DOI:10.16016/j.2097-0927.202408088

小鼠的下丘脑室旁核向前包钦格复合体直接投射参与调控呼吸

刘凌琳,张俊鸿,熊 玮 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院老年医学与特勤医学科

[摘要] **目的** 探究小鼠全脑呼吸相关核团的空间分布,以及下丘脑室旁核(paraventricular hypothalamic nucleus,PVN)与前包钦格复合体(preBötzinger complex,preBötC)之间的环路连接及投射关系。**方法** 运用从外周到中枢逆行示踪的研究策略,在小鼠的膈肌微量注射伪狂犬病毒(pseudorabies virus,PRV),逆行标记脊髓呼吸膈运动神经元的上游输入脑区。在 PVN 微量注射顺行不跨突触病毒(AAV2/9-EGFP),标记 PVN 下游脑区;并利用 Cre/loxP 基因表达策略,在 PVN 及 preBötC 分别注射 Dio-EGFP 及 Retro-Cre 病毒,验证 PVN-preBötC 环路及二者之间的投射关系。**结果** PRV 介导的逆行示踪结果显示:被 PRV-EGFP 标记的阳性神经元分布在 PVN、preBötC、孤束核(nucleus tractus solitarii,NTS)、蓝斑(locus coeruleus,LC)和中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray,PAG)等多个脑区,除延髓区域外,PVN 脑区的 PRV-EGFP 阳性神经元占比最高(P<0.000 1)。在 PVN 注射 AAV2/9-EGFP,经病毒感染后在 preBötC 脑区可见绿色神经纤维。在 PVN 和 preBötC 分别注射 Dio-EGFP 及 Retro-Cre 病毒,经病毒感染后 PVN 脑区可见绿色神经元胞体。**结论** PVN 是脊髓呼吸膈运动神经元上游重要的输入核团,并有可能通过 PVN-preBötC 环路的直接投射调控呼吸。

[关键词] 下丘脑室旁核;前包钦格复合体;呼吸运动神经网络;膈运动神经元
[中图法分类号] R338.2;R322.8;R563.8 [文献标志码] A

Paraventricular hypothalamic nucleus projects directly to the preBötzinger complex and is involved in regulation of respiration in mice

LIU Linglin, ZHANG Junhong, XIONG Wei Department of Geriatrics and Special Service Medicine, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To probe the spatial distribution of respiratory-related nuclei throughout the whole brain, and to investigate the circuit and projection links between the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) and the preBötzinger complex (preBötC) in mice. **Methods** Using a retrograde tracing strategy from peripheral to central, pseudorabies viruses (PRV) were microinjected into the diaphragm of mice to retrogradely label the upstream inputs brain regions from spinal respiratory phrenic motor neurons. The anterograde non-transsynaptic tracing viruses (AAV2/9-EGFP) were microinjected into the PVN to label the downstream brain region of the PVN; And using the Cre/loxP gene expression strategy, Dio-EGFP and Retro-Cre viruses were injected in the PVN and preBötC, respectively, to validate the PVN-preBötC circuit and the projection relationship between the two. **Results** The results of PRV-mediated retrograde tracing showed that PRV-EGFP-positive neurons were distributed in several brain regions such as PVN, preBötC, nucleus tractus solitarii (NTS), locus coeruleus (LC) and periaqueductal grey (PAG). Except for the medulla oblongata region, the PVN brain region had the highest percentage of PRV-EGFP-positive neurons (P<0.000 1). After AAV2/9-EGFP viruses were injected in the PVN, green neurofibrils were observed in the preBötC brain region after viral infection; Dio-EGFP and Retro-Cre viruses were injected in the PVN and preBötC, respectively, and green neuronal cells were seen in the brain region of the PVN after viral infection. **Conclusion** PVN is an important upstream input nucleus of spinal respiratory phrenic motor neurons, and has the potential to

[基金项目] 国家重点研发计划(2018YFC2000301)
[通信作者] 熊 玮,E-mail: xiongwei@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

regulate respiration through direct projections from PVN-preBötC circuit.

[**Key words**] paraventricular hypothalamic nucleus; preBötzinger complex; respiratory motor neural network; phrenic motor neuron

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC2000301). Corresponding author: XIONG Wei, E-mail: xiongwei@tmmu.edu.cn

呼吸是整个生命过程中非常重要且不能持续中断的生理过程[1-4]。人体通过节律性呼吸来维持生命活动,而呼吸运动又受到复杂的呼吸中枢神经网络的调控[5-8]。故呼吸中枢神经网络中的任何区域受到抑制都很有可能引起吸气动力或气道排泄等方面能力的减弱,甚至出现呼吸衰竭[9-12]。为了全面了解呼吸中枢神经网络,课题组前期对脊髓呼吸运动神经元的形态学进行了研究,描绘了全脊髓呼吸相关核团的图谱,但缺乏对上游输入大脑区域呼吸相关核团分布的描述[13]。延髓的前包钦格复合体(preBötzinger complex, preBötC)被一致认为是吸气节律的起源部位[14],并通过兴奋脊髓运动神经元使膈肌及肋间肌等吸气肌群收缩,始动吸气以实现肺部通气[5-8];同时呼吸也受到脑干以上呼吸相关脑区(如下丘脑)的调控[4,15]。下丘脑参与调节各种自主脑功能,同时驱动整个呼吸网络[16-21]。而下丘脑室旁核(paraventricular hypothalamic nucleus,PVN)被称为"下丘脑中枢",是一个发挥高度整合功能的核团[22]。早年有文献报道指出:PVN 的神经元可以投射到脑干和脊髓的"经典"呼吸控制区域,包括延髓头端腹外侧(rostral ventrolateral medulla, RVLM)、脑桥呼吸组[如臂旁复合体、孤束核(nucleus tractus solitarii, NTS)和膈核]等[23-30]。同时 PVN 也接受来自一些脑区(如 NTS、迷走神经背侧运动核、海马和弓状核等)的传入纤维[31-32]。近年来对 PVN 的研究大部分是针对心血管、代谢、应激、疼痛及压力调节等方面[33-36],而在呼吸相关方面的研究,如 PVN 在呼吸中枢神经网络中的作用以及对呼吸调控机制等方面的研究报道相对较少。因此,本研究进一步利用伪狂犬病毒(pseudorabies virus,PRV)逆行示踪技术,描述脊髓呼吸运动神经元的上游输入脑区呼吸相关核团的空间分布,验证 PVN 在呼吸中枢神经网络中的重要位置。同时利用 Cre/loxP 基因表达策略及不跨突触示踪技术,验证 PVN-preBötC 环路的存在以及二者之间的直接突触联系。为后续 PVN 对呼吸调控作用的研究提供解剖学基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究使用 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 22~25 g,共计 36 只,均购自湖南斯莱克景达公司。3~5 只小鼠同笼饲养,置于 25 ℃的恒温环境中,暗/光周期为 12 h。自由摄食和饮水。遵照动物伦理指南进行小鼠实验操作。所有动物实验经过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC20227002),并严格遵循《国际动物实验指南》。

