



杨斐, 副研究员, 硕士研究生导师, 长期从事实验动物学科研、教学和管理工 作。现 任 复 旦 大 学 国 家 级 基 础 医 学 实 验 教 学 中 心 医 学 实 验 动 物 学 教 学 团 队 负 责 人, 兼 任 上 海 市 实 验 动 物 标 准 化 技 术 委 员 会 副 主 任 委 员、《实 验 动 物 与 比 较 医 学》杂 志 编 委, 历 任 上 海 市 实 验 动 物 学 会 副 理 事 长、中 国 实 验 动 物 学 会 理 事。复 旦 大 学 实 验 动 物 学 专 业 硕 士 研 究 生 毕 业 后, 曾 作 为 高 级 访 问 学 者 赴 美 国 杜 克 大 学、新 加 坡 国 立 大 学、欧 洲 实 验 小 鼠 资 源 库 (EMMA)、Charles River Laboratory 欧 洲 分 部 等 国 际 专 业 机 构 进 修。主 持 实 验 动 物 学、比 较 医 学 等 省 部 级 及 以 上 科 技 项 目 15 项, 获 得 发 明 专 利 6 项, 主 编 国 家 及 行 业 规 划 教 材 4 部, 在 核 心 期 刊 发 表 学 术 论 文 30 余 篇, 获 得 软 件 著 作 权 5 项。荣 获 2015 年 第 27 届 上 海 市 优 秀 发 明 选 拔 赛 优 秀 发 明 奖、2015 年 度 “复 旦-复 星”上 海 医 学 院 优 秀 教 师 奖。

环境丰富对英国短毛猫应激相关指标的改善作用

陈鸿婷¹, 杨斐², 胡樱²

(1. 复旦大学实验动物科学部, 上海 200032; 2. 复旦大学基础医学院, 上海 200032)

[摘要] **目的** 研究环境丰富对实验用英国短毛猫应激反应的缓解作用。**方法** 将14只实验用英国短毛猫按有无环境丰富干预措施随机分为福利组和对照组, 每组7只, 实验共持续11周。测定并分析比较各组实验猫的血液生理生化指标、神经内分泌指标、免疫学指标, 评价不同组别的应激水平。**结果** 福利组的平均红细胞体积明显小于对照组 ($P < 0.05$), 淋巴细胞百分比极明显大于对照组 ($P < 0.01$), 中性粒细胞百分比极明显小于对照组 ($P < 0.01$)。另外, 福利组的尿素、肌酐、球蛋白和总蛋白水平均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 肾上腺素、多巴胺两项指标也明显低于对照组 ($P < 0.05$), 而Ⅱ型干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IFN- γ /IL-4 比值、IL-2/IL-4 比值、IFN- γ /IL-5 比值和 IL-2/IL-5 比值均高于对照组; 其中 IFN- γ 、IL-2、IFN- γ /IL-5 比值和 IL-2/IL-5 比值差异明显 ($P < 0.05$), IL-5 差异极明显 ($P < 0.01$)。**结论** 采取环境丰富的干预措施能够有效提高实验猫的福利水平, 缓解应激反应。

[关键词] 实验动物福利; 环境丰富; 应激; 英国短毛猫

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0152-07

Improving Effect of Environmental Enrichment on Stress-related Indicators of British-shorthair Cats

CHEN Hongting¹, YANG Fei², HU Ying²

(1. Department of Laboratory Animal Science, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: YANG Fei, E-mail: yfdwbfd@fudan.edu.cn

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of environmental enrichment on alleviating stress in laboratory British-shorthair cats. **Methods** A total of fourteen laboratory British-shorthair cats were randomly divided into welfare group ($n = 7$) and control group ($n = 7$) according to the presence of environmental enrichment interventions which lasted for 11 weeks. The hematological and blood biochemical, neuroendocrine and immunological parameters of each group were measured and compared to evaluate the stress level of different groups. **Results** The mean corpuscular volume in the welfare group

[基金项目] 上海市科技发展基金创新行动计划项目: 实验用猫生物学特性研究(19140900200)

[作者简介] 陈鸿婷(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: hongtingchen1989@163.com

[通信作者] 杨斐(1968—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: yfdwbfd@fudan.edu.cn

was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), the percentage of lymphocyte was extremely higher than that in the control group ($P < 0.01$), and the neutrophilic percentage was extremely lower than that in the control group ($P < 0.01$). In addition, the levels of carbamide, creatinine, globulin, total protein in the welfare group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$); the adrenaline and dopamine indicators in the welfare group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), while interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ /IL-4 ratio, IL-2/IL-4 ratio, IFN- γ /IL-5 ratio and IL-2/IL-5 ratio of the welfare group were higher than those of control group; among them, IFN- γ , IL-2, IFN- γ /IL-5 ratio and IL-2/IL-5 ratio were significantly different ($P < 0.05$), and IL-5 difference was extremely significant ($P < 0.01$). **Conclusion** The environmental enrichment interventions can effectively improve the welfare level of laboratory cats and reduce the biological costs of stress.

