

# 基于 PLC/IP3 通路探讨岩黄连对新生儿高胆红素血症大鼠听觉系统损伤的影响

雷瑞瑞<sup>1</sup>, 周栩平<sup>1</sup>, 王新华<sup>1</sup>, 李晶晶<sup>2</sup>, 周 静<sup>3</sup>

1. 驻马店市中心医院 新生儿及 NICU 科, 河南 驻马店 463000

2. 郑州大学第二附属医院 新生儿科, 河南 郑州 450002

3. 驻马店市中心医院 临床药理学, 河南 驻马店 463000

**摘要:**目的 探讨岩黄连 *Corydalis saxicola* 对新生儿高胆红素血症(neonatal hyperbilirubinemia, NH)大鼠磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)/磷酸肌醇(inositol triphosphate, IP3)通路及听觉系统损伤的影响。方法 取 7 d 龄 SD 大鼠 50 只, 用随机数字表法分为对照组、模型组及岩黄连低、中、高剂量(40、80、160 mg/kg)组, 每组 10 只; 除对照组 ip 生理盐水外, 其余各组大鼠均按 200  $\mu$ g/g 的剂量 ip 胆红素建立 NH 大鼠模型。造模后, 对照组和模型组 ig 给予 10 mL/kg 的生理盐水, 岩黄连各剂量组 ig 给予相应剂量的岩黄连提取物, 各组均给药 1 d, 3 次/d。末次给药 2 h 后, 观察大鼠一般行为状况, 检测脑干听觉诱发电位(auditory brainstem response, ABR)和血清及脑干组织胆红素含量; HE 染色观察耳蜗核组织病理变化; 免疫组化染色法观察耳蜗核组织钙素(calcium, CaM)活性; 蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测脑干组织磷酸化 PLC(p-PLC)、IP3 蛋白表达水平。结果 与对照组相比, 模型组大鼠出现烦躁等神经异常行为, 耳蜗核组织可见神经细胞肿胀等病理损伤, ABR 阈值、耳蜗核组织 CaM 阳性表达率、血清及脑干组织胆红素含量升高( $P < 0.05$ ), I、II、III 波潜伏期明显延长( $P < 0.05$ ), 脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 岩黄连低、中、高剂量大鼠上述神经异常行为及耳蜗核组织病理损伤得到缓解, ABR 阈值、耳蜗核组织 CaM 阳性表达率、血清及脑干组织胆红素含量降低( $P < 0.05$ ), I、II、III 波潜伏期明显缩短( $P < 0.05$ ), 脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白表达升高( $P < 0.05$ ), 且岩黄连发挥的作用呈剂量相关性。结论 岩黄连可激活 NH 大鼠耳蜗核组织 PLC/IP3 通路蛋白表达, 减轻胆红素对耳蜗核听力神经系统的毒害, 改善 NH 大鼠听觉。

**关键词:** 岩黄连; 高胆红素血症; 磷脂酶 C/三磷酸肌醇通路; 听觉系统损伤; 胆红素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3649-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.022

## Effects of *Corydalis saxicola* on auditory system damage in rats with neonatal hyperbilirubinemia based on PLC/IP3 pathway

LEI Rui-rui<sup>1</sup>, ZHOU Xu-ping<sup>1</sup>, WANG Xin-hua<sup>1</sup>, LI Jing-jing<sup>2</sup>, ZHOU Jing<sup>3</sup>

1. Department of Neonatology and NICU, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Department of Neonatology, Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China

3. Department of Clinical Pharmacy, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of Yanhuanglian (*Corydalis Saxicola*) on phospholipase C (PLC)/inositol phosphate (IP3) pathway and auditory system damage in neonatal hyperbilirubinemia (NH) rats. **Methods** A total of 50 7-d-old SD rats were randomly divided into control group, NH model group (NH group), *C. saxicola* low (40 mg/kg), middle (80 mg/kg) and high (160 mg/kg) dose groups, with 10 rats in each group; Except the control group, which was intraperitoneally injected with normal saline, the rats in the other groups were intraperitoneally injected with bilirubin at the dose of 200  $\mu$ g/g to establish NH rat model. After modeling, the control group and NH group were given 10 mL/kg normal saline by gavage, and *C. saxicola* groups were given the corresponding dose of *C. saxicola* extract by gavage, and each group was given medicine for 1 d, 3 times a day. Two hours after the

收稿日期: 2020-11-12

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20190315)

