

一例新西兰白兔系统性淀粉样变性病理学诊断

林晴晴^{1,2,3}, 戴锦龙^{1,2,3}, 陈志森^{1,2,3}, 郭健敏^{1,2,3}, 杨威^{1,2,3}

(1. 广东莱恩医药研究院有限公司, 广州 510990; 2. 广州湾区生物医药研究院, 广州 510990; 3. 广东省药物非临床评价与研究重点实验室, 广州 510990)

[摘要] **目的** 通过1例新西兰白兔系统性淀粉样变性的病理学诊断, 为实验动物淀粉样变性的诊断提供参考。**方法** 在一项为期6个月的重复滴眼给药毒性试验中, 发现1只新西兰白兔的常规大体解剖检查异常, 随后将其各脏器组织制作成石蜡切片, 进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和刚果红染色, 于光学显微镜和偏振光显微镜下观察其病理组织学特征。**结果** 大体解剖后肉眼形态观察见该例动物的脾脏偏大, 肺脏颜色和质地改变。对各脏器组织进行HE染色后显示: 脾脏组织结构被破坏, 脾脏白髓周围被致密淀粉样沉积物以结节环的形式包围, 白髓可见压力性萎缩; 颌下淋巴结、肠系膜淋巴结以及回肠、圆小囊、蚓突、空肠、盲肠和直肠亦可见淀粉样蛋白沉积。刚果红染色显示, 各受影响脏器组织内淀粉样蛋白呈鲑鱼粉色, 在偏振光显微镜下呈现特殊的苹果绿双折光。**结论** 该例新西兰白兔的各脏器组织病理特征符合系统性淀粉样变性的诊断特征。

[关键词] 淀粉样变性; 脾脏; 病理形态学; 新西兰白兔

[中图分类号] S852.31; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0695-05



Pathological Diagnosis of Systemic Amyloidosis in a New Zealand White Rabbit

LIN Qingqing^{1,2,3}, DAI Jinlong^{1,2,3}, CHEN Zhisen^{1,2,3}, GUO Jianmin^{1,2,3}, YANG Wei^{1,2,3}

(1. Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510990, China; 2. Guangzhou Bay Area Institute of Biomedicine, Guangzhou 510990, China; 3. Guangzhou Provincial Key Laboratory of Drug Non-Clinical Evaluation and Research, Guangzhou 510990, China)

Correspondence to: YANG Wei (ORCID: 0000-0001-9731-197X), E-mail: ywdocn@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To provide a reference for the diagnosis of amyloidosis in experimental animals through the pathological diagnosis of systemic amyloidosis in a case of a New Zealand white rabbit. **Methods** In a 6-month repeated ocular toxicity study, an abnormal finding was noted during the routine gross anatomical examination of one New Zealand white rabbit. Its organs were prepared as paraffin sections and stained with hematoxylin-eosin (HE) staining and Congo red staining. The histopathological features were observed under optical and polarized light microscopy. **Results** Gross anatomical examination of the animal revealed an enlarged spleen and changes in the color and texture of the lung. HE staining showed that the splenic tissue structure was destroyed, the white pulp of the spleen was surrounded by dense amyloid deposition in the form of nodular rings, along with pressure atrophy of the white pulp. Amyloid deposits were also observed in the submandibular lymph nodes, mesenteric lymph nodes, ileum, sacculus rotundus, vermiform appendix, jejunum, cecum, and rectum. Congo red staining showed that the amyloid deposition in the affected organs appeared salmon-pink, and exhibited characteristic apple green birefringence under polarized light microscopy. **Conclusion** The histopathological features of the New Zealand white rabbit are consistent with the diagnostic characteristics of systemic amyloidosis.

[Key words] Amyloidosis; Spleen; Pathological morphology; New Zealand white rabbit

[基金项目] 广东省科技计划项目(科技创新平台类)“广东省药物非临床评价研究企业重点实验室”(2023B1212070029); 广东省重大人才工程项目“广东特支计划”科技创业领军人才-杨威”(2021TY060021)

[第一作者] 林晴晴(1994—), 女, 硕士, 研究方向: 毒性病理学。E-mail: linqingqing@lewin.com.cn

[通信作者] 杨威(1978—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 新药临床前安全性评价研究工作。E-mail: ywdocn@163.com。ORCID: 0000-0001-9731-197X

淀粉样变性 (amyloidosis) 是淀粉样蛋白在机体局部或全身性多器官沉积导致组织结构破坏、器官功能障碍的一类进行性疾病的总称。系统性淀粉样变性已在多种物种中被观察到, 包括人类、家畜及实验动物^[1-3]。相较于人类, 动物系统性淀粉样变性的研究较少, 尤其在新西兰白兔中, 自发性系统性淀粉样变性未见相关文献报道。本课题组在一项使用实验动物新西兰白兔的为期6个月的重重复滴眼给药毒性试验过程中, 发现受试动物低剂量组有1例新西兰白兔的既定病理学检查结果疑似系统性淀粉样变性。因此, 本文通过总结该病例各脏器的肉眼观察、HE染色及刚果红染色结果, 对其病理组织学特征进行初步探讨, 以期为新西兰白兔的自发性系统性淀粉样变性诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究对象来自一项为期6个月、使用新工艺阿托品滴眼液的重重复滴眼毒性试验。该实验设5组, 共120只新西兰白兔, 分别为阴性对照组、低剂量组 (0.02 mg/d)、中剂量组 (0.04 mg/d)、高剂量组 (0.08 mg/d) 以及旧工艺高剂量组 (0.08 mg/d), 每天滴眼给药1次 (100 μ L/眼), 连续给药5个月, 分别于给药中期、给药末期以及给药结束后恢复4周, 按实验计划对动物进行病理学检查。该例新西兰白兔为连续5个月滴眼给予中剂量阿托品滴眼液的恢复期动物, 雌性, 普通级, 7月龄, 安乐死前体重为2.992 kg, 购自湖南太平生物科技有限公司 [SCXK (湘) 2020-0005]。动物饲养于广东莱恩医药研究院有限公司的普通级环境兔/豚鼠观察室 [SYXK (粤) 2022-0146], 单笼饲养, 环境温度 $16\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为40%~70%。该重复滴眼给药毒性试验的研究方案及过程符合实验动物福利伦理相关要求, 并通过广东莱恩医药研究院有限公司动物管理与使用委员会批准 (IA-SE2022081-01、IASE2022081-02)。

