

[文章编号] 1000-2200(2007)01-0010-04

· 基础医学 ·

新生豚鼠高胆红素血症时 P50抑制变化的研究

丁辉^{1,3}, 何平², 马原野³

[摘要]目的: 评价新生豚鼠高胆红素血症时 P50抑制值[即 T/C值(T为实验, C为对照)]的动态变化对神经系统的毒性作用。方法: 出生 5~7天的新生豚鼠 30只, 随机分成 5组, 每组 6只。其中, 第一组为正常对照组(C), 其余 4组为实验组(T)。5组新生豚鼠均在硫喷妥钠麻醉下行颅骨电极包埋术, 待手术麻醉清醒后, 分别测各组新生豚鼠的 T/C值。检测完毕, 分别向其中 2组实验组动物腹腔注入胆红素溶液 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 h 8 h后观察; 另 2组实验组动物腹腔注入胆红素溶液 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 h 8 h后观察。正常对照组动物均向腹腔注入生理盐水 0.5 ml。各组动物在观察完行为学变化和 T/C值检测后, 再迅速处死动物, 取脑组织, 在光镜、电镜下观察脑组织结构的变化。结果: 实验豚鼠在注入胆红素溶液后, 除 T1b组变化不明显外($P > 0.05$), 其余各组豚鼠 T/C值的变化差异均有统计学意义($P < 0.01$)。不同实验组与正常对照组的 T/C值的变化差异也均有统计学意义($P < 0.01$)。结论: P50抑制(T/C)在高胆红素血症不同时段均有明显变化, 可以较早期地(在胆红素聚集阶段)预测胆红素对神经系统的毒性作用, 为临床预防和评价高胆红素血症对新生儿神经系统损伤提供一种新的方法。

[关键词] 胆红素过多; 黄疸, 新生儿; P50感觉门控; 豚鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 552 R 722.17 [文献标识码] A

A study on the change of sensory gating in guinea pigs with hyperbilirubinemia

DING Hui¹, HE Ping², MA Yuan ye³

(1. Department of Pediatrics Anhui General Hospital of Forcad Police Hefei 230041;

2. Department of Pediatrics The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College Kunming 650031;

3. Institute of Kunming Animal Chinese Academy of Sciences Kunming 650081, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the toxic influence of the change of T/C on the nervous system of neonatal guinea pigs with hyperbilirubinemia. **Methods** Thirty neonatal guinea pigs at 5 to 7 days of age were randomly divided into five equal groups: one control group and four experiment groups. They were embedded electrode in cranium after anesthesia. Experiment groups were injected with crystal bilirubin (T1: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; T2: 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and control group with normal saline (0.5 ml). T/C were recorded and nervous systems including their behavior were observed before and after 4 h, 8 h of injection. Then guinea pigs were executed and taken their brain tissue which were observed under optical and electron microscope. **Results** T/C in experiment groups there is statistical significance between before and after celiac injection of bilirubin ($P < 0.01$), except T1b group ($P > 0.05$). T/C in all groups T1(T1a, T1b) groups and T2(T2a, T2b) groups respectively compared with the control group and there is statistical significance between them ($P < 0.01$). **Conclusion** The change of T/C in hyperbilirubinemia at different concentration and time we can forecast the injury of neural toxicity in hyperbilirubinemia early. Sensory gating as a measurement of cognitive and attention to the brain may evaluate and prevent the injury of brain to neonate in clinic.