作者简介: 雷瑞瑞(1985—)女, 硕士, 主治医师, 主要从事新生儿及 NICU 科方面的相关研究。E-mail: 570355465@qq.com Tel: 18790383265

last administration, the general behavior and auditory brainstem response (ABR) were observed; The content of bilirubin in serum and brain stem tissue was detected by absorbance (A450); HE staining was used to observe the pathological changes of cochlear nucleus; The activity of calcium (CaM) in cochlear nucleus was observed by immunohistochemistry; Moreover, Western blot was used to detect the expression levels of p-phospholipase C (PLC) and IP3 in brain stem. **Results** Compared with those in control group, the rats in NH group had abnormal nervous behaviors such as irritability, and pathological damage such as nerve cell swelling in cochlear nucleus tissue, ABR threshold, CaM positive expression rate in cochlear nucleus and bilirubin content in serum and brain stem tissue were higher ( $P < 0.05$ ), the latencies of waves I, II and III were significantly prolonged ( $P < 0.05$ ), and the expressions of p-PLC and IP3 proteins in brain stem tissue were lower ( $P < 0.05$ ); Compared with those in NH group, the above abnormal behaviors and pathological damage of cochlear nucleus in *C. saxicola* low, middle and high dose groups were alleviated, ABR threshold, CaM positive expression rate in cochlear nucleus and bilirubin content in serum and brain stem tissue were lower ( $P < 0.05$ ), the latencies of waves I, II and III were significantly shortened ( $P < 0.05$ ), and the expressions of p-PLC and IP3 proteins in brain stem tissue were higher ( $P < 0.05$ ), and the *C. saxicola* group exerted the effect in a dose dependent manner. **Conclusions** *C. saxicola* can activate the expression of PLC/IP3 pathway protein in cochlear nucleus of NH rats, reduce the toxicity of bilirubin to the auditory nervous system of cochlear nucleus, and improve the hearing of NH rats.

**Key words:** *Corydalis saxicola* Bunting; hyperbilirubinemia; phospholipase C/inositol triphosphate pathway; auditory system damage; bilirubin

新生儿高胆红素血症 (neonatal hyperbilirubinemia, NH) 又称新生儿黄疸, 是指由于胆红素代谢异常使血中胆红素水平升高, 导致皮肤、黏膜及巩膜黄染的病症<sup>[1-2]</sup>。NH 是新生儿常见病症, 可导致新生儿急慢性脑病、脏器损害、神经毒性及听力下降, 甚至死亡等, 严重危害新生儿生命健康<sup>[3-4]</sup>。听觉中枢更易受胆红素毒性损害, 据流行病学分析, 超过 70% 的 NH 患者可出现脑干听觉核团、前庭核、下丘核等特定中枢核团的功能损害症状<sup>[5-6]</sup>。然而虽然学术界认同 NH 容易导致听觉损伤, 但其听觉损害及中枢神经毒性机制还不甚明确, 这使得临床仍缺乏特异性、有效性的防治药物。近来研究发现, 磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) / 三磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP3) 通路可介导脑组织神经元凋亡发挥脑神经保护作用<sup>[7]</sup>, 且能触发内质网钙库释放, 促进新生大鼠耳蜗血管纹缘细胞释放三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP), 调节声转导、听敏度等生理活动<sup>[8]</sup>。故研究 PLC/IP3 通路在 NH 病理过程中的调控机制, 对阐明听觉损害及中枢神经毒性机制具有潜在临床价值。传统中药岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting 富含生物碱, 临床上常用于治疗急慢性肝炎、病毒性肝炎、高胆红素血症、肝癌及其他肿瘤的辅助治疗<sup>[9]</sup>。近年来研究发现, 岩黄连可减轻 NH 的程度和持续时间及 NH 用药过程中的不良反应, 对 NH 有较好的治疗效果<sup>[10]</sup>。但岩黄连治疗 NH 的具体机制及对听觉损害的影响还未见报道, 本研究建立 NH 大鼠模型,

给予岩黄连治疗, 探究岩黄连对 NH 大鼠 PLC/IP3 通路及听觉损伤的影响, 以期阐明岩黄连治疗 NH 的作用机制, 为其临床合理用药提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 7 d 龄清洁级 SD 大鼠 50 只, 体质量 15~20 g, 雌雄不限, 动物均无耳毒性药物使用及强噪声暴露史, 由广东省医学实验动物中心提供, 生产许可证号为 SCXK (粤) 2018-0002。所有大鼠于本院动物房中饲养, 自然光照, 自由饮食、饮水, 温度 25 °C, 相对湿度 50%, 噪音低于 80 dB, 保持动物房环境及鼠笼清洁、透气。本实验经驻马店市中心医院伦理委员会批准 (批准号 ZMD-20200109 0034), 实验动物符合 3R 原则。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 岩黄连对照药材 (货号 A-121416-1g) 购自上海信帆生物科技有限公司, 经驻马店市中心医院周静药师鉴定为岩黄连 *C. saxicola* Bunting; 胆红素 (货号 QN0823-PFQ, 橙色至暗红棕色结晶体) 购自北京百奥莱博科技有限公司; 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号 G1120) 购自北京索莱宝科技有限公司; 大鼠总胆红素酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒 (货号 DIBR-180) 购自北京冬歌博业生物科技有限公司; 钙素 (calcium, CaM)、磷酸化 PLC (p-PLC)、IP3 抗体 (货号分别为 ab181052、ab68148、ab252536), 均购自美国 Abcam 公司; BCA 蛋白定量试剂盒和胰蛋白酶 (货号分别为 P0768、P0231), 均购自美国 Pierce 公司。

