



SD大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验的基础数据

叶向锋, 刘芷含, 王灵芝, 张淑敏, 王爱平, 魏金锋

(中国医学科学院北京协和医学院新药安全评价研究中心, 北京 100050)

【摘要】 目的 检测胚胎-胎仔发育毒性试验中SD大鼠妊娠期的体重、生殖功能指标及胎鼠的各项发育指标,为SD大鼠的发育毒性研究提供参考数据。方法 395只SD雌性大鼠,交配成功后,于妊娠第20天剖检孕鼠,检查孕鼠的内脏器官有无异常,称量子宫重量、窝重和胎盘重量,计数黄体数、着床数、活胎数、吸收胎数和死胎数。胎鼠共5272只,将一半胎鼠放入固定液中做内脏检查,另一半胎鼠进行骨骼检查,检查胎鼠外观、内脏和骨骼有无异常和变异。结果和结论 建立SD大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验中各项指标的数据库,求得各指标的正常值及标准差,95%的可信区间,为生殖毒性研究提供正常值的参考依据。

【关键词】 SD大鼠;发育毒性;致畸性

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)10-11-0162-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10.11.036

Basic Data of SD Rats in Embryo-fetal Development Toxicity Study

YE Xiang-feng, LIU Zhi-han, WANG Ling-zhi, ZHANG Shu-min, WANG Ai-ping, WEI Jin-feng
(New Drug Safety Evaluation Center in Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union
Medical College, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To obtain the basic data of the Sprague-Dawley rats in embryo-fetal development toxicity study. **Methods** Timed-pregnant rats (n = 395) were sacrificed at the end of the gestation period (GD 20). Terminal examinations include necropsy, count of corpora lutea and live and dead implantations, gross evaluation of placenta, fetal body weight, and external, visceral, and skeletal examination of fetuses. 50% of fetuses were examined for visceral alterations and 50% of fetuses for skeletal abnormalities. **Results and Conclusion** The basic data of the Sprague-Dawley rats, such as body weight, fetal development, and fetal malformation/variation, were obtained.

【Key words】 SD rats; Development toxicity; Teratogenicity

随着社会经济的发展,人类接触的外源化学物质如农药、药品、食品添加剂以及环境中存在的各种污染物日益增多,其中许多物质反复接触后可损伤生殖细胞或胚胎细胞,引起生殖能力下降、不孕不育、胚胎死亡、畸形和遗传疾病等多种严重后果。从70年代起,我国已开始了对药品、农药、食品添加剂和环境污染物的致畸研究,并把生殖毒性评价列

为农药、食品及首次进口化学品等的安全性毒理学评价的重要组成部分。胚胎-胎仔发育毒性试验是生殖毒性评价的重要内容,妊娠动物自胚胎着床至硬腭闭合期间接触受试物,评价外源化学物质对妊娠动物、胚胎及胎仔发育的影响,评价内容包括妊娠动物较非妊娠雌性动物增强的毒性、胚胎胎仔死亡、生长改变和结构变化等。胚胎-胎仔发育毒

[作者简介] 叶向锋(1973-),女,博士,副研究员,研究方向:生殖毒理学。E-mail: yxf428@163.com。

[通讯作者] 魏金锋, E-mail: weijin-feng@imm.ac.cn。

性试验通常采用两种动物,一种为啮齿类动物,推荐用大鼠;另一种为非啮齿类动物,推荐用家兔^[1]。我们中心在 2008 年以来所有完成的大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验中,对溶剂对照组共 395 只 SD 孕鼠的数据进行统计分析,建立各项指标的背景数据库,为生殖毒性研究提供正常值的参考依据,使研究结果评价更加科学合理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性大鼠 395 只,由军事医学科学院实验动物中心提供 [SCXK(军) 2007-004],入室体重约 180~220 g。动物饲养于屏障环境设施内,饲养管理人员为经过培训的专业人员。房间连续通风消毒,光照时间为 8:00~20:00,室温 20~26°C,湿度 40~70%。标准饲养盒内喂养,每笼 3~5 只。食水不限,饲料为 SPF 级繁殖鼠料,军事医学科学院实验动物中心生产 [SCXK(军) 2007-005]。市政自来水先经初级过滤柱预处理后,再经纳米膜渗透过滤,最后经紫外线循环杀菌后供动物饮用。动物入室后经过 1 周左右的适应性饲养期后再进行试验。

