



溶血致新生大鼠高胆红素血症动物模型的建立及评价

杨李, 王宝田, 田克印, 吴德, 唐久来

(安徽医科大学第一附属医院 儿科, 合肥 230022)

【摘要】 目的 探讨建立操作简便可行、成功率高、具有良好模拟性的新生大鼠高胆红素血症动物型, 为开展高胆红素血症致核黄疸及相关神经损伤机制研究提供实验基础模型。方法 随机选取7日龄SD大鼠, 分别采用25、50、75 mg/kg三个梯度腹腔内注射盐酸苯肼, 建立溶血致高胆红素血症动物模型, 同时设立对照组, 分别在实验处理48h后, 测定血、脑组织胆红素、同时进行脑组织NSE分析对模型进行评价。结果 三组实验组分别与对照组相比, 血、脑组织胆红素、脑组织NSE均大于对照组, 差异具有显著性($P < 0.05$), 而血红蛋白含量小于对照组, 差异具有显著性($P < 0.05$); 50 mg和75 mg剂量组血、脑组织胆红素、脑组织神经元特异性烯醇化酶(NSE)均大于25 mg剂量组, 而血红蛋白含量小于25 mg剂量组, 差异具有显著性($P < 0.05$); 50 mg和75 mg剂量组间相比各项指标差异无显著性($P > 0.05$)。结论 腹腔注射盐酸苯肼能够制作出符合临床特征的高胆红素血症动物模型, 50 mg/kg为最佳浓度, 是建立新生儿高胆红素血症动物模型的理想方法。

【关键词】 高胆红素血症; 大鼠模型; 盐酸苯肼; 溶血

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0371-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.008

Establishment and evaluation of a neonatal rat model of hyperbilirubinemia caused by hemolysis

YANG Li, WANG Bao-tian, TIAN Ke-ying, WU De, TANG Jiu-lai

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

【Abstract】 **Objective** To establish and evaluate a reliable and highly reproducible neonatal rat model of hyperbilirubinemia and to provide an experimental basis for research of kernicterus and related mechanism of neuroinjury. **Methods** Sixty 7-day old SD rats (28 male and 32 female) were used in this study. Three doses of phenylhydrazine hydrochloride (25, 50, and 75 mg/kg) were intraperitoneally injected respectively to the neonatal rats to establish models of hyperbilirubinemia induced by hemolysis. The control group was set up at the same time. 48 hours after the experimental treatment, the bilirubin in blood and brain tissue, neuron-specific enolase (NSE) of brain tissue, and hemoglobin were detected to evaluate the models. **Results** Compared with the control group, the bilirubin in the blood and brain tissue and the brain tissue NSE in the three experimental groups were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), while hemoglobin content was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The bilirubin of blood and brain tissue and brain tissue NSE in the 50 mg/kg and 75 mg/kg dose phenylhydrazine hydrochloride groups were significantly higher than that of the 25 mg/kg dose group ($P < 0.05$), while hemoglobin content was significantly lower than that of the 25 mg/kg dose group ($P < 0.05$). There were no significant differences between the 50 mg and 75 mg dose groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Intraperitoneal injection of phenylhydrazine hydrochloride can be used to produce neonatal rat models of hyperbilirubinemia, mimicking the clinical features of this disease, and 50 mg/kg of phenylhydrazine hydrochloride is

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:81270665)。

[作者简介] 杨李(1982-), 男, 在读博士, 专业: 小儿神经系统疾病基础与临床。E-mail: younglee168@126.com。

[通讯作者] 唐久来(1953-), 男, 教授, 博士生导师, 专业: 小儿神经系统疾病基础与临床。E-mail: tangjiulai8888@163.com。

the best concentration. It is an ideal method to establish newborn rat models of hyperbilirubinemia.

