

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.05.011

论著·实验研究

## 新生猪溶血性黄疸模型的制备与验证

李永富<sup>1</sup> 马月兰<sup>1</sup> 聂玲<sup>1</sup> 陈爽<sup>1</sup> 金美芳<sup>2</sup> 王三南<sup>1</sup>

(1. 苏州市立医院本部新生儿科, 江苏 苏州 215002;  
2. 苏州大学附属儿童医院儿科研究所, 江苏 苏州 215123)

**[摘要]** **目的** 建立新生猪溶血性黄疸动物模型, 以进一步研究新生儿溶血性黄疸的病理生理。**方法** 7日龄纯种大约克白猪分成实验组和对照组, 每组各6只。并采用免疫新西兰大白兔的方法制备兔抗猪红细胞抗体, 分离兔抗猪红细胞血清。实验组静脉注射兔抗猪红细胞血清5 mL, 对照组注射5 mL生理盐水。两组均每6 h采血送检血常规及肝功能。**结果** 实验组注射兔抗猪红细胞血清18 h后血清胆红素水平高于对照组( $64 \pm 30 \mu\text{mol/L}$  vs  $20 \pm 4 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ ), 48 h达高峰( $275 \pm 31 \mu\text{mol/L}$ ), 96 h明显降低( $95 \pm 17 \mu\text{mol/L}$ ), 均高于对照组( $P < 0.05$ )。注射抗血清后18 h, 实验组红细胞降至 $(4.58 \pm 0.32) \times 10^{12}/\text{L}$ , 低于对照组 $[(5.09 \pm 0.44) \times 10^{12}/\text{L}]$  ( $P < 0.05$ ); 24 h实验组红细胞 $[(4.21 \pm 0.24) \times 10^{12}/\text{L}]$ 和HB( $87 \pm 3 \text{ g}$ )进一步降低, 低于对照组 $[(5.11 \pm 0.39) \times 10^{12}/\text{L}$ ,  $97 \pm 6 \text{ g}]$  ( $P < 0.05$ ); 二组间的红细胞、血红蛋白差异在36~48 h达高峰。**结论** 新生猪溶血性黄疸模型较好地模拟了人类溶血性黄疸的病理过程, 为更进一步研究新生儿溶血病提供了良好的生物物质基础。  
**[中国当代儿科杂志, 2016, 18(5): 431-434]**

**[关键词]** 新生儿溶血病; 高胆红素血症; 动物模型; 猪

### Establishment and validation of a neonatal pig model of hemolytic jaundice

LI Yong-Fu, MA Yue-Lan, NIE Ling, CHEN Shuan, JIN Mei-Fang, WANG San-Lan. Department of Neonatology, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, Jiangsu 215002, China (Wang S-L, Email: wangsn@126.com)

**Abstract: Objective** To establish a neonatal pig model of hemolytic jaundice. **Methods** Twelve seven-day-old purebred Yorkshire pigs were randomly divided into an experimental group and a control group ( $n=6$  each). Immunization of New Zealand white rabbits was used to prepare rabbit anti-porcine red blood cell antibodies, and rabbit anti-porcine red blood cell serum was separated. The neonatal pigs in the experimental group were given an intravenous injection of rabbit anti-porcine red blood cell serum (5 mL), and those in the control group were given an intravenous injection of normal saline (5 mL). Venous blood samples were collected every 6 hours for routine blood test and liver function evaluation. **Results** The experimental group had a significantly higher serum bilirubin level than the control group at 18 hours after the injection of rabbit anti-porcine red blood cell serum ( $64 \pm 30 \mu\text{mol/L}$  vs  $20 \pm 4 \mu\text{mol/L}$ ;  $P < 0.05$ ). In the experimental group, the serum bilirubin level reached the peak at 48 hours ( $275 \pm 31 \mu\text{mol/L}$ ), and decreased significantly at 96 hours after the injection ( $95 \pm 17 \mu\text{mol/L}$ ), but all significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). At 18 hours after the injection, the experimental group had a significantly lower red blood cell (RBC) count than the control group  $[(4.58 \pm 0.32) \times 10^{12}/\text{L}$  vs  $(5.09 \pm 0.44) \times 10^{12}/\text{L}$ ;  $P < 0.05$ ]; at 24 hours, the experimental group showed further reductions in RBC count and hemoglobin level and had significantly lower RBC count and hemoglobin level than the control group [RBC:  $(4.21 \pm 0.24) \times 10^{12}/\text{L}$  vs  $(5.11 \pm 0.39) \times 10^{12}/\text{L}$ ,  $P < 0.05$ ; hemoglobin:  $87 \pm 3 \text{ g}$  vs  $97 \pm 6 \text{ g}$ ,  $P < 0.05$ ]. The differences in RBC count and hemoglobin level between the two groups were largest at 36-48 hours. **Conclusions** The neonatal pig model of hemolytic jaundice simulates the pathological process of human hemolytic jaundice well and provides good biological and material bases for further investigation of neonatal hemolysis.

