

·论著·

在体微透析检测豚鼠胆红素脑病模型 脑组织兴奋性氨基酸神经递质

贲晓明 陈舜年 秦玉明 何振娟 孙安阳 吴圣楣

[摘要] 目的 探讨胆红素脑病动物模型制作及其脑组织中兴奋性氨基酸(EAA)神经递质变化。方法 豚鼠腹腔内给予胆红素 200 $\mu\text{g/g}$ 后 8 h,电镜观察脑组织形态结构,在体脑内微透析提取神经突触间细胞外液,HPLC检测分析天冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu)和甘氨酸(Gly)。结果 胆红素毒性脑组织神经元及其线粒体肿胀,细胞外 Gly 含量为 $21.35 \pm 4.87 \mu\text{M}$,明显高于对照组 $14.02 \pm 1.56 \mu\text{M}$ ($P < 0.01$);胆红素毒性脑组织细胞外 Asp, Glu 与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。结论 胆红素毒性脑组织细胞外甘氨酸(Gly)含量增加,可提高 NMDA 受体对 EAA 神经递质 Asp 及 Glu 敏感性,致 NMDA 受体过度活化。

[关键词] 兴奋性氨基酸;胆红素脑病;脑内微透析;高效液相色谱;豚鼠

[中图分类号] R - 332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2000)01 - 0018 - 03

Microdialysis of Hippocampus for Measurement of the Neurotransmitter in Bilirubin Induced Encephalopathy Guinea Pigs in Vivo

BEN Xiao-Ming, CHEN Shun-Nian, QIN Yur-Ming, et al.

Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092

Abstract: **Objective** To study the excitatory amino acid (EAA) neurotransmitter concentration in bilirubin induced encephalopathy. **Methods** Guinea pigs with bilirubin - induced encephalopathy were fixed in the stereotaxic frame. The microdialysis probe was inserted in the hippocampus zone, Krebs' s ringer was irrigated and extracellular liquid was collected for analyses with high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The concentration of EAA neurotransmitter Gly in the extracellular liquid of the bilirubin precipitated brain was $21.35 \pm 4.87 \mu\text{M}$, significantly higher than that in the control group ($14.02 \pm 1.56 \mu\text{M}$). EAA neurotransmitter Glu and Asp did not show any significant change in the animal model compared with the control. **Conclusions** The increase of EAA neurotransmitter Gly concentration in the extracellular liquid of the bilirubin precipitated brain tissues might increase the sensitivity of the ligand Asp and Glu to the NMDA Receptor.

Key words: Excitatory amino acid; Bilirubin encephalopathy; Microdialysis; High performance liquid chromatography; Guinea pig

新生儿高胆红素血症是新生儿临床常见病症,并发胆红素脑病可致新生儿死亡,幸存者常留下神经系统后遗症,合理科学防治胆红素脑病对于优生优育有重要价值。近年来研究表明 NMDA 受体过度活化参与胆红素脑病发生^[1],为进一步探讨 NMDA受体活性变化的内在机制,我们对胆红素神

经毒性新生豚鼠进行在体脑内微透析,提取神经突触间细胞外兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAA),并作高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测分析。

[基金项目] 上海科学技术发展基金项目(954119025)
[作者简介] 贲晓明,男,1966 年出生,医学博士,主治医师。
[作者单位] 200092 上海第二医科大学附属新华医院儿科研究所(贲晓明,秦玉明,何振娟,吴圣楣); 200025 上海第二医科大学附属瑞金医院(陈舜年); 200032 上海医科大学神经生物学国家重点实验室(孙安阳)

1 材料与方法

1.1 动物模型制作

生后 1~2 d 豚鼠 18 只,重 20~25 g,雌雄不拘,购自上海生物制品研究所。随机分成对照组和模型组,每组 9 只。对照组豚鼠予生理盐水 0.5 ml 腹腔注射,模型组豚鼠^[2,3]于腹腔内给予胆红素 200 $\mu\text{g/g}$ 。

1.2 脑组织形态结构观察

动物模型制作后 8 h,取豚鼠脑组织投于戊二醛溶液中,乙醇梯度脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,电镜观察。

1.3 微透析提取神经递质

微透析探头 (microdialysis probe) 购自瑞典 CMA 公司,透析膜长 3 mm、直径 0.5 mm、透析截流分子量 20 000 Daltons,探头长 14 mm,不锈钢外管直径 0.64 mm。模型制作 8 h 后用乙醚吸入麻醉,按 Sander 方法^[4]将大鼠固定于立体定向仪 (stereotaxic frame) 中,参照鼠立体定向图谱,将探针固定于海马区域 (探针位置术后经由解剖证实)。灌流液为 Kreb's - ringer 液,流速 2.5 $\mu\text{l/min}$,灌流 1.5 h 后开始收集检测样本,持续收样 1 h。

