

经颅直流电刺激对脑外伤昏迷大鼠意识及脑源性生长因子表达的影响*

廖诚诚¹ 孙伟铭¹ 冯 珍^{1,2}

摘要

目的:探讨经颅直流电刺激(tDCS)对脑外伤昏迷大鼠的促醒作用及其可能机制。

方法:成年SD大鼠54只,随机分为3组,每组18只,分别是空白组、脑外伤(TBI)昏迷组及tDCS组。TBI和tDCS组制作脑外伤昏迷模型,前者进行假tDCS治疗,后者用tDCS治疗。各组处理后在6h、12h、24h点评定大鼠意识水平,对比治疗前后意识水平变化,处死大鼠,获取前额叶和海马,应用Western Blot法测定大鼠组织中脑源性生长因子(BDNF)的表达。

结果:空白组18只、TBI组6只、tDCS组11只出现翻正反射,TBI组大鼠前额叶与海马BDNF表达较空白组升高,在12h点,tDCS组大鼠前额叶BDNF表达较TBI组升高,差异有显著性意义($P < 0.05$),在6h点,tDCS组大鼠海马BDNF表达较TBI组升高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

结论:tDCS可促TBI昏迷大鼠觉醒,其机制可能与上调前额叶及海马BDNF表达有关。

关键词 经颅直流电刺激;脑外伤;昏迷;促醒;脑源性生长因子

中图分类号:R651.1, R454.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-03-0269-05

Effects of transcranial direct current stimulation on consciousness and expression of brain-derived neurotrophic factor in coma rats following traumatic brain injury/LIAO Chengcheng, SUN Weiming FENG Zhen//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(3): 269—273

Abstract

Objective: To investigate wake-promoting effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on brain injury-induced coma and the possible mechanism.

Method: Fifty-four adult SD rats were randomly divided into three groups with 18 rats in each group. They were blank group, traumatic brain injury-induced coma (TBI) group and tDCS group. Using classical free fall method to create brain injury-induced coma and then treated rats with tDCS, consciousness level of rats were assessed at 6h, 12h, 24h time points. After consciousness level evaluation, rats were put to death and then the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus of rats were extracted. Western Blot method was used to determine the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in three groups.

Result: Eighteen rats in control group, 6 rats in TBI group and 11 rats in tDCS group awakened. BDNF expression in TBI group was higher than that in blank group in PFC and hippocampus. More over, at 12h in PFC and at 6h in hippocampus, BDNF expression in tDCS group was higher than that in TBI group with statistically significant difference($P < 0.05$).

Conclusion: tDCS can improve the consciousness level of coma rats following TBI and the mechanism may be related to upregulation of BDNF expression in the PFC and hippocampus of rats.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.03.004

*基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目

1 南昌大学第一附属医院,南昌,330006; 2 通讯作者

作者简介:廖诚诚,女,硕士,住院医师; 收稿日期:2017-02-21

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

Key word transcranial direct current stimulation; traumatic brain injury; coma; wake-promoting; brain-derived neurotrophic factor

随着现代医疗技术发展,脑外伤救治水平逐步提高,越来越多的重型或特重型脑外伤患者得以保留生命,但却遗留大量昏迷(coma)及植物生存状态(vegetative state,VS)患者,据统计每年约有20万^[1],脑外伤后昏迷因缺乏有效的治疗手段,常以高死亡率、高致残率、高医疗费用^[2]给国家、社会和家庭带来巨大的经济负担,同时给患者家庭带来巨大的精神压力。因此,对昏迷状态促醒进行临床和基础研究迫在眉睫,使TBI昏迷患者早日苏醒亦是国内外神经康复领域的研究重点。

既往临床上常用的治疗昏迷的方法有^[3-4]:①维持患者生命体征;②手术治疗;③神经营养药及催醒药物运用;④中医治疗;⑤营养治疗;⑥感觉刺激;⑦高压氧舱治疗等。这些措施对治疗昏迷患者起到了一定作用,但有较多患者经上述治疗后仍昏迷不醒,部分患者昏迷较长时间,最终因并发症死亡。

经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation, tDCS)是一种非侵入性的、利用微小电流调节大脑皮质神经电活动和突触可塑性的新兴技术^[5-6],tDCS由直流微电刺激器、阴极电极和阳极电极组成,治疗时通过放置于头皮的电极片,电流通过头皮和颅骨时作用于大脑皮质,进而调节大脑皮质活动,研究表明tDCS可以影响相应区域的运动觉、认知,也可影响意识状态^[7-9],但tDCS影响意识状态的具体机制还有待研究。

