

# 迷走神经电刺激治疗对脑外伤意识障碍大鼠前额叶皮层NLRP3炎症小体表达变化的影响\*

董晓阳<sup>1</sup> 陈利薇<sup>1</sup> 王子雯<sup>1</sup> 刘军仕<sup>1</sup> 冯 珍<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:**研究前额叶皮层NLRP3(nucleotide-binding domain-like receptor protein 3)炎症小体在迷走神经电刺激(vagus nerve stimulation, VNS)对脑外伤(trumatic brain injury, TBI)意识障碍大鼠的促醒作用及相关机制。

**方法:**将30只SD大鼠随机分为3组:TBI组、TBI+VNS组、TBI+VNS+NLRP3组,建立TBI意识障碍大鼠模型,应用VNS刺激TBI意识障碍大鼠,通过意识状态行为学量表评估意识状态水平改变情况,并用Western-Blot、免疫组织化学技术、QPCR技术分别检测各组大鼠前额叶皮层NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax、Bcl-2、IL-1 $\beta$ 、IL-18的表达变化。

**结果:**TBI意识障碍大鼠给予VNS刺激后意识状态水平得到改善,且前额叶皮层组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax、IL-1 $\beta$ 、IL-18的表达明显低于TBI组,Bcl-2高于TBI组;而给予NLRP3激动剂后大鼠意识状态水平下降,同时伴随前额叶皮层组织中ASC、Caspase-1、Bax、TNF- $\alpha$ 的表达升高,Bcl-2表达降低。

**结论:**VNS改善TBI大鼠意识水平的作用机制之一可能是通过抑制前额叶皮层NLRP3炎症小体的表达,最终降低神经细胞炎症反应和抗凋亡反应达到神经保护作用。

**关键词** 迷走神经电刺激;脑外伤;意识障碍;NLRP3炎症小体;神经炎症;神经凋亡

**中图分类号:**R493,R742 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-05-0587-07

Vagus nerve stimulation down regulate the expression of nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 inflammasome in prefrontal cortex of traumatic brain injury rats with disorders of consciousness/  
DONG Xiaoyang, CHEN Liwei, WANG Ziwen, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(5): 587—593

## Abstract

**Objective:** To explore effects of nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome in vagus nerve stimulation (VNS) on promoting wakefulness of rats with traumatic brain injury (TBI) induced disorders of consciousness rats.

**Method:** A total of 30 Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: TBI group, TBI+VNS group and TBI+VNS+NLRP3 group. TBI induced disorder of consciousness rat model was established, and VNS or VNS+NLRP3 agonist injection was used correspondingly to TBI rats with consciousness disorder. The level of consciousness was assessed by the State of Consciousness Behavioral Scale. Western-Blot, immunohistochemistry, and QPCR were used to detect the expression of NLRP3, ASC, Caspase-1, Bax, Bcl-2, IL-1 $\beta$ , IL-18 in the prefrontal cortex of each group of rats.

**Result:** Comparing with the TBI group, the level of consciousness was better, the expression of NLRP3, ASC, Caspase-1, Bax, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in the prefrontal cortex were significantly lower, and Bcl-2 was high-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.05.003

\*基金项目:江西省自然科学基金青年项目(20202BAB216018);江西省教育厅青年项目(GJJ190125);江西省卫生健康委员会科技计划项目(20204202);江西省中医药管理局科技计划项目(2019A117)

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:董晓阳,男,博士研究生,主治医师; 收稿日期:2021-08-09

er after VNS. Nevertheless, the level of consciousness in VNS+NLRP3 agonist injection group was decreased, and the expression of ASC, Caspase-1, Bax, and TNF- $\alpha$  in the prefrontal cortex were increased, while the expression of Bcl-2 was decreased.

**Conclusion:** One of the mechanism for VNS to improve the level of consciousness in TBI rats is to inhibit the expression of NLRP3 inflammasomes in the prefrontal cortex, thus ultimately reduce the inflammatory response and anti-apoptotic response of nerve cells to achieve neuroprotection.

