

亚低温对胆红素脑病仔鼠脑保护作用的实验研究

李金玲, 李林, 李翠玲, 谭红香

[摘要] 目的 观察胆红素脑病仔鼠血液神经元特异性烯醇化酶(NSE)、S-100 蛋白(S-100 β)、总胆红素含量(TBC)的变化及亚低温的脑保护作用。方法 出生 7 d 的 Wistar 仔鼠 42 只随机分为 C 组(对照组, $n=10$)、 M_0 组(未干预组, $n=17$)和 M_1 组(亚低温组, $n=15$)。C 组给予腹腔注射生理盐水 0.5 ml, 其余各组腹腔注射胆红素 200 mg/kg 制成胆红素脑病模型。通过病理和血液 NSE、S-100 β 值的变化, 观察亚低温对胆红素脑病仔鼠的脑保护作用。结果 胆红素脑病新生仔鼠出现明显的神经行为异常和病理改变, M_1 组经亚低温干预后血液 NSE、S-100 β 、TBC 下降, 与 M_0 组相比差异有非常显著性意义($P<0.01$)。结论 亚低温对胆红素脑病仔鼠有脑保护作用。

[关键词] 胆红素脑病; 亚低温; 神经元特异性烯醇化酶; S-100 蛋白; 新生鼠

Protective Effect of Mild hypothermia on Brain of Newborn Rats with Bilirubin Encephalopathy LI Jin-ling, LI Lin, LI Cui-ling, et al. The Department of Rehabilitation, the Children Hospital of Guangzhou City, Guangzhou 510120, Guangdong, China

Abstract: **Objective** To observe the changes of neuron-specific enolase (NSE), S-100 protein and TBC in the blood of newborn rats at early stage of bilirubin encephalopathy, and the protective effect of mild hypothermia on the brain. **Methods** 42 Wistar rats (7-day postnatal) were divided randomly into the group C (control group, $n=10$), group M_0 (normal-temperature group, $n=17$) and group M_1 (mild hypothermia group, $n=15$). The rats of the group C received physiological saline 0.5 ml, the rats in the groups of M_0 and M_1 were injected with bilirubin intraperitoneally (200 mg/kg) to establish the model of bilirubin encephalopathy. The changes of the content of NSE and S-100 protein in the blood of newborn rats, and the protective effect of mild hypothermia on brain were observed. **Results** The animals with established bilirubin encephalopathy shown significant changes of neurobehaviour and pathological examination. Values of NSE and S-100 protein of the group M_1 decreased after the treatment of mild hypothermia, and there was a significant difference compared with group M_0 ($P<0.01$). **Conclusion** The mild hypothermia has protective effect on brain of newborn rats with bilirubin intraperitoneally.

Key words: bilirubin encephalopathy; mild hypothermia; neuron-specific enolase (NSE); S-100 protein; newborn rat

[中图分类号] R454.5 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)10-0928-03

[本文著录格式] 李金玲, 李林, 李翠玲, 等. 亚低温对胆红素脑病仔鼠脑保护作用的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(10): 928-930.

胆红素脑病是新生儿期严重高胆红素血症所致的神经综合征, 大约 1/4 的患儿可遗留手足徐动、眼球运动障碍、感觉神经性听力障碍、构音障碍和智力低下等后遗症, 是人类脑性瘫痪、听力障碍、视觉异常、智能发育迟缓等的重要病因。自该病 1904 年被命名以来, 已对其进行了多方面的研究, 但迄今尚无特异治疗方法, 临床的早期干预和治疗较为被动。

低温防治颅脑损伤的作用在上世纪 40 年代就已被认识到。由于轻中度低温($28^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$)有良好的脑保护作用, 江基尧等于 1993 年首先将 $28^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$ 的轻中度低温称为亚低温。国内外学者就亚低温对脑损伤的保护作用进行了大量实验研究和临床观察, 多数结论是肯定的。查阅多篇文献报道^[1-4], 发现亚低温在保护血脑屏障不被破坏、降低脑氧耗量等脑保护方面有很好的疗效, 但在胆红素脑病的治疗中未见报道。

