

# 巴马小型猪胚胎-胎仔发育毒性试验基础数据的建立

张元慧, 郝新彦, 高虹\*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

**【摘要】 目的** 检测巴马小型猪胚胎-胎仔发育毒性试验的生殖功能指标和胎仔的各项发育指标, 为巴马小型猪的发育毒性研究提供参考数据。**方法** 12 只雌性巴马小型猪分别于妊娠第 30、40、50、60、70、80、90、100、112 天剖检胎仔, 计数黄体数、着床数、活胎数、吸收胎数和死胎数, 测量胎仔身长、尾长、脑直径, X 光拍照后进行内脏和骨骼检查。**结果** 巴马小型猪妊娠 40 d 胎仔性别可辨, 内脏器官、骨骼系统基本发育成型。得到妊娠不同天数的小型猪胎仔各项发育指标的正常值和标准差, 及 95% 的可信区间。**结论** 巴马小型猪可以作为胚胎-胎仔发育毒性试验的观察对象, 此次研究得到这些基础数据可以为评价外源化合物的生殖毒性试验提供背景参考数据。

**【关键词】** 巴马小型猪; 胚胎发育; 生殖毒性试验

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0081-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.014

## Establishment of basic data of Bama minipigs for embryo-fetal development toxicity study

ZHANG Yuanhui, HAO Xinyan, GAO Hong\*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** To obtain the basic data of Bama minipigs and provide basic reference for embryo-fetal developmental toxicity study. **Methods** Pregnant minipigs were sacrificed at different days during the gestation period respectively. The examinations included necropsy, count of corpora lutea, live and dead implantations, fetal body weight, and external, visceral, and skeletal examination of fetuses. **Results** The basic data of Bama minipigs, such as body weight, fetal development, and fetal malformation/variation were obtained. **Conclusions** We obtained the basic reproductive parameters of pregnant Bama minipigs and the indexes of fetal development, which can provide valuable reference data for embryo-fetal developmental toxicity tests of Bama minipigs.

**【Key words】** Bama minipig; embryonic development; reproductive toxicity study

随着时代的发展, 各类外源化合物如农药、兽药、化妆品、食品添加剂、环境污染物日益增多, 长期接触这些化学物质可导致人类生殖细胞损伤, 生育能力下降, 胚胎死亡、畸形比例上升, 这一问

[作者简介] 张元慧(1993—), 女, 硕士研究生, 专业: 比较医学。E-mail: 369098717@qq.com

[通信作者] 高虹(1968—), 女, 研究员, 研究方向: 药物临床前安全性评价。E-mail: gaoh@cnilas.org

题促使各国加强了对生殖毒性评价的重视<sup>[1]</sup>。生殖毒性试验是研究有害因素对亲代生殖功能和子代生长发育造成的有害作用,是药物非临床安全性评价的重要组成部分<sup>[2]</sup>,其对实验动物种属的选择也越来越严格。随着人们对小型猪研究的逐渐深入,发现其性成熟时间为 6 个月,发情周期和妊娠期短,胎仔数量多,胚胎大,便于观察微小畸形<sup>[3]</sup>,与人类在解剖学、生理学、疾病发生机理等方面存在一定的相似性<sup>[4-5]</sup>,是潜在的生殖毒性评价的良好动物模型。因此,本研究对妊娠不同时期的巴马小型猪进行解剖,观察孕猪的生殖功能指标和胎仔的各项发育指标,为生殖毒性研究提供正常值的参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

自然受孕二胎妊娠巴马小型猪 12 只,体重 50.8 ~ 119.5 kg,均接种猪瘟、口蹄疫、细小、乙脑、呼吸与繁殖综合征共 5 种疫苗,由北京实创世纪小型猪养殖基地提供[SCXK(京)2013-0008]。饲养于普通环境内,室温 16℃~21℃,湿度 60%~80%。常规饲养,饲养环境指标控制在国标规定的范围内。实验中涉及动物的操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准,批准号为 ILAS-GH17001。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 孕猪处理

