

貓延腦黑暗縫合核呼吸神經元之特性

吳英賓 黃基礎* 王雪娥

國立台灣師範大學生物學系

摘要

本研究是想探討延腦黑暗縫合核(nucleus raphe obscurus; NRO)是否含有呼吸有關神經元,並觀察其對二氧化碳濃度增加及電刺激迷走神經傳入纖維的反應。貓經去大腦、麻醉、切斷兩側迷走神經後,以人工呼吸器維持通氣,呼吸末氣體濃度維持在高氧及二氧化碳濃度正常。分離並記錄膈神經活動。以金屬微電極記錄 NRO 神經元放電,然後提高二氧化碳濃度或電刺激迷走神經傳入纖維,以測試神經元的反應。在所記錄的 133 個神經元中,與呼吸有關的神經元有 66 個,約佔半數,可分為呼氣神經元(E)、吸氣呼氣神經元(IE)、呼氣吸氣神經元(EI)及連續性呼氣吸氣神經元(T-EI)、連續性吸氣呼氣神經元(T-IE)等,其中以 EI 及 T-EI 所佔比例較高,其次是 IE 與 T-IE。在 66 個呼吸神經元中,有 40 個測試對二氧化碳濃度升高的反應,結果有 18 個神經元放電率降低($p < 0.05$),8 個放電率升高,其餘反應不規則。有 13 個與呼吸有關神經元測試對迷走神經傳入纖維興奮的反應,有 9 個神經元放電率降低($p < 0.05$),3 個升高,1 個不受影響。這些結果顯示,延腦黑暗縫合核的呼吸神經元會受到化學接受器與肺伸張接受器之調節,暗示這些呼吸神經元對呼吸管制可能扮演重要角色。

關鍵詞：黑暗縫合核、呼吸神經元、二氧化碳濃度增加、迷走神經傳入纖維、貓

緒言

縫合核是一群位於中腦、橋腦、及延腦中線的神經元。其中位於延腦中線區域者,稱為延腦縫合核(medullary raphe nuclei; MRN),又可分為:黑暗縫合核(nucleus raphe obscurus; NRO),蒼白縫合核(nucleus raphe pallidus; NRP)及大縫合核(nucleus raphe magnus; NRM)三部份(Taber等人,1960)。

最近的報告均指出延腦縫合核與呼吸管制的關係密切,事實上,早在 1939 年,Pitts 等人就發現以電流刺激延腦中線,相當於 NRM 及 NRO 區域,會抑制動物吸氣,而刺激相當於 NRP 位置時,則會促使動物換氣量。Millhorn (1986) 電刺激 NRO 十分鐘造

成膈神經的興奮作用達一個小時以上,而此興奮作用可被血壓胺拮抗物所抵消。Holtman 等人 (1986) 通電或麩胺酸化學刺激 NRO,結果膈神經活性增強。Lalley (1986) 分別以電刺激 NRO, NRM 及 NRP,發現 NRO 及 NRM 會促使膈神經核的細胞膜電阻增加,放電率降低,整條膈神經活性受抑制,這種抑制作用會因 CO_2 濃度提高而被抵消,相反地,刺激 NRP 使膈神經核細胞膜電阻減少而活性增強。Yen 與 Hwang (1989) 曾報告興奮延腦吻端大縫合核不僅會降低膈神經高度而且會改變呼吸頻率。1987 年 Aoki 等人指出延腦縫合核可能涉及呼氣的 off-switch 作用,理由是縫合核興奮後會抑制吸氣而使之轉為呼氣。1990 年, Song 等人以 HRP 及逆向傳導鑑定法證明橋腦的呼吸

* 通信作者(corresponding author): 黃基礎(Ji-Chuu Hwang); FAX: 886-2-9312904; E-mail: jchwang@cc.ntnu.edu.tw



調節中樞有下行神經徑路投射到 NRM，1991 年 Song 等人則更進一步證實橋腦的呼吸調節中樞，抑制呼氣的 "off-switch" 機制，有一部份是經 NRM 來完成。最近，Man and Liu (1992) 也指出在吸氣時刺激 NRO 會有 off-switch 的作用，也即促使吸氣改換為呼氣。綜合以上的這些報告，可知縫合核既會影響呼吸活動，也與呼吸管制之調節有密切關係，因此，我們推論延腦縫合核本身應含有與呼吸相關的(或簡稱呼吸)神經元。關於這一點，簡 (1991) 在延腦吻端大縫合核確實記錄到許多呼吸有關的神經元，至於延腦尾端黑暗縫合核是否含有與呼吸有關神經元，並不十分清楚，因此本實驗的主要目的是以單一細胞記錄法 (single unit recording) 在延腦尾端黑暗縫合核找尋與呼吸有關的神經元，並觀察這些神經元對 CO₂ 濃度升高與迷走神經興奮的反應。以期能對延腦黑暗縫合核與呼吸有關的特性有更深入的了解。

材料與方法

實驗分成三部份來進行。第一部份是尋找黑暗縫合核與呼吸有關神經元，第二部份是提高二氧化碳濃度，觀察這些神經元對 CO₂ 濃度改變的反應，第三部份是以電流興奮迷走神經的感覺神經纖維，觀察黑暗縫合核呼吸神經元放電率的反應。茲將各實驗步驟加以說明如下。

動物準備

以成貓(1.7~4.3 kg)為實驗動物，性別不拘。經秤重後放入麻醉箱，以純氧將 halothane 氣化成濃度 4% 以麻醉動物。待貓麻醉後取出，套上與麻醉氣體相連的面罩，繼續麻醉，裝置氣管插管，然後降低 halothane 濃度至 2.5%。分離兩側迷走神經並穿線作記號。裝置股動、靜脈插管以使用來測量血壓及注射藥物或補充液體用。並結紮兩側的外頸動脈。

將貓頭固定在立體定位儀 (stereotaxic instrument, DKI 4600) 上，切開頭頂正中線皮膚，開腦並以真空

幫浦吸取部份大腦組織，露出上阜 (superior colliculi) 後，在上下阜間 (intercollicular level) 切斷大腦與腦幹的連接，再吸掉斷面前的腦組織，並止血，完成去大腦手術 (Hwang *et al.*, 1983)，halothane 隨即減至 0.5%。

使用骨剪去除枕骨中部及尾部，以露出部份小腦，再以真空幫浦吸去部份小腦組織，露出第四腦室底部及閃 (obex)，以便目視定位電極。手術後動物不再麻醉，並由股靜脈注入肌肉麻痺劑 (gallamine trithiodine, 5 mg/kg) 後，立即將氣管插管接至人工呼吸機 (Harvard 665)，以正壓方式將含高氧之混合氣體送入動物的肺臟。用二氧化碳分析儀 (CO₂ analyzer, Applied Electrochemistry CD-3A) 自氣管插管處取樣，分析二氧化碳濃度。調整人工呼吸機的送氣體積或頻率，以維持動物呼氣末二氧化碳濃度 (end-tidal fractional concentration of CO₂; F_{ET}CO₂) 在 0.04 到 0.05 之間。以電溫度計 (electrical thermometer) 測量肛溫，實驗中以電毯及台燈維持貓體溫在 37~38 °C。實驗中的動物均給予高氧呼吸，以免呼吸與循環受血氧過低 (hypoxia) 影響。

