

一种新型呕吐动物模型——水貂

岳 旺^{1*}, 张 芳¹, 王 蕾¹, 方 选¹, 刘艳霞¹, 南 胜²

(1. 青岛大学 医学院 药理教研室, 山东 青岛 266021; 2. 日本国北海道医疗大学 药理教研室, 日本 北海道 061 - 0239)

摘要: 目的 用水貂建立一种新型呕吐动物模型。方法 将水貂随机分组, 给予 3 种经典致呕剂顺铂、阿朴吗啡、硫酸铜及 X 射线全身照射, 测定致吐反应和抗呕吐药的抗呕吐反应, 最后取水貂肠管进行 5-HT 免疫组化检测。结果 顺铂($7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip)、阿朴吗啡($1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sc) 和硫酸铜($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig) 3 种致呕剂均使水貂发生恶心、干呕和呕吐, 顺铂引起水貂呕吐的阈值剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。昂丹司琼和甲氧氯普胺可抑制顺铂和阿朴吗啡所致的干呕、呕吐。5-HT 免疫组化结果提示, 肠道 EC 细胞 5-HT 释放参与呕吐的发生机制。结论 水貂可作为一种新型呕吐模型, 这对于抗呕吐机制和新药筛选研究有意义。

关键词: 呕吐; 水貂; 顺铂; 昂丹司琼; 阿朴吗啡; X 射线

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)02 - 0089 - 03

A new vomiting animal model —— mink

YUE Wang¹, ZHANG Fang¹, WANG Lei¹, FANG Xuan¹, LIU Yan-xia¹, MINAMI Masaru²

(1. Department of Pharmacology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China;

2. Department of Pharmacology, Health Sciences University of Hokkaido, Hokkaido 061 - 0239, Japan)

Abstract: **Aim** To establish a new, reliable vomiting model in minks. **Methods** Adult male minks (*Mustela vison*) were randomly divided into groups ($n = 6$). Cisplatin, apomorphine, copper sulfate and X radiation were used to establish vomiting model. Retching and vomiting were observed after the vomiting models were given anti-vomiting agents. After the behavioral experiment, assay of 5-HT in the ileum was performed by immunohistologic method. **Results** Cisplatin $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip, apomorphine $1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sc and copper sulfate $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig were shown to evoke vomiting. Retching and vomiting were significantly inhibited in ondansetron and metoclopramide pretreated minks ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** As a new vomiting model, minks may be of great value in studying vomiting mechanism and screening new antiemetic drugs.

Key words: vomit; mink; cisplatin; ondansetron; apomorphine; X radiation

癌症化疗及放疗常致强烈的恶心、呕吐, 引起电解质平衡紊乱等。呕吐还见于眩晕疾病、术后和药物中毒反应。研究呕吐机制及筛选抗呕吐药物需要与人类恶心、呕吐过程及行为相似的动物模型。雪貂(ferret, *Mustela putorius*) 是目前国际公认较理想的呕吐模型^[1], 但饲养条件较高, 来源有限。本文在国内外首次采用与雪貂同属鼬科的水貂(mink, *Mustela vison*) 制备呕吐模型, 观察经典致呕剂引起

水貂的呕吐反应, 并探讨抗呕吐药物及其作用机制。

材料与方法

动物 体重 $1.3 \sim 1.8 \text{ kg}$, δ , 健康成年黑色水貂, 由青岛市特种动物饲养中心提供。

药品与试剂 顺铂(cisplatin, 齐鲁制药厂); 盐酸昂丹司琼注射液(ondansetron hydrochloride injection, 宁波天衡制药厂); 硫酸铜(copper sulfate, 上海亨达化学制品公司); 阿朴吗啡(apomorphine, 美国 Sigma); 盐酸甲氧氯普胺注射液(metoclopramide dihydrochloride injection, 天津人民制药厂); SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

仪器 2100-C 直线加速器(美国瓦里安公司);

收稿日期: 2002-02-15.

