

温度对臂旁外侧核神经元胞外放电活动的影响

叶梦萍 梁黄鹏 薛雅文 唐瑜 林友胜 王念 张洁

摘要 目的 研究臂旁外侧核(LPB)自发放电神经元的温敏特性。**方法** 采用红外可视脑片膜片钳胞外记录技术,观察温度对LPB神经元自发放电频率和幅度的影响,分析LPB热敏、冷敏神经元的分布、形态学和电生理学特点。**结果** 温度变化对LPB不同类型神经元放电频率的影响不同,热敏神经元放电频率随温度升高明显加快;冷敏神经元放电频率随温度升高明显减慢。在参与前馈调节的3个亚核即LPBel、LPBc和LPBd,热敏和冷敏神经元均有分布,但其分布百分比差异无统计学意义($P > 0.05$)。LPB热敏神经元的温敏系数范围为 $0.8 \sim 3.4 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$,冷敏神经元的温敏系数范围为 $-0.6 \sim -4.2 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$;在 32°C 、 36°C 和 39°C 3个温度条件下,热敏神经元放电频率均快于温度不敏感神经元($P < 0.05$);LPB神经元胞体形态呈椭圆形、梭形、三角形或圆形,虽然LPB3类神经元胞体形态有所不同,但4种形态神经元的比例差异无统计学意义($P > 0.05$);温度变化对三类神经元的放电幅度均无明显影响($P > 0.05$)。**结论** LPB部分神经元的自发放电活动具有温度敏感度,存在内在温度感受机制。

关键词 臂旁外侧核 温度 胞外放电活动

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.023

Effects of Temperature on the Extracellular Activities of Rat Lateral Parabrachial Neurons. Ye Mengping, Qi Huangpeng, Xue Yawen, et al. Department of Physiology, Chengdu Medical College, Sichuan 610500, China

Abstract Objective To investigate the temperature - sensitive properties of rat lateral parabrachial (LPB) neurons. **Methods** The spontaneous firing rate and amplitude of LPB neurons in rat brainstem slices during changes in temperature was extracellularly monitored by loose - seal cell - attached patch clamp recordings, and the location, morphological, and electrophysiological properties of temperature - sensitive neurons in LPB were analysed. **Results** LPB neurons were classified into three types including warm - sensitive, cold - sensitive and temperature - insensitive neurons according to the temperature coefficients of their firing rate in response to temperature changes. In warm - sensitive neurons, warming increased their firing rate. On the contrary, warming decreased the firing rate of cold - sensitive neurons. The temperature - sensitive neurons were located in LPBel, LPBc and LPBd, the three LPB subnuclei responsible for the transmission of cutaneous feedforward signals, and the percentages of warm - and cold - neurons within the three LPB subnuclei were not significantly different($P > 0.05$). The spontaneous firing rate of the warm - sensitive neurons was all significantly greater than that of the temperature - insensitive neurons at 32°C , 36°C and 39°C ($P < 0.05$). Temperature coefficients, for the warm - sensitive neurons in the LPB, ranged from 0.8 to $3.4 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$; for the cold - sensitive neurons, ranged from -0.6 to $-4.2 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$. Although the three types of LPB neurons appeared to have different cell morphology, there was, in fact, no significant difference in the proportions of the fusiform, oval, triangular, and round neurons($P > 0.05$). In addition, temperature had no effects on the firing amplitude of rat LPB neurons($P > 0.05$). **Conclusion** Some neurons are inherently temperature sensitive in their spontaneous firing activity in the LPB.