[Key words] Laboratory animal welfare; Environmental enrichment; Stress; British-shorthair cats

猫在解剖学、生理学以及对疾病的反应方面与人类相似,因此被广泛应用于生理学、毒理学、免疫学及神经科学等实验研究^[1]。随着实验猫使用范围的不断扩大,公众对生物医学研究中实验猫的饲养管理等问题也越来越重视,尤其在一些欧美国家相关研究日益增多^[2-3]。目前,国内人工饲养实验猫多采用单一的普通笼养的饲养方式^[4],虽然此方法经济实用、便于管理,但是长期笼养会限制猫的天性和自然行为表达,从而导致严重的健康问题,最终影响动物实验结果的可靠性、科学性。因此,本研究从美国引进遗传特征稳定并具有代表性的英国短毛猫原种,在实验室饲养环境下封闭繁殖育种,并根据英国短毛猫的生物特性及感官体验设计相应的环境丰富(environmental enrichment)措施,分别对单一笼养饲养环境和福利化饲养环境下实验用英国短毛猫的血浆学、神经内分泌及免疫学进行比较分析,探索环境丰富对实验用英国短毛猫健康状况的影响,从而帮助研究者认识到提高与改善实验猫福利水平的重要性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养环境

从美国引进的英国短毛猫原种在复旦大学实验动物科学部[SYXK(沪)2020-0032]普通级实验室环境下封闭繁殖饲养,育成后随机选取14只2周岁左右的普通级实验用英国短毛猫。其中雌性9只,体质量约2.5~2.8 kg;雄性5只,体质量约3.8 kg。实验室采用自然通风和照明,室温控制在18~26℃,相对湿度为40%~70%。每只实验猫单笼饲养,笼具规格为82 cm×70 cm×76 cm;每个饲养笼内放置单独的食盆、水碗、砂盆,笼底置有清洁托盘,笼内另有规格为65 cm×30 cm×35 cm的栖息处。整个实验流程获

得复旦大学实验动物伦理委员会审核批准(伦理审批号:202106052Z)。

1.2 动物饲料及饲喂方法

按照定时定量的原则饲喂室内成猫全价粮(法国皇家宠物食品有限公司产品, Royal Canin I27),每日上午8:15定时饲喂,按照各猫体质量定量饲喂。饮用水为煮沸消毒冷却的自来水,每日上午8:40和下午16:00更换两次,24 h持续供应。

1.3 主要仪器与试剂

ProCyte Dx 自动化血细胞分析仪和Catalyst Dx 生化分析仪为美国IDEXX Laboratories公司产品;InnoScan 300 Microarray Scanner 荧光扫描仪为法国Innopsys公司产品;Thermo Scientific Wellwash Versa 芯片洗板机为美国Thermo Fisher Scientific公司产品。

肾上腺素、去甲肾上腺素、皮质醇、多巴胺检测用ELISA试剂盒,以及Quantibody® Feline Cytokine Array 1蛋白芯片试剂盒(含Cy3-链霉亲和素小管和检测抗体混合物小管)均为美国RayBiotech公司产品。

1.4 实验分组及干预措施

14只实验用英国短毛猫随机分为有环境丰富干预的福利组及未干预的对照组。其中,福利组实验猫雌性4只(平均2.8 kg),雄性3只(平均3.8 kg);对照组实验猫雌性5只(平均2.5 kg),雄性2只(平均3.8 kg)。福利组的环境丰富干预方式包括:(1)笼内环境丰富,即每个笼内右侧放置隐藏纸箱(30 cm×30 cm×25 cm)及猫抓板各1个;(2)笼外环境丰富,即笼外活动区域放置有猫抓板、爬架、乒乓球等玩具,并设置高处空间栖息处,且实验台紧贴窗户,可供猫观察到窗外环境,给予感官刺激;(3)社交环境丰富,即实验者每日与每只实验猫个体交流、爱抚、互动10 min,并利用激光笔、钓鱼竿和实验猫群体互动30

min, 此外每日实验猫群体笼外自由活动 60 min, 以促进其个体相互之间的社会性交往(雌猫与雄猫群体分开活动)。对照组实验猫除每日实验者为其检查个体状况及护理外(每只 5 min), 均待在各自笼内, 无以上环境丰富措施。对照组和福利组实验猫虽然在同一饲养间内, 但是两组间相互隔离, 互不接触, 以尽可能减轻对照组的额外压力和影响。实验总时间为 11 周(77 d)。

