

◆方药研究◆

## 茵陈蒿汤对新生大鼠高胆红素血症的治疗作用及机制研究

张小路<sup>1</sup>, 杜梅红<sup>2</sup>, 张全<sup>1</sup>, 陈红跃<sup>1</sup>, 赵林<sup>1</sup>, 郭伟胜<sup>2</sup>

1. 河南省中医院普外二科, 河南 郑州 450002; 2. 河南省中医院放射科, 河南 郑州 450002

**[摘要]** 目的: 研究茵陈蒿汤对新生大鼠高胆红素血症的治疗作用及作用机制。方法: 200只7日龄SPF级SD大鼠, 随机选取36只作为正常组, 其余腹腔注射胆红素诱发新生大鼠高胆红素血症, 剔除不合格大鼠, 选择建模成功大鼠144只随机分为模型组和茵陈蒿汤低、中、高各剂量组, 各36只。茵陈蒿汤低、中、高各剂量组分别给予2、4、8 g/(kg·d)茵陈蒿汤灌胃, 正常组和模型组灌胃等量的生理盐水, 两周为1疗程。观察大鼠的一般行为变化, 检测血清和脑组织中胆红素含量和神经元细胞膜Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中神经元特异性烯醇化酶(NSE)浓度, TUNEL法检测脑组织细胞凋亡率, 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测脑组织caspase-3 mRNA的表达。结果: 与正常组比较, 模型组和茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠给药24 h和14天后血清及脑组织胆红素浓度明显升高, 脑组织神经元细胞膜Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶的活性明显降低, 神经元特异性烯醇化酶含量明显升高, 脑组织细胞凋亡率显著升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。给药24 h后, 与模型组比较, 茵陈蒿汤高剂量组大鼠脑组织中胆红素的浓度明显降低, 脑组织神经元细胞膜Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶的活性明显升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。给药14天后, 与模型组比较, 茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠血清及脑组织胆红素浓度明显降低, 脑组织神经元细胞膜Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶的活性明显升高, 神经元特异性烯醇化酶含量和脑组织细胞凋亡率显著降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与同组24 h比较, 茵陈蒿汤低、中、高各剂量组给药14 d后, 血清及脑组织中胆红素的含量明显降低, 脑组织神经元细胞膜Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶的活性明显升高, 神经元特异性烯醇化酶含量明显降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与正常组比较, 模型组大鼠caspase-3 mRNA的表达显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠caspase-3 mRNA的表达显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 茵陈蒿汤对新生大鼠高胆红素血症有明显的治疗作用, 可能通过改善新生大鼠的脑组织中Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力, 升高血清神经元特异性烯醇化酶的表达, 降低脑组织细胞凋亡率及凋亡基因caspase-3 mRNA的表达来发挥作用。

**[关键词]** 高胆红素血症; 茵陈蒿汤; Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性; 神经元特异性烯醇化酶(NSE); caspase-3 mRNA; 动物实验; 新生大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415(2017)07-0001-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.07.001

## Yinchenhao Tang Has Curative Effect for Hyperbilirubinemia on Newborn Rats

ZHANG Xiaolu, DU Meihong, ZHANG Quan, CHEN Hongyue, ZHAO Lin, GUO Weisheng

**Abstract:** Objective: To study the curative effect and mechanism of Yinchenhao Tang for hyperbilirubinemia on newborn rats. Methods: Two hundreds seven-day-old SPF(Specific Pathogen Free) SD rats were selected as study objects. Among them, 36 rats were divided into the normal group, and the rest were given bilirubin by intraperitoneal injection to induce hyperbilirubinemia. Unqualified rats were eliminated. One hundred and forty-four rats with successful established models were divided into the model group and Yinchenhao tang low, middle and high dosage groups, 36 rats in each group. Yinchenhao tang low, middle and high dosage groups were respectively given 2, 4 and 8 g/(kg·d) by gavage, while the normal group and the model group were given the same amount of normal saline by gavage. One course lasted for two weeks. Observed general behavioral changes in rats. Detected the bilirubin content in serum and brain tissue as well as the activity of