1.2 病毒示踪手术

1.2.1 逆行示踪手术 20 只小鼠用 1%~2%的异氟烷持续吸入麻醉,将其仰卧固定在小鼠操作台上,打开加热垫,保持小鼠体温。用手术剪去除小鼠胸前的毛发,充分消毒其局部皮肤。然后沿前正中线剪开皮肤,用显微剪缓慢分离皮肤与皮下组织,用组织剪剪开腹部肌肉组织,轻移动肝脏,暴露膈肌,用有齿镊沿着肋骨提起膈肌,暴露右侧膈肌。用 Hamilton 注射器(Hamilton 公司,瑞士)抽取 2 μL PRV-EGFP(p03001, ≥2.00×10^9 PFU/ mL,BrainVTA,武汉枢密公司)斜行插入膈肌中,避免穿透膈肌,停留 2 min,等待肌肉适应后缓慢注射,注射完毕后等待 3 min 使病毒在膈肌内充分扩散后拔针。若有渗出,用棉球擦拭干净,并再次对手术区域消毒,缝合皮肤,放回鼠笼中饲养,密切关注小鼠情况,并保证充足粮水。

1.2.2 不跨突触病毒示踪手术 小鼠用 1%~2%的异氟烷持续吸入麻醉,并将其固定在脑立体定位仪(RWD 生命科学有限公司,深圳)上,打开加热垫使小鼠体温维持在 37 ℃左右。剔除小鼠头顶部毛发,对头部皮肤进行消毒后,沿正中线剪开头颅皮肤,棉签擦去小鼠骨膜,暴露骨性标志。前后、左右分别调平定位仪后,利用 Cre/loxP 基因表达策略,用固定好的玻璃电极定位目标脑区($n=8$)PVN [前后,即前囟前或后(anteroposterior, AP):-0.80 mm,左后,即中缝左或右(mediolateral, ML):±0.19 mm,上下,即颅骨硬脑膜平面向下(dorsoventral, DV):-4.8 mm],并在双侧 PVN 微量注射 Dio-EGFP(rAAV-EF1a-DIO-EGFP-WPRE-Hgh polyA,5.20×10^{12} VG/mL,BrainVTA,武汉枢密公司)80~100 nL/边,注射完毕停留 5 min,使病毒充分扩散后退针。在同一只小鼠双侧 preBötC(AP:-6.80 mm,ML:±1.35 mm,DV:-4.9 mm)显微注射 Retro-Cre(rAAV-hSyn-CRE-WPRE-Hgh polyA, 5.45×10^{12} VG/mL,BrainVTA,武汉枢密公司)并混合少量霍乱毒素 β 亚基 555(cholera toxin β-subunit Alexa Fluor

TM 555, CTB555, 用于标记颜色)以 5∶1的剂量比例,共计 80~100 nL/边,注射完毕停留 5 min 后退针。另一批小鼠(n=8)在双侧 PVN(AP:-0.80 mm,ML:±0.19 mm,DV:-4.8 mm)微量注射 AAV2/9(rAAV-hSyn-EGFP-WPRE-Hgh polyA, 5.27×10^{12}VG/mL, BrainVTA,武汉枢密公司)100 nL/边,注射完毕停留 5 min 后退针。然后缝合小鼠头皮伤口放回笼中继续饲养。待病毒感染 4 周后行组织学实验。

1.3 组织学和免疫荧光检测

将膈肌注射 PRV-EGFP 病毒后 2.5~3.0 d(n=6),3.5~4.0 d(n=6)以及 4.5~5.0 d(n=8)的小鼠以及行脑定位注射不跨突触病毒的上述 2 组小鼠,待病毒感染 4 周后,分别予以 1%~2%异氟烷麻醉后,再予以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)和 4%的多聚甲醛(paraformaldehyde,PFA)溶液进行心脏灌注。随后剥离脑组织置于 4%PFA 固定,12 h 后置换为含有 30%蔗糖的 PBS 液,进行脱水直至脑组织完全沉底。包埋和冷冻脑组织后,将其从嗅球端至脑干端以 40 μm 的厚度连续冠状切片,收集切片,用含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)的封片液封片,待其自然干后,置于 4 ℃保存。

1.4 荧光显微镜拍片及绘制脊髓呼吸膈运动神经元上游输入核团

利用 VS200 及共聚焦显微镜拍片,将膈肌注射 PRV-EGFP 病毒后 2.0~2.5 d,3.5~4.0 d 以及 4.5~5.0 d 后的小鼠脑片分别进行整理。根据被 PRV-EGFP 标记的阳性神经元,绘制脊髓呼吸膈运动神经元上游输入脑区神经元群(即全脑呼吸相关核团)分布图。

1.5 PRV-EGFP 阳性神经元计数

在 PRV-EGFP 注射 4.5~5.0 d 的小鼠脑片中,根据小鼠脑图谱,选取 PVN、preBötC、NTS 等 14 个脑区的所有脑片,对被 PRV-EGFP 标记的阳性神经元进行人工计数。

1.6 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行统计分析。多组数据之间比较采用单因素方差分析。符合正态分析数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

