

2014年北京地区啮齿类实验动物质量的病理学评价

李超,董浩迪,徐琳凯,王春雨,宋志琦,刘春法,李超斯,岳瑞超,程广宇,
赵化佳,赵德明,尹晓敏,周向梅,杨利峰

(中国农业大学动物医学院/国家动物海绵状脑病实验室,北京 100193)

【摘要】目的 从病理学角度评价啮齿类实验动物的健康情况,为实验动物标准化饲养提供建议,确保相关科研结果的准确性。**方法** 本文主要对2014年10月北京市15家实验动物单位的啮齿类实验动物病理学抽检情况进行统计分析。采集啮齿类实验动物的心、肝、脾、肺、肾、大肠和小肠后经甲醛钙液固定,通过石蜡切片HE染色、PAS染色、冰冻切片油红O染色后于显微镜下观察。**结果** 实验动物总体合格,但个别单位仍然存在问题。检出病变器官主要是肝脏和肺脏,肝脏病变检出率小鼠为6%,大鼠为2.5%,豚鼠为8.2%,地鼠未检出,肝脏病变表现为细胞肿胀,且经特殊染色确证部分为脂肪变性;肺脏病变检出率豚鼠为15.5%,其余未检出,肺脏病变表现为淤血、渗出及间质性肺炎。**结论** 实验动物病理学检测基本健康,肝脏出现损伤可能与饲料有关;而肺脏病变可能与垫料及空气有关,而秋冬季雾霾及低温可能对实验动物健康有所影响。

【关键词】 啮齿类实验动物;病理学诊断;器官病变;油红-O染色;PAS染色

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)05-0067-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.016

Assessing the quality of rodent laboratory animals in Beijing area by pathological diagnosis in October 2014

LI Chao, DONG Hao-di, XU Lin-kai, WANG Chun-yu, SONG Zhi-qi, LIU Chun-fa, LI Chao-si, YUE Rui-chao,
CHENG Guang-yu, ZHAO Hua-jia, ZAO De-ming, YIN Xiao-min, ZHOU Xiang-mei, YANG Li-feng
(Veterinary Medicine, China Agricultural University / National Animal TSE Laboratory, Beijing 100193, China)

【Abstract】 Objective To assess the health status of rodent laboratory animals by pathological diagnosis, our lab has been taking part in investigating the quality of laboratory animals in Beijing area for years and offer some advices for standardized breeding to ensure accurate results of scientific research. This paper focuses on the analysis of laboratory rodent samples that collected in October 2014. **Methods** We collected the heart, liver, spleen, lung, kidney, large intestine and small intestine, and put these organs into 10% Calcium formaldehyde solution for fixation, and then prepared into two different sections for optical microscopy observation including all paraffin specimens stained with H&E and the frozen sections stained with Oil Red-O and PAS. **Results** The vast majority of laboratory rodents were up to standard, but there still a problem in individual units. The main problem is liver and lung disease. The rate of Hepatocyte swelling is 6% (mouse), 2.5% (rat), 8.2% (guinea pig), moreover part of them were lipodosis, according to Oil Red-O stain. The mainly problem of lung is congestion, edema and Interstitial pneumonia, the detectable rate of pulmonary diseases is 15.5% (guinea pig). **Conclusions** The vast majority of laboratory rodents were pathologically diagnosed as healthy animals. The

【基金项目】 国家科技支撑计划(2011BAI15B01)。

【作者简介】 李超(1990-),女,硕士生,研究方向:动物医学病理诊断方面研究,Email:924313054@qq.com。

【通讯作者】 杨利峰,副教授,研究方向:动物病理学及 Prion 疾病致病机制研究,Email:yanglf@cau.edu.cn。

liver disease may be caused by improper feeding. And disease of lung may led by haze, unqualified bedding and low temperature.

【Key words】 Laboratory rodents; Pathological diagnosis; Organ diseases; Oil red-ostain; PAS stain

实验动物的标准化对动物实验研究结果的敏感性、准确性及可重复性具有重要影响。北京市实验动物管理条例规定从事实验动物繁育工作的单位,应当根据相关标准,定期进行质量检测。

本实验室历年承担北京市实验动物质量抽查中的病理学检查任务,本文就 2014 年 10 月北京市 15 家实验动物单位的啮齿类实验动物健康状况进行统计分析。结果显示啮齿类实验动物质量总体合格,但个别单位仍然存在问题,主要病变器官是肝脏和肺脏。分析肝脏出现损伤可能与饲料和垫料有关,而肺脏病变反映饲养环境有待改善。环境条件可影响实验动物的质量,环境控制程度越高,在该环境中的实验动物标准化越高,实验结果就更趋于稳定一致^[4]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