本实验拟通过放射免疫法、酶联免疫法、重氮检测法等方法观察神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、S-100 蛋白(S-100 β)、总胆红素含量(total bilirubin content, TBC)的变化, 探讨亚低温对胆红素脑病的脑保护作用, 从而为胆红素脑病的临床治疗提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物: 出生 7 d 的正常 Wistar 仔鼠 42 只, 随机分为 C 组(对照组, $n=10$)、 M_0 组(未干预组, $n=17$)和 M_1 组

(亚低温组, $n=15$)。主要试剂: 胆红素(美国 Sigma 公司)、NSE 放免药盒(北京北方生物技术研究所)、S-100 β 酶免药盒(第四军医大学生理教研室)。胆红素溶液配制: 避光称取胆红素, 每 50 mg 溶于 1 ml 0.5 M NaOH 中, 加入双蒸水 9 ml, 用 0.5 M HCl 调至 pH 8.5, 并在 1 h 内使用。

1.2 方法

1.2.1 分组处理 C 组仔鼠给予腹腔注射生理盐水 0.5 ml, 于 6 h 断头取血液和脑组织; M_0 和 M_1 组仔鼠给予腹腔注射胆红素溶液(胆红素 200 mg/kg)制成胆红素脑病动物模型, 置于恒温、恒湿、避光环境中自然哺育。造模后 6 h, M_1 组给予亚低温干预, 将动物放入半导体可调恒温水箱内的玻璃缸内, 入缸时水温 25°C , 0.5 h 后升至 29°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$), 并维持此温度至亚低温干预结束。使用直径 0.127 mm 的温度探针(OMEGA 450 AET)进行肛温(rectal temperature, RT)和脑温(brain temperature, BT)测定^[5], 每组随机选 2 只动物用作“探针动物”。“探针动物”在 $29^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 环境温度(environmental temperature, ET)范围内, RT 和 BT 呈显著正相关($BT = 0.6332 + 0.968 RT$, $r = 0.99$, $P < 0.001$)。 M_0 组肛温控制在 $36^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$, M_1 组肛温控制在 $32^{\circ}\text{C} \sim 33^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 标本处理 造模后 24 h 将 M_0 和 M_1 组动物断头取血及脑组织。血清采集与处理: 将动物断头取血液 0.5 ml, 避光条件下 $3\ 500\ \text{rpm}/\text{min}$, 4°C 低温离心 10 min。取上清液, 置 -20°C 冰箱中保存备用。脑组织采集与处理: 取血同时, 于冰盒上迅速将仔鼠断头取脑, 剥离去除粗大血管, 冷生理盐水冲洗数次, 滤纸吸干, 将脑组织矢状缝切开, 一侧脑组织立即放入

作者单位: 广州市儿童医院神经康复科, 广东广州市 510120。作者简介: 李金玲(1976-), 女, 山东日照市人, 医师, 硕士研究生, 主要研究方向: 脑损伤的早期发现与早期干预。

10 %中性甲醛中固定,石蜡包埋,取相当于耳间线前 2 mm 水平行冠状位切片,分别予常规 HE 染色及硫堇尼氏小体染色,光镜下观察。

1.2.3 观察指标 病理学观察光镜下细胞形态改变。生化指标:应用固相原位放射原理测定 NSE;酶联免疫方法测定 S-100 蛋白;重氮检测法测定血清 TBC。

1.2.4 统计学处理 实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行样本均数两两比较的 q 检验、方差分析和两样本均数比较 t 检验。

2 结果

2.1 行为观察 C 组(对照组)动物神经行为能力未见异常。实验组(M_0 组和 M_1 组)仔鼠发生不同程度兴奋、烦躁和易激惹,出现头部有规律的颤抖、尖叫、翻滚,逐渐失去平衡能力,部分仔鼠逐渐出现肌张力增高、抽搐、翻身不能,对外界刺激反应迟钝、肢体运动障碍等。

2.2 病理改变 肉眼观察, M_0 组脑片可见淡黄染,以基底神经节及海马回最重;镜下可见急性坏死的神经细胞、噬神经细胞现象,神经元细胞尼氏小体消失,胞浆略透明,细胞核见核浓缩、核碎裂,神经纤维明显脱髓鞘,神经细胞肿胀,胶质细胞增多,胶质结节形成。24 h 时, M_1 组可见神经元轮廓逐渐清晰,胞核与胞质界限渐能分清,尼氏染色胞质蓝色颗粒明显比 C 组少,偶有颗粒外溢。