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

**Key word** vagus nerve electrical stimulation; traumatic brain injury; disorder of consciousness; NLRP3 inflammasome; neuroinflammation; neuroapoptosis

随着我国社会现代化进程的快速发展,因交通伤、坠落伤、运动损伤、自然灾害、大型公共突发事件及其它意外事故等引起的脑外伤(traumatic brain injury, TBI)患者日益增多,意识障碍(disorders of consciousness, DOC)是颅脑外伤后常见并发症。据报道,我国目前至少有30—50万TBI意识障碍患者因无有效的治疗手段,长期处于昏迷(coma)、植物生存状态(vegetative state, VS)/无反应觉醒综合征(unresponsive arousal syndrome, UAS)和最小意识状态(minimally conscious state, MCS),且每年新增患者超过10万,年累计医疗费用达300—500亿元<sup>[1-2]</sup>,给家庭和社会都带来了沉重的经济负担和精神压力。因此,早期对TBI意识障碍患者进行有效促醒,恢复其功能,减少致残率和提高患者的生活质量,使其真正重返家庭、回归社会,具有重要的社会意义和经济意义。

神经调控技术是近年来神经科学领域发展最迅猛的技术,我们前期研究发现迷走神经电刺激(vagus nerve stimulation, VNS)能够改善TBI意识障碍大鼠的觉醒水平<sup>[3]</sup>,其具体机制尚且不明晰。炎症小体(inflammasomes)是近年来在固有免疫系统中发现的与免疫及炎症反应密切相关的炎性物质。炎症小体激活后可活化caspase-1,活化的caspase-1分解前IL-1 $\beta$ 、前IL-6和前IL-18等前炎性细胞因子而具有活性参与神经炎症和凋亡反应。文献表明,炎症小体活化与多发性硬化、阿尔茨海默病和外伤性中枢神经系统疾病等密切相关<sup>[4-5]</sup>。同时,研究发现TBI后神经炎症和凋亡是神经元二次损伤的关键因素,且抗炎效应和抗凋亡效应是VNS特点之一。此外,前额叶皮层是意识控制的高级中枢,也是众多

睡眠/觉醒调控核团最终作用的靶点,故本研究旨在探讨前额叶皮层NLRP3炎症小体在VNS促进TBI意识障碍大鼠觉醒中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、分组、材料及仪器

成年SD大鼠30只(体重250—300g,普通级),由南昌大学医学部动物科学研究部提供,采用实验室饮食和饮水的标准方案,适应环境饲养1周后开始实验。实验方案遵循美国NIH的实验动物使用指南,经南昌大学第一附属医院动物伦理委员会批准。按照随机数字表将大鼠随机分为以下3组,每组10只。①TBI意识障碍组:建立TBI意识障碍大鼠模型,给与连接VNS刺激器,不给予VNS刺激;②TBI+VNS组:建立TBI意识障碍大鼠模型,给与连接VNS刺激器,给予VNS刺激;③TBI+VNS+NLRP3组:建立TBI意识障碍大鼠模型,侧脑室注射NLRP3激动剂,给与连接VNS刺激器,给予VNS刺激。迷走神经电刺激仪(ES—420, Sanyo, Japan)、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)。抗体试剂材料:抗NLRP3 (Abcam, ab214185)、抗ASC (Abcam, ab175449),抗caspase-1 (Novus bio, NB100-56565),抗Bax (Abcam, ab32503),抗Bcl-2 (Abcam, ab59348),抗IL-18 (Abcam, ab71495)和抗IL-1 $\beta$  (Abcam, ab9787),抗 $\beta$ -actin (Abcam, ab8226),NLRP3激动剂Nigericin sodium salt(Synonyms:尼日利亚菌素钠盐)。

## 1.2 TBI意识障碍大鼠模型建立

TBI意识障碍大鼠模型采用经典“自由落体撞击法”来构建动物模型<sup>[6]</sup>,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,致使颅骨凹陷性骨折,消毒后缝合皮肤,放回笼中。1h后根据大鼠的感觉、运动功能,将大鼠意识状态水平分6级:I级:在笼内活动正常;II级:在笼内活动减少;III级:在笼内活动减少并且运动失调;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级纳入实验中,在造模过程中出现大鼠死亡情况,再次挑选新的大鼠进行补充。

