

## 上海交通大学医学院



学者介绍

Author introduction

**时海波** 博士

教授、主任医师、博士生导师

ORCID ID: 0000-0002-2920-0183

**SHI Hai-bo**

M.D, Ph.D

Professor, Chief Physician, Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0002-2920-0183

**时海波** (1971—), 上海交通大学附属第六人民医院耳鼻咽喉头颈外科常务副主任, 教研室主任。2006 年获日本九州大学博士学位。2010 年赴美国 House Ear Institute 进修耳科专业。现任中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会中青年委员会副主任委员、上海市医学会耳鼻咽喉头颈外科专科分会委员、中国中西医结合眩晕专病委员会副主任委员、上海市声学学会生理学组主任委员。

- 长期从事耳鼻咽喉头颈外科学的医学、教学及科研工作, 专攻耳科疾病, 尤其是耳聋、耳鸣、耳源性眩晕的临床诊治及研究, 掌握娴熟的耳显微外科手术技术。先后主持国家自然科学基金面上项目 3 项、上海市科委基础研究重点项目 2 项、教育部留学回国人员科研启动基金 1 项, 作为学术骨干参与“973”课题 2 项。发表 SCI 收录论文 30 余篇, 其中以第一作者或通信作者发表 27 篇, 主审及参编著作 5 部。入选 2013 年上海市卫生和计划生育委员会新百人计划、2015 年上海市教育委员会高峰高原学科建设计划。2013 年获上海市科技进步奖一等奖、上海医学科技奖二等奖。

**SHI Hai-bo** born in 1971, executive deputy director of Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, The Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, director of the teaching and research section. He got his Ph.D from Kyushu University of Japan in 2006 and acted as a visiting scholar to further his otologic studies in House Ear Institute of USA in 2010. Currently, he is the vice chairman of young and middle-aged committee of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery branch of Chinese Medical Association, the committee member of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery branch of Shanghai Medical Association, the vice chairman of special disease of vertigo committee of combination of Chinese Traditional and Western Medicine, the chairman of Physiology group of Shanghai Acoustic Association.

- Prof. SHI mainly engaged in medical care, teaching and scientific researches of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, specializing in ear disease, particular in the diagnosis and treatment of deafness, tinnitus and aural vertigo, with skilled in otology microsurgical techniques. He has undertaken 3 projects of National Natural Science Foundation of China, 2 basic research key projects of Shanghai Science and Technology Commission, 1 project of Scientific Research Foundation of Chinese Overseas Returnees of National Ministry of Education and 2 projects of National Program on Key Basic Research Project of China (973 Program). He has published more than 30 articles in SCI indexed journals, including 27 of these articles published as the first author or corresponding author, and edited 5 works. He was enrolled into “New 100-Talent Program of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning” in 2013 and “Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support” in 2015. He has won the first prize of “Shanghai Science and Technology Advancement Award” and the second prize of “Shanghai Medical Science and Technology Progress Award” in 2013.



## 论著·基础研究

胆红素导致 SD 大鼠脑干神经元突触小体  $\text{Ca}^{2+}$  过载

李丹萍, 赖 轲, 王际平, 时海波

上海交通大学附属第六人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200233

**[摘要]** **目的**·探讨胆红素暴露对 SD 大鼠脑干神经元突触小体游离钙离子浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 的影响。**方法**·采用出生后 7 ~ 14 d 的 SD 大鼠 40 只, 随机分成 3 组, 分别为对照组、胆红素组 (浓度分别为 0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 以及胆红素 + 甘氨酸熊脱氧胆酸 (GUDCA) 干预组。用蔗糖密度梯度离心法提纯脑干神经元突触小体; 采用光学显微镜及透射电子显微镜验证突触小体活性, 以 OG-BAPTA 作为钙离子荧光探针, 共聚焦激光扫描显微镜下观察不同条件下突触小体荧光强度的实时变化。**结果**·获得了具有活性的 SD 大鼠脑干神经元突触小体。在对照组中随着观察时间的推移, 突触小体荧光强度缓慢升高; 胆红素组表现更为强烈、与暴露时间及浓度相关的升高 (主体内、主体间效应检验,  $P < 0.05$ ); 单纯给予 GUDCA 并未改变实验体系中的荧光强度升高趋势 (与对照组比较,  $P = 0.656$ ), 但 GUDCA 干预降低了胆红素暴露所致荧光强度的升高程度, 尤其是较高浓度 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 胆红素, 差异具有统计学意义 ( $P = 0.000$ )。**结论**·胆红素能使突触小体发生钙超载, 并与暴露浓度、时间呈正相关; GUDCA 对胆红素所致的突触小体钙超载具有抑制作用, 可能通过该途径拮抗胆红素神经毒性。

