

正中神经电刺激对脑外伤后昏迷大鼠 γ -氨基丁酸b受体表达变化的影响*

魏天祺¹ 冯 珍^{1,2}

摘要

目的:研究正中神经电刺激(median nerve electrical stimulation, MNES)对脑外伤昏迷大鼠前额叶皮质 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid b receptor, GABA)b受体表达的影响及促醒可能机制。

方法:将SD大鼠分为空白对照组、假刺激组、MNES组、GABA b受体激动剂巴氯芬组,应用MNES治疗脑外伤后昏迷大鼠,观察其行为学变化,实验完成后6h、12h、24h每组每个时间点各处死10只大鼠,用蛋白质印迹技术检测前额叶皮质GABA b受体的表达。

结果:大鼠经“自由落体撞击法”造模后出现与临床昏迷状态相似的行为学变化,经MNES后表现出短暂的行为觉醒反应。空白对照组意识状态全部为I级,假刺激组平均为(5.33±0.758)级,刺激组平均为(3.80±1.064)级,巴氯芬组平均为(4.63±0.964)级,4组的意识状态分级呈“空<刺<巴<假”递增趋势,组间两两比较差异有显著性意义($P<0.05$)。Western blot结果显示同一组3个时间点的前额叶皮质GABA b受体表达呈“6h<12h<24h”趋势,空白对照组及刺激组3个时间点间差异无显著性意义($P>0.05$),假刺激组及巴氯芬组3个时间点间差异有显著性意义($P<0.05$)。而同一时间点4组的GABA b受体表达呈“刺<空<巴<假”递增趋势,6h、12h、24h空白对照组与刺激组比较差异无显著性意义($P>0.05$),其余同一时间点4组间两两比较差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:正中神经电刺激后大鼠出现短暂的兴奋性反应,意识状态等级提高,正中神经电刺激是治疗脑外伤后昏迷的有效治疗方法,其机制可能与降低前额叶抑制性递质GABA b受体表达有关。

关键词 γ -氨基丁酸b受体;巴氯芬;正中神经电刺激;脑外伤;昏迷;促醒

中图分类号:R651.1, R454.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-01-0009-05

Effects of median nerve electrical stimulation on expression of γ -aminobutyric acid b receptor in prefrontal cortex of coma rats after traumatic brain injury/WEI Tianqi, FENG Zhen//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(1): 9—13

Abstract

Objective: To investigate the changes of γ -aminobutyric acid b receptor (GABA bR) expression in prefrontal cortex of coma rats models after traumatic brain injury with median nerve electrical stimulation (MNES), and to explore the effects and possible mechanisms of MNES in coma and wake.

Method: SD rats were divided into 4 groups: control group, sham-stimulation group, MNES group and baclofen group. MNES was applied to traumatic brain injury coma rats. Then, behaviors of rats were observed and the prefrontal cortices of each group were extracted at 6h, 12h, 24h after the experiment. Western-blot techniques were used to detect the expressions of GABA bR.

Result: Rats' "free-fall drop model" appeared behavioral changes similar to clinical coma, while after MNES, the comatose rats showed a transient behavioral arousal. The states of consciousness in control group all were

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.01.003

*基金项目:国家自然科学基金(81260295);江西省自然科学基金(20132BAB205063)

1 南昌大学第一附属医院康复医学科,江西,330006; 2 通讯作者

作者简介:魏天祺,女,硕士研究生; 收稿日期:2014-12-22

class I, in sham-stimulation group were class (5.33 ± 0.758), stimulation group were class (3.80 ± 1.064), baclofen group were class (4.63 ± 0.964). The consciousness grade for four groups was "control < stimulation < baclofen < sham-stimulation", there were statistical significances among the four groups ($P < 0.05$). Western-blot results showed that the expressions of GABA bR in prefrontal cortex in the same group at the three time points was "6h < 12h < 24h", there was no statistical significance at the three time points in control group and stimulation group ($P > 0.05$), while there were statistical significances at the three time points in sham-stimulation group and baclofen group ($P < 0.05$). In each time point the expressions of GABA bR in prefrontal cortex was "NMES < control < Baclofen < sham-stimulation", there was no statistical significance between control group and NMES group ($P > 0.05$), while at the same time point there were statistical significances among the comparisons of each 2 groups ($P < 0.05$).

