

高胆红素血症动物模型构建的研究进展

杨汐静¹, 刘道龙², 王 洋³, 杨 阳¹

¹四川大学华西医院动物实验中心 四川成都

²黑龙江珍宝岛药业股份有限公司 黑龙江哈尔滨

³新希望六和股份有限公司 四川成都

【摘要】目前已经有很多种方法和动物种类可以构建高胆红素血症模型,如通过腹腔注射或者静脉注射胆红素、利用基因编辑技术构建基因缺陷动物模型、利用化学药物注射诱导、利用延髓直接注射胆红素的方法等。为了更深层探究高胆红素血症的发病机制以及改善和优化其治疗方法,本文收集并总结了高胆红素血症各类动物模型的构建方法以及优缺点,为高胆红素血症模型的建立提供了参考,对后续临床研究高胆红素血症机制及治疗具有重要意义。

【关键词】高胆红素血症; 动物实验; 疾病模型; 胆红素; 新生儿

【收稿日期】2023 年 11 月 20 日 **【出刊日期】**2024 年 1 月 12 日 **【DOI】**10.12208/j.jmbr.20240001

Research advances in animal models of hyperbilirubinemia

Xijing Yang¹, Dalong Liu², Yang Wang³, Yang Yang¹

¹The Experimental Animal Center of West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan

²Heilongjiang Zbd Pharmaceutical Co., Ltd, Ha'erbin, Heilongjiang

³New Hope Liuhe Co., Ltd, Chengdu, Sichuan

【Abstract】 There are many methods and animal species to establish animal models of hyperbilirubinemia, such as abdominal or intravenous injection of bilirubin, the use of gene defective animal models, the use of chemical injection induction, and the direct injection of bilirubin into the medulla oblongata and so on. In order to further explore the pathogenesis of hyperbilirubinemia and improve and optimize its treatment methods, This paper collected and summarized the construction methods, advantages and disadvantages of various animal models of hyperbilirubinemia, providing a reference for the establishment of hyperbilirubinemia models, which is of great significance for subsequent clinical research on the mechanism and treatment of hyperbilirubinemia.

【Keywords】 Hyperbilirubinemia; Animal experiment; disease model; bilirubin; Neonatal

胆红素是生物体内铁卟啉化合物的主要代谢产物之一, 机体内含有卟啉的化合物主要为血红蛋白、肌红蛋白、过氧化物酶、过氧化氢酶及细胞色素等^[1]。体内的胆红素大部分来自血液循环中红细胞代谢后的废弃物, 红细胞的生命周期为 120 天, 当红细胞衰老时经过脾脏消化处理, 血红蛋白氧化还原最终形成胆红素; 小部分来自骨髓中未分化成熟的红细胞血红蛋白; 还有极少部分来自肝脏中的游离胆红素和含有血红素的蛋白等旁路性胆红素^[2]。

机体内游离胆红素参与了血液循环, 并且附着于血液中白蛋白上, 形成胆红素与白蛋白相结合的复合物, 借由循环运输到肝脏。胆红素-白蛋白复合物被肝细胞微突摄取, 将白蛋白与胆红素分离, 胆红素进入肝细胞后, 被胞浆载体蛋白携带并转运至光面内质网的微粒体内^[3]; 胆红素在内质网微粒体内经由葡萄糖醛酸转移酶催化作用, 与葡萄糖醛酸基相结合形成结合胆红素, 随后结合胆红素从肝细胞中排出经由胆总管进入肠道, 进入肠腔后, 经肠道细

菌脱氢还原为尿胆原, 大部分随粪便排泄物排出体内^[4-5]。小部分经回肠下段或者结肠重吸收, 通过门静脉血回到肝脏, 转变为胆红素, 或未经转变再随胆汁排入肠内^[6]。

胆红素在临床医学上是判定黄疸十分重要的依据, 同时也是肝脏功能的一个重要指标。正常人每天机体产生的胆红素大概为 250~350mg, 血清中胆红素超过一定指标时, 可能会出现肝脏病变、胆管阻塞一系列症状, 血清中胆红素数值的高低代表异常严重程度, 当机体内胆红素超过正常数值时即被判定为高胆红素血症^[7-9]。

