



不同阶段幼龄 SD 大鼠血液指标差异的探讨

孙 超¹ 黄维芝² 孙俊梅¹ 李晓菲¹ 汤连升¹

(1.山东省药学院山东省化学药物重点实验室,济南 250101)(2.山东中医药高等专科学校附属医院,烟台 264199)

摘要:目的 本研究旨在采集不同发育阶段幼龄 SD 大鼠的血液指标,建立相应的背景数据,为开展儿科药物安全性评价提供参考。**方法** 分别收集 3、6、8、12 和 16 周龄共计约 200 余只幼龄 SD 大鼠的血样,采用全自动血球计数仪、生化分析仪、测定相应指标。**结果** 从各指标参数结果看,6 周龄组大鼠的血液指标与 16 周龄大鼠相比 RBC、HGB、TP、BUN 等大部分指标存在一定差别,12 周龄组大鼠的血液指标与 16 周龄大鼠相比 WBC、HGB、BUN 等大部分指标无差异。**结论** 结果表明不同周龄阶段的幼龄 SD 大鼠的血液指标具有一定的时间相关性,建立不同时期的背景数据对于幼龄大鼠试验血液指标的统计分析和讨论具有一定的指导意义。

关键词:幼龄 SD 大鼠;血液学指标;血生化指标;背景数据

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)05-0042-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.008

随着临床对儿科用药安全理念的加强,儿科药物非临床安全性评价和幼龄动物相关试验越来越受到重视。婴、幼儿期是一个不断发育成长的过程,在生长的不同阶段拥有不同的体征,对药物作用的反馈也存在一定的差异,同样不同发育阶段的幼龄大鼠对于药物的不良反应以及毒性表征亦存在差异^[1-2]。不同区域或者 GLP 条件下成年 SD 大鼠生物学指标文献报道较多^[3-4],但 GLP 条件幼龄大鼠尚无建立一套完整的、规范的血液学和血清生化学指标背景数据^[5-6],本研究在幼龄大鼠的不同发育时间段,对大鼠的血生化指标及血液学指标进行采集分析,探究不同发育阶段对血液指标影响,以期构建本中心幼龄大鼠的背景数据,用于试验结果异常数据的解释。

1 材料与方法

1.1 试剂和主要仪器

戊巴比妥钠,由济南亿欧生物科技有限公司分装提供;SYSMEX XT-2000IV 型全自动血球计数仪, Sysmex Corporation 生产;SYSMEX CA1500 全自动血凝分析仪, Sysmex Corporation 生产;日立 7180 全自

动生化分析仪,日本株式会社日立高新技术生产;SPF 级大、小鼠生长繁殖饲料,北京科澳协力饲料有限公司生产。

1.2 动物与饲养条件

取成年性成熟健康 SD 大鼠 60 只(用于繁殖幼龄 SD 大鼠),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2012-0001。60 只幼龄大鼠来源于不同窝别,雌雄各半,饲养于中心 SPF 屏障系统内,实验动物使用许可证号 SYXK(鲁)2014 0008。饲养条件:饲养间控制温度 20~26℃,日温差≤4℃,湿度 40%~70%,换气次数至少 8 次/h;每笼 1 只饲养于放有垫料的透明大鼠饲养盒(笼盒尺寸≥500 mm×360 mm×200 mm),用 SPF 大小鼠生长繁殖饲料喂养,自由进食和饮水。

1.3 动物分组

将成年雄鼠与雌鼠 1:1 合笼,分娩后第 4 天根据健康状况每窝留取雌、雄胎鼠各半,分娩后第 15 天按照胎鼠体重随机分成 6、12 和 16 周龄组,每组动物 20 只,雌雄各 10 只。幼龄大鼠 6、12 和 16 周龄分别相当于人类儿童、青少年和成年时期,大体覆盖了机体发育特征显著的三个时间段^[7-9]。

收稿日期:2019-03-28

作者简介:孙 超(1987—),男,主管药师,药理毒理研究.E-mail:1115897569@qq.com

通信作者:汤连升(1980—),男,副主任药师,药理毒理研究.E-mail:13276419796@163.com

1.4 生物样本的收集和检测

相应组别分别于 6、12 和 16 周龄时禁食 12 h,按照 40 mg/kg 体质量剂量腹腔注射 1%戊巴比妥钠溶液麻醉后腹主动脉取血^[10],然后分别置于添加 EDTAK₂、枸橼酸钠和促凝剂的一次性负压采血管中,根据要求处理后置于 Sysmex XT-2000iv 全自动血液分析仪、SYSMEX CA1500 全自动血凝分析仪和日立 7180 全自动生化分析仪进行检测。

