



新生儿高胆红素血症动物模型研究进展

杨 李, 吴 德, 唐久来

(安徽医科大学第一附属医院小儿神经康复中心, 合肥 230032)

【摘要】 目前多种方法可建立新生儿高胆红素血症动物模型,如通过腹腔或静脉注射胆红素方法、利用基因缺陷动物模型、利用注射化学药物特殊的作用,以及延髓直接注射胆红素的方法等,为更好的利用动物模型进行高胆红素血症及所导致的核黄疸、听觉障碍等的病因、发病机制及治疗的研究,本文对新生儿高胆红素血症各类动物模型构建方法、应用和优缺点进行综述,以期对新生儿高胆红素血症模型的研究提供参考。

【关键词】 新生儿高胆红素血症;模型;动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 09-0078-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.009.015

Research advances in animal models of neonatal hyperbilirubinemia

YANG Li, WU De, TANG Jiu-lai

(The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

【Abstract】 There are many ways to establish animal models of neonatal hyperbilirubinemia, such as intraperitoneal or intravenous injection, genetic defect animal models, the use of chemical drugs, and injection of bilirubin into cerebellomedullary cistern, and so on. In order to study the etiology, pathogenesis, and therapy of neonatal hyperbilirubinemia through animal models, we review the literature on rodent and primate models of neonatal hyperbilirubinemia, including establishment of models and their applications, in order to provide reference for the research of neonatal hyperbilirubinemia.

【Key words】 Neonatal hyperbilirubinemia; Models, animal

新生儿高胆红素血症是新生儿时期最为常见的疾病,新生儿由于其自身代谢特点,出生后红细胞破坏增加致胆红素生成增多、肝细胞摄取、转化代谢能力不足和新生儿自身肠肝循环,导致高胆红素血症^[1];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、智力低下,脑性瘫痪等严重后果^[2]。

动物模型应尽可能模拟出疾病的特点、病理生理机制,目前高胆红素血症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 大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,故本文对上述模型进行综述,分析其不同特点,对研究新生儿高胆红素血症提供指导依据。

1 腹腔或静脉注射胆红素模型

腹腔或静脉注射胆红素,是最常见的建模方法,国内学者采用不同剂量胆红素(15 mg/kg、30 mg/kg

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81270665),科技部项目(编号:2014BAI03B00)。

【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。

和 50 mg/kg) 颈静脉注 7 d 龄 SD 大鼠, 探讨黄疸新生儿免疫功能紊乱易发生感染的原因, 结果显示, 随着浓度变化出现不同程度的皮肤黄染, 但 1 h 后均出现皮肤黄染减退^[3]。Mesner 等^[4] 同样以 50 mg/kg 浓度静脉注射小鼠方式建模, 并进行脑组织病理学学分析, 结果显示: 脑干中可见胆红素结晶, 提示能成功地复制高胆红素血症模型, 该方法干扰因素小, 可以达到理想的胆红素水平峰值, 可应用于对多个系统的研究。Sima P 等^[5] 给小鼠颈静脉注入胆红素后发现, 胆红素可降低体液免疫反应且作用时间在初次抗体应答及产生阶段, 但静脉注射的方法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, 且对 7 d 龄大鼠行置管静脉注射的操作性较差。因此, 静脉注射方法虽然操作难度大, 但干扰因素小, 可通过血液循环分布各个器官, 适用于对多个系统的研究, 尤其是免疫系统的研究,

陈舜年等^[6] 采用不同剂量胆红素腹腔注射新生豚鼠, 在给药后 4 h 血清胆红素均达峰值, 并显示脑组织胆红素沉积与 ATP 含量下降; 200 $\mu\text{g/g}$ 组在给药后 8 h 后有明显神经行为变化, 并显示脑组织超微结构改变, 表明新生 7 d 龄豚鼠腹腔给予胆红素 (100 ~ 200) $\mu\text{g/g}$ 可经腹腔收进入血液, 并通过血脑屏障沉积于脑组织, 致胆红素脑病发生; 国内学者对 3d 龄新生 SD 大鼠腹腔注射胆红素, 以每天 2 次连续注射 3 d 的方式, 建立高胆红素血症模型, 结果显示 50 $\mu\text{g/g}$ 和 100 $\mu\text{g/g}$ 浓度, 亦可引起胆红素脑病的发生^[7]。Větvicka 等^[8] 给动物腹腔注入胆红素后, 收集腹腔灌洗液在电镜下观察发现, 渗出的细胞有大量巨噬细胞, 少量中性粒细胞、淋巴细胞, 因此如果进行免疫系统研究, 化学性腹膜炎是不可避免的干扰因素。腹腔注射方法相对静脉注射操作较为简单, 建模成功率高, 但与静脉注射方法存在同样的缺点是: 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。

