DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.004
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2169-04

论著

大鼠高胆红素血症与海马神经细胞凋亡关系的实验研究

杨光英[1],孔祥英[1],吴晓翠[2] ([1]第三军医大学附属西南医院儿科,重庆 400038;[2]解放军第44医院儿科,贵阳 550009)

提 要:目的 探讨高胆红素血症新生大鼠海马区Fas蛋白、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的表达、神经细胞凋亡率及其相关性,以进一步阐明胆红素的神经毒性机制。方法 通过制作高胆红素血症动物模型,采用免疫组化法、TUNEL法及流式细胞术检测大鼠海马区Fas蛋白、NMDA受体的表达率及神经细胞的凋亡率,并探讨其间相关性。结果 高胆红素血症时,海马区神经组织,Fas蛋白、NMDA受体表达率及神经细胞凋亡率明显增高,且与脑组织胆红素浓度呈正相关。结论 高胆红素血症时,胆红素可通过NMDA受体过度活化和Fas系统的参与,传递凋亡信号,介导胆红素神经毒性的发生,导致神经细胞凋亡。

关键词:高胆红素血症;Fas蛋白;NMDA受体;凋亡
中图法分类号:R322.8;R329.25;R725.52 文献标识码:A

Relationship between hyperbilirubinemia and nerve cell apoptosis in rat hippocampus

YANG Guang-ying, KONG Xiang-ying, WU Xiao-cui (Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of bilirubin in the hippocampus of the newborn rats with hyperbilirubinemia. Methods Hyperbilirubinemia model was established. The expression levels of Fas protein and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and the apoptosis rate of nerve cells in rat hippocampus were detected with immunochemistry, TUNEL method and cytometry. Results Histological changes of nerve cells were found in hippocampal area of rats with hyperbilirubinemia. Significantly increased expression levels of Fas protein and NMDA receptor and apoptosis rate of nerve cells were positively correlated with the bilirubin level in rat brain tissues. Conclusion The bilirubin neurotoxicity is mediated by the excessive activation of NMDA receptor and participation of Fas system, which induces the apoptosis of nerve cells.

Key words: hyperbilirubinemia; Fas protein; NMDA receptor; apoptosis

新生儿高胆红素血症是新生儿临床常见病症,若并发胆红素脑病可致新生儿死亡[1~3],幸存者常留下智力障碍、听力损伤等神经系统后遗症[4]。正确认识胆红素神经毒性机制,对于防治胆红素神经毒性,提高人口素质有重要价值。本研究通过制作高胆红素血症动物模型,检测海马区Fas蛋白、NMDA受体的表达率及神经细胞凋亡率并探讨其间相关性,为进一步阐明胆红素脑病的发病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生1周的SD大鼠26只,体质量15.5~19.8 g,雌雄不拘,由贵阳医学院实验动物中心提供。

1.2 仪器设备

组织分散器(GT-1型,江苏海门其林医用仪器厂);分析天平(TG328A型,上海天平仪器厂);光学显微镜(CH型,OLYMPUS);透射电镜(JEM-2000EX型);721型分光光度计(四川仪表九厂);离心机(LD-2型,北京医用离心机厂);恒温培养箱(PYX-DHS型,上海市跃进医疗器械厂);MEPICS ELITE EST型流式细胞仪(美国库特尔公司)。

1.3 药品与试剂

胆红素由Sigma公司提供。兔抗大鼠Fas蛋白的多克隆抗体由北京中山生物有限公司提供,NMDA受体检测试剂盒由深圳晶美生物有限公司提供,细胞凋亡原位检测试剂盒(德国Boechring mannheim公司产品)由北京中山生物有限公司提供,其它试剂均为国产分析纯。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 将实验动物分成对照组(Control group, CG, $n=10$)、实验1组(Tested group 1, T_1G, $n=8$)和实验2组(Tested group 2, T_2G, $n=8$)。

