

论著 · 实验研究

高胆红素血症新生大鼠耳蜗核 NMDAR 活性变化与听力损伤的实验研究

李克方¹ 杜开先² 蒋月星¹ 董雪蕾¹ 张艳²

(郑州大学第三附属医院 1. 耳鼻喉科; 2. 儿内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨高胆红素血症时听力损伤的机制及 NMDAR 活性变化在此损伤中的作用。方法 7 d 龄 Sprague-Dawley 大鼠 60 只, 随机分为对照组和实验组, 实验组又根据腹腔注射胆红素的剂量 (100 μg/g 和 200 μg/g) 分为 M1、M2 组, 对照组以生理盐水取代胆红素溶液。测试各组动物脑干听觉诱发电位 (ABR), 检测血清胆红素浓度和脑组织胆红素含量, 免疫组化 SABC 法测试大鼠耳蜗核 NMDAR 的活性变化。结果 M1 组和 M2 组 ABR 反应阈明显升高, I、II、III 波潜伏期及 I~II、II~III、I~III 波间期明显延长。M1 组、M2 组耳蜗核 NMDAR 免疫组化平均灰度值明显低于对照组, 与脑组织胆红素含量呈显著负相关, 与 ABR 反应阈亦呈显著负相关。结论 NMDAR 活性升高在高胆红素血症听力损伤过程中发挥重要作用。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(3):201-204]

[关键词] 高胆红素血症; NMDAR; 脑干听觉诱发电位; 听力损伤; 新生大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)03-0201-04

NMDAR expression in the cochlear nucleus and hearing damage in neonatal rats with hyperbilirubinemia

Li Ke-Fang, DU Kai-Xian, JIANG Yue-Xing, DONG Xue-Lei, ZHANG Yan. Department of Otolaryngology, Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Du K-X, Email:dukaixian@126.com)

Abstract: Objective To study the role of N-methyl-D-aspartate-receptor (NMDAR) expression in the development of hearing damage in neonatal rats with hyperbilirubinemia. **Methods** Sixty seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly injected with bilirubin of 100 μg/g (low-dose treatment group) or 200 μg/g (high-dose treatment group) or normal saline (control group). Auditory brainstem response (ABR) was examined. The concentrations of bilirubin in blood and brain were measured. NMDAR expression in the cochlear nucleus slices was examined by immunohistochemistry assay. **Results** ABR reflecting threshold obviously increased, and I, II and III wave latency as well as I-II, II-III and I-III interval were more prolonged in the two bilirubin treatment groups when compared with the control group. The NMDAR expression in the cochlear nucleuse in the two bilirubin treatment groups was obviously lower than that in the control group. The NMDAR expression in the cochlear nucleuse was negatively correlated with the brain bilirubin content and the ABR reflecting threshold in the two bilirubin treatment groups. **Conclusions** An increased NMDAR activity may play an important role in hearing damage following hyperbilirubinemia. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(3):201-204]

Key words: Hyperbilirubinemia; N-methyl-D-aspartate-receptor; Auditory brainstem response; Hearing damage; Neonatal rats

新生儿高胆红素血症是新生儿时期常见病症,若并发胆红素脑病常在急性期导致新生儿死亡,幸存者常遗留神经系统后遗症,以听力损伤最为常见^[1]。研究表明中枢神经系统兴奋性氨基酸 (excitatory amino acids, EAAs) 神经递质及其 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate-receptor, NMDAR) 过度活化参与介导胆红素脑病发生^[2]。为了探讨高胆红素血症时听力损伤的机制及

NMDAR 在此损伤中的作用,本研究在制作高胆红素血症动物模型的基础上,采用免疫组化技术,观察不同血清胆红素水平下脑组织胆红素的含量及耳蜗核组织 NMDAR 活性变化,以及与各组动物脑干听觉诱发电位 (auditory brainstem response, ABR) 的相关性,探讨胆红素对脑干听觉中枢的毒性作用机制,为防治高胆红素血症导致的听力损伤提供实验数据。