2 Gunn 大鼠模型

Gunn 大鼠为编码葡萄糖醛酸转移酶的基因缺陷大鼠, 类似人类 Crigler-Najjar 综合征 I, 其建模原理是: 新生鼠体内游离的胆红素不能转化成结合型胆红素被排泄而出现黄疸, 因此, Gunn 大鼠多被用于开展对遗传性葡萄糖醛酸转移酶缺陷和非溶血性高胆红素血症的模型研究^[9,10], 但是 Gunn 大鼠

的高胆红胆红素的浓度往往达不到核黄疸的程度, 国外有学者建立 ugt1 位点外显子 4 基因突变 (ugt^{-/-}) 小鼠, 该类型小鼠胆红素浓度可达到正常鼠的 50 ~ 60 倍, 病理结果可见脑组织黄染^[11]。在对胆红素的神经系统损伤模型中, 常通过药物提高 Gunn 鼠血中胆红素浓度, 如竞争性抑制胆红素与白蛋白结合的磺胺类药物, 破坏红细胞膜的盐酸苯胍等从而建立胆红素脑病模型, Rice AC^[12] 采用 Gunn 大鼠腹腔梯度注射盐酸苯胍的方法, 诱发溶血来增加胆红素水平浓度, 并以脑干听觉诱发电位鉴定核黄疸模型, 提示模型的成功, 但这类药物除损伤红细胞外, 也可致白细胞减少, 损伤动物的免疫功能, 且该种动物模型研究成本较高, 基因缺陷是否造成免疫系统缺陷尚不明确。

3 皮下或腹腔注射盐酸苯胍致溶血模型

盐酸苯胍经腹腔吸收入血后, 能迅速与氧合血红蛋白反应, 生成高铁血红蛋白 (MHb)、氮和苯, 特异地对红细胞进行氧化损伤, 促进血红蛋白变性; 苯胍也可直接破坏红细胞膜蛋白和脂类, 使红细胞膜溶解破裂引起溶血^[13]。国内学者通过对 7d 龄 Wistar 大鼠皮下注射盐酸苯胍溶血造成高胆红素血症, 实验结果显示皮下注射盐酸新生大鼠血清总胆红素、直接胆红素、间接胆红素较对照组明显升高, 出现严重运动障碍, 但对耳蜗毛细胞、螺旋神经节无明显损伤^[14]。该种模型的其机制是利用盐酸苯胍可破坏动物体内的红细胞, 导致溶血, 造成胆红素大量堆积, 超过新生鼠肝脏的代谢能力, 未结合胆红素水平急剧升高, 与新生儿高胆红素血症发病病理生理机制相似, 能良好的模拟新生儿高胆红素血症, 但盐酸苯胍作为化学药物, 除损伤红细胞外, 也可以损伤免疫细胞, 影响免疫系统, 故该种方式不适用于胆红素对免疫系统的损伤研究^[15]。

4 延髓注射胆红素模型

为减少血脑屏障功能的影响, 可更直接地研究胆红素的神经毒性, 国内学者采用经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, 均出现不同程度的神经行为异常, 如呼吸不规则、进食少、反应差、甚至抽搐, 与临床胆红素脑病的表现类似。光镜下可见脑组织胆红素黄染, 海马神经细胞发生不同程度的凋亡和坏死^[16]。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。