[收稿日期] 2017-02-21

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(142300410070)

[作者简介] 张小路(1976-), 男, 主治医师, 主要从事肝胆胰脾疾病的发生机制研究及临床治疗。

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in neuron membrane. Determined the concentration of serum neuron specific enolase(NSE) by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and the ratio of brain cells apoptosis by TUNEL technique. Studied the expression of caspase-3 mRNA in brain tissue using reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). Results: Comparing with those in the normal group, after 24 h and 14 days of medication, in the model group and Yinchenhao tang low, middle and high dosage groups, bilirubin content in serum and brain tissues was evidently increased, the activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in neuron membrane was markedly reduced, NSE content was significantly raised, and the ratio of brain cells apoptosis was obviously increased, all differences being significant( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). After 24 h of medication, when compared with those in the model group, in Yinchenhao tang high dosage group, bilirubin content in serum and brain tissue was markedly decreased and the activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in neuron membrane was raised( $P<0.05$ ). After 14 days of medication, comparing with those in the model group, in Yinchenhao tang low, middle and high dosage groups, bilirubin content in serum and brain tissues were obviously declined, the activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in neuron membrane was significantly increased, NSE content and the ratio of brain cells apoptosis was evidently decreased( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). When compared with those after 24h of medication, in Yinchenhao tang low, middle and high dosage groups after 14 days of medication, bilirubin content in serum and brain tissue was obviously reduced, the activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in neuron membrane was significantly raised, NSE content and the ratio of brain cells apoptosis was evidently declined, differences being significant( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Comparing with those in the normal group, the expression of caspase-3 mRNA in the model group was increased( $P<0.05$ ). Comparing with those in the model group, in Yinchenhao tang low, middle and high dosage groups, the expression of caspase-3 mRNA was decreased( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Conclusion: Yinchenhao tang has significant curative effect for hyperbilirubinemia in newborn rats. It may function by improving the activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in neuron membrane, increasing the expression of NSE, reducing the ratio of brain cells apoptosis, and decreasing the expression of caspase-3 mRNA in newborn rats.

**Keywords:** Hyperbilirubinemia; Yinchenhao tang; Activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase; Neuron specific enolase (NSE); Caspase-3 mRNA; Animal experiment; Newborn rats

新生儿高胆红素血症临床上主要是指血清总胆红素水平 $>34\ \mu\text{mol/L}$ ,一般分为未结合胆红素升高和结合胆红素升高两种高胆红素血症。胆红素脑病是其最严重的并发症<sup>[1]</sup>,严重的高胆红素血症可使新生儿出现永久性的神经损伤、核黄疸,或留下神经系统后遗症,甚至会导致死亡<sup>[2-3]</sup>。发生这些的原因主要是由于过量的游离胆红素可透过血脑屏障在脑组织细胞沉积,影响脑组织神经元细胞膜Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶的活性,促使神经细胞凋亡,影响神经细胞的功能,造成脑损伤<sup>[1]</sup>。目前针对高胆红素血症主要采用光疗和换血,药物治疗主要应用安妥明、茵栀黄等<sup>[4]</sup>。近临床研究表明茵陈蒿汤治疗新生儿高胆红素血症疗效显著,但其作用机制尚不明确<sup>[5-6]</sup>。本研究采用新生SD大鼠腹腔注射胆红素建立新生大鼠高胆红素血症模型,探讨茵陈蒿汤对高胆红素血症的治疗作用及其潜在的机制。

## 1 实验材料

1.1 实验动物 选择7日龄新生SPF级SD大鼠200只,体重(12.2±1.8)g,雌雄各半,购自山西医科大学实验动物中心,合格证号:SCXK(晋)2015-0011。

