

# 胆红素脑病 SD 乳鼠模型中脑水通道蛋白-4 表达发生变化

文 凤<sup>1)</sup>, 樊 萍<sup>2)</sup>, 隆 令<sup>1)</sup>, 胡嘉恒<sup>1)</sup>, 李培正<sup>1)</sup>, 黄 娟<sup>1)</sup>,  
徐 进<sup>1)</sup>, 邱国平<sup>1)</sup>, 甘胜伟<sup>1)</sup>\*, 孙善全<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016; <sup>2)</sup>重庆市第5人民医院妇产科, 重庆 400062)

**摘要** 神经细胞水肿是胆红素脑病(bilirubin encephalopathy, BE)发生发展过程中的重要病理变化。水通道蛋白-4(aquaporin-4, AQP4)的表达及分布异常与多种疾病所致细胞毒性脑水肿的发生发展具有密切联系。但胆红素脑病中 AQP4 的表达变化规律及其在病理进展中的作用尚不清楚。采用 7 日龄 SD 大鼠小脑延髓池注射胆红素溶液的方法,建立新生大鼠胆红素脑病模型。胆红素脑病模型根据胆红素作用时间的不同,分为 12 h、24 h、48 h、72 h 和 7 d 组。采用 HE 及尼氏染色,检测各新生大鼠脑组织的病理改变;应用透射电镜(TEM),检测胆红素作用 24 h 后,鼠脑组织超微结构的变化;应用免疫荧光及 Western 印迹,检测 AQP4 在脑组织中的表达变化。通过上述实验,以探讨 AQP4 的表达变化与胆红素所致脑损伤的关系。HE 及尼氏染色结果显示,随着胆红素沉积时间的延长,神经细胞逐渐肿胀,细胞间隙增大,尼氏小体数量逐渐减少;电镜结果显示,胆红素脑病 24 h 后神经细胞线粒体出现肿胀;免疫荧光染色显示,24 h 组 AQP4 的表达范围明显增加,其后表达范围逐渐减少,表达强度也随之减弱;Western 印迹结果显示,AQP4 表达在不同时间点呈现先增高后降低的趋势,在 24 h 达到峰值(24 h 组  $1.38 \pm 0.11$  vs 对照组  $0.87 \pm 0.21$ ,  $P < 0.05$ ),在之后的各时间点上,AQP4 的表达呈现下降趋势,而 72 h 组与 7 d 组 AQP4 表达均低于 48 h 组( $P < 0.05$ ),基本恢复到对照组的表达水平( $P > 0.05$ )。上述结果提示,胆红素脑病中胆红素的毒性作用将引起 AQP4 表达量的改变,AQP4 的表达变化与胆红素脑病中细胞毒性脑水肿的发生相关,并且可能在胆红素脑病脑损伤的进展中发挥作用。

**关键词** 胆红素脑病;胆红素;小脑延髓池;水通道蛋白-4;细胞毒性脑水肿

**中图分类号** R744.1;R72;Q291

## Expression and Significance of Brain AQP4 in the Neonatal SD Rat Model of Bilirubin Encephalopathy

WEN Feng<sup>1)</sup>, FAN Ping<sup>2)</sup>, LONG Ling<sup>1)</sup>, HU Jia-Heng<sup>1)</sup>, LI Pei-Zheng<sup>1)</sup>,  
HUANG Juan<sup>1)</sup>, XU Jin<sup>1)</sup>, QIU Guo-Ping<sup>1)</sup>, GAN Sheng-Wei<sup>1)</sup>\*, SUN Shan-Quan<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

<sup>2)</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, The Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China)

收稿日期: 2019-06-13; 修回日期: 2019-08-01; 接受日期: 2019-08-21

国家自然科学基金(No. 31300911); 重庆市自然科学基金(No.cstc2016jcyjA0073, No.cstc2016jcyjA0172, No.cstc2016jcyjA0229, No.cstc2017jcyjAX0414)和重庆市卫生局项目(No.2015MSXM109)资助

\* 通讯作者 Tel: 023-68485763; E-mail: 100364@cqmu.edu.cn

Received: June 13, 2019; Revised: August 1, 2019; Accepted: August 21, 2019

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31300911); Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (No.cstc2016jcyjA0073, No.cstc2016jcyjA0172, No.cstc2016jcyjA0229, No.cstc2017jcyjAX0414) and Health Bureau of Chongqing (No.2015MSXM109)

\* Corresponding author Tel: 023-68485763; E-mail: 100364@cqmu.edu.cn

**Abstract** Edema of neurocytes is an important pathological change in the occurrence and development of bilirubin encephalopathy (BE). Abnormal expression and distribution of aquaporin-4 (AQP4) are closely related to the occurrence and development of cytotoxic brain edema caused by various diseases. However, the expression of AQP4 in BE and its role in the development of BE are still unclear. The BE model of neonatal SD rats was established by injecting bilirubin solutions into the cerebellomedullary cistern of 7-day-old SD rats. The BE model was divided into 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 d groups according to the different acting intervals of bilirubin. HE and Nissl staining were used to detect the pathological changes of each brain tissue of neonatal rats; transmission electron microscopy (TEM) was used to detect the ultrastructural changes of brain tissues after 24 h of bilirubin treatment; immunofluorescence and Western blotting were used to detect the changes of AQP4 expression in brain tissues. The temporal and spatial changes of AQP4 expression during the development of BE was studied by the above-mentioned experiments, and the relationship between the changes of AQP4 expression and brain injury was explored. The results of HE and Nissl staining showed that with the prolongation of bilirubin deposition duration, neurocytes become swollen and intercellular space is increased, with the number of Nissl bodies decreased gradually. TEM showed that the mitochondria of neurocytes are swollen after 24 hours of bilirubin treatment. Immunofluorescence staining showed that the expression range of AQP4 increased significantly in the 24 h group, and then subsequently decreased gradually; Western blotting results showed that the expression of AQP4 increased firstly and then decreased at different durations. At the 24 h group, the expression of AQP4 reached its peak ( $1.38 \pm 0.11$  in 24 hours *vs*  $0.87 \pm 0.21$  in the control,  $P < 0.05$ ). Subsequently, the expression of AQP4 decreased, while the expression of AQP4 in the 72 h group and 7 day group was lower than that in the 48 h group ( $P < 0.05$ ), and it is basically restored to the level of the control group ( $P > 0.05$ ). These results suggest that the toxic effect of bilirubin in BE will cause the change of AQP4 expression, which may be related to neuronal edema in BE and play a role in the progression of brain injury in BE.