**[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(5): 431-434]**

**Key words:** Neonatal hemolysis; Hyperbilirubinemia; Animal model; Pigs

[收稿日期] 2016-01-06; [接受日期] 2016-03-28

[基金项目] 苏州市科技发展计划项目(社会发展-应用基础研究 SYSD2010139)。

[作者简介] 李永富, 男, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 王三南, 男, 主任医师。

新生儿高胆红素血症是新生儿最常见的疾病，发病率近年有上升趋势，大约60%的足月儿和80%的早产儿在生后一周可出现黄疸，母乳喂养的婴儿在生后一个月时仍然可能存在黄疸<sup>[1]</sup>。而造成高胆红素血症的原因中新生儿血型不合溶血病(hemolytic disease of the newborn, HDN)占28%~30%<sup>[2]</sup>。新生儿血型不合溶血病主要因母婴血型不合引起，包括ABO血型和Rh血型以及其他血型不合<sup>[3]</sup>。溶血可发生在胎儿期和新生儿早期，严重者可引起胎儿死亡，发生血型不合者出生后黄疸迅速加深<sup>[4]</sup>。因胆红素对神经系统具有毒性作用<sup>[5]</sup>，可引起不同程度的脑损伤，严重者可引起胆红素性脑病，造成死亡或伤残，给家庭和社会造成极大的痛苦和经济负担。

为更加深入地研究HDN的病理生理改变以及治疗策略，制作相关疾病模型模拟病理生理过程是一种有效的方法。但目前广泛应用于黄疸研究的大多是体外细胞模型<sup>[6]</sup>，动物模型多是采用注射四氯化碳、酒精、对乙酰氨基酚等造成肝细胞坏死形成黄疸<sup>[7-11]</sup>，或者结扎/堵塞胆总管制成梗阻性黄疸模型<sup>[12]</sup>，更有甚者直接采用胆红素静脉注射来进行研究<sup>[13]</sup>。大部分都是围绕肝细胞性或者梗阻性黄疸来进行，并且都是针对成年人的疾病模型。这些模型和方法均不能够体现HDN和新生儿黄疸的真正病理生理特点。

有鉴于此，我们通过制备和注射兔抗猪红细胞血清引发新生猪溶血、高胆红素血症。经检索Elsevier Science Direct、Ovid、中国知网、万方数据等数据库，证实这是国内外首次采用免疫学方法制备新生猪溶血性黄疸模型、模拟溶血性黄疸的病理生理过程，为进一步研究HDN提供良好的生物物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

7日龄纯种大约克白猪12只，雌雄不限，体重2600~3760g，由苏州市太仓国家级种猪场提供(YY-TCZZC-14)，随机分成实验组和对照组，每组6只。成年新西兰大白兔，体重2650g，由苏州大学动物中心提供，用于制备抗血清。

### 1.2 实验设备及试剂

台式低温高速离心机(Labofuge 400R, 德国 Heraeus 公司)，TGL-16B台式离心机(上海安亭科学仪器厂)，超低温冰箱(-60℃日本SANYO公司)，移液器(Eppendorf公司)。ACD全血保存液，由苏州市中心血站提供。

