

## 全身体积描记法在大鼠呼吸系统试验中的应用

刘艳菊<sup>1,2</sup>, 周博宇<sup>1</sup>, 钟飞<sup>1</sup>, 兰天龙<sup>1</sup>, 葛鹏<sup>1</sup>, 徐德璐<sup>1</sup>, 胡雷<sup>1,2\*</sup>

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301
2. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

**摘要:** **目的** 应用全身体积描记法观察药物对大鼠呼吸指标的影响, 对动物肺功能检测系统进行性能验证, 为该技术用于药物安全药理学评价提供依据。**方法** SD大鼠30只, 雌雄各半, 分为溶媒对照组、巴氯芬(30 mg/kg)组、茶碱(30 mg/kg)组, 溶媒对照组给予等体积的0.5%羧甲基纤维素钠溶液。实验时将动物放入体积描记箱中, 动物肺功能检测系统连续获取给药前至少60 min及给药后6 h内的数据, 药后24 h至少连续采集60 min的数据, 将每只动物给药前、给药后1、2、4、6、24 h均选取连续平稳的30个呼吸波, 检测潮气量(TV)、每分钟通气量(MV)、呼吸频率(F)。**结果** 与溶媒对照组比较, 巴氯芬组TV在给药后1、2、4、6、24 h显著增大( $P < 0.05$ ), 呈先上升后下降趋势; F在药后2、4、6 h显著减慢( $P < 0.05$ ), 呈先下降后上升趋势。大鼠给予30 mg/kg的茶碱后呼吸急促, 药后1、2、4 h F明显加快、MV显著增加, 均呈先上升后下降趋势, 与溶媒对照组比较, 药后1、2 h出现统计学差异( $P < 0.05$ )。**结论** SD大鼠给予巴氯芬和茶碱后呼吸指标具有良好时间-反应趋势, 可作为阳性药用于仪器的性能验证; 肺功能检测系统能够准确记录清醒无束缚大鼠呼吸指标的变化情况, 可用于呼吸系统安全药理学研究。

**关键词:** 全身体积描记法; 巴氯芬; 茶碱; 清醒大鼠; 呼吸系统; 性能验证; 潮气量; 每分钟通气量; 呼吸频率

**中图分类号:** R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)08-1391-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.005

## Application of whole-body plethysmography in rats respiratory system study

LIU Yanju<sup>1,2</sup>, ZHOU Boyu<sup>1</sup>, ZHONG Fei<sup>1</sup>, LAN Tianlong<sup>1</sup>, GE Peng<sup>1</sup>, XU Delu<sup>1</sup>, HU lei<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300301, China
2. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

**Abstract: Objective** To research the performance qualification of pulmonary function test system with whole-body plethysmography to observe the effect of drugs on rats, and to provide a basis for the future application of this technique for drug safety evaluation. **Methods** Totally 30 Sprague-Dawley rats were used in this study, 15 males and 15 females. The rats were divided into three groups: solvent control group, baclofen group, and theophylline group. The baclofen and theophylline group received a single dose of 30 mg/kg baclofen or theophylline, and the control group was given an equal volume of 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution. In the experiment, rats were placed in a plethysmograph box. The animal lung function test system obtained data at least 60 min before and 6 h after administration. At least 60 min data were collected at least 24 h after administration, and 30 continuous and stable respiratory waves were selected for each animal at 1, 2, 4, 6, and 24 h after administration, and the tidal volume (TV), minute ventilation (MV), and respiratory rate (F) were detected. **Results** Compared with solvent control group, TV of the baclofen group increased significantly at 1, 2, 4, 6, and 24 h after administration ( $P < 0.05$ ), rising first and then descending; And F decreased at 2, 4, and 6 h after administration, descending first and then rising. F and MV of the theophylline group increased significantly at 1, 2 h after administration ( $P < 0.05$ ), rising first and then descending. **Conclusion** Based on the good time-response curve, baclofen and theophylline could be used as positive drugs in respiratory safety assessment, for its sensitive and good performance in SD rats. Respiratory signals could be acquired for 6 h continuously in conscious and unrestrained rats accurately with pulmonary function test system, and the system can be used for drug safety pharmacological research of respiratory system. **Key words:** whole-body plethysmography; baclofen; theophylline; conscious rats; respiratory system; performance qualification; tidal volume; minute ventilation; respiratory rate

收稿日期: 2018-04-19

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004); 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