1.5 统计方法

计算各测定指标参数的平均值和 95%的置信区间,采用 SPSS18.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 幼龄大鼠血常规及凝血主要指标的测定与分析

参见表 1、2,结果显示不同周龄间雌性幼鼠的 WBC、PLT、APTT、TT 和 Fbg 指标以及雄性幼鼠的 LYNPH%、Fbg 指标无统计学差异($P>0.05$)。6 周龄组的血常规和凝血指标多数指标与 12 周龄和 16 周龄组比较有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);12 周龄组仅个别指标与 16 周龄组相比有统计学差异

($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。统计分析结果表明:幼龄 SD 大鼠前期发育阶段的血常规及凝血指标与成年时期的 SD 大鼠指标具有一定差异性。

数据分析表明雌雄幼鼠的大部分血常规及凝血指标呈现一定的时间相关性;12 周龄和 16 周龄幼鼠的 RBC、PLT、HGB 指标与 6 周龄幼鼠相比均出现明显升高现象,个别数据虽无统计学差异,但是亦有升高趋势;NEUT 和 EO 比例随着幼鼠周龄的增加呈现升高趋势,而 MONO 比例则出现降低趋势。12 周龄和 16 周龄幼鼠的 RET 细胞数与 6 周龄幼鼠相比均出现明显降低现象。凝血方面雄性 6 周龄幼鼠 APTT 指标出现极显著性降低,其他 6 周龄幼鼠部分指标与 12 周龄、16 周龄组相比虽有统计学差异,但是各组的平均值差别不大,无太明显的离散性。12 周龄幼鼠和 16 周龄大鼠比较,仅个别指标有统计学差异,其余指标均无明显差异。通过对统计结果的分析判断,处于儿童时期的 SD 幼鼠的血常规和凝血指标与青少年、成年时期相比有一定的差异性,值得进一步探究,而处于青少年时期的 SD 大鼠和成年期的指标参数基本一致,数据无明显的离散性;该发现对今后幼鼠试验有一定的参考价值。

表 1 雌性幼龄大鼠血常规及凝血指标数据

Table 1 Blood Routine and Coagulation Index Data of Young Female Rats			
血液指标	6 周龄(♀)	12 周龄(♀)	16 周龄(♀)
WBC/(10 ⁹ /L)	4.16± 1.42	4.13± 1.57	3.92± 1.69
RBC/(10 ¹² /L)	5.45± 0.32 * * * ^{##}	7.16± 0.41	7.47± 0.35
HGB/(g/L)	125.10± 8.30 * * * ^{##}	150.00± 8.80	147.90± 5.90
PLT/(10 ⁹ /L)	794.50±71.00	900.10±250.30	928.80±198.20
NEUT/%	9.20± 3.40 **	9.50± 3.30 *	13.50± 3.60
LYMPH/%	79.00± 5.30	82.60± 3.60 *	77.90± 5.80
MONO/%	10.60± 3.40 * * * ^{##}	6.60± 2.10	5.10± 2.00
EO/%	1.20± 1.00 *	1.30± 0.40 *	3.60± 3.20
RET/(10 ¹² /L)	7.17± 1.64 * * * ^{##}	3.38± 0.44	3.52± 0.53
PT/s	14.40± 1.10 * * * ^{##}	13.60± 0.40	13.10± 0.60
INR/s	1.23± 0.09 * * * ^{##}	1.16± 0.04	1.13± 0.05
APTT/s	13.00± 5.80	13.80± 1.30	11.40± 1.10
TT/s	32.10± 1.50	33.70± 3.20	33.70± 2.00
Fbg/s	1.90± 0.40	1.90± 0.20	1.80± 0.20

注:6 周龄、12 周龄组与 16 周龄组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$,6 周龄组与 12 周龄组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$
Note:The comparison between 6 weeks old group、12 weeks old group and 16 weeks old group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;The comparison between 12 weeks old group and 16 weeks old group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

2.2 幼龄大鼠血生化主要指标背景数据的测定与分析

结果参见表 3、4,雌性幼鼠的 ALT、TC、TG 不同

周龄间无统计学差异($P>0.05$);雄性幼鼠的 ALT、AST、TBIL、TG、CK 不同周龄间无统计学差异($P>0.05$)。雌雄幼鼠 6 周龄组的血生化指标大部分数

