技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)05-0703-03

# 溶血性贫血大鼠模型的建立及实验评价

黄 波[1],李 静[2],王小中[1],张玲玲[1],章海斌[1]
(1.南昌大学第二附属医院检验科;2.南昌大学第一附属医院检验科 南昌 330006)

【摘 要】目的:探讨建立操作简便、建模周期短、成功率高的溶血性贫血(Hemolytic anemia,HA)动物模型,为开展 HA 的相关科学研究提供良好的实验材料。方法:随机取 10 只 SD 大鼠,采用腹腔内注射乙酰苯肼的方法制作模型,同时设立假处理组作为对照。实验处理 8 d 后以血液分析、网织红细胞计数、骨髓象检验等实验室检查对模型进行评价。结果:第 8 d 实验组大鼠外周血 RBC、HGB、PLT、Ret%分别为(2.98 ± 0.623) × $10^{12}$ 个/L、(100 ± 14.2) g/L、(320 ± 358.8) × $10^{9}$ 个 /L、90.7% ± 4.23%,另外间接胆红素浓度为(10.3 ± 3.30) μmol/L、血浆游离血红蛋白浓度为(1 248 ± 282.1) mg/L,与对照组比较差异均有统计学意义;骨髓象中有核细胞增生明显活跃,以红系增生为主。结论:腹腔内注射乙酰苯肼的方法能够在较短时间内方便地制作出符合临床特征的 HA 动物模型,是建立 HA 动物模型的理想方法。

【关键词】溶血性贫血;大鼠模型;实验室评价
【中国图书分类法分类号】R556.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-14

# Establishment of hemolytic anemia rat model and its laboratory evaluation

*HUANG Bo, et al*
(*Department of Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Nanchang University*)

【Abstract】*Objective*: Study on establishing HA animal model, which is operated simply and have short model building period and high successful rate, to provide favorable test materials for HA-related scientific research. *Methods*: 10 SD rats were randomly selected to set up the model by using APH intraperitoneal injection, meanwhile rats intraperitoneally infused with saline served as controls group. After 8 days of experimental treatment, we evaluated the animal model by using blood analysis, reticular count, myelogram and other laboratory experimental results. *Results*: On eighth day after experimental treat, the results of RBC、HGB、PLT、Ret% in Rats' peripheral blood are respectively (2.98 ± 0.623) × $10^{12}$/L、(100 ± 14.2) g/L、(320 ± 358.8) × $10^{9}$/L、90.7% ± 4.23%, the concentration of indirect bilirubin and free-haemoglobin in plasma are respectively (10.3 ± 3.30) μmol/L、(1 248 ± 282.1) mg/L. Compared to the control group, the difference of the results all have the statistical significance; bone marrow exhibited that karyocytes proliferate obviously, mainly the erythroid system. *Conclusion*: APH intraperitoneal injection can set up HA animal model shortly and conveniently, and the animal model has the clinical features. So the method of APH intraperitoneal injection is an ideal way to establish HA animal model

【Key words】Hemolytic anemia; Rat animal model; Laboratory evaluation

溶血性贫血(Hemolytic anemia,HA)是一种常见的贫血类型,是指由于某种原因使红细胞存活期缩短,破坏增加,超过了骨髓代偿能力所引起的一类贫血,是常见的造血系统疾病,目前尚无较好的治疗方法。我们采用了腹腔内注射乙酰苯肼的方法,成功制作了适合科学研究需要的溶血性贫血大鼠模型,并为今后进行药物氧化性 HA 的研究打下基础。现报道如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 试剂 注射用乙酰苯肼(acetylphenyl hydrazine):批号 20010323。

1.1.2 实验动物 5 周龄清洁级 Sragu-Dawley 大鼠 26 只,雌雄不限,体重 105 ~ 125 g,由南昌大学实验动物科学部提供。

1.1.3 实验仪器 BC-3000 Plus 全自动血液分析仪由深圳迈瑞公司生产;骨髓细胞图像分析系统由北京伟力新世纪科技发展有限公司生产。

作者介绍:黄 波(1983-),男,硕士,研究方向:血液学检验。
通讯作者:李 静,女,副主任技师,E-mail:wxzlijing@sina.com。
基金项目:江西省教育厅课题(编号:JXJG-07-1-62)。