[收稿日期] 2009-07-30; [修回日期] 2009-10-31
[作者简介] 李克方,男,硕士研究生,主治医师。
[通信作者] 杜开先,副主任医师。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和模型制备

7 d 龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 体重 9 ~ 20 g, 雌雄不限, 均无强噪声暴露及耳毒性药物使用史。随机分为对照组, 实验 1 组 (M1 组) 和实验 2 组 (M2 组), 每组 20 只。按照 Simmons 等^[3] 及陈舜年等^[4] 的腹腔注射胆红素的经典方法进行胆红素脑病动物模型制作, M1 组和 M2 组大鼠腹腔内注射胆红素溶液分别为 100 μg/g 体重和 200 μg/g 体重。对照组大鼠以 0.5 mL 生理盐水取代胆红素溶液, 其余条件与 M1 组和 M2 组相同。

1.2 神经行为观察

注射后大鼠置于笼中母鼠身边, 恒温恒湿和避光环境中自然哺育 24 h。观察各组动物的一般情况, 有无烦躁、翻滚及俯伏等异常神经行为活动, 耳廓反射及对外界刺激反应灵敏程度。

1.3 ABR 测试

各组动物用药后 24 h 进行 ABR 测试, 测试 ABR 反应阈, I、II、III 波潜伏期及 I ~ II、II ~ III、I ~ III 波间期。ABR 反应阈的判定以 II 波为标准。

1.4 血清胆红素和脑组织胆红素浓度测定

每组取 10 只大鼠断头取血 0.5 mL, 重氮反应法测定血清胆红素浓度^[5]。各组大鼠断头取脑后, 脑组织沿正中切开, 一侧称重后, 置 2 mL 冰醋酸中匀浆, 加等体积丙酮混匀离心 (3 000 r/min × 10 min), 抽提上清液 0.2 mL 加于测试管中, 加入重氮试剂 2.8 mL, 混匀, 5 min 后于波长 450 nm 下读取吸光度 (A450), 根据脑组织胆红素浓度标准曲线换算出脑组织胆红素浓度^[6]。

1.5 耳蜗核切片标本制备和图像分析

各组动物开胸灌注, 开颅取脑干, 固定 1 周。组织经酒精梯度脱水, 二甲苯透明后进行石蜡包埋, 经面神经根平面向后做连续冠状切片^[7], 片厚 7 μm, 取从耳蜗核开始出现至消失的切片。耳蜗核的定位以王平宇^[8] 的《大白鼠中枢神经系统解剖学基础》及《常用实验动物脑立体定位图谱》^[9] 为基础。免

疫组织化学染色采用 SABC 法, DAB 显色, 显微镜下观察, 控制反应时间, 见阳性物质呈棕黄色, 蒸馏水终止显色反应。苏木素轻度复染 (30 s), 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。图像分析采用 HPIAS-1000 (同济医科大学千屏影像工程公司) 电子计算机图像分析系统分析各组大鼠耳蜗核 NMDAR 免疫组织化学染色的平均灰度值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件进行分析, 所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较用 *q* 检验, 各因素之间进行相关性分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验大鼠的一般情况

对照组大鼠呼吸平稳, 无烦躁、翻滚及俯伏等异常神经行为活动, 耳廓反射灵敏, 对外界刺激反应灵敏。M1 组大鼠在给药后 24 h 有 1 例出现烦躁, 1 例出现俯伏, 耳廓反射迟钝, 对外界刺激反应迟钝。M2 组大鼠在给药 24 h 后有 2 例出现翻滚, 3 例出现烦躁, 呼吸急促, 耳廓反射消失, 对外界刺激无逃避反应。

2.2 ABR 测试结果

M1 组和 M2 组用药后, ABR 反应阈明显升高, I、II、III 波潜伏期及 I ~ II、II ~ III、I ~ III 波间期明显延长, 与对照组相比, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。尤其以 II 波潜伏期及 I ~ II 波间期延长最为显著。见表 1。

2.3 实验动物血清和脑组织胆红素浓度

M1 组和 M2 组血清胆红素浓度明显高于对照组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); M2 组明显高于 M1 组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。对照组脑组织胆红素含量为 0, M1 组和 M2 组脑组织胆红素含量明显增高, 并且 M2 组明显高于 M1 组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 2。