2.3 生化指标 M_0 组和 M_1 组的血清 NSE、S-100、TBC 较 C 组显著升高($P < 0.001$),但 M_1 组均低于 M_0 组($P < 0.05 \sim 0.01$),见表 1 ~ 表 4。

表 1 三组动物血清 NSE、S-100 β 含量和胆红素浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NSE (ng/ml)	S-100 β (μ g/L)	胆红素 (μ mol/L)
C 组	4.98 \pm 0.15	0.69 \pm 0.14	16.96 \pm 2.51
M_0 组	6.01 \pm 0.30	3.67 \pm 0.25	294.16 \pm 14.95
M_1 组	5.36 \pm 0.22	2.89 \pm 0.22	217.50 \pm 27.91
F	23.30	216.01	220.72
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:方差分析显示,各组总体均数不等,故采用两两比较 q 检验,结果见表 2 ~ 表 4。

表 2 三组动物血清 NSE 含量均数两两比较

组别	两均数之差	q	P
C 组与 M_0 组	1.0317	12.1392	< 0.01
C 组与 M_1 组	0.3750	4.4125	< 0.05
M_0 组与 M_1 组	0.6567	7.7267	< 0.01

表 3 三组动物血清 S-100 β 含量均数两两比较

组别	两均数之差	q	P
C 组与 M_0 组	2.9793	38.1435	< 0.01
C 组与 M_1 组	2.1907	28.0464	< 0.01
M_0 组与 M_1 组	0.7887	10.0971	< 0.01

表 4 三组动物血清胆红素浓度均数两两比较

组别	两均数之差	q	P
C 组与 M_0 组	277.2033	39.4405	< 0.01
C 组与 M_1 组	200.5333	28.5319	< 0.01
M_0 组与 M_1 组	76.6700	10.9086	< 0.01

3 讨论

近年来,对胆红素脑病,国外学者多以体外培养的神经细胞和 Gunn 大鼠为对象研究胆红素的神经毒性作用^[6]。1997 年,陈舜年建立了新生豚鼠腹腔注射胆红素溶液制备胆红素脑病动物模型的方法^[7],其后国内研究者利用新生大鼠、豚鼠、兔成功制备胆红素脑病动物模型,并进一步研究胆红素的神经毒性和病理改变等^[8,9]。经腹腔注射胆红素溶液制备胆红素脑病动物模型的方法成功率高,重复性好,易于制备,存活期长,利于研究。

本实验采用新生 7 d 仔鼠腹腔注射胆红素 200 mg/kg 制作胆红素脑病动物模型,在生理机能、生化代谢、形态结构上与新生儿胆红素脑病发生机制有相似之处,且可见胆红素沉积于脑组织并引起神经毒性损伤(神经行为异常和病理改变),表明动物模型制备成功。

理想的神经生化标志物具有以下特点:①在神经系统中较高含量并有组织特异性;②只有在不可逆损伤后从受损组织释放出来;③在血浆和脑脊液中可溶,且较稳定;④器官损伤后,酶的释放具有时间依赖性,释放的量对组织损伤范围具有提示作用;⑤与病变程度和预后相关^[10,11]。近年来的研究显示,NSE、S-100 蛋白比较符合上述特点,可反映神经元和神经胶质细胞的损伤程度,是判定胆红素脑病的可靠神经生化指标。血清总胆红素浓度在较低水平即可引发脑神经通路功能的改变,是评价胆红素神经毒性的指标。

本实验结果显示, M_1 组的神经生化指标较 M_0 组均有明显下降($P < 0.01$),表明亚低温干预措施能对抗胆红素的神经毒性作用,发挥脑保护作用。虽然以上指标 24 h 未降到正常水平,但较造模成功时的数值已有明显降低,推测有可能随治疗时间的延长疗效会更好,但亚低温应持续多长时间疗效最佳还有待进一步研究。