第一作者: 刘艳菊(1986-), 女, 天津, 助理研究员, 硕士, 研究方向为临床前药物安全性评价。Tel: 15102264435 E-mail: liuyj@tjipr.com

\*通信作者: 胡雷, 副研究员, 硕士, 研究方向为临床前药物安全性评价。E-mail: hul@tjipr.com

呼吸系统实验是安全药理学核心组合实验的重要组成部分<sup>[1]</sup>,应用麻醉动物进行研究,会因麻醉程度、麻醉时间和束缚产生的应激反应对评价结果产生干扰,导致评价结果准确性降低<sup>[2]</sup>。因此新版《药物安全药理学评价研究技术指导原则》建议使用清醒动物评价药物的安全性。

目前国内部分实验室已能实现大动物清醒状态下呼吸指标的采集,但是获得的指标仅限于呼吸频率(F)和呼吸幅度,未对呼吸深度进行量化。本研究选择成本更为低廉的大鼠替代高等动物,通过给予阳性药,应用全身体积描记法观察药物对清醒无束缚大鼠呼吸系统的影响,对肺功能检测系统进行性能验证,为该技术应用用于呼吸系统安全性评价提供依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与主要试剂

巴氯芬片,批号为160304C01,规格为10 mg,由宁波天新药业股份有限公司生产。茶碱缓释片,批号为20160603,规格为0.1 g,由广州迈特兴华制药厂有限公司生产。羧甲基纤维素钠,批号为20130426,规格为500 g/瓶,由国药集团化学试剂有限公司生产。

### 1.2 动物

SD大鼠,SPF级,30只,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2016-0011。饲养于天津药物研究院新药评价有限公司动物实验楼(屏障环境),饲养间温度控制在20~26℃,湿度40%~70%,换气次数不少于8次全新风/小时,光照为12 h明暗交替。

### 1.3 试验仪器

电子天平E3000-0.5,常熟市双杰测试仪器厂;电子天平BT224S,德国赛多利斯股份公司;超净工作台,天津市拉贝尔实验室设备有限公司;动物肺功能检测系统,Emka Technologies。

## 2 方法

### 2.1 剂量及组别设定

实验设置3个组,即溶媒对照组、巴氯芬组、茶碱组,每组10只动物,雌雄各半。巴氯芬组和茶碱组剂量为30 mg/kg<sup>[3]</sup>,溶媒对照组给予等体积的0.5%羧甲基纤维素钠溶液,ig给药,给药体积为6 mL/kg。

### 2.2 数据采集和分析

实验前对动物肺功能检测系统仪器参数进行

校正,参数设置为气泵流量1.5 L/min,放大器放大倍数100,采样频率1000 Hz,输入校准Low值0,High值为-50 mL/s。

实验时将动物放入体积描记箱中稳定10 min适应环境,当有效波形达90%时开始记录数据<sup>[4-5]</sup>,连续获取给药前至少60 min及给药后6 h内的数据,药后24 h至少连续采集60 min的数据。在每个时间点剔除因动物躁动等因素导致的数据丢失和显著的大幅度数值漂移,将每只动物给药前、给药后1、2、4、6、24 h均选取连续平稳的30个呼吸波求均值。

### 2.3 观察指标

大鼠呼吸指标:潮气量(TV)、每分钟通气量(MV)、呼吸频率(F)。

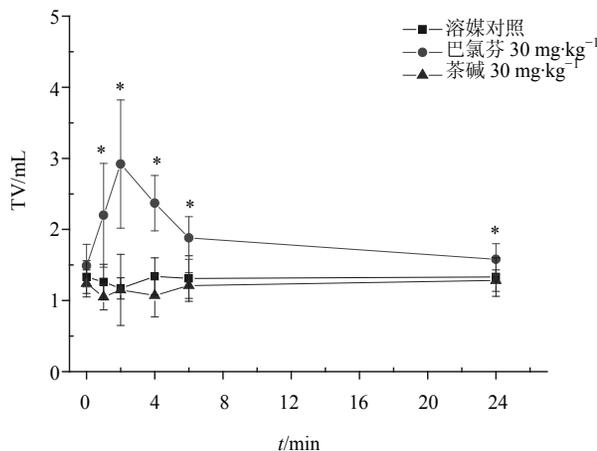
### 2.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 23.0统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

