

## 论著

## 不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究

宋雁<sup>1,2</sup>, 贾旭东<sup>1</sup>, 崔文明<sup>1</sup>, 张倩男<sup>1</sup>, 李永宁<sup>1</sup>, 雍凌<sup>1</sup>, 李宁<sup>1</sup>

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;

2. 中国疾病预防控制中心, 北京 100050)

**摘要:**目的 比较4种不同剂量和不同方式给予环磷酰胺诱导正常小鼠免疫抑制的4种方法, 选择合适的免疫抑制动物模型以评价受试物的免疫毒性。方法 选择雌性BALB/c小鼠, 设1个对照组(每日灌胃蒸馏水)和4个环磷酰胺组(灌胃组每天40 mg/kg BW; 腹腔注射1组每天40 mg/kg BW; 腹腔注射2组, 先连续注射3 d, 后每周注射一次, 注射剂量为80 mg/kg BW; 腹腔注射3组, 试验结束前24 h一次性注射200 mg/kg BW), 试验周期为30 d。观察不同剂量及不同途径给予环磷酰胺后对小鼠免疫病理学、体液免疫、细胞免疫、非特异性免疫等各项免疫指标的影响。结果 4个环磷酰胺组的小鼠免疫器官重量、外周血白细胞计数及其淋巴细胞百分比、血清免疫球蛋白水平、外周血B淋巴细胞百分比、脾空斑形成细胞数、24 h小鼠足跖厚度变化、脾T淋巴细胞和B淋巴细胞增殖能力较对照组均有不同程度下降, 全血中性粒细胞百分比均高于对照组。环磷酰胺灌胃组和注射1组可刺激全血NK细胞百分比较对照组明显升高, 而注射2组和3组的Th细胞百分比和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值均高于对照组, 其差异分别具有统计学意义( $P < 0.05$ )。此外, 环磷酰胺灌胃组和注射1组还可引起动物体重下降、肝脏相对重量降低、血清谷丙转氨酶、血糖、甘油三酯的改变。对于试验所测定的大部分指标, 注射2组和注射3组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 环磷酰胺的4种给予方式均可诱导动物免疫抑制, 但于试验结束前24 h一次性腹腔注射200 mg/kg BW环磷酰胺为最合适的免疫抑制动物模型造模方法。

**关键词:** 环磷酰胺; 免疫抑制; 免疫病理学; 体液免疫; 细胞免疫; 非特异性免疫; 小鼠

中图分类号: R155; Q503 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)03-0218-08

### Comparison research of immunosuppression models induced by different ways and doses of cyclophosphamide in mice

Song Yan, Jia Xudong, Cui Wenming, Zhang Qiannan, Li Yongning, Yong Ling, Li Ning

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To compare four methods for developing immune-suppressed mouse models induced by cyclophosphamide (CP) with different doses and ways, and choose the appropriate animal model of immunosuppression to evaluate the immunotoxicity of a substance. **Methods** The female BALB/c mice were assigned to five groups; the control group with distilled water daily gavage; CP gavage group with 40 mg/kg BW/d by gavage; CP ip-1 group with 40 mg/kg BW/d by intraperitoneally injection (ip); CP ip-2 group with 80 mg/kg BW/d in the first three days by ip and once a week in the following period; CP ip-3 group with 200 mg/kg BW 24 h before the end point by ip. The study lasted for 30 days. **Results** The immune organ weights, the number of leucocyte and the percentage of lymphocytes in peripheral blood, IgA and IgG levels in serum, the percentage of B cells in peripheral blood, the plaque forming cells in spleen, 24 h footpad thickness change, LPS- and ConA-induced splenocyte proliferation in four cyclophosphamide groups were significantly lower than those in control group ( $P < 0.05$ ). The percentages of neutrophils in peripheral blood in four cyclophosphamide groups were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). However, the percentage of NK cells in peripheral blood in CP gavage group and CP ip-1 group were significantly higher than that in control group, and the percentage of Th cells and the ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup> in CP ip-2 group and CP ip-3 group were higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). In addition, the body weight and liver relative weight in CP gavage group and CP ip-1 group were lower than those in control group, the levels of alanine aminotransferase, glucose and triglyceride changed significantly ( $P < 0.05$ ). There was no

收稿日期: 2013-02-17

基金项目: 社会公益项目(200903054-06); 转基因重大专项(2012BAK01B00)

作者简介: 宋雁 女 博士生 研究方向为卫生毒理学 E-mail: songyan3000@sina.com

通信作者: 李宁 女 研究员 研究方向为卫生毒理学 E-mail: lining\_65@163.com

significant difference between CP ip-2 group and CP ip-3 group except the body weight and haematology parameters such as mean corpuscular hemoglobin concentration and red blood cell distribution width ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The four ways of CP administration could induce immunosuppression in BALB/c mice, however the appropriate animal model of immunosuppression may be established by intraperitoneal injection of 200 mg/kg BW CP 24 h before the end point.

