

·临床研究·

新生儿血清游离胆红素的测定及临床应用价值探讨

黄益础, 陈雪雨, 杨勇, 余霞娟, 邱晓媚, 赵捷, 熊小云, 杨传忠
(南方医科大学第一临床医学院//深圳市妇幼保健院新生儿科, 广东 深圳 518000)

摘要:【目的】探讨过氧化物酶(POD)法检测新生儿血清游离胆红素(UB)的临床适用性及应用价值。【方法】向胆红素标准品溶液(1、2、3 $\mu\text{mol/L}$)加入 H_2O_2 (0.33 mol/L)和三种不同终末浓度(0.019、0.038、0.075 $\mu\text{g/mL}$)的辣根过氧化物酶(HRP)以获得标准化的HRP一级速率常数 K_p ;新生儿血清上样量 25 μL , 稀释倍数 41.6, 于 37 $^\circ\text{C}$ 且避光条件下用 2.4、4.8 $\mu\text{g/mL}$ HRP 检测血清 UB 水平, 并验证该方法学的准确性、精密度以及稳定性;收集 33 例黄疸患儿的一般情况及临床资料, 主要包括血清总胆红素(TSB)、间接胆红素(IDB)、白蛋白(ALB)、胆红素与白蛋白摩尔比值(BAMR)等;用 Graphpad Prism 8.0 统计分析实验数据。【结果】在 pH 值为 7.4 ± 0.2 , 反应温度 37 $^\circ\text{C}$ 且避光条件下, 标准化 K_p 为 $(7.20\pm 1.08) \text{ mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。HRP 活性和 UB 水平分别于 -20 $^\circ\text{C}$ 冻存 3 周和 1 周内无明显下降。不同 UB 水平血清样品的平均日内、日间变异系数均小于 10%。本研究用 POD 法检测 33 例黄疸患儿(胎龄 ≥ 35 周)的血清 UB 范围为 $(0.32\sim 1.20) \mu\text{g/dL}$, 与 TSB、IDB 及 BAMR 均显著相关。有 5 例 UB 水平 $\geq 1.0 \mu\text{g/dL}$, 强光疗者占 60% (3/5)。【结论】采用 POD 法结合常见设备分光光度计检测新生儿血清 UB 水平不仅操作简易、检测快速, 且试剂成本低, 具有良好的准确性和精密度, 便于临床开展。血清 UB 的测定对新生儿黄疸的临床管理有一定的指导意义。

关键词: 新生儿黄疸; 血清游离胆红素; 过氧化物酶试验

中图分类号: R722.17 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2023)02-0318-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0217

Determination of Serum Unbound Bilirubin and Its Clinical Application Value in Neonates

HUANG Yi-chu, CHEN Xue-yu, YANG Yong, YU Xia-juan, QIU Xiao-mei, ZHAO Jie,
XIONG Xiao-yun, YANG Chuan-zhong

(Department of Neonatology, Affiliated Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital//The First School of Clinical
Medicine, Southern Medical University, Shenzhen 518000, China)

Correspondence to: YANG Chuan-zhong; E-mail: yangczgd@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the clinical appropriateness and application value of the peroxidase (POD) method for the detection of unbound bilirubin (UB) in neonatal serum. 【Methods】 Hydrogen peroxide (0.33 mol/L) and three different final concentrations (0.019, 0.038, 0.075 $\mu\text{g/mL}$) of horseradish peroxidase (HRP) were added to standard bilirubin solution (1, 2, 3 $\mu\text{mol/L}$) to obtain a standardized HRP primary rate constant K_p . Then 25 μL of neonatal serum was diluted by 41.6 fold, and measured with 2.4 and 4.8 $\mu\text{g/mL}$ HRP at 37 $^\circ\text{C}$ under the dark, to determine the UB concentration. The accuracy, precision, and stability of the methodology were validated. The clinical characteristics of 33 jaundiced neonates were collected, including total serum bilirubin (TSB), indirect bilirubin (IDB), albumin (ALB), bilirubin to albumin molar ratio (BAMR), etc. The experimental data were analyzed by Graphpad Prism 8.0. 【Results】 A standardized K_p of $(7.20\pm 1.08) \text{ mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ was determined at pH 7.4 ± 0.2 , 37 $^\circ\text{C}$ in the dark. The HRP activity and UB concentrations remained stable at -20 $^\circ\text{C}$ for 3 weeks and a week, respectively. The mean intra-day and inter-day coef-

收稿日期: 2022-11-03

基金项目: 广东省高水平临床重点专科项目(SZGSP009)

作者简介: 黄益础, 硕士生, 研究方向: 儿科学, E-mail: huangyichu369@163.com; 杨传忠, 通信作者, 主任医师, E-mail: yangczgd@163.com

ficients of variation of the serum samples with different UB concentrations were less than 10%. In this study, the UB concentrations in 33 jaundiced neonates (gestational age ≥ 35 weeks) were measured by the POD method in the range of (0.32 ~ 1.20) $\mu\text{g}/\text{dL}$, which was positively correlated with TSB, IDB and BAMR. Of the five infants whose UB concentrations measured more than 1 $\mu\text{g}/\text{dL}$, three received intensive phototherapy (60%).【Conclusions】The POD method combined with a standard equipment spectrophotometer to detect serum UB concentrations in neonates is easy to operate, rapid to detect, and low cost. This method has good accuracy and precision, which is convenient for clinical implementation. Moreover, the measurement of serum UB may assist us in better management of neonatal jaundice in clinical practice.

