

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217( 2016) 04-0311-04

## 心血管中枢与心血管功能的同步记录技术

陶宜楠, 郑超, 秦雯, 张环环, 汪萌芽

( 皖南医学院 细胞电生理研究室, 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 建立心血管中枢与心血管功能的同步记录技术, 用于观察心血管中枢活动和外周自主神经功能活动, 研究心血管中枢对心血管活动的调节。方法: 取成年 SD 大鼠, 用混合麻药腹腔麻醉后, 同步记录延髓头端腹外侧区( rostral ventrolateral medulla, RVLM) 神经元单位放电活动、心电图、血压、呼吸肌肌电、体温, 并进行相关参数的分析。结果: 可记录到明确稳定的神经元单位放电活动等各项指标, 在 12 只大鼠的 RVLM 中一共记录了 18 个自发单位放电, 其中连续放电有 12 个, 周期性簇状放电有 6 个。另外, 两种类型放电分别对应的同步记录指标进行组间比较, 仅呼吸肌肌电幅值差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在记录各项指标时观察到 RVLM 神经元自发放电与血压之间有相互影响。结论: 同步记录心血管中枢与心血管活动是一种实时可靠的在体动物实验技术, 为研究心血管各级中枢之间的相互作用提供了一种有效的方法。

**【关键词】**在体; 多通道同步记录技术; 细胞外单位放电记录; 大鼠

**【中图分类号】**R 331.38 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2016.04.002

## Establishment of simultaneous recording technique for observing cardiovascular center and cardiovascular activities

TAO Yi'nan, ZHENG Chao, QIN Wen, ZHANG Huanhuan, WANG Mengya

Cell Electrophysiology Laboratory, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To establish a simultaneous recording technique for observing the activities of the cardiovascular center and peripheral autonomic nervous system in studying the regulation of the center on cardiovascular activities. **Methods:** Adult Sprague-Dawley rats were anesthetized with mixed anesthetic. The single-unit discharge of rostral ventrolateral medulla (RVLM) neurons, electrocardiogram (ECG), blood pressure (BP), respiratory muscle electromyogram and body temperature were simultaneously recorded and related parameters were analyzed. **Results:** Stable and clear single-unit discharge signal of neurons and other signals were well recorded. Eighteen spontaneous unit discharges were recorded in 12 rats, containing 12 continuous discharges and 6 periodical burst discharges. In addition, only the respiratory muscle electromyogram amplitude was significantly different ( $P < 0.05$ ) between two types of discharge groups. The interaction between the RVLM spontaneous neural discharge and blood pressure was observed when recording the indicators. **Conclusion:** The results indicate that the simultaneous recording technique is a real-time and reliable method for animal experiment *in vivo*, which may provide an effective technique for studying the interaction between cardiovascular and all levels of the central nervous system.

**【Key words】***in vivo*; simultaneous recording technique by polygraph; extracellular single-unit recordings; rat

心血管中枢与心血管功能的同步记录技术是将中枢在体细胞外记录技术与外周生理指标同步记录技术相结合, 应用 PowerLab 八通道生理记录仪, 同步记录多项生理指标, 如中枢神经元单位放电、血压、心电、呼吸、体温等, 是一项用途广泛的实验技术。该技术的建立主要用于研究各级心血管中枢对

外周心血管功能活动的调节。外周心血管活动主要接受自主神经系统的调节, 而自主神经系统接受中枢下丘脑和延髓的调控, 脑内调节心血管活动的最基本的中枢就位于延髓, 包括延髓头端腹外侧区( rostral ventrolateral medulla, RVLM)、延髓尾端腹外侧区( caudal ventrolateral medulla, CVLM) 等核团, 其

基金项目: 安徽省自然科学基金项目( 1408085MH155); 皖南医学院博士科研启动基金项目( 201402); 国家自然科学基金项目( 31271155; 31200828)

收稿日期: 2016-02-09

作者简介: 陶宜楠( 1992-), 女, 2014 级硕士研究生, ( 电话) 18226701617, ( 电子信箱) 283092373@qq.com;

汪萌芽, 男, 教授, 硕士生导师, ( 电子信箱) wangmy@wnmc.edu.cn, 通信作者;

张环环, 女, 副教授, 硕士生导师, ( 电子信箱) anhuihh@163.com, 通信作者。

中 RVLM 也是脑内其他心血管中枢调节交感心血管运动系统的重要联系核团,且具有自发活动<sup>[1]</sup>,而其他心血管活动的调节中枢,分布于从脊髓到大脑皮层的各个水平,相互构成复杂的神经网络,通过不同的神经递质共同调节心血管活动。