Key words The lateral parabrachial nucleus; Temperature; Extracellular activities

最近,Nakamura等研究发现,臂旁外侧核(lateral parabrachial nucleus, LPB)不但是前馈体温调节上传通路的重要中继站,且不同亚核在前馈体温调节中的作用也不同,外亚核(LPBel)/中央亚核(LPBc)和背亚核(LPBd)分别上传由脊髓传入的皮肤冷、热信号

基金项目:发育与再生四川省重点实验室研究基金资助项目(SYS14-004);成都医学院大学生创新实验计划项目(CXXS201406)

作者单位:610500 成都医学院生理学教研室

通讯作者:张洁,教授,电子信箱:zhangjief@126.com

至体温中枢视前区,视前区提前从LPB获取皮肤温度感受器传来的前馈信号,在环境温度变化引起体核温度变化前,引发冷、热防御反应,维持体温相对稳定^[1~3]。在Nakamura等描述的前馈体温调节神经通路中,皮肤温度信号经背根神经节的初级神经元、脊髓背角二级神经元上传至LPB,再由LPB神经元直接上传至视前区。这条通路中的脊髓背角和视前区均存在温度敏感神经元,前期研究采用脑片膜片钳胞内记录技术证实LPB也存在感受局部脑温变化的温

度敏感神经元^[4~6]。本研究采用胞外记录技术,进一步探讨 LPB 温度敏感神经元的分布、形态学和电生理学特点,不仅进一步证实 LPB 存在内在温度感受机制,还为后续研究 LPB 温度敏感神经元在温度信息整合中的作用及其调控机制奠定基础。

材料与方法

1. 材料与试剂:雄性 SD 大鼠,体质量 80~150g,由成都达硕生物医学科技有限公司提供。MgATP、Na₂GTP、乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、葡萄糖酸钾购自 Sigma 公司。戊巴比妥钠、NaCl、KCl、CaCl₂、MgSO₄、KH₂PO₄、NaHCO₃ 和葡萄糖购自成都科龙化工试剂厂。人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 成分: NaCl 124mmol/L, NaHCO₃ 26mmol/L, KCl 5mmol/L, CaCl₂ 2.4mmol/L, MgSO₄ 1.3mmol/L, KH₂PO₄ 1.24mmol/L, 葡萄糖 10mmol/L (pH 7.4, 渗透压 300mOsm/kgH₂O)。电极内液成分: 葡萄糖酸钾 130mmol/L, MgATP 2mmol/L, Na₂GTP 0.4mmol/L, EGTA 10mmol/L, CaCl₂ 1mmol/L, HEPES 10mmol/L (pH 7.2, 渗透压 290mOsm/kgH₂O)。

2. 制备含 LPB 大鼠脑薄片:成年雄性 SD 大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉后,迅速断头取脑。将全脑置于混合氧(95% O₂ 和 5% CO₂)饱和的 0℃ ACSF 中冷冻 1min,然后取出修块,头端在中脑上、下丘之间横断,尾端在脑桥与延髓之间横断。将脑干块紧贴琼脂块固定于标本盘内,刀刃向头端倾斜 20°,在 0℃ 持续通氧 ACSF 中从头端开始振动切片,直到在脑桥头端背外侧出现一新月形透明区,提示已到达 LPB 头端,然后切下 300~350μm 厚脑片,选用 LPB 头尾方向中间 1/3 水平冠状片进行实验,这个水平 LPB 表面积最大,是取得 LPB 各种膜片钳记录最理想的位置,而且参与前馈调节的 3 个亚核即 LPBel、LPBc 和 LPBd 在该水平都有分布^[6,7]。脑片在 32℃ 下孵育 1h 后开始实验。

3. 脑片膜片钳胞外记录神经元自发放电活动:将孵育好的脑片移入灌流槽内,用附着有尼龙丝的 U 形铂金框轻覆于脑片上,用恒流泵向灌流槽中持续灌流充以混合氧的 ACSF。使用正置微分干涉相差显微镜(FNI,日本 Nikon 公司),在低倍物镜(×4)下找到透明的新月形 LPB 区,参照文献[6,7],根据与结合臂的解剖关系并拍照(记录完成)鉴定 LPBel、LPBc 和 LPBd 3 个亚核,然后在高倍浸水物镜(×40)下,通过图像采集软件(NIS Elements D 3.1, 日本 Nikon