Key words: neonatal jaundice; unbound bilirubin; peroxidase test

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(2): 318-325]

游离胆红素(unbound bilirubin, UB)是人血清中极少量的未联结白蛋白的未结合胆红素(unconjugated bilirubin, UCB),具有疏水、亲脂性,可以穿透血脑屏障诱导特定脑功能区域的神经元凋亡和坏死,继而发展为胆红素脑病(bilirubin encephalopathy, BE),以致残甚至致死^[1]。因此,UB的监测对于胆红素脑病的早期甄别与防治尤为重要。目前国内外诊疗指南主要根据血清总胆红素(total serum bilirubin, TSB)水平结合特定的危险因素来决定光疗或换血治疗与否^[2-3]。然而,低水平TSB的黄疸患儿可能存在较高水平的UB,由于“干预不足”导致低胆红素水平胆红素脑病的发生;而高水平TSB预测胆红素脑病的特异性欠佳,导致部分足月黄疸患儿的过度干预,这或许与高TSB水平并不对应高UB水平有关。胆红素与白蛋白比值(bilirubin to albumin ratio, B/A)或摩尔比值(bilirubin to albumin molar ratio, BAMR)可作为高胆红素血症治疗决策的附加参考条件^[1-2],但由于血清中可能存在胆红素置换剂干扰胆红素与白蛋白的联结、胆红素与白蛋白的亲合力存在个体差异等原因^[4],该比值只是间接评估UB水平,并不能完全替代UB。UB在人血清中的含量微乎其微,干扰因素多,精准检测难度大,因此其定量检测是20世纪以来的研究热点及难点,从而诞生了不同原理的UB检测方法^[5],包括过氧化物酶(peroxidase, POD)法、色谱法、荧光光谱法、压电技术等,而POD法^[6]是较为经典的方法之一,其主要原理为酶促反应动力学与分光光度法的结合。基于POD法衍生出不同的改良方法学^[7-8],由此不同的UB检测设备亦相继被开发,如UB-Analyzer^[9]和FloPro Analyzer^[8]。鉴于方法学的不统一、设备昂贵等因素仅限于国外部分重点实验室开展,尚未常规应用于临床实践。为了进

一步优化新生儿黄疸管理,把握更好的干预时机,做好胆红素脑病的防与治,临床上亟需开展起新生儿血清UB水平检测方法的研究及实践,确立一项成本相对低、可行性高、便于临床开展的检测方法。本研究拟采用实验室常用设备分光光度计,通过POD法检测新生儿血清UB水平,初步探讨UB在新生儿黄疸管理中的适用性及应用价值,并为今后研究胆红素神经毒性的UB阈值提供实验学基础。

1 材料与方 法

1.1 实验试剂及仪器

实验仪器: Nanodrop OneC 微量分光光度计(ThermoFisher)。试剂:胆红素标准品(bilirubin, Sigma 14370-250MG)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP, Sigma P8125-5KU, Type I)、过氧化氢溶液(hydrogen peroxide, H_2O_2 , 9.9 mol/L)、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、去离子水、EDTA溶液(0.1 mol/L)、氢氧化钠溶液(NaOH, 0.1 mol/L)。

1.2 实验溶液制备

1.2.1 胆红素标准品溶液 精密称取11.7 mg胆红素,溶于0.2 mL 0.1 mol/L NaOH和0.1 mL 0.1 mol/L EDTA中,用适量去离子水稀释至10 mL。此原液在暗室中可稳定数小时,现配现用,并于避光条件下制备。

1.2.2 辣根过氧化物酶溶液 精密称取1.0 mg HRP,溶于1.0 mL PBS,浓度1 mg/mL,分管储存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。胆红素标准品测定采用终末浓度0.019、0.038、0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的HRP进行;黄疸血清采用终末浓度4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.3 H_2O_2 溶液 取10 μL 9.9 mol/L H_2O_2 ,加入