1.2 实验仪器

ASP300S全自动组织脱水机、EG1150H石蜡包埋机、EG1150C冷台、RM2016轮转式切片机、ST5020多功能染色机、DM3000生物显微镜和DMC4500病理图像分析系统均购自德国LEICA公司; Aperio GT 450扫片机购自徕卡显微系统 (上海) 有限公司; BCE224-1CCN电子天平购自赛多利斯科学仪器 (北

京) 有限公司。

1.3 主要试剂

苏木精染液购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司 (批号G2115209); 伊红Y (醇溶性) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司 (批号I2018021); 甲醇刚果红染色液购自珠海贝索生物技术有限公司 (批号C240301)。

1.4 病理学检查

重复滴眼给药毒性试验结束后, 根据受试动物体重, 使用丙泊酚乳状注射液, 通过静脉注射进行全身麻醉, 麻醉剂量为16 mg/kg。在动物进入外科麻醉期后, 通过腹主动脉采血方式实施安乐死。按既定方案进行常规大体解剖检查 (含全身46个脏器), 留取组织样本并用体积分数为10%的中性甲醛溶液固定 (眼和睾丸用Davison's固定液进行快速固定)。当发现其他任何组织器官出现体积、颜色、质地等异常改变时, 均详细记录并加以固定。所有固定后的组织样本经常规取材、脱水、石蜡包埋, 参照HE染色操作流程以及甲醇刚果红试剂说明书进行HE染色和甲醇刚果红染色, 然后在光学显微镜及偏振光镜下观察染色结果。本研究对象在之前饲养及试验过程中未出现明显异常, 而是在给安乐死后的系统剖检时发现异常。

2 结果

2.1 肉眼形态观察及脏器系数

该例新西兰白兔的体表检查完好无损, 生理腔道未见异常分泌物; 脏器剖检后肉眼观察可见: 脾脏偏大, 测量尺寸约为7.5 cm $\times$ 1.5 cm $\times$ 0.5 cm (图1), 质量为5.209 g, 脏体系数为0.174, 脏脑系数为0.533; 肺脏多处呈灰红色, 较正常肺组织质地略硬; 其余脏器的解剖位置正常, 颜色正常且有光泽, 质地均匀, 未见异常增大或缩小。



图1 1例疑似系统性淀粉样变性新西兰白兔的脾脏

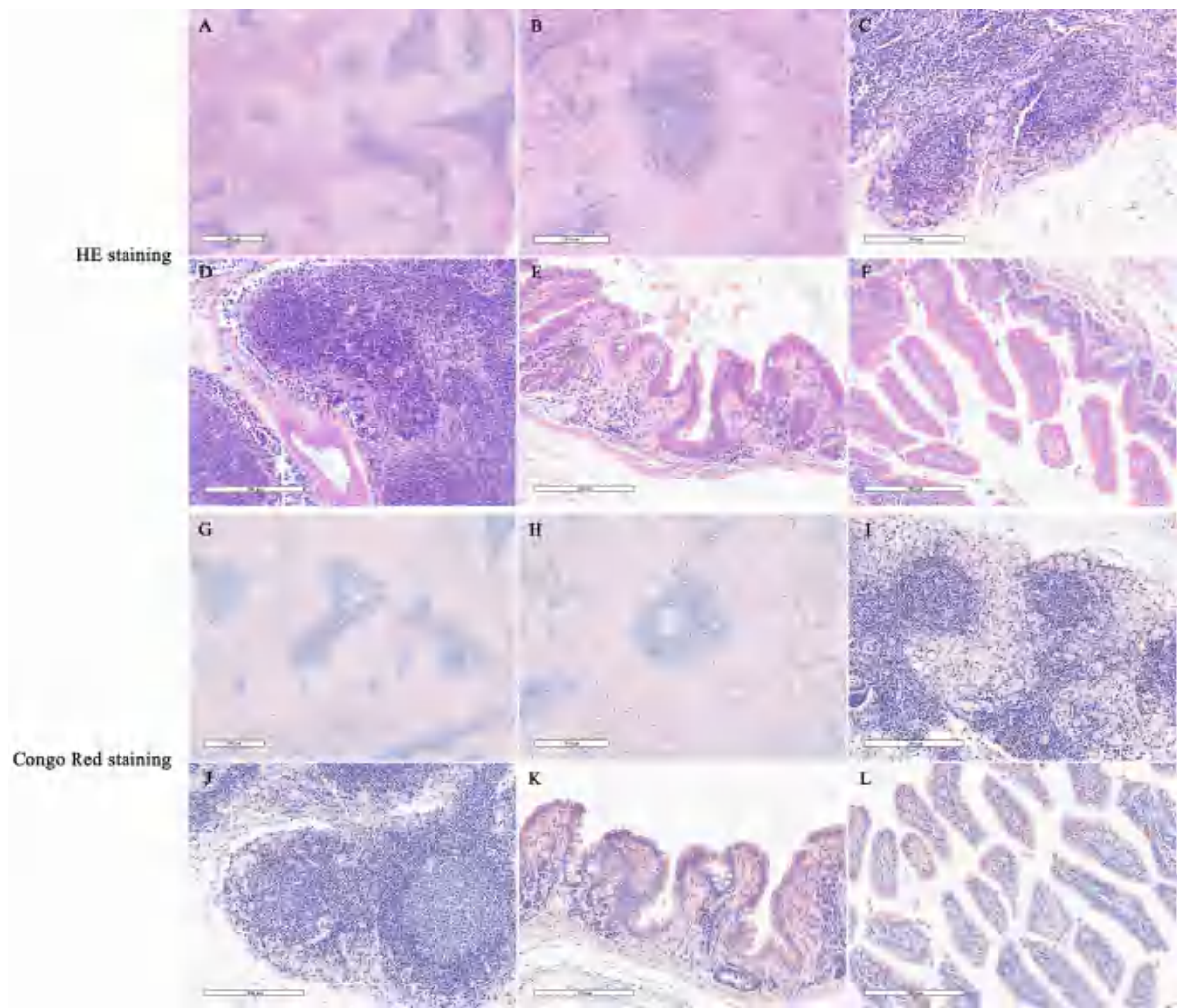
Figure 1 Spleen of a New Zealand white rabbit suspected of systemic amyloidosis