公司)观察镜下细胞,选取边界清楚,成像清晰,立体感强的神经元进行实验。利用三维微推进器(MPC 200 Sutter Instruments, USA)驱动充有电极液带正压的微电极接近细胞,电极入水阻抗为(3~7) MΩ,当电极尖端接触并轻压在细胞膜表面时,稍加负压,形成细胞贴附式构型,切换成电流钳模式后,经放大器 EPC-10(德国 HEKA 公司)记录胞外自发放电。通过 Patchmaster 进行数据的采集和记录,采样频率 10kHz,低通滤波 2kHz。

4. 鉴别神经元温度敏感度:通过两个温度控制器 TC-324B 和 CL-100(Warner Instruments, USA)共同将灌流槽浴液的基础温度保持在 36℃ 左右,并可使浴液温度在 30~45℃ 之间快速变化。改变脑片灌流液温度,观察 LPB 神经元放电频率的变化,以放电频率为指标,线性回归分析放电频率和局部脑温之间的相关系数即温敏系数 m 值,m 值表示单位温度和时间内的放电个数,即 impulses/(s·℃) [imp/(s·℃)]。按体温中枢视前区神经元分类标准^[8]鉴别 LPB 神经元温度敏感度,即 m 值 ≥ 0.8imp/(s·℃) 为热敏神经元,m 值 ≤ -0.6imp/(s·℃) 为冷敏神经元,-0.2 ≤ m 值 ≤ 0.2imp/(s·℃) 为低斜率的温度不敏感神经元,0.21 ≤ m 值 ≤ 0.79imp/(s·℃) 为中斜率的温度不敏感神经元。

5. 统计学方法:采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行单因素方差分析和 χ^2 检验,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 ABF Utility 软件将 Patchmaster 里的原始数据进行转换,随后用 Clampfit 软件分析,用 Microsoft Excel 进行数据整理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 温度对 LPB 神经元自发放电频率的影响:按视前区神经元分类标准^[8],根据温度对神经元放电频率影响的不同,即温敏系数的不同,将 LPB 神经元分为热敏、冷敏和温度不敏感神经元。在胞外记录的 118 个 LPB 神经元中,热敏神经元占 28.0%,冷敏神经元占 5.9%,其余的则为温度不敏感神经元,其中低斜率温度不敏感神经元占 20.3%,中等斜率温度不敏感神经元占 45.8%。热敏神经元和冷敏神经元在 LPBel、LPBc 和 LPBd 的分布见图 1,在记录的 33 个热敏神经元中,14 个位于 LPBc,14 个位于 LPBd,5 个位于 LPBel;在记录的 7 个冷敏神经元中,1 个位于 LPBc,5 个位于 LPBd,1 个位于 LPBel,但热敏、冷敏神经元在 LPB 3 个亚核的分布百分比差异无统计学

意义($P > 0.05$)。LPB 热敏神经元的温敏系数范围为 $0.8 \sim 3.4 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$, 平均值为 $1.3 \pm 0.1 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$ ($n=33$); LPB 冷敏神经元的温敏系数范围为 $-0.6 \sim -4.2 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$, 平均值为 $-1.5 \pm 0.4 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$ ($n=7$)。1 例典型的热敏神经元, 其放电频率随温度升高明显加快, 随温度降低明显减慢, m 值为 $1.1 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$ (图 2); 1 例典型的冷敏神经元, 温度升高至 38°C 时, 放电突然停止, 直到温度降低放电又逐渐恢复, $34.5 \sim 41.5^\circ\text{C}$ 范围内的 m 值为 $-1.1 \text{imp}/(\text{s} \cdot ^\circ\text{C})$ (图 3)。