1.2　HA 动物模型的制作

将在本实验室生长良好的 20 只 SD 大鼠随机分为实验组和对照组，常规饲养，自由摄食饮水。实验组大鼠（10 只）分别于实验的第 1、4、7 d 腹腔内注射 2%乙酰苯肼生理盐水溶液，第 1 d 剂量为 1 ml/100 g 体重，第 4、7 d 剂量减半为 0.5 ml/100 g 体重，对照组（10 只）大鼠分别注射等量生理盐水。实验第 8 d 检测实验室指标判断动物模型是否成功。

1.3　评价实验方法

1.3.1　一般生长状态观察　包括一般行为、毛发、出血点及死亡情况。

1.3.2　外周血常规参数测定　于实验第 8 d 采用断尾采血法采集大鼠血液，EDTA-K2 抗凝，以 BC-3000 Plus 全自动血液分析仪检测其外周血红细胞计数（RBC）、白细胞计数（WBC）、血小板计数（PLT）、血红蛋白（HGB）等参数。血清间接胆红素（Indirect bilirubin，IBIL）、血浆游离血红蛋白（Free Hemoglobin，FHB）测定均按文献[1]进行。

1.3.3　网织红细胞计数（Ret）实验第 8 d，在洁净干燥的试管中加入 10 g/L 煌焦油蓝染色液 2 滴，快速加入等量新鲜采集未抗凝全血，立即混匀后室温放置 10 ~ 15 min，取 1 滴制成薄片，再行瑞氏染色后，油镜下进行网织红细胞计数，并保存图像。

1.3.4　骨髓象检查　在实验第 8 d 采血完成后，断颈处死大鼠，钝性分离出股骨，用生理盐水将血液冲洗干净，并以细针小心吸取骨髓，制作骨髓涂片，瑞氏染色后油镜下观察并保存图像。

1.4　统计学处理

所有数据采用 SPSS 16.0 软件，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据比较采用 $t$ 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结　果

2.1　一般生长状况

从第 3 d 开始，实验组大鼠陆续出现活动减少、毛发暗淡无光泽、摄食减少、体重下降和尿色变深等情况，但直至第 8 d 均未见出血点及死亡现象。

2.2　血液学常规指标测定

检测后发现，对照组大鼠的血液学常规参数在实验期间基本保持稳定（$P>0.05$）；第 8 d 时实验组大鼠外周血白细胞稍有升高，但无统计学意义；红细胞下降至（2.98 ± 0.623）× $10^{12}$ 个/L、血红蛋白下降至（100 ± 14.2）g/L，与对照组比较差异有显著统计学意义（$P<0.001$）。血小板下降至（320 ± 358.8）× $10^9$ 个/L，间接胆红素浓度升高至（10.3 ± 3.30）μ mol/L，血浆游离血红蛋白浓度升高为（1 248 ± 282.1）mg/L，与对照组比较差异有统计学意义，见表 1。

表 2 显示，大鼠平均红细胞体积（MCV）、平均红细胞血红蛋白含量（MCH）与对照组相比差异有显著统计学意义（$P<0.001$），平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）与对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）

2.3　网织红细胞计数

经煌焦油蓝活体染色可见，实验组大鼠外周血网织红细胞明显增多，而且红细胞内网织颗粒明显增多。同时可见红细胞体积明显大于对照组，进一步确认了血液分析仪的 MCV 检测结果（图 1）。油镜下计数，对照组网织红细胞百分比（Ret%）为 8.2% ± 2.45%，实验组网织红细胞百分比（Ret%）

