

·基础研究·

迷走神经电刺激对脑外伤昏迷大鼠前额叶皮质组胺H₁受体表达的影响*

黄菲菲¹ 董晓阳¹ 陈 琴¹ 冯 珍^{1,2}

摘要

目的:探讨迷走神经电刺激(vagus nerve electrical stimulation, VNS)对脑外伤(trumatic brain injury,TBI)昏迷大鼠的促醒作用及其对TBI昏迷大鼠前额叶皮层组胺H₁受体表达的影响。

方法:将72只SD大鼠分为4组:空白对照组、假刺激组(TBI)、刺激组(TBI+VNS)和Orexin-1受体(OX₁R)拮抗剂组(TBI+SB334867+VNS)。应用VNS治疗脑外伤后昏迷大鼠,观察其行为学变化,并用免疫组织化学检测各组大鼠前额叶皮质组胺H₁受体(H₁R)表达的变化。

结果:刺激组18只大鼠中12只出现翻正反射;假刺激组4只出现翻正反射;拮抗剂组9只出现翻正反射。免疫组化结果显示刺激组大鼠PFC区的H₁R的表达水平显著高于假刺激组和拮抗剂组($P < 0.05$)。

结论:VNS可改善脑外伤后昏迷大鼠的意识状态,有望成为TBI昏迷促醒的一种新的电刺激方法,其促醒机制可能与PFC区H₁R水平的上调有关,Orexin-A可能通过OX₁R在其中起调节作用。

关键词 迷走神经电刺激;脑外伤;昏迷;促醒;组胺H₁受体;食欲素A

中图分类号:R651.1, R454.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-11-1208-06

Expression of the histamine H₁ receptor in rat prefrontal cortex with traumatic brain injury induced-coma after vagus nerve electrical stimulation/HUANG Feifei, DONG Xiaoyang, CHEN Qin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(11): 1208—1213

Abstract

Objective: To investigate the wake-promoting action and the expression of histamine H₁ receptor in rat prefrontal cortex (PFC) in traumatic brain injury (TBI)-coma rats after vagus nerve electrical stimulation (VNS).

Method: Seventy-two SD rats were randomly divided into four groups: a control group, a sham stimulated group (TBI), a stimulated group (TBI+VNS), and an antagonist group (TBI+SB334867+VNS). VNS was applied to the rats after TBI-coma models were established and then a six classical levels of consciousness were assessed, followed by immunohistochemistry to determined the expression of the H₁R in rat PFC at 6, 12, and 24 hours after injury.

Result: The righting reflex was appeared in 12 rats in stimulated group, 4 rats in TBI groups, and 9 rats in antagonist group. Significant increase of H₁R expression was observed in stimulated group when compared with sham stimulated group and antagonist group ($P < 0.05$).

Conclusion: The vagus nerve electrical stimulation might modulate wakefulness by promoting the the activity of H₁R expression in the prefrontal cortex of rats with traumatic brain injury-induced coma, and Orexin-A and its receptor, OX₁R may be involved in this modulation.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University,

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.11.001

*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:黄菲菲,女,硕士研究生; 收稿日期:2016-01-13

Medical School of Nanchang University, Nanchang, 330006

Key word vagus nerve electrical stimulation; traumatic brain injury; wake-promoting; coma; histamine H_1 receptor; Orexin-A

迷走神经电刺激(vagus nerve electrical stimulation, VNS)是指用一种可植入装置刺激迷走神经的治疗方法,在临床上主要应用于难治性癫痫和持续性、复发性抑郁及丛集性头痛等^[4]。有学者在用VNS治疗癫痫时发现其能降低患者白天嗜睡的时间,提高警觉和增加快速动眼睡眠周期(rapid eye movement, REM),延长觉醒时间^[5-7],这表明VNS对昏迷患者可能存在促醒作用,但目前国内外均未见VNS促醒相关的动物实验和临床报道。因此,VNS昏迷促醒的可行性及机制有待进一步研究。本研究旨在探讨VNS对脑外伤(trumatic brain injury, TBI)昏迷大鼠的促醒作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

