



恒河猴幼猴出生后生长发育参数背景数据 及其行为学特征

梁志刚¹, 吴明玲², 曾利才², 姚尊伟², 易思瑞², 李 蓉², 曹 东²,
毕凤均², 龚 立², 曾 文^{1, 2}

(1. 四川抗菌素工业研究所, 成都 610052; 2. 四川普莱美生物科技集团有限公司, 成都 610041)

【摘要】 目的 研究恒河猴幼猴出生后 12 个月的生长发育变化特征及神经行为学特征, 建立生长发育参数背景参考数据。**方法** 选取单笼条件下出生的、遗传背景清晰、出生天数明确的 18 只(雄性 11 只, 雌性 7 只)恒河猴幼猴, 于出生后第 1 天至 360 天每月进行体重、身高、头围、胸围、前肢长、后肢长、冠臀长、尾长及肛门生殖器距离等生长发育指标的测量, 出生后第 28、175 和 360 天进行血液学、血液生化学和淋巴细胞亚群分析检测, 出生后第 208 天进行手指迷路测试。**结果** 体重呈线性增长, 性别间差异无显著性($P > 0.05$); 形态发育指标中除肛门生殖器距离雄性显著大于雌性外($P < 0.01$), 其余指标在各检测点性别间差异均无显著性($P > 0.05$); 血液学各指标性别间差异无显著性($P > 0.05$), 出生后第 175 和 360 天的 RBC 和 HGB 显著高于第 28 天($P < 0.05$); 与出生后第 28 天相比, 血液生化学中 TP 和 BUN 水平在出生后第 175 和 360 天均显著升高($P < 0.01$), ALP 虽表现为降低, 但差异不显著($P > 0.05$); 与出生后第 28 天相比, 淋巴细胞亚群中 $CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 比值在出生后第 175 和 360 天均显著降低($P < 0.01$), 而 $CD8^+$ 比例显著升高($P < 0.01$); 手指迷路测试中, 学习期幼猴完成任务 2 所需测试次数显著多于其他任务, 且雌性显著少于雄性($P < 0.05$), 其余任务性别间差异无显著性($P > 0.05$); 记忆期连续 2 天随机测试雌性幼猴的正确率均显著高于雄性幼猴($P < 0.05$)。**结论** 体重及形态发育指标与出生天数呈线性增长, 血液学、血液生化学和淋巴细胞亚群指标中 RBC、HGB、LYMPH、TP、BUN、ALP、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 等出现了与幼猴器官系统生长发育相关的改变, 在药物评价中应重点关注, 手指迷路测试提示雌性幼猴逆转学习能力及长期记忆优于雄性幼猴。本研究建立了恒河猴幼猴出生后 12 个月生长发育参数的背景数据及神经行为学特征, 为恒河猴生殖发育毒性评价提供了参考依据及数据支持。

【关键词】 恒河猴; 幼猴; 生殖发育毒性; 背景数据; 手指迷路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 04-0024-11

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 04. 005

Growth and developmental parameters and behavioral characteristics of infant rhesus monkeys

LIANG Zhi-gang¹, WU Ming-ling², ZENG Li-cai², YAO Zun-wei²,
YI Si-rui², LI Rong², CAO Dong², BI Feng-jun², GONG Li², ZENG Wen^{1, 2}
(1. Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610052, China;
2. Sichuan Primed Bio-Tech Group Co., Ltd, Chengdu 610041, China)

【基金项目】 四川省科技计划项目青年基金(2015JQ0059); 四川省科技计划项目支撑计划(2015SZ0012)。

【作者简介】 梁志刚(1988-), 男, 硕士研究生, 药理毒理学。E-mail: liangzhigang88@163.com。

【通讯作者】 曾文(1970-), 女, 博士, 主要从事非人灵长类疾病模型及转化医学研究。E-mail: zengwen10@vip.163.com。

【Abstract】 Objective To explore the growth and developmental parameters and behavioral characteristics of rhesus monkeys during the first year of birth and to establish the background data. **Methods** A total of 18 ($\delta = 11$, $\varphi = 7$) infant rhesus monkeys born from individually caged mothers and with known genetic background and postnatal days were monitored monthly for body weight, body height, head circumference, chest circumference, forelimb length, hind limb length, crown-rump length, tail length and anal-genital distance from postnatal day (PND) 1 to 360, while hematology, blood chemistry and lymphocyte subsets were examined on PND 28, 175 and 360, and finger maze test was carried out on PND 208. **Results** The body weight showed linear growth with no significant difference between genders ($P > 0.05$). Except for the anal-genital distance of male infants was significantly greater than that of female infants ($P < 0.01$), no significant differences were observed between sexes in other morphological parameters. No significant differences of hematology were seen between genders ($P > 0.05$). Compared with that at PND28, TP and BUN were significantly increased ($P < 0.01$) while ALP decreased with no significant difference ($P > 0.05$) at PND 175 and 360. Compared with that at PND28, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ were significantly decreased ($P < 0.01$) while $CD8^+$ significantly increased ($P < 0.01$) at PND175 and 360. The number of sessions to solve task 2 in learning test was significantly greater than other tasks with females significantly less than males ($P < 0.05$). The females had higher correct rate than males in the 2-day random memory test ($P < 0.05$). **Conclusions** Body weight and morphological parameters show a linear growth. The PND. The RBC, HGB, LYMPH, TP, BUN, ALP, $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in hematology, blood chemistry and lymphocyte subsets show relevant changes to the growth and development of organs and systems in infants, which should be highly concerned in drug evaluation. The finger maze test indicates that female infants have better reversal learning and long-term memory than male infants. Background data and behavioral characteristics of infant rhesus monkeys during the first 12 months of birth are established in this study, which provide useful reference and support the evaluation of developmental and reproductive toxicity of drugs in rhesus monkeys.

【Key words】 Rhesus monkey; Infant; Developmental toxicity; Reproductive toxicity; Behavioral characteristics; Background data; Finger maze test

生殖发育毒性 (developmental and reproductive toxicity, DART) 评价是药物临床前安全性评价的重要组成部分,常用的评价模型为大鼠、小鼠以及家兔^[1,2]。由于大多数生物技术药物在种属特异性、免疫原性、药理学活性及体内代谢分布等方面都与小分子药物存在显著差异^[3],因此在开展此类药物的 DART 评价时通常选用具有药理学相关性且与人类更加接近的非人灵长类 (non-human primates, NHPs)^[4-7]。

近年来由于生物技术药物的快速发展,利用 NHPs 进行生殖发育毒性评价已越来越普遍^[8-12]。恒河猴是中国境内分布最多最广的非人灵长类动物^[13],其作为药物 DART 评价中最常用的 NHPs 之一^[14-16],在新药安全性评价中扮演着重要角色。近几年提出的“强化的”出生前后发育毒性试验 (enhanced pre- and postnatal development, ePPND) 不仅可减少整体动物的使用,同时也能保证每组有足够的动物数以完成对妊娠中晚期暴露的功能性评价^[17-19]。其产后观察期最常见为 6 ~ 12 个月^[20],评价终点主要包括幼猴出生后的临床观察、体重及形态发育监测、行为学测试,神经和免疫系统评价等^[21]。然而,目前正常恒河猴幼猴生长发育