由中国食品药品检定研究院从北京市 15 家实验动物单位包括北京沙河通利实验动物养殖场【SCXK(京)2013-0007】、斯贝福(北京)实验动物科技有限公司【SCXK(京)2014-0006】、北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2014-0008】、北京天坛生物制品股份有限公司【SCXK(京)2014-0005】、中国食品药品检定研究院【SCXK(京)2014-0013】、北京昌扬西山动物养殖场【SCXK(京)2011-0010】、北大医学部实验动物部【SCXK(京)2011-0001】、北京科宇动物养殖中心【SCXK(京)2012-0004】、北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司【SCXK(京)2010-0001】、北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂【SCXK(京)2011-0006】、维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】、北京芳元缘养殖场【SCXK(京)2014-0012】、北京海科祥瑞实验动物养殖场【SCXK(京)2011-0009】、北京隆安实验动物养殖中心【SCXK(京)2014-0003】及北京富龙腾飞养殖中心【SCXK(京)2013-0004】抽取不同品系的小鼠(BALB/c、KM、C57、裸鼠、NIH、ICR)、大鼠(Wistar、SD、Lewis)和豚鼠三种啮齿类实验动物进行检测,实验动物均为 4~6 周龄(表 1)。采样工作在中国食品药品检定研究院【SYXK(京)2011-0037】动物

实验设施内进行,制片及诊断在中国农业大学【SYXK(京)2013-0013】国家动物性海绵状脑病实验室进行,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

表 1 2014 年 10 月啮齿类实验动物采样情况

Tab. 1 Classification of samples of laboratory rodents in October 2014

种类 Species	SPF 级/只 SPF	清洁级/只 Clean grade	普通级/只 Conventional grade	总数/只 Sum
小鼠 Mice	30	60	0	90
大鼠 Rats	20	20	0	40
豚鼠 Guinea pigs	0	20	90	110
地鼠 Hamsters	0	10	0	10
合计 Sum	50	110	90	250

1.2 实验方法

1.2.1 组织切片的制备和观察

CO₂ 窒息处死动物,采集动物的心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、小肠和大肠,用甲醛钙液(10% 甲醛 + 1% 氯化钙)固定。按照常规方法制作石蜡切片,HE 染色,OLYMPAS U-SRG 数码显微镜采图并观察。

1.2.2 肝脏油红 O 染色

对于在 HE 染色下观察疑似为脂肪变性的样品肝脏,抽取部分进行脂肪的油红 O 染色。具体步骤为:

- 1) 组织块用甲醛钙液(10% 甲醛 + 1% 氯化钙)固定一周,并于采样后第二天换液;
- 2) 制作肝组织冰冻切片,厚约 10 μm;
- 3) 用油红 O(5%) 乙醇溶液染色约 8 min;
- 4) 用 50% 乙醇分化约 30 s,自来水终止分化;
- 5) 苏木素复染核约 1 min,自来水轻柔冲洗返蓝约 10 min;
- 6) 甘油明胶封片,最后显微镜观察。

1.2.3 肝脏 PAS 染色

同时取做油红 O 染色相同病例的肝组织做糖原的 PAS 染色。具体步骤为:

- 1) 甲醛钙液固定组织块一周,并于采样后第 2 天换液;
- 2) 制作组织石蜡切片;
- 3) 切片于梯度酒精中下行脱腊至水;
- 4) 高碘酸液氧化 5 min,蒸馏水洗 2 次;
- 5) 切片置于密封 Schiff 氏试剂中于 37℃ 温箱里

染色 30 min;

6) 蒸馏水洗 2 次后, 苏木素复染 10 min;

7) 0.5% 盐酸酒精分化约 10 s, 自来水冲洗;

8) 经 95% 酒精及无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片观察。

2 结果(彩图见封 3)

2.1 实验鼠的肝脏病理学变化及统计

2.1.1 镜下病变

本次调查表明, 肝脏以细胞肿胀变性为主, 与正常对照(图 1A) 比较, 病变样本镜下可见肝索结构紊乱, 肝细胞体积变大, 内有大小不等、数量不等的空泡, 肝细胞核深蓝染, 大小不一, 可清楚地观察到枯否氏细胞和少量的新生细胞, 肝血窦内有大量红细胞(图 1B)。对肝细胞肿胀样本进行油红 O 染色, 阳性可见蓝染肝细胞轮廓及细胞核, 胞质中可见大量大小不一的圆形红色脂滴(图 1C)。病变肝脏同时进行 PAS 染色可见阳性样本肝细胞胞浆部分呈紫红色即是糖原物质沉着的区域, 与未着色部分的淡粉色形成明显对比, 胞核呈深红着色(图 1D)。