【Key words】 Neonatal hyperbilirubinemia; Rat model; Phenylhydrazine hydrochloride; Hemolysis

新生儿高胆红素血症是新生儿时期最为常见的疾病,胆红素具有神经毒性,轻度升高,即可导致患儿神经系统损伤,达到一定浓度时,可发生核黄疸,导致听觉障碍、脑性瘫痪,智力低下等严重后遗症^[1]。目前高胆红素动物模型常见的有静脉注射胆红素溶液、或利用基因缺陷动物模型 Gunn 鼠建立高胆红素血症模型,或利用磺胺类药物促使脑组织胆红素浓度升高^[2-3];然而,上述模型并非溶血导致黄疸,结合新生儿高胆红素血症发病机制,并没有良好的模拟作用,本研究通过腹腔梯度注射盐酸苯肼,建立溶血致高胆红素血症模型,并测定血、脑组织胆红素、NSE 等水平,对模型进行评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 7 日龄清洁级 SD 大鼠 60 只,体重 19 ~ 22 g,其中雄性 28 只,雌性 32 只,由安徽省实验动物中心【SCXK(皖) 2011-002】提供。

1.2 材料

盐酸苯肼 (phenylhydrazine hydrochloride) (阿拉丁公司,中国)。盐酸苯肼溶液配制^[4]:避光称取盐酸苯肼 0.5 g,溶于 50 mL 灭菌注射用生理盐水中,配制成 1% 的盐酸苯肼溶液;盐酸苯肼 0.75 g,溶于 50 mL 灭菌注射用生理盐水中,配制成 1.5% 的盐酸苯肼溶液;盐酸苯肼 0.25 g,溶于 50 mL 灭菌注射用生理盐水中,配制成 0.5% 的盐酸苯肼溶液。为保证在不同注射剂量下,注射总液体量相同,以上试剂均用 0.22 μm 过滤头过滤除菌。

1.3 动物模型的分组及建立

随机分为 4 组,每组 15 只,分别以 25、50、75 mg/kg 三种浓度腹腔注射盐酸苯肼,作为实验 1、2、3 组;对照组按体重注射等量灭菌注射生理盐水,均连续两天同一时间进行注射。按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.3 实验方法及评价

建模 48 h 后实验组和对照组动物均安乐死,取颈内静脉和颈总动脉约 0.5 ~ 0.75 mL 血; Roche

COBAS INTEGRA 800 全自动生化分析仪测定血清总胆红素和 NSE 水平, Abbott Cell-Dyn 3200 血细胞分析测定全血血红蛋白水平;同时机械剥离实验动物脑组织,称重后 10 倍体积冰醋酸制成均浆等体积,丙酮抽提,同样采用生化仪测定脑组织胆红素浓度。

1.4 统计学处理方法

计量数据 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间资料采用单因素方差分析 (SNK 法),采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型一般情况观察

实验组 2 和实验组 3,在建立模型后陆续出现皮肤灰暗、呼吸急促、活动减少、摄食次数减少和尿色变深的情况,其中实验组 2 中的 1 只动物、实验组 3 中的 2 只动物在实验过程中死亡,但至取材尚未出现自发性出血现象;实验 1 组出现活动、摄食减少,尿色轻度变深,皮肤灰暗现象较实验 2、3 组轻。腹腔注射生理盐水对照组尚未出现上述情况,且无死亡情况发生。

2.2 血和脑组织胆红素及血红蛋白水平测定

与空白对照组相比,腹腔注射盐酸苯肼的 3 个不同剂量的实验组血清总胆红素、脑组织的胆红素水平显著升高 ($P < 0.05$),实验组 2 和实验组 3 的胆红素水平均大于实验组 1 ($P < 0.05$),而实验组 2 和实验组 3 之间差异无显著性 ($P > 0.05$);3 个实验组的血红蛋白水平均低于对照组 ($P < 0.05$);实验组 2 和实验组 3 血红蛋白水平均小于实验组 1 ($P < 0.05$),实验组 2 和实验组 3 相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 血清神经特异性烯醇化酶

与空白对照组相比,腹腔注射盐酸苯肼的 3 个不同剂量的实验组血清神经特异性烯醇化酶 (NSE) 显著升高 ($P < 0.05$),实验组 2 和实验组 3 的 NSE 水平均大于实验组 1 ($P < 0.05$),而实验组 2 和实验组 3 之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 血和脑组织胆红素水平和血红蛋白测定 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Measurement of brain tissue and blood bilirubin, and hemoglobin concentrations

