 Cd 敏感性呼吸起步神经元特征的仅有 4 个,占 3.39%。

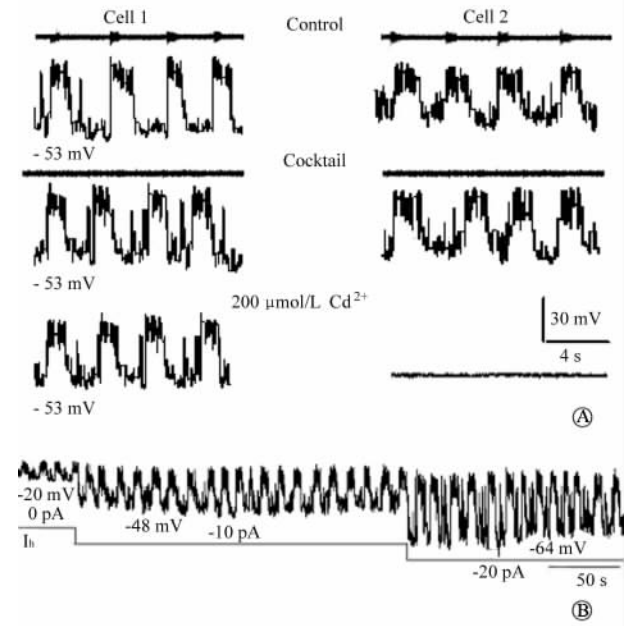


图 2 起步神经元的不同分类

Fig 2 Developmental heterogeneity of pacemaker neurons in the mNRF

A: Upper and middle traces: recordings of two inspiratory pacemaker neurons that continued bursting in the presence of the cocktail; A: Lower traces: application of 200 $\mu\text{mol/L}$ cadmium (Cd^{2+}) revealed two groups of neurons: Cd-sensitive (Cell 1) and Cd-insensitive (Cell 2); B: Both types of pacemakers had voltage-dependent sensitivity, which was revealed by applying descending current to a Cd-sensitive pacemaker neuron. Voltage and time calibration bars apply to all recordings

2.3 对舌下神经吸气性放电的影响(burst frequency) 在新生 SD 大鼠离体延髓脑薄片上, t-BHP 对呼吸节律具有兴奋性作用,而 α -LA 为抑制性作用(图 3A)。灌流 500 $\mu\text{mol/L}$ tBHP 时,呼吸

周期(respiratory cycle, RC)从(12.67±2.47) s 减少到(7.87±1.21) s($n=5, t=5.546, P=0.005$), 放电峰值(peak value of discharge)从(345.10±21.39) μV 增加到(385.17±21.39) μV ($n=5; t=6.659, P=0.003$); 给予 250 $\mu\text{mol/L}$ $\alpha\text{-LA}$ 时, RC 从(12.67±2.47) s 增加到(28.99±4.99) s($n=5; t=8.924, P=0.001$), 放电峰值从(345.10±21.39) μV 减少到(304.61±26.34) μV ($n=5; t=4.321, P=0.012$) (图 3B,3C)。