## 1.3 TBI意识障碍大鼠侧脑室注射

TBI意识障碍大鼠造模成功后按上述相同的方法麻醉,使其俯卧位,固定头部及四肢于脑立体定位仪上,消毒大鼠头顶部。用微量注射器抽取NLRP3激动剂Nigericin sodium salt(Synonyms:尼日利亚菌素钠盐),剂量为4mg/kg<sup>[7]</sup>,安装于脑立体定位仪上,将注射器针头固定于前囟点,设置定位仪参数,使针头以前囟为基点,水平向后移动1.0mm,垂直正中线向右移动1.5mm,在该处做一标记,用颅骨钻小心地钻一小孔。将针头固定于小孔的颅骨水平处,设置定位仪参数,使针头垂直插入颅骨下4.5mm,并以2.5μl/min的速度进行注射,结束后留针2min再退针,消毒,缝合头皮,并置于加热垫上,观察大鼠的反应。

## 1.4 迷走神经电刺激方法(vagus nerve stimulation, VNS)

TBI意识障碍大鼠模型建立后,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>[3]</sup>:频率30Hz,脉宽0.5ms,电流1.0mA,刺激5min,停止5min,反复进行3次,通过串联灵敏电流计判断电流是否形成环路。刺激治疗结束后30min,再次评估意识状态等级评分,将V级、VI级纳入实验中,实验完毕后放回笼中。TBI意识障碍大鼠则按刺激组(TBI+VNS)同样操作,但不给予电流输出。

## 1.5 意识状态评估及组织蛋白提取、检测

VNS刺激完成后的24h再次行意识状态水平评估,评估结束后断头处死各组大鼠,取大鼠前额叶皮质组织,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。应用免疫组织化学技术、Western-Blot法、QPCR技术分别测定NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax、Bcl-2、IL-1β、IL-18含量。

## 1.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, QPCR)

使用TRIzol试剂(Invitrogen公司)提取TBI大鼠(n=6)前额叶皮层组织中的mRNA。利用紫外线分光光度计(上海精密科技仪器公司)测定RNA浓度,然后总mRNA使用商业试剂盒(TransGen Biotech)逆转录合成cDNA,具体步骤见操作说明书。使用SYBR™ Green PCR预混液(TransGen Biotech)进行qRT-PCR,反应在StepOne实时荧光定量PCR系统(赛默飞世尔科技)上进行。扩增程序是进行具体如下:在95℃下变性15min,然后是40个循环:95℃ 10s, 60℃ 32s。为了建立PCR产物溶解曲线,从95℃开始15s,然后是60℃ 1min, 95℃下15s,使用2<sup>-ΔΔCT</sup>方法量化mRNA表达含量。所用引物见表1。

## 1.7 Western-Blot

完成意识状态水平评估后取出前额叶大脑皮层(长×宽×高:3mm×3mm×5mm),用试剂盒提取总蛋白,并测定蛋白浓度。经分离胶和浓缩胶电泳、转膜后,将硝酸纤维素膜用兔抗NLRP3(1:500, Abcam, ab214185)、ASC(1:500, Abcam, ab175449)、Caspase-1(1:1000, Novusbio, NB10056565)、Bax(1:1000, Abcam, ab32503)、Bcl-2(1:1000, Abcam, ab59348)单克隆抗体4℃孵育过夜,然后用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(稀释比1:2000, Abcam,