1.2 主要仪器 全自动生化分析仪(BS600 深圳迈瑞),流式细胞仪(FACSCanto II 美国BD公司),十万分之一电子天平

(XS105 DualRange),台式离心机(5424R 艾本德中国有限公司),酶标仪(Spectra Max Ms 美国分子仪器公司)。

1.3 药物与试剂 晶体胆红素(美国Sigma公司,批号:L20141213);总胆红素测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20150916);Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20151023);细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:KGA112);大鼠神经元特异性烯醇化酶测定试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号:20150903),RNA提取试剂盒(北京康为世纪科技有限公司,批号:CW0581)。

胆红素溶液配制<sup>[7]</sup>:避光称取晶体胆红素50 mg,溶于1 mL 0.5 mol/L NaOH中,加入双蒸水9 mL,用0.5 mol/L HCl调节pH至8.5。

茵陈蒿汤:茵陈180 g,栀子120 g,大黄(去皮)60 g,3600 mL水浸泡2 h,先文火后武火,煎煮2次,每次30 min,漏斗过滤,合并2次所得滤液,减压浓缩至360 mL,浓度为含原药材量1 g/mL,4℃保存备用。

## 2 实验方法

2.1 模型的建立及分组与给药 参照文献[8],选取36只7日龄新生SD大鼠腹腔注射0.5 mL 0.9% NaCl注射液作为正

常组,其余大鼠腹腔注射 100 μg/g 的胆红素溶液作为高胆红素血症模型,选取血清胆红素与正常组有显著性差异的 144 只造模成功大鼠随机分为 4 组,每组 36 只,分别为茵陈蒿汤低、中、高各剂量组和模型组。茵陈蒿汤低、中、高各剂量组分别按 2、4、8 g/(kg·d)立即给予茵陈蒿汤灌胃,模型组和正常组给予等体积的 0.9% NaCl 溶液灌胃。在给药 24 h 后,每组随机选取 12 只,检测血清和脑组织中胆红素含量、脑组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力、血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)浓度;其余大鼠继续给药 14 d 后,检测血清和脑组织中胆红素含量、脑组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力、血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)、细胞凋亡数目、脑组织 caspase-3 mRNA 的表达。

2.2 观察各组幼鼠的一般行为 观察各组幼鼠的皮肤颜色,对外界的刺激反应,有无抽搐、翻滚、俯伏等神经行为,并做详细记录。

2.3 血清胆红素浓度测定 各实验组幼鼠在给药 24 h 和 14 d 后摘眼球取血,采用酶联免疫吸附法(ELISA),在 546 nm 波长下,按照试剂盒说明书操作测定血清总胆红素浓度。

2.4 脑组织胆红素浓度测定 给药 24 h 和 14 d 后断头处死,每组随机选 12 只大鼠脑组织取出左侧称重,加入冰醋酸,置于组织匀浆器中进行匀浆,然后用等体积甲醇氯仿进行抽提,3000 r/min 离心 15 min 取上清液,用重氮化反应法进行测定,570 nm 波长下测定吸光度,按标准曲线法计算出脑组织胆红素浓度<sup>[8]</sup>。

2.5 脑组织神经元细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性测定 给药 24 h 和 14 d 后断头处死,每组随机取 12 只大鼠右侧脑组织称重,加入 0.9% NaCl 溶液,使用匀浆器制备组织匀浆浓度为 2%,2 000 r/min 离心 10 min,取离心所得上清液,采用比色法,在 440 nm 波长下,按照试剂盒说明书操作测定 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性。

2.6 血清中神经元特异性烯醇化酶(NSE)测定 各实验组幼鼠在给药 24 h 和 14 d 后摘眼球取血,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中 NSE 浓度。

2.7 检测脑组织细胞凋亡 剥离新生大鼠脑组织,取同一部位的皮层和海马回组织,采用 TUNEL<sup>[9]</sup>检测法按试剂盒说明书进行细胞凋亡检测,分析细胞凋亡情况,任意取组织切片的 8 个视野,采用 Qwin 图象分析系统分析单位面积内阳性细胞百分率。