组别 Groups	血清胆红素* Serum bilirubin / $\mu\text{mol/L}$	脑组织胆红素 Δ Brain tissue bilirubin / nmol/g	血红蛋白 $\#$ Hemoglobin / g/L
Experimental group 1 实验组 1 ($n = 15$)	31.5 \pm 5.8	5.25 \pm 0.41	61.5 \pm 8.1
Experimental group 2 实验组 2 ($n = 14$)	61.1 \pm 5.7	14.8 \pm 0.49	40.5 \pm 3.2
Experimental group 3 实验组 3 ($n = 13$)	63.1 \pm 7.0	14.91 \pm 0.51	41.2 \pm 2.6
Control group 对照组 ($n = 15$)	2.8 \pm 0.56	0.10 \pm 0.04	137.8 \pm 11.6

注: * $\Delta\#$: 三组实验组和对照组相比差异具有显著性 ($P < 0.05$), 实验 1 组和实验 2、3 组相比差异具有显著性 ($P < 0.05$), 实验 2、3 组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

Note. * $\Delta\#$: There was a significant difference between the three experimental groups and the control group ($P < 0.05$). There was a significant difference between experimental group 1 and experimental groups 2 and 3 ($P < 0.05$). There was no significant difference between experimental groups 1 and 2 ($P > 0.05$).

表 2 血清神经特异性烯醇化酶测定 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Measurement of serum NSE

组别 Groups	血清神经特异性烯醇化酶* /ng/mL Serum NSE
实验组 1 ($n = 15$) Experimental group 1	12.65 \pm 1.12
实验组 2 ($n = 14$) Experimental group 2	19.21 \pm 1.27
实验组 3 ($n = 13$) Experimental group 3	19.89 \pm 1.52
对照组 ($n = 15$) Control group 4	6.25 \pm 0.16

注*: 三组实验组和对照组相比差异具有显著性 ($P < 0.05$), 实验 1 组和实验 2、3 组相比差异具有显著性 ($P < 0.05$), 实验 2、3 组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。

Note. * $\Delta\#$: There was a significant difference between the three experimental groups and control group ($P < 0.05$). There was a significant difference between experimental group 1 and experimental groups 2 and 3 ($P < 0.05$). There was no significant difference between experimental groups 1 and 2 ($P > 0.05$).

3 讨论

动物模型应尽可能模拟出疾病的特点及病理生理机制。国内学者采用不同剂量胆红素联合脂多糖颈静脉注 7 日 SD 龄大鼠方式建立动物模型, 结果显示模型出现不同程度的皮肤黄染, 1 h 后皮肤黄染均出现减退, 提示胆红素在体内存留时间过短, 不能模拟高胆红素持续损害的过程^[5]。王晓丽等^[6]以 3 日龄 SD 新生大鼠为对象, 进行连续 6 次胆红素注射, 从而建立相对稳定的高胆红素血症模型, 但是静脉置管方法对新生鼠操作难度相对较大。现较多采用的是腹腔注射胆红素建模方法^[7], 具有操作简便, 建模成功率高特点, 但存在胆红素腹腔吸收入血浓度不稳定, 血清胆红素浓度偏低问题, 同静脉注射方法存在共同的缺点是均不能良好的模拟新生儿

高胆红素血症是红细胞破坏增加的致病原因。Gunn 大鼠多被用于开展对遗传性葡萄糖醛酸转移酶缺陷的模型研究, 其血液中胆红素的浓度达不到核黄疸的程度, 因此, 有研究应用磺胺类药物通过置换结合胆红素方法, 加强了胆红素对脑的损害作用^[8], 或采用腹腔注射盐酸苯胍的方法, 诱发溶血来增加胆红素水平浓度^[9], 但是此类研究动物模型成本较高, 且基因缺陷是否造成免疫系统缺陷尚不明确。有报道采用新生大鼠小脑延髓池注射胆红素溶液的方法制作胆红素脑病的动物模型, 该方法虽受血脑屏障功能状态的影响较小, 可更直接地研究胆红素的神经毒性。但是对新生大鼠小脑延髓池注射本身即对中枢神经系统是一种外伤性损害, 操作难度较大, 易诱发出血损伤, 动物建模成功率较低^[10]。