表1 PCR扩增的引物序列

| 基因             | 引物序列(F:上游引物,R:下游引物)               |                                    |
|----------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| NLRP3          | F: 5'-TGTGTGTCAGGATCTCGCA-3'      | R: 5'-AGTGAAGTAAGGCCGGAAT-3'       |
| ASC            | F: 5'-TTGGCTGCCGACTGAGGAGG-3'     | R: 5'-AGTGAAGTAAGGCCGGAAT-3'       |
| Caspase-1      | F: 5'-TGTGACCACTGGCATTTCATT-3'    | R: 5'-TCCTCCCTCTTCCGAGATT-3'       |
| Bax            | F: 5'-GAGGTCTTCTTCCGTGTGG-3'      | R: 5'-GATCAGCTCGGGCACTTT-3'        |
| Bcl-2          | F: 5'-AGGAATCTTCAGGGATGG-3'       | R: 5'-GCGATGTTGTCCACCAG-3'         |
| IL-1 $\beta$   | F: 5'-CCCTTGACTTGGGCTGT-3'        | R: 5'-CGAGATGCTGCTGTGAGA-3'        |
| IL-18          | F: 5'-AACGAATCCCAGACCAGAC-3'      | R: 5'-AGAGGGTAGACATCCTTCCAT-3'     |
| $\beta$ -actin | F: 5'-GTCCACCCGCGAGTACAACCTTCT-3' | R: 5'-TCCTTCTGACCCATACCACCACATC-3' |

ab8226)室温孵育2h,经显影、定影获得蛋白条带,内参蛋白为 $\beta$ -actin。用Image-lab 3.0软件对各蛋白条带的灰度值进行定量分析,目的蛋白的相对表达水平以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值来表示。

### 1.8 免疫组化

用于免疫组化染色的脑组织样本来自同一亚组的大鼠,用苏木精和伊红进行染色( $n=6$ )。IL-18和IL-1 $\beta$ 蛋白石蜡包埋切片采用免疫组化染色检测。脑组织石蜡标本切片切成5 $\mu$ m厚的切片,用二甲苯脱蜡,采用梯度为100%、95%、85%和80%乙醇脱水,并在柠檬酸缓冲液(pH6.0)中进行抗原提取30min。随后,切片冲洗3次,每次5min然后与正常山羊血清孵育20min。切片分别与兔抗IL-18(1:2000, Abcam, ab71495)和抗IL-1 $\beta$ (1:50, Abcam, ab9787)在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,二抗为山羊抗兔(1:2000, Abcam, ab8226)。用光学显微镜观察载玻片,阳性染色区域使用Image J软件(美国国家健康研究院)进行统计。

### 1.9 统计学分析

检测指标NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax、Bcl-2、IL-1 $\beta$ 、IL-18含量以均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS 21.0统计软件作单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 意识状态行为学评估

在造模过程中共有7只大鼠死亡,补充同等数量的大鼠继续完成造模。VNS治疗后1h进行行为学评估:TBI组10只大鼠中2只苏醒(Ⅲ级1只、Ⅳ级1只、Ⅴ级5只、Ⅵ级3只);

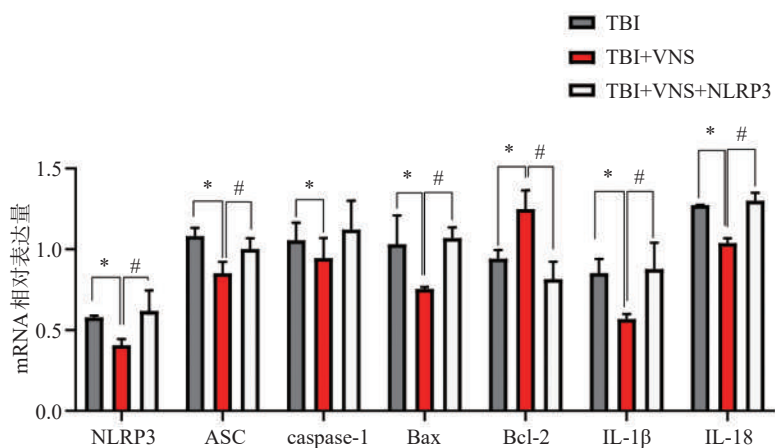
刺激组(TBI+VNS)10只大鼠中8只大鼠苏醒(Ⅱ级2只、Ⅲ级5只、Ⅳ级1只、Ⅴ级2只);TBI+VNS+NLRP3组4只大鼠苏醒(Ⅱ级1只、Ⅲ级2只、Ⅳ级1只、Ⅴ级6只)。各组大鼠苏醒只数比较依次为:TBI组<TBI+VNS+NLRP3组<TBI+VNS组(见表2)。

