

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.18.002

MNES 对脑损伤后昏迷大鼠 PFC 去甲肾上腺素 α_1 受体表达的影响*陈 琴, 杜 青, 冯 珍[△]

(南昌大学第一附属医院康复医学科, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨正中神经电刺激(MNES)对脑损伤(TBI)后昏迷大鼠的促醒作用及其对前额叶皮质(PFC)去甲肾上腺素 α_1 受体(α_1 R)表达的影响。**方法** 将健康成年 SD 大鼠 72 只分为对照组、假刺激组、刺激组和拮抗剂组。对照组不做任何处理,其余 3 组均制作 TBI 昏迷大鼠模型,假刺激组不做治疗,拮抗剂组大鼠侧脑室注射食欲素受体 1(OX1R)拮抗剂 SB334867,刺激组和拮抗剂组均给予 MNES 治疗。观察各组大鼠行为学变化,并应用免疫组织化学技术检测各组大鼠 PFC 区 α_1 R 表达水平。**结果** 刺激组和拮抗剂组苏醒大鼠分别为 13 只和 8 只,而假刺激组仅有 4 只苏醒。 α_1 R 水平从低到高依次为对照组、假刺激组、拮抗剂组、刺激组,并呈依次递增趋势,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** MNES 可改善 TBI 后昏迷大鼠的意识状态水平,其机制可能与上调 PFC 区 α_1 R 表达水平有关,且食欲素 A 参与调节此过程。

[关键词] 正中神经;电刺激疗法;脑损伤;昏迷;促醒;受体,肾上腺素能 α_1 ;食欲素 A

[中图分类号] R651.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)18-2453-03

Effect of median nerve electrical stimulation on expression of α_1 -adrenergic receptor in prefrontal cortex of coma rats induced by traumatic brain injury*

Chen Qin, Du Qing, Feng Zhen[△]

(Department of Rehabilitation Medicine, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the wake-promoting action of median nerve electrical stimulation(MNES) in coma rats induced by traumatic brain injury(TBI) and its influence on the expression of α_1 -adrenergic receptor(α_1 R) in the prefrontal cortex (PFC). **Methods** Seventy-two healthy Sprague Dawley(SD) rats were randomly divided into the control group, sham-stimulated group(TBI), stimulated group(TBI+MNES) and antagonist group(TBI+OX1R antagonist+MNES). The control group had no any treatment. The TBI coma rat models were prepared in the other 3 groups. The sham stimulated group had no treatment. The antagonist group was injected with orexin receptor-1(OX1R) antagonist SB334867 into lateral ventricle, and both the antagonist group and stimulated group received MNES treatment. Then the behavior changes of rats in each group were observed and the α_1 R expression level in PFC was detected by using the immunohistochemistry technique. **Results** Thirteen rats in the stimulated group and 8 rats in the antagonist group revived, while only 4 rats in the TBI group. The α_1 R levels from low to high were the blank control group, sham-stimulated group, antagonist group and stimulated group, showing the increasing trend, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** MNES can improve the rat consciousness level after TBI coma, and its mechanism may be related with up-regulating the α_1 R expression level in PFC area, moreover Orexin-A participates in this regulation process.

[Key words] median nerve; electric stimulation therapy; brain injuries; coma; wake-promoting; receptors, adrenergic, alpha-1; Orexin-A

近年来,脑损伤(trumatic brain injury, TBI)增长率(21%)远超全球人口的增长率(6%),有“静息性流行病”之称^[1],已成为全球医疗难题。昏迷是 TBI 的严重并发症之一。我国因 TBI 所致的长期昏迷患者以 10 万人/年的速度递增,给国家和患者家庭带来沉重的负担^[2]。目前临床上治疗 TBI 昏迷的方法有^[3]:药物治疗、物理治疗、高压氧治疗、中医针灸治疗等。电刺激治疗作为一种物理疗法已应用于临床昏迷患者促醒的治疗^[4],常用的电刺激方法包括:颈部脊髓硬膜外刺激(cervical spinal cord stimulation, cSCS)、深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)和正中神经电刺激(median nerve electrical stimulation, MNES)等。本课题前期研究了 MNES 对 TBI 后昏迷大鼠促醒作用与食欲素 A(Orexin-A, OXA)及食欲素 1 型受体(OX1R)和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA) b 受体的关系^[5-8]。本研究旨在探讨 MNES 对 TBI 后昏