2.2 系统性淀粉样变性的病理学诊断

2.2.1 HE 染色的组织学检查结果

经常规石蜡制片及HE染色后，在光学显微镜下检查这例新西兰白兔全身46个脏器组织，包括心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、胸腺、胸骨、股骨、淋巴结、胃肠道等。其中，在脾脏、肠系膜淋巴结、颌下淋巴结及各肠道等部位可见疑似淀粉样沉积（图2）。在低倍镜下，脾脏组织结构被破坏，白髓周围被致密的、疑似嗜酸性淀粉样蛋白团块所环绕，导致白

髓面积占比及其细胞数量明显减少，即白髓呈压力性萎缩（图2A）；在高倍镜下，脾脏白髓边缘区淋巴细胞已不可见，仅残存部分动脉周围淋巴鞘（图2B）。受影响的免疫组织还包括颌下淋巴结（图2C）及肠系膜淋巴结（图2D），其中不定形的淀粉样物质沉积在淋巴结被膜下位置，甚至可延至浅层皮质区。此外，在胃肠道组织，如回肠、圆小囊、蚓突、空肠、盲肠和直肠的黏膜层，亦可见疑似淀粉样蛋白沉积（图2E~F）。



注：A~F分别为HE染色后低倍镜下脾脏（×40）以及高倍镜下脾脏（×100）、颌下淋巴结（×200）、肠系膜淋巴结（×200）、直肠（×200）和回肠（×200）的淀粉样蛋白沉积；G~L为刚果红染色后同一倍数显微镜下的脾脏、颌下淋巴结、肠系膜淋巴结、直肠和回肠的组织学形态。各图标尺分别为600 μm（A、G）、300 μm（B、H）和200 μm（C~F、I~L）。
Note: A-F show amyloid deposition in the spleen at low magnification (×40) and high magnification (×100), submandibular lymph node (×200), mesenteric lymph node (×200), rectum (×200) and ileum (×200); G-L show histological morphology of spleen, submandibular lymph nodes, mesenteric lymph nodes, rectum, and ileum under the same magnification after Congo red staining. Scale bars: 600 μm (A, G), 300 μm (B, H), 200 μm (C-F, I-L).

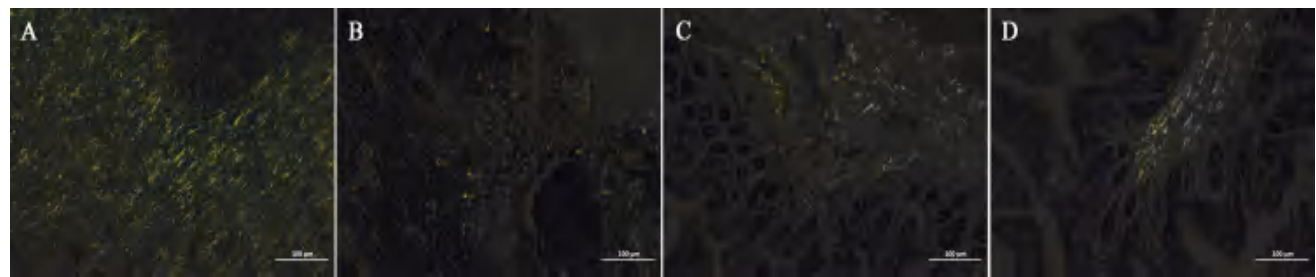
图2 1例系统性淀粉样变性新西兰白兔受影响器官组织的普通光学显微观察
Figure 2 General optical microscopic observation of affected organs in a New Zealand white rabbit with systemic amyloidosis

2.2.2 刚果红染色的组织学检查结果

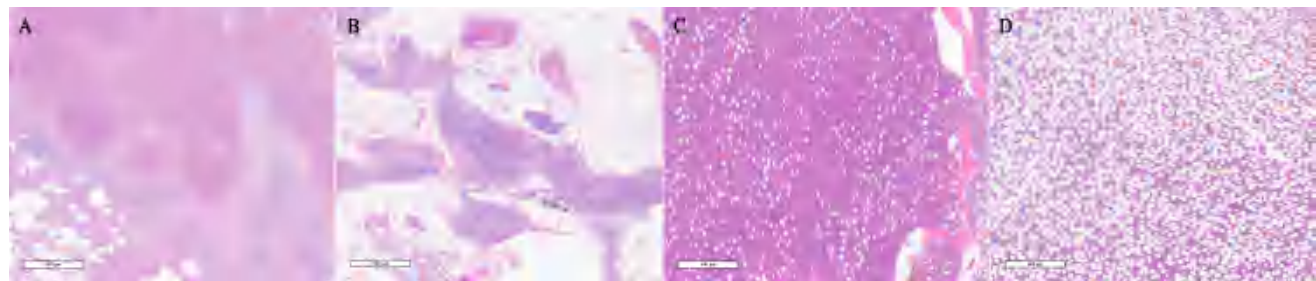
刚果红染色结果显示，新西兰白兔的脾脏、肠系膜淋巴结、颌下淋巴结及各肠道等受影响脏器组织内的淀粉样蛋白呈鲑鱼粉色（图2G~L），其粉染的淀粉样蛋白的分布区域与HE染色结果相一致，分别位于脾脏白髓周围、淋巴结的被膜下区以及肠道的黏膜层。在偏振光显微镜下，脾脏、淋巴结和肠道组织内沉积的淀粉样蛋白呈现特殊的苹果绿双折光（图3），表明该病例符合系统性淀粉样蛋白变性的诊断特征。

