

· 论 著 ·

高胆红素血症新生大鼠脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的研究

周艳, 陈吉庆, 邵小松

(南京医科大学第一附属医院儿科, 江苏 南京 210029)

【摘 要】 目的 探讨胆红素神经毒性的作用环节, 研究胆红素脑病发病机理。方法 72只新生7 d SD大鼠随机分为对照组(C组)和实验组(T组), T组又根据腹腔注射胆红素剂量的依次增加分为 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 和 T_5 组。检测各组脑组织和血清中胆红素含量, 定磷法测定脑组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$)活力。结果 给药后4 h和8 h均随着腹腔注射胆红素量的增加, 血清总胆红素浓度、脑组织内胆红素含量逐渐增加, 脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力则逐渐降低, 除 T_1 组外余各组与对照组相比差异均有显著性($P < 0.05$ 或 0.01); 各实验组血清胆红素浓度4 h、8 h之间差异无显著性($P > 0.05$), 但脑组织内胆红素含量、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力除 T_1 组外各组4 h、8 h之间差异有显著性($P < 0.05$)。血清总胆红素浓度与脑组织内胆红素含量无相关性($r = 0.28$, $P > 0.05$), 脑组织内胆红素含量与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力呈负相关($r = -0.86$, $P < 0.01$)。结论 脑组织内胆红素对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力有抑制作用。

【关 键 词】 高胆红素血症; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶; 脑; 胆红素; 新生鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2001)06-0636-03

Action of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ of the Brain in Neonatal Rats with Hyperbilirubinemia

ZHOU Yan, CHEN Ji-Qing, SHAO Xiao-Song

Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract: **Objective** To observe the action of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ of the brain in neonatal rats with hyperbilirubinemia and to explore the pathogenesis of bilirubin encephalopathy. **Methods** Seventy-two 7-day-old SD rats were randomly assigned to the control group and the experiment group. The rats of the experiment group were subdivided into 5 groups: T_1 , T_2 , T_3 , T_4 and T_5 groups according to the increased bilirubin injected intraperitoneally. And the hyperbilirubinemic animal model was established. The bilirubin contents in the brain and serum were measured and the action of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the brain was assayed by measuring the inorganic phosphorous content per milligram protein of brain tissues in the rats. **Results** Four and 8 hours after the bilirubin injection, as the injected bilirubin was increasing, the serum total bilirubin concentration and the brain bilirubin content were increasing, and the action of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the brain was decreasing. Except for the T_1 group, there were significant differences in all the experiment groups compared with the control group ($P < 0.05$ or 0.01). No difference was found in the serum bilirubin content between 4 and 8 hours after the bilirubin injection in all the experiment groups, while there were significant differences in the brain bilirubin content and the action of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the brain between 4 and 8 hours after the bilirubin injection in the $T_2 - T_5$ groups ($P < 0.05$). There was negative relation between the bilirubin content and the action of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the brain ($r = -0.86$, $P < 0.01$). No relation was noted between the serum total bilirubin concentration and brain bilirubin content. **Conclusions** The bilirubin might inhibit the action of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the brain.

Key words: Hyperbilirubinemia; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; Brain; Bilirubin; Neonatal rat

胆红素神经毒性的机制并未完全明确,血脑屏障通透性增加、胆红素易于沉积于神经细胞膜,引起胆红素中毒神经元突触传递功能下降,线粒体生物氧化受阻、能量代谢障碍是其焦点^[1]。本研究通过给新生 7 d SD 大鼠腹腔注射不同剂量的胆红素,观察不同血清胆红素水平下新生大鼠脑组织内胆红素含量和神经元细胞膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 酶活性,旨在研究胆红素神经毒性的作用环节,为胆红素脑病发病机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

生后 7 d SD 大鼠 72 只,体重 14~18 g,雌雄不限,购自南京医科大学实验动物中心,随机分成 6 组:对照组(C组)12 只,实验 1 组(T_1 组)、实验 2 组(T_2 组)、实验 3 组(T_3 组)、实验 4 组(T_4 组)、实验 5 组(T_5 组)各 12 只。

1.2 方法

1.2.1 胆红素溶液配制 避光称取晶体胆红素(Sigma 公司)50 mg,溶于 1 ml 1M NaOH 中,加入双蒸水 9 ml,用 1M HCl 调节 pH 至 8.5^[2]。

