

实验动物与比较医学



期刊网站

Shiyan Dongwu Yu Bijiao Yixue

双月刊 1981年9月创刊 第41卷 第5期(总第189期)

2021年10月25日出版

主 管

上海科学院

主 办

上海市实验动物学会

上海实验动物研究中心

编 辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主 编

高 诚

出 版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

富群华

印 刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发 行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发售

邮发代号: 4-789

零 售

《实验动物与比较医学》编辑部

201203, 上海市金科路3577号

电话: 021-50793657

联系人: 王伟民

定 价

每期10.00元, 全年60.00元

中国标准连续出版物号

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

版 权 声 明

2021年版权归《实验动物与比较医学》编辑委员会所有, 未经授权, 不得转载、摘编本刊文章。

除非特别说明, 本刊刊出的所有文章

不代表上海市实验动物学会、上海

实验动物研究中心和《实验动物与

比较医学》编辑委员会的观点。

如有印刷或装订质量问题, 请向本刊编辑部调换。

目 次

创刊40周年专家论坛

复杂疾病小鼠模型构建新策略: 类精子单倍体胚胎干细胞介导的
半克隆技术

赖梭梅, 丁一夫, 李劲松 369

CNAS实验动物机构认可进展

吴孝槐 384

利用中国仓鼠制备疾病模型的优势与进展

高继萍, 陈朝阳, 轩瑞晶, 张锐虎, 宋国华 392

创刊40周年专题: 各地实验动物科学发展

云南省实验动物工作40年发展历程与思考

罕园园, 李 娜, 代解杰 399

论著: 人类疾病动物模型

MC38结肠癌小鼠肿瘤浸润免疫细胞的动态变化

张波扬, 陈煥鹏, 余文兰, 刘忠华, 黄朝峰 409

CD137信号调控内皮细胞间质转化促进小鼠心脑血管新生

翁嘉懿, 马雪兴, 李 渊, 孙康云 418

咽立爽口含滴丸对慢性咽炎家兔免疫细胞亚群及NF- κ B信号 通路的影响

唐 焱, 喻国冻, 何星辰, 王 佳, 张 田 426

多囊卵巢综合征-胰岛素抵抗大鼠子宫组织中PPARs异常表达 与胰岛素抵抗的关系

魏 巍, 陈艺华, 张秀智, 冷义福, 李 纯, 尹天晓 435

探索与实践: 生物安全

病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中的作用

探讨

罗银珠, 闵凡贵, 王 静, 何丽芳, 潘金春 443

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981

Volume 41, Issue 5

October 25, 2021

Directed by

Shanghai Academy of Science and
Technology

Sponsored by

Shanghai Laboratory Animal Science
Association
Shanghai Laboratory Animal Research
Center

Edited by

Editorial Board of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*

Editor-in-Chief

GAO Cheng

Published by

Editorial Office of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*
3577 Jinke Road, Pudong District,
Shanghai 201203, China
Tel: 0086-21-50793657
E-mail: bjb50793657@163.com
<http://www.slarc.org.cn/dwyx>

Managing Editor

FU Qunhua

Printed by

Shanghai Newcabo Business Printing
Co., Ltd.

Distributed by

Shanghai Postal Bureau of Press Issuing
Postal code: 4-789

Price

RMB 10.00 per issue

CSSN

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

Copyright© 2021 by the Editorial

Board of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*

No content published by the journal of *Laboratory
Animal and Comparative Medicine* may be
reproduced or abridged without authorization.

All articles published represent the opinions of the
authors, and do not reflect the official policy of
the Editorial Board of *Laboratory Animal and
Comparative Medicine*, unless this is clearly
specified.

Executive Editors for This Issue

ZHANG Junyan, FU Qunhua

CONTENTS IN BRIEF

40th Anniversary Expert Forum

A New Strategy for Constructing Mouse Models of Complex Diseases:

Semi-cloning Technology Based on Sperm-like Haploid Embryonic Stem Cells

LAI Suomei, DING Yifu, LI Jinsong 370

Progress on the Accreditation for Laboratory Animal Institutions of CNAS

WU Xiaohuai 384

Advantages and Progress of Using Chinese Hamsters to Construct Disease Models

GAO Jiping, CHEN Zhaoyang, XUAN Ruijing, ZHANG Ruihu, SONG Guohua 392

40th Anniversary: Development of Laboratory Animal Science Across China

History and Countermeasures Discovered from 40-year Development of

Laboratory Animals in Yunnan Province

HAN Yuanyuan, LI Na, DAI Jiejie 399

Original Article: Animal Models of Human Diseases

Dynamic Changes of Tumor-infiltrating Immune Cells in Mice with MC38

Colon Cancer

ZHANG Boyang, CHEN Huanpeng, YU Wenlan, LIU Zhonghua, HUANG Chaofeng
..... 409

CD137 Signaling Promotes Cardio-cerebral Angiogenesis in Mice Through

Regulating Endothelial-mesenchymal Transition

WENG Jiayi, MA Xuexing, LI Yuan, SUN Kangyun 418

Effects of Pharyngeal Refreshing Pills on Immune Cell Subsets and NF- κ B

Signaling Pathway in Chronic Pharyngitis

TANG Yi, YU Guodong, HE Xingchen, WANG Jia, ZHANG Tian 426

Relationship Between the Abnormal Expression of PPARs and Insulin Resistance in

Uterus of Rats with Polycystic Ovary Syndrome and Insulin Resistance

WEI Wei, CHEN Yihua, ZHANG Xiuzhi, LENG Yifu, LI Chun, YIN Tianxiao 435

Exploration and Practice: Biosafety

Prevention and Control of Pathogenic Microorganisms for the Management and

Biosafety Control in Laboratory Animal Facilities

LUO Yinzhu, Min Fangui, WANG Jing, HE Lifang, PAN Jinchun 443

Practice and Exploration of Laboratory Animal and Laboratory Safety Training

for Medical Freshmen

SONG Guoying, XU Yan, ZHU Meilin, ZHANG Hongwei, LI Pei 450

Design of Two-dimensional Code Information Management System for Animal

Corpses in Medical Experimental Teaching

JIN You, WANG Chenchen, YU Shangbin, LUO Junyu, ZHOU Shunchang 455

Exploration and Practice: Laboratory Animal Management

Design and Application of an Online Centralized Procurement System for Laboratory

Animals in Universities: Capital Medical University as an Example

LIU Xiaonan, ZHANG Wei, MENG Xia, LU Jing 459

《实验动物与比较医学》第六届编辑委员会

The Editorial Board of

Laboratory Animal and Comparative Medicine

顾问：(按姓氏汉语拼音为序)

窦如海 漆畹生 尹松林

主 编：高 诚

副主编：(按姓氏汉语拼音为序)

陈洪岩	陈洛南	陈学进	代解杰	顾为望	富群华
高 翔	贺争鸣	黄 韧	李根平	刘恩岐	秦 川
徐 平	薛智谋	燕顺生	姚 明		

编 委：(按姓氏汉语拼音为序)

常 艳	陈国强	陈国元	陈 来	陈 丽	陈立军
陈民利	陈振文	褚 芳	崔淑芳	杜小燕	韩凌霞
胡 樱	冷 颖	李建军	李 娜	李善刚	李 垚
刘吉宏	刘忠华	卢 静	陆彩霞	陆嘉琦	马 璟
潘学营	邵义祥	师长宏	宋国华	宋晓明	孙兆增
唐利军	唐小江	唐 瑛	陶元清	王纯耀	王德军
王 刚	王福金	王靖宇	王玉娥	王可洲	王胜昌
汪思应	王 萧	王 勇	魏建军	魏 强	吴宝金
吴 强	夏长友	肖 杭	谢家骏	谢建云	邢凤英
邢正弘	徐 彭	徐艺玫	薛整风	闫明霞	杨 斐
杨建业	杨伟敏	应华忠	袁 进	恽时锋	张 泉
张永斌	张 钰	张 周	赵 静	赵四海	郑和平
郑志红	周光兴	周 洁	周文江	周正宇	朱顺星

王建飞 (加拿大) Kathryn Bayne (美国)

Judy MacArthur Clark (英国)



李劲松, 博士, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(原生物化学与细胞生物学研究所)研究员, 从事干细胞与胚胎发育相关研究。率领团队建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞(即“类精子干细胞”), 证明其能代替精子使卵子受精产生健康小鼠(即“半克隆技术”), 并利用类精子干细胞携带 CRISPR/Cas9 文库实现了小鼠个体水平的遗传筛选; 提出并推动基于类精子干细胞技术的基因组标签计划。相关研究成果于 2011 年和 2012 年入选“中国科学十大进展”。以第一作者或通信作者身份在 *Cell*、*Nature*、*Cell Stem Cell*、*Nature Cell Biology* 等杂志发表 60 余篇研究论文。荣获中国科学院“百人计划”、国家杰出青年科学基金、中青年科技创新领军人才、国家百千万

人才工程、中组部万人计划。

丁一夫, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(原生物化学与细胞生物学研究所)李劲松研究组助理研究员, 主要从事以类精子胚胎干细胞为工具的人类复杂疾病的动物模拟研究, 参与科技部、国家自然科学基金委员会、上海市科委的多个科研项目, 以(并列)第一作者在 *Cell Research*、*Nature Cell Biology*、*Methods in Molecular Biology*、*Science China-Life Science* 等杂志上发表科研论文 7 篇。



复杂疾病小鼠模型构建新策略: 类精子单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术

赖梭梅^{1,2}, 丁一夫¹, 李劲松¹

[1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所), 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031; 2. 中国科学院大学, 北京 100039]

[摘要] 类精子单倍体胚胎干细胞是源自小鼠孤雄囊胚中的一种新型单倍体胚胎干细胞, 仅含有父源遗传物质, 性染色体为 X 染色体, 能在体外长期自我更新、增殖或诱导分化, 并可以利用 CRISPR 系统进行单基因或多基因的编辑, 能替代精子使卵母细胞受精。区别于原核注射、卵胞质内注射获得嵌合体或利用四倍体补偿技术等传统构建基因修饰小鼠模型的方法, 通过将基因编辑后的类精子单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞中, 可以高效稳定地一步获得基因型确定的半克隆小鼠, 不会存在嵌合现象, 原代小鼠即可用于研究。基于类精子单倍体胚胎干细胞获得的多基因精准编辑的复杂疾病小鼠模型, 可以在生物个体水平上阐述多个基因协同互作的效应, 从而更充分地模拟复杂的、可能受多个基因影响的人类疾病的各种病理特征, 以挖掘新的诊断和治疗方法。

[关键词] 单倍体; 类精子单倍体胚胎干细胞; CRISPR/Cas9; 小鼠疾病模型

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0369-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(32030029;31730062;31821004)

[作者简介] 赖梭梅(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 以类精子胚胎干细胞为工具的人类复杂疾病的动物模拟。

E-mail: laisuomei2020@sibcb.ac.cn

[通信作者] 李劲松(1971—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 利用类精子胚胎干细胞介导的半克隆技术进行生殖细胞发育及疾病模型研究。E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

丁一夫(1990—), 男, 理学学士, 助理研究员, 研究方向: 以类精子胚胎干细胞为工具的人类复杂疾病的动物模拟。E-mail: yfding@sibcb.ac.cn

A New Strategy for Constructing Mouse Models of Complex Diseases: Semi-cloning Technology Based on Sperm-like Haploid Embryonic Stem Cells

LAI Suomei^{1,2}, DING Yifu¹, LI Jinsong¹

(1. Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Correspondence to: LI Jinsong, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn; DING Yifu, E-mail: yfding@sibcb.ac.cn

[Abstract] The development of haploid genetics has motivated studies on genome evolution and function, especially the technological advancements in recent years have prompted the birth of culture techniques for mammalian haploid embryonic stem cells (haESCs). Sperm-like haESCs are novel haESCs derived from mouse parthenogenetic blastocysts. Sperm-like haESCs only contain paternal genetic material, and their sex chromosome is the X chromosome. They can self-renew, differentiate, and proliferate *in vitro* for a long time. Furthermore, editing single or multiple genes using the CRISPR system is possible for sperm-like haESCs, which can replace sperms to fertilize oocytes. In contrast to traditional methods for constructing mouse models, such as pronuclear injection, cytoplasmic injection, and tetraploid complementation, by injecting sperm-like haESCs after gene editing into oocytes, semi-cloned mice with a definitive genotype can be obtained efficiently and stably without chimerism, and primary mice can be used for research. The mouse disease model based on multiple precisely edited genes obtained from sperm-like haESCs can explain the effect of multiple genes synergistic interaction at the level of biological individuals to completely simulate various pathological characteristics of complex human diseases that may be affected by multiple genes, and this model facilitates the exploration of novel diagnostic and therapeutic methods.

[Key words] Haploid; Sperm-like haploid embryonic stem cells; CRISPR/Cas9; Mouse disease model

由于能够掩盖发生的隐性突变, 提高环境适应度, 二倍体基因组是大多数动物的典型特征, 但这恰好限制了基于突变研究的遗传学的发展^[1]。而单倍体基因组具有外显优势, 非常适合用于在体外分析各种突变对基因功能的影响。在自然状态下, 因酵母能够以单倍体形式稳定存活^[2], 故围绕功能基因筛选的研究常常在酵母上开展。同时, 科研人员一直试图构建一种可用于体外筛选的单倍体细胞系, 尤其是哺乳动物的单倍体细胞系。

自然状态下哺乳动物体内的单倍体细胞只有精子和卵细胞, 但是目前的技术尚无法实现体外长期培养精子或卵细胞以用于研究^[3-4]。科研人员在19世纪70年代就探索利用胚胎分割^[5]、孤雌激活卵母细胞^[6]、显微去除原核^[7]等方法构建单倍体胚胎, 并成功地获得了小鼠的单倍体胚胎^[8]。然而单倍体基因组在体外会自发地二倍体

化, 因此体外长期培养单倍体细胞成为了一个难以逾越的壁垒。直到2011年, 科研人员才实现哺乳动物单倍体胚胎干细胞的体外培养^[9]。

因为单倍体细胞的突变都是显性的, 在类精子单倍体胚胎干细胞技术诞生之前, 单倍体的应用主要集中于功能基因筛选。2009年, Carrette等^[10]借助人慢性髓细胞性白血病细胞系KBM-7(该细胞系除了8号染色体外, 其余染色体都是单倍体核型)进行遗传筛选。他们利用KBM-7单倍体细胞筛选细胞致死性膨胀毒素(cytolethal distending toxins, CDTs)所必需的宿主因子, 并通过在单倍体上大规模敲除基因, 使得筛选病原体致病所必需的宿主因子如毒素、病毒、受体的配体成为可能。最后研究者成功找到了鞘磷脂合成酶1和G蛋白偶联受体TMEM181分别独立地插入失活的抗CDTs的细胞系。2008年, Chong等^[11]构建了条件性Drosha敲除的小鼠。Drosha

在细胞核中催化 pri-miRNA 转录产物转化为 pre-miRNA 茎环前体^[12], 这对于 miRNA 加工的起始非常重要。2011 年之前尚无 Drosha 敲除细胞系的报告。直到 2011 年, Elling 等^[13] 利用基因诱捕 (gene trap) 技术, 在单倍体细胞上获得了一株不表达 Drosha 的细胞系。

在过去的一个世纪里, 基因筛选已经帮助人们阐明了多种生物学过程^[14]。但对于基因功能的研究, 尤其是复杂的人类疾病, 仅在细胞水平上进行基因筛选是远远不够的, 一些简单的动物模型不足以阐明疾病发生的具体机制。因此, 构建更贴近人类发病模式的复杂疾病小鼠模型在疾病相关研究中显得非常重要。

近几十年来, 基因编辑小鼠模型使得生物领域的基础研究有了飞跃式进展, 尤其是与人类有关的研究如衰老^[15]、肿瘤^[16]、自闭症^[17]、抑郁症^[18]、肥胖^[19], 以及各种器官损伤、再生、修复等基础研究。但科研工作者仍然渴求在短时间内以较低成本获得特定的基因型小鼠, 这需要实现基因组的编辑, 并将这种编辑传递到生殖系中。人们最开始是通过同源重组实现基因组的编辑, 然后是病毒介导的转基因、重组锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN) 和转录激活因子样效应蛋白核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 技术, 尤其是 2020 年诺贝尔化学奖得主 Charpentier 和 Doudna 等开发的成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /CRISPR 相关蛋白核酸酶 9 (CRISPR-associated nuclease 9, Cas9) 技术。这些技术的出现使得基因组编辑越来越便捷、精准。例如, 应用原核注射或卵胞质内注射, 或者通过囊胚注射, 可以将基因编辑上升到小鼠个体水平。

遗憾的是, 采用常规的动物模型建立技术产生的模型小鼠存在或多或少的嵌合, 嵌合体需要通过交配获得无嵌合的小鼠。而如果是多基因同时编辑的模型动物, 在交配时由于存在基因分离现象, 会极大地增加饲养与鉴定的成本。2012 年类精子单倍体胚胎干细胞的诞生^[20] 以及后续的优化工作^[21], 证明了利用类精子单倍体胚胎干

细胞可以高效地获得多基因杂合编辑的半克隆小鼠, 可直接将细胞水平的编辑传递到小鼠个体水平, 为人类复杂疾病的动物模型研究带来了新的工具。

1 类精子单倍体胚胎干细胞技术的发展历程

核移植技术和单倍体胚胎干细胞培养技术的优化, 使得从单倍体胚胎中获取可体外稳定培养的单倍体胚胎干细胞成为可能^[22]。1970 年, Freed 等^[23] 在美洲豹蛙的孤雄胚胎中建立了两株单倍体细胞系, 其中一株可以传代 200 次以上。1975 年, Philippe 等^[24] 成功在体外培养了蟑螂孤雌胚胎来源的单倍体细胞。1978 年, Debec^[25] 建立并培养了黑腹果蝇的单倍体细胞。1999 年, Kotecki 等^[26] 从慢粒细胞白血病患者的骨髓中通过连续亚克隆的方式分离出了“近单倍体”的细胞系 KBM-7, 该细胞系中除了 8 号染色体是 2 条, 其余皆为 1 条。2009 年, Yi 等^[27] 构建了青鳉鱼孤雌单倍体多能干细胞, 再次将单倍体细胞的研究推向高潮。然而在哺乳动物胚胎中, 单倍性维持和发育并不兼容, 尽管在卵圆筒期 (egg cylinder stage) 的孤雌胚胎中观察到了单倍体细胞的存在, 但是存活的胚胎中细胞多为二倍体^[9]。直到 2011 年, Leeb 等^[9] 引入了 2i 培养系统 (含有两个小分子抑制剂 PD184352、CHIR99021) 后, 才成功获得了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞, 并通过流式分选富集单倍体, 可在体外维持该细胞系的单倍性 35 代左右。PD184352 和 CHIR99021 通过抑制糖原合成酶激酶 3 和丝裂原活化的细胞外信号调节激酶信号通路, 促进胚胎干细胞的自我更新^[28-29], 白血病抑制因子可抑制胚胎干细胞的分化^[29]。同年 Elling 等^[13] 也建立了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞系。但是 Leeb 和 Elling 等只是通过多能性实验验证了他们获得的孤雌单倍体胚胎干细胞具有体内外的分化能力, 研究并未证明其获得的小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞能否发生生殖系嵌合, 是否保留母源基因组的表观遗传特性, 以及是否能代替卵子基因组获得半克隆小鼠。

单倍体胚胎干细胞研究的一个重大突破是

2012年Li带领的团队首次建立了小鼠孤雄胚胎来源的单倍体胚胎干细胞,这些孤雄单倍体胚胎干细胞保持了大部分的父源印记,表达典型的多能性基因,并在注射到二倍体囊胚时,可嵌合发育成生殖系在内的各种组织;最重要的是孤雄单倍体胚胎干细胞在注入卵母细胞后可以产生可育的小鼠^[20]。同年Zhou带领的团队也独立建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞,并证明了这类细胞替代精子内遗传物质的可能性^[30]。

此外,孤雄单倍体胚胎干细胞的出现使得复杂基因编辑小鼠的获取变得更加容易。但是通过注射孤雄单倍体胚胎干细胞获得小鼠的效率很低,不到移植胚胎的2%,并且还有大约50%的半克隆小鼠呈现出生长迟缓的表型,在出生后不久就死亡。低出生效率、生长迟缓的现象直接阻碍着利用孤雄单倍体胚胎干细胞构建基因修饰小鼠。直到2015年,Zhong等^[31]利用CRISPR/Cas9技术在孤雄单倍体胚胎干细胞中将H19、IG差异性甲基化区域(differentially methylated region, DMR)敲除,这种敲除后的孤雄单倍体胚胎干细胞的基因组更接近精子中的状态;进一步将双敲除的孤雄单倍体干细胞注射到卵母细胞后,产生健康半克隆小鼠的效率高达22.3%,这比2012年Yang等^[20]的研究结果提高了10倍,真正意义上将孤雄单倍体胚胎干细胞由概念上的创新转变为类精子单倍体胚胎干细胞这一强有力的构建小鼠模型的工具。次年,Yang等^[32]通过孤雌激活的方法,成功获得了两株食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞MPH1和MPH2。食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞具有胚胎干细胞的典型特征;最重要的是,食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞支持体外遗传操作,能够用于大规模的遗传筛选研究。

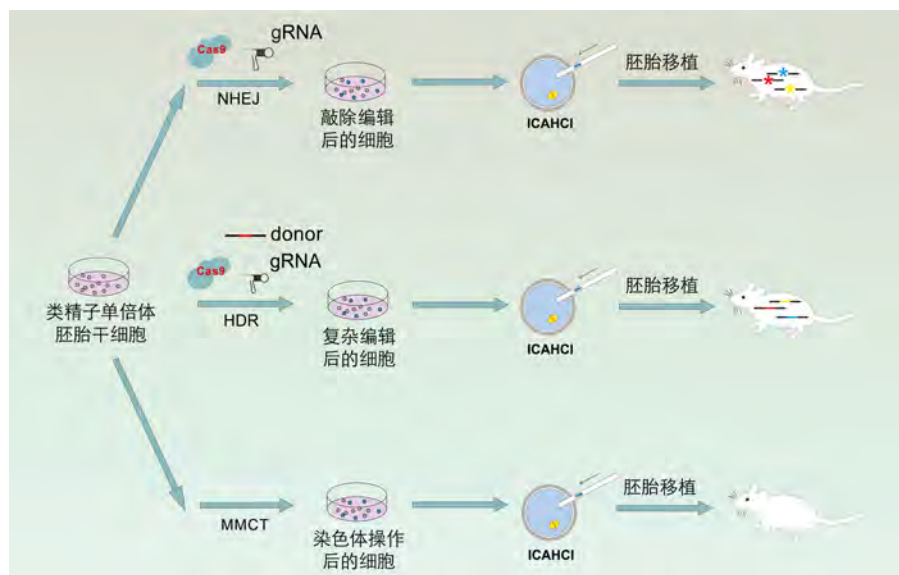
2016年Li等^[33]将小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞和大鼠的孤雄单倍体胚胎干细胞融合在一起,形成的异源二倍体不仅含有稳定的基因组,而且具有分化成三胚层和早期生殖细胞的多能性;同时,小鼠和大鼠单倍体胚胎干细胞的等位基因对异源二倍体中的基因表达贡献类似。同年Sagi等^[34]和Zhong等^[35]分别采用孤雌激活和去除受精卵雄原核的方式,从单倍体孤雌囊胚中获得了人单倍体胚胎干细胞系。随后,Zhong等^[35]