脑源性神经因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)主要表达于中枢神经系统,是神经营养素家族最重要的成员^[10]。免疫组化检测发现,大脑皮质、海马、纹状体等部位BDNF阳性颗粒不仅分布在神经元胞体,而且延续到纤维,其中以海马和皮质的BDNF含量最高。研究发现,应急反应中BDNF在脑组织含量变化与应急程度呈正相关,有可能为临床脑损伤的治疗、损伤程度及预后的判断提供新思路^[11],由此可见,BDNF是大脑损伤应急调节的重要因素,已知tDCS可通过上调BDNF表达使运动学习能力加强^[12],但tDCS是否可通过上调

BDNF表达使TBI昏迷觉醒尚不清楚,故本课题选用tDCS刺激TBI后昏迷大鼠,检验tDCS促醒潜能并分析BDNF是否参与促醒机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级重250—300g的SD大鼠54只,雌雄不限,由南昌大学动物实验科学部提供,购买大鼠后置于本实验中心适应性饲养1周,自然光照下进行常规饲养,大鼠可自由饮食饮水,实验房温度保持在23℃左右,本实验过程均遵守本院动物实验伦理委员会管理条例规定。54只大鼠纳入实验,采用随机数字表法平均分为三组:①空白组:无任何处理的健康SPF大鼠;②脑外伤昏迷组:自由落体制造脑外伤昏迷大鼠;③tDCS组:脑外伤后昏迷大鼠给予tDCS,每组18只大鼠。

1.2 建立TBI后昏迷模型

本实验采用经典“自由落体打击法”^[13]来建立昏迷大鼠模型。吸入乙醚麻醉大鼠后,将麻醉大鼠俯卧位置于打击装置正下方,头顶部毛皮消毒,切开分离头顶部皮肤,剥离骨膜,暴露颅骨顶部,在颅顶冠状缝与人字缝间交界处固定一铁制圆盘(直径10mm左右),其底与颅顶相吻合。检查SD大鼠待其恢复刺痛反射,根据大鼠体重,将直径10mm的400g圆柱撞击锤从40—44cm不等高度,从垂直金属杆内自由下落,正好撞击于颅骨上的铁质圆盘,造成大鼠颅脑损伤,记录大鼠昏迷时间。

1.3 意识状态评分

半小时后根据大鼠的感觉和运动功能,将大鼠意识水平分成6级:I级:在笼内活动正常;II级:在笼内活动减少;III级:在笼内活动降低合并运动失调;IV级:当大鼠背部置于笼的底部时能翻回(即翻正反射存在)但不能站立;V级:翻正反射消失但保留疼痛刺激的肢体回缩反应;VI级:翻正反射消失、疼痛刺激无反应;其中大鼠V级、VI级至少持续30min被认为是昏迷状态^[14]。

1.4 tDCS方法

本实验进行tDCS处理时阳极电极为直径2mm的透明塑料管,里面填充海绵。将铜丝插入海绵中后,用聚丙烯酸酯固定铜导线。圆柱电极上方保留有用于刺激中滴加生理盐水的小孔,从而减小电极接触阻抗。管状的阳极电极则用玻璃离子水门汀固定于颅骨表面的左侧前额叶体表投影部位,阴极置于右侧眶上切迹。刺激参数参照李一言^[15]大鼠经颅直流电刺激实验,选择40 μ A,30min,tDCS组大鼠进行阳极刺激,TBI组只有始末各进行10s阳极刺激。

1.5 蛋白提取及 Western Blot法检测BDNF蛋白的表达

依据组织蛋白抽提试剂盒说明书,按如下步骤提取前额叶和海马蛋白质:冰面上分离提取大鼠前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)组织,蛋白提取试剂盒提取前额叶皮质及海马蛋白,充分磨匀,12kg冷冻条件下离心10min,收集上清液并分装于小管内后置于液氮罐内备用。测定蛋白浓度后上样及电泳。①将蛋白与4 $\times$ 蛋白上样缓冲液以3:1比例混合在沸水浴中煮5min。离心后在玻璃板上的上样孔依次上样。②80V在浓缩胶中电泳20min后,Marker分离出红线时改为稳压100V继续电泳,待溴酚蓝的电泳接近胶的底时(大约70min)停止电泳。③转膜:卸下胶,根据Marker位置切下BDNF蛋白及 β -actin所在的胶,将胶浸于缓冲液中,剪取与胶大小及长度一致的PVDF膜(BDNF及 β -actin均0.45 μ m),活化PVDF膜于甲醇中8min,在湿转架中按负极至正极的顺序依次放置滤纸、胶、PVDF膜、滤纸,用玻璃棒赶去平面上气泡,按正负级上好湿转装置,以稳流200mA转膜80min。④封闭:转膜结束后,将PVDF膜放入5%脱脂牛奶进行封闭,置于摇床上室温下慢摇2h。⑤结合一抗:将封闭结束的PVDF膜浸入一抗反应液(BDNF的一抗稀释比例为1:2000, β -actin一抗稀释比例为1:2000)4 $^{\circ}$ C过夜。次日将膜用TTBS冲洗3次,每次10min,将膜上残留的一抗反应液洗去。⑥结合二抗:将洗过的PVDF膜浸入二抗反应液(BDNF的二抗稀释比例为1:2000, β -actin二抗稀释比例为1:3000),于室温下摇床上反应1h,将膜用适量TTBS清洗3次,每次15min,将膜上残留液洗去。⑦化学发光、曝光:

将PVDF膜上残余液用滤纸吸去,置入新鲜配制的化学发光显影液中,与显影液充分接触,在暗室中见到淡绿色荧光条带后,在Biomed机上曝光条带。⑧分析蛋白表达水平:使用QuantityOne软件分析条带的光密度值。将所得BDNF条带的光密度值与内参蛋白 β -actin相除,得到BDNF相对蛋白表达量。

1.6 统计学分析

各组大鼠之间意识水平的差别用秩和检验,不同组别和时间点的BDNF表达以均值 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS 17.0统计软件进行Western Blot数据的方差齐性检验、单因素方差分析。

2 结果

2.1 意识状态变化

治疗后6h、12h、24h再次行为学评估,TBI组18只大鼠中6只清醒,12只昏迷(其中V级5只,VI级7只);tDCS组18只大鼠中11只大鼠清醒,7只仍昏迷状态(其中V级5只,VI级2只)。空白组18只觉醒(大鼠出现翻正反射时被定义为觉醒),三组大鼠的觉醒水平呈现“空白组>tDCS组>TBI组”的趋势。

2.2 前额叶皮质及海马BDNF表达

组间比较:PFC在12h点比较,三组的BDNF含量呈“空白组、TBI组、tDCS组”依次递增趋势,差异有显著性意义($P<0.05$);而在6h、24h点比较,三组的BDNF含量虽然也呈“空白组、TBI组、tDCS组”依次递增趋势,但组间BDNF含量差异无显著性意义($P>0.05$)。见图1,表1。海马BDNF表达在6h、12h点呈现“空白组、TBI组、tDCS组”依次递增趋势,6h点差异有显著性意义($P<0.05$),12h点差异无显著性意义($P>0.05$),海马BDNF表达在24h点呈现“空白组、tDCS组、TBI组”依次递增趋势,差异无显著性意义($P>0.05$)。见图2,表2。

组内比较:每组大鼠PFC内的BDNF在6h、12h、24h间比较差异无显著性意义($P>0.05$)。见表1。在海马内则表现为空白组和tDCS组BDNF含量在6h、12h、24h间无显著性差异($P>0.05$);TBI组大鼠海马BDNF含量呈现“6h、12h、24h”依次递增趋势,差异有显著性意义($P<0.05$)。见表2。

表1 大鼠前额叶皮质不同时间点BDNF的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	6h	12h	24h
空白组	2.62±0.39	1.66±0.20	1.88±0.25
TBI组	2.65±0.81	2.32±0.49 ^①	2.94±0.94
tDCS组	3.80±1.15	5.15±0.28 ^{①②}	3.48±0.82

与空白组比较:① $P < 0.05$;与TBI组比较:② $P < 0.05$ 表2 大鼠海马BDNF在不同时间点的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	6h	12h	24h
空白组	1.88±0.22	2.40±0.21	2.40±0.25
TBI组	3.22±0.58 ^①	3.27±0.83	5.25±1.07 ^{①③}
tDCS组	5.12±0.19 ^{①②}	4.36±0.52 ^①	5.15±0.85 ^①

