

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.23.007
文章编号: 1005-8982 (2024) 23-0041-05

实验研究·论著

经皮神经电刺激对睡眠剥夺小鼠疲劳状态的影响*

蒋子人, 缪雪蓉

(海军军医大学第三附属医院 康复医学与理疗科, 上海 200438)

摘要: 目的 分析经皮神经电刺激 (TENS) 治疗对睡眠剥夺小鼠疲劳状态的影响及可能的神经体液机制。**方法** SPF级昆明小鼠共18只, 按照随机数字表法分为电刺激+睡眠剥夺组、睡眠剥夺组及正常组, 每组6只。电刺激+睡眠剥夺组行每日睡眠剥夺20 h联合TENS干预; 睡眠剥夺组行每日睡眠剥夺20 h; 正常组不行任何干预。干预7 d后进行悬尾实验和旷场实验以采集相关行为学数据, 并采用竞争性抑制酶免疫分析技术检测各组小鼠的血清促肾上腺皮质激素释放因子和皮质酮 (CORT) 水平。**结果** 悬尾实验结果表明, 电刺激+睡眠剥夺组的不动时间占比低于睡眠剥夺组 ($P < 0.05$), 电刺激+睡眠剥夺组的挣扎时间占比高于睡眠剥夺组 ($P < 0.05$)。旷场实验结果表明, 电刺激+睡眠剥夺组的中央区域时间长于睡眠剥夺组 ($P < 0.05$)。血清激素水平检测结果显示, 睡眠剥夺组的血清CORT水平高于正常组 ($P < 0.05$)。**结论** TENS可改善小鼠因睡眠不足导致的焦虑、抑郁等精神行为改变, 这可能与其对体内下丘脑-垂体-肾上腺轴激素水平的调节有关, TENS在改善睡眠不足导致的精神疲劳方面有潜在价值。

关键词: 睡眠剥夺; 精神疲劳; 经皮神经电刺激疗法; 悬尾实验; 旷场实验

Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on fatigue status in sleep deprived mice*

Jiang Zi-ren, Miao Xue-rong

(Department of Rehabilitation Medicine and Physiotherapy, The Third Affiliated Hospital of Naval Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: Objective To analyze the role of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) in alleviating fatigue in sleep-deprived mice and to explore the potential neurohumoral mechanisms involved. **Methods** A total of 18 SPF-grade Kunming mice were selected and numbered according to their body weight. They were randomly divided into three groups: the electrical stimulation + sleep deprivation group, the sleep deprivation group, and the normal group, with six mice in each group. Mice in the electrical stimulation + sleep deprivation group underwent 20 hours of sleep deprivation daily, combined with TENS intervention. The sleep deprivation group received only the 20 hours of sleep deprivation, while no intervention was performed on the normal group. After 7 days of intervention, all three groups underwent tail suspension and open field tests to collect relevant behavioral data. Serum levels of corticotropin-releasing factor and corticosterone (CORT) in each group were measured using competitive inhibition Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **Results** The results from the tail suspension test indicated that the percentage of immobility time in the electrical stimulation + sleep deprivation group was lower than that in the sleep deprivation group ($P < 0.05$), while the percentage of struggling time in the electrical stimulation + sleep deprivation group was higher ($P < 0.05$). In the open field test, the time spent in the central area by the electrical stimulation + sleep deprivation group was longer compared to the sleep deprivation group ($P < 0.05$). Serum hormone level analysis showed that serum CORT levels in the sleep deprivation group were higher than those

收稿日期: 2024-06-17

* 基金项目: 上海市科委科技创新行动 (No: 21Y11903200)

[通信作者] 缪雪蓉, E-mail: miaoxr@smmu.edu.cn; Tel: 13636551152

in the normal group ($P < 0.05$). **Conclusion** TENS can ameliorate anxiety, depression, and other behavioral changes induced by sleep deprivation in mice, which may be related to abnormal hormone levels in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. TENS holds potential value in relieving mental fatigue caused by sleep deprivation.