雌性巴马小型猪分别于妊娠第 30、40、50、60、70、80、90、100、112 天舒泰过量麻醉处死,检查孕猪外观是否异常,切开腹部暴露子宫和内脏器官,将子宫与母体分离,称量子宫重量,取出子宫内的胎仔,计数黄体数、着床数、活胎数、吸收胎数和死胎数。称量活胎的重量,测量活胎的身长、尾长、脑直径,每个胎仔均进行 X 光拍照。

#### 1.2.2 胎仔检查

观察胎仔头部有无露脑、脑膜膨出,眼耳口鼻外观有无异常,上下颌有无唇裂,再进行四肢、躯干和尾部的检查,有无脐疝、腹裂,脊髓膨出、脊柱裂、脊柱侧突等,有无短尾、卷尾、无尾等异常情况。X 光拍照后将每窝一半胎仔放入 Bouin's 液中固定进行内脏检查,另一半胎仔用氢氧化钾茜素红染色进行骨骼检查<sup>[6]</sup>,其中妊娠 112 d 孕猪胎仔直接进行大体解剖检查。

### 1.3 统计学方法

所有数据用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。实验数据以平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果

### 2.1 孕期小型猪生殖功能指标及胎仔生长发育指标

在胚胎-胎仔生殖毒性试验中,妊娠动物自身增强的毒性、胎仔生长发育及死亡情况均是该段试验评价的主要内容<sup>[7]</sup>。评价指标主要包括孕猪外观和各脏器发育情况,黄体数、活胎数、死胎数、吸收胎数和着床数,胎仔外观发育情况,胎仔的身长、尾长等数值。各项指标的数据见表 1、表 2。

表 1 巴马小型猪孕期生殖功能指标( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

| Tab.1 Reproductive parameters of the pregnant Bama minipigs |                  |                                     |
|-------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| 检测指标<br>Indexes                                             | 结果<br>Results    | 95% 可信区间<br>95% confidence interval |
| 总黄体数<br>Total number of corpora lutea                       | 160              | -                                   |
| 窝平均黄体数<br>No. of corpora lutea per litter                   | 13.33 $\pm$ 4.83 | 10.26 ~ 16.40                       |
| 总着床数<br>Total number of implantation                        | 125              | -                                   |
| 窝平均着床数<br>No. of implantation per litter                    | 10.42 $\pm$ 3.92 | 7.93 ~ 12.91                        |
| 着床率(%)<br>Implantation rate                                 | 78.13            | -                                   |
| 吸收胎窝数<br>Resorbed embryos litter count                      | 2                | -                                   |
| 吸收胎数<br>Absorbed embryos                                    | 3                | -                                   |
| 吸收胎率(%)<br>Absorbed embryo rate                             | 2.40             | -                                   |
| 活胎数<br>Live fetus counts                                    | 122              | -                                   |
| 窝平均活胎数<br>No. of live fetuses per litter                    | 10.17 $\pm$ 3.59 | 7.89 ~ 12.45                        |
| 活胎率(%)<br>Live fetus rate                                   | 97.60            | -                                   |
| 死胎窝数<br>Dead fetus litter count                             | 0                | -                                   |
| 死胎数<br>Number of dead fetuses                               | 0                | -                                   |
| 死胎率(%)<br>Dead fetus rate                                   | 0                | -                                   |
| 性别比(雌/雄)<br>Sex ratio (female/male)                         | 1:0.95           | -                                   |

