·重大新药创制专项巡礼·

幼龄 SD 大鼠重复给药毒性试验背景数据的建立

崇立明[1,2,3],杨　阳[1,2,3],陈丽芬[1,2,3],许　丽[1,2,3],陈丁实[1,2,3],王忠辉[1,2,3],周　莉[1,2,3],孙祖越[1,2,3]
(1 上海市计划生育科学研究所药理毒理学研究室,中国生育调节药物毒理检测中心,上海 200032;
2 国家人口和计划生育委员会计划生育药具重点实验室,上海 200032;
3 复旦大学生殖与发育研究院,上海 200032)

[摘要] **目的**:对本研究室幼龄 SD 大鼠 4 周重复给药毒性试验中正常对照组的各项指标进行统计整理,建立本研究室的数据背景资料,为儿科药物非临床安全性评价提供参考。**方法**:从本研究室 2015—2019 年进行的儿科药物重复给药毒性试验中,选取全部正常对照组幼龄 SD 大鼠的数据,包括体重、摄食量、生殖发育(龟头包皮腺裂开和阴道张开时间)、骨骼发育(顶臀长、胫骨长度和密度)、血液学、血生化、免疫和脏器指标进行统计分析。**结果**:经过数据统计分析,得出不同性别幼龄 SD 大鼠各项指标的均值、标准差、最大值、最小值、95% 置信区间和变异系数。**结论**:初步建立了不同性别和年龄的幼龄 SD 大鼠各项指标的正常值参考范围。

[关键词] 幼龄;SD 大鼠;重复给药毒性;背景数据
[中图分类号] R99　[文献标志码] A　[文章编号] 1003－3734(2021)01－0017－08

Development of background data on repeated toxicity studies in juvenile SD rats

CHONG Li-ming[1,2,3], YANG Yang[1,2,3], CHEN Li-fen[1,2,3], XU Li[1,2,3], CHEN Ding-shi[1,2,3],
WANG Zhong-hui[1,2,3], ZHOU Li[1,2,3], SUN Zu-yue[1,2,3]
(1 *Shanghai Institute of Planned Parenthood Research*, *National Evaluation Center for Toxicology of Fertility Regulating Drugs*, *Shanghai* 200032, *China*; 2 *NHC Key Lab. of Reproduction Regulation*, *Shanghai* 200032, *China*; 3 *Reproductive and Developmental Research Institute*, *Fudan University*, *Shanghai* 200032, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To summarize the indexes of juvenile SD rats in control group of the 4-week repeated administration toxicity test in our laboratory, and to establish the background data of our laboratory so as to provide reference for the evaluation of non-clinical safety of pediatric drugs. **Methods**: From repeated administration toxicity test of pediatrics between 2015 and 2019, the indexes of juvenile SD rats were selected and analyzed, including body weight, feed consumptions, reproductive development (preputial separation and vaginal patency), skeletal development (crown-rump length, tibia length and bone density), hematology, blood biochemistry, immunization and viscera index. **Results**: The mean value, standard deviation, maximum and minimum values, 95% confidence interval as well as coefficient of variation of all indicators from juvenile SD rats in different genders were obtained through statistical analysis. **Conclusion**: The reference ranges of normal values of juvenile SD rats for different genders and ages were established.

[**Key words**] juvenile;SD rats;repeated toxicity;background data

---

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2018ZX09201017-002);上海市科委研发平台专项(17DZ2293600)
[作者简介] 崇立明,男,助理研究员,主要从事药物生殖与发育毒理学研究。E-mail:chonglm@163.com。
[通讯作者] 周莉,女,硕士生导师,研究员,主要从事药物生殖与发育毒理学研究。E-mail:zhoulijss@163.com。孙祖越,男,博士生导师,研究员,主要从事药物生殖与发育毒理学研究。E-mail:sunzy64@163.com。

重复给药毒性试验是描述动物重复接受受试物后的毒性特征,它是非临床安全性评价的重要内容,通常实验动物选择正常、健康、性成熟的 SD 大鼠[1]。若受试物拟用于儿童时,为了获得不同于成年研究中所发现的潜在安全性特性的信息,应选择幼龄 SD 大鼠作为实验动物[2-5],成年动物的各项毒理学指标的参考范围对于幼龄动物并不一定适用,同时还需要考虑实验动物来源、个体差异、实验室条件、测定方法、试剂及仪器等不同因素。所以,有必要建立本研究室的幼龄 SD 大鼠各项毒理学指标的正常值参考范围。为此,本文总结了本研究室 2015—2019 年所完成的 6 个批次的 4 周重复给药毒性试验正常对照组(以纯水为对照)180 只幼龄 SD 大鼠(雌雄各半)的体重、摄食量、生殖发育、骨骼发育、血液学和脏器等数据进行了分析和探讨,希望为儿科药物安全性评价提供准确、可靠的参考依据。

材料与方法

1 药品与试剂

乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2,上海实验试剂有限公司,批号:20141118);枸橼酸钠(上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号:140720);戊巴比妥钠(pentobarbital sodium salt,德国默克公司,批号:20150520)。

2 仪器

Mettler Toledo PL1502E 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Hitachi 7020 全自动生化分析仪(日本日立公司);Sysmex XT2000i 血球分析仪(日本希森美康公司);Sysmex CA500 SERIES 凝血分析仪(日本希森美康公司);UltraFocus DXA 型 X 射线微焦点成像及双能骨密度仪系统(美国 Faxitron 公司);XCT Research SA 外周骨定量断层扫描仪(德国 STRATEC Medizintechink 公司)。