的数据往往因为观测指标或观测时间有限^[22,23],往往不能全面地反映其正常的生长发育情况,从而无法为药物 DART 评价提供足够的参考信息。

本研究旨在通过动态监测单笼饲养条件下出生的、遗传背景清晰、且出生天数明确的正常恒河猴幼猴出生后 12 个月的体重、形态发育、血液学、血液生化学、淋巴细胞亚群及手指迷路测试的数据,明确其生长发育变化特征及神经行为学特征并建立背景数据,为恒河猴用于生物技术药物 DART 评价提供参考依据和数据支持。

1 材料和方法

1.1 F1 动物选择

我们前期的研究工作已经完成了妊娠猴的诊断及生理学特征背景数据的建立^[24,25]。前期入选普通级性成熟的 96 只健康雌性恒河猴,体重 5.0 ~ 8.5 kg,与 16 只健康雄性恒河猴 (结核杆菌、寄生虫、沙门氏菌属、志贺菌属以及带状疱疹 B 病毒查均为阴性),体重 5.0 ~ 12.0 kg,采用后宫式交配法 (雄:雌 = 1:6) 同笼交配 7 d。同笼第 18 天,雌猴肌肉注射氯胺酮注射液镇静后,行腹部 B 超妊娠诊断,以发现孕囊为确诊怀孕,共得到孕猴 28 只,并进

行单笼饲养(规格:100 cm × 90 cm × 110 cm)。妊娠期间通过 B 超动态监测妊娠状态及胚胎/胎儿的存活状态,并监测胚胎/胎儿的头围、冠臀长和心率以评价胎儿宫内发育情况。用于交配的恒河猴均由雅安普莱美生物科技有限公司提供,生产许可证为 SCXK(川)2014-027,使用许可证为 SYXK(川)2014-186。

孕猴自然分娩,分娩当天确认幼猴存活状态,并记为幼猴出生第 0 天(postnatal day 0, PND0)。在排除宫内发育不良、死产、疾病和弃婴等异常动物后,共入选 18 只(雄性 11 只,雌性 7 只)正常恒河猴幼猴。所有动物均饲养于环境受控的动物房,室温 16℃ ~ 26℃,相对湿度 40 % ~ 70 %,换气次数每小时 8 ~ 10 次,每日 12 h/12 h 交替照明。幼猴离乳前由母猴抚养,出生第 180 天离乳,随机分笼后人工饲养于单笼,并按照少食多餐,营养均衡的原则给食,并配以适量果蔬,自由饮水,以保证幼猴的正常生长发育。

1.2 实验材料

B 型超声检测仪(迈瑞 DP50-Vet)、电子称重显示器(友声 XK3123)、软尺、全自动五分类血液分析仪(Sysmex XT-2000i)、全自动生化分析仪(Beckman Coulter Synchron CX4 PRO)、高速冷冻离心机(Thermo Scientific Sorvall ST16R)、流式细胞仪(BD Accuri C6)、湘仪 L-550 低速离心机、移液器(Eppendorf)、一次性真空采血管(河北鑫乐科技有限公司)、一次性真空采血针(上海康浓医疗器械有限公司)、流式管(BD Falcon)、美国贝克曼库尔特配套生化检测试剂、小鼠抗人 CD3-PerCP、CD4-FITC、CD8-PE、CD20-APC 抗体(BD Biosciences)、红细胞裂解液(eBioscience)、磷酸盐缓冲液(Lonza)、盐酸氯胺酮注射液(Bioniche Teoranta)、手指迷路装置、苹果。

1.3 实验方法

1.3.1 临床观察:幼猴出生后于每天上午下午观察两次,包括一般状态、摄食量、饮水量,粪便情况以及母子间行为,如理毛、哺乳及社会探索等并观察有无弃婴行为的发生。

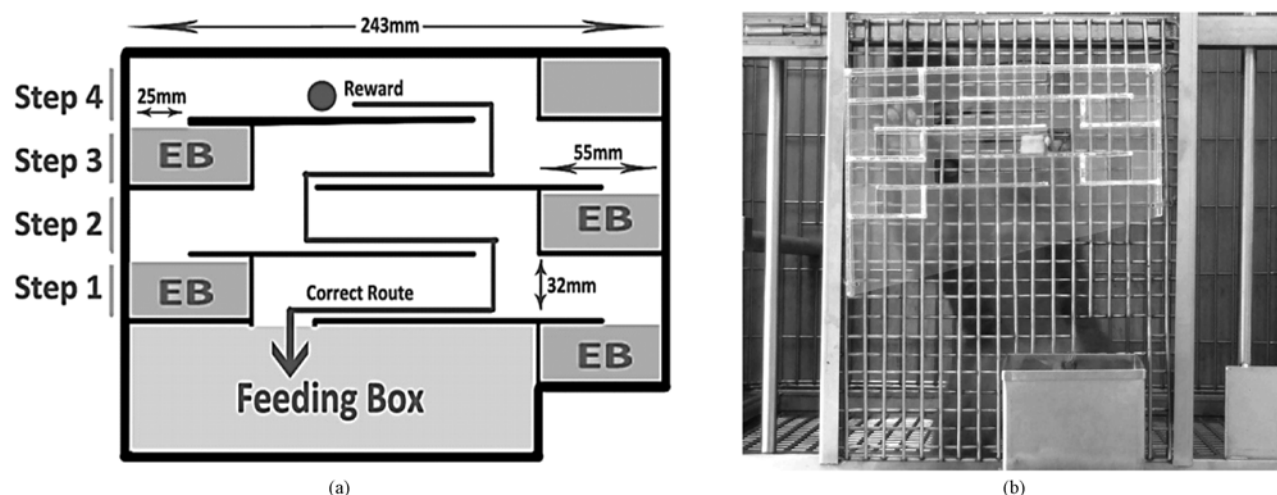
1.3.2 体重与形态发育指标测量:幼猴于 PND1、30、60、90、120、150、180、210、240、270、300、330 及 360 进行体重和形态发育指标的测定。形态发育指标的测量方法参考邹如金等^[26]和崔伟等^[22]的报道,包括:头围(head circumference, HC)、胸围

(chest circumference, CC)、前肢长(forelimb length, FLL)、后肢长(hind limb length, HLL)、冠臀长(crown-rump length, CRL)、身高(body height, BH)、尾长(tail length, TL)以及肛门生殖器距离(anal-genital distance, AGD)。

1.3.3 幼猴血样采集及检测:幼猴于 PND28、175 及 360 日晨经后肢静脉采集血液 2 mL。其中 1 mL 全血 EDTA-K2 抗凝后用于血液学及淋巴细胞亚群检测,剩余 1 mL 全血以 5 000 r/min 离心 10 min 后分离血清用于血液生化学检测。

血液学检测指标包括:红细胞计数(RBC)、血红蛋白含量(HGB)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、白细胞计数(WBC)、淋巴细胞计数(LYMPH)、中性粒细胞计数(NEUT)、单核细胞计数(MONO)、血小板计数(PLT)和平均血小板体积(MPV)。血液生化学指标包括:总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT)、胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、血糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(CR)、尿酸(UA)和肌酸激酶(CK)。淋巴细胞亚群指标包括:CD3⁺(T 淋巴细胞)、CD4⁺(辅助/诱导 T 淋巴细胞)、CD8⁺(抑制/细胞毒 T 淋巴细胞)及 CD20⁺(B 淋巴细胞)。