### 1.3 实验方法

新生猪红细胞抗原制备：通过股静脉采取15mL猪全血置于ACD全血保存液中，4℃冰箱保存。免疫前取适量抗凝血于离心管中，200转/min离心10min，弃去上清，加入约8倍的无菌生理盐水悬起红细胞，2000转/min离心10min，吸去上清液。连续洗涤3次后制成终浓度为2%~5%的红细胞悬液，检查无溶血现象后即可用于免疫。

兔抗猪红细胞血清的制备：通过兔耳缘静脉注射制备的猪红细胞悬液，第1天0.5mL，以后逐日递增0.5mL，第5天达2.5mL，共5次。第13天从兔的耳静脉或心脏采血，分离血清，作免疫溶血试验，滴定抗血清，效价达到1:16以上为合格。达到要求后在无菌条件下从心脏采集全部血液，4000转/min离心20min，分离血清。将抗血清小量分装，-60℃冻存。

新生猪溶血病模型的制备和验证：实验组新生猪静脉注射制备的兔抗猪红细胞血清5mL，观察皮肤颜色变化，并每6h采静脉血送检血常规及肝功能，以验证体内红细胞及胆红素的变化。对照组予以静脉注射5mL生理盐水，常规喂养，与实验组在相同时间点采血送检血常规及肝功能。

### 1.4 统计学分析

采用SAS 9.3统计软件进行分析处理。所有数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

实验组在注射兔抗猪红细胞血清约8h后出现肉眼可见黄疸、尿色变黄，18h起血清胆红素水平高于对照组( $64 \pm 30 \mu\text{mol/L}$  vs  $20 \pm 4 \mu\text{mol/L}$ )，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )；48h达到高峰( $275 \pm 31 \mu\text{mol/L}$ )，72h胆红素逐渐下降( $231 \pm 20 \mu\text{mol/L}$ )，96h明显降低( $95 \pm 17 \mu\text{mol/L}$ )，

均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。整个过程中对照组未出现肉眼黄疸。见表1。

表1 各组不同时间点胆红素水平 ( $n=6, \bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

组别	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h
对照组	2.5 ± 0.8	4.8 ± 1.6	17 ± 7	20 ± 4	21 ± 3	22 ± 4	22 ± 3	19 ± 3	13 ± 3
实验组	2.3 ± 1.1	5.6 ± 1.5	25 ± 11	64 ± 30	168 ± 20	218 ± 24	275 ± 31	231 ± 20	95 ± 17
<i>t</i> 值	-0.31	0.93	1.34	3.16	17.58	19.59	19.95	25.17	11.55
<i>P</i> 值	0.765	0.373	0.215	0.012	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注射抗血清后18 h实验组红细胞降至  $(4.6 \pm 0.3) \times 10^{12}/\text{L}$ ，低于对照组  $[(5.1 \pm 0.4) \times 10^{12}/\text{L}]$ ，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；但两组间血红蛋白差异无统计学意义 ( $93 \pm 3 \text{ g}$  vs  $99 \pm 6 \text{ g}$ )， $P > 0.05$ 。24 h 实验组 RBC  $[(4.21 \pm$

$0.24) \times 10^{12}/\text{L}]$  和 HB ( $87 \pm 3 \text{ g}$ ) 进一步降低，低于对照组  $[(5.1 \pm 0.4) \times 10^{12}/\text{L}, 97 \pm 6 \text{ g}]$ ， $P < 0.05$ ；二组间的红细胞、血红蛋白差异在36~48 h达高峰。见表2~3。

表2 各组不同时间点红细胞水平 ( $n=6, \bar{x} \pm s, \times 10^{12}/\text{L}$ )