**Key words** bilirubin encephalopathy (BE); bilirubin; cisterna magna; aquaporin-4 (AQP4); cytotoxic cerebral edema

高胆红素血症是由新生儿血液中未结合胆红素 (unconjugated bilirubin, UCB) 水平升高所引起。升高的 UCB 可通过尚不成熟的血脑屏障沉积于脑细胞,引起严重的脑损伤,即导致所谓的胆红素脑病 (bilirubin encephalopathy, BE)<sup>[1]</sup>。在胆红素脑病患者中,约 50%~70%可死于急性期,约 75%~90%的幸存者伴有发育迟缓、听力丧失和智力迟钝等神经功能障碍<sup>[2, 3]</sup>。迄今为止,关于胆红素脑病中脑功能损伤的分子机制仍不明确,因而对胆红素脑病的治疗缺乏有效的手段,致使胆红素脑病对新生儿的生命和健康造成严重的威胁。

胆红素脑病中脑细胞的水肿在其病程进展中具有重要意义。在胆红素脑病兔模型中发现,其最显著的病理变化为脑血管周围星形胶质细胞足突的肿胀。足突肿胀在神经元出现黄疸变化 (icteric alterations) 之前就已发生,并随着黄疸持续时间的延长而加重<sup>[4]</sup>。针对临床胆红素脑病患儿的回顾性研究还发现,胆红素脑病脑组织发生了弥漫性水肿,此病变促进了 UCB 的沉积,增加了神经组织对于 UCB 的损伤敏感性,致使血清胆红素水平轻度升高时神经细胞也易于损伤<sup>[5]</sup>。并且,UCB 作为血红

蛋白的代谢产物,在脑出血的早期也可促进脑组织的水肿及炎性细胞的浸润,蛋白激酶 C 信号通路可能在其中发挥着作用<sup>[6, 7]</sup>。以上结果提示,神经细胞水转运异常及继发的细胞毒性脑水肿的发生在胆红素所致脑损伤的病程进展中发挥重要作用。相关研究表明,急性水中毒和缺血性脑卒中等神经系统损伤所致脑水肿 (brain edema) 的发生、发展过程与水通道蛋白-4 (aquaporin-4, AQP4) 的表达及分布异常有密切联系<sup>[8]</sup>。

AQP4 是脑内含量最多、分布最广的水通道蛋白质<sup>[9]</sup>。在星形胶质细胞中, AQP4 呈极性表达 (polarized expression) 于软脑膜内表面所形成的胶质界膜、室管膜细胞的基底部,以及毛细血管周围的终足膜等特定膜域<sup>[10, 11]</sup>。AQP4 在细胞毒性脑水肿 (cytotoxic cerebral edema) 的形成中发挥关键性作用<sup>[12]</sup>。在缺血性脑卒中与细菌性脑膜炎等病理条件下,脑组织因缺血缺氧出现代谢异常,使得神经细胞内外的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  等离子交换障碍和乳酸堆积,导致细胞内渗透压增高,形成细胞毒性脑水肿。AQP4 的表达增加可使水从细胞间隙进入细胞内,促进了星形胶质细胞水肿的形成<sup>[13]</sup>。AQP4 表达的

降低,则可延缓水肿的形成。由此可见,AQP4 的表达变化对细胞毒性脑水肿的病程进展具有重要的影响。有文献<sup>[14]</sup>提及,AQP4 可被蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 所磷酸化,从而发生内化或者进行特定的胞内分选,导致 AQP4 的亚细胞定位和/或表达量变化,进而影响其功能。

由于 AQP4 在细胞毒性脑水肿中提供了水内流的主要通道,而胆红素脑病中星形胶质细胞足突发生了水肿。该部位也为 AQP4 极性表达的区域,此水肿改变必然是由 AQP4 所介导的<sup>[15]</sup>。在脑出血和脑外伤等多种原因所致细胞毒性脑水肿中,均观察到 AQP4 的表达增加<sup>[16, 17]</sup>。然而,目前尚未见到 AQP4 在胆红素脑病病程进展中的表达变化及其作用的相关报道。本研究旨在研究胆红素脑病模型中 AQP4 的表达变化,并探讨其在胆红素脑病中的作用及其可能的机制,以便为胆红素脑病的干预治疗提供新的分子靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SPF 级 SD 成年健康大鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供。大鼠按照雄雌 1:1 合笼,确定怀孕后即单笼喂养,待其足月自然分娩后,新生鼠由母鼠喂养至 7 d 备用。兔来源 AQP4 多克隆抗体(荧光染色,1:100)及小鼠来源 AQP4 单克隆抗体(WB, 1:1 000)均购自英国 abcam 公司,荧光二抗购自碧云天生物技术有限公司,小鼠来源  $\beta$ -肌动蛋白单克隆抗体购自中国 Protein tech 公司,胆红素购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 胆红素溶液的制备