高胆红素血症多见于新生儿, 其可能是生理性诱发产生, 也可能是由特殊的原发疾病引起。新生儿高发高胆红素血症的病因比较多, 胆红素产生增加、胆红素的排泄减少或者是多种因素的叠加引起^[10]。除与新生儿期的代谢特点有关外, 围产因素如缺氧、酸中毒、头颅出血、血肿等亦加重黄疸, 成为高胆红素血症的重要发病因素^[10-11]。因新生儿血脑屏障发育不成熟, 极易发生高胆红素脑病, 造成神经系统的不可逆性损害, 甚至死亡^[12]。新生儿黄疸的出现是多种疾病的征象, 研究新生儿高胆红素血症的病因并及时发现与治疗可以减少婴儿高胆红素血症的发生, 保障婴儿的健康。

1 常见的高胆红素血症造模动物种类

目前, 成熟且稳定的高胆红素血症动物模型仍在不断研究中, 很多方法虽然能成功建模,

但是存活率不高, 有研究发现利用大剂量 D-氨基半乳糖胺 (D-Gal) 能造成急性肝衰竭, 虽然能够让胆红素急速上升, 但是动物存活时间短^[13]。常见的用于高胆红素血症造模的动物

有小香猪、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猕猴等动物^[14-19], 研究不同种类动物模型其共同目的都在于如何能建立一个模型稳定且存活周期长的动物模型, 为研究高胆红素血症的发病机制及治疗方法提供一个稳定的基础。

2 高胆红素血症动物模型建立及优缺点

2.1 大鼠高胆红素血症模型的构建

根据目前对高胆红素血症模型的研究发现, 大鼠是首选的动物模型。针对大鼠的高胆红素血症模型, 构建的方法主要为鼠基因敲除、腹腔注射胆红素或盐酸苯肼、静脉注射胆红素以及小脑延髓池注射

胆红素等方法。这里我们根据近几年国内外的研究成果对大鼠高胆红素血症模型构建进行了总结与整理。

有研究人员利用 CRISPR/Cas9 基因技术成功构建了 Slco1b2 基因敲除大鼠模型, 该模型呈现出高胆红素血症疾病特征, 可以作为研究高胆红素血症相关疾病的疾病模型, 同时还可以运用于大鼠的药代动力学研究^[20]; 也有研究对 7 日龄的 SD 大鼠腹腔注射不同浓度的胆红素来构建新生儿高胆红素血症动物模型, 在干预 24 h 后通过测定血清和脑中血清胆红素水平和 S-100 β , HE 染色观察神经细胞变化等指标来评价模型的可行性和稳定性, 发现腹腔注射 50 mg/kg 胆红素可成功建立大鼠高胆红素血症模型^[21]; 也有研究通过构建 Gunn 大鼠使其缺乏尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸基转移酶 1, 从而可以通过注射磺二甲氧基辛使其游离胆红素增加而导致急性高胆红素血症, 但是该方法的不足之处可能在于基因突变存在一些未知的风险并且费用昂贵^[22]。还有在 9 d 大的 SD 大鼠颈静脉直接注射胆红素溶液构建模型, 虽然短时间能达到很高的胆红素水平, 但是胆红素体内存留时间过短且对 7d 幼龄大鼠颈静脉注射操作需要很高的水平才能达到, 可见此模型具有一定改善和优化的空间^[23]。也有研究通过皮下注射或者腹腔注射盐酸苯肼来构建高胆红素血症模型^[24-25], 成功模拟了溶血造成的急性高胆红素血症, 但是因盐酸苯肼是有毒化学药物, 在损伤红细胞的同时, 还损伤了别的细胞及免疫系统; 还有研究通过新生大鼠小脑延髓池直接注射胆红素来构建疾病模型, 该方法可以避开血脑屏障从而直接研究胆红素的神经损伤作用, 但是延髓池注射本身就是一种外伤性的神经损伤, 操作较为复杂且容易诱发脑出血, 造模成功率较低^[26]。综合可以得出结论, 已经有很多研究设计了不同的方法构建大鼠的高胆红素血症模型, 但是在操作难度、稳定性、安全性及胆红素的浓度维持等方面仍然需要继续完善和改进。

