

巴马小型猪植入式遥测动物模型的建立及应用

张燕华¹, 刘天斌¹, 曲庆美², 郑智勇¹, 李海涛¹, 陈凯^{1*}

1. 山东省药学院, 山东省化学药物重点实验室, 山东 济南 250101

2. 山东药品食品职业学院, 山东 淄博 255011

摘要: 目的 基于遥测技术建立适用于监测清醒自由活动状态下巴马小型猪心电、血压、体温等生理指标的动物模型, 为其在安全药理学研究中的应用提供支持。方法 8只巴马小型猪(雌雄各半)经手术植入植入子, 手术后恢复3~4周, 经体格检查确认已完全恢复后, 采用EMKA遥测系统连续监测至少24 h心电图、血压等生理指标, 包括心率、PR间期、QRS间期、QT间期、校正QT(QTcv)间期、体温、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、平均动脉压(MBP), 并于次周重复监测1次。对巴马小型猪的24 h指标变化进行分析, 并与Beagle犬和食蟹猴数据进行种属间对比分析。结果 巴马小型猪的心电数据和血压数据昼夜节律均不明显; 体温呈现明显的昼夜节律, 白天体温高, 夜间体温低; 动物的心率、血压和体温均受外界影响比较大, 与动物的活动呈现明显的相关性; 与Beagle犬和食蟹猴比较, 巴马小型猪的心率和人类最为相似, SBP仅稍高于人类。结论 通过体内植入植入子, 成功建立了巴马小型猪植入式遥测动物模型; 与Beagle犬和食蟹猴比较, 巴马小型猪更适合用于药物对心血管系统影响的评价。

关键词: 巴马小型猪; 植入式遥测; 心血管系统; 安全药理; 遥测技术

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)10-2049-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.10.015

Establishment and application on implantable telemetry animal model of bama miniature pigs

ZHANG Yanhua¹, LIU Tianbin¹, QU Qingmei², ZHENG Zhiyong¹, LI Haitao¹, CHEN Kai¹

1. Key Laboratory of Chemical Drug Research of Shandong Province, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China

2. Shandong Drug and Food Vocational College, Zibo 255011, China

Abstract: Objective To establish an animal model for monitoring electrocardiogram (ECG), blood pressure (BP) and body temperature (T) of Bama miniature pig in conscious and free movement state based on telemetry technology, and to provide support for its application in safety pharmacology research. **Methods** Eight Bama mini-pigs (male and female half) were implanted surgically and recovered for at 3—4 weeks. ECG, blood pressure and other physiological indexes [(including heart rate, PR interval, QRS interval, QT interval, corrected QT (QTcv) interval, body temperature, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MBP)] were monitored continuously by EMKA telemetry system for at least 24 hours. The monitoring was repeated in the next week. The 24 h indexes of Bama miniature pig were analyzed, and the data of Beagle dog and cynomolgus monkey were analyzed interspecies. **Results** The circadian rhythm of ECG and BP was not obvious in Bama miniature pig. The body temperature showed obvious circadian rhythm, which was high in daytime and low at night. The heart rate, blood pressure and body temperature of the animals were greatly influenced by the outside world, and showed obvious correlation with the activity of animals. Compared with Beagle dogs and cynomolgus monkeys, the heart rate of Bama minipigs was the most similar to that of humans, with only slightly higher systolic blood pressure, compared with that of humans. **Conclusion** Bama miniature pig model was successfully established by implanting seeds in Bama miniature pig, and it was proved that Bama miniature pig was more suitable for the evaluation of drug cardiovascular system than Beagle dog and cynomolgus monkey.

