·基础研究·

深部脑刺激对脑外伤昏迷大鼠前额叶皮质γ-氨基丁酸 b受体表达变化的影响*

方龙君[1] 熊 婧[1] 江 健[1] 钟琳阳[1] 冯 珍[1,2]

摘要

目的：研究深部脑刺激(DBS)对脑外伤（TBI）昏迷大鼠前额叶皮层γ-氨基丁酸（GABA）b受体表达变化的影响及促醒可能机制。

方法：将54只成年标准大鼠随机分为空白组、假刺激组、刺激组，应用DBS治疗TBI昏迷大鼠，观察其行为学变化，实验完成后12h处死每组大鼠，用蛋白质印迹法（WB）及免疫荧光技术检测前额叶皮质区GABA b受体的表达。

结果：①刺激组18只大鼠中16只大鼠出现翻正反射，假刺激组18只中9只出现翻正反射；②WB检测显示，刺激组大鼠前额叶皮质区GABA b受体表达水平显著低于假刺激组（$P<0.05$）；③免疫荧光检测显示，刺激组大鼠前额叶皮质区GABA b受体表达水平显著低于假刺激组（$P<0.05$）。

结论：DBS可提高TBI昏迷大鼠意识状态，其机制可能与下调前额叶皮质区GABA b受体表达有关。

关键词 昏迷；促醒；深部脑刺激；脑外伤；γ-氨基丁酸b受体

中图分类号：R651.15，R49 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-1242(2021)-01-0010-06

Effects of deep brain stimulation on expression of γ-aminobutyric acid b receptor in prefrontal cortex of coma rats post traumatic brain injury/FANG Longjun，XIONG Jing，JIANG Jian，et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine，2021，36(1)：10—15

Abstract

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

Method： Standard rats were divided into 3 groups：control group，sham-stimulation group，stimulation group. DBS was applied to TBI coma rats. Then，the behaviors were observed and the prefrontal cortices of each group were extracted at 12h after the experiment. Western Blot(WB) and Immunofluorescence technique were used to detect the expressions of GABA b receptor.

Result： Sixteen of 18 rats exhibited righting reflex in the stimulation group, and 9 of 18 rats had the same responses in the sham-stimulation groups.GABA b receptor levels in the stimulated groups were lower than the sham-stimulation groups in prefrontal cortex under WB($P<0.05$). GABA b receptor levels in the stimulated groups were lower than the sham-stimulation groups in prefrontal cortex under Immunofluorescence technique ($P<0.05$).

Conclusion：DBS could raise consciousness in TBI induced coma rats, and the potential mechanism may be related to the decreas of the expression of GABA b receptor in prefrontal cortex.

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

Key word coma；wake-promoting；deep brain stimulation；traumatic brain injury；GABA b receptor

DOI：10.3969/j.issn.1001-1242.2021.01.003

*基金项目：国家自然科学基金资助课题（81660382，81260295）

1 南昌大学第一附属医院康复医学科，江西省南昌市，330006；2 通讯作者

第一作者简介：方龙君，男，硕士研究生；收稿日期：2019-04-24

脑外伤(traumatic brain injury,TBI)是全球死亡和致残的主要原因,据流行病学研究报道,全球每年大约5000多万人患有严重的TBI,其中高达10%—15%的幸存者因TBI导致长期处于持续植物状态或最小意识状态,严重影响了患者的预后和转归[1—2]。深部脑刺激(deep brain stimulation,DBS)是一种新型的神经调控技术,早期主要应用于帕金森病、特发性震颤、肌张力障碍等疾病的治疗[3]。近年来,有学者发现DBS对于TBI昏迷患者的意识状态水平具有一定的改善作用,但具体作用机制仍不明确,目前认为主要与激活网状上行激活系统、增加脑血流灌注、影响神经递质分泌等有关。γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid,GABA)作为一种广泛分布于中枢神经系统内的抑制性神经递质,研究发现其可通过作用于GABA b受体参与癫痫、焦虑、成瘾、睡眠等多种生理病理发生过程[4—5]。本课题组前期研究发现GABA b受体的表达活性与TBI后昏迷的发生密切相关,降低GABA b受体表达活性可显著改善TBI后昏迷大鼠意识状态水平,促进觉醒[6—7]。然而,DBS昏迷促醒作用与GABA b受体表达活性关联性如何,国内外尚未见相关报道。因此,本实验旨在探讨DBS昏迷促醒作用与GABA b受体表达变化的关系,以期为DBS昏迷促醒机制研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器及材料