据与 12 周龄、16 周龄组相比有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 12 周龄组仅个别血生化指标与 16 周龄组相比有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表明幼龄 SD 大鼠的血生化指标在不同时间点是有所差异的。

通过数据分析发现雌、雄幼鼠的大部分血生化指标具有一定的时间相关性,且相关性无明显性别差异;雌、雄幼鼠 ALP、A/G 均呈时间负相关性,TP、TBIL、GLU、BUN、Crea 均呈时间正相关性。12 周龄幼鼠和 16 周龄大鼠的 ALP、A/G 指标与 6 周龄幼鼠

相比均有明显降低现象。12 周龄和 16 周龄组的 TP、TBIL、GLU、BUN、Crea 指标与 6 周龄幼鼠相比均有明显升高现象,个别数据虽无统计学差异,但是亦有升高趋势。12 周龄幼鼠和 16 周龄大鼠比较,除个别指标有统计学差异外其余指标均无明显差异。通过对以上统计结果的分析判断,SD 大鼠儿童时期的血生化指标与青少年、成年时期相比差异性比较明显,而 SD 大鼠青少年时期与成年时期相比基本无明显差别。

表 2 雄性幼龄大鼠血常规及凝血指标数据

Table 2 Blood Routine and Coagulation Index Data of Young Male Rats

血液指标	6 周龄(♂)		12 周龄(♂)		16 周龄(♂)	
WBC/($10^9/L$)	5.78±	1.57 *	6.53±	1.31	7.38±	1.84
RBC/($10^{12}/L$)	5.61±	0.37 ** ##	7.38±	0.40 **	8.05±	0.22
HGB/(g/L)	126.00±	7.50 ** ##	154.70±	5.20	153.70±	4.80
PLT/($10^9/L$)	838.10±	108.90 ** ##	1001.80±	84.70	1079.50±	125.60
NEUT/%	8.50±	2.40 **	10.10±	2.10	12.00±	2.30
LYMPH/%	79.90±	5.10	81.20±	3.10	81.00±	3.30
MONO/%	10.90±	3.90 * * #	7.70±	2.70	5.60±	1.20
EO/%	0.80±	0.50 *	1.00±	0.40	1.40±	0.50
RET/($10^{12}/L$)	7.37±	2.02 * * ##	4.24±	0.54	3.71±	0.26
PT/s	13.40±	0.40 * #	13.90±	0.60	14.00±	0.50
INR/s	1.15±	0.03 * #	1.19±	0.05	1.20±	0.04
APTT/s	9.30±	1.70 * * ##	15.20±	1.30	14.90±	1.20
TT/s	32.60±	1.40 * * ##	35.10±	1.30	35.40±	1.00
Fbg/s	2.30±	0.30	2.20±	0.10	2.20±	0.20

注:6 周龄、12 周龄组与 16 周龄组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 6 周龄组与 12 周龄组比较# $P<0.05$, ## $P<0.01$
Note:The comparison between 6 weeks old group、12 weeks old group and 16 weeks old group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;The comparison between 12 weeks old group and 16 weeks old group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

表 3 雌性幼龄大鼠血生化指标数据

Table 3 Blood Biochemical Index Data of Female Young Rat

血液指标	6 周龄(♀)		12 周龄(♀)		16 周龄(♀)	
ALT/(U/L)	37.10±	8.70	31.60±	4.70	36.70±	7.90
AST/(U/L)	104.00±	20.70	106.80±	19.70 *	87.20±	18.10
TP/(g/L)	51.60±	3.30 ** ##	58.00±	2.70 **	62.40±	4.10
TBIL/(umol/L)	0.86±	0.22 ** ##	1.40±	0.28	1.37±	0.32
ALP/(U/L)	192.90±	43.30 ** ##	108.60±	19.8 **	70.80±	14.30
GLU/(mmol/L)	6.10±	0.90 ** ##	8.20±	1.00	8.70±	0.70
BUN/(mmol/L)	5.20±	1.20 ** ##	6.70±	0.90	6.90±	1.50
Crea/(umol/L)	17.80±	3.80 ** ##	27.80±	3.00 **	33.50±	6.20
TC/(umol/L)	1.76±	0.30	1.53±	0.40	1.69±	0.35
TG/(mmol/L)	0.50±	0.20	0.40±	0.20	0.50±	0.20
CK/(U/L)	682.20±	291.70 *	750.60±	279.50 *	422.10±	244.10
A/G	1.17±	0.05 * * ##	1.01±	0.06	1.00±	0.05

