

喂饲辐照饲料和高压饲料大鼠子代生长发育及神经反射、学习记忆功能比较

林蔚¹ 钟礼云¹ 陈冠敏^{1,2} 翁顺泰¹ 林健^{1,2}

1.福建省人兽共患病研究重点实验室（福建省疾病预防控制中心），福州 350001；2.福建医科大学公共卫生学院教学基地，福州 350004

摘要：目的 对喂饲经辐照和高压两种不同灭菌处理方法饲料的大鼠的子代的生理生长、神经反射指标和学习记忆功能进行比较研究，为实验动物饲料灭菌方法的取舍、限制提供参考依据。**方法** 试验设2个组，分别为喂饲高压蒸汽灭菌饲料组和喂饲辐照灭菌饲料组。给亲代大鼠分别喂饲高压蒸汽灭菌饲料和辐照灭菌饲料10周后，合笼交配，自然分娩产仔。每组选15窝，每窝选8只仔鼠，测试仔代大鼠生理生长指标（张耳、开眼、长毛、出牙时间）和神经反射指标（平面翻正、前肢抓力、悬崖回避、听觉警戒、负趋地性、视觉发育、空中翻正）；于6周龄时，各组选择雄性大鼠15只分别进行避暗试验和穿梭试验，测试学习记忆功能指标（避暗潜伏期、错误次数、穿梭主动回避次数、主动回避时间）。实验数据以SPSS软件统计分析。**结果** 避暗试验中，摄食辐照饲料大鼠在记忆巩固和记忆消退试验中，潜伏期 $[(150.0 \pm 62.7)s]$ 和 $[(126.6 \pm 61.8)s]$ 均长于摄食高压饲料大鼠 $[(65.9 \pm 83.9)s]$ 和 $[(56.0 \pm 53.7)s]$ ($P < 0.05$)，错误次数 $[(0.2 \pm 0.4)$ 次和 (0.5 ± 0.6) 次]均小于摄食高压饲料大鼠 $[(0.9 \pm 0.9)$ 次和 (1.4 ± 0.9) 次] ($P < 0.05$)，其余各项生理生长、神经反射指标和学习记忆功能指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 喂饲辐照饲料和高压饲料的大鼠子代生长发育及神经反射方面未见明显差异，被动记忆方面喂饲辐照饲料子代大鼠表现优于喂饲高压饲料。

关键词 辐照饲料；高压饲料；大鼠；生长发育；神经反射；学习记忆

Comparison on growth, neural reflex, learning and memory ability for the offspring rats with irradiated feed and high-pressure steam feed

Corresponding author: LIN Jian, E-mail: 18786381@qq.com

[基金项目]福建省科技计划重点项目（2013Y0084）

[作者简介]林蔚(1974-)，男，副主任技师，研究方向：毒理学，E-mail: 39235622@qq.com

[通讯作者]林健，主任技师，研究方向：毒理学，实验动物学。E-mail: 18786381@qq.com

LIN Wei*, ZHONG Li-yun, CHEN Guan-min, WENG Shun-tai LIN Jian
(*Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou, Fujian 350001, China)