表 1 各组 ABR 各波潜伏期 (ms) 及阈值 (dB SPL) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	I	II	III	I ~ II	II ~ III	I ~ III	阈值
对照组	20	1.10 ± 0.04	1.69 ± 0.04	2.56 ± 0.03	0.58 ± 0.04	0.87 ± 0.05	1.46 ± 0.05	16 ± 6
M1 组	20	1.17 ± 0.03 ^a	1.95 ± 0.04 ^a	2.93 ± 0.03 ^a	0.78 ± 0.05 ^a	0.99 ± 0.05	1.76 ± 0.05 ^a	40 ± 8 ^a
M2 组	20	1.25 ± 0.03 ^{a,b}	2.19 ± 0.03 ^{a,b}	3.22 ± 0.03 ^{a,b}	0.95 ± 0.04 ^a	1.02 ± 0.05 ^{a,b}	1.97 ± 0.05 ^{a,b}	59 ± 7 ^{a,b}
<i>F</i> 值		85.21	851.83	2245.42	412.01	51.04	564.26	191.83
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组比较, *P* < 0.05; b: 与 M1 组比较, *P* < 0.05

表 2 各组血清及脑组织内胆红素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	血清胆红素($\mu\text{mol/L}$)	脑组织胆红素(nmol/g)
对照组	10	15.1 ± 0.9	0
M1 组	10	319.5 ± 8.6^a	3.7 ± 0.3^a
M2 组	10	$546.6 \pm 12.4^{a,b}$	$6.5 \pm 0.2^{a,b}$
F 值		9376.36	2236.98
P 值		<0.05	<0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 M1 组比较, $P < 0.05$

2.4 耳蜗核组织苏木精-伊红染色结果

光镜下见对照组大鼠耳蜗核无胆红素沉积,各亚核神经细胞密集,染色均匀,尼氏体正常,胞核和胞浆极少有皱缩和空泡样变;胶质细胞正常,毛细血管壁无增厚,管腔无扩大和缩小。M1 组和 M2 组大鼠耳蜗核可见胆红素沉积,各亚核神经细胞数目明显减少,神经细胞肿胀,胞核和胞浆皱缩,脂褐素沉积,尼氏体减少,胞浆内空泡形成;胶质细胞增生,毛细血管管腔增多,内皮细胞增生肥大,管壁增厚。见图 1(上排)。

2.5 耳蜗核组织 NMDAR 免疫组化活性

光镜下 M1 组和 M2 组大鼠耳蜗核可见 NMDAR 免疫阳性反应物沉积,呈棕黄色颗粒,主要位于细胞膜,神经纤维内亦见阳性沉积物。对照组大鼠耳蜗核内无 NMDAR 阳性沉积物。M1 组和 M2 组耳蜗核 NMDAR 免疫组化平均灰度值分别为 163.3 ± 9.0 、 135.5 ± 5.2 ,明显低于对照组(202.1 ± 7.5),差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时 M2 组耳蜗核 NMDAR 免疫组化平均灰度值明显低于 M1 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1 下排。

2.6 相关性分析

M1 组、M2 组脑组织胆红素含量随着血清胆红素浓度增加而增加,但无相关性。耳蜗核组织 NMDAR 的免疫组化平均灰度值与脑组织胆红素含量呈显著负相关。M1 组、M2 组 ABR 反应阈随着脑组织胆红素浓度的增加而增加,呈显著正相关。耳蜗核组织 NMDAR 的免疫组化平均灰度值与 ABR 反应阈呈显著负相关。各指标之间相关性分析结果见表 3。

