

·基础研究·

# 迷走神经电刺激对脑外伤后昏迷大鼠前额叶皮质去甲肾上腺素 $\alpha 1$ 受体表达变化的影响\*

陈 琴<sup>1</sup> 黄菲菲<sup>1</sup> 董晓阳<sup>1</sup> 冯 珍<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:**探讨迷走神经电刺激(vagus nerve stimulation, VNS)对脑外伤(traumatic brain injury, TBI)后昏迷大鼠的促醒作用及其可能机制。

**方法:**健康成年SD大鼠90只,随机分为空白对照组、假刺激组和刺激组。TBI后昏迷大鼠给予VNS治疗,观察其行为学变化,并通过免疫组织化学和Western-blot技术检测各实验组大鼠前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)组织中去甲肾上腺素 $\alpha 1$ 受体( $\alpha 1R$ )含量。

**结果:**假刺激组和刺激组大鼠各30只,观察行为学变化发现,刺激组中20只出现翻正反射,假刺激组仅8只出现翻正反射;将3个实验组中 $\alpha 1R$ 含量进行两两比较,发现刺激组 $\alpha 1R$ 水平均显著高于其他两组( $P < 0.05$ )。

**结论:**VNS可改善TBI后昏迷大鼠的意识状态水平,对促进TBI后昏迷大鼠的觉醒有积极的治疗作用,其机制可能与PFC去甲肾上腺素 $\alpha 1R$ 水平上调有关。

**关键词** 迷走神经电刺激;脑外伤;昏迷;促醒;去甲肾上腺素 $\alpha 1$ 受体

**中图分类号:**R651.1, R454.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-01-0028-05

Effect of vagus nerve stimulation on expression of  $\alpha 1$ -adrenergic receptor in prefrontal cortex of coma rats induced by traumatic brain injury/CHEN Qin, HUANG Feifei, DONG Xiaoyang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(1): 28—32

## Abstract

**Objective:** To investigate the wake-promoting action of vagus nerve stimulation (VNS) in traumatic brain injury (TBI) induced coma rats and its possible mechanism.

**Method:** Ninety healthy Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups: control, sham-stimulated (TBI) and stimulated (TBI+VNS) group. VNS was applied to rats after TBI induced coma models. Then, to observe the changes in the behavior of rats and to detect the content of  $\alpha 1$ -adrenergic receptor in the prefrontal cortex (PFC) by using immunohistochemistry and Western-blotting techniques.

**Result:** Twenty rats in the stimulated group exhibited righting reflex and 8 rats had the same responses in TBI group. In stimulated group, the level of  $\alpha 1$ -adrenergic receptor in PFC were significantly higher than those in other groups ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** VNS can improve the level of consciousness of the rats after TBI-coma, and has a positive effect on wake-promoting action. The potential mechanism might be related to upregulating the expression of  $\alpha 1$ -adrenergic receptor in PFC.

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

**Key word** vagus nerve stimulation; traumatic brain injury; coma; wake-promoting;  $\alpha 1$ -adrenergic receptor

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.01.007

\*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260295)

1 南昌大学第一附属医院康复医学科,南昌,330006; 2 通讯作者

作者简介:陈琴,女,硕士研究生; 收稿日期:2016-01-19

近年来,脑外伤(trumatic brain injury, TBI)呈不断上升趋势,其增长率(21%)远超全球人口的增长率(6%),有“静息性流行病”之称<sup>[1]</sup>,现已成为全球关注的热点及难题。昏迷是TBI后严重并发症之一,在我国,因TBI所致的长期昏迷患者以10万人/年的速度递增,给国家和患者家庭带来沉重的负担<sup>[2]</sup>。目前临床上治疗TBI昏迷的方法有<sup>[3]</sup>:药物治疗、物理治疗、高压氧治疗、中医针灸治疗等,其首要任务在于促进患者苏醒,使患者在清醒基础上恢复运动、言语等功能,至少达到生活自理。电刺激作为一种物理疗法已应用于临床昏迷患者促醒的治疗<sup>[4]</sup>,常用的电刺激方法包括:颈部脊髓硬膜外刺激(cervical spinal cord stimulation, cSCS)、深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)、正中神经电刺激(median nerve electrical stimulation, MNES)、迷走神经电刺激(vagus nerve stimulation, VNS)等。我们的前期研究<sup>[5-6]</sup>证实了MNES对TBI后昏迷大鼠的促醒作用,并阐述其相关机制。本研究旨在探讨VNS对TBI后昏迷大鼠的促醒作用及其与PFC区去甲肾上腺素 $\alpha 1$ 受体的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