避光称取晶体胆红素 5 mg 溶于 50  $\mu$ L 0.5 mol/L NaOH 中,加入双蒸水 450  $\mu$ L,用 0.5 mol/L HCl 调节 pH 至 8.5。

### 1.3 实验动物分组及胆红素脑病鼠模型的复制

将 7 日龄的 SD 鼠(10~15 g)78 只随机分为假手术对照组( $n=15$ ,其中 3 只用于电镜)和模型组,模型组又根据胆红素作用时间分为 12 h( $n=12$ )、24 h( $n=15$ ,其中 3 只用于电镜)、48 h( $n=12$ )、72 h( $n=12$ )、7 d( $n=12$ )组。参照 Song 等<sup>[18]</sup>介绍的方法,将乳鼠麻醉后,经小脑延髓池(cisterna magna, CM)抽取 15  $\mu$ L 脑脊液以防止因注射胆红素而产生的颅内压升高。用微量进样器向其 CM 内注入上述胆红素溶液(20  $\mu$ g 胆红素/g 体重)。并于注射后相应时间点进行后续处理。对照组于 CM 中注射生理

盐水 20  $\mu$ L,并在注射后 24 h 进行后续处理。

### 1.4 动物模型的观察和鉴定

对各组动物的一般情况及神经行为学变化进行观察和鉴定,主要关注其呼吸、心率、体重变化以及异常神经行为的出现,例如是否出现吃奶困难、侧卧、俯伏、活动减少、四肢颤动、爬行不稳或转圈等表现。在后续断头取脑时仔细观察,证实小脑、延髓及大脑均有胆红素黄染现象,且无明显损伤出血灶。将到达相应时间点之前死亡或有出血灶的动物淘汰,并立即补齐。

### 1.5 脑切片的制备及 HE 染色、尼氏染色

随机选取各组乳鼠 6 只,在到达相应时间点时将其麻醉,经左心室快速灌注预冷(4℃)的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)20 mL,然后使用 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.2)50 mL 进行灌注固定,断头取脑,并置于相同的固定液中后固定 24 h,随后放入梯度蔗糖磷酸盐缓冲液(浓度 10%~30%, 0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.2)中脱水,使用 OCT 包埋剂包埋并进行冰冻切片,片厚 8  $\mu$ m,风干后部分切片进行常规 HE 及尼氏染色。剩余切片置于-30℃冰箱中保存。

### 1.6 电镜样品的制备

选取对照组及 24 h 组乳鼠各 3 只进行麻醉,冲洗血液后,先灌注 20 mL 2.5% 的戊二醛固定液,后灌注 50 mL 多聚甲醛固定。迅速取出大脑,将皮质切为 1×1×1 mm<sup>3</sup> 大小组织块放入 4% 戊二醛固定液中 4℃ 固定 2 h,送电镜室进行后续处理并切片。使用 H-7500 型电镜观察并摄片。

### 1.7 脑蛋白质样品的制备及 Western 印迹检测

随机选取各组乳鼠 6 只,在到达相应时间点时将其麻醉,置于冰上,经左心室快速灌注预冷(4℃)的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)20 mL,并将右心耳剪开,置换出其血液,待其血液冲洗干净,快速取脑,分离出大脑皮质,使用细胞裂解液提取蛋白质;BCA 法测定各组蛋白质浓度并调节其浓度达到一致,取等量蛋白质样品(70  $\mu$ g),经 SDS-PAGE 分离蛋白质,将蛋白质条带转移至 PVDF 膜上。使用 Western 封闭液将 PVDF 膜封闭 2 h;1:500 兔抗 AQP4 多克隆抗体,1:50 000 小鼠抗  $\beta$ -肌动蛋白,4℃ 过夜。漂洗后,将条带放入相对应的二抗中,山羊抗兔二抗(1:22 000),山羊抗小鼠二抗(1:10 000),37℃ 孵育 1.5 h,采用 ECL 发光法进行显影。Quantity One 对 AQP4 和  $\beta$ -肌动蛋白的条带进行灰度值的分析,其结果以 AQP4 条带灰度/ $\beta$ -肌



动蛋白条带灰度的比值进行表示。

1.8 免疫荧光检测

脑切片经 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 漂洗 30 min,0.3% Triton X-100 作用 30 min;1%牛血清白蛋白 (BSA) 封闭,37℃,90 min;1:100 稀释的小鼠抗大鼠单克隆 AQP4 抗体 4℃ 孵育过夜;0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min×3 次,加入 1:200 稀释的 Alexa Flour 488 标记山羊抗小鼠二抗孵育,37℃,90 min;0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min×3 次,5% DAPI-甲醇溶液孵育 5 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min×3 次,50% 甘油+50%PBS 封片。空白对照采用一抗稀释液代替一抗进行孵育。使用激光共焦显微镜 (TCS SP5, Leica, Germany) 观察并拍照。

1.9 统计学方法

应用 SPSS 24.0 统计软件包进行资料的统计学分析。测定资料数据均以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,采用 One-Way ANOVA 进行组间比较,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