RM2125RTS 型手动轮转式切片机 (德国 Leica 公司); SMZ745 光学显微镜 (日本尼康公司); 1659001 型蛋白电泳仪、Trans-Blot SD 半干转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); GIS-500 凝胶成像仪 (杭州米欧仪器有限公司); CHARTR EP/ASSR 脑干诱发电位仪、TDH-39 气导耳机 (丹麦 Interacoustics 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 岩黄连药液的制备** 参照文献方法<sup>[11]</sup>, 岩黄连药材用蒸馏水煎煮, 取水提液浓缩干燥 (每克干燥物中含生药量 8 g), 取干燥物用生理盐水配制成 0.5、1.0、2.0 mg/mL (相当于生药量 4.0、8.0、16.0 mg/mL) 的溶液 (其中含岩黄连总生物碱 0.28~1.12 mg/mL)。

**1.2.2 NH 大鼠模型建立及分组与给药** 出生后 7 d 的 SD 大鼠 50 只, 采用随机数字表法分为对照组、模型组及岩黄连低、中、高剂量 (40、80、160 mg/kg) 组, 每组 10 只; 除对照组外, 其余各组新生大鼠均参照文献方法<sup>[12]</sup>按 200  $\mu$ g/g 的剂量 ip 胆红素溶液 (20 mg 晶体胆红素溶于 1 mL 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液中, 加入蒸馏水 9 mL, 用 0.05 mol/L 的盐酸调节 pH 8.5, 终质量浓度为 2 mg/mL, 按 1 mL/kg 剂量给药) 建立 NH 模型, 药物注射后于恒温、恒湿和避光环境中自然哺育 24 h, 并观察大鼠行为活动, 若大鼠出现烦躁、翻滚现象, 表明造模成功。对照组大鼠 ip 等量生理盐水后置于同样条件下哺育 24 h。各组均于注射胆红素后 30 min 开始给药, 按 10 mL/kg ig 给予相应剂量的岩黄连药液, 对照组及模型组按 10 mL/kg ig 给予生理盐水, 各组均给药 1 d, 3 次/d。

**1.2.3 大鼠一般行为观察** 各组大鼠末次给药 2 h 后, 观察大鼠有无烦躁、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。

**1.2.4 大鼠听性脑干反应 (auditory brainstem response, ABR) 检测** 各组大鼠置于隔声屏蔽室 [本底噪声不大于 30 dB 声压级 (sound pressure level, SPL)] 中, 麻醉后, 用 TDH-39 型气导耳机给声并紧贴大鼠外耳道口, 设置脑干诱发电位仪听觉诱发参数为带通滤波 100~3000 Hz, 描时 10 ms, 叠加次 1024 次, 刺激声为交替短声。设置完参数, 接通点击后开始进行测试, ABR 反应阈的判断以 II 波为标准, 刺激强度从 90 dB SPL 开始, 10 dB 一档递减至 II 波不可辨别, 再以 80 dB 的刺激强度测试大鼠双耳的各波潜伏期和波间期。数据经测试系统自身的微机自动读取、存储。

**1.2.5 大鼠血清及脑干组织标本采集及胆红素含量**

**测定** 各组大鼠在测完 ABR 后, 腹主动脉取血 0.5 mL, 置于室温 1 h, 凝固后, 置 4  $^{\circ}$ C 下过夜, 析出血清, 3000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液加于测试管中, 按胆红素 ELISA 试剂盒说明书方法检测血清胆红素含量。将大鼠麻醉, 开胸, 经左心室快速灌注生理盐水, 冲净血液, 随后缓慢灌注多聚甲醛磷酸缓冲液, 然后断头处死, 开颅取脑干组织, 剪取 1 g 后备用, 剩余部分迅速置于上述灌注液中固定 1 周备用。从 1 g 脑干组织中剪取 0.5 g, 加 0.5 mL 冰醋酸匀浆后, 再加 0.5 mL 丙酮混匀, 于 3000 r/min 离心 10 min 后取上清液 0.2 mL, 按胆红素 ELISA 试剂盒说明书方法检测血清胆红素含量, 剩余脑干组织迅速置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