脑立体定位仪(SA102,上海玉研科学仪器有限公司)、异氟烷呼吸麻醉机(上海玉研科学仪器有限公司)、生物机能实验系统(BL420S,成都泰盟软件有限公司)、平头微量进样器(10μl宁波镇海三爱仪器厂)、牙科钻(上海美耐特实业有限公司)、自制自由落体撞击器、抗GABA b抗体(香港Abcam有限公司)。

1.2 实验动物及分组

选用成年健康清洁级Wistar种系大鼠54只,体重250—300g,雌雄不限,由南昌大学动物科学部提供。大鼠在标准环境下饲养,室温控制在20—25℃左右,24h昼夜循环光照,自由进食饮水。

大鼠编号001—054,采用随机数字表法平均分为空白组、假刺激组及刺激组3组,每组各18只。空白组:正常大鼠;假刺激组:昏迷大鼠安置双极铂铱合金电极至两侧丘脑后,不给予电刺激;刺激组:昏迷大鼠安置双极铂铱合金电极至两侧丘脑后,给予电刺激。若实验过程中大鼠出现死亡,则从资料中剔除后并补充相应数量大鼠继续实验。

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。

1.3 TBI昏迷大鼠模型建立

本实验应用"自由落体撞击法"构建TBI昏迷大鼠模型[8]。采用2%异氟醚面罩吸入麻醉大鼠,待大鼠出现四肢松弛性瘫痪但呼吸平顺时,将大鼠置于立体定位架上,额顶部备皮消毒,切开并钝性剥离头皮及骨膜,暴露颅骨,并在冠状缝与人字缝间固定一大小适宜的薄铝垫片,待大鼠恢复刺痛反射后,根据体重不同,将400g的圆柱形撞击锤从38—44cm高度,沿垂直金属杆自由下落,撞击固定于顶骨上的薄铝垫片,致颅脑损伤,缝合头皮,消毒后放回笼内,给予保暖措施。

1.4 行为学评估

造模完成后1h,根据大鼠的感觉、运动功能,将大鼠意识状态分6级[9],Ⅰ级:笼内活动如常;Ⅱ级:笼内活动减少;Ⅲ级:笼内活动减少且运动失调;Ⅳ级:翻正反射存在,但不能站立;Ⅴ级:翻正反射消失,但后爪对疼痛刺激有反应;Ⅵ级:对任何刺激均无反应;若大鼠意识状态处于Ⅴ、Ⅵ级即为造模成功。本实验完成后0.5h需再次应用双盲法评估空白组、假刺激组及刺激组大鼠意识状态水平。

1.5 DBS方法及参数设置

大鼠麻醉后,剥离骨膜,利用三维立体定向仪将同轴双极铂铱合金电极置入双侧丘脑区(距前囟点后:−2.80mm,外:±1.40mm, 深:−5.20mm)[10]。刺激参数[11]:频率:200Hz;脉宽:0.1ms;电压:2—4V。刺激组左右两侧交替各刺激5min,持续1h。实验完毕,返回笼中。假刺激组按刺激组同样操作,但不给予电刺激。

1.6 组织蛋白提取及检测

在实验完成后12h,3组大鼠分别处死,并提取前额叶皮质区脑组织切片,采用免疫荧光技术及蛋白质印迹法(Western Blot,WB)测定3组大鼠前额叶皮质区GABA b受体的表达情况。

1.7 统计学分析

实验结束后0.5h各组大鼠之间意识状态水平的比较采用秩和检验，不同组别的GABA b受体表达水平以均数±标准差表示，使用SPSS19.0进行统计分析，不同组别间的WB及免疫荧光数据行方差齐性检验，若方差齐性，则进行单因素方差分析，若方差不齐，则进行Krusakl-Wallis *H*检验。$P<0.05$时认为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 行为学变化

实验结束后0.5h对3组大鼠进行行为学评估，空白对照组18只大鼠在笼内活动如常，意识状态均为Ⅰ级；假刺激组18只大鼠中Ⅲ级9只，Ⅴ级3只，Ⅵ级6只；刺激组18只大鼠中Ⅲ级10只，Ⅳ级6只，Ⅴ级2只。3组大鼠意识状态等级依次呈“空白组<刺激组<假刺激组”，且组间比较差异具有显著性意义（$P<0.05$），见表1。