Key words: Bama miniature pig; implantable telemetry; cardiovascular system; safety pharmacology; telemetry technology

收稿日期: 2022-04-18

第一作者: 张燕华(1989—),女,硕士,研究方向为药理毒理。E-mail: zhangyanhua@sdaps.cn

*通信作者: 陈凯(1982—),男,硕士,研究方向为药理毒理。Tel: 18006360766 E-mail: chen kai@sdaps.cn

临床前安全药理试验研究主要包括与人体重要器官系统相关的心血管系统试验、呼吸系统试验和中枢神经系统试验,根据国家药品监督管理局(NMPA)《药物安全药理学评价研究技术指导原则》和ICH S7A.《Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals》的要求,心血管系统试验建议采用清醒动物进行相关指标的测定,目前在非临床研究中最常用的动物为犬、猴和猪^[1-3]。猪由于体型较大、难以驯化、遗传背景不清晰等原因限制了应用。但实际上猪与其他哺乳动物相比,心脏解剖结构和血流动力学与人类更为相似,心脏生物电数据与人类更为相似且更为平稳清晰^[4-6]。本研究选择体型较小的巴马小型猪,采用植入式遥测技术,建立适用于监测清醒自由活动状态下心电图、血压、体温等生理指标的动物模型,待动物手术后恢复3~4周,采集清醒状态下的数据并与前期同样方法获得的犬和猴的数据进行比较,为其在安全药理学研究中的应用提供支持。

1 材料

1.1 实验动物

普通级巴马小型猪8只,雌雄各半,10~11月龄,体质量为26.5~28.1 kg,购于北京实创世纪小型猪养殖基地,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2018-0011,饲养于山东省药学院新药评价中心,实验动物使用许可证号为SYXK(鲁)2018-0031,饲养间温度控制在16~26℃,湿度40%~70%,每小时换气次数 ≥ 8 ,100%全新风,光照为12 h明暗交替。动物实验中涉及的动物所有操作程序符合3R原则,已经得到山东省药学院新药评价中心实验动物管理和使用委员会的批准,批复编号IACUC-2018-114。

1.2 主要仪器

EMKA PACK 4G 马甲式遥测系统、EPTA 植入子、IOX 2.10.5.14 数据采集系统、ECGauto 3.3.0.24 数据分析系统,法国EMKA公司;AS-01-0007呼吸麻醉机,Molecular Imaging Products Company。

2 方法

2.1 植入手术

2.1.1 术前准备 采用呼吸麻醉机对动物进行麻醉,待动物麻醉后对拟开口部位进行备皮和消毒,其后手术人员进行无菌消毒和穿戴无菌手术衣,待穿戴完毕后打开消毒过的器械及植入子无菌包装,将植入子整体放入灭菌后生理盐水中浸泡至少15 min。注意导线开口端不可浸入液面下,压力导

管开口端必须浸在液面下。

2.1.2 植入子主体的植入 在动物侧腹部剪开1个大小适中的切口,切口大小以能放入植入子为宜。沿着肌肉的走向钝性剥离腹部肌肉,使2层肌肉之间出现1个可以放置植入子的空腔,并将植入子放到肌肉层空腔内。

2.1.3 血压电极的植入 沿腹股沟的股动脉走向在皮肤上做1个3 cm左右切口,用钝器分离皮下组织和筋膜,暴露股动脉,将股动脉远心端进行结扎,用2条2-0或者3-0固定线(不可吸收缝合线)打1松结置于尿管下,用皮下穿引套管从腹股沟切口处穿入,经过皮下从植入子切口处穿出,将压力导线引入至腹股沟处,轻柔、缓慢地牵引出导管顶端的保护套。助手使用动脉夹夹闭近心端,术者用眼科剪刺破股动脉,将导管轻轻插入血管向近心端推行(约15 cm),将血管上打松结的两根缝线打结固定。用生理盐水冲洗切口,分层次缝合伤口^[7]。