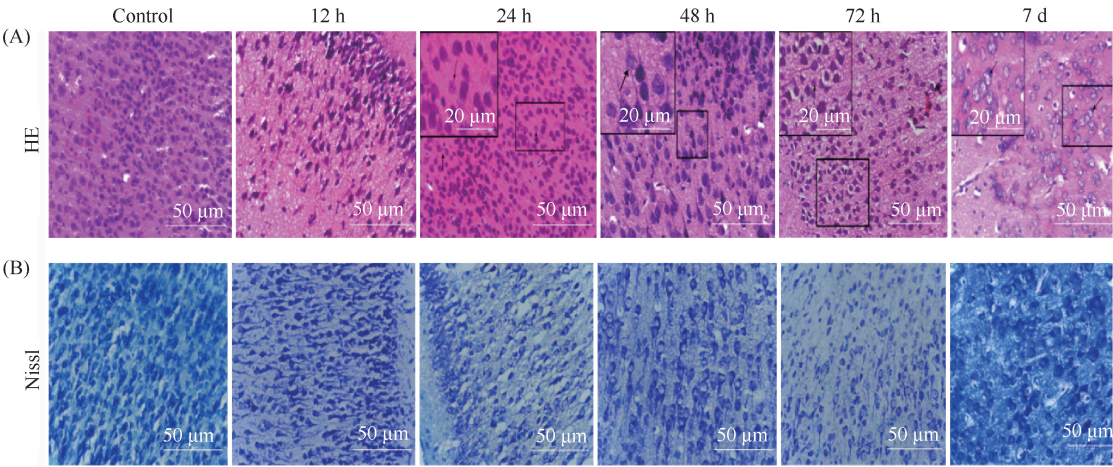
2.1 胆红素脑病动物模型出现行为异常

胆红素脑病动物造模后,观察其神经行为学变化

以初步判断造模成功。可见对照组动物无明显行为异常,各组模型鼠出现活动减少、俯伏、对外界刺激反应低下,部分鼠出现步态不稳、转圈,甚至出现四肢颤动 (结果未显示),呼吸节律不稳等表现。24 h 组有 2 只提前死亡,7 d 组有 3 只死亡,立即补充完全。

2.2 动物建模 24 h 细胞形态学改变

为了研究胆红素脑病病理过程中大鼠皮质神经元细胞形态及结构的变化,使用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 及尼氏染色,以检测各组模型鼠脑组织随着胆红素作用时间的不同而发生的病理改变。HE 染色结果显示,对照组大鼠皮质神经元结构清晰完整,细胞排列整齐有序,神经元的胞浆丰富淡染,细胞核居中,模型组中发现胆红素黄染,12 h 组与对照组相比较,未见明显改变,24 h 及之后的各时间点,可见鼠脑组织细胞核固缩、核周间隙变宽、胞浆变少及细胞与细胞之间间隙增大,部分细胞呈现嗜酸性改变 (Fig.1A);尼氏染色结果显示 对照组大鼠皮质结构完整,细胞的层次清晰,神经元细胞的胞浆内有均匀蓝染的块状尼氏小体;与对照组相比较,12 h 组和 24 h 组皮质及海马神经元胞体内未见尼氏小体明显改变,48 h 及之后的各时间点,发现尼氏小体减少 (Fig.1B)。



**Fig.1 HE staining (A) and Nissl staining (B) of the rat brain cortex in different groups** 7-day-old rats were randomly divided into control and 12 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours, and 7 days groups, according to the duration of action of bilirubin. The figures in the upper panel are HE staining of cortices of the control and bilirubin-treated groups for 12 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours, and 7 days. It showed that with the prolongation of bilirubin deposition duration, nerve cells become swollen and intercellular space is increased; The figures in the lower panel are Nissl staining, the number of Nissl bodies was gradually reduced. Arrows point to the swollen nerve cells. Scale bars=50 μm (Scale bars in the inset=20 μm)

2.3 胆红素处理 24 h 组神经细胞超微结构出现变化

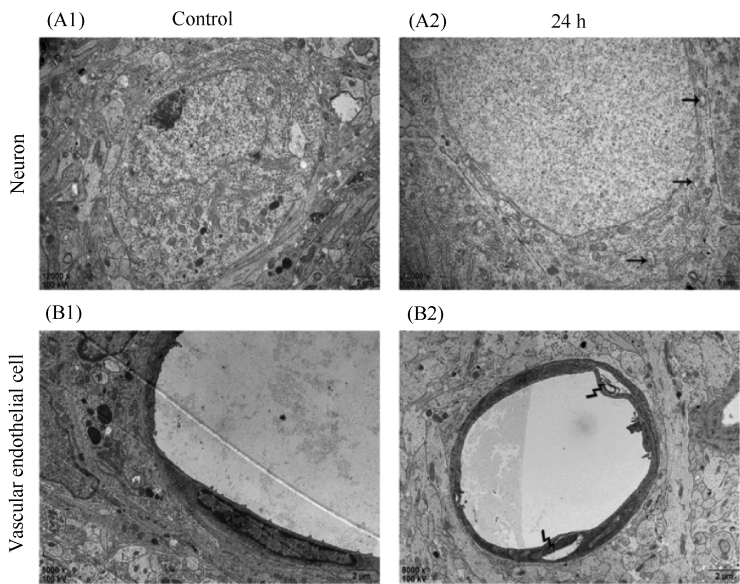
为了研究胆红素对神经细胞的超微结构的影响,使用透射电镜 (transmission electron microscope, TEM)


检测 24 h 各组鼠脑超微结构的变化。对照组神经元细胞的质膜完整,细胞器丰富,内质网、高尔基体和初级溶酶体结构正常,核糖体聚集成片,核膜完整,染色质分布均匀 (Fig.2A1),毛细血管内皮细胞形态正常,