目前采用盐酸苯胍或乙酰苯胍建立的溶血动物模型多是采用成年大鼠或其他成年动物, 腹腔注射浓度报道也多不一致, 从 40 mg/kg 到 75 mg/kg 均有报道^[3,11], 对 7 日龄溶血致高胆红素血症的研究国内外较少。本研究采用 25、50、75 mg/kg 三种梯度的盐酸苯胍腹腔注射 7 日龄大鼠, 结果发现: 三实验组均出现溶血, 与对照组相比较血、脑组织胆红素水平和 NSE 均大于对照组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 而血红蛋白含量均小于对照组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$); 其中, 50 mg 和 75 mg 剂量组的脑、血胆红素水平均大于 25 mg 剂量组 ($P < 0.05$), 50 mg/kg 和 75 mg/kg 剂量腹腔注射组相比各项指标差异无显著性 ($P > 0.05$), 提示 50 mg/kg 浓度已达溶血高峰, 随着盐酸苯胍的浓度增高并未出现溶血增加; 腹腔注射盐酸苯胍诱发溶血, 其机制是进入腹

腔后吸收入血,能迅速与 Hb 形成 MHb 并生成海因兹(Heinz)小体,海因兹小体沉积在细胞膜上,使其流动性下降,渗透性增加,其并可裂解部分细胞膜功能,导致溶血发生,而盐酸苯胍本身并无明显神经毒性,故能较好的模拟新生儿溶血致高胆红素血症病理生理过程,尤其研究对中枢神经系统的损伤研究^[12]。

模型鉴定中检测的血清标志物神经特异性烯醇化酶(NSE)和神经细胞的分化和成熟有关,其特异性地存在于神经元和神经内分泌细胞中,脑组织缺氧缺血时神经元细胞可发生变性坏死,同时其血脑屏障通透性增加,NSE 可释放到血和脑脊液中,因此 NSE 可判断神经元损伤的程度和对预后的估计,且具有较高的特异性,可作为模型鉴定的指标之一^[13]。本研究中 50 mg/kg 和 75 mg/kg 剂量组的脑组织 NSE 水平均大于对照组及 25mg 剂量组($P < 0.05$),50mg 和 75mg 剂量腹腔注射组相比 NSE 指标差异无显著性($P > 0.05$),随着盐酸苯胍的浓度增高并未出现脑组织 NSE 增加,提示 NSE 与溶血性黄疸致神经系统损伤程度呈正相关,与盐酸苯胍水平无明显相关性。

综上所述,本实验选取 7 日龄大鼠腹腔内注射盐酸苯胍的方法能够制作出模拟临床病理生理过程的高胆红素血症动物模型,其中 50 mg/kg 盐酸苯胍是较为合适的建模浓度,从而建立理想的高胆红素血症动物模型,为开展高胆红素血症致核黄疸及相关神经损伤机制研究提供实验平台。

参 考 文 献

- [1] 吴青林. 新生儿高胆红素血症神经毒性作用的监测 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(15): 56-58.
- [2] Thyagarajan B, Deshpande SS. Cotrimoxazole and neonatal kernicterus: a review [J]. Drug Chem Toxicol. 2014, 37(2): 121-129.
- [3] Wennberg RP. Animal models of bilirubin encephalopathy [J]. Adv Vet Sci Comp Med. 1993, 37: 87-111.
- [4] Salama A. Drug-induced immune hemolytic anemia [J]. Expert Opin Drug Saf. 2009, 8(1): 73-79.
- [5] 邵天伟. 静脉注入胆红素对新生大鼠脾磷酸化 TAK1 和磷酸化 IKK 蛋白表达的影响 [D]. 泸州医学院, 2012.
- [6] 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 [J]. 2014, 30(8): 1523-1531.
- [7] 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: 166-169.
- [8] Daood MJ, McDonagh AF, Watchko JF. Calculated free bilirubin levels and neurotoxicity [J]. J Perinatol, 2009, 29(Suppl 1): S14-S19.
- [9] Rice AC, Shapiro SM. A new animal model of hemolytic hyperbilirubinemia-induced bilirubin encephalopathy (kernicterus) [J]. Pediatr Res. 2008, 64(3): 265-269.
- [10] 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.
- [11] Geiger AS, Rice AC, Shapiro SM. Minocycline blocks acute bilirubin-induced neurological dysfunction in jaundiced Gunn rats [J]. Neonatology. 2007, 92(4): 219-226.
- [12] Jollow DJ, McMillan DC. Oxidative stress, glucose-6-phosphate dehydrogenase and the red cell [J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 500: 595-605.
- [13] Papa L, Ramia MM, Kelly JM, et al. Systematic review of clinical research on biomarkers for pediatric traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2013, 30(5): 324-338.

[收稿日期] 2015-02-28