

小鼠游泳耐力实验系统的建立与 红景天抗疲劳作用的验证

谢磊^{1,2}, 李由³, 刘新民², 陈善广³, 王克柱², 陈怡西¹, 王琼¹

(1. 四川医科大学, 四川 泸州 646000; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;
3. 中国航天员科研训练中心人因工程重点实验室, 北京 100094)

【摘要】 目的 建立小鼠游泳耐力实验系统, 挖掘评价小鼠游泳耐力的新指标, 并用此系统验证红景天对小鼠耐力的影响。方法 将计算机视频采集技术和图像分析技术应用于小鼠游泳耐力实验中, 实时获取小鼠游泳信息, 提取包括力竭时间、首次下沉时间、下沉总时间、首次连续下沉时间在内的多个耐力评价指标, 客观精确地在线分析小鼠耐力数据; 利用正常小鼠、红景天给药小鼠对系统的稳定性、可靠性进行实验研究。结果 计算机记录数据与人工记录数据具有高度相关性, $r > 0.95$, 系统稳定可靠。首次连续下沉时间与力竭时间的相关性系数 $r = 0.974$, 其他新指标与力竭时间的相关性系数 $r < 0.9$ 。红景天给药组较空白组, 首次下沉时间和首次连续下沉时间显著性增加。结论 该系统用于评价小鼠游泳耐力的指标客观、精确、灵敏, 实现了视频采集、信息整合、数据分析、统计输出一体化, 寻找到了与力竭时间高度相关的新指标-首次连续下沉时间。全套系统自动化、智能化程度高, 为抗疲劳药物的筛选提供了一套可靠的实验系统。

【关键词】 小鼠; 力竭游泳; 计算机; 红景天

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0071-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.011

Establishment of the swimming endurance system in mice and the verification of the anti-fatigue effect in hongjingtian

XIE Lei^{1,2}, LI You³, LIU Xin-min², CHEN Shan-guang³,
WANG Ke-zhu², CHEN Yi-xi¹, WANG Qiong¹

(1. Sichuan Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;
3. National Key Laboratory of Human Factors Engineering, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China)

【Abstract】 Objective To establish a swimming endurance system, excavating new indexes evaluating the swim capacity in mice and detecting the effects of HONGJINGTIAN (HJT) capsule on the swimming capacity in mice. **Methods** Combining video capture technology with image analysis technology into the Exhaustive swimming test, this system would automatically collect and objectively analyze the data when the swimming behavior perform synchronously in mice. A series of indexes would be calculated, such as Exhaustive time, First sink time, Total sink time, Sink frequency, Continuous sink

【基金项目】 人因工程重点实验室开放基金资助项目 (HF2012-K-01, HF2012-K-06); 国家科技重大专项 (2012ZX09J12201); 四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研资金项目 (14JC01323-LH50)。

【作者简介】 谢磊 (1990-), 男, 硕士生, 研究方向: 中药神经精神药理, E-mail: 296303836@qq.com。

【通讯作者】 王琼, 女, 博士生导师, E-mail: wqimplad@126.com; 刘新民, 男, 博士生导师, E-mail: liuxinmin@hotmail.com。

time. Furthermore, the classical anti-fatigue herb named HJT will use to detect the stability and reliability of this swimming endurance system. **Results** The data showed high correlation between the computer and manual record ($r > 0.95$), indicating high stability and reliability of the swimming endurance system. The continuous sink time (CST) have been proved out high correlation with Exhaustive time(ET) ($r = 0.974$), while the correlation of others indexes less than 0.9. The mice treated with HJT by intragastric administration had showed significantly increase in the First sink time (FST) and the Continuous sink time (CST) compared with the control group. **Conclusions** The results showed that the system could assess swimming capacity objectively, precisely and sensitively in mice. In addition, this system realized integrating video capture, data analysis and data output together automatically. Besides, a new index-CST was found to be high correlation with ET. This system turn out to be high automatically and intelligently, and provide a reliable system to screen the potential anti-fatigue drugs.