1.2 孕鼠处理

于妊娠第 20 天时处死孕鼠,立即称重,然后切开腹部暴露两侧子宫和内脏器官,将左右两侧子宫从母体切下,称妊娠子宫重量,计数总黄体数、着床数,分离出胎仔,记录死胎、活胎、吸收胎数目,称量活胎和胎盘的重量,记录有无着床痕,并检查有无异常组织,必要时留取并固定,作组织病理学检查。

1.3 胎鼠处理

1.3.1 胎鼠外观检查

先检查头部,有无露脑、脑膜膨出;头部大小;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。

1.3.2 胎鼠标本的制作

内脏标本制作:将每窝 1/2 胎鼠放入 Bouin's 液固定,2~4 周后做内脏检查;

骨骼标本制作:将每窝另 1/2 放入 95% 酒精中固定做骨骼检查。2~4 周后将胎鼠冲洗干净,放入 1% KOH 溶液中浸泡 8 h,然后除去胎鼠内脏,再将骨骼标本放入茜素红应用液中染色 16~24 h,最后用 1% KOH 溶液脱去染色液,将标本置于透明液中

透明,放入纯甘油中备查。

1.3.3 胎鼠标本的检查

骨骼检查内容:颅骨是否完整,有无骨化不全,枕骨的骨化程度,胸骨、肋骨及脊椎等有无异常,四肢骨骨化程度、长短粗细、指趾骨的发育状况等。

内脏检查内容:先测量每只胎鼠的身长及尾长,再进行内脏切片检查。

1.4 统计学方法

所有数据用 SPSS 16.0 统计软件进行处理,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 SD 大鼠孕期体重变化

处理对母体体重增长的影响经常被认为是母体毒性的评价指标之一。在胚胎-胎仔发育毒性试验中,于妊娠第 6~15 天给予孕鼠受试物,每 3 天称量动物体重 1 次,测得孕鼠妊娠各时期的体重数据见表 1。

表 1 SD 孕鼠孕期体重 ($\bar{x} \pm s$, g)
Tab. 1 Body weight of pregnant rats ($\bar{x} \pm s$, g)

妊娠期 (GD)	体重(动物数) (Bodyweight, n=395)	95% 可信区间 (95% confidence interval)
0	248.0 ± 24.8	245.5 ~ 250.4
3	269.0 ± 24.9	266.5 ~ 271.4
6	284.8 ± 25.7	282.3 ~ 287.3
9	298.9 ± 26.7	296.3 ~ 301.6
12	317.1 ± 27.8	314.3 ~ 319.8
15	336.4 ± 29.3	333.5 ~ 339.3
18	371.4 ± 32.4	368.2 ~ 374.6
20	399.7 ± 34.5	396.2 ~ 403.1
孕期体重增长 (Bodyweight gain) (GD6 - GD20)	37.3 ± 16.9	35.6 ~ 38.9

2.2 SD 大鼠孕期生殖功能指标及胎鼠生长发育指标

妊娠第 20 天处死孕鼠后,打开孕鼠腹腔,暴露并切开孕鼠子宫,取出胎鼠,称量胎鼠和胎盘的重量,对进行内脏检查的胎鼠测量其身长和尾长,检测各项指标的数据见表 2、3。在胚胎-胎仔发育毒性试验中,黄体数、着床数、吸收胎数、死胎数等指标通常是衡量胚胎早期、晚期发育毒性的指标,胎鼠、胎盘的重量以及胎鼠的身长、尾长数值同样也是评价外来受试物对胎鼠是否产生毒性的一个指标,母体毒性有时会引起继发的胚胎毒性,造成胚胎发育迟缓和/或迟滞,从而造成胎鼠的体重偏低,身体短小。通过对背景数据的分析,可以在评价受