普通级成年SD大鼠90只,体质量250—300g,由南昌大学医学部动物部提供。安静、温暖、避强光等适宜条件下饲养约1w后开始实验。

### 1.2 主要试剂与仪器设备

抗 $\alpha 1$ -肾上腺素受体兔多克隆抗体购自英国Abcam有限公司;抗 $\beta$ -actin单克隆抗体和组织蛋白抽提试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。主要仪器包括:电刺激仪(ES-420)、组织切片机(RM2015, Leica Germany)、高速低温离心机(5804-R, Eppendorf Germany)、电泳系统(Mini-protein 3, Bio-Rad, USA)等。

### 1.3 实验分组及模型建立

将符合实验标准的90只SD大鼠随机分为3组,每组各30只:空白对照组,不做任何处理;假刺激组,造模成功的脑外伤昏迷大鼠;刺激组,造模成功大鼠给予VNS治疗。

使用经典“自由落体撞击法”构建脑外伤昏迷大

鼠模型。乙醚吸入麻醉,将大鼠俯卧位固定于手术台,备皮、消毒操作区域后暴露顶部颅骨,立体定位仪定位:中线左侧旁开2mm、冠状缝前1mm,用注射器针头十字标记此点为撞击点。待大鼠翻正反射恢复,依据大鼠体重,将直径约1cm重400g圆形铁柱从38—42cm高度沿垂直金属杆自由下落,撞击颅骨表面撞击点上的薄铝垫片,致颅骨凹陷性骨折,操作完毕,消毒并缝合大鼠头部皮肤后将其置于安静适宜环境。1h后采用双盲法完成意识状态等级评分。根据大鼠感觉及运动功能情况,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。将V级、VI级评定为昏迷状态纳入实验<sup>[7]</sup>。实验过程中大鼠意外死亡共10只:假刺激组6只,刺激组4只,在VNS治疗过程中无大鼠死亡,并重新挑选合格大鼠行相应的处理给予补充。

### 1.4 迷走神经分离术与VNS方法

刺激组和假刺激组大鼠均于脑外伤昏迷造模成功后行迷走神经分离术。然而,刺激组大鼠给予VNS治疗,假刺激组连接电刺激仪,但无电流输出。

术前约15min大腿肌肉注射硫酸庆大霉素(0.1ml/100g)预防感染,予10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔注射麻醉。麻醉生效后将大鼠仰卧位固定于手术台,左肩部垫高,头偏右侧,颈部皮肤消毒、铺巾,于颈部正中线偏左侧切开皮肤,钝性分离皮下组织和肌肉,游离并切开颈动脉鞘,分离左迷走神经约5mm。将特制的刺激电极包绕迷走神经,灵敏电流表检测确保接触良好后给予电流刺激,治疗结束后取出电极,消毒并缝合手术切口,将大鼠置于恒温垫30min后放回笼中。VNS治疗参数<sup>[8]</sup>:频率30Hz,脉宽0.5ms,电流1.0mA,总治疗时间为15min,共3个循环。治疗结束后1h,再次评估意识状态水平,实验完毕,返回笼中,给予充足的食物和水。

### 1.5 组织提取及检测方法

实验结束后6、12、24h,每个时间点每组均处死10只大鼠,共90只。断头取大鼠前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)组织,低温条件下使用组织蛋

白抽提试剂盒提取相应的组织蛋白,冷冻离心,取上清液,用BCA法测定蛋白浓度。应用 Western-blotting 和免疫组织化学技术检测 $\alpha 1R$ 水平。

## 1.6 统计学分析

本实验所得计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS 17.0统计软件作单因素方差分析;等级资料采用Kruskal-Wallis H秩和检验、析因分析。