**[关键词]** 胆红素; 突触小体; 游离钙离子; 甘氨酸熊脱氧胆酸; 免疫荧光探针

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.11.002 **[中图分类号]** R338.2 **[文献标志码]** A

## Bilirubin-induced calcium overload in synaptosomes isolated from brainstem neurons of rats

LI Dan-ping, LAI Ke, WANG Ji-ping, SHI Hai-bo

Department of Otorhinolaryngology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

**[Abstract]** **Objective** · To observe real-time changes of calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) exposure to bilirubin in synaptosomes isolated from brainstem nucleus of rats. **Methods** · Forty P7–14 SD rats were randomly assigned to three groups: control group, bilirubin group (with levels of 0.1, 1 and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) and bilirubin plus glyoursodeoxycholic acid (GUDCA) group. The synaptosomes were purified from brainstem nucleus by sucrose density gradient centrifugation. After loading OG-BAPTA in synaptosomes, two dimensional image of intracellular calcium and analysis of fluorescence intensity were achieved by Confocal laser scanning microscopy. **Results** · Synaptosomes with well biological activity were obtained from brainstem of the SD rats. In the control group, a progressive increase in fluorescent intensity of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was detected. In the bilirubin group, acuter increases in fluorescent intensity were observed in all levels of bilirubin, with a manner of both concentration and time-dependent ( $P < 0.05$ ). Fluorescent intensity of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was reduced in the present of GUDCA, which was not significant compared with the control group ( $P = 0.656$ ). However, GUDCA could abate the increase of fluorescent intensity of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by bilirubin exposure, of which showing significant decrease in 10  $\mu\text{mol/L}$  bilirubin exposure ( $P = 0.000$ ). **Conclusion** · Bilirubin could induce calcium overload in synaptosomes. GUDCA could abate bilirubin-induced calcium overload in synaptosomes, possibly explaining its protection effect of neurons from bilirubin neurotoxicity.

**[Key words]** bilirubin; synaptosome; intracellular calcium; glyoursodeoxycholic acid; fluorescent probe

黄疸即高胆红素血症, 是新生儿常见的临床表现, 发生率可高达 85%<sup>[1]</sup>。新生儿溶血、感染、酸中毒等多种因素都会加剧血浆未结合胆红素 (UCB) 浓度的增高, 或者增大血脑屏障通透性, 从而使较多的 UCB 沉积于中枢而产生神经毒性。胆红素选择性地损害中枢大脑皮层以外的特定区域, 包括基底神经节、齿状核、小脑蚓体、脑干<sup>[2]</sup>, 其中脑干听觉、前庭、动眼神经等核团更为敏感<sup>[3]</sup>,

导致患儿感音神经性聋、徐动性脑性麻痹、凝视麻痹, 甚至死亡。胆红素毒性机制至今不明, 使得临床缺乏对因治疗方法, 只能采用蓝光、换血等对症治疗。

既往研究表明, 胆红素作用于脑干听觉核团神经元可导致胞内游离钙离子浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 增高, 最终导致细胞凋亡或坏死。我们的研究发现, 胆红素暴露 2 min 即可增强 SD 大鼠脑干核团神经元突触小体 GABA/ 甘氨

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目 (81371092, 81570909); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20152233), 上海申康医院发展中心促进市级医院临床技能与临床创新能力三年行动计划 (16CR3041A) (National Natural Science Foundation of China, 81371092, 81570909; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20152233; Clinical Research Promotion Plan of Shanghai Shen Kang Hospital Development Center, 16CR3041A)。