RVLM 区也有呼吸相关调节神经元的分布。本实验技术在原有的四通道记录技术的基础上,增加了通道数目,比如可以增加同步记录呼吸肌肌电指标,用于反映中枢呼吸相关神经元的活动。因此,该技术也为中枢心血管相关神经元的鉴定提供了便利。本实验平台联合应用美国 A-M systems 公司的放大器,将原有的金属电极改为玻璃电极,玻璃电极的尖端相较于金属电极而言不易被极化,且更有利于贴合神经元,记录神经元的单位放电。

本实验通过心血管中枢与外周心血管生理指标的同步记录技术,通过不同的实验设计,可进一步鉴定 RVLM 区心血管相关神经元,以及为进一步研究心血管各级中枢间交互作用以及心血管中枢与外周心血管活动的相互影响提供基本的技术支持。

### 1 材料与方 法

1.1 实验动物 成年 SD 雄性大鼠 250~300 g,购自南京青龙山动物繁殖场。

1.2 主要仪器设备和药品 脑立体定位仪(瑞沃德 68000 系列)、美国 A-M Systems 的刺激器(MODEL 2100)和放大器(MODEL 1800)、动物恒温系统(上海奥尔科特生物科技有限公司)、常用手术器械、手术显微镜、双层铜网电生理屏蔽罩和防震台、不锈钢同芯金属电极、金属参考电极、玻璃微电极、Power-Lab 八通道生理信号采集系统(AD Instruments, Australia)及其 Chart Pro 记录和分析软件、氨基甲酸乙酯、 $\alpha$ -氯醛糖等。

### 1.3 实验方 法

1.3.1 外周生理指标同步记录 用氨基甲酸乙酯(700 mg/kg)和  $\alpha$ -氯醛糖(35 mg/kg)混合腹腔麻醉大鼠后,将大鼠取仰卧位固定于手术板上,首先分离股动静脉,将充满 0.02% 肝素钠生理盐水的聚乙烯塑料导管插入股动脉向心端,通过三通管接口连接血压传感器并经桥式放大器连接 PowerLab 记录系统转入计算机连续记录血压。股动脉插管后将大鼠置于有双层铜网电生理屏蔽罩的防震台上的恒温毯上,用针式电极记录标准肢体 II 导联心电图。将 2 根针式电极插入大鼠右侧腋中线第 9 肋下缘肋间外肌内,两根电极垂直放置,记录呼吸肌肌电图。将体温换能器探头插入大鼠肛门内,进行体温信号的

采集<sup>[2]</sup>。

1.3.2 RVLM 神经元在体细胞外记录 头部备皮后,大鼠取俯卧位固定于脑立体定位仪上。剪去颅顶部分皮肤,钝性分离皮下组织和骨膜,暴露颅骨,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 擦拭充分止血,暴露前囟、人字缝和矢状缝,用生理盐水再次擦拭暴露出的颅骨,调节前囟、人字缝到同一水平面。使用玻璃电极定位前囟后,参照 Paxinos and Watson 图谱<sup>[3]</sup>定位 RVLM:前囟后(AP): -12.36~-12.00 mm,右旁开(ML): 1.9~2.4 mm,颅骨表面以下(DV): 10.2~10.7 mm。以颅骨钻颅开窗,冷光源照明,用弯针头挑破硬脑膜、蛛网膜和软脑膜。将玻璃电极(内充 2% 滂胶天蓝和 0.5 mol/L 的醋酸钠溶液,电极电阻 5~15 M $\Omega$ )移至 RVLM 处颅窗上方,缓慢垂直下调至核团顶端,2% 盐水琼脂封窗。参考电极置于大鼠颅顶边缘皮下。微调记录电极寻找明确的细胞外电活动信号。记录到信号后,等待 30 min,待信号稳定后,观察 RVLM 区核团放电活动以及与心率、血压等外周心血管指标间的相互关系。