1.2.2 高胆红素血症动物模型制备 C 组 SD 大鼠腹腔注射生理盐水 0.5 ml, T_1 组 SD 大鼠腹腔注射胆红素 30 mg/kg, T_2 组腹腔注射胆红素 60 mg/kg, T_3 组腹腔注射胆红素 90 mg/kg, T_4 组腹腔注射胆红素 120 mg/kg, T_5 组腹腔注射胆红素 150 mg/kg。分别于给药后恒温、恒湿、避光环境下自然哺育 4 h(T_{1a} 组、 T_{2a} 组、 T_{3a} 组、 T_{4a} 组、 T_{5a} 组,每组 $N=6$)、8 h(T_{1b} 组、 T_{2b} 组、 T_{3b} 组、 T_{4b} 组、 T_{5b} 组,每组 $N=6$)后取血 0.1 ml,用微量胆红素测定仪(TOITU BL-100A,日本生产)微量法测定血清胆红素浓度,制成高胆红素血症动物模型后断头取脑。

1.2.3 脑组织内胆红素含量测定 SD 大鼠断头取脑后,脑组织沿正中切开,一侧称重后,置 2 ml 冰醋酸中匀浆,加等体积丙酮摇匀离心(3000 转/min, 15 min),抽提上清液于 450 nm 分光光度计测光吸收度,根据胆红素标准曲线换算出脑组织胆红素浓度^[3]。

1.2.4 脑组织神经元细胞膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 酶活性测定 另一侧脑组织称重,加生理盐水制成 2% 匀浆液,2 000 转/min 离心 10 min,取上清 0.1 ml,用定磷法测定 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力^[4],单位为每小时 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 。ATP 酶检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,具体步骤按试剂盒说明书操作。

1.3 统计学分析

统计学处理采用 t 检验和相关分析。

2 结果

随着腹腔注射胆红素量的增加给药后 4 h 和 8 h 的血清总胆红素浓度、脑组织内胆红素含量均逐渐增加, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力则逐渐降低,除 T_1 组外其余各组与对照组差异均有显著性($P < 0.05$ 或 0.01)。各实验组血清总胆红素浓度 4 h, 8 h 之间差异无显著性($P > 0.05$),但脑组织内胆红素含量、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力除 T_1 组外其余各组 4 h, 8 h 之间差异有显著性($P < 0.05$)。见表 1, 2。血清总胆红素浓度与脑组织内胆红素含量无相关性($r = 0.28$, $P > 0.05$),脑组织内胆红素含量与 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力呈负相关($r = -0.86$, $P < 0.01$)。

表 1 给药后不同时间血清及脑组织内胆红素水平

Table 1 Levels of bilirubin in serum and brain at 4 h and 8 h after injection ($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

组别	血清胆红素($\mu\text{mol/L}$)		脑组织胆红素($\mu\text{mol/g}$)	
	给药后 4 h	给药后 8 h	给药后 4 h	给药后 8 h
C 组	16.10 $\pm$ 7.00	17.85 $\pm$ 6.98	0	0
T_1 组	26.23 $\pm$ 9.98	27.40 $\pm$ 8.20	0	0
T_2 组	55.80 $\pm$ 14.10 ^a	68.73 $\pm$ 15.70 ^a	0.41 $\pm$ 0.03 ^b	0.57 $\pm$ 0.06 ^{b,c}
T_3 组	92.60 $\pm$ 16.11 ^b	97.03 $\pm$ 19.93 ^b	3.58 $\pm$ 0.35 ^b	4.40 $\pm$ 0.48 ^{b,c}
T_4 组	140.87 $\pm$ 23.58 ^b	159.30 $\pm$ 24.23 ^b	11.35 $\pm$ 0.56 ^b	14.70 $\pm$ 1.10 ^{b,c}
T_5 组	217.33 $\pm$ 34.01 ^b	237.62 $\pm$ 36.21 ^b	13.83 $\pm$ 1.00 ^b	17.47 $\pm$ 1.46 ^{b,c}

注: a 与 C 组相比 $P < 0.05$; b 与 C 组相比 $P < 0.01$; c 与给药后 4 h 相比 $P < 0.05$

表 2 给药后不同时间 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力

Table 2 The action of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ of brain at 4 h and 8 h after injection ($n=12$, $\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol}/\text{mg}$)

组别	$\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力	
	给药后 4 h	给药后 8 h
C 组	11.80 $\pm$ 1.21	11.85 $\pm$ 2.15
T_1 组	11.67 $\pm$ 1.55	11.29 $\pm$ 1.49
T_2 组	9.39 $\pm$ 1.00 ^a	9.93 $\pm$ 0.84
T_3 组	2.46 $\pm$ 0.39 ^b	1.77 $\pm$ 0.33 ^b
T_4 组	1.04 $\pm$ 0.16 ^c	0.86 $\pm$ 0.10 ^c
T_5 组	0.83 $\pm$ 0.10 ^b	0.61 $\pm$ 0.08 ^c