表 2 巴马小型猪胎仔生长发育指标

Tab.2 Indexes of embryonic development of the Bama minipigs

| 胚胎龄 (d)<br>Embryonic<br>age | 胎重 (g)<br>Body weight              |                                                 | 身长 (mm)<br>Body length             |                                                 | 尾长 (mm)<br>Tail length             |                                                 | 脑直径 (mm)<br>Brain diameter         |                                                 |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                             | 均值 ±<br>标准差<br>( $\bar{x} \pm s$ ) | 95% 可信<br>区间<br>(95%<br>Confidence<br>interval) | 均值 ±<br>标准差<br>( $\bar{x} \pm s$ ) | 95% 可信<br>区间<br>(95%<br>Confidence<br>interval) | 均值 ±<br>标准差<br>( $\bar{x} \pm s$ ) | 95% 可信<br>区间<br>(95%<br>Confidence<br>interval) | 均值 ±<br>标准差<br>( $\bar{x} \pm s$ ) | 95% 可信<br>区间<br>(95%<br>Confidence<br>interval) |
|                             |                                    |                                                 |                                    |                                                 |                                    |                                                 |                                    |                                                 |
| 30 (n=11)                   | 0.94 ± 0.04                        | 0.91 ~ 0.97                                     | 19.88 ± 0.58                       | 19.49 ~ 20.27                                   | 3.82 ± 0.60                        | 3.41 ~ 4.23                                     | 4.80 ± 0.32                        | 4.58 ~ 5.02                                     |
| 40 (n=19)                   | 14.63 ± 7.06                       | 11.23 ~ 18.03                                   | 57.38 ± 12.56                      | 51.33 ~ 63.43                                   | 11.67 ± 2.00                       | 10.70 ~ 12.63                                   | 13.11 ± 2.79                       | 11.77 ~ 14.46                                   |
| 50 (n=18)                   | 21.95 ± 3.32                       | 20.30 ~ 23.60                                   | 73.57 ± 4.23                       | 71.46 ~ 75.67                                   | 13.65 ± 0.73                       | 13.28 ~ 14.01                                   | 16.51 ± 0.68                       | 16.18 ~ 16.85                                   |
| 60 (n=19)                   | 58.49 ± 9.70                       | 53.81 ~ 63.16                                   | 99.04 ± 6.27                       | 96.02 ~ 102.07                                  | 19.32 ± 1.81                       | 18.44 ~ 20.19                                   | 21.64 ± 1.70                       | 20.83 ~ 22.46                                   |
| 70 (n=12)                   | 92.14 ± 8.83                       | 86.53 ~ 97.75                                   | 120.26 ± 3.38                      | 118.11 ~ 122.41                                 | 23.93 ± 2.19                       | 22.54 ~ 25.32                                   | 25.84 ± 2.16                       | 24.46 ~ 27.21                                   |
| 80 (n=13)                   | 149.60 ± 12.84                     | 141.85 ~ 157.36                                 | 134.24 ± 9.14                      | 128.71 ~ 139.76                                 | 28.24 ± 1.74                       | 27.18 ~ 29.29                                   | 28.19 ± 1.97                       | 27.00 ~ 29.38                                   |
| 90 (n=7)                    | 282.34 ± 20.83                     | 263.07 ~ 301.60                                 | 184.29 ± 5.85                      | 178.87 ~ 189.70                                 | 41.88 ± 1.97                       | 40.06 ~ 43.71                                   | 38.12 ± 0.63                       | 37.54 ~ 38.70                                   |
| 100 (n=7)                   | 428.76 ± 61.20                     | 372.15 ~ 485.36                                 | 203.86 ± 9.67                      | 194.92 ~ 212.80                                 | 44.52 ± 3.45                       | 41.33 ~ 47.71                                   | 41.69 ± 1.82                       | 40.01 ~ 43.38                                   |
| 112 (n=16)                  | 430.98 ± 94.00                     | 380.89 ~ 481.07                                 | 231.69 ± 24.46                     | 218.66 ~ 244.72                                 | 56.68 ± 6.89                       | 53.00 ~ 60.35                                   | 56.86 ± 3.76                       | 54.86 ~ 58.87                                   |



注：(a) 30 d 胎仔；(b) 40 d 胎仔；(c) 50 d 胎仔；(d) 60 d 胎仔；(e) 70 d 胎仔；(f) 80 d 胎仔；(g) 90 d 胎仔；(h) 100 d 胎仔。

图 1 巴马小型猪胎仔外形

Note. (a) A 30-day-old embryo. (b) A 40-day-old embryo. (c) A 50-day-old embryo. (d) A 60-day-old embryo. (e) A 70-day-old embryo. (f) A 80-day-old embryo. (g) A 90-day-old embryo. (h) A 100-day-old embryo.