2. LPB 热敏、冷敏和温度不敏感神经元放电频率的比较: 在 32°C 时, 温度不敏感神经元的放电频率慢

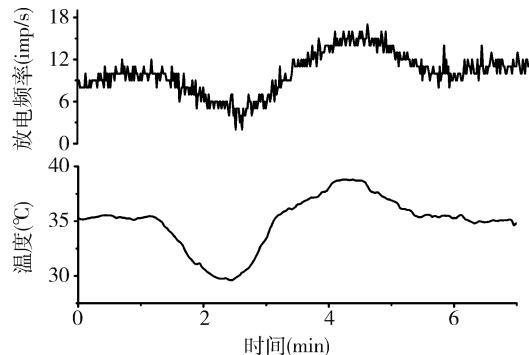


图 2 温度对 LPB 热敏神经元自发放电频率的影响

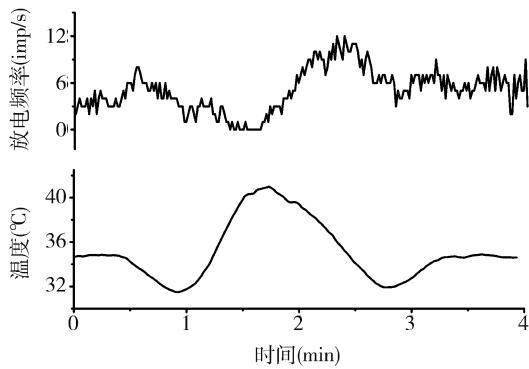


图 3 温度对 LPB 冷敏神经元自发放电频率的影响

于热敏神经元的放电频率($P < 0.05$), 但热敏和冷敏神经元之间以及温度不敏感和冷敏神经元之间的放电频率差异无统计学意义($P > 0.05$); 在 36°C 和 39°C 时, 冷敏神经元和温度不敏感神经元的放电频率均明显慢于热敏神经元的放电频率($P < 0.05$), 但温度不敏感神经元和冷敏神经元的放电频率差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 4)。

3. 温度对 LPB 神经元放电幅度的影响: 3 类神经

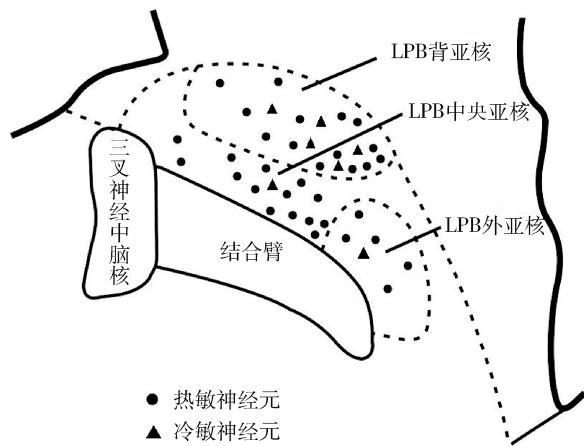
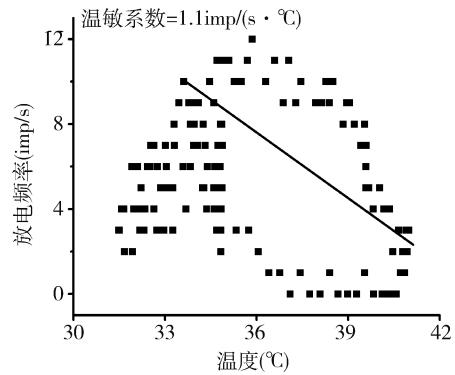
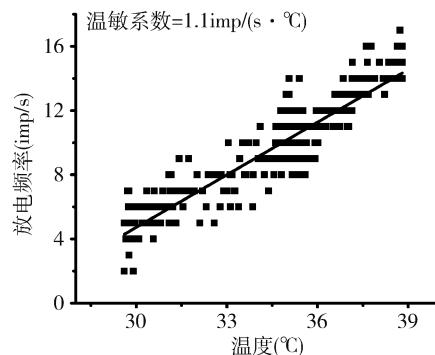


图 1 热敏神经元和冷敏神经元在 LPB 3 个亚核的分布



元在 32°C 、 36°C 和 39°C 3 个温度条件下的放电幅度均差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 5)。