实验结束,大鼠断头取脑于 4% 甲醛溶液内固定后,进行冠状面切片,观察滂胶天蓝标记位置,并与图谱中 RVLM 的位置进行比对,以鉴定记录位点。

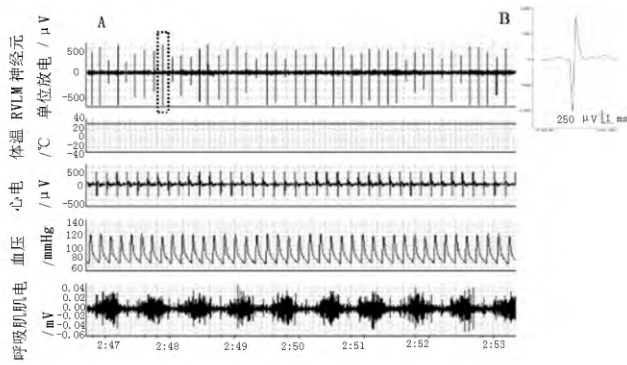
1.3.3 数据采集与分析 采集到的信号经放大器放大,接入 PowerLab 多导生理信号采集系统,再通过计算机及 LabChart 软件进行数据的采集、储存和分析。采样频率 4 kHz。各个通道的参数设置如下:神经元电活动信号量程 1 V,体温信号滤波参数为低通 10 Hz,心电信号高通 10 Hz、低通 100 Hz,呼吸肌肌电信号高通 0.1 Hz、低通 200 Hz。放大器滤波参数设置为低频截止频率 100 Hz、高频截止频率 5000 Hz,信号增益为 1000。结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用两样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结 果

2.1 PowerLab 多通道同步记录 对 12 只大鼠进行 RVLM 区神经元单位放电活动的记录,并同步记录大鼠的体温、心电、血压、呼吸。同步记录的原始图见图 1、2。

2.2 RVLM 神经元单位放电 12 只 SD 大鼠共记录到 18 个 RVLM 区神经元单位放电,各取稳定记录的 RVLM 电信号 20 min,用 Chart Pro 软件检测出的平均频率作为放电频率值。其放电类型有两种,一种是连续放电(66.7%, 12/18),另一种是周期性簇状

放电(33.3% ,6/18)。两种放电类型分别见图 1、2 中的 RVLM 神经元单位放电。



A: RVLM 区神经元连续放电、体温、心电、血压、呼吸肌肌电信号的同步记录。B: 放大后的单位放电信号。

图 1 多通道同步记录的原始图

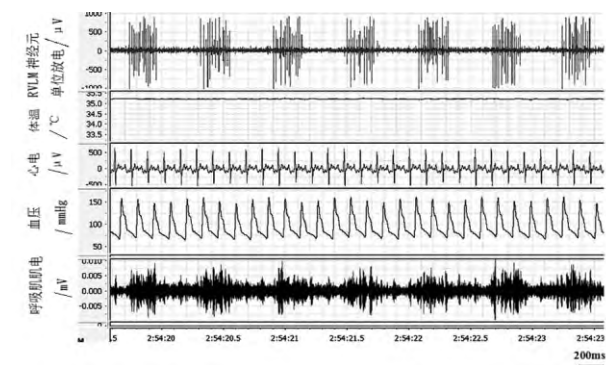


图 2 RVLM 区神经元周期性簇状放电、体温、心电、血压、呼吸肌肌电信号的同步记录

2.3 两种放电类型分别对应的同步记录的各项生理指标间的比较 对 RVLM 神经元两种类型的单位放电信号及各自对应的同步记录的外周指标进行两组间比较分析,其中仅两种放电类型分别对应的同步呼吸肌肌电幅值间比较有统计学差异( $P < 0.05$ ) ,其他指标组间比较均无统计学差异( $P > 0.05$ )。详见表 1。

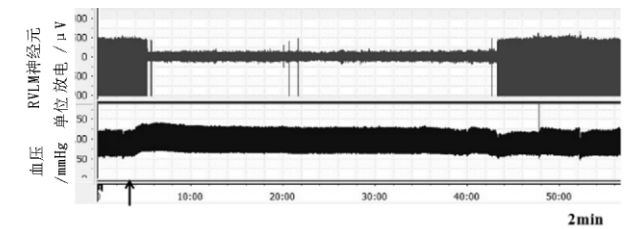
2.4 RVLM 神经元与外周心血管活动之间的相互影响 实验过程中,在稳定记录到各项生理指标时,通过股静脉注入苯肾上腺素(10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 鉴定所记录到的 RVLM 心血管相关神经元。对记录到的 4 个 RVLM 神经元单位放电进行鉴定,在注入苯肾上腺素之后,血压升高,其中 3 个 RVLM 神经元单位放电受到抑制,即为心血管相关神经元(75% ,3/4)。典型记录结果见图 3。