连接紧密,屏障结构完整(Fig.2B1);模型 24 h 组,神经元中可见大量肿胀的线粒体呈空泡化,内质网扩张,

核糖体颗粒较少(Fig.2A2),毛细血管内皮细胞之间连接疏松,髓样结构形成,屏障结构破坏(Fig.2B2)。



**Fig.2 Transmission electron microscope images showing the ultra-microstructure of control (A1, B1) and bilirubin-treated groups for 24 hours(A2, B2)** In the control group, the plasma membrane of neurons was intact, and organelles were abundant. The structures of endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and primary lysosome were normal, ribosomes were aggregated into pieces. The nuclear membrane was intact; chromatin was evenly distributed (Fig. 2A1); capillary endothelial cells were normal, closely connected; barrier structure was intact (Fig.2B1). In the bilirubin-treated groups for 24 hours, a large number of swollen mitochondria were vacuolated. Endoplasmic reticulum was dilated. Ribosome granules were less (Fig.2A2); the connection between capillary endothelial cells was loose; medullary structure was formed; the barrier structure was destroyed (Fig.2B2). Arrowheads point to the swollen mitochondria; arrows point to the swollen mitochondria; circles point to the intact barrier structures;  points to the destroyed barrier structures. (*n* = 3)

**2.4 动物建模 24 h AQP4 表达量最高,并且主要表达于细胞膜**

为了研究胆红素作用不同时间,各组鼠脑 AQP4 表达的改变,使用免疫荧光染色,以检测各组鼠脑组织随着胆红素作用时间的不同其 AQP4 的表达情况。结果显示,对照组 AQP4 表达微弱,主要位于细胞膜上及血管周围。其中,表达 AQP4 的细胞比较散在,且细胞膜上 AQP4 的表达比较多;随着胆红素在脑中沉积时间延长,12 h 组中表达 AQP4 细胞增加,并且单个细胞膜上 AQP4 表达量也在增加;24 h 组中,细胞膜上 AQP4 的表达继续增加;48 h 组表达 AQP4 的细胞数量相对减少,单个细胞膜上表达也在减少;72 h 组表达 AQP4 的细胞数量继续减少;7 d 组中 AQP4 在膜上表达减少,表达的细胞数量减少,且多见于血管上(Fig.3)。

**2.5 动物建模 24 h 组 AQP4 表达量最多**

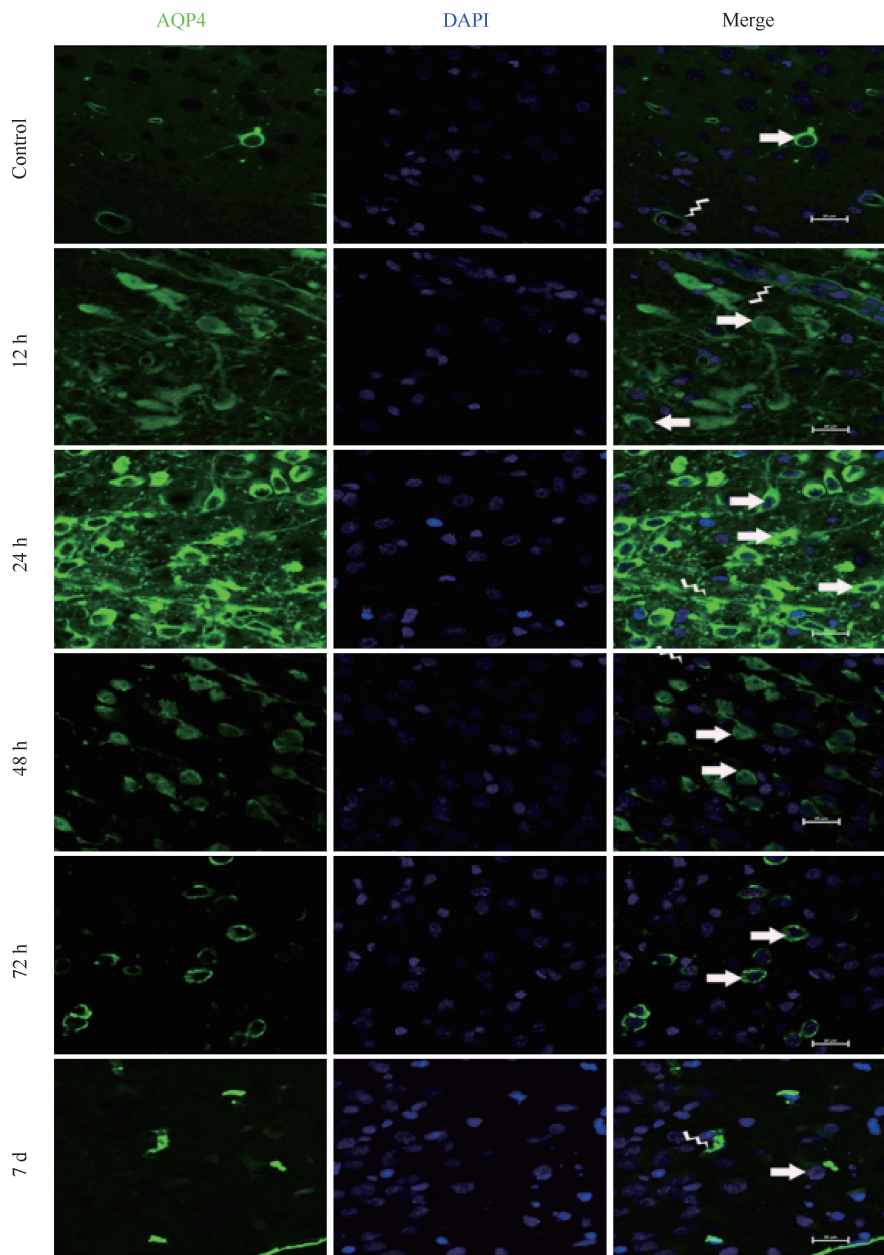
为了研究胆红素作用不同时间对鼠脑 AQP4 表达量的影响,使用 Western 印迹法,以检测各组鼠脑组织随着胆红素作用时间的不同其 AQP4 表达量的情况。结果表明,同假手术对照组(sham)相比较,


