

应用植入遥测技术对恒河猴部分生理指标的观测

卢祺炯, 陈敏华, 徐 聪, 邓 军, 徐志伟, 宣尧仙*

(长三角绿色制药协同创新中心药物安全性评价团队, 浙江省医学科学院安全性评价研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 应用植入遥测技术观测清醒恒河猴呼吸、血压、心电、体温等生理指标的昼夜变化规律和应激时的变化。**方法** 取 3~5 岁雌雄各半的 8 只恒河猴行遥测植入手术, 恢复 3 周后用 DSI 遥测系统获取清醒无束缚恒河猴连续 24 h 的呼吸、血压、心电、体温数据, 用 Ponemah 软件分析上述指标并统计实验结果。**结果** 恒河猴的部分心电指标存在明显的昼夜差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中心率 (HR) 的昼夜均值在每分钟 155.0~122.4 次之间波动; 呼吸频率间期 (RR-I) 为 410.8~535.7 ms; T 波幅度 (T-A) 为 0.181~0.157 mV; PR 间期 (PR-I) 为 80.4~87.4; QT 间期 (QT-I) 为 224.8~263.9 ms; 校正 QT 间期 (QTcb) 为 352.3~366.7 ms。猴的血压与呼吸指标白昼均值显著高于夜晚 ($P < 0.01$), 其中收缩压 (SYS) 昼夜波动范围为 144.6~131.6 mmHg; 舒张压 (DIA) 为 99.8~89.9 mmHg; 平均动脉压 (MAP) 为 121.5~110.2 mmHg; 潮气量 (TV) 为 64.5~36.6 mL; 分钟通气量 (MV) 为 1931.9~920.1 mL/min; 呼吸频率 (RR) 为每分钟 32.3~25.4 次。实验室工作人员清扫、喂食活动对猴有一定的应激影响。**结论** 应用植入遥测技术观察到的恒河猴呼吸、血压、心电、体温等生理指标基本均有明显的昼夜节律变化, 呼吸、血压、心电、体温等指标白昼均高于夜晚, 符合正常恒河猴的生理周期特性。经过驯养的恒河猴在饥饿状态下受工作人员的喂食、清扫活动的应激影响比较强烈。应用植入遥测技术可以对清醒无束缚状态下恒河猴心电、血压、呼吸、体温等进行连续监测, 能真实地反映恒河猴 24 h 内上述生理指标的变化规律, 为恒河猴在药理毒理学研究中的应用提供参考。同时应用植入遥测技术, 有助于提高药物安全药理研究的效率, 减少动物的使用数量, 符合 3R 原则。

【关键词】 安全药理学; 植入遥测技术; 恒河猴; 生理指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 01-0100-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.01.018

Observation of several physiological indexes of rhesus monkeys by implantable telemetry technology

LU Qijiong, CHEN Minhua, XU Cong, DENG Jun, XU Zhiwei, XUAN Yaoxian*

(Drug Safety Evaluation Team, Green Pharmaceutical Collaborative Innovation Center of Yangtze Delta;

Center of Safety Evaluation and Research, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To observe the changes of circadian characteristics and stress-response-related physiological parameters including respiration, blood pressure, electrocardiography and body temperature of conscious rhesus monkeys by implantable telemetry technique. **Methods** Surgery was performed on 8 rhesus monkeys (half male and half female, 3-5 years old) for implantation of a telemetry transmitter. After 3 weeks of recovery, the physiological parameters of respiration, blood pressure, electrocardiography and body temperature of the conscious rhesus monkeys without binding were automatically recorded by a DSI telemetry system and the data were analyzed by the Ponemah

[作者简介] 卢祺炯 (1976—), 男, 助理研究员, 研究方向: 毒理学和安全药理学。E-mail: luqijiong@163.com

[通信作者] 宣尧仙 (1954—), 女, 研究员, 研究方向: 毒理学。E-mail: 13505811365@163.com

software. **Results** Some electrocardiographic indexes showed significant differences at daytime and nighttime ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) including mean heart rate (HR) (155.0 – 122.4 times/min), respiratory rate interval (RR-I) (410.8 – 535.7 ms), T-wave amplitude (T-A) (0.181 – 0.157 mV), PR interval (PR-I) (80.4 – 87.4 ms), QT interval (QT-I) (224.8 – 263.9 ms), and corrected QTcb interval (QTcb) (352.3 – 366.7 ms). The indexes of blood pressure and respiration at daytime were significantly higher than those at nighttime ($P < 0.01$), including the mean systolic pressure (SYS) at daytime and nighttime (144.6 – 131.6 mmHg), diastolic pressure (DIA) (99.8 – 89.9 mmHg), mean arterial pressure (MAP) (121.5 – 110.2 mmHg), tidal volume (TV) (64.5 – 36.6 mL), minute ventilation (MV) (1931.9 – 920.1 mL/min), and respiratory rate (RR) (32.3 – 25.4 times/min). Cleaning and feeding activities of the laboratory staff at 9:00 a. m. and 2:00 p. m. had a certain effect on the stress-responses in the monkeys. **Conclusions** The parameters of respiration, blood pressure, electrocardiography and body temperature of the conscious rhesus macaques observed by implanted telemetry system show obvious circadian changes, which can truly reflect the changes of physiological indexes at daytime and nighttime, and avoid the stress in hungry monkeys caused by the feeding and cleaning activities of laboratory staff. This technique can improve the efficiency of drug safety pharmacology studies, reduce the number of animals used and meet the requirements of 3R principles.