基金项目: 国家教委出国留学人员基金资助项目(教外司留 [1995]806 号); 山东省卫生厅资助项目(1999CAI CBA3)。

* 通讯作者 Tel: 86 - 532 - 3812449, Fax: 86 - 532 - 3801449,

E-mail: faoqmc @public.qd.sd.cn

多功能显微镜(日本 Olympus BX50)。

顺铂、阿朴吗啡、硫酸铜及放射线对水貂的致呕作用 将水貂随机分为 6 组(n = 6), 每只单独置于 75 cm × 50 cm × 50 cm 铁网笼内, 24 h 昼夜循环光照, 实验前自由进食、饮水, 实验在上午 9 时开始。第 1 组给予生理盐水(NS, 5 mL·kg⁻¹, ip) 作为自身对照, 次日给予顺铂(2.5 mg·kg⁻¹, ip), 给药容积为 5 mL·kg⁻¹; 第 2 组按第 1 组方法和 ip 容积给予顺铂(5 mg·kg⁻¹, ip); 第 3 组给予雪貂阈上致呕剂量^[1,2] 顺铂(7.5 mg·kg⁻¹, ip); 第 4 组为阿朴吗啡组, NS 0.4 mL·kg⁻¹, sc 作为自身对照, 次日给予阈上致呕剂量阿朴吗啡^[1,2] 1.6 mg·kg⁻¹, sc, 给药容积为 0.4 mL·kg⁻¹; 第 5 组为硫酸铜组, NS 15 mL·kg⁻¹, ig 作为自身对照, 次日给予雪貂阈上致呕剂量硫酸铜^[1,2] 40 mg·kg⁻¹, ig, 给药容积为 15 mL·kg⁻¹; 第 6 组为 X 射线照射组, 将水貂置于有机玻璃容器内, 假性 X 射线照射, 次日接受直线加速器 6 Mev, 18 Gy 全身照射 4.5 min。

按 Minami^[2] 雪貂呕吐指标进行观察, 呕吐过程分为 3 相: 吐前, 呕吐时, 吐后。① 呕吐前伴有流涎、下颚抖动、退缩等人类呕吐前的恶心及干呕(膈肌、胸腹肌的同步性运动) 等动作。② 呕吐时头伸向前、下方, 张口、耸肩、腹部收缩, 以出现呕吐物为呕吐。③ 吐后 6 h 内水貂的反应。在实验中同时记录呕吐发生潜伏期、干呕和呕吐的次数及发生率。

昂丹司琼和甲氧氯普胺对水貂呕吐模型的作用 将 24 只水貂随机分为 4 组(n = 6), 第 1 组用阈上致呕剂量顺铂 7.5 mg·kg⁻¹ ip 作为呕吐模型对照; 第 2 组给予昂丹司琼注射液(5-HT₃ 受体拮抗剂, 抗呕吐药) 2 mg·kg⁻¹ ip, 给药容积为 1 mL·kg⁻¹, 30 min 后给予顺铂阈上致呕剂量^[2] 7.5 mg·kg⁻¹ ip; 第 3 组用阈上致呕剂量阿朴吗啡 1.6 mg·kg⁻¹ sc 作为呕吐模型对照; 第 4 组甲氧氯普胺 4 mg·kg⁻¹ ip, 给药容积为 0.8 mL·kg⁻¹, 30 min 后给予阿朴吗啡阈上致呕剂量^[2] 1.6 mg·kg⁻¹ sc。

顺铂对水貂肠管 EC 细胞 5-HT 释放的影响 分别取正常水貂, 给药后 3 h 对照 NS 组和顺铂组(7.5 mg·kg⁻¹) 的水貂(n = 3), 颈椎脱臼处死, 立即剖开腹腔, 取距幽门 20 cm 处小肠 3 cm 置于 10% 甲醛中固定, 按 SABC 试剂盒说明书用 5-HT 抗体对 EC 细胞免疫组化染色, 多功能显微镜下定性观察对照组与顺铂组 5-HT 的染色分布。

统计学处理 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验比较组间差异。

结果

1 顺铂、阿朴吗啡、硫酸铜及放射线对水貂的致呕作用

3 种经典致呕剂顺铂、阿朴吗啡及硫酸铜在给予雪貂阈上致呕剂量后, 均引起水貂呕吐反应, 其干呕和呕吐表现与 Minami^[2] 报道的雪貂表现相似(表 1), 而自身对照 NS 组 6 只水貂均无呕吐反应。在顺铂 2.5 mg·kg⁻¹ 组, 6 只水貂均无呕吐反应, 但 3 只出现流涎、舔床和下颚抖动等恶心的表现; 在顺铂 5 mg·kg⁻¹ 组, 6 只水貂中 2 只出现干呕及呕吐反应; 在顺铂 7.5 mg·kg⁻¹ 组, 6 只水貂均出现干呕及呕吐反应, 表明 5 mg·kg⁻¹ 是其致呕的阈值剂量。由此可见顺铂引起水貂呕吐反应有量效关系(表 1)。6 只水貂接受 18 Gy X 射线照射后, 5 只出现呕吐反应。