试物时得出科学合理的结论。

表 2 SD 大鼠孕期生殖功能指标
Tab. 2 Reproductive parameters of pregnant rats

检测指标 (Index)	结果 (Results)	95% 可信区间 (95% confidence interval)
交配动物数(No. of mating)	430	—
受孕动物数(No. of conception)	395	—
受孕率(Conception rate)	91.9	—
总黄体数(Corpora lutea counts)	6111	—
窝平均黄体数(No. of corpora lutea, $\bar{x} \pm s$)	15.5 \pm 2.5	15.2 ~ 15.7
总着床数(Implant counts)	5617	—
窝平均着床数(No. of implantation, $\bar{x} \pm s$)	14.2 \pm 3.2	13.9 ~ 14.5
着床率(Implantation rate, %)	92.5	—
吸收胎(Resorbed embryos)	147(37.3%)	—
窝数(Litter counts, %)	—	—
吸收胎数(Resorbed embryos)	229	—
吸收胎率(Resorbed embryos rate, %)	4.1	—
活胎(Live fetuses)	5272	—
活胎总数(Live fetuses counts)	—	—
窝平均活胎数(No. of live fetuses, $\bar{x} \pm s$)	13.4 \pm 3.5	13.0 ~ 13.7
活胎率(Live fetuses rate, %)	97.8	—
死胎(Dead fetuses)	早死胎(early) 晚死胎(lately)	—
死胎窝数(Litter counts, %)	54 (13.7%) 11 (2.8%)	—
死胎数(Dead fetuses counts)	101 15	—
死胎率(Dead fetuses rate, %)	1.9 0.3	—
子宫连胎重(Gravid uterine weights, $\bar{x} \pm s$)	77.5 \pm 19.4	75.6 ~ 79.5
性别比(雌/雄) Sex ratio (female/male)	1:0.94	—

表 3 胎鼠生长发育指标($\bar{x} \pm s$, g)

Tab. 3 Index of fetal development

检测指标(Index)	均值 \pm 标准差(动物数) Mean \pm SD (n)	95% 可信区间(95% confidence interval)
身长(Body length, mm)	33.8 \pm 2.4 (n = 2617)	33.7 ~ 33.9
尾长(Tail length, mm)	13.6 \pm 1.2 (n = 2617)	13.6 ~ 13.7
窝重(Dams weight, g)	52.3 \pm 14.8 (n = 395)	50.8 ~ 53.7
平均胎重(Fetal body weight, g)	4.0 \pm 0.8 (n = 5272)	3.9 ~ 4.0
胎盘重(Placenta weight, g)	7.8 \pm 2.0 (n = 395)	7.6 ~ 8.0

2.3 胎鼠外观、内脏及骨骼检查

对胎鼠进行外观、内脏及骨骼检查是进一步判断外来受试物是否对胎鼠产生毒性的手段之一。对胎鼠的内脏进行切片检查,头部主要检查有无唇裂、腭裂等,鼻、眼、大脑、脑室等组织结构有无异常。沿胸腹壁中线和肋下沿水平线各切一刀,暴露胸腔与腹腔内脏,依次检查心、肺、横膈膜、肝脏、胃肠道等脏器的大小、位置,然后将其摘除,检查肾脏、输尿管、膀胱、子宫或睾丸位置及发育情况,再将肾脏切开,观察有无肾盂扩大或积水。胎鼠的骨骼发育存在变异,包括脊椎骨和肋骨的数量、胸骨节骨化模式或胸骨节与肋骨的融合、腰椎及骶椎及髌骨的联合,骨骼的发育也存在广泛的可塑性,一般情况下,自然发生率相对高的群体所发生的变异

趋势经常是可逆的,对动物产生很小的或不产生有害性后果^[2]。

在本中心的研究结果表 4 中可以看到,有 4 只胎鼠出现外观异常,分别表现为双下肢内翻、脑膨出、颈部皮下淤血和肝肠外露;胎鼠的内脏检查未见异常;胎鼠骨骼检查主要表现为胸骨数目的变异,主要表现为第 5、6 胸骨的缺失;肋骨异常表现为波状肋;枕骨的 0 级骨化率在 99% 以上。

3 讨论

生殖毒性研究(reproductive toxicity study) 是外来受试物非临床安全性评价的重要内容,它与急性毒性、长期毒性、遗传毒性等毒理学研究有着密切

(下转第 172 页)