1.5 血液标本采集与处理

整个环境丰富干预实验结束当日, 在实验猫清醒状态下, 经股静脉采集全血 2 mL。取其中 0.5 mL 全血经 EDTA-K2 抗凝后, 于 2 h 内测定血液生理学指标。另取 0.5 mL 全血经肝素抗凝后, 于 2 h 内测定血液生化指标。最后 1 mL 全血经 EDTA-K2 抗凝后, 于 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清于 -80 °C 冻存, 待用于神经内分泌和免疫学指标的测定。

1.6 血液学指标测定

使用 IDEXX ProCyt Dx 自动化血细胞分析仪测定 21 项血液学相关指标: 白细胞数、淋巴细胞数、单核细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数、嗜碱性粒细胞数、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比、中性粒细胞百分比、嗜酸性粒细胞百分比、嗜碱性粒细胞百分比、红细胞比容、红细胞数、血红蛋白含量、网织红细胞数、平均红细胞体积、红细胞平均血红蛋白浓度、红细胞平均血红蛋白含量、血小板数量、平均血小板体积、血小板比积。

1.7 血液生化指标测定

使用 IDEXX Catalyst Dx 生化分析仪测定 12 项血液生化指标: 白蛋白、碱性磷酸酶、丙氨酸转氨酶、尿素、钙、胆固醇、肌酐、球蛋白、葡萄糖、磷、总胆红素和总蛋白的含量。

1.8 神经内分泌指标测定

采用 ELISA 法测定 4 项神经内分泌指标: 肾上腺素、去甲肾上腺素、皮质醇、多巴胺水平, 按试剂盒说明书操作。

1.9 免疫学指标测定

采用蛋白芯片技术测定 5 项细胞因子: II 型干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5 水平。按蛋白芯片试剂盒说明书严格操作: 首先将蛋白芯片取出, 在室温平衡 20~30 min 后打开, 放在室温干燥 1~2 h; 同时从 -80 °C 冰箱取出备用血清样本, 放置于室温使其融

解; 然后向蛋白芯片上的每个孔中加 100 μ L 样品稀释液, 室温摇床上孵育 1 h, 封闭定量抗体芯片; 抽去每个孔中的样品稀释液, 添加 100 μ L 的标准液和样品到孔中, 在摇床上 4 °C 孵育过夜, 使用 Thermo Scientific Wellwash Versa 芯片洗板机清洗玻片; 离心检测抗体混合物小管, 加入 1.4 mL 样品稀释液混匀并快速离心, 添加 80 μ L 的检测抗体到每个孔中, 室温摇床上孵育 2 h 后清洗玻片; 然后离心 Cy3-链霉亲和素小管, 加入 1.4 mL 样品稀释液混匀并快速离心, 添加 80 μ L 的 Cy3-链霉亲和素到每个孔中, 室温避光摇床上孵育 1 h 后清洗玻片; 使用 InnoScan 300 激光扫描仪扫描信号(采用 Cy3 或者绿光通道, 激发光波长为 532 nm)。

1.10 统计学分析

将各测定指标的原始数据录入 Microsoft® Excel for Mac 整理后, 运用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 8 软件做进一步统计分析, 去除极端值后以独立样本 *t* 检验比较组间差异。数据结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 环境丰富影响实验猫的血液学指标

血液学指标检测结果见表 1。红细胞方面, 福利组实验猫的平均红细胞体积明显低于对照组 ($P < 0.05$), 其余指标无明显差异 ($P > 0.05$)。白细胞方面, 福利组实验猫的淋巴细胞百分比极明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而中性粒细胞百分比极明显低于对照组 ($P < 0.01$), 其余指标则无明显差异 ($P > 0.05$)。在血小板方面, 两组间各项指标均无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.2 环境丰富影响实验猫的血液生化指标

血液生化指标测定结果见表 2。与对照组相比较, 福利组实验猫的血液尿素、肌酐、球蛋白、总蛋白含量均明显降低 ($P < 0.05$), 其余指标的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 环境丰富影响实验猫的神经内分泌指标

神经内分泌指标测定结果显示, 福利组实验猫的肾上腺素和多巴胺两项指标均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 其余指标差异不明显 ($P > 0.05$), 见图 1A。

2.4 环境丰富影响实验猫的免疫学指标

免疫学指标检测结果显示, 与对照组相比较, 环境丰富后福利组实验猫的血清 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IFN- γ /IL-4 比值、IFN- γ /IL-5 比值、IL-2/IL-4 比值和 IL-2/IL-5 比值均有所升高, 其中 IFN- γ 、

表1 环境丰富对实验猫血液学指标的影响

Table 1 Effect of environmental enrichment on hematological parameters in laboratory cats