1.3.4 手指迷路测试:幼猴于 PND208 进行手指迷路测试,测试方法及测试装置(图 1)参考 Tsuchida 等^[27]和 Negishi 等^[28]的报道。迷路由 4 段组成,每段设有降落口和误差口,以苹果作为报酬,幼猴用手指将苹果成功地移动到降落口,最后可以从食盒获得苹果报酬。测试由适应期、学习期和记忆期组成,每天上午下午完成两部分测试,每部分测试包含 15 次试验。适应期幼猴须适应测试装置和测试人员,以能迅速(< 2 s)从食盒(或测试人员手中)取回苹果作为进入学习期的标准。学习期测试依次由任务 1、2、3、4 组成,分别对应测试装置的第 1、2、3、4 步。在任务 1 开始前,苹果被放置于装置第 1 步,幼猴需在避免将苹果落入误差盒的前提下,将苹果移至食盒并迅速取回。幼猴成功取回苹果(试验正确)或将苹果落入误差盒(试验错误)记为 1 次试验完成,当幼猴在连续的两部分测试中,每部分均完成 ≥ 14 次正确试验时方可进入下一任务,在



注: (a) 手指迷路测试装置示意图, 开放区域为迷路部分, 灰色区域为误差盒 (EB) 和食盒 (feeding box), 报酬 (reward) 为一小块苹果, 从下往上依次为测试第 1、2、3、4 步; (b) 一只幼猴正在进行手指迷路测试。

图 1 4 步非校正法手指迷路测试

Note. (a) Schematic diagram of the finger maze test apparatus. Open area: maze section, shaded area: error box (EB) and feeding box, reward: a piece of apple, from the bottom: step 1, step 2, step 3, and step 4; (b) Photograph of an infant monkey trying the finger maze test to obtain a reward.

Fig. 1 Four-step non-correction-method-type finger maze test

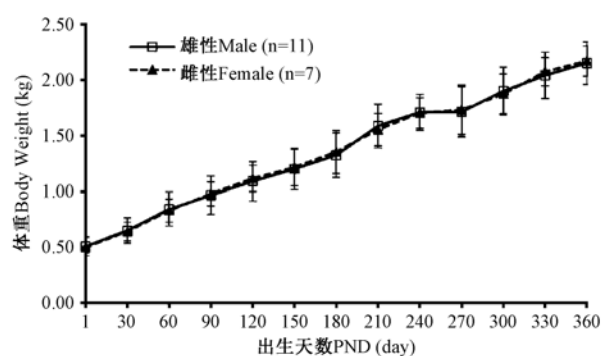


图 2 雌、雄恒河猴幼猴出生后体重变化情况

Fig. 2 Changes of body weight of the male and female infant rhesus monkeys

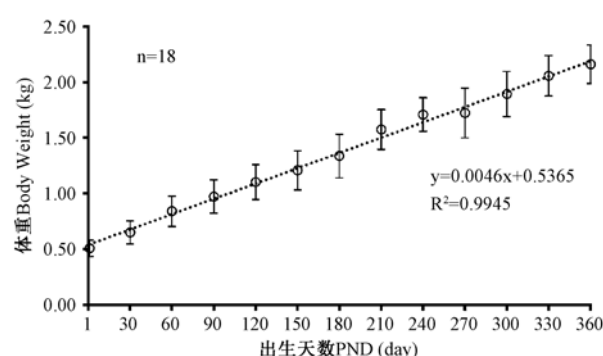


图 3 恒河猴幼猴出生后体重与出生后天数的关系

Fig. 3 Relation between body weight and postnatal days in the infant rhesus monkeys

完成全部 4 个任务后整个学习期结束。记忆期测试在学习期结束 2 个月后的连续 2 d 进行, 每天各完成一部分测试, 每部分测试包含 16 次试验, 苹果由测试人员随机放置, 每步放置 4 个。学习期及记忆期测试时记录幼猴正确和错误试验的次数。

1.3.5 统计方法: 所有数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 数据分析采用 IBM SPSS Statistics 20.0 完成, 图表绘制采用 Microsoft Excel 2013 完成。不同检测时间点的数据比较运用单因素方差进行分析, 不同性别的数据比较运用独立样本 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有高度统计学意义。

2 结果

2.1 体重

雌、雄恒河猴幼猴出生后 12 个月的体重变化情况见表 1, 性别间无显著差异 ($P > 0.05$)。对雌、雄幼猴不同检测时间点的体重进行作图分析 (图 2), 可见雌、雄幼猴的体重随出生天数的增加而增加, 且雌、雄幼猴间体重呈同步增长 ($r = 0.999$)。进一步对所有幼猴的体重 (y) 与出生天数 (x) 进行线性回归分析, 得到关系式 $y = 0.0046x + 0.5365$, $R^2 = 0.9945$ (图 3)。

2.2 形态发育

雌、雄恒河猴幼猴出生后各形态发育指标变化

情况见表 1, 各指标均呈线性增长。除肛门生殖器距离表现为雄性显著大于雌性外 ($P < 0.01$), 其余指标在各检测点性别间差异均无显著性 ($P > 0.05$)。各指标中身高增长最快, 约 0.0668 cm/d , 且与后肢长增长显著相关 ($r = 0.999$); 而肛门生殖器距离增长最慢, 雄性约 0.0066 cm/d , 雌性约 0.0019 cm/d 。

2.3 血液学与血液生化学

雌、雄恒河猴幼猴的血液学与血液生化学指标变化情况见表 2、表 3。与 PND28 相比, 血液学指标中 RBC、HGB 和 MCHC 在 PND175 和 360 显著升高 ($P < 0.05$), MCV、MCH 显著降低 ($P < 0.05$), HCT 无显著变化 ($P > 0.05$); WBC、LYMPH 及 NEUT 在 PND175 显著升高 ($P < 0.01$); PLT 及 MPV 在 PND360 显著降低 ($P < 0.01$)。血液学各指标在 PND28、175 和 360 性别间差异无显著性 ($P > 0.05$)。与 PND28 相比, 血液生化学指标中 TP、ALT 和 BUN 在 PND175 及 360 均显著升高 ($P < 0.05$), ALB 在 PND360 显著升高 ($P < 0.01$); AST、ALP、CR 和 LDL 的变化不显著 ($P > 0.05$)。雌性幼猴的 CHOL 在 PND360 低于雄性幼猴 ($P = 0.034$) 而 TG 则高于雄性幼猴 ($P = 0.015$), 其余指标性别间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 淋巴细胞亚群分析 (免疫表型检测)

雌、雄恒河猴幼猴淋巴细胞亚群的变化情况见表 4。与 PND28 相比, $CD4^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ 在 PND175 及 360 显著降低, 而 $CD8^+$ 显著升高 ($P < 0.01$); $CD3^+$ 在 PND175 显著降低 ($P < 0.05$); $CD20^+$ 在各检测点均无显著变化 ($P > 0.05$)。雌性