## 2 结果

### 2.1 行为学改变

VNS治疗后1h再次评估行为学情况,刺激组30只大鼠中有20只觉醒,其中:Ⅱ级4只,Ⅲ级6只,Ⅳ级10只;10只仍处于昏迷状态。假刺激组30只大鼠中仅8只清醒,均为Ⅲ级;22只仍昏迷。

### 2.2 免疫组织化学检测

$\alpha$ 受体( $\alpha 1R$ )在PFC神经元细胞膜和细胞质中

均有表达。组间比较:3组中 $\alpha 1R$ 含量呈“空白对照组、假刺激组、刺激组”依次递增趋势,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );组内比较:3个时间点的 $\alpha 1R$ 含量呈“6h、12h、24h”依次递增趋势,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。见图1。

### 2.3 Western-blotting 检测

**2.3.1 组间比较:**6h、12h、24h的3个组别进行比较, $\alpha 1R$ 含量均呈现“空白对照组 $<$ 假刺激组 $<$ 刺激组”的趋势,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。见图2—3。

**2.3.2 组内比较:**空白对照组,假刺激组,刺激组的3个时间点进行比较,假刺激组和刺激组: $\alpha 1R$ 水平呈“6h、12h、24h”依次递增趋势,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),空白对照组3个时间点 $\alpha 1R$ 含量呈现“6h $<$ 12h $<$ 24h”趋势,但差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。见图2—3。

图1 各组及各时间点前额叶皮质 $\alpha 1$ 受体免疫反应性的显微照片

(免疫组化,  $\times 400$ )