和Li等^[36]证明将敲除了2个印记基因DMR(H19、IG)的孤雌单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞中,可以产生存活的孤雌来源小鼠。2年后,Li等^[37]研究发现,敲除了7个母源性高甲基化印记基因(Nespas、Grb10、lgf2r、Snrpn、Kcnq1、Peg3和Gnas)的孤雄单倍体胚胎干细胞和精子共注射后,采用四倍体补偿技术,可以产生存活的孤雄小鼠,但是这些孤雄小鼠出生后不久便相继死亡,提示目前仍有很多的印记相关问题有待研究。

2 类精子单倍体胚胎干细胞的特性

为了获得类精子单倍体胚胎干细胞,首先需要将受精卵中的雌原核去除以获得孤雄单倍体胚胎,进一步将体外培养至囊胚时期的孤雄单倍体胚胎的内细胞团分离进行培养,就可以获得类精子单倍体胚胎干细胞。类精子单倍体胚胎干细胞兼具二倍体干细胞和单倍体精子的诸多特性,其本质仍是胚胎干细胞,因此在形态、分化、增殖、基因表达图谱等方面都十分类似于二倍体胚胎干细胞。

类精子单倍体胚胎干细胞在体外可形成拟胚体,并进一步分化为各类型的细胞。向严重免疫缺陷小鼠皮下注射类精子单倍体胚胎干细胞后,可产生包含所有胚层的畸胎瘤。把类精子单倍体胚胎干细胞注射到二倍体囊胚中后,可以在12.5 d的胚胎中体细胞和生殖系中检测到类精子单倍体胚胎干细胞的痕迹^[30]。Yang等^[20]通过免疫印迹发现,类精子单倍体胚胎干细胞表达胚胎干细胞的标志基因如Nanog、Oct4、Sox2和SSEA1,微阵列表达图谱表明其基因表达模式与小鼠的二倍体胚胎干细胞接近。类精子单倍体胚胎干细胞只有一套父源的遗传物质,它的性染色体是X染色体,通过卵胞质内单细胞注射技术,将类精子单倍体胚胎干细胞注射进卵母细胞,可以使之受精并发育,产生后代全为雌性的半克隆小鼠。类精子单倍体胚胎干细胞和孤雌单倍体细胞相近,通过定期的流式细胞分选富集单倍体^[13, 20, 30],可以在体外长期传代培养并保持单倍体性。上述这些特性使得类精子单倍体胚胎干细胞支持多轮的基因编辑,进而获得携带多基因编辑的小鼠(图1)。



注：NHEJ 全称 Non-homologous end joining，即非同源末端连接；HDR 全称 Homologous recombination，即同源重组；MMCT 全称 Microcell mediated chromosome transfer，即微细胞介导的染色体转移技术；ICAHCI 全称 Intracytoplasmic AG-haESCs injection，即卵胞质内孤雄单倍体细胞注射术；gRNA 全称 guide RNA，即向导 RNA。

图 1 类精子单倍体胚胎干细胞上的遗传修饰可以一步传递至子代小鼠中

Figure 1 Genetic modification of sperm-like haploid embryonic stem cells can be transmitted to offspring mice in one step

3 基因修饰小鼠模型的发展历史

基因修饰小鼠模型一直是科学界广泛使用的动物模型之一。1974 年 Jaenisch 等^[38]将猴空泡病毒 40 (SV40) DNA 注射到小鼠囊胚腔内，这些囊胚大约有 40% 可以正常发育且在 1 岁时也未检测到肿瘤；用从这些动物的不同器官中提取的 DNA 进行 SV40 特异性 DNA 序列检测，结果显示大约 40% 的成年小鼠的器官中检测到了 SV40 表达。1976 年 Jaenisch^[39]又用小鼠白血病病毒 (M-MuLV) 感染刚出生的小鼠和植入前的小鼠胚胎 (4~8 细胞时期)，两种小鼠均出现病毒诱导的白血病。与新生小鼠感染不同，着床前胚胎的感染可导致病毒整合到生殖系中并传递给下一代。1980 年 Gordon 等^[40]报告，将基因序列注射到小鼠胚胎的原核中，当胚胎被移植到代孕母鼠体内并发育到期时，可以成功地将目的基因序列保留在小鼠基因组中。1981 年 Evans 等^[41]成功地建立了小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cells) 的体外培养技术。1985 年，Smithies 等^[42]在哺乳动物细胞中通过同源重组完成对特定人类基因

的修饰，而又不影响基因组的其他部分。

胚胎干细胞的体外培养和同源重组技术的出现是伟大的突破，由于可以精确地操纵小鼠基因组，进而可以创建人类疾病的动物模型，因此在过去的 50 年里推动生物学研究取得了长足的进步^[43]。1987 年 Thomas 等^[44]首次报告，通过体外同源重组成功突变了小鼠胚胎干细胞的内源性次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT) 基因。1993 年 Gu 等^[45]首次应用 Cre/LoxP 系统，获得了一个删除 IgH 位点的 JH-E μ 片段小鼠品系 JHT。2009 年 Geurts 等^[46]将编码 ZFNs 的 DNA 或 mRNA 单次注射到单细胞大鼠胚胎中，导致靶基因位点发生 25%~100% 的破坏，并且这些突变可以有效地传递给后代。2010 年 Meyer 等^[47]通过 ZFN 介导小鼠受精卵的同源重组。2012 年 Doudna 团队与 Charpentier 团队合作，创造性地将 CRISPR/Cas9 系统用于基因组的定向编辑^[48]。2013 年 Zhang 带领的团队首次利用 CRISPR/Cas9 系统在人和小鼠细胞的内源性基因组位点上实现

了精确编辑^[49]。2015年Zhong等^[31]将CRISPR/Cas9技术与类精子单倍体胚胎干细胞相结合,通过简单的步骤可以稳定高效地批量获得基因修饰的半克隆小鼠,实现了个体水平的基因筛选。

4 构建基因修饰小鼠的胚胎操作技术

构建小鼠疾病模型主要包含两部分:基因组的编辑和胚胎的操作、培养。基因组编辑的方法主要有同源重组、病毒、转座子、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9等。在体外培养的哺乳动物细胞中,外源DNA片段和染色体基因之间如果序列存在相似性,便会发生同源重组,只是这种重组的频率非常低^[42]。病毒介导的基因组修饰是随机的,常用的可整合到基因组上的病毒有慢病毒、逆转录病毒等。随机插入存在破坏正常基因功能的可能,需要在鉴定时加以注意。PiggyBac转座酶通过剪切/粘贴机制介导基因的转移^[50]。转座过程不依赖DNA复制,具有较高的插入效率。PiggyBac转座插入的位点同样不是固定的,存在破坏正常基因功能的可能,需在鉴定时加以注意。

ZFN与TALEN都是一类人工合成的限制性内切酶,由DNA结合域与限制性内切酶的DNA切割域融合而成,ZFN与TALEN发生的基因编辑一般是位点特异的。Cas9是一种由向导RNA(guide RNA, gRNA)引导,能够使DNA发生双链断裂的核酸内切酶。Cas9对基因组的切割依赖于与目的序列配对的gRNA序列以及序列附近的PAM(NGG)位点。CRISPR/Cas特异性编辑所依赖的gRNA的设计和合成难度也远远小于TALEN和ZFN技术的DNA识别模块的构建过程。所以,CRISPR/Cas技术是目前实现基因组精确编辑的最常用手段^[48]。

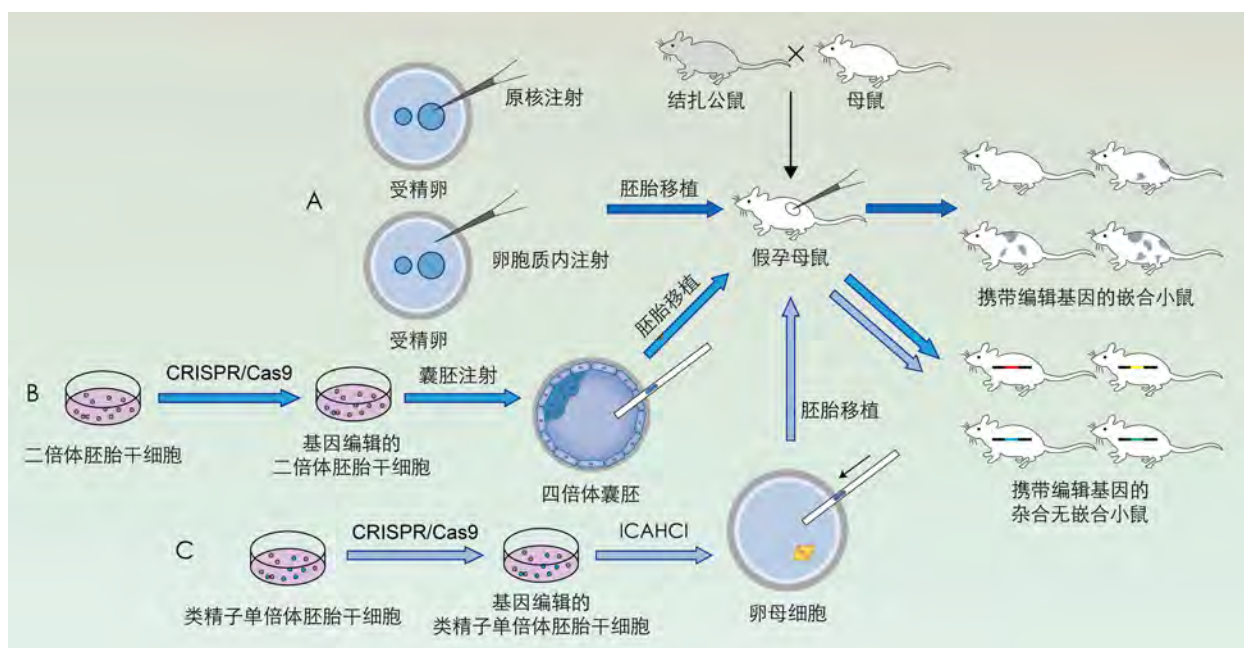
除了上述能对基因组进行修饰的分子生物学技术外,仍然需要借助胚胎操作技术将遗传修饰体现在个体水平上,才能在真正意义上建立可用于研究的基因修饰小鼠模型。目前,广泛利用原核注射、卵胞质内注射、基于胚胎干细胞的囊胚注射、四倍体补偿这4种方法来构建小鼠模型。

原核注射是第一个被证明可有效产生基因整合小鼠的技术^[40]。它将外源DNA通过显微注射

的方法注射到受精卵的原核内,注射的DNA可以整合到小鼠受精卵的基因组中,并稳定遗传给后代。由于DNA都是随机整合到基因组上,无法预测整合的转基因拷贝数,这就导致每一只原代小鼠有自身独特的整合位点、整合方式、拷贝数,需一一进行分析。原核注射也可以结合PiggyBac系统,从而限定插入局限在基因组的TTAA位点。如果一个原代小鼠的多条染色体发生转基因的整合,其后代小鼠也可能产生不同的品系。通常情况下,整合发生在二细胞时期之前,但是仍有20%~30%的原代小鼠出现基因整合延迟,发生在二细胞之后,就产生了嵌合体^[51]。而且多数原代小鼠传递的转基因频率较低,仅为5%~10%^[51]。如果想实现一只小鼠上有多种基因的转基因整合,就需要将不同的转基因小鼠相互交配。

随着CRISPR/Cas9技术的成熟,直接在卵胞质内注射体外转录的Cas9 mRNA和gRNA,或是体外组装好的Cas9蛋白与gRNA复合物也可以简单地实现基因编辑^[52],并且卵胞质内注射会比原核注射的效率更高^[53]。Cas9及gRNA进入受精卵后,在特异性的位点产生DNA的双链断裂,随后会发生非同源末端连接修复或同源重组修复,前者会产生随机的碱基插入或缺失,后者会依照同源的模板将双链断裂修复。如果在卵胞质内注射的同时给予带有同源臂的模板DNA(Donor),细胞就可以利用该模板进行修复,从而实现人为改变指定区域基因序列的效果。卵胞质内注射同样存在一定的延迟,子代小鼠大多存在一定程度的嵌合,将目的基因位点实现了特定编辑的原代小鼠与野生型小鼠交配,可以获得稳定的基因编辑小鼠。由于CRISPR/Cas系统的效率取决于gRNA,因此差异较大,但总体而言仍远高于原核注射。卵胞质内注射对RNA纯度和浓度的要求较高,否则非常影响胚胎的发育效率以及基因编辑效率(图2)。

嵌合体通常指个体的细胞基因组存在不同的现象。1961年,Tarkowski^[54]将遗传上不同的八细胞时期的胚胎的透明带移去,体外培养时让它们彼此接触,再将聚集的胚胎移植到代孕母鼠后,产生了存活的嵌合体后代。1968年,Gardner^[55]将胚胎干细胞注射到囊胚腔中也获得



注：A为向受精卵中注射基因编辑复合物（Cas9+gRNA+Donor）获得嵌合体小鼠的途径；B为通过四倍体补偿技术在四倍体囊胚中注射二倍体胚胎干细胞获得非嵌合体小鼠的途径；C为通过类精子单倍体胚胎干细胞注射高效获得非嵌合体小鼠的途径。CRISPR/Cas9 全称 clustered regularly interspaced short palindromic repeats/it-associated nuclease 9，即成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白核酸酶 9 基因编辑技术；ICAHCl 全称 Intracytoplasmic AG-haESCs injection，即卵胞浆内孤雄单倍体细胞注射术。

图2 构建基因修饰小鼠模型的胚胎操作方法

Figure 2 Experimental methods for constructing mouse models

了小鼠嵌合体。嵌合同样有一定概率发生在生殖系中，将这种嵌合体小鼠与野生型小鼠交配，可获得不同基因型的小鼠。这种囊胚注射发生生殖系传递的效率是不稳定的，而一种改进的被称为四倍体补偿的技术的出现弥补了这一缺陷。四倍体补偿将二细胞时期的胚胎通过电或病毒方式融合，产生四倍体的胚胎，这些四倍体的细胞后续只能发育为胚外组织，而无法发育产生健康胚胎，但如果此时向四倍体囊胚中注射二倍体的胚胎干细胞，会产生完全来源于注射的供体干细胞的健康胚胎。胚胎干细胞有着成熟的培养、编辑系统，注射经过基因编辑的胚胎干细胞到四倍体囊胚中，就可以获得基因组完全来自于注射细胞的小鼠（图2）。

利用类精子单倍体胚胎干细胞构建小鼠模型，完全排除了上述方式产生的原代小鼠基因型不确定、存在嵌合、需要回交、多次鉴定等问

题。类精子单倍体胚胎干细胞可以使卵母细胞受精形成胚胎，同时可在体外进行培养，也可结合CRISPR/Cas9系统对类精子单倍体胚胎干细胞进行基因的编辑，这个过程同对二倍体胚胎干细胞进行基因编辑一样。类精子单倍体胚胎干细胞具有单倍体的特性，每一次的编辑只会产生“是”或“否”的结果，对编辑后的细胞进行单克隆建系，通过测序就可以判断基因编辑是否如预期发生。如果需要获得多基因同时编辑的细胞，只需要在前一轮得到的细胞系的基础上再进行一轮编辑即可。由于所有的鉴定都是在细胞层面上完成，鉴定的时间成本较低，建成携带指定基因型的类精子单倍体胚胎干细胞系，注射后产生的原代小鼠的基因型均为编辑且杂合的，不存在嵌合情况，可以直接在原代小鼠中开展研究，并能够稳定地传递给下一代（图2）。

基于类精子单倍体胚胎干细胞的半克隆技术

相比于原核或卵胞质内注射、四倍体补偿技术来构建复杂的小鼠模型更具优势 (表1)。但是由于只携带Y染色体的孤雄胚胎无法发育至囊胚, 所以全部的类精子单倍体胚胎干细胞的性染色体都

是X染色体, 注射到卵母细胞后产生的后代全部是雌性。同时如果编辑的基因本身会影响干细胞的生存、自我更新过程, 细胞系就难以建立, 也无法得到后代小鼠 (表1)。

表1 常用于构建基因修饰小鼠模型的动物实验手段优势比较

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of different animal experiments for constructing mouse models

实验方法	优势	劣势
原核或卵胞质内注射	结合 PiggyBac 或 CRISPR/Cas9 系统相比于直接注射 DNA 片段, 整合效率、目的基因表达效率较高, 插入的基因片段更大, 不需要额外构建细胞系	PiggyBac 系统: 可能会破坏其他基因功能; 无法控制插入拷贝数; 插入位点局限在 TTAA 位点; 存在嵌合, 后续需要多轮回交 CRISPR/Cas9 系统: 胚胎发育效率很受 RNA 质量影响, 需要体外转录获得 RNA; 原代小鼠存在嵌合, 需进行回交; 多基因同时敲除或敲入需要连续注射或者共同注射, 效率较低
四倍体补偿技术	可产生非嵌合小鼠; 可快速获得目的基因型的小鼠	基因编辑二倍体胚胎干细胞较单倍体细胞复杂; 出生效率较低, 需要进一步扩繁; 小鼠性别比例失衡, 倾向于雄性; 无法用于编辑影响干细胞自我更新或生存的基因
基于类精子单倍体胚胎干细胞的半克隆技术	可构建多基因同时敲除或敲入的小鼠; 可一步获得非嵌合的原代杂合小鼠并直接用于研究	类精子单倍体胚胎干细胞性染色体只会是 X 染色体, 注入卵细胞后也只能产生雌性小鼠; 无法用于编辑影响干细胞自我更新或生存的基因

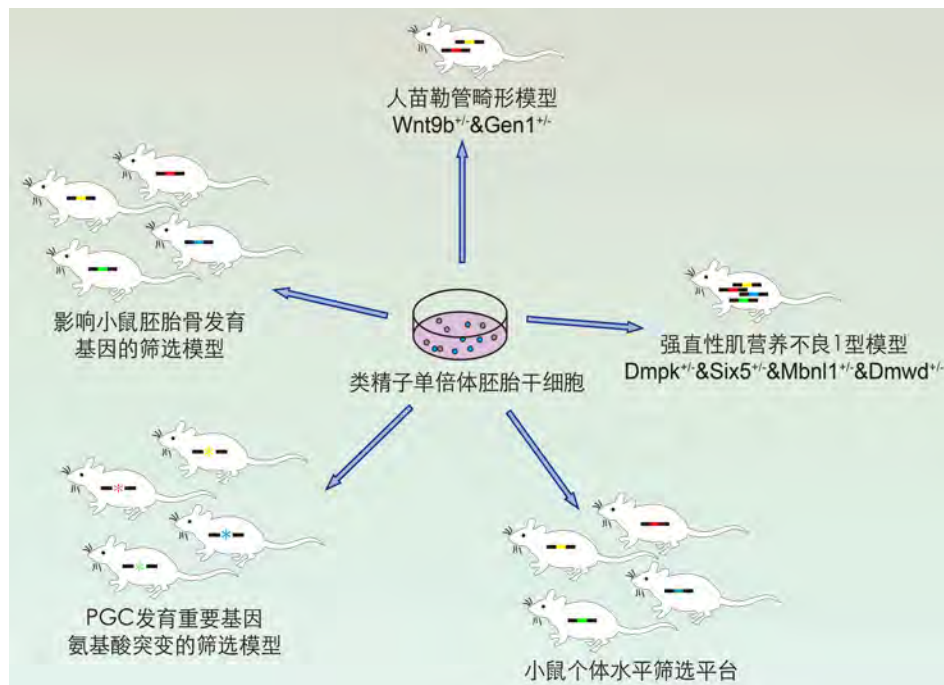
5 类精子单倍体胚胎干细胞构建小鼠模型的应用

类精子单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术中半克隆是指将类精子单倍体胚胎干细胞注射至卵母细胞产生的后代有别于克隆产生的后代, 只有一半的遗传物质来源于体外培养的细胞。基于该技术, 科研人员已经在多种复杂疾病小鼠模型的构建方面取得了突破性进展 (图3)。

人强直性肌营养不良 1 型 (myotonic dystrophy type 1, DM1) 是一种复杂的遗传性疾病, 主要由强直性肌营养不良蛋白激酶 (dystrophia myotonica protein kinase, DMPK) 基因 3' 非编码区的 CTG 重复扩增引起^[56-57]; 通常随着重复数量的增加而加重表型, 最严重时可以发展为呼吸衰竭和智力迟钝 (如先天性 DM1, 即 CDM)^[58]。许多研究都表明, CTG 的重复扩增不仅影响 DMPK 本身的表达水平, 也会影响 DMPK 邻近区域的染色体结构, 从而降低邻近基因的表达水平^[59-60]。携带 DM1 相关基因 Dmpk、

Six5 和 Mbnl1 的其中任何一个基因杂合突变的小鼠只能部分重现 DM1 患者的症状^[61-63], 而任何一个纯合突变的小鼠病情会加重。但在 DM1 患者中, 几乎不存在 Dmpk、Six5 和 Mbnl1 这几个相关基因的纯合突变。

另外一种 DM1 的小鼠模型构建策略是侧重于重现 CTG 的重复。如携带人骨架肌动蛋白基因 HAS 的转基因小鼠, 其肌肉 HAS 非编码区插入了大约 250 个 CUG 重复扩增^[64]。这种转基因小鼠在肌肉多个方面出现了和 DM1 患者一样的表型, 但并没有出现 DM1 患者常见的其他症状, 如肌肉萎缩和白内障^[64]。DM1 患者出现肌肉萎缩、白内障、胰岛素抵抗、心脏传导缺陷等多方面的症状, 很可能是上述多个基因的表达不足导致^[65-66]。但限于传统方法的局限性, 难以获得如此多基因同时敲除的小鼠, 多基因表达不足的猜想一直未得到实验验证。2019 年, Yin 等^[58]通过将 Dmpk、Six5 和 Mbnl1 这 3 个基因敲除的类精子单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞后, 产生的杂合小鼠出现了 DM1 的部分表型; 进一步将



注：PGC全称primordial germ cells，即原始生殖细胞。

图3 类精子单倍体胚胎干细胞在构建疾病模型上的应用

Figure 3 Application of sperm-like haploid embryonic stem cells in the construction of disease model