Conclusion: The comatose rats showed a transient behavioral arousal and the class of consciousness states increased after MNES. The expression of GABA bR in prefrontal cortex of traumatic brain injury coma rats after MNES was down-regulated, which certified the arousal effect of MNES.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi, 330006

Key word γ -aminobutyric acid b receptor; baclofen; median nerve electrical stimulation; traumatic brain injury; coma; arousal

脑外伤后昏迷促醒一直是神经康复医学研究领域的热点和难点,既往常规治疗效果不明显。正中神经电刺激(median nerve electrical stimulation, MNES)对脑外伤昏迷患者有一定的效果^[1-3],其机制与影响神经递质的分泌有关^[4-5],而 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统内最主要的一种抑制性神经递质,研究表明内源性GABA可以作用于GABA b受体参与觉醒及异相睡眠的调节^[6-7],由此我们推测,MNES促醒作用机制与GABA b受体可能存在着某种密切的联系,但目前却未见关于MNES昏迷促醒后GABA b受体水平变化的相关报道。本研究通过MNES治疗脑外伤后昏迷大鼠,观察其行为学变化并检测GABA b受体水平的变化,从而探讨MNES昏迷促醒作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验场所及材料

所有模型制作均在南昌大学第一附属医院康复医学科实验动物中心完成,Western-blot实验在南昌大学药理实验室完成。抗GABA b抗体(ab131417)由香港Abcam有限公司提供,抗 β -actin单克隆抗体(CW0096)、山羊抗大鼠IgG、山羊抗兔IgG、组织蛋白抽提试剂盒(CWB10)由北京康为世纪生物科技

有限公司提供,GABA b受体激动剂巴氯芬(baclofen)B5399-500MG由SIGMA公司提供,ZS-BS数显脑立体定位仪由北京众实迪科技发展有限公司提供。电刺激仪、低温高速离心机、电泳系统、转移系统、切片机分别使用ES-420、5804-R、Mini-PROTEAN 3、Mini Trans-Blot、RM2015。

1.2 实验动物及分组

选用成年SPF级健康SD大鼠,雌雄兼用,体重250—300g,动物房温度控制在23℃左右,自然光照下常规饲养,动物自由饮食、饮水,南昌大学动物实验科学部授权使用,实验过程中对动物的饲养及取材均遵守实验动物管理条例的规定。将120只大鼠纳入实验,采用随机数字表法平均分为4组:①空白对照组:无任何处理的健康大鼠;②假刺激组:脑外伤后昏迷大鼠;③刺激组:脑外伤后昏迷大鼠给予MNES;④GABA b受体激动剂巴氯芬组:脑外伤后昏迷大鼠经侧脑室注射给予巴氯芬后行MNES。

1.3 脑外伤昏迷动物模型的建立

本实验采用经典“自由落体撞击法”来构建动物模型^[8],乙醚吸入麻醉,将麻醉的大鼠俯卧于一块海绵垫上,头顶部备皮消毒,切开头顶部皮肤,钝性剥离骨膜,暴露顶骨,颅顶表面冠状缝与人字缝间用502胶固定一铁制圆盘(直径10mm,厚0.5mm),其底呈弯弧状,与颅顶相吻合。待SD大鼠恢复刺痛

反射,将直径为10mm的400g圆柱形撞击锤从40—44cm高度,沿垂直金属杆自由下落,撞击固定于颅骨上的铁质圆盘,致颅脑损伤,撞击后立即移开海绵垫以避免二次撞击,记录打击时间。0.5h后应用双盲法根据大鼠的感觉、运动功能,将大鼠意识状态分6级:Ⅰ级:在笼内活动如常;Ⅱ级:在笼内活动减少;Ⅲ级:在笼内活动减少并运动失调;Ⅳ级:当背部放在笼的底部时能滚动(翻正反射存在)但不能站立;Ⅴ级:翻正反射消失但对疼痛刺激有肢体回缩反应;Ⅵ级:对任何刺激无反应;其中Ⅴ级、Ⅵ级被认为是昏迷状态^[9]。本实验为随机对照实验、刺激组及巴氯芬组在实验完成后0.5h应用双盲法再次评定大鼠意识状态。

1.4 侧脑室注射GABA_b受体激动剂巴氯芬

10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔麻醉大鼠,使动物呈俯卧姿势,将大鼠头部固定于脑立体定位仪上,头顶皮肤剃毛,消毒,在头部正中做一长约0.5—1cm切口,剥离颅骨上附着的骨膜及肌肉,以棉球蘸少量生理盐水涂擦颅骨表面血迹,清楚暴露前凶点,并用墨水标记。以前凶点为0点寻找进针点,按照Paxinos & Watson大鼠脑图谱,侧脑室坐标为:前凶后1.0mm,中线旁开1.5mm,颅骨表面下4.5mm,墨水标记。用牙科钻将标记点钻开至硬脑膜,用针尖刺破硬脑膜,消毒棉签止血,干燥术野。将微量注射器垂直插入约4.5mm,1min内缓慢注射5μl巴氯芬(100mg/100ml,溶于蒸馏水),留针1min后拔出,缝合伤口。