3 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,180 只,雌雄各半,接收时出生后 d 19(postnatal day 19,PND_{19}),体重 35.0 ~ 45.2 g,上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产合格证号 SCXK(沪)2018-0006。动物在上海市计划生育科学研究所(中国生育调节药物毒理检测中心)SPF 级动物房内饲养,饲养于 400 × 350 × 200 mm^3 塑料笼内,每笼饲养同性动物不多于 5 只,自由饮水、摄食,室温 20 ~ 26 ℃,相对湿度 40% ~ 70%,光照 12 h,黑暗 12 h,换气 12 次·h^{-1},全新风,实验开始前动物适应性饲养 2 d,给药时动物年龄 PND_{21}。

4 体重

PND_{21}称重,第 1 周隔天测定 1 次,之后每周测定 2 次。

5 摄食量

每周测定 1 次,计算 24 h 的摄食量。

6 生殖发育指标

雌鼠 PND_{27}开始检查阴道张开情况,雄鼠 PND_{37}开始检查龟头包皮腺裂开情况。

7 血液学

动物麻醉后,腹主动脉采集血液,取约 0.4 mL 加入预先加有 0.1 mL EDTA-K2(5%)的抗凝管中,充分混匀后用血球分析仪测定;凝血指标:3.8% 枸橼酸钠以 1∶9 比例抗凝,充分混匀后 3 000 r·min^{-1}离心 10 min,用凝血分析仪测定。

8 血生化

动物麻醉后,腹主动脉采集血液,取约 3 ~ 4 mL 静置 1 h 左右,3 000 r·min^{-1}离心 15 min 后吸取上清,用全自动生化分析仪检测血液生化指标。

9 骨骼发育指标

顶臀长、胫骨长和胫骨骨密度。骨密度测量方法包括 pQCT 法(外周骨定量计算机断层扫描法,peripheral quantitative computed tomography)和 DXA 法(双能 X 射线测量法,dual-energy X-ray absorptiometry)。

10 脏器指标

对脏器进行大体观察和称重,计算脏器系数,脏器系数 = 脏器重量/体重 × 100%。

11 数据处理

采用 SPSS 19.0 统计软件对各项指标数据进行正态性分布检验,计算 $\bar{x} \pm s$,确定最小值(Min)、最大值(Max)、95% 可信区间(95% CI)和变异系数(CV = SD/Mean × 100%),雌雄之间比较采用 t 检验。

结　果

1 体重

雌、雄大鼠 $PND_{19\sim76}$期间体重的分析统计数据见表 1。结果表明,雌、雄大鼠的变异系数较低,各个时间点的变异系数在 6.0% ~ 9.8%,体重增长稳定;PND_{27}开始,雄鼠体重明显高于雌鼠。

表 1 幼龄 SD 大鼠生长发育阶段体重的背景值

年龄 /PND	n/只	雄性				雌性			
		$\bar{x} \pm s$/g	Min,Max/g	95% CI/g	CV/%	$\bar{x} \pm s$/g	Min,Max/g	95% CI/g	CV/%
19	90	39.4 ±2.8	35.0,45.2	38.8 ~40.0	7.2	39.9 ±2.9	35.0,45.2	39.3 ~40.5	7.2
20	90	48.0 ±4.5	39.8,57.3	47.1 ~49.0	9.4	48.1 ±4.1	40.2,57.1	47.3 ~49.0	8.5
21	90	51.1 ±3.8	44.7,59.1	50.0 ~52.3	7.5	53.4 ±4.4	46.5,62.2	52.0 ~54.7	8.2
23	90	61.9 ±4.6	51.9,71.8	60.9 ~62.9	7.5	60.7 ±5.5	49.5,73.6	59.6 ~61.9	9.1
25	90	74.6 ±5.4	64.6,85.1	73.4 ~75.7	7.2	71.3 ±5.9	59.6,86.5	70.0 ~72.5	8.3
27	90	88.1 ±6.2[a]	77.9,101.1	86.7 ~89.4	7.1	82.7 ±6.6	69.8,100.6	81.3 ~84.1	8.0
30	90	109.7 ±7.4[a]	97.3,124.3	108.1 ~111.2	6.8	100.2 ±7.3	85.7,118.2	98.6 ~101.7	7.3
34	90	138.4 ±9.5[a]	117.4,157.4	136.4 ~140.4	6.9	122.8 ±8.5	104.6,142.4	121.1 ~124.6	6.9
37	90	158.7 ±10.6[a]	133.4,179.1	156.5 ~161.0	6.6	136.4 ±8.5	113.6,153.1	134.7 ~138.2	6.2
41	90	188.8 ±12.7[a]	159.2,216.4	186.1 ~191.4	6.8	155.4 ±9.5	126.2,177.9	153.4 ~157.4	6.1
44	90	211.1 ±13.9[a]	178.4,241.5	208.1 ~214.0	6.6	166.7 ±10.3	142.9,195.1	164.5 ~168.8	6.2
48	90	239.3 ±15.8[a]	198.0,270.3	236.0 ~242.6	6.6	179.8 ±11.5	151.4,204.0	177.4 ~182.2	6.4
51	30	263.5 ±15.9[a]	224.6,288.1	257.6 ~269.4	6.0	188.0 ±17.1	156.1,217.1	181.6 ~194.4	9.1
55	30	287.3 ±17.7[a]	248.1,320.8	280.7 ~293.9	6.2	199.2 ±17.7	171.3,229.3	192.6 ~205.8	8.9
58	30	305.4 ±19.1[a]	265.1,344.2	298.3 ~312.5	6.3	208.0 ±17.5	179.3,240.0	201.4 ~214.5	8.4
62	30	326.2 ±22.9[a]	275.2,376.0	317.6 ~334.7	7.0	214.8 ±21.1	173.2,260.7	206.9 ~222.7	9.8
65	30	351.8 ±22.2[a]	317.0,393.7	339.5 ~364.1	6.3	234.7 ±18.7	197.9,265.6	224.3 ~245.0	8.0
69	30	372.3 ±26.4[a]	327.0,423.3	357.7 ~386.9	7.1	242.9 ±18.9	206.3,274.7	232.4 ~253.4	7.8
72	30	383.3 ±27.2[a]	336.9,433.6	368.2 ~398.3	7.1	251.2 ±20.4	210.5,283.6	240.0 ~262.4	8.1
76	30	393.4 ±28.6[a]	341.1,446.1	377.6 ~409.2	7.3	253.6 ±20.3	215.4,286.3	242.4 ~264.8	8.0