**1.2.6 大鼠耳蜗核标本制作及 HE、CaM 免疫组化染色检测** 取“1.2.5”项下 4% 多聚甲醛溶液中固定 1 周的脑干组织, 经脱水、透明、石蜡包埋后, 经面神经根平面向后做连续冠状切片, 片厚 7  $\mu$ m, 取从耳蜗核开始出现至消失的切片, 共 2 套, 一套根据 HE 试剂盒说明书进行 HE 染色, 并在显微镜下观察组织变化, 另一套用二甲苯脱蜡、3% 过氧化氢消化过氧化物酶活性后, 滴加 1:500 的 CaM 抗体, 行 CaM 免疫组化染色, 在共聚焦显微镜下观察切片中细胞染色情况, 采用 Image-pro plus 定量检测染成棕黄色细胞数数目, 并计算 CaM 阳性细胞表达率。耳蜗核定位参照《常用实验动物脑立体定位图谱》<sup>[13]</sup> 和《大白鼠中枢神经系统解剖学基础》<sup>[14]</sup> 进行。

CaM 阳性细胞表达率 = 染成棕黄色细胞数/细胞总数

**1.2.7 Western blotting 法检测脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白相对表达量** 取“1.2.5”项中 -80  $^{\circ}$ C 保存的脑干组织, 于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中解冻后, 用组织匀浆器匀浆, 离心分离后, 取上清液, 用蛋白提取试剂盒提取蛋白, 蛋白定量 BCA 试剂盒检测蛋白总浓度后, 取 50  $\mu$ g 蛋白上样, 进行电泳和转膜反应, TBST 溶液清洗后, 加入 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h, TBST 溶液清洗 3 次后, 加入一抗 [p-PLC、IP3、 $\beta$ -actin (内参)] 抗体, 稀释倍数分别为 1:1000、1:1000、1:2000, 4  $^{\circ}$ C 摇床室温孵育过夜, TBST 振荡后加入 HRP 羊抗兔二抗 (稀释倍数 1:2000), 37  $^{\circ}$ C 摇床室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次后, 采用增强化学发光法显色, 以凝胶成像仪观察条带并拍照, 并以 Image-J 软件分析各组蛋白相对表达量。

## 1.3 统计学分析

以 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析,

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较进行单因素方差分析, 进一步两组间比较进行 Snk- $q$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般行为

对照组大鼠行为活动正常, 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; 与对照组相比, 模型组大鼠出现烦躁、翻滚及俯伏等异常神经行为活动, 且耳廓反射及对外界刺激反应迟钝; 与模型组相比, 岩黄连低、中、

高剂量组大鼠烦躁、翻滚及俯伏等异常神经行为活动明显减少, 且耳廓反射及对外界刺激反应迟钝现象得到不同程度改善。

### 2.2 各组大鼠 ABR 各波潜伏期及阈值

与对照组相比, 模型组大鼠 ABR 阈值升高 ( $P < 0.05$ ), I、II、III 波潜伏期明显延长 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 岩黄连低、中、高剂量组大鼠 ABR 阈值降低 ( $P < 0.05$ ), I、II、III 波潜伏期明显缩短 ( $P < 0.05$ ), 且岩黄连各剂量组上述指标呈剂量相关性, 见表 1。

表 1 各组大鼠 ABR 各波潜伏期及阈值 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Incubation period and threshold of ABR wave in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 潜伏期/ms                     |                            |                            | 阈值/dB SPL                   |
|-----|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|     |                               | I 波                        | II 波                       | III 波                      |                             |
| 对照  | —                             | 1.09 ± 0.02                | 1.51 ± 0.04                | 2.52 ± 0.03                | 16.66 ± 1.29                |
| 模型  | —                             | 1.39 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 2.31 ± 0.05 <sup>a</sup>   | 3.41 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 54.23 ± 1.51 <sup>a</sup>   |
| 岩黄连 | 40                            | 1.31 ± 0.03 <sup>ab</sup>  | 2.01 ± 0.04 <sup>ab</sup>  | 3.11 ± 0.03 <sup>ab</sup>  | 40.32 ± 1.42 <sup>ab</sup>  |
|     | 80                            | 1.22 ± 0.02 <sup>abc</sup> | 1.77 ± 0.03 <sup>abc</sup> | 2.81 ± 0.04 <sup>abc</sup> | 29.67 ± 1.36 <sup>abc</sup> |
|     | 160                           | 1.11 ± 0.02 <sup>bcd</sup> | 1.62 ± 0.03 <sup>bcd</sup> | 2.54 ± 0.03 <sup>bcd</sup> | 19.08 ± 1.22 <sup>bcd</sup> |