2.8 测定脑组织 caspase-3 mRNA 的表达 取 2.7 中剩余部分新生大鼠脑组织提取总 RNA,使用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)来检测 RNA,使用 RNA 提取试剂盒提取脑组织的 RNA,使用 Primer 6.0 设计引物,caspase-3 的引物为:caspase-3-F:5'-GCACTGGAATGTCAGCTCGCA-3',caspase-3-R:5'-GCCACCTTCCGGTTAACACGA-3',559 bp,β-actin 的引物为:β-actin-F:5'-CATCTCTGTCTCGA

AGTCCA-3',β-actin-R:5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3',300 bp。逆转录反应条件如下:30℃ 8 min,42℃ 42 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min,1 个循环。caspase-3 PCR 反应条件:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 8 min。PCR 反应产物进行检测,电泳结果使用凝胶成像分析仪进行分析,目的条带的灰度值与 β-actin 的比值看做 caspase-3 mRNA 的相对表达量。

2.9 统计学方法 利用 SPSS17.0 统计学软件分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,2 个独立样本组间均数差异性比较用 T 检验,多组间均数差异性比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用多重 T 检验。

### 3 结果

3.1 各组大鼠的一般行为 大鼠腹腔注射 100 μg/g 的胆红素溶液后 24 h,模型组和茵陈蒿汤各剂量组皮肤均出现轻度黄染,弹性变差,对外界刺激反应迟钝,并出现抽搐、翻滚、俯伏等神经行为异常表现,吃奶次数与自主活动明显减少,但茵陈蒿汤各剂量组的症状较模型组轻。造模 48 h 后,模型组仍存在神经行为异常表现,茵陈蒿汤各剂量组神经行为异常表现基本消失。随着给药时间的延长,茵陈蒿汤各剂量组皮肤黄染程度、皮肤弹性、抽搐、对外界刺激的反应、翻滚等神经行为异常表现都有所缓解。

3.2 各组大鼠血清及脑组织中胆红素浓度比较 见表 1。与正常组比较,模型组和茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠给药 24 h 和 14 d 后血清及脑组织胆红素浓度明显升高( $P < 0.01$ )。给药 24 h 后,茵陈蒿汤高剂量组脑组织中胆红素的浓度明显低于模型组( $P < 0.05$ );给药 14 天后,与模型组比较,茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠血清及脑组织胆红素浓度明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与同组 24 h 比较,茵陈蒿汤低、中、高各剂量组给药 14 d 后,血清及脑组织中胆红素的含量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 1 各组大鼠血清及脑组织中胆红素浓度比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	血清中胆红素的含量(nmol/L)		脑组织中胆红素的含量(nmol/g)	
	24 h	14 d	24 h	14 d
正常组	0.13±0.041	0.14±0.055	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	20.17±1.63 <sup>①</sup>	17.27±1.22 <sup>①</sup>	1.84±0.14 <sup>①</sup>	1.71±0.15 <sup>①</sup>
茵陈蒿汤低剂量组	18.87±1.28 <sup>①</sup>	14.29±1.33 <sup>②③</sup>	1.72±0.19 <sup>①</sup>	1.01±0.14 <sup>②③</sup>
茵陈蒿汤中剂量组	17.61±0.95 <sup>①</sup>	7.13±0.80 <sup>③⑤</sup>	1.61±0.13 <sup>①</sup>	0.7±0.11 <sup>③⑤</sup>
茵陈蒿汤高剂量组	15.84±0.88 <sup>①</sup>	3.57±0.56 <sup>③⑤</sup>	1.51±0.14 <sup>①②</sup>	0.32±0.08 <sup>③⑤</sup>

与正常组比较,① $P < 0.01$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ,③ $P < 0.01$ ;与同组 24 h 比较,④ $P < 0.05$ ,⑤ $P < 0.01$