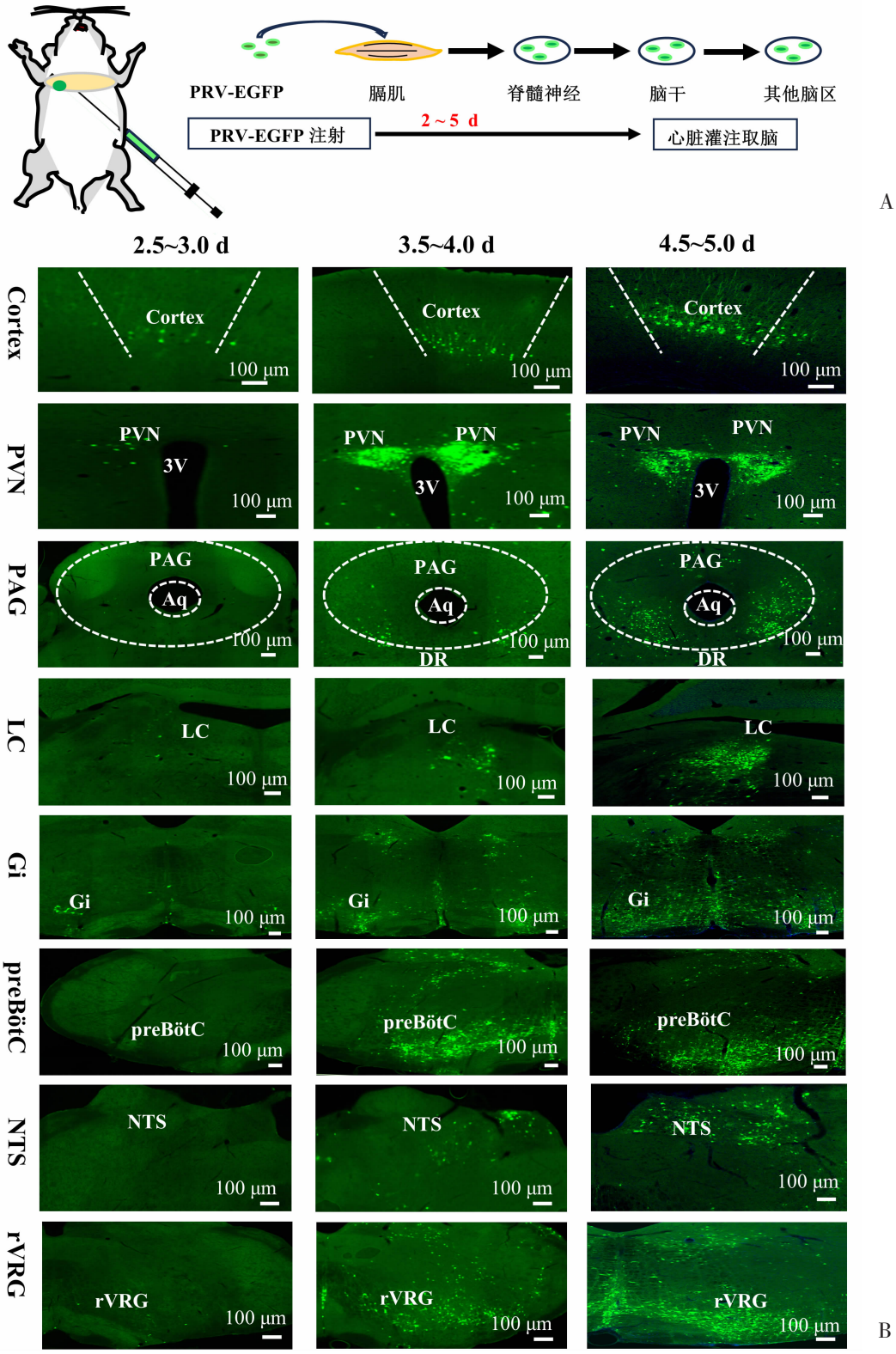
2.1 PRV 从外周到中枢的逆行示踪结果

为了追踪脊髓呼吸膈运动神经元上游脑区的呼吸相关核团。将 PRV-EGFP 病毒注入小鼠右侧膈肌,并在 PRV 注射后的不同时间段采集脑组织标本(图 1A)。结果发现病毒感染 2.5~3.0 d 后,脑内仅在大脑皮层[主要是初级运动皮层(primary motor cortex,M1)区域]、PVN、preBötC、嘴端腹侧呼吸组(rostral ventral respiratory group, rVRG)以及网状核(gigantocellular reticular nucleus, Gi)等区域发现少量 PRV-EGFP 阳性神经元。PRV-EGFP 注射 3.5~4.0 d 后,在大脑皮层(主要是 M1 区域)、PVN、蓝斑(locus coeruleus,LC)、中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray,PAG)、Gi、preBötC、rVRG、NTS 等区域均发现 PRV-EGFP 阳性神经元。PRV-EGFP 注射 4.5~5.0 d 后,在与 3.5~4.0 d 的相同区域,发现了更多的 PRV-EGFP 阳性神经元(图 1B)。同时病毒注射 4.5~5.0 d 后,大多数小鼠均出现肢体颤动、咬尾等神经中毒表现。病毒注射超过 5 d 后,大多数小鼠会因 PRV 引起的毒性反应而死亡。

利用 PRV-EGFP 从脊髓呼吸膈运动神经元逆行示踪,对注射病毒 4.5~5.0 d 后的小鼠脑片行全脑扫描,发现脊髓呼吸膈运动神经元上游呼吸相关核团大多数位于延髓,包括 preBötC、rVRG、包钦格复合体(Bötzinger complex,BötC)、NTS 等,部分位于脑桥(如 LC)、中脑(如 PAG)以及小脑[如前庭核(vestibularnuclei,Ve)等],另一部分则位于下丘脑[如:PVN、外侧下丘脑(lateral hypothalamic, LH)等]、杏仁核(central amygdala, CeA)、皮层等区域(图 2)。

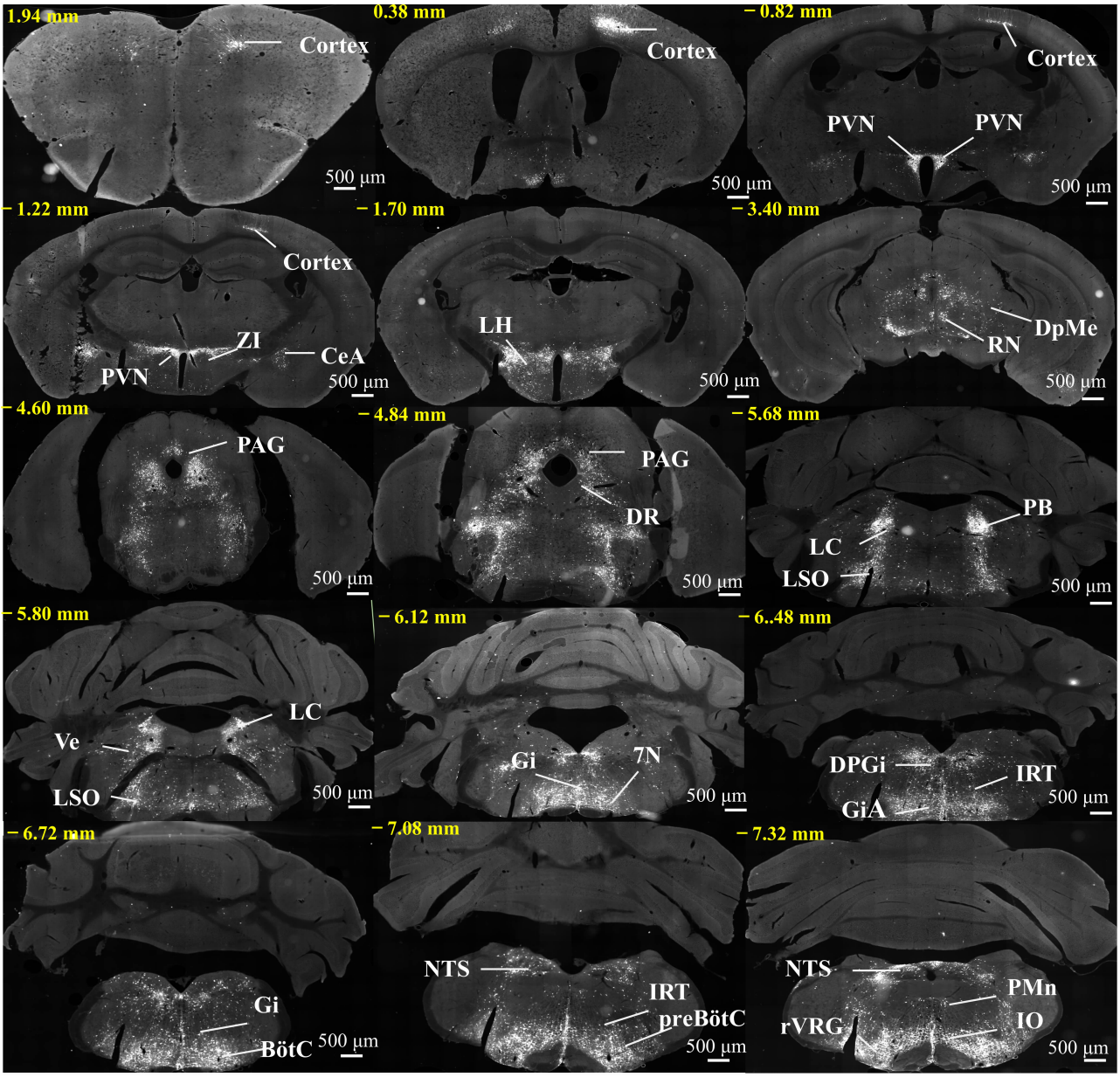
为了统计脑内主要呼吸相关核团中 PRV-EGFP 阳性神经元的数量,选取了皮层、PVN、LH 等 14 个核团进行人工计数。同时为了更详细地显示被 PRV-EGFP 标记的神经元,选择以下主要核团的冠状图像进行共聚焦拍摄,包括:皮层、外侧隔核(lateral septal nucleus,LS)、CeA、PVN、LH、PAG、LC、未确定带(zona incerta,ZI)、Ve、Gi、NTS、preBötC 等(图 3A)。