迷大鼠的促醒作用及其对前额叶皮质(PFC)区去甲肾上腺素 α_1 受体(α_1 R)表达的影响,同时探究 α_1 R 与 OXA 及 OX1R 之间的关系,证实 OXA 在 TBI 昏迷促醒中是否起“开关”作用。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)实验动物:普通级成年 SD 大鼠 72 只,体质量 250~300 g,由南昌大学医学部动科部提供。适宜条件下饲养 1 周后开始实验。(2)主要试剂与仪器设备:抗 α_1 -肾上腺素受体(α_1 -adrenergic receptor, α_1 -AR)兔多克隆抗体购自英国 Abcam 公司;OX1R 受体拮抗剂(SB334867)由美国 Tocris bioscience 公司提供;ZS-BS 数显脑立体定位仪购自北京众实迪创科技发展有限公司;其他仪器包括:电刺激仪(ES-420)、切片机(RM2015, Leica Germany)等。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及模型建立 将 72 只大鼠分为 4 组,每组

18 只。对照组:不做任何处理;假刺激组:造模成功的 TBI 昏迷大鼠;刺激组:造模成功的 TBI 大鼠给予 MNES 治疗;拮抗剂组:造模成功的 TBI 大鼠侧脑室注射 OX1R 拮抗剂后给予 MNES。使用经典“自由落体撞击法”构建 TBI 昏迷大鼠模型。乙醚吸入麻醉,取俯卧位,暴露颅顶,立体定位仪定位:中线左侧旁开 2 mm、冠状缝前 1 mm,用注射器针头十字标记此点为撞击点。待大鼠翻正反射恢复,依据大鼠体质量,将质量 400 g 圆形铁柱从 38~42 cm 高度沿垂直金属杆自由下落,撞击颅骨表面撞击点上的薄铝垫片,致颅骨凹陷性骨折,操作完毕,消毒并缝合皮肤。1 h 后采用双盲法完成意识状态等级评分。根据大鼠感觉及运动功能情况,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、VI 级评定为昏迷状态纳入实验^[9]。实验过程中大鼠意外死亡共 8 只:假刺激组 5 只,刺激组 1 只,拮抗剂组 2 只,在 MNES 治疗过程中无大鼠死亡,并重新挑选合格大鼠行相应的处理给予补充。

1.2.2 侧脑室注射 OX1R 拮抗剂 造模成功的 TBI 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL/kg)进行麻醉。麻醉生效后,将大鼠取俯卧位,固定于脑立体定位仪上,拆去大鼠头顶部缝合线,暴露颅顶,消毒铺巾。定位于前囟向后 1.0 mm,正中中线旁开 1.5 mm 处,用颅骨钻于此处钻孔,切忌误入脑组织。用微量进样器抽取 SB334867[10 mg/kg 粉末溶解于 60:40 二甲基亚砜(DMSO)]约 5 μ L,固定进样器后垂直进针,颅骨表面往下约 4.5 mm,以 2.5 μ L/min 速度泵注,注射完毕留针 2~3 min 后退针,消毒并缝合头皮。将大鼠放置于恒温加热垫上,观察行为学反应,1 h 后给予 MNES 治疗。

1.2.3 MNES 方法 刺激组大鼠在 TBI 昏迷造模成功后给予 MNES 治疗;拮抗剂组大鼠 TBI 造模成功后先行侧脑室注射 OX1R,再给予 MNES 治疗;假刺激组连接 MNES 仪,但无电流输出。MNES 治疗方法:于大鼠右前肢腕部内侧正中,距腕横纹约 5 mm 处插入 1 根毫针,齿状接头夹住毫针,连接刺激仪。设置刺激参数:频率 30 Hz,脉宽 0.5 ms,电流 1.0 mA。总治疗时间为 15 min,共 3 个循环。刺激结束后 1 h,再次评估意识状态水平,实验完毕,返回笼中,给予充足的食物和水。

1.2.4 实验标本提取与免疫组织化学检测 (1)实验标本提取:每个时间点每组处理大鼠 6 只,取脑组织标本 6 个。于实验结束后 6、12、24 h,腹腔注射 10% 水合氯醛(0.1 g/mL)深度麻醉大鼠,行正中开胸暴露心脏。将成人头皮针(针尖磨平)插入左心室至主动脉弓,剪开右心耳,注入加有肝素钠的灭菌生理盐水约 200 mL,直至流出液变清亮,缓慢灌注 4% 多聚甲醛约 200 mL,直到大鼠整个身体僵硬,断头取大鼠 PFC 区。(2)免疫组织化学检测:将脑组织置于 4% 的水合氯醛溶液内固定 12 h,并在 PBS 液中冷冻保存。脑组织行冠状切片,厚度 4 μ m, PBS 漂洗后用 0.3% 的过氧化氢液处理 30 min,滴加正常山羊血清封闭液,室温条件下孵育 1 h,按 1:500 比例滴加抗 α_1 R 抗体,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, PBS 洗涤后再滴加生物素标记的山羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h。最后由有经验的病理实验师在显微镜下观察免疫组织化学实验结果,进行 400 倍的显微照相,最后计算出免疫组织化学评分(immunohistochemical score, IHS)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,不同组别和时间点的 α_1 R 水平以秩均值表示,作 Kruskal-Wallis H 秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学改变比较 MNES 治疗后 1 h 再次进行意识状态评估,刺激组中 13 只大鼠出现翻正反射(III 级 8 只,IV 级 5 只);拮抗剂组中 8 只大鼠出现翻正反射(III 级 4 只,IV 级 4 只);假刺激组中 4 只出现翻正反射(IV 级 4 只)。