Dmpk、Six5、Mbnl1 和 Dmwd 共4个基因敲除的类精子单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞后，产生的杂合小鼠重现了DM1患者的绝大多数病理状态。四基因敲除的杂合小鼠模型直接证明了多基因剂量不足效应确实能够导致DM1。

苗勒管异常（Müllerian anomalies, MA）包括子宫、宫颈、输卵管或阴道的各种解剖学畸形^[67-69]。MA女性的生殖能力低下，同时要承受巨大的心理痛苦^[70]。关于MA的病因，遗传危险因素通常被认为具有很强的影响力。但是由于MA患者个体之间存在广泛的基因异质性，很难确定潜在的致病基因^[70]。先前的一些研究提示，基因组拷贝数变异（copy number variations, CNV）参与了MA致病^[70]。2019年，Wang等^[70]分析了25例MA患者的全基因组杂交芯片数据，发现其中有3例患者和苗勒管发育有关的基因Gen1（1/25）、Tbx6（1/25）和Lhx1（1/25）存在基因拷贝数差异。为了进一步了解这些基因的拷贝数差异是否会造成苗勒管发育异常，研究人员对新的100例MA患者的qPCR数据检验后发现，其中有6例患者的Tbx6（4/100）和Lhx1

（2/100）存在基因拷贝数差异。但是Gen1基因杂合敲除小鼠并没有展现出任何苗勒管畸形表型，提示单基因缺陷并不足以导致苗勒管畸形，而很可能是多基因缺陷造成的。研究人员后续对这9例MA患者进行全基因组测序分析，将目光锁定到了Gen1/Wnt9b以及Tbx6/Gata3这两种基因组合。通过分析由类精子单倍体胚胎干细胞一步获得的Gen1/Wnt9b双杂合敲除小鼠的子宫发现，其确实比Gen1或Wnt9b单杂敲除小鼠的子宫发育畸形程度更严重，从而证明Gen1和Wnt9b双基因缺陷导致了苗勒管畸形的产生^[70]。有趣的是，研究人员还确定了4例携带Gen1有害突变，但没有Wnt9b有害突变的个体，这支持Gen1突变对MA致病的遗传贡献。由于Gen1中的单个突变不足以引起人或小鼠的MA，其他基因的有害突变可能与Gen1突变协同作用而引起MA，与MA的高度遗传异质性相符。总之，这些结果均表明Gen1/Wnt9b是MA致病基因中一个重要的组合，并提示Gen1是MA的主要致病因素^[70]。

稳定表达Cas9的类精子单倍体胚胎干细胞

和gRNA文库结合会产生一种非常高效便捷的小规模基因筛选系统。每个类精子单倍体胚胎干细胞中转染一种gRNA后,其基因组被稳定表达的Cas9切割,实现对应的一个基因的编辑,注射到卵母细胞后又会进一步切割母源基因组,产生纯合敲除的小鼠。2019年Bai等^[71]通过向卵母细胞注射稳定表达Cas9和以72个预选基因为靶标的gRNA文库的类精子单倍体胚胎干细胞系,建立了一个文库基因突变的半克隆小鼠库,并通过对出生小鼠的骨骼分析筛选出了4个与骨骼发育相关的基因,其中Zic1和Clec11a已被报告是骨骼发育所必需的基因,而Rln1和Irx5基因从未有研究表明对骨骼有影响。Rln1纯合敲除小鼠仅在出生时骨骼较小,而Irx5纯合敲除小鼠由于骨量减少和骨髓脂肪生成增加,在出生后和成年阶段均显示骨骼异常^[4, 71]。利用类似的策略,2018年Li等^[72]结合CRISPR/Cas9介导的单碱基编辑器发现了小鼠原始生殖细胞(primordial germ cells, PGC)发育的重要基因Dnd1上有4个与PGC发育相关的氨基酸。这种对蛋白质关键氨基酸进行体内遗传筛选的系统,为蛋白质结构和功能的研究开辟了一个新的体系^[4]。该体系的一个潜在应用是在小鼠中筛选与疾病发展相关基因的功能位点,并与已有的SNVs数据库进行比对,以预测疾病相关基因的致病位点^[73]。

上述研究为人和小鼠中多基因致病理论提供了实验证据,证明利用类精子单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术作为一种快速有效的实验检测手段,可用于鉴定复杂疾病的小鼠模型中遗传变异的致病性组合。

6 类精子单倍体胚胎干细胞技术构建小鼠模型的展望

人类遗传学在研究方法和概念上的进步加快了对人类致病基因的鉴定过程。当某种疾病涉及一个以上基因时,准确判断各致病基因突变的贡献率及其组合形式至关重要。越来越多疾病的遗传和突变数据也逐渐阐明了多个基因(包括等位基因)联合作用如何产生表型效应^[74]。生物学、医学、进化学对于疾病的定义各不相同,但是毋庸置疑的是,环境、文化、人口等外在因素和遗传内在因素交错在一起导致了疾病的复杂性以及

人类群体在各种简单或者复杂疾病发生率上的差异。复杂性状疾病(complex disease)的发病由多个基因位点共同参与,且与环境因素相互作用决定疾病表型,往往是遗传疾病,如心血管疾病、肿瘤性疾病、自身免疫病等^[75]。而且在遗传疾病中,如果涉及染色体结构或数量异常,也会增加该遗传疾病的复杂性。基于类精子单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术可以获得多基因突变的小鼠,可以较优地模拟涉及多基因、染色体异常(非整倍体)这类复杂的疾病,从而发挥其对高风险人群的预测、筛查及干预作用,为复杂性状疾病提供更准确的诊断、预后工具。

以神经退行性疾病肌萎缩侧索硬化征为例,肌萎缩侧索硬化征(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)即Lou Gehrig's disease病,是一种成人发病且致命的罕见神经退行性疾病^[76]。ALS以进行性肌肉无力、肌肉萎缩和最终瘫痪为特征,诊断后患者生存期从2年到5年不等,仅有10%的ALS患者可以存活10年以上^[77]。ALS实际上和许多成人发病的神经退行性疾病共享许多临床和病理学特征,如额颞叶痴呆(frontotemporal dementia, FTD)。在许多患者中,也会观察到ALS和FTD的共同存在;其中约15%的FTD患者会发展为ALS,5%~22%的ALS患者发展为FTD^[78]。目前公认的ALS发病机制主要有以下方面:RNA稳定性改变、代谢失调、运动神经元细胞骨架破坏^[79]、内质网压力和蛋白质稳态失调、线粒体结构或功能受损、谷氨酸介导的兴奋性毒性、胶质细胞丧失功能、免疫功能失调及代谢障碍。自1993年报告第一个ALS相关基因SOD1后^[80],迄今为止已发现超过50个基因在其突变的情况下可能引起ALS^[81],只是这些基因对ALS的贡献程度有大有小,而且这些基因存在相同或截然不同的功能,这给早期临床诊断带来了巨大的挑战。

C9ORF72、SOD1、TDP-43、TBK1、OPTN等基因只能解释不到50%的ALS/FTD患者发病原因^[81]。而且很多时候某个基因的突变不会影响ALS/FTD进展,或者即使影响ALS/FTD的发生,但不显著改变生存时间;甚至某些基因突变反而可以减缓ALS的症状。Gerbino等^[82]研究表

明,小鼠表达人的丧失功能、无义突变的TBK1时,并不会出现和神经退行有关的症状;但是如果在SOD1^{G93A}这样经典的ALS小鼠中特异性敲除TBK1后,会削弱自噬,增加SOD1聚集,加速疾病进展,但不改变生存时间。更令人困惑的是,TBK1上的点突变同样可以加速疾病的发生,但可以延长生存时间。

遗传异质性、多基因共同效应、每个基因存在不同的突变点、基因功能的交叉性、神经元与周围的胶质细胞共同作用等多方面因素,使得ALS/FTD的深入研究及临床诊治进展缓慢,既缺乏ALS发病早期确诊的遗传学证据,也缺乏有效的治疗药物。目前被FDA批准上市的只有2种药物(利鲁唑和依达拉奉),既不能治愈ALS/FTD,也不适用于所有的ALS/FTD患者,且药物对于中位生存时间的增加效果相当有限,其中一个重大的障碍是缺乏研究ALS的小鼠模型。

1994年Gurney等^[83]通过转基因使得小鼠中高表达含有G93A点突变的人SOD1蛋白的突变体,这些小鼠脊髓中运动神经元丧失导致一条或多条肢体瘫痪,并在5~6个月龄时死亡。SOD1^{G93A}小鼠模型确实重现了ALS的一些指征,如突变的SOD1蛋白异常聚集^[84],星形胶质细胞中EAAT2谷氨酸转运体的丧失导致运动神经元产生兴奋性毒性死亡^[85]。米诺环素(minocycline)、头孢曲松(ceftriaxone)、塞来昔布(celecoxib)、来那度胺(lenalidomide)和其他抗炎药物在SOD1^{G93A}小鼠中被证明有疗效,但在临床试验中全部失败^[86]。其中一个关键点在于,ALS患者存在实质性的皮质运动神经元退行性变,但是在大多数SOD1^{G93A}小鼠模型中并没有明确地看到实质性的皮质运动神经元退行性变^[87]。而且高达50%的ALS患者会共同发展为FTD,而在SOD1^{G93A}小鼠模型中未发现^[87]。

除了SOD1^{G93A}小鼠模型外,TDP-43小鼠模型也常被用来研究ALS。但无论是SOD1还是TDP-43,单一基因缺陷的小鼠模型都无法完全模拟ALS患者的典型病症。如果采用类精子单倍体胚胎干细胞技术,先在细胞水平上获得多个致病基因同时修饰的突变系,除了可以进行神经元的定向分化以检测其对神经元细胞功能的影响

外,还可以通过半克隆技术注射后获得杂合突变的小鼠,有望更好地在小鼠上模拟出ALS症状。

除了多基因有关的复杂疾病外,基于类精子单倍体胚胎干细胞获得的半克隆小鼠也非常适合应用于染色体数目变化相关疾病的研究。人类胚胎早期致死、流产或出生后发育缺陷的一个重要原因是染色体数目的异常,其中三体是染色体数目变异的一种最普遍的形式^[88]。临床上公认的35%的自然流产和4%的死产是由于染色体三体或单体造成,约有0.3%的新生儿为非整倍染色体组^[89]。

获得非整倍性染色体组小鼠模型,研究其发育过程是相当复杂的。1983年Gropp等^[90]通过育种获得了多种常染色体三体的小鼠胚胎,其中许多三体的胚胎都无法存活到器官发生阶段;将存活时间较长、三体胚胎来源的造血干细胞移植到辐射损伤的小鼠体内后发现,不同三体胚胎来源的造血干细胞对造血系统受损小鼠的生存支持能力差异巨大,其中19号染色体三体胚胎来源的造血干细胞对受损小鼠的支持最好,可以支撑小鼠存活12个月。2004年Baker等^[91]发现纺锤体组装检查点蛋白BubR1水平较低的小鼠表现为渐进性非整倍体化,并伴随着寿命短、急腹症、矮小、跛行、白内障、皮下脂肪丢失和伤口愈合受损等多种特征。2008年Lavon等^[92]从非整倍体胚胎中获得整倍体人类胚胎干细胞,阐明了整倍体和非整倍体嵌合体胚胎发育过程中,由于整倍体具有竞争优势,因此随着发育进行,非整倍体细胞逐渐消失。2016年Bolton等^[93]通过活胚胎成像和嵌合胚胎的单细胞追踪技术,发现从囊胚开始,非整倍体细胞逐渐减少;而且通过非整倍体和整倍体嵌合实验证明,一定比例的整倍体细胞即可支持胚胎发育。染色体三体小鼠模型中,较常见的一种是Ts16小鼠。小鼠第16号染色体的远端部分和人类第21号染色体的长臂之间存在同源性,所以Ts16小鼠常被应用于研究人类三体综合征。Ts16小鼠胎儿具有许多相似的表型特征,包括心脏缺陷和鼻肉瘤,只是Ts16小鼠胎儿会在子宫内死亡,使得Ts16小鼠的研究仅限于早期发育阶段^[94]。后续Davisson等^[94]构建了Ts65Dn小鼠模型,Ts65Dn小鼠能存活至36个月,与人类第21号染色体长臂具有广泛的同源

性。但Ts65Dn小鼠模型只包含了人类第21号染色体长臂的绝大部分,而长臂的少部分以及短臂都被排除在外。如果通过类精子单倍体胚胎干细胞技术,在细胞水平上先构建染色体数目差异的细胞系,再将其注射进卵母细胞中获得胚胎,可排除常规技术嵌合率低的问题,能更方便地得到非正常倍性的小鼠模型资源,有助于阐明发生非整倍性现象背后的原因。

综上,基因修饰小鼠模型的使用让阐明疾病发生机制和进行新药临床前试验更为直观、简便。目前使用传统技术手段如原核注射、卵胞质内注射、基于胚胎干细胞的囊胚注射或四倍体补偿获得的小鼠模型只是部分模拟了人类疾病的一些基因突变,尚不能完全概括人类疾病的生理和病理机制。要想解决这些问题,需要建立一个可以最大程度上模拟患者复杂体系及相关复杂机制的人源化或类人化小鼠模型^[95],这需要科学界的共同合作。例如,可以结合临床上患者的病理、家系、相关基因突变等信息,利用类精子单倍体胚胎干细胞获得和患者携带基因突变一致或相关基因人源化的小鼠模型。这些小鼠的疾病症状和严重程度可以更好地反映某些基因对疾病的贡献,以实现生物医学研究的最终目标:更深入地了解人类疾病的致病机制,进而开发出新的诊断方法和改进疗法。类精子单倍体胚胎干细胞技术的出现为构建精确可控、多基因、复杂编辑的小鼠模型提供了一种全新的有力工具。

参考文献:

- [1] WUTZ A. Haploid animal cells[J]. Development, 2014, 141(7):1423-1426. DOI:10.1242/dev.102202.
- [2] HARTWELL L H, CULOTTI J, PRINGLE J R, et al. Genetic control of the cell division cycle in yeast[J]. Science, 1974, 183(4120): 46-51. DOI: 10.1126/science.183.4120.46.
- [3] SHI L, YANG H, LI J. Haploid embryonic stem cells: an ideal tool for mammalian genetic analyses[J]. Protein Cell, 2012, 3(11): 806-810. DOI: 10.1007/s13238-012-2096-4.
- [4] 丁一夫,李劲松,周琪.哺乳动物单倍体胚胎干细胞的建立与应用[J].中国科学:生命科学,2019,49(12):1635-1651.
- [5] TARKOWSKI A K, ROSSANT J. Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes[J]. Nature, 1976, 259(5545):663-665. DOI:10.1038/259663a0.
- [6] TARKOWSKI A K, WITKOWSKA A, NOWICKA J. Experimental parthenogenesis in the mouse[J]. Nature, 1970, 226(5241):162-165. DOI:10.1038/226162a0.
- [7] MODLIŃSKI J A. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus[J]. J Embryol Exp Morphol, 1975, 33(4):897-905.
- [8] 陈俏羽,王俊政,李荣凤.单倍体胚胎干细胞研究进展及思考[J].中国细胞生物学学报,2017,39(1):71-77.
- [9] LEEB M, WUTZ A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos[J]. Nature, 2011, 479(7371):131-134. DOI:10.1038/nature10448.
- [10] CARETTE J E, GUIMARAES C P, VARADARAJAN M, et al. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens[J]. Science, 2009, 326(5957): 1231-1235. DOI:10.1126/science.1178955.
- [11] CHONG M M, RASMUSSEN J P, RUDENSKY A Y, et al. The RNase III enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease[J]. J Exp Med, 2008, 205(9):2005-2017. DOI:10.1084/jem.20081219.
- [12] WU H, XU H, MIRAGLIA L J, et al. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing[J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36957-36965. DOI:10.1074/jbc.m005494200.
- [13] ELLING U, TAUBENSCHMID J, WIRNSBERGER G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(6): 563-574. DOI: 10.1016/j.stem.2011.10.012.
- [14] NÜSSEIN-VOLHARD C, WIESCHAUS E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. Nature, 1980, 287(5785): 795-801. DOI: 10.1038/287795a0.
- [15] VANHOOREN V, LIBERT C. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities[J]. Ageing Res Rev, 2013, 12(1): 8-21. DOI:10.1016/j.arr.2012.03.010.
- [16] IKEHARA Y, YAMAGUCHI T, IKEHARA S. Mouse models of cancer[M]//Glycoscience: Biology and Medicine. Tokyo: Springer Japan, 2014: 1-5. DOI: 10.1007/978-4-431-54836-2_194-1.
- [17] SILVERMAN J L, YANG M, LORD C, et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism[J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(7): 490-502. DOI:10.1038/nrn2851.
- [18] GOODWILL H L, MANZANO-NIEVES G, GALLO M, et al. Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model[J]. Neuropsychopharmacology, 2019, 44(4):711-720. DOI:10.1038/s41386-018-0195-5.
- [19] KEPPELY L J W, WALKER S J, GADEMSEY A N, et al. Nervonic acid limits weight gain in a mouse model of diet-induced obesity[J]. Faseb J, 2020, 34(11):15314-15326. DOI:10.1096/fj.202000525r.

- [20] YANG H, SHI L, WANG B A, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2012, 149(3):605-617. DOI:10.1016/j.cell.2012.04.002.
- [21] WANG L B, LI J S. 'Artificial spermatid'-mediated genome editing[J]. *Biol Reprod*, 2019, 101(3):538-548. DOI:10.1093/biolre/iox087.
- [22] SUBTELNY S. The development of haploid and homozygous diploid frog embryos obtained from transplantations of haploid nuclei[J]. *J Exp Zool*, 1958, 139(2):263-305. DOI:10.1002/jez.1401390204.
- [23] FREED J J, MEZGER-FREED L. Stable haploid cultured cell lines from frog embryos[J]. *PNAS*, 1970, 65(2):337-344. DOI:10.1073/pnas.65.2.337.
- [24] PHILIPPE C, LANDUREAU J C. Culture of cockroach embryonic cells and hemocytes of parthenogenic origin. Maintenance *in vitro* of haploid and aneuploid forms [J]. *Exp Cell Res*, 1975, 96(2):287-296. DOI:10.1016/0014-4827(75)90259-1.
- [25] DEBEC A. Haploid cell cultures of *Drosophila melanogaster*[J]. *Nature*, 1978, 274(5668): 255-256. DOI:10.1038/274255a0.
- [26] KOTECKI M, REDDY P S, COCHRAN B H. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 252(2):273-280. DOI:10.1006/excr.1999.4656.
- [27] YI M, HONG N, HONG Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells[J]. *Science*, 2009, 326(5951):430-433. DOI:10.1126/science.1175151.
- [28] YING Q L, WRAY J, NICHOLS J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal[J]. *Nature*, 2008, 453(7194):519-523. DOI:10.1038/nature06968.
- [29] DAVIES S P, REDDY H, CAIVANO M, et al. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors[J]. *Biochem J*, 2000, 351(pt 1):95-105. DOI:10.1042/0264-6021:3510095.
- [30] LI W, SHUAI L, WAN H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice[J]. *Nature*, 2012, 490(7420): 407-411. DOI: 10.1038/nature11435.
- [31] ZHONG C, YIN Q, XIE Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 221-232. DOI: 10.1016/j.stem.2015.06.005.
- [32] YANG H, LIU Z, MA Y, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes[J]. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1187-1200. DOI:10.1038/cr.2013.93.
- [33] LI X, CUI X L, WANG J Q, et al. Generation and application of mouse-rat allodiploid embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2016, 164(1-2): 279-292. DOI:10.1016/j.cell.2015.11.035.
- [34] SAGI I, CHIA G, GOLAN-LEV T, et al. Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2016, 532(7597): 107-111. DOI: 10.1038/nature17408.
- [35] ZHONG C, ZHANG M, YIN Q, et al. Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus[J]. *Cell Res*, 2016, 26(6): 743-746. DOI:10.1038/cr.2016.59.
- [36] LI Z, WAN H, FENG G, et al. Birth of fertile bimaternal offspring following intracytoplasmic injection of parthenogenetic haploid embryonic stem cells[J]. *Cell Res*, 2016, 26(1):135-138. DOI:10.1038/cr.2015.151.
- [37] LI Z K, WANG L Y, WANG L B, et al. Generation of bimaternal and bipaternal mice from hypomethylated haploid ESCs with imprinting region deletions[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(5): 665-676. e4. DOI: 10.1016/j.stem.2018.09.004.
- [38] JAENISCH R, MINTZ B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA[J]. *PNAS*, 1974, 71(4): 1250-1254. DOI: 10.1073/pnas.71.4.1250.
- [39] JAENISCH R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus [J]. *PNAS*, 1976, 73(4):1260-1264. DOI:10.1073/pnas.73.4.1260.
- [40] GORDON J W, SCANGOS G A, PLOTKIN D J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA[J]. *PNAS*, 1980, 77(12):7380-7384. DOI:10.1073/pnas.77.12.7380.
- [41] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156. DOI: 10.1038/292154a0.
- [42] SMITHIES O, GREGG R G, BOGGS S S, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination[J]. *Nature*, 1985, 317(6034):230-234. DOI:10.1038/317230a0.
- [43] RAABE T, WESSELSCHMIDT R L. Genetic manipulation of embryonic stem cells[J/OL]. *Human Stem Cell Manual*, 2007: 267-288. <https://doi.org/10.1016/B978-012370465-8/50025-9>.
- [44] THOMAS K R, CAPECCHI M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. *Cell*, 1987, 51(3):503-512. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90646-5.
- [45] GU H, ZOU Y R, RAJEWSKY K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting[J]. *Cell*, 1993, 73(6): 1155-1164. DOI:

- 10.1016/0092-8674(93)90644-6.
- [46] GEURTS A M, COST G J, FREYVERT Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. *Science*, 2009, 325(5939): 433. DOI: 10.1126/science.1172447.
- [47] MEYER M, DE ANGELIS M H, WURST W, et al. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases[J]. *PNAS*, 2010, 107(34): 15022-15026. DOI: 10.1073/pnas.1009424107.
- [48] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096):816-821. DOI:10.1126/science.1225829.
- [49] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823. DOI:10.1126/science.1231143.
- [50] FRASER M J, CARY L, BOONVISUDHI K, et al. Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP₂ in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA[J]. *Virology*, 1995, 211(2):397-407. DOI:10.1006/viro.1995.1422.
- [51] WILKIE T M, BRINSTER R L, PALMITER R D. Germline and somatic mosaicism in transgenic mice[J]. *Dev Biol*, 1986, 118(1):9-18. DOI: 10.1016/0012-1606(86)90068-0.
- [52] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- [53] YEN S T, ZHANG M, DENG J M, et al. Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes[J]. *Dev Biol*, 2014, 393(1):3-9. DOI:10.1016/j.ydbio.2014.06.017.
- [54] TARKOWSKI A K. Mouse chimeras developed from fused eggs[J]. *Nature*, 1961, 190(4779):857-860. DOI: 10.1038/190857a0.
- [55] GARDNER R L. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst[J]. *Nature*, 1968, 220(5167):596-597. DOI:10.1038/220596a0.
- [56] MAHADEVAN M, TSILFIDIS C, SABOURIN L, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene[J]. *Science*, 1992, 255(5049): 1253-1255. DOI: 10.1126/science.1546325.
- [57] BROOK J D, MCCURRACH M E, HARLEY H G, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member[J]. *Cell*, 1992, 68(4):799-808. DOI:10.1016/0092-8674(92)90154-5.
- [58] YIN Q, WANG H, LI N, et al. Dosage effect of multiple genes accounts for multisystem disorder of myotonic dystrophy type 1[J]. *Cell Res*, 2020, 30(2): 133-145. DOI:10.1038/s41422-019-0264-2.
- [59] PETTERSSON O J, AAGAARD L, JENSEN T G, et al. Molecular mechanisms in DM1-a focus on foci[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(4): 2433-2441. DOI: 10.1093/nar/gkv029.
- [60] LEE J E, COOPER T A. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy[J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(pt 6):1281-1286. DOI:10.1042/bst0371281.
- [61] KLESERT T R, CHO D H, CLARK J I, et al. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 105-109. DOI:10.1038/75490.
- [62] JANSEN G, GROENEN P J, BÄCHNER D, et al. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice[J]. *Nat Genet*, 1996, 13(3):316-324. DOI:10.1038/ng0796-316.
- [63] SARKAR P S, APPUKUTTAN B, HAN J, et al. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 110-114. DOI:10.1038/75500.
- [64] MANKODI A, LOGIGIAN E, CALLAHAN L, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat[J]. *Science*, 2000, 289(5485): 1769-1773. DOI:10.1126/science.289.5485.1769.
- [65] GROENEN P, WIERINGA B. Expanding complexity in myotonic dystrophy[J]. *Bioessays*, 1998, 20(11):901-912. DOI: 10.1002/(sici)1521-1878(199811)20:11<901:aid-bies5>3.0.co;2-0.
- [66] LARKIN K, FARDAEI M. Myotonic dystrophy: a multigene disorder[J]. *Brain Res Bull*, 2001, 56(3-4): 389-395. DOI:10.1016/s0361-9230(01)00656-6.
- [67] VISOOTSASAK J, GRAHAM J M. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2006, 1:42. DOI:10.1186/1750-1172-1-42.
- [68] RACKOW B W, ARICI A. Reproductive performance of women with müllerian anomalies[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007, 19(3): 229-237. DOI: 10.1097/gco.0b013e32814b0649.
- [69] KOBAYASHI A, BEHRINGER R R. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(12):969-980. DOI:10.1038/nrg1225.
- [70] WANG L, ZHANG Y, FU X, et al. Joint utilization of genetic analysis and semi-cloning technology reveals a digenic etiology of Müllerian anomalies[J]. *Cell Res*, 2020, 30(1):91-94. DOI:10.1038/s41422-019-0243-7.
- [71] BAI M, HAN Y, WU Y, et al. Targeted genetic screening in mice through haploid embryonic stem cells identifies critical genes in bone development[J].