[Abstract] Objective: The experiment aims to provide reference for the choice and restriction of experimental animal feed sterilization methods by comparing the physiological growth, neural reflex, learning and memory ability of the offspring for rats with high-pressure steam feed and irradiated feed. **Methods:** The experiment consisted of two groups: the group of rats fed with high pressure sterilization feed and the group of rats fed with irradiation sterilization feed. The parental rats were fed by high pressure sterilization feed and irradiation sterilization feed respectively for 10 weeks. Then the rats mated in the cage and gave birth naturally. The physiological growth index (the states of ear opening, eye opening, hair growth and tooth growth) and neural reflex (plane righting reflex test, the forelimb grip, cliff avoidance test, auditory vigilance, the negative geotaxis, visual development, and air righting reflex test) of the offspring rats were tested. At the age of 6 weeks, 15 male rats were selected to do the test of learning memory ability (dark avoidance test, shuttle test, etc). The experimental data was analyzed by the software SPSS. **Results:** In the dark avoidance test, the incubation of rats with irradiated feed ($150.0 \pm 62.7s$ and $126.6 \pm 61.8s$) was longer than that of rats with high-pressure steam feed ($65.9 \pm 83.9s$ and $56.0 \pm 53.7s$) ($P < 0.05$) at the stage of memory consolidation and memory fading. At same time, the number of errors of rats with irradiated feed (0.2 ± 0.4 and 0.5 ± 0.6) was less than that of rats with high-pressure steam feed (0.9 ± 0.9 and 1.4 ± 0.9) ($P < 0.05$). The differences of all the other indexes, i.e. physiological growth, neural reflex, learning and memory ability, were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** There is no obvious difference of the growth and neural reflex of the offspring for rats with high-pressure steam feed and irradiated feed. The offspring rats with irradiated feed have better passive memory than the rats with high-pressure steam feed.

[Keywords] irradiated feed; high-pressure steam feed; rats; growth; neural reflex; learning and memory

饲料消毒灭菌是实验室培育、喂养合格实验动物的重要手段，我国动物实验室目前对饲料的灭菌基本上采用⁶⁰Co 辐照灭菌和高压灭菌两种方法。关于两种灭菌方式对喂饲动物的影响有过不少文献报道，多集中在对生殖的影响以及饲料效价方面，罕见对大鼠生长发育及神经反射行为的研究^[1-5]，且未见在动物学习记忆方面的研究资料。本文对喂饲不同灭菌方法饲料大鼠的子代的生长发育、神经反射及主动记忆和被动记忆试验方面进行研究，从另一角度对实验动物饲料灭菌方法进行评价，为实验动物饲料灭菌方法的取舍、限制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠，雌雄各 50 只，45-55g，购自上海斯莱克实验动物股份有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（沪）2012-0002 号。动物质量合格号：2007000564861。

1.2 饲养环境 福建省疾控中心 SPF 级动物实验室，实验动物使用许可证号：SYXK（闽）2012-0008。

1.3 饲料 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司，饲料生产企业审查合格证号：沪饲审（2008）04002。

1.3.1 高压饲料 生长繁殖饲料，用前经115℃、30分钟高压灭菌。

1.3.2 辐照饲料 生长繁殖饲料，经25 kGy ⁶⁰Co辐照后使用。

1.4 仪器 电子天平、秒表、DigBehv 避暗视频分析系统、DigBehv 穿梭视频分析系统。

1.5 实验方法 将大鼠分成 2 组，每组雌雄各 25 只。1 组喂饲辐照饲料，2 组喂饲高压饲料。10 周后对动物合笼交配，产仔，每组选 15 窝，每窝选 8 只仔鼠进行生理生长、神经反射指标相关实验；另外挑选剩余的仔鼠断乳后继续分别喂饲辐照料和高压料，于 6 周龄时，选择雄性大鼠分别进行避暗试验和穿梭试验。