与空白组比较:① $P < 0.05$;与TBI组比较:② $P < 0.05$;与6h组比较:③ $P < 0.05$

图1 三组大鼠前额叶皮质内BDNF在不同时间点的表达

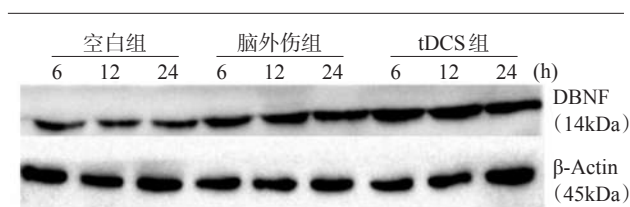
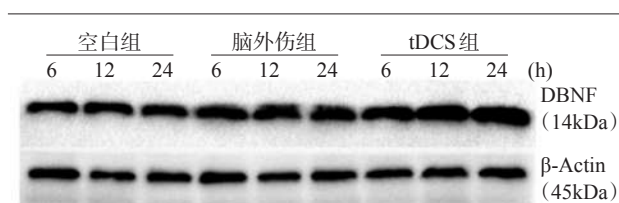


图2 三组大鼠海马中BDNF在不同时间点的表达



3 讨论

近年来TBI所致昏迷依旧是高发病率、高死亡率、高致残率的疾病。如何更有效地治疗TBI昏迷,减少患者的死亡率及提高患者的生存质量正是神经科学领域的重点研究方向。TBI之后可发生原发性和继发性脑损害改变,前者包括脑动静脉破裂导致神经元和脑白质弥漫性损害,后者包括脑缺血缺氧、二氧化碳蓄积、颅内压升高等造成的损害,当这些损害引起脑干网状激活系统功能失活和大脑兴奋性与抑制性递质的失衡时,TBI昏迷便由此产生,目前临床上常采用综合的促醒方法治疗TBI昏迷,联合药物、高压氧、针灸,但治疗后仍有相当一部分患者处于昏迷状态,研究出新的安全有效的促醒方法迫在眉睫,tDCS可能是一项潜在的促醒治疗方法。

本实验在tDCS促醒作用研究方面表明,TBI组

有12只大鼠昏迷(V级8只,VI级4只)、6只觉醒,而tDCS组7只大鼠昏迷(V级3只,VI级4只)、11只觉醒,两组大鼠意识水平比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。tDCS可通过微电流刺激大脑,激活脑神经细胞并且可直接作用于大脑皮质增加皮质兴奋性,近年研究表明tDCS对各类神经系统疾病均有一定治疗作用,这些疾病包括脑卒中后失语、帕金森病、难治性癫痫、抑郁症等^[16-19],特别是tDCS可以提高昏迷患者意识水平^[20],具备促醒潜能,tDCS提高大脑皮质兴奋性的机制可能有:①tDCS阳极引起静息膜电位去极化的改变,使皮质的兴奋性提高,微弱电流直接调节神经细胞活动或者膜的极化可能是tDCS刺激后即时作用的主要机制^[21-22];②除了即时作用外,tDCS同样有刺激后效应,如果刺激时间持续足够长,大脑皮质的改变可持续达1h或更久^[23];③tDCS同样可以调节远隔皮质及皮质下区域兴奋性^[24],阳极的tDCS可能增加兴奋性来对抗TBI引起的异常的 γ -氨基丁酸效应^[25],利于去除皮质抑制,唤起觉醒;④tDCS通过调节BDNF表达提高突触可塑性,利于修复损伤脑组织^[26]。

在tDCS作用分子机制研究方面,本实验发现,TBI后大鼠的PFC及海马内BDNF表达升高,这与Grundy等^[27-28]的研究结果类似,表明BDNF可能参与脑外伤应激保护作用,经过tDCS治疗后TBI大鼠的PFC及海马内BDNF表达进一步升高,这与Yoon KJ等^[29]研究tDCS提高了BDNF的表达水平一致,tDCS组与TBI组表达比较有显著性差异($P < 0.05$),提示BDNF可能参与tDCS促醒机制,但tDCS是直接引起BDNF亦或是间接引起其上升还有待探索。BDNF属于神经营养物质,是在脑内合成的一种蛋白质,广泛分布于中枢神经系统内,可通过多种方式发挥作用,对神经元的存活、分化、生长等起非常重要作用。BDNF的脑保护作用包括^[30]:①防止神经元受损伤后死亡、减轻神经元的病理状态,促进受损伤神经元再生;②调节兴奋性神经递质乙酰胆碱、多巴胺等的分泌,促进神经细胞的抗衰老和对抗损伤性刺激;③成熟中枢神经系统的神经元生存及维持正常生理功能需要BDNF,应激、缺血、低血糖以及脑损伤等导致BDNF表达增加,可能具备病理条件下的脑保护作用。综上所述,大鼠PFC及海马

内的BDNF表达升高,可能是大鼠的一种自我保护机制,经过tDCS处理后,BDNF表达进一步升高,提示BDNF可能参与tDCS促醒机制,提高TBI昏迷大鼠意识水平。