Fig. 1 External appearance of Bama minipig embryos

表 3 巴马小型猪胎仔外形特征

| Tab.3 External features of the Bama minipig embryos |                                                                         |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 胚胎龄 (d)                                             | 外形特征                                                                    |
| Embryonic ages                                      | External features                                                       |
| 30                                                  | 外耳出现,视网膜色素明显<br>Auris externa formed, obvious retinal pigment           |
| 40                                                  | 指(趾)分开,眼睑闭合,性别可辨<br>Digits separated, catamysis, distinguishable gender |
| 50                                                  | 耳竖起<br>Ear rear                                                         |
| 60                                                  | 蹄甲出现<br>Hoof and nail formed                                            |
| 70                                                  | 头臀黑的毛色特点出现<br>The skin of head and buttock blackened                    |
| 80                                                  | 眉毛出现<br>Eyebrow formed                                                  |
| 90                                                  | 牙齿出现<br>Teeth formed                                                    |
| 100                                                 | 外形特征发育良好<br>External features well developed                            |
| 112                                                 | 与成年猪的外观特点一致<br>Consistence with the appearance of adult minipigs        |

表 4 巴马小型猪胎仔内脏发育特征

| Tab.4 Embryonic visceral developmental characteristics of the Bama minipigs |                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 胚胎龄 (d)                                                                     | 内脏发育特征                                                                                                                                       |
| Embryonic ages                                                              | Visceral developmental characteristics                                                                                                       |
| 30                                                                          | 内脏器官初步成型,肝脏开始分叶,心房心室无法分辨<br>Viscera formed initially, hepatic lobules begin to form, the heart atrium and ventricle can not be distinguished |
| 40                                                                          | 肺脏 5 叶,肝脏 6 叶,可分辨心房心室<br>Pulmonary lobules and hepatic lobules formed, heart atrium and ventricle distinguishable                            |
| 50 ~ 100                                                                    | 内脏器官逐渐发育成熟 The internal viscera gradually completed                                                                                          |
| 112                                                                         | 内脏器官发育完全 Visceral system well developed                                                                                                      |

表 5 巴马小型猪胎仔骨骼发育数量(块)

| Tab.5 Indexes of embryonic skeletal development of the Bama minipigs( Block) |                       |         |         |         |         |         |         |                         |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------------|
| 骨骼<br>Skeleton                                                               | 胚胎龄 (d) Embryonic age |         |         |         |         |         |         | 新生胎仔<br>Newborn minipig |
|                                                                              | 40 d                  | 50 d    | 60 d    | 70 d    | 80 d    | 90 d    | 100 d   |                         |
| 肋骨(左/右)<br>Ribs( Left/Right)                                                 | 13 ~ 14/13 ~ 14       | 14/14   | 14/14   | 14/14   | 14/14   | 14/14   | 14/14   | 14/14                   |
| 尾椎<br>Tailbone                                                               | 4 ~ 5                 | 7 ~ 9   | 13 ~ 16 | 16 ~ 19 | 18 ~ 20 | 21 ~ 22 | 22 ~ 23 | 21 ~ 24                 |
| 胸骨<br>Sternum                                                                | 0                     | 0       | 1 ~ 2   | 2 ~ 3   | 3 ~ 4   | 5 ~ 6   | 5 ~ 6   | 5 ~ 6                   |
| 腕骨<br>Carpus                                                                 | 0                     | 0       | 0       | 0       | 0       | 12 ~ 14 | 14 ~ 16 | 16                      |
| 掌骨<br>Metacarpus                                                             | 4 ~ 8                 | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8                       |
| 指骨<br>Phalanges                                                              | 4 ~ 12                | 12 ~ 20 | 20 ~ 24 | 24      | 24      | 24      | 24      | 24                      |
| 跗骨<br>Tarsus                                                                 | 0                     | 0 ~ 2   | 2       | 2       | 2       | 6 ~ 10  | 14      | 14                      |
| 跖骨<br>Metatarsus                                                             | 4 ~ 8                 | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8                       |
| 趾骨<br>Phalanxes                                                              | 4 ~ 8                 | 8 ~ 20  | 24      | 24      | 24      | 24      | 24      | 24                      |