检测指标	对照组 (n=7)	福利组 (n=7)
WBC $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	8.41±2.67	7.96±3.27
LYMPH $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	1.58±0.33	2.50±0.91
MONO $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	0.40±0.20	0.25±0.06
NEUT $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	5.82±2.21	4.34±2.04
EO $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	0.54±0.27	0.81±0.56
BASO $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	0.07±0.03	0.06±0.04
LYMPH %	20.09±5.37	32.41±6.36**
MONO %	4.59±1.30	3.37±0.63
NEUT %	67.87±4.99	54.33±6.22**
EO %	6.53±2.95	9.11±3.56
BASO %	0.93±0.58	0.77±0.36
HCT %	37.26±3.99	36.46±3.09
RBC $\omega/(10^{12} \cdot L^{-1})$	9.33±1.10	9.81±1.23
HGB $\omega/(g \cdot L^{-1})$	12.70±1.31	12.54±0.94
RETIC $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	9.27±4.80	8.87±4.61
MCV $\omega/(fL)$	40.01±2.10	37.34±1.88*
MCHC $\omega/(g \cdot L^{-1})$	34.11±0.83	34.44±0.65
MCH $m/(pg)$	13.64±0.88	12.89±0.81
PLT $\omega/(10^9 \cdot L^{-1})$	312.86±92.76	211.57±74.30
MPV $\omega/(fL)$	13.01±1.15	14.19±1.76
PCT %	0.40±0.10	0.30±0.11

注: WBC即白细胞数, LYMPH即淋巴细胞数, MONO即单核细胞数, NEUT即中性粒细胞数, EO即嗜酸性粒细胞数, BASO即嗜碱性粒细胞数, LYMPH%即淋巴细胞百分比, MONO%即单核细胞百分比, NEUT%即中性粒细胞百分比, EO%即嗜酸性粒细胞百分比, BASO%即嗜碱性粒细胞百分比, HCT即红细胞比容, RBC即红细胞数, HGB即血红蛋白含量, RETIC即网织红细胞数, MCV即平均红细胞体积, MCHC即红细胞平均血红蛋白浓度, MCH即红细胞平均血红蛋白含量, PLT即血小板数量, MPV即平均血小板体积, PCT即血小板比积。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表2 环境丰富对实验猫血液生化指标的影响

Table 2 Effect of environmental enrichment on blood biochemical parameters in laboratory cats

检测指标	对照组 (n=7)	福利组 (n=7)
ALB $\rho/(g \cdot L^{-1})$	33.14±1.46	33.29±1.03
ALKP $z/(U \cdot L^{-1})$	43.00±10.53	42.86±7.41
ALT $z/(U \cdot L^{-1})$	70.00±19.38	60.29±9.28
UREA $c/(mmol \cdot L^{-1})$	6.50±1.26	5.06±0.95*
CA $c/(mmol \cdot L^{-1})$	2.40±0.07	2.34±0.07
CHOL $c/(mmol \cdot L^{-1})$	2.48±0.53	2.65±0.57
CREA $c/(\mu mol \cdot L^{-1})$	120.00±16.24	102.29±7.28*
GLOB $\rho/(g \cdot L^{-1})$	50.43±6.21	43.71±2.71*
GLU $c/(mmol \cdot L^{-1})$	6.17±1.08	5.43±0.55
PHOS $c/(mmol \cdot L^{-1})$	1.73±0.12	1.68±0.17
TBIL $c/(\mu mol \cdot L^{-1})$	3.14±1.25	2.14±0.35
TP $\rho/(g \cdot L^{-1})$	83.45±5.53	77.14±2.80*

注: ALB即白蛋白, ALKP即碱性磷酸酶, ALT即丙氨酸转氨酶, UREA即尿素, CA即钙, CHOL即胆固醇, CREA即肌酐, CLOB即球蛋白, GLU即葡萄糖, PHOS即磷, TBIL即总胆红素, TP即总蛋白。与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