**[作者简介]** 李丹萍 (1989—), 女, 住院医师, 硕士生; 电子信箱: danping\_710@163.com。

**[通信作者]** 时海波, 电子信箱: haibo99@hotmail.com。

酸等神经递质的释放概率<sup>[4]</sup>,其潜在机制可能与突触小体 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有关。Brito等<sup>[5]</sup>发现,将取材于沙鼠大脑皮层的突触小体暴露于胆红素4 h,可诱导一系列代谢异常。拮抗胆红素神经毒性的研究发现,甘氨酸熊脱氧胆酸(glycoursodeoxycholic acid, GUDCA)可以抑制胆红素诱导的谷氨酸释放,提示了其对于突触小体的潜在保护作用。GUDCA能完全阻止胆红素对细胞色素C氧化酶的抑制作用,并有效拮抗胆红素诱导下神经元的氧化应激,代谢改变甚至细胞凋亡<sup>[6]</sup>。在本研究中,我们通过提取SD大鼠幼崽脑干核团神经元的突触小体,观察胆红素在急性条件下对敏感区域突触小体钙离子稳态平衡的影响,并探讨GUDCA的潜在拮抗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物** 健康Sprague-Dawley大鼠(雌雄不拘),出生后7~14 d,总共40只,体质量为20~30 g。由上海交通大学附属第六人民医院动物中心提供,动物生产许可证号为SCXK(沪)2012-0002,使用许可证号为SYXK(沪)2011-0128。将动物饲养在12 h光照/黑暗、恒温恒湿的环境下。

**1.1.2 主要试剂和仪器** BCA(K3000-BCA,中国申能博彩生物科技有限公司);Oregon Green 488 BAPTA-1/AM(06807,美国Life);HBSS(14175-095,美国Gibco);蔗糖、胆红素、DMSO、乙酰丙嗪(Sigma);高速离心机(1-15PK,德国Sigma);电动匀浆器(14227-322,美国VWR);分光光度计(SmartSpec Plus,美国BIO-RAD);共聚焦激光扫描显微镜(LSM-710,德国Zeiss);透射电子显微镜(简称透射电镜,JEM-1230,日本JEOL)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 突触小体提取** 采用蔗糖密度梯度离心法,所有操作都尽量在冰上完成,保持温度4℃,离心机设置温度也为4℃,以保证突触小体活性。取材方法简述如下:SD大鼠麻醉后断头,在充氧的孵育液中快速切取脑干,称重,按1:10(1 g:10 mL)加入4℃预冷的0.32 mol/L蔗糖(pH值7.0);电动匀浆(800 r/min)30 s;1 000×g离心,10 min,4℃;取上清,沿管壁缓慢加在预冷的2 mL 1.2 mol/L蔗糖液表面;离心8 000×g,20 min,4℃;取出突触所在的中间梯度带,按1:3体积比用0.32 mol/L蔗糖液稀释;稀释液缓慢铺在预冷的2 mL 0.8 mol/L蔗糖液表面;16 000×g离心,20 min,4℃;弃上清,沉淀即为

突触体;用标准生理盐水缓冲液(Na-Pss;NaCl 145 mmol/L、KCl 2.6 mmol/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 mmol/L、CaCl<sub>2</sub> 0.02 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 1.2 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、HEPES 10 mmol/L,pH值7.4)悬浮突触体;BCA法测突触小体悬浮蛋白质浓度,调至120~200 mg/L,4℃保存备用。

**1.2.2 突触小体纯度检测** 取出突触小体悬液,8 000×g离心,10 min,4℃;弃上清,所得突触小体沉淀物在4℃条件下用2%多聚甲醛和2.5%戊二醛的0.1 mol/L PB(pH值7.4)固定2 h;用0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,每次10 min;后用1%锇酸固定1 h;用乙醇梯度脱水、渗透、包埋、聚合、醋酸铀染色、硝酸铅染色;透射电镜观察并摄片。

**1.2.3 荧光着色** 选用OG-BAPTA作为钙离子荧光探针,最大激发波长为494 nm,最大发射波长为523 nm。在悬浮突触体加入OG-BAPTA,使最终浓度为10 μmol/L。室温孵育40 min,然后用无钙离子的HBSS冲洗3遍(每次16 000×g离心,10 min)。从染色开始保持在避光环境中操作,防止荧光探针分解。

**1.2.4 游离钙离子浓度检测** 突触小体荧光着色后,培养皿(含20 μL悬浮液)固定于激光共聚焦显微镜载物台上,用油镜100倍、目镜10倍观察。胆红素组分别加入0.2、2、20 μmol/L胆红素20 μL,使得终浓度为0.1、1、10 μmol/L。GUDCA干预组分别加0.4、4、40 μmol/L胆红素10 μL,后迅速加入200 μmol/L GUDCA 10 μL,使得最终胆红素浓度同前。所有试验均选定固定区域(X=500,Y=500,Z=500)进行荧光强度数据采集,每1 min扫一幅,每系列扫15幅。图像资料和OG-BAPTA荧光强度的量化均由Zeiss软件处理。统计分析时,均以第1分钟的荧光强度为基线值1,后续时间节点取其相对值。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS19.0进行统计学处理,比较整个观察过程中不同条件下荧光强度的改变,并比较第15分钟时各组内及组间荧光强度的差异,均采用重复测量的多因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

