



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101897627 A

(43) 申请公布日 2010.12.01

(21) 申请号 201010214192.8

A61B 5/00 (2006.01)

(22) 申请日 2010.06.30

(71) 申请人 广州医学院第一附属医院

地址 510120 广东省广州市越秀区沿江西路
151 号

申请人 美国 Buxco 电子有限公司

广州呼吸疾病研究所

呼吸疾病国家重点实验室

(72) 发明人 陈莉延 约瑟夫·马克·罗麦斯克

赖克方 钟南山 蒋波

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有

限公司 44245

代理人 陈燕娴

(51) Int. Cl.

A61D 7/00 (2006.01)

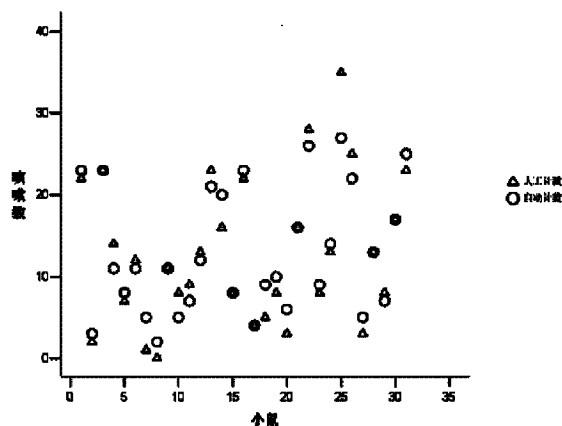
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法,包括以下操作步骤:(1) 提供雌性 Balb/c 小鼠,小鼠的年龄为 10 周龄,小鼠体重为 22 ~ 25g,动物级别为 SPF 级;(2) 提供 Buxco 无创检测系统,该 Buxco 无创密闭体描舱连接有声音监听设备和信号转化器,将上述小鼠置于体描舱内自由活动;(3) 使用辣椒素激发液雾化激发小鼠咳嗽,实时监听小鼠咳嗽声音,通过声音分析软件记录声波,并通过 Finepointe 软件将舱内气流变化转化为呼吸波形进行记录并自动实时分析。本方法同时监测小鼠咳嗽声音和呼吸波形,可大大降低工作强度,节省工作时间,提高工作效率,有利于小鼠咳嗽模型的推广和应用。



1. 一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法,其特征在于包括以下操作步骤:

(1) 提供雌性 Balb/c 小鼠,小鼠的年龄为 6 ~ 15 周龄,小鼠体重为 22 ~ 25g,动物级别为 SPF 级;

(2) 提供 Buxco 无创检测系统,该 Buxco 无创密闭体描舱连接有声音监听设备和信号转换器,将上述小鼠置于体描舱内自由活动;

(3) 使用辣椒素激发液雾化激发小鼠咳嗽,实时监听小鼠咳嗽声音,通过声音分析软件记录声波,并通过 Finepointe 软件将舱内气流变化转化为呼吸波形进行记录并自动实时分析。

2. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法,其特征在于:步骤 (1) 所述小鼠的年龄为 10 周龄。

3. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法,其特征在于:步骤 (2) 所述声音监听设备为微型麦克风。

4. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法,其特征在于:步骤 (3) 所述辣椒素激发液的浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$;所述辣椒素激发液的雾化剂量为 $1.0\text{ml}/3\text{min}$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法,其特征在于:步骤 (3) 所述声音分析软件为 cooledit 软件。

6. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法,其特征在于:步骤 (3) 所述辣椒素激发液由以下组分配制而成:辣椒素 30.5mg,吐温 80 1ml,无水乙醇 1ml,质量百分数 0.9% 的氯化钠溶液 8ml。

一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学研究领域,特别涉及一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法。