【Key words】 safety pharmacology; implantable telemetry technology; rhesus monkeys; physiological parameters

国家食品药品监督管理总局 2014 年发布的《药物安全药理学研究技术指导原则》^[1]与 ICH 发布的《Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals》^[2],均建议采用清醒动物进行实验。应用遥测技术,可以长时间不间断获取清醒无束缚动物的呼吸、血压、心电和体温等核心数据,实验方法不仅符合各类指导原则的要求,而且获取的数据更加真实可信。但因动物自身存在着昼夜差异与应激变化,在需要长时间连续观察的实验场合,无法避免上述影响因素的干扰,所以了解动物生理信号的昼夜变化规律和对应激因素的反应程度,是合理设计实验方案、客观分析实验结果所必须的。近年来已有许多国内外学者对恒河猴的生理数据的自身规律做了一定的研究,齐卫红^[3]、仇怀林^[4]等观察了猴的心电、血压的周期性和应激变化,Kaiser 等^[5]观察了猴的生活环境对生理信号的影响,但上述研究或者是在麻醉、束缚状态下进行,或者应用了遥测系统但观察指标数量少,范围窄,不能作为 GLP 条件下的安全药理学研究的参考数据。作者用恒河猴建立应用植入遥测技术的动物模型,获取了恒河猴清醒无束缚状态下 24 h 的呼吸、血压、心电和体温等指标,了解了恒河猴核心生理指标的昼夜节律以及部分应激条件下的变化情况,为今后恒河猴在药理毒理学中的应用提供可靠的参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

恒河猴,普通级,年龄 3 ~ 5 岁,体重 3.1 ~ 6.5

kg,8 只,雌雄各半,由宁波市鄞州东吴天童猕猴养殖场提供 [SCXK (浙) 2013 – 0027],动物质量合格证号:0002570。饲养于浙江省医学科学院安全性评价研究中心普通级猴饲养室中,温度 16℃ ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 70%,中央空调集中通风每小时 8 ~ 10 次,光照 12 h 明、12 h 暗 [SYXK (浙) 2012 – 0176]。喂饲猴全价颗粒营养饲料,LAWS-2000 实验动物反渗透纯水机处理的饮水。经 IACUC 批准动物使用申请书编号:GLP-A-033。

1.2 主要试剂与仪器

注射用头孢西丁钠(2 g),兽用复方氨基比林注射液,戊巴比妥钠,异氟烷。DSI 电生理遥测系统,植入子型号 TL11M3-D70-PCTR,美国 DSI 公司;Matrix 动物麻醉机,美国 Midmark 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立

(1)术前准备:猴下肢建立静脉通道静注戊巴比妥钠溶液(3%,1 mL/kg)诱导麻醉后备皮,手术台恒温 37℃,麻醉机维持麻醉后静脉滴注射用头孢西丁钠,每只猴 0.5 g,3 mL/min。开启遥测系统主机与植入子电源,监测植入子信号,植入子浸泡于 0.9% NaCl 注射液 20 min 以上。

(2)植入手术:沿术侧股动脉搏动最明显位置纵向切开皮肤(切口 1,见图 1),切口长度 3 ~ 4 cm。钝性分离皮下组织和肌肉层,暴露并分离股动脉后,沿股动脉下方穿三根非吸收线备用,盖上浸润 0.9% NaCl 注射液的无菌纱布预防切口干燥。术侧腹斜肌位置,以脐部横向延伸线为中点,切开 6 ~ 7 cm 皮肤,分离皮下组织,分离腹斜肌 5 ~ 6 cm 并扩

张成一大小合适的“口袋”供植入子主体放入,在已分离的腹斜肌层靠近股动脉侧穿孔引出压力导管后沿皮下穿至切口 1,将植入子放入已分离的腹斜肌层内,电极导线自分离处引出备用。结扎已分离股动脉远心端,动脉夹夹住近心端,开口后插入压力导管到达腹主动脉横膈膜上方,导管到位后用预留的非吸收线结扎并固定,遥测系统观察确认检测到血压并且正常后,分层缝合切口 1 组织和皮肤。

(3)切口 3、4、5 位置的确定:沿着动物侧面的腋窝褶皱向尾部延伸至第 7 肋骨处为中点,在动物身体双侧对称位置各作约 4 cm 的纵向切口,即切口 3、4。切口 5 位于动物右胸锁骨正中下方,横向,长约 2 cm,放置 ECG 负极。所有负极放在动物右侧,所有正极放在左侧,绿色参考电极固定在植入子本体处(切口 2)。见图 1。

(4)电极导线穿引顺序:先将所有心电、呼吸电极导线从切口 2 穿引至切口 3。再将 ECG 负极和呼吸测量负极从切口 3 穿引至切口 4,其余留在切口 3 处。最后将 ECG 负极由切口 4 穿引至切口 5。所有电极头部剥去适量导线外皮制作电极环。

(5)呼吸电极的埋植:钝性分离切口 3、4 的胸腔肌肉形成小的“口袋”,可将环状的电极平放在肌肉下的“口袋”中。紫色电极朝头部方向,蓝色电极朝

尾部方向,暂不缝合固定。随后打开 Ponemah 软件监测下微调电极距离至呼吸电阻信号 50 ~ 70 Ω 之间,非吸收线缝合固定。之后分层缝合 3、4、5 切口。

(6)将植入子本体和切口 2 用生理盐水冲洗干净。整理电极导线一并放入肌肉下“口袋”内,分层缝合切口 2 肌肉层、皮下组织和皮肤。每个切口缝合前先用抗生素溶液冲洗腔体,完成缝合后即碘伏消毒。待头孢西丁钠注射液滴注完毕后,拔去留置针。解除动物固定,肌注复方氨基比林注射液,停止吸入麻醉,立即将动物转移至动物笼中观察动物状态至清醒。

1.3.2 术后护理

术后次日注射复方氨基比林注射液 1 次,连续 3 d 肌注青霉素,碘伏消毒切口 5 d 后拆线。定期观察伤口恢复情况,防止动物撕咬或抓挠伤口将导管、导线或主体拉出。伤口如出现血清肿,用注射器抽取皮下积液。恢复期 3 周后进行实验。