AQP4 的表达在不同时间点呈现先增高后降低的趋势,AQP4 表达在 12 h 增加,持续至 24 h 到达峰值(24 h 组  $1.38 \pm 0.11$  vs sham  $0.87 \pm 0.21$ ,  $P < 0.05$ ),之后在 48 h、72 h、7 d AQP4 的表达持续下降,72 h AQP4 表达低于 48 h(72 h 组  $0.98 \pm 0.26$  vs 48 h  $1.09 \pm 0.14$ ,  $P < 0.05$ ),72 h 组及 7 d 组 AQP4 的表达与对照组相比无统计学差别( $P > 0.05$ , Fig.4)。

**3 讨论**

胆红素脑病是由于高胆红素血症所引起的神经综合征,是新生儿黄疸最为严重的并发症,其发病与 UCB 的神经毒性作用有关<sup>[19]</sup>。在病理条件下,过多的 UCB 透过受损的血脑屏障进入大脑,沉积于大脑皮质、基底神经核、小脑等不同脑区<sup>[20]</sup>;损伤其神经元和星形胶质细胞,进而引起新生儿神经功能障碍<sup>[21]</sup>。

本文参照 Song 等<sup>[18]</sup>的方法建立胆红素脑病模型,运用形态学及分子生物学的方法,研究胆红素脑病所致脑损伤与 AQP4 表达变化的关系。HE 及尼

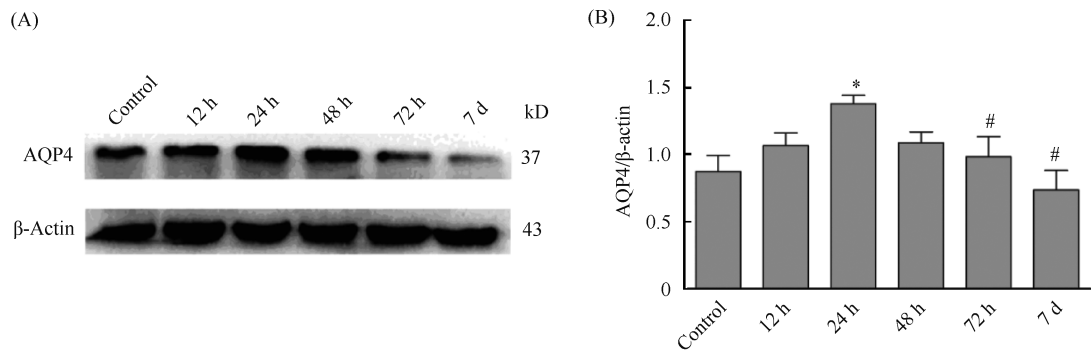


**Fig.3 Confocal images showing the expression of AQP4 in different groups** In the control group, the expression of AQP4 is weak and lines the blood vessels and membrane of astrocytes. The expression of AQP4 in the cytoplasm of astrocyte increased with more AQP4-positive cells in the bilirubin-treated groups for 12 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours, and 7 days, especially in the 24 hour group. Subsequently, AQP4-positive cells gradually decreased in the group of 48 hours, 72 hours and 7 days. The expression of AQP4 was more common lining the blood vessels in the group of 7 days. Arrows point to the AQP4-positive cells;  points to the AQP4 lines the blood vessels (bar scale= 20 μm)

氏染色结果提示,胆红素对脑组织的损伤作用在 24 h 开始出现 (Fig.1), 因此, 本文选取该时间点对脑组织的超微结构进行了检测。电镜结果提示, 脑细胞存在能量产生障碍 (Fig.2), 胆红素在脑内的持续毒性作用, 最终将使脑组织能量储备耗竭, 生理性代偿失调, 导致神经元生理功能异常与形态结构变化。据研究, 胆红素脑病不可逆性的脑损伤通常在出生后 24 h 发生<sup>[22]</sup>, 其原因可能与该时间点胆红素开

始发挥神经毒性作用, 导致神经细胞超微结构发生变化有关。

已有的研究表明, UCB 对神经系统具有多种不利影响, 可导致脑细胞能量代谢、DNA 和蛋白质合成、膜及受体功能和特定蛋白质功能的调控、神经递质的摄取与释放等方面的异常<sup>[23-25]</sup>。在血脑屏障结构不完善、功能不成熟的情况下, 血清中的 UCB 可从血管穿过星形胶质细胞足突并被其吞噬, 介导



**Fig.4 Western blotting showing the expression of AQP4 in different groups** Compared with the control, the expression of AQP4 was increased in the 12 hours group and reached its peak in the 24 hour group ( $1.38 \pm 0.11$  in 24 hours group *vs*  $0.87 \pm 0.21$  in control,  $P<0.05$ ). Subsequently, the expression of AQP4 decreased with the prolongation of bilirubin deposition duration. Compared with that in the 48 hour group, the expression of AQP4 decreased significantly than the 72 hour group, and the difference was statistically significant. ( $0.98 \pm 0.26$  in the 72 hour group *vs*  $1.09 \pm 0.14$  in the 48 hour group,  $P<0.05$ ). The expression of AQP4 in the 72 hour group ( $0.98 \pm 0.26$ ) and 7 day group ( $0.74 \pm 0.25$ ) was not significantly different from that in the control group ( $0.87 \pm 0.21$ ). \*  $P<0.05$  *vs* control, #  $P<0.05$  *vs* the 24 hour group. ( $n=6$ )