背景技术

[0002] 由于生理解剖结构微小,声音信号极为微弱,研究较少且结果不一,小鼠有无咳嗽目前在国际上还存在很大争议。印度学者和墨西哥学者将药物刺激后的小鼠用漏斗形装置罩住,将听诊器置于顶端进行小鼠声音的监测,但结果相对主观不能记录分析。我国的吴康松于 2002 年发表了小鼠咳嗽模型的建立方法,主要模仿日本的 Junzo Kamei 教授的检测方法进行,并没有特殊的改进。Kamei 教授自上世纪九十年代起开始并坚持使用小鼠咳嗽模型进行镇咳药的研究,是目前使用小鼠咳嗽模型最多的学者。他使用双腔体描舱将小鼠的头部和身体分处于相对独立的密闭舱中,小鼠处于清醒半固定状态,定量雾化辣椒素,连接呼吸波形描记仪检测胸部气流的变化,主要通过观察小鼠腹部急速抽搐运动同时合并异常呼吸波形进行咳嗽的判断。但由于没有咳嗽声音检测,因此说服力较弱。因始终未能像豚鼠一样得到声音和波形的统一,小鼠咳嗽检测至今未得到学术界的公认,小鼠咳嗽声音检测是逾越这一障碍的关键。

[0003] 豚鼠性情温和,咳嗽反射容易引出,声音响亮可直接听到,自 1955 年 Charles 监听豚鼠咳嗽声音以来,豚鼠一直是进行咳嗽反射机制及咳嗽新药研究的最常用动物。2004 年美国 Buxco 公司和诺华公司共同研发了豚鼠咳嗽自动检测软件,其人工检测和软件自动检测的符合率已达到 98% 以上,在 2005 年 ATS 大会发布后得到了广泛的认可。虽然豚鼠的咳嗽检测已十分成熟,但使用豚鼠进行实验成本较高,豚鼠体质娇嫩容易死亡,筛选药物时药物耗费大,难以进行多组及大批量研究。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的缺点和不足,本发明的目的在于提供一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法。

[0005] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法,包括以下操作步骤:

[0006] (1) 提供雌性 Balb/c 小鼠,小鼠的年龄为 6 ~ 15 周龄,小鼠体重为 22 ~ 25g,动物级别为 SPF 级;

[0007] (2) 利用 Buxco 无创检测系统,该 Buxco 无创密闭体描舱连接有声音监听设备和信号转化器,将上述小鼠置于体描舱内自由活动;

[0008] (3) 使用辣椒素激发液雾化激发小鼠咳嗽,实时监听小鼠咳嗽声音,通过声音分析软件记录声波,并通过 Finepointe 软件将舱内气流变化转化为呼吸波形进行记录并自动实时分析。

[0009] 步骤 (1) 所述小鼠的年龄优选为 10 周龄。

[0010] 步骤 (2) 所述声音监听设备为微型麦克风。

[0011] 步骤(3)所述辣椒素激发液的浓度为 $100\ \mu\text{mol/L}$;所述辣椒素激发液的雾化剂量为 $1.0\text{ml}/3\text{min}$ 。

[0012] 步骤(3)所述声音分析软件为 cooledit 软件。

[0013] 步骤(3)所述辣椒素激发液由以下组分配制而成:辣椒素 30.5mg ,吐温 801ml ,无水乙醇 1ml ,质量百分数 0.9% 的氯化钠溶液 8ml 。

[0014] 本发明与现有技术相比,仅需在监听小鼠咳嗽声音的同时观察小鼠咳嗽呼吸波形即可即时确定小鼠咳嗽,在小鼠咳嗽检测同时就能得到最终数据。具有如下优点和有益效果:

[0015] (1) 本发明利用原本用于肺功能检测的 Buxco 的无创肺功能检测系统仪器装置,来进行小鼠咳嗽的检测,这是国际首创;

[0016] (2) 直接监听小鼠咳嗽声音,并记录保存进行回放分析,从而确保咳嗽数据的客观性和准确性,为 FP 软件开发提供可靠的数据来源;

[0017] (3) 小鼠呼吸波形分析更为细致,通过 Buxco 系统 FP 软件得到的呼吸波形区分为 7 类,可更加准确地辨认性质特征;

[0018] (4) 无需观察小鼠腹部运动情况,减少主观因素对判断的影响;