**Key words:** Cyclophosphamide; immunosuppression; immunopathology; humoral immunity; cell-mediated immunity; non-specific immunity; mice

免疫系统由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成,在机体中承担着抗感染、抗肿瘤等重要作用。在某些情况下,免疫系统是容易受到攻击的靶器官,在其他器官系统尚未观察到毒性作用时,免疫系统可能已经受到损害,如免疫病理学改变、细胞免疫异常、体液免疫异常、特异性免疫改变或宿主抵抗力下降等。因此,免疫系统的效应变化是某些危害的毒理学安全性评价中较为敏感的指标。目前,许多国家和国际权威机构已建立了适合于本国的免疫毒性检测方案,因此在我国建立快速、灵敏的免疫毒理学安全评价的检测方法非常必要<sup>[1-4]</sup>。环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是一种细胞毒性化疗药物,同时属于烷化剂类免疫抑制剂,可破坏DNA结构,阻断复制,从而导致细胞死亡。因环磷酰胺具有较强的免疫抑制作用,故在免疫毒理学中是制备免疫抑制模型的常用阳性物<sup>[2,5]</sup>。本研究旨在对环磷酰胺4种不同给予方法和剂量对正常小鼠的免疫病理学、细胞免疫、体液免疫和非特异性免疫等指标的影响进行对比,从而建立合适的免疫毒性动物模型,并为我国免疫毒性评价方法的建立提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物及饲养

选用SPF级雌性BALB/c小鼠,体重18~22 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2009-0007],饲养于中国疾病预防控制中心营养与食品安全所南纬路动物房[许可证号:SYXK(京)2008-0017]。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

CO<sub>2</sub>恒温培养箱、酶联免疫检测仪、流式细胞仪、生物显微镜。

环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司)。绵羊红细胞(北京兰伯瑞生物技术有限责任公司),FITC标记的抗小鼠CD3抗体、APC标记的抗小鼠CD19抗体、PE标记的抗小鼠CD49抗体、APC标记的抗小鼠CD4抗体、PE标记的抗小鼠CD8抗体、红细胞裂解液、小鼠CBA细胞因子试剂盒(均来自BD公司),小鼠免疫球蛋白ELISA试剂盒(GenWay公

司)等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试验分组

分为7个免疫组,每个免疫组设5个试验组,即1个对照组(每日灌胃蒸馏水)和4个环磷酰胺组(分别为环磷酰胺灌胃组,每日灌胃剂量为40 mg/kg BW;环磷酰胺腹腔注射1组,每日注射剂量为40 mg/kg BW;环磷酰胺腹腔注射2组,先连续注射3 d,后每周注射一次,注射剂量为80 mg/kg BW;环磷酰胺腹腔注射3组,试验结束前24 h一次性注射剂量为200 mg/kg BW)。动物经适应性饲养3 d后按体重随机分组,每组10只动物,按组分笼饲养,自由进食和饮水。试验周期为30 d。

#### 1.2.2 测定指标

动物喂养30 d后测定各项指标。免疫I组:血液学、体重和脏器重量的测定;免疫II组:血清免疫球蛋白、对有丝分裂原LPS的反应、对有丝分裂原ConA的反应、NK细胞活性测定;免疫III组:脾空斑形成细胞试验;免疫IV组:血生化、全血免疫细胞表型分析、NK细胞活性测定;免疫V组:血清溶血素的测定;免疫VI组:迟发型变态反应;免疫VII组:巨噬细胞功能测定。

##### 1.2.2.1 一般毒性指标和免疫病理学指标

小鼠体重及脏器系数:每周称取2次动物体重,以调整灌胃量,并记录试验结束时动物体重。眼眶内眦静脉放血处死动物后,迅速取脏器并称重。称取肝脏、肾脏、脾脏、胸腺和淋巴结(包括颈部淋巴结、腋下淋巴结和肠系膜淋巴结)重量,并计算其脏体比。

血液学指标:动物处死前眼眶内眦静脉取血,EDTA-K<sup>2</sup>抗凝血,测定白细胞计数(WBC)、淋巴细胞(LYM)及其百分比、单核细胞(MON)及其百分比、中性粒细胞(NEUT)及其百分比、嗜酸性粒细胞(EOS)及其百分比、嗜碱性粒细胞(BAS)及其百分比、红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞压积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞宽度(RDW)、血小板(PLT)、凝血酶原消耗试验(PCT)、平均血小板压积(MPV)、血小板宽度(PDW)。

血生化指标:动物处死前眼眶内眦静脉取血,4 000 r/min离心 10 min,分离血清。测定谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、碱性磷酸酶(ALP)、血糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、钙(Ca)、钾(K)、钠(Na)。

外周血淋巴细胞表型分析:动物处死前眼眶内眦静脉取血,EDTA-K<sup>2</sup>抗凝,每只设定2支流式试管进行测定,每管加入50 μl抗凝血。在2管中分别加入CD3/CD19/CD49和CD3/CD4/CD8不同荧光素标记的单克隆小鼠抗体。轻轻混匀,室温下避光保存20 min。每管加入2 ml FACS红细胞裂解液,漩涡混匀,室温下避光保存20 min。1 200 r/min离心5 min,弃去上清液。每管再加入2 ml PBS,1 200 r/min离心5 min,弃去上清液。加入0.5 ml PBS混匀后上流式细胞仪检测细胞,Cellquest软件获取分析细胞,每个检测获取10 000个细胞。

#### 1.2.2.2 体液免疫

血清免疫球蛋白测定:按试剂盒提供的ELISA法测定血清IgG、IgM和IgA水平,向酶标板内加入阴性对照、标准品或经稀释的待测血清样品100 μl,做复孔。酶标板加上覆膜,水平放置,室温孵育60 min。弃去液体,甩干,用洗涤液洗涤4次,甩干。每孔加酶标抗体100 μl,加上覆膜,室温避光孵育30 min。弃去液体,甩干,用洗涤液洗涤4次,甩干。每孔加TMB底物溶液100 μl,室温避光孵育10 min。依序每孔加终止溶液100 μl,终止反应。用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度值(OD值)。