1.3.3 数据采集与分析

连续观察分析 24 h 猴的 II 导心电图、呼吸、血压,并用 Ponemah 分析软件进行各指标分析,同时比较猴昼夜生理指标的变化。观察期间设定上午 9:00、下午 14:00 时间段实验室工作人员进入猴房清洗、喂食。

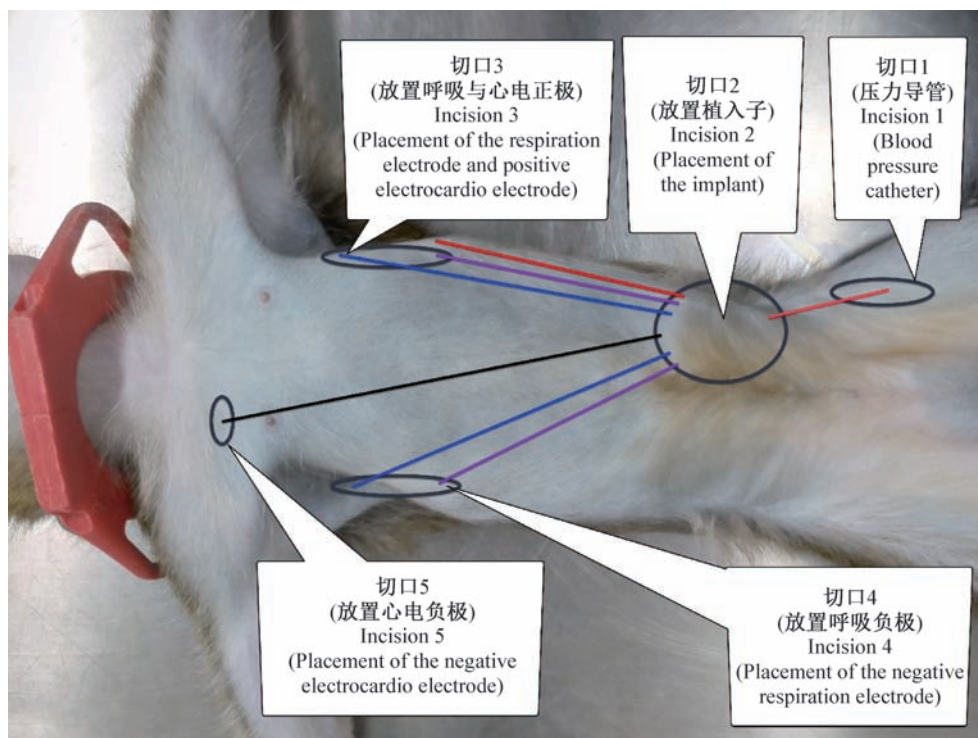


图 1 手术区域示意图

Fig. 1 Diagram of operation regions

1.3.4 观察指标

猴心电图指标:心率(HR)、P波幅度(P-A)、PR间期(PR-I)、R波幅度(R-A)、QRS时程(QRS)、ST位移(STE)、T波幅度(T-A)、QT间期(QT-I)、校正QT间期(QTcb);猴呼吸指标:呼吸频率(BPM)、分钟通气量(MV)、潮气量(TV);血压指标:收缩压(SYS)、舒张压(DIA)、平均动脉压(MAP);体温。以及上述指标的白昼均值、夜晚均值。

1.4 统计学方法

数据以小时为单位取平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),用SPSS 18.0软件统计,分别取8:00~16:00,20:00~4:00的时间段代表昼夜进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。计算白昼与夜晚各指标的变异系数,以 $\leq 10\%$ 为稳定。

2 结果

经数据分析、整理与统计,下列表1、表2、表3所示数据为本次研究获取的恒河猴呼吸、血压、心

电、体温的24 h连续检测结果。表4为本次研究获取的恒河猴各项生理指标的白昼、黑夜与全天均值。

2.1 恒河猴 24 h 呼吸、体温分析

根据表1、表3、表4可知,恒河猴的潮气量(TV)、分钟通气量(MV)、呼吸频率(RR)、体温的白昼均值明显高于夜晚($P < 0.01$),其中TV均值白昼为(64.5 ± 20.9) mL,夜晚为(36.6 ± 17.0) mL;MV均值白昼为(1931.9 ± 887.2) mL/min,夜晚为(920.1 ± 527.5) mL/min;RR均值白昼为每分钟(32.3 ± 5.7)次,夜晚为每分钟(25.4 ± 4.3)次;体温白昼均值为(38.0 ± 0.4) $^{\circ}\text{C}$,夜晚为(36.9 ± 0.3) $^{\circ}\text{C}$ 。上午9:00为呼吸、体温的峰值时段,夜晚的22:00为TV和MV的最低点,夜晚0:00为RR的最低点,1:00为体温的最低点。自17:00起,猴的呼吸和体温的四项参数值均开始下降,至19:00趋于平稳。猴的呼吸和体温指标中,TV、MV的昼夜变异系数均 $> 10\%$,RR和体温的昼夜变异系数均 $< 10\%$ 。

表1 恒河猴 24 h 各项呼吸指标列表($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Respiratory parameters of the rhesus monkeys during 24 h