1.4.2 动物模型的制作 避光称取胆红素20 mg溶于1 ml 0.5 mol/L NaOH中,加入双蒸水9 ml,用0.5 mol/L HCl调节pH至8.5,配制成胆红素溶液。向T_1G和T_2G大鼠腹腔内注射胆红素溶液,注射剂量分别为0.171 μmol/g(100 μg/g)和0.342 μmol/g(200 μg/g),给药后于恒温、恒湿和避光环境中自然哺育

作者简介:杨光英(1974-),女,贵州省六盘水市人,硕士,医师,主要从事新生儿黄疸方面的研究,现在贵州省贵阳市解放军第44医院儿科。电话:(0851)3803042
收稿日期:2002-09-26;修回日期:2003-08-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

48 h。CG 动物除以生理盐水取代胆红素溶液外，其余条件与 T_1G、T_2G 相同。

1.4.3 标本的获取 将动物断头取血 0.5 ml，重氮反应法测定血清胆红素浓度，取血同时迅速取左侧海马组织 1 mm×1 mm×2 mm 2 块置于冰冷的固定液中作切片，分别行组织染色及光镜、电镜观察，右侧海马组织置于冰冷的 Hanks 液中，其余脑组织称重后置于冰醋酸制成 10%的匀浆，以等体积甲醇-氯仿混合溶剂(甲醇∶氯仿=1∶1)抽提，用重氮反应法测定脑组织胆红素浓度。

1.4.4 脑组织形态观察 将各组 1/2 实验动物左侧 1 mm×2 mm×1 mm 2 块海马组织中的其中 1 块入戊二醛中固定、脱水，环氧树脂中包埋，再行超薄切片，电镜观察；另 1 块用福尔马林固定、切片、HE 染色，光镜观察。

1.4.5 脑组织 Fas 蛋白免疫组织化学染色 取海马中部脑组织 1 mm×2 mm×1 mm 1 块连续快速冰冻切片依次加入 0.3% H_2O_2 甲醇溶液、蛋白酶 K 消化，2%牛血清白蛋白、兔抗大鼠 Fas 蛋白的多克隆抗体，生物素化的羊抗兔 IgG，DAB 显色。结果以光镜下呈黄色者为阳性细胞。

1.4.6 脑组织 NMDA 受体免疫组织化学染色 连续快速冰冻切片依次入大鼠抗 NMDAR1，2A/B、Biotin 标记的驴抗大鼠血清(1∶100，Vector)、ABC 复合物(1∶200，Vector)、含 0.02% DAB 和 0.3% H_2O_2 的 Tris-HCl 溶液中染色，铬明胶贴片、晾干、脱水、透明。

1.4.7 脑细胞凋亡率 TUNEL 法检测 取海马组织 1 mm×2 mm×1 mm 1 块连续快速冰冻切片，依次加入蛋白酶 K 消化，3% H_2O_2 室温下反应，以 1∶9 滴加末端脱氧核苷酸转移酶∶带荧光素的 X-DUTP，DAB 染色。以光镜下细胞呈紫红色者为凋亡细胞。

1.4.8 脑细胞凋亡率流式细胞仪检测 取置于 Hanks 液(pH 7.4)中的海马组织，剔除软脑膜及血管，加入 1.25 g/L 胰蛋白酶液制成匀浆，筛网过滤，RNase 处理后加入 EB 染液，MEPICS ELITE EST 流式细胞仪检测并进行计算机分析得出神经细胞凋亡率。