雌雄之间比较,a:$P < 0.01$

2 摄食量

雌、雄大鼠 24 h 摄食量均随年龄的增加呈上升趋势,雌性之间摄食量比较均有统计学差异($P < 0.01$),结果见表 2。

表 2 幼龄 SD 大鼠 24 h 摄食量的背景值

年龄 /PND	n/只	雄性				雌性			
		$\bar{x} \pm s$/g	Min,Max/g	95% CI/g	CV/%	$\bar{x} \pm s$/g	Min,Max/g	95% CI/g	CV/%
24 ~25	90	10.1 ±0.6[a]	9.2,11.5	9.8 ~10.4	5.4	9.4 ±0.5	8.6,10.8	9.1 ~9.6	5.8
30 ~31	90	15.9 ±0.7[a]	14.5,17.1	15.6 ~16.3	4.5	14.2 ±1.0	12.9,16.3	13.8 ~14.7	6.8
37 ~38	90	20.5 ±1.0[a]	19.2,23.0	20.0 ~21.0	5.1	16.4 ±0.8	15.0,17.8	16.0 ~16.8	4.8
44 ~45	90	24.0 ±1.0[a]	22.2,26.2	23.5 ~24.5	4.3	18.1 ±1.6	16.0,21.7	17.3 ~18.8	8.8
51 ~52	30	25.7 ±0.5[a]	25.1,26.4	25.2 ~26.1	1.8	18.5 ±1.6	16.0,20.9	16.8 ~20.1	8.6
58 ~59	30	25.9 ±0.8[a]	24.7,26.9	25.1 ~26.7	3.1	18.6 ±1.5	15.4,21.1	16.4 ~20.8	8.1
65 ~66	15	26.5 ±0.7[a]	25.8,27.2	24.8 ~28.3	2.7	19.5 ±1.0	18.7,20.6	17.1 ~21.9	5.0
72 ~73	15	27.2 ±1.6[a]	25.6,28.8	23.3 ~31.2	6.3	16.2 ±1.5	14.6,17.3	12.7 ~19.8	9.0

雌雄之间比较,a:$P < 0.01$

3 生殖发育指标

雌鼠从 PND_{27} 开始,每天检查阴道张开情况,结果显示在 $PND_{31.9}$ 达到性成熟;雄鼠从 PND_{37} 开始,每天检查龟头包皮腺裂开情况,在 $PND_{51.9}$ 达到性成熟;两者变异系数较低,达到性成熟的时间比较稳定结果见表 3。

表 3 幼龄 SD 大鼠生殖发育指标的背景值

生殖发育指标	n/只	$\bar{x} \pm s$/d	Min,Max/d	95% CI/d	CV/%
龟头包皮腺裂开时间	90	51.9 ± 1.9	48,56	51.5 ~ 52.3	3.7
阴道张开时间	90	31.9 ± 1.9	28,36	31.5 ~ 32.3	6.0

4 血液学指标

血液学检测指标包括:红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞容积(HCT)、平均红细胞容积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、网织红细胞(Ret)计数、白细胞计数(WBC)、血小板计数(PLT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)。雌、雄大鼠的血液学指标分析统计数据见表 4,结果显示 7 周龄大鼠的 HGB,HCT,MCV,MCH,RET#,WBC,PLT,APTT 指标雌雄间有性别差异;11 周龄大鼠的 RBC,HGB,HCT,WBC,PT 指标雌雄间有性别差异。