2.2 胎仔外观检查

妊娠 30 d 小型猪胎仔性别无法分辨,妊娠 40 d 胎仔外观即可分辨性别。外观形态如图 1 所示,外观检查结果如表 3 所示。

2.3 胎仔内脏检查

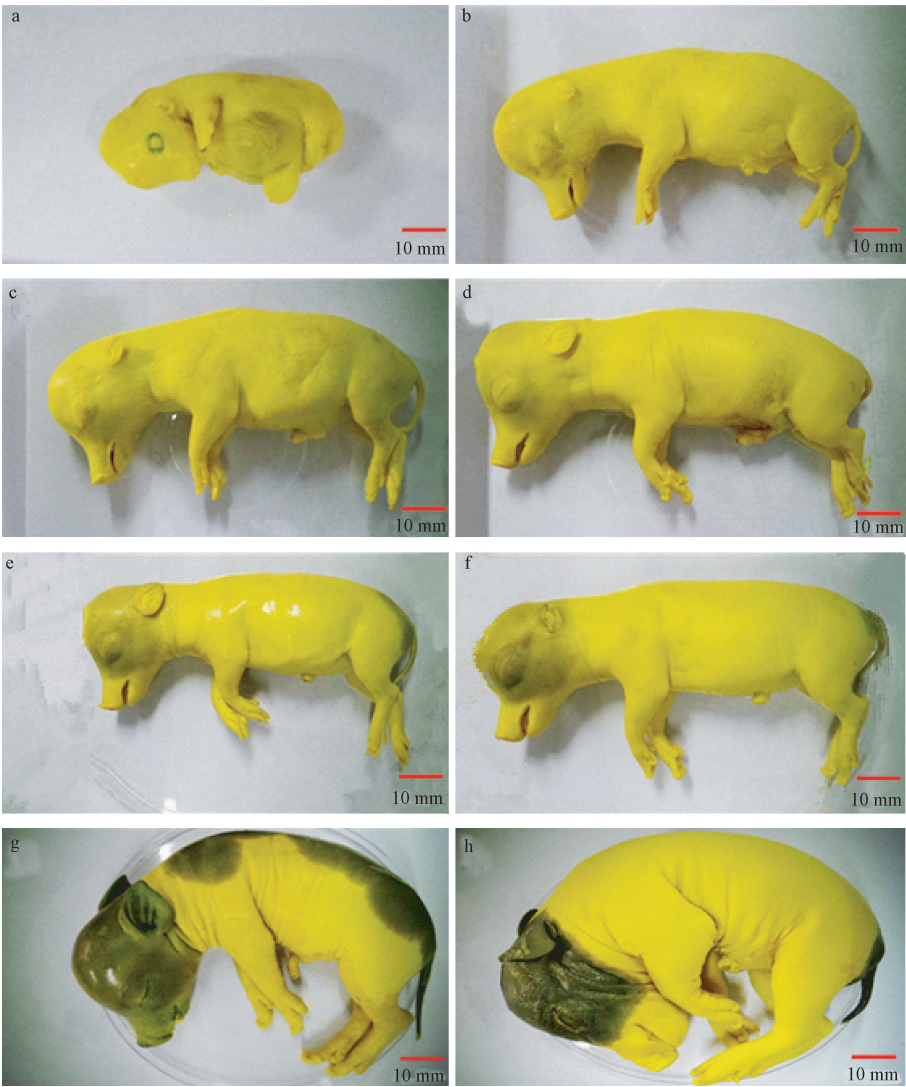
妊娠 30 d 的胎仔各内脏器官初步成型,但未发育完全,妊娠 40 d 胎仔各内脏器官已发育成型,可作为生殖毒性试验的观察对象。固定后胎仔形态如图 2 所示,内脏检查结果如表 4 所示。