成年SD大鼠72只(普通级,体重250—300g)由南昌大学动科部提供,适应性饲养1周后开始实验。抗 H_1R 抗体(BA1633-1)由武汉博士德生物工程有限公司提供,抗 β -actin单克隆抗体(CW0096)、组织蛋白抽提试剂盒(CWB10)由北京康为世纪生物科技公司提供,Orexin 1受体拮抗剂(SB334867, Tocris Bioscience),ZS-BS数显脑立体定位仪(北京),电刺激仪(ES-420)、切片机(RM2015, Leica Germany)。

1.2 动物模型及分组

本实验采用经典“自由落体撞击法”来构建脑外伤昏迷模型,采用乙醚吸入性麻醉,待麻醉起效后切开大鼠头部皮肤暴露顶部,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,并在该区域用胶水固定一大小适宜的薄铝垫片。400g圆柱形撞击锤从40—44cm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,致颅骨凹陷性骨折,缝合头皮,消毒后放回笼内。根据大鼠的感觉、运动功能,将大鼠意识状态分6级:在笼内活动如常为I级;在笼内活动减少为II级;在笼内活动减少并运动失调为III级;当背部放在笼的底部时能滚动(翻正反射存在)但不能站立为IV级;翻正反射消失但对疼痛刺激有肢体回缩反应

为V级;对任何刺激无反应为VI级;其中V级、VI级被认为是昏迷状态^[8]。大鼠昏迷1h以上即为造模成功。在造模过程中共有10只大鼠死亡,再次挑选新的健康大鼠补充。造模1h后采用双盲法进行意识状态的评估。将72只符合标准的大鼠纳入实验,随机分为4组。空白对照组18只:不做任何处理;假刺激组18只:经脑外伤造模成功后,解剖迷走神经,安放电极,但不进行电刺激;刺激组18只:脑外伤后昏迷大鼠给予VNS;拮抗剂组:脑外伤后昏迷大鼠,经脑立体定位仪,往侧脑室内注射Orexin 1受体(Orexin 1 receptor, OX_1R)拮抗剂后再给予VNS。

1.3 迷走神经电刺激方法

脑外伤昏迷大鼠模型建立后,将大鼠置于无菌环境下,10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔注射麻醉并肌肉注射硫酸庆大霉素(0.1ml/100g)预防感染,麻醉起效后,消毒,于颈部正中做一切口,钝性分离出左侧迷走神经干约5mm,将特制的刺激电极包绕迷走神经并外接刺激器,通过灵敏电流表检测电极与迷走神经接触良好后给予电刺激,刺激之后取出电极,逐层缝合手术伤口,将大鼠放置于温床30min,然后放回笼中。VNS方法及参数设置^[9]:频率30Hz,脉宽0.5ms,电流1.0mA,刺激总时间为15min,共3个循环刺激。刺激组大鼠在昏迷造模成功后给予VNS,拮抗剂组在侧脑室内注射 OX_1R 拮抗剂后给予VNS。实验完毕后,返回笼中,1h后再次运用双盲法评估动物意识状态。假刺激组则按刺激组同样操作,但无电流输出。

1.4 侧脑室 OX_1R 受体拮抗剂SB334867的注射

大鼠造模成功后腹腔注射10%水合氯醛(3ml/kg),待麻醉起效后,将大鼠头部及四肢俯卧位固定于脑立体定位仪上,消毒大鼠头顶,在前囟后约1.0mm,正中线旁开1.5mm作一标记,用颅骨钻在标记点处钻一小孔,微量进样器抽取5 μ l SB334867(10mg/kg粉末溶解于60:40 DMSO),垂直插入颅骨表面下4.5mm,以2.50 μ l/min速度注射,注射完毕留针2—3min后退针,消毒,缝合头皮。

1.5 组织标本的提取及免疫组织化学检测

实验完成后的6、12、24h,腹腔注射10%的水合氯醛深度麻醉大鼠后,向心脏灌注4%的多聚甲醛至大鼠全身僵硬,断头取脑,将脑组织用4%的水合氯醛固定12h,并在20%蔗糖磷酸盐溶液(phosphate buffered saline,PBS)中冷冻保存,按此方法每组每个时间点均处死6只。将脑组织切成40 μ m的冠状切片,PBS漂洗后用0.3%的过氧化氢(H₂O₂)处理30min,滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育1h,滴加稀释的兔抗H₂R抗体(1:400),4℃过夜,PBS漂洗后再滴加生物素标记的山羊抗兔IgG,室温孵育1h,漂洗后再滴加HRP标记链霉卵白素工作液,37℃孵育20min后漂洗3次。采用免疫染色法对组织切片进行染色,具体操作如下:取DAB试剂盒中的显色剂A、B、C液各一滴与1ml ddH₂O混匀,滴至切片,观察显色情况。由两位有经验的病理实验师利用双盲法对免疫组化的实验结果进行观察,最后计算出阳性细胞百分比及免疫组化得分(immunohistochemical score,IHS)。