Table 1 Effects of cisplatin, apomorphine and copper sulfate on minks (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

| Group | Dose/ mg·kg ⁻¹ | Incidence of vomiting | Latency/ min | No. of retching | No. of vomiting |
|----------------|------------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| NS (ip) | - | 0/6 | - | 0 | 0 |
| Cisplatin | 2.5 | 0/6 | - | 0 | 0 |
| | 5 | 2/6 | 120 ± 26 | 76 ± 24 | 8.0 ± 2.4 |
| | 7.5 | 6/6 | 92 ± 21 | 92 ± 37 | 12 ± 3 |
| NS (sc) | - | 0/6 | - | 0 | 0 |
| Apomorphine | 1.6 | 6/6 | 39 ± 36 | 28 ± 16 | 5.3 ± 1.9 |
| NS (ig) | - | 0/6 | - | 0 | 0 |
| Copper sulfate | 40 | 6/6 | 7.0 ± 2.0 | 29 ± 9 | 8.7 ± 2.3 |

Three emetics were used on 5 group of minks and the results were observed for 6 h after giving emetics

2 昂丹司琼和甲氧氯普胺对水貂呕吐模型的作用

阈上致呕剂量顺铂 7.5 mg·kg⁻¹, 在 6 只水貂均出现干呕、呕吐, 反应多发生在给药后 60 min, 在 2 h 达到高峰, 可持续 5 h。5-HT₃ 受体拮抗剂昂丹司琼处理组, 有 1 只水貂未出现干呕和呕吐, 其余 5 只干呕、呕吐的次数及频率显著减少(与对照组比较 P < 0.05)。阈上致呕剂量阿朴吗啡 1.6 mg·kg⁻¹, 在 6 只水貂出现干呕和呕吐; 甲氧氯普胺处理组在 6 只中仅 1 只出现呕吐反应, 其余 5 只均无任何干呕、呕吐反应(与对照组比较 P < 0.01), 见表 2。

3 顺铂对水貂肠管 EC 细胞 5-HT 释放的影响

免疫组化的染色显示, 顺铂组(n = 3) 水貂肠管 EC 细胞有 5-HT 释放, 而对照组(n = 3) EC 细胞无 5-HT 释放; 在 HE 染色 × 400 倍条件下, 将对照组 EC 细胞外周 5-HT 染色深度与顺铂组进行定性比较, 前者明显大于后者, 该镜下定性观察结果与在雪貂观

察到的 5-HT 被 EC 细胞大量释放的结果相似^[3]。

Table 2 Effects of ondansetron and metoclopramide on vomiting induced by cisplatin (7.5 mg·kg⁻¹, ip) or apomorphine (1.6 mg·kg⁻¹, sc) in minks (n=6, $\bar{x} \pm s$)

| Group | Dose/ mg·kg ⁻¹ | Latency/ min | No. of retching | No. of vomiting |
|------------------------------|------------------------------|-----------------|--------------------|------------------------|
| Cisplatin | | 92 ± 21 | 92 ± 37 | 12 ± 3 |
| Cisplatin + Ondansetron | 2 | 144 ± 79 | 47 ± 41 | 5 ± 5 [#] |
| Apomorphine | | 39 ± 36 | 28 ± 16 | 5.3 ± 1.9 |
| Apomorphine + Metoclopramide | 4 | - a | 1 ± 3 [#] | 0.3 ± 0.8 [#] |

Ondansetron and metoclopramide were used on minks pretreated by cisplatin and apomorphine, the results were observed for 6 h after giving anti-vomiting agents. [#] P < 0.05 vs vehicle pretreated cisplatin group, ^{##} P < 0.01 vs vehicle pretreated apomorphine group. - a: Only one mink vomit, can not be included in statistics