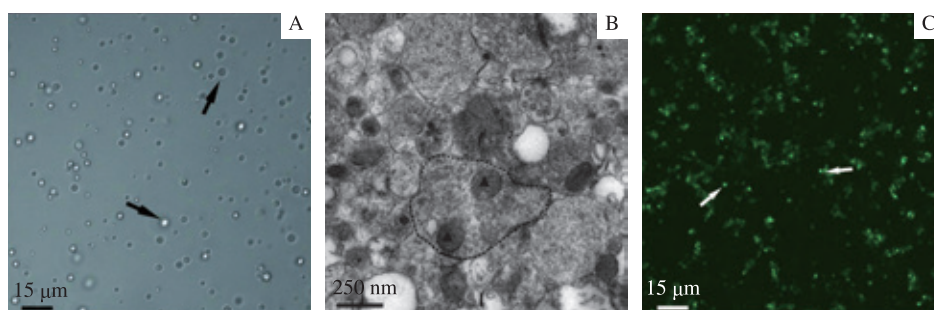
## 2 结果

### 2.1 突触小体鉴定及游离钙离子免疫荧光染色

激光共聚焦显微镜下可见SD大鼠脑干神经元突触小体,均匀散在分布于视野中,呈透亮球形,直径1~5 μm(图1A)。透射电镜下可见活性完好、大小不等

的突触小体, 内含线粒体和丰富的囊泡, 同时可见毁损的突触小体呈现空泡化, 不含有细胞质 (图 1B)。激光共聚

焦显微镜下 OG-BAPTA 染色的突触小体, 呈现散在分布的绿色荧光 (图 1C)。



注: A. 共聚焦显微镜下突触小体表现 ( $\times 1000$ ); 黑色箭头所指为突触小体。B. 透射电镜下突触小体表现 ( $\times 6000$ ); 虚线框示突触小体, 内含线粒体 (黑色三角形所示) 和突触小泡。C. OG-BAPTA 染色后突触小体共聚焦显微镜下表现 ( $\times 1000$ ); 白色箭头所示为突触小体。

图 1 突触小体形态学表现

Fig 1 Morphological appearance of synaptosome

## 2.2 不同实验条件下突触小体 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化

每组均完成 5 次观察, 取其均值进行分析比较。在对照组, 无胆红素及 GUDCA 的作用下, 随着时间的延长, 突触小体的荧光强度缓慢升高; 提示在本实验条件下, 突触小体存在自发的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高, 但在各个样本中此种增高趋势表现平稳 (图 2)。这可能与实验操作中的机械损伤、检测激光的损害有关。

在胆红素组, 通过重复测量的多因素方差分析的主体内效应检验发现, 时间和浓度的改变对荧光强度均有显著影响。相同浓度胆红素的作用下, 随着时间推移, 突触小体内荧光强度呈不同程度的升高 (图 2); 相同时间点上, 胆红素浓度越高, 所测得荧光强度的升高趋势越明显 (图 3)。在第 15 分钟, 0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$  胆红素暴露与对照组比较, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  胆红素的荧光强度变化无统计学意义 ( $P=0.391$ ), 1、10  $\mu\text{mol/L}$  胆红素的荧光强度则显著升高 ( $P=0.020$ ,  $P=0.000$ ) (图 3)。由此可见, 胆红素可以诱发突触小体  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高, 且此种作用存在时间及浓度相关性。

在整个 30 min 的观察时间内, 单纯 GUDCA 干预、没有胆红素暴露时突触小体荧光强度依然呈现缓慢升高的趋势, 且与对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P=0.656$ ) (图 2)。GUDCA 联合 0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$  胆红素暴露时, 荧光强度依然表现为浓度相关性的升高, 但其程度均明显低于单纯胆红素暴露。以第 15 分钟所测荧光强度进行比较, GUDCA+ 不同浓度胆红素 (0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组的荧光强度分别为  $2.59 \pm 0.09$ 、 $3.26 \pm 0.26$ 、 $3.8 \pm 0.36$ , 均显著低于单纯胆红素暴露组的  $3.41 \pm 0.46$ 、 $4.23 \pm 0.01$ 、 $5.47 \pm 0.08$  ( $P=0.048$ ,  $P=0.021$ ,  $P=0.000$ ) (图 3); 单纯 GUDCA 干预的荧光强度为  $2.95 \pm 0.29$ , 与联合 0.1、1、