时间 Time	潮气量 (mL) TV	分钟通气量 (L) MV	呼吸频率 (每分钟次数) RR (beats per minute, BPM)	呼吸频率间期 (ms) RR-I
8:00	69.2 $\pm$ 22.6	2004.8 $\pm$ 876.1	31.6 $\pm$ 5.1	405.7 $\pm$ 86.7
9:00	74.0 $\pm$ 21.9	2488.5 $\pm$ 1102.9	35.8 $\pm$ 5.5	339.8 $\pm$ 53.1
10:00	59.2 $\pm$ 20.4	1839.5 $\pm$ 842.8	32.0 $\pm$ 5.0	411.6 $\pm$ 74.7
11:00	55.6 $\pm$ 16.7	1652.9 $\pm$ 740.3	30.9 $\pm$ 5.6	443.9 $\pm$ 79.1
12:00	58.7 $\pm$ 18.9	1798.4 $\pm$ 818.7	31.9 $\pm$ 6.4	436.5 $\pm$ 92.7
13:00	71.0 $\pm$ 25.2	2072.5 $\pm$ 1080.4	32.3 $\pm$ 6.2	408.3 $\pm$ 72.8
14:00	69.4 $\pm$ 21.9	1990.8 $\pm$ 924.0	31.1 $\pm$ 5.7	412.7 $\pm$ 81.6
15:00	63.3 $\pm$ 22.0	1827.4 $\pm$ 902.2	32.8 $\pm$ 6.4	403.5 $\pm$ 64.5
16:00	59.9 $\pm$ 19.6	1712.0 $\pm$ 813.6	32.6 $\pm$ 6.8	435.5 $\pm$ 72.6
17:00	36.3 $\pm$ 12.4	1066.2 $\pm$ 327.9	30.0 $\pm$ 6.6	492.9 $\pm$ 82.6
18:00	31.0 $\pm$ 9.9	832.1 $\pm$ 269.0	27.1 $\pm$ 4.1	509.6 $\pm$ 107.9
19:00	32.2 $\pm$ 14.7	851.3 $\pm$ 515.9	26.5 $\pm$ 4.4	526.5 $\pm$ 139.4
20:00	30.7 $\pm$ 14.3	767.5 $\pm$ 399.6	26.1 $\pm$ 3.2	523.0 $\pm$ 120.4
21:00	35.8 $\pm$ 21.7	964.2 $\pm$ 700.3	26.7 $\pm$ 4.7	538.4 $\pm$ 140.2
22:00	28.7 $\pm$ 16.2	719.2 $\pm$ 446.3	25.4 $\pm$ 3.2	549.6 $\pm$ 119.4
23:00	33.1 $\pm$ 14.2	836.2 $\pm$ 366.7	24.9 $\pm$ 3.4	528.9 $\pm$ 132.7
0:00	33.7 $\pm$ 14.3	793.8 $\pm$ 392.9	23.9 $\pm$ 3.7	550.9 $\pm$ 141.3
1:00	39.6 $\pm$ 20.5	1049.7 $\pm$ 685.4	26.4 $\pm$ 6.7	541.1 $\pm$ 168.5
2:00	42.1 $\pm$ 14.8	1058.0 $\pm$ 420.7	25.6 $\pm$ 4.3	524.2 $\pm$ 133.2
3:00	33.7 $\pm$ 10.5	783.5 $\pm$ 280.8	24.0 $\pm$ 3.9	561.7 $\pm$ 144.1
4:00	52.0 $\pm$ 19.3	1308.7 $\pm$ 788.9	25.9 $\pm$ 5.4	503.8 $\pm$ 131.1
5:00	72.7 $\pm$ 33.9	1984.7 $\pm$ 1499.0	28.8 $\pm$ 7.7	442.3 $\pm$ 144.0
6:00	73.1 $\pm$ 26.3	2130.4 $\pm$ 1274.4	30.4 $\pm$ 7.6	407.6 $\pm$ 120.2
7:00	71.4 $\pm$ 30.4	2119.2 $\pm$ 1179.2	31.9 $\pm$ 4.5	419.7 $\pm$ 130.1

表 2 恒河猴 24 h 各项心电图指标列表 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Electrocardiographic parameters of the rhesus monkeys during 24 h

