

·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和下丘脑Orexin-A及其受体OX1R表达变化的影响\*

董晓阳<sup>1</sup> 刘丹<sup>1</sup> 黄菲菲<sup>1</sup> 冯珍<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:**探讨迷走神经电刺激(VNS)对脑外伤(TBI)昏迷大鼠的促醒作用及可能相关机制。

**方法:**将SD大鼠随机分为3组:空白对照组、假刺激组和刺激组。应用VNS治疗脑外伤后昏迷大鼠,观察其行为学变化,并用ELISA、Western-blot、免疫组织化学技术检测各组大鼠前额叶皮质(PFC)和下丘脑组织的Orexin-A及OX1R表达。

**结果:**刺激组30只大鼠中20只出现翻正反射,假刺激组30只中8只出现翻正反射;将3组的Orexin-A及OX1R含量进行两两比较,发现刺激组Orexin-A及受体OX1R水平高于假刺激组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

**结论:**VNS可提高脑外伤昏迷大鼠意识状态,其可能机制为上调PFC及下丘脑部位Orexin-A及OX1R水平,因此VNS有望成为脑外伤后昏迷促醒有效方法。

**关键词** 脑外伤;迷走神经电刺激;促醒;昏迷;Orexin-A;OX1R

**中图分类号:**R651.1, R454.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-07-0744-06

**Effects of vagus nerve stimulation on awakening up and upregulating expression of orexin-A and OX1R in prefrontal cortex and hypothalamic area in traumatic brain injury coma rats induced rats/DONG Xiaoyang, LIU Dan, HUANG Feifei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017,32(7): 744—749**

## Abstract

**Objective:** To explore the wake-promoting effects and possible mechanisms of vagus nerve stimulation (VNS) in traumatic brain injury induce-coma rats.

**Method:** SD rats were randomly divided into three groups: control, sham-stimulated (TBI) and stimulated (TBI+VNS) group. ELISA, Western blot and immunohistochemistry technique were used to detect the expression of Orexin-A and OX1R level in prefrontal cortex (PFC) and hypothalamus area.

**Result:** Twenty of 30 rats exhibited righting reflex in stimulated group, and 8 of 30 rats had the same responses in TBI groups. Orexin-A and OX1R levels in stimulated groups were higher than TBI groups both in PFC and hypothalamus area ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** VNS could raise consciousness in TBI induced coma rats, and the potential mechanism may be upregulating the expression of Orexin-A and OX1R in PFC and hypothalamus area. Therefore, VNS may be used as a wake-promoting method for patient after brain injury.

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

**Key word** vagus nerve stimulation; traumatic brain injury; wake-promoting; coma; Orexin-A; OX1R

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.07.003

\*基金项目:国家自然科学基金项目(81260295);江西省研究生创新基金(YC2015-S090)

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:董晓阳,男,硕士研究生; 收稿日期:2015-12-04

专家预测,脑外伤(traumatic brain injury, TBI)在2020年将成为全球第三大疾病负担<sup>[1]</sup>。随着TBI救治技术的进步,TBI患者的死亡率有明显下降,但是仍有高达14%的TBI患者经抢救后处于长期昏迷或植物状态,从而降低了患者和家庭的生存质量,增大了医疗费支出压力<sup>[2]</sup>。目前临床上治疗脑外伤后昏迷的方法有<sup>[3]</sup>:药物治疗、高压氧治疗、音乐疗法、电刺激治疗、中医中药及针灸治疗等。常用的电刺激治疗主要包括:深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)、颈部脊髓硬膜外刺激(cervical spinal cord stimulation, cSCS)、正中神经电刺激(median nerve electrical stimulation, MNES)、迷走神经电刺激(vagus nerve electrical stimulation, VNS)等。我们前期研究表明<sup>[4-5]</sup>MNES可作为脑外伤后昏迷促醒的有效手段,其机制可能与前额叶(prefrontal cortex, PFC)和下丘脑部位Orexin-A及OX1R(Orexin-1receptor)水平上调有关。本次研究旨在探讨VNS对脑外伤昏迷大鼠的促醒作用及与Orexin-A和OX1R的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、材料及仪器