- PLoS Biol, 2019, 17(7): e3000350. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000350.
- [72] LI Q, LI Y, YANG S, et al. CRISPR-Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(11): 1315-1325. DOI:10.1038/s41556-018-0202-4.
- [73] LI Q, LI Y, YANG S, et al. CRISPR-Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(11): 1315-1325. DOI:10.1038/s41556-018-0202-4.
- [74] BADANO J L, KATSANIS N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(10):779-789. DOI:10.1038/nrg910.
- [75] 吴歆, 耿旭强, 徐沪济. 多基因风险评分在复杂性状疾病中的应用进展[J]. 诊断学理论与实践, 2020, 19(5):540-543. DOI:10.16150/j.1671-2870.2020.05.019.
- [76] AL-CHALABI A, HARDIMAN O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time [J]. Nat Rev Neurol, 2013, 9(11): 617-628. DOI: 10.1038/nrneurol.2013.203.
- [77] CHIÒ A, LOGROSCINO G, HARDIMAN O, et al. Prognostic factors in ALS: a critical review[J]. Amyotroph Lateral Scler, 2009, 10(5-6):310-323. DOI: 10.3109/17482960802566824.
- [78] RAAPHORST J, DE VISSER M, LINSSEN W H, et al. The cognitive profile of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis[J]. Amyotroph Lateral Scler, 2010, 11(1-2):27-37. DOI:10.3109/17482960802645008.
- [79] CASTELLANOS-MONTIEL M J, CHAINEAU M, DURCAN T M. The neglected genes of ALS: cytoskeletal dynamics impact synaptic degeneration in ALS[J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 594975. DOI: 10.3389/fncel.2020.594975.
- [80] SELLIER C, CAMPANARI M L, JULIE CORBIER C, et al. Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death[J]. EMBO J, 2016, 35(12): 1276-1297. DOI:10.15252/embj.201593350.
- [81] TAYLOR J P, BROWN R H, CLEVELAND D W. Decoding ALS: from genes to mechanism[J]. Nature, 2016, 539(7628):197-206. DOI:10.1038/nature20413.
- [82] GERBINO V, KAUNGA E, YE J, et al. The loss of TBK₁ kinase activity in motor neurons or in all cell types differentially impacts ALS disease progression in SOD1 mice[J]. Neuron, 2020, 106(5):789-805.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.03.005.
- [83] GURNEY M E, PU H, CHIU A Y, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation[J]. Science, 1994, 264(5166):1772-1775. DOI:10.1126/science.8209258.
- [84] CHOU S M, WANG H S, KOMAI K. Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study[J]. J Chem Neuroanat, 1996, 10(3-4): 249-258. DOI: 10.1016/0891-0618(96)00137-8.
- [85] BENDOTTI C, TORTAROLO M, SUCHAK S K, et al. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels[J]. J Neurochem, 2001, 79(4): 737-746. DOI:10.1046/j.1471-4159.2001.00572.x.
- [86] PHILIPS T, ROBBERECHT W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(3): 253-263. DOI:10.1016/s1474-4422(11)70015-1.
- [87] PHILIPS T, ROTHSTEIN J D. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Curr Protoc Pharmacol, 2015, 69: 5.67.1-5.67.21. DOI: 10.1002/0471141755.ph0567s69.
- [88] NIAKAN K K, HAN J N, PEDERSEN R A, et al. Human pre-implantation embryo development[J]. Dev Camb Engl, 2012, 139(5): 829-841. DOI: 10.1242/dev.060426.
- [89] HASSOLD T, HUNT P. To err (meiotically) is human: the *Genesis* of human aneuploidy[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(4):280-291. DOI:10.1038/35066065.
- [90] GROPP A, WINKING H, HERBST E W, et al. Murine trisomy: developmental profiles of the embryo, and isolation of trisomic cellular systems[J]. J Exp Zool, 1983, 228(2):253-269. DOI:10.1002/jez.1402280210.
- [91] BAKER D J, JEGANATHAN K B, CAMERON J D, et al. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice[J]. Nat Genet, 2004, 36(7):744-749. DOI:10.1038/ng1382.
- [92] LAVON N, NARWANI K, GOLAN-LEV T, et al. Derivation of euploid human embryonic stem cells from aneuploid embryos[J]. Stem Cells, 2008, 26(7): 1874-1882. DOI:10.1634/stemcells.2008-0156.
- [93] BOLTON H, GRAHAM S J L, VAN DER AA N, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential[J]. Nat Commun, 2016, 7:11165. DOI:10.1038/ncomms11165.
- [94] DAVISSON M T, SCHMIDT C, AKESON E C. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome[J]. Prog Clin Biol Res, 1990, 360:263-280.
- [95] 赵国屏. 从人类基因组计划到精准医学——比较医学的发展趋势与挑战[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(1):1-8. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.022.
- (收稿日期: 2021-08-27 修回日期: 2021-09-24)



吴孝槐, 博士, 高级工程师, 中国合格评定国家认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 实验动物和 GLP (Good Laboratory Practice) 项目高级主管, 国家标准样品技术委员会 TC118 委员, 国家标准委 SAC/TC251/SC1 委员, 中国毒理学会理事, 经济合作与发展组织 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 的 GLP 工作组中国观察员。2004 年 2 月博士毕业于中国科学院植物研究所分子发育中心。2004 年 2 月—2011 年 2 月于北京市食品安全监控中心从事食品中有害物质的监测和风险评估工作。2011 年 2 月至今于 CNAS 从事 17025 实验室、实验动物机构和 GLP 认可, 以及能力验证统计技术研究和评价工作。

CNAS 实验动物机构认可进展

吴孝槐

(中国合格评定国家认可委员会, 北京 100062)

[摘要] 中国合格评定国家认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 实验动物机构认可制是既与国际接轨又符合中国国情的第三方评价制度, 与实验动物许可证制度互为补充, 是我国实验动物机构管理的一项重要制度。本文介绍了 CNAS 实验动物机构认可的起源、发展历程、认可现状, 以及面临的问题与挑战, 并提出了完善实验动物机构认可制度的对策和建议。

[关键词] 实验动物机构; 认可制度; 动物福利; 进展

[中图分类号] Q95-33; R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0384-08

Progress on the Accreditation for Laboratory Animal Institutions of CNAS

WU Xiaohuai

(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China)

Correspondence to: WU Xiaohuai, E-mail: wuxh@cnas.org.cn

[Abstract] The accreditation for laboratory animal institutions of China National Accreditation Service for Conformity Assessment (CNAS) is a third-party evaluation program that is in line with international practices and China's national conditions, it is complementary to the national laboratory animal license system, and is an important system for the management of laboratory animal institutions. This paper introduces the origin, development, status quo, problems, and challenges of CNAS laboratory animal accreditation, and proposes countermeasures and suggestions for improving the accreditation system of laboratory animal institutions.

[Key words] Laboratory animal institution; Accreditation program; Animal welfare; Progress

实验动物资源是生命科学研究和生物技术的发展不可或缺的基础材料和支撑条件, 是国家科技创新的重要生物资源。实验动物机构是生命科学

研究的基础平台, 在其运行和发挥作用的过程中涉及从业人员健康、设施与环境安全、实验动物质量与福利, 以及动物实验质量等重大科学问题

[基金项目] 中国合格评定国家认可委员会科技项目(2019 CNAS12)

[作者简介] 吴孝槐(1973—), 男, 高级工程师, 研究方向: 认证认可, 包括 GLP 实验室和实验动物机构认可。

E-mail: wuxh@cnas.org.cn

和社会伦理问题。

我国对实验动物机构管理实行的是许可证制度。许可证制度是实验动物管理的市场准入制度,是保障实验动物和动物实验质量的重要措施。除许可证制度外,中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)创建了实验动物机构认可制度(以下简称认可制度)。许可证管理是法规强制性要求,认可是自愿性第三方评价。CNAS实验动物机构认可制度既符合国内实际现状,又借鉴了国际上实验动物机构认可和管理的先进经验,如美国实验动物评估与认可协会(AAALAC)和加拿大实验动物管理委员会(CCAC)的认可管理经验。认可制度与许可证制度相互促进、相互补充,共同致力于我国实验动物机构管理体系的完善,推动我国实验动物科学和生命科学事业的发展。

1 CNAS实验动物机构认可的起源

科学人道地对待和使用动物已经成为全人类的共识。只有建立在动物福利和伦理基础上的动物实验,其研究和检测结果才有可能获得世界范围内的广泛认可。西方一些发达经济体,如美国、加拿大、欧盟等已经将实验动物的福利以立法形式进行保障。

我国对实验动物管理的基本法规是《实验动物管理条例》(以下简称条例)。条例于1988年颁布实施,后经过3次修订,现行有效的是2017年修订版。在笔者撰写本文之际,新一版条例修订草案已开始公开征求意见。条例提出我国实行实验动物许可证制度和质量合格证制度,条例内容主要涉及动物质量。2006年国家科学技术部发布了《善待实验动物的指导性意见》,对实验动物福利提出了更为明确、具体的要求。但在实施过程中,实验动物领域一直缺乏一部系统的国家标准和相应的认可评价体系。

随着各国政府主管部门及相关国际组织对实验动物机构认可结果的采信和利用,特别是在我国政府部门减政放权和推行放管服改革的大背景下,建立以动物福利为基础的我国实验动物机构认可制度已经势在必行。因此,为建立一套既与

国际接轨又符合中国国情的实验动物机构认可制度,CNAS于2011年底提出了建设中国实验动物机构认可制度的构想,并着手实施。

2 实验动物机构认可的发展历程

2011年,在国家科学技术部、原国家质量监督检验检疫总局(简称质检总局)和国家认证认可监督管理委员会(简称认监委)的支持下,CNAS联合北京市实验动物管理办公室、中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心、中国医学科学院医学实验动物研究所、上海实验动物研究中心、北京实验动物研究中心、中国食品药品检定研究院、中国科学院昆明动物研究所等专业机构,提出了构建符合中国国情并能与国际通行做法相接轨的中国实验动物机构认可制度的提议,相关研究被列入国家“十二五”科技支撑计划《实验动物质量保证条件和认可评价关键技术研究及示范》(项目编号:2011BAI15B03)。同年,由CNAS牵头,联合上述权威机构,共同制定完成《实验动物机构质量和能力的通用要求》(GB/T 27416—2014)(等同转换为实验动物机构认可准则),该标准于2014年10月1日正式发布实施^[1]。该标准的发布实施为CNAS开展实验动物机构认可奠定了坚实基础。随着认可体系文件的发布、实验动物专业委员会的组建和一系列现场评审活动的开展(表1),我国实验动物管理进入了新阶段。

CNAS实验动物机构认可制度的建立丰富了我国的认可体系。在国际实验室认可合作组织(ILAC)范围内,CNAS是首家开展实验动物机构认可的认可机构。随着CNAS实验动物机构认可体系逐步完善,国内一些有影响力的实验动物机构开始申请认可,实验动物机构认可的影响力在实验动物行业和生命科学领域日益增强。

3 实验动物机构认可的现状

3.1 认可文件

CNAS实验室及相关机构认可的规范类文件分为四个层级,分别为认可规则、认可准则、认可指南和认可方案等。《实验动物饲养和使用机构认可规则》主要规定CNAS实验动物机构认可

表1 CNAS实验动物机构认可发展里程碑事件

Table 1 Milestones for CNAS accreditation of laboratory animal institutions

序号	时间	事件
1	2015—2016年	CNAS对前期参与课题研究和标准制定的10家实验动物机构开展试点认可,探索实验动物机构认可试行版体系文件和评审流程的适宜性
2	2016年1月27—29日	CNAS在京举办了实验动物机构认可科研示范总结会议及首批认可评审员培训班
3	2017年5月16日	CNAS发布认可委(秘)(2017)48号文件“关于发布实施CNAS-CL60:2017《实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则》、CNAS-RL08:2017《实验动物饲养和使用机构认可规则》的通知”,标志着CNAS实验动物机构认可制度的正式实施
4	2018年1月24—26日	CNAS在昆明首次开展了实验动物机构认可现场评审活动。中国科学院昆明动物研究所作为全国首家申请实验动物机构认可的单位,通过了现场评审
5	2018年5月28—30日	CNAS对第2家申请机构——中国人民解放军军事科学院军事医学研究院实验动物中心开展初次现场评审
6	2018年9月20日	CNAS实验动物专业委员会成立大会暨第一届委员第一次会议在京召开,标志着CNAS实验动物机构专业委员会正式成立
7	2018年9月—2021年7月	CNAS对新申请的10家实验动物机构实施现场评审
8	2020年5月	中国合格评定国家认可中心对内设机构进行调整,新组建的特殊标准实验室认可部(特标部)负责CNAS实验动物机构认可
9	2021年3月23日	CNAS实验动物专业委员会在北京举办认可技术研讨会,讨论制修订实验动物机构认可文件

体系运作的程序和要求,包括认可条件、认可流程、申请受理要求、评审要求、对多场所实验动物机构认可的特殊要求、变更要求、暂停、恢复、撤销、注销认可,以及CNAS和实验动物机构的权利和义务。《实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则》则主要规定了实验动物机构的设施、管理和运行在质量、安全、动物福利、职业健康等方面应达到的基本要求。

为方便实验动物机构的认可申请、自我核查和指导评审员的现场评审工作,CNAS还制定了实验动物机构认可工作文件,包括《实验动物机构认可申请书》《实验动物机构认可评审报告》《实验动物机构自查报告》《实验动物机构认可评审工作指导书》等文件。

为提高认可准则的适用性和现场评审的有效性,针对目前大量的实验动物机构饲养和使用基因修饰动物,CNAS实验动物专业委员会成立工作组,起草了“实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则在基因修饰动物饲养和使用机构认可中的应用说明”;为考察实验动物机构是否遵循本单位管理文件和操作规程,借鉴实验室认可

评审现场能力考核的做法,实验动物专业委员会成立了工作组,起草了“实验动物机构认可评审现场考核方案”。

3.2 认可流程

CNAS实验动物认可的评审周期为5年。初次评审后第1年,机构进行自查;第2年,进行现场监督评审;第3年和第4年,实施机构自查;第5年,实施现场复查。

实验动物机构申请认可的流程包括:意向申请、正式申请、评审准备、现场评审、认可批准、监督评审和复评阶段(图1)。

意向申请阶段,申请机构联系人可通过来访、电话或邮件的方式向CNAS秘书处咨询认可要求和流程,获取最新版认可文件。正式申请阶段,CNAS秘书处审查申请机构提交的申请资料,做出是否受理的决定并通知申请机构。在评审准备阶段,CNAS秘书处根据公正性原则组建评审组,评审组由具备资格的评审员和相应的技术专家组成,并征得申请机构同意。

现场评审包括文件审核和现场审核。文件审核是指由评审组对申请机构提供的申请资料和管

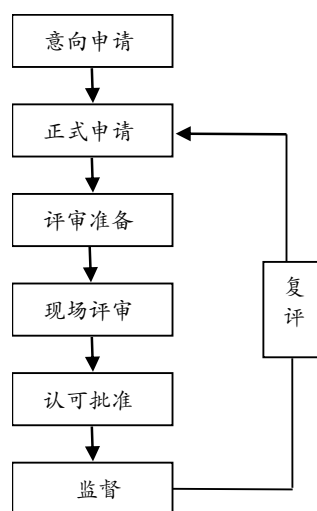


图1 实验动物机构认可流程图

Figure 1 The flow chart for the accreditation of laboratory animal institutions

理体系文件与认可准则的符合性进行审核。现场审核由评审组对设施设备、饲养管理、动物医护、职业健康安全、机构动物管理和使用委员会(IACUC)职责等方面的软硬件系统,以及管理体系的运行情况进行核查。现场评审完成后,通常有2~3个月的整改期。机构整改完成并提交整改材料后,CNAS秘书处将最终评审材料(包括评审报告、整改材料和验收意见)提交给评定委员会,评定委员会对申请机构与认可要求的符合性进行评价并做出评定结论。为证实获准认可的机构持续符合要求,通过评定获得认可的机构需接受监督评审和复评审。

CNAS秘书处新调整设置的17个内设部门中,涉及实验动物机构认可业务的部门,除主责部门即特殊标准实验室认可部(特标部)外,还涉及评定部和监督部(图2)。

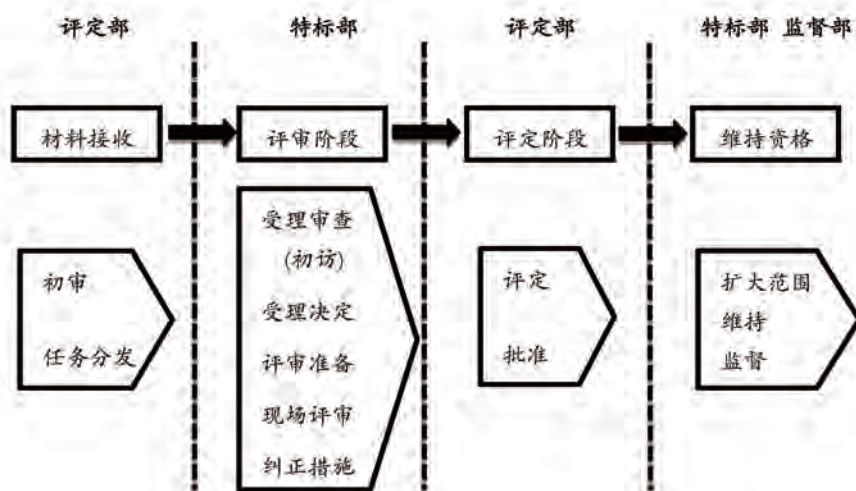


图2 CNAS实验动物机构认可相关部门和职责

Figure 2 The responsible departments and their roles in CNAS accreditation of laboratory animal institutions

评定部负责材料接收和评定,包括前期申请材料的接收、初审和任务分发,以及最终的评定和批准。特标部作为实验动物机构认可评审的主责部门,负责评审阶段和资格维持阶段的工作。评审阶段包括受理审查、初访、受理决定、评审准备、现场评审和纠正措施;维持资格阶段包括扩项、复评和监督。同时,在维持资格阶段,监督部可根据投诉情况和督查计划对认可的机构进行不定期监督评审。

3.3 认可业务系统

为提高实验动物机构申请和现场评审的效率,缩短工作时限,CNAS开发建立了认可业务信息管理系统。针对实验动物机构认可业务特点开发了实验动物机构认可业务模块。申请机构可在线提交申请材料,项目主管通过系统审核申请材料,反馈审查意见。同时项目主管可通过业务系统组建现场评审组,发放评审通知和评审材料。评审组专家在现场评审时可在线填写评审发

现和评审报告。认可流程的电子化使所有操作流程和节点都可在信息系统中显示,有利于控制每个节点的时限。CNAS 认可业务信息系统大大提高了工作效率,减少了沟通费用和时间。

3.4 认可的实验动物机构

自 2018 年 1 月对中国科学院昆明动物研究所首次开展实验动物机构认可现场评审以来,截至

2021 年 8 月, CNAS 已认可实验动物机构 12 家(表 2)。其中获证机构 10 家;其余 2 家机构已经完成现场评审(表 2 中序号 11 和 12 号),目前还未进入评定批准阶段。其中 9 家位于北京,其余 3 家分别位于云南、四川和上海。3 家机构是生产机构,7 家是使用机构,2 家既是生产机构又是使用机构。