### 2.2 QPCR

QPCR结果提示VNS+TBI组中NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax、IL-1 $\beta$ 、IL-18明显低于TBI组(差异具有显著性);VNS+TBI组NLRP3、ASC、Bax、IL-1 $\beta$ 、IL-18低于VNS+TBI+NLRP3组,差异具有显著性;VNS+TBI组中Bcl-2明显高于TBI组和VNS+TBI+NLRP3组,差异具有显著性,见图1。

表2 各组大鼠意识状态水平比较

| 组别             | 觉醒(Ⅰ—Ⅳ级) | 意识障碍 |    |
|----------------|----------|------|----|
|                |          | V级   | Ⅵ级 |
| TBI组           | 2        | 5    | 3  |
| TBI+VNS组       | 8        | 2    | 0  |
| TBI+VNS+NLRP3组 | 4        | 6    | 0  |

图1 NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax、Bcl-2、IL-1 $\beta$ 、IL-18在各组的mRNA相对表达含量(QPCR)

\*TBI组和TBI+VNS组比较差异具有显著性意义( $P<0.05$ );#TBI+VNS组和VNS+TBI+NLRP3组比较差异具有显著性意义( $P<0.05$ )。



### 2.3 Western-Blot结果

结果提示 VNS+TBI 组中 NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax 明显低于 TBI 组和 VNS+TBI+NLRP3 组,差异具有显著性,而 Bcl-2 高于 TBI 组和 VNS+TBI+NLRP3 组,差异具有显著性,见图2。

### 2.4 免疫组化结果(IHC)

IHC 结果提示 VNS+TBI 组中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 明显低于 TBI 组和 VNS+TBI+NLRP3 组,差异具有显著性,见图3。