表 4 幼龄 SD 大鼠血液学及血凝指标的背景值

指标	年龄/周	n/只	雄性				雌性			
			$\bar{x} \pm s$	Min,Max	95% CI	CV/%	$\bar{x} \pm s$	Min,Max	95% CI	CV/%
RBC/$\times 10^{12} \cdot L^{-1}$	7	60	5.34 ± 0.29	4.55,5.83	5.27 ~ 5.42	5.4	5.23 ± 0.38	4.47,6.21	5.14 ~ 5.34	7.3
	11	10	6.44 ± 0.28[a]	5.90,6.81	6.24 ~ 6.63	4.3	5.80 ± 0.30	5.42,6.27	5.58 ~ 6.01	5.2
HGB/$g \cdot L^{-1}$	7	60	109 ± 6[a]	94,120	108 ~ 111	5.1	105 ± 8	85,124	103 ~ 108	7.6
	11	10	122 ± 6[b]	109,130	118 ~ 126	4.8	112 ± 4	106,120	109 ~ 115	4.0
HCT/%	7	60	33.4 ± 2.0[a]	29.1,37.6	32.9 ~ 33.9	6.1	31.9 ± 1.5	28.2,37.3	31.5 ~ 32.3	4.8
	11	10	34.9 ± 1.9[b]	31.0,37.2	33.6 ~ 36.2	5.3	32.2 ± 1.3	30.0,34.2	31.3 ~ 33.1	3.9
MCV/fL	7	60	62.6 ± 2.7[a]	57.7,67.6	61.9 ~ 63.3	4.2	61.1 ± 2.3	56.5,65.8	60.5 ~ 61.7	3.7
	11	10	54.2 ± 1.4	52.1,56.9	53.2 ~ 55.2	2.6	55.5 ± 1.6	52.3,57.8	54.4 ~ 56.7	2.9
MCH/pg	7	60	20.5 ± 0.7[a]	18.3,22.1	20.3 ~ 20.7	3.3	20.2 ± 0.7	18.5,21.9	20.0 ~ 20.3	3.4
	11	10	19.0 ± 0.3	18.5,19.5	18.7 ~ 19.2	1.7	19.4 ± 0.4	18.5,19.9	19.0 ~ 19.7	2.3
MCHC/$g \cdot L^{-1}$	7	60	328 ± 16	289,352	324 ~ 332	4.8	330 ± 15	292,353	326 ~ 334	4.4
	11	10	350 ± 5	342,357	346 ~ 353	1.4	349 ± 5	339,355	345 ~ 352	1.4
RET#/$\times 10^{9} \cdot L^{-1}$	7	60	434.6 ± 44.0[a]	346.2,586.1	423.2 ~ 446.0	10.1	303.8 ± 52.6	206.6,435.7	290.5 ~ 318.1	17.3
	11	10	273.1 ± 36.6	195.5,313.6	246.9 ~ 299.3	13.4	254.6 ± 21.1	227.6,284.6	239.6 ~ 269.7	8.3
WBC/$\times 10^{9} \cdot L^{-1}$	7	60	4.17 ± 0.97[a]	2.44,6.07	3.92 ~ 4.42	23.3	3.43 ± 1.06	1.33,5.55	3.16 ~ 3.72	31.0
	11	10	3.81 ± 1.05[b]	1.56,4.97	3.06 ~ 4.56	27.5	2.81 ± 0.69	2.26,4.39	2.32 ~ 3.31	24.6
PLT/$\times 10^{9} \cdot L^{-1}$	7	60	1 081 ± 155[b]	496,1 565	1 041 ~ 1 121	14.3	1 022 ± 191	279,1 492	990 ~ 1 078	18.7
	11	10	870 ± 75	778,993	816 ~ 924	8.6	923 ± 93	816,1 084	856 ~ 989	10.1
PT/S	7	60	8.0 ± 0.8	6.4,10.5	7.8 ~ 8.2	9.7	7.9 ± 0.6	7.0,9.3	7.8 ~ 8.1	7.6
	11	10	9.0 ± 0.4[b]	8.3,9.7	8.6 ~ 9.3	5.0	8.3 ± 0.2	8.1,8.6	8.2 ~ 8.4	2.1
APTT/S	7	60	18.5 ± 2.9[a]	11.4,27.8	17.8 ~ 19.3	15.4	16.3 ± 2.4	10.0,21.4	15.7 ~ 16.9	14.6
	11	10	19.8 ± 2.0	16.0,23.0	18.3 ~ 21.2	10.2	18.9 ± 1.5	16.8,21.9	17.8 ~ 20.0	8.1

雌雄之间比较,a:$P < 0.01$,b:$P < 0.05$

5 血生化指标

血生化检测指标包括:天门冬氨酸氨基转换酶(AST)、丙氨酸氨基转换酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、肌酸磷酸激酶(CK)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、血糖(GLU)、总胆红素(TBIL)、总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TRIG)、γ-谷氨酰转移酶(GGT)、钠(Na^+)、钾(K^+)、氯(Cl^-)、免疫球蛋白 G(IgG)和免疫球蛋白 M(IgM)。雌、雄大鼠的血生化指标分析统计数据见表 5,结果显示 7 周龄大鼠的 AST,ALT,ALP,CK,BUN,CREA,GLU,CHOL,TRIG,K^+ 指标雌雄间有性别差异;11 周龄大鼠的 AST,ALT,ALP,CK,BUN,ALB,CHOL,K^+ 指标雌雄间有性别差异。