[Key words] hyperbilirubinemia; jaundice, neonatal; P50 sensory gating; guinea pig

新生儿高胆红素血症是新生儿时期最常见的疾病之一, 约半数以上出现不同程度的黄疸, 尤其是病情严重者, 因其可能引起胆红素脑病(即核黄疸)^[1], 可造成严重的中枢神经系统病变, 威胁新生儿的生命和健康, 病死率高, 50%~75%患儿死于急性期, 幸存者约 75%~90%留有严重的神经系统后

遗症, 是人类听力障碍、视觉异常、智能发育迟缓以及其它神经行为异常的重要原因之一^[2]。因此, 早期预测和及时干预新生儿高胆红素血症, 对防止胆红素脑病及其后遗症的发生有极其重要的意义。

作为大脑一种正常功能的“感觉门控”(sensory gating)是指大脑能抑制无关的感觉刺激输入。P50属于一种中潜伏期诱发电位, 是出现在听觉刺激后 30~90 ms间的大脑皮层一个正相波。P50是衡量感觉门控效率的常用指标, 即反映中枢神经系统抑制功能强弱的一个可靠指标^[3]。当给予受试者较短刺激间隔的重复刺激时, 其中第二个刺激(S2)引起的 P50波幅与第一个刺激(S1)引起的 P50波幅比值, 即 P50的 S2/S1波幅比值称为 P50抑制(T/C)。目前 P50抑制被广泛地认为是测量感觉门控

[收稿日期] 2006-04-04

[基金项目] 云南省教育厅自然科学研究资助项目(03z520c)

[作者单位] 1 武警安徽总队医院 儿科, 安徽 合肥 230041; 2 昆明医学院附属二院 儿科, 云南 昆明 650031; 3 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650018

[作者简介] 丁辉(1974-), 男, 主治医师(现首都医科大学儿科博士研究生)。

的一种可操作性手段。根据高胆红素血症时脑损伤机制, TC 会发生变化, 本实验根据以往成功的胆红素脑病动物模型^[4], 动态观察动物在不同浓度胆红素注射后不同时间段 P50 的变化, 以探讨 P50 抑制对胆红素神经系统损害的早期诊断和监测的价值, 为临床防治胆红素脑病提供更完善的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 取出生后 5~7 天的杂色豚鼠 30 只(由昆明医学院实验动物中心提供), 体重 50~70 g 雌雄不限, 外耳道清洁, 耳廓反应灵敏, 四肢活动自如, 肌张力正常。将其随机分为 5 组, 即: (1)生理盐水正常对照组 6 只(C); (2)高胆红素血症实验组 12 只(T1); (3)胆红素脑病实验组 12 只(T2); T1、T2 组分别随机分成 2 组, 各 6 只, 分别于给药后 4 h(T1a T2a)、8 h(T1b T2b)观察其行为学变化及指标测定。

1.2 实验动物的准备 取新生豚鼠, 分别予 2% 硫喷妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 麻醉成功后, 置豚鼠于脑立体定位仪上, 固定头部, 剪开颅顶皮肤, 刮除颅骨上软组织, 暴露颅骨, 止血, 待干燥后, 参照邵殿华^[5]的方法, 在颅骨表面标记记录电极、参考电极、地线 3 个点, 用小型电钻钻穿颅骨, 旋入小螺钉固定, 并按顺序焊上电极, 连接到一个小型的 3 针插头上, 将医用牙托水和牙托粉混匀成牙托水泥, 用其将整个装置固定于颅骨表面, 待牙托水泥凝固后, 从脑立体定位仪上取下豚鼠, 备用。

1.3 动物模型制作

1.3.1 胆红素溶液的配制 避光称取晶体胆红素 20 mg 溶于 1 ml 0.5 mol/L NaOH 溶液中, 加入双蒸水 9 ml 用 0.5 mol/L HCl 溶液调节 pH 至 8.5 配成胆红素溶液。

1.3.2 对照组动物模型(C) 取手术后清醒新生豚鼠 6 只, 腹腔注入生理盐水 0.5 ml 待测。

1.3.3 高胆红素血症模型(T1) 取手术后清醒新生豚鼠 12 只, 腹腔注入胆红素溶液 100 μ g/kg 各 6 只分别作 4 h(T1a)、8 h(T1b)观察, 待测。