Keywords: sleep deprivation; mental fatigue; transcutaneous electrical nerve stimulation; mouse tail suspension test; open field test

经皮神经电刺激 (transcutaneous electrical nerve stimulation, TENS) 是通过在机体皮肤相应部位放置电极片, 将特定频率的电流经皮肤输入人体刺激神经的一种温和无损伤性的物理治疗手段^[1]。目前, TENS在临床主要运用于镇痛领域, 尤其在缓解软组织疼痛的治疗方面效果显著。TENS镇痛机制的解释目前包括多种学说, 如疼痛“闸门控制理论”、弥漫性伤害抑制控制理论、激活机体阿片系统等^[2]。如今国内外已将TENS作为一种非药物镇痛模式应用于各种急、慢性疼痛的镇痛与治疗中, 包括手术镇痛、术后镇痛、分娩镇痛, 以及各种顽固性慢性疼痛等^[3]。同时亦有研究表明, TENS在缓解肢体痉挛、改善脑卒中后患者运动功能和慢性阻塞性肺疾病患者肺功能等方面有临床应用价值^[4]。现阶段部分研究表明, TENS可以缓解机体疲劳状态^[5-6], 但目前大部分研究主要集中在运动性疲劳领域, 对TENS是否可以缓解精神疲劳及其相关机制的研究仍较少。

受经济社会发展影响, 当代人群由于生活压力增大, 饮食结构及生活作息发生改变, 失眠发生率不断升高。有研究表明, 目前国内中青年人群失眠发生率约为27.3%^[7], 因此, 由于睡眠时间减少带来的精神疲劳问题值得关注。精神疲劳主要指当身体、心理负荷失衡时出现的组织、器官及整个机体工作能力暂时性或持续性下降的现象, 同时也会带来焦虑、抑郁等心理情绪障碍或认知功能异常^[8]。目前一些临床研究显示, TENS对机体精神领域, 如治疗失眠障碍、改善术后谵妄及认知功能障碍等方面具有特定作用^[9-11]。也有实验发现, TENS可以改善慢性疲劳大鼠学习及记忆能力^[12]。本研究拟探讨TENS在缓解精神疲劳小鼠焦虑、抑郁情绪方面的作用, 结合其无创、简便、安全等优势, 如果能确定其治疗价值, 则会具有很高的临床应用前景, 因此值得进一步探索。本研究通过复制睡眠剥夺小鼠疲劳状态模型, 给予TENS干预, 再使用行为学及血清激素测定等方法, 分析TENS对睡眠剥夺小鼠疲

劳状态下焦虑、抑郁情绪的影响及可能的神经体液机制, 为临床应用该物理手段改善因睡眠不足导致的精神疲劳提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级昆明小鼠18只, 雄性, 周龄6~8周, 平均(6.98±0.30)周, 体重31~41 g, 平均(37.52±2.58)g, 购自上海杰思捷实验动物有限公司。依照小鼠体重编号, 按照随机数字表法分为电刺激+睡眠剥夺组、睡眠剥夺组及正常组, 每组6只。3组小鼠周龄、体重比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2023-0004, 实验动物使用许可证号: SYCK(沪)2022-0011。

1.2 实验方法

对电刺激+睡眠剥夺组、睡眠剥夺组小鼠均实施睡眠剥夺干预。运用旋杆型小动物睡眠剥夺仪, 参数设置: 旋转角度360°, 旋转时间25 s, 间隔时间15 s, 速度0.04 r/s, 单程周期40 s。每天剥夺睡眠20 h(当日19:00~次日15:00), 再恢复睡眠4 h, 连续1周。电刺激+睡眠剥夺组小鼠于每日睡眠剥夺结束后固定时间予以10 min的电刺激干预, 电刺激干预参数: 连续波, 强度5 mA, 频率10 Hz, 电极片固定部位均选取背部(见图1)。睡眠剥夺组小鼠仅接受睡眠剥夺干预, 在相同时间固定10 min, 不予电刺激干预。正常组小鼠不进行睡眠剥夺, 不接受电刺激干预, 只在相同时间实施固定操作。

1.3 行为学检测

1.3.1 旷场实验 实验最后1天电刺激干预结束后, 将小鼠放入40 cm×40 cm×40 cm的黑色壁、无顶盖的旷场实验箱中, 观察每只小鼠6 min的活动情况, 然后用酒精清理实验箱底部与侧壁, 待实验箱干燥、无异味后方可展开下一只小鼠的测试。测定指标: 平均速度、中央路程、中央区域

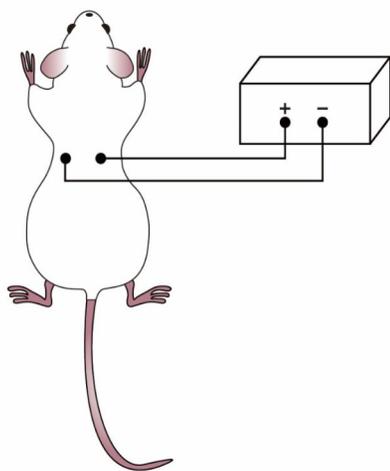


图 1 小鼠经皮电刺激模式图

时间。去掉前 2 min 可能有干扰的时间段, 测量时间取后 4 min。

1.3.2 悬尾实验 实验最后 1 天电刺激干预结束后, 将小鼠尾巴用胶带固定于挂钩上, 实验中小鼠除尾巴外其他身体部位不与悬尾仪接触, 记录此状态下 6 min 内小鼠产生绝望的不同状态, 包含不动时间、晃动时间、挣扎时间 (总时长不变的情况下, 各状态下时间以占比形式表示更为清晰)。去掉前 2 min 可能存在干扰的时间段, 测量时间取后 4 min。