星形胶质细胞足突膜水胀及结构破坏,进而UCB还可通过受损的足突膜扩散至神经元树突中,导致神经元受损<sup>[4]</sup>。UCB对线粒体能量代谢的毒性作用在胆红素脑病的发生、发展中发挥极其重要的作用,并且这种毒性作用呈现UCB剂量依赖性 & 作用时间依赖性。随着沉积于脑组织UCB的增多及作用时间的延长,胆红素可引起脑细胞线粒体功能的障碍、增加线粒体膜的通透性、抑制线粒体对氧的利用、影响其氧化磷酸化作用、能量代谢<sup>[26]</sup>和功能状态;并且UCB在神经细胞内的堆积也将导致胞内渗透压增高,促进水分子进入,导致细胞毒性水肿的发生<sup>[27]</sup>。在胆红素脑病患儿脑尸检时发现,脑组织中共同的特征是海绵状变(spongy change),即水肿改变<sup>[5]</sup>。由此可见,神经细胞发生细胞毒性脑水肿是胆红素脑病脑损伤的一个基本的病理改变。

由于AQP4在脑水肿形成和发展中具有重要的作用,本课题检测了胆红素作用不同时间点AQP4的表达变化情况。免疫荧光及Western印迹结果均显示,随着胆红素作用时间的延长,AQP4的表达量存在着先增加、后减少的变化,并且在24 h达到峰值(Fig.3,4)。本项目组之前的研究提示,在多种因素作用下,脑/视网膜胶质细胞可发生AQP4的内化及溶酶体的降解<sup>[28-30]</sup>,而AQP4的内化/降解与PKC对其的磷酸化有关<sup>[14]</sup>。文献表明,UCB可抑制PKC的蛋白质磷酸化功能<sup>[31]</sup>及抑制星形胶质细胞膜的内吞功能<sup>[32]</sup>,UCB对PKC及AQP4内吞/降解的抑制作用是否与胆红素作用早期(24 h内)脑AQP4表达的增加相关,尚需更深入的研究。由于

UCB可导致脑组织发生细胞毒性水肿,AQP4在细胞膜上表达的增加,使得细胞膜对水的通透性增加,水分子可以通过AQP4沿着渗透梯度进入细胞内,在胆红素脑病的早期将促进脑水肿的形成。胆红素脑病中AQP4的表达变化,可能是UCB所致神经细胞水肿的原因,而神经细胞的水肿又将促进胆红素的沉积,加重神经细胞的损伤<sup>[5]</sup>。AQP4的异常表达所介导的细胞毒性脑水肿及继发的脑组织对胆红素的易感性(susceptibility),可以部分的解释以下现象:临床上发生胆红素脑病后,经过治疗使血清UCB远远低于治疗指南推荐的UCB浓度时,神经损伤仍然继续发生<sup>[33]</sup>。在胆红素作用24 h,由于神经细胞的不可逆性损伤已经出现,神经元及星形胶质细胞逐渐出现坏死及凋亡<sup>[34, 35]</sup>,伴随着星形胶质细胞数量的减少,AQP4的表达将减少,这可能是胆红素作用48 h及之后各组AQP4表达下降的原因。

总之,本研究证实,在SD乳鼠胆红素脑病模型中,UCB的神经毒性将导致脑AQP4在早期表达增加,在24 h到达峰值后逐渐减少。AQP4的表达变化与神经细胞的水肿及其超微结构的损伤有关,并在胆红素脑病的持续进展中发挥作用。那么,UCB是通过对AQP4的表达进行直接调控,亦或是进入胶质细胞后通过渗透压的变化而对AQP4的表达进行调控,是下一步工作中值得深入的研究问题。

参考文献 (References)

[ 1 ] Bahr TM, Christensen RD, Agarwal AM, *et al.* The neonatal acute bilirubin encephalopathy registry (NABER): background, aims, and protocol[J]. Neonatology, 2019, **115**(3): 242-246  
[ 2 ] Slusher TM, Owa JA, Painter MJ, *et al.* The kernicteric facies;