表 2 CNAS 实验动物机构认可名单

Table 2 List of CNAS accredited laboratory animal institutions

序号	机构名称	机构类型	动物种类和级别
1	中国科学院昆明动物研究所	生产、使用	猕猴、食蟹猴、平顶猴
2	中国人民解放军军事科学院军事医学研究院实验动物中心	使用	大鼠、小鼠、豚鼠、兔、犬、猴
3	北京维通利华实验动物技术有限公司	生产	大鼠、小鼠(SPF)
4	北京玛斯生物技术有限公司	生产	比格犬(普通级)
5	北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司	生产	鸡、鸡蛋(SPF)
6	中国医学科学院阜外医院动物实验中心	使用	猪、犬、兔、豚鼠、羊、牛
7	中国疾病预防控制中心实验动物中心	使用	小鼠、SPF 鸡、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、犬、猫、猴
8	中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所	生产、使用	大鼠、小鼠、豚鼠、兔(SPF)
9	成都华西海圻医药科技有限公司	使用	大鼠、小鼠、豚鼠、兔、犬、猴、小型猪
10	澎立检测技术(上海)有限公司	使用	猪、犬、兔
11	中国科学院生物物理研究所动物实验中心	使用	小鼠、大鼠、仓鼠
12	中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心实验动物中心	使用	猕猴、食蟹猴

3.5 认可评审中发现的主要问题

3.5.1 文件评审阶段

在资料审查和文件评审阶段,发现申请机构提交的申请资料文件中存在主要问题有:(1)非法人单位的实验动物机构无法人授权书和法律责任声明;(2)机构组织结构设置不合理,缺少 IACUC 和职业健康安全委员会设置,或其在组织结构中的岗位设置与其职责不匹配;(3)内审和管理评审缺少审核计划和审核记录,未按照准则中内审和管理评审的要素和条款要求开展评审;(4)机构提供的动物设施平面图信息不全,缺少人员、物品和动物流向信息,以及隔离区和屏障区信息;(5)缺少关键人员(如机构负责人和 IACUC 主席)在动物福利伦理方面的资质和培训经历描述等。

3.5.2 现场评审阶段

在现场评审阶段,评审员根据认可准则的条款要求逐条核查其符合性。认可准则的主体部分共分为 6 大部分,现场评审时发现的一些不符合准则要求的问题和不符合项的分布比例见表 3。

3.6 认可评审员和实验动物专业委员会

CNAS 评审员和技术专家是 CNAS 的核心技术支持资源,是确保认可有效性和认可质量的重要保障。截至 2021 年 8 月, CNAS 已签约聘用 44 名实验动物机构评审员和技术专家。其中主任评审员 4 名,技术评审员 7 名,实习评审员 24 名,技术专家 9 名。为确保评审员对认可要求和认可准则的准确理解,提升评审技巧,统一评审尺度, CNAS 秘书处每年会举办评审员培训班以对评审员进行初始培训或持续培训。

为确保实验动物机构认可有效实施和认可品牌的高端、权威、有公信力, CNAS 秘书处根据 CNAS 专门委员会工作规则的有关规定,于 2018 年 5 月 30 日正式批准成立了 CNAS 实验室专门委员会实验动物机构专业委员会。24 名委员会专家成员来自中国科学院、中国医学科学院、军事科学院、政府管理部门、高校、生物医药企业和认证认可机构,都是我国实验动物领域的权威专家和知名学者。CNAS 实验室专门委员会实验动物机构专业委员会的工作职责主要有:(1)参与

表3 12家实验动物机构现场评审中发现的不符合项统计

Table 3 Statistics of non-conformance found in the evaluation of 12 laboratory animal institutions

序号	准则内容	常见不符合问题	不符合项数量	不符合项数量占总数的百分比/%
1	管理体系	缺少人员进出设施、传递窗的使用、动物接收的程序文件或文件化规定;管理手册和SOP文件缺少修订号、生效日期和唯一性识别信息;配制试剂缺少标签标识或标识信息不全;安全手册中缺少生物风险描述;机构的年度培训计划缺少IACUC活动与检查、关键岗位人员教育、培训能力评估以及关键设备校准、核查和维护等内容	64	30.62
2	实验动物设施	动物房内的温湿度计未进行计量检定;饲养笼具的高度和尺寸不满足标准规定要求;饲料库房缺少可控制温度、湿度和通风的设备;无IVC和隔离笼通风失效的预案;无菌手术室未进行空气洁净度和沉降菌浓度检测等	28	13.40
3	动物饲养	饲养笼盒内没有放置表现实验动物天性的物品或装置;动物笼牌缺少必要信息;不能提供环境控制和监测记录;不能提供饲料、垫料出入库记录;对动物饲料、垫料等物品的供应商没有评估等	34	16.27
4	动物医护	无菌手术操作流程如洗手方式、手套规格、手套穿戴不符合大动物外科手术规范;患病动物和疑似患病动物未在兽医师的指导下处置,处置方案未经IACUC的审核;手术实施方案中没有制定完整的镇痛方案等	38	18.18
5	职业健康安全	职业健康安全委员会成员组成未包含员工代表;传递窗和手术室缺少防紫外线辐射的标识;缺少防噪声个体防护装备;职业健康安全危险因素一览表没有涵盖机构所有的安全因素等	29	13.87
6	IACUC的职责与管理要求	IACUC成员中没有来自非本机构的从事社会科学、人文科学或法律工作的人员;IACUC检查不够全面,未包含实际操作检查,如动物生产;对实施安乐死和人造终点的员工缺少专门培训和评估等。	16	7.66

注:SOP为标准操作程序;IACUC为机构动物管理和使用委员会。

CNAS实验动物机构认可规则、准则和政策的制(修)订;(2)负责制订实验动物机构认可领域的技术指南和(或)补充技术要求;(3)跟踪实验动物领域的国际认可活动,参与国际同行的技术交流;(4)开展实验动物使用和实验动物认可评审活动的技术研究,为国内同行提供技术交流平台,并为认可提供技术支持;(5)开展实验动物领域相关的专业技术培训,可受CNAS委托开展实验动物机构认可评审员或其他评审员的技术培训等工作;(6)为涉及实验动物机构认可的申诉、投诉的处理提供技术支持。

4 实验动物机构认可面临的主要挑战

4.1 缺少法律法规支持和政府相关部门采信

实验动物机构认可可是自愿性认可制度,不同于许可证制度的强制性要求,目前,《实验动物管理条例》和其他法律法规中对实验动物机构认

可并没有明确规定,也没有鼓励机构申请认可的条款。而且政府相关部门没有以制度化的方式采信CNAS认可结果。相比而言,与CNAS地位和设置相似的CCAC是加拿大政府授权负责实验动物机构认可的权威机构,但加拿大政府采信CCAC的认可结果,这对CCAC的实验动物机构认可制度的实施起到了有力的推动作用;同时,经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)的药物非临床研究质量管理规范即良好实验室规范(Good Laboratory Practice, GLP)评价制度中对实验动物系统的要求,以及美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)关于科研立项和药品生产外包过程中对实验动物的要求,均承认AAALAC评价的结果^[2]。

尤其是在我国科研项目立项或涉及国家财政资金的项目招投标时,对涉及使用实验动物的项

目,并未要求实验动物机构通过认可。虽然CNAS实验动物机构认可制度的理念、内容和操作性方面达到了国际先进水平,同时又符合中国国情,但认可结果并没有得到政府相关部门的普遍采信,这与欧美发达国家存在较大的差距。如果不能得到政府相关部门的采信,CNAS实验动物机构认可的价值和影响力将会受到很大限制。

4.2 认可数量和规模需进一步拓展

我国实验动物认可制度从2018年实施,至今只有10家获得认可证书,还有2家已完成现场评审。这在全国近两千余家获得许可证的实验动物机构中,所占份额还是非常小。根据2018年CNAS认可制度发展规划,预期在2018—2021年认可的实验动物机构数量达到30家。但截至目前,实际申请认可的机构数量发展远不及预期,其可能原因除了CNAS认可是自愿性认可外,也与认可初期设置的门槛和受理条件过高有关。

认可制度设立之初,为树立CNAS认可制度的高端品牌形象,确保申请认可的实验动物机构是质量较好的国内高水平权威机构,CNAS于2019年1月发布了《CNAS关于实验动物饲养和使用机构申请认可条件补充说明的通知》(暂行),对《实验动物饲养和使用机构认可规则》条款4“认可条件”中的“相关要求”做出补充说明,要求申请认可的机构是科研项目的牵头单位,具有独立的质量检验部门,或申请认可的能力包括特色或稀有品种的实验动物,或动物的数量和生产规模达到一定水平。该补充说明暂行一段时间后,前期申请认可的12家机构基本都是国内各行业有影响力的实验动物机构,起到了很好的宣传和带动作用,树立了CNAS实验动物机构认可的高端品牌形象。然而过高的门槛也限制了认可业务的进一步发展。同时,CNAS秘书处也收到了对该暂行通知的不同意见,认为该通知将一些满足认可要求但不符合补充说明的中小规模机构排除在外,与《合格评定-认可机构的通用要求》(GB/T 27011—2019)中对认可机构的公正性要求有冲突,也不利于实验动物行业的整体发展。CNAS通过咨询专家意见,最终研究决定取消暂行通知。同时启动对《实验动物饲养和使用机构认可受理要求的说明》和认可规则的制

(修)订工作。

此外,认可的机构数量少也与CNAS实验动物机构认可的宣传推广力度不够有关。CNAS与实验动物的管理部门、学会和行业的沟通交流有待加强。在实验动物行业举办的各种论坛和学术会议上,介绍CNAS认可议题的不多。很多机构对CNAS认可并不了解,缺乏了解的渠道和平台。

4.3 认可评审需进一步优化

许可证制度的定位是基本的市场准入制度,认可制度的定位则是高端、权威、有公信力的能力评价制度。两个制度各有侧重,互为促进。在申请认可时,取得许可证是前提条件。认可的主要依据《实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则》已涵盖许可证核查的基本要求,认可准则的实验动物设施部分包含《实验动物环境和设施》(GB14925—2010)和《实验动物设施建筑技术规范》(GB50447—2008)的要求。许可证作为受理前提,可保障申请认可机构满足基本的生产和使用要求。但在现场评审时,认可核查仍然涵盖实验动物机构环境设施和建造要求等这些许可证核查的内容。现场评审时,评审员需在2~3 d内完成准则条款的全面核查,包括6大部分550个条款,需要对每个条款的符合性逐条核查。除文件核查外,还需要进行设施核查。因此,核查任务和工作量过于繁重。建议在现场评审资源和时间有限的情况下,需考虑与许可证核查制度的有机衔接,减少重复评审,关注认可重点,提高认可效率,体现认可特色和重点。

5 完善实验动物机构认可的对策和建议

为进一步规范CNAS实验动物机构认可工作,提升认可质量和认可效率,以便更好地为实验动物机构提供认可服务,笔者针对目前CNAS认可面临的问题和挑战,建议今后做好以下几方面的工作:

(1)争取政府相关部门和组织采信认可结果。加强与实验动物管理部门和科研管理部门的沟通协调,呼吁在相关法律法规或实施办法中增加鼓励认可条款,建议实验动物相关科研课题立项和项目招投标时将认可作为前提条件、评分指标或加分项。

(2) 优化认可评审。建立与许可证制度的有机衔接, 认可评审时, 许可证核查的要求可不再重复核查, 或直接采信。同时加强动物福利伦理审查, 提升认可效率和质量^[3]。

(3) 完善认可文件。针对特殊种类动物和特殊情形制定认可准则应用说明, 制定认可准则核查细则, 以方便机构进行自我核查, 提高认可准则的适用性。修订认可规则中对受理条件的要求, 明确受理条件, 为实验动物行业提供更好的认可服务。

(4) 对评审员和机构加强培训。通过培训加深评审员对准则条款的理解, 提升评审员的评审技巧和评审水平, 统一评审尺度和判定标准。对已认可机构和意向申请机构开展培训, 特别是在内审核管理评审方面开展培训, 帮助机构了解认可要求。

(5) 加强合作和推广宣传。加强与实验动物管理部门和学会等社团组织的合作, 开展行业培

训和宣传, 推广CNAS实验动物机构认可。

(6) 开展国际交流合作。与AAALAC、CCAC等国际知名实验动物认可和评价组织开展交流与合作, 借助CNAS国际互认平台, 为CNAS实验动物机构认可结果获得国际承认创造有利条件。

参考文献:

- [1] 全国认证认可标准化技术委员会. GB/T 27416—2014《实验动物机构 质量和能力的通用要求》理解与实施[M]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [2] 史光华, 吕京, 葛红梅, 等. 北美实验动物认可管理现状[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(2): 138-141. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2015.02.011.
- [3] 刘晓宇, 赵海龙, 卢选成, 等. 关于建设我国实验动物福利保障体系的思考[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(4): 326-330. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-5817.2019.04.014.

(收稿日期: 2021-08-18 修回日期: 2021-09-05)

《实验动物与比较医学》杂志2022年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管, 上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办, 是我国实验动物与比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊), 并被美国“Chemical Abstracts”、中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录, 2020年入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高, 刊登实验动物和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究, 以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目包括专家论坛、研究论著、综述、经验交流、实践与探索、技术与平台、政策与法规、标准与指南、人物、简报、动态与书讯等。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理, 以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎订阅!

本刊为双月刊, 大16开, 彩色铜版印刷; 全年共6期, 每期定价30元/本, 全年共180元/套。读者可通过各地邮局订阅, 邮发代号为4-789; 也可以联系本刊编辑部购买, 联系电话: 021-50793657。E-mail: bjb50793657@163.com。编辑部地址: 上海市浦东新区金科路3577号(邮编201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部



宋国华,教授,博士生导师,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室副主任,兼任中国实验动物学会高校教育工作委员会副主任委员、中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会委员、女科技工作者工作委员会委员,以及山西省实验动物学会副理事长兼秘书长、中共山西省高等院校工委、中共山西省教育厅党组联系的高级专家,荣获第九届山西省优秀科技工作者。担任《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》《实验动物与比较医学》杂志编委。主要从事实验动物学教学科研工作,研究方向为实验动物资源的开发与利用、人类疾病动物模型的建立与机制研究。参编《实验动物学》《人类疾病动物模型》等教材7部,撰写《遗传标记在实验动物遗传质量控制中的应用》专著1部。主持国家自然科学基金2项,省部级科研项目10项,省级教改项目4项。荣获山西省科技进步二等奖、三等奖各1项,山西省高等学校科技进步一等奖1项,山西省青年科技奖,山西省教学成果二等奖2项,中国实验动物学会优秀青年人才奖,中国实验动物学会科技进步二等奖、三等奖各1项。在 *Molecular Carcinogenesis*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 等学术期刊发表论文60余篇。

高继萍,硕士,山西医科大学实验动物中心实验师。主要研究方向为人类疾病动物模型的建立与机制研究。主持山西省自然科学基金青年项目1项,参与国家自然科学基金2项。发表SCI论文3篇,核心期刊论文4篇,刊于 *Environmental Science and Pollution Research*, *Biological Trace Element Research* 和《中国公共卫生》等期刊,荣获第十二届中国实验动物科学年会优秀论文协和奖,第十七届中国北方实验动物科技年会优秀论文一等奖。



利用中国仓鼠制备疾病模型的优势与进展

高继萍¹, 陈朝阳¹, 轩瑞晶¹, 张锐虎¹, 宋国华^{1,2}

(1. 山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001;

2. 山西医科大学附属精神卫生医院, 太原 030001)

[摘要] 中国仓鼠是具有中国特色的实验动物, 在医学和生物学等实验研究中占有重要地位, 广泛用于遗传学、传染病学和组织培养等生命科学研究, 尤其是在糖尿病与口腔癌等动物模型及机制研究方面独具特色。本文就中国仓鼠自被开发以来在疾病动物模型中的应用研究进行综述, 探讨中国仓鼠在生物医学研究中的作用与面临的问题。

[关键词] 中国仓鼠; 生物医学; 动物模型

[中图分类号] Q95-33;R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0392-07

Advantages and Progress of Using Chinese Hamsters to Construct Disease Models

GAO Jiping¹, CHEN Zhaoyang¹, XUAN Ruijing¹, ZHANG Ruihu¹, SONG Guohua^{1,2}

(1. Laboratory Animal Center of Shanxi Medical University, Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Models, Taiyuan 030001, China; 2. Mental Health Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Correspondence to: SONG Guohua, E-mail: ykdsgh@163.com

[Abstract] Chinese hamsters are experimental animals originally from China. They play an important role

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31970513); 山西省实验动物资源共享服务平台项目(201605D121019)

[作者简介] 高继萍(1987—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: 1076584833@qq.com

[通信作者] 宋国华(1973—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

in experimental research on medicine and biology. They are widely used in life science research, such as genetics, infectious diseases, tissue culture, especially in animal models and mechanism research, such as diabetes and oral cancer. This paper reviews the relevant applied studies of Chinese hamsters in disease animal models since its development, and discusses the advantages and problems associated with the use of these animals in biomedical research.

[Key words] Chinese hamster; Biomedicine; Animal model

中国仓鼠 (Chinese hamster) 属于黑线仓鼠华北亚种 (*Cricetulus barabensis griseus*), 俗称中国地鼠, 是我国独特的啮齿类实验动物之一, 主要分布在华北、东北和内蒙古等地区^[1]。中国仓鼠的特点是背部有一条黑色条纹, 短尾, 有一对易于翻出的颊囊, 而且雄鼠有一对硕大而下坠的睾丸, 染色体数量为22条^[1]。1919年, 我国学者谢恩增首次利用中国仓鼠进行肺炎研究, 但在实验室未能繁育成功^[2]。1948年末, 美国学者从中国引入10对野生中国仓鼠, 之后用于欧、美、日等部分主要实验室^[3]。1980年春, 山西医科大学薄嘉璐教授从北京郊外捕获60只中国仓鼠, 开始进行驯化繁殖^[4-5]。1991年, 山西医科大学建成近交系中国仓鼠群体, 命名为山医群体近交系中国仓鼠, 英文简称为SYB1^[3]。之后, 山西医科大学又相继开展了中国仓鼠实验动物标准化、清洁级近交系中国仓鼠生产供应基地和基本生物学数据共享平台建设等关键技术的研究工作^[6]。中国仓鼠因其自身独特的解剖结构和生物学特性, 成为了一种理想的疾病动物模型, 极大地推动了其在生物医学研究中的应用。

1 糖尿病研究

糖尿病是一种内分泌代谢性障碍疾病, 其中2型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM) 占所有糖尿病确诊患者的90%以上。T2DM的病因受非遗传因素和遗传因素影响, 最佳的T2DM动物模型应属于标准的自发性糖尿病实验动物模型^[7]。通过近亲交配的遗传性糖尿病中国仓鼠模型是理想的T2DM自发动物模型, 其发病症状与人类十分相似。早在1959年, Meier等^[8]已对自发性遗传性糖尿病中国仓鼠的各个脏器进行了病理研究。随后, 以T2DM中国仓鼠模型为基础, 研究者们对糖尿病的发病机制、药物治疗干预等

进行了深入探究。孙淑华等^[9]和田金菊等^[10]研究发现, 自发性T2DM中国仓鼠的血液电解质含量、血糖代谢指标含量、血液相关酶的6项指标及总蛋白含量均增高, 提示自发性T2DM中国仓鼠的糖代谢和蛋白代谢出现异常。Wang等^[11]成功建立了山医群体近交系中国仓鼠自发性T2DM动物模型后, 发现模型组血糖轻度升高, 糖脂代谢改变, 可产生胰岛素抵抗, 而且其抗氧化机制及生物活动规律受损, 骨骼肌和肝脏中糖脂代谢相关基因存在差异性表达。王晨阳^[12]应用蛋白质组学和代谢组学对中国仓鼠自发性T2DM动物模型的小肠组织和血清样本进行了生物信息学分析, 发现糖尿病中国仓鼠的分子生物学特征主要集中在糖脂代谢、胰岛素抵抗、氨基酸代谢紊乱和炎症反应等方面。李国生等^[13]基于T2DM中国仓鼠模型探讨小檗碱对T2DM的治疗作用, 发现小檗碱可显著降低中国仓鼠的血糖血脂水平, 具有改善糖耐量和胰岛素抵抗的作用。吴大兴等^[14]研究应激和动物情绪对中国仓鼠糖尿病发生的影响, 发现二者共同作用导致糖尿病发生。姚树桥等^[15]探讨实验性应激对中国仓鼠糖尿病发作时胰腺内分泌功能和形态的影响, 通过选用震动、旋转和合并限制等方法进行实验性刺激1年, 结果发现慢性实验性应激促使糖尿病发病率增加, 胰岛素敏感性指数降低, 胰腺内分泌功能及形态学发生损伤。

以上研究说明中国仓鼠是较为理想的T2DM动物模型, 可为探索糖尿病的发病机制及药物研制等方面提供基础保障。基于中国仓鼠自发性糖尿病动物模型, 结合蛋白组学和代谢组学等技术, 从分子水平探究糖尿病中国仓鼠抗胰岛素的机制具有重要意义, 并且寻找相关生物标志物及药物靶点是当前的研究目标。

2 肿瘤研究

中国仓鼠口腔两侧有一对易于翻出的透薄颊囊, 血管丰富, 有致密的微血管网, 伸缩性大, 便于牵出, 是多种恶性肿瘤移植的理想直观部位^[16]。中国仓鼠口腔黏膜可动态模拟人类口腔癌变过程, 因此中国仓鼠口腔颊囊癌模型是进行口腔癌发病机制研究的理想动物模型。皇甫冰^[17]和李莉红^[18]分别在颊囊膜上涂抹二甲基苯并蒽构建了中国仓鼠颊囊黏膜癌前病变和鳞状细胞癌模型, 采用高通量转录组技术、微小RNA (microRNA, miRNA) 测序技术和生物信息学分析方法构建了差异基因表达谱, 该模型可连续动态地观察口腔颊囊黏膜癌前病变, 筛选出的差异基因有望成为肿瘤标志物。卫佳宁等^[19]构建中国仓鼠口腔鳞状细胞癌动物模型, 探究非编码RNA miR-504在癌组织及癌旁舌组织中的表达特征, 发现癌组织中miR-504表达显著上调, 推测其可能通过调控下游靶基因及信号通路影响口腔癌的发生和发展。王晓堂等^[20]首次通过高通量测序构建中国仓鼠口腔鳞状细胞癌长链非编码RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 差异表达谱, 为探讨LncRNA调控口腔鳞状细胞癌发生发展的具体调控机制奠定了基础。宋国华团队^[21]目前已经构建了中国仓鼠口腔黏膜癌变不同时期的mRNA和miRNA表达谱, 筛选出差异表达的mRNA和miRNA进入功能鉴定和机制研究阶段, 对寻找有效的口腔黏膜癌早期诊断及恶性进展的生物分子标志具有重要意义。