大鼠作为高胆红素血症动物模型的首选动物, 在药代动力学和毒理学研究中具有许多优势, 其体积大, 易于处理, 血容量充足, 耐受性强。大鼠模型更能准确、全面地反映药物或化合物在体内的吸收、分布、代谢和排泄情况。

2.2 小鼠高胆红素血症模型的构建

有实验室构建了 *Ugt1* 基因突变的小鼠使其出生后不久即为高胆红素血症且出现严重的黄疸, 若不治疗会在两周内因胆红素神经毒性死亡, 此方法虽然能构建但为致死模型且因基因突变个体差异而不好控制同一变量^[27]; 也有研究通过对昆明小鼠腹腔注射胆红素 (150 mg/kg) 制备高胆红素血症模型, 24 h 后通过眼球取血检测模型组小鼠血清中 AST、ALT、TBA、TBIL 含量均显著升高来证明模型的成功建立, 但是此模型会造成小鼠肝损伤, 如果要专门研究肝的影响可能需要更换方法^[28];

同样, 在小鼠模型中也有研究通过对 7 日龄新生小鼠腹腔注射不同浓度的盐酸苯胂溶液来建立溶血性高胆红素血症小鼠模型, 通过小鼠脑组织细胞病理变化、氧化应激、神经元特异性损伤指标的改变和炎症反应来判断模型是否构建成功, 并且能够较好的模拟新生儿溶血致高胆红素血症病理生理过程, 但是在低剂量时 $\text{TNF-}\alpha$ 处于下调趋势与理论趋势相反, 其在剂量上的选择还需要进一步进行讨论和研究^[29]; 也有研究将胆红素直接注射到小鼠的小脑延髓池中建立高胆红素血症模型, 但小鼠体积更小, 操作比大鼠更为精细和复杂, 且注射延髓池也是一种神经损伤, 容易诱发脑出血^[30];

针对高胆红素血症的小鼠模型, 目前大多数研究都采用腹腔注射胆红素或者盐酸苯胂溶液来建立模型^[31-32], 因为腹腔注射属于最基础的小鼠给药方式, 且不会对小鼠造成额外的伤害, 但是关于剂量和药物浓度的选择, 因不同种类小鼠和不同年龄的小鼠安全剂量和模型成功建立的指标不一致, 需要进行梯度浓度的摸索后再进行下一步试验。

2.3 猪的高胆红素血症模型

猪虽然不是高胆红素血症的常用模型, 但是新生猪来源广泛容易获得, 且品系稳定, 七日龄的猪体重接近新生婴儿的体重, 为此也有一些研究应用猪作为新生儿黄疸及新生儿高胆红素血症的研究。有研究通过静脉注射自制的兔抗猪红细胞血清引发 7 日龄纯种大约克白猪的溶血性黄疸及高胆红素血症, 模拟了溶血性黄疸的病理生理过程, 在注射兔抗猪血清约 8 h 后新生仔猪出现肉眼可见的黄疸且尿色变黄, 48 h 血清胆红素水平达到峰值, 但猪对胆红素的处理能力较大, 在 72 h 后体内胆红素水平就开始降低, 故应用此模型时研究时间最好以注射 48 h

为窗口期^[33]; 有研究利用低剂量的 D-氨基半乳糖胺静脉注射到纯系巴马香猪体内并结合胆总管结扎手术建立稳定、成活率高的高胆红素血症动物模型, 为临床研究提供实用可靠的模拟高胆红素血症的动物模型^[34]。

2.4 豚鼠的高胆红素血症模型

豚鼠的高胆红素血症模型主要用于高胆红素血症对听觉神经和功能等方面的研究, 因为豚鼠的周围听觉系统中内耳的螺旋神经节较其他部位易受胆红素毒性损害^[35]。大多数研究都是通过对新生豚鼠腹腔注射胆红素的方式来构建胆红素血症模型, 通过观察其行为改变及耳蜗毛细胞和螺旋神经节等结构的形态学变化来判断其影响^[36]。