## 3 讨论

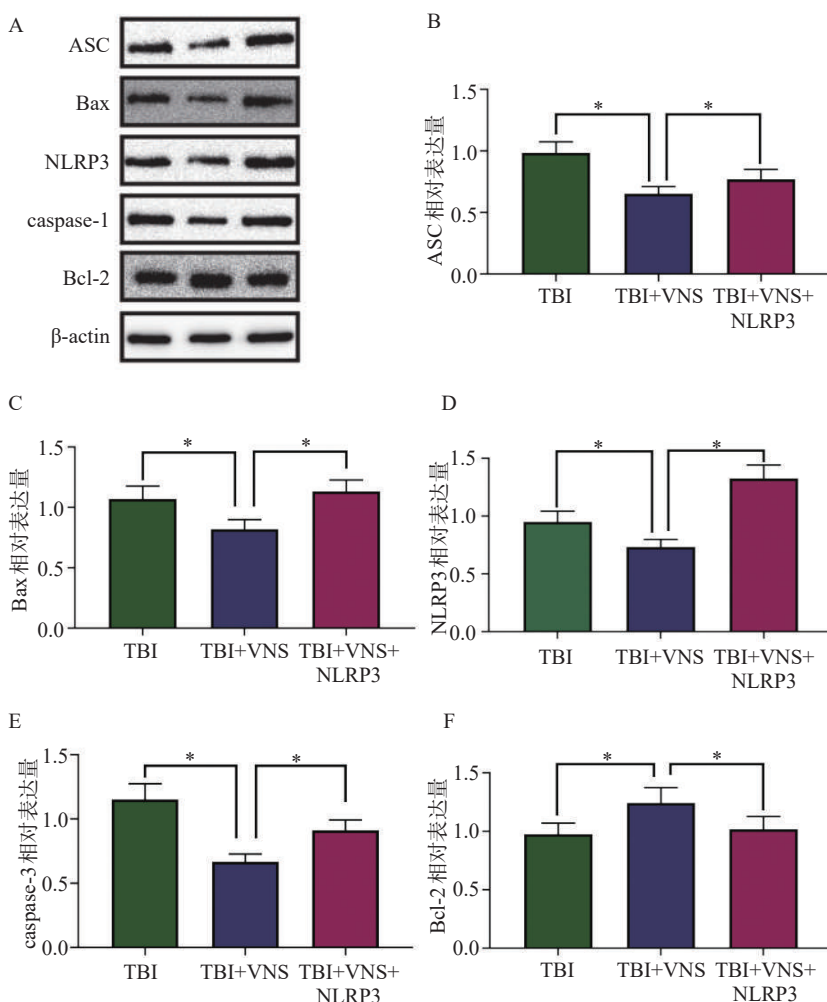
迷走神经电刺激目前被应用于难治性癫痫、复

发性抑郁和认知功能障碍等<sup>[8-9]</sup>。基于迷走神经解剖学特点和 ARAS 网状上行激活系统,我们前期研究提出应用 VNS 干预脑损伤意识障碍,发现 VNS 能够提高 TBI 意识障碍大鼠的意识状态水平<sup>[10-11]</sup>。此后越来越多的学者关注 VNS 治疗脑损伤意识障碍。2017年3月,Yu 等<sup>[12]</sup>研究发现持续性经耳 VNS 能够改善 TBI 后意识障碍患者的觉醒度,意识状态水平由 VS 转为 MCS,其改良昏迷恢复指数(coma recovery scale-revised scores, CRS-R)评分由 5 分提升至 13 分,且该患者运动功能得到明显改善。同年9月,Corazzol 等<sup>[13]</sup>研究也发现持续性植入式 VNS 能够促进脑损伤后持续植物状态患者向最小意识状态转变,CRS-R 评分由 5 分提升至 10 分,且该患者的运动功能及注意力得到明显改善。最近,2019年12月 Noe E 等<sup>[14]</sup>通过小样本的临床试验发现迷走神经电刺激是一种安全有效的技术,能够改善严重脑损伤导致的意识障碍。本研究行为学结果与前期实验结果相同,进一步表明 VNS 能够改善 TBI 意识障碍大鼠的觉醒水平,然而 VNS 治疗 TBI 意识障碍的相关作用机制不明确。

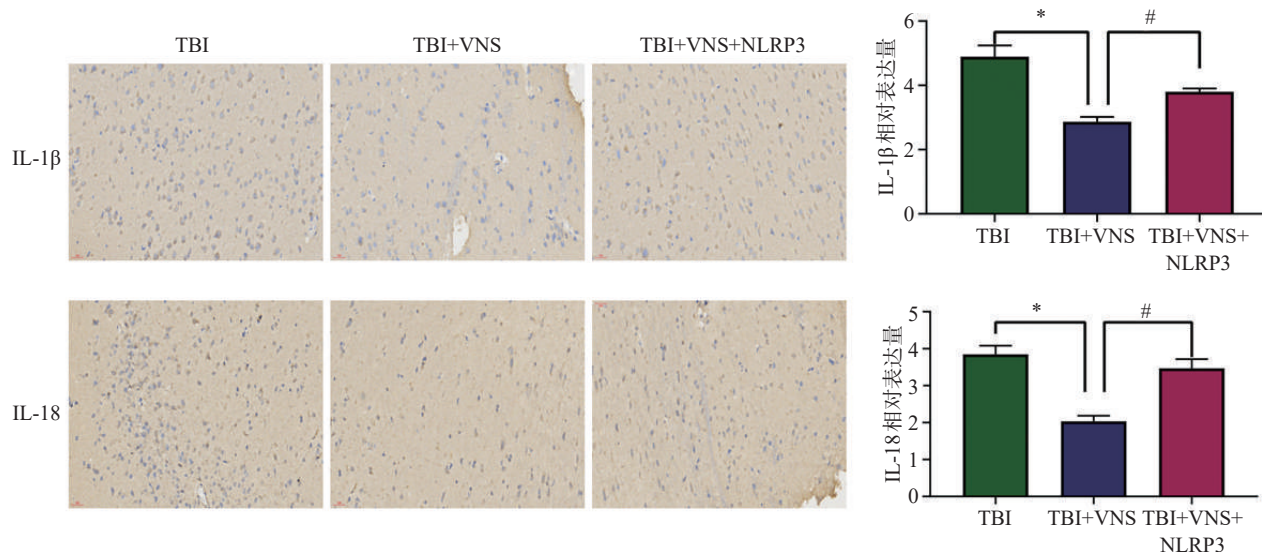
脑外伤继发过程包括脑缺血、能量代谢障碍、钙离子超载、氧自由基堆积、兴奋性氨基酸的神经毒性作用以及神经炎症因子刺激等<sup>[15]</sup>,其中神经炎症和凋亡参与了多种病理生理过程,包括脑水肿、脑血流紊乱、血脑屏障通透性改变、神经元细胞死亡及中枢神经系统修复和再生等,是造成 TBI 后意识障碍发生和发展的主要原因。