2.1.2 病变样本统计

结果显示 100 例小鼠样本中, HE 染色肝细胞肿胀有 11 例, 其中轻度变性 5 例, 中度 6 例, 病变率为 6%。油红 O 染色未检出脂肪变性, PAS 染色确证其中 4 例为糖元沉积, 特殊染色均呈阴性的细胞肿胀病例, 可能是动物死后血管渗透性增大, 血管中血浆成分渗入细胞中所造成; 大鼠肝细胞肿胀变性程度总体轻微, 40 例大鼠样本中, HE 染色肝细胞肿胀有 1 例, 病变率 2.5%。并由 PAS 染色确证为糖原沉积; 豚鼠肝细胞肿胀变性病例相对较多, 程度较严重, 110 例豚鼠样本中, HE 染色细胞肿胀有 21 例, 轻度 12 例, 中度 9 例, 病变率为 8.2%。其中确证 7 例为脂肪变性, 8 例为糖元沉积, 剩余 6 例可能由于死后血管通透性增大, 血液成分渗出所致; 10 例地鼠样本肝脏均未见明显病变。

2.2 实验鼠的肺脏病理学变化及统计

2.2.1 镜下变化

肺脏病变主要以淤血、渗出及间质性肺炎为主, 与正常对照(图 1E) 比较, 病变样本低倍镜下可见肺组织密度增大, 不见特征性肺泡结构, 肺静脉、肺间隔以及肺泡腔内可见大量红细胞, 有的静脉内有大量蛋白样液体, 细支气管上皮脱落, 细支气管

周围间质有深染细胞聚集, 肺泡隔增厚(图 1F); 高倍镜下, 细支气管周深染细胞为淋巴样细胞, 肺间隔内有增生的肺泡上皮细胞、淋巴样细胞, 红细胞位于毛细血管内, 肺泡中有少量红细胞、淋巴样细胞、尘细胞及脱落上皮细胞, 有的红细胞崩解成均质红染团块。

2.2.2 病变样本统计

统计结果显示, 小鼠、地鼠肺脏未见明显异常; 大鼠肺脏以淤血、间质增厚、肺泡腔浆液渗出为主, 但无炎性细胞浸润, 判断为由于处死窒息造成的肺组织结构异常。其中肺脏充血、淤血、肺泡腔浆液渗出可能为窒息处死造成的组织学反应, 而血管淤血可导致轻度的间质增厚; 110 例豚鼠肺脏样本中, 出现 31 例异常病例, 其中 17 例为严重的淤血、间质增厚、肺泡腔浆液渗出, 病变率为 15.5%。

2.3 实验鼠其他器官的病理学变化及统计

2.3.1 心脏病变

豚鼠心脏检出 1 例出血性心肌炎, 表现为急性心外膜出血、心肌出血, 低倍镜下, 心外膜充血、出血, 心外膜增厚, 心肌纤维之间血管破裂出血(图 1G); 高倍镜下, 心肌纤维之间充满红细胞, 同时有少量炎性细胞浸润。可能与死前挣扎有关, 由于窒息缺氧使血管通透性增加; 肾上腺素分泌增多, 使小血管、毛细血管内压升高发生破裂。

2.3.2 脾病变

此外大鼠新发现 1 例脾组织含铁血黄素沉着, 镜下可见脾脏红髓内少量出血和含铁血黄素沉着(图 1H), 说明可能存在陈旧性出血, 可能是窒息死亡较慢, 缺氧导致血管通透性增大、脾脏红细胞增多, 血管中红细胞进入组织后被吞噬细胞分解导致。

2.3.3 肾脏病变

大鼠肾脏以肾小管, 集合管官腔中出现均质粉染渗出为主要病变, 但未见炎性细胞浸润, 很可能是由于死后血管通透性升高, 血浆成分渗出而形成(图 1I)。豚鼠肾脏检出 3 例肾淤血、出血及蛋白管型, 可能是由于处死应激造成。

3 讨论

3.1 结论

肝脏病变主要出现于小鼠和豚鼠, 小鼠肝细胞肿胀主要由于糖元沉积造成, 而豚鼠肝细胞脂肪变性和糖元沉积参半。

肺脏病变主要发生于豚鼠, 表现为肺脏淤血、

渗出及间质性肺炎。

全部鼠的小肠、大肠等脏器在镜下无明显病理变化。

综上所述,绝大多数实验用啮齿动物为健康状态,排除由于处死过程造成的组织学病理变化,非健康动物主要以肝脏,肺脏病变为主。但整体上看,各送检单位的实验用鼠各器官病变发生率均在合格范围内,病理学检测基本健康。