2.3 其他脏器组织的异常改变

HE染色结果显示，该例动物其余脏器组织还表现出以下异常的改变；肺脏呈现重度弥散性炎症，以中性粒细胞和单个核细胞浸润为主，同时可见肺泡腔渗出/水肿（图4A）；胸腺萎缩表现为皮髓质淋巴细胞数量减少，分界不清，周围见脂肪组织（图4B）；骨髓腔内细胞数量弥漫性增多，以中性粒细胞和浆细胞为主，脂肪细胞数量相对减少（图4C）；同期正常对照动物的骨髓情况见图4D。



注：A，脾脏；B，颌下淋巴结；C，直肠；D，回肠。标尺为100 μm。
Note: A, spleen; B, submandibular lymph nodes; C, rectum; D, ileum. Scale bar: 100 μm (A-D).
图3 1例系统性淀粉样变性新西兰白兔受影响器官组织的偏振光显微检查(刚果红染色, ×200)
Figure 3 Polarized light microscopy of affected organ tissue in a New Zealand white rabbit with systemic amyloidosis (Congo red staining, ×200)



注：A，肺脏重度弥散性炎症；B，胸腺萎缩；C，骨髓腔内细胞数量弥漫性增多；D，同期正常对照动物的骨髓细胞。图中所有标尺为600 μm。
Note: A, Severe diffuse inflammation of the lungs; B, Thymic atrophy; C, Diffuse increase in cellularity in the bone marrow cavity; D, Bone marrow micrograph of normal control animals at the same time point. All scale bars in the figure are 600 μm (A-D).
图4 1例系统性淀粉样变性新西兰白兔的其他脏器组织病理学观察(HE染色, ×40)
Figure 4 Histopathology of other organs of a New Zealand white rabbit with systemic amyloidosis (HE staining, ×40)

3 讨论

根据国际淀粉样变性学会（International Society of Amyloidosis）所发布的指南，“淀粉样蛋白”一词主要指细胞外的纤维蛋白沉积物，这些沉积物可通过刚果红染色及偏振光显微镜相结合而识别，并可基于淀粉样蛋白类型进行分类^[4]。目前，动物中已知的淀粉样蛋白共分为10种，其中多数哺乳动物和鸟类的淀粉样蛋白为AA型，即其淀粉样原纤维蛋白来源于血清淀粉

样蛋白A（serum amyloid A，SAA）。AA型淀粉样变性通常与感染性、炎症性疾病和恶性肿瘤相关，来源于急性期反应物——SAA的降解，也被称为继发性淀粉样变性^[5]。本研究中，该例动物的病理学检查显示其存在严重的肺脏炎症，提示这种炎症可能与全身多脏器组织的淀粉样蛋白沉积相关。

在淀粉样变性晚期病例中，几乎所有脏器组织都可能受到影响，但大多数哺乳动物的淀粉样变性通常发生在特定器官或器官群中^[6]。早期研究中，Jakbo^[6]

根据淀粉样蛋白沉积部位的解剖学分类方法,分析了典型的淀粉样沉积特征,即淀粉样蛋白主要沉积在脾脏、肝脏、肾脏和肾上腺中,并随着物种不同而改变沉积偏好部位;而在非典型案例中,其他器官组织也可受影响。脾脏作为典型淀粉样变性中最常受影响的器官,淀粉样蛋白常沉积在淋巴滤泡、红髓、小动脉壁和被膜。在本研究中,这例新西兰白兔的脾脏中发现了相对大量的淀粉样蛋白沉积,提示脾脏为淀粉样变性典型的好发部位,且其淀粉样蛋白主要沉积在滤泡周围及红髓中,并在白髓周围呈结节状分布;这种严重的脾脏淀粉样变性可导致白髓压力性萎缩,进而使脾脏的功能受损。与脾脏相比,该动物其余淋巴结、肠道等部位的淀粉样蛋白沉积相对较少。

在小鼠和豚鼠等实验动物中,可以通过持续性给予炎症刺激诱导AA型淀粉样变性^[2,7-8]。当实验性地通过口服或静脉注射外源蛋白诱导动物发生AA型淀粉样变性时,观察到最早的淀粉样蛋白沉积在脾脏中^[9-11]。这可能与脾脏过滤功能相关,即与其他器官组织相比,淀粉样蛋白在循环经过脾脏时更容易被蓄积。也有文献支持淀粉样蛋白可能通过体内免疫细胞转运^[8],这可以解释本研究中观察到各淋巴结中也有淀粉样蛋白沉积的现象。除主要的淀粉样沉积部位外,其他部位如胃肠道也是系统性淀粉样变性的常见受影响部位。

综上,本研究通过分析1例新西兰白兔疑似系统性淀粉样变性的组织形态学特征,为该种属动物淀粉样沉积部位的解剖学模式提供参考。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验已通过广东莱恩医药研究院有限公司动物管理与使用委员会批准(批号:IA-SE2022081-01、IASE2022081-02),所有实验操作均按照广东莱恩医药研究院有限公司标准操作规程进行,遵循中国实验动物相关法律法规条例要求。

All animal experimental protocols involved in the study have been approved by the Animal Management and Use Committee of the Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd. (Approval No. IA-SE2022081-01, IASE2022081-02). All experimental operations have been carried out in accordance with the standard operating procedures of the Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., and in compliance with the requirements of the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

林晴晴负责实验操作、论文撰写;

戴锦龙参与实验操作、指导工作;

陈志森负责动物剖检工作;