290 μL PBS 稀释至 0.33 mol/L, 现配现用。

1.3 基本原理与计算

检测原理与计算依据参照 Jacobsen^[6] 和 Ahl-fors^[8] 报道的方法, 在过氧化物酶的催化下, 游离胆红素被过氧化氢氧化成无色化合物, 如图 1A 所示, 其中 ALB 为白蛋白, B 为游离胆红素, ALB-B 为白蛋白-胆红素复合物, X 为该氧化反应产生的无色复合物。在无白蛋白的实验条件下, 游离胆红素的氧化反应遵循一级动力学, 可以通过测定加入 H_2O_2 和 HRP 到稀释胆红素标准品溶液 (1、2、3 $\mu\text{mol/L}$) 后的吸光度下降速率来确定游离胆红素氧化反应的一级速率常数 K_p :

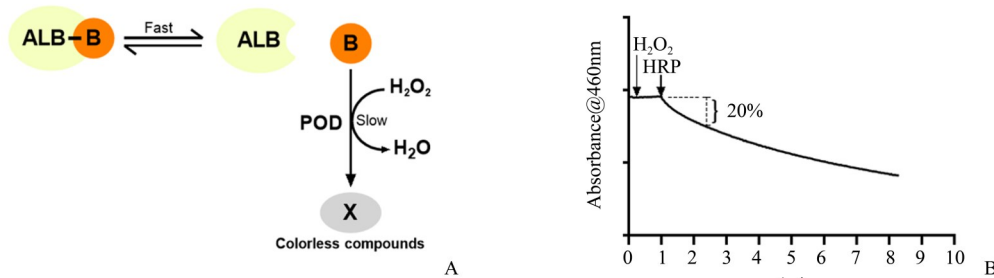
$$K_p = \frac{v_0}{[\text{HRP}] \cdot [\text{Bf}]} \quad (1)$$

其中, K_p 为该氧化反应的一级速率常数, 单位为 $\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $[\text{HRP}]$ 为 HRP 浓度, 单位为 $\mu\text{g/mL}$; $[\text{B}_f]$ 为胆红素标准品浓度或游离胆红素浓度 (free/

unbound bilirubin concentration), 单位为 $\mu\text{g/dL}$ 或 nmol/L ($1 \mu\text{g/dL} = 17.1 \text{ nmol/L}$)。 v_0 是用分光光度计监测胆红素吸光度的初始下降速率, 即胆红素的初始氧化速率 (初始速率范围内, 反应体系剩余底物浓度远超反应产物, 且其他影响因素尚未发挥作用), $v_0 = (A_0 - A_t)/t$, t 为胆红素下降 20% 所需耗时 (min), A_0 为胆红素在 440 nm 处 (胆红素标准品溶液的吸收峰, $\epsilon^{440} = 47\,500 \text{ A/mol}$) 的初始吸光度, A_t 为经 t (min) 后胆红素的吸光度。

由于新生儿血清中的胆红素-白蛋白复合物的解离速率远大于游离胆红素的氧化速率, 因此, B_f 可以通过测定在加入 H_2O_2 和 HRP 后在 460 nm 处 (白蛋白联结胆红素的吸收峰, $\epsilon^{460} = 48\,000 \text{ A/mol}$) 吸光度的初始下降速率来确定 (见图 1B)。由算式 (1) 推导 B_f 的计算公式如下:

$$B_f = \frac{v_0}{K_p \cdot [\text{HRP}]} \quad (2)$$



A: Chemical reaction of peroxidase method. B: Experimental procedure of peroxidase method. ALB: albumin; B: bilirubin; POD: peroxidase; H_2O_2 : hydrogen peroxide; HRP: horseradish peroxidase.

图1 过氧化物酶法的化学反应和实验进程

Fig. 1 Chemical reaction and experimental procedure of peroxidase method

1.4 实验步骤

1.4.1 辣根过氧化物酶的 K_p 标准化 ①取 25 μL 适宜浓度的胆红素标准品溶液加入 10 mm 光程的比色皿中, 用 1.0 mL PBS 稀释至目标浓度 (1、2、3 $\mu\text{mol/L}$), 置于 Nanodrop OneC 比色皿槽中匀速加热至 37 $^{\circ}\text{C}$, 并记录 A_{440} (胆红素标准品溶液的吸光度); ②加入 5 μL 0.33 mol/L H_2O_2 , 1 min 后记录 A_{440} , 以确定是否有下降; ③加入 10 μL HRP (终末浓度 0.019、0.038、0.075 $\mu\text{g/mL}$), 利用磁力转子持续混匀, 并用分光光度计持续监测 A_{440} 的下降过程, 记录下降初始吸光度的 20% 时所需耗时 (min), 根据算式 (1) 计算出 K_p 值; ④以上实验步骤根据不同浓度胆红素标准品及不同浓度 HRP 浓度组合重复 3 次,