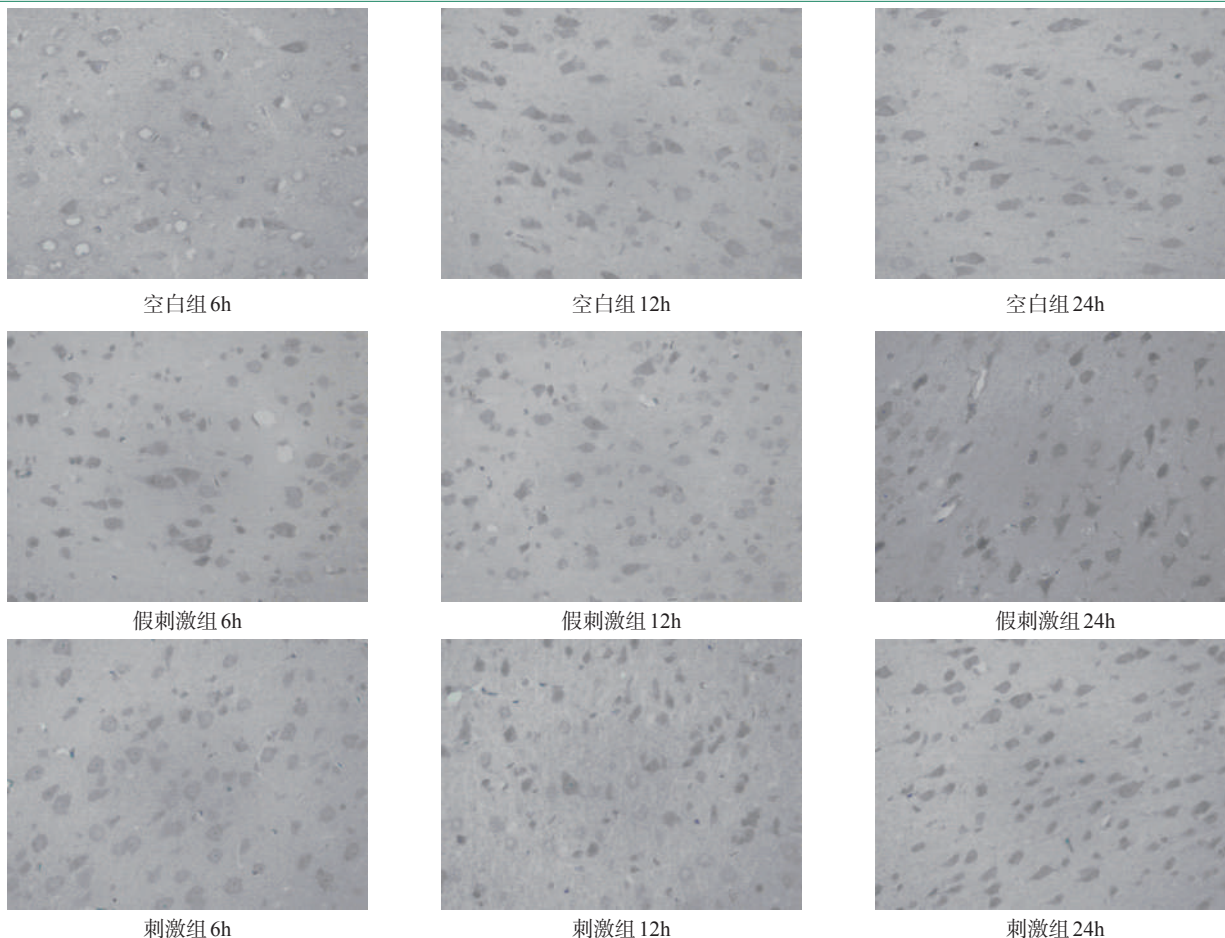


图2 大鼠PFC区各组各时间点 $\alpha 1$ 受体 Western-blotting条带图

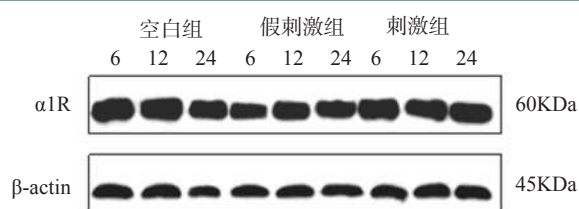
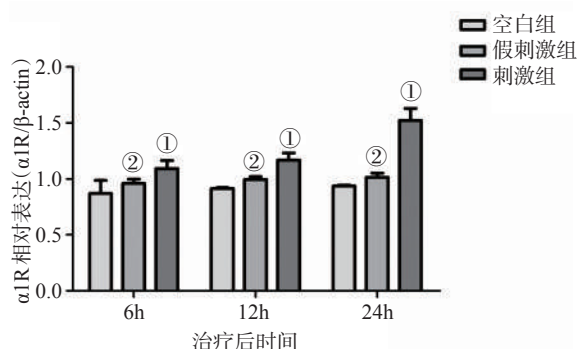


图3 各组各时间点大鼠前额叶皮质 $\alpha 1$ 受体表达情况



刺激组与假刺激组比较:① $P < 0.05$ ;假刺激组与空白组比较:② $P < 0.05$

### 3 讨论

迷走神经电刺激出现于20世纪80年代中期,主要应用于难治性癫痫和抑郁<sup>[9]</sup>,临床效果显著且安全可靠。近些年,不少研究<sup>[10-11]</sup>发现应用VNS治疗TBI癫痫患者的同时,可改善其白天嗜睡症状,延长觉醒时间,但其机制尚不明确。目前认为VNS促进觉醒的可能机制为<sup>[12-18]</sup>:①激活上行网状激活系统及大脑皮质促进觉醒;②改善前额叶皮质、下丘脑、丘脑等觉醒相关脑区血流量;③促进脑神经营养因子的表达,增强脑可塑性;④抑制炎症因子释放,发挥脑保护作用;⑤促进大脑兴奋性神经递质的分泌。从解剖学分析,迷走神经上行纤维终止于延髓背侧的迷走神经复合体:孤束核、三叉神经脊束核、迷走神经背核和疑核等<sup>[19]</sup>,其中孤束核接受其传入纤维最多,并发出纤维投射到蓝斑(Locus Coeruleus, LC),LC通过释放去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)广泛支配整个皮质、间脑和大脑的其他区域<sup>[20]</sup>。而且NE是维持觉醒的重要神经递质之一,通过其兴奋性受体发挥促醒作用。由此,我们推测VNS可能具有昏迷促醒的作用,且可能通过影响NE相关受体表达发挥效应。