郭健敏、杨威负责指导工作以及文章修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] MURAKAMI T, ISHIGURO N, HIGUCHI K. Transmission of systemic AA amyloidosis in animals[J]. Vet Pathol, 2014, 51(2): 363-371. DOI: 10.1177/0300985813511128.
- [2] MURAKAMI T, INOSHIMA Y, ISHIGURO N. Systemic AA amyloidosis as a prion-like disorder[J]. Virus Res, 2015, 207:76-81. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.12.019.
- [3] MIRIOGLU S, ULUDAG O, HURDOGAN O, et al. AA amyloidosis: a contemporary view[J]. Curr Rheumatol Rep, 2024, 26(7):248-259. DOI: 10.1007/s11926-024-01147-8.
- [4] BENSON M D, BUXBAUM J N, EISENBERG D S, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee[J]. Amyloid, 2018, 25(4): 215-219. DOI: 10.1080/13506129.2018.1549825.
- [5] 赵亮, 黄湘华. AA型淀粉样变性的研究进展[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2021, 30(1): 69-74. DOI: 10.3969/j.issn.1006-298X.2021.01.015.
- [6] ZHAO L, HUANG X H. Advances in AA amyloidosis[J]. J Nephrol Dialy Transplant, 2021, 30(1): 69-74. DOI: 10.3969/j.issn.1006-298X.2021.01.015.
- [7] JAKOB W. Spontaneous amyloidosis of mammals[J]. Vet Pathol, 1971, 8(4):292-306. DOI: 10.1177/030098587100800402.
- [8] KUROIWA M, AOKI K, IZUMIYAMA N. Histological study of experimental murine AA amyloidosis[J]. J Electron Microsc (Tokyo), 2003, 52(4):407-413. DOI: 10.1093/jmicro/52.4.407.
- [9] MCADAM K P, SIPE J D. Murine model for human secondary amyloidosis: genetic variability of the acute-phase serum protein SAA response to endotoxins and casein[J]. J Exp Med, 1976, 144(4):1121-1127. DOI: 10.1084/jem.144.4.1121.
- [10] IWAIDE S, OBA R, KOBAYASHI N, et al. Local administration of amyloid enhancing factor initiates *in situ* amyloid A deposition followed by systemic lesions in mice[J]. Exp Anim, 2023, 72(2):218-223. DOI: 10.1538/expanim.22-0125.
- [11] MURAKAMI T, MUHAMMAD N, INOSHIMA Y, et al. Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens[J]. Amyloid, 2013, 20(2): 80-85. DOI: 10.3109/13506129.2013.783474.
- [12] KENNEL S J, MACY S, WOOLIVER C, et al. Phagocyte depletion inhibits AA amyloid accumulation in AEF-induced hL-6 transgenic mice[J]. Amyloid, 2014, 21(1): 45-53. DOI: 10.3109/13506129.2013.876400.

(收稿日期:2024-07-06 修回日期:2024-10-11)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,吴昊晟)

[引用本文]

林晴晴, 戴锦龙, 陈志森, 等. 一例新西兰白兔系统性淀粉样变性病理学诊断[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 695-699. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.092.

LIN Q Q, DAI J L, CHEN Z S, et al. Pathological diagnosis of systemic amyloidosis in a New Zealand white rabbit[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(6): 695-699. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.092.



孙 强, 研究员, 博士生导师, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心非人灵长类研究平台主任。系国家杰出青年科学基金获得者、科技部中青年科技创新领军人才, 并且荣获2018年谈家桢生命科学创新奖、2019年国务院政府特殊津贴、2020年药明康德生命化学研究奖-学者奖、2022年度上海市自然科学奖一等奖。同时是中国实验动物学会理事、灵长类实验动物专业委员会常务理事, 上海市实验动物学会理事、生物安全专业委员会委员。长期致力于实验动物管理和模式动物构建及相关技术的研发工作, 获得中国首批“试管食蟹猴”, 利用慢病毒转染和基因编辑技术先后构建了多种实验猴疾病动物模型, 建立了基于精巢异种移植和激素注射的实验猴成熟加速技术, 并在国际上首次得到体细胞克隆猴和胚胎干细胞高比例嵌合的食蟹猴。同时为了向公众普及实验动物相关知识, 坚持实验动物科普写作多年, 是“实验动物那些事儿”公众号主要作者之一, 发表科普文章70余篇。

殊途同归的免疫缺陷小鼠培育史

孙 强

(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 上海 200031)



[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] B [文章编号] 1674-5817(2024)06-0700-04

继本专栏推出的《近交系小鼠培育及其背后的故事》^[1]《NOD小鼠培育接力赛》^[2]之后, 本期我们将目光投向具有独特免疫缺陷特性的实验小鼠模型——无胸腺裸鼠(又称“裸小鼠”)和重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠。接下来的内容将详细介绍裸小鼠和SCID小鼠的培育历程、生物学特性及其在科研中的应用价值, 以期为读者提供一个全面而深入的视角, 增进对这些具有特殊表型的实验小鼠的理解和认识, 推动相关领域的发展与进步。

早在基因工程技术应用于小鼠模型构建之前, 裸小鼠和SCID小鼠就因先天性免疫缺陷而成为医学生物学研究领域不可或缺的实验动物, 特别是在肿瘤学和免疫学研究、药品与生物制品的安全性评价、有效药品的临床前筛选等方面, 都发挥了重要的作用。然而, 这两种小鼠的培育历程却截然不同。

1 裸小鼠的起源及发现历程

1.1 裸小鼠的起源与遗传特性

裸小鼠的起源可追溯至20世纪60年代初, 最先是由英国格拉斯哥(Glasgow)鲁契尔医院病毒实验室的玛格丽特·格里斯特(Margaret Grist)博士在其饲养的白化小鼠种群(非近交系)中发现的。1962年, 有关这一突变小鼠的详细信息被正式记录并发表于《小