炎症小体是一种胞浆蛋白分子复合物,称之为 NOD 样受体(NOD like receptors, NLRs),目前能够组装成具有活性的多蛋白复合物的炎症小体主要有 NLRP-1、NLRP-3、NLRP-4、IPAF 和 AIM-

图2 NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax、Bcl-2在各组的相对表达含量(Western Blot)



\*TBI+VNS 组与 TBI 组和 VNS+TBI+NLRP3 组相比,差异均具有显著性意义( $P < 0.05$ )。

图3 IL-1 $\beta$ 、IL-18在各组的相对表达含量(免疫组化,  $\times 400$ )

\*TBI组和TBI+VNS组比较差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ); #TBI+VNS组和VNS+TBI+NLRP3组比较差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。

2等。NLRP-3炎症小体主要包括NLRP-3受体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶caspase-1和与炎症小体相关的接头蛋白ASC。NLRP-3是始动分子,caspase-1为效应分子,ASC起催化作用。通过NLRP-3的寡聚化作用使得caspase-1活化,活化的caspase-1可将pro-IL-1 $\beta$ 和pro-IL-6分解为IL-1 $\beta$ ,IL-6等,从而参与神经炎症和神经凋亡反应<sup>[16]</sup>。Wallisch等<sup>[17]</sup>通过检测脑外伤患者的脑脊液发现NLRP-3的表达含量明显高于正常人,提出了脑损伤后神经损伤的严重程度与NLRP-3的表达存在相关性。Xu等<sup>[18]</sup>研究发现阻断剂抑制NLRP-3炎症小体能够降低脑外伤后神经炎症水平,且能够提高脑损伤大鼠的神经功能评分,改善预后。同时研究表明NLRP3炎症小体是评估和治疗颅脑损伤的关键指标<sup>[19]</sup>。此外,Borovikova等<sup>[20]</sup>研究表明VNS能够降低前额叶皮层脑组织肿瘤坏死因子、IL-18、IL-1 $\beta$ 等炎症因子,Bie等<sup>[21]</sup>研究表明VNS能够抑制脑组织凋亡水平,降低凋亡蛋白的表达。基于迷走神经电刺激抗炎抗凋亡特性和NLRP3炎症小体作用特点以及前额叶皮层组织是睡眠觉醒调控的关键区域,因此,本研究主要探索前额叶皮层NLRP3炎症小体在VNS促进TBI后意识障碍觉醒中的作用。

行为学结果提示VNS组中苏醒大鼠的只数多

于TBI组大鼠,实验结果与本课题组前期研究相同,即表明TBI意识障碍大鼠给予VNS刺激后意识状态水平能够得到改善。Western-Blot、PCR、免疫组化结果提示VNS组中前额叶皮层组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、Bax、IL-1 $\beta$ 、IL-18的表达明显低于TBI组,Bcl-2高于TBI组;而给予NLRP3激动剂后大鼠意识状态水平出现下降,同时伴随前额叶皮层组织中ASC、Caspase-1、Bax、TNF- $\alpha$ 的表达升高,Bcl-2表达降低。综上,实验结果提示VNS可能是通过抑制NLRP3炎症小体降低前额叶皮层神经凋亡和神经炎症反应,进而改善TBI意识障碍大鼠的觉醒水平。

然而,本实验也存在一定的不足,未来需要采用多维度的方法如脑电图、诱发电位等评估意识障碍水平;另外,本研究主要针对前额叶皮层脑区,VNS对其他脑区炎症小体的影响仍然值得探索;此外,基于本课题前期研究基础,外侧下丘脑觉醒肽Orexin-A是否介导VNS调控NLRP3炎症小体仍然需要进一步深入研究。