2.1.4 心电电极的植入 在动物左侧最后1根肋骨肋弓处开1个小口,作为心电正极埋植,胸肌并肩胛骨上缘胸腔入口处作另一小切口作为心电负极的埋置,切口长度在0.5 cm左右。用套管将2根电极线引到合适位置,确定电极线长度,考虑动物的生长,可适当预留部分电极线,并将多余长度的导线剪掉。将电极末端的硅胶套用刀片轻轻切开,然后轻轻拔出露出1.0~1.5 cm的不锈钢电极线。将裸露的电极线折成1个线圈,并用不可吸收缝合线固定好。

2.1.5 植入子主体的缝合 心电电极植入完成后,缝合腹横肌与腹内斜肌使植入子周围空腔进行最大程度闭合。逐层缝合腹部正中切口。

2.2 数据采集和分析

巴马小型猪手术后恢复3~4周,经体格检查确认已完全恢复后对其生理指标进行采集。使用IOX采集系统对巴马小型猪进行至少连续24 h的监测,间隔7 d再次采集同1批动物的各项生理指标数据。使用ECGauto数据分析系统对采集的图谱数据进行分析,24 h内每小时分析1 min的整点数据,分析指标包括心率、PR间期、QRS间期、QT间期、校正QT(QT_{cv})间期、体温、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、平均动脉压(MBP)。

2.3 数据处理及分析

采用Excel 2010对所获得的数据进行整理分析,计算2次采集的1 min数据的平均值,并用折线图描述该指标24 h的变化曲线,采用同样的方法对

植入式遥测模型(模型制备方法同巴马小型猪) Beagle 犬和食蟹猴的心率和 SBP 进行分析,并与巴马小型猪的数据进行比对。

3 结果

3.1 巴马小型猪 24 h 数据结果

3.1.1 心电图数据结果 如图 1 所示,巴马小型猪的心率范围为 $62\sim 114$ 次 $\cdot\text{min}^{-1}$,其中白天(7:00—19:00 时)为 $62\sim 114$ 次 $\cdot\text{min}^{-1}$,夜间(19:00—7:00 时)为 $62\sim 86$ 次 $\cdot\text{min}^{-1}$,心率最高点出现在 17:00 时(动物喂食时间)左右,最低点出现在凌晨 5:00 时左右。

如图 2 所示,PR 间期范围为 $109\sim 144$ ms,其中白天范围为 $109\sim 139$ ms,夜间范围为 $113\sim 144$ ms,PR 间期最高点出现在 12:00 时左右,最低点出现在 17:00 时左右。QRS 间期范围为 $41\sim 67$ ms,其中白天范围为 $41\sim 67$ ms,夜间范围为 $42\sim 65$ ms,QRS 间期最高点出现在 16:00 时左右,最低点出现在 14:00 时左右。

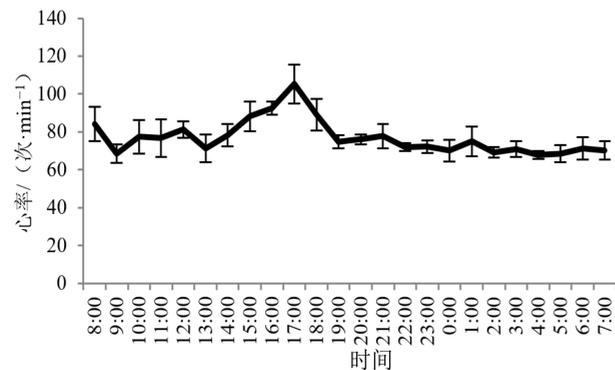


图 1 巴马小型猪的 24 h 心率变化曲线图($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 1 24-hour heart rate curve of Bama miniature pig ($\bar{x}\pm s, n=8$)