2.5 兔的高胆红素血症模型

兔的红细胞酶活性已被用人类常用模型中以及兔体型较大, 易于操作, 适合在数周内采血^[37]。高胆红素血症家兔模型可以作为研究清除血液中胆红素药物的稳定模型, 有研究表明通过口服苯胂溶液 (10 mg/kg) 和腹腔注射熊去氧胆酸溶液 (10 mg/kg⁻¹ 体重) 可以诱导新西兰白化兔高胆红素血症, 证明口服榆叶提取物可以有效减少血液中胆红素^[38]; 同时, 也有研究通过新生兔腹腔注射胆红素溶液研究新生儿高胆红素血症导致的脑损伤机制^[39-40]。

2.6 猕猴的高胆红素血症模型

新生猕猴存在与人类相似的生理性黄疸过程, 在血液组成及胆红素代谢方面与人类婴幼儿相似^[41], 同时猕猴的生理性黄疸期多在出生 2~3 天, 可用于胆红素脑病研究。可采用 3 日龄猕猴下肢静脉注射盐酸苯胂方法建立新生猕猴高胆红素血症模型。当实验组猕猴出现溶血、贫血及黄疸的表现, 同时与对照组相比血清胆红素明显升高 ($P<0.01$), 血红蛋白水平明显减低 ($P<0.01$), 则表明达到高胆红素血症诊断标准, 成功建立了猕猴的高胆红素血症模型^[42], 为开展高胆红素血症及核黄疸研究提供实验参考。

3 总结与展望

高胆红素血症在临床上是新生儿常见疾病之一, 发病率高, 未及时有效治疗可引起胆红素脑病、感音神经性耳聋、眼球运动障碍、牙釉质发育不好等严重并发症, 其中高胆红素血症造成的脑部损伤可能导致永久性的神经系统后遗症。人类疾病动物模型广泛的用于人类疾病发病机制研究、防治新技术