组别	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h
对照组	5.25 ± 0.40	5.13 ± 0.37	5.12 ± 0.41	5.09 ± 0.44	5.11 ± 0.39	5.08 ± 0.37	5.09 ± 0.37	5.05 ± 0.43	4.98 ± 0.52
实验组	5.05 ± 0.53	5.03 ± 0.48	4.80 ± 0.39	4.58 ± 0.32	4.21 ± 0.24	4.16 ± 0.25	4.17 ± 0.25	4.18 ± 0.18	4.19 ± 0.41
<i>t</i> 值	-0.72	-0.43	-1.39	-2.29	-4.82	-5.10	-5.07	-4.55	-2.87
<i>P</i> 值	0.488	0.676	0.196	0.045	<0.001	<0.001	<0.001	0.0011	0.017

表3 各组不同时间点血红蛋白水平 ( $n=6, \bar{x} \pm s, \text{g/L}$ )

组别	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h
对照组	100 ± 6	101 ± 6	101 ± 7	99 ± 6	97 ± 6	97 ± 4	96 ± 4	96 ± 5	95 ± 5
实验组	102 ± 5	98 ± 3	96 ± 4	93 ± 3	87 ± 4	87 ± 4	86 ± 6	86 ± 5	87 ± 5
<i>t</i> 值	0.62	-0.86	-1.51	-1.75	-3.65	-4.21	-3.44	-3.37	-2.73
<i>P</i> 值	0.551	0.412	0.163	0.112	0.0045	0.0018	0.0063	0.0072	0.021

### 3 讨论

新生儿溶血病是由于母子血型不合所致。ABO-HDN 常发生在第一胎的新生儿，Rh-HDN 多发生在第二胎或第二胎以后的新生儿。孕妇与胎儿依靠胎盘之间绒毛膜的合体细胞层分隔，当分隔层有小的渗漏时，胎儿红细胞就会由胎盘直接进入并刺激母体，产生相应的血型抗体。该抗体再由胎盘进入到胎儿体中，从而引起胎儿或新生儿体内出现特异性抗原抗体反应，使红细胞致敏，在单核-吞噬细胞系统内破坏而溶血<sup>[14-15]</sup>。

在自然界中，猪、羊、牛等偶蹄类哺乳动物也会发生溶血病<sup>[16]</sup>。根据文献，7日龄猪处于新生期<sup>[17]</sup>，体重约2.5~4 kg，与人类足月新生儿接近；

且新生猪来源易得，品系稳定，故选用7日龄新生猪作为模型的制作载体。根据HDN的发病机制，我们采用免疫学方法，通过给成年新西兰大白兔注射提纯的猪红细胞刺激兔的免疫系统，产生兔抗猪红细胞抗体。分离出含大量兔抗猪红细胞抗体的血清，注射至新生猪体内，引发抗原抗体反应，造成新生猪溶血和黄疸。为尽量减少种属差异，我们在分离猪红细胞时严格进行洗涤，制备出抗血清后也尽可能分离纯化。根据前期预实验结果，发现5 mL兔抗猪红细胞血清即可引起明显的溶血反应，但又不至于因溶血过重死亡。

结果显示，注射抗血清后，新生猪8 h开始出现肉眼黄疸，48 h黄疸达高峰；由于猪的胆红素处理能力比较强大<sup>[18]</sup>，体内胆红素水平在72 h

即开始降低,至96h已降至高峰值的约1/3。故我们建议,应用本模型进行研究时以注射抗血清后48h作为窗口期为宜。随着溶血的发生,实验组新生猪的红细胞以及血红蛋白在18h就有降低,36~48h降低最为明显。本实验结果提示,新生猪静脉注射兔抗猪红细胞血清后发生了黄疸和贫血,与人类HDN的病理过程相似,符合新生儿溶血病的特点,是一个稳定可靠的HDN动物模型。