[Key words] Mice; Exhaustive swimming; Computer; Hongjingtian

随着社会竞争压力的增加,各类急性疲劳、慢性疲劳综合症已成为严重影响人类工作、生活的社会性问题。近年来有关西药抗疲劳药物研究报道较少且副作用大^[1],因此,从中药中寻找有效的抗疲劳成分已成为抗疲劳药物研究的热点。目前国内用于抗疲劳药物研究的行为学方法主要包括负重游泳实验、强迫游泳实验、跑台实验、转棒实验等^[2-4],其中最为经典的是负重游泳实验^[5],该实验方法对动物心理应激小、生理伤害少,从而被广泛使用。

然而现阶段大量的负重游泳实验方法多为人工记录,自动化程度低、结果可靠性差,测试中获得的信息量少、检测环境不稳定(水温需人工调节)、动物之间相互干扰(多只动物同时检测,出现身体碰撞、相互蹬踏等不可避免的干扰因素),导致实验重复性差^[6]。研究自动化程度高、更为科学客观的负重游泳实验系统,挖掘能更好评价小鼠游泳耐力的新指标是现在科研工作者急需解决的问题。因此,本研究结合计算机视频采集技术和图像分析技术,旨在构建一套小鼠游泳耐力实验系统并评价疲劳相关的行为学指标,为抗疲劳药物的研究提供科学、客观的实验方法。

1 材料和方法

1.1 仪器

计算机主机(Pentium 3.2 GHz,内存 2.00 GB,硬盘 500 G)、摄像机(VS-250DH,分辨率 752 * 582,)、镜头(AFT-VS0410ZM),图像采集卡(维视 MV-E8800,总线数据传输速率 250MByte/S, 10bit AD 转换芯片)、显示器(Dell 17 寸显示器,分辨率 1280 * 1024)、负重游泳测试缸及附属配件、恒温装置(亨庭 X-218 加热棒,功率 1000w)、负重游泳测

试桶。

1.2 实验动物与材料

1.2.1 实验动物

雄性 ICR 小鼠,SPF 级,购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】。给药期间饲养于实验室动物房,实验室温度恒定保持 25℃,12h 照明/12h 黑暗环境(8:00 am 开灯,20:00 pm 关灯),动物自由饮食饮水。动物实验在协和药用植物研究所动物房进行【SYXK(京)2013-0023】,并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2.2 材料

央科藏域红景天胶囊:购自西藏央科生物科技有限公司,生产日期:20140410,生产批号:140401

羧甲基纤维素钠 300 ~ 800 mPa·s:购自国药集团化学试剂有限公司。

铅皮:渔具店购买。

1.3 小鼠游泳耐力实验系统的建立

1.3.1 硬件的研制

硬件包括测试缸,及测试缸内的测试桶(2 个)、加热装置、LED 灯和测试缸外的主支架、相机支架、亚格力透光板、摄像机(2 个)、LED 背景灯控制器、视频采集卡和计算机。采用全开放式缸体设计,单一测试缸尺寸 750 * 350 * 400 mm (长 * 宽 * 高)的组合式长方体超白玻璃缸,内含两个平行放置的有机玻璃桶。实验桶尺寸为 250 * 300 mm (直径 * 高),右侧壁板上安置加热装置一套。缸外顶部和前部安置有摄像装置,摄像装置分别通过各自相机支架固定于主支架的顶部和前部。缸外底部和后部有与摄像装置相对应的红色 LED 背景灯,LED 背景灯与缸体之间间隔一层亚格力透光板,LED 背景灯外侧有主支架,主支架对测试缸及其他结构起支撑作用。硬件结构如图 1。