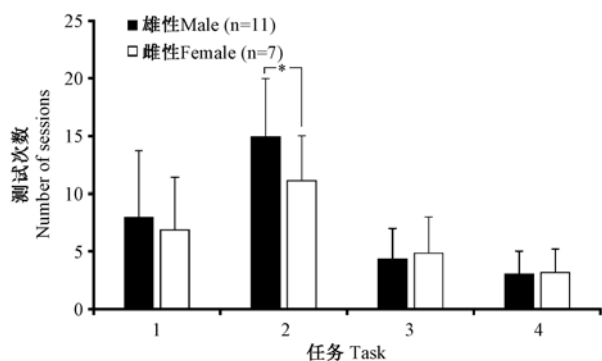
幼猴的 $CD8^+$ 在 PND28 显著低于雄性幼猴 ($P = 0.001$), $CD20^+$ 则高于雄性幼猴 ($P = 0.037$), 而 $CD4^+/CD8^+$ 在 PND28 及 360 均高于雄性幼猴 ($P = 0.001$, $P = 0.024$)。

2.5 手指迷路测试

雌、雄恒河猴幼猴手指迷路测试结果见图 4、图 5。在学习期测试中, 完成 4 项任务所需测试次数由多到少依次为: 任务 2 > 任务 1 > 任务 3 > 任务 4, 完成任务 2 所需的测试次数显著多于任务 1、3 和 4 ($P < 0.01$), 完成任务 1 所需测试次数显著多于任务 3 和 4 ($P < 0.05$), 完成任务 3 和 4 所需测试次数间差异无显著性 ($P > 0.05$); 除雄性完成任务 2 所需测试次数显著多于雌性外 ($P < 0.05$), 完成其余任务所需测试次数性别间差异无显著性 ($P > 0.05$)。在学习期结束 2 个月后的连续 2 天随机测试中, 第 2 天较第 1 天的正确率升高, 但差异无显著性 ($P > 0.05$); 而雌性幼猴的正确率在测试第 1 天和第 2 天均显著高于雄性幼猴 ($P < 0.05$)。

3 讨论

建立正常恒河猴幼猴出生后 12 个月的生长发育背景数据对恒河猴用于生物技术药物 DART 评价有着重要意义。体重及形态发育数据可为评价药物子宫内暴露提供重要信息, 血液学、血液生化学数据可评估药物对子代各器官系统生长发育的影响以及评价组织器官的生理状态, 而免疫表型及学习能力和记忆力的数据对评价药物对免疫系统和神经系统功能发育的影响也有着重要意义。

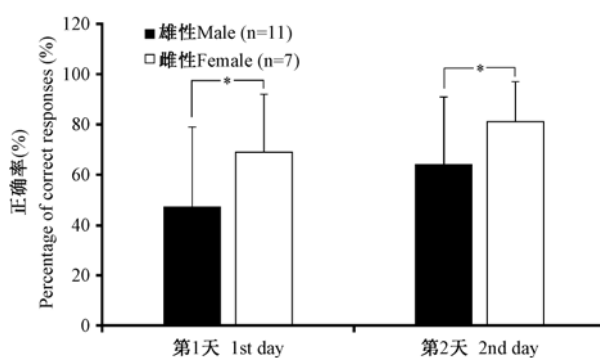


注: 与雄性比, * $P < 0.05$ 。

图 4 雌、雄恒河猴幼猴完成学习期各项任务所需的测试次数

Note. Compared with the males, * $P < 0.05$.

Fig. 4 Number of sessions for the male and female infant rhesus monkeys to solve each task in the learning test



注: 与雄性比, * $P < 0.05$ 。

图 5 雌、雄恒河猴幼猴记忆期测试的正确率

Note. Compared with the male, * $P < 0.05$.

Fig. 5 The correct rate of memory test in the male and female infant rhesus monkeys

表 1 雌、雄恒河猴幼猴体重及形态发育指标变化情况
Tab. 1 Changes of body weight and morphological development parameters of the male and female infant rhesus monkeys