开发和治疗药物的探索与研究。利用疾病动物模型研究能有助于阐明人类疾病的发生机制, 建立预防、诊断和治疗的新方法, 也更好的规避了以人类作为实验研究对象的伦理局限性。建立人类疾病动物模型可以更好地帮助科学家理解人类疾病的发生机制以及疾病相关的信号通路、分子机制和相互作用的关系。本文综述了常见的几种高胆红素血症动物模型及其建立方法, 对于后续建立高胆红素血症动物模型, 研究临床高胆红素血症发病机制及其治疗有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Santosh Man Shrestha, Masayoshi Kage, Byung Boong Lee. Hepatic vena cava syndrome: New concept of pathogenesis Hepatol Res. 2017 Jun; 47(7): 603-615.
- [2] Irwin M. Ariens. Liver biology and pathobiology Hepatology (Sixth Edition). 2020 Feb; 43(2 Suppl 1): S235-8.
- [3] Wolkoff A W, Berk P D. Bilirubin Metabolism and Jaundice[M]. Wiley-Blackwell, 2015.
- [4] Kassahun Woldeteklehaymanot et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among neonates with jaundice in Africa; systematic review and meta-analysis[J]. Heliyon, 2023, 9(7): e18437-e18437.
- [5] Riskin Arie et al. The Genetics of Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase (G6PD) and Uridine Diphosphate Glucuronosyl Transferase 1A1 (UGT1A1) Promoter Gene Polymorphism in Relation to Quantitative Biochemical G6PD Activity Measurement and Neonatal Hyperbilirubinemia. [J]. Children (Basel, Switzerland), 2023, 10(7)
- [6] Binita M Kamath, Philip Stein, Roderick H J Houwen, Henkjan J Verkade Potential of ileal bile acid transporter inhibition as a therapeutic target in Alagille syndrome and progressive familial intrahepatic cholestasis Liver Int. 2020 Aug; 40(8): 1812-1822.
- [7] Ye H, Xing Y, Zhang L, et al. Bilirubin-induced neurotoxic and ototoxic effects in rat cochlear and vestibular organotypic cultures [J]. Neurotoxicology, 2019, 71(9): 75-86.
- [8] Kair LR, Phillipi CA. Simplifying Hyperbilirubinemia Risk Estimation[J]. Pediatrics, 2021, 147(5): 45-46.
- [9] Adin CA. Bilirubin as a Therapeutic Molecule: Challenges and Opportunities[J]. Antioxidants(Basel), 2021, 10(10): 3-4.
- [10] 邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小灿. 实用新生儿学. 第五版 [M]. 2019(4): 451.
- [11] 舒春兰, 邓爱果, 晏菲琴等. 足月新生儿高胆红素血症影响因素的流行病学调查 [J]. 江西医药, 2022, 57(10): 1681-1683.
- [12] 王卫平, 孙锟, 常立文. 儿科学第 9 版, 北京: 人民卫生出版[M]. 2020. 111.
- [13] Itova Tatyana D.; Georgieva Victoria A. Journal | [J] Journal of Biomedical and Clinical Research. Volume 15, Issue 2. 2022. PP 158-164
- [14] 苏瑞, 闫莉华, 代庆海等. 高胆红素血症动物模型的研究[J]. 中国城乡企业卫生, 2022, 37(06): 1-4.
- [15] Shihan Sun, Shuyuan Yu, Hong Yu, Gang Yao, et al. The pyroptosis mechanism of ototoxicity caused by unconjugated bilirubin in neonatal hyperbilirubinemia[J]. Biomed Pharmacother. 2023 Sep; 165: 115162.
- [16] Vodret Simone, Bortolussi Giulia, Iaconcig Alessandra et al. Attenuation of neuro-inflammation improves survival and neurodegeneration in a mouse model of severe neonatal hyperbilirubinemia. [J]. Brain Behav Immun, 2018, 70: 166-178.
- [17] 赵振鹿, 丛涛, 杨驹等. 新生豚鼠急性高胆红素血症模型的听性脑干反应特征[J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2017, 15(04): 285-290.
- [18] 王宝田. 新生猕猴溶血性高胆红素血症模型建立的实验研究[D]. 安徽医科大学, 2016.
- [19] Haq Nawaz, Iqra Naseem, Tanzila Rehman, et al. Optimization of zinc oxide nanoparticle-catalyzed in vitro bilirubin photolysis and in vivo treatment of hyperbilirubinemia. Nanomedicine (Lond). 2021 Jul; 16(16): 1377-1390.
- [20] Ma Xinrun, Shang Xuyang, Qin Xuan et al. Characterization of organic anion transporting polypeptide