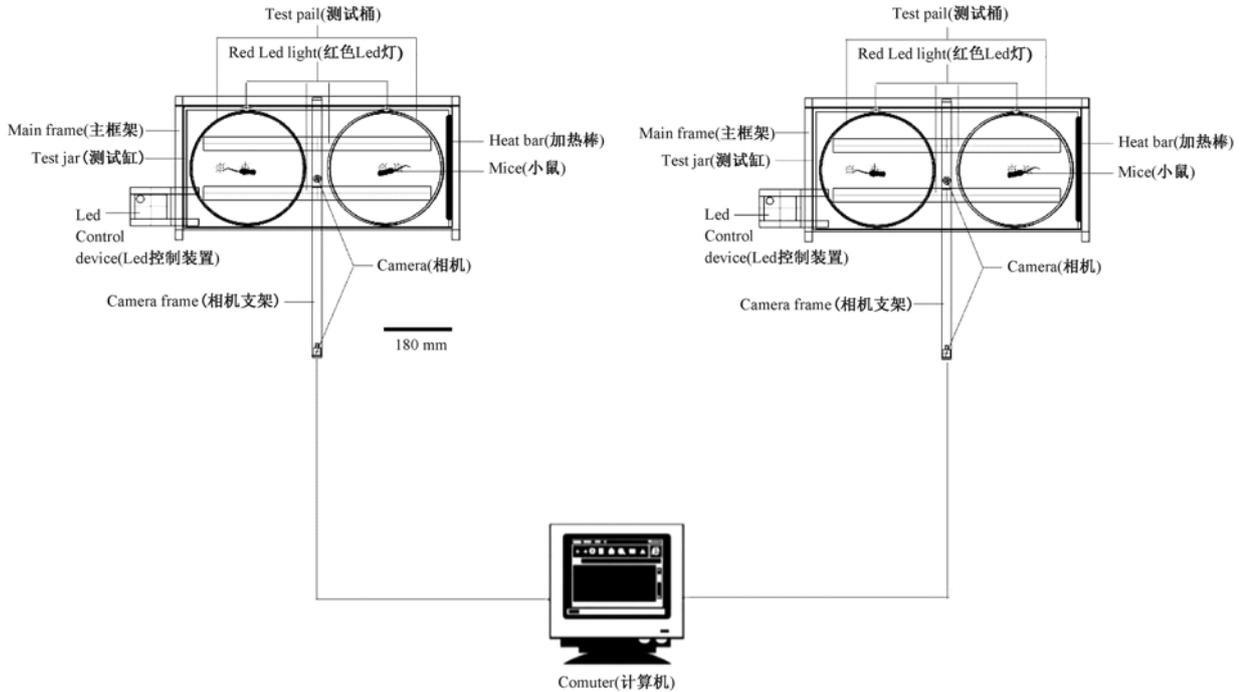


图 1 小鼠游泳耐力实验系统结构图

Fig. 1 Diagram of swimming endurance system in mice

1.3.2 软件的研制

软件系统采用 Microsoft Visual C++ 6.0 语言开发环境,运行于 XP 操作系统,设置实验项目、实验参数、实验操控、数据输出 4 大功能模块。设定包括力竭模式、下沉次数模式和下沉总时间模式等 3 种不同的实验模式。软件可提取的耐力指标包括: 1) 力竭时间 (exhaustive time, ET), 动物从开始检测至全部躯干浸入水下超过 7 s 计算机所记录的游泳时间; 2) 首次下沉时间 (first sink time, FST), 动物从开始检测至首次全部躯干浸入水下计算机所记录的游泳时间; 3) 下沉总时间 (total sink time, TST), 动物从开始检测至力竭期间或指定时间点下沉时间的总和; 4) 下沉次数 (sink frequency, SF), 动物从开始检测至力竭期间或指定时间点下沉次数的总和; 5) 首次连续下沉时间 (continuous sink time, CST): 动物从开始检测至 7 s 内连续出现 2 次或以上的下沉行为计算机所记录的游泳时间。软件界面图见图 2。

1.4 系统验证

1.4.1 指标可靠性验证

ICR 小鼠 20 只, 雄性, 36 ~ 42 g, SPF 级, 来源于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号【SCXK(京)2012-0001】, 实验室使用许可证号【SYXK(京)2013-0023】。调用“力竭模式”, 将 20

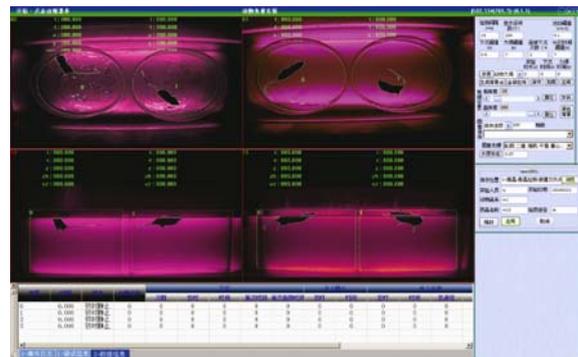


图 2 小鼠游泳耐力实验系统软件界面图

Fig. 2 software interface of swimming endurance system in mice

只 Icr 雄性小鼠称重后尾根部捆绑 6% * m (m 代表小鼠体重) 的铅皮^[5], 进行负重游泳测试, 水深 $\geq 25\text{cm}$ ^[7-8]。实验过程中, 记录人工观察到的动物 ET、FST、TST、SF、CST, 并与计算机记录的 ET、FST、TST、SF、CST 进行相关性分析^[9]。再将计算机记录的 ET 与计算机记录的 FST、TST、SF、CST 进行相关性分析, 以寻找与经典指标 ET 高度相关的新指标。考虑到动物之间存在个体差异, 游泳时间不同, 利用软件数据分段提取的功能, 分别将动物 150 s、200 s、250 s 游泳时刻的下沉次数、下沉总时间单独提取, 与力竭时间进行相关性分析。采用 SPSS18.0 统