出生天数 PND (day)	体重 BW (kg)	身高 BH (cm)	冠臂长 CRL (cm)	前肢长 FLL (cm)	后肢长 HLL (cm)	头围 HC (cm)	胸围 CC (cm)	尾长 TL (cm)	肛门生殖器距离 AGD (cm)
雄性 Male (n = 11)									
1	0.51 ± 0.09	28.6 ± 1.2	17.9 ± 1.1	16.3 ± 1.1	18.2 ± 1.2	19.7 ± 0.7	15.2 ± 1.0	9.8 ± 0.8	3.2 ± 0.4
30	0.65 ± 0.11	33.0 ± 1.8	21.1 ± 1.4	18.0 ± 1.1	20.0 ± 1.3	20.8 ± 0.7	16.6 ± 1.3	11.2 ± 1.1	3.5 ± 0.2
60	0.84 ± 0.15	36.9 ± 2.4	23.3 ± 1.7	19.6 ± 1.3	22.4 ± 1.5	21.7 ± 0.9	17.5 ± 1.5	12.4 ± 1.0	4.1 ± 0.3
90	0.97 ± 0.17	39.8 ± 2.2	24.6 ± 2.0	21.1 ± 1.6	24.3 ± 1.5	22.5 ± 0.8	18.7 ± 1.4	13.2 ± 1.1	4.4 ± 0.3
120	1.09 ± 0.18	41.8 ± 2.6	26.1 ± 2.1	22.1 ± 1.5	25.2 ± 1.3	22.8 ± 0.6	19.1 ± 1.6	13.5 ± 1.1	4.5 ± 0.4
150	1.20 ± 0.18	43.7 ± 2.2	27.1 ± 1.6	22.7 ± 1.1	26.1 ± 1.2	23.1 ± 0.6	20.1 ± 1.1	13.8 ± 1.1	4.8 ± 0.4
180	1.32 ± 0.20	45.8 ± 2.3	27.6 ± 1.4	23.3 ± 1.1	27.0 ± 1.3	23.3 ± 0.6	20.7 ± 1.3	14.1 ± 1.3	4.9 ± 0.3
210	1.59 ± 0.20	46.7 ± 1.9	28.2 ± 1.3	23.8 ± 1.2	27.5 ± 1.4	23.4 ± 0.7	22.5 ± 1.6	14.3 ± 1.3	5.0 ± 0.5
240	1.71 ± 0.16	48.2 ± 1.9	28.9 ± 1.1	24.1 ± 1.3	27.9 ± 1.3	23.6 ± 0.7	23.4 ± 1.3	14.3 ± 1.3	5.0 ± 0.5
270	1.71 ± 0.23	48.7 ± 1.9	29.3 ± 1.0	24.2 ± 1.2	28.1 ± 1.4	23.8 ± 0.9	23.7 ± 1.0	14.3 ± 1.4	5.1 ± 0.6
300	1.90 ± 0.22	49.7 ± 1.7	29.4 ± 1.3	24.6 ± 1.1	28.6 ± 1.2	23.9 ± 0.9	23.8 ± 1.9	14.4 ± 1.3	5.1 ± 0.5
330	2.04 ± 0.21	50.8 ± 2.9	30.9 ± 1.9	25.0 ± 1.4	29.2 ± 1.6	24.0 ± 0.8	24.1 ± 1.6	14.5 ± 1.5	5.0 ± 0.5
360	2.15 ± 0.19	52.9 ± 2.4	32.2 ± 1.6	26.4 ± 1.5	30.5 ± 1.7	24.7 ± 0.8	25.4 ± 1.7	15.1 ± 1.5	5.5 ± 0.6
雌性 Female (n = 7)									
1	0.50 ± 0.05	29.3 ± 1.8	18.3 ± 1.2	16.2 ± 0.8	18.1 ± 1.0	19.6 ± 1.2	14.9 ± 1.1	9.9 ± 1.1	1.7 ± 0.4
30	0.64 ± 0.08	32.8 ± 1.6	20.7 ± 1.0	17.6 ± 0.6	19.7 ± 0.6	20.2 ± 0.4	16.2 ± 0.7	11.1 ± 1.0	1.6 ± 0.3
60	0.83 ± 0.10	37.0 ± 1.3	23.0 ± 1.0	19.1 ± 0.6	22.0 ± 0.6	21.5 ± 0.4	17.4 ± 0.9	12.0 ± 1.2	1.6 ± 0.3
90	0.98 ± 0.11	40.1 ± 1.8	24.3 ± 0.9	20.7 ± 0.8	24.0 ± 0.6	22.3 ± 0.7	18.6 ± 0.8	12.7 ± 1.1	1.6 ± 0.3
120	1.12 ± 0.12	42.1 ± 1.3	25.8 ± 1.0	21.8 ± 0.7	25.4 ± 0.5	22.8 ± 0.5	19.1 ± 0.9	13.2 ± 1.3	1.8 ± 0.4
150	1.21 ± 0.16	44.4 ± 1.1	26.9 ± 1.0	22.5 ± 0.8	26.2 ± 0.8	22.9 ± 0.7	20.3 ± 1.2	13.4 ± 1.4	2.0 ± 0.3
180	1.35 ± 0.19	45.9 ± 1.2	27.8 ± 0.6	23.2 ± 0.6	27.0 ± 0.8	23.3 ± 0.5	20.8 ± 1.3	13.8 ± 1.4	2.1 ± 0.3
210	1.55 ± 0.15	47.2 ± 1.9	28.6 ± 1.3	23.7 ± 1.0	27.6 ± 1.0	23.5 ± 0.4	22.2 ± 1.1	13.7 ± 1.3	2.2 ± 0.4
240	1.71 ± 0.14	48.1 ± 1.7	28.9 ± 1.3	23.9 ± 0.9	27.9 ± 0.9	23.5 ± 0.4	23.4 ± 0.9	13.8 ± 1.3	2.3 ± 0.3
270	1.73 ± 0.22	49.1 ± 1.8	29.2 ± 1.2	24.1 ± 0.9	28.4 ± 0.9	23.5 ± 0.4	23.4 ± 1.5	13.8 ± 1.4	2.3 ± 0.3
300	1.88 ± 0.18	50.2 ± 1.6	29.6 ± 1.1	24.6 ± 0.9	28.9 ± 1.0	23.8 ± 0.3	23.6 ± 1.2	13.9 ± 1.3	2.3 ± 0.3
330	2.08 ± 0.13	51.4 ± 1.8	31.2 ± 1.3	25.0 ± 0.9	29.5 ± 0.8	24.2 ± 0.5	24.9 ± 1.2	14.1 ± 1.4	2.3 ± 0.3
360	2.17 ± 0.14	53.2 ± 1.7	32.0 ± 1.2	26.1 ± 0.9	30.4 ± 0.6	24.4 ± 0.5	25.4 ± 0.9	14.4 ± 1.2	2.4 ± 0.4

表 2 雌、雄恒河猴幼猴血液学指标变化情况
Tab. 2 Hematological changes of the infant male and female rhesus monkeys

	雄性 Male (n = 11)				雌性 Female (n = 7)				合计 Both genders (n = 18)			
	PND28	PND175	PND360	PND175	PND28	PND175	PND360	PND175	PND28	PND175	PND360	PND175
红细胞 RBC ($10^9/L$)	4.87±0.52	5.55±0.50	5.42±0.76	5.42±0.76	4.86±0.40	5.61±0.63	5.15±0.45	5.15±0.45	4.87±0.48	5.58±0.56**	5.31±0.67**	5.31±0.67**
血红蛋白 HGB (g/L)	123±14	133±14	132±15	132±15	120±12	135±15	126±12	126±12	122±14	134±15**	129±14*	129±14*
红细胞压积 HCT (%)	39.1±4.3	39.5±3.5	39.4±5.7	39.4±5.7	38.4±3.1	39.5±3.1	37.6±3.1	37.6±3.1	38.8±3.9	39.5±3.3	38.7±4.9	38.7±4.9
平均红细胞体积 MCV (fL)	80.4±3.3	71.5±6.9	72.5±2.5	72.5±2.5	79.0±3.0	71.1±7.8	73.1±3.0	73.1±3.0	79.8±3.3	71.3±7.3**	72.8±2.7**	72.8±2.7**
平均红细胞血红蛋白量 MCH (pg)	25.2±1.4	24.0±2.2	23.7±1.6	23.7±1.6	24.7±1.7	24.1±2.2	24.3±1.6	24.3±1.6	25.0±1.5	24.0±2.2*	23.9±1.6**	23.9±1.6**
平均红细胞血红蛋白浓度 MCHC (g/L)	313±8	337±26	326±19	326±19	313±12	341±24	332±21	332±21	313±10	338±25**	329±20**	329±20**
白细胞 WBC ($10^{12}/L$)	6.92±2.61	10.89±2.77	8.00±2.75	8.00±2.75	7.46±2.98	11.44±2.76	9.28±2.35	9.28±2.35	7.14±2.78	11.12±2.78**	8.52±2.67	8.52±2.67
淋巴细胞 LYMPH ($10^9/L$)	4.09±2.19	6.33±2.35	3.98±1.87	3.98±1.87	4.14±2.54	5.71±1.56	4.29±1.12	4.29±1.12	4.11±2.34	6.07±2.08**	4.11±1.62	4.11±1.62
中性粒细胞 NEUT ($10^9/L$)	1.98±0.85	3.38±1.44	2.05±0.92	2.05±0.92	2.25±1.03	3.85±1.89	2.52±0.75	2.52±0.75	2.10±0.94	3.57±1.66**	2.23±0.89	2.23±0.89
单核细胞 MONO ($10^9/L$)	0.98±0.56	1.46±0.62	2.02±1.37	2.02±1.37	1.16±0.55	1.53±0.55	2.17±1.43	2.17±1.43	1.05±0.56	1.49±0.60**	2.08±1.39**	2.08±1.39**
血小板 PLT ($10^9/L$)	361±101	362±91	310±96	310±96	385±72	359±109	259±87	259±87	371±91	360±99	289±96**	289±96**
平均血小板体积 MPV (fL)	10.3±1.1	10.3±3.3	9.5±1.4	9.5±1.4	10.4±0.9	9.5±2.1	9.2±1.2	9.2±1.2	10.3±1.0	10.0±2.9	9.4±1.3**	9.4±1.3**