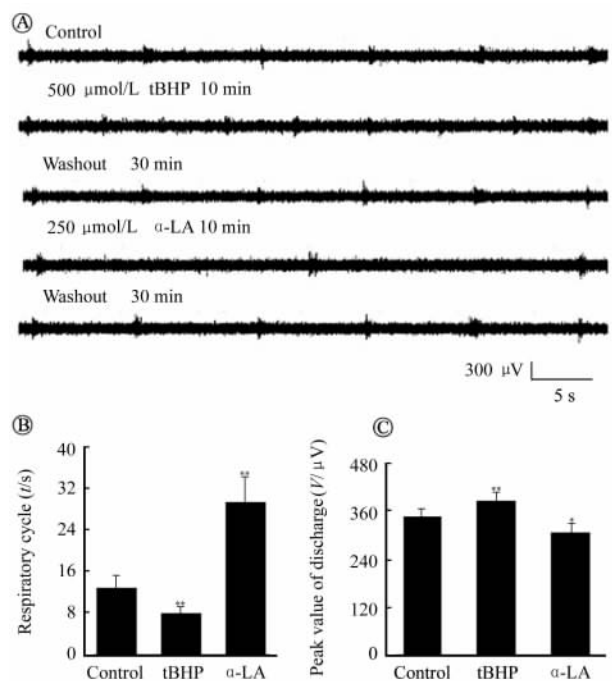


图 3 tBHP、 $\alpha\text{-LA}$ 对呼吸节律的影响

Fig 3 Effects of tBHP and $\alpha\text{-LA}$ on respiratory rhythm

A: Recordings of the respiratory rhythm with control (the first trace), 500 $\mu\text{mol/L}$ tBHP after 10 min (the second trace), 250 $\mu\text{mol/L}$ $\alpha\text{-LA}$ after 10 min (the fourth trace), washout after 30 min (the third and fifth traces); B and C: Histograms for respiratory cycle and peak value of discharge. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control (data not shown). Voltage and time calibration bars apply to all recordings. $n=3, \bar{x}\pm s$

2.4 对呼吸起步神经元的影响

2.4.1 tBHP 对呼吸起步神经元作用 在新生 SD 大鼠离体延髓脑薄片 mNRF, 我们灌注 500 $\mu\text{mol/L}$ tBHP 时, 发现 tBHP 可以使 Cd^{2+} 非敏感性呼吸起步神经元动作电位的周期从(9.395±1.21) s 减少到(7.33±1.44) s($n=4; t=9.362, P=0.003$), 幅度从(58.68±4.96) mV 增加到(64.53±5.20) mV ($n=4; t=7.871, P=0.004$); 对 Cd^{2+} 非敏感性呼吸起步神经元来说, 动作电位的周期和幅度无显著性变化(图 4A), 周期从(8.82±1.27) s 增加到

(8.73±1.27) s($n=4; t=0.273, P=0.802$), 幅度从(60.88±4.88) mV 增加到(61.41±5.74) mV ($n=4; t=0.388, P=0.724$) (图 4A~4C)。

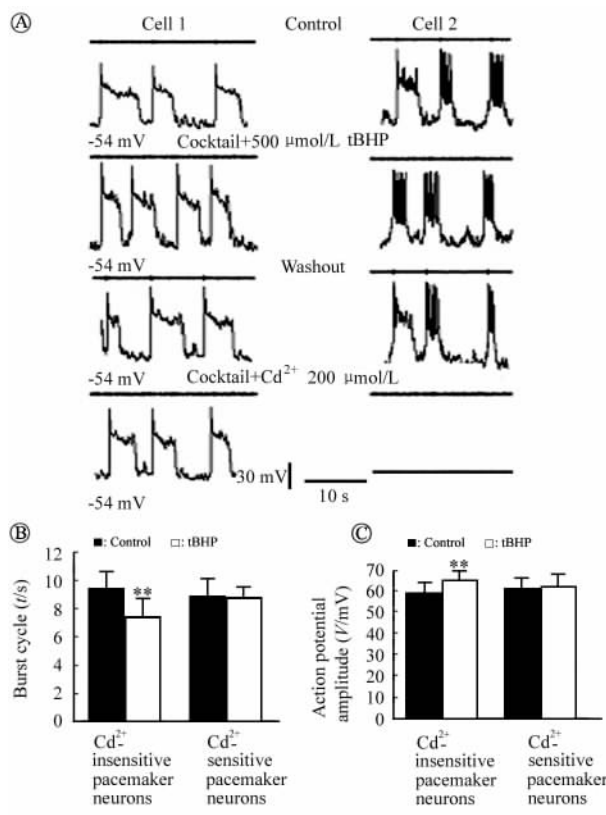


图 4 tBHP 对呼吸起步神经元作用

Fig 4 Effect of tBHP on pacemaker neurons

A: 500 $\mu\text{mol/L}$ tBHP reduced the burst cycle(s), increased the action potential amplitude on Cd-insensitive pacemaker neurons (Cell 1) and had no effect on Cd-sensitive pacemaker neurons (Cell 2); B and C: Histograms for the burst cycle(s) and the action potential amplitude between the two types of pacemakers. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control (data not shown). Voltage and time calibration bars apply to all recordings. $n=4, \bar{x}\pm s$