2.2 各组大鼠免疫组织化学检测 α_1 R 在 PFC 区神经细胞膜和细胞质中均有表达(图 1)。组间 IHS 比较: α_1 R 水平从低到高依次为对照组(31.56)、假刺激组(31.78)、拮抗剂组(33.34)和刺激组(48.67),两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验结束后 6、12、24 h 3 个时间点的 α_1 R 的表达水平分别为 34.25、35.08、40.17,呈依次递增趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

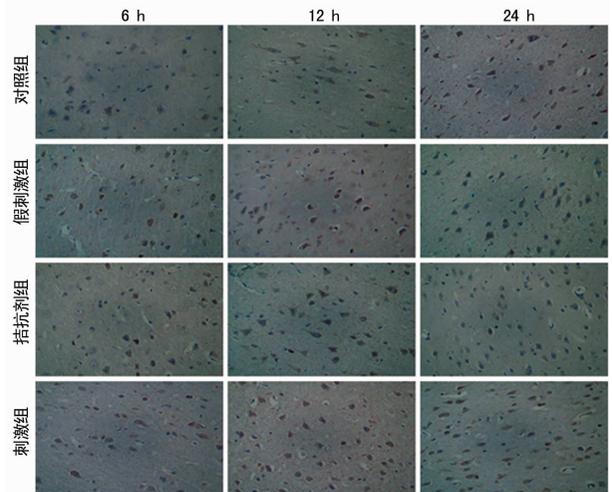


图 1 各组大鼠 PFC 区 α_1 R 水平表达($\times 400$)

3 讨论

MNES 作为一种外周神经电刺激治疗昏迷的方法,于 1996 年被日本学者 Yokotama 首次报道。有研究证实, MNES 不仅用于治疗持续植物状态,而且还可用于各种病因所致的意识水平下降的促醒^[10-11]。MNES 具有非创伤性、无明显并发症、易操作且费用低廉等优点^[12],已广泛应用于临床昏迷患者的促醒治疗。MNES 治疗昏迷促醒的临床效果确切,但机制尚未完全明晰。目前认为 MNES 促醒的可能机制为^[10-11,13-15]:激活上行网状激活系统(ascending reticular activating system, ARAS)和觉醒相关核团;增强脑电活动,改善大脑皮质兴奋性;增加大脑皮质血流量灌注,减少神经细胞死亡,促进神经元再生;促进神经营养因子释放,提高大脑神经可塑性;影响大脑神经递质的分泌。正中神经的神经元突触直接参与 ARAS 活动^[13], ARAS 包括 3 个主要的觉醒系统:胆碱能系统、中缝背核-5 羟色胺(5-HT)系统、蓝斑-去甲肾上腺素能系统,其中蓝斑核(locus coeruleus, LC)合成分泌的去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)广泛释放,并支配整个皮质、间脑和大脑的其他区域^[16]。而且 NE 是维持觉醒的重要神经递质之一,通过其兴奋性受体发挥促醒作用。

蓝斑-去甲肾上腺素能系统参与调解睡眠-觉醒。LC 合成和释放的 NE 广泛分布于中枢神经系统, NE 包含 α_1 、 α_2 和 β 受体家族,在众多脑区均有表达。NE 通过兴奋性受体 α_1 作用于大脑皮质,维持大脑皮质电生理活动,维持觉醒状态^[17]。PFC 参与调节觉醒、认知、运动、注意及奖赏等功能。有研究表明,激活大鼠 PFC 区 α_1 R 可提高大鼠觉醒水平,从而改善认知能力^[18]。此外, Hilakivi 等^[19]研究发现 α_1 R 拮抗剂可以延长猫的睡眠时间,而 α_1 R 激动剂缩短其睡眠时间,维持觉醒状