1.4 血清 CRF 及 CORT 激素水平检测

小鼠眼球取血, 每只小鼠取血 2 mL, 取好的血液静置 3~4 h, 待初步分层状态形成后, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清。采用竞争性抑制酶免疫分析技术检测各组小鼠 7 d 干预后的血清促肾上腺皮质激素释放因子 (corticotropin-releasing factor, CRF) 和皮质酮 (Corticosterone, CORT) 水平。小鼠 CRF 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (CSB-E14068m) 购自武汉华美生物工程有限公司, 小鼠皮质酮/肾上腺酮 ELISA 试剂盒 (CSB-E07969m) 购自武汉华美生物工程有限公司。

1.5 观察指标

旷场实验中小鼠的平均速度、中央路程、中央区域时间; 悬尾实验中小鼠的不动时间、晃动时间、挣扎时间; 小鼠血清 CRF、CORT 水平。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 26.0 统计软件。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用方差分析; 非正态分布的计量资料以中位数和四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 比较用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较采用 Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠悬尾实验结果

3 组小鼠不动时间、挣扎时间比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 睡眠剥夺小鼠的不动时间均长于电刺激+睡眠剥夺组和正常组, 睡眠剥夺组小鼠的挣扎时间均短于电刺激+睡眠剥夺组和正常组。3 组小鼠晃动时间比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组小鼠悬尾实验指标比较 ($n=6, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	不动时间	晃动时间	挣扎时间
电刺激+睡眠剥夺组	57.43 \pm 9.48	15.93 \pm 3.70	26.64 \pm 7.73
睡眠剥夺组	78.29 \pm 6.89	10.29 \pm 3.16	11.42 \pm 5.39
正常组	57.75 \pm 15.18	16.41 \pm 6.31	25.84 \pm 11.22
F 值	6.993	3.276	6.152
P 值	0.007	0.066	0.011

2.2 小鼠旷场实验结果

电刺激+睡眠剥夺组、睡眠剥夺组、正常组中央区域时间比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 电刺激+睡眠剥夺组小鼠的中央区域时间长于睡眠剥夺组。3 组小鼠平均速度、中央路程比较, 经方差分析, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 3 组小鼠激素水平比较

3 组小鼠 CRF 比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组小鼠血清 CORT 比较 (箱形图法), 去除其中的离群值 (包括睡眠剥夺组中 1 例, 正常组中 1 例) 后, 数据不符合正态性分布, 因此采用 Kruskal-Wallis H 检验进行多组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 睡眠剥夺组小鼠血清 CORT 水平高于正常组 ($P < 0.05$)。电刺激+睡眠剥夺组 CRF 和 CORT 水平与其他两组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 3组小鼠旷场实验指标比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	平均速度/(mm/s)	中央路程/mm	中央区域时间/s
电刺激+睡眠剥夺组	59.91 ± 8.39	3835.57 ± 738.79	37.70 ± 6.75
睡眠剥夺组	65.99 ± 11.46	2 997.39 ± 1 058.40	27.51 ± 5.50
正常组	78.26 ± 17.70	4 063.74 ± 1 285.68	34.81 ± 5.04
F值	3.051	1.710	4.907
P值	0.077	0.214	0.023

表 3 3组小鼠激素水平比较 ($n=6$)

组别	CRF/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)	CORT/[ng/mL, M(P ₂₅ , P ₇₅)]
电刺激+睡眠剥夺组	12.69 ± 0.75	367.44(300.70, 801.13)
睡眠剥夺组	13.97 ± 2.02	160.98(156.99, 166.16)
正常组	14.55 ± 1.38	119.99(104.76, 146.87)
F/Z值	2.493	7.957
P值	0.116	0.019

3 讨论

本实验对睡眠剥夺及TENS干预后的小鼠进行了悬尾实验、旷场实验等行为学检测。悬尾实验是一种经典而且能快速评价动物抑郁程度的行为学方法，其中动物的挣扎行为时间及不动行为时间均可反映动物的抑郁程度^[13]。一般来说动物挣扎时间越短，不动时间越长代表其抑郁程度更重。本次行为学实验发现电刺激+睡眠剥夺组和正常组的挣扎时间占比都高于睡眠剥夺组，电刺激+睡眠剥夺组和正常组的不动时间占比低于睡眠剥夺组，说明睡眠剥夺干预使得小鼠的抑郁程度加重，而TENS干预可改善小鼠抑郁程度。