与对照组比较: <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与岩黄连低剂量组比较: <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与岩黄连中剂量组比较: <sup>d</sup> $P < 0.05$ , 下表同

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs *C. saxicola* low-dose group; <sup>d</sup> $P < 0.05$  vs *C. saxicola* medium-dose group, same as below tables

### 2.3 各组大鼠血清及脑干组织胆红素含量

与对照组相比, 模型组大鼠血清及脑干组织胆红素含量升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 岩黄连低、中、高剂量组大鼠血清及脑干组织胆红素含量降低 ( $P < 0.05$ ), 且岩黄连各剂量组血清及脑干组织胆红素含量呈剂量相关性, 见表 2。

### 2.4 各组大鼠耳蜗核组织 HE 染色

对照组大鼠耳蜗核组织正常, 染色均匀。与对

照组相比, 模型组大鼠耳蜗核组织可见胆红素沉积, 各亚核神经细胞肿胀、数目减少, 胞浆皱缩且有空泡形成, 脂褐素沉积增多, 尼氏体减少等病理现象严重。岩黄连低、中、高剂量组上述病理损伤得到不同程度改善。见图 1。

### 2.5 各组大鼠耳蜗核组织 CaM 免疫组化染色

对照组大鼠耳蜗核组织细胞染色正常, 无棕黄色颗粒沉积。与对照组相比, 模型组大鼠耳蜗核组织细胞核染色较浅, 棕黄色或棕色颗粒增多, CaM 阳性表达率增高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 岩黄连各剂量组棕黄色或棕色颗粒明显减少, 且 CaM 阳性表达率呈剂量相关性降低 ( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 3。

### 2.6 各组大鼠脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白表达量

与对照组相比, 模型组大鼠脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白表达量降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 岩黄连低、中、高剂量大鼠脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 且岩黄连各剂量组大鼠脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白表达量呈剂量相关性, 见图 3 和表 4。

表 2 各组大鼠血清及脑干组织胆红素含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Content of bilirubin in serum and brain stem tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 血清胆红素/<br>( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 脑干组织胆红素/<br>( $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |
|-----|-------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 对照  | —                             | 15.09 ± 1.92                                      | 0.00 ± 0.00                                       |
| 模型  | —                             | 511.39 ± 10.24 <sup>a</sup>                       | 4.01 ± 0.15 <sup>a</sup>                          |
| 岩黄连 | 40                            | 301.31 ± 9.93 <sup>ab</sup>                       | 3.21 ± 0.14 <sup>ab</sup>                         |
|     | 80                            | 102.22 ± 8.02 <sup>abc</sup>                      | 1.07 ± 0.03 <sup>abc</sup>                        |
|     | 160                           | 17.11 ± 2.02 <sup>bcd</sup>                       | 0.09 ± 0.03 <sup>bcd</sup>                        |

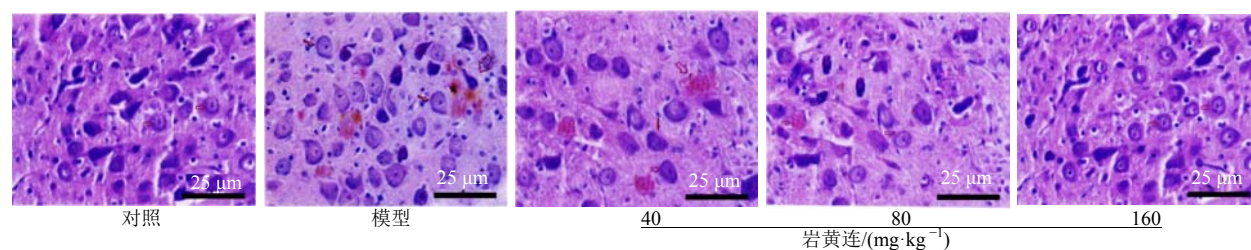
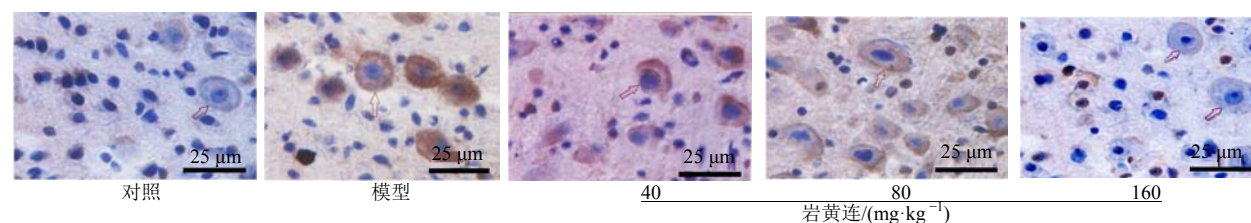