注:6 周龄、12 周龄组与 16 周龄组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 6 周龄组与 12 周龄组比较# $P<0.05$, ## $P<0.01$
Note:The comparison between 6 weeks old group、12 weeks old group and 16 weeks old group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;The comparison between 12 weeks old group and 16 weeks old group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

表 4 雄性幼龄大鼠血生化指标数据

Table 4 Blood Biochemical Index Data of Male Young Rat

血液指标	6 周龄(♂)	12 周龄(♂)	16 周龄(♂)
ALT(U/L)	40.80± 3.40	40.20± 6.80	42.00± 9.40
AST(U/L)	128.40± 24.40	111.20± 15.90	120.60± 30.00
TP(g/L)	50.80± 3.10***	56.10± 1.80	57.40± 3.20
TBIL(umol/L)	1.08± 0.24	1.28± 0.40	1.36± 0.34
ALP(U/L)	266.60± 80.40***	175.20± 22.00	149.10± 51.10
BUN(mmol/L)	6.50± 0.90**	7.50± 0.80**	8.90± 0.80
Crea(umol/L)	5.20± 0.70**	5.90± 0.80**	7.30± 0.90
TC(umol/L)	18.30± 2.60***	24.20± 2.70*	27.60± 3.70
TG(mmol/L)	1.89± 0.31##	1.48± 0.27*	1.81± 0.40
CK(U/L)	1.00± 0.40	0.70± 0.20	0.80± 0.40
A/G	924.20±319.50	771.10±180.30	761.90±257.60
ALT(U/L)	1.13± 0.06***	0.92± 0.04	0.87± 0.08

注:6 周龄、* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 6 周龄组与 12 周龄组比较# $P<0.05$, ## $P<0.01$

Note:The comparison between 6 weeks old group、12 weeks old group and 16 weeks old group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;The comparison between 12 weeks old group and 16 weeks old group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

3 讨论

实验动物的血液学指标和血生化指标是药效、新药评价试验的基础指标,这些基础指标在幼龄动物中尤其匮乏。本次试验得到了本试验室不同时间段幼龄 SD 大鼠的血液学和血清生化学常用检测指标的正常生理波动的大体范围,初步建立了相应的背景数据,为本中心开展儿科药物的非临床安全性评价提供数据支持。所得数据与部分文献数据^[11-13]基本相近,但也存在一定的差异性,初步估计是可能主要由于采集血液样本的动物周龄阶段不同所引起的。从本次研究结果可知,相对于 12 周龄幼鼠,6 周龄幼龄大鼠血液指标与 16 周龄成年大鼠相比有明显的差异,推测可能周龄越小幼鼠的血液学和血清生化学指标较成年动物的差异性会更明显,这应与幼龄时期机体的发育正处于旺盛阶段有必然的联系。

目前的试验数据基本建立了本中心幼龄 SD 大鼠不同发育阶段的血液学和血清生化学数据参考范围,可初步用于本中心血液学结果的合理解释。资料显示幼龄犬标准血液学参数指标从出生到青春期有一些特殊的差异^[14],本试验研究结果表明幼龄大鼠亦存在一定的差异。但是,由于受到样本量的限制,尚未建立全面完善的幼龄大鼠血液指标的背景数据,在此希望各实验动物中心或研究中心逐步采集和分享幼龄大鼠血液指标的相关数据,以期建全幼龄大鼠血液学参考范围,为今后开展幼龄大鼠试

验的血液学和血清生化学数据分析提供参考范围,为正常生物学变异和儿科新药的药效作用判断提供了参考。

参 考 文 献

[1] FDA. Guidance for Industry: Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products [EB/OL]. (2006-02) [2015-09-15]. <http://www.fda.gov/download/drug/guidancecompianceregulatoryinformation/guidances/ucm079247.Pdf>.

[2] Center for Drug Evaluation of CFDA. Technical Guidelines for Population Drug Clinical Trials in Pediatrics (exposure draft) [儿科人群药物临床试验技术指导原则(征求意见稿)] [EB/OL]. (2015-07) [2015-12-8]. <http://www.cde.org.cn>.

[3] 杨桂梅,王振宇,陈丽玲,等. SPF 级 SD 大鼠部分生物学指标的建立[J]. 实验动物科学,2008,25(4):19-22.

[4] 王丽芳,代宝强,谭余庆,等. GLP 屏障环境动物实验室 SD 大鼠标准生物学指标的建立[J]. 实验动物科学,2019,36(1):10-16.