2.4.2 $\alpha\text{-LA}$ 对呼吸起步神经元作用 在新生 SD 大鼠离体延髓脑薄片 mNRF, 我们灌注 250 $\mu\text{mol/L}$ $\alpha\text{-LA}$ 时, 发现 $\alpha\text{-LA}$ 可以使 Cd^{2+} 非敏感性呼吸起步神经元动作电位的周期从(9.27±1.21) s 增加到(12.64±2.30) s($n=4; t=3.667, P=0.035$), 幅度从(59.05±5.48) mV 减少到(46.50±3.06) mV ($n=4; t=7.401, P=0.005$); 对 Cd^{2+} 非敏感性呼吸起步神经元来说, 动作电位的周期和幅度无显著性变化(图 5A), 周期从(8.82±1.27) s 增加到(9.02±1.27) s($n=4; t=0.796, P=0.484$), 幅度从(60.88±4.88) mV 增加到(61.76±4.43) mV ($n=4; t=0.91, P=0.430$, 图 5A~5C)。

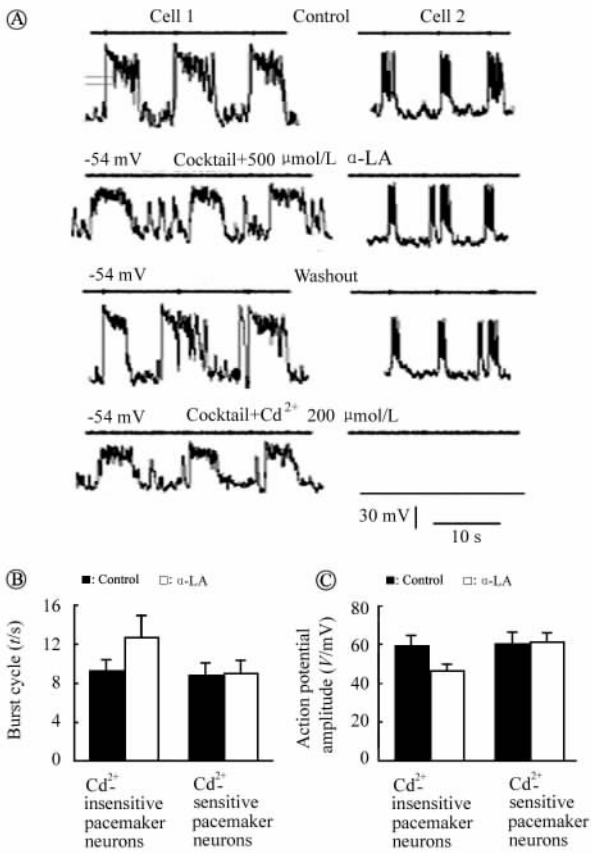


图5 α-LA对起搏神经元作用

Fig 5 Effect of α-LA on pacemaker neurons

A: 250 μmol/L α-LA increased the burst cycle, reduced the action potential amplitude on Cd-insensitive pacemaker neurons (Cell 1) and had no effect on Cd-sensitive pacemaker neurons (Cell 2); B and C: Histograms for the burst cycle and the action potential amplitude between the two types of pacemakers. * P<0.05, ** P<0.01 vs control (data not shown). Voltage and time calibration bars apply to all recordings. n=4, $\bar{x} \pm s$