本研究统计分析了脑内几个主要呼吸相关核团中被 PRV-EGFP 标记的神经元数量在整个大脑被标记的神经元总数量的比例。结果显示:延髓区域占比最高,其中 NTS 占(8.387±1.965)%,rVRG 占(4.193±0.263)%,BötC 占(3.263±0.851)%,preBötC 占(3.970±0.252)%,Gi 占(18.850±3.271)%。其次为下丘脑,其中 PVN 占(12.790±0.595)%,LH 占(4.753±0.568)%,ZI 占(3.493±0.751)%。中脑:PAG 占(11.680±2.799)%。脑桥:LC 占(4.960±1.187)%。小脑:Ve 占(2.003±0.407)%。皮层占(4.300±1.524)%。CeA 占(4.957±1.528)%。LS 占(0.430±0.130)%。各脑区 PRV-EGFP 阳性神经元占比的差异有统计学意义(F=12.08,P<0.000 1,图 3B)。上述被 PRV-EGFP 标记的核团与脊髓呼吸膈运动神经元都有直接或间接的投射关系。根据 PRV 逆行示踪及全脑扫描和共聚焦拍片的结果,初步绘制小鼠全脑呼吸相关核团分布图(图 4)。



A:小鼠膈肌注入 PRV-EGFP,经病毒感染 2~5 d 后经心脏灌注取脑示意图;B:膈肌注入 PRV-EGFP 后不同时间点各呼吸相关脑区 PRV-EGFP 阳性神经元分布情况 Cortex:皮层;PVN:下丘脑室旁核;3V:第三脑室;PAG:中脑导水管周围灰质;Aq:中脑导水管;DR:中缝背核;LC:蓝斑;Gi:网状核区域;NTS:孤束核;preBötC:前包饮格复合体;rVRG:嘴端腹侧呼吸组

图 1 PRV-EGFP 注入后不同时间点 PRV-EGFP 阳性神经元在各脑区的差异



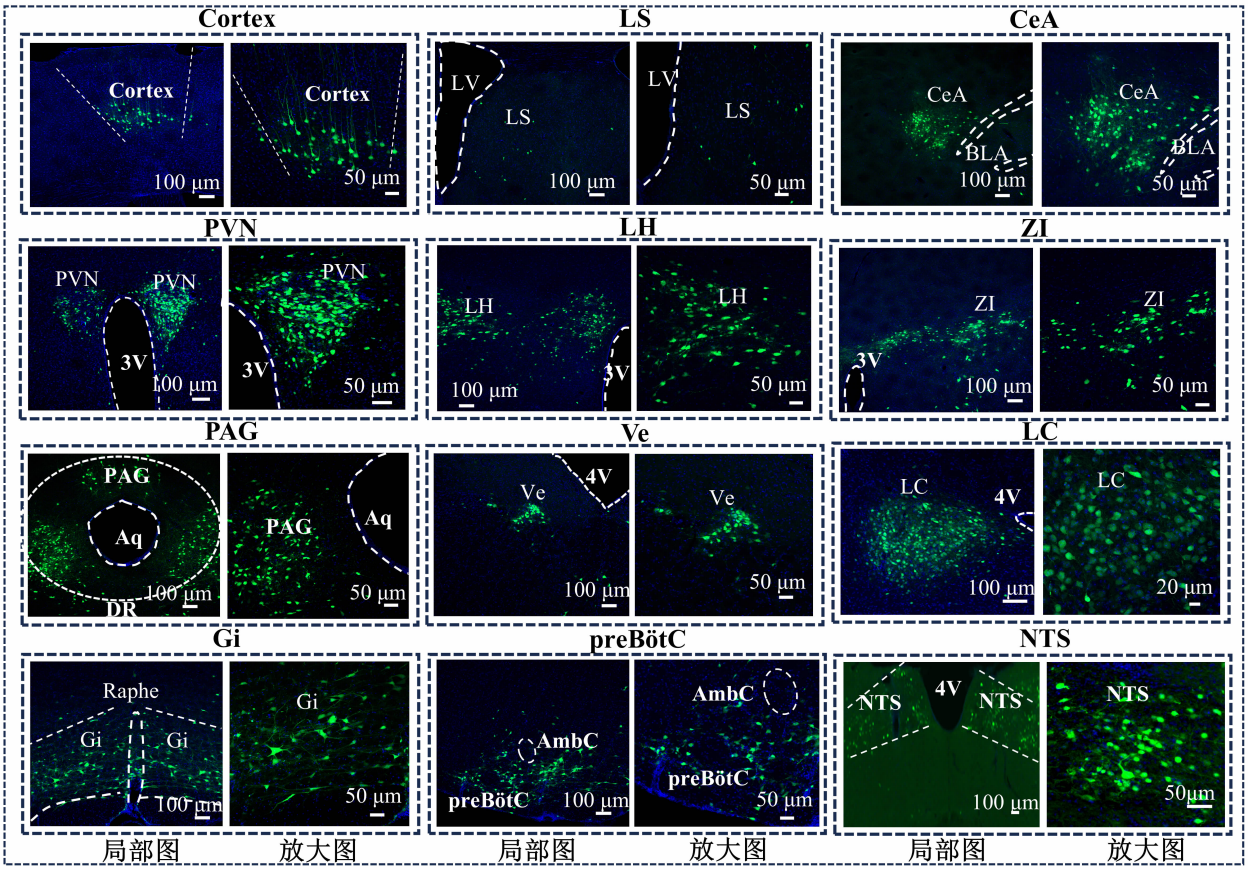
根据小鼠脑图谱标记各区域,图中左上角的黄色数字代表各区域所在深度 Cortex:皮层;PVN:下丘脑室旁核;ZI:未确定带;CeA:中央杏仁核;LH:外侧下丘脑;RN:红核;DpMe:中脑深部核;PB:臂旁核;LC:蓝斑;Ve:前庭核;LSO:外侧上橄榄核;7N:面神经核;DPGi:背侧旁巨细胞核;Gi:网状核;IRT:中间网状核;GiA:巨细胞网状核;PMn:旁正中网状核;IO:下橄榄核;PAG:中脑导水管周围灰质;DR:中缝背核;NTS:孤束核;preBötC:前包钦格复合体;BötC:包钦格复合体;rVRG:嘴端腹侧呼吸组

图 2 PRV-EGFP 注入后全脑 PRV-EGFP 阳性神经元分布图

2.2 PVN-preBötC 环路及二者之间直接投射

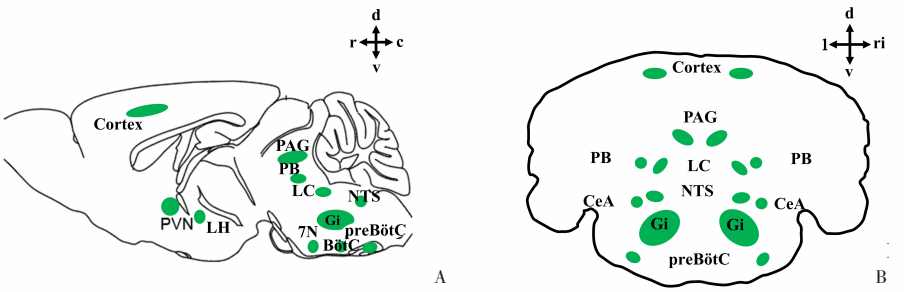
为了明确 PVN 与 preBötC 有无直接突触联系,在 PVN 定位注射 AAV2/9-EGFP(顺行不跨突触病毒),待小鼠病毒感染 4 周后,在 preBötC 脑区观察到了绿色的神经纤维(图 5)。