早期电生理研究表明,蓝斑—去甲肾上腺素能神经系统对睡眠—觉醒调节起重要作用。LC合成分泌的NE广泛分布于整个中枢神经系统,NE包括3个主要的受体家族: $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\beta$ 受体,在众多脑区均有表达。NE通过兴奋性受体 $\alpha 1$ 广泛作用于大脑皮质,维持大脑皮质电生理活动,参与觉醒的维持<sup>[21]</sup>。而PFC参与调节觉醒、认知、运动、注意及奖赏等功能。研究表明,激活大鼠前额叶皮质去甲肾上腺素能 $\alpha 1$ 受体可提高大鼠觉醒水平,从而改善认知能力<sup>[22]</sup>。此外,Hilakivi等<sup>[23]</sup>研究发现 $\alpha 1$ 受体拮抗剂可以延长猫的睡眠时间,而 $\alpha 1$ 受体激动剂缩短其睡眠时间,维持觉醒状态。因此,推测VNS昏迷促醒作用可能与PFC区 $\alpha 1$ 受体表达变化有关。

本实验通过观察大鼠行为学变化,发现刺激组昏迷大鼠30只中有20只清醒,假刺激组仅苏醒8只,且通过Western-blot和免疫组织化学检测发现刺激组PFC组织中 $\alpha 1$ R的表达水平显著高于假刺激组和空白对照组,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。由此可说明VNS对TBI后昏迷大鼠具有促醒作用,其作用机制可能与增加PFC区 $\alpha 1$ R表达相关。同时,本实验免疫组化结果发现,刺激组大鼠PFC区3个时间点的 $\alpha 1$ R含量呈“6h、12h、24h”依次递增趋势,Western-blot检测得到同样的结果,即PFC组织 $\alpha 1$ R水平呈现“6h < 12h < 24h”趋势,差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。假刺激组大鼠PFC组织内3个时间点 $\alpha 1$ R水平均较空白组高,且呈“6h、12h、24h”依次递增趋势,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。这可能与脑外伤后应激性脑保护作用相关,以适应应激引起机体内外环境的变化,且在一定时间范围内NE参与的应激强度逐渐增加。空白对照组大鼠PFC组织内3个时间点 $\alpha 1$ R水平也呈“6h < 12h < 24h”趋势,但差异无显著性意义( $P > 0.05$ ),可能与蓝斑—去甲肾上腺素能神经元自身节律相关。当然,本实验需要进一步完善,如延长实验观察时间;再者,本实验只检测了PFC区 $\alpha 1$ R表达水平,其他相关促醒脑区是否有改变仍需进一步研究;此外,炎症因子或营养因子是否介导VNS促醒作用,仍需要进一步探讨。本实验研究的是VNS治疗脑外伤昏迷大鼠的即时效应,即单次治疗效果,我们后期研究将进一步探究VNS治疗在动物研究中的长期疗效以及临床

应用效果,并明确相关治疗参数。

综上所述,VNS治疗可改善TBI后昏迷大鼠的意识状态水平,并上调PFC中 $\alpha 1R$ 表达水平,因此我们推测VNS治疗后意识水平的改善可能与增加PFC区 $\alpha 1R$ 表达有关,且上调PFC区 $\alpha 1R$ 表达水平可能是VNS昏迷促醒的机制之一,但其确切机制有待进一步研究。我们同期研究结果表明:VNS昏迷促醒可能机制为上调PFC区Orexin-A及OX1R(Orexin-1 receptor)水平。后期研究将进一步探究VNS促醒机制中去甲肾上腺素 $\alpha 1R$ 与Orexin-A及OX1R之间的关系,证实Orexin-A在TBI昏迷促醒中是否起“开关”作用。