图 1 各组大鼠耳蜗核组织 HE 染色图 (×400)

Fig. 1 HE staining of cochlea nucleus tissue of rats in each group (×400)



箭头所示为球形及锥型细胞胞浆, 对照组及岩黄连高剂量耳蜗核细胞浆棕黄色染色较浅, 模型组细胞浆棕黄色染色最深, 岩黄连低、中剂量组细胞浆染色依次变浅

the arrow shows the cytoplasm of spherical and cone-shaped cells, the cytoplasm of control group and *C. saxicola* high-dose cochlear nucleus group is lighter, the cytoplasm of model group is the most darker, and the cytoplasm of *C. saxicola* low-dose and medium-dose groups becomes lighter successively

图 2 各组大鼠 CaM 免疫组化染色图 (×400)

Fig. 2 CAM immunohistochemical staining of rats in each group (×400)

表 3 各组大鼠耳蜗核组织 CaM 阳性表达率 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 3 Positive expression rate of CaM in cochlea nucleus of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | CaM 阳性表达率/%                 |
|-----|---------------------------|-----------------------------|
| 对照  | —                         | 10.07 ± 1.96                |
| 模型  | —                         | 90.19 ± 4.09 <sup>a</sup>   |
| 岩黄连 | 40                        | 60.87 ± 3.04 <sup>ab</sup>  |
|     | 80                        | 35.64 ± 2.92 <sup>bc</sup>  |
|     | 160                       | 13.73 ± 2.03 <sup>bcd</sup> |

表 4 各组大鼠脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 4 Expression levels of p-PLC and IP3 protein in brain stem tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | p-PLC/β-actin              | IP3/β-actin                |
|-----|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照  | —                         | 1.06 ± 0.13                | 1.07 ± 0.11                |
| 模型  | —                         | 0.15 ± 0.10 <sup>a</sup>   | 0.13 ± 0.14 <sup>a</sup>   |
| 岩黄连 | 40                        | 0.46 ± 0.12 <sup>ab</sup>  | 0.45 ± 0.13 <sup>ab</sup>  |
|     | 80                        | 0.76 ± 0.11 <sup>abc</sup> | 0.72 ± 0.12 <sup>abc</sup> |
|     | 160                       | 1.02 ± 0.10 <sup>bcd</sup> | 1.01 ± 0.15 <sup>bcd</sup> |

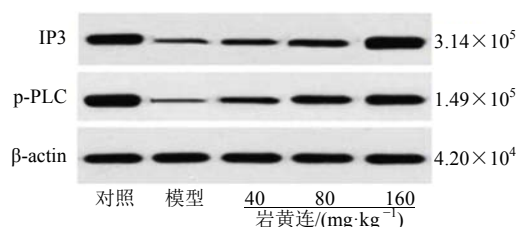


图 3 各组大鼠脑干组织 p-PLC、IP3 蛋白表达免疫印迹图  
Fig. 3 Western blotting of p-PLC and IP3 protein expression in brain stem tissues of rats in each group

### 3 讨论

NH 是新生儿常见病症, NH 并发脑病可在急性期导致新生儿死亡, 即使患儿幸存也常遗留神经系统疾病, 尤其以神经系统损伤最为常见<sup>[13]</sup>。目前对

胆红素的神经毒性如何作用于脑干听觉核团导致听力损伤的机制尚不明确<sup>[14]</sup>。脑干听觉核团包括耳蜗核、上橄榄核复合体、外侧丘系核和下丘, 是声音传导的重要通路之一<sup>[15]</sup>。ABR 是应用于临床的听生理测试技术, 可全面准确地记录声刺激后听觉系统所产生的一系列电位反应, 可以判断听力损伤发生的部位及程度<sup>[16]</sup>。胆红素是水溶液中溶解度极低的极性分子, 其阴离子可通过血脑屏障进入脑组织, 并与神经细胞极性基团结合, 并沉积在神经细胞膜, 影响并抑制神经细胞能量代谢水平、神经末梢突触膜去极化反应、神经冲动反应而使神经元化学传递作用及神经的电传导功能受损<sup>[17]</sup>。李克方<sup>[12]</sup>