另外, 中国仓鼠易受多种致癌因素的刺激, 发展为特异肿瘤。刘球等^[22]用雌激素处理中国仓鼠, 发现3个月后中国仓鼠会发生垂体前叶腺瘤。Fukuhara等^[23]和Uchida等^[24]通过给予亚硝胺处理或者移植仓鼠胰腺癌细胞PGHAM-1成功构建了胰腺癌动物模型。此外, 乏氧、营养缺乏和低pH影响肿瘤的放疗和化疗效果。李五岭^[25]以中国仓鼠V79细胞为研究对象, 探讨以上因素在体外诱导V79细胞的抗药物阿霉素 (adriamycin, ADR) 作用, 结果表明乏氧、营养缺乏和低pH都能使V79细胞对ADR产生抗性, 从而影响肿瘤化疗效果。

由此可见, 中国仓鼠在肿瘤发病机制和抗癌药物筛选相关研究中有巨大的应用潜力。

3 组织培养研究

目前根据抗药性、抗病毒性、温度敏感性和营养需要, 已建立了许多中国仓鼠突变型细胞株, 这些细胞株已成为诱变和致癌研究的实验工具^[26]。中国仓鼠卵巢 (Chinese hamsters ovary, CHO) 细胞经建系、培养后用于获得大量异源蛋白, 是生物制药的主要生产载体。CHO细胞作为使用最广泛的表达宿主, 具有很多优势: (1) CHO细胞可无血清悬浮培养, 具有大规模生产能力; (2) 通过基因扩增可提高蛋白生产率; (3) 表达产物即重组蛋白经翻译后修饰与人的相应蛋白接近, 对人类病毒感染具有抵抗作用, 产品安全性较高^[27-28]。在过去的几十年里, CHO细胞广泛用于合成一系列重组蛋白, 这些蛋白已经被临床用于治疗许多人类疾病。

另外, 基于CHO细胞进行重组药物和生物制药等方面的研究, 给生物制药行业带来了巨大价值^[29]。Kido等^[30]研究发现, 紫色杆菌素通过控制CHO细胞周期, 提高重组免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG) 的产量, 提示紫色杆菌素具有单抗生产增强剂的作用。Henry等^[31]提出, 抑制CHO细胞凋亡能够提高生物制药的产量。中国仓鼠肺 (Chinese hamsters lung, CHL) 细胞被广泛用于染色体畸变和遗传毒理研究。许多学者以CHL细胞为研究对象, 探讨三七、黄连素、脂多糖和纳米银等药物及其他材质的细胞毒性和遗传毒性^[32-33]。Liu等^[34]在体外实验中运用CHL细胞证实, 维生素D对环磷酰胺 (cyclophosphamide) 诱导的基因组和DNA损伤有拮抗作用。Yamano-Adachi等^[35]比较CHL-YN细胞与CHO-K1细胞增殖速度, 发现CHL细胞增殖比常规的CHO细胞和普通的哺乳动物细胞快得多, 且IgG蛋白产量高, 认为CHL-YN细胞是用于产生重组蛋白的最佳细胞系。

4 传染病学研究

中国仓鼠对多种细菌、病毒和寄生虫高度敏感, 可作为病原感染研究的候选模型动物, 广泛应用于传染病学研究。中国仓鼠最早被用于肺炎

球菌研究,发现其对结核菌的感染效果好,症状出现早,致病明显,效果优于小鼠和豚鼠^[36]。也有研究报告,在中国仓鼠体内发现鼠疫病毒抗体^[37-38]。Ma等^[39]发现,异嗜性白血病病毒相关病毒的宿主细胞系是CHO细胞。高法衡等^[40]运用中国仓鼠经口途径感染牛付结核菌,成功构建了牛付结核菌的动物模型,该模型主要表现为在中国仓鼠肝、脾、肠管感染菌增殖,肠淋巴结发生病变。李存等^[41]构建了稳定表达和分泌型IgA (sIgA)的CHO细胞系,发现在CHO细胞中成功表达了sIgA抗体。Chuan等^[42]和Lu等^[43]发现,中国仓鼠在检测白喉棒状杆菌毒力方面与豚鼠一样敏感且更可靠。贾西等^[44]探究重组人抗狂犬病病毒单抗SO57和SOJB对不同狂犬病病毒株的作用,首先用街毒株SBD肌内注射中国仓鼠,4 h后注射抗体SO57或SOJB,结果显示剂量为100 U/kg的SO57能够完全保护被街毒株攻击的中国仓鼠,而SOJB也具有70%~80%的保护率。

此外,Luo等^[45]使用中国仓鼠构建严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)感染动物模型,探讨马抗SARS-CoV中和性抗体对SARS-CoV感染的防治作用。Luan等^[46]通过分析血管紧张素I转化酶2(angiotensin I converting enzyme 2, ACE2)识别S蛋白关键残基,预测严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的潜在宿主,发现在哺乳动物中包括宠物猫和犬、穿山甲及仓鼠中都保留来自SARS-CoV和SARS-CoV-2中S蛋白最关键的残基,提示利用中国仓鼠和金黄仓鼠构建SARS-CoV-2感染小动物模型成为可能。Bertzbach等^[47]利用中国仓鼠建立了新型冠状病毒感染模型,研究表明中国仓鼠易受SARS-CoV-2感染,病毒在上呼吸道和下呼吸道可以快速复制,中国仓鼠伴有支气管炎和肺炎,感染后体质量显著下降,且与金黄仓鼠模型相比,中国仓鼠具有显著优势,包括临床症状明显、体积小、遗传数据鲜明。

另外,中国仓鼠具有建立感染巴贝西虫实验模型的潜能。叶莉等^[48]通过腹腔注射含巴贝西

虫的血液感染中国仓鼠,发现病原体可在中国仓鼠体内长期潜伏,且具有典型的蜱传寄生虫病特点。中国仓鼠对杜氏利什曼原虫也非常敏感,是理想的黑热病模型实验动物^[49]。同时,中国仓鼠也是旋毛虫感染较为适宜的模型动物^[50]。由此可见,中国仓鼠在传染病学研究中具有非常重要的作用。

5 其他研究

陈玲等^[51]通过高脂膳食饲养并结合小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)腹腔注射构建了中国仓鼠的高糖高脂模型,研究发现高脂膳食单纯升高血脂,多次少量STZ可减缓中国仓鼠血糖升高,而且该模型出现一定的氧化应激损伤。郭长焕等^[52]在中国仓鼠背部皮肤植入小室成功构建了微循环观察模型,观察发现其背部皮肤微动脉存在特有的自律运动波。

由于中国仓鼠体外受精完全依赖于自身卵丘细胞及其胞外基质(cumulus oophorus and matrix, COM),因此中国仓鼠是研究COM与受精关系较为理想的动物模型。袁玉英等^[53]采用软骨染色液(阿利新蓝法)和放射免疫法测定中国仓鼠COM中糖胺多糖总量和孕酮含量,并采用精子穿卵实验探究精子的受精能力,结果发现卵子细胞外基质中糖胺多糖和孕酮可引起精子获能,促进顶体反应,从而提高受精能力。

中国仓鼠是研究动物行为的良好动物模型。高桂彬^[54]以雄性中国仓鼠为实验对象,探究不同性格雄性中国仓鼠攻击行为的变化及其与大脑内五羟色胺1a受体(5-hydroxytryptamine 1A receptor, Htr1a)和五羟色胺1b受体(5-hydroxytryptamine 1B receptor, Htr1b)的关联性,研究发现Htr1a mRNA的表达量与不同性格的雄性中国仓鼠攻击行为相关,推测Htr1a可能参与雄性动物攻击行为的脑内调控。

6 问题与挑战

目前,以中国仓鼠为实验动物构建了与人类疾病非常相似的动物模型,并运用该模型进行相关疾病的发病机制研究已取得初步成果。中国仓鼠在生物医学研究中展现出了巨大的优势和广阔

的应用前景。

由于中国仓鼠的研究历史较短,基础研究资料相对稀缺,国内外应用有局限性,与其他成熟的实验动物比较仍有许多不足。首先,虽然近交系中国仓鼠推动了遗传学、肿瘤学、免疫学等学科的发展,但由于其高度近交,导致隐性有害基因也高度纯合,后代生理功能的稳定性差,影响正常的繁殖,使保种传代比较困难。其次,中国仓鼠尚缺乏成熟、高效和特异的遗传操作技术与方法,目前尚未建立转基因及基因敲除等动物模型。开发转基因中国仓鼠,观察其生物学行为的变化,探究目的基因的生物学功能,揭示调控基因的效果仅仅是开始。另外,缺乏特异性强的诊断试剂,由于中国仓鼠特殊的分类学地位,现有动物和人的诊断试剂不能满足中国仓鼠实验需求,因此急需开发特异性强的检测试剂盒和方法,如制备适合中国仓鼠的特异性高的抗体、引物等。最后,中国仓鼠的肿瘤鉴定及肿瘤发展过程中的阶段性标志物检测也较为困难,极大地限制了中国仓鼠在相关研究领域的应用。

推动中国仓鼠在人类疾病模型中的研究,加强与国内外同行开展开发应用方面的合作,实现中国仓鼠最优化、更广泛的运用迫在眉睫。笔者认为,结合生物学特性数据开展定向培育,建立标准化实验动物的中国仓鼠模型种群,开发新的疾病模型,拓展新的应用,实现中国仓鼠资源共享是我们今后的工作重点。

参考文献:

- [1] YERGANIAN G. Cytogenetic possibilities with the Chinese hamster, *Cricetulus barabensis griseus*[J]. Genetics (Abstract.), 1952, 37: 638.
- [2] HSIEH ET. A new laboratory animal, *Cricetulus griseus* [J]. Nat Med J China, 1919, 5:20-24.
- [3] 刘田福. 中国地鼠山医群体近交系的培育[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(z1): 22-24. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2003.z1.008.
- [4] 薄家璐, 郭守明, 朱长源, 等. 中国地鼠的驯养与繁殖[J]. 山西医学院学报, 1983, 14(1):1-7.
- [5] 薄家璐, 王济, 张炜芳, 等. 山医群体近交系中国地鼠(*Cricetulus griseus*)的研究: I、驯养与繁殖[J]. 中国实验动物学报, 1993, 1(1): 8-12.
- [6] 续国强, 高继萍, 刘茂林, 等. 近交系中国仓鼠遗传质量标准的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(4): 305-309. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2019.04.009.
- [7] 张建红, 刘田福, 宋国华, 等. 中国地鼠糖尿病模型研究现状[J]. 山西医科大学学报, 2003, 34(4):370-372. DOI:10.3969/j.issn.1007-6611.2003.04.043.
- [8] MEIER H, YERGANIAN G A. Spontaneous hereditary diabetes mellitus in Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). 1. Pathological findings[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1959, 100(4): 810-815. DOI: 10.3181/00379727-100-24786.
- [9] 孙淑华, 刘德惠, 苏卫, 等. 自发NIDDM中国地鼠血液相关酶及蛋白的变化研究[J]. 中国实验动物学报, 1999, 7(2): 122-124. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.1999.02.013.
- [10] 田金菊, 刘德惠, 孙淑华, 等. 自发NIDDM中国地鼠的血液学性状及血气分析[J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9(4): 231-235. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.1999.04.011.
- [11] WANG L, WANG C Y, ZHANG R H, et al. Phenotypic characterization of a novel type 2 diabetes animal model in a SHANXI MU colony of Chinese hamsters [J]. Endocrine, 2019, 65(1): 61-72. DOI: 10.1007/s12020-019-01940-x.
- [12] 王晨阳. 小肠蛋白质组学结合血清代谢组学分析中国地鼠自发性2型糖尿病动物模型的分子生物学特征[D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- [13] 李国生, 刘树晗, 朱华, 等. 小檗碱对2型糖尿病中国地鼠的治疗作用[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(10): 559-562, 567. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2007.10.001.
- [14] 吴大兴, 姚树桥, 邹涛, 等. 应激对中国地鼠糖尿病发生的影响[J]. 心理学报, 2001, 33(4):367-371.
- [15] 姚树桥, 孙海霞, 吴大兴, 等. 实验性应激诱发中国地鼠糖尿病的胰腺形态功能改变[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18(2): 144-145. DOI: 10.3760/j.issn:1000-6699.2002.02.021.
- [16] 皇甫冰, 庞文彪, 张锐虎, 等. 中国地鼠口腔颊囊黏膜癌模型的建立及癌变的动态观察[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(1): 56-59, 65. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616x.2016.01.012.
- [17] 皇甫冰. 基于高通量测序的中国地鼠颊囊鳞癌转录组差异表达研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- [18] 李莉红. 中国地鼠口腔黏膜癌中microRNA差异表达谱建立及其调控网络研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2018.
- [19] 卫佳宁, 续国强, 高继萍, 等. 中国仓鼠口腔鳞癌miR-504的表达特征分析[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(5): 342-348. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.05.002.
- [20] 王晓堂, 肖兰飞, 高继萍, 等. 中国地鼠口腔鳞状细胞

- 癌相关的长链非编码RNA 差异表达谱建立及应用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 7-15. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.11.002.
- [21] XU G Q, LI L H, WEI J N, et al. Identification and profiling of microRNAs expressed in oral buccal mucosa squamous cell carcinoma of Chinese hamster[J]. Sci Rep, 2019, 9(518): 3573-1010. DOI: 10.1038/s41598-019-52197-3.
- [22] 刘球. 溴化钠与咖啡因对雌激素诱发中国地鼠垂体腺瘤的影响[J]. 生理学报, 1963, 15(3):205-210.
- [23] FUKUHARA M, UCHIDA E, TAJIRI T, et al. Reexpression of reduced VEGF activity in liver metastases of experimental pancreatic cancer[J]. J Nippon Med Sch, 2005, 72(3):155-164. DOI: 10.1272/jnms.72.155.
- [24] UCHIDA E, MATSUSHITA A, YANAGI K, et al. Experimental pancreatic cancer model using PGHAM-1 cells: characteristics and experimental therapeutic trials[J]. J Nippon Med Sch, 2008, 75(6):325-331. DOI: 10.1272/jnms.75.325.
- [25] 李五岭. 乏氧和营养缺乏及低pH诱发中国仓鼠V79细胞抗药性[J]. 北京医科大学学报, 1994, 26(1):23-24.
- [26] 陈经公. 中国仓鼠卵巢细胞培养工艺表征研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- [27] 刘国奇, 王海涛. 外源蛋白在中国仓鼠卵巢细胞中高效表达的策略[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 496-500. DOI: 10.3321/j. issn: 1000-3282. 2000. 05.011.
- [28] 王登, 刘煜. 用于重组蛋白表达的哺乳动物细胞系的研究进展[J]. 药物生物技术, 2014, 21(5):478-482. DOI:10.19526/j.cnki.1005-8915.2014.05.022.
- [29] 郭景亮. 中国仓鼠卵巢细胞表达外源蛋白研究进展[J]. 生物技术世界, 2016, 13(4):321.
- [30] KIDO M, IDOGAKI H, NISHIKAWA K, et al. Violacein improves recombinant IgG production by controlling the cell cycle of Chinese hamster ovary cells[J]. Cytotechnology, 2021, 73(3): 319-332. DOI: 10.1007/s10616-020-00434-3.
- [31] HENRY M N, MACDONALD M A, ORELLANA C A, et al. Attenuating apoptosis in Chinese hamster ovary cells for improved biopharmaceutical production[J]. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(4):1187-1203. DOI: 10.1002/bit.27269.
- [32] JO H G, PARK C, LEE H, et al. Inhibition of oxidative stress induced-cytotoxicity by coptisine in V79-4 Chinese hamster lung fibroblasts through the induction of Nrf-2 mediated HO-1 expression[J]. Genes Genomics, 2021, 43(1): 17-31. DOI: 10.1007/s13258-020-01018-3.
- [33] 唐娇, 杨颖, 李庆, 等. 利用中国仓鼠肺细胞体外微核试验评价三七提取液的遗传毒性[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31(5): 397-400. DOI: 10.3969/j. issn. 1004-616x.2019.05.011.
- [34] LIU H Q, FENG X Q, WU S Y, et al. Vitamin D resists cyclophosphamide-induced genomic and DNA damage in CHL cells in vitro and in mice in vivo[J]. Nutr Cancerr, 2019, 71(6): 1030-1039. DOI: 10.1080/01635581.2019.1595050.
- [35] YAMANO-ADACHI N, ARISHIMA R, PURIWAT S, et al. Establishment of fast-growing serum-free immortalised cells from Chinese hamster lung tissues for biopharmaceutical production[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):17612. DOI:10.1038/s41598-020-74735-0.
- [36] TUNG T, WONG S C. Rapid multiplication of *Mycobacterium tuberculosis* in Chinese hamsters[J]. Exp Biol Med, 1940, 43(1): 70-72. DOI: 10.3181/00379727-43-11098.
- [37] YERGANIAN G. The striped-back or Chinese hamster, *Cricetulus griseus* 2[J]. J Natl Cancer Inst, 1958, 20(4): 705-727. DOI:10.1093/jnci/20.4.705.
- [38] YEN A C H. Experimental virus infections in Chinese hamster. I. susceptibility to fixed rabies virus[J]. Exp Biol Med, 1936, 34(3): 315-318. DOI: 10.3181/00379727-34-8602c.
- [39] MA R, BI M G, CUI X L. Growth curve of murine xenotropic leukemia virus-related virus grown in Chinese hamster ovary cells[J]. J Chin Med Assoc, 2014, 77(1):44-48. DOI:10.1016/j.jcma.2013.09.005.
- [40] 高法衡, 毕秀纯. 牛付结核菌感染中国地鼠试验[J]. 吉林畜牧兽医, 1980, 1(S1):40.
- [41] 李存, 张宝中, 安小平, 等. 抗禽流感病毒H5N1分泌型IgA在中国仓鼠卵巢细胞中的表达[J]. 生物工程学报, 2011, 27(2): 219-225. DOI: 10.13345/j. cjb. 2011. 02.007.
- [42] CHUAN F, LIM C E. Titration of diphtheria toxin and antitoxin on hamsters[J]. Exp Biol Med, 1930, 28(3): 226-228. DOI:10.3181/00379727-28-5242.
- [43] LU K J, ZIA S H. Use of Chinese hamster for testing the virulence of *C. diphtheriae*[J]. Exp Biol Med, 1935, 33(3):334-337. DOI:10.3181/00379727-33-8364c.
- [44] 贾茜, 徐葛林, 赵伟, 等. 重组人抗狂犬病病毒单抗SO57、SOJB对不同狂犬病病毒毒株中和作用的研究[J]. 病毒学报, 2006, 22(4):256-261. DOI:10.3321/j. issn: 1000-8721.2006.04.003.
- [45] LUO D Y, NI B, ZHAO G Y, et al. Protection from infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus in a Chinese hamster model by equine neutralizing F(ab')₂[J]. Viral Immunol, 2007, 20(3):495-502. DOI:10.1089/vim.2007.0038.
- [46] LUAN J W, LU Y, JIN X L, et al. Spike protein

- recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(1):165-169. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.03.047.
- [47] BERTZBACH L D, VLADIMIROVA D, DIETERT K, et al. SARS-CoV-2 infection of Chinese hamsters (*Cricetulus griseus*) reproduces COVID-19 pneumonia in a well-established small animal model[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68(3): 1075-1079. DOI: 10.1111/tbed.13837.
- [48] 叶莉, 马帅, 王昱佳, 等. 巴西黑线仓鼠生物学特性的变化[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(8):36-41. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.005.
- [49] 王照南, 薄家璐, 郭守明. 短尾黑线仓鼠在医学上的应用[J]. *生物学通报*, 1997, 32(3):14-15.
- [50] 张小飞, 刘冉, 崔晓霞, 等. 旋毛虫感染黑线仓鼠及其白化突变系后细胞因子变化比较分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(08): 11-15, 23. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.008.003.
- [51] 陈玲, 衡先培, 林青, 等. 中国地鼠高糖高脂动物模型的实验研究[J]. *福建中医学院学报*, 2009, 19(6):54-56. DOI:10.3969/j.issn.1004-5627.2009.06.022.
- [52] 郭长焕, 段重高, 修瑞娟, 等. 中国地鼠微循环观察模型的建立[J]. *中国医学科学院学报*, 1986(2):110.
- [53] 袁玉英, 张振汉, 石其贤. 卵丘细胞及胞外基质诱发中国仓鼠精子顶体反应[J]. *解剖学报*, 1998, 29(4):404-409. DOI:10.3321/j.issn:0529-1356.1998.04.016.
- [54] 高桂彬. Htr1a 参与黑线仓鼠攻击行为的脑内调控[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2019.
- (收稿日期: 2021-01-05 修回日期: 2021-05-16)

《中华人民共和国生物安全法》: 总则

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过, 自2021年4月15日起施行。

第一章 总则

第一条 为了维护国家安全, 防范和应对生物安全风险, 保障人民生命健康, 保护生物资源和生态环境, 促进生物技术健康发展, 推动构建人类命运共同体, 实现人与自然和谐共生, 制定本法。

第二条 本法所称生物安全, 是指国家有效防范和应对危险生物因子及相关因素威胁, 生物技术能够稳定健康发展, 人民生命健康和生态系统相对处于没有危险和不受威胁的状态, 生物领域具备维护国家安全和持续发展的能力。

从事下列活动, 适用本法: (1) 防控重大新发突发传染病、动植物疫情; (2) 生物技术研究、开发与应用; (3) 病原微生物实验室生物安全管理; (4) 人类遗传资源与生物资源安全管理; (5) 防范外来物种入侵与保护生物多样性; (6) 应对微生物耐药; (7) 防范生物恐怖袭击与防御生物武器威胁; (8) 其他与生物安全相关的活动。

第三条 生物安全是国家安全的重要组成部分。维护生物安全应当贯彻总体国家安全观, 统筹发展和安全, 坚持以人为本、风险预防、分类管理、协同配合的原则。

第四条 坚持中国共产党对国家生物安全工作的领导, 建立健全国家生物安全领导体制, 加强国家生物安全风险防控和治理体系建设, 提高国家生物安全治理能力。

第五条 国家鼓励生物科技创新, 加强生物安全基础设施和生物科技人才队伍建设, 支持生物产业发展, 以创新驱动提升生物科技水平, 增强生物安全保障能力。

第六条 国家加强生物安全领域的国际合作, 履行中华人民共和国缔结或者参加的国际条约规定的义务, 支持参与生物科技交流合作与生物安全事件国际救援, 积极参与生物安全国际规则的研究与制定, 推动完善全球生物安全治理。

第七条 各级人民政府及其有关部门应当加强生物安全法律法规和生物安全知识宣传普及工作, 引导基层群众性自治组织、社会组织开展生物安全法律法规和生物安全知识宣传, 促进全社会生物安全意识的提升。相关科研院校、医疗机构以及其他企业事业单位应当将生物安全法律法规和生物安全知识纳入教育培训内容, 加强学生、从业人员生物安全意识和伦理意识的培养。新闻媒体应当开展生物安全法律法规和生物安全知识公益宣传, 对生物安全违法行为进行舆论监督, 增强公众维护生物安全的社会责任意识。