4. LPB 不同类型神经元形态的比较: 在正置红外微分干涉相差显微镜下, 观察到 LPB 神经元胞体较小, 呈椭圆形、梭形、三角形或圆形, 3 类神经元胞体形态有所不同, 热敏神经元胞体多呈椭圆形和梭形; 冷敏神经元胞体多呈梭形或三角形; 温度不敏感神经元胞体形态多为椭圆形、梭形或三角形, 但热敏、冷敏

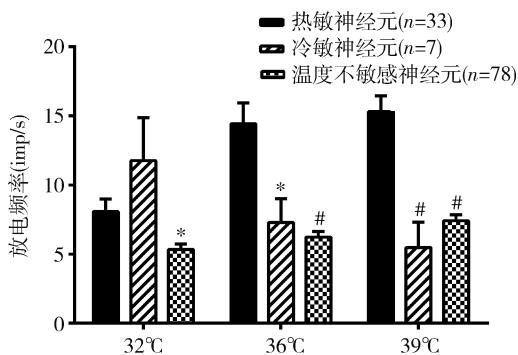


图4 不同温度下3类神经元自发放电频率的比较

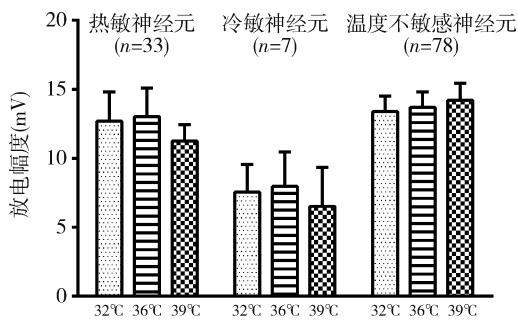
与热敏神经元比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 

图5 温度对3类神经元放电幅度的影响

和温度不敏感神经元的4种形态神经元的比例差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

表1 LPB不同类型神经元的形态

细胞形态	热敏神经元	冷敏神经元	温度不敏感神经元
椭圆形	17	1	35
梭形	9	3	25
三角形	5	2	14
圆形	2	1	4
合计	33	7	78

讨 论

中枢温度敏感神经元是存在于中枢神经系统内对温度变化敏感的神经元,包括热敏和冷敏神经元。动物实验显示,在体温中枢视前区,热敏神经元较多^[9],而在脑干网状结构和下丘脑的弓状核中以冷敏神经元居多。在本实验中,笔者采用红外可视脑片膜片钳胞外记录技术,按照视前区标准鉴定LPB神经元温度敏感度,结果显示,在记录的118个LPB自发放电神经元中,28.0%为热敏神经元,5.9%为冷敏神经元,其比例与文献报道的视前区热敏和冷敏神经元的比例接近^[9],也与胞内记录到的LPB热敏和冷敏神经元的比例接近^[6]。LPB热敏神经元的温敏系数范围为0.8~3.4imp/(s·°C),冷敏神经元的温敏

系数范围为-0.6~-4.2imp/(s·°C),与相同实验条件下的视前区热敏和冷敏神经元温敏系数范围接近^[9]。比较LPB热敏、冷敏和温度不敏感3类神经元放电频率,发现在32°C、36°C和39°C3个温度条件下,热敏神经元放电频率均快于温度不敏感神经元,这一特点也和视前区神经元相似^[9]。笔者试图找出LPB3类神经元的形态学差异,结果发现,虽然3类神经元胞体形态有所不同,但LPB神经元的温度敏感度和其胞体形态并无相关性,其放电幅度也不受温度影响。