[0019] (5) 无需分析声波变化,避免杂音干扰影响数据分析。

[0020] (6) 本方法可大大降低工作强度,节省工作时间,提高工作效率,有利于小鼠咳嗽模型的推广和应用。在本研究基础上与美国 Buxco 公司合作开发的 Finepointe 小鼠咳嗽检测软件具有较高的相关性和一致性,显示了良好的开发前景和应用价值。

附图说明

[0021] 图 1 为人工计数和软件计数的相关性分析图。

[0022] 图 2 为人工计数和软件计数的一致性分析图。

具体实施方式

[0023] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0024] 实施例 1

[0025] 1、实验动物及分组

[0026] SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,10 周龄,体重 $22\text{--}25\text{g}$,可以自由进食去 OVA 的饲料和三蒸水。将 40 只小鼠分为生理盐水 (normal saline, NS) 组、可待因 (codeine, CDI) 组、辣椒平 (capsazepine, CPZ) 组、辣椒素 (Capsasin, CAP) 耗竭组,每组 10 只。CDI 组和 CPZ 组小鼠在实验前 2 天及实验日均给予药物预处理,共计 3 次。CDI 组小鼠 (100mg/kg) 予可待因 0.2ml/d 灌胃,CPZ 组小鼠 (6mg/kg) 予 0.2ml/d 辣椒平腹腔注射。NS 组使用生理盐水 0.2ml/d 灌胃,实验流程同前。辣椒素耗竭组在实验前 3 天予 50mg/kg 、 100mg/kg 、 150mg/kg 辣椒素皮下注射,总剂量达到 300mg/kg 。每次用药前均使用戊巴比妥钠 (60mg/kg) 浅麻醉,氨茶碱 (25mg/kg) 腹腔注射、特布他林 (0.1mg/kg) 皮下注射以减少药物不适反应,实验当日直接行咳嗽检测。

[0027] 2、检测方法

[0028] 清醒小鼠位于 Buxco 无创体描舱中自由活动,向雾化头中加入 $100 \mu\text{mol/L}$ 辣椒素激发液(所述辣椒素激发液由以下组分配制而成:辣椒素 30.5mg,吐温 801ml,无水乙醇 1ml,质量百分数 0.9%的氯化钠溶液 8ml)1ml 雾化 3min,雾化结束后继续观察 3min,共记录 6min 内小鼠咳嗽次数。微型麦克风实时监听小鼠咳嗽声音,同时通过 cooledit 软件记录声波,必要时可回放以便重复分析。使用 Finepointe 软件记录小鼠呼吸波形,可通过呼吸波形的变化自动判断小鼠异常呼吸波形是否为咳嗽。操作者仔细观察小鼠腹部运动,如果在小鼠出现典型快速扬头张口,腹部急速抽动的同时听到清脆的咳嗽声音,立即点击热键标记为一次咳嗽。待小鼠咳嗽检测结束后再次浏览软件自动标记咳嗽波形及热键标记符号,观察声音和呼吸波形的一致性,最终判断是否咳嗽。

[0029] 3、统计学方法

[0030] 药物预处理后小鼠咳嗽次数检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS12.0 软件进行分析。多组样本均数进行单因素方差分析,方差齐性检验;软件分析和人工计数小鼠咳嗽进行相关性检验和一致性分析, $P < 0.05$ 表示差别有统计学意义。

[0031] 4、结果:

[0032] (1) 药物预处理后小鼠咳嗽次数的变化(结果见表 1)

[0033] CAP 组小鼠在用药后出现精神萎靡,食欲减退,10 只小鼠存活 8 只。其余实验组小鼠无明显不适。经辣椒素刺激后各药物预处理组小鼠与 NS 组比较咳嗽次数显著降低,进一步提示建立的小鼠咳嗽检测方法具有较高的可信性。

[0034] 表 1 使用不同药物预处理后小鼠咳嗽次数的比较

[0035]