注:与 PND28 比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the PND28 monkeys, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 3 雌、雄恒河猴幼猴血液生化指标变化情况

	Tab. 3 Changes of blood biochemical parameters in the male and female infant rhesus monkeys					
	雄性 Male (n = 11)			雌性 Female (n = 7)		
	PND28	PND175	PND360	PND28	PND175	PND360
总蛋白 TP (g/L)	59.9 ± 4.9	68.0 ± 4.0	68.9 ± 4.3	58.8 ± 4.0	68.3 ± 6.5	69.7 ± 3.1
白蛋白 ALB (g/L)	32.2 ± 1.5	33.2 ± 3.1	36.9 ± 2.4	32.8 ± 2.0	33.3 ± 3.9	37.3 ± 2.8
总胆红素 TBIL (μmol/L)	6.6 ± 1.6	3.9 ± 2.0	6.0 ± 1.2	6.3 ± 1.8	4.0 ± 1.4	6.4 ± 1.2
直接胆红素 DBIL (μmol/L)	0.9 ± 0.8	0.6 ± 0.6	0.8 ± 0.5	0.8 ± 0.6	0.4 ± 0.3	0.9 ± 0.6
谷草转氨酶 AST (IU/L)	33.2 ± 9.8	31.4 ± 10.0	31.2 ± 5.7	35.2 ± 11.2	34.0 ± 14.0	34.7 ± 6.2
谷丙转氨酶 ALT (IU/L)	21.1 ± 10.1	26.2 ± 11.4	32.1 ± 5.8	22.8 ± 4.5	29.5 ± 20.5	37.7 ± 14.0
碱性磷酸酶 ALP (IU/L)	776.9 ± 472.4	706.6 ± 171.2	711.5 ± 143.5	872.7 ± 312.2	782.7 ± 136.2	771.9 ± 225.2
谷氨酰转氨酶 GGT (IU/L)	133.5 ± 33.6	95.0 ± 28.3	80.7 ± 22.1	142.8 ± 34.4	97.5 ± 28.9	80.6 ± 14.9
胆固醇 CHOL (mmol/L)	4.15 ± 1.23	5.12 ± 1.10	3.31 ± 0.52	4.16 ± 1.27	4.74 ± 0.76	2.98 ± 0.41 [#]
甘油三酯 TG (mmol/L)	1.30 ± 0.83	0.50 ± 0.23	0.49 ± 0.16	1.25 ± 0.92	0.53 ± 0.22	0.63 ± 0.14 [#]
高密度脂蛋白 HDL (mmol/L)	1.80 ± 0.35	2.18 ± 0.51	1.41 ± 0.31	1.73 ± 0.39	2.13 ± 0.34	1.30 ± 0.21
低密度脂蛋白 LDL (mmol/L)	1.63 ± 0.88	2.07 ± 0.70	1.57 ± 0.37	1.68 ± 0.67	1.93 ± 0.47	1.36 ± 0.23
血糖 GLU (mmol/L)	5.49 ± 0.98	5.84 ± 1.23	4.72 ± 0.74	5.47 ± 0.64	5.38 ± 0.73	4.41 ± 0.62
血尿素氮 BUN (mmol/L)	3.9 ± 1.2	5.4 ± 1.3	6.6 ± 1.8	3.5 ± 0.7	4.8 ± 0.8	6.0 ± 1.7
肌酐 CR (mmol/L)	37.1 ± 13.4	38.6 ± 14.5	37.1 ± 10.0	36.6 ± 11.7	38.0 ± 14.4	35.5 ± 11.9
尿酸 UA (μmol/L)	16.7 ± 4.0	14.8 ± 2.9	12.1 ± 2.4	13.8 ± 1.3	13.1 ± 2.7	11.1 ± 2.0
肌酸激酶 CK (IU/L)	251.9 ± 132.6	243.0 ± 194.3	103.7 ± 42.0	205.7 ± 66.7	280.3 ± 167.6	109.4 ± 39.0

注:与雄性比, [#] $P < 0.05$; 与 PND28 比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。Note. Compared with the male monkeys, [#] $P < 0.05$; Compared with the PND28 monkeys, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

表 4 雌、雄恒河猴幼猴淋巴细胞亚群比例变化情况

	Tab. 4 Changes of the proportion of lymphocyte subsets in the male and female rhesus monkeys					
	雄性 Male (n = 11)			雌性 Female (n = 7)		
	PND28	PND175	PND360	PND28	PND175	PND360
CD3 ⁺ (%)	64.88 ± 10.78	59.91 ± 8.28	58.65 ± 9.14	60.89 ± 10.95	56.60 ± 11.87	60.88 ± 10.12
CD4 ⁺ (%)	42.08 ± 8.89	33.07 ± 6.52	31.43 ± 6.90	44.97 ± 9.33	33.28 ± 9.47	36.03 ± 9.39
CD8 ⁺ (%)	20.63 ± 6.40	26.19 ± 5.43	24.04 ± 6.50	14.76 ± 3.03 ^{##}	22.38 ± 7.37	21.31 ± 6.70
CD20 ⁺ (%)	22.22 ± 8.95	23.21 ± 8.44	24.18 ± 8.48	28.22 ± 7.17 [#]	26.05 ± 10.32	23.01 ± 7.93
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	2.28 ± 0.78	1.25 ± 0.49	1.42 ± 0.49	3.12 ± 0.72 ^{##}	1.57 ± 0.50	1.84 ± 0.76 [#]

注:与雄性比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与 PND28 比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。Note. Compared with the males, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; compared with the PND28 monkeys, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

本研究通过对正常恒河猴幼猴出生后 12 个月的体重和形态发育指标的动态监测发现,除雄性肛门生殖器距离显著大于雌性外,其余指标性别间均无显著差异,且幼猴的体重及各形态发育指标与出生天数呈线性增长关系。提示在药物 DART 评价中,若幼猴体重及形态发育指标(肛门生殖器距离除外)在 12 个月的观察期内出现显著的性别差异,或与预期体重及形态发育指标相比显著增加或降低时,可提示与药物导致的幼猴发育障碍有关。形态发育指标中身高增长最快,且与后肢长骨的增长密切相关,提示幼猴处于长骨迅速增长的时期,而肛门生殖器距离增长最慢,可能与幼猴体内缺乏性激素刺激有关。此外,头围可反映脑及颅骨的发育,胸围可反映肺及胸廓的发育,且胸围的增长速度大于头围^[29]。幼猴出生时胸围平均约 15.1 cm,比头围平均小 4.6 cm,至出生后 330 d 超过头围,若该交叉点延迟,可提示幼猴营养不良或药物导致发育迟缓^[29]。