1.6 统计学分析

不同组别和时间点的H₂R阳性细胞数以均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS 17.0统计软件作单因素方差分析、析因分析和Kruskal-Wallis H秩和检验。

2 结果

2.1 意识状态评估

VNS治疗后1h再次进行意识状态评估,刺激组中12只大鼠出现翻正反射(Ⅲ级8只,Ⅳ级4只),6只仍昏迷状态(V级4只,Ⅵ级2只);假刺激组中4只出现翻正反射(Ⅳ级4只),14只昏迷(V级8只,Ⅵ级6只);拮抗剂组9只大鼠出现翻正反射(Ⅲ级4只,Ⅳ级5只),9只仍昏迷状态(V级4只,Ⅵ级5只)。

2.2 免疫组化检测

H₂R分布于前额叶皮质神经元的胞浆和胞膜中(见图1)。各组间的H₂R阳性细胞数(以占总数的百分比表示)比较显示:在6h和24h均呈现假刺激组<拮抗剂组<刺激组<空白组($P<0.05$)的趋势;在12h则呈现假刺激组<拮抗剂组<空白组<刺激组的趋势(见图2)。组间两两比较:在3个时间点假刺激组的阳性细胞数均小于刺激组和空白组,且刺激

组的阳性细胞数均大于拮抗剂组,差异均具有显著性意义($P<0.05$)。组内比较发现仅空白组3个时间具有显著性差异,6h、12h和24h的阳性细胞数呈现先下降再上升的趋势($P<0.05$),通过计算根据IHS来判断H₂R的表达情况,评分标准^[10]A:为阳性细胞数分级0:0—1%、1:1%—10%、2:10%—50%、3:50%—80%、4:80%—100%;B:为阳性细胞显色强度分级0(阴性)、1(弱阳性)、2(阳性)、3(强阳性),IHS=A $\times$ B。将各组IHS(n=6)进行秩和检验发现4个组的H₂R表达水平呈“假刺激组、拮抗剂组、刺激组、空白对照组”依次递增趋势,差异有显著性意义($P<0.01$),两两比较的结果显示假刺激组的IHS小于空白组和刺激组($P<0.01$);刺激组的IHS明显大于拮抗剂组($P<0.05$),见表1。4个组在6h、12h和24h 3个时间点的H₂R表达水平呈“先下降再上升”的趋势,但差异无显著性意义($P>0.05$),见表2。

表1 各组间前额叶皮质区H₂R的免疫组化得分比较

	空白对照组	假刺激组	刺激组	拮抗剂组	合计	P
IHS的秩均值*	45.22	25.78 ^①	43.44	31.56 ^②	-	0.001
样本数	18	18	18	18	72	