血壓的測定是將股動脈插管連上液態壓力轉換器 (liquid pressure transducer, Hewlett Packard 280C)，再連上壓力放大器 (pressure amplifier, Hewlett Packard 8805C)，經校正後，由多用途記錄器 (Hewlett Packard 7758A) 記錄血壓，同時由資料記錄儀 (Neuro-Corder Model DR-890) 錄到錄影帶中。

神經之分離與記錄

從貓右前肢側面約在肩胛骨上方處切開皮膚並進一步分離膈神經 (C₅ 或 C₆)，自末梢端剪斷，脫去結締組織鞘。將膈神經放在不鏽鋼雙極電極上，潤以液態蠟，以防止神經乾死並減少干擾。電極接至放大器 (Grass preamplifier P511)，神經訊號經濾波 (0.1~10 kHz) 後由資料記錄儀記錄在錄影帶上，以備日後分析。

尋找並記錄神經元訊號



把金屬微電極裝置在電極支架 (electrode holder, DKI) 上，調整電極支架與立體定位儀的垂直面呈 24° ，取一不鏽鋼絲插入動物肌肉中當參考電極。以門 (obex) 作為微電極移動的參考原點，沿中線向吻端移動 2 mm，以該處腦組織表面為零，向下插入 2 mm，然後以推進器 (motorized drive, Fredrick Haer & Co.) 控制微電極前進，尋找並記錄神經元的活動。記錄的範圍是中線表面下 2~4.5 mm，正確的位置由組織切片鑑定之。

每記錄一個神經元放電需先鑑定電極尖端是否位於細胞體附近，鑑定的方法有三個，即(1)自發性動作電位具雙向波型 (biphasic shape)，波寬約在 1-2 ms，(2)在上升的波形中可見到一個缺刻 (Freygang, 1958; Yen 與 Blum, 1984)，(3)其波形與振幅應相同。若同時記錄 2 個神經元放電，則於分析時以窗格區分器 (Window discriminator, WPI-121) 加以分辨。

在呼氣末二氧化碳濃度正常 ($F_{ET}CO_2=0.04$) 狀態下，記錄神經元放電，然後升高混合氣體中二氧化碳比例，使 $F_{ET}CO_2$ 達到 0.06 及 0.09，再分別記錄其放電。將神經元訊號，經放大器 (Grass P511) 放大、濾波 (0.1-10 kHz) 後，與膈神經活動及血壓一起記錄於磁帶中。

電刺激迷走神經傳入纖維

有些呼吸神經元的放電會在 $F_{ET}CO_2$ 正常下，以電刺激迷走神經傳入纖維，觀察並記錄神經元放電率之變化。電刺激是由刺激器 (Grass S11) 所引發的，本研究選用刺激脈波頻率為 80 赫茲、脈寬 (pulse duration) 0.5 毫秒，刺激電流大小，是以引起膈神經活動高度降低， T_I 縮短、 T_E 延長之最小電流強度為準，每次刺激時間約 20 秒。

記錄點之確認

實驗完成後，在 NRO 最後一個記錄位置，施以 100 微安培，20 秒的直流電灼燒 (lesion) 記錄點。然後取出腦幹組織，浸漬於 10% 福馬林溶液至少一週並進行冰凍切片，厚度為 50μ 。以焦油紫 (cresyl fast violet) 染色後，利用顯微鏡觀察並配合微電極深度之

記錄，確認記錄點確實在黑暗縫合核內。

結果分析

1. 呼吸週期的計算

由於研究的目的，是尋找與呼吸有關的神經元，故以膈神經的活動作為呼吸週期的指標。當膈神經放電時，就是吸氣時間 (inspiratory duration; 簡稱 T_I)。兩次膈神經放電間隔時間為呼氣時間 (expiratory duration; 簡稱 T_E)。 T_I 和 T_E 的總和即呼吸週期的總時間 (簡稱 T_{TOT})。神經訊號從磁帶播放出來，經積分器積分後，由類比數位訊號轉換器 (A/D converter DT2801A, Data Translation Co.)，將訊號轉換成數位形式後，送入電腦，利用電腦軟體程式取 20 次完整呼吸週期，加以重疊平均後，算出 T_I 、 T_E 及 T_{TOT} ，並取膈神經活動積分圖形的最高點為其活動的高度。

2. 單一神經元放電率的計算

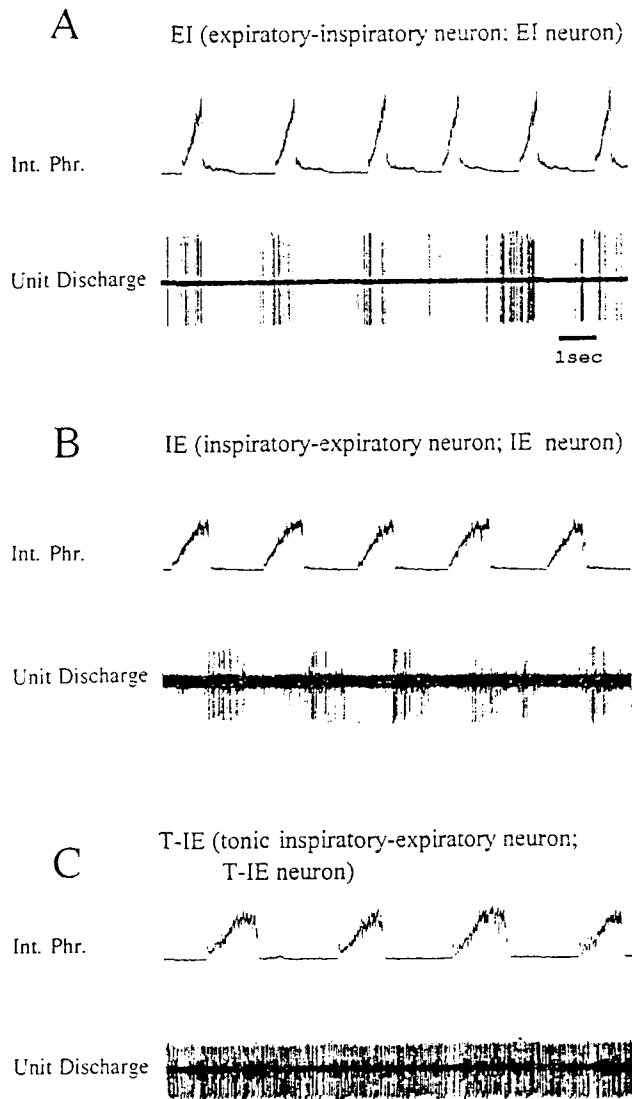
單一神經元的動作電位，經窗格區分器轉變為方形波，調整窗格大小以確認所要的動作電位都已變為方形波而被計算進來，然後再經類比數位訊號轉換器 (DT 2801A) 進行資料攫取 (data acquisition) 與分析 (data analysis)。其方法是以膈神經活動時間為基準，分別計算該單一神經元在 T_I 和 T_E 各階段及 T_{TOT} 的平均放電率。以每一神經元的放電率為縱軸，呼吸週期的時間為橫軸，取 20 次呼吸週期的神經元放電率累加並繪製成直方圖 (histogram)，所得結果包括放電率及直方圖以印表機列印出來 (袁和黃, 1992)。