计算平均值得出标准化 K_p 。

1.4.2 新生儿血清游离胆红素的测定 在消毒无菌条件下采集新生儿血液样品 200 μL , $2\,810 \times g$ 离心 10 min 后留取血清, 避光 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。新生儿血清上样量 25 μL , 稀释和加样处理同 K_p 标准化所述, 区别在于: ①持续监测 A_{460} 和 A_{575} (血红素的吸光度), 并采用算式校正血红素对 A_{460} 的影响^[7]: 校正 $A_{460} = A_{460} - 0.8 \times A_{575}$; ②HRP 溶液终末浓度参照 Nakamura 等^[7] 和 Roca 等^[10], 选用 4.8、2.4 $\mu\text{g/mL}$, 根据算式 (2) 计算出 B_f 。新生儿血液样本均来源于深圳市妇幼保健院, 临床血液样本采集已通过深圳市妇幼保健院伦理委员会批准【2019】119。

1.5 黄疸患儿临床资料收集

收集 33 例黄疸患儿的临床资料, 包括孕周、日

龄、出生体质量,光疗前的血常规、动脉血气及血生化指标,主要包括TSB、直接胆红素(direct bilirubin, DB)、间接胆红素(indirect bilirubin, IDB)、白蛋白(albumin, ALB)及BAMR,以及后续追踪随访资料,包括脑干听觉诱发电位(brainstem auditory evoked potentials, BAEP),以评估胆红素所致听觉神经系统损害的风险^[11]。临床资料采集已通过深圳市妇幼保健院伦理委员会批准【2019】119,患者家属知情同意。

1.6 统计学分析

实验数据用Graphpad Prism 8.0统计分析;正态分布的计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析结合双尾 t 检验进行统计学分析;采用标准回归方法对UB水平分别与TSB、IDB及BAMR进行线性比较,并计算回归方程和决定系数(R^2); $P < 0.05$ 的相关性和差异有统计学意义。

2 结果

2.1 K_p标准化

向不同浓度(1、2、3 μmol/L)的稀释胆红素标准品溶液加入H₂O₂(0.33 mol/L)和不同浓度(终末浓度0.019、0.038、0.075 μg/mL)的HRP以获得标准化的HRP一级速率常数K_p。在pH 7.4±0.2,反应温度37.0 °C且避光条件下,标准化的K_p为(7.20±1.08) mL·μg⁻¹·min⁻¹。如表1所示,三种不同浓度HRP及三种不同浓度的胆红素标准品溶液对应的K_p均值差异无统计学意义。

2.2 稳定性

本研究分别分析了HRP、黄疸患儿血清样品于-20 °C冻存0至1个月的稳定性。

2.2.1 辣根过氧化物酶冻存的稳定性 将1 mg/mL的HRP溶液分管于-20 °C冻存,分别于冻存前、冻存7 d、14 d、21 d、1个月测定HRP对应的K_p,观察酶活性改变情况,如图2A所示,单因素方差分析结果提示随着冻存时长延长,HRP酶活性下降($n=3$, $F=20.250$, $P < 0.001$),多重比较结果提示冻存前、冻存7 d、14 d、21 d对应K_p均值差异无统计学意义,而冻存1个月的HRP对应K_p较前4个时间点下降,因此,HRP于-20 °C冻存时长3周内,其活性无明显下降。

2.2.2 黄疸患儿血清样品冻存的稳定性 将黄疸

表1 不同浓度的HRP和胆红素标准品溶液对一级速率常数K_p的影响

Table 1 Effects of different concentrations of HRP and bilirubin standard solutions on the primary rate constant K_p

Concentration of bilirubin standard solution/(μmol/L)	Concentration of HRP/(μg/mL)	K _p /(mL·μg ⁻¹ ·min ⁻¹)
1.0	0.038	7.06±0.53
2.0	0.038	7.00±1.09
3.0	0.038	7.53±1.47
3.0	0.075	7.52±1.52
3.0	0.019	6.84±0.96

Experiments were repeated 9 times. The values are presented as ($\bar{x} \pm s$).

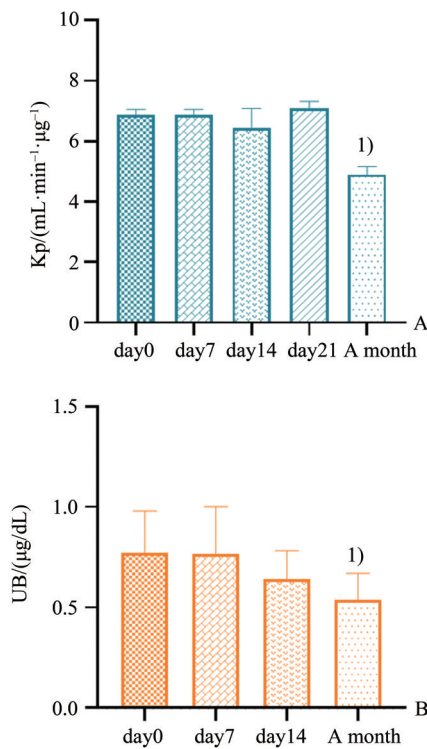
患儿血清样品分管置于-20 °C冻存,分别于冻存前、冻存7 d、14 d、1个月后检测UB的水平。结果显示,血清样品于-20 °C冻存1个月时限内,冻存1个月后的UB较前明显下降($n=14$, $F=5.285$, $P=0.003$),冻存1周内UB水平差异无变化,冻存2周内UB水平出现下降,但无统计学意义,如图2B所示。因此,当设计UB相关临床研究时,或者当UB不能在收取样品后短时间内进行测定时,可将血清样品冻存于-20 °C,尽量于1周内完成UB测定,最迟不可超过2周。