同样地，旷场实验这种行为学检测手段可以评价啮齿类实验动物的探索行为与焦虑程度^[14]，因啮齿类动物具有畏惧开阔区域的“趋避性”特点^[15]，旷场的中央区域对于小鼠而言是存在潜在危险性的场所，故小鼠在陌生环境中总会本能地靠近存在墙体的边缘地区，小鼠在旷场中央区域活动时间越长，提示其适应陌生环境的能力增强及焦虑程度降低^[16]。本实验中，电刺激+睡眠剥夺组小鼠的中央区域停留时间长于睡眠剥夺组，也从行为学层面揭示了TENS在改善小鼠焦虑情绪方面的作用。

在激素水平测定中，本研究发现睡眠剥夺干

预能提高小鼠体内CORT水平。CORT是生物体内参与应激状态的一种酶，其主要依靠下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴实施分泌与调控。目前已有研究证明，在机体处于慢性应激刺激状态时，HPA轴能够异常激活，致使CORT水平升高，进而对生物机体形成各种负面作用^[17]。HPA轴是包含下丘脑-垂体-肾上腺在内的激素分泌系统，其中下丘脑释放促肾上腺皮质激素释放激素，作用于垂体并使之释放促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)，ACTH又继续作用于肾上腺皮质促进CORT的分泌^[18]。本实验3组小鼠体内血清CORT水平比较结果说明睡眠剥夺等慢性应激状态可通过某种机制增加小鼠体内CORT浓度，进而导致小鼠疲劳状态。慢性应激刺激导致的高CORT水平对HPA轴存在负反馈调节作用，并导致HPA轴上级器官的损害，这可能是本实验中小鼠体内血清CRF水平未见差异的原因之一。

同时，TENS改善慢性疲劳小鼠行为学表现的机制，也可能与其影响HPA轴有关，其机制可能是对小鼠体表特殊部位进行刺激后，激活了外周感觉神经纤维，这些感觉神经纤维将外周刺激信号传输至神经中枢，进而对HPA轴进行调控。LIU等^[19]对外周电针刺刺激驱动迷走神经-肾上腺轴的神经生物学解剖基础的研究就曾发现，刺激小鼠足三里穴位，可激活PROKR2神经元，进而驱动迷走神经-肾上腺轴发挥抗炎作用。

TENS作为一种从70年代兴起的经皮肤将特定的低频脉冲电流输入人体以治疗疼痛的电疗方法，在止痛方面具有良好的疗效，因而在临床普遍使用^[20]。近年来，TENS在缓解疲劳方面的作用不断显现，因其具有安全、方便、高效等优点，与其相关产品的研制也具有一定的临床及市场应用前景^[21]。目前有研究已初步发现TENS在缓解运动性

疲劳方面的部分机制, 方剑乔等^[22]发现经皮穴位电刺激可以通过降低中枢 5-HT 表达、减轻神经细胞损伤, 从而改善大鼠的运动性疲劳状态。王鹏等^[23]发现, 经皮穴位电刺激有利于体内代谢产物, 如血乳酸、血清肌酸激酶的抑制和快速清除, 从而调节疲劳状态, 提高运动员身体机能。目前相关研究主要集中于 TENS 缓解运动性疲劳方面, 对于其缓解精神疲劳及其导致的情绪、认知改变方面的研究较少, 因此本实验从后者角度探讨了 TENS 缓解疲劳的作用。

综上所述, TENS 治疗可改善睡眠剥夺小鼠的精神疲劳状态, 这可能与 TENS 可独特调节机体 HPA 轴有关。本实验中睡眠剥夺干预可影响 CORT 水平的观点已得到了验证, 但 TENS 对小鼠血清 CORT、CRF 水平影响无差异, 这可能与本实验样本量较少, 针对小鼠的 TENS 干预的各项参数不够充分有关, 后续可进一步完善实验方案, 寻找最佳干预参数, 为进一步明确 TENS 缓解精神疲劳的内在机制提供依据。本实验初步观察到了 TENS 对小鼠 HPA 轴的影响, 后续可以进一步测量 ACTH 变化水平, 并对小鼠下丘脑及垂体部位进行细胞水平和分子水平的研究, 寻找 TENS 影响慢性疲劳应激状态小鼠的深层机制, TENS 在改善睡眠不足导致的精神疲劳方面具有一定的研究价值, 值得进一步探索。