5 实验动物模型选择

Vannucci 等^[17]研究表明,7 d 龄大鼠和新生儿的脑组织发育在组织学方面相似,血脑屏障不完善,与新生儿高胆红素血症容易致胆红素脑病的病变特点相吻合,故文献报道的实验研究多采用 7 d 龄 SD 或者 wistar 大鼠,亦有报道国内学者选取 3 d 龄和 9 d 龄大鼠^[7,18]。动物类型选择上除选用 SD 或者 wistar 大鼠外,豚鼠及新西兰仔兔也多有报道^[19,20]。目前新生儿高胆红素血症的研究多集中在胆红素所致神经毒性方面,如神经细胞能量代谢的改变,递质的摄取与释放,突触受体功能和兴奋性氨基酸调控等,动物模型建立多为腹腔或静脉直接注射胆红素方式,动物类型的选择上多根据研究的内容方向来确定。

综上所述,确立研究方向后,应根据所研究内容,选择与所研究系统疾病发病机制、代谢特点相似,干扰因素相对较小的新生儿高胆红素血症动物模型。

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] Bhutani VK, Wong RJ. Bilirubin neurotoxicity in preterm infants; risk and prevention [J]. *J Clin Neonatol*, 2013, 2(2): 61–69.
- [3] 梁小明,陈昌辉,邵天伟,等. 静脉注入胆红素对新生大鼠脾磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶蛋白表达和细胞凋亡的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(12): 931–935.
- [4] Mesner O, Miller MJ, Iben SC, et al. Hyperbilirubinemia diminishes respiratory drive in a rat pup model [J]. *Pediatr Res*, 2008, 64(3): 270–274.
- [5] Sîma P, Malá J, Miler I, et al. The suppressive effect of continuous infusion of bilirubin on the immune response in mice [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 1980, 25(6): 483–490.

- [6] 陈舜年,贡小明,李佩红,等. 胆红素脑病动物模型的制作与鉴定 [J]. *新生儿科杂志*, 1997, 12(4): 166–168.
- [7] 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.
- [8] Vrticka V, Rossman P, Bilej M, et al. In vivo interaction of bilirubin with the cells of the immune system in mice: an ultrastructural electronmicroscopic study [J]. *Cell Biol Int Rep*, 1989, 13(3): 301–308.
- [9] Schreuder AB, Vanikova J, Vitek L, et al. Optimizing exchange transfusion for severe unconjugated hyperbilirubinemia: studies in the Gunn rat [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e77179.
- [10] Shaia WT, Shapiro SM, Spencer RF. The jaundiced Gunn rat model of auditory neuropathy/dyssynchrony [J]. *Laryngoscope*, 2005, 115(12): 2167–73.
- [11] Nguyen N, Bonzo JA, Chen S, et al. Disruption of the *ugt1* locus in mice resembles human Crigler-Najjar type I disease [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(12): 7901–7911.
- [12] Rice AC, Shapiro SM. A new animal model of hemolytic hyperbilirubinemia-induced bilirubin encephalopathy (kernicterus) [J]. *Pediatr Res*, 2008, 64(3): 265–269.
- [13] 周光兴,高诚,徐平,等. 人类疾病动物模型复制方法学 [M]. 上海科学技术文献出版社. 2007: 233–234.
- [14] 陈培培,郭维维,杨仕明,等. 高胆红素血症动物模型的建立及对听觉系统损伤评估 [J]. *中华耳科学杂志*, 2012, 10(1): 101–104.
- [15] 黄波,李静,王小中,等. 溶血性贫血大鼠模型的建立及实验评价 [J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(5): 703–705.
- [16] 胡影,田巧红,华子瑜,等. 小脑延髓池注射胆红素溶液建立新生大鼠胆红素脑病模型的评价 [J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 35(2): 177–181, 244.
- [17] Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 55(2): 158–163.
- [18] 程小杰. 新生大鼠胆红素脑病神经递质变化的 HR1HMRS 和病理学研究 [D]. 温州医学院, 2013, 13–14.
- [19] 何平,李雪琴,王廷华,等. 新生豚鼠胆红素脑病时皮层及海马 BDNF 及其 mRNA 表达影响的实验研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2000, 21(1): 27–32.
- [20] 王丽梅,郝艳秋,石丽宏. 局部亚低温对胆红素脑病仔兔脑基底节中多巴胺及 5-羟色胺的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(1): 35–37.

[修回日期]2015-08-08