与空白对照组和刺激组相比:① $P<0.01$;与刺激组相比:② $P<0.05$

*IHS:免疫组化得分。

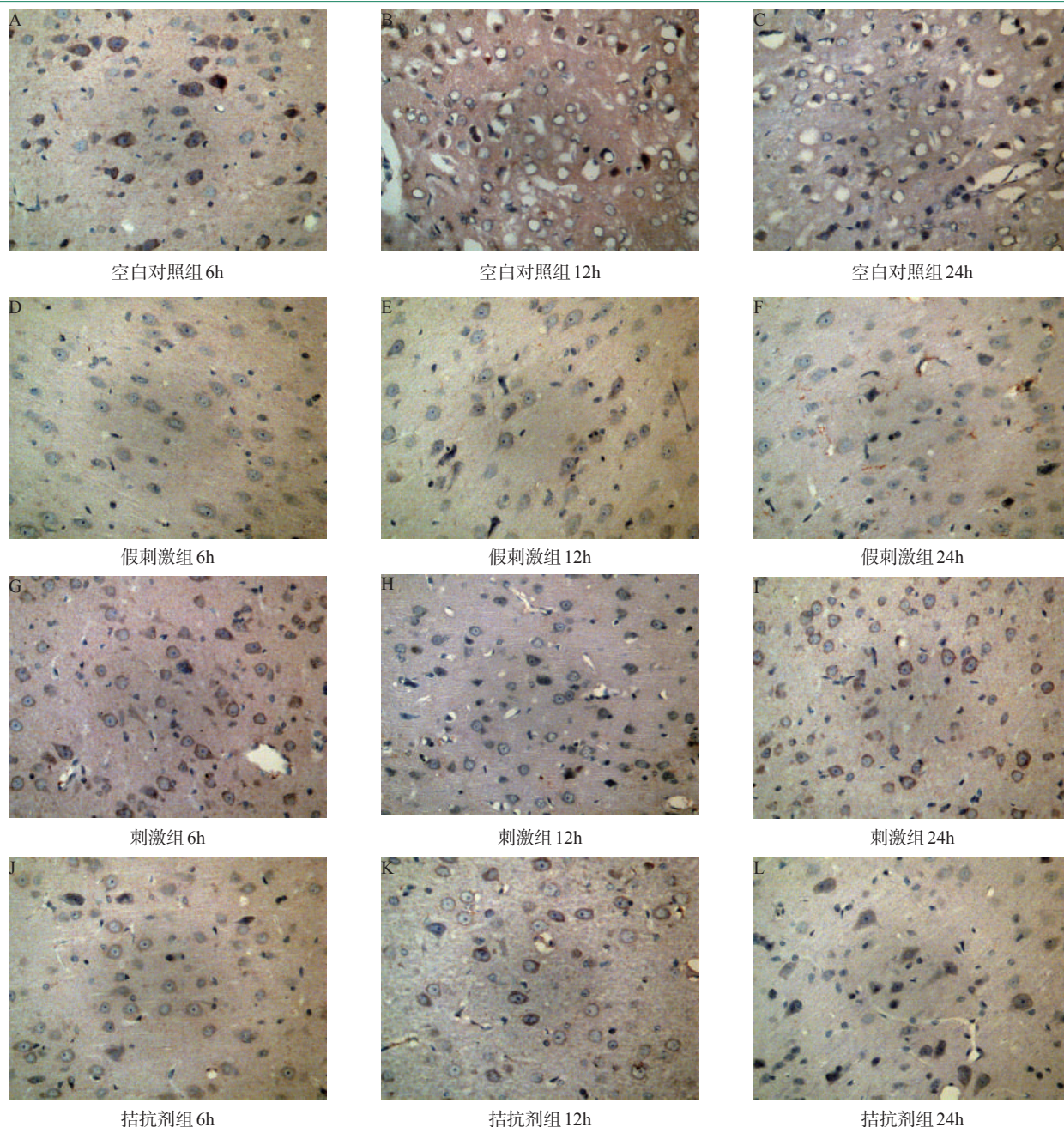
表2 组内不同时间点前额叶皮质区H₂R的IHS比较

	6h	12h	24h	合计	P
IHS的秩均值*	38.08	32.96	38.46	-	0.445
样本数	24	24	24	72	

*IHS:免疫组化得分。

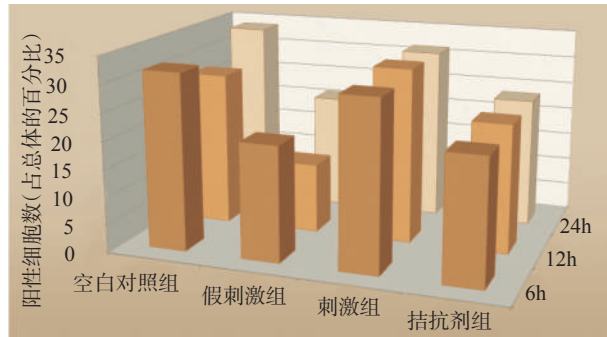
3 讨论

随着交通等事故的逐年增长和脑外伤救治技术的不断改善,越来越多的TBI患者经抢救后幸存^[1],但仍有高达14%的TBI患者处于长期昏迷或持续植物状态^[2]。脑外伤后昏迷以其高死亡率、高致残率、高医疗费用给国家、社会和家庭带来巨大的经济压力,如何使昏迷患者早日苏醒,提高其生存质量是国内神经康复领域亟待解决的科学难题。近十余年来,国内外学者应用电刺激治疗昏迷患者,取得了一定的临床疗效^[3]。常用的电刺激方法有:深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)、颈部脊髓硬膜外刺激(cervical spinal cord stimulation, cSCS)、迷走神经电刺激、周围神经电刺激(peripheral nerve