3.2 分析

此次检测发现主要病变发生于肝脏和肺脏。

3.2.1 肝脏病变反映的问题

结合实验动物饲养环境级别来看,肝脏病变在所有 100 例普通级实验动物中有 7 例,占 7%,所有 110 清洁级实验动物中有 6 例,占 5.5%,全部 50 例 SPF 级实验动物中有 3 例,占 6%,肝脏病变在三个级别均有发生,且发生率差别极小(均值 6.2%,极差 1%,标准差 0.6)。

通常肝脏病变反映进食情况,而数据显示不论动物级别如何,肝脏均有一定程度病变,说明肝脏损伤可能与饲料有关,而各受检单位均使用目前市场上的成品饲料商品,可见其原料质量及配方有待规范。而饮水来源则根据级别要求使用自来水或高压灭菌自来水,故不排除自来水水质如微生物含量,重金属、消毒剂及农药残留和硬度等对实验动物健康的影响。秋冬季低温同样不容忽视,在低温环境下动物能量代谢加强,需要通过增加采食量来维持热平衡,如果饲料供应不足,同样会引起营养不良和抗病力下降,饲料充足又易造成脂肪沉积,动物患肥胖病,故应注意固定饲喂次数及进食量。

3.2.2 肺脏病变反映的问题

结合实验动物饲养环境级别分析,肺脏病变在全部 100 例普通级有 15 例,占比例较高(15%),在全部 110 例清洁级有 2 例,所占比例较低(1.8%),全部 50 例 SPF 级中无检出病例(0%),可见各级别肺脏病变发生率差异显著(极差 15%,标准差 6),且动物级别越低,肺脏病变越明显。

肺脏病变主要反映饲养环境空气情况。可见普通级动物的空气及垫料有待改善,原因可能有垫料不合格、饲养密度过大、秋冬季雾霾天气及低温影响等。劣质的垫料碎屑及尘埃较多,极易造成异物刺激引发肺部炎症。秋饲养间密度过大、通风不

和饲养员清理不及时,室内的气味(臭味、氨味)浓度就大,空气不洁可诱发气管炎、肺炎等。开放系统很大程度依赖于自然环境空气质量,而北京地区秋季的雾霾严重,空气欠佳,对实验动物肺脏也有所影响。而秋冬季的低温也是动物冻伤、感冒、支气管炎和肺炎等疾病的直接诱因。

对比历年肺脏病变检出率可见(图 2),历年发生率呈波动趋势,且秋季较为高发,几次肺脏病变检出率高峰(2011 年、2013 年)均发生于秋季,更加说明秋冬季雾霾天,空气中可吸入颗粒物密度大,对实验动物肺部病变有不可忽视的影响^[1-2]。

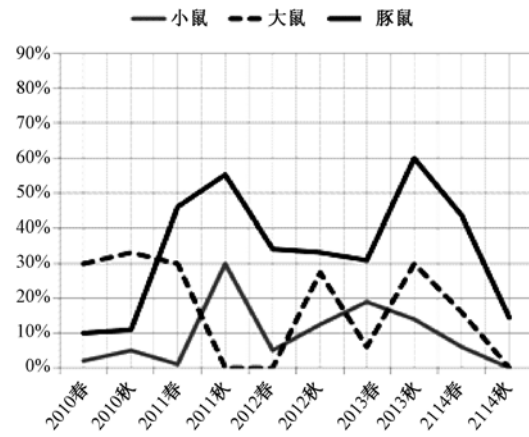


图 2 2010 年春季至 2014 年秋季北京市啮齿类实验动物肺脏病变检出率

Fig. 2 The detectable rate of pulmonary diseases of rodent laboratory animal from 2010 to 2014

参考文献:

- [1] 付永瑶,吕悦,王继宏,等. 北京市大鼠、小鼠、豚鼠的病理学调查[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(7):54-56.
- [2] 吕悦,付永瑶,王继宏,等. 2014 年春季北京地区啮齿类实验动物健康状况的病理学调查和分析[J]. 实验动物科学,2014,4:6-10.
- [3] 赵德明,兽医病理学[M]. 第 3 版. 北京:中国农业大学出版社,2013.
- [4] 刘艳,王珑. 浅述实验动物质量控制[J]. 中国公共卫生管理,2011,01:25-27.
- [5] McGavin, M. Donald/Zachary, James F., Ph. D., Pathologic Basis of Veterinary Disease. fourth edition, Elsevier Science Health Science div, 2006-2008.

[修回日期]2015-04-07