2.2 Western Blot检测结果

3组大鼠前额叶皮质区GABA b受体表达水平“空白组<刺激组<假刺激组”，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）；与空白组相比，假刺激组GABA b受体的表达明显升高，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）；与假刺激组相比，刺激组GABA b受体的表达明显降低，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）。见图1，表2。

2.3 免疫荧光技术检测结果

3组大鼠前额叶皮质区GABA b受体表达水平“空白组<刺激组<假刺激组”，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）；与空白组相比，假刺激组GABA b受体的表达明显升高，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）；与假刺激组相比，刺激组GABA b受体的表达明显降低，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）。见图2，表2。

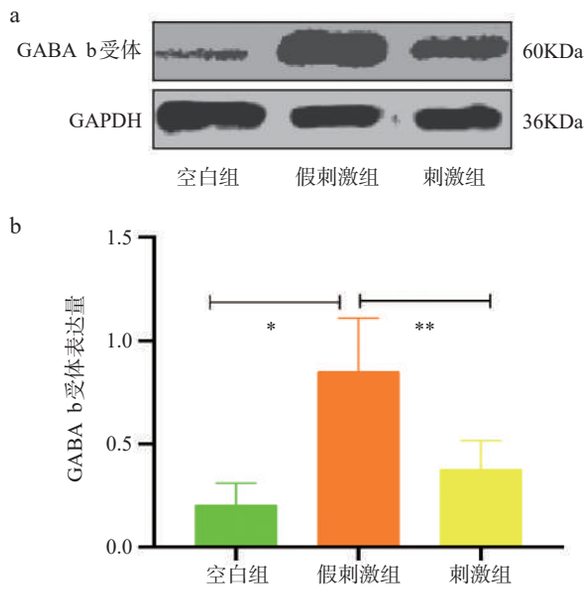
表1 实验后0.5h行为学评估结果

	空白组	假刺激组	刺激组
秩均数	9.50	48.50	41.22
样本量	18	18	18

表2 前额叶皮质区GABA b受体相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=18）

	空白组	假刺激组	刺激组
WB	0.205±0.106	0.850±0.260	0.378±0.139
免疫荧光	0.320±0.137	1.477±0.510	0.611±0.210