图1 前额叶皮质(PFC区)各组各时间点 H₁R 免疫反应性的显微照片 (免疫组化染色, ×400)

stimulation, MNS)。研究发现 VNS 可减少癫痫患者白天嗜睡时间,提高警觉和增加快速动眼睡眠周期,延长觉醒时间^[5-7],表明 VNS 具有促醒作用,但其促醒的机制目前并未明晰。研究表明 VNS 能够影响脑内与觉醒相关的神经递质及相应的受体, Manta 等^[13-14]发现 VNS 能使大鼠 PFC 区细胞外去甲肾上腺素和多巴胺含量升高,椎体神经元中突触后

α_2 受体增加。组胺是下丘脑后分泌的一种兴奋性神经递质,目前已发现 H₁、H₂、H₃ 及 H₄ 四个受体亚型,其中 H₁受体(H₁R)发现最早、分布最广, H₁R 广泛分布于中枢神经系统,特别是在具有唤醒功能的区域,例如,丘脑、皮质、蓝斑中的 H₁R 具有很高水平^[15]。中枢组胺能神经系统参与睡眠—觉醒调节, H₁R 则是调控觉醒的重要受体。在觉醒时期,组胺

图2 前额叶皮质各组各时间点H₁R阳性细胞数的比较

假刺激组与空白对照组和刺激组相比: * $P < 0.05$; 拮抗剂组与刺激组相比: # $P < 0.05$; 12h与6h、24h相比: & $P < 0.05$

能够通过H₁R激活大脑皮质,从而促进觉醒^[16]。H₁R基因敲除(knock out, KO)小鼠夜间觉醒水平明显下降,且丧失行为刺激的觉醒维持能力^[17]。额叶皮质约占全部皮质面积的1/3,其兴奋性的增加在一定程度上反映了机体觉醒水平的升高^[18]。因此,我们猜测VNS的促醒作用可能与PFC区H₁R的表达水平有关。

本实验通过免疫组化检测大鼠PFC区H₁R的表达水平发现,大鼠在损伤后6h、12h和24h,假刺激组的H₁R的表达明显低于空白组,表明脑外伤后昏迷能够导致PFC区H₁R的表达下降,考虑是机体为防止脑外伤后组胺应激性分泌过高引起的兴奋性毒性而产生的保护性反应。另外,本实验还发现在3个时间点,刺激组H₁R的表达均较假刺激明显增加($P < 0.05$),这说明VNS能够上调TBI昏迷大鼠PFC区H₁R的表达,在行为学评估中我们又发现刺激组中12只大鼠出现翻正反射,而假刺激组中仅4只出现翻正反射,提示VNS对脑外伤昏迷大鼠具有促醒作用。由此可见,MNS可上调脑外伤后昏迷大鼠前额叶皮质H₁R水平而达到促醒作用。但VNS是如何上调H₁R的表达并不清楚。

迷走神经起源于脑干,其传入纤维直接或通过孤束核及其网状上行结构系统,达下丘脑、杏仁核海马复合体及弥漫性投射到大脑皮质^[11]。研究发现^[12]VNS能够影响大鼠脑电活动,可引起大脑皮质的同步和非同步去极化,Kling等^[21]还发现VNS能够显著增加下丘脑外侧区(lateral hypothalamic area, LHA)等脑区c-fos基因的表达,而c-fos可作为接受