为了进一步验证 PVN 与 preBötC 之间直接突触联系,利用 Cre/loxP 系统与不跨突触病毒相结合,在小鼠 preBötC 注射 Retro-Cre,在 PVN 注射 Dio-EGFP,从而限定 PVN-preBötC 环路,结果在 PVN 脑区找到绿色神经元胞体(图 6)。且胞体大多集中在 PVN 的腹侧区域即 PVNmpv 区域,这里包含了大部分下行的自主神经前神经元(图 6C)。



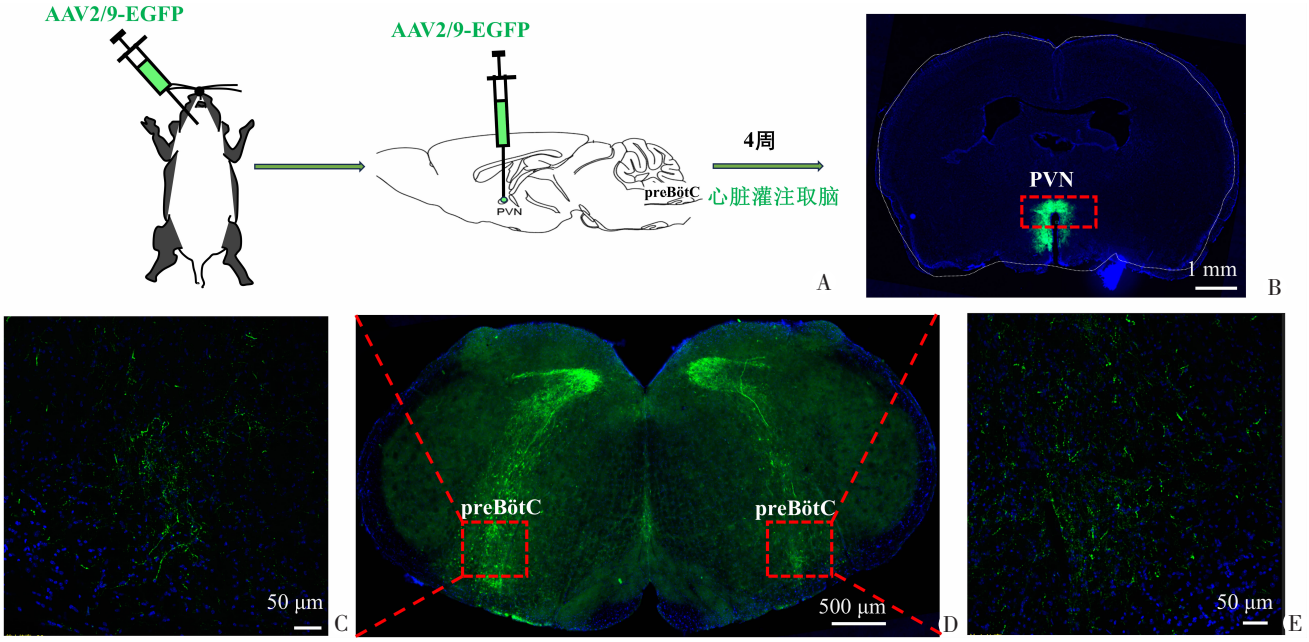
A:PRV-EGFP 注入 5 d 后各脑区 PRV-EGFP 阳性神经元局部图;B:各主要脑区被 PRV-EGFP 标记的阳性神经元占比情况($n=3$, $\bar{x}\pm s$) Cortex:皮层;LV:侧脑室;LS:外侧隔核;CeA :中央杏仁核;BLA:基底外侧杏仁核;PVN:下丘脑室旁核;3V:第三脑室;LH:外侧下丘脑;ZI:未确定带; PAG:中脑导水管周围灰质;Aq:中脑导水管; LC:蓝斑;4V:第四脑室;Ve:前庭核;Raphe:中缝;preBötC:前包钦格复合体; Gi:网状核; DR:中缝背核; AmbC:疑核;NTS:孤束核

图 3 PRV-EGFP 注入后部分脑区 PRV-EGFP 标记的阳性神经元分布图及各脑区阳性神经元占比



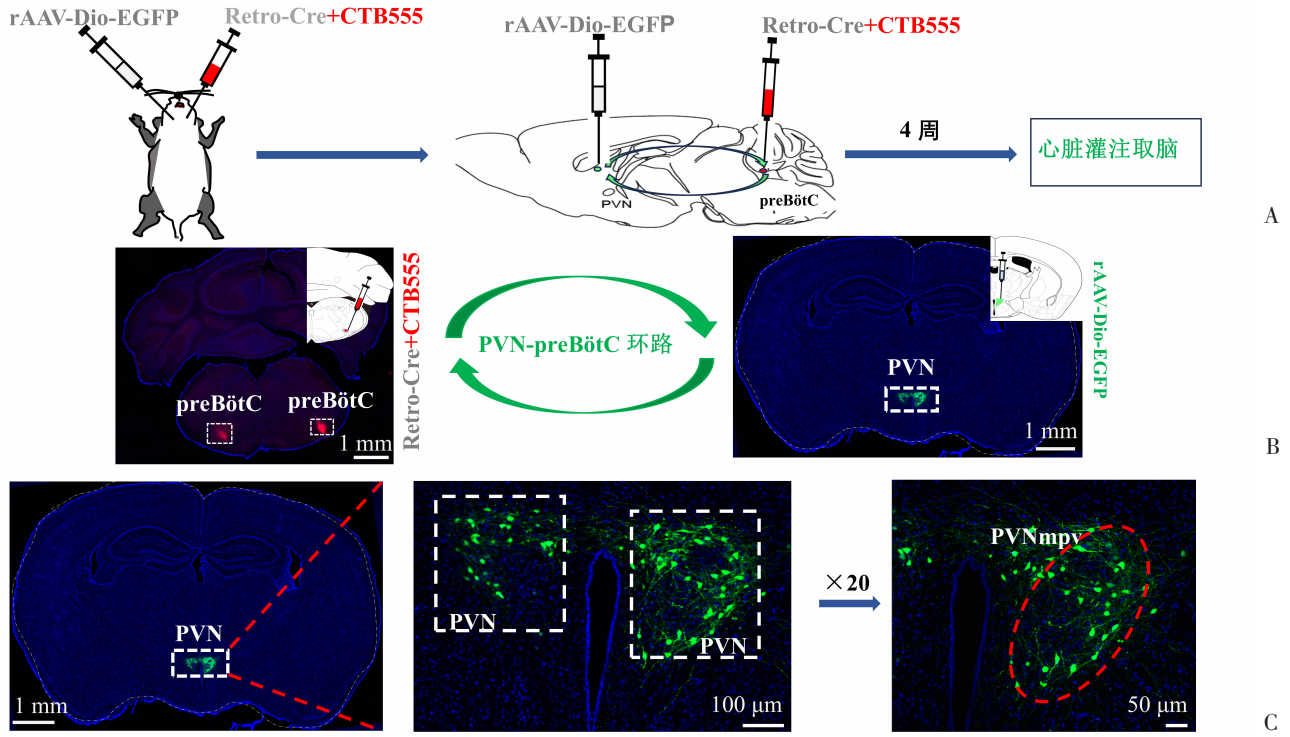
A:矢状位主要脑呼吸相关核团分布示意图;B:冠状位主要脑呼吸相关核团分布示意图 Cortex:皮层;PVN:下丘脑室旁核;CeA:中央杏仁核;LH:外侧下丘脑; PB:臂旁核;7N:面神经核;Gi:网状核;PAG:中脑导水管周围灰质; LC:蓝斑;NTS:孤束核;preBötC:前包钦格复合体; BötC:包钦格复合体;坐标:d、v 代表上、下,l、ri 代表冠状面的左右,r、c 代表嘴侧(即头部前端)、尾侧