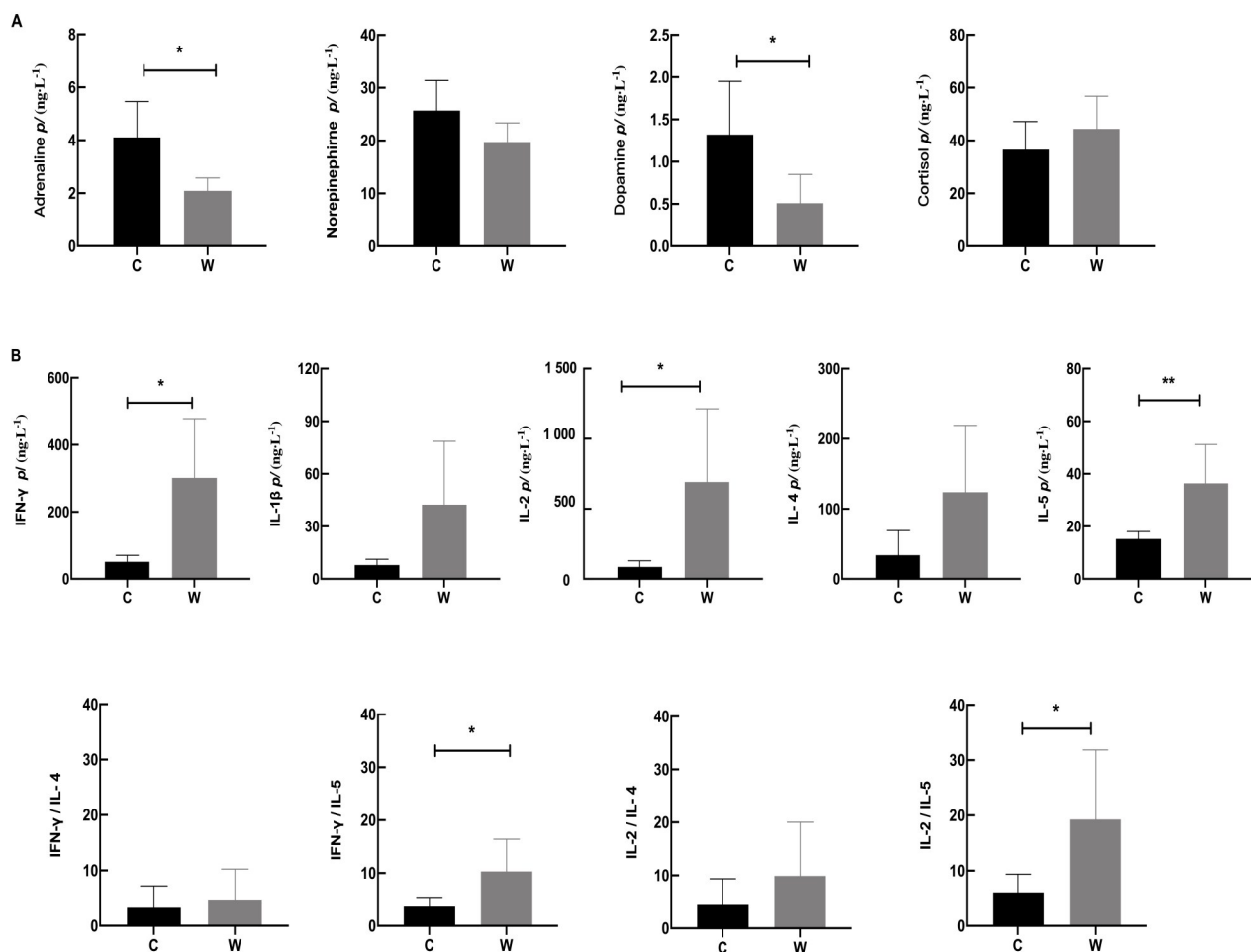
IL-2、IFN- γ /IL-5比值和IL-2/IL-5比值差异明显 ($P < 0.05$), IL-5差异极明显 ($P < 0.01$), 而其余指标差异尚无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图1B。

3 讨论

饲养环境对于实验猫福利具有重要的影响。长期笼养环境下的实验猫, 一方面缺乏足够的活动空间或丰富的设施满足其玩耍、探索、躲避的天性, 另一方面还缺乏与同伴及人类互动的机会而不能满足其社交需求^[5]。当实验动物需求不能得到满足时, 其福利状况就会受到不同程度的损害, 由此将导致物质及能量代谢的生理变化和情绪不稳定等心理问题^[6-7]。因此, 本实验通过设置笼内隐藏箱、笼外活动区域的攀爬设施及玩具、增加个体相互间游戏玩耍以及和人类交流互动建立信任关系的机会等环境丰富干预措施, 满足实验猫的躲避、玩耍、探索、社交等需求, 然后从血液学、神经内分泌学、免疫学三个方面评估这些环境丰富福利措施对实验猫健康状况的影响。

本实验结果显示, 对照组的肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺水平均高于福利组, 其中肾上腺素和多巴胺水平的组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这表明对照组实验猫的交感-肾上腺髓质系统更敏感, 机体更可能处于高度警觉的应急状态, 而福利组实验猫的交感-肾上腺髓质系统则相对稳定在低活性状态。对于笼养环境下的猫而言, 其应激原主要来自于贫瘠环境以及缺乏与同伴及人类之间的相互交流^[8]。环境丰富可以通过大脑影响整个神经系统, 改变多种神经递质的活动, 从而缓解实验动物的恐惧、焦虑等不良情绪^[9]。一些研究发现, 大鼠缺乏环境刺激或剥夺社交行为, 以及小鼠遭遇社交失败, 均会对正常大脑功能产生不利影响, 常伴有多巴胺分泌活动增加等方面的神经化学改变^[10-11]。此外, 肾上腺素、多巴胺水平更高的实验猫在面对日常实验操作如采血等应激时, 更容易处于持续的惊恐和紧张状态, 表现出更多的反抗情绪及行为, 不仅使实验操作更加困难, 而且增加反抗本身对动物造成身心伤害的可能, 例如恐惧、紧张等情绪的生理反应多表现为交感神经系统活动的相对亢进^[12], 会进一步威胁实验猫的健康状况。