抗体生成细胞数检测和HC<sub>50</sub>值测定:参照《保健食品检验与评价技术规范》(2003版)<sup>[6]</sup>测定。

#### 1.2.2.3 细胞免疫

刀豆蛋白A(ConA)诱导脾T淋巴细胞增殖和脂多糖(LPS)诱导B脾淋巴细胞增殖试验:无菌取脾,置于盛有Hank's液的平皿中,用4层纱布将脾磨碎,制成单细胞悬液,移入带盖的无菌试管中,用Hank's液洗2次,每次1 000 r/min离心10 min,然后将细胞悬浮于1 ml完全培养液,计数细胞,调整细胞浓度为3 × 10<sup>6</sup>个/ml。将每份脾细胞悬液平行3孔加入24孔培养板,每孔1 ml。1孔加75 μl ConA液(100 μg/ml),1孔加75 μl LPS液(400 μg/ml),另1孔作对照。置37℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养72 h。培养结束前4 h,每孔轻轻吸去上清液0.7 ml,加入0.7 ml不含小牛血清的RPMI 1640培养液,同时加入MTT(5 mg/ml)50 μl/孔,继续培养4 h。培养结束后,每孔加入1 ml酸性异丙醇,吹打混匀。然后分装到96孔培养板中,每个孔作3个平行孔,用酶标仪在

570 nm波长处测定各孔的OD值<sup>[6]</sup>。

迟发型变态反应(足跖增厚法):小鼠用2%(V/V)SRBC腹腔注射免疫,每只小鼠注射0.2 ml。免疫后4 d,用游标卡尺测量左后足跖部厚度,然后在测量部位皮内注射20%(V/V)SRBC 20 μl。注射后24 h再次测量左后足跖部厚度,每只动物测量3次,取平均值。以攻击前后足跖厚度的差值来表示DTH的程度<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.2.4 非特异性免疫

巨噬细胞功能测定(小鼠碳廓清试验):小鼠尾静脉注入稀释的墨汁(10 ml/kg BW)后2和10 min,分别从小鼠内眦静脉丛取血20 μl,并立即将其加到2 ml 0.1%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液中。用酶标仪在600 nm波长处测定OD值。处死小鼠,取肝脏与脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,称重。以吞噬指数表示小鼠碳廓清的能力,吞噬指数计算方法: $k = (\lg OD_1 - \lg OD_2) / (t_2 - t_1)$ ,OD<sub>1</sub>为t<sub>1</sub>时的OD值,OD<sub>2</sub>为t<sub>2</sub>的OD值,吞噬指数<sup>[6]</sup> $a = \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重}) \times k^{1/3}$ 。

NK细胞活性试验:制备效应细胞:小鼠脾细胞用RPMI 1640完全培养液调整浓度为2 × 10<sup>7</sup>个/ml。靶细胞传代:试验前24 h将YAC细胞进行传代培养,应用前以Hank's液洗2次,用RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度为4 × 10<sup>5</sup>个/ml。效应细胞和靶细胞之比为50:1。反应孔加靶细胞和效应细胞各100 μl于U形96孔板,靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各100 μl,靶细胞最大释放孔加靶细胞和2.5% Triton溶液各100 μl,每样做3个平行孔。37℃、5% CO<sub>2</sub>培养4 h。培养结束后,1 500 r/min离心5 min,每孔吸取上清100 μl置于平底96孔板中,同时加入LDH基底液100 μl,室温避光反应3 min后,每孔加入50 μl 1 mol/L的HCl溶液终止反应。用酶标仪在490 nm波长处测定各孔的OD值。用下列公式计算:NK细胞活性(%) = (反应孔OD值 - 靶细胞自然释放孔OD值) / (最大释放孔OD值 - 靶细胞自然释放孔OD值) × 100%<sup>[6]</sup>。

#### 1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对试验数据进行单因素方差分析或非参数检验。

## 2 结果

### 2.1 一般毒性指标和免疫病理学指标

#### 2.1.1 对小鼠体重及脏器系数的影响

由表1可见,第1、2、3、4周,环磷酰胺灌胃组、注射1组和注射2组动物体重均出现不同程度下降,虽然注射2组在第1周体重下降最为明显,并且

表1 环磷酰胺对小鼠每周体重的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of CP on weekly body weight in mice

组别	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周
对照组	19.7 ± 0.7	19.2 ± 0.8 <sup>b,c,d</sup>	20.2 ± 1.0 <sup>b,c,d</sup>	20.0 ± 1.2 <sup>b,c,d</sup>	20.0 ± 1.3 <sup>b,c</sup>
环磷酰胺灌胃组	19.8 ± 1.4	16.6 ± 1.4 <sup>a,d,e</sup>	17.8 ± 1.6 <sup>a,e</sup>	17.6 ± 1.3 <sup>a,e</sup>	18.1 ± 1.6 <sup>a,e</sup>
环磷酰胺注射1组	19.8 ± 0.9	16.9 ± 1.8 <sup>a,d,e</sup>	18.0 ± 1.5 <sup>a,e</sup>	17.3 ± 1.5 <sup>a,e</sup>	17.7 ± 1.7 <sup>a,e</sup>
环磷酰胺注射2组	19.2 ± 1.0	15.1 ± 2.1 <sup>a,b,c,e</sup>	17.6 ± 1.7 <sup>a,e</sup>	17.6 ± 1.4 <sup>a,e</sup>	18.8 ± 1.4
环磷酰胺注射3组	19.4 ± 1.3	19.6 ± 1.1 <sup>b,c,d</sup>	19.8 ± 0.9 <sup>b,c,d</sup>	20.1 ± 1.2 <sup>b,c,d</sup>	20.0 ± 1.0 <sup>b,c</sup>

注:a表示与对照组比较, $P < 0.05$ ;b表示与环磷酰胺灌胃组比较, $P < 0.05$ ;c表示与环磷酰胺注射1组比较, $P < 0.05$ ;d表示与环磷酰胺注射2组比较, $P < 0.05$ ;e表示与注环磷酰胺射3组比较, $P < 0.05$ 。

较灌胃组和注射1组差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),但其第4周体重较对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而注射3组在试验周期内体重变化较对照组差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ ),并且均高于其他给药组。