1.5 MNES方法及参数设置

在大鼠右前肢内侧正中距腕关节5mm及15mm处插入2根毫针,齿状接头夹住毫针,接通刺激器。刺激参数:频率30Hz,脉宽0.5ms,电流1.0mA。刺激总时间为15min^[10]。实验完毕,返回笼中。假刺激组则按刺激组同样操作,但不给予刺激。

1.6 组织蛋白提取及检测

实验完成后的6h、12h、24h,每组每个时间点均处死10只,取大鼠前额叶皮质组织,应用Western-blot法测定4组GABA_b受体表达。

1.7 统计学分析

不同组别意识状态分级、不同组别和时间点的GABA_b受体表达以均值±标准差表示,采用SPSS

17.0统计软件进行方差齐性检验、单因素方差分析。

2 结果

2.1 意识状态观察

空白对照组、假刺激组、刺激组、巴氯芬组大鼠在实验完成后0.5h应用双盲法进行行为学评估,整个实验过程中共11只大鼠死亡,从资料中剔除。空白对照组30只大鼠中在笼内活动如常,意识状态全部为Ⅰ级。假刺激组大鼠造模后出现短暂的呼吸暂停(约5—10s)、眼球突出、胡须震颤,部分老鼠伴有四肢抽搐、尿失禁,随即安静进入昏迷状态。假刺激组30只大鼠中Ⅳ级5只,Ⅴ级10只,Ⅵ级15只,平均为(5.33±0.758)级。刺激组及巴氯芬组大鼠在行MNS后出现呼吸加速、睁眼、右前肢抽动、四肢回缩、滚动等相似的清醒反应,刺激组30只大鼠中Ⅲ级17只,Ⅳ级5只,Ⅴ级5只,Ⅵ级3只,平均为(3.80±1.064)级。巴氯芬组30只大鼠中Ⅲ级4只,Ⅳ级9只,Ⅴ级11只,Ⅵ级6只,平均为(4.63±0.964)级。4组的意识状态分级呈“空<刺<巴<假”递增趋势,组间两两比较差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.2 Western-blot测定

同一组内3个时间点的GABA_b受体表达为“6h<12h<24h”,空白对照组及刺激组3个时间点间差异无显著性意义($P>0.05$),假刺激组及巴氯芬组3个时间点间差异有显著性意义($P<0.05$)。而同一时间点4组的GABA_b受体表达呈“刺<空<巴<假”递增趋势,6h、12h、24h空白对照组与刺激组比较差异无显著性意义($P>0.05$),其余同一时间点4组间两两比较差异有显著性意义($P<0.05$)。见表1。

3 讨论

昏迷是指各种原因导致的高级神经中枢结构与功能活动受损所引起的严重意识障碍。目前认为其

表1 前额叶皮质GABA_b受体表达的组内及组间比较($\bar{x}\pm s$)

时间点	空白对照组	假刺激组	刺激组	巴氯芬组
6h	0.434±0.133	1.247±0.280 ^①	0.396±0.081	0.726±0.217 ^①
12h	0.485±0.211	1.800±0.119 ^①	0.459±0.150	1.188±0.327 ^①
24h	0.574±0.246	2.517±0.274 ^①	0.548±0.189	1.842±0.249 ^①