众所周知, 机体在应激反应中, 神经-内分泌-免疫系统之间存在着广泛而精细的相互调节作用, 细胞因子即是其中主要的交汇点。由图1可知, 对照组实验猫的血清IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5水平均低于福利组, 其中IFN- γ 、IL-2、IL-5的组间差异均



注: Adrenaline 即肾上腺素, Norepinephrine 即去甲肾上腺素, Dopamine 即多巴胺, Cortisol 即皮质醇, IFN-γ 即干扰素-γ, IL-1β 即白细胞介素-1β, IL-2 即白细胞介素-2, IL-4 即白细胞介素-4, IL-5 即白细胞介素-5。c 为对照组, w 为福利组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 环境丰富对实验猫神经内分泌指标(A)和免疫学指标(B)的影响

Figure 1 Effect of environmental enrichment on neuroendocrine parameters(A) and immunological parameters (B) in laboratory cats

有统计学意义 ($P < 0.05$)。IL-1β 是机体固有免疫应答过程中最为重要的调节因子之一; IFN-γ 及 IL-2 则是 Th1 型细胞因子的主要代表, 共同促进细胞介导的免疫应答; 同时, IL-4 介导 Th2 细胞亚群分化, 分化后的 Th2 细胞能分泌 IL-4 和 IL-5 等细胞因子, 从而增强抗体介导的体液免疫应答^[13]。因此, 本研究结果提示, 对照组实验猫的免疫功能相较于福利组受到抑制, 而当机体免疫功能受到抑制时, 很容易并发传染性疾病或诱发各种躯体-神经性疾病。处于长期应激状态下的猫, 由于免疫抑制增加了其对传染性疾病如猫上呼吸道感染的易感性, 不仅威胁实验动物的健康, 同时也增加了实验室环境下爆发传染性疾病的风险, 甚至对实验人员健康造成威胁^[14]。另外, 机体的适应性免疫平衡通常取决于 Th1 型细胞因子介导的细胞免疫与

Th2 型细胞因子介导的体液免疫之间的平衡 (即 Th1/Th2 比值), 长期 (慢性) 应激可通过改变 Th1 和 Th2 细胞因子的平衡促使轻度慢性炎症反应的发生^[15]。由图 1 可知, 对照组实验猫的血清 Th1/Th2 即 IFN-γ/IL-4、IL-2/IL-4、IFN-γ/IL-5、IL-2/IL-5 比值均低于福利组, 其中 IFN-γ/IL-5、IL-2/IL-5 比值在两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这说明不同饲养环境可导致 Th1/Th2 细胞因子平衡的改变, 对照组 Th1/Th2 较福利组低, 说明其免疫平衡更偏向于 Th2。据文献报道, 慢性心理应激可导致 Th1/Th2 平衡偏向于 Th2 介导的体液免疫, 并可增加过敏性疾病的易感性, 甚至促进肿瘤生长^[16]。

应激对免疫功能的作用还受体内白细胞分布的影响^[17]。本实验中白细胞相关指标的检测结果显示, 对

对照组实验猫的淋巴细胞数、淋巴细胞百分比低于福利组,中性粒细胞及中性粒细胞百分比高于福利组,其中淋巴细胞百分比和中性粒细胞百分比的组间差异有极显著的统计学意义($P < 0.01$)。白细胞分布常被用来评估机体的应激反应:中性粒细胞(N)增加、淋巴细胞(L)降低造成N:L比值增加,这种现象在大部分脊椎动物的应激反应中均可观察到^[18]。综合以上白细胞相关指标及细胞因子的变化,本研究结果提示对照组实验猫的免疫功能,无论是固有免疫还是适应性免疫,均与福利组相比受到了明显抑制,而免疫功能的相对低下不仅意味着机体对疾病的抵抗力下降,更容易受到感染,而且免疫反应受到抑制并不能够节省能量,实际上反而需要额外的能量消耗,如免疫抑制因子的合成与释放及细胞凋亡的过程中均需要消耗能量。曾有研究者指出,从进化的角度来看,由应激所导致的机体专门消耗能量来抑制淋巴细胞启动强大的适应性免疫反应是毫无意义的^[19],因为这需要机体调用本该用于其他生物学功能的贮备能量来对应激,同时也改变了机体内各种生物活动之间的资源分配,这将直接影响动物的福利状况。因此,为进一步了解不同饲养环境下实验猫能量代谢的变化,本实验还测定了血液生理生化指标。