## 3 结果

大鼠给予30 mg/kg的巴氯芬后呼吸逐渐加深减慢。与溶媒对照组比较,TV在药后1、2、4、6、24 h显著增大(见图1),呈先上升后下降趋势,出现统计学差异( $P < 0.05$ );F在药后2、4、6 h减慢(见图2),呈先下降后上升趋势,出现统计学差异( $P < 0.05$ )。

大鼠给予30 mg/kg的茶碱后呼吸急促,药后1、2、4 h F明显加快(见图2)、MV显著增加(见图3),均呈先上升后下降趋势,药后6 h基本恢复至正常水平。与溶媒对照组比较,药后1、2 h的F和MV出现统计学差异( $P < 0.05$ )。



与溶媒对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs solvent control group

图1 大鼠TV的变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Change of TV in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

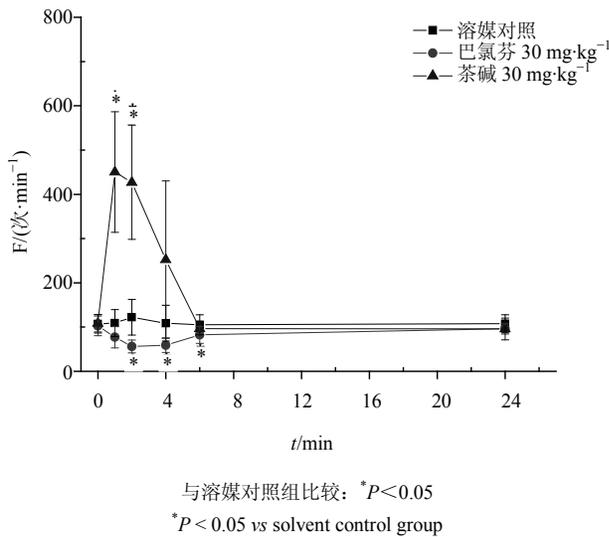


图2 大鼠呼吸频率的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Change of F in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

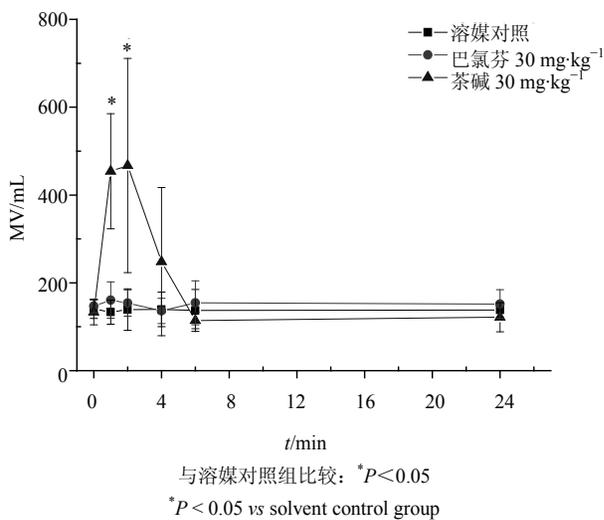


图3 大鼠MV的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 Change of MV in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

#### 4 讨论

全身体积描记法是将清醒大鼠放入体积描记箱内, 通过检测实验动物呼吸时引起体积描记箱内气压的改变, 进一步绘制出动物的呼吸波形, 从而得到实验动物的呼吸参数。动物肺功能检测系统的工作原理就是通过全身体积描记法记录动物呼吸指标的变化。根据《药物非临床研究质量管理规范》认证标准即GLP认证检查要点的要求, 在动物肺功能检测系统的安装、操作功能均已确认无误后, 需要对其进行性能验证。

仪器的性能验证主要是选择合适的动物给予公

认的模拟药物, 来确认仪器设备是否能够满足使用者对实验的正常要求<sup>[6]</sup>。目前小动物呼吸系统的阳性药尚无统一的规定和标准, 有学者用尼可刹米作为阳性药用于大鼠呼吸检测仪器的性能验证, 但是大鼠对尼可刹米注射液的敏感性较差, 个体差异大。本研究选用巴氯芬和茶碱作为呼吸系统阳性药, 验证动物肺功能检测系统的反应性或灵敏性。