鼠简讯》^[3]。但在当时, 格里斯特博士对这只全身赤裸、无被毛的小鼠并没有多大兴趣, 故未对其开展深入的探索与分析。

4年后, 爱丁堡动物遗传研究所(the Institute of Animal Genetics, IAG)的斯坦利·帕特里克·佛拉纳根(Stanley Patrick Flanagan)从格里斯特处得到1只裸小鼠和2只同窝有被毛个体, 并对其进行了遗传学和生物学特性分析。遗憾的是, 这只裸小鼠(雄性)在死亡前没有得到后代; 而另外两只被毛正常(雌雄各一)的个体在交配后, 成功产下两窝共23个子代。佛拉纳根利用这些子代小鼠进行互交, 其中一对产下的后代中再次出现了无毛个体。根据后代性状分离数据, 他确定产下无毛个体的这对父母为杂合子。随后, 佛拉纳根利用这对杂合子和它们的后代建立了裸小鼠种群, 并将导致无毛特征的突变基因命名为“Nude”, 简称为“nu”。

佛拉纳根还发现雌性裸小鼠的生育能力极其低下。他将46只雌性裸小鼠与正常被毛雄鼠进行配对后, 仅有4只成功产子, 且这些雌性裸小鼠因乳腺发育不良无法产生乳汁而不能将子代养大。之后, 佛拉纳根还对裸小鼠的生长状况、毛发发育过程、nu基因与已知突变基因的连锁情况进行了研究, 并在1966年将上述结果进行整理后发表^[4]。遗憾的是, 尽管佛拉纳根的研究涵盖了多个方面, 但当时尚未发现裸小鼠最重要

的特性——无胸腺。

1.2 裸小鼠的免疫缺陷特性及其发现历程

在裸小鼠出现之前,细胞免疫学领域的研究常依赖于两种手段来操控小鼠的T细胞生成:一是使用药物抑制小鼠T细胞的产生,二是通过外科手术摘除小鼠的胸腺。早在1944年,McEndy等^[5]就发现早期切除高发白血病的AKR小鼠胸腺可以降低小鼠的白血病发生率;而切除C58小鼠的胸腺可有效抑制化学或辐射诱导的白血病发生。胸腺切除后,不仅会导致小鼠循环系统内淋巴细胞数目减少,还会导致抗体生成量减少。这些发现均表明,胸腺在免疫应答过程中发挥着重要作用。因此,胸腺切除术也成为当时制备免疫缺陷动物模型的常规方法。然而,胸腺切除术也存在致命的弱点。即幼年动物在胸腺切除后,往往因感染而在1~3周内死亡,或因胸腺切除不彻底而导致实验失败^[6]。同时,在模型制作过程中,胸腺切除不可避免地会给实验动物带来疼痛和不适。

1968年,苏格兰斯特拉斯克莱德大学(University of Strathclyde)生物学系的佩蒂路易斯(E. M. Pantelouris)从爱丁堡动物遗传研究所得到了裸小鼠。在解剖过程中,意外地发现裸小鼠胸腺发育不全^[7]。佩蒂路易斯进一步分析发现,裸小鼠的白细胞数量明显低于正常小鼠,仅为同窝野生型小鼠的1/4。裸小鼠天生缺乏胸腺,即意味着其有望替代胸腺切除小鼠,成为一种天然的免疫缺陷动物模型。这一发现的重要性远远超出其裸露无毛表型。因此,佩蒂路易斯的相关成果一经报告,便迅速引起了科学界的广泛关注。然而,在裸小鼠成为广泛可用的动物模型之前,如何提升其繁殖效率与生存能力是亟待解决的关键问题。

佛拉纳根在分析裸小鼠的生物学特性时发现,纯合型裸小鼠的生长速度比野生型或杂合同窝小鼠减缓了约30%。同时,他还发现,雌性裸小鼠的卵巢体积小,黄体缺失;雄性裸小鼠的精子活力差,精子尾部有卷曲等现象。这些特性都预示着裸小鼠的生殖能力存在问题。此外,裸小鼠的生存能力也是个大问题。因为在20世纪60年代,还不具有饲养无特定病原菌(specific pathogen free, SPF)级别动物的设施条件,无法控制动物种群中各种病原微生物的污染。裸小鼠因其免疫缺陷特性而无法抵抗病原微生物的侵袭。因此,在最初发现裸小鼠时,有超过一半的个体在出生后第2周死亡,仅有10%的个体能够存活至12周龄。若上述问题未能得到有效解决,裸小鼠便无法成为真

正可用的动物模型。

利用裸小鼠与其他品种小鼠进行杂交,是否可以筛选出携带 nu 基因的高生育力品系?这项研究最先是丹麦哥本哈根病理解剖研究所的病理学家——雷加德(Rygaard)和波维森(Povlsen)开展的。有趣的是,他们开展该实验的目的是验证当时新提出的“肿瘤免疫监控理论”。为此,他们将从爱丁堡动物遗传研究所得到的裸小鼠分别和纯系BALB/c、C3H、C57BL/6小鼠交配,并不断选育,成功获得了3种近交系裸小鼠新品系^[8]。这项工作是在1969—1972年完成的。在此期间,雷加德和波维森将 nu 基因引入到不同遗传背景的近交系小鼠中,虽然在一定程度上改善了裸小鼠的生物学性状,但仍未能克服其繁殖力低下和存活时间过短的问题。

1974年,美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)的汉森团队取得了突破性进展。他们成功地将BALB/c背景品系下的 nu 基因引入到了Swiss NIH远交系小鼠中,从而培育出了远交系裸小鼠。这一新品系裸小鼠的繁殖能力和抗病能力都得到了明显加强,研究者可以直接利用 nu/nu 纯合型雌雄鼠进行交配繁育后代^[9]。在进一步引入了SPF饲养体系后,裸小鼠感染病原微生物的风险显著降低,从而极大地延长了裸小鼠的寿命,使其能够达到接近于常规近交系小鼠的寿命水平。

1996年,决定裸小鼠表型的突变基因被确定,是由 $Foxn1$ 基因点突变导致编码蛋白提前终止,从而形成截短的无功能蛋白。该突变基因被称为 $Foxn1^{nu}$ ^[10]。显然 $Foxn1$ 基因具有多效性,能够同时影响小鼠的毛发和胸腺发育。裸体特征是因携带纯合 $Foxn1^{nu}$ 的小鼠毛囊中毛杆无法正常穿透表皮生长所致。