1.6 观察指标

1.6.1 张耳 双耳廓完全展开并直立为达标，观察各窝所有仔鼠耳廓分离时间。

1.6.2 门齿萌出 以1颗门齿长出牙床达标，观察各窝全部仔鼠出牙时间。

1.6.3 开眼 以双眼被膜处可见明显裂隙为达标，观察各窝所有仔鼠双眼均开放时间。

- 1.6.4 长毛 以仔鼠全身表面开始泛白为达标，观察各窝所有仔鼠长毛时间。
- 1.6.5 平面翻正反射实验 于仔鼠生后第1天开始，将仔鼠仰面置于一平面上，如在5秒内完全翻正即四脚着地为达标，观察各窝所有仔鼠翻正所需天数。
- 1.6.6 负趋地性反射实验 于仔鼠生后第5天开始，在一倾斜25度的底板上将仔鼠头朝下摆正，1分钟内调转头位180度为达标，观察各窝所有仔鼠达标所需天数。
- 1.6.7 断崖回避反射实验 于仔鼠生后第5天开始，将仔鼠头朝前放在悬空的平面边缘，前两爪悬空，以仔鼠在4S内向后退到前两爪完全缩回到平面上为达标，观察各窝所有仔鼠达标所需天数。
- 1.6.8 触须定位反射实验 于仔鼠生后第10天开始，捉住仔鼠尾巴，头面向竖直平面并逐渐缩短距离，以触须刚刚垂直接触平面表面时，仔鼠出现抬头，前肢向平面方向伸展为达标，观察各窝所有仔鼠达标所需天数。
- 1.6.9 听觉惊愕反射实验 于仔鼠生后第12天开始，将仔鼠单独置于一鼠笼里，待动物平静后，突然关闭鼠笼，发出啪的一声刺激仔鼠，仔鼠身体突然蜷缩为阳性反应。观察各窝所有仔鼠全部阳性所需天数。
- 1.6.10 空中翻正反射实验 于仔鼠生后第14天开始，将仔鼠背向下从30cm高处自由向垫料落下，观察仔鼠着地时体位，落下呈俯卧状态者为达标，观察各窝所有仔鼠达标所需天数。
- 1.6.11 前肢握力试验 于仔鼠生后第10天开始，将仔鼠前肢放在一固定的直径1mm铁丝横杠上，以悬挂5S为达标，观察各窝所有仔鼠全部达标所需天数。
- 1.6.12 视觉发育指标 于仔鼠生后第16天开始，抓住仔鼠尾部，头朝下，使之面部和前腿朝向一个竖直平面，逐渐缩短距离，以在触须触及平面之前用前爪抓触摸平面为阳性，观察各窝所有仔鼠全部阳性所需天数。
- 1.6.13 避暗试验 辐照饲料组和高压饲料组大鼠各选取15只。试验时将大鼠面部背向洞口放入明室内，同时启动自动记录器。动物穿过洞口进入暗室受到电击，暗室底部铺有通电的铜栅，（电流0.3mA）。记录器自动记录每鼠从放入明室至第一次进入暗室遭电击所需的时间，此即潜伏期，并记录3min内电击次数和错误动物数。第1d上午9:00开始记忆获得练习，第2上午9:00进行记忆巩固检测，第5d上午9:00进行记忆消退（记忆再现）检测。记录各鼠进入暗

室的潜伏期，3min 内的电击次数。

1.6.14 穿梭试验 辐照饲料组和高压饲料组大鼠各选取 15 只。将大鼠置于穿梭箱一小室内，安全期 5s 后给予声光刺激 10s，如果大鼠仍留在同侧，则随后再给以电刺激 5s（电流 0.3mA）。小鼠受电击从圆洞逃至对侧，则是又 5s 安全期后给予声光刺激 10s 再给以电刺激 5s。如此反复训练 3min。当有声光信号发生时，虽未产生电击，大鼠也能主动回避到对侧小室从而获得记忆。在声光刺激出现 10s 内即未电击前大鼠逃向安全区为主动回避反应，电击后才逃向安全区为被动回避反应，记录大鼠遭受声光刺激逃跑的次数(主动回避次数)、每次大鼠的主动回避时间；第 1d 训练，第 2d 测试。停止测试一周后进行记忆消退试验，方法同前。每次试验时间均在下午 14：30～18：30。

1.6 统计方法 实验数据以SPSS软件统计分析，两组比较方差齐采用成组t检验，方差不齐采用秩和检验，检验水准 $\alpha = 0.05$

2 结果

2.1 仔鼠的生长发育 见表1，2组仔鼠各项生长发育指标差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

表1 仔鼠生长发育指标（天， $\bar{x} \pm S$ ）

组别	窝数	张耳	出毛	出牙	开眼
辐照组	15	3.9±0.5	6.2±0.6	9.6±1.1	14.5±1.0
高压组	15	3.7±0.5	5.9±0.4	9.7±1.3	14.1±0.9

2.2 仔鼠的神经反射和感官功能指标 见表2，2组仔鼠神经反射和感官功能各项指标差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