综上,VNS可改善TBI意识障碍大鼠的意识状态水平,其关键作用机制之一可能是通过降低前额叶皮层NLRP3炎症小体的表达。本研究进一步为VNS在临床上治疗TBI意识障碍提供了理论基础,然而经

典植入性VNS具有创伤性、手术费用高等不足,缺乏可推广性和可接受性,未来我们将进一步探索无创耳VNS与植入性VNS是否具有相同的作用特点,为无创VNS干预意识障碍的临床应用奠定基础。

## 参考文献

- [1] 赵继宗. 意识障碍临床诊疗的现状与进展[J]. 临床神经外科杂志, 2020, 17(1):1—3, 7.
- [2] Edlow BL, Claassen J, Schiff ND, et al. Recovery from disorders of consciousness: mechanisms, prognosis and emerging therapies[J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 135—156.
- [3] Dong XY, Feng Z. Wake-promoting effects of vagus nerve stimulation after traumatic brain injury: upregulation of orexin-A and orexin receptor type 1 expression in the prefrontal cortex[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(2):244—251.
- [4] Tang Y, Dong X, Chen G, et al. Vagus nerve stimulation attenuates early traumatic brain injury by regulating the NF-kappaB/NLRP3 signaling pathway[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2020, 34(9):831—843.
- [5] Irrera N, Russo M, Pallio G, et al. The role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of traumatic brain injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):6204.
- [6] 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.
- [7] Deng CC, Liang Y, Wu MS, et al. Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(9):1997—2006.
- [8] Toffa DH, Touma L, El MT, et al. Learnings from 30 years of reported efficacy and safety of vagus nerve stimulation (VNS) for epilepsy treatment: a critical review[J]. *Seizure*, 2020(83):104—123.
- [9] Zhang X, Qing MJ, Rao YH, et al. Adjunctive vagus nerve stimulation for treatment-resistant depression: a quantitative analysis[J]. *Psychiatr Q*, 2020, 91(3):669—679.
- [10] 董晓阳, 冯珍. 迷走神经电刺激对脑外伤昏迷大鼠前额叶皮质5-羟色胺2A受体表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(4):404—408.
- [11] 董晓阳, 刘丹, 黄菲菲, 等. 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[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(7):744—749.
- [12] Yu YT, Yang Y, Wang LB, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation in disorders of consciousness monitored by fMRI: The first case report[J]. *Brain Stimul*, 2017, 10(2):328—330.
- [13] Corazzol M, Lio G, Lefevre A, et al. Restoring consciousness with vagus nerve stimulation[J]. *Curr Biol*, 2017, 27(18):R994—R996.
- [14] Noe E, Ferri J, Colomer C, et al. Feasibility, safety and efficacy of transauricular vagus nerve stimulation in a cohort of patients with disorders of consciousness[J]. *Brain Stimul*, 2020, 13(2):427—429.
- [15] Georges A, MDJ. Traumatic brain injury[J]. *Treasure Island*, 2021(16):1—9.
- [16] Wang L, Hauenstein AV. The NLRP3 inflammasome: mechanism of action, role in disease and therapies[J]. *Mol Aspects Med*, 2020(76):100889.
- [17] Wallisch JS, Simon DW, Bayir H, et al. Cerebrospinal fluid NLRP3 is increased after severe traumatic brain injury in infants and children[J]. *Neurocrit Care*, 2017, 27(1):44—50.
- [18] Xu X, Yin D, Ren H, et al. Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2018(117):15—27.
- [19] O'Brien WT, Pham L, Symons GF, et al. The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: potential as a biomarker and therapeutic target[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):104.
- [20] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin[J]. *Nature*, 2000, 405(6785):458—462.
- [21] Bie B, Wang Z, Chen Y, et al. Vagus nerve stimulation affects inflammatory response and anti-apoptosis reactions via regulating miR-210 in epilepsy rat model[J]. *Neuroreport*, 2021, 32(9):783—791.