图 4 小鼠全脑主要呼吸相关核团分布区



A:小鼠 PVN 注入顺行不跨突触病毒 AAV2/9-EGFP 经病毒感染 4 周后经心脏灌注取脑示意图;B:显微镜拍照验证 PVN 注射部位的正确性;C~E:分别为病毒感染后,在 preBötC 脑区找到从 PVN 投射到 preBötC 的神经纤维的左侧局部放大图、整体图和右侧局部放大图　绿色:示 EGFP;蓝色:示 DAPI

图 5　小鼠 PVN 与 preBötC 的直接投射关系



A:小鼠双侧 preBötC 注射 Retro-Cre+CTB555,PVN 注射 rAAV-Dio-EGFP 病毒,经病毒感染 4 周后经心脏灌注取脑示意图;B:验证双侧 preBötC 及 PVN 的注射位点,通过 PVN-preBötC 环路在 PVN 注射的 rAAV-Dio-EGFP 病毒显色;C:双侧 PVN 脑区 rAAV-Dio-EGFP 病毒感染后,神经元局部放大,在 PVNmpv 区域可见清晰的绿色神经元胞体　绿色:示 EGFP;蓝色:示 DAPI

图 6　小鼠 PVN-preBötC 环路及二者之间投射关系

3 讨论

人类呼吸运动的维持是在脑干呼吸中枢呼吸模式和节律的产生以及脑桥呼吸调节中枢和高位脑呼吸相关脑区等呼吸神经网络的协同作用下完成的[3, 38]。因此研究整个呼吸中枢神经网络的解剖结构分布、潜在回路、神经及生理机制等对呼吸障碍相关性疾病的靶向诊治至关重要。本研究基于 PRV 的神经示踪技术,Cre/loxP 系统以及多种显微成像技术,全面解析了小鼠全脑呼吸相关核团的空间分布,同时验证了 PVN-preBötC 环路以及二者之间直接投射关系。

3.1 绘制全脑呼吸相关核团空间分布,PVN 是脊髓呼吸膈运动神经元重要的上游输入核团

PRV 属于疱疹病毒科,具有逆向跨多级突触连接的特性。将其注入外周组织后,可依次感染与该组织相连接的上游神经结构,包括周围神经、脊髓及大脑区域相关脑区。PRV 不感染人及灵长类动物,是目前解析啮齿类动物神经环路研究的重要工具[39]。由于 PRV 是通过逆向感染神经传导通路内的神经元[40],因此所观测到的 PRV 阳性神经元是分布在脊髓呼吸膈运动神经元下行神经传导通路中,这些神经元与膈运动神经元有直接或间接的突触联系。在之前的实验中,课题组根据脊髓区域 PRV-EGFP 阳性神经元的分布,绘制了全脊髓呼吸相关核团图谱。故此次研究主要针对全脑呼吸相关核团的描述。本研究结果显示:PRV-EGFP 病毒注入小鼠膈肌后感染的时间长短不同,脑中 PRV-EGFP 阳性神经元分布脑区出现的时间先后及感染神经元数量的多少亦有所不同。PRV-EGFP 病毒似乎更先到达皮层(主要是 M1 区)、PVN、preBötC 等核团。但 PRV 在中枢内的传播速度以及跨突触传播的级数是根据 PRV 的生活周期推测的,故想要明确哪个核团是脊髓呼吸膈运动神经元的直接上一级脑区,则需利用不跨突触或跨单突触传播的病毒示踪进一步验证[39]。但是从上述实验结果可以看出除延髓区域外,皮层和 PVN 似乎是与脊髓呼吸膈运动神经元联系相对更紧密的核团。

PRV-EGFP 注射 4.5~5.0 d 后在全脑范围内标记 PRV-EGFP 阳性神经元。这些被标记的核团均是“经典”的呼吸相关核团,且与脊髓呼吸膈运动神经元之间存在直接或间接突触联系。研究认为呼吸起源于脑干的中央模式发生器(central pattern generator,CPG),包括 preBötC、BötC 以及腹侧呼吸组(ventral respiratory group,VRG)等[1],其中 preBötC 被一致认为可能与呼吸节律起源密切相关[14]。位于延髓背侧的 NTS,是心肺感受器传入神经冲动在中枢整合的重要部位[41-47],脑桥的臂旁核、LC 等与呼吸模式的调节以及吸气/呼气相的转换等有关[48-49]。FAULL 等[50] 和 MCGOVERN 等[51]报道 PAG 在呼吸障碍调控中发挥重要作用。除此之外,也有研究发现小鼠的大脑皮层、上丘、CeA、下丘脑等脑区会发送投射至 preBötC 神经元[4, 52]。这些投射可能参与呼吸调控的潜在通路[8, 53-54]。从各脑区被标记的 PRV-EGFP 阳性神经元所占的比例来看,除延髓区域以外,下丘脑区域,特别是 PVN 脑区所占比例最高。可见 PVN 在呼吸中枢神经网络中的重要性。

3.2 PVN-preBötC 环路存在且二者之间有直接投射关系

下丘脑是间脑腹侧的灰质,调节各种自主脑功能。并且有研究报道,下丘脑与呼吸调控密切相关[16-21]。其中 PVN 是下丘脑参与呼吸控制的主要核团。PVN 包含大量神经元,其中包括与心肺功能调节相关的催产素神经元、加压素神经元以及去甲肾上腺素神经元等[23, 55-56],近年来通过神经示踪技术,描述了 PVN 传出纤维投射到达神经元群的多样性,每一组在控制呼吸网络中的位置和功能不同,这些结构包括位于脑桥、延髓、脊髓以及包含驱动呼吸肌的运动神经元[23-26, 57]。但并没有直接证据证明 PVN 与这些神经元之间是否存在直接突触联系,这一漏洞一直被用来质疑 PVN 在呼吸中枢神经网络调控中的作用。

preBötC 神经元是 CPG 的核心[1]。本研究利用不跨突触示踪技术,在 PVN 注射 AAV2/9-EGFP 病毒。不跨突触病毒不能多级传导,只能靶定上下一级脑区。待病毒感染后在 preBötC 脑区找到了绿色的神经纤维,说明 PVN 是 preBötC 的直接上一级输入核团。由于 DIO 元件的病毒只有在 Cre 动物模型中才会表达,故本研究运用 Cre/loxP 系统和 AAV 血清型(如 rAAV2/9 或 rAAV2/retro 等)相结合,以实现对神经环路标记和功能特异性研究的目的。在 PVN 注射 Dio-EGFP,在 preBötC 注射 Retro-Cre 病毒,从而限定了 PVN-preBötC 环路,待病毒感染后,在 PVN 脑区找到绿色神经元胞体,证明了 PVN-preBötC 环路的存在。由于病毒不跨突触传播,亦可证明二者之间有直接突触联系,更加验证了 PVN 在呼吸中枢神经网络中至关重要的解剖学位置。然而这些结果只能证明 PVN 具备了参与呼吸调控的有利“地理位置”和与脑干联系的直接“通路”。它有可能通过 PVN-preBötC 环路的直接投射调控呼吸。但 PVN 在呼吸调控中的具体作用机制目前我们仍不能确定,还需在后期 PVN 对呼吸调控的功能研究中进一步验证。众所周知,PVN 包含大量神经元,且与多个呼吸相关核团有投射关系,在不