综上,裸体是一个易于观察和发现的表型,但很少有人会将其与免疫缺陷相联系。佛拉纳根虽然对裸小鼠的生物学特性进行了系统的分析,但却与发现裸小鼠的胸腺发育不良这一重要特性失之交臂。相比之下,佩蒂路易斯则更为细心和幸运,在裸小鼠突变体首次出现后的7年里,经过坚持不懈探索,最终发现了胸腺缺乏这一重要的生物学特性。鉴于当时艰难的保种和繁育条件,以及裸小鼠低生育力和低生存能力的背景,能够成功保留该突变个体实属难得。若不是因为发现其无胸腺,裸小鼠很可能早已淡出科学家的视野。尽管其裸露表型显而易见,但胸腺发育不良这一关键特性的发现却需要研究者具有细致入微的观察

力和些许运气，而这也正是科学探索的魅力所在。

2 SCID小鼠的发现及培育历程

2.1 SCID小鼠的发现与遗传特性

SCID小鼠是一种比裸小鼠更为严重的免疫缺陷型小鼠，无疑是继裸小鼠之后另一种极具研究价值的免疫缺陷型实验动物。然而，SCID小鼠的发现和培育却经历了与裸小鼠培育完全不同的历程。

20世纪80年代初，位于美国费城的福克斯蔡斯癌症研究中心（Fox Chase Cancer Center）的研究人员梅尔文·波斯玛（Melvin J. Bosma），采用免疫球蛋白重链（immunoglobulin heavy chain, Igh）同源导入近交系小鼠C.B-17，开展血清内不同亚型免疫球蛋白的定量分析实验。同源导入近交系是指通过连续多次回交后将一个基因导入到另一个近交系而培育成的新近交系。C.B-17就是通过连续的回交，将C57BL/6小鼠所携带的Igh^b亚型等位基因导入BALB/c小鼠，进而替代BALB/c原有的Igh^a亚型等位基因，从而形成的同源导入近交系小鼠。C.B-17小鼠与BALB/c小鼠唯一的不同就是Igh位点，前者为Igh^b/Igh^b，而后者为Igh^a/Igh^a。

2.2 SCID小鼠的免疫功能研究历程

在分析C.B-17小鼠血清中的Igh表达量时，波斯玛意外发现有4只（4/35）小鼠的血清内未检测到Igh^b基因的表达产物^[11]（产物浓度 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ）。起初，波斯玛认为可能是这几只小鼠在繁殖过程中出现了遗传污染，且污染源最有可能是BALB/c小鼠。为了验证这一假设，细心的波斯玛利用特异性检测Igh^a表达产物的试剂，对这4份血清样本进行了分析。然而，结果仍是阴性，说明这4只小鼠并未如先前所推测的那样，受到来自BALB/c小鼠的遗传污染。

面对这一难以解释的现象，波斯玛决定采取更为全面的检测策略，对其目前可用的所有免疫球蛋白相关试剂进行了测试。令人惊讶的是，这4只小鼠的免疫球蛋白家族成员中IgM、IgG3、IgG2b、IgG2a和IgA也不见了。这是一个极不寻常的结果。为便于后续的描述与分析，我们将此类无法检测到免疫球蛋白的个体暂时命名为Ig⁻小鼠；相应地，将可检测到免疫球蛋白的个体称为Ig⁺小鼠。

波斯玛通过谱系检查发现，这4只Ig⁻小鼠是同窝出生的兄妹，该窝另有3只Ig⁺个体。血清学分析结果显示，该窝小鼠的父亲也是Ig⁻，而母亲则是Ig⁺。上述结果表明，这些Ig⁻小鼠很可能是由于遗传突变所致。

为了验证这个假设，波斯玛用4只Ig⁻小鼠（雌雄各2只）两两进行交配后，发现所得5只后代全部为Ig⁻。接着，他将其中一只Ig⁻雄鼠与同窝的Ig⁺雌鼠进行交配，得到的5只后代中，有3只为Ig⁻，2只为Ig⁺。基于孟德尔遗传学定律，结合谱系与遗传分析结果，波斯玛得出结论：Ig⁻表型是由某个隐性突变基因所导致的。

进一步的分析结果表明，Ig⁻小鼠同时缺乏功能性T淋巴细胞和B淋巴细胞。早在20世纪50年代，学术界就有因先天性缺乏功能性T、B两种淋巴细胞而导致一类被称为SCID的病例报告^[12]。基于此，波斯玛将这个突变基因命名为*Scid*，并将这种小鼠命名为SCID小鼠^[13]。具体而言，纯合的C.B-17^{scid/scid}小鼠为Ig⁻个体，杂合型C.B-17^{+/scid}小鼠为Ig⁺个体。

SCID小鼠的外观与其主要遗传背景来源的BALB/c小鼠呈现高度相似性，不仅毛色继承了BALB/c小鼠的白化表型，并且在体重和生长发育指标上也与之相似。但SCID小鼠的胸腺、脾脏和淋巴结的重量不及野生型BALB/c小鼠对应器官重量的30%。通过组织病理学检查发现：SCID小鼠的胸腺被脂肪组织包围，无皮质结构，仅残存髓质，淋巴细胞缺陷；SCID小鼠胸腺在细胞组成上主要由类上皮细胞和成纤维细胞构成，边缘偶见灶状淋巴细胞群；脾脏是功能性B淋巴细胞成熟的重要组织，在SCID小鼠中表现为白髓区域不明显、脾小体主要由网状细胞构成、无淋巴细胞聚集；此外，SCID小鼠淋巴结无明显皮质区，副皮质区缺失，由网状细胞占据，小鼠肠黏膜下和支气管淋巴结少见，且结构内无淋巴细胞聚集^[14]。