2.3 精密度

采集6例未经光疗的黄疸患儿血清样品,每份样品分3管,其一在同1天重复检测6次,计算日内变异系数(intra-day coefficient of variation);剩余2管避光冻存于-20 °C用于第2、3天检测,即连续检测3天并计算日间变异系数(inter-day coefficient of variation)。平均日内变异系数为3.3%,平均日间变异系数为7.1%,二者均小于10%(表2)。

2.4 临床应用

在分析了POD法的准确性、精密度和稳定性等验证参数后,本研究开展了POD法检测UB水平的初步临床实践。本研究共检测了33例黄疸患儿光疗前的UB水平,一般情况及相关临床指标如表3,其中男婴19例(57.6%),女婴14例(42.4%);早产儿5例(15.2%),足月儿28例(84.8%),小于胎龄儿1例(3.0%),足月大于胎龄儿3例(9.1%)。新生儿



A: Differences were statistically significant between HRP after storage for a month at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and before freezing on $K_p(n = 3)$. $F = 20.250$, $P < 0.001$, 1) $P = 0.001$ vs baseline. B: Differences were statistically significant between serum samples after storage for a month at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and before freezing on UB concentrations($n = 14$). $F = 5.285$, $P = 0.003$, 1) $P = 0.004$ vs baseline.

图2 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存时长对 K_p (HRP)和新生儿黄疸血清UB水平的影响

Fig. 2 Effects of storage time at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ on the primary rate constant (K_p) of HRP and UB concentrations of serum samples from jaundiced newborns

ABO血型不合溶血病1例,新生儿红细胞增多症2例,G-6-PD缺乏症3例。33例黄疸患儿均接受了光疗,普通光疗者30例,强光疗者3例。后续完善BAEP异常者1例。

所有血清样品($n=33$)的TSB与血清UB水平的线性回归分析如图3A所示,TSB与UB水平显著相关($\hat{Y} = 0.060\ 21X - 0.080\ 73$, $R^2 = 0.606$, $P < 0.000\ 1$); IDB与血清UB线性比较(图3B)亦是显著相关($\hat{Y} = 0.061\ 51X - 0.061\ 49$, $R^2 = 0.612$, $P < 0.000\ 1$);同时本研究对BAMR与血清UB浓度进行线性比较(图3C),二者显著相关($\hat{Y} = 1.914\ 0X - 0.121\ 2$, $R^2 = 0.717$, $P < 0.000\ 1$)。

3 讨论

3.1 过氧化物酶法检测游离胆红素的临床适用性

POD法是一种灵敏度高、成本低且快速定量分析UB水平的检测方法。其首要步骤为 K_p 标准化,而用于测定过氧化物酶 K_p 的“金标准”则是无白蛋白胆红素标准品溶液^[6]。在 $\text{pH } 7.4 \pm 0.2$,反应温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 且避光条件下,本研究探讨了不同终末浓度的HRP溶液和胆红素标准品溶液对一级速率常数 K_p 的影响,发现各组间 K_p 值差异无统计学意义,这与Ahlfors等^[12]和Roca等^[10]实验结果相符。在上述实验条件下,所测得的标准化 K_p 为 $(7.20 \pm 1.08)\text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。HRP于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存时长3周内活性尚且稳定,然而仍需对酶试剂活性及稳定性的标准化行更进一步探究。我们观察到黄疸血清样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存1周后UB水平开始下降,因此冻存于

表2 POD法检测UB水平的精密度

Table 2 Precision of POD method for UB concentration

Serum sample	Intra-day results			Inter-day results		
	UB concentration/ ($\mu\text{g/dL}$)	Replicates	CV/%	UB concentration/ ($\mu\text{g/dL}$)	Replicates	CV/%
1	1.109±0.020	6	1.8	1.055±0.054	3	5.1
2	1.164±0.022	6	1.9	1.132±0.083	3	7.3
3	0.531±0.020	6	3.8	0.537±0.039	3	7.3
4	0.631±0.025	6	3.9	0.603±0.048	3	7.9
5	0.454±0.018	6	4.0	0.451±0.036	3	8.0
6	0.945±0.042	6	4.5	0.929±0.063	3	6.7

The values are presented as ($\bar{x} \pm s$).