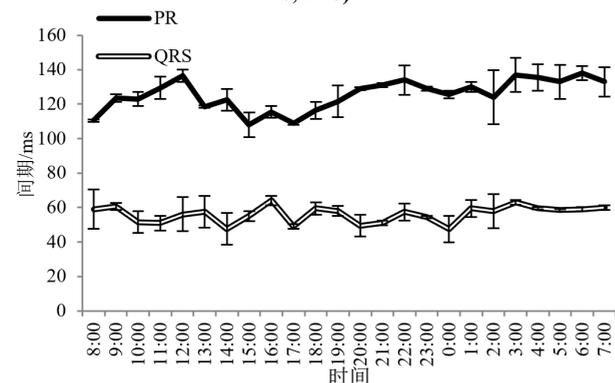


图 2 巴马小型猪的 24 h PR 和 QRS 变化曲线图($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 2 24-hour PR and QRS curves of Bama miniature pig ($\bar{x}\pm s, n=8$)

如图 3 所示,QT 间期范围为 $291\sim 374$ ms,其中白天范围为 $291\sim 359$ ms,夜间范围为 $312\sim 374$ ms,QT 间期最高点出现在 6:00 时左右,最低点出现在 15:00 时左右。QTcv 间期范围为 $310\sim 376$ ms,其中白天范围为 $310\sim 364$ ms,夜间范围为 $324\sim$

376 ms,QTcv 间期最高点出现在 3:00 左右,最低点出现在 12:00 时左右。

3.1.2 体温数据结果 巴马小型猪 24 h 的体温变化曲线见图 4。体温范围为 $36.6\sim 39.0$ $^{\circ}\text{C}$,其中白天范围为 $37.0\sim 39.0$ $^{\circ}\text{C}$,夜间范围为 $36.6\sim 38.9$ $^{\circ}\text{C}$,体温最高点出现在 16:00 时左右,最低点出现在 4:00 时左右。

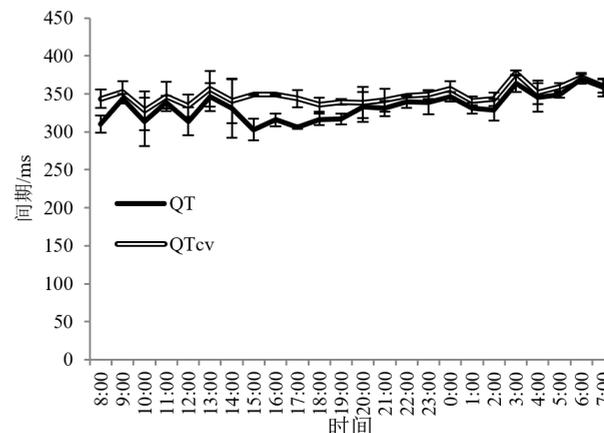


图 3 巴马小型猪的 24 h QT 和 QTcv 变化曲线图($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 3 24-hour QT and QTcv curves of Bama miniature pig ($\bar{x}\pm s, n=8$)

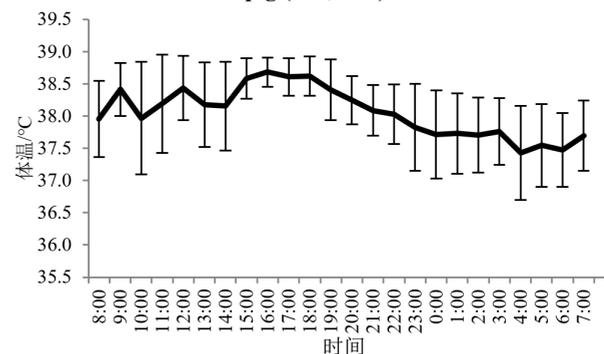


图 4 巴马小型猪的 24 h 体温变化曲线图($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 4 24-hour temperature curve of Bama miniature pig ($\bar{x}\pm s, n=8$)

3.1.3 血压数据结果 巴马小型猪 24 h 的血压变化曲线见图 5。巴马小型猪的 SBP 范围为 $133\sim 155$ mm Hg (1 mm Hg= 0.133 kPa),其中白天范围为 $133\sim 155$ mm Hg,夜间范围为 $133\sim 140$ mm Hg; DBP 范围为 $89\sim 116$ mm Hg,其中白天范围为 $96\sim 116$ mm Hg,夜间范围为 $89\sim 107$ mm Hg; MBP 范围为 $105\sim 131$ mm Hg,其中白天范围为 $108\sim 131$ mm Hg,夜间范围为 $105\sim 117$ mm Hg; SBP、DBP 和 MBP 的最高点均出现在 18:00 时左右,最低点出现在 3:00—5:00 时。