本实验目前为止只研究了tDCS对BDNF表达的影响,其对BDNF下游分子及信号通路的影响也还有待明确,24h之后tDCS对BDNF调节变化等也值得进一步研究。

4 结论

tDCS作为一种非侵入性、安全、简便的电刺激方法,可能成为潜在的TBI昏迷促醒技术,通过激活大脑皮质觉醒及其邻近区域,有助于去除TBI后皮质抑制,对TBI昏迷起治疗作用,其促醒机制可能与上调PFC及海马的BDNF表达有关,但其具体作用机制,特别是信号通路方面等尚待探索。

参考文献

- [1] 刘明铎.实用颅脑损伤学[M].北京:人民军医出版社,2003.508—509.
- [2] 任玉倩,崔云,张育才,等.儿童意外伤害病因及预后[J].中国急救复苏与灾害医学杂志,2015,(2):104—107.
- [3] Harch PG, Andrews SR, Fogarty EF, et al. A phase I study of low-pressure hyperbaric oxygen therapy for blast-induced post-concussion syndrome and post-traumatic stress disorder[J]. J Neurotrauma, 2012, 29(1):168—185.
- [4] 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.
- [5] Mastroeni C, Bergmann TO, Rizzo V, et al. Brain-derived neurotrophic factor--a major player in stimulation-induced homeostatic metaplasticity of human motor cortex?[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e57957.
- [6] Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation[J]. J Physiol, 2000, 527(Pt 3):633—639.
- [7] 朱琳,刘霖,宋为群,等.经颅直流电刺激联合手部功能生物反馈电刺激对卒中后手功能改善的影响[J].中国脑血管病杂志,2016,13(09):449—454.
- [8] Harty S, Robertson IH, Miniussi C, et al. Transcranial direct current stimulation over right dorsolateral prefrontal cortex enhances error awareness in older age[J]. J Neurosci, 2014, 34(10):3646—3652.
- [9] Angelakis E, Liouta E, Andreadis N, et al. Transcranial direct current stimulation effects in disorders of consciousness[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2014, 95(2):283—289.
- [10] 孙萌萌,刘兰芬.脑源性神经营养因子BDNF与精神分裂症的关联性研究进展[J].精神医学杂志,2011,24(5):392—394.
- [11] 邵淑红,李尊岭,潘芳,等.急、慢性应激对大鼠海马BDNF表达的影响[J].基础医学与临床,2012,32(4):428—432.
- [12] Fritsch B, Reis J, Martinowich K, et al. Martinowich, K., et al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning[J]. Neuron, 2010, 66(2):198—204.
- [13] 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.
- [14] Feng Z, Du Q. Mechanisms responsible for the effect of median nerve electrical stimulation on traumatic brain injury-induced coma: orexin-A-mediated N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 upregulation[J]. Neural Regen Res, 2016, 11(06):951—956.
- [15] 李一言.经颅直流电刺激改善帕金森大鼠行为学症状的研究[D].重庆:重庆大学,2012.
- [16] 汪洁,吴东宇,袁英,等.经颅直流电刺激对非流利型原发性进行性失语症语言功能的作用[J].中国康复医学杂志,2015,30(11):1112—1117.
- [17] San-Juan D, Calcáneo Jde D, González-Aragón MF, et al. Transcranial direct current stimulation in adolescent and adult Rasmussen's encephalitis[J]. Epilepsy Behav, 2011, 20(1):126—131.
- [18] Pereira JB, Junqué C, Bartres-Faz D, et al. Modulation of verbal fluency networks by transcranial direct current stimulation (tDCS) in Parkinson's disease[J]. Brain Stimul, 2013, 6(1):16—24.
- [19] Martin DM, Alonzo A, Ho KA, et al. Continuation transcranial direct current stimulation for the prevention of relapse in major depression[J]. J Affect Disord, 2013, 144(3):274—278.
- [20] Burns N, Bavishi S, Bockbrader M, et al. Poster 57 transcranial direct current stimulation for minimally conscious state: A case report[J]. PM&R, 2015, 7(9): S110.
- [21] 袁英,汪洁,孙妍,等.经颅直流电刺激对吞咽失用症及皮质兴奋性的作用[J].中国康复医学杂志,2012,27(06):497—503.
- [22] Nitsche MA, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans[J]. Neurology, 2001, 57(10):1899—1901.
- [23] Knotkova H, Portenoy RK, Cruciani RA. Transcranial direct current stimulation (tDCS) relieved itching in a patient

(下转第285页)