成年SD大鼠90只(体重250—300g),普通级,由南昌大学医学部动物部提供,适应环境饲养1周后开始实验。抗OX1R抗体(ab68718,香港Abcam有限公司),抗 $\beta$ -actin单克隆抗体(CW0096)、组织蛋白抽提试剂盒(CWB10,北京康为世纪生物科技有限公司),Orexin-A检测试剂盒(cE90607a 96 T,武汉优尔生科技股份有限公司)。电刺激仪(ES-420)、低温高速离心机(5804-R, Eppendorf Germany)、电泳系统(Mini-protein 3, Bio-Rad, USA)、转移系统(Mini Trans-Blot, Bio-Rad, USA)、切片机(RM2015, Leica Germany)。

### 1.2 模型建立及分组

本实验应用经典“自由落体撞击法”来构建动物模型,乙醚吸入性麻醉,麻醉起效后暴露颅骨顶部,于左侧中线旁2mm、冠状缝前1mm用注射器针头在颅骨表面十字标记打击点。根据体重不同,400g圆柱形撞击锤从38—42cm高度沿垂直金属杆自由下落,撞击左侧颅骨表面打击点上的薄铝垫片,致使颅

骨凹陷性骨质,消毒后缝合皮肤,放回笼中。1h后根据大鼠的感觉、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。将Ⅴ级、Ⅵ级被认为是昏迷状态纳入实验中<sup>[6]</sup>。在造模过程中大鼠死亡,再次挑选新的大鼠进行补充。造模1h后采用双盲法完成意识状态等级评分。将90只健康大鼠随机分为空白组、假刺激组、刺激组,各个组分别进行相应的处理。空白对照组30只,不做任何处理;假刺激组30只,构建脑外伤后昏迷大鼠;刺激组30只,构建脑外伤昏迷大鼠后给予VNS。

### 1.3 迷走神经电刺激方法

刺激组大鼠需要进行VNS,脑外伤昏迷大鼠模型建立后,将大鼠置入无菌环境下,手术前用10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔注射麻醉和硫酸庆大霉素(0.1ml/100g)肌肉注射预防感染,待麻醉起效后固定于手术台,左侧颈部消毒,靠近颈部正中中线切开皮肤,钝性分离皮下脂肪、唾液腺、肌肉(胸骨舌骨肌和胸锁乳突肌),切开颈动脉鞘(迷走神经和颈动脉),分离左侧迷走神经5mm,将特制刺激电极包绕迷走神经,通过灵敏电流表检测电极是否与迷走神经接触良好,检测接触良好后给予电刺激,刺激之后取出电极,缝合手术切口,将大鼠放置于温床30min,然后放回笼中。VNS治疗参数<sup>[7]</sup>:频率30Hz,脉宽0.5ms,电流1.0mA,刺激5min,停止5min,反复进行3次。刺激结束后1h,再次评估意识状态等级评分,实验完毕后放回笼中。假刺激组则按刺激组同样操作,但无电流输出。

### 1.4 组织蛋白提取及检测

电刺激完成后的6h、12h、24h,每组每个时间点均处死10只,取大鼠下丘脑和前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)组织,用组织蛋白抽提试剂盒提取相应组织蛋白,冷冻离心处理,取上清液,用BCA法测定蛋白浓度。应用ELISA法检测Orexin-A含量,免疫组织化学技术和Western-blot法测定OX1R含量。

### 1.5 统计学分析

不同组别和时间点的Orexin-A和OX1R含量以

均数±标准差表示,采用SPSS 17.0统计软件作单因素方差分析、析因分析和Kruskal-Wallis H秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 意识状态行为学评估

在造模过程中共有8只大鼠死亡,补充同等数量的大鼠继续造模。VNS治疗后1小时再次行为学评估,刺激组30只大鼠中20只大鼠苏醒(Ⅱ级4只,Ⅲ级6只,Ⅳ级10只),10只仍昏迷状态(Ⅴ级8只,Ⅵ级2只);假刺激组30只大鼠中8只苏醒(Ⅲ级8只),22只昏迷(Ⅴ级10只,Ⅵ级12只)。

