

三七三醇皂苷对胆红素中毒性脑病的干预研究

钟琳 江西省兴国县妇幼保健院 342400

中国图书分类号 R722 文献标识码 B 文章编号 1001-4411 (2012) 16-2477-02

【摘要】 目的: 探讨三七三醇皂苷对胆红素中毒性脑病抑制氧化应激损伤的作用, 以及对活性氧族物质 (ROS) 含量的影响。方法: 建立豚鼠胆红素中毒性脑病的模型, 组成模型组, 分别建立对照组和治疗组, 对照组豚鼠不给予任何干预, 治疗组给予三七三醇皂苷干预, 对胆红素中毒性脑病豚鼠脑组织形态结构进行观察, 并对脑组织 ROS 含量进行比较。结果: 模型组与对照组相比, 可见豚鼠腹腔给予胆红素后 8h, 脑组织的脑神经元及线粒体肿胀, 而对照组脑组织脑线粒体不肿胀, 具有统计学差异 ($P < 0.05$), 脑组织中 ROS 含量明显增加 ($P < 0.05$), 超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性显示明显降低 ($P < 0.05$)。治疗组与模型组相比, 三七三醇皂苷治疗组豚鼠脑组织中 ROS 含量明显减少 ($P < 0.05$), SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$)。结论: 三七三醇皂苷对于胆红素中毒性脑病豚鼠可以减轻氧化应激损伤, 与脑组织中 SOD 活性升高、ROS 含量降低密切相关, 具有显著的治疗效果。

【关键词】 胆红素中毒性脑病 三七三醇皂苷 治疗作用 临床研究

胆红素中毒性脑病是由于未结合胆红素在脑细胞的沉积所引起的一种病变, 它是新生儿黄疸最严重的并发症, 严重威胁新生儿的生命和健康。近年来研究表明 N-甲基-D 天冬氨酸 (NMDA) 受体过度活化参与胆红素脑病发生⁽¹⁾, 氧化应激损伤被认为是胆红素中毒性脑病的关键机制之一, 活性氧族物质 (ROS) 的升高已经被证明与胆红素中毒性脑病的发生和并发症的产生密切相关⁽²⁻⁴⁾, 为进一步探讨抑制氧化应激损伤对胆红素中毒性脑病的治疗作用, 我们已经建立了豚鼠胆红素中毒性脑病的模型, 初步研究发现, 豚鼠胆红素中毒性脑病组 ROS 含量较对照组显著升高, 三七三醇皂苷可以通过减轻氧化应激损伤治疗胆红素中毒性脑病。

1 材料与方法

1.1 材料 选取实验动物为生后 6~8 天的豚鼠 45 只, 体重为 40~50 g, 雌雄各半。试剂与药品使用丙二醛 (ROS) 测定试剂盒, 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒, 所有试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供, 胆红素由 Sigma 公司提供。仪器采用 7200 型紫外分光光度计 (上海精工); 恒温培养箱 (HPX29272MBE, 常州诺基仪器有限公司); 冷冻离心机 (Eplaxmdorf); 玻璃匀浆器 (上海仪器二厂)。

1.2 方法

1.2.1 分组 将豚鼠随机分为 3 组, 即对照组、模型组、三七三醇皂苷治疗组, 每组各 15 只豚鼠, 对照组和模型组不做任何治疗干预, 治疗组在造模注射胆红素的同时给予三七三醇皂苷 20 mg 治疗, 建立模型 8 h 后豚鼠取脑, 进行电镜观察脑组织形态结构。

1.2.2 动物造模 生后 6~8 天豚鼠 45 只, 体重 40~50 g, 雌雄各半, 随机分成对照组、模型组和治

疗组, 每组 15 只。胆红素中毒性脑病豚鼠造模^(2,5), 对照组豚鼠予生理盐水 0.5 ml 腹腔注射, 模型组和治疗组豚鼠于腹腔内给予胆红素 200 μg/g, 8 h 后模型建立。

1.2.3 脑组织形态结构观察 动物模型制作后 8 h, 将豚鼠脑组织置于戊二醛溶液中, 然后进行乙醇梯度脱水, 环氧树脂包埋, 最后超薄切片, 进行电镜观察脑组织形态结构。

1.2.4 脑组织 SOD 活性及 ROS 含量的测定 将豚鼠脑组织去除低位脑干及嗅束, 用生理盐水冲洗后, 用滤纸吸干表面水分, 取双侧大脑半球, 用超声波细腔粉碎机制成组织匀浆, 采用冷冻离心机离心 15 min, 然后取上清液, 分别采用硫代巴比妥显色法、黄嘌呤氧化法测定 ROS 含量、SOD 的活性。

2 结果

2.1 脑组织形态结构 电镜观察可见豚鼠腹腔给予胆红素 8h, 脑组织的脑神经元及线粒体肿胀, 而对照组脑组织脑线粒体不肿胀。具体见图 1, 图 2。

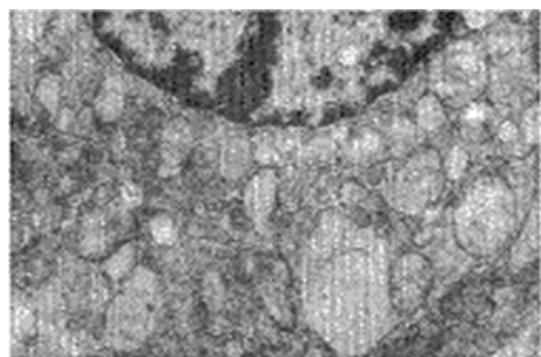


图1 模型组脑组织线粒体肿胀明显 (×6 000 倍)