1.5 统计学处理

采用 t 检验及直线相关分析。

2 结果

2.1 海马区组织学变化

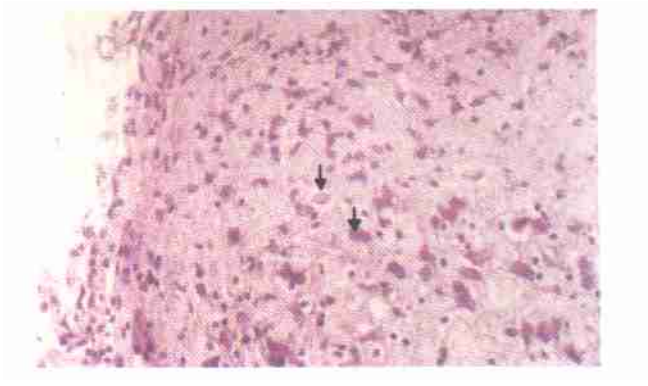
光镜下 CG 未见胆红素沉积，T_1G、T_2G 有黄色胆红素沉积，神经细胞肿胀，T_2G 部分细胞呈嗜酸性变，见图 1。电镜下可见 T_1G、T_2G 线粒体肿胀，线粒体嵴断裂，染色质浓缩、边集，T_1G 有少许髓鞘样蜕变物形成，T_2G 细胞出现核凹陷，髓鞘样蜕变物形成增多，见图 2。

2.2 脑组织胆红素浓度

CG 脑组织胆红素浓度为 0，T_1G、T_2G 的脑组织胆红素浓度分别为(6.59±0.22) mmol/g 和(8.27±0.60) nmol/g，T_2G 明显高于 T_1G，有非常显著性差异($P<0.01$)。

2.3 Fas 蛋白及 NMDA 受体的表达

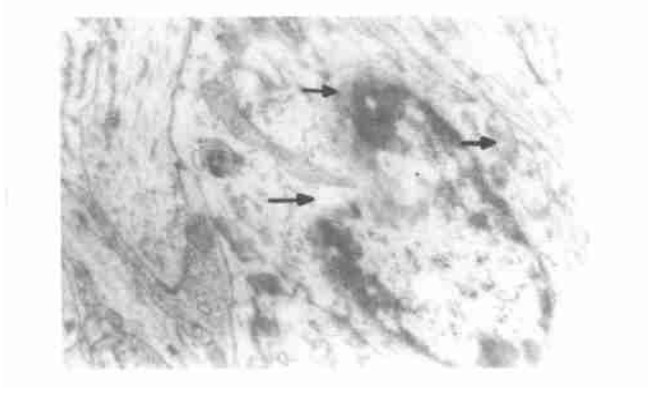
在 10×10 放大倍数下，每张切片中随机选取 5 个 2 cm×2 cm 的视野，计算阳性细胞表达率($\bar{x}\pm s$)%。T_1G、T_2G 的 Fas 蛋白表达率分别为(19.13±0.25)%和(33.38±3.54)%，均明显高于 CG 的(6.81±1.69)%($P<0.01$)；该两组的 NMDA 受体表达率分别为(32.00±3.70)%和(55.61±3.82)%，亦明显高于 CG 的(23.31±1.95)%($P<0.01$)。就 T_2G 与 T_1G 比较，前者的 Fas 蛋白表达率和 NMDA 受体表达率，又显著高于 T_1G，差异有显著性($P<0.01$)，见图 3、4。



↑: Swelling of nerve cells can be seen and some are acidophile

图 1 实验 2 组的海马神经细胞 (HE×400)

Fig 1 Hippocampal nerve cells T_2G (HE×400)



↑: Swelling of mitochondria, concentrated chromatin and flattened nuclear membranes are seen

图 2 实验 2 组的海马神经细胞超微结构 (TEM×5 000)

Fig 2 Ultrastructure of the hippocampal nerve cell in T_2G (TEM×5 000)

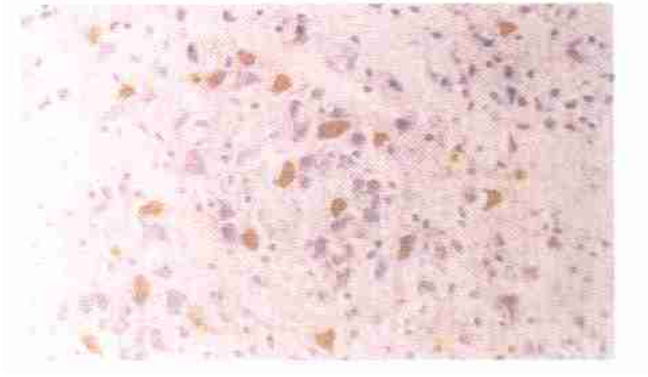


图 3 实验 2 组的海马神经细胞 Fas 表达 (ABC×200)