目前临床上对于新生儿溶血病的治疗主要采取光照疗法、静脉注射丙种球蛋白以及换血治疗等。光疗需通过胆红素的光异构作用才能将胆红素从胆汁和尿液排出,起效慢,对于重症黄疸疗效不佳,还可能出现青铜症、DNA损伤等副作用;免疫球蛋白只能结合血中游离抗体,对于已致敏的红细胞无效,且不能直接降低血清中胆红素水平;而换血治疗操作复杂,受血源供给限制,还可出现感染、心力衰竭、心跳骤停、坏死性小肠结肠炎及肠穿孔等并发症<sup>[19]</sup>。近来有报道采用血液灌流等手段治疗新生儿溶血病,但是也存在灌流后血小板减少、血清Ca<sup>2+</sup>降低等副作用<sup>[20]</sup>。因此,仍需探寻新生儿溶血病得更好的治疗方法,而本模型较好地模拟了溶血性黄疸的病理生理过程,为更进一步研究HDN及探索新的治疗手段提供了良好的生物物质基础。

#### [参 考 文 献]

[1] Rennie J, Burman-Roy S, Murpy S. Neonatal jaundice: summary of NICE guidance[J]. *BMJ*, 2010, 340: c2409.  
[2] 吴仕孝. 新生儿溶血病的研究进展[J]. *中国实用儿科杂志*, 1999, 14(2): 72-74.  
[3] Altuntas N, Yenicesu I, Himmetoglu O, et al. The risk assessment study for hemolytic disease of the fetus and newborn in a university hospital in Turkey[J]. *Transfus Apher Sci*, 2013, 48(3): 377-380.  
[4] Markham KB, Rossi KQ, Nagaraja HN, et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to multiple maternal antibodies[J].

*Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213(1): 68.e1.  
[5] 裴进升, 张华. 胆红素神经毒性机制及早期监测的研究进展[J]. *华夏医学*, 2011, 24(5): 619-622.  
[6] 陈敏, 陈昌辉, 刘会领, 等. 胆红素对新生儿脐血单核细胞NF-κB表达的影响[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 6(3): 635-638.  
[7] Sabreen S, Khan MR, Khan RA. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl<sub>4</sub>-induced damage in rat[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2011, 11: 48.  
[8] 朱强, 王科, 钱晓锋, 等. 改良小鼠酒精性肝损伤模型的建立[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2010, 4(9): 1532-1536.  
[9] van Swelm RPL, Laarakkers CM, van der Kuur EC, et al. Identification of novel translational urinary biomarkers for acetaminophen induced acute liver injury using proteomic profiling in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49524.  
[10] Luyendyk JP, Flanagan KC, Williams CD, et al. Tissue factor contributes to neutrophil CD11b expression in alpha-naphthylisothiocyanate-treated mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 250(3): 256-262.  
[11] 欧巧群, 钱新华, 黄笑群, 等. ANIT诱导大鼠亚急性肝内胆汁淤积的生化病理变化[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2015, 24(4): 463-465.  
[12] 张春兴, 王芳, 廖彩仙, 等. 梗阻型黄疸小鼠模型构建及相关指标观察[J]. *大连医科大学学报*, 2014, 36(1): 23-26.  
[13] 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.  
[14] 詹影影. ABO血型系统诊断新生儿溶血病的实验研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(6): 1421-1422.  
[15] 陈玫, 毕晓琳, 叶萍, 等. 孕妇血清中抗-A(B)IgG亚类与新生儿溶血病关系的研究[J]. *中国输血杂志*, 2005, 18(6): 484-486.  
[16] 包亚双, 吴树林, 张红艳, 等. 关于新生仔猪溶血症防治探讨[J]. *畜禽业*, 2013, 5: 84.  
[17] 金龙, 蒋智, 夏渝东, 等. 猪不同年龄段骨骼肌的甲基化组比较分析[C]. 四川省畜牧兽医学学会2014学术年会论文集. 成都: 四川省畜牧兽医学学会, 2014: 33-43.  
[18] 张世昌, 王英杰, 陈志, 等. 乳猪肝细胞的生物学特性观察[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(24): 2307-2310.  
[19] 朴梅花, 王庆红. 新生儿黄疸的治疗[M]// 邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 300-306.  
[20] 李波. 血液灌流治疗新生儿重症高胆红素血症19例疗效及安全性观察[J]. *实用医院临床杂志*, 2011, 8(5): 145-147.

(本文编辑: 俞燕)