統計分析

呼氣末二氧化碳濃度增高對神經元放電率的影響，以多重比較方法 (multiple comparison test) 來檢定 (Dunnett, 1964)，其方法是先以單因子變數分析 (one way ANOVA)，若達顯著水準 ($p < 0.05$) 再以 modified test 檢定 (Wallenstein *et al.*, 1980)。電刺激迷走神經傳入纖維後，神經元放電率的改變，則採 paired-t 檢定，以 $p < 0.05$ 為顯著差異。



結果



圖一、黑暗縫合核三個呼吸神經元的放電類型。A, B, 與 C 分別代表呼氣吸氣神經元(EI), 吸氣呼氣神經元(IE), 以及連續放電神經元。這三個呼吸神經元分別記錄自不同的動物。

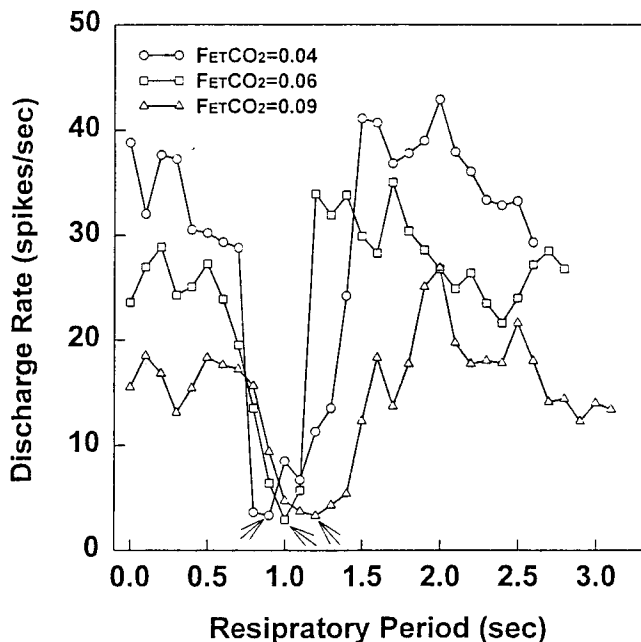
Figure 1. Discharge pattern of three respiratory-related neurons within the nucleus raphe obscurus (NRO). A, B and C represent expiratory-inspiratory (EI), inspiratory-expiratory (IE) and tonic inspiratory-expiratory neurons respectively. Note that these three neurons were recorded from different animals.

本實驗在 23 隻貓記錄到 133 個神經元。經組織學鑑定電極的座標位置是在門前 1.5-2.5 mm, 中線表面下 2.0-4.5 mm, 中線左右不超過 0.1 mm, 應是黑暗縫合核的位置。其中 13 個呼吸神經元僅測試其對迷走神經感覺纖維興奮後之反應。

神經元的分類

以膈神經放電為指標, 當神經元的放電時間與膈神經活動相關時, 則稱該神經元為與呼吸有關的神經元 (respiratory-related neuron) (Cohen and Wang, 1959; Bianchi and St. John, 1982), 或簡稱為呼吸神經元。相對地, 如果神經元的放電與膈神經活動在時間上無關, 則稱之為非呼吸有關的神經元 (non-respiratory-related neuron)。圖一是三個與呼吸有關神經元的放電類型, 有些神經元每次放電都是從呼氣時間延續到吸氣時間稱之為呼氣吸氣神經元 (expiratory-inspiratory neuron; 簡稱 EI) (圖一A)。有些神經元的放電是從吸氣時間延續到呼氣時間, 故稱為吸氣呼氣神經元 (inspiratory-expiratory neuron; 簡稱 IE) (圖一B)。也有些神經元呈現連續性放電, 但在連續放電的過程中, 從呼氣到吸氣的跨期當中其放電率較高, 因此也歸類為與呼吸有關, 稱為連續性呼氣吸氣神經元 (tonic expiratory-inspiratory neuron; 簡稱 T-EI) (圖一C)。除這三種類型神經元外, 尚有少數的呼氣神經元 (E)、連續性呼氣神經元 (T-E)、連續性吸氣神經元 (T-I) 及連續性吸氣呼氣神經元 (T-IE)。

在所記錄到 133 個神經元中, 與呼吸有關的神經元有 66 個, 佔總數的 49.6%, 其餘 67 個則屬非呼吸有關的神經元, 佔 50.4%。在 66 個呼吸神經元中, 屬於 EI 類型的有 29 個, 佔呼吸神經元總數的 43.9%, 其次有 14 個 T-EI, 佔 21.2%, 有 10 個 IE, 佔 15.1%, 有 9 個 T-IE, 佔 13.6%, 其餘 E 及 T-E 類型各有 2 個, 各佔 3.0%, T-I 類型有一個, 佔 1.5%, 在這些與呼吸有關的神經元中, 以 EI (43.9%) 及 T-EI (21.2%) 所佔比例最多, 其次是 IE 與 T-IE。



圖二、一個 EI 神經元在呼吸週期的放電率直方圖。這個神經元的放電率隨二氧化碳濃度增加而降低。箭頭表吸氣(Ti)與呼氣(TE)時間分界點。

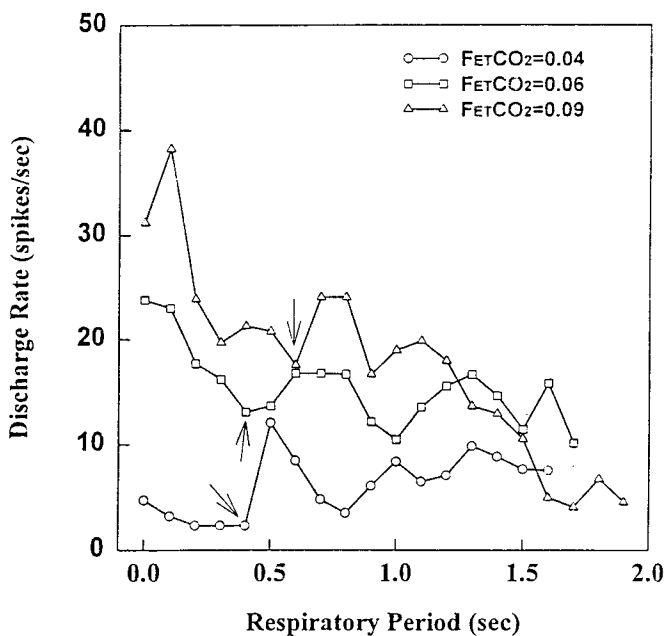
Figure 2. Histogram of an EI neuron showing decreases in discharge rate both in inspiratory (Ti) and expiratory period (TE) in response to different levels of hypercapnia. Arrowhead represents the time between Ti and TE.