Fig 3 Fas expression of hippocampal nerve cells in T_2G (ABC×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

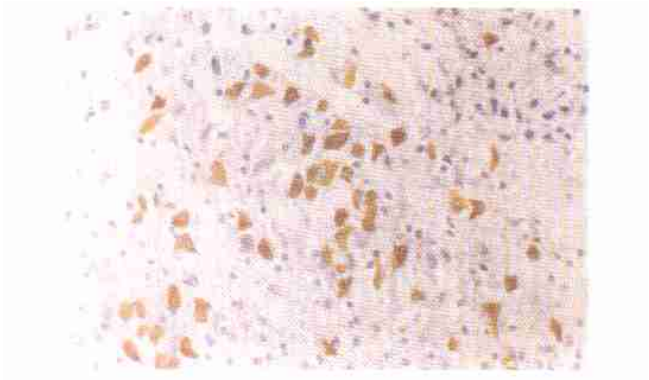


图 4　实验 2 组的海马神经细胞 NMDA 受体表达　(ABC× 200)

Fig 4　Expression of NMDA receptor of hippocampal nerve cells in T_2G　(ABC× 200)

2.4　神经细胞凋亡率的检测

流式细胞仪检测 CG 未见明显凋亡峰, 而 T_1G、T_2G 的 G_1 期峰值则明显升高, S 期明显下降, 并可见到典型的亚二倍体凋亡峰(AP), 见图 5。就神经细胞凋亡率而言, T_1G 为(6.13±0.37)%、T_2G 为(15.44±0.64)%, 均显著高于 CG 的(1.12±0.23)%, 而 T_2G 又较 T_1G 显著增高($P<0.01$)。TUNEL 法原位检测的神经细胞凋亡率, CG 仅为(1.51±0.71)%, 而 T_1G、T_2G 分别达到(5.00±0.93)%和(14.25±1.04)%, T_1G、T_2G 均显著高于 CG($P<0.05$, $P<0.01$); T_2G(图 6)又显著高于 T_1G($P<0.05$)。

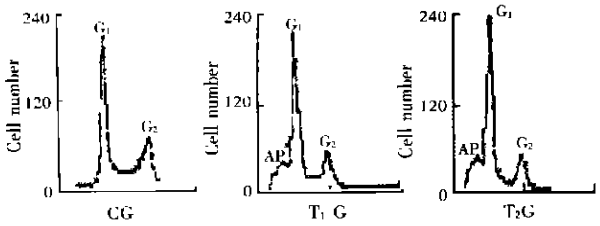


图 5　各组的神经细胞凋亡情况　(流式细胞术)

Fig 5　Apoptosis of nerve cells in CG, T_1G and T_2G　(flow cytometry)

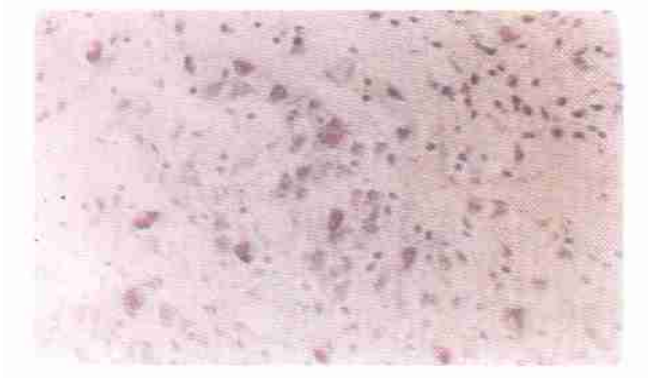


图 6　实验 2 组海马神经细胞的凋亡阳性细胞　(TUNEL×200)

Fig 6　Apoptosis rate of hippocampal nerve cells in T_2G　(TUNEL×200)