Richard 等认为,胆红素的主要毒性作用在于解离线粒体的氧化磷酸化作用,引起明显的能量代谢紊乱^[12]。由于 ATP 含量下降,细胞内 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 逆浓度运出障碍,进而使胆红素堆积至渗透负荷增高,水分子进入,导致细胞水肿。而低温可抑制脑组织的氧化代谢率,保存高能磷酸化合物,抑制乳酸蓄积,维持细胞内外的 pH。一般来说,体温每降低 1 $^{\circ}C$,氧耗量约下降 5 % ~ 7 %。低温可促进 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性的恢复,减少 Ca^{2+} 超载,进而抑制磷脂酶 A2 激活,保护蛋白激酶 C 和钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 的活性,减轻缺血神经元损伤。低温还可改善缺血区组织 DNA 与转录因子的活性,抑制 DNA 的裂解,促进蛋白质合成的恢复,从而减轻脑组织病理损伤,起到脑保护作用,并促进脑功能的恢复。贵晓明等认为,胆红素神经毒性与 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体活性变化有关,内部机制可能是甘氨酸在细胞外过度堆积,提高了 NMDA 受体对兴奋性氨基酸神经递质天冬氨酸、谷氨酸的敏感性,致 NMDA 受体过度活化,参与介导胆红素神经毒性^[13]。国内外许多研究已证实,谷氨酸和其他兴奋性氨基酸在缺血脑组织的组织病理形态损害上起很大作用,脑缺血可引起细胞外谷氨酸浓度剧烈升高,亚低温的神经保护机制与减少兴奋性氨基酸的释放,缓解有害物质对脑组织的损伤有关。故亚低温可对抗胆红素的神经毒性作用,因此有望应用于胆红素脑病的治疗。

亚低温的脑保护作用显著,长程低温对神经细胞有远期保

护作用。但亚低温的脑保护作用仍存在一些实际问题,如脑损伤后不同时间开始低温治疗与低温持续时间的相关关系、亚低温的理想疗程、如何使低温平稳过渡至复温阶段并巩固低温后的疗效、亚低温对脑损伤区半暗带脑功能的影响、如何减少低温对免疫、心血管系统、消化系统等干扰,以及低温本身是否会对神经系统造成损伤等,均有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Zhi DS, Zhang S, Zhou LG. Continuous monitoring of brain tissue oxygen pressure in patients with severe head injury during moderate hypothermia[J]. Surg Neurol, 1999, 52(4): 393—396.
- [2] 只达石,张赛. 第五届日本脑低温疗法研讨会简介[J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19(1): 76.
- [3] 冯爱琼,曾少霞,覃丽红. 高压氧联合亚低温治疗重型颅脑损伤的临床研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(2): 148—149.
- [4] 卢红玉,庞全塘,刘淑萍. 大面积脑梗死并高热老年患者的亚低温治疗疗效观察[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(8): 663—664.
- [5] 秦梅,王兴河,陈莲,等. 亚低温对缺氧缺血损伤保护作用的实验研究[J]. 中华围产医学杂志, 1998, 1(2): 105—108.
- [6] Rodriguez Garay EA, Dickson ER. Intrahepatic distribution of tritiated bilirubin in normal and Gunn rats: subcellular fractionation[J].

Proc Soc Exp Biol Med, 1967, 125(4): 1291—1293.

- [7] 陈舜年, 贡晓明, 夏振伟. 胆红素脑病动物模型制作与鉴定[J]. 新生儿科杂志, 1997, 12(4): 166—169.
- [8] 李晓捷, 郭丽, 李林, 等. 胆红素脑病仔兔血清 NSE 及 MBP 含量的实验研究[C]// 第 23 届国际儿科大会, 北京: 中华医学会, 中华儿科学会, 2001.
- [9] 贡晓明, 陈舜年, 秦玉明, 等. 胆红素脑病模型鼠 EAA 神经递质的检测[J]. 新生儿科杂志, 2000, 15(1): 14—17.
- [10] Hansen TW, Cashore WJ, Oh W. Changes in piglet auditory brainstem response amplitudes without increase in serum or cerebrospinal fluid neuron-specific enolase[J]. Pediatr Res, 1992, 32(5): 524—529.
- [11] Bakay RA, Ward AA Jr. Enzymatic changes in serum and cerebrospinal fluid in neurological injury[J]. J Neuro Surg, 1983, 58(1): 27—37.
- [12] Wennberg RP, Johanson BB, Folbergrova J, et al. Bilirubin-induced changes in brain energy metabolism after osmotic opening of the blood-brain barrier[J]. Pediatr Res, 1991, 30(5): 473—478.
- [13] 贡晓明, 陈舜年, 秦玉明, 等. NMDA 受体拮抗剂胆红素脑病的实验研究[J]. 中国优生优育, 2000, 11: 33—35.

(收稿日期: 2007-08-07)