**表 1　大鼠血液学指标比较（$n$=7，$\bar{x} \pm s$）**

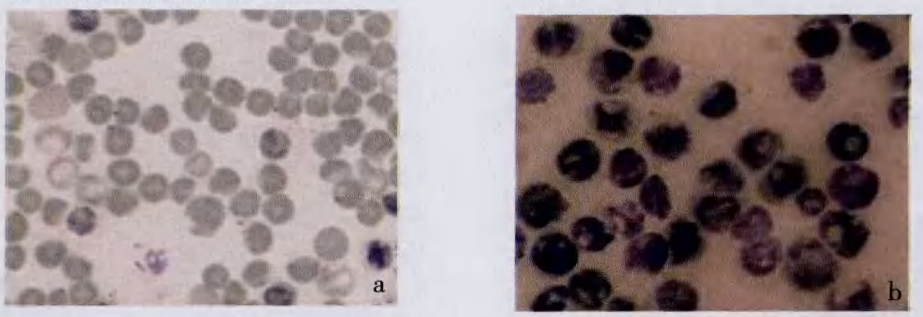
| 组别 | $n$ | WBC（$10^9$ 个/L） | RBC（$10^{12}$ 个/L） | HGB（g/L） | PLT（$10^9$ 个/L） | IBIL（μ mol/L） | FHB（mg/L） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 7 | 9.5 ± 2.23 | 5.85 ± 0.775 | 120 ± 13.7 | 722 ± 377.6 | 4.2 ± 1.25 | 255 ± 167.4 |
| 实验组 | 7 | 10.3 ± 4.43 | 2.98 ± 0.623* | 100 ± 14.2* | 320 ± 358.8# | 10.3 ± 3.30# | 1 248 ± 282.1# |

注：* 与对照组相比 $P<0.001$；# 与对照组相比 $P<0.05$

**表 2　红细胞平均值参数的统计（$\bar{x} \pm s$）**

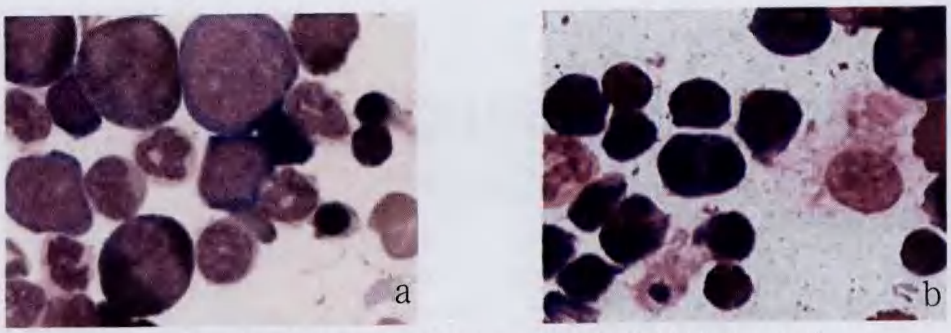
| 组别 | $n$ | MCV（fl） | MCH（pg） | MCHC（g/L） |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 10 | 58.6 ± 3.74 | 20.7 ± 1.46 | 359 ± 12.0 |
| 实验组 | 10 | 104.9 ± 25.10* | 33.9 ± 2.71* | 345 ± 11.75§ |

注：§ 与对照组相比，$P>0.05$；* 与对照组相比，$P<0.001$




注：a 为对照组，b 为实验组　染色方法：煌焦油蓝 + 瑞氏染色　放大倍数：10 × 40 倍

**图 1　实验第 8 d 外周血网织红细胞镜下观**




注:a 为对照组,b 为实验组　染色方法:瑞氏染色　放大倍数:10×100 倍

**图 2　实验第 8 d 骨髓象镜下观**

为 90.7%±4.23%,两者比较差异有统计学意义($P<0.001$)。

2.4　骨髓象检查

骨髓象检查(图 2)显示:实验组大鼠骨髓有核细胞增生活跃,以红系增生为主,其中又以中晚幼红细胞增生为主,粒系、淋系比例降低,符合溶血性贫血骨髓象。

## 3　讨　论

实验性动物模型是指研究者通过物理、化学和生物的致病因素作用于动物,造成动物组织、器官或全身一定的损害,出现类似人类疾病时的功能、代谢改变。乙酰苯肼(Acetylphenyl hydrazine,APH)是一种强氧化剂,能特异地对红细胞起缓和而进行性地氧化损伤作用,尤其是干扰红细胞内的葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶,促进血红蛋白变性而形成海氏小体(Heinz body),也可直接破坏红细胞的膜蛋白和脂类,使膜溶解破裂,红细胞崩解,造成溶血性贫血。据此,用乙酰苯肼来制造大鼠溶血性贫血模型[2]。