表 5 幼龄 SD 大鼠血生化及免疫指标的背景值

指标	年龄/周	n/只	雄性				雌性			
			$\bar{x} \pm s$	Min,Max	95% CI	CV/%	$\bar{x} \pm s$	Min,Max	95% CI	CV/%
AST/U·L^{-1}	7	60	141 ± 27[a]	80,228	134 ~ 148	19.2	118 ± 28	45,176	110 ~ 125	23.6
	11	10	158 ± 29[a]	118,224	137 ~ 179	18.5	116 ± 13	102,148	106 ~ 126	11.5
ALT/U·L^{-1}	7	60	48 ± 11[a]	30,107	45 ~ 51	23.3	37 ± 7	23,53	36 ~ 39	18.3
	11	10	46 ± 13[a]	35,79	37 ~ 55	27.5	29 ± 2	26,33	27.9 ~ 30.9	7.0
ALP/U·L^{-1}	7	60	272 ± 62[a]	148,455	256 ~ 288	22.7	162 ± 53	91,346	148 ~ 175	32.6
	11	10	164 ± 28[a]	114,196	144 ~ 184	17.1	78 ± 14	56,106	67 ~ 88	18.6
CK/U·L^{-1}	7	60	582 ± 201[a]	179,1264	530 ~ 634	34.5	465 ± 191	133,973	415 ~ 514	41.1
	11	10	561 ± 151[a]	350,865	453 ~ 670	26.9	386 ± 73	311,535	334 ~ 437	18.9
BUN/mmol·L^{-1}	7	60	4.8 ± 0.7[b]	3.5,6.3	4.6 ~ 5.0	14.5	5.1 ± 1.0	3.5,8.5	4.9 ~ 5.4	19.8
	11	10	5.3 ± 0.5[a]	4.6,5.9	4.9 ~ 5.7	9.7	4.1 ± 0.3	3.4,4.5	3.8 ~ 4.3	8.2
CREA/μmol·L^{-1}	7	60	16 ± 3[a]	9,20	16 ~ 17	15.7	19 ± 3	9,23	19 ~ 20	14.4
	11	10	21 ± 2	19,25	20 ~ 23	9.1	21 ± 2	18,23	20 ~ 22	8.5
TP/G·L^{-1}	7	60	50.2 ± 2.0	45.7,54.6	49.7 ~ 50.7	4.1	49.3 ± 1.7	45.8,52.7	48.9 ~ 49.7	3.4
	11	10	49.2 ± 2.1	46.5,52.4	47.7 ~ 50.8	4.4	49.7 ± 2.5	46.2,52.7	47.8 ~ 51.5	5.1
ALB/G·L^{-1}	7	60	29.1 ± 2.3	23.4,32.4	28.5 ~ 29.7	8.0	28.9 ± 2.2	23.9,32.4	28.4 ~ 29.5	7.5
	11	10	24.6 ± 1.3[b]	22.7,26.3	23.7 ~ 25.6	5.4	26.5 ± 1.0	25.1,27.9	25.8 ~ 27.2	3.8
GLU/mmol·L^{-1}	7	60	5.99 ± 0.98[a]	3.80,9.10	5.74 ~ 6.24	16.3	6.67 ± 0.98	4.40,8.65	6.41 ~ 6.92	14.8
	11	10	6.76 ± 1.03	5.39,8.51	6.03 ~ 7.50	15.2	6.15 ± 0.21	5.91,6.53	6.00 ~ 6.30	3.5
TBIL/μmol·L^{-1}	7	60	1.42 ± 0.70	−0.10,2.80	1.24 ~ 1.60	49.6	1.22 ± 0.53	−0.10,2.30	1.09 ~ 1.36	42.9
	11	10	5.14 ± 1.91	3.30,9.40	3.77 ~ 6.51	37.2	5.97 ± 1.77	3.70,8.80	4.70 ~ 7.24	29.6
CHOL/mmol·L^{-1}	7	60	1.67 ± 0.29[a]	1.12,2.53	1.59 ~ 1.74	17.5	1.99 ± 0.33	1.35,2.91	1.90 ~ 2.07	16.4
	11	10	1.11 ± 0.12[a]	0.95,1.30	1.02 ~ 1.20	11.2	1.50 ± 0.32	1.15,1.91	1.27 ~ 1.73	21.3
TRIG/mmol·L^{-1}	7	60	0.62 ± 0.18[a]	0.31,1.08	0.57 ~ 0.66	29.4	0.39 ± 0.11	0.18,0.72	0.36 ~ 0.42	28.0
	11	10	0.55 ± 0.25	0.24,1.04	0.37 ~ 0.73	45.3	0.47 ± 0.11	0.32,0.67	0.39 ~ 0.54	23.1
K^+/mmol·L^{-1}	7	60	4.71 ± 0.36[a]	4.15,5.99	4.61 ~ 4.80	7.7	4.31 ± 0.28	3.73,4.95	4.24 ~ 4.38	6.6
	11	10	4.69 ± 0.22[a]	4.32,5.05	4.53 ~ 4.84	4.6	4.03 ± 0.16	3.91,4.45	3.91 ~ 4.14	4.0
Na^+/mmol·L^{-1}	7	60	145 ± 4	138,151	144 ~ 146	2.6	144 ± 5	135,150	142 ~ 145	3.3
	11	10	136 ± 1	135,139	135 ~ 137	1.0	137 ± 1	136,139	136 ~ 138	0.7
Cl^-/mmol·L^{-1}	7	60	102 ± 4	92,109	101 ~ 103	3.8	103 ± 4	95,110	102 ~ 104	4.0
	11	10	99 ± 2	97,102	98 ~ 101	1.7	101 ± 2	98,105	99 ~ 102	1.8
Ca^{2+}/mmol·L^{-1}	7	60	2.27 ± 0.22	1.97,2.75	2.22 ~ 2.33	9.6	2.26 ± 0.20	1.98,2.66	2.21 ~ 2.31	8.8
	11	10	2.06 ± 0.02	2.03,2.10	2.04 ~ 2.07	1.2	2.09 ± 0.05	2.04,2.20	2.05 ~ 2.13	2.4
IgG/ng·mL^{-1}	7	60	0.88 ± 0.54	0.00,2.36	0.74 ~ 1.01	61.3	1.06 ± 0.57	0.00,2.64	0.92 ~ 1.21	53.8
	11	10	0.44 ± 0.04	0.36,0.51	0.41 ~ 0.47	9.8	0.54 ± 0.18	0.42,0.98	0.42 ~ 0.67	32.3
IgM/ng·mL^{-1}	7	60	0.07 ± 0.03	0.04,0.15	0.06 ~ 0.08	38.4	0.08 ± 0.03	0.04,0.17	0.07 ~ 0.09	38.2
	11	10	0.09 ± 0.01	0.07,0.12	0.08 ~ 0.10	16.0	0.11 ± 0.01	0.09,0.12	0.09 ~ 0.10	9.1

雌雄之间比较,a:$P < 0.01$,b:$P < 0.05$

6 骨骼发育指标

pQCT 法检测指标包括:总骨密度、小梁骨密度和皮质骨密度;DXA 法检测指标包括:骨密度(BMD)和骨矿物含量(BMC)。pQCT 法结果显示,雌、雄大鼠总骨密度和皮质骨密度随着周龄的增长而增加,小梁骨密度降低;DXA 法结果显示,雌、雄大鼠 BMD、BMC 均随着周龄的增长而增加,结果见表 6。