10  $\mu\text{mol/L}$  胆红素暴露时荧光强度相比, 差异均无统计学意义 ( $P=1.000$ ,  $P=1.000$ ,  $P=0.242$ )。上述结果提示了 GUDCA 干预对胆红素所致突触小体荧光强度升高的拮抗作用。

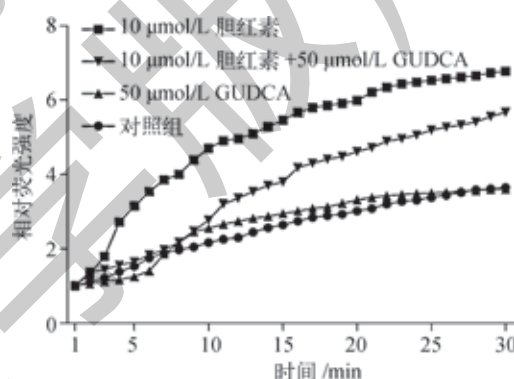
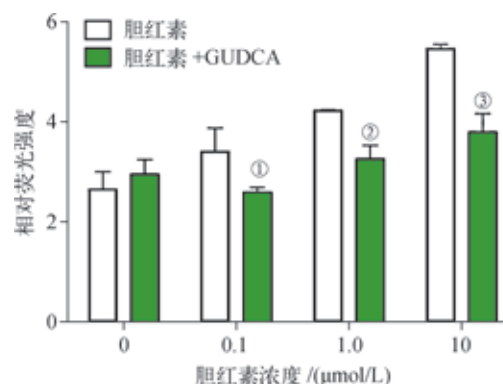


图 2 不同外液孵育 30 min 所测突触小体相对荧光强度 ( $n=5$ )

Fig 2 Relative fluorescence intensity of synaptosome incubated in different solution for 30 min ( $n=5$ )



注: <sup>①</sup>  $P=0.048$ , <sup>②</sup>  $P=0.021$ , <sup>③</sup>  $P=0.000$ , 与胆红素组比较。

图 3 胆红素和 GUDCA 孵育第 15 分钟突触小体的相对荧光强度 ( $n=5$ )

Fig 3 Relative fluorescence intensity of synaptosome incubated in bilirubin and GUDCA for 15 min ( $n=5$ )

### 3 讨论

多种因素可以导致新生儿血浆胆红素浓度显著增加, 诱发不同程度的神经功能障碍。虽然血清未结合胆红素浓度与中枢神经系统损伤更为相关, 但由于技术限制, 目前临床上仍以血清总胆红素浓度作为主要检测指标, 使得临床损害表现得更为隐匿。本实验采用的是未结合胆红素, 且浓度范围接近临床上高胆红素血症的血清浓度, 适用于研究胆红素神经毒性的机制。本研究揭示, 胆红素急性暴露即可破坏钙稳态平衡, 诱发敏感区域神经元突触小体的钙超载, 可能是胆红素神经毒性的始发环节。

突触小体钙超载会造成一系列的代谢紊乱及神经信号转导异常, 最终导致细胞凋亡或坏死。钙超载主要通过外源性钙离子内流和内源性钙离子释放这 2 种途径。钙内流主要通过电压依赖型钙通道、谷氨酸受体等开放, 这些通道广泛分布于突触小体表面。另一方面, 内源性钙离子主要来自线粒体、内质网等贮钙细胞器, 这些细胞器也是突触小体的重要构成。我们前期研究<sup>[4]</sup>发现, 胆红素诱导神经元超兴奋性以及神经元钙超载, 但并未明确胆红素对突触小体钙离子稳态平衡的影响。既往研究还发现, 胆红素暴露数分钟后即可使增加突触小体的神经递质释放概率, 且此种作用并不依赖于胞外钙离子内流<sup>[7]</sup>。鉴于游离钙离子浓度升高是突触小体神经递质释放的主要触发因素之一, 通过本研究证实, 在不含外源性钙离子的实验条件下, 胆红素可以诱导突触小体  $[Ca^{2+}]_i$  显著增高, 提示了胆红素对突触小体中线粒体、内质网等细胞器的破坏作用。该研究和既往研究结果, 为研究胆红素兴奋毒性机制提供了新的线索。