2.4 胎仔骨骼检查

妊娠 30 d 的胎仔骨骼未发育完全,无法用 X 光和骨骼染色法进行观察。各胎仔骨骼发育情况如图 3、表 5 所示。

2.5 胎仔发育情况

根据本次试验得到的数据结果,将巴马小型猪胎仔的发育特征总结如表 6 所示。



注：(a)30 d 胎仔；(b)40 d 胎仔；(c)50 d 胎仔；(d)60 d 胎仔；(e)70 d 胎仔；(f)80 d 胎仔；(g)90 d 胎仔；(h)100 d 胎仔。

图2 Bouin’s 液固定后的巴马小型猪胎仔

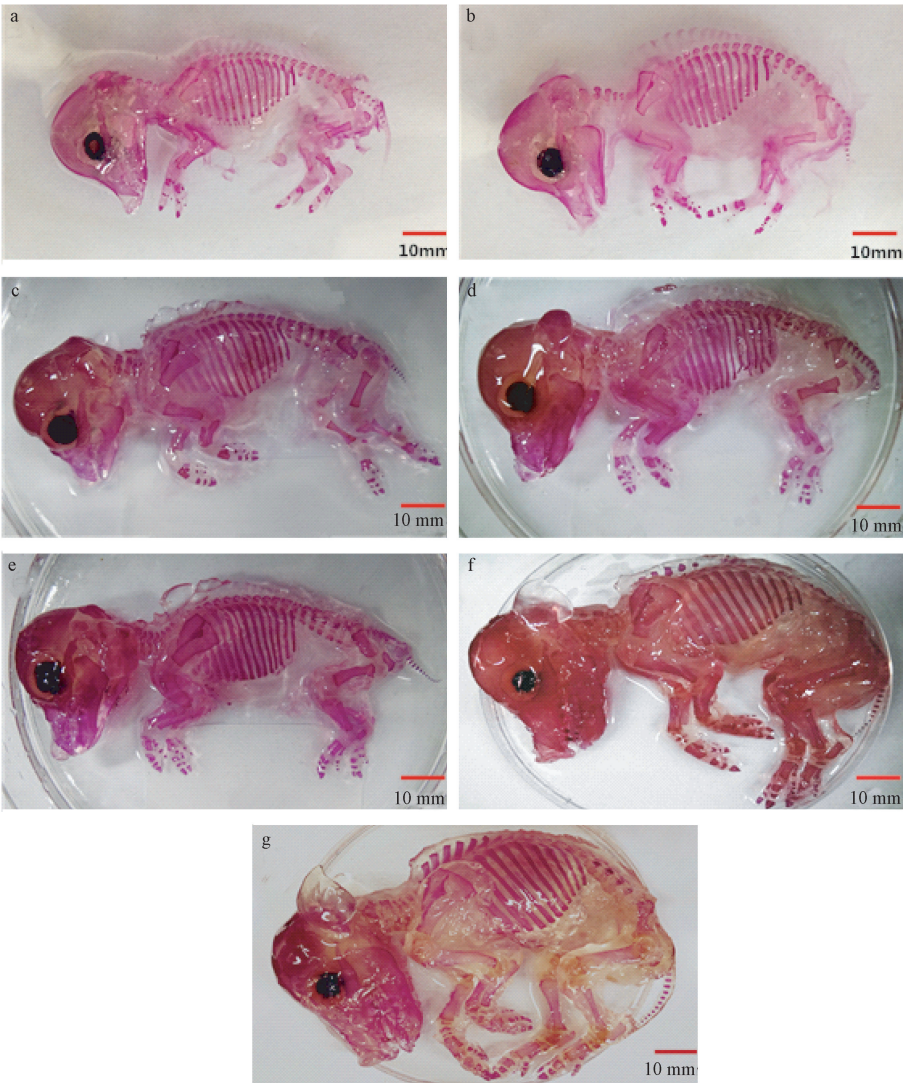
Note. (a) A 30-day-old embryo. (b) A 40-day-old embryo. (c) A 50-day-old embryo. (d) A 60-day-old embryo. (e) A 70-day-old embryo. (f) A 80-day-old embryo. (g) A 90-day-old embryo. (h) A 100-day-old embryo.