1.3.4 胆红素脑病模型(T2) 取手术后清醒新生豚鼠 12 只, 腹腔注入胆红素溶液 200 μ g/kg 各 6 只分别作 4 h(T2a)、8 h(T2b)观察, 待测。

1.4 指标测定

1.4.1 神经行为观察 包括对外界刺激反应、四肢运动及肌张力等情况的观察。

1.4.2 P50 的记录 豚鼠头部的插头首先被连接(通过一个可拔插的插座)到一个前置放大器, 该放大器有助于减轻运动带来的干扰, 所有豚鼠于腹腔

注射前及后 4 h 8 h 分别在隔音室内利用扬声器发出的相隔 500 ms 的两个声音刺激, 记录豚鼠的 EEG, 随后, EEG 信号被放大, 滤波及数字化, 这两个声音刺激的强度均为 80 dB, 叠加 100 次, 每屏扫描时间为 12 ms, 取波形重复良好者。最后数据被保存在电子表格内(Microsoft Excel), 用 Matlab 软件对所有数据进行分析, 计算 S2/S1 波幅比值, 即 P50 抑制值(TC 值)。

1.4.3 形态学观察 各组动物在电生理记录完毕, 分别抽取腹主动脉血 1 ml 检测其胆红素浓度后, 立即处死, 取脑组织正中切开, 一半置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 光镜观察脑组织胆红素沉积情况; 另一半置入戊二醛中固定, 脱水, 环氧树脂中包埋, 再行超薄切片(片厚 5 μ m), 电镜观察, 以验证模型的建立是否成功。

1.5 统计学方法 采用 *t* 检验和方差分析及 *q* 检验。

2 结果

2.1 神经行为观察结果 正常生理盐水对照组, 和注射前无明显变化, 无神经行为异常; 注射胆红素后 T1a、T1b 组及 T2a 组, 逃避反应佳, 后肢有力, 个别有不同程度的精神萎靡; T2b 出现明显神经行为异常, 逃避反应差, 其中 3 例俯伏。

2.2 光镜观察结果 取各组动物脑组织 HE 染色后, 在光镜下检查: T1、T2 组在注射胆红素 4 h 后, 即可见不同程度的胆红素沉积, 但生理盐水对照组与实验组比较神经元未见明显异常改变, 神经元细胞核大而圆, 位于细胞中央(见图 1); T2 组在注射胆红素 8 h 后可见细胞排列散乱, 大小不一, 胞质深浅不等, 核着色较深, 部分浓染(见图 2)。

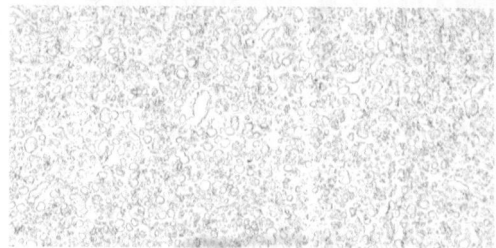


图 1 对照组神经元结构未见明显改变, 细胞结构正常

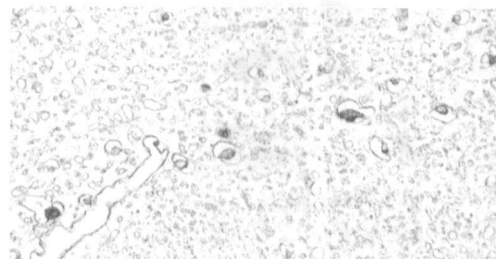


图 2 T2 组神经元细胞排列散乱, 核着色较深, 部分浓染

2.3 电镜观察结果 注射胆红素后,取各组动物脑组织超薄切片在电镜下观察:T1a、T1b、T2a的线粒体、核等超微结构未见明显异常改变,仅见部分神经纤维水肿(见图3);T2b可见线粒体较正常组变圆,着色深,嵴模糊,粗面内质网弯曲扩张,增多,糖原颗粒散在堆积,核染色质有浓缩、边集现象,可见残体(见图4)。