2.5　组间、组内数据直线相关分析结果

CG、T_1G 及 T_2G 海马区神经细胞 Fas 蛋白、NMDA 受体表达率、凋亡阳性细胞率及流式细胞术检测神经细胞凋亡率随着脑组织胆红素浓度的增加而增加, 各项检测指标在 CG、T_1G 及 T_2G 内呈显著正相关, 直线相关分析结果见表 1。

表 1　各项检测指标之间的相关性分析(r)

Tab 1　Correlation analysis of the detected indexes in T_1G and T_2G and CG(r)

Detected index	T_1G	T_2G
Bilirubin concentration and expressions of Fas protein	0.79☆☆	0.83☆☆
Bilirubin concentration and expressions of NMDA receptors	0.63☆	0.72☆
Bilirubin concentration and the rate of neuronal apoptosis	0.95☆☆	0.87☆☆
Expressions of Fas protein and the rate of neuronal apoptosis	0.75☆☆	0.82☆☆
Expressions of NMDA receptors and the rate of neuronal apoptosis	0.98☆☆	0.97☆☆

☆: $P<0.05$, ☆☆: $P<0.01$ *vs* CG

3　讨论

凋亡又称程序性细胞死亡(PCD), 是机体受到凋亡的刺激信号后, 诱导细胞周期停滞, DNA 断裂、降解, 含量减少, 将携带不可修复 DNA 的细胞主动清除的消亡过程, 从而维持机体的正常运行。凋亡规律一旦失常, 机体将出现病理现象, 导致老年性痴呆、帕金森病等退行性疾病及肿瘤的形成。

新生儿期, 由于红细胞破坏较多, 肝脏对胆红素摄取与转化能力较低, 胆红素肠肝循环增加, 易发生新生儿高胆红素血症。在感染、缺氧、低血糖等病理情况下, 胆红素与白蛋白结合度降低, 血浆游离胆红素增多, 血脑屏障开放, 胆红素沉积于脑组织, 引起神经细胞毒性损伤, 导致记忆力下降、学习能力差等神经系统后遗症。

本实验显示在高胆红素血症时, 海马区神经细胞呈嗜酸性变, 有染色质边集、浓缩, 出现核凹陷, 基本符合凋亡的组织学改变, 未出现凋亡小体, 考虑与凋亡小体存在的时间短暂, 不易捕获有关。经 TUNEL 原位法及流式细胞仪检测, 发现随着脑组织内胆红素浓度的增加, T_1G、T_2G 海马区凋亡阳性细胞增多, 神经细胞周期提前, 细胞停滞在 G_1 期的比例增加, 不能向 S 期、G_2 期及 M 期发展完成有丝分裂的全过程, G_1 期前有明显亚二倍体凋亡峰出现, 细胞凋亡率明显增高, 与脑组织内胆红素浓度呈明显正相关, 进一步验证高胆红素血症时, 胆红素可导致神经凋亡的发生。

NMDA 受体是中枢神经系统兴奋性氨基酸受体(NRS)的亚类, 为离子型谷氨酸受体, 受配基调节, 不仅对单价离子 Na^+、K^+ 有通透性, 而且对 Ca^{2+} 有高通透性[4,5]。在体内, NMDA 受体参与了许多复杂的生理

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和病理机制，如诱导长时程增强作用(LTP)，控制着大脑神经元回路及神经退行性变。近年来的研究表明，NMDA 受体的活性对听力、语言功能及认知、记忆力的形成有重要影响[6,7]。Fas 抗原是存在于细胞表面的一种跨膜蛋白受体，属于肿瘤坏死因子受体家族(TNFR1 亚)，在环境刺激如 X 线、紫外线、毒素、药物的作用下均可诱导其表达。