前馈体温调节上传通路中的脊髓背角和视前区均存在温度敏感神经元^[4,5]。这些温度敏感神经元不仅对局部组织温度变化敏感,还接受来自皮肤等外周温度感受器的输入信号^[4,5]。在前馈体温调节上传通路的重要中继站LPB,皮肤冷、热刺激分别引起LPBel、LPBd神经元放电频率加快^[1,2]。本实验在LPB参与前馈体温调节的3个亚核LPBel、LPBe和LPBd均记录到对局部脑温变化敏感的热敏和冷敏神经元,表明LPB除了接受这些皮肤温度信号外,还存在内在温度感受机制,但LPB前馈信号传递神经元是否能直接感受局部脑温变化有待于深入研究。LPB温度敏感神经元的发现,也表明LPB具有与视前区相似的局部温度敏感度,这些神经元可能代表了LPB温度感受功能的细胞学基础,表明LPB不但参与前馈体温调节,还能感受局部脑温变化,参与负反馈体温调节。在极端环境温度下,当由皮肤温度信号驱动的前馈体温调节已不足以维持脑温和体核温度稳定,这些中枢温度敏感神经元可监测局部脑温变化,引起负反馈体温调节反应,维持体温的相对稳定。LPB是感觉信息传递通路上的重要中继站,不但接受来自皮肤的前馈温度信号,还接受和整合经孤束核中继后上行的部分内脏感觉信息^[10]。因此,LPB温度敏感神经元是否整合了来自皮肤和内脏的温度信号,然后将整合后的温度信号上传至视前区,参与体温调节,值得进行深入研究。

参考文献

- Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway that controls body temperature [J]. Nat Neurosci, 2008, 11(1):62~71
- Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway mediating heat - defense responses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(19):8848~8853
- Geerling JC, Kim M, Mahoney CE, et al. Genetic identity of thermosensory relay neurons in the lateral parabrachial nucleus [J]. Am Physiol Regul Integr Com Physiol, 2016, 310(1):R41~R54

(下转第90页)

在正常膀胱黏膜组织发生破坏、增生及化生过程中起着重要作用,且与腺性膀胱炎的进展呈正相关^[13,14]。然而,从炎症的角度,其与腺性膀胱炎术后复发的关系尚不明确,故本研究旨在探讨 RDW 与其复发的相关性。

本研究发现,腺性膀胱炎患者术后 3 年的复发率高达 20.5%,这说明该类患者的复发需要得到临床高度重视,能在早期预测的情况下进行临床干预。泌尿系结石史及慢性炎症史在复发患者中的比例明显增高,且与复发呈独立相关,这与前人研究一致,这也提示临床医师在碰到该类患者时,需早期干预结石与炎症的存在,减少复发。同时笔者还发现, RDW 在复发组显著增高,且除外相关因素后,仍是复发的独立相关因素, RDW 每升高 1%,其复发的概率增加 2.12 倍,这也提示对于 RDW 较高的患者,可能存在复发的高风险,应引起足够的重视。

本研究也存在一定的局限性,首先,笔者医院每年收治腺性膀胱炎手术患者约 38~45 例,且存在着失访患者,故样本量相对较小;其次,本研究尽管发现 RDW 与复发密切相关,但仍可能存在信息偏倚;最后,有研究显示 RDW 可能呈动态变化,对于本研究的患者,若能进一步监测其 RDW 水平的变化,可能应用价值更高^[15]。综上所述, RDW 水平与腺性膀胱炎患者术后复发关系密切,高 RDW 水平有复发的高风险。然而,尽管本研究已有阳性结果,但仍需前瞻性、大样本的研究来进一步证实。