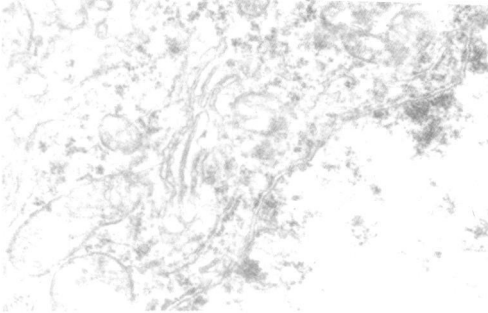


图3 T2a神经细胞,线粒体结构尚正常

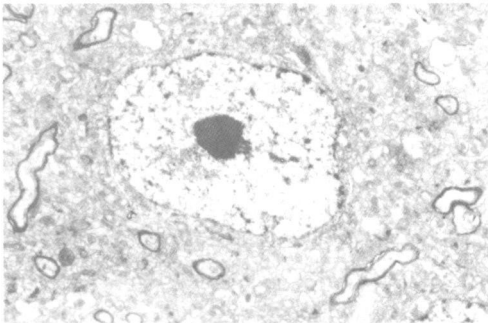


图4 T2b神经细胞结构改变,有残体形成

2.4 实验结果 除T1b组豚鼠注射胆红素溶液后T/C变化不明显外($P>0.05$),其余各实验组豚鼠在注入胆红素溶液后T/C值均有影响($P<0.01$)(见表1)。不同动物间实验组与正常对照组的T/C值比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。而实验组间差异均无统计学意义($P>0.05$)(见表2)。

表1 实验各组实验前后T/C值比较($n_i=6 \bar{x} \pm s$)

分组	用药前	用药后($\bar{d} \pm s_d$)	t	P
T1a	0.516 ± 0.102	-0.090 ± 0.040	5.51	< 0.01
T1b	0.761 ± 0.228	-0.030 ± 0.114	0.64	> 0.05
T2a	0.715 ± 0.140	-0.378 ± 0.106	8.73	< 0.01
T2b	0.616 ± 0.092	-0.348 ± 0.058	14.70	< 0.01

自身对照配对t检验,均 $P<0.01$

3 讨论

新生儿时期,由于胆红素产生较多,肝脏对胆红素摄取与转化能力较低,以及胆红素肠肝循环等诸多因素,导致新生儿高胆红素血症的发生;特别在病理状态下,由于胆红素白蛋白结合度降低,过量胆红

表2 各组T/C值变化比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	4h [☆]	8h ^{☆☆}	t	P
C	6	0.824 ± 0.128	0.696 ± 0.151	1.58	> 0.05
T1	6	0.426 ± 0.107 ^{**}	0.429 ± 0.176 ^{**}	0.04	> 0.05
T2	6	0.310 ± 0.101 ^{**}	0.268 ± 0.098 ^{**}	0.73	> 0.05
F	—	34.39	13.27	—	—
P	—	< 0.01	< 0.01	—	—
MS _{组内}	—	0.013	0.021	—	—