表3 33例黄疸患儿的临床特征
Table 3 Clinical characteristics of 33 jaundiced neonates

Items	($\bar{x} \pm s$)	Range (minimum to maximum)
Gestational age/week	38 ^{±6} ± 1.5	35.0 ~ 41.0
Postnatal age/day	3.2 ± 2.8	1.0 ~ 13.0
Birth weight/g	3266 ± 447	2500 ~ 4310
pH	7.39 ± 0.04	7.30 ~ 7.49
HGB/(g/L)	183.7 ± 21.7	146.0 ~ 226.0
Hct/%	53.4 ± 6.6	41.8 ~ 65.9
TSB/(mg/dL) ¹⁾	12.8 ± 3.2	5.8 ~ 18.6
DB/(mg/dL) ¹⁾	0.6 ± 0.2	0.2 ~ 0.9
IDB/(mg/dL) ¹⁾	12.2 ± 3.2	5.6 ~ 17.7
UB/(μ g/dL) ²⁾	0.69 ± 0.25	0.32 ~ 1.20
ALB/(g/L) ³⁾	34.4 ± 3.6	27.2 ~ 40.4
BAMR	0.42 ± 0.11	0.20 ~ 0.66

HGB: hemoglobin; Hct: hematocrit, TSB: total serum bilirubin; DB: direct bilirubin; IDB: indirect bilirubin; UB: unbound bilirubin; ALB: albumin; BAMR: bilirubin to albumin molar ratio.
¹⁾ 1 mg/dL=17.1 μ mol/L; ²⁾ 1 μ g/dL=17.1 nmol/L; ³⁾ 1 g/L=15.1 μ mol/L.

-20 °C 的血清样品尽量于1周内完成UB的测定。不同浓度的血清样品检测的平均日内、日间变异系数均小于10%,具有良好的精确度。此外,在POD法检测过程中可能受到以下因素的干扰^[13]:①样品稀释:本研究检测前对血清样品稀释41.6倍,虽减少了检测时所需的血清样品量,但增强了白蛋白与胆红素内在亲和力,同时也减弱了某些竞争物质与UB竞争白蛋白结合位点的效应,可能导致UB的低

估;②直接胆红素:DB包括结合胆红素(conjugated bilirubin, CB),大部分 δ -胆红素及少部分UCB。其中CB亦可被POD催化氧化成无色化合物^[14]。当DB \geq 1 mg/dL或DB/TSB \geq 5%时,可能导致UB的高估^[15];③血红素:血红素是一种弱过氧化物酶,在460 nm处有相当大的吸光度。采血操作不当或标本处理不及时可能导致样品出现不同程度的溶血:当血清样品轻度溶血时,血红素对检测的影响较低;当发生中度溶血时可能会增加过氧化物酶活性,可能导致UB的高估;当发生严重溶血时在460 nm处的吸光度超过了UCB,又可能导致UB的低估及TSB的高估。因此,对于以新生儿溶血病、新生儿红细胞增多症为主要病因的高未结合胆红素血症患儿及因操作不慎导致样品溶血时,血清UB的检测可能受到不同程度溶血的干扰^[6, 9],需要谨慎解读UB的检测结果。

3.2 过氧化物酶法检测游离胆红素的临床应用

TSB是诊断新生儿高胆红素血症的金标准,亦是主要的临床干预指标^[2]。然而,由于多种导致神经系统发育迟缓的因素(如窒息、颅内出血、早产等)可能增加TSB水平和胆红素神经毒性的易感性,所以TSB峰值水平预测胆红素脑损伤的价值有限^[16]。大量研究证明,血清UB对神经系统异常的预后更具预测价值^[17-19]。相比TSB和BAMR,UB是预测严重黄疸的晚期早产儿和足月儿发生听神经病谱系障碍(auditory neuropathy spectrum disorder, ANSD)的一个更敏感和特异的指标^[18]。Amin等^[19]于2017年报道了一项严重高胆红素血症患儿(男59例,女41例,平均胎龄37.4周)的前瞻性队列研究,结果显示100例研究对象中有28例出现胆红素所致的听神经毒性(包括听神经病和听力损失),峰