发现 7 d 龄大鼠 ip 200  $\mu\text{g/g}$  的胆红素 24 h, 可使大鼠血清和脑组织胆红素含量增加, 耳蜗核组织 HE 染色可见神经细胞损伤, 免疫组化反应可见 CaM 阳性表达增加, 推测胆红素沉积于耳蜗核的神经细胞突触膜, 使细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$  内流超载,  $\text{Ca}^{2+}$  与 CaM 结合后形成  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 复合物, 发挥毒性作用, 导致耳蜗核信息的传入功能受到影响及 ABR 阈值升高、各波的潜伏期及听觉传导时间延长。本研究用 200  $\mu\text{g/g}$  胆红素 ip 7 d 龄大鼠 24 h 后发现, 与对照组相比, 模型组大鼠出现烦躁、翻滚、耳廓反射迟钝或消失, 对外界刺激反应迟钝或无逃避反应, 耳蜗核组织各亚核神经细胞体积肿胀、神经细胞数目及尼氏体减少、胞质内空泡较多等病理现象, ABR 反应阈明显升高且 I、II、III 波潜伏期明显延长, 血清及脑干组织胆红素含量升高, 耳蜗核组织中 CaM 阳性率增高<sup>[11]</sup>, 提示造模成功。

NH 所致听力神经损伤在早期具有可逆性, 一旦发生不可逆的听觉损伤, 患儿只能用助听器及耳蜗植入等方式进行治疗, 因此在 NH 早期及时进行治疗具有一定意义<sup>[18]</sup>。近来研究发现, 岩黄连对 NH 有较好的治疗效果, 可减轻 NH 的程度和持续时间, 刘馨烛等<sup>[19]</sup>发现岩黄连可促进胆汁转运体表达, 降低大鼠急性肝内胆汁淤积, 防止胆汁逆流入血, 而出现血清胆红素升高。本研究发现, 与模型组相比, 岩黄连低、中、高剂量组大鼠烦躁、翻滚、耳廓及对外界刺激反应迟钝等现象明显改善, 耳蜗核组织病理损伤明显减轻, ABR 反应阈降低且 I、II、III 波潜伏期缩短, 血清及脑干组织胆红素含量降低, 耳蜗核组织 CaM 阳性表达降低, 且上述指标呈剂量相关性, 表明岩黄连可降低新生 NH 大鼠血清及脑组织胆红素沉积, 减少耳蜗核组织 CaM 表达, 缓解胆红素对耳蜗核听力神经系统的毒害作用。然而其具体分子机制还不甚明确。

$\text{Ca}^{2+}$  是神经系统正常活动和神经突触传导的重要信使, 神经细胞内钙超载, 可诱导线粒体的氧化应激反应, 并激活大量蛋白水解酶, 导致大量神经元和少突胶质细胞大量死亡<sup>[20]</sup>, 可能是胆红素沉积于耳蜗核的神经细胞突触膜, 使细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$  内流超载, 是导致神经毒性的原因之一<sup>[11]</sup>。故促进胞内  $\text{Ca}^{2+}$  释放, 抑制细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载引起的神经坏死, 可能是缓解胆红素对耳蜗核听力神经系统的毒害作用的主要机制之一。而 PLC/IP3 通路介导的内网钙库释放, 参与神经突触间传导和神经元可塑性调

节, Melo 等<sup>[21]</sup>发现多巴胺受体可与 G 蛋白偶联并激活 PLC, 活化后的 PLC 可促进 IP3 的释放, 引起胞内钙释放, 发挥调节神经元生长、分化、生存的生理效应。刘斌等<sup>[22]</sup>发现在新生大鼠耳蜗血管纹缘细胞中, 细胞外 ATP 在无钙离子的环境中, 可以通过 PLC-IP3 途径触发内质网钙库释放, 促进溶酶体的胞吐作用, 从而将 ATP 以囊泡形式释放到胞膜外, 调节声传导、听敏度、耳蜗内电位、耳蜗内环境稳定等神经信号传导。Luo 等<sup>[7]</sup>发现褪黑素可激活 PLC/IP3/ $\text{Ca}^{2+}$  途径升高脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 水平, 抵抗高胆红素引起的海马神经元凋亡和神经毒性作用, 而 PLC/IP3 通路阻滞剂可拮抗褪黑素对 NH 所致神经毒性的抵抗作用。本研究发现, 与对照组相比, 模型组大鼠脑干组织中 p-PLC、IP3 蛋白表达降低, 提示 NH 大鼠脑干组织 PLC/IP3 通路被抑制, 可能抑制胞内  $\text{Ca}^{2+}$  释放, 导致胞内钙超载引起神经毒性。而与模型组大鼠相比, 岩黄连低、中、高剂量组 p-PLC、IP3 蛋白表达呈剂量相关性升高, 表明岩黄连可能通过激活 PLC/IP3 通路, 促进胞内钙释放, 进而减轻胆红素沉积引起的胞内钙超载, 改善脑干中神经损伤。