q检验:与正常组比较^{*} $P<0.01$;[☆]示实验T1a、T2a组;^{☆☆}示实验T1b、T2b组

素可通过开放的血脑屏障沉积于脑组织,抑制神经元能量代谢,致脑细胞水肿,造成神经细胞毒性损伤。本研究T2b组动物脑组织标本在电镜下可见线粒体肿胀、嵴断裂、神经元破坏等损伤,与文献报道一致^[6],且在T2b组的神经元内看到明显的残体形成,该残体证实为胆红素在神经元内沉积所致,故从形态学上直接证明了胆红素对神经细胞的毒性作用。Rodrigues等^[7]研究发现:胆红素通过影响线粒体的通透性而释放细胞色素C,再作用于Caspase产生一系列瀑布式级联放大反应,从而导致神经细胞凋亡的发生,因此,胆红素对神经细胞的毒性作用通过线粒体的ATP产生受抑制和由线粒体介导的神经细胞凋亡共同体现。董淑兰等^[8]研究发现:在新生儿,尤其是早产儿,血清胆红素在较低水平时即引起脑神经通道功能的改变,在新生儿期,胆红素的神经毒性作用可以在临床上未有表现,因此,仅凭血清胆红素水平并不能确定其预后。通过临床和实验研究发现,在胆红素聚集、结合阶段,其病变是可逆的,临床上常应用脑干听觉诱发电位(BAEP)^[9,10]、闪光视觉诱发电位(FVEP)^[11]来评价听觉、视觉传导神经通道功能状态,预测胆红素所致的脑损害。在新生儿高胆红素血症期,体感诱发电位(SEP)也有助于监视胆红素对中枢神经系统的影响。但它们的敏感性还受到一定的限制。

感觉门控作为一种保护机制在多种哺乳动物种系中存在^[12]。P50抑制是反映大脑抑制功能,即测量感觉门控的一种直观的脑电生理学新指标,P50属中潜伏期电位,是近年来研究的热点之一。它具有跨种属存在,多种感觉形式和多种刺激参数下稳定广泛的出现,以及可以精确定量描述等特点。所以,P50用来反映感觉门控障碍所造成的认知、感觉、运动异常的神经精神疾病,对它的研究也有了长足的发展,特别是在精神分裂症、癫痫、亨廷顿舞蹈病、抽动-秽语综合征等神经精神疾病的研究。有

研究^[13]表明, 损毁出生 7 天的大鼠腹侧海马, 有感觉门控的变化, 在其成年后有神经精神等异常症状, 推测感觉门控对神经系统损害的远期评价有一定的价值, 因此, 它可能成为评价胆红素对新生儿神经系统远期损害的一个指标。

脑损伤能影响听觉 P50 的改变, 使 P50 波幅降低。用深部电极能从人的海马部位记录到较小的 P50 波。推测动物和人类 P50 的产生依赖于海马部位, 尤其是 CA₃ 区, 故这个部位的损伤能改变 P50 波。在新生儿胆红素脑病的病理切片可以发现某些区域被非结合胆红素染成黄色, 特别是丘脑下小体、海马回区、嗅周围、纹状体、丘脑、苍白球、豆状核、下斜坡、小脑核和颅神经核^[14]。所以新生儿高胆红素血症时应该可以检测到 P50 波的变化。

根据胆红素进入脑组织对神经元毒性作用的机制, 胆红素在脑内聚集阶段, 出现突触递质的磷酸化作用受抑制, 导致酪氨酸吸收减少, 随之多巴胺的合成量也减少。有研究表明, 感觉门控的变化有赖于突触前多巴胺 (DA) 释放的变化。而听觉诱发电位 P50 作为感觉门控的一个衡量指标, 反映这种变化, 它的变化应该是抑制增强, 即 S2/S1(TC) 应该减小。我们的实验证明了这一点, 在 T1、T2 各个实验组, 分别于腹腔注射胆红素前和后测同一动物的 TC 作自身对照, 分析表明, 除 T1b 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余各实验组差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明这种 S2/S1 值的减小有实际意义。各实验组与对照组以及各实验组之间比较发现, 各实验组与对照组差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 而在实验组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明胆红素对新生豚鼠神经元的毒性作用引起了 P50 的变化, 即感觉门控的变化。本实验未对听觉诱发电位 P50 BAEP、F-VEP 作比较。

本实验以 1 周内的新生豚鼠作为动物模型, 主要有以下原因: (1) 新生豚鼠肝脏酶系统功能不健全, 与新生儿高胆红素血症发生条件有相似之处; (2) 豚鼠中枢发育相对成熟, 个体较大, 监测胆红素神经毒性作用较可靠, 且在包埋电极时较易成功。在实验中采用 50~70 g 的新生豚鼠, 与文献报道比较稍大, 其原因是: 在预实验中发现, 新生豚鼠太小, 难以耐受包埋电极手术, 术后死亡率较高。