针刺大鼠尾部,观察到 RVLM 神经元放电频率明显加快,同时血压也逐渐上升,随后放电频率略有降低,血压也略有下降,典型记录如图 4 所示。

表 1 两种放电类型分别对应的同步记录的各项生理指标

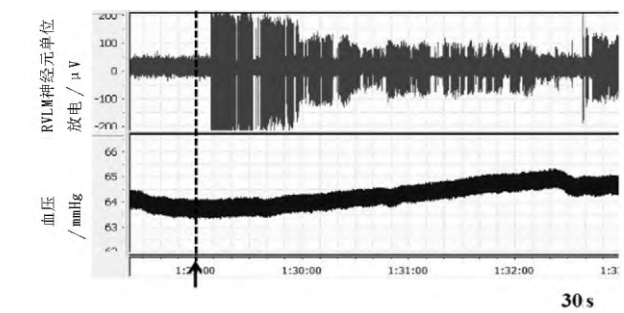
类型	连续放电	周期性簇状放电	t 值
RVLM 放电频率/Hz	17.3±10.0 <sup>a</sup>	22.1±19.0 <sup>b</sup>	0.7
RVLM 放电幅值/ $\mu\text{V}$	1423.8±549.1 <sup>a</sup>	1196.3±563.6 <sup>b</sup>	0.8
HRV(LF) /nu	14.1±12.1 <sup>a</sup>	8.1±7.0 <sup>b</sup>	1.1
HRV(HF) /nu	11.2±6.7 <sup>a</sup>	6.3±4.3 <sup>b</sup>	1.6
HRV(LF/HF)	1.2±0.5 <sup>a</sup>	1.2±0.3 <sup>b</sup>	0.0
心率/(次/min)	397.4±61.0 <sup>a</sup>	429.8±36.5 <sup>b</sup>	1.2
体温/ $^{\circ}\text{C}$	35.4±1.6 <sup>a</sup>	35.2±1.8 <sup>b</sup>	0.2
收缩压/mmHg	112.1±19.6 <sup>c</sup>	102.0±31.6 <sup>d</sup>	0.8
舒张压/mmHg	73.7±16.3 <sup>c</sup>	69.0±18.0 <sup>d</sup>	0.5
平均动脉压/mmHg	86.5±12.2 <sup>c</sup>	80.0±13.2 <sup>d</sup>	1.0
呼吸肌肌电频率/(次/min)	97.2±15.5 <sup>e</sup>	103.4±22.2 <sup>f</sup>	0.3
呼吸肌肌电幅值/ $\mu\text{V}^*$	46.8±31.0 <sup>e</sup>	21.1±11.2 <sup>f</sup>	2.4

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较进行两样本 t 检验 \*  $P < 0.05$ 。a:  $n = 12$  b:  $n = 6$ ; c:  $n = 10$  d:  $n = 5$ ; e:  $n = 11$  f:  $n = 5$ 。HRV: 心率变异性, HF: 高频 LF: 低频。nu: 归一化单位, nu = LF 或 HF 功率  $\times 100 /$  (总功率 - 极低频功率)。



图中箭头指示注入苯肾上腺素。

图 3 注射苯肾上腺素后 RVLM 神经元放电及血压变化



图中箭头指示给予大鼠尾部针刺刺激。

图 4 刺激鼠尾 RVLM 神经元放电与血压的变化

### 3 讨论

本实验采用心血管中枢与心血管功能的同步记录技术,在整体水平进行心血管中枢 RVLM 核团放电活动与外周生理指标的同步记录,在整个实验过程中均能够实时记录各项指标的变化。通过对同步记录的各项指标进行统计分析,结果显示,各项指标参数与已报道的类似参数基本一致<sup>[1,4,6-7]</sup>,提示实验方法及结果可靠。

已知相关文献<sup>[4-5,7]</sup>中在RVLM区有与呼吸相关的神经元。本次实验记录到两种类型的RVLM神经元单位放电活动,分别是连续放电和周期性簇状放电。实验过程中发现周期性簇状放电的放电频率基本上与呼吸节律同步,且从两种类型放电及其相应的同步外周指标间的分析结果也可看出,仅呼吸肌肌电幅值间比较有显著差异,我们的实验结果也进一步说明在RVLM区有与呼吸相关的神经元,RVLM神经元与心血管活动和呼吸活动均有相关性<sup>[8]</sup>。同时,也可通过此方法剔除RVLM区非心血管相关神经元,而只进行RVLM区心血管相关神经元与外周心血管活动的研究。