表 6 幼龄 SD 大鼠骨骼发育指标的背景值

骨骼发育指标	年龄/周	n/只	雄性				雌性			
			$\bar{x} \pm s$	Min,Max	95% CI	CV/%	$\bar{x} \pm s$	Min,Max	95% CI	CV/%
顶臀长/cm	7	60	17.0 ± 0.8	14.7,18.4	16.8 ~ 17.2	4.8	15.3 ± 0.6	13.7,16.8	15.1 ~ 15.4	4.1
	11	10	20.2 ± 0.5	19.5,20.9	19.8 ~ 20.6	2.7	18.5 ± 0.5	17.6,19.2	18.2 ~ 18.9	2.8
胫骨长/mm	7	60	29.95 ± 0.72	27.95,31.29	29.72 ~ 30.18	2.4	28.81 ± 0.49	27.70,29.81	28.65 ~ 28.96	1.7
	11	10	35.67 ± 0.67	34.12,36.33	35.07 ~ 35.82	1.9	32.68 ± 0.58	31.85,33.94	32.15 ~ 32.68	1.8
pQCT										
总骨密度/mg·cm^{-3}	7	50	334.3 ± 18.3	294.0,370.7	329.1 ~ 339.5	5.5	418.5 ± 28.0	369.0,521.6	410.5 ~ 426.4	6.7
	9	20	367.7 ± 20.3	344.6,425.3	358.2 ~ 377.1	5.5	485.4 ± 40.1	427.1,596.6	466.6 ~ 504.2	8.3
小梁骨密度/mg·cm^{-3}	7	50	245.4 ± 14.9	211.3,284.4	241.2 ~ 249.7	6.1	292.2 ± 28.7	250.5,373.8	284.1 ~ 300.4	9.8
	9	20	236.6 ± 16.1	206.2,261.3	229.1 ~ 244.1	6.8	289.4 ± 30.2	233.5,351.3	275.3 ~ 303.6	10.4
皮质骨密度/mg·cm^{-3}	7	50	784.2 ± 15.0	749.6,827.1	779.9 ~ 788.4	1.9	824.9 ± 18.2	786.6,867.6	819.7 ~ 830.1	2.2
	9	20	827.4 ± 20.8	791.1,892.5	817.6 ~ 837.2	2.5	907.3 ± 27.4	866.9,985.9	894.5 ~ 920.1	3.0
DXA										
BMD/mg·cm^{-3}	7	20	153.6 ± 20.0	122.8,189.3	144.3 ~ 163.0	13.0	165.4 ± 16.3	136.8,188.4	157.7 ~ 173.0	9.9
	11	10	186.0 ± 5.4	178.9,195.8	182.1 ~ 189.9	2.9	206.8 ± 18.5	179.4,228.8	193.6 ~ 220.0	8.9
BMC/g	7	20	0.162 ± 0.019	0.136,0.201	0.153 ~ 0.171	11.8	0.155 ± 0.015	0.129,0.177	0.148 ~ 0.163	9.8
	11	10	0.265 ± 0.013	0.243,0.282	0.256 ~ 0.274	4.8	0.241 ± 0.022	0.206,0.271	0.225 ~ 0.257	9.3

7 脏器指标

脏器指标包括:脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、胸腺的重量和脏器系数,并做雌雄之间比较,睾丸、附睾、子宫、卵巢仅列其数值。统计结果显示,7 周龄大鼠的脏器重量雌雄间均有显著性差异,脑、肾上腺和胸腺脏器系数雌雄间有显著性差异;11 周龄大鼠的脏器重量除胸腺外,雌雄间均有显著性差异,脑、脾脏、肾上腺和胸腺脏器系数雌雄间有显著性差异,结果见表 7。

表 7 幼龄 SD 大鼠脏器指标的背景值

指标	年龄/周	性别	n/只	脏器重量				脏器系数			
				$\bar{x} \pm s$/g	Min,Max/g	95% CI/g	CV/%	$\bar{x} \pm s$/%	Min,Max/%	95% CI/%	CV/%
体重	7	♂	60	225.2 ± 16.1	183.2,258.3	221.0 ~ 229.3	7.1	—	—	—	—
		♀	60	171.8 ± 10.6	150.8,211.2	169.1 ~ 174.6	6.2	—	—	—	—
	11	♂	10	372.9 ± 20.8	337.9,407.1	358.0 ~ 387.8	5.6	—	—	—	—
		♀	10	243.5 ± 20.7	205.1,271.4	228.7 ~ 258.2	8.5	—	—	—	—
脑	7	♂	60	1.816 ± 0.086[a]	1.538,2.003	1.794 ~ 1.839	4.7	0.809 ± 0.051[a]	0.720,0.988	0.796 ~ 0.822	6.3
		♀	60	1.716 ± 0.096	1.295,1.888	1.691 ~ 1.740	5.6	1.002 ± 0.077	0.657,1.159	0.982 ~ 1.022	7.7
	11	♂	10	1.966 ± 0.091[a]	1.846,2.177	1.901 ~ 2.031	4.6	0.528 ± 0.031[a]	0.482,0.585	0.506 ~ 0.550	5.8
		♀	10	1.818 ± 0.078	1.696,1.975	1.762 ~ 1.873	4.3	0.751 ± 0.067	0.674,0.875	0.703 ~ 0.799	8.9
心脏	7	♂	60	1.038 ± 0.130[a]	0.804,1.332	1.005 ~ 1.072	12.6	0.461 ± 0.043	0.358,0.601	0.450 ~ 0.472	9.4
		♀	60	0.824 ± 0.080	0.652,0.988	0.804 ~ 0.845	9.7	0.480 ± 0.042	0.381,0.563	0.469 ~ 0.491	8.7
	11	♂	10	1.471 ± 0.113[a]	1.288,1.633	1.390 ~ 1.552	7.7	0.395 ± 0.034	0.352,0.448	0.371 ~ 0.419	8.6
		♀	10	1.029 ± 0.088	0.890,1.176	0.966 ~ 1.092	8.5	0.424 ± 0.029	0.389,0.474	0.403 ~ 0.444	6.8
肝脏	7	♂	60	8.367 ± 0.918[a]	6.056,11.168	8.130 ~ 8.605	11.0	3.711 ± 0.242	3.147,4.359	3.649 ~ 3.774	6.5
		♀	60	6.510 ± 0.737	5.217,8.782	6.320 ~ 6.701	11.3	3.784 ± 0.288	3.189,4.661	3.709 ~ 3.858	7.6
	11	♂	10	11.550 ± 0.774[a]	10.245,12.680	10.997 ~ 12.104	6.7	3.097 ± 0.113	2.972,3.340	3.016 ~ 3.178	3.7
		♀	10	7.714 ± 0.872	5.974,9.049	7.090 ~ 8.337	11.3	3.186 ± 0.465	2.749,4.412	2.853 ~ 3.518	14.6