时间 Time	心率 (BPM) HR	R 波幅度 (mV) R-A	P 波幅度 (mV) P-A	T 波幅度 (mV) T-A	ST 位移 (mV) STE	QRS 时程 (ms) QRS	PR 间期 (ms) PR-I	QT 间期 (ms) QT-I	校正 QT 间期 (ms) QTcb
8:00	159.4 ± 32.3	1.805 ± 0.580	0.140 ± 0.031	0.155 ± 0.052	-0.072 ± 0.070	45.2 ± 2.8	78.0 ± 9.8	225.6 ± 20.6	355.7 ± 11.8
9:00	184.0 ± 29.7	1.893 ± 0.668	0.157 ± 0.035	0.175 ± 0.045	-0.075 ± 0.081	43.7 ± 2.7	75.1 ± 7.5	200.6 ± 21.5	345.5 ± 16.5
10:00	153.2 ± 30.9	1.869 ± 0.617	0.146 ± 0.035	0.167 ± 0.032	-0.073 ± 0.074	45.6 ± 3.0	80.6 ± 7.2	227.5 ± 20.0	355.8 ± 17.4
11:00	143.1 ± 28.0	1.693 ± 0.527	0.140 ± 0.041	0.176 ± 0.044	-0.055 ± 0.064	45.3 ± 4.1	82.6 ± 8.2	235.0 ± 20.5	354.9 ± 19.5
12:00	146.4 ± 30.1	1.660 ± 0.526	0.142 ± 0.047	0.184 ± 0.068	-0.051 ± 0.065	44.5 ± 3.9	82.9 ± 9.7	232.5 ± 25.0	353.4 ± 20.1
13:00	155.0 ± 29.3	1.763 ± 0.606	0.139 ± 0.039	0.184 ± 0.052	-0.061 ± 0.073	44.9 ± 3.4	80.4 ± 9.1	222.8 ± 18.5	350.5 ± 19.3
14:00	154.7 ± 31.7	1.791 ± 0.631	0.143 ± 0.038	0.197 ± 0.037	-0.064 ± 0.070	45.3 ± 3.2	80.0 ± 8.7	222.8 ± 20.2	348.2 ± 19.5
15:00	153.8 ± 23.9	1.761 ± 0.586	0.140 ± 0.040	0.181 ± 0.037	-0.065 ± 0.067	46.2 ± 2.4	79.6 ± 7.9	222.4 ± 16.2	351.7 ± 20.9
16:00	145.8 ± 23.9	1.652 ± 0.513	0.146 ± 0.046	0.207 ± 0.043	-0.038 ± 0.066	43.8 ± 4.6	84.9 ± 7.7	233.7 ± 20.6	355.2 ± 22.3
17:00	126.8 ± 21.4	1.852 ± 0.855	0.150 ± 0.078	0.217 ± 0.089	-0.043 ± 0.101	44.7 ± 5.9	88.7 ± 12.7	252.0 ± 16.1	358.4 ± 27.5
18:00	124.5 ± 24.8	1.688 ± 0.599	0.119 ± 0.035	0.156 ± 0.040	-0.050 ± 0.057	46.8 ± 3.1	85.2 ± 9.0	258.0 ± 14.0	365.5 ± 25.7
19:00	125.0 ± 40.6	1.652 ± 0.666	0.128 ± 0.068	0.178 ± 0.154	-0.042 ± 0.076	45.9 ± 3.7	87.1 ± 12.6	264.0 ± 12.4	367.5 ± 24.6
20:00	122.4 ± 27.6	1.630 ± 0.579	0.120 ± 0.046	0.147 ± 0.067	-0.045 ± 0.054	46.1 ± 2.5	85.7 ± 10.4	261.5 ± 12.3	368.4 ± 25.1
21:00	121.2 ± 32.9	1.701 ± 0.748	0.142 ± 0.071	0.192 ± 0.114	-0.044 ± 0.067	45.2 ± 4.1	89.5 ± 10.1	265.9 ± 14.1	369.0 ± 26.3
22:00	114.5 ± 22.3	1.677 ± 0.675	0.122 ± 0.045	0.135 ± 0.059	-0.057 ± 0.060	45.9 ± 2.9	87.8 ± 9.5	268.9 ± 13.0	371.6 ± 26.8
23:00	122.2 ± 29.8	1.759 ± 0.789	0.135 ± 0.052	0.153 ± 0.062	-0.050 ± 0.069	45.5 ± 2.6	87.9 ± 9.1	263.0 ± 15.3	367.5 ± 21.4
0:00	118.6 ± 31.5	1.872 ± 0.751	0.143 ± 0.059	0.153 ± 0.061	-0.053 ± 0.085	45.6 ± 3.4	88.3 ± 9.1	272.2 ± 15.5	370.1 ± 24.4
1:00	126.1 ± 53.1	1.646 ± 0.779	0.172 ± 0.095	0.195 ± 0.107	-0.014 ± 0.083	43.9 ± 6.2	90.5 ± 10.8	266.1 ± 23.3	364.6 ± 23.4
2:00	125.6 ± 31.5	1.723 ± 0.631	0.129 ± 0.043	0.148 ± 0.035	-0.044 ± 0.067	44.9 ± 2.8	85.8 ± 10.4	257.9 ± 15.9	361.0 ± 26.7
3:00	114.4 ± 27.2	1.774 ± 0.650	0.126 ± 0.046	0.130 ± 0.050	-0.061 ± 0.063	46.6 ± 3.3	87.0 ± 12.4	267.9 ± 16.8	365.2 ± 25.7
4:00	136.4 ± 35.9	1.781 ± 0.623	0.136 ± 0.048	0.156 ± 0.057	-0.053 ± 0.061	45.2 ± 2.6	84.1 ± 10.8	251.9 ± 28.6	362.9 ± 16.4
5:00	152.2 ± 47.8	1.751 ± 0.724	0.133 ± 0.039	0.145 ± 0.062	-0.062 ± 0.069	44.8 ± 2.7	79.3 ± 12.7	232.7 ± 37.8	353.0 ± 9.1
6:00	162.6 ± 45.6	1.786 ± 0.671	0.145 ± 0.033	0.140 ± 0.051	-0.064 ± 0.073	44.1 ± 3.4	79.6 ± 10.9	222.8 ± 32.5	349.8 ± 10.8
7:00	158.7 ± 45.5	1.754 ± 0.672	0.141 ± 0.036	0.147 ± 0.064	-0.069 ± 0.071	44.6 ± 3.8	78.8 ± 10.2	226.3 ± 33.2	351.3 ± 6.4

表 3 恒河猴 24 h 体温和血压生理指标列表 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.3 Body temperature and blood pressure of the rhesus monkeys during 24 h