呼吸神經元對二氧化碳濃度增加的反應

二氧化碳濃度增加對神經元放電率影響，可歸納分成三種類型：第一類是隨呼氣末二氧化碳濃度增加，神經元在吸氣時間與呼氣時間平均放電率都降低 ($E \downarrow I \downarrow$)；第二類是神經元在吸氣時間與呼氣時間平均放電率皆增加 ($E \uparrow I \uparrow$)；其餘歸為第三種，隨著二氧化碳濃度增加，有的其平均放電率在吸氣時間增加而呼氣時間卻降低 ($I \uparrow E \downarrow$)，有的是在呼氣時間增加但吸氣時間降低 ($I \downarrow E \uparrow$)，甚至有的在吸氣時間或呼氣時間其平均放電率，在呼氣末二氧化碳濃度增加到 0.06 時升高，但繼續提高到 0.09 時，放電率反而下降，由於這些神經元對二氧化碳濃度增加的反應不規則，且每一種的個數不多，所以歸為不規則類型。這些神經元在呼吸週期中的放電率隨二氧化碳濃度增加的反應以直方圖 (histogram) 來表示，圖二這個神經元的放電率隨呼氣末 CO_2 濃度從 0.04 提高到 0.06 及

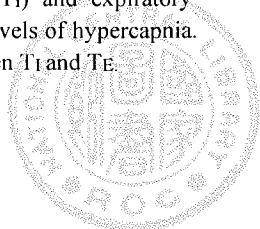
0.09 時，其瞬間放電率不論在吸氣或呼氣時間都明顯下降；相對地，圖三是一連續放電 EI 神經元，其瞬間放電率不論是在吸氣或呼氣時間都隨 CO_2 濃度增加而升高。

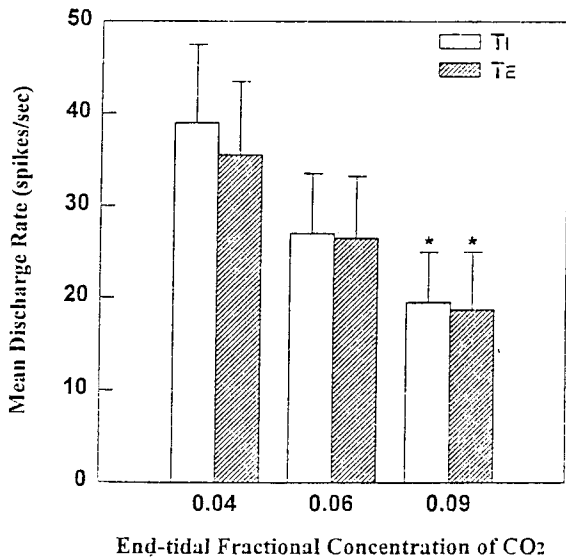
在 66 個呼吸神經元中只有 40 個測試對 CO_2 濃度增加的反應，屬第一類型者 ($I \downarrow E \downarrow$)，共有 18 個，佔全部 45%；屬第二類型者 ($I \uparrow E \uparrow$)，有 8 個，佔 20%；不規則類型共有 14 個，佔 35%。將第一類型 18 個神經元在呼吸週期中的放電率加以統計分析後，發現呼氣末 CO_2 濃度由 0.04 升高為 0.06 時，吸氣時間的平均放電率從每秒 39.3 ± 8.2 spikes 降到 27.2 ± 6.1 spikes (圖四)，當提高至 0.09 時，其平均放電率降至每秒 19.8 ± 5.8 spikes (圖四， $p < 0.05$)；而呼氣時間的平均放電率在呼氣末 CO_2 濃度為 0.04 時是每秒 35.9 ± 7.5 spikes，升高到 0.06 時，降為 26.4 ± 6.5 spikes，再提高到 0.09 時，其平均放電率降至



圖三、一個連續放電神經元 (tonic-EI) 在呼吸週期的放電率直方圖。這個神經元的放電率隨二氧化碳濃度增加而增強。箭頭表吸氣(Ti)與呼氣(TE)時間分界點。

Figure 3. Histogram of a tonic-EI neuron showing increases in discharge rate both in inspiratory (Ti) and expiratory period (TE) in response to different levels of hypercapnia. Arrowhead represents the time between Ti and TE.





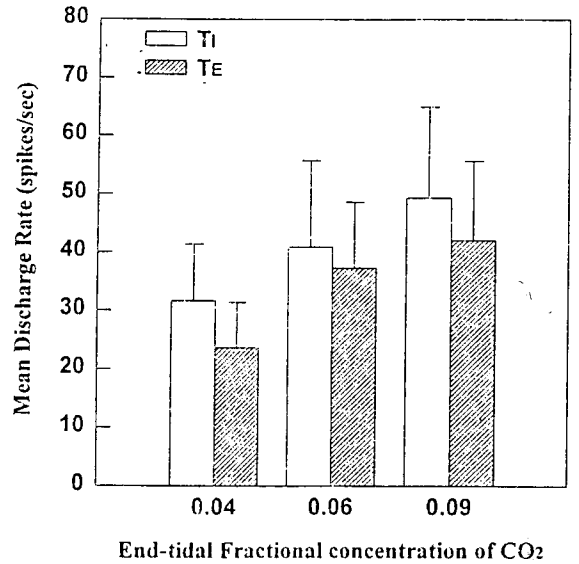
圖四、十八個神經元的平均放電率(±標準誤)。這些神經元在吸氣時間(Ti)與呼氣時間(TE)的平均放電率均隨二氧化碳濃度增加而明顯降低($p < 0.05$)。

Figure 4. Mean values (±se) of neuron discharge rate. Neuron activities during inspiratory (Ti, open bars) and expiratory period (TE, striped bars) are decreased with hypercapnia. * $p < 0.05$ compared with control by multiple comparison test. N=18.

19.3 ± 6.4 spikes (圖四, $p < 0.05$)。圖五是 8 個第二類神經元的平均放電率, 在呼氣末 CO₂ 濃度等於 0.04, 吸氣時間的平均放電率為每秒 31.6 ± 9.8 spikes, 呼氣時間的平均放電率為每秒 23.6 ± 7.7 spikes, 當呼氣末二氧化碳濃度升高為 0.06 時, 其平均放電率在吸氣與呼氣時分別為每秒 40.9 ± 14.8 spikes 及 37.3 ± 11.4 spikes; 若再提高到 0.09, 則分別為 49.3 ± 15.7 及 42.1 ± 13.6 spikes, 由於數量不多, 未進行統計測試。

電流興奮迷走神經傳入纖維對縫合核呼吸神經元的影響

另有 13 個與呼吸有關神經元, 在記錄到其放電後, 電刺激迷走神經傳入纖維, 結果吸氣時間(Ti)縮短, 呼氣時間(TE)延長, 膈神經活動降低(圖六, $p < 0.05$)。這十三個神經元中, 有 9 個的平均放電率



圖五、八個神經元的平均放電率(±標準誤)。這些神經元在吸氣時間(Ti)與呼氣時間(TE)的平均放電率均隨二氧化碳濃度增加而增強。

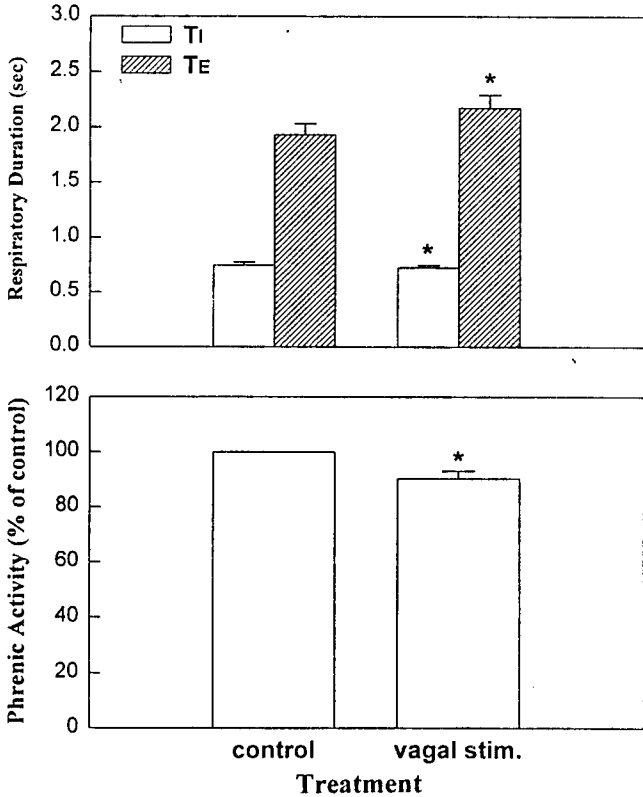
Figure 5. Mean values (±se) of neuron discharge rate. Neuron activities during inspiratory (Ti, open bars) and expiratory (TE, striped bars) period are increased with hypercapnia. N=8.