续表 7

指标	年龄/周	性别	n/只	脏器重量				脏器系数			
				$\bar{x} \pm s$/g	Min,Max/g	95% CI/g	CV/%	$\bar{x} \pm s$/%	Min,Max/%	95% CI/%	CV/%
脾脏	7	♂	60	0.741 ± 0.126[a]	0.493,1.187	0.708 ~ 0.773	17.0	0.329 ± 0.048	0.211,0.463	0.316 ~ 0.341	14.5
		♀	60	0.578 ± 0.090	0.412,0.815	0.555 ~ 0.601	15.5	0.336 ± 0.048	0.228,0.442	0.324 ~ 0.349	14.2
	11	♂	10	0.828 ± 0.076[b]	0.739,0.939	0.774 ~ 0.883	9.2	0.222 ± 0.015[a]	0.192,0.242	0.211 ~ 0.233	6.9
		♀	10	0.730 ± 0.113	0.569,0.881	0.649 ~ 0.811	15.5	0.298 ± 0.025	0.267,0.328	0.281 ~ 0.316	8.3
肾脏	7	♂	60	2.044 ± 0.210[a]	1.511,2.607	1.990 ~ 2.098	10.3	0.907 ± 0.060	0.778,1.060	0.892 ~ 0.923	6.6
		♀	60	1.584 ± 0.161	1.273,2.278	1.542 ~ 1.626	10.2	0.922 ± 0.083	0.757,1.338	0.901 ~ 0.944	9.0
	11	♂	10	2.908 ± 0.284[a]	2.573,3.406	2.704 ~ 3.111	9.8	0.780 ± 0.065	0.678,0.897	0.733 ~ 0.827	8.4
		♀	10	1.871 ± 0.143	1.631,2.087	1.769 ~ 1.973	7.6	0.770 ± 0.042	0.707,0.832	0.740 ~ 0.800	5.4
肾上腺	7	♂	60	0.045 ± 0.009[a]	0.029,0.090	0.043 ~ 0.048	20.8	0.020 ± 0.004[a]	0.014,0.040	0.019 ~ 0.021	19.8
		♀	60	0.056 ± 0.010	0.035,0.083	0.054 ~ 0.059	17.2	0.033 ± 0.006	0.021,0.049	0.031 ~ 0.034	17.4
	11	♂	10	0.050 ± 0.009[a]	0.034,0.062	0.043 ~ 0.056	17.3	0.013 ± 0.002[a]	0.010,0.016	0.012 ~ 0.015	16.6
		♀	10	0.079 ± 0.008	0.063,0.090	0.073 ~ 0.085	10.7	0.033 ± 0.005	0.023,0.040	0.029 ~ 0.036	15.0
胸腺	7	♂	60	0.684 ± 0.105[b]	0.471,0.975	0.657 ~ 0.711	15.4	0.304 ± 0.040[a]	0.223,0.436	0.293 ~ 0.314	13.2
		♀	60	0.644 ± 0.073	0.488,0.784	0.626 ~ 0.663	11.3	0.376 ± 0.041	0.293,0.459	0.365 ~ 0.386	11.0
	11	♂	10	0.609 ± 0.118	0.479,0.859	0.524 ~ 0.693	19.4	0.163 ± 0.028[a]	0.123,0.211	0.143 ~ 0.183	17.1
		♀	10	0.589 ± 0.089	0.459,0.733	0.525 ~ 0.652	15.1	0.242 ± 0.034	0.198,0.309	0.218 ~ 0.266	13.8
睾丸	7	♂	60	2.099 ± 0.197	1.595,2.718	2.048 ~ 2.150	9.4	0.934 ± 0.080	0.667,1.125	0.913 ~ 0.936	8.6
	11	♂	10	2.714 ± 0.135	2.522,2.984	2.617 ~ 2.810	5.0	0.729 ± 0.048	0.659,0.801	0.695 ~ 0.764	6.6
附睾	7	♂	60	0.443 ± 0.077	0.308,0.676	0.423 ~ 0.463	17.4	0.197 ± 0.032	0.141,0.318	0.189 ~ 0.205	16.2
	11	♂	10	1.174 ± 0.192	0.886,1.500	1.037 ~ 1.312	16.3	0.315 ± 0.047	0.249,0.395	0.281 ~ 0.348	14.9
子宫	7	♀	60	0.352 ± 0.119	0.187,0.891	0.321 ~ 0.382	33.8	0.205 ± 0.069	0.114,0.500	0.187 ~ 0.223	33.5
	11	♀	10	0.486 ± 0.128	0.341,0.707	0.394 ~ 0.577	26.4	0.200 ± 0.050	0.126,0.281	0.164 ~ 0.236	24.9
卵巢	7	♀	60	0.115 ± 0.022	0.060,0.163	0.110 ~ 0.121	19.1	0.067 ± 0.013	0.035,0.095	0.064 ~ 0.071	19.0
	11	♀	10	0.185 ± 0.031	0.144,0.240	0.162 ~ 0.207	16.9	0.076 ± 0.013	0.053,0.092	0.067 ~ 0.086	17.1

雌雄之间比较,a:$P < 0.01$,b:$P < 0.05$

讨　论

在药物安全性评价试验中,判断某指标是否异常,正常背景值是一个非常重要的参考指标。但由于实验动物的生长发育易受到各种内外因素的影响,包括温湿度、光照时间及营养水平等环境因素制约,在不同的实验室之间同一品系的动物也由于健康状况、年龄、性别等个体因素差别,即使控制环境条件,其生长发育的各项指标仍会出现差异。