综上所述, 岩黄连可激活 NH 大鼠耳蜗核组织 PLC/IP3 通路蛋白表达, 缓解胆红素对耳蜗核听力神经系统的损伤, 可能为阐明岩黄连改善高胆红素沉积所致听力神经毒性作用机制提供一定参考, 但高胆红素沉积所致神经毒性机制复杂, 可能涉及其他通路, 岩黄连的具体生物学机制仍需深入研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Chen S J, Tukey R H. Humanized *UGT1* mice, regulation of *UGT1A1*, and the role of the intestinal tract in neonatal hyperbilirubinemia and breast milk-induced jaundice [J]. *Drug Metab Dispos*, 2018, 46(11): 1745-1755.
- [2] 李圆, 张欣. 新生儿高胆红素血症的研究进展 [J]. *心理医生*, 2017, 23(27): 1-2.
- [3] Timmons Z, Timmons J, Conrad C, et al. Epidemiology of hyperbilirubinemia in a quaternary pediatric emergency department over a three-year period [J]. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2018, 21(4): 297-305.
- [4] Grosse S D, Prosser L A, Botkin J R. Avoiding harm from hyperbilirubinemia screening-reply [J]. *JAMA Pediatr*, 2019, 173(12): 1209-1210.

- [5] Nam G S, Kwak S H, Bae S H, *et al.* Hyperbilirubinemia and follow-up auditory brainstem responses in preterm infants [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2019, 12(2): 163-168.
- [6] Watchko J F, Tiribelli C. Bilirubin-induced neurologic damage: Mechanisms and management approaches [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(21): 2021-2030.
- [7] Luo Y, Peng M, Wei H. Melatonin promotes brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and anti-apoptotic effects in neonatal hemolytic hyperbilirubinemia via a phospholipase (PLC)-mediated mechanism [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5951-5959.
- [8] 刘斌, 李吉平, 刘君. 三磷酸腺苷在新生大鼠耳蜗血管纹缘细胞中的释放机制 [J]. 中华耳科学杂志, 2019, 17(3): 394-399.
- [9] 余姣娇, 邱志霞, 刘秋燕, 等. 岩黄连的研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(6): 342-345.
- [10] 张仙花. 岩黄连治疗新生儿高胆红素血症 63 例 [J]. 陕西中医, 2013, 34(7): 786-787.
- [11] 蒋东平. 岩黄连对大鼠急性肝损伤保护作用的研究 [J]. 卫生职业教育, 2007, 25(19): 119-120.
- [12] 李克方. 高胆红素血症大鼠听力损伤与耳蜗核 CaM 活性的相关性研究 [J]. 中国医药指南, 2015, 13(13): 6-7.
- [13] 邓敏, 何四平, 伍光春, 等. 胆红素脑病所致听力受损患儿听觉通路纤维束的 DTI 研究: 各向异性分数和其他扩散系数的变化 [J]. 临床放射学杂志, 2017, 36(11): 1679-1683.
- [14] 王丹, 杨波, 郑瑞平. 胆红素/清蛋白比值及脑干听觉诱发电位与胆红素神经毒性的相关性 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(8): 621-623.
- [15] Epprecht L, Qureshi A, Kozin E D, *et al.* Human cochlear nucleus on 7 tesla diffusion tensor imaging: Insights into micro-anatomy and function for auditory brainstem implant surgery [J]. *Otol Neurotol*, 2020, 41(4): e484-e493.
- [16] Xie L, Wang M, Liao T, *et al.* The characterization of auditory brainstem response (ABR) waveforms: A study in tree shrews (*Tupaia belangeri*) [J]. *J Otol*, 2018, 13(3): 85-91.
- [17] Kuter N, Aysit-Altuncu N, Ozturk G, *et al.* The neuroprotective effects of hypothermia on bilirubin-induced neurotoxicity *in vitro* [J]. *Neonatology*, 2018, 113(4): 360-365.
- [18] 时海波, 李春燕. 高胆红素血症所致听觉损害的临床特征及治疗现状 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 33(8): 685-687.
- [19] 刘馨烛, 邱剑楠, 戚莉, 等. 岩黄连对急性肝内胆汁淤积大鼠的干预作用及胆汁酸转运体表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1700-1703.
- [20] Liu K, Ding L, Li Y, *et al.* Neuronal necrosis is regulated by a conserved chromatin-modifying cascade [J]. *PNAS*, 2014, 111(38): 13960-13965.
- [21] Melo C V, Okumoto S, Gomes J R, *et al.* Spatiotemporal resolution of BDNF neuroprotection against glutamate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons [J]. *Neuroscience*, 2013, 237: 66-86.
- [22] 刘斌, 李吉平, 刘君. 三磷酸腺苷在新生大鼠耳蜗血管纹缘细胞中的释放机制 [J]. 中华耳科学杂志, 2019, 17(3): 394-399.

[责任编辑 潘明佳]