一定刺激的神经元激活的标志,因此提示VNS能够激活LHA。LHA主要存在大量的Orexin能神经元,Orexin包括Orexin-A和Orexin-B,是促进和维持觉醒重要的神经递质。Orexin有2个G蛋白偶联受体,即Orexin 1受体和Orexin 2受体(Orexin 2 receptor, OX₂R),Orexin A对OX₁R和OX₂R表现出高亲和力,而Orexin B仅对OX₂R具有高选择性。研究发现^[19]口服锌能通过刺激迷走神经上调下丘脑Orexin mRNA的表达,进而促进食欲,且该作用能被OX₁R的拮抗剂阻断,表明这种作用主要是通过迷走神经刺激Orexin-A的释放实现的。同期研究也发现VNS能够上调下丘脑及PFC区的Orexin-A和OX₁R的水平。而且,Orexin-A能调节组胺能系统发挥促醒作用,Orexin能神经元纤维可投射到组胺能的结节乳头核(tuberomammillary nucleus, TMN),Orexin-A能直接兴奋组胺能神经元,向大鼠TMN灌注Orexin-A,发现内侧视前区和前额叶皮质细胞外液中组胺释放量增加,大鼠觉醒时间延长,睡眠时间缩短,向小鼠侧脑室注射Orexin-A,WT小鼠觉醒增加,睡眠减少,而H₁R-KO小鼠睡眠与觉醒不受影响^[20],这表明H₁R与Orexin-A的促醒作用紧密相关。因此,我们推测下丘脑的Orexin系统能够调节前额叶皮质H₁R的表达。

本实验观察到侧脑室注射了OX₁R拮抗剂SB334867的大鼠其PFC区的H₁R水平较刺激组显著下降,且行为学评估结果显示刺激组中12只大鼠出现翻正反射,而拮抗剂组9只大鼠出现翻正反射,提示下丘脑Orexin-A参与了VNS上调PFC区H₁R的表达,这一作用可能是VNS促醒机制之一。

综上所述,VNS可以改善TBI后昏迷大鼠意识状态,将来有望成为TBI昏迷的一种促醒手段,其机制可能与VNS激活下丘脑Orexin能神经元释放Orexin-A并激活OX₁R上调PFC区H₁R的表达有关。

参考文献

- [1] Frost RB, Farrer TJ, Primosch M, et al. Prevalence of traumatic brain injury in the general adult population: a meta-analysis[J]. Neuroepidemiology, 2013, 40(3):154—159.
- [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] Yuan H, Silberstein SD. Vagus nerve and vagus nerve stimu-

- lation, a comprehensive review: Part II[J]. Headache, 2016, 56(2):259—266.
- [4] Guerra A, Costantini EM, Maatta S, et al. Disorders of consciousness and electrophysiological treatment strategies: a review of the literature and new perspectives[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(26):4248—4267.
- [5] Hallböök T, Lundgren J, Köhler S, et al. Beneficial effects on sleep of vagus nerve stimulation in children with therapy resistant epilepsy[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2005, 9(6): 399—407.
- [6] Malow BA, Edwards J, Marzec M, et al. Vagus nerve stimulation reduces daytime sleepiness in epilepsy patients[J]. Neurology, 2001, 57(5):879—884.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. Cancer, 2000, 89(12):2637—2645.
- [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-Madrigal 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] 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.
- [14] Manta S, Dong J, Debonnel G, et al. Optimization of vagus nerve stimulation parameters using the firing activity of serotonin neurons in the rat dorsal raphe[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2009, 19(4):250—255.
- [15] Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine[J]. Prog Neurobiol, 2001, 63(6):637—672.
- [16] JS Lin. Brain histamine in sleep-wake control[J]. European Neuropsychopharmacology, 1999, 5(9):172—173.
- [17] Parmentier R, Zhao Y, Perier M, et al. Role of histamine H_1 -receptor on behavioral states and wake maintenance during deficiency of a brain activating system: A study using a knockout mouse model[J]. Neuropharmacology, 2015, 4(9): 1—15.
- [18] Lambe EK, Aghajanian GK. Hypocretin (orexin) induces calcium transients in single spines postsynaptic to identified thalamocortical boutons in prefrontal slice[J]. Neuron, 2003, 40(1):139—150.
- [19] Ohinata K, Takemoto M, Kawanago M, et al. Orally administered zinc increases food intake via vagal stimulation in rats[J]. J Nutr, 2009, 139(3):611—616.
- [20] Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, et al. Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus[J]. J Neurosci, 2001, 21(23):9273—9279.
- [21] Kling MA, Loyd D, Sansbury N, et al. Effects of short-term VNS therapy on Fos expression in rat brain nuclei[C]. Poster presented at the 58th Annual Scientific Convention of the Society of Biological Psychiatry. San Francisco, CA, 2003, 15—17.
- [22] 周龙, 林进皇, 郁毅刚, 等. 迷走神经刺激对兔脑爆炸伤后血清及脑组织中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-10$ 水平的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2014, 13(5):442—445.