由表2-1和2-2可见,终体重:灌胃组和注射1组动物终体重下降最为明显,较对照组、注射2组和注射3组差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。肝脏:灌胃组和注射1组的肝脏相对重量与对照组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且注射1组的肝脏相对重量最大。肾脏:注射1组的肾脏绝对重量明显下降,与对照组、注射2组和注射3组比较均

具有统计学意义( $P < 0.05$ )。灌胃组的肾脏相对重量最大,较对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。脾脏:4个给药组的脾脏绝对重量均低于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),注射2组和注射3组的脾脏相对重量与对照组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且注射3组的两项指标均最低。胸腺:4个给药组的胸腺绝对和相对重量与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),灌胃组和注射1组胸腺的绝对和相对重量较低。淋巴结:除注射3组淋巴结绝对重量较对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )外,其他各组之间绝对和相对重量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表2-1 环磷酰胺对小鼠终体重和主要器官重量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2-1 Effects of CP on final body weight and organ weights in mice

组别	终体重(g)	肝脏		肾脏	
		绝对重量(g)	相对重量(%)	绝对重量(g)	相对重量(%)
对照组	18.5 ± 0.9 <sup>b,c</sup>	0.719 ± 0.064	3.886 ± 0.262 <sup>b,c</sup>	0.222 ± 0.014 <sup>c</sup>	1.201 ± 0.076 <sup>b</sup>
环磷酰胺灌胃组	16.0 ± 1.6 <sup>a,d,e</sup>	0.705 ± 0.090	4.414 ± 0.311 <sup>a</sup>	0.207 ± 0.015	1.304 ± 0.653 <sup>a</sup>
环磷酰胺注射1组	15.2 ± 0.8 <sup>a,d,e</sup>	0.740 ± 0.150	4.910 ± 1.121 <sup>a,d,e</sup>	0.193 ± 0.015 <sup>a,d,e</sup>	1.277 ± 0.107
环磷酰胺注射2组	17.5 ± 1.2 <sup>b,c</sup>	0.750 ± 0.055	4.292 ± 0.403 <sup>c</sup>	0.216 ± 0.213 <sup>c</sup>	1.240 ± 0.166
环磷酰胺注射3组	17.6 ± 0.9 <sup>b,c</sup>	0.708 ± 0.427	4.036 ± 0.215 <sup>c</sup>	0.216 ± 0.015 <sup>c</sup>	1.228 ± 0.074

注:a表示与对照组比较, $P < 0.05$ ;b表示与环磷酰胺灌胃组比较, $P < 0.05$ ;c表示与环磷酰胺注射1组比较, $P < 0.05$ ;d表示与环磷酰胺注射2组比较, $P < 0.05$ ;e表示与注环磷酰胺射3组比较, $P < 0.05$ 。

表2-2 环磷酰胺对小鼠终体重和主要器官重量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2-2 Effects of CP on final body weight and organ weights in mice

组别	脾脏		胸腺		淋巴结	
	绝对重量(g)	相对重量(%)	绝对重量(g)	相对重量(%)	绝对重量(g)	相对重量(%)
对照组	0.071 ± 0.017 <sup>b,c,d,e</sup>	0.382 ± 0.084 <sup>d,e</sup>	0.034 ± 0.010 <sup>b,c,d,e</sup>	0.181 ± 0.057 <sup>b,c,d,e</sup>	0.009 ± 0.004 <sup>c</sup>	0.049 ± 0.023
环磷酰胺灌胃组	0.048 ± 0.012 <sup>a,e</sup>	0.304 ± 0.074 <sup>e</sup>	0.008 ± 0.003 <sup>a,d,e</sup>	0.053 ± 0.015 <sup>a,d,e</sup>	0.007 ± 0.005	0.045 ± 0.029
环磷酰胺注射1组	0.047 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.307 ± 0.108 <sup>e</sup>	0.009 ± 0.005 <sup>a,d,e</sup>	0.058 ± 0.038 <sup>a,d,e</sup>	0.006 ± 0.003	0.042 ± 0.017
环磷酰胺注射2组	0.047 ± 0.022 <sup>a</sup>	0.271 ± 0.137 <sup>a</sup>	0.020 ± 0.006 <sup>a,b,c</sup>	0.111 ± 0.032 <sup>a,b,c</sup>	0.006 ± 0.003	0.035 ± 0.016
环磷酰胺注射3组	0.034 ± 0.006 <sup>a,b</sup>	0.191 ± 0.031 <sup>a,b,c</sup>	0.021 ± 0.007 <sup>a,b,c</sup>	0.118 ± 0.041 <sup>a,b,c</sup>	0.005 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.030 ± 0.016

注:a表示与对照组比较, $P < 0.05$ ;b表示与环磷酰胺灌胃组比较, $P < 0.05$ ;c表示与环磷酰胺注射1组比较, $P < 0.05$ ;d表示与环磷酰胺注射2组比较, $P < 0.05$ ;e表示与注环磷酰胺射3组比较, $P < 0.05$ 。

2.1.2 对血液学指标的影响

由表3-1、3-2和3-3可见,4个环磷酰胺给予组动物的WBC、LYM百分比、NEUT百分比较对照组差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中,灌胃组的WBC最低,注射3组的LYM百分比最高而NEUT百分比最低。灌胃组、注射1组和注射2组

的BAS百分比、MCHC和RDW水平较对照组差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。注射1组PLT水平明显升高,而LYM百分比降低较明显,与对照组比较差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.1.3 对血生化指标的影响

由表4-1和4-2可见,环磷酰胺注射1组动物血

表 3-1 环磷酰胺对小鼠血液学指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3-1 Effects of CP on haematology parameters in mice