- facial features of acute bilirubin encephalopathy [J]. *Pediatr Neurol*, 2011, **44**(2): 153-154
- [3] 姜志梅, 李晓捷, 孙爱萍, 等. 胆红素脑病新生鼠脑组织神经元特异性烯醇化酶 mRNA 及其蛋白的动态变化[J]. 实用儿科临床杂志 (Jiang ZM, Li XJ, Sun AP, *et al.* Dynamic changes of neuron-specific enolase mRNA and protein in brain tissue of offspring rats with bilirubin encephalopathy. *J Appl Clin Pediatr*, 2008, **23**(12): 915-917, 922
- [4] Chen HC, Tsai DJ, Wang CH, *et al.* An electron microscopic and radioautographic study on experimental kernicterus. I. Bilirubin transport via astroglia[J]. *Am J Pathol*, 1969, **56**(1): 31-58
- [5] Turkel SB, Miller CA, Guttenberg ME. A clinical pathologic reappraisal of kernicterus [J]. *Pediatrics*, 1982, **69**(3): 267-272
- [6] Loftspring MC, Johnson HL, Feng R, *et al.* Unconjugated bilirubin contributes to early inflammation and edema after intracerebral hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, **31**(4): 1133-1142
- [7] Huang FP, Xi G, Keep RF, *et al.* Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products[J]. *J Neurosurg*, 2002, **96**(2): 287-293
- [8] Thiagarajah JR, Papadopoulos MC, Verkman AS. Noninvasive early detection of brain edema in mice by near-infrared light scattering[J]. *J Neurosci Res*, 2005, **80**(2): 293-299
- [9] Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4**(12): 991-1001
- [10] Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema [J]. *Pediatr Nephrol*, 2007, **22**(6): 778-784
- [11] Gleiser C, Wagner A, Fallier-Becker P, *et al.* Aquaporin-4 in astroglial cells in the CNS and supporting cells of sensory organs-A comparative perspective [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(9): pii: E1411
- [12] Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, *et al.* Water movements in the brain: role of aquaporins[J]. *Trends Neurosci*, 2008, **31**(1): 37-43
- [13] Zador Z, Stiver S, Wang V, *et al.* Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, (190): 159-170
- [14] Carmosino M, Procino G, Tamma G, *et al.* Trafficking and phosphorylation dynamics of AQP4 in histamine-treated human gastric cells[J]. *Biol Cell*, 2007, **99**(1): 25-36
- [15] Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, *et al.* New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice[J]. *Neuroscience*, 2004, **129**(4): 983-991
- [16] Chen CH, Xue R, Zhang J, *et al.* Effect of osmotherapy with hypertonic saline on regional cerebral edema following experimental stroke: a study utilizing magnetic resonance imaging [J]. *Neurocrit Care*, 2007, **7**(1): 92-100
- [17] Sun MC, Honey CR, Berk C, *et al.* Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats[J]. *J Neurosurg*, 2003, **98**(3): 565-569
- [18] Song S, Hu Y, Gu X, *et al.* A novel newborn rat kernicterus model created by injecting a bilirubin solution into the cisterna magna[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(5): e96171
- [19] Daood MJ, McDonagh AF, Watchko JF. Calculated free bilirubin levels and neurotoxicity [J]. *J Perinatol*, 2009, **29** Suppl 1: S14-19
- [20] Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system [J]. *Pediatr Neurol*, 2003, **29**(5): 410-421
- [21] 金叶, 倪琼. 新生儿胆红素脑病的相关危险因素及其防治措施分析[J]. 浙江医学教育 (Jin Y, Ni H. Correlated risk factors and preventive measures analysis on the incidence of neonatal bilirubin encephalopathy[J]. *Zhejiang Med Edu*, 2018, **17**(5): 23-25, 54
- [22] Falcao AS, Silva RF, Vaz AR, *et al.* Cross-talk between neurons and astrocytes in response to bilirubin: early beneficial effects [J]. *Neurochem Res*, 2013, **38**(3): 644-659
- [23] Weil ML, Menkes JH. Bilirubin interaction with ganglioside: possible mechanism in kernicterus [J]. *Pediatr Res*, 1975, **9**(10): 791-793
- [24] Silva R, Mata LR, Gulbenkian S, *et al.* Inhibition of glutamate uptake by unconjugated bilirubin in cultured cortical ratastrocytes; role of concentration and pH[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **265**(1): 67-72
- [25] Rodrigues CM, Solá S, Castro RE, *et al.* Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis [J]. *J Lipid Res*, 2002, **43**(6): 885-894
- [26] Wennberg RP, Johansson BB, Folbergrová J, *et al.* Bilirubin-induced changes in brain energy metabolism after osmotic opening of the blood-brain barrier [J]. *Pediatr Res*, 1991, **30**(5): 473-478
- [27] 陈舜年, 贡晓明, 李佩红, 等. 胆红素脑病动物模型制作与鉴定[J]. 新生儿科杂志 (Chen SN, Ben XM, Li PH, *et al.* Establishment and identification of animal model of bilirubin encephalopathy[J]. *J Neonatol*, 1997, **12**(4): 166-168
- [28] Huang J, Sun SQ, Lu WT, *et al.* The internalization and lysosomal degradation of brain AQP4 after ischemic injury [J]. *Brain Res*, 2013, **1539**: 61-72
- [29] Huang J, Lu WT, Sun SQ, *et al.* Upregulation and lysosomal degradation of AQP4 in rat brains with bacterial meningitis [J]. *Neurosci Lett*, 2014, **566**: 156-161
- [30] Gan SW, Ran JH, Chen H, *et al.* Lysosomal degradation of retinal glial AQP4 following its internalization induced by acute ocular hypertension[J]. *Neurosci Lett*, 2012, **516**(1): 135-140
- [31] Amit Y, Boneh A. Bilirubin inhibits protein kinase C activity and protein kinase C-mediated phosphorylation of endogenous substrates in human skin fibroblasts[J]. *Clin Chim Acta*, 1993, **223**(1-2): 103-111
- [32] Silva RF, Mata LM, Gulbenkian S, *et al.* Endocytosis in rat cultured astrocytes is inhibited by unconjugated bilirubin [J]. *Neurochem Res*, 2001, **26**(7): 793-800
- [33] Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, *et al.* Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity [J]. *Trends Mol Med*, 2004, **10**(2): 65-70
- [34] Rawat V, Bortolussi G, Gazzin S, *et al.* Bilirubin-Induced Oxidative Stress Leads to DNA Damage in the Cerebellum of Hyperbilirubinemic Neonatal Mice and Activates DNA Double-Strand Break Repair Pathways in Human Cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 1801243
- [35] Amin SB, Smith T, Timler G. Developmental influence of unconjugated hyperbilirubinemia and neurobehavioral disorders [J]. *Pediatr Res*, 2019, **85**(2): 191-197