第八条 任何单位和个人不得危害生物安全。任何单位和个人有权举报危害生物安全的行为; 接到举报的部门应当及时依法处理。

第九条 对在生物安全工作中做出突出贡献的单位和个人, 县级以上人民政府及其有关部门按照国家规定予以表彰和奖励。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)



代解杰, 男, 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所研究员(二级), 博士生导师, 树鼩种质资源中心主任。系国家科技支撑计划项目首席科学家, 全国优秀科技工作者, 云南省中青年学术和技术带头人, 云南省有突出贡献的优秀专业技术人员, 云南省实验树鼩标准化与应用创新团队带头人。兼任中国实验动物学会常务理事, 中国实验动物学会灵长类专业委员会主任委员(现为名誉主任), 中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会和屏障医学专业委员会副主任委员, 中国实验动物学会标准化委员会常务委员, 云南省实验动物产业技术创新战略联盟常务副理事长, 云南省实验动物学会副理事长, 《中国实验动物学报》和《实验动物与比较医学》期刊副主编。从事实验动物研究与管理工作35年, 主要研究方向: 人类疾病动物模型建立及药品有效性评价, 实验动物新品种研发及标准化研究。先后主持国家级、省部级、WHO合作等项目10余项, 构建了艾滋病、糖尿病、高脂血症、甲型肝炎等猕猴模型, 以及丙型肝炎、手足口病和帕金森综合征树鼩模型等。作为研究团队的领头人, 率先攻克了树鼩繁殖关键技术, 建立了我国最大的树鼩种质资源基地, 为我国实验动物新品种的研发提供了重要的经验和示范。先后获得省部级科技奖9项, 其中云南省科技进步一等奖(排名第一), 中国实验动物学会科学技术奖一等奖3项(排名第一、第二和第三), 云南省自然科学奖二等奖等。另外, 组织制定云南省《实验树鼩》地方标准5项, 中国实验动物学会团体标准6项; 发表学术论文100余篇, 获国家发明专利12项, 出版著作多部。

罕园园, 女, 博士, 副主任技师, 主要从事动物模型创建与评价工作。2019年入选昆明市中青年学术和技术带头人后备人选。主持省级面上项目2项, 参与国家、省部级研究课题6项, 发表论文10余篇, 获得发明专利5件, 起草制定云南省地方标准1项。



云南省实验动物工作40年发展历程与思考

罕园园, 李娜, 代解杰

(中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

[摘要] 实验动物是支撑科技进步与创新不可或缺的战略资源, 是国家保持科技领先、提高国际科技竞争力的核心要素之一。本文对近40年云南省实验动物工作的法制化与标准化建设、主要的研究机构、科学研究特色与学术成就等发展历程, 以及存在问题与对策等进行梳理归纳, 以期为我国实验动物事业的发展提供参考。

[关键词] 云南省; 实验动物; 发展历程; 对策

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0399-10

History and Countermeasure Discovered from 40-year Development of Laboratory Animals in Yunnan Province

HAN Yuanyuan, LI Na, DAI Jiejie

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Correspondence to: DAI Jiejie, E-mail: dj@imbcams.com.cn

[Abstract] Laboratory animals are strategic resources that are indispensable to support scientific and

[基金项目] 云南省基础研究计划项目(202001AT070145; 202101AT070288)

[作者简介] 罕园园(1983—), 女, 博士, 研究方向: 病原感染与免疫。E-mail: hyy@imbcams.com.cn

[通信作者] 代解杰(1961—), 男, 博士生导师, 研究方向: 实验动物学与管理。E-mail: dj@imbcams.com.cn

technological progress and innovation. It is one of the core elements required for country to maintain scientific and technological leadership and improve international scientific and technological competitiveness. In this study, the legalization and standardization, major research institutions, scientific research features and academic achievements, and current opportunities and countermeasures over 40 years of progression of laboratory animals in Yunnan Province were summarized to provide a reference for the further development of laboratory animals in China.

[Key words] Yunnan Province; Laboratory animal; Progression of development; Countermeasures

享有“动物王国”美誉的云南省具有得天独厚的自然条件，我国半数以上的兽类和鸟类都在这里栖息。2021年2月9日国家林业和草原局、农业农村部联合发布的《国家重点保护的野生动物名录》中重点保护的陆生野生动物有686种，其中分布在云南省的国家重点保护陆生野生动物有385种，占总数的56.12%。云南省也是我国实验动物科技工作的发源地和摇篮。早在1946年，我国科学家齐长庆教授将引入的瑞士小鼠饲养在昆明，培育出国内第一个实验动物品系——昆明小鼠，一度成为国内应用范围最广、使用量最多的实验动物。1982年，在云南西双版纳，原国家科委主持召开了全国第一届实验动物工作会议，这次会议对全国实验动物科学的发展具有巨大影响和里程碑意义。经过近40年的发展，云南省实验动物在我国生物医学、生命科学、食品药品和生物安全等领域中仍发挥着不可替代的重要作用。

1 实验动物管理工作体系的法制化与标准化建设

云南省实验动物管理条例和地方标准的研究制定和发布实施，为规范实验动物市场、营造竞争有序的市场环境提供了保障，也在我国实验动物质量的标准化和新资源共享服务、保证动物实验结果可靠性和医用生物材料使用安全性等方面发挥了重要作用^[1-3]。

1.1 组织管理体系

云南省人民政府科学技术行政主管部门负责本省行政区域内的实验动物管理工作；州（市）人民政府科学技术行政主管部门协助管理本行政区域内的实验动物管理工作。云南省实验动物管理办公室负责全省实验动物管理的日常工作，昆明市科技局下设的昆明市实验动物管理办公室负

责昆明市行政区域内的实验动物管理的日常工作。与实验动物相关单位成立本单位的实验动物管理和使用委员会、实验动物福利伦理委员会（实验动物用量少的单位仅成立后者）的组织机构，单位层面管理机构一般由分管领导、行政职能部门领导、实验动物部门领导、兽医和相关专家等组成，对本单位实验动物生产、质量控制、科学研究、技术服务和动物实验福利伦理审查等进行科学管理。

1.2 政策法规体系

1.2.1 法规体系建设

云南省实验动物工作法制化管理始于2003年。为加强云南省实验动物许可证的管理，保证实验动物和动物实验的质量，根据国家《实验动物许可证管理办法（试行）》，2003年2月云南省科学技术厅、云南省卫生厅、云南省教育厅等6个厅局联合发布了《云南省实验动物许可证管理实施细则（试行）》，开启了云南省实验动物工作的法制化管理进程。

2007年7月27日，《云南省实验动物管理条例》由云南省人大常委会颁布，2007年10月1日开始施行。该条例对实验动物管理部门、从事实验动物工作的单位和个人，以及实验动物许可证制度和实验动物伦理等做出明确的规定。

2008年4月24日，《云南省实验动物许可证管理办法》经云南省科学技术厅会议通过，自2008年6月6日起施行，对云南省行政区域内实验动物许可证的申请、审批、发放、监督与管理进行了具体的规定。2003年2月8日发布的《云南省实验动物许可证管理实施细则（试行）》同时作废。

2012年11月28日，依据《中华人民共和国行政许可法》、《云南省实验动物管理条例》、《云

南省实验动物许可证管理办法》和《云南省人民代表大会常务委员会关于授予昆明市行使有关经济社会行政管理权的决定》，昆明市行政区域内的实验动物行政管理权下放至昆明市科技局。昆明市实验动物行政管理的属地化管理体系顺应当时昆明市社会经济发展的需求，同时增强了省科技厅对实验动物行政管理的力量。2013年1月1日，昆明市科技局颁布实施了《昆明市实验动物许可证管理办法》。本办法明确了昆明市科技局是昆明市行政区域内许可证审批、发放和监督管理的职能部门，对昆明市行政区域内的许可证实施监督管理和执法检查工作。市科技局实验动物管理办公室承担昆明市行政区域内实验动物生产、使用许可证的行政管理的具体事务性工作。在同一行政区域内，将实验动物许可证的审批、发放和监督管理等工作分成2个部分，这在全国尚属首次。

2007年云南省人大常委会颁布的《云南省实验动物管理条例》包含从事实验动物工作的单位和人员、实验动物生产和使用、实验动物质量检测与防疫、实验动物生物安全与实验动物福利、实验动物管理与监督、法律责任等共8章内容。2018年11月29日，根据云南省第十三届人民代表大会常务委员会第七次会议《关于废止和修改部分地方性法规的决定》，通过了对《云南省实验动物管理条例》（2007）第七条内容的修正，即“从事实验动物工作的人员应当经过专业培训，遵守实验动物管理的规定”，原条文内容为“从事实验动物工作的人员应当经过专业培训，并经省科学技术行政主管部门考核合格。从事实验动物工作的人员应当遵守实验动物管理的各项规定”。此内容的修正符合昆明市科技局发放昆明市行政区域内实验动物人员上岗证的实际情况。

以上实验动物管理的条例、细则和办法，为云南省实验动物工作法制化管理提供了有力的实施依据^[4-6]。

1.2.2 标准体系建设

2009年8月17日，云南省质量技术监督局发布了《实验动物病理学检测》第1~4部分的地方标准（DB53/T 293.1~4—2009）：《实验动物

处死方法》、《病理剖检方法》、《病理切片制备方法》和《病理检测技术规程》。这是我国第一部实验动物病理学检测地方标准，对指导科学实验和药品、食品安全性评价等试验中实验动物病理学的检测起到了积极作用。

2010年11月16日，云南省质量技术监督局发布了《实验树鼩》第1~5部分的地方标准（DB53/T 328.1~5—2010）：《实验树鼩 微生物学等级及监测》、《实验树鼩 寄生虫学等级及监测》、《实验树鼩 遗传质量控制》、《实验树鼩 配合饲料》和《实验树鼩 环境及设施》，自2011年3月1日起实施。这是我国第一个树鼩地方标准，标志着树鼩纳入实验动物管理。2012年5月25日，云南省质量技术监督局又发布了《实验树鼩》第6~10部分的云南省地方标准（DB53/T 328.6~10—2012）：《实验树鼩 饲养管理》、《实验树鼩 生物学特性数据测定》、《实验树鼩 实验基本操作技术》、《实验树鼩 HCV 病毒感染树鼩原代肝细胞模型制作》和《实验树鼩 HCV 病毒感染树鼩模型制作》，自2012年7月1日起实施。树鼩系列地方标准及相关成果获得了2012年云南省科技进步一等奖。

为进一步完善或补充实验树鼩的云南省地方标准的不足，中国医学科学院医学生物学研究所历经3年研究制定了《实验动物 树鼩微生物学等级及监测》（T/CALAS 8—2017）、《实验动物 树鼩寄生虫学等级及监测》（T/CALAS 9—2017）、《实验动物 树鼩环境及设施》（T/CALAS 10—2017）、《实验动物 树鼩遗传质量控制》（T/CALAS 11—2017）、《实验动物 树鼩配合饲料》（T/CALAS 12—2017）和《实验动物 树鼩病理学诊断规范》（T/CALAS 13—2017）共6个团体标准，由中国实验动物学会于2017年5月18日发布并实施。树鼩的地方标准和团体标准是云南省迄今为止独有的，对推动树鼩在生命科学和生物医药研发中的广泛应用发挥了重要支撑作用。

2016年11月10日，云南省质量技术监督局发布了《实验小型猪》第1~6部分的地方标准（DB53/T 802.1~6—2016）：《实验小型猪 遗传质量控制》、《实验小型猪 微生物学等级及监测》、《实验小型猪 寄生虫学等级及监测》、《实验小型

猪病理学诊断规范》、《实验小型猪配合饲料》和《实验小型猪环境及设施》，自2017年2月1日起实施。

目前，云南省核发的实验动物生产和使用许可证67个，其中生产许可证24个，使用许可证43个，涉及猕猴、食蟹猴、狨猴、树鼩、小型猪、犬、雪貂、兔、豚鼠、大鼠、小鼠等实验动物。使用设施包括：普通级、SPF级、ABSL-2。

1.3 支撑保障体系

为更好地贯彻执行实验动物相关的法律法规，云南省科技厅和昆明市科技局每年举办云南省各州（市）科技局实验动物管理执法人员和实验动物从业人员业务培训，通过专业知识及技术培训和考核，保障实验动物管理执法人员和从业人员的合法性和专业性。同时，还对取得实验动物生产和使用许可证的单位和个人进行定期或不定期的年检和抽查，发现不合格的提出整改，再核查认定，确保实验动物的生产和使用合法合规，从而发挥对云南省生命科学研究和生物医药产业发展的支撑作用。

在上级部门的支持和指导下，云南省医疗器械研究院在2016年累计取得云南省质量技术监督局颁发的64项实验动物质量检测资质认定，具备实验动物质量、设施环境等检测能力，为云南省实验动物许可证制度的实施和实验动物质量符合标准要求起到了重要的保障作用。

2 主要研究机构及条件平台

基础科研条件平台是科技创新和可持续性发展的重要基础，是提高科研人员创新水平和实践能力的重要载体。在过去的40年，云南省实验动物研究机构和条件平台建设取得的成绩可圈可点。云南省实验动物科学研究及其相关的生物医药产业发展曾经站在全国前列。

中国科学院昆明动物研究所拥有遗传资源与进化国家重点实验室、中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室、国家昆明高等级生物安全灵长类动物实验中心（P3实验室）、国家非人灵长类实验动物资源库、国家西南种质资源库动物分库、云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室、云南省动物生殖生物学重点实验室等研究

平台，也是云南省实验动物学会的挂靠单位，负责编辑出版的动物学核心刊物 *Zoological Research*（《动物学研究》）在169种动物学学科SCI刊物中排名第12位，并在中科院期刊分区中位于生物大类及动物学小类双1区。该单位饲养的猕猴曾经为我国的“两弹一星”事业做出过重要贡献。建设中的“十二五”国家重大科技基础设施灵长类模式动物表型与遗传研究设施，是世界上首个对灵长类动物表型与遗传进行全尺度研究、国际一流的大型综合研究设施，该设施以解析生命活动过程中的核心问题为目标，通过标准化、规模化、自动化、智能化、精准化的系统建设，开展以灵长类动物为模型的表型与遗传研究，认识人类生命活动规律、重大疾病的发生发展机制，支撑以脑科学、疾病机制与药物研发等为主的前沿领域研究，促进相关领域原创性理论和关键技术的重大突破。

中国医学科学院医学生物学研究所集医学科学研究和生物制品研制生产为一体，主要从事医学病毒学、免疫学、分子生物学技术、医学遗传学、分子流行病学及以灵长类动物为主的实验动物及动物实验技术的基础和应用研究机构，是我国第一家研发出脊髓灰质炎减毒疫苗的科研机构，迄今已供应了50多亿人份的疫苗，为中国乃至世界很多国家消灭小儿麻痹症做出了巨大贡献。在2003年抗击非典的关键时期，国家卫生部又从该所紧急调运了72只SPF级猕猴，用于SARS疫苗的研制和病理模型建立研究，并取得可喜的科研成果。基于该所创建的手足口病猕猴模型等相关科研成果，2016年自主研发的全球首个肠道病毒71型（Enterovirus 71, EV71）灭活疫苗成功上市，是控制手足口病的一个里程碑^[7]。地处昆明西郊花红洞的医学生物学研究所实验动物养殖基地，1984年成为国家卫生部批准的唯一的全国医学灵长类研究中心；2020年建成投入使用的国家昆明高等级生物安全灵长类动物实验中心这一研究平台，为成功研制新冠灭活疫苗并获批上市得以国内紧急使用起到了重要保障作用。

昆明理工大学拥有省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室、云南省的生物医学动物模型国家地方联合工程研究中心、云南省灵长类生

物医学动物重点实验室等研究平台。这些研究平台瞄准灵长类动物体外受精、早期胚胎发育调控、基因编辑、干细胞多能性和人类疾病的猴模型及致病机制等世界科技最前沿科学问题,从科技创新的“追逐者”成为“引领者”,为中国生殖和干细胞研究做出了突出贡献,也为中国灵长类动物研究的国际化并跻身于世界先进行列发挥了重要作用。

云南农业大学拥有云南省动物营养与饲料重点实验室、云南省版纳微型猪近交系重点实验室等研究平台,立足云南省的小型猪资源优势,2005年在国内率先培育成功近交系版纳微型小型猪种群,并利用基因编辑和体细胞核移植两项优势核心技术,建立了动物基因编辑与体细胞核移植、动物疾病模型构建、异种器官移植三大技术平台。2019年云南省动物基因编辑与体细胞克隆技术重点实验室获批省级重点实验室,为利用小型猪开展人类疾病动物模型构建及机制研究、异种器官移植和生物医学研究提供了优良的技术平台。

云南省药物研究所药物安全性评价中心于2004年建成,具备大鼠、小鼠、豚鼠、兔、犬、非人灵长类动物等实验设施条件,以及成熟的实验技术和经验丰富的人才团队,并获得国家食品药品监督管理局批准的可开展药品临床前安全性评价全部项目的资质,目前已完成了数十项新药GLP (good laboratory practice for nonclinical laboratory studies) 评价,为我国生物医药研发及新药临床前安全性评价做出了重大贡献。

云南大学借助获得国家首批“双一流”高校的契机,建设近1万平方米的实验动物中心,拥有国内一流的大鼠、小鼠、兔、豚鼠和斑马鱼等实验动物设施条件,以及肿瘤模型建立、抗体制备、病理组化分析、动物饲养和质量控制、生物净化和基因编辑动物模型等五大服务平台,将在2021年下半年投入运行。期待该中心为国内乃至南亚、东南亚的生物医疗、细胞生物学、发育生物学、代谢组学和神经生物学等研究领域发挥重要作用。

3 主要的学术组织、学术活动和学术成就

3.1 学术组织

2012年,昆明医科大学牵头,整合云南省高

校、研究所和企业的实验动物资源和技术力量,经云南省科技厅批准成立了云南省实验动物产业技术创新战略联盟。通过整合技术创新资源,组建技术创新服务平台,建立信息共享机制,在突破共性关键技术与核心技术,促进云南省实验动物产业创新和提升核心竞争力,实现跨省区的合作与交流等方面发挥了重要的作用。

为提升云南省实验动物科学技术参与生物高科技领域的国际竞争力,提高云南省实验动物在国内外的知名度及影响力,促进实验动物科学技术的普及和推广,提高科技人员的技术和管理水平,2016年云南省实验动物学会获得云南省民政厅批准成立,挂靠于中国科学院昆明动物研究所,并建立了云南省实验动物网站 (<http://kprc.kiz.cas.cn>)。学会的成立和运行为云南省实验动物科学、生命科学、生物医药等领域的发展、国内外合作、信息共享与学术交流等提供了交流平台。

2012年6月,在昆明市科技局和昆明市民政局支持和指导下,由昆明市行政区域内高校、研究所和企业共30家单位成立了昆明市实验动物行业协会。协会接受昆明市科技局的业务管理,同时在昆明市民政局的业务指导和监督下,宣传贯彻国家、省市发展实验动物科学事业的方针和政策,促进实验动物科技人员专业技术培训,推动实验动物标准化、专业化和产业化进程,为昆明市生物医药和生命科学等相关科学的发展提供有力的基础支撑和服务。

3.2 学术活动

云南省实验动物学术活动始于1981年12月,中国第一届灵长类学术研讨会在昆明召开。会议达成共识:随着我国科学事业的发展,不仅动物学、实验生物学,而且医学、人类学、心理学和社会学的发展都需要借助灵长类动物来进行研究。因此,迫切需要建立灵长类动物研究中心和饲养中心,以保证科研之用。

1989年10月在昆明召开了西南地区第三届实验动物学术交流会,包括云南、贵州、四川、重庆和广西的代表参会。为了进一步促进区域性实验动物科学发展与学术交流,2001年将西南地区(云南、贵州、四川、重庆、广西)和西北地

区（陕西、甘肃、宁夏、新疆）共9省市自治区的实验动物学术会议合并为中国西部实验动物管理与学术研讨会，由9省的科技厅轮流主办每年的会议，至今已成功组织召开了十八届学术会议，彰显了西北地区丰富多样的实验动物资源、学术研究及发展特色。

2002年在云南丽江组织召开了中国实验动物学会灵长类实验动物专业委员会成立大会暨第一届实验灵长类动物学术交流会，开启了灵长类实验动物专业性的学术交流与科研合作的新局面。

2004年10月，中国科学院昆明动物研究所举办了第一届国际灵长类生物医学研讨会，汇聚了来自美国、英国、意大利、日本，以及国内50多位国际顶级灵长类动物研究领域的专家，对生物医学国际前沿、热点科学问题展开学术交流，促进了我国灵长类生物医学研究和发展。随后每两年由云南中科灵长类生物医学重点实验室主办，至今已成功举办了八届会议。这些会议大大提升了我国灵长类生物医学研究的国际学术地位和影响力，使云南的相关研究团队在灵长类基因编辑动物模型、早期胚胎发育调控、脑科学与干细胞等生物医学及转化研究的学术水平跻身国际前列。

2013年9月，由云南实验动物产业技术创新战略联盟和中国实验动物学会灵长类实验动物专业委员会主办的第三届实验树鼩战略发展研讨会在云南大理成功召开。会议主题为“实验动物资源的战略发展、协同创新、共谋发展”。本次会议为具有云南特色的树鼩资源成为实验动物新品种并加以推广应用起到了积极的推动作用。

2019年9月，由云南省实验动物学会承办的第十五届中国实验动物科学年会在昆明顺利召开，该会议代表着我国实验动物科学领域规模最大、水平最高的学术会议，600多名与会代表就“创新实验动物科技、驱动生命科学发展”主题进行了广泛地学术交流，也彰显了云南省实验动物科技水平和组织能力。

3.3 学术成就

在生物医药研发方面，基于云南省灵长类实验动物资源和相关技术的优势，中国医学科学院医学生物学研究所应用猕猴肾细胞生产脊髓灰质炎减毒活疫苗，并对自主研发的脊髓灰质炎疫

苗、EV71和新型冠状病毒灭活疫苗进行了灵长类实验动物的有效性和安全性评价^[8]，这些疫苗的上市为人类健康事业做出巨大贡献。中国实验动物云南灵长类中心也是国内首家将灵长类实验动物出口到国外服务于科学研究的机构。