本研究室总结了幼龄 SD 大鼠的体重、摄食量、血液相关指标、脏器重量及系数的背景值范围和变异系数,与其他实验室报道的结果总体接近,但也有一定的差异[6-11]。同时增加了文献中未见报道的生殖发育和骨骼发育指标的背景值。考虑到幼龄 SD 大鼠生长发育较快,增加了体重的称量频率,相关文献报道中通常以周龄或月龄为单位,本文中数据以日龄为单位,更加严谨、可靠。研究结果发现,雄性 SD 大鼠体重和摄食量明显高于同龄的雌性大鼠,表明雄性大鼠的生长发育速度比雌鼠快。

7 和 11 周龄时,雄性 SD 大鼠的脑、心脏、肝脏、脾、肾和肾上腺的重量显著高于雌性,但 11 周龄雌雄大鼠之间的胸腺重量无统计学差异,7 周龄时具有显著性差异;可能是 SD 大鼠在达到性成熟后,胸腺重量不再随着年龄和体重的增加而增大。同时由于均衡了体重因素的影响,部分脏器如心脏、肝脏、肾脏的脏器系数雌雄间无统计学差异,表明脏器系数作为 SD 大鼠生长发育的指标更为客观合理。

血液学及凝血指标统计结果显示 7 和 11 周龄 SD 大鼠的 HGB,HCT 和 WBC 指标雌雄间均有性别差异,且各周龄雄性大鼠的 HGB,HCT 和 WBC 均显著高于雌性。从各指标的变异系数来看,WBC 的变异系数均较大,说明该指标的离散度大,可能是由于

指标的绝对值较小,比较容易受到偶然因素的影响。血生化指标统计结果显示7和11周龄雄性SD大鼠的AST,ALT,ALP,CK,K^+高于雌性,雌性的CHOL较雄性高,差异有统计学意义,其余指标部分有性别差异。由于幼龄动物的免疫系统未发育安全,幼龄动物毒性研究如涉及发育免疫毒性,要考虑免疫系统具有延迟成熟的特点,所以在血清生化学检查中增加了免疫球蛋白G(IgG)和免疫球蛋白M(IgM)的测定,结果显示雌性之间无统计学差异。

本文报道了原则上未达标或仍然高度变化的生殖发育指标:雌鼠阴道张开及雄鼠龟头包皮腺裂开情况,结果显示雌鼠阴道张开时间为PND(31.9±1.9),雄鼠龟头包皮腺裂开时间为PND(51.9±1.9),与国外文献中的报道相一致[12]。

在试验终点增加了顶臀长和胫骨长的测量,雄鼠的顶臀长和胫骨长明显大于雌鼠。本研究首次报道了用2种不同的方法(pQCT法和DXA法)检测7,9和11周龄的SD大鼠的胫骨骨密度。pQCT法结果显示,雌、雄大鼠总骨密度和皮质骨密度随着周龄的增长而增加,但小梁骨密度却降低,可能与骨有机质和矿物质代谢有关,这有待进一步的研究证实[13];DXA法结果显示,雌、雄大鼠BMD和BMC均随着周龄的增长而增加。

综上所述,幼龄SD大鼠各项指标背景数据的确定是新药非临床安全性评价的重要积累和研究,是科研工作的重要课题,是试验评价的重要内容之一。因此,加强幼龄动物各项指标背景数据的不断积累及动态研究汇总,建立本研究室各项指标的背景值,使试验数据的解释建立在较为客观、可信、合理的基础上,为儿科用药的非临床安全性评价提供科学依据,为从事幼龄动物实验人员提供参考,而保障用药安全。

[参 考 文 献]

[1] 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物重复给药毒性研究技术指导原则[EB/OL]. (2014-05-13). http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=192.

[2] 孙祖越, 周莉. 儿科用药非临床安全性评价中方案设计的策略[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(21): 2473-2482.

[3] 周莉, 孙祖越. 非临床安全性评价中离乳前给药的幼龄动物分组设计[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(21): 2483-2488.

[4] 周莉, 孙祖越. 儿科用药发育毒性研究指标设定及中药安全性评价的特别关注点[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(1): 21-28.

[5] 孙祖越, 周莉, 韩玲. 儿科用药非临床安全性评价要则及中药评价的特殊性[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(1): 13-20.

[6] 项华, 章晓玲, 查捷, 等. SD大鼠生长发育指标和主要脏器正常参考值的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(2): 299-301.

[7] 赵毓梅, 郑定仙, 黄业宇, 等. SD大鼠血常规、血液生化指标、脏体比正常参考值范围研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(2): 165-167.

[8] 刘科亮, 王林, 王睿, 等. SD大鼠血常规指标正常参考值范围探讨[J]. 预防医学情报杂志, 2009, 25(9): 715-716.

[9] 赵安莎, 孙于兰, 周蓉, 等. SD大鼠30天喂养试验血液学指标和血清生化指标参考值探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(1): 13-15.

[10] 蒋中仁, 徐薇, 金伟, 等. SD大鼠血液学指标、血生化指标及脏体比正常值范围探讨[J]. 预防医学情报杂志, 2011, 27(10): 789-791.

[11] 胡雄飞, 杨秀鸿, 陈志莲. 不同周龄雌雄SD大鼠血液生理生化指标比较分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(10): 1173-1176.

[12] HOBERMAN AM, LEWIS EM. Pediatric nonclinical drug testing[M]. Hoboken NJ USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

[13] 严雪铭, 张振德. 小鼠不同周龄与骨密度的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(3): 288-289.

编辑:赵文锐/接受日期:2020-05-12