3.3 各组大鼠脑组织神经元细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性比较 见表 2。与正常组比较,模型组和茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠给药 24 h 和 14 d 后脑组织神经元细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP



酶的活性明显降低( $P < 0.01$ )。给药 24 h 后,茵陈蒿汤高剂量组脑组织神经元细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的活性明显高于模型组( $P < 0.05$ )。给药 14 天后,与模型组比较,茵陈蒿汤低、中、高各剂量组脑组织神经元细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的活性明显升高( $P < 0.01$ )。与同组 24 h 比较,茵陈蒿汤低、中、高各剂量组给药 14 天后,脑组织神经元细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的活性明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 2 各组大鼠脑组织神经元细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	
	24 h	14 d
正常组	13.14± 0.67	12.86± 0.73
模型组	1.36± 0.13 <sup>①</sup>	1.05± 0.34 <sup>①</sup>
茵陈蒿汤低剂量组	1.96± 0.31 <sup>①</sup>	5.26± 0.46 <sup>①②③</sup>
茵陈蒿汤中剂量组	2.53± 0.43 <sup>①</sup>	6.83± 1.03 <sup>①②④</sup>
茵陈蒿汤高剂量组	3.14± 0.38 <sup>①②</sup>	7.39± 0.60 <sup>①②④</sup>

与正常组比较,① $P < 0.01$ ;与模型组比较,② $P < 0.01$ ;与同组 24 h 比较,③ $P < 0.05$ ,④ $P < 0.01$

3.4 各组大鼠血清中神经元特异性烯醇化酶浓度比较 见表 3。与正常组比较,模型组和茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠给药 24 h 和 14 d 后神经元特异性烯醇化酶含量明显升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,茵陈蒿汤低、中、高各剂量组给药 14 天后神经元特异性烯醇化酶含量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与同组 24 h 比较,茵陈蒿汤低、中、高各剂量组给药 14 d 后,神经元特异性烯醇化酶含量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 3 各组大鼠血清中神经元特异性烯醇化酶浓度比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	神经元特异性烯醇化酶( $\text{ng}/\text{mL}$ )	
	24 h	14 d
正常组	5.86± 0.36	5.73± 0.64
模型组	18.41± 2.05 <sup>①</sup>	19.26± 3.02 <sup>①</sup>
茵陈蒿汤低剂量组	17.92± 1.88 <sup>①</sup>	14.86± 1.71 <sup>①②④</sup>
茵陈蒿汤中剂量组	17.53± 0.56 <sup>①</sup>	11.32± 1.46 <sup>①③⑤</sup>
茵陈蒿汤高剂量组	16.87± 0.36 <sup>①</sup>	8.26± 0.51 <sup>①③⑤</sup>

与正常组比较,① $P < 0.01$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ,③ $P < 0.01$ ;与同组 24 h 比较,④ $P < 0.05$ ,⑤ $P < 0.01$

3.5 各组大鼠脑组织细胞凋亡率比较 见表 4。与正常组比较,模型组和茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠脑组织细胞凋亡数显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠脑组织细胞凋亡数显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

3.6 各组新生大鼠脑组织中 caspase-3 mRNA 的表达比较 见表 5。与正常组比较,模型组大鼠 caspase-3 mRNA 的表

达显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,茵陈蒿汤低、中、高各剂量组大鼠 caspase-3 mRNA 的表达显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 4 各组大鼠脑组织细胞凋亡率比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	脑组织细胞凋亡率
正常组	0.14± 0.09
模型组	16.96± 3.34 <sup>①</sup>
茵陈蒿汤低剂量组	12.24± 2.92 <sup>①②</sup>
茵陈蒿汤中剂量组	8.92± 2.78 <sup>①③</sup>
茵陈蒿汤高剂量组	3.80± 1.26 <sup>①③</sup>

与正常组比较,① $P < 0.01$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ,③ $P < 0.01$