本实验通过建立高胆红素血症模型，检测大鼠海马区 Fas 蛋白及 NMDA 受体表达，发现二者在 T_1G、T_2G 的表达率明显高于 CG，T_2G 明显高于 T_1G，差异有显著性($P<0.01$)，与脑组织内胆红素浓度呈明显正相关，与神经细胞凋亡率呈显著相关性，进而证明胆红素通过诱导 Fas 系统参与，NMDA 受体过度活化，介导胆红素神经毒性，导致神经细胞凋亡。其机制可能如下：①高胆红素血症时，胆红素进入脑组织后优先与突触膜结合，使脑能量代谢障碍，ATP 贮备耗竭，致使脑细胞内 Na^+、Ca^{2+} 逆浓度转运障碍，胞内 Na^+、Ca^{2+}、Cl^- 堆积，细胞内外离子浓度的正常梯度不能维持，突触前膜持续去极化，谷氨酸(Glu)等兴奋性氨基酸持续释放，加上胶质细胞逆浓度摄取回收减少，致胞外谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)持续上升。Glu 通过激活蛋白激酶 C(PKC)、钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ(CaMPK Ⅱ)，再作用于 NMDA 受体，使之过度磷酸化；其次，由于突触前膜去极化致 NMDA 受体离子通道内的 Mg^{2+} 让位，NMDA 受体过度活化。过度激活的 NMDA 受体使 Ca^{2+} 内流增加，NMDA 受体离子通道内 Mg^{2+} 让位，大量 Ca^{2+} 内流，使神经细胞内 Ca^{2+} 超载。持续升高的游离 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]i$)和甘油二酯(DAG)共同作用，通过有丝分裂原蛋白激酶(MAPK)通路，激活磷脂酶 A_2(PLA_2)或与 ATP 共同作用于染色质，使 DNA 降解，从而导致神经细胞凋亡发生[8]；②Fas 作为一种坏死因子受体，可通过激活半胱氨酸水解酶途径、神经鞘磷脂循环信号传递通路或通过有丝分裂原蛋白激酶(MAPK)的两个亚类 JNK 和 EPK 传递 Fas 的凋亡信号，诱导细胞凋亡。

参考文献：

[1] Govuley G R. Bilirubin metabolism and kernicterus[J]. Adv Pediate, 1997, 44: 173-229.

[2] 俞惠民，洪文澜，施丽萍，等. 新生儿间接高胆红素血症患儿远期随访观察[J]. 中华儿科杂志，1996, 34(5): 324-326.

[3] 黄 宁. 早期新生儿高胆红素血症的诊疗探讨[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(11): 1072, 1076.

[4] Inglefield J R, Schwartz-Bloom R D. Activation of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampal slice increase intracellular Cl^- and cell volume[J]. J Neuochem, 1998, 71(4): 1396-1404.

[5] Sung K W, Kirby M, Mcdonald M P, *et al*. Abnormal GABA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransports null mice[J]. J Neurosci, 2000, 20(20): 7531-7538.

[6] Kelly J B, Kidd S A. NMDA and AMPA receptors in the dorsal nucleus of the lateral lemniscus shape binaural in rat inferior colliculus[J]. J Neurophysiol, 2000, 83(3): 1403-1414.

[7] Zhang H M, Kelly J B. AMPA and NMDA receptors regulate responses of neuron on the rat's inferior colliculus[J]. J Neurophysiol, 2001, 86(2): 871-880.

[8] Grojean S, Koziel V, Vert P, *et al*. Bilirubin induces apoptosis *via* activation of NMDA receptor in developing rat brain neurons[J]. Exp Neurol, 2000, 166(2): 334-341.

(编辑 张 宁)

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于 1984-02-27 公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27 国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准，全国必须统一采用的计量单位。

我国的法定计量单位包括：①国际单位制的基本单位，如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等；②国际单位制的辅助单位；③国际单位制中具有专门名称的导出单位，如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J)；④国家选定的非国际单位制单位，如时间(min、h、d)、转速(r/min)；⑤由以上单位构成的组合形式单位，如速度(m/s)、浓度(mol/L)；⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位，如 μm、kPa、ml 等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外，均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母，无复数形式，符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位，例如：Pa、Gy、W 等和 10^6 以上的词头，例如：M、G、T 等的首字母大写以外均为小写，“升”的符号可用大写(L)也可用小写(l)，一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如：化学元素符号)之间应留半个阿伯数字空隙，词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用，也不能重叠使用(例如：“mμm”应为“nm”)。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net