### 参考文献

- [1] 王波定,王洪财,朱坤灿,等.创伤性脑损伤模型的延续与完善:二次脑损伤模型[J].中华神经医学杂志,2013,12(4):426—429.
- [2] 陈健.脑外伤长期昏迷患者促醒治疗[J].吉林医学,2013,34(27):5740.
- [3] Cossu G. Therapeutic options to enhance coma arousal after traumatic brain injury: state of the art of current treatments to improve coma recovery[J]. Br J Neurosurg, 2014, 28(2): 187—198.
- [4] Lei J, Wang L, Gao G, et al. Right Median Nerve Electrical Stimulation for Acute Traumatic Coma Patients[J]. J Neurotrauma, 2015, 32(20):1584—1589.
- [5] Feng Z, Zhong YJ, Wang L, et al. Resuscitation therapy for traumatic brain injury-induced coma in rats: mechanisms of median nerve electrical stimulation[J]. Neural Regen Res, 2015, 10(4):594—598.
- [6] Zhong YJ, Feng Z, Wang L, et al. Wake-promoting actions of median nerve stimulation in TBI-induced coma: An investigation of orexin-A and orexin receptor 1 in the hypothalamic region[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3):4441—4447.
- [7] Morgan M, Lockwood A, Steinke D, et al. Pharmacotherapy regimens among patients with posttraumatic stress disorder and mild traumatic brain injury[J]. Psychiatr Serv, 2012, 63(2):182—185.
- [8] 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.
- [9] De Ferrari GM, Schwartz PJ. Vagus nerve stimulation: from pre-clinical to clinical application: challenges and future directions[J]. Heart Fail Rev, 2011, 16(2):195—203.
- [10] Malow BA, Edwards J, Marzec M, et al. Vagus nerve stimulation reduces daytime sleepiness in epilepsy patients[J]. Neurology, 2001, 57(5):879—884.
- [11] Rizzo P, Beelke M, De Carli F, et al. Chronic vagus nerve stimulation improves alertness and reduces rapid eye movement sleep in patients affected by refractory epilepsy[J]. Sleep, 2003, 26(5):607—611.
- [12] Ansari S, Chaudhri K, Al Moutaery KA. Vagus nerve stimulation: indications and limitations[J]. Acta Neurochir Suppl, 2007, 97(Pt 2):281—286.
- [13] Kosel M, Brockmann H, Frick C, et al. Chronic vagus nerve stimulation for treatment-resistant depression increases regional cerebral blood flow in the dorsolateral prefrontal cortex[J]. Psychiatry Res, 2011, 191(3):153—159.
- [14] Conway CR, Sheline YI, Chibnall JT, et al. Brain blood-flow change with acute vagus nerve stimulation in treatment-refractory major depressive disorder[J]. Brain Stimulation, 2012, 5(2):163—171.
- [15] Furmaga H, Carreno FR, Frazer A. Vagal nerve stimulation rapidly activates brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB in rat brain[J]. PLoS One, 2012, 7(5):e34844.
- [16] Biggio F, Gorini G, Utzeri C, et al. Chronic vagus nerve stimulation induces neuronal plasticity in the rat hippocampus[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2009, 12(9):1209—1221.
- [17] Bonaz B, Picq C, Sinniger V, et al. Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. Neurogastroenterol Motil, 2013, 25(3):208—221.
- [18] 赵彬元,李玉霞,明海霞,等.电刺激单、双侧迷走神经对肝郁证大鼠模型脑内NE、DA、5-HT和5-HIAA的影响[J].中医研究, 2013,26(1):64—66.
- [19] Henry TR. Therapeutic mechanisms of vagus nerve stimulation[J]. Neurology, 2002, 59(6 Suppl 4):S3—14.
- [20] Dailey JW, Yan QS, Adams-Curtis LE, et al. Neurochemical correlates of antiepileptic drugs in the genetically epilepsy-prone rat (GEPR)[J]. Life Sciences, 1996, 58(4):259—266.
- [21] Samuels ER, Szabadi E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part II: physiological and pharmacological manipulations and pathological alterations of locus coeruleus activity in humans[J]. Curr Neuropharmacol, 2008, 6(3):254—285.
- [22] Lapid MD, Morilak DA. Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability[J]. Neuroscience, 2006, 137(3):1039—1049.
- [23] Hilakivi I, Leppävuori A. Effects of methoxamine, and alpha-1 adrenoceptor agonist, and prazosin, an alpha-1 antagonist, on the stages of the sleep-waking cycle in the cat[J]. Acta Physiol Scand, 1984, 120(3):363—372.