表2-1 仔鼠的神经反射和感官功能指标（天， $\bar{x} \pm S$ ）

组别	窝数	平面翻正	负趋地性	断崖回避	触须定位
辐照组	15	3.6±1.8	7.4±0.9	7.5±0.6	12.1±1.2
高压组	15	3.6±1.4	6.9±1.3	7.9±0.7	11.5±1.3

表2-2 仔鼠的神经反射和感官功能指标（天， $\bar{x} \pm S$ ）

组别	窝数	听觉惊愕	空中翻正	前肢握力	视觉发育
辐照组	15	12.8±0.4	15.4±0.6	12.5±0.9	19.9±1.0
高压组	15	12.9±1.0	15.7±0.6	11.9±0.8	20.3±1.0

2.3 避暗试验 见表 3，摄食辐照饲料大鼠在记忆巩固和记忆消退试验中，潜伏期均长于摄食高压饲料大鼠（ $P<0.05$ ），错误次数小于摄食高压饲料大鼠（ $P<0.05$ ）。

表 3 大鼠子代避暗试验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	数量 (只)	体重 (g)	潜伏期 (s)			错误次数 (次)		
			记忆获得	记忆巩固	记忆消退	记忆获得	记忆巩固	记忆消退
辐照组	15	243±15	24.7±20.4	150.0±62.7	126.6±61.8	2.5±2.2	0.2±0.4	0.5±0.6
高压组	15	241±10	28.8±51.4	65.9±83.9*	56.0±53.7*	4.5±3.8	0.9±0.9*	1.4±0.9*

注：*与辐照组比较 $P<0.05$

2.4 穿梭试验 见表 4。在记忆获得及记忆消退试验中，两组主动回避次数及主动回避时间差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表 4 大鼠子代穿梭试验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	数量 (只)	体重 (g)	主动回避次数 (次)		主动回避时间 (s)	
			记忆获得	记忆消退	记忆获得	记忆消退
辐照组	15	242±13	3.40±2.40	2.00±2.10	4.51±2.64	4.77±3.00
高压组	15	244±10	3.20±1.82	1.47±1.06	4.14±1.97	4.84±3.11

3 讨论

在胚胎发育过程中，神经系统的发育是一个精密的时程化改变过程，任何一个环节发生障碍都将导致神经功能改变，所以神经系统对接受外源性因素作用较其他组织系统更为敏感。神经行为的研究更多地应用于毒理学上而不是营养学上，可以推测毒性效应对机体神经发育的影响远大于营养素多寡所产生的效应。神经行为毒理学研究方法由于它的敏感性、可定量测定外源性因素导致的发育过程表现，平面翻正、悬崖回避、空中翻正、前肢悬挂等经典的试验指标，由于具有高度的发育规律性和重复性，可较全面地反映中枢神经系统的发育情况。由于神经系统结构的复杂性及中枢神经系统有较强的代偿能力，同时各种试验机制不完全相同，譬如：听觉惊愕与注意力有很大相关，当注意力无法集中或被转移时，对声刺激的反应大大减弱^[6]。而空中翻正完成的功能机制则是海马神经环路所具有的NM DA 受体通道和LTP^[7]。所以不能用单一的行为试验来揭示某种因素对机体整个行为的影响，而必须采用一组组合行为试验^[8]。

认知行为包括学习和记忆,回避试验是最常用的试验方法,包括被动回避和主动回避。被动回避是让动物记住某一行为带来不良的后果,这样动物在以后想进行该行为时就会犹豫,避暗试验是被动回避试验最常采用的方法之一。避暗试验利用鼠类的嗜暗及钻洞的习性而设计,对记忆过程特别是对记忆再现有较高的敏感性,具有方法简便,指标明确的优点^[9]。主动回避实验则是要求动物采取某种措施以逃避惩罚,反映了动物的非陈述记忆的能力,穿梭试验是常采用的方法之一,主要用来检测动物的主动性及被动性条件刺激反应及非陈述记忆能力。避暗箱、穿梭试验都用来检测动物学习记忆能力,并据此来评价动物的高级中枢神经功能。