1.4 EAA 神经递质 HPLC 分析

取微透析细胞外液 50 μl 、加内标液 (甲硫氨酸 250 $\mu\text{M/L}$) 50 μl ,涡流振摇,加入 micropure separator (millipore) 离心去除蛋白质、核酸及悬浮大颗粒。取滤液 50 μl ,加入衍生化试剂 (PITC 异硫氰酸苯脂 甲醇 三乙胺 水 = 1 7 1 1) 50 μl 涡流振摇、室温反应 10 min,真空干燥^[4]。真空干燥样本加入 NaH_2PO_4 稀释液 500 μl ,涡流混匀,取 200 μl 混合液进样。分析柱为 HPLC - 氨基酸专用分析柱,管径 15 cm $\times$ 4.6 mm (ID),柱温维持 38 $^{\circ}\text{C}$;柱填充 Taq 硅胶,规格 120A;流动相 A 泵进样 15MNaAc,B 泵进样乙晴 甲醇 水 = 9 3 8,A + B 进样流速 1 ml/min。紫外检测、波长 254 nm、氨基酸波峰积分微处理计算氨基酸含量^[4]。

2 结果

2.1 脑组织形态结构

电镜观察显示:豚鼠腹腔给予胆红素后 8 h,脑神经元及其线粒体肿胀,而正常对照组脑线粒体不肿胀。见图 1,图 2。

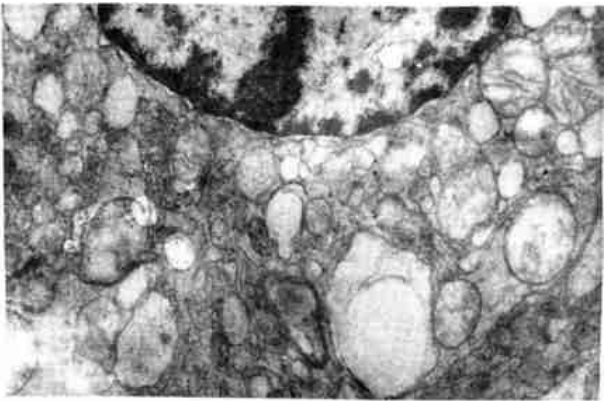


图 1 模型组线粒体肿胀明显 ($\times 6000$ 倍)

Fig 1. Mitochondrial swelling in bilirubin precipitated neurons.

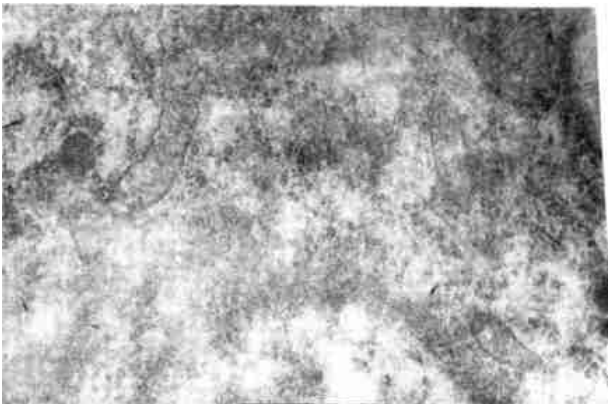


图 2 对照组正常线粒体 ($\times 6000$ 倍)

Fig 2. Normal neuron mitochondria in the control group ($\times 6000$)

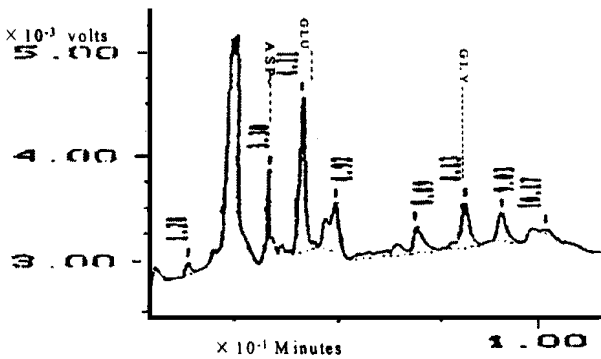


图 3 透析液 HPLC 氨基酸色谱图

Fig 3. Excitatory amino acid chromatography

2.2 透析液 HPLC 氨基酸含量及色谱图

模型组透析液 Gly 含量为 $21.35 \pm 4.87 \mu\text{M}$,明显高于对照组 $14.02 \pm 1.56 \mu\text{M}$ ($P < 0.01$);模型组透析液 Asp, Glu 含量与对照组比较差异不显著 (P