2.5 抗氧化剂抑制RRA与瞬时性和持续性Na⁺电流的改变 以上研究表明抗氧化剂α-LA可以使呼吸周期变长, Cd²⁺非敏感性呼吸起搏神经元的动作电位周期延长、幅度减少, 而对Cd²⁺敏感性呼吸起搏神经元的动作电位无类似作用。我们推测此作用可能与瞬时性和持久性的Na⁺电流相关。为了证明这个推测, 我们记录了5个Cd²⁺非敏感性呼吸起搏神经元(图6A)。在检测α-LA对Cd²⁺非敏感性呼吸起搏神经元的瞬时性和持久性Na⁺电流的影响时, 相应采用了voltage steps(-80~+20 mV, 图6B)和voltage ramp(-80~+20 mV, 90 mV/s, 图6D)。I-V曲线表明α-LA可以抑制持久性Na⁺电流(F=34.908, t=0.000, 图6B); 在长时程的voltage steps(-80~-20 mV)也可引出持久性Na⁺电流(图6C), 它的慢失活归因于引起Na⁺电流的时

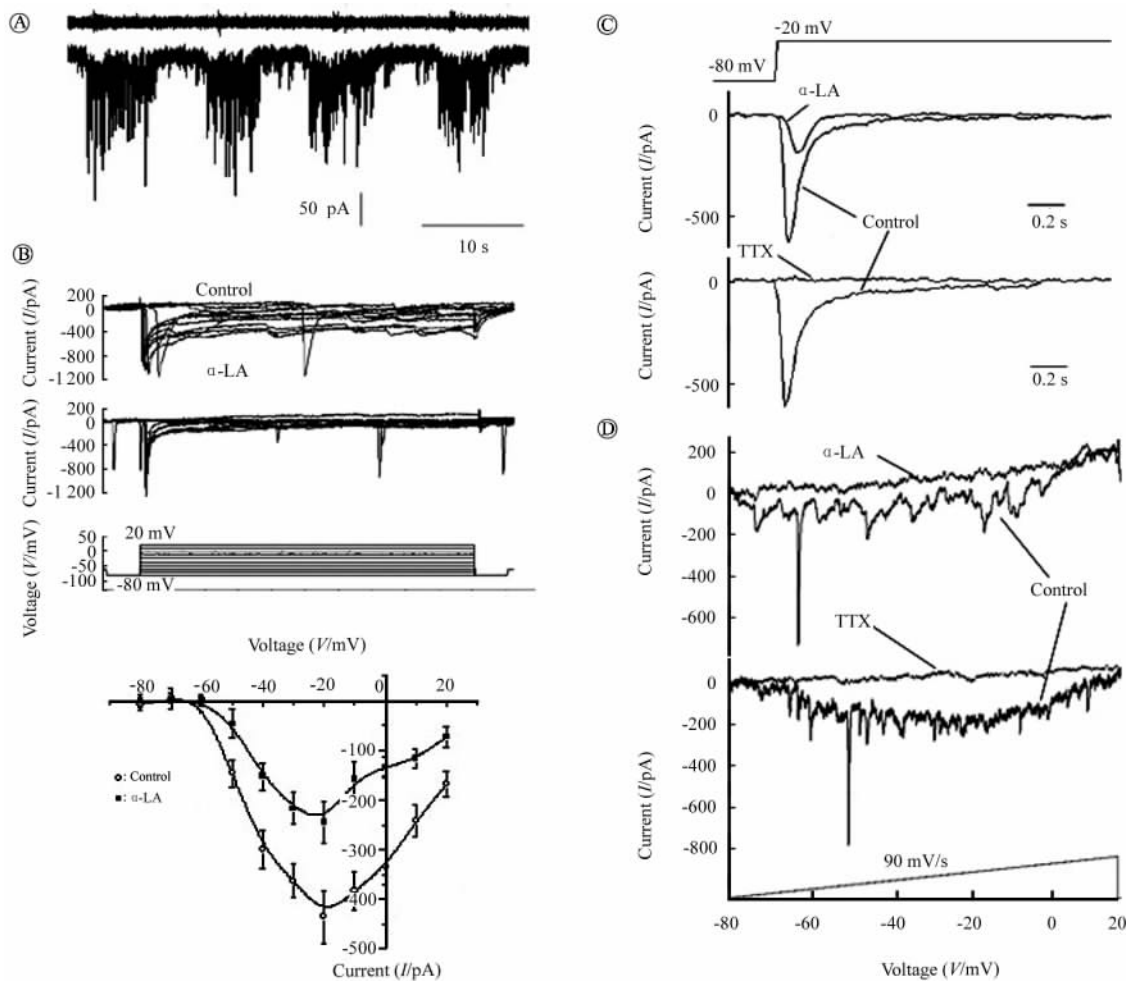
程; 图6D显示了由voltage ramp(-80~+20 mV, 90 mV/s)引出的持久性Na⁺电流, 而该电流能被α-LA阻断(图6D上图)。而此两类电流可以被1 μmol/L TTX完全抑制(图6C下图、6D中图)。