分析表1可知,在红细胞方面,对照组实验猫的平均红细胞体积显著大于福利组($P < 0.05$),红细胞数和血红蛋白含量等其余指标在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。红细胞的生成与营养物质的吸收与利用有关,而慢性应激会引起机体营养代谢紊乱^[20]。本实验中对照组与福利组的饲喂方式及饲料品种一致,并且各组红细胞数和血红蛋白含量等其余红细胞相关指标无显著差异。因此推测,对照组实验猫的平均红细胞体积大于福利组,可能是由于应激引起交感神经兴奋,肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺等神经递质合成与释放增加,机体的微量元素如铁、维生素B₁、维生素B₁₂、叶酸多用于合成以上神经递质,从而不足以促进红细胞成熟所致。若长此以往,将可能导致实验猫幼幼细胞贫血^[21]。另外,对照组实验猫的血小板数也略多于福利组($P = 0.059$)。据文献报告,慢性应激状态下的大鼠凝血功能及血小板活性增强,进而影响心血管的发生^[22]。由表2可知,对照组实验猫的尿素、肌酐、球蛋白和总蛋白水平平均显著高于福利组($P < 0.05$)。当机体细胞处于应激状态时,肌蛋白降解促使肌酸从组织中释放并代谢生成肌酐。同时,尿素和肌酐还是判断肾功能的重要指标,若均高于正

常值则表明其肾功能受到损害^[23]。血浆蛋白质主要包括白蛋白、球蛋白和纤维蛋白原,通常将白蛋白、球蛋白、总蛋白三者结合起来分析,若三者都以同一比率升高,则可能是由于水的相对缺乏引起血浆蛋白浓度升高。本研究中对照组实验猫的血清总蛋白和球蛋白含量显著高于福利组,但两组之间的白蛋白水平相近,这说明其主要差异为球蛋白的差异,而机体免疫功能受到抑制时可能引起球蛋白水平升高。由此可见,对照组实验猫的营养、能量代谢途径相较于福利组也发生改变以对应激。

本研究通过为实验猫设置隐藏箱、攀爬设施及玩具、增加其与同伴及实验人员社交互动的机会等环境丰富干预措施,满足实验猫躲避、玩耍、探索及社交需求。例如,躲藏是猫与生俱来的固有行为表现,尤其在笼养环境下观察到的这种行为表现已被国外相关研究^[24]报告过。Gourkow等^[25]观察到如果没有为笼养环境下的猫提供隐藏箱,它们将会试图通过打翻砂盆来建立可供其隐藏的地方。在本实验的日常管理中也观察到此现象,而这种行为的发生不仅会给同伴造成额外的应激压力,还给实验室的管理带来不便。玩耍、探索、与同伴及人类互动等活动不仅满足实验猫的行为需求,而且促进其日常运动量的适度增加。虽然运动作为应激原也会引起应激反应,但定期适度运动有助于利用机体的短期应激反应提高其对抗应激的能力^[26]。通过适度运动来激活体内短期应激反应,可以显著增强机体免疫力,并减少肿瘤的发生率,这将有助于提高实验猫抵抗病原微生物感染的能力^[27]。

综上所述,本研究从血液学、神经内分泌、免疫学三个方面分析了环境丰富对缓解实验用英国短毛猫应激作用的影响,结果发现不同饲养环境下的实验用英国短毛猫的血液生理生化、神经内分泌、免疫学部分指标均有明显的改变。研究结果提示,相较于普通单一笼养环境,环境丰富下的实验猫的机体应激水平较低,免疫功能相对未受到抑制;而普通单一笼养环境会使实验猫的部分生理功能受到损害,威胁实验猫的身心健康。此外,本研究所采取的环境丰富措施易操作且经济便利,能够保证实验猫的生理健康,更好地实现实验动物福利的完整内涵,确保实验结果的科学性及可靠性,具有较高的应用价值与现实意义。然而,由于目前实验猫的行为学研究尚无可靠量表及专用的观察分析仪器,国内外实验猫行为学的相关研究也很少见。因此,本研究在实验猫行为学方面尚存在不足,这也是今后需要进一步探讨的方向。

[作者贡献]