时间 Time	体温 (°C) Body temperature	收缩压 (mmHg) SYS	舒张压 (mmHg) DIA	平均动脉压 (mmHg) MAP
8:00	37.8 ± 0.5	145.8 ± 16.8	100.4 ± 8.4	122.6 ± 11.3
9:00	38.3 ± 0.6	160.3 ± 19.7	110.0 ± 11.5	134.1 ± 13.8
10:00	38.1 ± 0.5	142.2 ± 19.3	99.2 ± 11.3	120.0 ± 13.9
11:00	37.9 ± 0.2	137.4 ± 18.6	95.1 ± 10.8	115.7 ± 13.6
12:00	37.8 ± 0.4	138.6 ± 20.1	95.9 ± 10.2	116.5 ± 14.0
13:00	38.0 ± 0.4	141.4 ± 19.8	97.3 ± 11.5	118.7 ± 14.4
14:00	37.9 ± 0.4	148.9 ± 20.3	101.3 ± 12.1	124.3 ± 15.0
15:00	38.0 ± 0.4	148.7 ± 21.6	103.3 ± 14.1	125.5 ± 17.3
16:00	37.8 ± 0.4	138.4 ± 23.8	96.1 ± 15.3	116.6 ± 19.1
17:00	37.6 ± 0.3	132.7 ± 22.6	92.7 ± 14.8	112.0 ± 18.2
18:00	37.3 ± 0.3	129.2 ± 21.3	88.4 ± 14.8	108.2 ± 17.4
19:00	37.1 ± 0.3	128.3 ± 21.3	86.8 ± 14.1	106.8 ± 17.4
20:00	37.0 ± 0.2	131.0 ± 19.9	89.5 ± 13.0	109.9 ± 15.9
21:00	36.9 ± 0.2	129.0 ± 20.5	87.8 ± 14.7	107.5 ± 17.0
22:00	36.9 ± 0.2	129.8 ± 21.3	88.7 ± 13.8	109.1 ± 16.8
23:00	36.9 ± 0.3	132.0 ± 21.4	90.1 ± 14.4	110.6 ± 17.3
0:00	36.8 ± 0.3	129.9 ± 18.7	89.0 ± 12.7	109.1 ± 14.9
1:00	36.8 ± 0.3	130.9 ± 19.1	89.3 ± 12.2	108.9 ± 14.1
2:00	36.9 ± 0.3	136.3 ± 19.1	93.2 ± 10.8	114.2 ± 14.0
3:00	37.1 ± 0.4	130.0 ± 19.6	88.5 ± 13.6	108.9 ± 15.3
4:00	37.2 ± 0.3	135.9 ± 19.6	93.1 ± 12.0	114.0 ± 14.9
5:00	37.3 ± 0.5	141.2 ± 19.3	95.9 ± 10.9	118.0 ± 13.8
6:00	37.6 ± 0.4	144.2 ± 18.6	98.2 ± 9.7	120.7 ± 13.1
7:00	37.8 ± 0.4	141.9 ± 18.0	97.3 ± 9.5	119.2 ± 12.6

表 4 恒河猴 24 h 呼吸、心电、体温、血压各指标分析结果 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 4 Statistical analysis of physiological parameters including respiration, blood pressure, electrocardiogram and body temperature of the conscious monkeys during 24 h

参数 Parameters	全天 Whole day	白昼 (8:00 ~ 16:00) Daytime (8:00 ~ 16:00)	夜晚 (20:00 ~ 4:00) Nighttime (20:00 ~ 4:00)	变异系数 (%) Coefficient of variation (CV)	
				白昼 Daytime	夜晚 Nighttime
潮气量 (mL) TV	51.1 ± 25.1	64.5 ± 20.9	36.6 ± 17.0 **	10.1	19.4
分钟通气量 (L) MV	1443.8 ± 941.2	1931.9 ± 887.2	920.1 ± 527.5 **	13.0	20.8
呼吸频率 (BPM) RR	28.9 ± 6.1	32.3 ± 5.7	25.4 ± 4.3 **	4.5	3.9
体温 (°C) Body temperature	37.4 ± 0.6	38.0 ± 0.4	36.9 ± 0.3 **	0.4	0.4
呼吸频率间期 (ms) RR-I	471.6 ± 123.8	410.8 ± 77.4	535.7 ± 130.6 **	7.4	3.3
心率 (BPM) HR	139.4 ± 36.3	155.0 ± 29.6	122.4 ± 32.1 **	7.8	5.5
R 波幅度 (mV) R-A	1.747 ± 0.622	1.765 ± 0.558	1.729 ± 0.659	4.9	4.4
P 波幅度 (mV) P-A	0.139 ± 0.048	0.144 ± 0.037	0.136 ± 0.057	3.8	11.5
T 波幅度 (mV) T-A	0.167 ± 0.068	0.181 ± 0.046	0.157 ± 0.071 *	8.6	14.4
ST 位移 (mV) STE	-0.054 ± 0.068	-0.062 ± 0.067	-0.047 ± 0.066	19.5	29.3
QRS 时程 (ms) QRS	45.2 ± 3.5	45.0 ± 3.3	45.4 ± 3.4	1.8	1.7
PR 间期 (ms) PR-I	83.7 ± 10.3	80.4 ± 8.4	87.4 ± 9.9 **	3.6	2.3
QT 间期 (ms) QT-I	243.9 ± 28.3	224.8 ± 21.6	263.9 ± 17.9 **	4.6	2.3
校正 QT 间期 (ms) QTcb	359.0 ± 21.3	352.3 ± 18.0	366.7 ± 23.1 **	1.0	1.0
收缩压 (mmHg) SYS	137.7 ± 20.4	144.6 ± 20.1	131.6 ± 18.9 **	5.0	2.0
舒张压 (mmHg) DIA	94.5 ± 13.0	99.8 ± 12.0	89.9 ± 12.5 **	4.7	2.2
平均压 (mmHg) MAP	115.5 ± 15.9	121.5 ± 15.1	110.2 ± 14.9 **	4.8	2.1

注:与白昼比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with daytime, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 恒河猴 24 h 心电分析

根据表 1~4 可知,恒河猴的心律(HR)、呼吸频率间期(RR-I)、T 波幅度(T-A)、PR 间期(PR-I)、QT 间期(QT-I)、校正 QT 间期(QTcb)等心电指标存在昼夜差异,且差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),R 波幅度(R-A)、P 波幅度(P-A)、ST 位移(STE)、QRS 时程(QRS)等心电指标无昼夜差异无显著性($P > 0.05$)。差异有显著性的各项心电指标中,HR 白昼均值为每分钟(155.0 ± 29.6)次,黑夜为每分钟(122.4 ± 32.1)次;RR-I 白昼为