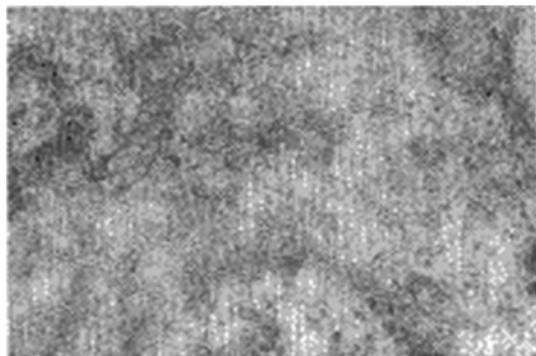


图 2 对照组脑组织正常线粒体 (×6 000 倍)

2.2 脑组织中 ROS 含量、SOD 的活性比较 见附表。

附表 3 组豚鼠脑组织 SOD 活性、ROS 含量 (mmol/mg)

分组	SOD 活性水平	ROS 含量
对照组	52.67 ± 5.32	6.72 ± 0.57
模型组	16.78 ± 1.82	12.98 ± 1.62
治疗组	40.92 ± 3.57	8.58 ± 0.70

注: 模型组与对照组相比, $P < 0.05$; 治疗组与模型组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

胆红素中毒性脑病的病死率高, 约有 50% ~ 75% 的患儿死于急性期, 即使幸存, 也常留下手足徐动症、眼球运动障碍、听觉障碍、牙釉质发育不全 (即“核黄疸三联征”) 和智力低下等神经系统后遗症, 胆红素中毒性脑病在我国的蔓延, 已严重威胁我国人民的健康, 氧化应激损伤日益受到研究者的重视。

3.1 氧化应激损伤是胆红素中毒性脑病的关键机制之一 自由胆红素能抑制神经细胞膜生物功能, 降低细胞内核酸和核蛋白合成, 并影响线粒体氧化活力及能量代谢, 也就是说自由胆红素损伤了线粒体的功能, 氧化应激损伤被认为是胆红素中毒性脑病的关键机制之一, 活性氧族物质 (ROS) 的升高已经被证明与胆红素中毒性脑病的发生和并发症的产生密切相关, 研究者在豚鼠胆红素中毒性脑病模型中发现⁽⁶⁾, 胆红素中毒性脑病发生时 ROS 明显升高, 而且不仅氮氧化物 (NOX) 浓度、丙二醛 (MDA) 含量升高, 连谷胱甘肽 (GSH)、SOD 和过氧化氢 (CAT) 等自由基清除酶的含量也明显升高, 但是这种清除酶含量的升高尚不足以逆转 ROS 的升高, 最终豚鼠仍然表现为 ROS 的升高。

3.2 抑制氧化应激损伤可以治疗胆红素中毒性脑病 既往的研究者从不同的方面对于抑制氧化应激损伤

是否可以治疗胆红素中毒性脑病及其并发症进行了探索: 自由基清除剂褪黑激素已经被证明对胆红素中毒性脑病具有治疗作用, 在应用一种印度农家广泛种植的草药对胆红素中毒性脑病进行预防性治疗后发现^(7,8), MDA 由 5.87 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 下降至 4.60 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 差异具有统计学意义。以上不同药物的研究说明, 通过清除自由基, 抑制氧化应激反应确实可以起到治疗胆红素中毒性脑病的作用。

3.3 胆红素中毒性脑病氧化应激关键酶及亚单位与三七三醇皂苷干预相关 我们已经建立了豚鼠胆红素中毒性脑病的模型, 初步研究结果发现, 豚鼠胆红素中毒性脑病组 ROS 含量较对照组显著升高, 三七三醇皂苷可以通过减轻氧化应激损伤治疗胆红素中毒性脑病。胆红素中毒性脑病氧化应激关键酶及亚单位的通路与三七三醇皂苷干预相关联。

4 参考文献

- McDonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS *et al.* Excitatory amino acid neurotransmitter systems contribute to the pathophysiology of bilirubin encephalopathy (J). *Ann Neurol*, 1990, 28: 413
- Wennberg RP, Hance AJ. Experimental bilirubin encephalopathy (J). *Pediatr Res*, 1986, 20: 789
- Sein Anand J, Chodorowski Z, Wisniewski M *et al.* The assessment of albumin liver dialysis - MARS efficacy in the treatment of Amanita phalloides poisoning (J). *Przegląd Lekarski*, 2007, 64 (4-5): 255
- Sarici SU, Saldır M. Genetic factors in neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus (J). *Turkish Journal of Pediatrics*, 2007, 49 (3): 245
- 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
- Novelli G, Rossi M, Pugliese F *et al.* Molecular adsorbents recirculating system treatment in acute - on - chronic hepatitis patients on the transplant waiting list improves model for end-stage liver disease scores (J). *Transplantation Proceedings*, 2007, 39 (6): 1864
- Shaw E, Grenier D. Prevention of kernicterus: new guidelines and the critical role of family physicians (J). *Canadian Family Physician Medecin de Famille Canadien*, 2008, 54 (4): 575
- Rifai K. Extracorporeal albumin dialysis (J). *Hepatol Res*. 2008, 38: S41 ~ S45

(2010-08-30 收稿)

(编校 李秀娟)