组别	WBC ( $\times 10^9/L$ )	RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	HGB (g/L)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)
对照组	7.45 ± 1.81 <sup>b,c,d,e</sup>	9.67 ± 1.18	155.9 ± 18.5	45.9 ± 5.5	47.5 ± 0.7	16.1 ± 0.3	339.8 ± 7.8 <sup>b,c,d</sup>
环磷酰胺灌胃组	2.75 ± 0.80 <sup>a,d</sup>	9.60 ± 1.63	170.7 ± 29.4	47.2 ± 7.7	49.2 ± 1.0	17.8 ± 0.9	361.2 ± 15.3 <sup>a,d,e</sup>
环磷酰胺注射 1 组	3.14 ± 1.16 <sup>a</sup>	10.18 ± 1.50	175.1 ± 23.1	49.3 ± 7.2	48.5 ± 1.4	17.3 ± 0.7	356.1 ± 9.5 <sup>a</sup>
环磷酰胺注射 2 组	4.48 ± 2.26 <sup>a,b</sup>	10.05 ± 1.15	169.0 ± 20.2	48.2 ± 5.8	48.0 ± 1.3	16.9 ± 0.9	350.4 ± 11.8 <sup>a,b</sup>
环磷酰胺注射 3 组	3.81 ± 1.98 <sup>a</sup>	10.70 ± 2.11	176.3 ± 37.3	50.7 ± 9.9	47.5 ± 0.9	16.4 ± 0.4	346.3 ± 10.8 <sup>b</sup>

注: a 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与环磷酰胺灌胃组比较,  $P < 0.05$ ; c 表示与环磷酰胺注射 1 组比较,  $P < 0.05$ ; d 表示与环磷酰胺注射 2 组比较,  $P < 0.05$ ; e 表示与注环磷酰胺注射 3 组比较,  $P < 0.05$ 。

表 3-2 环磷酰胺对小鼠血液学指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3-2 Effects of CP on haematology parameters in mice

组别	RDW (%)	PLT ( $\times 10^9/L$ )	PCT (%)	MPV (fL)	PDW (%)
对照组	13.34 ± 0.33 <sup>b,c,d</sup>	713.8 ± 89.0 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.03	2.47 ± 0.39 <sup>e</sup>	17.78 ± 0.72
环磷酰胺灌胃组	15.28 ± 0.81 <sup>a,d,e</sup>	758.5 ± 211.0	0.20 ± 0.07	2.58 ± 0.45	17.27 ± 0.86
环磷酰胺注射 1 组	14.79 ± 0.86 <sup>a,e</sup>	803.9 ± 164.3 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.06	2.75 ± 0.46	17.44 ± 0.63
环磷酰胺注射 2 组	14.25 ± 0.90 <sup>a,b</sup>	792.2 ± 248.7	0.21 ± 0.04	2.67 ± 0.46	17.39 ± 0.67
环磷酰胺注射 3 组	13.63 ± 0.39 <sup>b,c</sup>	687.4 ± 105.8	0.20 ± 0.05	2.88 ± 0.36 <sup>a</sup>	17.69 ± 0.85

注: a 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与环磷酰胺灌胃组比较,  $P < 0.05$ ; c 表示与环磷酰胺注射 1 组比较,  $P < 0.05$ ; d 表示与环磷酰胺注射 2 组比较,  $P < 0.05$ ; e 表示与注环磷酰胺注射 3 组比较,  $P < 0.05$ 。

表 3-3 环磷酰胺对小鼠血液学指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3-3 Effects of CP on haematology parameters in mice

组别	LYM		MON		NEUT	
	( $\times 10^9/L$ )	(%)	( $\times 10^9/L$ )	(%)	( $\times 10^9/L$ )	(%)
对照组	5.40 ± 1.18 <sup>b,c,d,e</sup>	72.77 ± 8.18 <sup>b,c,d,e</sup>	0.30 ± 0.22 <sup>c,d,e</sup>	4.37 ± 4.53	1.74 ± 1.09	22.12 ± 8.62 <sup>b,c,d,e</sup>
环磷酰胺灌胃组	1.14 ± 0.28 <sup>a,e</sup>	43.99 ± 13.02 <sup>a,e</sup>	0.20 ± 0.07 <sup>e</sup>	7.75 ± 3.48 <sup>d,e</sup>	1.41 ± 0.76 <sup>d</sup>	48.11 ± 15.19 <sup>a</sup>
环磷酰胺注射 1 组	0.87 ± 0.40 <sup>a,e</sup>	32.20 ± 16.47 <sup>a,e</sup>	0.18 ± 0.10 <sup>a</sup>	7.26 ± 4.34 <sup>d,e</sup>	1.62 ± 1.19	50.26 ± 22.85 <sup>a</sup>
环磷酰胺注射 2 组	2.05 ± 2.07 <sup>a</sup>	41.51 ± 15.39 <sup>a,e</sup>	0.14 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.41 ± 2.28 <sup>b,c</sup>	2.28 ± 0.78 <sup>b,e</sup>	54.72 ± 13.82 <sup>a,e</sup>
环磷酰胺注射 3 组	2.41 ± 1.81 <sup>a,b,e</sup>	58.02 ± 18.18 <sup>a,b,c,d</sup>	0.08 ± 0.12 <sup>a,b</sup>	2.98 ± 4.51 <sup>b,c</sup>	1.32 ± 0.59 <sup>d</sup>	38.28 ± 19.15 <sup>a,d</sup>

  

组别	EOS		BAS	
	( $\times 10^9/L$ )	(%)	( $\times 10^9/L$ )	(%)
对照组	0.01 ± 0.03	0.35 ± 0.43	0.00 ± 0.00	0.39 ± 0.19 <sup>b,c,d</sup>
环磷酰胺灌胃组	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.12 <sup>a</sup>
环磷酰胺注射 1 组	0.47 ± 1.45	10.19 ± 31.56	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.10 <sup>a,d,e</sup>
环磷酰胺注射 2 组	0.01 ± 0.03	0.20 ± 0.24	0.00 ± 0.00	0.16 ± 0.19 <sup>a,c</sup>
环磷酰胺注射 3 组	0.00 ± 0.00	0.42 ± 0.16	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.40 <sup>c</sup>