计分析软件中的相关性分析对人工记录数值和计算机记录数值做相关性分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.4.2 小鼠游泳耐力实验系统的应用

ICR 小鼠 20 只,雄性,19~21 g,SPF 级,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号【SCXK(京)2012-0001】,实验室使用许可证号【SYXK(京)2013-0023】。于动物房进行环境适应性饲养 1 周,于购入第 8 天随机分为 2 组:对照组和红景天组。5% CMC-Na 红景天悬液灌胃 14 d 后进行负重游泳检测,给药体积为 0.2 mL/10 g 体重,给药剂量为 120 mg/kg^[10],对照组给予等体积的 5% CMC-Na 悬液。末次给药 30 min 后选择力竭模式进行尾部捆绑 6% * m 的铅皮进行负重游泳检测,水深 ≥ 25 cm。采用 SPSS18.0 统计分析软件中的两样本 t 检验进行统计分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

2 结果

2.1 指标相关性验证

结果显示,ET、FST、TST、SF、CST 计算机记录值与人工记录值均高度相关,除 TST 的人机相关系数 $r=0.96$,其余 4 个指标的人机相关系数均 >0.99 ,也进一步验证了下沉阈值($=0.5$ s)的可靠性(表 1)。

2.2 新指标与经典指标(ET)相关性分析

结果显示,TST 与 ET 间相关性最低($r=0.043$),CST 与 ET 间的相关性最高($r=0.974$),SF 与 ET 间相关性较低($r=0.16$),FST 与 ET 间相关性较高($r=0.771$)。分段后各时刻得到的下沉次数、下沉总时间分别与力竭时间进行相关性分析所得到的相关性系数均较力竭时刻的下沉次数、下沉总时间的相关性系数高,且所取时刻越大,相关性越高。提示下沉次数和下沉总时间两个指标在实验数据分析时应在固定游泳时间下进行分析。结果如表 2、表 3、表 4。

表 1 小鼠游泳耐力实验系统指标相关性验证($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab. 1 Correlation of basic indexes in swimming endurance system in mice($\bar{x} \pm s, n=20$)

方法 (Methods)	力竭时间 (Exhaustive time, ET) (s)	首次下沉时间 (First sink time, FST) (s)	下沉次数 (Sink frequency, SF) (次)	下沉总时间 (Total sink time, TST) (s)	首次连续下沉时间 (Continuous sink time, CST) (s)
人工记录(Manual record)	490.1 ± 199.8	317.6 ± 169.4	12.1 ± 6.8	33.7 ± 14.6	426.7 ± 212.6
计算机记录(Computer record)	490.6 ± 200.0	317.0 ± 170.0	12.4 ± 7.2	34.4 ± 14.7	426.7 ± 212.5
相关性系数(Pearson value)	>0.99	>0.99	>0.99	=0.96	>0.99

表 2 小鼠游泳耐力实验系统新指标与力竭时间相关性分析($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab. 2 Correlation between new indexes and exhaustive time in swimming endurance system in mice($\bar{x} \pm s, n=20$)

新指标 (New indexes)	首次下沉时间 (First sink time, FST) (s)	下沉次数 (Sink frequency, SF) (次)	下沉总时间 (Total sink time, TST) (s)	首次连续下沉时间 (Continuous sink time, CST) (s)
新指标值 (Value of New indexes)	317.6 ± 169.4	12.1 ± 6.8	33.7 ± 14.6	426.7 ± 212.6
力竭时间 (Exhaustive time, ET) (s)	490.1 ± 199.8	490.1 ± 199.8	490.1 ± 199.8	490.1 ± 199.8
相关性系数 (Pearson value)	0.771	0.16	0.043	0.974

表 3 小鼠游泳耐力实验系统分段下沉次数(次)与力竭时间(s)相关性分析($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab. 3 Correlation between different period of sink frequency and exhaustive time in swimming endurance system in mice($\bar{x} \pm s, n=20$)

分段下沉次数 (Paragraph of sink frequency)	150 s 下沉次数 (Sink frequency of 150 s)	200 s 下沉次数 (Sink frequency of 200 s)	250 s 下沉次数 (Sink frequency of 250 s)
分段值 (Value of the Paragraphs)	0.6 ± 1.57	1.0 ± 2.43	1.95 ± 3.36
力竭时间(Exhaustive time, ET)	490.1 ± 199.8	490.1 ± 199.8	490.1 ± 199.8
相关性系数(Pearson value)	0.42	0.442	0.596