研究显示, 大鼠给予30 mg/kg的巴氯芬后呼吸加深减慢, 抑制作用明显、持久, TV、F的变化情况具有良好时间-反应趋势, 说明巴氯芬可以作为呼吸抑制阳性药用于动物肺功能检测系统的性能验证。巴氯芬是γ-氨基丁酸(GABA)的衍生物, 通过激动GABA的β受体而使兴奋性氨基酸、门冬氨酸的释放受到抑制, 从而抑制单突触和多突触反射在中枢神经系统的传递, 最终起到解痉作用<sup>[7-9]</sup>。在本研究中, 巴氯芬对呼吸的抑制作用可能与其对呼吸肌的松弛作用有关。大鼠给予30 mg/kg的茶碱后兴奋呼吸中枢, 短时间内呼吸急促, 起效较快、作用显著, F和MV的变化情况具有良好时间-反应趋势, 说明茶碱可以作为呼吸兴奋阳性药用于动物肺功能检测系统的性能验证。茶碱是非选择性磷酸二酯酶抑制剂, 有增强呼吸肌收缩力、延缓疲劳发生、加快疲劳恢复的作用<sup>[10]</sup>。本研究中该药对大鼠呼吸的兴奋作用可能与其舒张支气管、改善通气、降低气道反应<sup>[11-13]</sup>的药理作用有关。

应用全身体积描记法进行呼吸系统安全药理试验具有有多方面优势: 一、操作便捷, 无需手术, 将动物放入体积描记箱即可采集数据; 二、动物能够在体描箱内自由活动, 应激小, 消除了由于精神紧张引起的数据干扰, 测量得到的生理信号更能反映自然状态下的动物生理状况; 三、排除麻醉剂的干扰, 数据更加真实可靠; 四、既能检测常规指标如F、TV、MV, 又可检测50%呼气流量、吸气流峰值、呼气流量峰值和增强呼吸间歇等反应动物肺功能和气道反应性情况的指标; 五、可以实现长时间连续检测, 数据更全面。在安全药理实验中使用无束缚全身体积描记法能够满足《药物安全药理学评价研究技术指导原则》和ICH S7A的要求, 而且符合动物福利3R原则中的“替代、优化”。

SD大鼠对巴氯芬和茶碱比较敏感, 两种药物对呼吸的作用与文献<sup>[3]</sup>报道基本一致, 应用动物肺功能检测系统可灵敏监测到呼吸系统的相关变化, 全身体积描记法应用于药物呼吸系统安全性评价研

究具有可行性。

#### 参考文献

- [1] CFDA. 药物安全药理学研究技术指导原则 [EB/OL]. (2014-05-13)[2018-04-06]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=187>.
- [2] 潘水珍, 张利棕, 潘永明, 等. 生理遥测和全体积描记法联用观测清醒大鼠昼夜节律变化及其在多索茶碱安全药理学中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 439.
- [3] 张颖丽, 王超, 王三龙, 等. 非束缚清醒大鼠呼吸功能测量系统3Q验证 [A]. //张颖丽. 第四届药物毒理学年会论文集 [C]. 昆明: 中国毒理学, 2014.
- [4] 方贤磊, 李杨, 聂李亚, 等. 肺功能分析在放射性肺损伤防治药物药效评价中的作用 [J]. 军事医学, 2015, 39(7): 519-522.
- [5] 孙晓红, 张宪成, 黄春倩, 等. 清醒大鼠肺功能检测系统在全氟异丁烯吸入毒理研究中的应用 [J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(6): 446.
- [6] 王三龙, 沈连忠, 齐卫红, 等. 安全药理遥测系统进行3Q验证的关注点 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(10): 798.
- [7] 谢瑞满. 巴氯芬临床应用研究进展 [J]. 世界临床药物, 2006, 27(3): 149-150.
- [8] 汪萌芽, 朱蓉. 解痉药巴氯芬研究进展 [J]. 中国药理学通报, 1992, 8(5): 335.
- [9] Bowery N G, Hill D R, Hudson A L, et al. Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor [J]. Nature, 1980, 283(5742): 92-94.
- [10] 徐永健. 吸呼肌疲劳治疗的研究近况 [J]. 临床内科杂志, 1991, 8(5): 10.
- [11] 黄爱霞, 郑则广. 茶碱缓释片联合噻托溴铵干粉治疗稳定期慢性阻塞性肺疾病的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(6): 623-626.
- [12] 孙长虹, 张长群, 张占纺, 等. 沙美特罗替卡松粉吸入剂联合异丙托溴铵喷雾剂治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期疗效评价 [J]. 疑难病杂志, 2011, 10(7): 538-539.
- [13] 黄怀焕, 林俊锋, 伍胜孟. 多索茶碱与氨茶碱治疗老年患者支气管哮喘急性发作的疗效及对肺功能的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(32): 101-104.