注: a 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与环磷酰胺灌胃组比较,  $P < 0.05$ ; c 表示与环磷酰胺注射 1 组比较,  $P < 0.05$ ; d 表示与环磷酰胺注射 2 组比较,  $P < 0.05$ ; e 表示与注环磷酰胺注射 3 组比较,  $P < 0.05$ 。

清 ALT 水平升高最明显, 较对照组差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 并且其 GLU 水平也高于对照组和其他 3 个给药组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。灌胃组、注射 1 组和注射 2 组动物血清 TP、ALB 水平

较低, 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但注射 3 组的两项指标较对照组均无明显变化。灌胃组和注射 1 组血清 TG 水平低于对照组、注射 2 组和注射 3 组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 4-1 环磷酰胺对小鼠血生化指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 4-1 Effects of CP on clinical chemistry parameters in mice

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	ALP (U/L)	GLU (mmol/L)
对照组	27.0 ± 3.9 <sup>c</sup>	148.6 ± 29.0	65.66 ± 5.27 <sup>b,c,d</sup>	39.11 ± 1.75 <sup>b,c,d</sup>	110.7 ± 15.2	2.49 ± 1.13 <sup>c</sup>
环磷酰胺灌胃组	31.9 ± 13.9	151.1 ± 38.1	55.88 ± 4.28 <sup>a,e</sup>	35.72 ± 1.93 <sup>a,e</sup>	98.8 ± 18.3	2.35 ± 1.31 <sup>c</sup>
环磷酰胺注射 1 组	37.6 ± 15.8 <sup>a,d</sup>	163.4 ± 39.4	55.58 ± 5.71 <sup>a,e</sup>	34.81 ± 2.38 <sup>a,e</sup>	97.9 ± 23.8	1.37 ± 0.57 <sup>a,b,d,e</sup>
环磷酰胺注射 2 组	25.9 ± 7.3 <sup>c</sup>	155.7 ± 49.8	57.26 ± 5.54 <sup>a,c</sup>	36.64 ± 2.38 <sup>a</sup>	104.6 ± 20.3	2.45 ± 0.99 <sup>c</sup>
环磷酰胺注射 3 组	33.7 ± 10.7	165.4 ± 31.2	65.62 ± 3.49 <sup>b,c,d</sup>	38.33 ± 1.67 <sup>b,c</sup>	114.6 ± 10.8	2.60 ± 1.03 <sup>c</sup>

注: a 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与环磷酰胺灌胃组比较,  $P < 0.05$ ; c 表示与环磷酰胺注射 1 组比较,  $P < 0.05$ ; d 表示与环磷酰胺注射 2 组比较,  $P < 0.05$ ; e 表示与注环磷酰胺注射 3 组比较,  $P < 0.05$ 。

表 4-2 环磷酰胺对小鼠血生化指标的影响( $\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$ )  
Table 4-2 Effects of CP on clinical chemistry parameters in mice

组别	BUN	CRE	CHO	TG	Na	K	Ca
对照组	8.64 ± 1.32	52.50 ± 12.79	2.06 ± 0.27	1.10 ± 0.24 <sup>b,c</sup>	129.1 ± 7.2	6.9 ± 1.5	1.4 ± 0.1
环磷酰胺灌胃组	9.88 ± 2.75	51.46 ± 15.35	2.30 ± 0.33	0.74 ± 0.43 <sup>a,d,e</sup>	135.4 ± 16.2	6.3 ± 0.7	1.3 ± 0.1
环磷酰胺注射 1 组	9.05 ± 1.07	42.24 ± 5.81 <sup>d,e</sup>	2.23 ± 0.54	0.67 ± 0.20 <sup>a,d,e</sup>	128.4 ± 13.1	6.5 ± 0.5	1.3 ± 0.1
环磷酰胺注射 2 组	9.62 ± 2.11	59.89 ± 17.34 <sup>c</sup>	2.05 ± 0.25	1.03 ± 0.11 <sup>b,c</sup>	129.9 ± 13.2	6.3 ± 0.9	1.3 ± 0.1
环磷酰胺注射 3 组	8.78 ± 1.13	56.47 ± 15.69 <sup>c</sup>	2.20 ± 0.24	1.14 ± 0.20 <sup>b,c</sup>	135.4 ± 16.5	6.5 ± 0.3	1.4 ± 0.1

注:a 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与环磷酰胺灌胃组比较,  $P < 0.05$ ; c 表示与环磷酰胺注射 1 组比较,  $P < 0.05$ ; d 表示与环磷酰胺注射 2 组比较,  $P < 0.05$ ; e 表示与注环磷酰胺射 3 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.1.4 小鼠外周血淋巴细胞表型分析结果

由表 5 可见,与对照组相比,4 个环磷酰胺给予组小鼠外周血 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>)、NK 细胞(CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup>)、Th 细胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)和 Ts 细胞(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)百分比均不同程度升高;而外周血 B 淋巴细胞(CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)百分比有所下降,且较对照组差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中,注射 2 组和

注射 3 组的外周血 T 淋巴细胞、Th 细胞百分比,以及灌胃组和注射 1 组的 NK 细胞百分比升高较明显,与其他试验组比较差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );除注射 3 组外,其他 3 个给药组 Ts 细胞百分比较对照组差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。注射 2 组和注射 3 组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值与对照组比较明显升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 5 环磷酰胺对外周血淋巴细胞分型的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 5 Effects of CP on phenotypic analysis of peripheral blood lymphocytes in mice