表 4 小鼠游泳耐力实验系统分时段下沉总时间(s)与力竭时间(s)相关性分析($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Tab.4 Correlation between different period of total sink time and exhaustive time in swimming endurance system in mice($\bar{x} \pm s, n = 20$)

分段下沉总时间 (Paragraph of total sink time)	150 s 下沉总时间 (Total sink time of 150 s)	200s 下沉总时间 (Total sink time of 200s)	250s 下沉总时间 (Total sink time of 250s)
分段值 (Value of the Paragraphs)	1.06 ± 2.97	2.34 ± 7.4	4.03 ± 8.89
力竭时间(Exhaustive time, ET)	490.1 ± 199.8	490.1 ± 199.8	490.1 ± 199.8
相关性系数(Pearson value)	0.411	0.393	0.525

2.3 红景天对小鼠耐力的研究

结果显示,红景天能明显增加 ICR 小鼠游泳耐力,ICR 雄性小鼠经 14 d 灌胃后,体重与空白组比较无显著性差异,表现出首次下沉时间、首次连续下沉时间两项指标显著性 ($P < 0.05$) 增加,力竭时间也有很大增加 ($P = 0.057$)。

表 5 红景天对 Icr 小鼠体重(g)的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.5 Effect of HJT capsule on weight in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

时间 Date(d)	空白组 (Control group)	红景天组 (Integripetal rhodiola herb group)
1	26.58 ± 1.52	28.22 ± 1.51
4	29.54 ± 1.22	29.35 ± 1.34
7	30.20 ± 1.45	30.35 ± 1.51
10	31.18 ± 1.29	31.22 ± 1.65
14	31.45 ± 1.28	31.80 ± 1.65

3 讨论

力竭游泳实验是临床前实验中评价小动物耐力的经典实验方法^[11]。王艳杰等^[12]采用透光材质将动物分区实验,解决了动物在实验过程中相互干扰的问题,但仍采用人工记录数据的实验方法;张卫华等^[13]研制的动物游泳实验视频观察仪器,解决了力竭实验过程中出现的图像失真,动物位置偏好等问题,可获得漂浮时间、游泳时间、力竭时间三个指标;庄成乐等^[14]研制的大小鼠力竭游泳装置采用在大小鼠口鼻尖放置传感器来判定动物下沉行为,

获得动物下沉总时间 10 s 的时刻。本课题采用同一软件系统下,同时捕获 4 只动物在不同游泳桶内的二维活动,既避免了动物的相互干扰,又更准确提取了动物下沉行为信息,测试样本量也增加四倍。该系统设计的“小鼠力竭游泳实时监测软件”在现有指标下,增加了首次下沉时间、下沉次数、下沉总时间、首次连续下沉时间,还可提取分时段的下沉次数及分时段的下沉总时间。经过数百次实验验证,这些指标稳定可靠,与经典的力竭时间指标有很好的相关性。

研究表明,力竭时间是经典的负重游泳耐力评价指标,但动物力竭后生理及心理应激反应强烈,与动物伦理及福利相违背^[15]。龚梦娟等^[5]研制出一套小鼠游泳计算机自动控制与图像分析处理系统,首次提出了首次下沉时间的概念。因此,本课题致力于挖掘与力竭时间高度相关的耐力评价新指标,以多角度、小应激、低死亡、高精度为目的评价小鼠游泳耐力强弱。结果显示,首次连续下沉时间与力竭时间相关性最高,且出现时间更早,提示在实验动物较少或者负重游泳测试后需进行生化指标测定等的实验,可用首次连续下沉时间代替力竭时间来对实验进行评价。此外,刘静波等人研究指出,影响负重游泳的最大因素为游泳水温^[16],利用本系统的恒温装置可将水温恒定在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,大大减少了实验的变量,保证了实验环境的稳定。经

表 6 红景天对 Icr 小鼠游泳耐力指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.6 Effect of HJT capsule on swimming capacity indexes in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