RVLM是交感神经活动和心血管功能的整合中枢,对于交感神经活动和心血管活动具有重要的调节作用,同时外周活动也可以影响到RVLM。在稳定记录大鼠各指标信号时,发现随着大鼠RVLM区神经元单位放电信号的变化其血压也会相应改变。在大鼠的尾部进行针刺刺激后,观察到大鼠的血压、RVLM神经元放电均有相应改变。给予外周躯体刺激,通过外周传入中枢,RVLM神经元放电增加,引起血压升高。RVLM在动脉血压压力感受器反射调节中也起到关键性的作用<sup>[9]</sup>。RVLM神经元具有压力敏感性,其放电活动可被升高的血压所抑制。我们采取静脉注射苯肾上腺素(10 μg/kg)<sup>[10]</sup>的方法来鉴别RVLM神经元,观察到血压升高,RVLM神经元自发放电的频率降低甚至消失,待血压恢复至注射之前的水平,RVLM自发放电频率恢复,该结果与文献报道一致<sup>[11-12]</sup>。以上结果显示本实验所建立的心血管中枢与心血管功能的同步记录技术,既可以记录到由中枢神经活动变化引起的外周生理指标的变化,也可以记录到外周生理指标改变时中枢神经活动的变化。提示心血管中枢与心血管功能的同步记录技术可作为研究心血管各级中枢之间交互作用及心血管中枢对外周心血管活动调节的一种可靠的实验研究方法。

本实验表明,通过心血管中枢核团放电活动与外周生理指标同步记录技术,不仅可以观察到脑区核团放电活动改变时,外周生理指标的变化,在外周

生理环境发生改变时也能观察到脑区核团放电活动发生改变。通过不同方面验证实验结果的可靠性,证明了心血管中枢核团放电活动与外周生理指标同步记录技术的实用性。为研究各级心血管中枢之间的相互关系,以及心血管中枢对外周心血管活动的调节提供了技术支持。

#### 【参考文献】

- [1] 季淑梅,孙新平,张卫,等.心血管各级中枢的血压调节作用[J].生物医学工程学杂志,2009,26(1):216-220.
- [2] 刘伟,汪伟伟,黄军,等.大鼠脑内双核团电活动与多项生理指标的同步记录技术[J].皖南医学院学报,2013,32(5):423-429.
- [3] PAXINOS G,WATSON C.The rat brain in stereotaxic coordinates [M].5th edn.Burlington,MA: Elsevier Academic Press,2004.
- [4] 沈霖霖,曹银祥,吴国强,等.大鼠心率变异性频谱中高频成分的中枢机理分析[J].生理学报,1998,50(4):392-400.
- [5] DUFFIN J,EZURE K,LIPSKI J.Breathing rhythm generation: focus on the rostral ventrolateral medulla [J].News Physiol Sci,1995,10(3):133-140.
- [6] 王伟忠,刘旭东,戎伟芳,等.大鼠头端延髓腹外侧区前交感神经元的电生理研究[J].中国神经科学杂志,2000,16(2):119-122.
- [7] SHEN LL,PENG YJ,WU GQ,et al.The coherence analysis between neuronal discharge in the rostral ventrolateral medulla and the cardiovascular activity in rats [J].Acta Physiol Sin,1999,51(2):168-174.
- [8] 吴国强,赵耐青,沈霖霖,等.心血管变异性的中枢调节数学模型[J].生物物理学报,2001,17(3):504-511.
- [9] HORIUUCHI J,DAMPNEY RA.Dependence of sympathetic vasomotor tone on bilateral inputs from the rostral ventrolateral medulla in the rabbit: role of baroreceptor reflexes [J].Neurosci Lett,1998,248(2):113-116.
- [10] 王伟忠,戎伟芳,王超美,等.皮质酮对大鼠延髓头端腹外侧区神经元活动的影响[J].生理学报,2001,53(4):270-274.
- [11] CHEN QH,TONEY GM.in vivo discharge properties of hypothalamic paraventricular nucleus neurons with axonal projections to the rostral ventrolateral medulla [J].J Neurophysiol,2010,103(1):4-15.
- [12] WANG JJ,RONG WF,WANG WZ,et al.NMDA receptor mechanism involved in arterial baroreflex [J].Acta Pharmacol Sin,2000,21(7):617-622.