室废物废气处理,保护外部环境。在生物安全动物实验室内,均设有空气高效过滤设备。在顶层建设空气处理层,层高普遍在 6 m 以上,配有空气集中处理设施,每个房间及每个过滤器、压力调节阀、温湿度调节阀的位置均有清楚标识,风机、通风管道、净化、恒温、恒湿设备立体排列,以便检漏和维修。大动物三级实验室和一般实验室均采用上送上排方式。大动物解剖室为上送下排。风量、压力都采用 VAV box 末端进行控制,送排风均使用 bag in-bag out or bag out 设备过滤,四级实验室排风为两级高效过滤,送风为一级过滤;三级生物安全实验室排风为一级高效过滤,送风无过滤。排风过滤器每年检漏 1 次,采用人工发烟的方法,正压检漏(人工检漏)。排风过滤器在更换前将 bag in-bag out 两端的密闭阀关闭后,熏蒸消毒,然后打开更换。排风机均为每系统一用一备,送风机部分一用一备。

7 管理

美国、加拿大对生物安全三级实验室和生物安全三级动物实验室的日常管理特别严格,设有一套严密的人员管理系统和门禁系统,区分不同人员,授予不同的进入权限,进行严格的分级分区管理。人员参观实行严格登记,讲解员带领,还有保安监

督。对空气的排放要求特别严格,对每个过滤器、空气调节阀和设施实行定期或不定期检漏或维修。加拿大人类及动物卫生科学中心的维修管理人员达 58 人之多,占全中心总人数的八分之一。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部公告第 424 号《病原微生物实验室生物安全管理条例》,2004.
- [2] 中华人民共和国农业部公告第 302 号《兽医实验室生物安全管理规范》,2003.
- [3] 农业部兽医局、中国动物疫病预防控制中心编. 兽医实验室生物安全指南. 中国农业出版社, 2006.
- [4] 中华人民共和国国家标准 GB 19489-2008《实验室生物安全通用要求》,国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会.
- [5] 中国动物疫病预防控制中心组译. 兽医生物安全设施—设计与建造手册. 中国农业出版社, 2007.
- [6] 中国动物疫病预防控制中心编译. 国外兽医生物安全资料汇编. 中国农业出版社, 2007.
- [7] 程水生,等. 美国、加拿大生物安全三级动物实验室考察报告[J]. 中国兽药杂志第 41 卷第 10 期, 2007.
- [8] Laboratory Biosafety Manual Third edition WHO 2004. <http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>.

(修回日期)2011-09-16

(上接第 164 页)

的联系,其目的是通过动物试验反映受试物对哺乳动物生殖功能和发育过程的影响,预测其可能产生的对生殖细胞、受孕、妊娠、分娩、哺乳等亲代生殖机能的不良影响,以及对子代胚胎-胎儿发育、出生

后发育的不良影响。传统的生殖毒性试验一般分为三段进行,分别为生育力与早期胚胎发育毒性试验、胚胎-胎仔发育毒性试验、围产期毒性试验,胚胎-胎仔发育毒性试验早期也称为致畸敏感期毒性试验,属于 II 段试验,由于这个阶段接触敏感受试物导致的毒性后果相对更为严重,因此对结果的判断显得尤为重要,本中心得到的这些基础数据可以为外来受试物的生殖毒性评价试验提供一定的背景参考数据,随着试验的进一步开展,将有更多的数据补充进去,为研究提供更有参考价值的背景数据,使研究结果评价更加科学合理。

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[S], 2006.
- [2] 范玉明,李毅民,张舒等. 药物安全性评价(第一版)[M]. 北京:化学工业出版社, 2006: 218-249.

(修回日期)2011-09-16

表 4 胎鼠外观、内脏和骨骼检查

Tab. 4 Index of fetal examinations

检测指标 (Index)	胎鼠数 (No. of fetus)	畸形/变异数(率) (malformation/ variation, %)
外观检查(External examination)	5272	4 (0.07)
内脏检查(Visceral fetal examination)	2617	0(0.0)
骨骼检查(Skeletal fetal examination)	2655	—
椎骨(Vertebrae)		0(0.0)
肋骨(Rib)		10(0.4)
胸骨(Sternebrae)		635 (23.9)
四肢骨(Limbs)		0(0.0)
枕骨 (Ossification of Occipital bone)		
0 级		2638(99.4)
I 级		14(0.5)
II 级		3(0.1)
III 级		0(0.0)
IV 级		0(0.0)