表 5 各组新生大鼠脑组织中 caspase-3 mRNA 的表达比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	caspase-3 mRNA/ $\beta$ -actin
正常组	1.00± 0.038
模型组	1.92± 0.130 <sup>①</sup>
茵陈蒿汤低剂量组	1.56± 0.110 <sup>②</sup>
茵陈蒿汤中剂量组	1.43± 0.100 <sup>②</sup>
茵陈蒿汤高剂量组	0.81± 0.160 <sup>③</sup>

与正常组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ,③ $P < 0.01$

#### 4 讨论

高胆红素血症是新生儿一种生理或病理性疾病,是由于胆红素产生增加,排泄减少所导致<sup>[10]</sup>。高胆红素血症配合脂多糖可抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,加重炎症反应,从而引起免疫抑制与炎症反应,导致免疫功能紊乱<sup>[11]</sup>。本研究通过腹腔注射胆红素建立新生大鼠高胆红素血症模型,24 h 后模型组大鼠血清胆红素含量和脑组织胆红素含量显著高于正常组。

茵陈蒿汤出自医圣张仲景的《伤寒论》,是历代医家治疗黄疸的首选,由茵陈、大黄、栀子组成,不仅可以消退黄疸,而且具有抗肝损伤和肝纤维化的作用<sup>[12]</sup>。研究表明茵陈对胆汁郁结有一定的改善作用,可增强胆红素的排出量;大黄可促进胆囊收缩,十二指肠和胆管舒张,疏通淤积的胆汁,从而发挥利胆退黄的作用;环烯醚萜苷类是栀子的主要成分,具有保肝利胆的作用<sup>[12-13]</sup>。本研究显示,高胆红素血症新生大鼠在给予茵陈蒿汤 24 h 和 14 d 后,神经行为异常表现逐渐减轻;给予茵陈蒿汤 24 h 后,血清及脑组织中胆红素的浓度均有降低,但无统计学差异;给予茵陈蒿汤 14 d 后,血清及脑组织中胆红素的浓度均有显著降低,且给药 14 d 后与同组给药 24 h 后比较,血清及脑组织中胆红素的浓度均显著降低( $P < 0.05$ ),结果表明,茵陈蒿汤有利于高胆红素血症大鼠胆红素的代谢和排出,且随着给药时间的增加,疗效越来越显著。

新生儿高胆红素血症发生时可引起能量代谢障碍,降低脑

组织中  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP 酶的活性, 导致兴奋性氨基酸增多, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载, 影响线粒体与神经细胞膜的生物功能, 使细胞凋亡增加, 对胶质细胞和神经元都有毒性作用<sup>[4]</sup>。本研究显示, 高胆红素血症新生大鼠在给予茵陈蒿汤后, 脑组织神经细胞膜  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP 酶的活性均明显升高, 与模型组比较有统计学差异, 说明茵陈蒿汤可提高  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP 酶的活性, 对高胆红素血症引起的能量代谢异常具有改善作用, 并且随着给药时间的增加和给药剂量的增大, 作用越来越显著, 可能存在剂量依赖性, 这还有待于进一步研究。

神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)是参与糖酵解途径的烯醇化酶中的一种, 存在于神经内分泌组织和神经组织中<sup>[5]</sup>。NSE 在脑组织细胞的活性最高, 当神经元损伤或坏死时, NSE 从细胞内溢入血液和脑脊液<sup>[6]</sup>, NSE 可作为神经元损伤程度及预后估计的判断标准。本研究选用检测 NSE 以判断高胆红素血症对神经细胞的损伤程度以及茵陈蒿汤对神经细胞的损伤修复作用。结果表明, 随着茵陈蒿汤浓度的增加, NSE 含量明显降低, 茵陈蒿汤可显著降低 NSE 的活性, 说明茵陈蒿汤对高胆红素血症引起的神经细胞损伤具有修复作用。