参考文献

- Zhang W, Yao YS, Lin ME, et al. Unexplained association between cystitis glandularis and interstitial cystitis in females: a retrospective study [J]. Int Urogynecol J, 2015, 26(12):1835~1841
- Maeda M, Hirabayashi T, Inuzuka Y, et al. Case of cystitis glandularis causing bilateral hydronephrosis [J]. Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi, 2013, 104(5):671~673
- Riaz A, Casalino DD, Dalton DP. Cystitis cystica and cystitis glandularis causing ureteral obstruction [J]. J Urol, 2012, 187(3):1059~1060
- 容伟超,陈国威,区文贵. 经尿道等离子电切病灶加膀胱灌注吡柔比星预防腺性膀胱炎复发的临床研究 [J]. 中国内镜杂志, 2012, 18(3):288~290
- Lin ME, Huang D, Deng BH, et al. Expression and functional role of Cdx2 in intestinal metaplasia of cystitis glandularis [J]. J Urol, 2013, 190(3):1083~1089
- Oh HJ, Park JT, Kim JK, et al. Red blood cell distribution width is an independent predictor of mortality in acute kidney injury patients treated with continuous renal replacement therapy [J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(2):589~594
- 王飞,丁勇,姜婷婷,等. 红细胞分布宽度对危重患者预后的评估价值 [J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23(8):894~897
- Yuksel OH, Urkmez A, Erdogan T, et al. The role of steroid treatment in intractable cystitis glandularis: A case report and literature review [J]. Can Urol Assoc J, 2015, 9(5~6):E306~309
- Michajłowski J, Matuszewski M, Kłacz J, et al. Acute urinary retention in a patient with extended cystitis glandularis [J]. Cent Eur J Urol, 2011, 64(2):94~96
- Balta S, Demirkol S, Hatipoglu M, et al. Red cell distribution width is a predictor of mortality in patients with severe sepsis and septic shock [J]. Am J Emerg Med, 2013, 31(6):989~990
- Turcato G, Serafini V, Dilda A, et al. Red blood cell distribution width independently predicts medium-term mortality and major adverse cardiac events after an acute coronary syndrome [J]. Ann Transl Med, 2016, 4(13):254
- 王飞,游达礼,康文慧,等. 腺毒症患者预后与红细胞分布宽度的相关性 [J]. 中国医师进修杂志, 2015, 38(3):171~174
- Takizawa N, Matsuzaki T, Yamamoto T, et al. Novel strategy for cystitis glandularis: Oral treatment with cyclooxygenase-2 inhibitor [J]. Int J Urol, 2016, 23(8):706~708
- 刘敏,韩瑞发,雷铭德,等. 腺性膀胱炎 IL-6、IL-17 和 TGF-β 的表达及意义 [J]. 天津医药, 2012, 40(6):540~542
- Kim CH, Park JT, Kim EJ, et al. An increase in red blood cell distribution width from baseline predicts mortality in patients with severe sepsis or septic shock [J]. Crit Care, 2013, 17(6):R282

(收稿日期:2017-01-01)

(修回日期:2017-01-03)

(上接第 87 页)

- Graham BA, Brichta AM, Callister RJ. Recording temperature affects the excitability of mouse superficial dorsal horn neurons, *in vitro* [J]. J Neurophysiol, 2008, 99(5):2048~2059
- Griffin JD. Central thermosensitivity and the integrative responses of hypothalamic neurons [J]. J Therm Biol, 2004, 29(7):327~331
- Xue YW, Yang YL, Tang Y, et al. In vitro thermosensitivity of rat lateral parabrachial neurons [J]. Neuroscience Lett, 2016, 619(4):15~20
- Hayward LF, Felder RB. Electrophysiological properties of rat lateral parabrachial neurons *in vitro* [J]. Am J Physiol, 1999, 276(3):R696~R706
- Wright CL, Burgoon PW, Bishop GA, et al. Cyclic GMP alters the firing rate and thermosensitivity of hypothalamic neurons [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 294(5):R1704~R1715
- Kelso SR, Perlmuter MN, Boulant JA. Thermosensitive single-unit activity of *in vitro* hypothalamic slices [J]. Am J Physiol, 1982, 242(1):R77~R84
- Suzuki T, Sugiyama Y, Yates BJ. Integrative responses of neurons in parabrachial nuclei to a nauseogenic gastrointestinal stimulus and vestibular stimulation in vertical planes [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012, 302(8):R965~R975

(收稿日期:2016-10-30)

(修回日期:2016-11-13)