### 2.2 免疫组化检测

OX1R呈环形分布于PFC及下丘脑神经元的胞浆中。组间比较PFC和下丘脑3个组的OX1R含量呈“空白组、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PFC 3个时间点的OX1R含量呈“6h、24h、12h”依次递增趋势,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),下丘脑3个时间点OX1R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。

### 2.3 Western-blot检测

**2.3.1 组间比较:**PFC在6h、12h、24h比较,OX1R含量均呈“空白组 < 假刺激组 < 刺激组”,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );下丘脑OX1R表达趋势6h、24h:“假刺激组 < 刺激组 < 空白组”,差异有显著性意义

图1 前额叶各组各时间点 OX1R 免疫反应性的显微照片 (免疫组化染色,×400)

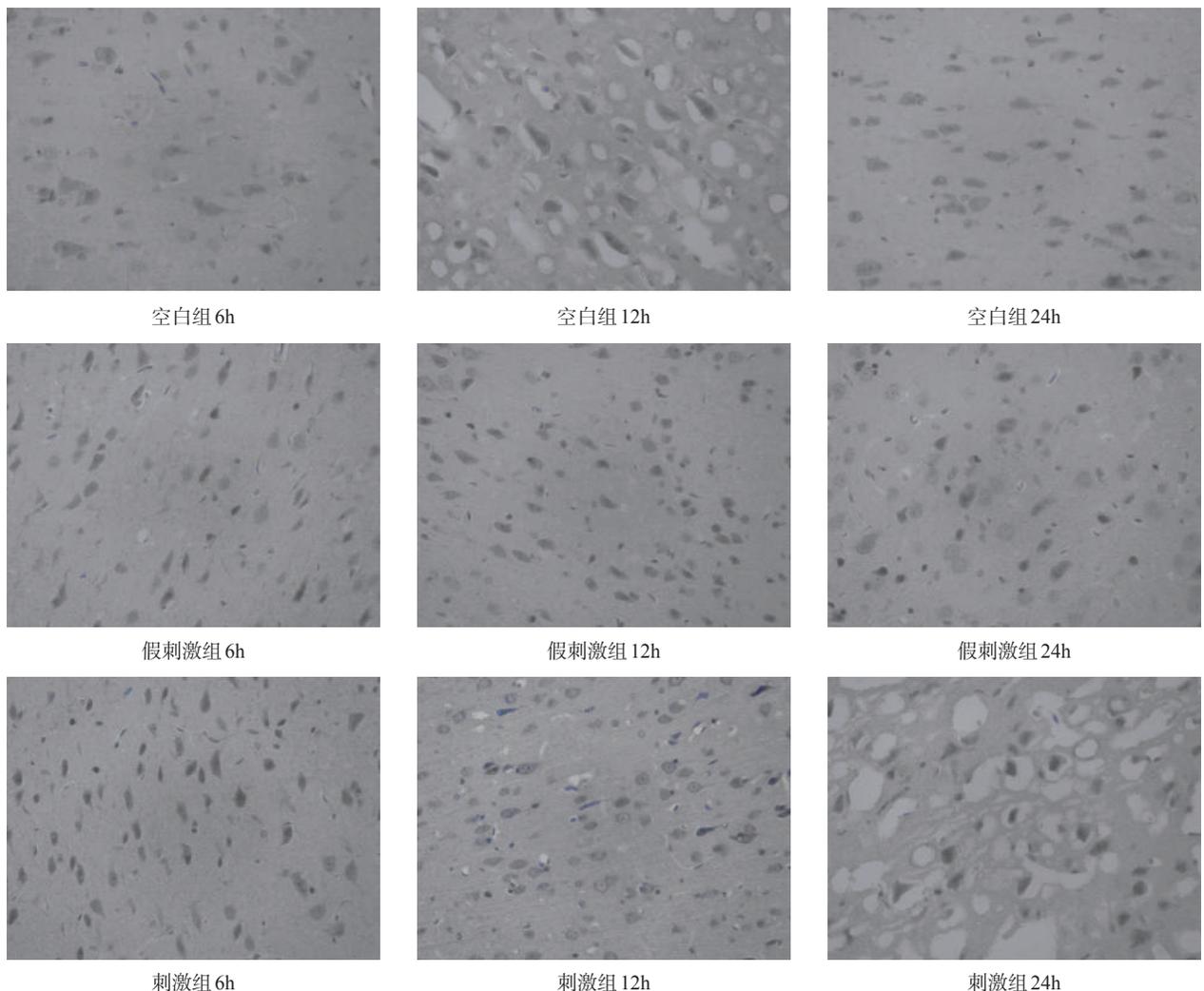
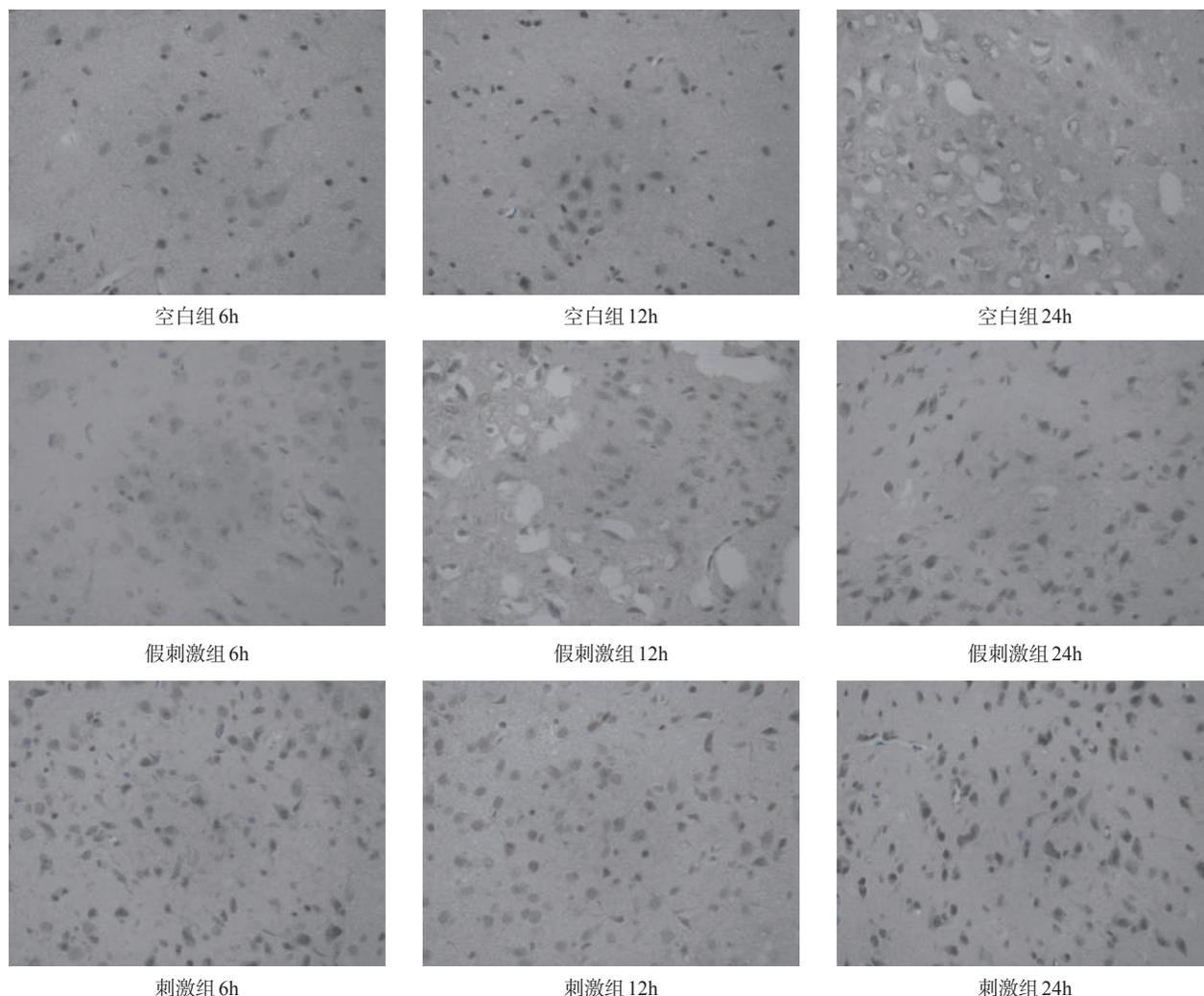