国内外关于恒河猴血液学及血液生化学的数据已有较多报道^[30-36],但大多都针对青少年或成年恒河猴,关于幼年恒河猴特别是用于 DART 评价的出生后 12 个月内的幼年恒河猴的数据则较缺乏。本研究通过对恒河猴幼猴出生后 28、175 和 360 天的血液学、血液生化学的测定发现,血液学各指标性别间差异不明显。PND28 的 RBC 和 HGB 水平显著低于 PND175 和 PND360,且低于 Smucny 等^[31]报道的成年恒河猴的 RBC 水平,提示幼猴出生后可能存在造血功能的增强。HCT 无显著变化,MCV、MCH 和 MCHC 的变化与 RBC 和 HGB 升高有关。幼猴 LYMPH 水平比周建华等^[34]报道的成年恒河猴高,与人类婴幼儿报道一致^[37],且表现为 PND175 升高,而 PND360 又回到与 PND28 相当的水平,可能与幼猴免疫系统的发育有关。与 PND28 相比,TP、ALB 和 BUN 水平在 PND175 及 360 均升高,提示幼猴可能处于生长发育旺盛时期,其蛋白质合成与分解均增加。本研究中幼猴的 ALP 水平显著高于 Smucny^[31]等和周建华等^[34]报道的成年恒河猴的 ALP 水平,这一现象与人类的报道相似^[38],因 ALP 与骨的形成有关,其水平会随着个体的生长发育而逐渐降低, Lee 等^[36]在青少年恒河猴中也发现了类似的现象。其余指标的变化不具有生理学意义。

目前关于 NHPs 免疫系统发育的报道主要集中在幼猴出生前^[39-41],而幼猴出生后的报道则较缺

乏。虽然在出生时 NHPs 与人类的免疫系统在形态结构和细胞组成方面就已发展得较为完善,但其功能仍需在出生后阶段发育成熟^[39,40]。因此现有的报道中,绝大部分单克隆抗体类药物的 DART 评价都会对免疫系统功能进行评估^[8-11,42]。本研究中幼猴 CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 在 PND175 和 360 显著高于 PND28,而 CD8⁺ 则显著低于 PND28,与 Bowman 等^[42]报道的幼猴在 PND30、180 及 360 的变化一致,可能与幼猴细胞免疫功能的发育有关。本研究中 PND175 及 PND360 的 CD3⁺ 较 PND28 降低,CD20⁺ 则相对稳定,而 Martin 等^[10]、Enright 等^[11] 和 Bowman 等^[42]报道的正常幼猴的 CD3⁺ 则有不同程度升高,CD20⁺ 有不同程度的降低,可能与恒河猴和食蟹猴之间的种属间差异有关。

学习能力及记忆力评价是 DART 神经行为学评价的重要组成部分^[21],也是药物发育神经毒性评价的重要内容^[43]。手指迷路测试作为评价学习能力和记忆力的一种快速而简便的方法,已被列入儿科药物非临床安全性评价指南作为药物评价的参考方法^[44]。本研究通过手指迷路测试对恒河猴幼猴的学习能力及记忆力评价,发现幼猴学习期完成任务 2 所需测试次数显著多于其他任务,提示任务 2 的难度最大,测试时出现错误的次数最多,与 Tsuchida 等^[27]报道的一致。其主要原因一方面在于任务 2 移动苹果的方向与任务 1 恰好相反,要在测试初期判断移动苹果的正确方向对幼猴有一定的难度;另一方面是因为任务 2 涉及到对幼猴逆转学习能力及空间辨别能力的测试。雌性幼猴完成任务 2 所需的测试次数显著少于雄性幼猴,而其他任务性别间无显著差异,提示雌性幼猴的逆转学习能力可能优于雄性幼猴。学习期测试结束 2 个月后连续 2 d 的随机测试属于对幼猴长期记忆的测试,雌性幼猴 2 d 测试的正确率均显著高于雄性幼猴,提示雌性幼猴的长期记忆可能优于雄性幼猴,与人类女性的记忆力优于男性的报道一致^[45]。雌、雄幼猴记忆力测试第 2 天的正确率均较第 1 天升高,与 Inoue 等^[44]的报道一致,可能与第 1 天的测试内容促进了幼猴长期记忆的回忆和再认或与第 1 天测试强化了长期记忆有关,具体原因有待进一步研究。

综上所述,本研究通过对 18 只单笼饲养条件下出生的、遗传背景清晰、出生天数明确的恒河猴幼猴体重和形态发育指标的连续监测,获得了幼猴出生后 12 个月的体重及形态发育指标的动态数据,并

发现体重及形态发育指标与出生天数呈线性增长,且性别间无差异,为评价幼猴出生后生长发育情况提供了依据,同时也为 DART 试验中评价药物对幼猴生长发育的影响提供了参考数据。通过对出生后第 28、175 和 360 天的血液学、血液生化学和淋巴细胞亚群的测定分析,发现 RBC 和 HGB 的升高可能与幼猴出生后造血功能增强有关,LYMPH 的变化及其水平高于成年猴可能与幼猴免疫系统的发育有关,TP、ALB 和 BUN 升高可能与幼猴代谢旺盛、蛋白质合成和分解增加有关,ALP 显著高于成年猴可能与幼猴骨骼的生长发育旺盛有关,CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 的升高及 CD3⁺、CD8⁺ 的降低可能与幼猴细胞免疫功能的发育有关,提示在药物 DART 评价中,要特别关注上述指标的变化,并区分这些变化是否由药物引起。通过出生后第 208 天的手指迷路测试对幼猴的学习能力及记忆力评价,发现雌性幼猴的逆转学习能力及长期记忆均优于雄性幼猴,提示在药物 DART 评价中同样需要注意对这种正常的生理差异与药物导致的差异进行区分。本研究建立了恒河猴幼猴出生后的生长发育背景参数,明确了各生长发育指标的变化特征及神经行为学特征,为恒河猴用于生殖发育毒性研究提供了参考依据和数据支持。