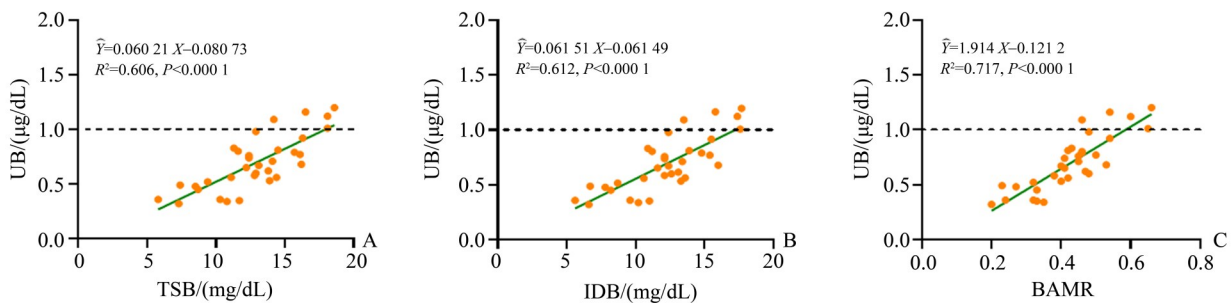


图3 胎龄 \geq 35周新生儿黄疸的TSB、IDB和BAMR分别与血清UB水平的线性回归分析(虚线为UB=1 μ g/dL水平)
Fig. 3 Linear regression analysis of TSB, IDB and BAMR with serum UB concentrations in jaundiced neonates at gestational age \geq 35 weeks (Dashed line refers to UB=1 μ g/dL)

值UB水平与听神经毒性的相关性(OR 2.9, 95% CI: 1.6~5.3, $P=0.0004$)更强于峰值TSB和峰值BAMR;对于存在重度高胆红素血症(TSB峰值超过20 mg/dL但未达到25 mg/dL)的晚期早产儿及足月儿,其血清UB预测听神经毒性的效能显著优于TSB峰值。因此,进一步研究造成胆红素脑损伤的血清UB阈值有着重要意义。关于血清UB作为临床干预阈值,在日本Kobe大学高胆红素血症的治疗标准(2017年修订)^[20]中有相关说明:对于胎龄 ≥ 35 周的黄疸患儿,当血清UB达到0.8 $\mu\text{g/dL}$ 时开始予普通光疗;血清UB达到1.0 $\mu\text{g/dL}$ 时,建议予强光疗干预;当UB ≥ 1.5 $\mu\text{g/dL}$ 则建议予输注白蛋白或换血干预。本研究纳入的33例黄疸患儿中有20例UB < 0.8 $\mu\text{g/dL}$,8例UB水平处于(0.8~1.0) $\mu\text{g/dL}$,实际均接受了普通光疗干预。5例UB ≥ 1.0 $\mu\text{g/dL}$ (见图3),实际强光疗者占60%(3/5),后续追踪BAEP均无异常;2例普通光疗者中BAEP正常者1例,另一例为黄疸合并肠道感染的早产儿,后续完善BAEP提示单侧异常(左侧V波潜伏期延长, I-III、I-V波间期延长),可能与临床干预不足相关。本研究无UB ≥ 1.5 $\mu\text{g/dL}$ 病例。对于33例黄疸患儿的临床光疗干预,本研究实际参照2004年美国儿科学会推荐的光疗参考标准^[21];但参考日本Kobe大学的UB干预阈值标准^[20],本研究33例黄疸病例中仅8例普通光疗干预,5例需强光疗干预,其余20例不需要干预。以上数据提示,仅以TSB水平作为光疗干预标准时,存在“干预不足”和“过度干预”共存的情况,而参考UB水平或可显著改善该现状。此外,部分相似TSB或IDB水平,或相近BAMR的黄疸患儿血清UB水平相差较大,这可能与血清白蛋白水平、白蛋白-胆红素结合力相关,其

中白蛋白-胆红素结合力与出生胎龄、纠正日龄有一定的相关性^[22]。血清白蛋白浓度和白蛋白-胆红素结合力的降低,白蛋白结合位点置换物质(如游离脂肪酸、布洛芬等)的存在,抑或合并有低温、缺氧、窒息、代谢性酸中毒及败血症等不稳定临床因素,均可能影响白蛋白与胆红素的联结以致血清UB水平的升高^[14,22-23]。本研究样本量较少,仅对血清UB检测的临床应用作初步探讨,后续我们会将UB引入新生儿黄疸管理实践中,除了合适的临床实验室检测技术来定量检测UB外,尚需进一步扩大样本量,进一步规范检测和收集UB的人群数据,继而探求和明确符合我国实际情况的UB临床干预阈值。

3.3 血清游离胆红素测定的临床意义

UB检测对于早期甄别和预防胆红素脑病极具价值,有益于减少发生胆红素脑损伤的风险,改善预后及生存质量。目前国内尚未普及UB的定量检测,POD法不妨为一合适选择,尽管检测干扰因素众多以致其准确性受到质疑,但随着方法学的改进及技术发展,UB检测结果准确性和临床应用可靠性将有所提高。POD法检测UB水平的实践,为今后预测胆红素脑损伤的UB阈值提供实验学基础,以进一步优化新生儿黄疸管理及胆红素脑病的诊疗方案,继而实现个体化的临床诊断、把握关键的干预时机以及作出明智的临床干预抉择。