3 讨论

我们的实验表明, 在SD(P1~3 d)新生大鼠的离体延髓脑薄片上, ROS在呼吸中枢中的作用是与调节Cd非敏感性呼吸起搏神经元的Na⁺电流有关。这种作用体现在: tBHP使呼吸周期显著缩短, 放电峰值显著增加, 显著减少Cd非敏感性呼吸起搏神经元动作电位周期, 增加其幅度; 而α-LA具有相反作用; Cd敏感性呼吸起搏神经元则不受影响, 进一步研究发现α-LA可以减少瞬时性和持久性Na⁺电流, 而此种电流能被TTX所阻断。

1988年我室吴中海等^[18]报道了mNRF在节律性呼吸发生中起关键作用, 并提出mNRF是呼吸发生部位的假说; 1991年Smith等^[2]提出产生基本呼吸节律的关键部位为位于延髓头段和中段腹侧呼吸组之间的前包氏复合体。随之提出了呼吸起搏神经元学说, 呼吸起搏神经元根据对镉(Cd²⁺)的敏感性分为Cd²⁺非敏感性起搏神经元和Cd²⁺敏感性起搏神经元两类, Cd²⁺非敏感性起搏神经元依赖于瞬时性和持久性的钠电流, 对Cd²⁺无反应, TTX能够阻断该类电流; Cd²⁺敏感性起搏神经元依赖于钙电流, 能够被Cd²⁺所阻断^[19-20]。所有的呼吸起搏神经元给予去极化和/或超级化电流证明有电压依赖性发放反应, 同时会产生异位发放^[15]。在本研究中, 我们观察到呼吸起搏神经元给予去极化和/或超级化电流有电压依赖性发放反应, 同时产生异位发放。实验中, 我们在记录到的118个呼吸起搏神经元中, 具有Cd敏感性呼吸起搏神经元特征的仅仅有4个(3.39%), 与Pena等^[21]所报道的P1~5 d新生鼠的2.9%基本接近。

ROS是有毒性作用的小分子, 能够导致多种退行性疾病^[9]。近年来研究发现微量的ROS能通过氧化还原通路调节生长因子和细胞因子的生理功能^[10]。Ward等^[22]发现在成年鼠离体心室肌细胞予H₂O₂显著延长动作电位, H₂O₂对非钙依赖性瞬时性外向K⁺电流(the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current, I_{to})及内向的整合K⁺电流(the inwardly rectifying K⁺ current, I_{K1})无显著改变, 而TTX可大部抑制H₂O₂对动作电位的影响。Ma等^[23]在豚鼠离体心室肌细胞上研究发现, H₂O₂(0.1, 0.5, 1.0 mmol/L)呈浓度依赖性增加了持久性

图6 α -LA 减少了瞬时性及持久的钠电流Fig 6 α -LA reduced transient and persistent sodium currents

A: Cd-insensitive pacemaker neuron was recorded under voltage-clamp condition (bottom trace) simultaneously with recording of Ca^{2+} activity. B: I-V curve for the transient sodium current obtained before and after the application of α -LA. The difference after and before administration was subjected to One-Way ANOVA analysis ($F = 34.908$, $t = 0.000$, data not shown). C: Fast transient sodium current evoked by voltage steps (from -80 to -20 mV) was reduced in the presence of α -LA. Long voltage step could also evoke the persistent sodium current. D: After the blockade of calcium ($200 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$) and potassium ($30 \mu\text{mol/L}$ tetraethylammonium chloride) currents, the same neuron exhibited a persistent sodium current in response to a voltage ramp, which was blocked after the application of α -LA. The bottom traces in C-D showed that the Na^+ currents recorded were sensitive to tetrodotoxin. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