图2 下丘脑各组各时间点 OX1R 免疫反应性的显微照片 (免疫组化染色, ×400)



( $P < 0.05$ ), 12h“刺激组 < 假刺激组 < 空白组”, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。见表1—2。

**2.3.2 组内比较:** PFC空白组, 假刺激组, 刺激组比较: OX1R含量呈“6h < 24h < 12h”, 差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ); 下丘脑3组组内 OX1R比较, 刺激组: “12h < 24h < 6h” 差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ), 空白组和假刺激组3个时间点 OX1R无明显差别。

#### 2.4 ELISA 检测

**2.4.1 组间比较:** PFC在6h、12h、24h, 各组 Orexin-A含量呈“空白组 < 假刺激组 < 刺激组”, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 下丘脑在6h, 各组 Orexin-A水平无显著性差异( $P > 0.05$ ), 12h和24h, 3组呈现“空白

组 < 假刺激组 < 刺激组”, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

**2.4.2 组内比较:** PFC空白组, 假刺激组, 刺激组 Orexin-A含量呈“6h < 24h < 12h”, 差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。下丘脑: 假刺激组, 刺激组 Orexin-A含量呈“6h < 24h < 12h”, 差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

迷走神经电刺激已广泛地应用于难治性癫痫和持续性、复发性抑郁及认知功能障碍等<sup>[8]</sup>。近年来, 越来越多的研究<sup>[9-10]</sup>表明 VNS 可减少脑外伤后癫痫患者白天嗜睡时间和快动眼睡眠周期(rapid eye

**表1 PFC区Orexin-A含量及OX1R的组内及组间比较** ( $\bar{x}\pm s$ )

检测时间点/项目	例数	ELISA(Orexin-A)	Western-blotting(OX1R)
<b>6h</b>			
空白组	10	50.760±4.132	1.000±0.000
假刺激组	10	63.952±5.928	1.216±0.070
刺激组	10	66.314±4.603	1.496±0.123
<b>12h</b>			
空白组	10	71.232±6.576	1.211±0.050
假刺激组	10	73.358±6.632	1.486±0.200
刺激组	10	80.761±8.010	2.142±0.378
<b>24h</b>			
空白组	10	63.152±11.952	1.188±0.628
假刺激组	10	70.125±10.633	1.462±0.067
刺激组	10	75.320±6.203	1.828±0.095

**表2 下丘脑Orexin-A含量及OX1R的组内及组间比较** ( $\bar{x}\pm s$ )

检测时间点/项目	例数	ELISA(Orexin-A)	Western-blotting(OX1R)
<b>6h</b>			
空白组	10	55.375±6.551	0.857±0.248
假刺激组	10	65.967±5.606	0.670±0.135
刺激组	10	67.385±4.756	0.703±0.107
<b>12h</b>			
空白组	10	60.457±6.351	0.847±0.133
假刺激组	10	72.399±4.556	0.739±0.146
刺激组	10	83.331±5.535	0.868±0.149
<b>24h</b>			
空白组	10	59.352±5.331	0.932±0.225
假刺激组	10	68.128±4.353	0.710±0.172
刺激组	10	80.136±6.982	0.793±0.125