组别	咳嗽数 (次/6min)	P (和 NS 组比较)
NS 组 (n = 10)	17 ± 5	
CDI 组 (n = 10)	$7 \pm 4^{**}$	0.000
CPZ 组 (n = 10)	$9 \pm 6^{**}$	0.005
CAP 组 (n = 8)	$4 \pm 4^{**}$	0.000

[0036] 注:与 NS 组比较, $^{**}p < 0.01$

[0037] (2) 小鼠呼吸波形的种类

[0038] Finepointe 系统检测到辣椒素刺激后小鼠出现的多种呼吸波形,结合小鼠腹部运动和声音监听结果,判断相关波形为:

[0039] 平静呼吸波形:波形频率和呼吸深度均一,多于初期小鼠适应舱内环境后及辣椒素雾化完毕小鼠恢复平静时出现。

[0040] 急促呼吸波形：呼吸频率增加，呼吸幅度增加。多于小鼠刚刚进入密闭舱尚未熟悉环境时、辣椒素刺激过程及恢复阶段中，活动明显增多。

[0041] 屏气波形：呼吸频率减慢，呼吸幅度明显减弱。多于辣椒素刺激后，小鼠主动性减慢呼吸以减少辣椒素的吸入，蜷缩于密封舱内，活动减少。

[0042] 典型咳嗽波形：振幅高大，波形较宽，类似心电图波形。此时小鼠出现快速扬头张嘴，腹部急速抽动，可听到清脆响亮的咳嗽声音。

[0043] 不典型咳嗽波形：波形与典型咳嗽波形相似，只是波形幅度较低，此时小鼠同样出现快速扬头张嘴，腹部急速抽动，可听到清脆响亮的咳嗽声音。

[0044] 深吸气波形：波形前宽后窄，与咳嗽波形明显不同，容易区分。此时亦有快速扬头张嘴，腹部急速抽动表现，但未听到咳嗽声音。

[0045] 甩头波形：呈倒 V 形。可听到清晰类似吹风的甩头声，音域稍低，时程稍长。此时小鼠有明显用力左右甩头动作。

[0046] (3) 人工监听与 Finepointe 软件自动记录小鼠咳嗽次数的相关性和一致性分析（见图 1 和图 2）。

[0047] 小鼠咳嗽人工计数和 Finepointe 软件计数的相关系数 $r = 0.964$, $p = 0.000$ ，按 $\alpha = 0.05$ 检验水准， r 有统计学意义。人工计数和软件计数呈正相关一致性分析提示 $ICC = 0.956$ ， ICC 的 95% 可信区间为 (0.911, 0.978)。其他误差占总误差的 4.4% (1-ICC)。软件计数与人工计数比较误差较小，精密度较高，信度较好。