钠电流的幅度, 而谷胱甘肽 (1 mmol/L) 能逆转由 H_2O_2 增加的持久性钠电流, 认为可能为直接氧化细胞膜所致。而在呼吸中枢中尚未见 ROS 相关研究报道。在实验中我们选用了 tBHP 作为氧化剂, α -LA 为抗氧化剂, tBHP 因有大量的残基, 而能选择与蛋白的蛋氨酸残基相互作用以产生 ROS^[24]; α -LA 的抗氧化作用主要是作为羟基、单态氧、次氯酸的清除剂, 以及通过螯合作用转变金属, 另外可再循环作用于其他抗氧化剂或增加细胞水平的谷胱甘肽而发挥作用^[25]。在本研究中, tBHP 使呼吸周期显著缩短, 放电峰值显著增加, 显著减少 Cd 非敏感性

呼吸起步神经元动作电位周期, 增加其幅度, 而 α -LA 具有相反作用; 进一步研究表明 α -LA 可以抑制瞬时和持久性 Na^+ 电流, 而这两类电流可以被 TTX 完全抑制。至于 ROS 对 Cd 非敏感性呼吸起步神经元产生上述作用机制是什么, 通过在心室肌细胞、肾小球膜细胞等相关研究报道, 我们做了如下推测: Ward 等^[22]发现 PKC 抑制剂显著延缓、减弱 H_2O_2 对成年鼠离体心室肌细胞的延长动作电位的发生, PKC 可能是 H_2O_2 产生作用的细胞内第二信使; 在晶状体上皮细胞^[26]、肾小球膜细胞^[11]中, PKC 的阻断剂可消除 ROS 的作用; Qu 等^[27]在鼠心室肌细胞

钠通道亚单位上发现并克隆了 PKC 磷酸化位点; 丝氨酸 1505, 并发现 PKC 激活可减慢钠通道的失活。Pena 等^[13]发现内源性的 5-HT_{2A}受体激动剂 DOI 增加呼吸频率, 阻断 5-HT_{2A}受体可以使呼吸频率、幅度下降, 呼吸节律不规则, 在细胞水平上发现, 阻断 5-HT_{2A}受体使所有依赖于 Na⁺电流的起步神经元动作电位释放减少, 依赖于 Ca²⁺电流的起步神经元不受影响, PKC 激活可抑制 5-HT_{2A}受体拮抗剂的作用, 认为内源性激活 5-HT_{2A}受体调节呼吸是经过 PKC 通路调节钠电导有关。上述研究结果提示: Cd 非敏感性呼吸起步神经元的钠通道可能存在 PKC 磷酸化位点, 而 ROS 可能是通过 PKC 的作用来调节钠通道, 从而影响 Cd 非敏感性呼吸起步神经元的放电活动。而这个推测有待于我们进一步的分子生物学研究证实。

结论是: ROS 对 RRA、Cd²⁺非敏感性起步神经元具有兴奋性作用, 是通过调节钠电流而起作用的。

[参考文献]