综上所述,采用常见设备分光光度计结合POD法检测UB水平不仅操作简易、快速,且试剂成本较低,具有较好的准确性和精密度,便于临床开展。血清UB的测定对新生儿黄疸的临床管理有一定指导意义。

参考文献

- [1] Kemper AR, Newman TB, Slaughter JL, et al. Clinical practice guideline revision: management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation[J]. *Pediatrics*, 2022, 150(3): e2022058859.
- [2] 杜立中, 马晓路. 新生儿高胆红素血症诊断和治疗专家共识[J]. *中华儿科杂志*, 2014, 52(10): 745-748.
Du LZ, Ma XL. Expert consensus on the diagnosis and treatment of neonatal hyperbilirubinemia[J]. *Chin J Pediatr*. 2014, 52(10): 745-748.
- [3] 王箫, 杜立中. 早产儿胆红素脑损伤的研究进展[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(14): 1041-1045.
Wang X, Du LZ. Research progress of bilirubin-induced brain injury in preterm neonate[J]. *Chin J Appl Clin Pediatr*, 2018, 33(14): 1041-1045.
- [4] Ngshangva L, Bachu V, Goswami P. Development of new methods for determination of bilirubin[J]. *J Pharm*

- Biomed Anal, 2019, 162:272-285.
- [5] Amin SB, Lamola AA. Newborn jaundice technologies: unbound bilirubin and bilirubin binding capacity in neonates [J]. *Semin Perinatol*, 2011, 35 (3) : 134-140.
- [6] Jacobsen J, Wennberg RP. Determination of unbound bilirubin in the serum of newborns [J]. *Clin Chem*, 1974, 20(7):783.
- [7] Nakamura H, Lee Y. Microdetermination of unbound bilirubin in icteric newborn sera: an enzymatic method employing peroxidase and glucose oxidase [J]. *Clin Chim Acta*, 1977, 79(2):411-417.
- [8] Ahlfors CE, Marshall GD, Wolcott DK, et al. Measurement of unbound bilirubin by the peroxidase test using Zone Fluidics [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 365(1-2) : 78-85.
- [9] Shimabuku R, Nakamura H. Total and unbound bilirubin determination using an automated peroxidase micro-method [J]. *Kobe J Med*, 1982, 28(2):91-104.
- [10] Roca L, Calligaris S, Wennberg RP, et al. Factors affecting the binding of bilirubin to serum albumins: validation and application of the peroxidase method [J]. *Pediatr Res*, 2006, 60(6):724-728.
- [11] Saluja S, Agarwal A, Kler N, et al. Auditory neuropathy spectrum disorder in late preterm and term infants with severe jaundice [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2010, 74(11):1292-1297.
- [12] Ahlfors CE. Effect of serum dilution on apparent unbound bilirubin concentration as measured by the peroxidase method [J]. *Clin Chem (Baltimore, Md.)*, 1981, 27(5):692-696.
- [13] Ahlfors CE, Wennberg RP, Ostrow J D, et al. Unbound (free) bilirubin: improving the paradigm for evaluating neonatal jaundice [J]. *Clin Chem*, 2009, 55 (7):1288-1299.
- [14] Morioka I, Iwatani S, Koda T, et al. Disorders of bilirubin binding to albumin and bilirubin-induced neurologic dysfunction [J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2015, 20(1):31-36.
- [15] Iwatani S, Yamana K, Nakamura H, et al. A novel method for measuring serum unbound bilirubin levels using glucose oxidase-peroxidase and bilirubin-inducible fluorescent protein (UnaG): No influence of direct bilirubin [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18):6778.
- [16] Ahlfors CE. Predicting bilirubin neurotoxicity in jaundiced newborns [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2010, 22(2) : 129-133.
- [17] Amin SB, Wang H. Unbound unconjugated hyperbilirubinemia is associated with central apnea in premature infants [J]. *J Pediatr*, 2015, 166(3):571-575.
- [18] Amin SB, Wang H, Laroia N, et al. Unbound bilirubin and auditory neuropathy spectrum disorder in late preterm and term infants with severe jaundice [J]. *J Pediatr*, 2016, 173:84-89.
- [19] Amin SB, Saluja S, Saili A, et al. Auditory toxicity in late preterm and term neonates with severe jaundice [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2017, 59(3):297-303.
- [20] Morioka I. Hyperbilirubinemia in preterm infants in Japan: New treatment criteria [J]. *Pediatrics int*, 2018, 60(8):684-690.
- [21] American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation [J]. *Pediatrics*, 2004, 114(1):297-316.
- [22] Amin SB. Bilirubin Binding Capacity in the Preterm Neonate [J]. *Clin Perinatol*, 2016, 43(2):241-257.
- [23] Cashore WJ. Free bilirubin concentrations and bilirubin-binding affinity in term and preterm infants [J]. *J Pediatr*, 1980, 96(3 Pt 2):521-527.

(编辑 孙慧兰)