脑干听觉核团神经元对胆红素神经毒性高度敏感, 在高胆红素血症动物模型中, 高浓度胆红素暴露 30 min 即

可出现听觉脑干诱发电位异常<sup>[8]</sup>。但这种损害存在可逆性, 高胆红素血症患者可表现出急性听觉电生理改变, 如果得到及时治疗, 则可完全恢复<sup>[9]</sup>; 而血清总胆红素浓度越高, 持续时间越长, 其愈后就越差。本实验证实, 突触小体内  $[Ca^{2+}]_i$  随着胆红素暴露时间及浓度的增加而增加, 这也解释了临床所见胆红素神经毒性的特征<sup>[10]</sup>。已有研究<sup>[5]</sup>显示, 成年蒙古沙鼠大脑皮层神经元突触小体在低浓度的胆红素 ( $<1 \mu\text{mol/L}$ ) 中孵育 4 h, 就会出现突触小体  $[Ca^{2+}]_i$  的明显增加。由于该研究采用大脑皮层神经元, 此区域并非胆红素毒性的靶器官, 并且仅仅是一个时间节点上的观察, 不能充分反映胆红素神经毒性的特征, 故本研究选用了胆红素高度敏感区域——脑干来提纯突触小体, 并且每分钟监测一次, 连续监测 30 min, 揭示了胆红素神经毒性的时间、浓度相关性。

既往研究显示, 胆红素具有神经兴奋毒性作用, 表现为突触小体兴奋性神经递质释放的增多。同时, 胆红素还具有代谢毒性, 诱导神经元产生炎症反应、氧化损伤以及细胞凋亡和坏死, 且 GUDCA 具有良好的拮抗作用。本研究发现, 单纯 GUDCA 干预与对照组所测荧光强度无明显差异, 提示 GUDCA 单独作用于神经元突触小体时, 并不能拮抗提纯操作、激光照射等对突触小体的损害。然而, 在联合不同浓度胆红素暴露时, GUDCA 有效维持了突触小体的钙离子稳态平衡。此种保护作用发生于突触前, 避免了突触小体  $[Ca^{2+}]_i$  的升高, 从而有望减少兴奋性神经递质释放及兴奋毒性, 提示 GUDCA 不仅可以拮抗胆红素所致神经元代谢损害, 还可以通过突触前机制发挥保护作用。

综上所述, 胆红素能够增强突触小体内源性钙离子的释放, 这可能与胆红素兴奋毒性密切相关。GUDCA 能降低胆红素作用下突触小体内源性钙离子的释放, 但需进一步深入研究, 为预防、治疗胆红素脑病提供新思路。

### 参 考 文 献

- [1] Watchko JF, Tiribelli C. Bilirubin-induced neurologic damage-mechanisms and management approaches [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(21): 2021-2030.
- [2] Koziol LF, Budding DE, Chidekel D. Hyperbilirubinemia: subcortical mechanisms of cognitive and behavioral dysfunction[J]. *Pediatr Neurol*, 2013, 48(1): 3-13.
- [3] Gazzin S, Tiribelli C. Bilirubin-induced neurological damage[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2011, 24(1): 154-155.
- [4] Shi HB, Kakazu Y, Shibata S, et al. Bilirubin potentiates inhibitory synaptic transmission in lateral superior olive neurons of the rat[J]. *Neurosci Res*, 2006, 55(2): 161-170.
- [5] Brito MA, Brites D, Butterfield DA. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes[J]. *Brain Res*, 2004, 1026(1): 33-43.
- [6] Vaz AR, Delgado-Esteban M, Brito MA, et al. Bilirubin selectively inhibits cytochrome c oxidase activity and induces apoptosis in immature cortical neurons: assessment of the protective effects of glyoursodeoxycholic acid[J]. *J Neurochem*, 2010, 112(1): 56-65.
- [7] Li CY, Shi HB, Wang J, et al. Bilirubin facilitates depolarizing GABA/glycinergic synaptic transmission in the ventral cochlear nucleus of rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660(2-3): 310-317.
- [8] Rice AC, Chiou VL, Zuckoff SB, et al. Profile of minocycline neuroprotection in bilirubin-induced auditory system dysfunction[J]. *Brain Res*, 2011, 1368: 290-298.
- [9] Wilkinson AR, Jiang ZD. Brainstem auditory evoked response in neonatal neurology[J]. *Semin Fet Neonatol Med*, 2006, 11(6): 444-451.
- [10] Tenetti L, Ilipton SA. Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons[J]. *J Neurochem*, 2000, 74(1): 134-142.

[收稿日期] 2017-04-11

[本文编辑] 吴 洋