[0048] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

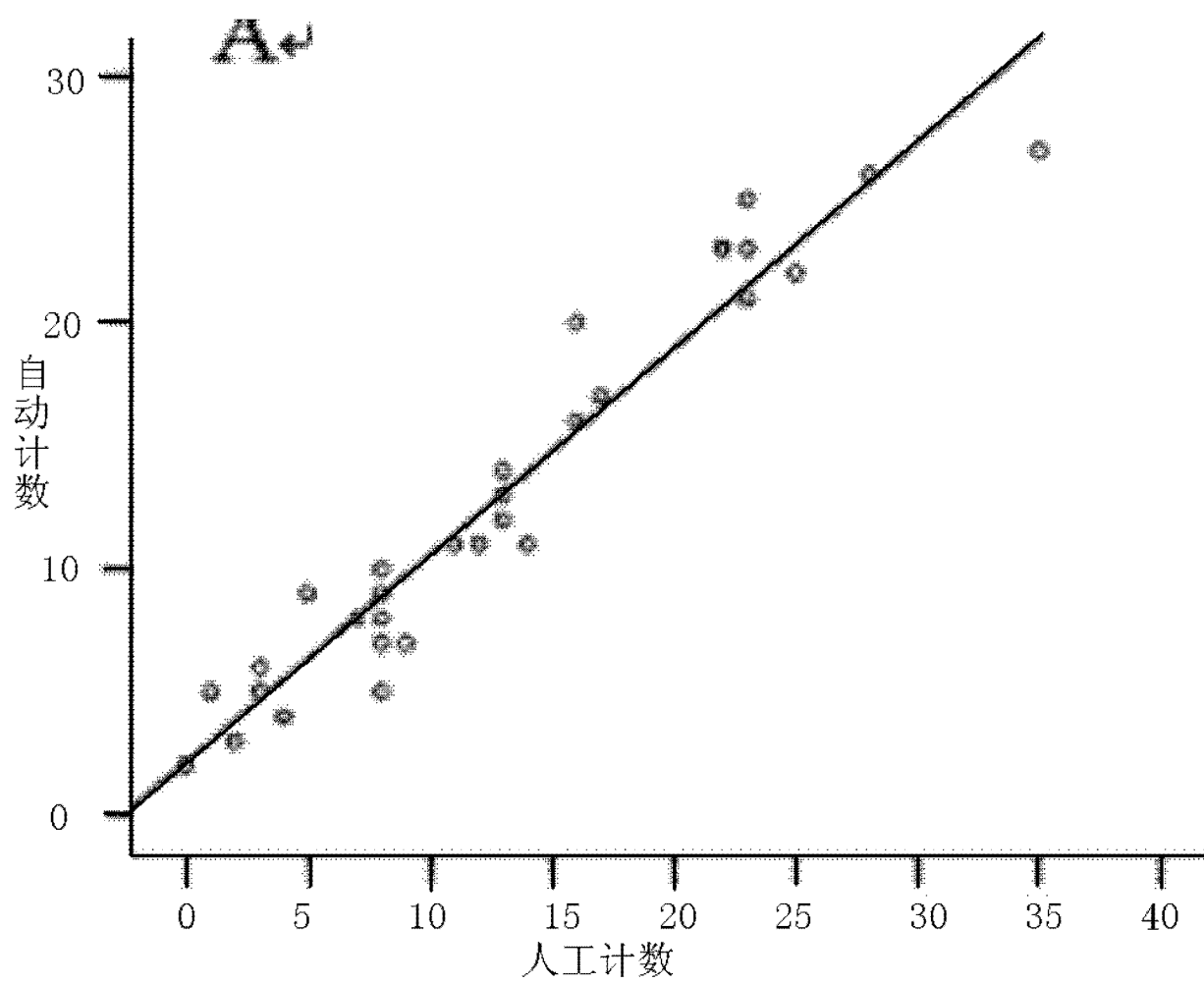


图 1

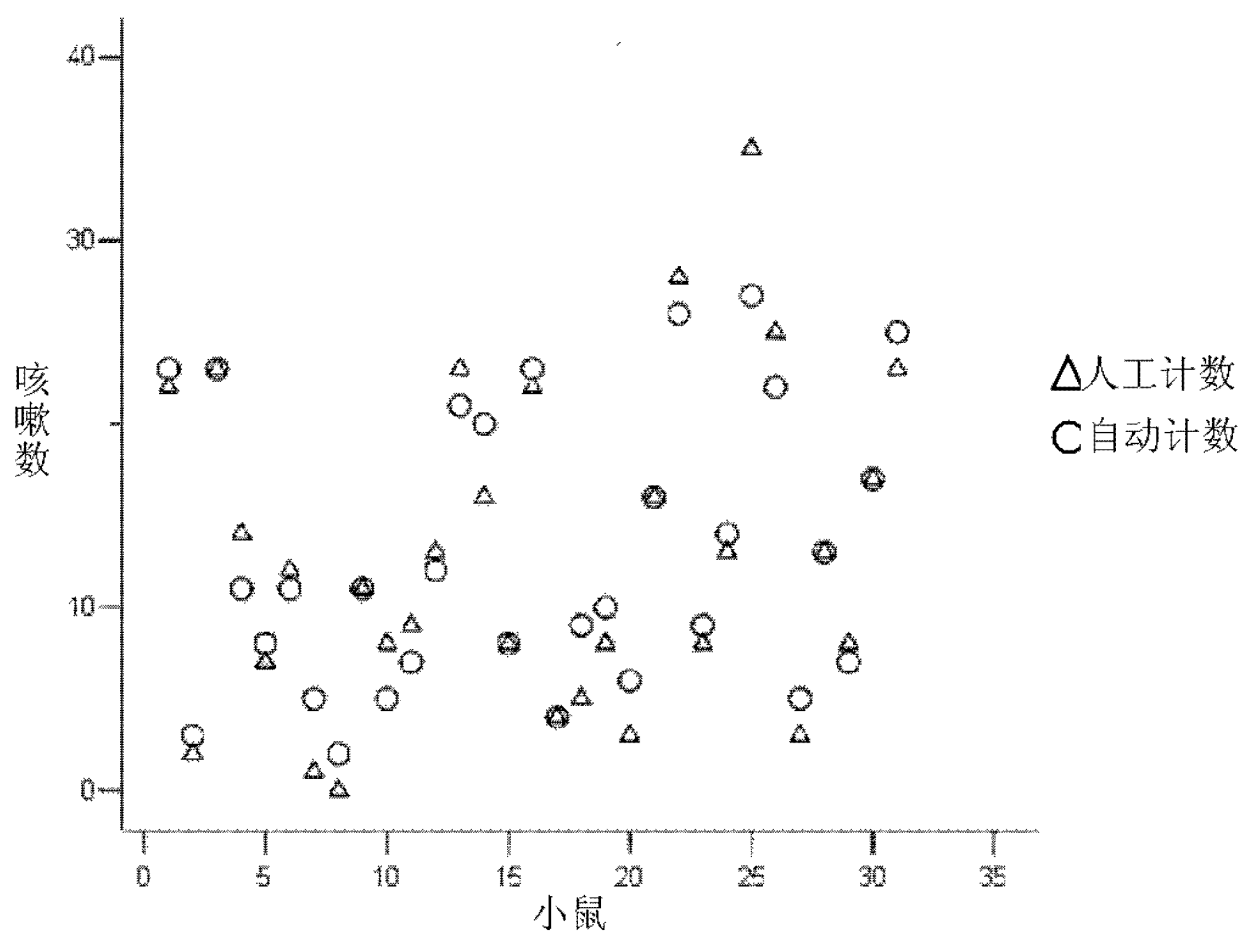


图 2

专利名称(译)	一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法		
公开(公告)号	CN101897627A	公开(公告)日	2010-12-01
申请号	CN201010214192.8	申请日	2010-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	广州医科大学附属第一医院		
申请(专利权)人(译)	广州医学院第一附属医院 广州呼吸疾病研究所 呼吸疾病国家重点实验室		
当前申请(专利权)人(译)	广州医学院第一附属医院 广州呼吸疾病研究所 呼吸疾病国家重点实验室		
[标]发明人	陈莉延 约瑟夫·马克·罗麦斯克 赖克方 钟南山 蒋波		
发明人	陈莉延 约瑟夫·马克·罗麦斯克 赖克方 钟南山 蒋波		
IPC分类号	A61D7/00 A61B5/00		
其他公开文献	CN101897627B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种小鼠咳嗽模型的建立和检测方法，包括以下操作步骤：(1)提供雌性Balb/c小鼠，小鼠的年龄为10周龄，小鼠体重为22~25g，动物级别为SPF级；(2)提供Buxco无创检测系统，该Buxco无创密闭体描舱连接有声音监听设备和信号转化器，将上述小鼠置于体描舱内自由活动；(3)使用辣椒素激发液雾化激发小鼠咳嗽，实时监听小鼠咳嗽声音，通过声音分析软件记录声波，并通过Finepointe软件将舱内气流变化转化为呼吸波形进行记录并自动实时分析。本方法同时监测小鼠咳嗽声音和呼吸波形，可大大降低工作强度，节省工作时间，提高工作效率，有利于小鼠咳嗽模型的推广和应用。