[5] 孙祖越,周莉,韩玲.儿科药物非临床安全性评价原则及重要评价的特殊性[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(1):13-20.

[6] 黄芳华,朱飞鹏,笪红远,等.中药儿科用药非临床安全性评价的一般考虑[J].中国新药杂志,2015,24(24):2779-2784.

[7] Buelke-Sam J. Comparative schedules of development in rats and humans: implications for developmental neurotoxicity testing [C]. Toxicological Sciences. Great Clarendon St, Oxford OX2 6dp, England: Oxford Univ Press,2003,72:169-169.

[8] 施新猷.医用实验动物学[M].北京:人民军医出版社,1999:388.

[9] 袁伯俊,廖明阳,李波.药物毒理学实验方法与技术[M].北京:化学工业出版社,2007.



- [10] 陈辉,姜骊,王雁,等. 三种不同麻醉药对 SD 大鼠肝移植手术麻醉效果的比较和应用[J].实验动物科学,2009,26(4):57-59.
- [11] 项华,查捷,孙建荣,等.清洁级 SD 大鼠血液学与血液生化学指标正常参考值的观察[J].中国卫生检验杂志,2009,19(4):772-774.
- [12] 蒋中仁,徐薇,金伟,等.SD 大鼠血液学指标、血生化指标及脏器比正常值范围探讨[J].预防医学情报杂志,2011,27(10):789-791.
- [13] 樊林花,李丹,刘茂林,等. 清洁级 SD 大鼠血液生理及生化指标正常参考值的观察[J]. 中国医疗前沿,2011,6(19):33-34,63.
- [14] Robinson K, Smith S Y, Viau A. Dog juvenile toxicity [M]//Hoberman AM. Pediatric Nonclinical Drug Testing: Principles, Requirements, and practices. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012,183-212.

Study of Blood Index of Young SD Rats in Different Stages

SUN Chao¹, HUANG Weizhi², SNU Junmei¹, LI Xiaofei¹, TANG Liansheng¹

(1.Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drugs, Jinan 250101, China)

2.Shandong College of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Yantai 264199, China)

Abstract: Objective The aim of this study is to collect physiological indicators of young SD rats at different developmental stages and establish relevant background data, to provide reference for the safety evaluation of pediatric drugs. **Method** The blood samples of about 200 young SD rats (3, 6, 8, 12 and 16 weeks) were collected, and the corresponding indexes were determined by automatic blood cell counting instrument, biochemical analyzer. **Result** From the result of each index parameter, the blood indexes of 6-week-old rats were different from those of 16-week-old rats in RBC, HGB, TP, BUN, etc. The blood indexes of 12-week-old rats had no difference from those of 16-week-old rats in WBC, HGB and BUN. **Conclusion** The result show that the blood indexes of young SD rats at different stages have a certain time correlation. Establishing background data of different stages has a certain guiding significance for statistical analysis and discussion of blood indexes of young SD rats.

Key words: young SD rats; hematology Index; blood biochemical index; background data

(上接第 41 页)

Establishment and Application of real-time fluorescent quantitative PCR Method for Detection of Bovine herpesvirus type 1

WANG Ji, FU Rui, LI Xiaobo, WANG Shujing, WANG Shasha, LI Wei, QIN Xiao,

HUANG Zongwen, GONG Wei, YUE Bingfei, HE Zhengming

(National Institutes for food and drug Control, National Center for quality of Laboratory Animal, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To establish a real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in Bovine origin samples. **Method** The primers and TaqMan probe were designed and synthesized according to the published BHV-1 specific sequences of *gB* gene. Q-PCR method is established. Then carries on the specificity, sensitivity, repeatability and stability of this method were tested. The method is used to detect 181 Bovine origin samples. **Result** The developed Q-PCR method was no cross reaction with Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3), Bovine viral diarrhea virus type 1 (BVDV1), herpes virus type 1 (HSV-1), Felid herpesvirus 1 (FHV-1), and Pig pseudo rabies virus (PRV); sensitivity was 1×10^1 copies/ μ L; Coefficient of variation (CV) was less than 5%; There were 6 positive reaction detected in the 181 Bovine origin samples. **Conclusion** The developed PCR method is good in specificity, sensitivity, repeatability and stability and may be used for rapid quantitative detection the BHV-1 in Bovine origin samples.

Key words: Bovine herpesvirus type 1; Real-time fluorescent quantitative PCR; bovine Origin Sample