贫血的诊断主要依赖于检查外周血血红蛋白、红细胞等参数。红细胞形成过程中,晚幼红细胞脱核释放入外周血后,变成含有 RNA 和少量 DNA 碎片的网织红细胞,这种细胞在血管内进一步成熟,24 ~ 36 h 后变成成熟红细胞[3],故外周血网织红细胞的含量能够反映骨髓的增殖情况,相关参数可作为贫血诊断中的重要指标[4]。本实验中,与对照组相比,实验组外周血血红蛋白、红细胞数均减少,确定实验组大鼠出现贫血,通过表 2 可发现其为大细胞性贫血。另外实验组网织红细胞显著升高,血浆游离血红蛋白和间接胆红素明显高于对照组,可初步判断为溶血性贫血,最后结合骨髓象检查结果及病因分析可确诊为溶血性贫血,可判断溶血性贫血模型建立成功。本实验用腹腔内注射乙酰苯肼制造溶血性贫血大鼠动物模型的方法简单,并且大鼠模型的症状和外周血象、血细胞的生物化学变化与人类溶血性贫血基本相似,为探讨实验性溶血性贫血提供了一种简易模型。

目前,溶血性贫血的治疗尚无特别有效的药物,皮质激素虽有一定疗效,但长期应用可导致骨质疏松、水盐代谢紊乱等,故关于溶血性贫血治疗药物的研究也越来越多,比如胡振玉等[5]研究表明山莨菪碱可降低红细胞膜的渗透性、减少血细胞破坏、防止血栓形成等作用,可作为治疗溶血性贫血的有效药物。据 WHO 统计,药物氧化性溶血性贫血占药源性血液疾病的 10.36%,且临床发病率逐年增高,故建立氧化性溶血性贫血的动物模型可为进行相关药物的治疗研究起重要作用。张玉[5]等通过制作溶血性贫血小鼠动物模型,并用当归多糖铁复合物进行治疗发现其具有一定的治疗溶血性贫血的作用,并存在量效关系;杜先婕等[7]也通过在溶血性贫血动物模型上使用复方阿胶浆进行治疗发现它能增强凝血因子凝血功能和骨髓造血功能,并可使 HGB 和 MCH 增加,对贫血可有很好的治疗作用;李秀军等[8]研究发现大剂量五味子酚可改善药物氧化性溶血性贫血模型的贫血状况。可见,溶血性贫血动物模型的应用对探索治疗溶血性贫血药物的研究非常重要。本实验用腹腔内注射强氧化剂乙酰苯肼的方法成功制作出符合临床特征的溶血性贫血大鼠动物模型,其特点是建模周期短,操作简便,为溶血性贫血治疗药物尤其是药物氧化性 HA 的研究提供了良好的材料。

## 参　考　文　献

[1]　叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].第 3 版.南京:东南大学出版社,2006.164-456.

[2]　施新猷,顾为望,主编.人类疾病动物模型[M].第 1 版.北京:人民卫生出版社,2008.242-243.

[3]　Gronowicz G,Swift H,Steck T L.Maturation of the reticulocyte in vitro [J].J Cell Sci,1984,71(1):177-197.

[4]　王　梅,陈　爽.网织红细胞计数在监测胸部肿瘤患者化疗后骨髓抑制状态的探讨 [J].重庆医科大学学报,2006,31(4):585-596.

[5]　胡振玉,李景梦,江　玲,等.山莨菪碱治疗溶血性贫血临床分析[J]. 实用医学杂志,2004,20(9):1062-1063.

[6]　张　玉,王珮珮,王凯平,等.当归多糖铁治疗溶血性贫血小鼠的实验研究[J].中国医院药学杂志,2007,27(12):1652-1654.

[7]　杜先婕,宋林奇,谢人明,等.复方阿胶浆对乙酰苯肼所致小鼠溶血性贫血模型的实验研究[J].中成药,2009,31(5):790-793.

[8]　李秀军.五味子酚对药物氧化性溶血性贫血模型家兔外周血及超氧化歧化酶活力和丙二醛含量的影响[J].贵州医药,2005,29(6):500-503.

(责任编辑:关蕴良)