参 考 文 献 :

- [1] 严佳虞, 任朝晖. 经皮神经电刺激的临床应用研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(3): 361-364.
- [2] 汤征宇, 汪汇泉, 夏晓磊, 等. 经皮神经电刺激的镇痛机制及其临床应用[J]. 生理学报, 2017, 69(3): 325-334.
- [3] 褚华清, 郑晖. 经皮神经电刺激在疼痛诊疗中的应用及研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2021, 27(9): 693-697.
- [4] 陈瑶, 陈创, 项育枝, 等. 经皮神经电刺激疗法临床应用的研究进展[J]. 临床荟萃, 2019, 34(2): 175-179.
- [5] 游世晶, 纪峰, 何芙蓉, 等. 经皮穴位电刺激对运动性疲劳大学生运动员 RBC、Hb 的影响[J]. 康复学报, 2016, 26(4): 43-46.
- [6] 刘多. 经皮穴位电刺激在大学生运动员小腿肌肉疲劳恢复中的应用研究[J]. 湖北第二师范学院学报, 2021, 38(2): 66-69.
- [7] 王欣琦, 李雪梅, 蔡梦怡, 等. 中青年人群失眠发生率及影响因素的系统评价[J]. 中风与神经疾病杂志, 2023, 40(3): 222-228.
- [8] 黄俊飞, 郭凯峰, 陈小昇, 等. 精神疲劳及其神经机制[J]. 心理学进展, 2024, 14(3): 383-392.
- [9] 张帅. 经皮耳穴迷走神经电刺激治疗失眠障碍的疗效及脑影像特征研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2023.
- [10] 黄梅艳, 贾树山, 王鹏, 等. 经皮穴位电刺激防治术后并发症的研究进展[J]. 医药前沿, 2023, 13(24): 36-39.
- [11] 戴敏, 杨子昌, 胡瑞霖, 等. 经皮穴位电刺激对老年肝癌患者术后早期认知功能障碍及血清相关炎症因子的影响[J]. 中国中医急症, 2024, 33(1): 85-89.
- [12] 钟晓玲, 童伯璞, 杨一涵, 等. 经皮穴位电刺激对慢性疲劳综合征大鼠学习记忆能力的影响及其机制探讨[J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 317-324.
- [13] STUKALIN Y, LAN A, EINAT H. Revisiting the validity of the mouse tail suspension test: systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2020, 112: 39-47.
- [14] KRAEUTER A K, GUEST P C, SARNYAI Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 99-103.
- [15] 王维刚, 刘震泽, 吴文婷, 等. 小鼠动物实验方法系列专题(七) 旷场实验在小鼠行为分析中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(11): 1191-1196.
- [16] 徐小珊, 田岳凤, 翟春涛, 等. 慢性疲劳综合征大鼠模型的行为学特征研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(21): 3906-3912.
- [17] 金硕, 张博威, 刘敬祺, 等. 运动疲劳通过 HPA 轴及促海马细胞凋亡诱导大鼠抑郁样行为[J]. 神经解剖学杂志, 2023, 39(1): 79-84.
- [18] 刘瑞东, 王泽鹏, 冯晓东, 等. 针刺对乳腺癌化疗后癌因性疲乏模型小鼠肠-脑轴相关因子的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(8): 21-27.
- [19] LIU S B, WANG Z F, SU Y S, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal - adrenal axis[J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 641-645.
- [20] 苏海婷, 李天裕, 安建军, 等. 作业疗法结合经皮神经电刺激对脑卒中后肩痛的疗效观察[J]. 广州医药, 2024, 55(5): 524-529.
- [21] 吴海燕, 李艳梅. 基于 TENS 低频电脉冲的女性疲劳缓解压力袜研制[J]. 服装学报, 2021, 6(5): 463-470.
- [22] 方剑乔, 马桂芝, 梁宜. 不同时间经皮穴位电刺激抗大鼠慢性运动性疲劳以及对海马和下丘脑形态与 5-羟色胺表达的影响[J]. 上海针灸杂志, 2010, 29(11): 735-738.
- [23] 王鹏. 经皮穴位电刺激对沈阳大学板球队运动员运动能力影响研究[D]. 沈阳: 沈阳大学, 2022.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 蒋子人, 缪雪蓉. 经皮神经电刺激对睡眠剥夺小鼠疲劳状态的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(23): 41-45.

Cite this article as: JIANG Z R, MIAO X R. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on fatigue status in sleep deprived mice[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(23): 41-45.