本课题研究的背景资料表明,采用⁶⁰Co辐照灭菌方法对饲料营养成分破坏较少^[10-11],而高压蒸汽灭菌饲料经高温消毒后,营养成分破坏较多,尤其是维生素含量下降大,一般均采用增加营养成分投料量的方式来弥补这部分的损失^[12]。但是,对于两种方法灭菌后营养成分的损失及改变的认识只能从目前科学认知水平以及可检测指标上获得,所能补充的也只是目前人类已经认知的营养素。对于人类尚未认识的营养素在高温过程中可能的破坏,无法给予补充。同时,对于灭菌后成分改变导致可能的毒性产生以及对机体伤害作用的研究很少。

本课题研究中我们分别用辐照饲料和高压灭菌饲料喂饲SD大鼠,观察其子代的仔鼠的生长发育、神经反射及感官功能方面各项指标。实验结果表明,两种灭菌饲料喂养的大鼠的子代在生长发育、神经反射各项指标差异均无显著性。说明两种饲料灭菌方式区别差别更多体现在对未知营养素的破坏上,而高温和辐照不同灭菌方式产生的毒理学效应并未在敏感的神经指标上观察到差异。

本课题研究中,在被动记忆的避暗研究中,在记忆巩固和记忆再现环节,辐照饲料组大鼠在潜伏期和避免错误上的均表现优于高压灭菌饲料组。而在检测主动记忆的穿梭试验中,两组大鼠在主动记忆的指标上未表现出差异。提示我们在进行相关试验时,需要考虑不同饲料灭菌方式对动物的生长以及实验结果的影响。本研究选择大鼠子代仔鼠的生理变化及神经行为发育指标作为观察终点,以期对动物学实验条件的选择提供正常大鼠行为基础资料。

参考文献:

- [1] 贵有军, 侯岩岩, 史深, 等. 不同方法的灭菌饲料饲喂清洁级 KM 小鼠的效价分析[J]. 地方病通报, 2010, 25(4): 41-43.
- [2] 周文江, 许兰文, 顾兆江, 等. ⁶⁰Co 辐照饲料对 KM 小鼠繁育情况的影响[J]. 上海实验动物科学, 1998, 18(1): 33-35.
- [3] 孙全文, 杜建华, 常宝. ⁶⁰Co 辐照日粮对 KM 小鼠繁育情况的影响[J]. 张家口医学院学报, 2003, 20(5): 30~321.
- [4] 施张奎, 余强, 卢立群, 等. 不同方法灭菌饲料对小鼠繁殖性能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(10): 615-616.
- [5] 张大维, 邴国强, 徐彩云, 等. 灭菌鼠全价颗粒饲料对大小鼠生长发育和繁殖性能的影响[J], 吉林农业大学学报, 2010, 32(4): 437-439.

- [6]Schickel and EJ, Blumenthal TD. The effects of caffeine and directed attention on acoustic startle habituation[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1998, 59(1): 145-150.
- [7]Wayner MJ Tracy HA, Armstrong DL, et al. Air righting: role of the NMDA receptor channel and hippocampal LTP[J]. Physiology & Behavior, 2000, 69: 505-510.
- [8]张铎, 刘毓谷. 毒理学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997. 402-422.
- [9]曾莉, 卜碧涛. 实验啮齿类动物行为学评估[J]. 神经损伤与功能重建, 2008, 3(5):352-356.
- [10]Joint FAO/IAEA/WHO Study Group. High-dose irradiation:wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. Report of a joint FAO/IAEA/WHO Study Group, 1999. 38~471.
- [11]张大维, 郝国强, 甘振威, 等. 不同灭菌方法对实验动物配合颗粒饲料营养成分的影响[J]. 饲料工业, 2012, 33(2): 40-43.
- [12]任春磊, 杨国山, 闫傲霜. ^{60}Co γ 射线辐照技术在实验动物饲料灭菌中的应用[J]. 实验动物科学, 2008, 5(4):51-54.