参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理局. 药物生殖毒性研究技术指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006-2007: 143-68.
- [2] Faqi AS. A critical evaluation of developmental and reproductive toxicology in nonhuman primates [J]. *Systems Biol Reprod Med*, 2012, 58(1): 23-32.
- [3] Buckley LA, Benson K, Davis-Bruno K, et al. Nonclinical aspects of biopharmaceutical development: discussion of case studies at a PhRMA-FDA workshop [J]. *Int J Toxicol*, 2008, 27(4): 303-312.
- [4] 魏振年. 猕猴的生殖生理及科研应用 [J]. *动物学杂志*, 1988, 23(6): 46-50.
- [5] Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, et al. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome [J]. *Science*, 2007, 316(5822): 222-234.
- [6] Chapman K, Pullen N, Graham M, et al. Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance [J]. *Nature Rev Drug Discov*, 2007, 6(2): 120-126.
- [7] Weinbauer GF, Frings W, Fuchs A, et al. Reproductive/developmental toxicity assessment of biopharmaceuticals in nonhuman primates [M]. *Pharmaceut Sci Encycl*, Wiley online Library, 2010. DOI: 10.1002/9780470571224.pse177
- [8] Martin PL, Oneda S, Treacy G. Effects of an anti-TNF- α monoclonal antibody, administered throughout pregnancy and lactation, on the development of the macaque immune system [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2007, 58(2): 138-149.
- [9] Wehner NG, Shopp G, Oneda S, et al. Embryo/fetal development in cynomolgus monkeys exposed to natalizumab, an $\alpha 4$ integrin inhibitor [J]. *Birth Defects Res Part B: Dev Reprod Toxicol*, 2009, 86(2): 117-130.
- [10] Martin PL, Sachs C, Imai N, et al. Development in the cynomolgus macaque following administration of ustekinumab, a human anti-il-12/23p40 monoclonal antibody, during pregnancy and lactation [J]. *Birth Defects Res Part B: Dev Reprod Toxicol*, 2010, 89(5): 351-363.
- [11] Enright BP, Tornesi B, Weinbauer GF, et al. Pre-and postnatal development in the cynomolgus monkey following administration of ABT-874, a human anti-IL-12/23p40 monoclonal antibody [J]. *Birth Defects Res Part B: Dev Reprod Toxicol*, 2012, 95(6): 431-443.
- [12] Boyce RW, Varela A, Chouinard L, et al. Infant cynomolgus monkeys exposed to denosumab in utero exhibit an osteoclast-poor osteopetrotic-like skeletal phenotype at birth and in the early postnatal period [J]. *Bone*, 2014, 64: 314-325.
- [13] 曾文. 恒河猴川西亚种生物学特性背景数据建立及在新药评估中的应用研究 [D]. 四川农业大学, 2010.
- [14] Buse E, Habermann G, Osterburg I, et al. Reproductive/developmental toxicity and immunotoxicity assessment in the nonhuman primate model [J]. *Toxicology*, 2003, 185(3): 221-227.
- [15] Martin PL, Weinbauer GF. Developmental toxicity testing of biopharmaceuticals in nonhuman primates: previous experience and future directions [J]. *Int J Toxicol*, 2010, 29(6): 552-568.
- [16] Faqi AS. A primate as an animal model for reproductive and developmental toxicity testing [J]. *Reprod Dev Toxicol*, 2011, 207-218.
- [17] Stewart J. Developmental toxicity testing of monoclonal antibodies: an enhanced pre-and postnatal study design option [J]. *Reprod Toxicol*, 2009, 28(2): 220-225.
- [18] Weinbauer GF, Fuchs A, Niehaus M, et al. The enhanced pre-and postnatal study for nonhuman primates: Update and perspectives [J]. *Birth Defects Res Part C: Embryo Today: Rev*, 2011, 93(4): 324-333.
- [19] Weinbauer GF, Luft J, Fuchs A. The enhanced pre-and postnatal development study for monoclonal antibodies [M]// *Teratogenicity Testing*. Humana Press, 2013: 185-200.
- [20] 袁芳, 潘晓靓, 林海霞, 等. 非人灵长类模型在生殖发育毒性评价中的应用 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 9: 012.
- [21] Chellman GJ, Bussiere JL, Makori N, et al. Developmental and reproductive toxicology studies in nonhuman primates [J]. *Birth Defects Res Part B: Dev Reprod Toxicol*, 2009, 86(6): 446-462.
- [22] 崔伟, 李春花, 匡德宣, 等. 人工繁育恒河猴婴儿生长发育

- 指标的测定分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(12): 734-736.
- [23] 范春梅, 李志雄, 周建华. 猕猴新生仔猴发育指标的建立 [J]. 福建畜牧兽医, 2008, 30(2): 24-24.
- [24] 吴明玲. 妊娠恒河猴器官形成期至分娩母体—胎儿发育临床参数的变化特征 [D]. 四川抗菌素工业研究所, 2015.
- [25] Wu ML, Gong L, Qian C, et al. Characteristics of blood chemistry, hematology, and lymphocyte subsets in pregnant rhesus monkeys [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(6): 409-414.
- [26] 邹如金, 杨上川, 季维智. 滇金丝猴幼仔的生长发育 [J]. 四川动物, 1999, 18(1): 12-14.
- [27] Tsuchida J, Kawasaki K, Sankai T, et al. New type of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis* [J]. Int J Primatol, 2003, 24(2): 261-270.
- [28] Negishi T, Shimomura H, Koyama T, et al. Gestational and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects social behaviors between developing rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. Toxicol Lett, 2006, 160(3): 233-244.
- [29] 李慧萍, 赖永洪. 婴儿胸围/头围比的动态变化及其意义初探 [J]. 广州医学院学报, 1996(4): 14-17.
- [30] 代解杰, 唐东红, 鲁帅尧, 等. 人工饲养条件下恒河猴血液学, 血液生化正常参考值测定及分析 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 8(4): 224-230.
- [31] Smucny DA, Allison DB, Ingram DK, et al. Changes in blood chemistry and hematology variables during aging in captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. J Medl Primatol, 2001, 30(3): 161-173.
- [32] Hassimoto M, Harada T, Harada T. Changes in hematology, biochemical values, and restraint ECG of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following 6-month laboratory acclimation [J]. J Med Primatol, 2004, 33(4): 175-186.
- [33] 季芳, 饶军华, 刘晓明. 人工饲养恒河猴血液生化正常参考值的测定与分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6): 345-349.
- [34] 周建华, 范春梅, 李志雄. 恒河猴血液细胞, 生化和凝血功能正常参考指标的测定 [J]. 福建畜牧兽医, 2006, 28(4): 6-9.
- [35] Chen Y, Qin S, Ding Y, et al. Reference values of clinical chemistry and hematology parameters in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. Xenotransplantation, 2009, 16(6): 496-501.
- [36] Lee JI, Shin JS, Lee JE, et al. Reference values of hematology, chemistry, electrolytes, blood gas, coagulation time, and urinalysis in the Chinese rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. Xenotransplantation, 2012, 19(4): 244-248.
- [37] Luster MI, Johnson VJ, Yucesoy B, et al. Biomarkers to assess potential developmental immunotoxicity in children [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 206(2): 229-236.
- [38] Van Hoof VO, Hoylaerts MF, Geryl H, et al. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis [J]. Clin Chem, 1990, 36(6): 875-878.
- [39] Hendrickx AG, Makori N, Peterson P. The nonhuman primate as a model of developmental immunotoxicity [J]. Human Exp Toxicol, 2002, 21(9-10): 537-542.
- [40] Buse E. Development of the immune system in the cynomolgus monkey: the appropriate model in human targeted toxicology? [J]. J Immunotoxicol, 2005, 2(4): 211-216.
- [41] 林志, 崔岚, 黄瑛, 等. 非人灵长类动物主要免疫器官及免疫细胞的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 751-754.
- [42] Bowman CJ, Evans M, Cummings T, et al. Developmental toxicity assessment of tanezumab, an anti-nerve growth factor monoclonal antibody, in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. Reprod Toxicol, 2014, 53:105-118.
- [43] Ladics GS, Chapin RE, Hastings KL, et al. Developmental toxicology evaluations—issues with including neurotoxicology and immunotoxicology assessments in reproductive toxicology studies [J]. Toxicol Sci, 2005, 88(1): 24-29.
- [44] Inoue A, Arima A, Kato H, et al. Utility of finger maze test for learning and memory abilities in infants of cynomolgus monkeys exposed to thiamazole [J]. Cong Anomal, 2014, 54(4): 220-224.
- [45] Halpern DF, LaMay ML. The smarter sex: a critical review of sex differences in intelligence [J]. Educ Psychol Rev, 2000, 12(2): 229-246.

[修回日期]2016-01-13