图1 WB检测前额叶皮质区GABA b受体表达情况

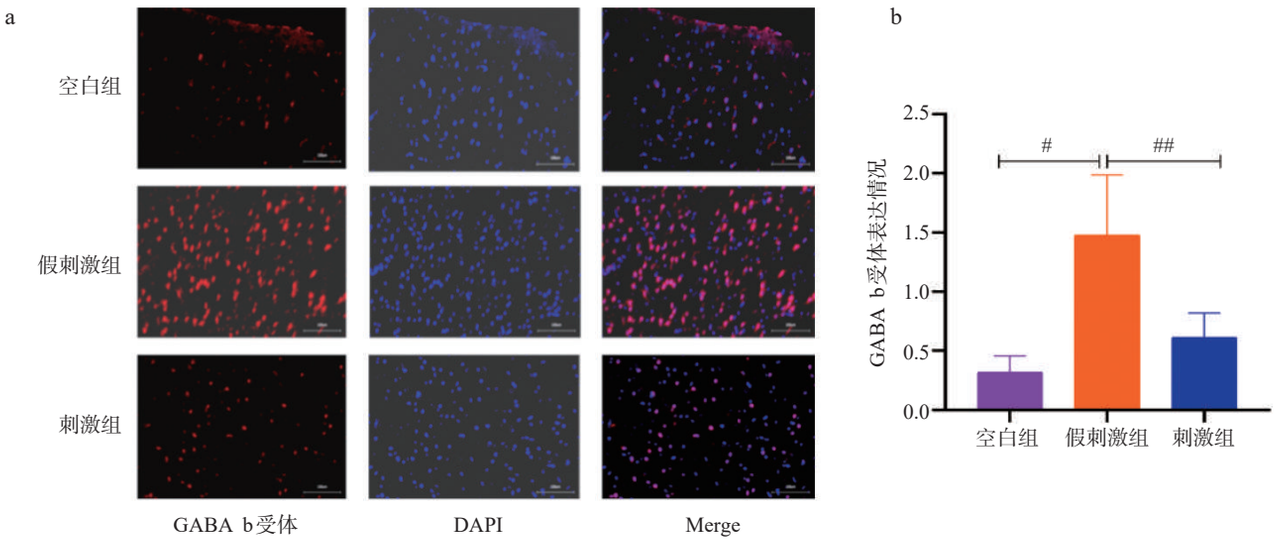


注：a图为典型的WB检测前额叶皮质区GABA b受体表达的条带图，GAPDH为内参条带；b图为前额叶皮质区GABA b受体表达的组间比较：*为空白组与假刺激组相比，假刺激组GABA b受体表达量显著高于空白组，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）；**为刺激组与假刺激组相比，刺激组GABA b受体表达量显著低于假刺激组，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）。

3 讨论

DBS作为一种新型神经调控技术，主要利用立体定向技术，将刺激电极植入脑深部特定神经核团，通过调控胸前脉冲发生器对神经核团进行刺激，从而调节神经元异常电活动，改善患者临床症状，达到治疗目的。近20年来随着DBS神经调控技术的快速发展，大量文献报道DBS对于意识障碍患者的促醒治疗具有独特疗效。早期，法国、日本和美国等参与的多中心临床研究表明DBS可有效提高重度颅脑损伤患者的意识状态水平[12—13]。随后，2016年Magrassi等[14]也通过前瞻性研究发现DBS可明显提高意识障碍患者CRS-R（coma recovery scale-revised scores）得分，改善患者肢体痉挛等临床症状。2018年，Lemaire等[15]通过对5例严重意识障碍患者接受DBS治疗后的促醒效果进行了11个月的长期观察，发现DBS可显著改善昏迷患者视觉、听觉、言语、运动等功能，且该作用可能与DBS激活大脑内侧皮质区神经元活性有关。2017年，Chudy

图2 免疫荧光检测前额叶皮质区GABA b受体表达情况



注:a图为典型的免疫荧光检测前额叶皮质区GABA b受体表达的电镜图,DAPI为4,,6-二脒基-2-苯基吲哚染色图,Merge为溶图;b图为前额叶皮质区GABA b受体表达的组间比较:#为空白组与假刺激组相比,假刺激组GABA b受体表达量显著高于空白组,且差异具有显著性意义($P<0.05$);##为刺激组与假刺激组相比,刺激组GABA b受体表达量显著低于假刺激组,且差异具有显著性意义($P<0.05$)。

等[16]通过早期应用DBS治疗14例意识障碍患者(包括10例持续植物状态和4例最小意识状态患者),随访38—60个月后发现,3例最小意识状态患者意识障碍水平均完全恢复,其中2例可流利交流、独立行走、日常生活能力自立;10例持续植物状态患者中1例可进行简单的指令活动,3例死亡,7例意识状态无明显改善。

本实验结束后0.5h通过观察大鼠行为学变化发现:假刺激组18只大鼠中Ⅲ级9只,Ⅴ级3只,Ⅵ级6只;刺激组18只大鼠中Ⅲ级10只,Ⅳ级6只,Ⅴ级2只,3组大鼠意识状态等级为"空白组<刺激组<假刺激组",且组间比较差异具有显著性意义($P<0.05$)。该结果表明DBS对于TBI昏迷大鼠意识状态水平具有显著的改善作用,可帮助昏迷大鼠快速觉醒,极大缩短昏迷促醒进程。该发现与前期研究结论一致。关于DBS昏迷促醒作用机制,现认为主要可能与以下方面有关:①DBS通过丘脑直接兴奋大脑皮质和网状上行激活系统,增强脑电活动,改善神经电生理功能,维持正常觉醒状态[17—18];②DBS通过增加脑血流量及脑代谢水平,改善神经元细胞供血、供氧能力,促进神经元细胞的增殖和修复[19—21];③DBS通过促进神经递质的分泌,如兴奋性神经递质多巴胺等,维持正常觉醒周期[22]。目前,国内外针对DBS昏迷促醒作用的机制研究尚少,具体作用机制仍尚不明确。