1996年，SCID小鼠的突变基因也被鉴定出来，是淋巴细胞发育过程中V（D）J重组所必需蛋白激酶的一个亚基（protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit）的编码基因，简称为*Prkdc*。*Prkdc*^{scid}是由于*Prkdc*基因发生了点突变，导致蛋白翻译过程提前终止^[15]。在携带*Prkdc*^{scid}突变的SCID小鼠淋巴细胞发育过程中，抗原受体基因重组过程无法正常进行，从而无法产生功能正常的抗原受体蛋白，受影响的淋巴细胞在成熟之前就会死亡，或被体内的巨噬细胞、粒细胞和自然杀伤（natural killer, NK）细胞清除。由于SCID小鼠的非淋巴性造血细胞分化过程并未受该突变基因的影响，因此在SCID小鼠体内移植外源性正常骨髓细胞或胎肝细胞后，其淋巴组织将获得部分或完全重建，恢复正常生理功能^[16]。重建的淋巴细胞来自供体而非宿主本身，这一特性奠定了SCID小鼠可作为外

源细胞或组织移植模型的重要基础。

值得注意的是,并非所有SCID小鼠都缺乏功能性淋巴细胞,有2%~23%的个体具有数量有限的T、B淋巴细胞,并能恢复部分免疫功能,即所谓的SCID小鼠“渗漏”现象^[17]。渗漏SCID小鼠虽然携带纯合的*Prkdc^{scid}*基因,但仍会有少量淋巴细胞不受影响而发育成熟。谱系分析和选育研究结果表明,SCID小鼠的渗漏特性并不具备遗传性,而是与年龄和饲养环境相关^[17],随着年龄增长,渗漏SCID小鼠比例呈现上升趋势。在渗漏SCID小鼠的血清样本内,还可检测出一定水平的免疫球蛋白,在其组织内亦能检测出少量B细胞。此外,胸腺内的T细胞受体(T-cell receptor, *TCR*)基因可发生重排,并且可检测出携带T细胞特异性抗原标志的细胞。约有50%的渗漏个体对同种异型皮肤移植有排斥作用^[17]。目前,关于SCID小鼠的渗漏机制尚不明确,需要进一步研究以揭示其过程。

综上,相较于无胸腺裸小鼠历经了数年和多位研究者共同努力才得以发现的艰辛历程,SCID小鼠的发现过程似乎没有那么复杂。但*Scid*基因突变也没有如*nu*基因突变那样形成一个显而易见的关联表型(裸体),因此并不容易被发现或检测到。在面对低比例(4/35)的异常实验结果时,波斯玛并未置之不理,而是对其产生原因提出了假设,并通过严格检验和分析来验证这些假设,最后抽丝剥茧般揭示了这一意料之外的重要发现。这一过程不仅体现了科学研究的严谨性,也彰显了科学研究的真谛和魅力所在。

致谢: 本文得到了“中国科学院战略生物资源专项实验动物平台项目”(编号:KFJ-BRP-005)的支持。

[参考文献 References]

- [1] 孙强. 近交系小鼠培育及其背后的故事[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(3): 335-338. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.085.
- [2] 孙强. NOD小鼠培育接力赛[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 583-586. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.144.
- [3] ISAACSON J H, CATTANACH B M. Two new 'hairless' mutants - Sha and Hfh11[J]. Mouse News Lett, 1962, 27:31.
- [4] FLANAGAN S P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse[J]. Genet Res, 1966, 8(3): 295-309. DOI: 10.1017/s0016672300010168.
- [5] MCENDY D P, BOON M C, FURTH J. On the role of *Thymus*, *spleen*, and gonads in the development of leukemia in a high-leukemia stock of mice[J]. Cancer Res, 1944, 4:377-383.
- [6] MILLER J F. Burnet oration. The thymus then and now[J]. Immunol Cell Biol, 1994, 72(5): 361-366. DOI: 10.1038/icb.1994.54.
- [7] PANTELOURIS E M. Absence of *Thymus* in a mouse mutant [J]. Nature, 1968, 217(5126):370-371. DOI: 10.1038/217370a0.
- [8] PANTELOURIS E M. Athymic development in the mouse[J]. Differentiation, 1973, 1(6): 437-450. DOI: 10.1111/j. 1432-0436.1973.tb00143.x.
- [9] RYGAARD J, POVLSEN C O. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance[J]. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol, 1974, 82(1): 99-106. DOI: 10.1111/j. 1699-0463.1974.tb02299.x.
- [10] SEGRE J A, NEMHAUSER J L, TAYLOR B A, et al. Positional cloning of the nude locus: genetic, physical, and transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat[J]. Genomics, 1995, 28(3): 549-559. DOI: 10.1006/geno.1995.1187.
- [11] BOSMA M J, CARROLL A M. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses[J]. Annu Rev Immunol, 1991, 9:323-350. DOI: 10.1146/annurev.iy.09. 040191.001543.
- [12] GLANZMANN E, RINIKER P. Essential lymphocytophthisis; new clinical aspect of infant pathology[J]. Ann Paediatr, 1950, 175(1-2):1-32.
- [13] BOSMA G C, CUSTER R P, BOSMA M J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse[J]. Nature, 1983, 301(5900):527-530. DOI: 10.1038/301527a0.
- [14] CUSTER R P, BOSMA G C, BOSMA M J. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms[J]. Am J Pathol, 1985, 120(3): 464-477.
- [15] BLUNT T, GELL D, FOX M, et al. Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(19):10285-10290. DOI: 10.1073/pnas.93.19.10285.
- [16] 郑亚伟, 郝莎, 胡林萍, 等. 免疫缺陷小鼠和人源化小鼠模型的发展及其在血液学研究中的应用[J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(11): 966-971. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.11.018.
- [17] BOSMA G C, FRIED M, CUSTER R P, et al. Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice[J]. J Exp Med, 1988, 167(3):1016-1033. DOI: 10.1084/jem.167.3.1016.

(收稿日期:2024-10-23 修回日期:2024-12-10)

(本文编辑:丁宇菁,张俊彦,干明红)

[引用本文]

孙强. 殊途同归的免疫缺陷小鼠培育史[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 700-703. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.153.