注:每个时间点每组例数为10。①组间比较 $P<0.05$

发病机制主要包括:①脑干上行网状激活系统受损;②神经递质的改变。临床研究表明脑外伤昏迷患者脑脊液中促进睡眠的神经递质分泌增加,主要是GABA的升高^[11]。目前对于昏迷状态的促醒治疗无疑是当今医学领域中一项具有挑战性的难题。周围神经电刺激疗法操作比较简单,不会给患者造成创伤,无并发症且费用低廉,在临床中应用较为广泛。MNES作为周围神经电刺激的一种,近年来国内外越来越多的研究报道了其治疗脑外伤昏迷患者的有效性^[12-14],其可能的机制主要有以下几点:①增加脑血流量;②增强脑电活动;③直接兴奋大脑皮质及脑干网状结构;④影响神经递质的分泌^[2,4-5]。而GABA是大脑中主要的抑制性神经递质,其广泛存在于大脑各区,神经生理学研究表明脑中不同部位的GABA神经元共同起到了促进睡眠的作用^[6]。GABA有两种类型的受体:一种是离子通道型受体,GABA_a受体和GABA_c受体,这两者都是氯离子通道受体;另外一种代谢型受体,GABA_b受体,GABA_b受体是G蛋白偶联受体。而GABA_b受体是由两个具有一定同源性的亚基GABA_{b1}(GB1)和GABA_{b2}(GB2)形成的异源二聚体,原位杂交与配体结合实验的结果显示GB1和GB2的mRNA广泛分布于啮齿类和人的中枢神经系统中^[15-16]。GABA_b受体涉及癫痫、焦虑、抑郁、伤害感、成瘾及睡眠^[17]。嗜睡大鼠新皮质及丘脑中GABA_b受体含量增加^[18-19]。GABA_b受体的缺失推迟了睡眠时间,减少了非快速动眼睡眠中delta和theta波的活动,增加觉醒时theta波的活动^[20]。而GABA_b受体激动剂巴氯芬可以通过激活GABA_b受体使K⁺通道开放,使含有GABA_b受体的激活系统神经元(例如蓝斑的去甲肾上腺素神经元)超极化从而增强慢波活动度,促进睡眠,并且降低外周肌肉紧张度^[21-22],故MNES促醒作用机制与GABA_b受体可能存在着某种密切的联系。但关于昏迷患者经MNES后GABA_b受体水平的变化,目前没有相关报道。

本实验中大鼠经“自由落体撞击法”造模后出现与临床昏迷状态相似的行为学变化,经MNES后表现出短暂的行为觉醒反应,空白对照组意识状态全部为I级,假刺激组平均为(5.33±0.758)级,刺激组平均为(3.80±1.064)级,巴氯芬组平均为(4.63±

0.964)级,4组的意识状态分级呈“空<刺<巴<假”递增趋势,组间两两比较差异有显著性意义($P<0.05$),表明MNES可以促进大鼠的行为觉醒。本实验中巴氯芬组与刺激组相比,意识等级更低证实了巴氯芬的促睡眠作用,与Orr等^[23]的研究相符。MNES对脑外伤昏迷大鼠具有促醒作用与韩震等^[24]研究结果相符,但其研究并未说明正中神经电刺激后昏迷大鼠神经递质的变化。

本实验中采用Western-blot技术检测脑外伤昏迷大鼠前额叶皮质中GABA_b受体表达,假刺激组3个时间点的GABA_b受体表达为“6h<12h<24h”且差异有显著性意义($P<0.05$),说明脑外伤昏迷24h内大鼠前额叶区GABA_b受体水平呈升高趋势,水涛等^[25]研究显示急性颅脑损伤轻、中、重型组患者伤后第一天脑脊液中GABA取样浓度均高于对照组,与本实验研究结果趋于一致,抑制性神经递质的反应性增高有拮抗兴奋性神经递质和保护神经细胞的作用。刺激组3个时间点的GABA_b受体表达为“6h<12h<24h”,表明MNES后GABA_b受体在24h内的呈升高趋势,但差异无显著性意义($P>0.05$),说明MNES后GABA_b受体随着时间的推移而增多,因此MNES后GABA_b受体在24h以后的变化有待进一步研究。同一时间点4组的GABA_b受体表达呈“刺<空<巴<假”递增趋势,3个时间点空白对照组与刺激组比较差异无显著性意义($P>0.05$),其余同一时间点4组间两两比较差异有显著性意义($P<0.05$),表明MNES后GABA_b受体表达低于假刺激组,且巴氯芬作为GABA_b受体激动剂,即使人为激活GABA_b受体,经MNES后GABA_b受体表达仍然低于假刺激组。因此,我们可以得出的初步结论是,MNES可降低脑外伤昏迷大鼠前额叶皮质GABA_b受体水平。

综上所述,本研究结果显示,MNES后大鼠出现短暂的兴奋性反应,意识状态等级提高,MNES可通过降低脑外伤后昏迷大鼠前额叶GABA_b受体表达水平达到促醒作用,初步探讨了MNES的有效性及其MNES昏迷促醒作用可能机制,为MNES治疗脑外伤后昏迷患者的相关治疗机制提供新的思路。然而,MNES后GABA_b受体在24h以后的变化及不同的刺激参数和治疗周期对脑外伤后昏迷大鼠促醒