不論在吸氣或呼氣時間都降低, 另有 3 個神經元其平均放電率增加, 餘下的一個則不受影響。

圖七是一個神經元放電率的直方圖, 顯示興奮迷走神經傳入纖維後, 該神經元在呼吸週期的平均放電率降低。這九個呼吸神經元受迷走神經傳入纖維興奮之影響, 其在吸氣時之平均放電率從每秒 59.3 ± 20.1 spikes 降到 48.9 ± 18.7 spikes ($p < 0.05$), 而在呼氣時的平均放電率則從每秒 59.1 ± 23.0 spikes 降為 48.3 ± 20.3 spikes ($p < 0.05$)。

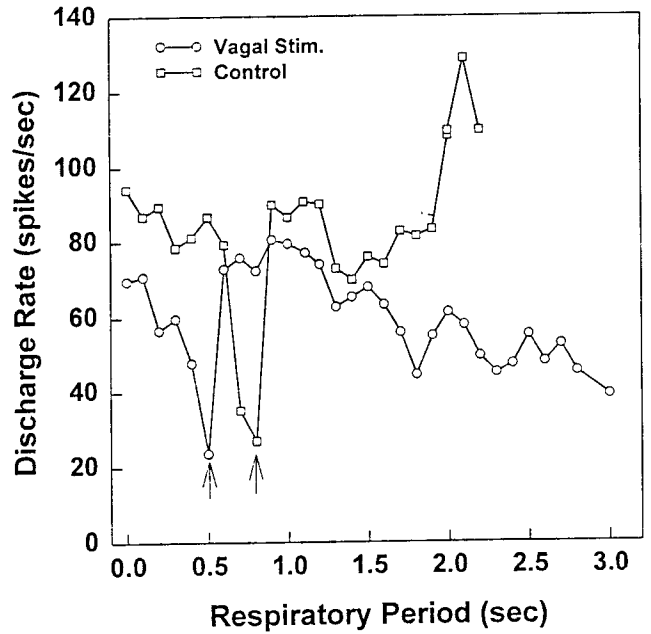
討 論

本研究所得結果顯示: (1)延腦黑暗縫合核確實含有呼吸神經元, 它們的放電型式依膈神經活動, 可分為呼氣神經元(E)、吸氣呼氣神經元(IE)、呼氣吸氣神經元(EI)及連續性呼氣吸氣神經元(T-EI)、連續



圖六、吸氣時間(圖上空柱)、呼氣時間(圖上斜柱)及膈神經活動(圖下空柱)的平均值±標準誤(十三次測試結果)。電刺激迷走神經傳入纖維(vagal stim.)會促使吸氣時間縮短、呼氣時間延長以及膈神經活動降低。*代表 $p < 0.05$ (與刺激前的control相比,採配對-t測試)。

Figure 6. Mean values ($\pm se$) of inspiratory duration (open bars in the upper panel), expiratory duration (striped bars in the upper panel) and phrenic nerve activity (lower panel) in response to vagal stimulation (vagal stim.). * $p < 0.05$ by paired t-test compared with control which is the average before treatment. N=13 tests.



圖七、以直方圖表示一個呼吸神經元在呼吸週期的放電率因迷走神經傳入纖維興奮(vagal stim.)而降低。箭頭表吸氣(Ti)與呼氣(Te)時間分界點。

Figure 7. Histogram of a respiratory-related neuron in response to vagal afferent stimulation. Discharge rate during inspiratory (Ti) and expiratory period (Te) decreases with vagal afferent stimulation (vagal stim.). Arrowhead represents the time between Ti and Te.

性吸氣呼氣神經元(T-IE)等,其中以EI及T-EI所佔比例較高,其次是IE與T-IE;(2)二氧化碳濃度增加時,有些呼吸神經元的放電率降低,有些則升高或反應不規則;(3)興奮迷走神經傳入纖維以模擬肺膨大,活化肺伸張接受器,會促使多數呼吸神經元的放電率降低,少數則升高或不受影響。

呼吸管制主要是由位於橋腦和延腦的神經元所負責,延腦的呼吸神經元主要集中在兩群神經核,即背呼吸神經核與腹呼吸神經核。背呼吸神經核所含的

神經元絕大多數是I神經元,只有極少數是E神經元,從這裡發出下行神經纖維,投射到兩側的頸脊髓,與膈神經核形成突觸,管制膈神經活動(Berger, 1977; Bianchi *et al.*, 1995);腹呼吸神經核位於延腦腹面,可分成三段:吻端是Botzinger complex,主要含有E神經元及Pre-Botzinger complex,主要含有I神經元(Smith *et al.*, 1991),中間段是疑核(nucleus ambiguus),後段是後疑核(nucleus retroambiguus),主要含有I和E神經元(Ellenberger and Feldman, 1990)。疑核和後疑核的下行神經徑路除了與膈神經核形成突觸外,還聯絡到胸腹部一些與呼吸有關的神經,如肋間神經與腹部神經(Merrill, 1970; Shannon, 1980)。背呼吸神經核與腹呼吸神經核所含神經元,大多數是I與E神經元,極少數是EI,IE,T-IE或T-



EI。本實驗在延腦黑暗縫合核所記錄到神經元，單純的 I 或 E 所佔比例極低，大多數是 EI，IE，T-EI 及 T-IE 佔所呼吸神經元的 91%，與延腦大縫合核 (NRM) 所含的呼吸神經元百分比相似 (簡，1991)。在性質上與背呼吸神經核及腹呼吸神經核所含的神經元大不相同，推論其功能可能也不一樣。

橋腦吻端的呼吸調節中樞位於內旁臂核 (nucleus parabranchialis medialis: NPBM) 和 Kolliker-Fuse nucleus (KF) 兩個區域 (Cohen, 1979; Feldman, 1986)，興奮不同區域時會終止吸氣而轉變成呼氣或停止呼氣而開始吸氣，具有促使呼與吸轉換的功能 ("off-switch" 機制) (Cohen, 1971; Aoki *et al.*, 1987)。Bertrand *et al.*, (1973) 有系統地探討 NPBM 與 KF 的呼吸神經元，發現 IE 神經元位於 I 與 E 兩群神經元之間，因此，推測這種神經元可能與吸氣神經元 (I) 和呼氣神經元 (E) 形成網路 (network)，並在呼吸週期中扮演調節呼吸的轉換作用，所以才稱之為跨期神經元 (phase-spanning neurons)，Bianchi 和 St. John (1982) 也發現 NPBM 及 KF 所含的跨期神經元高達 70%，其餘 30% 才是 I 或 E 神經元。本研究記錄延腦黑暗縫合核的呼吸神經元，發現 EI，T-EI，T-IE 及 IE 這類跨期神經元特別多，過去的報告指出以電或化學刺激延腦黑暗縫合核會使呼吸頻率加快 (Holtman *et al.*, 1986; Yen and Hwang, 1989)。因此推論 NRO 這些呼吸神經元的功能可能與呼吸週期之調節有關，類似呼吸調節中樞的功用。