(410.8 ± 77.4) ms,黑夜为(535.7 ± 130.6) ms;T-A 白昼为(0.181 ± 0.046) mV,黑夜为(0.157 ± 0.071) mV;PR-I 白昼为(80.4 ± 8.4) ms,黑夜为(87.4 ± 9.9) ms;QT-I 白昼为(224.8 ± 21.6) ms、黑夜为(263.9 ± 17.9) ms;QTcb 白昼为(352.3 ± 18.0) ms,黑夜为(366.7 ± 23.1) ms。恒河猴 24 h 心电指标中,峰值或谷值出现在上午 9:00 的有 RR-I、HR、QRS、PR-I、R-A、QT-I 和 QTcb 等指标,P-A 的峰值出现在 1:00,T-A 和 STE 峰值分别出现在 17:00 和 1:00。RR-I、HR、T-A、PR-I、QT-I、QTcb

等昼夜差异有显著性的心电指标中,均可见 17:00 ~ 19:00 时间段有着稳定且幅度较大的变化。ECG 各指标中 P-A、T-A 夜晚的变异系数 $> 10\%$, STE 昼夜变异系数均 $> 10\%$, 其余指标均 $< 10\%$ 。

2.3 恒河猴 24 h 动态血压分析

根据表 3、表 4 可知,恒河猴的收缩压(SYS)、舒张压(DIA)、平均动脉压(MAP)白昼均值明显高于夜晚($P < 0.01$),其中 SYS 均值白昼为(144.6 ± 20.1) mmHg、夜晚为(131.6 ± 18.9) mmHg, DIA 均值白昼为(99.8 ± 12.0) mmHg、夜晚为(89.9 ± 12.5) mmHg, MAP 均值白昼为(121.5 ± 15.1) mmHg、夜晚为(110.2 ± 14.9) mmHg。猴的 SYS、DIA、MAP 的峰值均出现在上午 9:00,自 17:00 起猴的血压指标均逐渐下降,至 19:00 趋于平稳,三个血压指标的昼夜变异系数均 $< 10\%$ 。

3 讨论

安全性评价研究中使用的灵长类动物常用恒河猴或食蟹猴。本机构实验用猴年龄段一般为 3 ~ 5 岁,体重因种属、性别、体型的不同,食蟹猴一般使用 3 ~ 5 kg,恒河猴为 3 ~ 7 kg。

遥测系统植入子的植入手术操作造成的创口多,并且动物的依从性较差,一旦植入失败或者植入子导线因为伤口裂开被动物撕咬破坏会造成较大的损失,所以此类手术对成功率的要求是非常高的,所以手术中缝合技术和术后护理方案的选择是在整个实验流程中非常重要的一环,梁春南^[6]曾报道过一例植入手术后创口开裂无法愈合,所以作者对不同层次的组织分别选用以下方法:肌肉层使用 8 字缝合法,皮下组织连续缝合,皮肤层皮内连续缝合法,缝合前一律用抗生素溶液清洗浸润创口。术后每日检视伤口恢复状况,发现伤口愈合良好,没有出现伤口开裂,抓挠或撕咬伤口拉扯埋置导线的情况。

在实验前期,因作者低估了猴的破坏能力,在使用全不锈钢半封闭猴笼(侧面封闭、正面钢管门、上下方与后方为钢管与不锈钢网)的条件下,植入子接收器导线因为布线不合理,在术后恢复期间被猴拉入笼内并咬断 2 根,修复导线之后作者重新调整了接收器的固定位置和导线的布线,避开猴肢体可能接触到的位置,才避免了猴对实验设施的继续破坏。

实验结果表明,在实验人员活动集中的时间段

(上午 9:00),出入动物房进行清扫、喂食、加饮水等此类非直接接触动物的行为,对恒河猴的呼吸、血压、心电和体温有着一定的应激影响,猴目视实验人员后在笼内跳跃、快速行走,待实验人员结束动物房内的操作离开后,猴会很快安静下来,从实验结果可见上午 10:00 时间段的各指标基本恢复至上午 8:00 的水平。但下午 14:00 时间段实验人员进行第二次清扫、喂食、加饮水操作时,猴的应激反应不再像上午 9:00 时间段那样激烈,基本上都比较安静,猴的呼吸、血压、心电、体温等指标的变化幅度也未见大范围的波动。笔者认为 9:00 时间段出现的应激变化比较明显的原因,是上午喂食之前猴基本都空腹 12 h 左右,饥饿感比较强,猴经过一段时间的驯养,已了解上午工作人员出现的时候就是喂食时间,所以更容易兴奋导致的。而下午 14:00 时间段操作时,猴的进食意愿就不如上午强烈,应激反应较小。

实验结果还表明,猴的生理指标存在明显的昼夜差异,其潮气量、分钟通气量、呼吸频率、收缩压、舒张压、平均动脉压、心率、T 波幅度、体温均为白天(8:00 ~ 16:00)明显高于夜晚(20:00 ~ 4:00),PR 间期、呼吸频率间期、QT 间期、校正 QT 间期则相应地表现为白天明显低于夜晚。而 R 波幅度、P 波幅度、ST 位移、QRS 时程这四个指标则未显示昼夜差异。从上述实验结果可以发现,呼吸、血压、体温的昼夜差异存在着一致性和相关性,但心电的时间指标中 RR 间期、PR 间期、QT 间期、校正 QT 间期等四项有昼夜差异,而 QRS 时程则无昼夜差异,电压指标中仅 T 波幅度显示有昼夜差异,R 波幅度、P 波幅度、ST 位移则未显示昼夜差异。本实验结果中计算的变异系数(CV),以 $\geq 10\%$ 为界,认为在统计学意义上的变化无参考意义,其中昼夜波动幅度均 $\geq 10\%$ 的有潮气量、分钟通气量和 STE 三项指标,另 P 波幅度、T 波幅度的夜晚 $CV \geq 10\%$,其余指标的昼夜 CV 均 $< 10\%$ 。根据实验结果,因猴的呼吸、血压、心电、体温等生理指标存在昼夜节律,所以在实验设计时应当充分考虑此因素,在给药和观察时间段应按已获取的基线结果设计,例如给药和观察时间较短,并且在白昼给药的,应把实验时间安排在 7:00 ~ 16:00 内。如发现猴对工作人员的应激反应比较剧烈,应记录此类应激反应特点和时间,此时间段的实验数据在后期分析时也应有的解释。在对获取的呼吸指标进行统计分析时,应综合其他