同压力源的作用下,PVN 中代表不同递质类型的神经元会受到不同的动员,从而启动与不同呼吸运动调控脑区的投射联系。而 PVN 与其他呼吸核团之间是否也存在特定的神经环路联系以及各种投射环路之间是如何协调的,还有待进一步的实验来验证。

综上,呼吸是维持人类生命活动的重要生理过程。呼吸障碍相关性疾病严重降低人类的生活质量,亟需找到新的诊治突破口。本研究利用神经示踪技术,描绘了呼吸中枢神经网络全脑主要呼吸相关核团空间分布图,并通过 Cre/loxp 系统和不跨突触示踪技术相结合,验证了 PVN-preBötC 环路以及二者之间的直接投射关系,证实了 PVN 在呼吸中枢神经网络中的重要位置。且 PVN 有可能通过 PVN-preBötC 环路的直接投射调控呼吸。为下一步 PVN 对呼吸调节机制的研究提供解剖学依据,同时也为呼吸障碍性疾病从中枢层面的靶向治疗提供了新的思路。

参考文献:

[1] DEL NEGRO C A, FUNK G D, FELDMAN J L. Breathing matters [J]. Nat Rev Neurosci, 2018, 19(6): 351-367. DOI:10.1038/s41583-018-0003-6.

[2] SHI Y, STORNETTA D S, REKLOW R J, *et al*. A brainstem peptide system activated at birth protects postnatal breathing [J]. Nature, 2021, 589(7842): 426-430. DOI: 10.1038/s41586-020-2991-4.

[3] GARCIA A J, 3RD, ZANELLA S, KOCH H, *et al*. Chapter 3--networks within networks: the neuronal control of breathing [J]. Prog Brain Res, 2011, 188: 31-50. DOI:10.1016/b978-0-444-53825-3.00008-5.

[4] SCHOTTELKOTTE K M, CRONE S A. Forebrain control of breathing: Anatomy and potential functions [J]. Front Neurol, 2022, 13: 1041887. DOI: 10.3389/fneur.2022.1041887.

[5] DEMPSEY J A, SMITH C A. Pathophysiology of human ventilatory control [J]. Eur Respir J, 2014, 44(2): 495-512. DOI:10.1183/09031936.00048514.

[6] DOBBINS E G, FELDMAN J L. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat [J]. J Comp Neurol, 1994, 347(1): 64-86. DOI: 10.1002/cne.903470106.

[7] ONAI T, MIURA M. Projections of supraspinal structures to the phrenic motor nucleus in cats studied by a horseradish peroxidase microinjection method [J]. J Auton Nerv Syst, 1986, 16(1): 61-77. DOI:10.1016/0165-1838(86)90051-2.

[8] GAYTAN S P, PASARO R, COULON P, *et al*. Identification of central nervous system neurons innervating the respiratory muscles of the mouse: a transneuronal tracing study [J]. Brain Res Bull, 2002, 57(3-4): 335-339. DOI:10.1016/s0361-9230(01)00674-8.

[9] SIECK G C, MANTILLA C B. Effect of mechanical ventilation on the diaphragm [J]. N Engl J Med, 2008, 358(13): 1392-1394. DOI:10.1056/NEJMe0801226.

[10] YEGEN C H, MARCHANT D, BERNAUDIN J F, *et al*. Chronic pulmonary fibrosis alters the functioning of the respiratory neural network [J]. Front Physiol, 2023, 14: 1205924. DOI:10.3389/fphys.2023.1205924.

[11] GUYENET P G, STORNETTA R L, SOUZA G, *et al*. The retrotrapezoid nucleus: central chemoreceptor and regulator of breathing automaticity [J]. Trends Neurosci, 2019, 42(11): 807-824. DOI:10.1016/j.tins.2019.09.002.

[12] JENSEN V N, ALILAIN W J, CRONE S A. Role of propriospinal neurons in control of respiratory muscles and recovery of breathing following injury [J]. Front Syst Neurosci, 2019, 13: 84. DOI: 10.3389/fnsys.2019.00084.

[13] ZHANG J, LUO F, REN S, *et al*. Spinal cord mapping of respiratory intercostal motoneurons in adult mice [J]. Neurosci Bull, 2022, 38(12): 1588-1592. DOI:10.1007/s12264-022-00883-0.

[14] 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(5032): 726-729. DOI:10.1126/science.1683005.

[15] BERGER A J, MITCHELL R A, SEVERINGHAUS J W. Regulation of respiration: (second of three parts) [J]. N Engl J Med, 1977, 297(3): 138-143. DOI: 10.1056/nejm197707212970305.

[16] SAPER C B, SCAMMELL T E, LU J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms [J]. Nature, 2005, 437(7063): 1257-1263. DOI:10.1038/nature04284.

[17] NAKAMURA K. Central circuitries for body temperature regulation and fever [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 301(5): R1207-1228. DOI: 10.1152/ajpregu.00109.2011.

[18] DAMPNEY R A. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives [J]. Adv Physiol Educ, 2016, 40(3): 283-296. DOI:10.1152/advan.00027.2016.

[19] SCHLENKER E H. Integration in the PVN: another piece of the puzzle [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 289(3): R653-655. DOI:10.1152/ajpregu.00386.2005.

[20] TENNEY S M, OU L C. Ventilatory response of decorticate and decerebrate cats to hypoxia and CO_2 [J]. Respir Physiol, 1977, 29(1): 81-92. DOI:10.1016/0034-5687(77)90119-0.

[21] VOITURON N, FRUGIèRE A, GROS F, *et al*.

Diencephalic and mesencephalic influences on ponto-medullary respiratory control in normoxic and hypoxic conditions: an in vitro study on central nervous system preparations from newborn rat [J]. Neuroscience, 2005, 132(3): 843-854. DOI:10.1016/j.neuroscience.2004.12.011.

[22] FUKUSHI I, YOKOTA S, OKADA Y. The role of the hypothalamus in modulation of respiration [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2019, 265: 172-179. DOI:10.1016/j.resp.2018.07.003.

[23] GEERLING J C, SHIN J W, CHIMENTI P C, *et al*. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem [J]. J Comp Neurol, 2010, 518(9): 1460-1499. DOI:10.1002/cne.22283.

[24] ZHENG J Q, SEKI M, HAYAKAWA T, *et al*. Descending projections from the paraventricular hypothalamic nucleus to the spinal cord: anterograde tracing study in the rat [J]. Okajimas Folia Anat Jpn, 1995, 72(2-3): 119-135. DOI:10.2535/ofaj1936.72.2-3_119.

[25] YEH E R, EROKWU B, LAMANNA J C, *et al*. The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat [J]. Neurosci Lett, 1997, 232(2): 63-66. DOI:10.1016/s0304-3940(97)00579-x.

[26] SCHLENKER E, BARNES L, HANSEN S, *et al*. Cardiorespiratory and metabolic responses to injection of bicuculline into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats [J]. Brain Res, 2001, 895(1-2): 33-40. DOI:10.1016/s0006-8993(01)02011-x.

[27] KC P, HAXHIU M A, TOLENTINO-SILVA F P, *et al*. Paraventricular vasopressin-containing neurons project to brain stem and spinal cord respiratory-related sites [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2002, 133(1-2): 75-88. DOI:10.1016/s1569-9048(02)00131-3.

[28] MACK S O, KC P, WU M, *et al*. Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing [J]. J Appl Physiol (1985), 2002, 92(2): 826-834. DOI:10.1152/japplphysiol.00839.2001.

[29] RUYLE B C, KLUTHO P J, BAINES C P, *et al*. Hypoxia activates a neuropeptidergic pathway from the paraventricular nucleus of the hypothalamus to the nucleus tractus solitarii [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2018, 315(6): R1167-r1182. DOI:10.1152/ajpregu.00244.2018.