許多報告均指出橋腦的呼吸調節中樞有神經纖維投射到延腦中線縫合核 (Brodal, 1960a; Bianchi and St. John, 1982; Song *et al.*, 1990)，Song 等人 (1991) 更明確地證明了呼吸調節中樞投射過來的神經末梢與大縫合核 (NRM) 間是單突觸結合，並進一步說明了呼吸調節中樞對呼吸的影響有部份可能是藉由 NRM 來完成的。目前並無任何報告顯示呼吸調節中樞也有神經經路投射到 NRO。但據本研究在 NRO 所得這些呼吸神經元的特性及簡 (1991) 先前所得結果來看，我們認為延腦縫合核這些呼吸神經元，可能接受了來自呼吸調節中樞的訊號，加以整合後，發出神經纖維投射

到兩側的 DRG 與 VRG 或直接投射到頸脊髓的膈神經核，以達到調節呼吸的功能。另外，在 NRM 與 NRO 所含呼吸神經元雖然其放電類型相似，但這兩個區域對膈神經活動的影響卻不一樣，電刺激 NRM 會抑制膈神經活動，而 NRO 卻會造成膈神經的活性增強 (Yen and Hwang, 1989)，是否從呼吸調節中樞下行至延腦縫合核的訊號有抑制性與促進性兩種，目前並不清楚，不過，就調節呼吸作用的功能來看，若延腦縫合核當中一個區域抑制呼吸作用，促使吸氣停止並轉為呼氣，而另一個區域則促進吸氣，使呼氣停止並轉為 (提前) 吸氣，也是很合理的，惟其詳細的作用機制，仍有待進一步研究。

本研究發現延腦黑暗縫合核的多數呼吸神經元，其放電率隨二氧化碳濃度增加而降低 (圖二與四)。這種結果看來似乎違背呼吸管制原理，因為呼吸的功能是維持血液中氣體濃度的恆定，當體內 CO₂ 濃度升高時，管制呼吸作用的神經活動會增強 (Cohen, 1967; Feldman, 1986)，不僅是中樞的呼吸神經元放電率隨 CO₂ 濃度升高而增加 (St. John and Wang, 1977; St. John, 1981; Feldman, 1986)，且周邊神經如膈神經、顏面神經、舌下神經及喉返神經的活動也會增強 (Hwang *et al.*, 1983, 1988)，只有這樣才能將體內過多的二氧化碳排出體外。但是也有例外，Cohen (1967) 就曾發現，腦幹中有些呼吸神經元，尤其是 EI 神經元的放電率與二氧化碳溶度變化正好相反，在所觀察的 25 個呼吸神經元當中有 20 個會因為 CO₂ 濃度降低而放電率增加，與本實驗所得結果相似。最近，簡 (1991) 也發現延腦吻端大縫合核內的呼吸神經元，其放電率隨 CO₂ 濃度提高而降低者，佔最多數，這種結果與本研究所得結果相似。這樣的性質是否與 off-switch 作用有關，目前雖無證據，但這樣的推論也不無可能，就呼吸功能來看，當體內 CO₂ 濃度增加時，吸氣與呼氣均須加強，表現在神經方面的如膈神經活動增強及呼吸神經元放電增加 (St. John and Wang, 1977; St. John, 1981)，在這樣的情況下，吸與呼的轉換 (off-switch) 作用當然必需減弱，這樣看來，縫合核的跨期神經元活動因 CO₂ 濃度增加而減弱是很合



理的。

CO₂ 濃度提高究竟是經由什麼神經徑路傳到延腦縫合核，目前並不清楚。已知 CO₂ 作用於化學接受器 (chemoreceptor)，由於本實驗的迷走神經已被切斷，因此二氧化碳應該是作用在中樞化學接受器 (central chemoreceptor) 或頸動脈體的化學接受器 (carotid body chemoreceptor)。頸動脈體化學接受器將二氧化碳濃度改變的訊號，沿竇神經 (sinus nerve) 傳入而終止於延腦的孤獨徑核 (nucleus of the tractus solitarius; NTS) (Cohen, 1979; Feldman, 1986)。中樞化學接受器多年來一直被認為是位於延腦腹面外側部位，最近陸續有報導指出可能是位於延腦外側的後菱形體 (retrotrapezoid body; RTN) 和後顏面神經核 (retrofacial nucleus) (Millhorn and Eldridge, 1986; Connelly *et al.*, 1989; Nattie *et al.*, 1988)。目前已知後菱形體與後顏面神經核都有神經徑路通至背呼吸神經核與腹呼吸神經核 (Connelly *et al.*, 1989; Ellenberger and Feldman, 1990; Bianchi and Barillot, 1982)，而組織化學也證明腹呼吸神經核有神經纖維傳達到延腦縫合核。雖然這些傳導路徑不一定就是傳遞呼吸的訊號，但不能排除這種可能性。由於 CO₂ 濃度提高究竟是經由何種神經徑路傳到延腦縫合核實在不清楚，延腦縫合核神經元放電率降低的機制是什麼，目前也不知道。不過，Weyne *et al.*, (1973)曾指出，腦部裡面的 GABA 會因 CO₂ 濃度升高而增多。而當 GABA 作用在呼吸神經元會使神經元膜電位降低，放電率下降 (Haji *et al.*, 1986)。由於 GABA 是中樞神經系統裡一種重要的抑制性神經傳導物質，如果能證實有作用在延腦縫合核的神經元，或許可用來解釋 CO₂ 濃度增加使延腦縫合核神經元放電率降低。

依照赫柏反射 (Hering-Breuer reflex)，迷走神經完好的情況下，肺膨大起來，會興奮分布於肺裡的肺伸張接受器 (pulmonary stretch receptors; 簡稱 PSR)，藉由迷走神經傳入纖維將肺膨大訊號傳到中樞，經處理後，抑制動物的吸氣活動。為了模擬肺膨大興奮 PSR，本研究採用近年來專家們所模擬的方式，即直接電刺激頸部迷走神經傳入纖維 (Berger and Dick,

1987; McCrimmon *et al.*, 1987)，興奮 PSR 的標準有三，即(1)吸氣時間縮短；(2)呼氣時間延長；(3)膈神經活動降低。若得到這樣的結果，則可視為興奮 PSR 的效果 (Feldman and Gautier, 1976; McCrimmon *et al.*, 1987)。此方法雖不能排除興奮其它的神經纖維，但由於與肺膨大作用之結果相似，所以被一些呼吸生理學者認可並予採行 (Feldman and Gautier, 1976; Iscoe *et al.*, 1979)。