3.2 巴马小型猪、Beagle 犬和食蟹猴的比较结果

3.2.1 不同动物种属的心率比较 图 6 为不同动物种属的 24 h 心率变化。在不同的时间段内食蟹猴的心率均高于其他动物种属,且有明显的昼夜节律

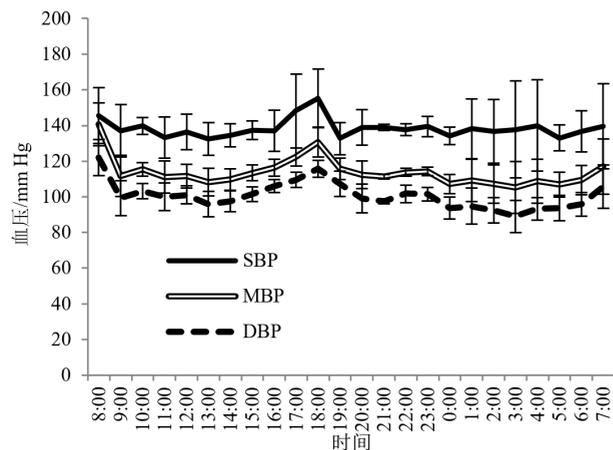


图 5 巴马小型猪的 24 h 血压变化曲线图 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 24-hour blood pressure curves of Bama miniature pig ($\bar{x} \pm s, n=8$)

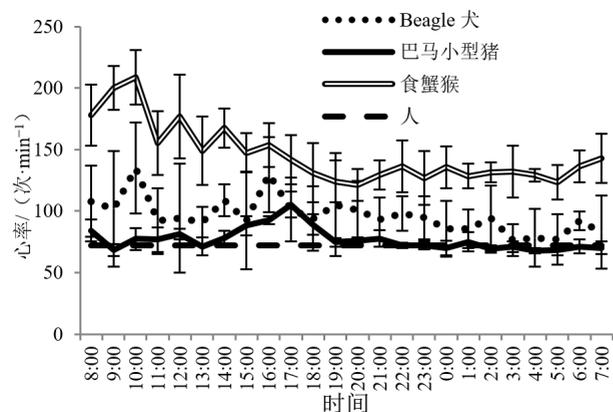


图 6 不同动物种属的 24 h 心率变化曲线图 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 6 24-hour blood pressure curves of different animal species ($\bar{x} \pm s, n=8$)

变化;巴马小型猪的心率与人类的心率最为相近,其昼夜节律变化最不明显;犬的心率均高于巴马小型猪和人类的心率,且具有昼夜节律变化。

3.2.2 不同动物种属的 SBP 比较 图 7 为不同动物种属的 24 h SBP 变化曲线图。Beagle 犬的 SBP 最高,其次分别为巴马小型猪和食蟹猴,其中食蟹猴的 SBP 和人类最为相似。

4 讨论

猪在解剖学、生理学及疾病发生过程与人类有着众多相似之处,随着国内对试验小型猪的研究越来越多,通过长期近亲体系交配和对优势品种的不断选择,形成了可以用于试验的背景清晰的不同封闭种群,所以小型猪现在已经越来越受到人们重视而应用于医学各个领域^[4]。而因其心电、血压数据比较稳定且参数与人类相近,尤其在心血管领域的应用越来越多^[5,8]。这就使得在试验中小型猪心电的检测尤为重要,而传统的麻醉状态下采集会给心电研究带来很多不可预测的因素,而且不同的麻醉