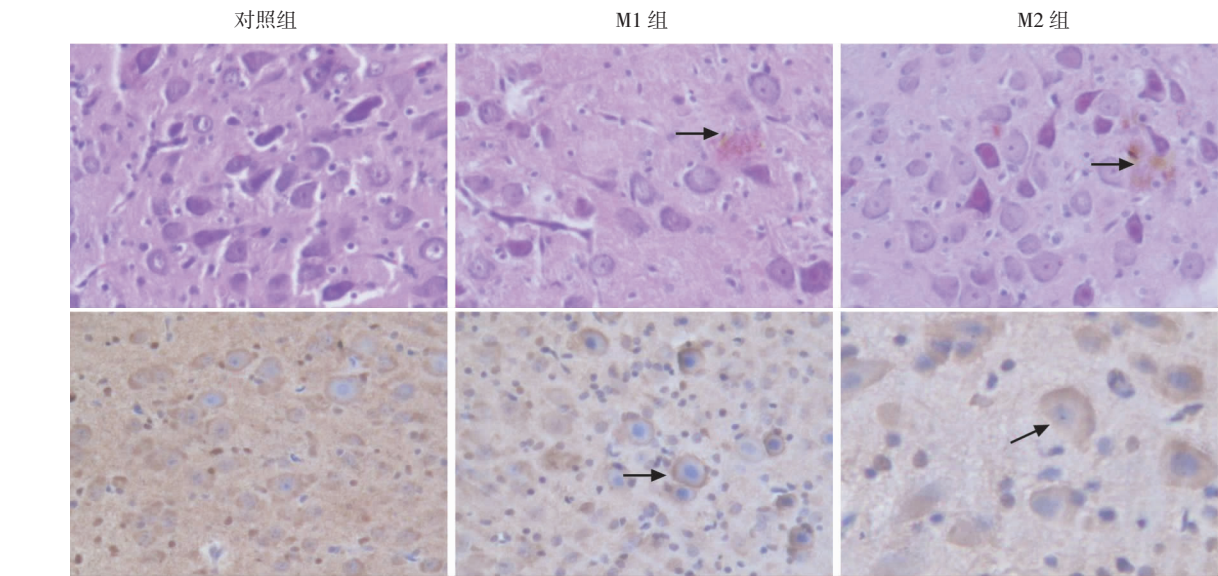


图 1 耳蜗核组织苏木精-伊红染色结果(×400,上排)和 NMDAR 免疫组织化学染色结果(×400,下排) 上排示 M1 组和 M2 组均可见胆红素沉积(箭头所示)。下排示 M1 组和 M2 组的球形细胞表面可见棕黄色 NMDAR 阳性反应物大量沉积(箭头所示)。

表 3 各指标之间的相关性分析				
指 标	M1 组		M2 组	
	r 值	P 值	r 值	P 值
血清胆红素与脑组织胆红素	0.283	0.429	0.312	0.380
血清胆红素与 ABR 阈值	0.413	0.235	0.257	0.474
脑组织胆红素与 ABR 阈值	0.946	0.000	0.694	0.026
血清胆红素与 NMDAR 灰度值	0.124	0.732	0.283	0.428
脑组织胆红素与 NMDAR 灰度值	-0.886	0.001	-0.964	0.000
NMDAR 灰度值与 ABR 阈值	-0.809	0.005	-0.947	0.000

3 讨论

目前对高胆红素血症时听力损伤的机制研究甚少。且不同浓度胆红素对机体具有不同作用^[10],本实验采用出生后 1 周的 SD 大鼠,腹腔内注射不同剂量的胆红素,24 h 后部分大鼠出现神经行为的异常,随着血清胆红素量的增加,耳蜗核组织中沉积的

胆红素量也增加,光镜下可见黄色的胆红素沉积,说明高胆红素血症动物模型建立成功。

耳蜗核是哺乳动物听觉传导通路上的第一级中枢,同侧传入听神经全部终止于此,除接受听神经纤维发出的全部冲动外,还与更高一级中枢和其他听觉核团有密切联系^[11]。本实验对大鼠耳蜗核组织苏木精-伊红染色切片观察发现,对照组大鼠耳蜗核无胆红素沉积,各亚核神经细胞密集,染色均匀,尼氏体正常;实验组大鼠耳蜗核可见胆红素沉积,各亚核神经细胞数目明显减少,神经细胞肿胀,胞核和胞浆皱缩,脂褐素沉积,尼氏体减少,胞浆内空泡形成。表明胆红素沉积于耳蜗核,改变了耳蜗核组织的正常结构和功能,这样必然会影响到耳蜗核信息的传入,并可使耳蜗核向其他核团传入的信息减少或异常,对听觉信号分析和加工功能减弱,从而导致听力下降。