组别	CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> (%)	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> (%)	CD3 <sup>-</sup> CD49 <sup>+</sup> (%)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%)	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
对照组	59.5 ± 8.6 <sup>b,d,e</sup>	35.1 ± 8.7 <sup>b,c,d,e</sup>	4.1 ± 1.0 <sup>b,c</sup>	49.7 ± 8.6 <sup>d,e</sup>	9.8 ± 1.0 <sup>b,c,d</sup>	5.1 ± 1.0 <sup>d,e</sup>
环磷酰胺灌胃组	69.9 ± 16.0 <sup>a,d,e</sup>	0.1 ± 0.3 <sup>a,e</sup>	24.6 ± 15.5 <sup>a,d,e</sup>	58.5 ± 14.2 <sup>d,e</sup>	11.4 ± 3.4 <sup>a</sup>	5.4 ± 1.6 <sup>c</sup>
环磷酰胺注射 1 组	66.4 ± 15.5 <sup>d,e</sup>	2.7 ± 4.6 <sup>a</sup>	23.4 ± 15.7 <sup>a,d,e</sup>	53.6 ± 15.6 <sup>d,e</sup>	12.8 ± 0.9 <sup>a,e</sup>	4.2 ± 1.2 <sup>d,e</sup>
环磷酰胺注射 2 组	86.1 ± 10.0 <sup>a,b,c</sup>	2.9 ± 2.9 <sup>a</sup>	6.3 ± 3.7 <sup>b,c</sup>	74.2 ± 9.6 <sup>a,b,c</sup>	11.9 ± 2.3 <sup>a,e</sup>	6.4 ± 1.3 <sup>a,c</sup>
环磷酰胺注射 3 组	84.6 ± 7.9 <sup>a,b,c</sup>	7.5 ± 8.4 <sup>a,b</sup>	5.4 ± 2.9 <sup>b,c</sup>	74.2 ± 8.8 <sup>a,b,c</sup>	10.4 ± 1.9 <sup>c,d</sup>	7.5 ± 2.1 <sup>a,b,c</sup>

注:a 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与环磷酰胺灌胃组比较,  $P < 0.05$ ; c 表示与环磷酰胺注射 1 组比较,  $P < 0.05$ ; d 表示与环磷酰胺注射 2 组比较,  $P < 0.05$ ; e 表示与注环磷酰胺射 3 组比较,  $P < 0.05$ 。

## 2.2 体液免疫

### 2.2.1 血清免疫球蛋白测定

由表 6 可见,4 个环磷酰胺给予组小鼠血浆免疫球蛋白 IgA、IgG 和 IgM 水平均低于对照组,只有

注射 3 组的 IgM 水平外较对照组差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。并且灌胃组、注射 1 组和注射 2 组的 IgM 水平,以及 4 个给药组的 IgA 水平均低于最低检测限。

表 6 环磷酰胺对小鼠血清免疫球蛋白的影响( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$ )  
Table 6 Effects of CP on serum immunoglobulin quantification in mice

组别	IgA	IgG	IgM
对照组	12.1 ± 7.04 <sup>b,c,d,e</sup>	2 251.5 ± 712.0 <sup>b,c,d,e</sup>	170.4 ± 77.4 <sup>b,c,d</sup>
环磷酰胺灌胃组	- <sup>a</sup>	836.0 ± 76.0 <sup>a</sup>	- <sup>a,e</sup>
环磷酰胺注射 1 组	- <sup>a</sup>	923.5 ± 82.5 <sup>a</sup>	- <sup>a,e</sup>
环磷酰胺注射 2 组	- <sup>a</sup>	811.0 ± 140.0 <sup>a</sup>	- <sup>a,e</sup>
环磷酰胺注射 3 组	- <sup>a</sup>	1 246.5 ± 533.0 <sup>a</sup>	124.3 ± 51.8 <sup>b,c,d</sup>

注:“-”表示低于最低检测限;a 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与环磷酰胺灌胃组比较,  $P < 0.05$ ; c 表示与环磷酰胺注射 1 组比较,  $P < 0.05$ ; d 表示与环磷酰胺注射 2 组比较,  $P < 0.05$ ; e 表示与注环磷酰胺射 3 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.2.2 抗体生成细胞数检测和 HC<sub>50</sub> 值测定

由表 7 可见,4 个环磷酰胺给予组小鼠脾空斑形成细胞数均低于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),尤以灌胃组和注射 1 组下降最为明显。4 个给药组小鼠血清半数溶血值(HC<sub>50</sub>)与对照组比较差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。

分裂原 ConA 对脾 T 细胞和 LPS 对脾 B 细胞的增殖能力较对照组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),尤以注射 2 组 T 细胞的增殖能力最低。而 4 个给药组的小鼠 24 h 足跖厚度增加值均高于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),但 4 个给药组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 2.3 细胞免疫

由表 7 可见,4 个环磷酰胺给予组小鼠脾有丝

### 2.4 非特异性免疫

由表 7 可见,4 个环磷酰胺给予组的小鼠巨噬

表7 环磷酰胺对小鼠免疫功能指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 7 Effects of CP on immune function parameters in mice