态。因此,推测 MNES 昏迷促醒作用可能与 PFC 区 α_1 R 表达变化有关。

本实验通过观察大鼠行为学变化,发现刺激组昏迷大鼠 18 只中有 13 只清醒,拮抗剂组苏醒 8 只,假刺激组仅苏醒 4 只,表明 MNES 能提高意识状态水平,促进觉醒。此外,通过免疫组织化学检测发现 PFC 组织中 α_1 R 的表达水平呈对照组、假刺激组、拮抗剂组、刺激组依次递增趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中刺激组明显高于假刺激组,提示 MNES 可上调 α_1 R 表达水平。由此可说明 MNES 对 TBI 后昏迷大鼠具有促醒作用,其作用机制可能与增加 PFC 区 α_1 R 表达有关。假刺激组高于对照组,可能与 TBI 后应激性脑保护作用相关,以适应机体内外环境的变化。本研究组前期研究结果发现,MNES 可以通过上调 OXA 及其受体 OX1R 的表达水平从而促进昏迷大鼠觉醒,且 OXA 在此过程中扮演着重要角色^[5-7]。但是 OXA 是否参与调节 α_1 R 的表达,尚并不明晰。本研究组拮抗剂组大鼠经侧脑室注射 OX1R 拮抗剂 SB334867 后给予 MNES 治疗,结果发现:与刺激组相比,拮抗剂组大鼠苏醒只数少,PFC 区 α_1 R 表达水平也比较低。由此证实了 OX1R 及其受体 OX1R 参与 MNES 促觉醒过程,其机制可能与 OX1R 上调 PFC 区 α_1 R 表达有关,但其具体分子机制还需进一步研究。6、12、24 h 3 个时间点的 α_1 R 的表达水平呈依次递增趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),这可能与蓝斑-去甲肾上腺素能神经元自身节律相关。当然,本实验需要进一步完善,如延长观察时间;检测其他相关促醒脑区 α_1 R 的表达水平。且本实验研究的是单次治疗效果,本课题组将进一步探究 MNES 的长期疗效以及其相关的分子机制。

综上所述,MNES 可以促进 TBI 后昏迷大鼠意识水平,并上调 PFC 中 α_1 R 表达水平。因此,本研究组推测 MNES 治疗 TBI 后意识水平的改善可能与增加 PFC 区 α_1 R 表达有关。上调 PFC 区 α_1 R 表达水平可能是 MNES 昏迷促醒的机制之一,且 OXA 参与调节此过程,但是具体的分子机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王波定,王洪财,朱坤灿,等. 创伤性脑损伤模型的延续与完善:二次脑损伤模型[J]. 中华神经医学杂志,2013,12(4):426-429.
- [2] 陈健. 脑外伤长期昏迷患者促醒治疗[J]. 吉林医学,2013,34(27):5740-5742.
- [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] Lei J, Wang L, Gao G, et al. Right median nerve electrical stimulation for acute traumatic coma patients[J]. J Neurotrauma, 2015,32(20):1584-1589.
- [5] 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 Regeneration Res, 2015,10(4):594-598.
- [6] Zhong F, Wang W. 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.
- [7] 钟颖君,王亮,魏天琪,等. 正中神经电刺激对脑外伤后昏迷大鼠前额叶皮质及下丘脑 Orexin-A 及其受体 OX1R 表达变化的影响[J]. 中国康复医学杂志,2015,30(7):640-644.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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]. Neuro-modulation, 2008,11(4):296-301.
- [11] 黄强,戴伟民,揭园庆,等. 重型颅脑损伤昏迷患者持续右正中神经刺激促进复苏的临床研究[J]. 中国临床神经科学,2011,19(3):314-316,320.
- [12] 杨初燕,王亮,冯珍,等. 正中神经电刺激对脑外伤后昏迷患者促醒作用的临床及机制研究[J]. 中国康复医学杂志,2016,31(11):1195-1199.
- [13] Cooper EB, Scherder EJ, Cooper JB. Electrical treatment of reduced consciousness: experience with coma and Alzheimer's disease[J]. Neuropsychol Rehabil, 2005,15(3/4):389-405.
- [14] 王士强,麦浩坚,钟新云,等. 右正中神经电刺激对脑损伤术后昏迷患者催醒的临床研究[J]. 热带医学杂志,2015,15(4):527-529.
- [15] 王广斌,谢丽君,吴贵平,等. 右正中神经电刺激对重型颅脑损伤患者脑血流灌注影响的 SPECT-CT 观察[J]. 临床神经外科杂志,2014,11(2):137-139.
- [16] Dailey JW, Yan QS, Adams-Curtis LE, et al. Neurochemical correlates of antiepileptic drugs in the genetically epilepsy-prone rat (GEPR)[J]. Life Sci, 1996,58(4):259-266.
- [17] Samuels ER, Szabadi E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part II: physiological and pharmacological manipulations and pathological alterations of locus coeruleus activity in humans[J]. Curr Neuropharmacol, 2008,6(3):254-285.
- [18] Lapiz MS, Morilak DA. Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability[J]. Neuroscience, 2006,137(3):1039-1049.
- [19] Hilakivi I, Leppavuori A. Effects of methoxamine, and alpha-1 adrenoceptor agonist, and prazosin, an alpha-1 antagonist, on the stages of the sleep-waking cycle in the cat[J]. Acta Physiol Scand, 1984,120(3):363-372.