陈鸿婷：设计实验方案，开展具体实验研究，获取实验数据，进行数据分析及解释，起草并撰写研究论文。

杨斐：提出研究思路，对实验设计方案、整个实验过程以及论文进行关键性修改和把关。

胡樱：协助开展具体实验研究，帮助获取实验数据及数据分析。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王亮, 付君言, 周子娟, 等. 人类疾病猫模型的制作与应用[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2):248-252. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.02.019.
- [2] GERET C, RIOND B, CATTORI V, et al. Housing and care of laboratory cats: from requirements to practice[J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2011, 153(4): 157-164. DOI:10.1024/0036-7281/a000175.
- [3] ROCHLITZ I. Recommendations for the housing and care of domestic cats in laboratories[J]. Lab Anim, 2000, 34(1): 1-9. DOI:10.1258/002367700780577939.
- [4] 滑志民, 蔡旋, 张似青, 等. 实验用猫的繁育[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2020(1):38-39. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2020.01.016.
- [5] ELLIS S L H. Environmental enrichment: practical strategies for improving feline welfare[J]. J Feline Med Surg, 2009, 11(11): 901-912. DOI:10.1016/j.jfms.2009.09.011.
- [6] LEWEJOHANN L, SCHWABE K, HÄGER C, et al. Impulse for animal welfare outside the experiment[J]. Lab Anim, 2020, 54(2):150-158. DOI:10.1177/0023677219891754.
- [7] STELLA J L, CRONEY C C. Environmental aspects of domestic cat care and management: implications for cat welfare[J]. Sci World J, 2016, 2016:6296315. DOI:10.1155/2016/6296315.
- [8] AMAT M, CAMPS T, MANTECA X. Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications[J]. J Feline Med Surg, 2016, 18(8):577-586. DOI:10.1177/1098612X15590867.
- [9] 李军延, 刘帅. 实验动物环境丰富化[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3):327-330. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.020.
- [10] BARKER T H, GEORGE R P, HOWARTH G S, et al. Assessment of housing density, space allocation and social hierarchy of laboratory rats on behavioural measures of welfare[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185135. DOI:10.1371/journal.pone.0185135.
- [11] HOLLY E N, DEBOLD J F, MICZEK K A. Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress: modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area[J]. Psychopharmacology (Berl), 2015, 232(24): 4469-4479. DOI: 10.1007/s00213-015-4082-z.
- [12] BROOM D M, JOHNSON K G. Stress and animal welfare: key issues in the biology of humans and other animals[M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2019: 99-130. DOI:10.1007/978-3-030-32153-6.
- [13] SCHILLER M, BEN-SHAANAN T L, ROLLS A. Neuronal regulation of immunity: why, how and where? [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(1):20-36. DOI:10.1038/s41577-020-0387-1.
- [14] STELLA J, CRONEY C, BUFFINGTON T. Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats[J]. Appl Anim Behav Sci, 2013, 143(2-4): 157-163. DOI: 10.1016/j.applanim.2012.10.014.
- [15] DHABHAR F S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology[J]. Neuroimmunomodulation, 2009, 16(5):300-317. DOI:10.1159/000216188.
- [16] HOU N, ZHANG X, ZHAO L Y, et al. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(4): 471-476. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.08.101.
- [17] DHABHAR F S, MILLER A H, MCEWEN B S, et al. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones[J]. J Immunol, 1996, 157(4): 1638-1644. DOI:10.1006/cimm.1996.0224.
- [18] DAVIS A K, MANEY D L, MAERZ J C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists[J]. Funct Ecol, 2008, 22(5): 760-772. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x.
- [19] DHABHAR F S. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful[J]. Immunol Res, 2014, 58(2-3):193-210. DOI:10.1007/s12026-014-8517-0.
- [20] 何钢华, 廖金娥, 陈结文, 等. 幼年期实验用食蟹猴血液学指标测定与比较[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 66-73. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.10.012.
- [21] GEORGIEFF M K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(2): 614S-620S. DOI:10.1093/ajcn/85.2.614S.
- [22] 宋洪涛, 武忠, 张瑞霞, 等. 慢性应激对大鼠凝血功能和血小板活化的影响及电针的干预作用[J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(3):304-307. DOI:10.3969/j.issn.1006-9771.2017.03.011.
- [23] 刘长金, 余承高. 医学生理学[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2009.
- [24] VINKE C M, GODIEN L M, VAN DER LEIJ W J R. Will a hiding box provide stress reduction for shelter cats? [J]. Appl Animal Behav Sci, 2014, 160: 86-93. DOI: 10.1016/j.applanim.2014.09.002.
- [25] SMITH G E, CHOUINARD P A, BYOSIERE S-E. If I fits I sits: A citizen science investigation into illusory contour susceptibility in domestic cats (*Felis silvestris catus*) [J]. Appl Anim Behav Sci, 2021, 240: 105338. DOI: 10.1016/j.applanim.2021.105338.
- [26] GÓMEZ-GALÁN M, FEMENÍA T, ÅBERG E, et al. Running opposes the effects of social isolation on synaptic plasticity and transmission in a rat model of depression[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0165071-e. DOI:10.1371/journal.pone.0165071.
- [27] DHABHAR F S, SAUL A N, DAUGHERTY C, et al. Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma[J]. Brain Behav Immun, 2010, 24(1):127-137. DOI:10.1016/j.bbi.2009.09.004.

(收稿日期: 2021-07-30 修回日期: 2021-12-08)

(本文编辑: 张俊彦, 洪怡)