[30] ABBOTT S B, DEPUY S D, NGUYEN T, *et al*. Selective optogenetic activation of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons produces cardiorespiratory stimulation in conscious mice [J]. J Neurosci, 2013, 33(7): 3164-3177. DOI:10.1523/jneurosci.1046-12.2013.

[31] KC P, KARIBI-IKIRIKO A, RUST C F, *et al*. Phenotypic traits of the hypothalamic PVN cells innervating airway-related vagal preganglionic neurons [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2006, 154(3): 319-330. DOI:10.1016/j.resp.2006.01.006.

[32] KING T L, RUYLE B C, KLINE D D, *et al*. Catecholaminergic neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus are essential for cardiorespiratory adjustments to hypoxia [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2015, 309(7): R721-731. DOI:10.1152/ajpregu.00540.2014.

[33] LIU Y, LI A, BAIR-MARSHALL C, *et al*. Oxytocin promotes prefrontal population activity via the PVN-PFC pathway to regulate pain [J]. Neuron, 2023, 111(11): 1795-1811.e7. DOI:10.1016/j.neuron.2023.03.014.

[34] RASIAH N P, LOEWEN S P, BAINS J S. Windows into stress: a glimpse at emerging roles for CRH(PVN) neurons [J]. Physiol Rev, 2023, 103(2): 1667-1691. DOI:10.1152/physrev.00056.2021.

[35] WEI B, CHENG G, BI Q, *et al*. Microglia in the hypothalamic paraventricular nucleus sense hemodynamic disturbance and promote sympathetic excitation in hypertension [J]. Immunity, 2024, DOI: 10.1016/j.immuni.2024.07.011.

[36] MONTANER M, DENOM J, SIMON V, *et al*. A neuronal circuit driven by GLP-1 in the olfactory bulb regulates insulin secretion [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 6941. DOI:10.1038/s41467-024-51076-4.

[37] BIAG J, HUANG Y, GOU L, *et al*. Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing [J]. J Comp Neurol, 2012, 520(1): 6-33. DOI:10.1002/cne.22698.

[38] FOGARTY M J, MANTILLA C B, SIECK G C. Breathing: Motor control of diaphragm muscle [J]. Physiology (Bethesda), 2018, 33(2): 113-26. DOI: 10.1152/physiol.00002.2018.

[39] REN S, WANG Y, YUE F, *et al*. The paraventricular thalamus is a critical thalamic area for wakefulness [J]. Science, 2018, 362(6413): 429-434. DOI: 10.1126/science.aat2512.

[40] CANO G, SVED A F, RINAMAN L, *et al*. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing [J]. J Comp Neurol, 2001, 439(1): 1-18. DOI:10.1002/cne.1331.

[41] FU C, SHI L, WEI Z, *et al*. Activation of Phox2b-expressing neurons in the nucleus tractus solitarii drives breathing in mice [J]. J Neurosci, 2019, 39(15): 2837-2846. DOI:10.1523/jneurosci.2048-18.2018.

[42] KANBAR R, STORNETTA R L, CASH D R, *et al*. Photostimulation of Phox2b medullary neurons activates cardiorespiratory function in conscious rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(9): 1184-1194. DOI: 10.1164/rccm.201001-0047OC.

[43] YU H, SHI L, CHEN J, *et al*. A neural circuit mechanism controlling breathing by leptin in the nucleus tractus solitarii [J]. Neurosci Bull, 2022, 38(2): 149-165. DOI: 10.1007/s12264-021-00742-4.

[44] OSTROWSKI D, HEESCH C M, SKLINE D D, *et al*. Nucleus tractus solitarii is required for the development and maintenance of phrenic and sympathetic long-term facilitation after acute intermittent hypoxia [J]. Front Physiol, 2023, 14: 1120341. DOI:10.3389/fphys.2023.1120341.

[45] MARTINEZ D, LIMA-SILVEIRA L, MATOTT M P, *et al*. Gamma-aminobutyric acid transporters in the nucleus tractus solitarii regulate inhibitory and excitatory synaptic currents that influence cardiorespiratory function [J]. Front Physiol, 2021, 12: 821110. DOI:10.3389/fphys.2021.821110.

[46] ZOCCAL D B, FURUYA W I, BASSI M, *et al*. The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities [J]. Front Physiol, 2014, 5: 238. DOI:10.3389/fphys.2014.00238.

[47] GASPARINI S, HOWLAND J M, THATCHER A J, *et al*. Central afferents to the nucleus of the solitary tract in rats and mice [J]. J Comp Neurol, 2020, 528(16): 2708-2728. DOI:10.1002/cne.24927.

[48] YOKOTA S, OKA T, ASANO H, *et al*. Orexinergic fibers are in contact with Kölliker-Fuse nucleus neurons projecting to the respiration-related nuclei in the medulla oblongata and spinal cord of the rat [J]. Brain Res, 2016, 1648(Pt A): 512-523. DOI:10.1016/j.brainres.2016.08.020.

[49] ZUPERKU E J, STUCKE A G, KROLIKOWSKI J G, *et al*. Inputs to medullary respiratory neurons from a pontine subregion that controls breathing frequency [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2019, 265: 127-140. DOI:10.1016/j.resp.2018.06.011.

[50] FAULL O K, SUBRAMANIAN H H, EZRA M, *et al*. The midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 98: 135-144. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.12.020.

[51] MCGOVERN A E, AJAYI I E, FARRELL M J, *et al*. A neuroanatomical framework for the central modulation of respiratory sensory processing and cough by the periaqueductal grey [J]. J Thorac Dis, 2017, 9(10): 4098-4107. DOI:10.21037/jtd.2017.08.119.

[52] TREVIZAN-BAU P, DHINGRA R R, FURUYA W I, *et al*. Forebrain projection neurons target functionally diverse respiratory control areas in the midbrain, pons, and medulla oblongata [J]. J Comp Neurol, 2021, 529(9): 2243-2264. DOI:10.1002/cne.25091.

[53] LOIS J H, RICE C D, YATES B J. Neural circuits controlling diaphragm function in the cat revealed by transneuronal tracing [J]. J Appl Physiol (1985), 2009, 106(1): 138-152. DOI: 10.1152/japplphysiol.91125.2008.

[54] YANG C F, KIM E J, CALLAWAY E M, *et al*. Monosynaptic projections to excitatory and inhibitory preBötzinger complex neurons [J]. Front Neuroanat, 2020, 14: 58. DOI:10.3389/fnana.2020.00058.

[55] PROCZKA M, PRZYBYLSKI J, CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA A, *et al*. Vasopressin and breathing: Review of evidence for respiratory effects of the antidiuretic hormone [J]. Front Physiol, 2021, 12: 744177. DOI:10.3389/fphys.2021.744177.

[56] ZERA T, PRZYBYLSKI J, GRYGOROWICZ T, *et al*. Vasopressin V1a receptors are present in the carotid body and contribute to the control of breathing in male Sprague-Dawley rats [J]. Peptides, 2018, 102: 68-74. DOI:10.1016/j.peptides.2018.03.004.

[57] KC P, HAXHIU M A, TROUTH C O, *et al*. CO(2)-induced c-Fos expression in hypothalamic vasopressin containing neurons [J]. Respir Physiol, 2002, 129(3): 289-296. DOI:10.1016/s0034-5687(01)00321-8.

(收稿:2024-08-21;修回:2024-08-31).

(编辑 严 涵)