注: a 与 C 组相比 $P < 0.05$; b 与 C 组相比 $P < 0.01$; c 与给药后 4 h 相比 $P < 0.05$

3 讨论

$\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 是存在于细胞膜上的蛋白质,由 α 和 β 两个亚基组成,1个亚基为酶的活性中心,另1个亚基与酶的稳定性有关。酶分子通常是成双成对地定位在膜上,暴露的表面分别朝向细胞膜的内外两侧。3个 Na^+ 和ATP结合到膜的内表面,接着一个磷酸基转移到酶分子上,随即释放出ADP。酶的构象变化后, Na^+ 输出到细胞膜外并从酶上释放,代之以两个 K^+ 结合到酶上。当结合在酶分子上的磷酸基移去后, K^+ 输入到细胞膜内,并从酶上脱离。由于输出的 Na^+ 比输入的 K^+ 多,这种差别使细胞膜内外形成电势差。跨膜电势差是神经刺激沿神经纤维或肌肉细胞传导的条件。当电刺激脑组织时, K^+ 流向细胞外, Na^+ 流向细胞内, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 减少,ADP和无机磷增加,促进了糖酵解和三羧酸循环^[5]。

胆红素神经毒性是由可逆到不可逆逐渐发展的过程。研究表明胆红素的毒性作用分为3个步骤:首先单价胆红素阴离子(BH^-)进入脑组织后优先与突触膜上的阳离子基团(神经节苷脂、神经鞘磷脂)形成静电复合物(这个过程发生极快,仅需 $<15\text{ s}$ 即立即反应),静电结合随介质中 H^+ 浓度加大而增多,也可被外加白蛋白分子阻止并逆转;其次是一个缓慢反应($>15\text{ min}$);胆红素酸(BH_2)在细胞膜疏水脂质层中掺和;最后,当细胞膜脂质层中胆红素达到饱和状态时,发生膜诱导 BH_2 沉积。胆红素在生物膜聚集与沉积,非特异性地阻滞膜相关电传导与化学传导(包括 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$),影响神经细胞膜与线粒体的生物功能^[6]。

利用ATP酶可分解ATP形成ADP及无机磷,用定磷法测定无机磷的量可判断 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力,ATP酶活力单位以每小时分解每毫克组织蛋白质产生的有机磷的含量来表明,即每小时 $\mu\text{mol}/\text{mg}$:本文结果提示,随脑组织中胆红素绝对量的增加,突触膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力明显下降,两者呈直线负相关,说明胆红素对 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 具有

抑制作用,抑制程度的大小与胆红素的量有关。由此产生的结果是 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力降低,脑神经元不能顺利地建立细胞内外离子梯度,细胞膜静息电位下降,神经元对冲动的反应性降低,神经传导延长,使神经元的化学传递作用以及神经的传导功能均受影响,从而使脑细胞能量代谢水平下降,神经末梢突触膜去极化反应减弱,并降低机体脑电活动(包括脑电幅度降低、传导时间延长),降低脑内磷酸肌酸、ATP含量,且脑电活动变化程度与脑组织胆红素浓度一致^[7],因此高胆红素血症新生儿早期检测闪光视觉诱发电位、听觉诱发电位可反映胆红素神经毒性。本文结果提示血清总胆红素浓度与脑组织中胆红素含量相关无显著性,与近年来一些研究发现相似,认为新生儿,尤其是早产儿血清胆红素在较低水平即可引发脑神经通道功能的改变,较安全的血清胆红素可引起智力、听力、视力的改变,而在新生儿期胆红素的神经毒性可轻微到临床上难以发展,因此单凭血清胆红素水平并不总能确定其预后^[8]。

【参考文献】

- [1] Amit Y, Cashore W, Schiff D. Studies of bilirubin toxicity at the synaptosome and cellular levels [J]. Seminars in Perinatology, 1992, 17(2): 188-194.
- [2] Wennberg PR, Hance AJ. Experimental bilirubin encephalopathy [J]. Pediatr Res, 1986, 20(4): 789-792.
- [3] Elzebeth S. Laboratory measurement of bilirubin [J]. Clinics in Perinatology, 1990, 17(2): 397-416.
- [4] 张丽娅,王桂芬,吴和平.东莨菪碱对兔脑缺血再灌注 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性的影响[J].中国病理生理杂志,2000, 16(1): 67-69.
- [5] 王恩多.ATP合成酶和 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ [J]. 科学,1998, 50(1): 60-62.
- [6] Hansen TW. Bilirubin in the brain: distribution and effects on neurophysiological and neurochemical processes [J]. Clin Pediatr, 1994, 33(8): 452-459.
- [7] 李云珠,夏振炜.新生儿黄疸及胆红素脑病发病机理的研究进展 [J]. 中国实用儿科杂志,1997, 12(2): 73-75.
- [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,1997, 14(2): 87-88.

(本文编辑:俞燕)