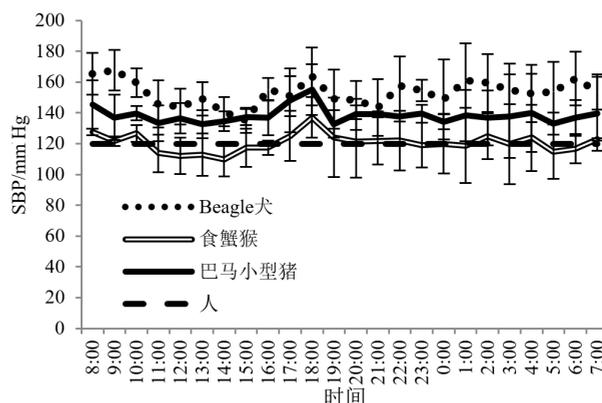


图 7 不同动物种属的 24 h 收缩压变化曲线图 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 7 24-hour SBP curves of different animal species ($\bar{x} \pm s, n=8$)

状态也会对心电的数据有影响^[9];而在清醒状态下采用猪吊床或其他保定方式进行检测会因为抓取和保定导致心率偏高,会造成假阴性的结果^[10]。因此采用遥测技术对猪的心电进行检测是减少动物应激,获得稳定性数据的最有效方法之一,本研究采用植入式遥测技术通过将可以长时间连续监测动物心电血压的植入子植入动物体内,建立了巴马小型猪的植入式遥测模型。

通过遥测技术对巴马小型猪 24 h 的心电、血压和体温数据进行了监测,结果表明:巴马小型猪的心电数据昼夜节律不明显,白天和夜间数据范围基本一致,昼夜变化不是很明显;SBP、DBP、MBP 昼夜节律也不明显;体温呈现明显的昼夜节律,夜间出现明显的降低。体温的昼夜节律变化可能与巴马小型猪的生活习性和活动度呈明显相关,这与国内外研究者对巴马小型猪生理指标的监测结果是基本一致的^[11-12]。从巴马小型猪的心电、血压和体温的 24 h 变化曲线图可知心率、血压和体温的最高点及 PR 间期的最低点均出现在 17:00 时附近,即动物喂食的时间,表明动物对外界反应比较敏感,饲养人员的活动对其影响较大,提示在试验期间应该合理且定点选择喂食时间,尽量减少对关键点数据的影响,且在整个试验期间均应减少人员活动或噪音的影响^[13]。

在植入式遥测模型的基础上,对不同动物种属的心率和 SBP 进行分析,结果表明 Beagle 犬的心率和血压均明显高于人类,且具有明显的昼夜节律,其 24 h 内的变异比较大,说明 Beagle 犬受外界的影响比较大;食蟹猴的血压和人类最为接近,但食蟹猴因活动度较大,其心率明显高于人类;而巴马小型猪的心率和人类最为相似,SBP 仅稍高于人类,但其 24 h 内的变化范围较小,且昼夜节律不明显,数

据更稳定。以上结果进一步证明小型猪比食蟹猴和Beagle犬更适合用于药物心血管系统作用的评价,这与国内外文献中关于小型猪在心血管系统研究中有一定的优势是一致的^[14-15]。