NMDAR 是一种离子型 EAAs 受体,当 NMDAR 过度兴奋时,Na⁺ 和 H₂O 被动内流,细胞内 Na⁺、H₂O、Ca²⁺ 增多,引起细胞水肿、坏死^[12]。本研究结果显示高胆红素血症时 M1、M2 组大鼠耳蜗核神经元细胞上的 NMDAR 过度表达,与对照组比较差异有统计学意义,且 NMDAR 平均灰度值与脑组织胆红素含量呈明显负相关,提示 NMDAR 的过度活化参与了胆红素的神经毒性作用。

胆红素沉积于脑干听觉核团尤其是耳蜗核的神经细胞突触膜,导致耳蜗核神经细胞水肿,超微结构线粒体肿胀,能量代谢障碍;细胞外兴奋性氨基酸堆积,过度激活 NMDAR,引起神经细胞内 Ca²⁺ 超载,与 CaM 结合形成 Ca²⁺-CaM 复合物导致耳蜗核神经细胞损伤,使神经细胞对听觉信号反应性降低,听觉信号传导时间延长。本研究结果显示,随着脑组织胆红素含量的增加,耳蜗核 NMDAR 的免疫组化平均灰度值明显下降,表明随着脑组织胆红素含量的增加,耳蜗核 NMDAR 的活性增加;并且随着 NMDAR 活性的升高,ABR 各波的潜伏期和波间期也延长,同时阈值升高,提示 NMDAR 活性升高在高胆红素血症听力损伤过程中发挥重要作用。

由上可知,高胆红素血症时听力损伤可能是多方面因素共同作用的结果,NMDAR 的过度活化在其发病过程中发挥了重要作用。通过观察高胆红素血症新生大鼠耳蜗核 NMDAR 的活性变化,探讨听力损伤的机制,在临床上可以应用 NMDAR 的拮抗剂类药物,从而可为预防和治疗高胆红素血症导致的听力损伤提供新思路。

[参 考 文 献]

[1] Rhee CK, Park HM, Jang YJ. Audiologic evaluation of neonates with severe hyperbilirubinemia using transiently evoked otoacoustic emissions and auditory brainstem responses [J]. Laryngoscope, 1999, 109(12):2005-2008.

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

[3] Simmons JL, Beauchaine KL. Auditory neuropathy: case study with hyperbilirubinemia [J]. J Am Acad Audiol, 2000, 11(6):337-347.

[4] 陈舜年, 贾晓明, 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.

[5] Elizebeth S. Laboratory measurment of bilirubin [J]. Clin Perinatol, 1990, 17(2):397-416.

[6] Wennberg RP, Johanson BB, Folbrearova J, Siesjo BK. Bilirubin induced changes in brain energy metabolism after osmotic opening of the blood-brain barrier [J]. Pediatr Res, 1991, 30(3):473-478.

[7] 田秀芬, 董明敏. 豚鼠耳蜗核复合体的解剖 [J]. 河南医科大学学报, 2000, 35(6):502-503.

[8] 王平宇. 大白鼠中枢神经系统解剖学基础 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987:9-120.

[9] 第二军医大学生理学教研室. 常用实验动物脑立体定位图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 1990:16-18.

[10] 杜开先, 贾天明, 栾斌, 马艳华, 魏琛. 血清胆红素浓度对足月新生儿神经心理发育的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(3):393-394.

[11] 倪道凤, 杜明, 梁兴群, 刘海, 徐春晓, 李奉荣. 不同龄豚鼠听性脑干反应和耳蜗核形态比较 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 1997, 5(3):113-117.

[12] Grojean S, Koziel V, Vert P, Daval JL. Billirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons [J]. Exp Neurol, 2000, 166(2):334-341.

(本文编辑:黄 榕)