GABA是中枢神经系统内一种广泛存在的抑制性神经递质,研究表明内源性GABA可通过作用于GABA b受体影响神经元细胞膜表面K^+通道、Ca^{2+}通道和腺苷酸环化酶等活性,从而参与癫痫、焦虑、成瘾、睡眠等生理或病理过程。研究表明嗜睡大鼠前额叶皮质和丘脑内GABA b受体含量较正常大鼠明显增多[4—5]。GABA b受体活性降低可缩短睡眠时间,减少非快速动眼期(non-rapid eye movement,NREM)δ波和θ波活性,提高觉醒期theta波活性[23]。GABA b受体激动剂巴氯芬可通过激活去甲肾上腺素能神经元,促进K^+内流,引起神经元超极化,进而增强慢波活性,促进睡眠[24]。本课题组前期研究也发现:前额叶皮质区内GABA b受体的表达与TBI后昏迷的发生密切相关,降低GABA b受体表达活性有助于TBI后昏迷大鼠向觉醒状态转变[6—7]。然而,目前关于DBS昏迷促醒机制与GABA b受体表达的关联性如何,尚未见文献报告。

本实验通过WB及免疫荧光技术检测TBI后昏迷大鼠前额叶皮质区内GABA b受体表达活性发现：3组大鼠前额叶皮质区内GABA b受体表达水平“空白组<刺激组<假刺激组”；假刺激组与空白组相比，GABA b受体表达活性明显升高，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）；刺激组与假刺激组相比，GABA b受体表达活性明显降低，且差异具有显著性意义（$P<0.05$）。该结果表明：DBS对TBI后昏迷大鼠前额叶皮质区内GABA b受体表达具有显著影响，其可通过抑制GABA b受体的表达，提高昏迷大鼠意识状态水平，促进大鼠觉醒。本课题组推测该机制可能与DBS抑制了丘脑网状核内GABA能神经元表达活性有关。研究表明丘脑涉及的神经核团主要包括丘脑中央核、中央中—束旁核复合体、丘脑板内核、丘脑网状核等，其中丘脑网状核主要由GABA能神经元聚集而成，参与了机体感觉、注意力和觉醒等生理调节过程[25—26]；丘脑网状核在丘脑到大脑皮质的信号传导路径中发挥了桥梁作用，既能接受来自丘脑和皮质区的兴奋性输入，也可为丘脑和大脑皮质提供抑制性输入[27—29]。TBI昏迷大鼠接受DBS治疗后丘脑网状核受内GABA能神经元活性受到抑制，丘脑和大脑皮质区内抑制性输入相应减少，神经元兴奋性增高，神经电生理功能改善，有助于机体维持正常觉醒状态。

4 结论

该实验进一步验证了DBS对TBI后昏迷促醒具有显著疗效，并揭示了DBS促醒机制与下调前额叶皮质区GABA b受体表达密切相关。但基于本研究仅探讨了DBS对前额叶皮质区GABA b受体单个时间点表达变化的影响，尚未涉及其他时间点变化，且未利用GABA b受体激动剂进行对照研究，未来仍需进一步深入相关研究。

参考文献

[1] Jiang J，Gao G，Feng J，et al. Traumatic brain injury in China[J]. Lancet Neurol，2019，18(3)：286—295.

[2] Levin HS，Saydjari C，Eisenberg HM，et al. Vegetative state after closed-head injury.A Traumatic Coma Data Bank Report[J]. Arch Neurol，1991，48(6)：580—585.

[3] Sharma M，Naik V，Deogaonkar M. Emerging applications of deep brain stimulation[J]. J Neurosurg Sci，2016，60(2)：242—255.

[4] Lin FH，Cao Z，Hosford DA. Increased number of GABA B receptors in the lethargic (lh/lh) mouse model of absence epilepsy[J]. Brain Res，1993，608(1)：101—106.

[5] Lin FH，Wang Y，Lin S，et al. GABA B receptor-mediated effects in synaptosomes of lethargic (lh/lh) mice[J]. J Neurochem，2010，65(5)：2087—2095.

[6] 魏天祺，冯珍. 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[J]. 中国康复医学杂志，2016，31(1)：9—13.

[7] 廖诚诚，冯珍，黄菲菲，等. 迷走神经电刺激对脑外伤昏迷大鼠意识及前额叶皮质γ-氨基丁酸b1受体表达的影响[J]. 中国康复理论与实践，2017，23(9)：1037—1042.