本研究在本中心原有的Beagle犬和食蟹猴植入式遥测模型的基础上建立了巴马小型猪植入式遥测模型,并对清醒自由状态下的巴马小型猪进行了连续24 h的数据监测,通过对巴马小型猪的心电血压和体温数据进行分析得出巴马小型猪心电血压数据昼夜节律不明显,体温昼夜节律明显,心率、血压和体温均外界反应比较敏感。通过与Beagle犬和食蟹猴的数据进行比对分析得出,小型猪的心电血压数据更稳定,不易波动,抗干扰能力强,比食蟹猴和Beagle犬更适合用于药物心血管系统作用的评价,为巴马小型猪在药理毒理研究中的应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 药物安全药理学研究技术指导原则 [S]. 2014. Technical guidelines for drug safety pharmacology [S]. 2014.
- [2] ICH. ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals [EB/OL]. (2000-11-08) [2019-10-01]. https://database.ich.org/sites/default/files/S7A_Guideline.pdf.
- [3] Hamdam J, Sethu S, Smith T, et al. Safety pharmacology: Current and emerging concepts [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 273(2): 229-241.
- [4] 邹迪莎, 于健. 巴马小型猪动物模型在医学领域的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4): 1128-1134. Zou D S, Yu J. Research progress on animal models of Bama miniature pigs in the field of medicine [J]. China Animal Husb & Vet Med, 2017, 44(4): 1128-1134.
- [5] 杨李厂, 周文兵, 丁隽, 等. 巴马小型猪心脏生物电特性遥测 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(5): 410-413. Yang L C, Zhou W B, Ding J, et al. Investigation on electrocardiogram of Bama minipigs by telemetry [J]. Lab Animal Comp Med, 2017, 37(5): 410-413.
- [6] 杨李厂. 上海巴马小型猪血清生化和心脏生物电特性研究 [J]. 上海农业科技, 2015(5): 72-73. Yang L G. Study on serum biochemical and cardiac bioelectrical characteristics of Shanghai Bama miniature pig [J]. Shanghai Agric Sci Technol, 2015(5): 72-73.
- [7] 张颖丽, 李芊芊, 齐卫红, 等. 清醒Beagle犬安全药理心血管呼吸遥测系统验证研究 [J]. 中南药学, 2014, 12(5): 393-396. Zhang Y L, Li Q Q, Qi W H, et al. Validation of telemetry system for cardiovascular and respiratory safety pharmacology in conscious Beagle dogs [J]. Central South Pharm, 2014, 12(5): 393-396.
- [8] Zhang S B, Guo K N, Xie F, et al. Normal electrocardiogram of Bama miniature pigs (*Sus scrofa domestica*) [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(2): 152-154.
- [9] 孙晶晶, 周泉, 齐珍珍, 等. 遥测方法对比传统安全药理学方法的优势及应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(8): 47-52. Sun J J, Zhou Q, Qi Z Z, et al. Advantages and application of telemetry compared with the traditional methods in safety pharmacology [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(8): 47-52.
- [10] 黄丽洁, 贾琳, 苟鹏, 等. 三个品系小型猪正常心电图的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 23-26. Huang L J, Jia L, Gou P, et al. Comparison of normal electrocardiogram among three different strain of minipigs [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(3): 23-26.
- [11] 操佳佳, 张海飞, 华修国. 基于遥测技术的巴马小型猪及食蟹猴循环系统监测研究 [J]. 当代畜牧, 2016(27): 58-62. Cao J J, Zhang H F, Hua X G. The study of cardiovascular function of minipigs and cynomolgus monkeys based on telemetry technique [J]. Contemp Animal Husb, 2016(27): 58-62.
- [12] Zhang Z D, Choy S J, Pitsillides K, et al. Application of implantable telemetry in swine heart failure models [J]. FASEB J, 2012, 26(S1): 1b629.
- [13] 陈亮, 潘永明, 朱科燕, 等. 基于遥测技术对巴马小型猪部分生理指标的观测 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 30-36. Chen L, Pan Y M, Zhu K Y, et al. Measurement of physiological parameters in Bama minipigs by telemetry technology [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(7): 30-36.
- [14] Authier S, Gervais J, Fournier S, et al. Cardiovascular and respiratory safety pharmacology in Göttingen minipigs: Pharmacological characterization [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2011, 64(1): 53-59.
- [15] 操佳佳. 清醒巴马小型猪与食蟹猴循环系统功能特点的比较 [D]. 上海: 上海交通大学, 2017. Cao J J. The comparison of characteristics of circulatory system functions between conscious Bama minipigs and cynomolgus monkeys [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2017.

[责任编辑 兰新新]