讨论

已知啮齿类小鼠(除特种遗传性者外)、大鼠和豚鼠等实验动物不能诱发呕吐。曾用于呕吐研究的常用动物是家鸽、猫、狗。抗癌药诱发鸽子呕吐试验尚未见报道,家鸽易携带实验病毒感染人类,限制了其使用。猫和狗有良好的学习能力,一旦用药引起一次呕吐,即使给抗呕吐药也可引起呕吐^[4]。哺乳动物鼠猴(*Suncus murinus*)更接近人类的呕吐反应^[5],但缺乏干呕表现。目前雪貂已被公认为较理想的呕吐模型动物,其呕吐行为与人类相似^[6],具有恶心、干呕和呕吐行为特征,在国外已广泛用于呕吐研究,如 Glaxo 公司利用雪貂呕吐模型发现 5-HT₃ 受体拮抗剂昂丹司琼是一种新型抗呕吐药。但雪貂饲养困难,价格昂贵,限制了使用。

水貂和雪貂同属于鼬科,比雪貂价廉易得,受环境因素影响小,从卫生经济学角度出发,可大量人工饲养,现国内各地已有利用皮毛作为经济动物的饲养场。在国外水貂曾用作自然疫病动物模型,但作为呕吐模型在国内外未见报道。为排除性周期雌激素波动对呕吐反应的影响,本试验采用雄性水貂,使用了无机物、有机物、放射线等经典致呕剂,结果表明硫酸铜、阿朴吗啡、顺铂和 X 射线均可诱发水貂产生恶心、干呕与呕吐,除症状表现与雪貂相似,其干呕、呕吐次数也与雪貂测定的指标相近。如顺铂 7.5 mg·kg⁻¹ 所致水貂呕吐和干呕次数平均分别为

12 次和 91.5 次。而顺铂 7 mg·kg⁻¹ 所致雪貂呕吐和干呕次数平均分别为 12 次和 130 次。结果说明水貂可作为替代雪貂的可靠呕吐动物模型。已有雪貂的研究结果证明^[2],化疗药引起的呕吐与 5-HT 有密切关系。已知人体内 90% 的 5-HT 存在于肠嗜铬(EC)细胞内,顺铂等抗癌药可直接作用于消化道的 EC 细胞引起局部释放 5-HT,通过在胃肠和中枢催吐化学感受区的 5-HT₃ 受体引起呕吐^[7]。5-HT₃ 受体拮抗剂昂丹司琼能抑制顺铂引起的呕吐反应。多巴胺受体激动剂阿朴吗啡是常用致呕剂,应用甲氧氯普胺(D₂/5-HT₃ 受体拮抗剂)能拮抗其致呕作用。本文用免疫组化法测定肠道 EC 细胞释放 5-HT,其结果与在雪貂测定的结果相吻合^[7]。作者最近发现,生半夏对水貂有明显的催吐作用,而炮制半夏则有明显抗呕吐作用,说明水貂呕吐模型在中药药理与毒理研究方面也有价值。以上结果证明水貂具有类似人类的恶心、干呕和呕吐行为特征,该模型为研究呕吐发生机制、呕吐物质及射线毒理学和筛选、开发抗呕吐药提供了一种新型动物模型。

References:

- [1] Endo T, Minami M, Monama Y. Emesis-related biochemical and histopathological changes induced by cisplatin in the ferret [J]. *J Toxicol Sci*, 1990, **15**(4): 235 - 244.
- [2] Minami M, Endo T, Tamakai H. Anti-emetic effects of N-3389, a new synthesized 5-HT₃ and 5-HT₄ receptor antagonist, in ferrets [J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, **321**(4): 333 - 342.
- [3] Marty M. Chemotherapy-induced nausea and vomiting: from experimentation to experience [J]. *Bull Cancer*, 1996, **83**(12): 1014 - 1018.
- [4] Yue W, Li GR, Minami M. Trends in the research of vomit model [J]. *Shandong Med Ind* (山东医药工业), 1999, **18**(1): 32 - 34.
- [5] Ueno S, Matsuke N, Saito H. *Suncus murinus*: a new experimental model in emesis research [J]. *Life Sci*, 1987, **41**: 513 - 518.
- [6] Watson JW, Gonsalves SF, Fossa AJ. The role of the NK₁ receptor in emetic responses: the anti-emetic effects of CP-99,994 in the ferret and the dog [J]. *Br J Pharmacol*, 1995, **115**(1): 84 - 94.
- [7] Endo T, Minami M, Hirafuji M, et al. Neurochemistry and neuropharmacology of emesis—the role of serotonin [J]. *Toxicology*, 2000, **153**(1 - 3): 189 - 201.