movement, REM), 延长觉醒时间, 但其机制尚不完全明晰。目前认为 VNS 延长觉醒时间的可能作用机制主要为: ①迷走神经广泛的纤维投射。80%迷走神经传入纤维止于孤束核(nucleus of the solitary tract, NTS), 小部分止于三叉神经脊束核、网状结构和疑核等, 传入神经可直接投射到大脑皮质和间接通过 NTS 到达网状上行激活系统(ascending reticular activating system, ARAS)<sup>[11]</sup>。ARAS 是激活和维持觉醒的重要组成部分, 电刺激迷走神经可提高 ARAS 信号输入, 进而可能达到促醒作用。②影响脑电活动。VNS 可提高动眼睡眠之前的慢波睡眠(slow-wave sleep, SWS) 并能够增加 REM 的频率, 此外, 睡眠梭状波及 δ 波谱显著增加<sup>[12]</sup>。③抗炎效应。迷走神经介导的抗炎效益主要是通过胆碱能抗炎通路实现的, 抑制炎症细胞因子释放避免神经细胞的第二次损伤<sup>[13]</sup>。④改善脑部血流量。VNS 可提高丘脑、下丘脑、前额叶皮质、网状结构等与觉

醒密切相关脑区的脑血流量, 脑血流量的增加对细胞存活, 促醒神经功能的恢复具有重要的意义<sup>[14]</sup>。⑤增加神经营养因子的表达和增强突触可塑性。神经营养因子在调节神经元存活、生长、功能及可塑性中扮演着重要的作用。VNS 可促进脑源性神经生长因子和神经生长因子在海马区、大脑皮质及前额叶区域中的表达<sup>[15]</sup>。此外, 神经营养因子与神经可塑性有很重要的联系, 它能使未激活的突触转化成有功能的突触, 对脑功能的恢复有重要的作用。⑥影响脑内相关神经递质的改变。促进觉醒的递质包括 Orexin-A、乙酰胆碱(Ach)、去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、组胺以及谷氨酸等<sup>[16]</sup>。研究表明 VNS 可提高下丘脑和前额叶皮质细胞内去甲肾上腺素水平、中缝背核的 5-羟色胺、前额叶和伏核的多巴胺水平等<sup>[17-18]</sup>。⑦其他机制, 包括 VNS 可促进内源性神经干细胞的增长、影响细胞去极化活动水平、降低颅内压、减少梗死面积、减轻大脑水肿程度及降低血脑屏障的损伤等<sup>[19]</sup>。推测 VNS 或许可以作为未来脑外伤昏迷促醒的有效手段, 本次研究旨在探讨 VNS 昏迷促醒作用的效果及对 Orexin-A 和 OX1R 表达变化的影响。

Orexins (包括 Orexin-A 和 Orexin-B) 是由下丘脑外侧分泌合成的一种神经多肽, 参与摄食、能量代谢、自主神经功能及睡眠觉醒等众多生理功能的调节<sup>[20]</sup>。Orexin-A 是一种兴奋性递质, 能够促进睡眠觉醒的调节, 其受体包括 OX1R 和 OX2R, 在众多的脑区中有所表达, 包括大脑皮质、腹背侧丘脑核、蓝斑核等, 尤其是在前额叶皮质有密集分布, 因此, 下丘脑 Orexin 神经元系统可通过直接神经支配效应来调节 PFC 的活动, 而 PFC 的功能主要参与调节睡眠觉醒、记忆、注意及情感等。Khoo 等<sup>[21]</sup>研究发现 Orexin-A 能够促进酒精性昏迷大鼠 PFC 神经元放电, 进而发挥控制成瘾和促醒作用。而 Orexin 神经元的丧失可使大鼠由觉醒向昏迷发生转变<sup>[22]</sup>。因此 Orexin-A 在觉醒中扮演着关键性的作用。

本实验通过意识状态评估方法表明, 假刺激组 8 只苏醒, 而刺激组 20 只苏醒, 通过 ELISA 发现刺激组下丘脑和 PFC 组织中 Orexin-A 水平显著高于假刺激组, 差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 通过 Western-blot 和免疫组化发现刺激组下丘脑和 PFC 组织