指标 (Indexes)	力竭时间 (Exhaustive time, ET) (s)	首次下沉时间 (First sink time, FST) (s)	下沉次数 (Sink frequency, SF) (次)	下沉总时间 (Total sink time, TST) (s)	首次连续下沉时间 (Continuous sink time, CST) (s)
空白对照组 (Control group)	717.9 ± 277.4	439.9 ± 190.2	20.1 ± 17.7	51.9 ± 33.7	612.3 ± 238.1
红景天组 (Integripetal rhodiola herb group)	1179.4 ± 601.3	798.0 ± 310.1	35.6 ± 32.5	70.1 ± 66.1	984.5 ± 455.9
两样本 t 检验值 (Values of Independent-Samples T tests)	0.057	0.006	0.202	0.447	0.034

前期研究证明,体重对负重游泳实验影响较大,相对较重的体重在进行力竭游泳测试时,各指标的数据分布更集中,标准差更小。因此,推荐力竭游泳实验测试时尽量选用大周龄小鼠($w > 7$),但购入动物不能超过 4 周龄,以免动物发生同笼厮打行为。

《四部医典》曾著红景天,其性平、味涩、善润肺、能补肾、理气养血。主治周身乏力、胸闷、恶心、体虚等症。耿欣等^[17]报道,红景天具有显著的抗疲劳、抗辐射功能,韩雪娇,郭娜等^[18]进一步证实了红景天中红景天苷的抗疲劳作用。本课题利用红景天的抗疲劳作用,再次验证了小鼠游泳耐力实验系统的可靠性。

本研究采用更完整的硬件设计,建立的小鼠游泳耐力实验系统,不仅有效避免了动物间的相互干扰,还能准确判断动物的下沉相关指标,同时温度自动控制,且检测样本量增加。开发的小鼠游泳耐力实验软件系统,不仅稳定可靠,还提取了与经典指标相关性高的新指标。全套系统自动化、智能化程度高,为抗疲劳药物的筛选提供了一套可靠的实验系统。

参考文献:

- [1] 徐志刚. 抗疲劳药物的研究进展[J]. 海峡药学,2012,01:21-23.
- [2] Matsumoto K, Ishihara K, Tanaka K, *et al.* An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice[J]. *Journal of Applied Physiology*, 1996, 81(4):1843-1849.
- [3] Billat V L, Mouisel E, Roblot N, *et al.* Inter-and intrastain variation in mouse critical running speed[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2005, 98(4):1258-1263.
- [4] 马挺军,徐艺青. 西伯利亚白刺籽油的抗疲劳活性[J]. 中国实验动物学报,2012,20(5):77-79.
- [5] 龚梦鹏,张煜. 基于小鼠游泳计算机自动控制系统的抗疲劳指标评价体系的建立[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12:59-61.
- [6] 钟雨,闫明珠,张泽生,等. 黄秋葵水提物抗运动疲劳作用研究[J]. 食品科技,2015,01:171-175.
- [7] Zhang H, Liu Y, Zhou J, *et al.* Amylopectin is the anti-fatigue ingredient in glutinous rice[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2014, 63:240-243.
- [8] Wang L, Zhang H L, Lu R, *et al.* The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice[J]. *Peptides*, 2008, 29(7):1176-1182.
- [9] 王琼,买文丽,李翊华,等. 自主活动实时测试分析处理系统的建立与开心散安神镇静作用验证[J]. 中草药,2009,11:1773-1779.
- [10] 马莉. 红景天苷抗疲劳作用及其机制的实验研究[D]. 第二军医大学,2006.
- [11] 何来英,严卫星,楼密密,等. 保健食品抗疲劳作用试验方法研究[J]. 中国食品卫生杂志,1997,04:3-8+26+48.
- [12] 王艳杰,刘慧慧,冯晓帆,等. 一种强迫小动物游泳实验装置[P]. 辽宁:CN203399599U,2014-01-22.
- [13] 张卫华,徐国标,黄坤,等. 动物游泳实验视频观察仪器[P]. 四川:CN202026685U,2011-11-09.
- [14] 庄成乐,陈帆风,黄冬冬,等. 一种专用于大小鼠力竭游泳实验的设备[P]. 浙江:CN204520726U,2015-08-05.
- [15] 金玫蕾. 我国实验动物科学带来的动物伦理及福利问题[J]. 生命科学,2012,11:1325-1329.
- [16] 刘静波,林松毅. 以负重游泳动物试验评价抗疲劳作用的影响因素分析[J]. 食品科学,2005,08:399-403.
- [17] 耿欣. 红景天抗疲劳作用研究进展[J]. 中医学报,2011,03:95-97.
- [18] 韩雪娇,郭娜,朱美宣,等. 红景天苷药理作用及其作用机理研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2015,01:171-175.

[修回日期]2016-02-24