- 1b2 knockout rats generated by CRISPR/Cas9: a novel model for drug transport and hyperbilirubinemia disease. [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 850-860.
- [21] 贾晓君. 高胆红素血症及胆红素脑病新生大鼠模型的建立及评价[D]. 山西医科大学, 2017.
- [22] Jaylyn Waddell, Min He, Ningfeng Tang et al. Christian Rizzuto, A Gunn rat model of preterm hyperbilirubinemia. [J]. *Pediatr Res*. 2020 Feb; 87(3): 480-484.
- [23] Influence of chronic hyperoxia on the developmental time course of the hypoxic ventilatory response relative to other traits in rats. [J]. *Respir Physiol Neurobiol*. 2020 Sep; 280: 103483.
- [24] Shoko Miura, Keiko Tsuchie, Michiyo Fukushima, Ryosuke, Arauchi, et al. Normalizing hyperactivity of the Gunn rat with bilirubin-induced neurological disorders via ketanserin. [J]. *Pediatr Res*. 2022 Feb; 91(3): 556-564.
- [25] Jia-Heng Hu, Ping Fan, Li-Rong Zhang, Chun-Yan Chen, et al. Neuroglobin expression and function in the temporal cortex of bilirubin encephalopathy rats. [J]. *Anat Rec (Hoboken)*. 2022 Feb; 305(2): 254-264.
- [26] 刘龙宾, 唐丽霞, 林新祝等. Nrf2 通路活化在胆红素脑病新生大鼠海马神经元损伤中的作用 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(6): 960-965
- [27] Vodret Simone, Bortolussi Giulia, Iaconcig Alessandra et al. Attenuation of neuro-inflammation improves survival and neurodegeneration in a mouse model of severe neonatal hyperbilirubinemia. [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 70: 166-178
- [28] 郭颖慧, 陈瑞, 曹天佑等. 丹参炭纳米类成分发现及其对高胆红素血症致小鼠肝损伤的保护作用[J]. *中医药导报*, 2023, 29(01): 6-11.
- [29] 李涛. 全基因组 DNA 甲基化修饰在高胆红素血症致小鼠大脑损伤中的作用初探[D]. 兰州大学, 2021.
- [30] Ercan Ilkcan, Cilaker Micili Serap, Soy Sila et al. Bilirubin induces microglial NLRP3 inflammasome activation in vitro and in vivo. [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2023, 125: 103850.
- [31] Liao Pingping, Wang Xiaoyu, Dong He et al. Hyperbilirubinemia Aggravates Renal Ischemia Reperfusion Injury by Exacerbating PINK1- PARKIN-mediated Mitophagy. [J]. *Shock*, 2023, undefined: undefined.
- [32] Simone Vodret, Giulia Bortolussi, Andrés F Muro et al. Attenuation of neuro-inflammation improves survival and neurodegeneration in a mouse model of severe neonatal hyperbilirubinemia. [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 4; 70: 166-178.
- [33] Yi Wang, Chenjie Zhou, Yu Fu et al. Establishment of acute liver failure model in Tibetan miniature pig and verified by dual plasma molecular adsorption system[J]. *Int J Artif Organs*. 2023 Mar; 46(3): 141-152.
- [34] 苏瑞, 闫莉华, 代庆海等. 高胆红素血症动物模型的研究[J]. *中国城乡企业卫生* 2022, 37(06): 1-4
- [35] 张奕, 吴小海, 林成光等. 茵陈水提物对新生豚鼠高胆红素血症耳蜗核抗炎保护作用[J]. *中国医学创新*, 2019, 16(09): 11-14.
- [36] 赵振鹿, 丛涛, 杨驹等. 新生豚鼠急性高胆红素血症模型的听性脑干反应特征. [J]. *中国听力语言康复科学杂志*, 2017, 15(04): 285-290.
- [37] Nawaz Haq, Shad Muhammad Aslam, Iqbal Mohammad Saeed, Optimization of phenylhydrazine induced hyperbilirubinemia in experimental rabbit. [J]. *Exp Anim*, 2016, 65: 363-372
- [38] Haq N, Tanzila R, Momna A, et al. Optimization of; *Phyllanthus emblica*; L. leaf extract-assisted clearance of hyperbilirubinemia in White New Zealand albino rabbits. [J]. *All Life*, 2022, 15(1).
- [39] Haq Nawaz, Iqra Naseem, Tanzila Rehman et al. Optimization of zinc oxide nanoparticle-catalyzed in vitro bilirubin photolysis and in vivo treatment of hyperbilirubinemia[J]. *Nanomedicine (Lond)*. 2021 Jul; 16(16): 1377-1390.
- [40] Pengpeng Yue, Biao Chen, Xiaoyan Lv et al. Biocompatible Composite Microspheres of Chitin/Ordered Mesoporous Carbon CMK3 for Bilirubin Adsorption and Cell Microcarrier Culture. [J]. *Macromol Biosci*. 2022 Apr; 22(4): e2100412.
- [41] 王宝田, 唐久来, 杨李, 等. 新生猕猴溶血性高胆红素

血症模型的建立. [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(15): 1192-1195.

- [42] Hitoshi Okada, Susumu Itoh, Kohichiroh Nii, Masashiro Sugino, et al. Bilirubin photoisomers in rhesus monkey serum. [J]. Photochem Photobiol B. 2018 Aug; 185: 50-54.