中OX1R的表达水平显著高于假刺激组,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。因此可以说明VNS对TBI后昏迷大鼠具有意识状态改善的作用,其可能的机制与下丘脑和PFC的Orexin-A和OX1R的高表达有关。同时免疫组化发现PFC刺激组3个时间点的OX1R含量呈“6h、24h、12h”依次递增趋势,Western-blot发现PFC内OX1R含量呈“6h < 24h < 12h”,ELISA检测发现下丘脑6h内,各组Orexin-A水平无明显差别,假刺激组和刺激组内OX1R表达水平不呈时间依赖性上升,以及在6h内Orexin-A各组表达水平无明显差异,此结果可能与Orexin神经元自身的节律性及脑外伤后急性应激反应性有关。当然,本实验也需要进一步去完善,如实验样本量太小,且只检测了下丘脑和PFC中Orexin-A和OX1R的表达,其他相关促醒脑区是否有改变仍需进一步研究,此外,OX1R表达水平检测可采用更加准确的mRNA PCR技术。此外,由于植入性迷走神经电刺激存在着损伤,在临床上应用具有一定的局限性,是否可以采用无创性方法达到类似的效果,有待今后进一步研究。

综上所述,VNS可提高TBI后昏迷大鼠的意识状态水平,且可上调下丘脑和PFC中Orexin-A和OX1R表达,而Orexin-A又是促进觉醒的重要兴奋性递质,因此我们认为VNS改善意识水平可能与下丘脑和PFC中上调Orexin-A和OX1R表达水平有关,同时也表明VNS未来可能作为昏迷促醒的一种新型治疗方法,然而VNS是否具有TBI昏迷促醒的作用需要进一步证实和研究。

### 参考文献

- [1] 励建安.脑外伤康复的现状与未来发展趋势[J].中国康复医学杂志,2011,26(12):1095—1097.
- [2] 游国清,廖琳,梁慧英.综合康复治疗对脑外伤后昏迷患者影响的随机对照研究[J].中国医药科学,2013,3(3):13—16.
- [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] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 魏天祺,冯珍.迷走神经电刺激临床应用及机制研究进展[J].中国康复医学杂志,2015,30(2):185—188.
- [9] Makoto,Kawai.Effects of vagus nerve stimulator nerve stimulation on daytime sleepiness[J]. Epilepsia,2006,47(s6):256—257.
- [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] Ansari S, Chaudhri K, Al Moutaery KA. Vagus nerve stimulation: indications and limitations[J]. Acta Neurochir Suppl, 2007, 97(Pt 2):281—286.
- [12] Valdés-Cruz A, Magdaleno-Madriral VM, Martínez-Vargas D, et al. Long-term changes in sleep and electroencephalographic activity by chronic vagus nerve stimulation in cats [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008, 32(3):828—834.
- [13] Bonaz B, Picq C, Sinniger V, et al. Vagus nerve stimulation for epilepsy: from the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. Neurogastroenterol Motil, 2013, 25(3):208—221.
- [14] 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.
- [15] Follesa P, Biggio F, Gorini G, et al. Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain[J]. Brain Res, 2007, (1179):28—34.
- [16] 钟颖君,冯珍.正中神经电刺激对促醒相关神经递质影响的研究进展[J].中国康复医学杂志,2015,30(3):299—301.
- [17] Manta S, El Mansari M, Debonnel G, et al. Electrophysiological and neurochemical effects of long-term vagus nerve stimulation on the rat monoaminergic systems[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2013, 16(2):459—470.
- [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] Kumaria A, Toliaas CM. Is there a role for vagus nerve stimulation therapy as a treatment of traumatic brain injury? [J]. Br J Neurosurg, 2012, 26(3):316—320.
- [20] Boss C, Roch C. Recent trends in orexin research--2010 to 2015[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(15):2875—2887.
- [21] Khoo SY, Brown RM. Orexin/hypocretin based pharmacotherapies for the treatment of addiction: DORA or SORA? [J]. CNS Drugs, 2014, 28(8):713—730.
- [22] Branch AF, Navidi W, Tabuchi S, et al. Progressive Loss of the Orexin Neurons Reveals Dual Effects on Wakefulness [J]. Sleep, 2016, 39(2):369—377.