因素判断受试物对呼吸指标的影响,而不是简单地参照统计学意义的结果进行判断。总而言之,在应用无创遥测系统进行安全药理学研究时,应当在正式实验之前,尽量考虑到所有对猴的各种应激因素^[4],获取完善的基线(baseline)数据,并对应正式实验操作的特点,在记录动物 baseline 数据的时候安排合适的应激因素(可以人工模拟),包括喂食、巡视、清扫、短时间固定、给药等,为该批次动物进行的实验提供正确的参考依据。

本文应用植入遥测技术观察到的恒河猴呼吸、血压、心电、体温等生理指标基本上均有明显的昼夜节律变化,呼吸、血压、心电、体温等指标白昼均高于夜晚,符合正常恒河猴的生理周期特性。经过驯养的恒河猴在饥饿状态下对工作人员的喂食清扫活动的应激影响比较强烈。应用植入遥测技术可以对清醒无束缚状态下恒河猴心电、血压、呼吸、体温等进行连续监测,能真实地反映恒河猴 24 h 内上述生理指标的变化规律,为恒河猴在药理毒理学

研究中的应用提供参考。同时应用植入遥测技术,有助于提高药物安全药理学研究的效率,减少动物的使用数量,符合 3R 原则。

参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理总局 [EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/101015.html>, 2014-05-13.
- [2] ICH. ICH Guidance for Industry ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals [S]. ICS 2001.
- [3] 齐卫红,李伟,李继红,等.健康恒河猴心电图研究[J].实验动物科学,2011,28(3):47-50.
- [4] 仇怀林,吕锡太.太行山猕猴动脉血压的研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),1989,30(2):116-119.
- [5] Kaiser R, Tichenor S, Regalia D, et al. Evaluation of jacketed external telemetry in multiple social housing paradigms for cynomolgus monkey [J]. J Pharmacol Toxicol, 2015, 75: 180.
- [6] 梁春南. Beagle 犬安全药理遥测系统埋植手术术位开裂处治失败 1 例报告 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(4): 52-54.

[收稿日期]2017-07-05

(上接第 99 页)

模板的利用率。本实验针对 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因建立的双重 PCR 方法,能够对棕背䟽的性别做出正确判断,具有快速、准确、简便等优点,可广泛应用于野生动物研究领域以及实验室繁育中的性别鉴定。该方法也可能存在一些局限性,对一些性别与正常情况不同,如 Y 染色体 *SRY* 基因缺失个体、染色体组型为 XXY、XXX 等个体,该方法不能做出正确鉴定,但这种情况在自然状态下发生的几率非常小^[1],可以忽略。通过利用针对 *ZFY/ZFX* 基因和 *SRY* 基因建立的双重 PCR 扩增方法,可以对棕背䟽的性别做出正确判断,合理安排分笼和繁殖,将对棕背䟽的实验室繁育有重要影响。

参考文献:

- [1] 徐艳春,马立新,白素英,等.应用 PCR 方法通过毛发进行哺乳动物性别鉴定[J].东北林业大学学报,2000,28(6):72-77.
- [2] 魏仰华,王凤臣,何亦祥,等.大林姬鼠棕背䟽引起流行性出血热爆发流行调查报告[J].人民军医,1983,34(11):26-29.
- [3] 姚李四.中朝长白山毗邻口岸区域鼠类和体表寄生虫及其携带病原初步研究[D].中国人民解放军军事医学科学院,2012.
- [4] 王元智,马芹,陆涛峰,等.棕背䟽的实验室繁育[J].中国实验动物学报,2017,25(2):169-173.
- [5] 牛永东,程詠,石刚刚.新生仔鼠早期性别的快速鉴定[J].

汕头大学医学院学报,2014,21(1):22-23.

- [6] 王淑香,闫明伟,王远东,等.麝鼠的性别鉴定[J].黑龙江畜牧科技,2000,28(1):40.
- [7] Page DC, Mosher R, Simpson EM, et al. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein [J]. Cell, 1987, 51(6): 1091-1104.
- [8] Schneider-Gädick A, Beer-Romero P, Brown LG, et al. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation [J]. Cell, 1989, 57(7): 1247-1258.
- [9] Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. Nature, 1990, 346(6281): 240-244.
- [10] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female transgenic for Sry [J]. Nature, 1991, 351(6322): 117-121.
- [11] 王晗. PCR 法进行小鼠和牛的性别鉴定[D].西北农林科技大学,2005.
- [12] 武建中,田青.聚合酶链式反应在小鼠雄性胚胎性别鉴定中的优化研究[J].黑龙江畜牧兽医,2015,58(9):92-94.
- [13] 潘求真,冯国兴,郑晓亮,等.利用多重 PCR 技术快速鉴定小鼠的性别[J].黑龙江畜牧兽医,2010,53(19):125-126.
- [14] Chen Y, Dong Y, Xiang X, et al. Sex determination of *Microtus mandarinus mandarinus* is independent of Sry gene [J]. Mamm Genome, 2008, 19(1): 61-68.

[收稿日期]2017-08-03