组别	脾空斑形成细胞数 (/10 <sup>6</sup> 脾细胞)	HC <sub>50</sub>	ConA 诱导脾细胞 增殖能力	LPS 诱导脾细胞 增殖能力	24 h 足跖增厚 (mm)	NK 细胞活性	巨噬细胞 吞噬指数
对照组	30.0 ± 18.9 <sup>b,c,d,e</sup>	256.0 ± 64.6	0.72 ± 0.14 <sup>b,c,d,e</sup>	0.38 ± 0.18 <sup>b,c,d,e</sup>	0.073 ± 0.048 <sup>b,c,d,e</sup>	28.54 ± 34.16 <sup>d</sup>	5.28 ± 3.49
环磷酰胺灌胃组	3.2 ± 3.7 <sup>a,e</sup>	258.5 ± 48.7	0.38 ± 0.41 <sup>a,d</sup>	0.11 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.004 ± 0.020 <sup>a</sup>	22.13 ± 20.16	4.77 ± 1.15
环磷酰胺注射1组	3.6 ± 6.4 <sup>a,e</sup>	226.1 ± 28.1	0.33 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.004 ± 0.034 <sup>a</sup>	18.49 ± 13.92	5.92 ± 0.68
环磷酰胺注射2组	7.3 ± 6.9 <sup>a</sup>	237.0 ± 54.4	0.17 ± 0.27 <sup>a,b</sup>	0.09 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.024 <sup>a</sup>	4.39 ± 7.73 <sup>a</sup>	4.19 ± 1.99
环磷酰胺注射3组	15.2 ± 8.4 <sup>a,b,c</sup>	227.8 ± 48.8	0.21 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.019 ± 0.033 <sup>a</sup>	13.08 ± 36.40	5.62 ± 4.43

注:a表示与对照组比较, $P < 0.05$ ;b表示与环磷酰胺灌胃组比较, $P < 0.05$ ;c表示与环磷酰胺注射1组比较, $P < 0.05$ ;d表示与环磷酰胺注射2组比较, $P < 0.05$ ;e表示与环磷酰胺注射3组比较, $P < 0.05$ 。

细胞吞噬指数与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而4个给药组小鼠NK细胞活性均低于对照组,尤以注射2组下降最为明显,与对照组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

目前在免疫毒理学中常用的阳性物有环磷酰胺、氢化可的松、地塞米松、环孢菌素A、放线菌素、长春新碱等<sup>[3,4]</sup>。已有研究表明,环磷酰胺能抑制动物的体液免疫应答和细胞免疫应答,可造成动物的免疫抑制<sup>[7-10]</sup>。因此,在许多国家和国际机构如美国EPA的免疫毒理学指南中均推荐环磷酰胺作为免疫毒性的阳性物。本研究结果表明,本试验条件下所设4个环磷酰胺给予组均可引起小鼠免疫器官重量、白细胞计数及其淋巴细胞百分比、血清免疫球蛋白水平、外周血B淋巴细胞百分比、脾空斑形成细胞数、脾T淋巴细胞和B淋巴细胞增殖能力下降,以及全血中性粒细胞百分比和迟发型变态反应升高。由此可见,环磷酰胺具有较为突出的免疫抑制作用,选择其作为阳性物是适宜的。

本研究中淋巴细胞亚型分析结果显示,4种环磷酰胺建模方法均可使B淋巴细胞百分比降低,而T淋巴细胞、Th细胞和Ts细胞百分比升高。但不同之处在于,变化的程度不同,且长期低剂量给予环磷酰胺(灌胃组和注射1组)可刺激NK细胞百分比升高,而大量少次给予环磷酰胺(注射2组和注射3组)更能使T淋巴细胞和Th细胞百分比、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值升高,而对NK细胞百分比未见影响。提示环磷酰胺作为一种应激原引起了淋巴细胞亚群稳定性的改变,且不同剂量和给予方式对不同亚类T细胞的敏感性不同,低剂量长期给予对Ts细胞较敏感,而高剂量少次给予对Th细胞较敏感。这与其他研究报道的结果相一致<sup>[11-13]</sup>。而且血液学检测和免疫功能试验进一步验证了环磷酰胺可降低全血淋巴细胞数及百分比,NK细胞活性以及T淋巴细胞和B淋巴细胞的增殖能力也可被抑制,因此认为环磷酰胺对小鼠淋巴细胞确有毒性作用。

本研究结果提示,环磷酰胺4种建模方法均可引起血清免疫球蛋白IgA、IgG、IgM水平下降,尤以IgA、IgG下降明显。而且环磷酰胺灌胃组、注射1组和注射2组因给予环磷酰胺时间较早且多次给予,可造成血清总蛋白、球蛋白以及白蛋白/球蛋白值明显降低。并且,4种建模方法均可引起脾空斑形成细胞数减少,但降低程度不同,长期低剂量给予环磷酰胺效果更为明显。血清免疫球蛋白和脾抗体的结果一致性较好,均提示环磷酰胺对小鼠的体液免疫具有抑制作用。但血清半数溶血值的结果并未显示血清抗体水平与对照组有差异,由此可见该试验的敏感性较差。

如前所述,环磷酰胺4种不同建模方法均可造成动物免疫抑制。但通过对4种建模方法进行比较,经灌胃或腹腔注射低剂量多次给予(灌胃组和注射1组)除免疫功能抑制较深外,还可引起动物体重下降、肝脏相对体重降低、血生化指标(谷丙转氨酶、血糖、甘油三酯)的改变。而且,在GB 15193—2003《食品安全性毒理学评价程序和方法》<sup>[14]</sup>中的骨髓细胞微核试验、哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验、小鼠精子畸形试验、小鼠塞丸染色体畸变试验、显性致死试验、TK基因突变试验也采用环磷酰胺40 mg/kg BW经口或腹腔注射建立阳性模型。因此,就建立免疫抑制模型而言,环磷酰胺40 mg/kg BW经口或腹腔注射30 d的建模方法特异性较差。环磷酰胺一次较大剂量给予后每周强化和一次性大剂量给予这两种建模方法在免疫病理学指标、细胞免疫、体液免疫和非特异性免疫的多数指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但前者可引起动物体重降低、血液学指标MCHC和RDW的异常,而后者不仅能有效降低免疫功能,且操作更为简便、造模周期短、对动物损伤小、模型特异性较好。故本研究推荐使用试验结束前24 h一次大剂量腹腔给予200 mg/kg BW环磷酰胺的造模方法,本模型适用于对食品及其相关产品、食品添加剂、新资源食品、食品污染物和农药等的免疫毒性评价。