[8] Feeney DM，Boyeson MG，Linn RT，et al. Responses to cortical injury：I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res，1981，211(1)：67—77.

[9] Stephens JR，Levy RH. Effects of valproate and citrulline on ammonium-induced encephalopathy[J]. Epilepsia，1994，35(1)：164—171.

[10] Kundishora AJ，Gummadavelli A，Ma C，et al. Restoring conscious arousal during focal limbic seizures with deep brain stimulation[J]. Cereb Cortex，2017，27(3)：1964—1975.

[11] Whiting DM，Tomycz ND，Bailes J，et al. Lateral hypothalamic area deep brain stimulation for refractory obesity：a pilot study with preliminary data on safety，body weight and energy metabolism[J]. J Neurosurg，2013，119(1)：56—63.

[12] Hosobuchi Y，Yingling C. The treatment of prolonged coma with neurostimulation[J]. Adv Neurol，1993，63：247—251.

[13] Schiff ND，Giacino JT，Kalmar K，et al. Behavioural improvements with thalamic stimulation after severe traumatic brain injury[J]. Nature，2007，448(7153)：600—603.

[14] Magrassi L，Maggioni G，Pistarini C，et al. Results of a prospective study (CATS) on the effects of thalamic stimulation in minimally conscious and vegetative state patients [J]. J Neurosurg，2016，125(4)：972—981.

[15] Lemaire JJ，Sontheimer A，Jean B，et al. Deep brain stimulation in five patients with severe disorders of consciousness[J]. Ann Clin Transl Neurol，2018，5(11)：1372—1384.

[16] Chudy D，Deletis V，Almahariq F，et al. Deep brain stimulation for the early treatment of the minimally conscious state and vegetative state：experience in 14 patients[J]. J Neurosurg，2018，128(4)：1189—1198

[17] Giacino J，Fins JJ，Machado A，et al. Central thalamic deep brain stimulation to promote recovery from chronic posttraumatic minimally conscious state：challenges and opportunities[J]. Neuromodulation，2012，15(4)：339—349.

[18] Mcintyre CC，Mori S，Sherman DL，et al. Electric field and stimulating influence generated by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus[J]. Clin Neurophysiol，2004，115(3)：589—595.

[19] Yamamoto T，Katayama Y，Kobayashi K，et al. Deep brain stimulation for the treatment of vegetative state[J].

Eur J Neurosci，2010，32(7)：1145—1151.
[20] Georgiopoulos M，Katsakiori P，Kefalopoulou Z，et al. Vegetative state and minimally conscious state：a review of the therapeutic interventions[J]. Stereotact Funct Neurosurg，2010，88(4)：199—207.
[21] Schiff ND，Giacino JT，Fins JJ.Deep brain stimulation，neuroethics，and the minimally conscious state：moving beyond proof of principle[J].Arch Neurol，2009，66(6)：697—702.
[22] Clauss RP. Neurotransmitters in coma，vegetative and minimally conscious states，pharmacological interventions.[J]. Med Hypotheses，2010，75(3)：287—290.
[23] Vienne J，Bettler B，Franken P，et al. Differential effects of GABA B receptor subtypes，{gamma}-hydroxybutyric Acid，and Baclofen on EEG activity and sleep regulation [J]. J Neurosci，2010，30(42)：14194—14204.
[24] Black SW，Morairty SR，Chen TM，et al. GABA agonism promotes sleep and reduces cataplexy in murine narcolepsy[J]. J Neurosci，2014，34(19)：6485—6494.
[25] Lewis LD，Voigts J，Flores FJ，et al. Thalamic reticular nucleus induces fast and local modulation of arousal state [J]. Elife，2015，4：e8760.
[26] McIntyre CC，Mori S，Sherman DL，et al. Electric field and stimulating influence generated by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus[J]. Clin Neurophysiol，2004，115(3)：589—595.
[27] McAlonan K，Cavanaugh J，Wurtz RH. Guarding the gateway to cortex with attention in visual thalamus[J]. Nature，2008，456(7220)：391—394.
[28] Guillery RW，Harting JK. Structure and connections of the thalamic reticular nucleus：Advancing views over half a century[J]. J Comp Neurol，2003，463(4)：360—371.
[29] Pinault D. The thalamic reticular nucleus：structure，function and concept[J]. Brain Res Brain Res Rev，2004，46 (1)：1—31.