> 0.05)。见附表。色谱图见图 3。

附表 透析液氨基酸含量($\bar{x} \pm s$, μM)

Table Contents of EAA in the extracellular liquid of brain				
组别	n	Asp	Glu	Gly
对照组	9	0.37 $\pm$ 0.294	2.56 $\pm$ 0.40	14.02 $\pm$ 1.56
模型组	9	0.674 $\pm$ 0.453	5.76 $\pm$ 5.35	21.35 $\pm$ 4.87
t		1.427	1.415	3.132
P		0.165	0.17	0.008

3 讨论

胆红素神经毒性的发生与能量储备耗竭相关;这种胆红素对能量代谢的影响涉及线粒体膜相关电传导与化学传导阻断和 ATP 生成障碍;在既往研究中我们亦证实胆红素神经毒性细胞 ATP 含量下降^[2]。由于 ATP 含量下降、细胞内 Na⁺,Ca²⁺ 逆浓度运出障碍;胞内 Na⁺,Cl⁻,Ca²⁺ 堆积至渗透负荷增高,水分子进入,细胞水肿。同时由于胞内外离子浓度梯度不能维持,突触前膜持续去极化,Glu 等兴奋性氨基酸持续释放,加之胶质细胞逆浓度摄取回收减少,致胞外兴奋性氨基酸神经递质持续上升^[1,5]。

EAA 主要指 Glu,Asp;兴奋性氨基酸受体分为 NMDA 受体和非 NMDA 受体(包括 AMPA/Quisqualate 受体和 Kainate 受体)。NMDA 受体活性主要是开放 Ca²⁺ 通道,其激活至少需三个信号:Gly 与 NMDA 受体结合,Glu/Asp 与 NMDA 受体结合,膜去极化致 NMDA 受体离子通道内 Mg²⁺ 让位、Ca²⁺ 内流。由于 NMDA 受体上 Gly 位点结合是 NMDA 受体活化前提,因而 Glu,Asp,Gly 均为 EAA 重要组成^[6]。

在本研究中,脑组织电镜观察显示脑神经元及其线粒体肿胀。表明豚鼠腹腔给予胆红素后 8 h,可

出现胆红素脑病的病理表现,在此状态下提取神经递质,能较好地反映胆红素脑病的病理机制。在本研究中,胆红素脑病模型组神经细胞外 Gly 较对照组明显升高($P < 0.01$),而 Asp,Glu 尽管较对照组平均值升高,但差异不显著($P > 0.05$)。在既往对 HIE 及低血糖动物模型脑内微透析研究中,显示 Asp 增高尤为明显,Glu 次之,而对 Gly 未作测试与统计^[4]。尽管胆红素神经毒性与 HIE、低血糖发生机制有根本差别,但均涉及细胞内能量代谢水平降低,因而可能有一些相通的病理生理途径,在 NMDA 受体活性变化上可能有一致之处。本研究中神经细胞外 Gly 在胆红素神经毒性新生鼠明显升高,而 Gly 是 NMDA 受体活性的前提配体,提示可能通过 Gly 提高 NMDA 受体对 Asp,Glu 敏感性。致 NMDA 受体过度活化,参与介导胆红素神经毒性。

[参 考 文 献]

[1] Mcdonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, et al. Excitatory amino acid neurotransmitter systems contribute to the pathophysiology of bilirubin encephalopathy. *Ann Neurol*, 1990, 28: 413 ~ 415.

[2] 陈舜年,袁晓明,夏振伟. 胆红素脑病动物模型制作与鉴定. *新生儿科杂志*,1997, 12: 166 ~ 169.

[3] Wennberg RP, Hance AJ. Experimental bilirubin encephalopathy. *Pediatr Res*, 1986, 20: 789 ~ 792.

[4] Sander M, Butcher SP, Hagberg H. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin - induced hypoglycemia; in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem*. 1986, 47: 178.

[5] Wennberg RP, Johanson BB, Folbrearova J, et al. Bilirubin induced changes in brain energy metabolism after osmotic opening of the blood brain barrier. *Pediatr Res*, 1991, 30: 473 ~ 478.

[6] Amit Y, Cashores W, Schiff D. Studies of bilirubin toxicity at the synaptosome and cellular levels. *Seminars in Perinatology*, 1992, 17: 186 ~ 190.

(收稿日期:1999 - 09 - 13 修回日期:1999 - 11 - 08)
(本文编辑:黄志强)

重要启事

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

中国当代儿科杂志社