Fig.2 Bouin’s fluid-fixed Bama minipig embryos

表6 巴马小型猪胎仔发育特征

Tab.6 Developmental characteristics of the Bama minipig embryos

| 胚胎龄(d)<br>Embryonic ages | 发育特征<br>Developmental characteristics                                                                                     |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 30                       | 内脏器官初步成型,但未发育完全,骨骼骨化不全 Basic organs formed initially, but not developed well                                              |
| 40                       | 性别可辨,器官形成期结束,各内脏器官已发育成型,躯干骨和四肢骨均可进行肉眼观察<br>Gender distinguishable, the structure of basic organs were gradually completed |
| 50                       | 掌骨和跖骨发育完全 Metacarpus and metatarsus well formed                                                                           |
| 60                       | 蹄甲出现,器官组织结构逐渐成熟,后肢趾骨全部成型<br>Hoof and nail formed, organs developed well, phalanx formed                                   |
| 70                       | 除腕骨和部分跗骨等较小的骨骼未成型,其他骨骼均骨化完全<br>Bone ossification is completed, except for carpus and tarsus                               |
| 80                       | 尾椎发育更加完全 Tailbone developed well                                                                                          |
| 90                       | 胸骨发育更加完全 Sternum developed well                                                                                           |
| 100                      | 腕骨、跗骨全部成型 Carpus and tarsus formed                                                                                        |
| 112                      | 内脏器官、骨骼系统发育完全 Visceral and skeletal system developed well                                                                 |



注:(a)40 d 胎仔;(b)50 d 胎仔;(c)60 d 胎仔;(d)70 d 胎仔;(e)80 d 胎仔;(f)90 d 胎仔;(g)100 d 胎仔。

图3 骨骼染色后的巴马小型猪胎仔

Note. (a) A 40-day-old embryo. (b) A 50-day-old embryo. (c) A 60-day-old embryo. (d) A 70-day-old embryo. (e) A 80-day-old embryo. (f) A 90-day-old embryo. (g) A 100-day-old embryo.

Fig.3 The skeleton of Bama minipig embryos after potassium hydroxide-alizarin red staining

3 讨论

生殖毒性是指有害因素对亲代生殖功能造成的有害作用<sup>[8]</sup>,其研究是受试物非临床安全性评价的重要内容,与急性毒性、长期毒性、遗传毒性等毒理学研究联系紧密。在传统的三段生殖毒性试验中<sup>[9]</sup>,即生育力与早期胚胎发育毒性试验(I段)、胚胎-胎仔发育毒性试验(II段)、围产期毒性试验(III段),胚胎-胎仔发育毒性试验 II 段)是评价妊娠动物增强的毒性、胚胎胎仔死亡情况、生长改变和结构变化,此阶段妊娠动物接触有害外来物质将会给胎仔生长发育带来严重不良影响,因此选择合适的

动物模型对结果的判断显得尤为重要。试验通常选择两种动物<sup>[10]</sup>,即啮齿类动物和非啮齿类动物,常规选用的是大鼠和家兔,但当大鼠或家兔等传统动物不适合进行致畸性试验研究时,也可采用小型猪作为替代动物<sup>[11]</sup>。

小型猪发育毒性试验一般选择在妊娠 110 ~ 112 d 左右处死进行剖宫检查<sup>[12]</sup>,但试验的周期过长,为了进一步缩短试验的期限,有研究者对哥廷根小型猪中期(妊娠第 60 天)和终末(妊娠第 110 天)剖宫产检查结果进行了比较分析,发现中期剖宫产胎猪生殖器官内部检查可确定性别,骨骼和软骨双染法可检出骨骼改变,从而表明小型猪中期剖