综上所述, 高胆红素血症可以引起新生儿脑损害, 甚至发展成为胆红素脑病, 是危害公共健康的疾病之一, 因此, 早期发现、早期干预是防止严重并发

症发生的关键^[15]。由于脑内胆红素与血清胆红素水平不呈正相关, 所以, 目前无法为临床提供最低的胆红素干预标准。听觉诱发电位 P50 是感觉门控的测量指标, 它可以较早期地 (在胆红素聚集阶段) 预测胆红素对神经系统的毒性作用, 而且, 感觉门控作为一种反映大脑认知及注意力的一个指标^[16], 使它可能成为评价胆红素对神经系统损伤的远期影响。P50 是一种无创的电生理检查, 操作简便, 有望成为动态监测新生儿高胆红素血症的一种新手段。

[参 考 文 献]

- [1] 孙素欣. 高胆红素血症新生儿脑干听觉诱发电位检测及其意义 [J]. 蚌埠医学院学报, 2005 30(3): 264-265
- [2] 俞善昌. 新生儿高胆红素中毒性脑病发病机制的研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 1997 15(1): 3-5.
- [3] Oranje B Van Berckelaer IBN, Kemner G, et al P50 suppression and prepulse inhibition of the startle reflex in human [J]. *Biol Psychiatry*; 1999 45(7): 883-890.
- [4] 陈舜年, 贲晓明, 李佩红, 等. 胆红素脑病动物模型制作与鉴定 [J]. 新生儿科杂志, 1997 12(4): 166-168
- [5] 邵殿华. 豚鼠脑干听觉中枢的立体定位 [J]. 生理学报, 1988 40(4): 386-389.
- [6] 贲晓明, 陈舜年, 秦玉明, 等. 兴奋性氨基酸受体拮抗剂对胆红素神经毒性的影响 [J]. 中华儿科杂志, 2000 38(3): 144-146.
- [7] Rodrigues CM, Sola S Brites D. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons [J]. *Hepatology* 2002 35(5): 1186-1195.
- [8] 董淑兰, 华青, 于爱华, 等. 新生儿高胆红素血症的远期随访研究 [J]. 中国实用儿科杂志, 1999 14(2): 87-88
- [9] 陈碧琴, 彭巧娣, 周康, 等. 行为测定和脑干听觉诱发电位在新生儿高胆红素血症中的应用 [J]. 中国当代儿科杂志, 2001 3(3): 295-296
- [10] 周丛乐. 高胆红素血症对新生儿听力损害及脑干听觉诱发电位检查 [J]. 中国实用儿科杂志, 1999 14(2): 81-82
- [11] 周艳, 陈吉庆, 袁孝如, 等. 高胆红素血症新生大鼠闪光视觉诱发电位的实验研究 [J]. 南京医科大学学报, 2001 21(3): 226-228.
- [12] 李量, 邵枫. 精神分裂症的听感觉运动门控障碍的动物模型 [J]. 科学通报, 2003 48(15): 1603-1612
- [13] Lipska BK, Jaskiw GE, Weinberger DR. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage [J]. *Neuropsychopharmacology* 1993 9(1): 67-75
- [14] Walker E. Nelson Textbook of Pediatrics [M]. 15th ed 西安: 世界图书出版公司, 1999 716.
- [15] Lillian R Avroy A Tonse NK, et al Research on prevention of bilirubin induced brain injury and kernicterus [J]. *Pediatrics* 2004 114(1): 229-233.
- [16] 王世伟, 唐一源, 赵杰, 等. 认知障碍的前脉冲抑制模型 [J]. 国外医学·精神病学分册, 2003 30(4): 244-248