治疗是否存在影响,尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Ambrosini E, Ferrante S, Pedrocchi A, et al. Cycling induced by electrical stimulation improves motor recovery in postacute hemiparetic patients: a randomized controlled trial [J]. *Stroke*, 2011, 42(4):1068—1073.
- [2] 黄强,戴伟民,揭园庆,等.重型颅脑损伤昏迷患者持续右正中神经刺激促进复苏的临床研究[J].*中国临床神经科学*,2011,19(3):314—320.
- [3] Gao GY, Bao YH, Liang YM, et al. Clinical efficacy of early right median nerve electrical stimulation for coma patients following craniocerebral trauma[J]. *Chinese Journal of Traumatology*, 2012, 28:200—204.
- [4] Cooper EB, Scherder EJ, Cooper JB. Electrical treatment of reduced consciousness: experience with coma and Alzheimer's disease[J]. *Neuropsychol Rehabil*, 2005, 15(3—4):389—405.
- [5] Liu JT, Wang CH, Chou IC, et al. Regaining consciousness for prolonged comatose patients with right median nerve stimulation[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2003, (87):11—14.
- [6] Pigeon WR, Caine ED. Insomnia and the risk for suicide: does sleep medicine have interventions that can make a difference?[J]. *Sleep Med*, 2010, 11(9):816—817.
- [7] Gmeiner F, Kołodziejczyk A, Yoshii T, et al. GABA(B) receptors play an essential role in maintaining sleep during the second half of the night in *Drosophila melanogaster*[J]. *J Exp Biol*, 2013, 216(20):3837—3843.
- [8] Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics[J]. *J Neurosurg*, 1994, 80(2):291—300.
- [9] Stephens JR, Levy RH. Effects of valproate and citrulline on ammonium-induced encephalopathy[J]. *Epilepsia*, 1994, 35(1):164—171.
- [10] Okazaki Y, Morimoto T, Sawai H. Parameters of optic nerve electrical stimulation affecting neuroprotection of axotomized retinal ganglion cells in adult rats[J]. *Neurosci Res*, 2008, 61(2):129—135.
- [11] Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, et al. Increased transmitter amino acid concentration in human ventricular CSF after brain trauma[J]. *Neuroreport*, 1994, 6(1):153—156.
- [12] Liu JT, Lee JK, Tyan YS, et al. Change in cerebral perfusion of patients with coma after treatment with right median nerve stimulation and hyperbaric oxygen[J]. *Neuromodulation*, 2008, 11(4):296—301.
- [13] Gao GY, Bao YH, Liang YM, et al. Right median nerve electrical stimulation improves the outcome of traumatic coma patients [J]. *Journal of Neurotrauma*, 2014, 31 (5):A43—A43.
- [14] 于洋,张琳瑛,同华.重型颅脑创伤早期康复治疗研究进展[J].*中国现代神经疾病杂志*,2014,14(6):548—551.
- [15] Wheatley M, Hawtin SR. Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role[J]. *Hum Reprod Update*, 1999, 5(4):356—364.
- [16] Liu X, He Q, Studholme DJ, et al. NCD3G: a novel nine-cysteine domain in family 3 GPCRs[J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(9):458—461.
- [17] Pinard A, Seddik R, Bettler B. GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity[J]. *Adv Pharmacol*, 2010, (58):231—255.
- [18] Lin FH, Cao Z, Hosford DA. Increased number of GABAB receptors in the lethargic (lh/lh) mouse model of absence epilepsy[J]. *Brain Res*, 1993, 608(1):101—106.
- [19] Lin FH, Wang Y, Lin S, et al. GABAB receptor-mediated effects in synaptosomes of lethargic (lh/lh) mice[J]. *J Neurochem*, 1995, 65(5):2087—2095.
- [20] Vienne J, Bettler B, Franken P, et al. Differential effects of GABAB receptor subtypes, gamma-hydroxybutyric Acid, and Baclofen on EEG activity and sleep regulation[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(42):14194—14204.
- [21] Williams SR, Turner JP, Crunelli V. Gamma-hydroxybutyrate promotes oscillatory activity of rat and cat thalamocortical neurons by a tonic GABAB, receptor-mediated hyperpolarization[J]. *Neuroscience*, 1995, 66(1):133—141.
- [22] Black SW, Morairty SR, Chen TM, et al. GABAB agonism promotes sleep and reduces cataplexy in murine narcolepsy[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(19):6485—6494.
- [23] Orr WC, Goodrich S, Wright S, et al. The effect of baclofen on nocturnal gastroesophageal reflux and measures of sleep quality: a randomized, cross-over trial[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(6):553—559.
- [24] 韩震,周岱,俞光弟,等.神经电刺激治疗对大鼠中脑损伤后意识障碍的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2001,23(1):11—13.
- [25] 水涛,只达石,张赛.急性颅脑损伤后脑脊液中递质类氨基酸变化[J].*中华神经外科疾病研究杂志*,2003,2(2):142—144.