caspase-3 是半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶的简称, 它是细胞凋亡的关键蛋白, 汇聚多条细胞凋亡通路, 激活调控多条细胞凋亡途径, 正常情况下以酶原形式存在于细胞内, 一般通过线粒体依赖途径和死亡受体介导途径被激活, caspase-3 一旦被活化, 细胞凋亡反应必然会发生, caspase-3 参与了高胆红素血症脑损伤的发生<sup>[7]</sup>。本研究表明, 高胆红素血症新生大鼠在给予茵陈蒿汤后, 脑组织细胞凋亡数明显降低, 脑组织 caspase-3 mRNA 表达显著降低, 茵陈蒿汤可能通过抑制 caspase-3 mRNA 表达, 从而抑制脑组织细胞凋亡。

综上所述, 茵陈蒿汤对新生大鼠高胆红素血症有明显的治疗作用, 可能通过改善新生大鼠的脑组织中  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP 酶活力, 升高血清神经元特异性烯醇化酶 NSE 的表达, 降低脑组织细胞凋亡数及凋亡基因 caspase-3 mRNA 的表达来发挥作用。

## [参考文献]

- [1] 郭志学, 马晓勇, 李鸿萱, 等. 新生儿高胆红素血症的研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(26): 23-24, 26.
- [2] Abdollahi FZ, Ahmadi T, Manchaiah V, et al. Auditory Brainstem Response Improvements in Hyperbilirubinemic Infants[J]. J Audiol Otol, 2016, 20(1): 13-16.
- [3] Zhou Y, Wang SN, Li H, et al. Association of UGT1A1 variants and hyperbilirubinemia in breast-fed full-term Chinese infants[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104251.
- [4] 赵冬莹, 张拥军. 新生儿高胆红素血症的治疗进展[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(9): 887-890.
- [5] 文化日, 张娟梅, 朱利君, 等. 加味茵陈蒿汤预防新生儿高胆红素血症 232 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(1): 39-40.
- [6] 李霞, 朱姬莲. 加味茵陈蒿汤治疗新生儿高胆红素血症 30 例[J]. 中医儿科杂志, 2013, 9(2): 42-43.
- [7] 李湘云, 师淑锋. 高胆红素血症新生大鼠脑组织 Tau 蛋白的变化与细胞凋亡的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(2): 122-124.
- [8] 王晓丽, 郭明星, 梁俊晖, 等. 新生大鼠高胆红素血症及脑病模型的建立与评价[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1523-1531.
- [9] 张广智, 胡长敏, 陈颖钰, 等. 细胞凋亡的主要检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(8): 89-92.
- [10] Bellini C, Risso FM. Phototherapy in transport for neonates with unconjugated hyperbilirubinaemia[J]. J Paediatr Child Health, 2016, 52(3): 356.
- [11] Sun XM, Kang P, Tao K. Causes of immune dysfunction in hyperbilirubinemia model rats[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(5): 382-385.
- [12] 张慧芹, 蔡华丹, 杨美娟, 等. 茵陈蒿汤水提物和乙醇提物对 D-氨基半乳糖诱导大鼠急性肝损伤保护作用的比较研究[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(2): 113-116.
- [13] 华圆, 冯健, 李范珠. 茵陈蒿汤利胆退黄物质基础的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7): 1520-1521.
- [14] 王君. 新生儿高胆红素血症相关影响因素分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2013.
- [15] Bartek J Jr, Thelin EP, Ghatan PH, et al. Neuron-Specific Enolase Is Correlated to Compromised Cerebral Metabolism in Patients Suffering from Acute Bacterial Meningitis; An Observational Cohort Study[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0152268.
- [16] 蒋海燕, 刘利军, 何海英, 等. 脑白质损伤早产儿血清 S100B 蛋白、神经元特异性烯醇化酶及肌酸激酶同工酶的变化[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(3): 221-224.
- [17] 安丽, 王晓琴, 王平, 等. 高胆红素血症新生大鼠脑组织激活素 A、caspase-3 表达的研究[J]. 中华神经医学杂志, 2008, 7(3): 262-266.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)