- [1] Onimaru H, Arata A, Homma I. Primary respiratory rhythm generation in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from new-born rat[J]. *Brain Res*, 1988, 4452: 314-324.
- [2] Smith J C, Ellenberger H H, Ballanyi K, et al. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals[J]. *Science*, 1991, 254: 726-729.
- [3] Zhang F T, Wu ZH, Li Y R. Effect of blocking medial area of nucleus retrofacialis on respiratory rhythm[J]. *Respir Physiol*, 1991, 85: 73-81.
- [4] Hilaire G, Bou C, Monteau R. Rostral ventrolateral medulla and respiratory rhythmogenesis in mice [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 224: 13-16.
- [5] 吴中海, 张枫桐, 李有仁. 家兔面神经后核内侧在呼吸节律起源中的作用[J]. *生理学报*, 1990, 42: 68-75.
- [6] 吴中海, 张枫桐, 徐小元. 损毁面神经后核内侧区神经元细胞对呼吸节律的影响[J]. *第一军医大学学报*, 1992, 12: 223-227.
- [7] 吴中海, 张枫桐, 李有仁. 阻滞面神经后核内侧区对节律性呼吸的影响[J]. *第一军医大学学报*, 1994, 14: 9-11.
- [8] 吴中海, 胡德辉, 高扬. 新生大鼠体外延髓脊髓标本的呼吸节律性放电及微切割延髓对其放电的影响[J]. *第一军医大学学报*, 1998, 18: 260-262.
- [9] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging[J]. *Nature*, 2000, 408: 239-247.
- [10] Chen K C, Zhou Y, Xing K, et al. Platelet derived growth factor (PDGF)-induced reactive oxygen species in the lens epithelial cells: the redox signaling[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78: 1057-1067.
- [11] Greene E L, Houghton O, Collinsworth G, et al. 5-HT_{2A} receptors stimulate mitogen-activated protein kinase *via* H₂O₂ generation in rat renal mesangial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278: 650-658.
- [12] Brandes I F, Zuperku E I, Stucke A G, et al. Serotonergic modulation of inspiratory hypoglossal motoneurons in decerebrate dogs[J]. *J Neurophysiol*, 2006, 95: 3449-3459.
- [13] Pena F, Ramirez J M. Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation in vitro [J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 11055-11064.
- [14] Suzue T. Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brainstem spinal cord preparation of the neonatal rat[J]. *J Physiol*, 1984, 354: 173-183.
- [15] Thoby-Brisson M, Ramirez J M. Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice[J]. *J Neurophysiol*, 2001, 86: 104-112.
- [16] Shuai J, Bikson M, Hahn P J, et al. Ionic mechanisms underlying spontaneous CA1 neuronal firing in Ca²⁺-free solution [J]. *Biophys J*, 2003, 84: 2099-2111.
- [17] Su H, Alroy G, Kirson E D, et al. Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons[J]. *J Neurosci*, 2001, 21: 4173-4182.
- [18] 吴中海, 张枫桐. 家兔延髓区域阻滞对呼吸的影响[J]. *生理学报*, 1988, 40: 250-257.
- [19] Elsen F P, Ramirez J M. Calcium currents of rhythmic neurons recorded in the isolated respiratory network of neonatal mice [J]. *J Neurosci*, 1998, 18: 10652-10662.
- [20] Pena F, Ramirez J M. Substance P-mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network [J]. *J Neurosci*, 2004, 24: 7549-7556.
- [21] Pena F, Parkis M A, Tryba A K, et al. Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia[J]. *Neuron*, 2004, 43: 105-117.
- [22] Ward C A, Giles W R. Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes[J]. *J Physiol*, 1997, 500: 631-642.
- [23] Ma J H, Luo A T, Zhang P H. Effect of hydrogen peroxide on persistent sodium current in guinea pig ventricular myocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26: 828-834.
- [24] Dean R T, Fu S, Stocker R, et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation [J]. *Biochem J*, 1997, 324: 1-18.
- [25] Sen C K, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription[J]. *FASEB J*, 1996, 10: 709-720.
- [26] Zhang W, Wang Y, Chen C H W, et al. The positive feedback role of arachidonic acid in the platelet-derived growth factor-induced signaling in lens epithelial cells[J]. *Mol Vision*, 2006, 12: 821-831.
- [27] Qu Y, Rogers J, Tanada T, et al. Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na⁺ channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C[J]. *J Gen Physiol*, 1996, 108: 375-379.

[收稿日期] 2006-11-20

[修回日期] 2007-02-01

[本文编辑] 孙岩, 邓晓群