本實驗於電刺激迷走神經時，均小心謹慎且多次測試刺激電流強度，選用能夠引起膈神經活動降低的最小電流，如此，則得到 T_i 縮短，T_E 延長，且膈神經明顯下降 (圖六，p<0.5)，在這樣的條件下，本實驗在 NRO 測試十三個呼吸神經元對迷走神經傳入纖維興奮後的反應，經統計分析後，不論是吸氣或呼氣時多數神經元 (其中九個) 的放電率均明顯降低，僅少數神經元放電率增加 (13 個當中的 3 個)，另有一個神經元沒有反應，這表示多數 NRO 呼吸神經元會受到來自 PSR 的調整作用。生理學和組織化學方法已證實 PSR 的傳入神經終止於延腦的孤獨徑核，主要是背呼吸神經核的位置 (Donoghue *et al.*, 1982; Berger and Averill, 1983)。又肺膨大會影響背呼吸神經核的細胞活性，若肺膨大而使其放電率降低者，稱為 I α ，相反地，放電率增加者，稱為 I β (Cohen, 1969; Averill *et al.*, 1984)。本研究的結果，顯示電刺激迷走神經傳入纖維，也會影響 NRO 與呼吸有關神經元的活性，造成有的神經元受到抑制，放電率降低 (圖七)，另有些神經元則放電率增加。已知 NRO 興奮時，會促進膈神經活動 (Holtman *et al.*, 1987)，而肺膨大會抑制吸氣，所以若電刺激迷走神經，NRO 中與呼吸有關神經元放電率降低 (本研究結果) 是合理的。至於有些神經元放電率增加，則類似 Hwang 等人 (1987) 的發現，肺膨大不僅會抑制膈神經活動，也有促進膈神經活動之作用。

本研究以電刺激迷走神經，由膈神經的反應推測可能興奮了 PSR，由於 PSR 的末梢是終止於背呼吸神經核附近 (Averill *et al.*, 1984)，因此，縫合核呼吸神經元的反應可能是間接的，最可能的途徑是經由



DRN的神經纖維傳到NRO，進而影響NRO神經元的放電。Smith等人(1989)已證實DRN有神經纖維投射到NRO，但此等神經徑路是否傳達肺膨大的訊息，則尚待進一步研究。

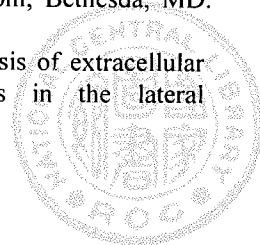
由本實驗結果，可得到以下三點結論：(1)在延腦黑暗縫合核，確實含有與呼吸有關的神經元，而且以EI，T-EI，IE及T-IE類型所佔比例最多。(2)二氧化碳濃度升高時，會影響這些神經元的放電率。(3)電刺激迷走神經傳入纖維，確實會影響NRO神經元的放電率活動。

誌 謝

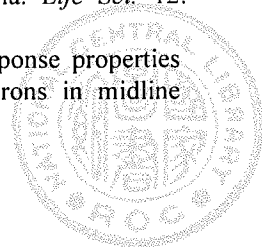
本研究承行政院國家科學委員會提供經費資助(NSC82-0209-B-003-016)，謹此致謝。部分結果為吳英賓碩士論文，並曾於中國生理學會年會(1993)做口頭報告。

參 考 文 獻

- Aoki, M., S. Mori, K. Kawahara, H. Watanabe and N. Ebata. 1987. Generation of spontaneous respiratory rhythm in high spinal cats. *Brain Res.* 202: 51-63.
- Averill, D. B., W. E. Cameron and A. J. Berger. 1984. Monosynaptic excitation of dorsal medullary respiratory neurons by slowly adapting pulmonary stretch receptors. *J. Neurophysiol.* 52: 771-785.
- Berger, A. J. 1977. Dorsal respiratory group neurons in the medulla of cat: spinal projections, responses to lung inflation and superior laryngeal nerve stimulation. *Brain Res.* 135: 231-254.
- Berger, A. J. and D. B. Averill. 1983. Projection of single pulmonary stretch receptors to solitary tract region. *J. Neurophysiol.* 49: 819-830.
- Berger, A. J. and T. E. Dick. 1987. Connectivity of slowly adapting pulmonary stretch receptors with dorsal medullary respiratory neurons. *J. Neurophysiol.* 58: 1259-1274.
- Bertrand, F., A. Hugelin, and J. F. Vibert. 1973. A stereologic model of Pneumotaxic oscillator based on spatial and temporal distributions of neuronal bursts. *J. Neurophysiol.* 37:91-107.
- Bianchi, A. L. and W. M. St. John. 1982. Medullary axonal projections of respiratory neurons of pontile pneumotaxic center. *Respir. Physiol.* 48: 357-373.
- Bianchi, A. L. and J. C. Barillot. 1982. Respiratory neurons in the region of the retrofacial nucleus: pontile, medullary, spinal and vagal projections. *Neurosci. Lett.* 31: 277-282.
- Bianchi, A. L., M. Denabit-Saubie, and J. Champagnat. 1995. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol. Rev.* 75: 1-43.
- Brodal, A., E. Taber and F. Walberg. 1960. The raphe nuclei of the brain stem in the cat. II. Efferent connections. *J. Comp. Neurol.* 114: 239-260.
- Cohen, M. I. and S. C. Wang. 1959. Respiratory neuronal activity in pons of cat. *J. Neurophysiol.* 22: 33-50.
- Cohen, M. I. 1968. Discharge patterns of brain-stem respiratory neurons in relation to carbon dioxide tension. *J. Neurophysiol.* 31: 142-165.
- Cohen, M. I. 1969. Discharge patterns of brainstem respiratory neurons during Hering-Breuer reflex evoked by lung inflation. *J. Neurophysiol.* 32: 356-374.
- Cohen, M. I. 1971. Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation. *J. Physiol. (London).* 217: 133-158.
- Cohen, M. I. 1979. Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. *Physiol. Rev.* 59: 1105-1173.
- Connelly, C. A., H. H. Ellenberger and J. L. Feldman. 1989. Are there serotonergic projections from raphe and retromedullary nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci. Lett.* 105: 34-40.
- Dunnett, C. W. 1964. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- Donoghue, S., M. Garcia, D. Jordan and K. M. Spyer. 1982. The brainstem projections of pulmonary stretch afferent neurons in cats and rabbits. *J. Physiol.* 322: 353-363.
- Ellenberger, H. H. and J. L. Feldman. 1990. Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Res.* 513: 35-42.
- Feldman, J. L. and H. Gautier. 1976. Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. *J. Neurophysiol.* 39: 31-44.
- Feldman, J. L. 1986. Neurophysiology of breathing in mammals. In "Handbook of Physiology. The Nervous System IV -- Intrinsic Regulatory Systems of the Brain." ed. by F. E. Bloom, Bethesda, MD: Amer. Physiol. Soc., pp. 463-524.
- Freygang, W. H., Jr. 1958. An analysis of extracellular potentials from single neurons in the lateral