宫产技术可行<sup>[13]</sup>。在小型猪胚胎发育过程中,妊娠第 40 天胚期结束,各脏器基本发育成型,并可分辨性别,因此本实验选择在妊娠第 30、40、50、60、70、80、90、100、112 天处死孕猪进行剖宫检查,并对妊娠不同天数的巴马小型猪胚胎的发育情况进行观察总结,发现妊娠 40 d 后的小型猪胎仔各内脏器官、骨骼系统已发育成型,可以作为胚胎-胎仔发育毒性试验的观察对象,且小型猪的自然畸变率相对较低,可成为生殖毒性试验的良好动物模型。此次研究得到这些基础数据可以为受试物的生殖毒性试验提供背景参考数据,随着研究的不断深入,将有更多的数据补充进去,使实验结果更加真实可靠。

#### 参考文献:

- [1] 孙祖越,周莉,闫晗,等. 如何成功开展药物非临床生殖毒性试验[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(22): 2195-2204.
- [2] 周宗灿. 毒理学教程[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 238-240.
- [3] Makin A. Minipigs as a non-rodent species for embryofetal development studies [C]. Meeting of the Japanese Society of Toxicology. The Japanese Society of Toxicology, 2013: 109.
- [4] Bode G, Clausing P, Gervais F, et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010, 62(3): 196-220.
- [5] Vamathevan JJ, Hall MD, Hasan S, et al. Minipig and beagle animal model genomes aid species selection in pharmaceutical discovery and development [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 270(2): 149-157.
- [6] 张均田, 杜冠华. 现代药理实验方法[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2012.
- [7] Schulz F, Batke M, Mangelsdorf I, et al. Sensitivity of different generations and developmental stages in studies on reproductive toxicity [J]. Toxicol Lett, 2014, 226(2): 245-255.
- [8] 孙祖越, 周莉, 闫晗, 等. 药物非临床生殖发育毒性试验中逐案原则的建议[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(8): 836-843.
- [9] 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: 143-168.
- [10] Peters PW. Developmental toxicology: Adequacy of current methods [J]. Food Addit Contam, 1998, 15(Suppl): 55-62.
- [11] van der Laan JW, Brightwell J, McNulty P, et al. Regulatory acceptability of the minipig in the development of pharmaceuticals, chemicals and other products [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010, 62(3): 184-195.
- [12] Svendsen O. The minipig in toxicology [J]. Exp Toxicol Pathol, 2006, 57(5-6): 335-339.
- [13] 原野, 马华智, 吴纯启. 小型猪作为生殖毒性实验模型的特点与优势分析[J]. 中国药理学与毒理学杂志. 2013, 27(3): 592.

[收稿日期]2017-10-30

#### 专家问答

##### 问:实验动物组织电镜取材注意事项及要求

答:电镜生物样品的取材,正确与否决定着实验结果的准确性,电镜要求样品必须忠实地反映其生活时的状态,应尽量避免“死后改变”和人为假象的发生,现将电镜取材注意事项总结如下:

(1)取材部位要准确:器官、部位要准确,如观察肾小球需取肾皮质而不要取到肾髓质。

(2)动作迅速:活体(血供未断)取材,材料离体后需在 1 min 内放入固定液(戊二醛),使组织尽可能保持原来的生活状态。

(3)材料体积要小:一般不超过 1 mm<sup>3</sup>,使组织得到均匀而充分的固定,需要定向包埋的样品(如皮肤、肌肉、血管等)应切成 1×3 mm<sup>2</sup> 的长条。

(4)机械损伤要小:取材应用锋利、清洁的双面刀片(新刀片应用酒精去除刀锋上的油脂),尽量避免牵拉和挤压。

(5)低温:固定液 4℃ 保存,取材所需器械应进行预冷,取材过程在冰盒上进行,取好的样品放在含固定液的小瓶中 4℃ 保存,尽量降低酶的活性,减少细胞的损伤。

(感谢上海中医药大学中医肾病研究所 刘伟伟 的解答)