- geniculate nucleus of the cat. *J. Gen. Physiol.* 513: 35-42.
- Haji, A., C. Connelly, S. A. Schultz, J. Wallare and J. E. Remmers. 1986. Postsynaptic actions of inhibitory Neurotransmitters on bulbar respiratory neurons. In: *Neurobiology of the Control of Breathing*" Ed. by von Euler, C., and H. Lagercrantz, Karolinska Institute Nobel Conference Series, Roven Press, New York. pp. 187-194.
- Holtman, J. R., Jr., N. C. Anastasi, W. P. Norman and K. L. Dretchen. 1986. Effect of electrical and chemical stimulation of the raphe obscurus on phrenic nerve activity in the cat. *Brain Res.* 362: 214-220.
- Holtman, J. R., Jr., T. E. Dick, and A. J. Berger. 1987. Serotonin-mediated excitation of recurrent laryngeal and phrenic motoneurons evoked by stimulation of the raphe obscurus. *Brain Res.* 417: 12-20.
- Hwang, J.-C., W. M. St. John, and D. Bartlett Jr. 1983. Respiratory-related hypoglossal nerve activity: influence of anesthetics. *J. Appl. Physiol.* 55(3): 785-792.
- Hwang, J.-C., W. M. St. John and D. Bartlett, Jr. 1987. Influence of pulmonary inflations on discharge patterns of phrenic motoneurons. *J. Appl. Physiol.* 63: 1421-1427.
- Hwang, J.-C., C.-T. Chien and W. M. St. John. 1988. Characterization of respiratory-related activity of the facial nerve. *Respir. Physiol.* 73: 175-188.
- Iscove, S., J. L. Feldman and M. I. Cohen. 1979. Properties of inspiratory termination by superior laryngeal and vagal stimulation. *Respir. physiol.* 36: 353-366.
- Lalley, P. M. 1986. Responses of phrenic motoneurons of the cat to stimulation of medullary raphe nuclei. *J. Physiol.* 380: 349-371.
- Man, H. Y. and L. Liu. 1992. Effect of electrical and L-glutamate stimulation of nucleus raphe obscurus on phrenic nerve activity in rabbits. *Acta Physiol. Sinica.* 44(1): 92-97.
- McCrimmon, D. R., D. F. Speck and J. L. Feldman. 1987. Role of the ventrolateral region of the nucleus of the tractus solitarius in processing respiratory afferent input from vagus and superior laryngeal nerve. *Exp. Brain Res.* 67: 449-459.
- Merrill, E. G. 1970. The lateral respiratory neurons of the medulla: their associations with nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, the spinal accessory nucleus and the spinal cord. *Brain Res.* 24: 11-28.
- Millhorn, D. E. 1986. Stimulation of raphe (obscurus) nucleus causes long-term potentiation of phrenic nerve activity in cat. *J. Physiol.* 381: 169-179.
- Millhorn, D. E., and F. L. Eldridge. 1986. Role of ventrolateral medulla in regulation of respiratory and cardiovascular systems. *J. Appl. Physiol.* 61: 1249-1263.
- Nattie, E. E., J. W. Millis, L. C. Ou and W. M. St. John. 1988. Kainic acid on the rostral ventrolateral medulla inhibits phrenic output and CO₂ sensitivity. *J. Appl. Physiol.* 65(4): 1525-1534.
- Otake, K., H. Sasaki, K. Ezure, and M. Manabe. 1988. Axonal projections from Botzinger expiratory neurons to contralateral ventral and dorsal respiratory groups in the cat. *Exp. Brain Res.* 72: 167-177.
- Pitts, R. F., H. W. Magoun, and S. W. Ranson. 1939. Localization of the medullary respiratory centers in the cat. *Am. J. Physiol.* 106: 673-688.
- Shannon, R. 1980. Intercostal and abdominal muscle afferent influence on medullary dorsal respiratory group neurons. *Respir. Physiol.* 39: 73-94.
- Smith, J. C., D. Morrison, H. H. Ellenberger, M. R. Otto, and J. L. Feldman. 1989. Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *J. Comp. Neurol.* 281: 69-96.
- Smith, J. C., H. H. Ellenberger, K. Ballanyi, D. W. Richter and J. L. Feldman. 1991. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254: 726-728.
- Song, G., A. Mizuguchi, N. Kobayashi and M. Aoki. 1990. Descending axonal projections from the medial parabrachial and Kolliker-Fuse nuclear complex to the nucleus raphe magnus in cats. *Neurosci. Lett.* 118: 273-275
- Song, G., A. Mizuguchi and M. Aoki. 1991. Axonal projections from the pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats. *Respir. Physiol.* 85: 329-339.
- St. John, W. M. and S. C. Wang. 1977. Response of medullary respiratory neurons to hypercapnia and isocapnic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 43(5): 812-821.
- St. John, W. M. 1981. Respiratory neuron responses to hypercapnia and carotid chemoreceptor stimulation. *J. Appl. Physiol.* 51(4): 816-822.
- Taber, E., A. Brodal and F. Walberg. 1960. The raphe nuclei of the brain stem in the cat: normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *J. Comp. Neurol.* 114: 161-188.
- Wallenstein, S., C. L. Zucker and J. L. Fleiss. 1980. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.* 47: 1-9.
- Weyne, J., F. Van Leuven and I. R. Leusen. 1973. Glutamate and glutamine in the brain: Influence of acute Pco₂ changes in normal rats and in rats under sustained hypercapnia or hypocapnia. *Life Sci.* 12: 211-218.
- Yen, C.-T. and P. S. Blum. 1984. Response properties and functional organization of neurons in midline



region of medullary reticular formation of cats. *J. Neurophysiol.* 52(5): 961-979.

Yen, C.-T. and J.-C. Hwang. 1989. Control of phrenic nerve activity and blood pressure by the medullary raphe nuclei in cats. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC.* 13(2): 89-96.

簡佩玉 1991. 貓延腦吻端縫合核有關呼吸方面單一神經細胞的探討。國立台灣大學，動物學研究所

碩士論文。

袁世一和黃基礎 1992. 利用個人電腦處理並分析單跟神經的動作電位。師大生物學報 27: 55-69。

(接受日期：1996. 5.15)

Characteristics of Respiratory-Related Neurons within the Nucleus Raphe Obscurus in the Cat

Ying-Ping Wu, Ji-Chuu Hwang and Shia-Er Wang

Department of Biology, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan 117, Republic of China

ABSTRACT

The purpose of the present study was to characterize respiratory-related neurons within the nucleus raphe obscurus (NRO) and to examine their responses to hypercapnia and vagal afferent stimulation. Cat was decerebrated, paralyzed, vagotomized and ventilated. End-tidal fractional concentration of CO₂ was maintained at hyperoxic normocapnia. The phrenic nerve was isolated and its activity was monitored. Neuron activity within the NRO was recorded and evaluated to the response to hypercapnia or vagal afferent excitation. Sixty-six of 133 neurons recorded showed respiratory-related activities. They were classified as expiratory-inspiratory (EI), inspiratory-expiratory (IE), tonic inspiratory-expiratory (T-IE) and tonic expiratory-inspiratory (T-EI) or expiratory (E) patterns according to their time-related with phrenic discharge. Responses of 40 respiratory-related neurons to hypercapnia were examined. Discharge rate of 18 neurons was significantly reduced in response to hypercapnia while 8 neurons was enhanced. The remaining neurons displayed irregular pattern as the concentration of carbon dioxide was increased. With vagal stimulation, most of the neurons (9 of 13) showed a reduction of discharge rate ($p < 0.05$) whereas the others were either increased or unaffected. These results indicate that respiratory-related neurons within the NRO can be modulated by the inputs from the chemoreceptors and vagal afferents. It also suggest that the NRO may play a role in the regulation of respiration.

Key words: nucleus raphe obscurus, respiratory-related neurons, hypercapnia, vagal afferents, cat