在灵长类动物科学研究方面，成果显著，取得了一系列世界领先的学术成就。例如，运用成簇的规律间隔的短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR）-CRISPR相关蛋白9（CRISPR-associated protein 9, Cas9）技术成功构建全球首例基因靶向修饰转基因灵长类动物，被评价为人类疾病模型研究向前发展的里程碑；运用类转录激活因子效应物核酸酶（transcription activator-like effector nucleases, TALENs）技术在国际上首次成功建立帕金森病的转基因猴模型，并运用TALENs技术构建了食蟹猴瑞特综合征（自闭）模型，开发出第一个三维人囊胚培养体系，首次绘制了人原肠前胚胎的发育全景图，为研究人类早期胚胎发育奠定了重要的研究基础；首次在国际上建立了猴胚胎干细胞同源饲养层培养体系，以及猕猴胚胎干细胞定向分化为功能神经干细胞的培养体系，为生物医药及转化研究奠定了基础。2019年中国科学院昆明动物研究所发布高质量中国猕猴参考基因组数据，并解析猿类特异的基因组结构变异，为我国灵长类动物学基础理论研究、实验动物技术创新和转化医学等领域产生了深远的国际影响力^[9-15]。

在树鼩研究方面，中国医学科学院医学生物学研究所和中科院昆明动物研究所在国际上首次建立树鼩种质资源中心，并将树鼩资源在国内外推广应用于肿瘤、肝炎、手足口病、流感、代谢紊乱、角膜炎和神经退行性疾病等人类疾病动物模型构建及机制研究^[16-24]。中国科学院昆明动物研究所在国际上首次破译了树鼩全基因组，并完成比较基因组分析，推动了树鼩应用于生物医药的系统研究进程^[25]；同时，建立了树鼩精原干细胞体外培养体系，并利用体外培养的树鼩精原干细胞成功获得世界首只转基因树鼩，实现了树鼩基因修饰技术的重大突破^[26-27]。

在小型猪研究方面，也取得了诸多研究进

展。云南农业大学研究团队与美国科学家合作,利用CRISPR-Cas9和体细胞克隆技术成功克隆出首批内源性反转录病毒灭活猪,为解决异种器官移植的临床安全性问题迈出了关键性一步^[28]。此外,2010年,获得世界上第一头版纳微型猪近交系体细胞克隆猪;2013年,利用高效基因敲除技术,在猪身上成功敲除了抑癌基因P53,首次获得6头成活的小型猪肿瘤模型;2014年,获得世界上第一头孤雌生殖克隆猪;2016年,利用Cas9/小向导RNA (small guide RNA, sgRNA)注射的受精卵导致DMD (Duchenne muscular dystrophy)基因修饰的猪肌肉萎缩;2017年,通过TALENs和体细胞核转移的方法高效获得了P53双等位基因敲除滇南小型猪;2018年,建立了亨廷顿敲除模型,再现亨廷顿病选择性神经退行性变特征^[29-31]。

在学术专著方面,季维智主编的《猕猴繁殖生物学》和杨世华编著的《猕猴辅助生殖原理与技术》系统介绍了猕猴的生物学特性、饲养繁育和辅助生殖原理及技术,为开展灵长类实验动物人工饲养繁殖和应用提供了理论基础。彭燕章、叶智璋等主编的《树鼩生物学》,郑永唐、姚永刚、徐林主编的《树鼩基础生物学与疾病模型》,以及王廷华、张荣平、代解杰主编的《树鼩组织学图谱》,系统介绍了树鼩的生物学特性、分类地位、疾病动物模型和正常组织学图谱等研究进展,为树鼩在生命科学和生物医药研究的广泛应用提供了基础理论知识和研究进展介绍。

4 云南省实验动物工作存在的主要问题与对策

回顾云南省实验动物发展历程,可以发现云南省在实验动物管理的法制化建设、灵长类实验动物饲养繁殖管理与科学研究、实验动物应用于生物制品研发与生产、小型猪资源建设与科学研究、树鼩实验动物标准化和种质资源建设及科学研究等方面始终走在国内前列,尤其在灵长类基因编辑动物模型、早期胚胎发育调控、脑科学与干细胞等生物学及转化研究方面的研究成果已居世界领先地位。除此之外,树鼩资源的开发与利用处于国内领先;基于猕猴肾细胞生产的脊髓

灰质炎减毒活疫苗为我国消灭脊髓灰质炎病毒起到了决定性的作用;国家昆明高等级生物安全灵长类动物实验中心也为我国防治新发、突发重大传染性疾病和保障人类健康发挥了重大支撑作用。云南省实验动物科技工作在过去40年的发展史上取得了丰硕成果,但是也存在一些问题,需要进一步完善。

4.1 实验动物工作法制化建设与监督管理有待进一步加强

目前,国家《实验动物管理条例》已进入征求意见阶段,有许多条款与之前的不同,因此,《云南省实验动物管理条例》(2018年修正)应该随之进行新一轮的修订,以使其与国家《实验动物管理条例》内容有机衔接。虽然云南省实验动物管理工作的法制化建设正在稳步推进,但也存在个别单位或课题组在未取得许可证的条件下开展动物实验及科研工作的情况。因此,监督管理也是一个薄弱环节,其原因是没有监督管理的编制及执法人员,难以做到实时监督。实验动物行政主管部门可以通过对各单位职能部门主管领导进行执法培训,并承担起本单位的日常监督工作,杜绝未取得实验动物许可证而开展相关工作的情况发生。

4.2 小型实验动物(小鼠、大鼠、兔、豚鼠)生产与供应问题突出

云南省每年大鼠和小鼠使用量在30余万只,由于缺乏专业化、标准化和规模化的实验动物生产机构,大多数单位需要通过外省购买(少数为自给自足);有生产能力的单位受体制机制的限制,也不愿意生产更多实验动物来供应市场。另外,虽然云南省的灵长类实验动物资源有一定规模,但受国内国际需求的影响,尤其是2020年新型冠状病毒肺炎疫情爆发增大了生物医药研发及科学研究对灵长类实验动物的需求,云南省同样陷入“一猴难求”的困境,加之灵长类实验动物价格飞涨,造成承担国家级、省级科研项目和生物医药研发的经费存在严重不足。实验动物产业对云南省大健康产业的发展起着重要的支撑作用,因此,随着云南省生物医药日新月异的发展,各级政府主管部门应采取积极的引导和支持政策,鼓励外省的企业落户云南,建立专业化、

规模化的实验动物生产基地,以满足市场需求。

4.3 实验动物种质资源创新、整合和共享机制不健全

实验动物资源是支撑科技进步与创新的国家科技基础条件平台的重要组成部分,是国家保持科技领先、提高国际科技竞争力的核心要素之一。基因工程大鼠和小鼠动物模型以及人源化小鼠在生物医药研发和生命科学研究方面发挥着重要作用,目前主要靠外省购买已远远不能满足需求。政府主管部门应制定相应政策,并给予经费支持,尽快建立各类实验动物种质资源的生产基地,实现实验动物资源增量及可持续性发展,不断提升自主创新的技术能力。同时加大实验动物新资源的开发。一般情况下,在研发期间有经费支持,一旦建成后则缺乏政策性新资源的维持费用,造成后期服务能力下降,故应建立实验动物资源整合与共享机制和平台,对原有的实验动物资源给予持续性的经费支持,促进现有实验动物资源的有效的合理使用,实现社会化共享服务^[32-34]。

4.4 实验动物人才引进力度需要加大

科技创新主要靠优秀的专业技术人员。云南省地处边疆,与北上广深等城市相比,缺乏区域优势,加之财政收入薄弱,人才引进困难。实验动物行业的规模虽然比较小,但是其对生物医药产业发展和科技进步有着不可替代的重要支撑作用。因此,各用人单位应加大人才引进力度,各级政府应给予一定的政策和经费支持,增强人才引进竞争力,让更多的人才汇聚云南省,为云南省的科技创新发展和经济社会建设做贡献。

附录:云南省实验动物重要事件

1946年,我国科学家齐长庆教授引入瑞士小鼠,后在昆明培育出昆明小鼠品系;

1958年,在昆明花红洞,中国医学科学院医学生物学研究所成立,并建立灵长类动物饲养繁殖基地;

1959年,在昆明花红洞,中国科学院昆明动物研究所成立,并建立灵长类动物饲养繁殖基地;

1962年,中国医学科学院医学生物学研究所运用猕猴肾细胞,研制出口服脊髓灰质炎糖丸减毒活

疫苗;

1981年,中国第一届灵长类实验动物学术研讨会在昆明召开;

1982年,原国家科委在云南西双版纳主持召开第一次全国实验动物工作会议,会议提出“关于改进我国实验动物工作的若干意见”,并建议在北京、天津、上海和云南建立4个国家级实验动物中心;

1982年,在云南西双版纳成立中国实验动物云南灵长类中心;

1984年,中国医学科学院医学生物学研究所灵长类动物饲养繁殖基地被卫生部批准为“全国医学灵长类研究中心”;

1989年,在昆明召开了西南地区第三届实验动物学术交流会;

1999年,云南省与中国科学院正式成立共建重点实验室“云南省动物生殖生物学重点实验室”,这是首个通过AAALAC认证的中国科研机构;

2009年,昆明科灵亚灵生物技术有限公司建成投入使用,成为云南省首个对国内外承包非人灵长类动物实验服务的CRO机构;

2009年,云南省质量技术监督局发布了《实验动物病理学检测》,成为中国第一部实验动物病理学检测标准,也是云南省首个实验动物相关的地方标准;

2010年,云南省质量技术监督局发布了《实验树鼩》第1~5部分的地方标准,2012年又发布了《实验树鼩》第6~10部分;

2010年,云南农业大学成功构建世界第一头版纳微型猪近交系体细胞克隆猪;

2011年,昆明国家生物产业基地实验动物中心获得国家发改委授牌投入使用;

2012年,《昆明市实验动物许可证管理办法》经昆明市科学技术局第18次局长办公会议通过,自2013年1月1日起施行;

2012年,“云南省实验动物产业技术创新战略联盟”和“昆明市实验动物行业协会”正式成立;

2012年,中国医学科学院医学生物学研究所科技成果“树鼩饲养繁殖种群建立及其在HCV动物模型中的应用”获得云南省科技进步一等奖,是我

国首个实验动物方面的省部级一等奖；

2013年，中国科学院昆明动物所在国际上首次破译了树鼩全基因组，并完成比较基因组分析，研究成果发表在 *Nature Communications* 期刊，推动了树鼩应用于生物医药的系统研究进程；

2014年，云南中科灵长类生物医学重点实验室运用CRISPR/Cas9技术成功构建全球首例基因靶向修饰转基因灵长类动物，被评价为人类疾病模型研究向前发展的里程碑；运用TALENs技术首次成功制备帕金森病的转基因猴模型。研究成果发表在 *Cell* 和 *Cell Stem Cell* 期刊，这两项技术首次在灵长类动物中有效运用，标志着我国灵长类动物基因靶向修饰和疾病动物模型研究方面已处于世界领先水平；

2015年，第十四届“中国西部实验动物管理与学术交流会”在云南昆明隆重召开；

2016年，中国科学院昆明动物研究所首次建树鼩精原干细胞体外培养体系，并利用体外培养的树鼩精原干细胞成功获得世界首只转基因树鼩，实现了树鼩基因修饰技术的重大突破，研究成果发表在 *Nature Communications* 期刊；

2017年，云南省灵长类生物医学重点实验室首次成功编辑灵长类自闭症关键基因，研究成果发表在 *Cell* 期刊；云南农业大学与美方合作在世界上首次构建了内源性反转录病毒灭活的克隆猪，研究成果发表在 *Science* 期刊；

2018年，中国科学院昆明动物研究所获得中国合格评定国家认可委员会(CNAS)全国首家实验动物机构认可；

2019年，云南省实验动物学会承办的“第十五届中国实验动物科学年会”在昆明隆重召开；

2019年，昆明理工大学研究团队开发出第一个三维(3D)人囊胚培养体系，首次绘制了人原肠前胚胎的发育全景图，为研究人类早期胚胎发育奠定了重要的研究基础，研究成果发表在 *Nature* 期刊；另外，运用体外培养体系解析灵长类着床后早期胚胎发育，揭示了植入后早期非人类灵长类动物胚胎发生的关键发展事件和复杂的分子机制，有助于对人类早期着床后胚胎发育的理解，成果发表在 *Science* 期刊。

参考文献：

- [1] 李小群, 陈朔阳. 建设昆明国际实验动物产业园 打造云南省经济发展新增长极[J]. 云南科技管理, 2018, 31(2):19-22. DOI:10.19774/j.cnki.53-1085.2018.02.005.
- [2] 刘佳, 李娟, 王学伟, 等. 云南省实验动物现状中存在的问题及解决策略[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(86):58-59.
- [3] 涂文姬, 吴志晖, 肖军, 等. 云南省人工繁育野生动物产业类型调查分析[J]. 林业调查规划, 2018, 43(5): 128-133.
- [4] 刘妮妮, 陈庆云. 抓住机遇 发展云南实验动物产业[J]. 2011, 24(6): 57-59. DOI: 10.3969/j. issn. 1004-1168.2011.06.021.
- [5] 龙云锋. 不断加强实验动物管理 助推生物医药产业发展[J]. 云南科技管理, 2015, 28(3): 32-35. DOI: 10.3969/j.issn.1004-1168.2015.03.009.
- [6] 龙云锋. 云南省实验动物现状与加快发展的思考[J]. 云南科技管理, 2016, 29(1):16-19.
- [7] ZHOU Y, LI J X, JIN P F, et al. *Enterovirus* 71: a whole virion inactivated *Enterovirus* 71 vaccine[J]. Expert Rev Vaccines, 2016, 15(7): 803-813. DOI: 10.1080/14760584.2016.1191357.
- [8] ZHANG Y, WANG L, LIAO Y, et al. Similar protective immunity induced by an inactivated *Enterovirus* 71 (EV71) vaccine in neonatal rhesus macaques and children[J]. Vaccine, 2015, 33(46): 6290-6297. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.09.047.
- [9] XIANG L F, YIN Y, ZHENG Y, et al. A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos[J]. Nature, 2020, 577(7791): 537-542. DOI: 10.1038/s41586-019-1875-y.
- [10] NIU Y Y, SUN N Q, LI C, et al. Dissecting primate early post-implantation development using long-term *in vitro* embryo culture[J]. Science, 2019, 366(6467): eaaw5754. DOI:10.1126/science.aaw5754.
- [11] CHEN Y, YU J, NIU Y, et al. Modeling rett syndrome using TALEN-edited MECP2 mutant cynomolgus monkeys[J]. Cell, 2017, 169(5): 945-955. e10. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.035.
- [12] CHEN Y C, ZHENG Y H, KANG Y, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(13): 3764-3774. DOI:10.1093/hmg/ddv120.
- [13] NIU Y, SHEN B, CUI Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos[J]. Cell, 2014, 156

- (4):836-843. DOI:10.1016/j.cell.2014.01.027.
- [14] HE Y X, LUO X, ZHOU B, et al. Long-read assembly of the Chinese rhesus macaque genome and identification of ape-specific structural variants[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):1-14. DOI:10.1038/s41467-019-12174-w.
- [15] SAMUELS B C, SIEGWART J T, ZHAN W, et al. A novel tree shrew (*Tupaia belangeri*) model of Glaucoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(7): 3136-3143. DOI:10.1167/iov.18-24261.
- [16] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩[J]. 动物学研究, 2012, 33(1):7-13.
- [17] XIAO J, LIU R, CHEN C S. Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model [J]. Zool Res, 2017, 38(3): 127-137. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.033.
- [18] JIA J, WANG W, KUANG D, et al. mRNA profiling reveals response regulators of decreased fungal keratitis symptoms in a tree shrew model[J]. Gene, 2020, 737: 144450. DOI:10.1016/j.gene.2020.144450.
- [19] XU S, LI X Y, YANG J Y, et al. Comparative pathogenicity and transmissibility of pandemic H1N1, avian H5N1, and human H7N9 influenza viruses in tree shrews[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2955. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02955.
- [20] ZHENG H, NIU S, ZHAO H, et al. Donepezil improves the cognitive impairment in a tree shrew model of Alzheimer's disease induced by amyloid- β_{1-40} via activating the BDNF/TrkB signal pathway[J]. Metab Brain Dis, 2018, 33(6):1961-1974. DOI:10.1007/s11011-018-0303-6.
- [21] TU Q, YANG D, ZHANG X N, et al. A novel pancreatic cancer model originated from transformation of acinar cells in adult tree shrew, a primate-like animal [J]. Dis Model Mech, 2019: dmm038703. DOI:10.1242/dmm.038703.
- [22] LI J, WANG W, TONG P, et al. Autophagy induction by HIV-tat and methamphetamine in primary midbrain neuronal cells of tree shrews via the mTOR signaling and ATG5/ATG7 pathway[J]. Front Neurosci, 2018, 12: 921. DOI:10.3389/fnins.2018.00921.
- [23] FENG Y, FENG Y M, LU C, et al. Tree shrew, a potential animal model for hepatitis C, supports the infection and replication of HCV *in vitro* and *in vivo*[J]. J Gen Virol, 2017, 98(8): 2069-2078. DOI: 10.1099/jgv.0.000869.
- [24] FAN Y, HUANG Z Y, CAO C C, et al. Genome of the Chinese tree shrew[J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426. DOI:10.1038/ncomms2416.
- [25] LI C H, YAN L Z, BAN W Z, et al. Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring[J]. Cell Res, 2017, 27(2): 241-252. DOI: 10.1038/cr.2016.156.
- [26] NIU D, WEI H J, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. Science, 2017, 357(6357): 1303-1307. DOI: 10.1126/science.aan4187.
- [27] YU H H, ZHAO H, QING Y B, et al. Porcine zygote injection with Cas9/sgRNA results in DMD-modified pig with muscle dystrophy[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10):1668. DOI:10.3390/ijms17101668.
- [28] SHEN Y F, XU K X, YUAN Z M, et al. Efficient generation of P53 biallelic knockout Diannan miniature pigs via TALENs and somatic cell nuclear transfer[J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 1-11. DOI: 10.1186/s12967-017-1327-0.
- [29] YAN S, TU Z C, LIU Z M, et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease[J]. Cell, 2018, 173(4):989-1002.e13. DOI:10.1016/j.cell.2018.03.005.
- [30] 贺争鸣. 基于能力提升的我国实验动物资源发展愿景[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(2):85-90. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.042.
- [31] 贺争鸣, 陈振文, 代解杰, 等. 实验动物品种增量建设与野生动物科学利用现状与建议[J]. 中国科技资源导刊, 2021, 53(2):50-58.
- [32] 王锡乐, 巩薇, 胡建武, 等. 我国实验动物科技工作发展的政策支撑与思考[J]. 实验动物科学, 2020, 37(4): 64-68.
- (收稿日期: 2021-08-17 修回日期: 2021-09-14)

MC38 结肠癌小鼠肿瘤浸润免疫细胞的动态变化

张波扬¹, 陈焕鹏², 余文兰¹, 刘忠华¹, 黄朝峰²

(1. 华南农业大学实验动物中心, 广州 510642; 2. 中山大学人类病毒研究所, 广州 510080)

[摘要] 目的 观察荷瘤小鼠肿瘤浸润免疫细胞在肿瘤发展过程中的动态变化。方法 将小鼠结肠癌 MC38 细胞移植到 24 只 C57BL/6J 小鼠皮下, 荷瘤后每周一次记录小鼠体质量及肿瘤大小的变化, 每周一次采用流式细胞术检测肿瘤浸润免疫细胞水平, 包括 CD45⁺ 细胞、CD3⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞、树突状细胞、巨噬细胞、M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞、髓源抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSC)、单核样髓源抑制细胞 (monocytic-MDSC, M-MDSC)、粒样髓源抑制细胞 (granulocytic-MDSC, G-MDSC), 共检测 4 周。结果 随着小鼠结肠癌肿瘤的增长, CD45⁺ 细胞水平总体表现出下降趋势, CD8⁺ T 细胞水平稳步下降至不可逆的水平, 而 CD4⁺ T 细胞比例在荷瘤早期迅速增长, 单位体积中浸润细胞数增长了近 8 倍, 肿瘤浸润的 T 细胞几乎为 CD4⁺ 表型。以 NK 细胞为代表的非特异性免疫应答水平持续下降, 而树突状细胞在肿瘤内持续累积, 并通过激活精氨酸酶 1 (Arginase-1, ARG1) 和诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthetase, iNOS), 进一步加深免疫抑制作用。巨噬细胞浸润水平整体无显著变化, 但 I 型巨噬细胞浸润细胞数的下滑速度显著高于 II 型。单位体积肿瘤内 MDSC 数未出现下降趋势, 在肿瘤内持续累积; 其中 G-MDSC 浸润水平呈稳降趋势, M-MDSC 浸润水平持续上升, 且占比远高于 G-MDSC。结论 小鼠移植 MC38 结肠癌细胞后, 肿瘤组织内免疫细胞浸润水平整体下降, 抗肿瘤免疫逐渐占据主导地位, 从而促进结肠癌的发展。肿瘤内产生了 Th1/Th2 漂移现象, 特异性和非特异性免疫应答水平均显著降低, 浸润的单核细胞和粒细胞主要是 Ly6C⁺ 表型。肿瘤相关树突状细胞和巨噬细胞发挥了重要的免疫抑制作用, CD4⁺ T 细胞和 M-MDSC 可能是发挥抗肿瘤免疫效应的关键点。

[关键词] 结肠癌; 肿瘤浸润免疫细胞; 免疫微环境; 小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0409-09

Dynamic Changes of Tumor-infiltrating Immune Cells in Mice with MC38 Colon Cancer

ZHANG Boyang¹, CHEN Huanpeng², YU Wenlan¹, LIU Zhonghua¹, HUANG Chaofeng²

(1. Laboratory Animal Center of South-China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Human Virology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: LIU Zhonghua, E-mail: 1003280841@qq.com; HUANG Chaofeng, E-mail: hzhaof@mail.sysu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To observe the dynamic changes of tumor-infiltrating immune cells in tumor-bearing mice during tumor development. **Methods** Mouse colon cancer MC38 cells were transplanted subcutaneously into 24 C57BL/6J mice, and the changes in body mass and tumor size of mice were recorded once a week after tumor-bearing. The levels of tumor-infiltrating immune cells, including CD45⁺ T cells, CD3⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, natural killer (NK) cells, dendritic cells, macrophages, M1-type macrophages, M2-type macrophages, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), mononuclear-like MDSCs (M-MDSCs), and granulocytic MDSCs (G-MDSCs) were detected by flow cytometry once a week for 4

[作者简介] 张波扬(1995—), 男, 硕士, 研究方向: 肿瘤模型。E-mail: 784772625@qq.com

[通信作者] 刘忠华(1970—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 1003280841@qq.com

黄朝峰(1975—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 免疫学。E-mail: hzhaof@mail.sysu.edu.cn

weeks. **Results** As the colon cancer tumor of the mouse grows, total CD45⁺ T cellular level decreased, and CD8⁺ T cellular level steadily decreased to an irreversible level, but CD4⁺ T cells proportion rapidly increased at the early stage of the tumor-bearing, quantity of infiltrating cells in the unit volume increased by 8 times, and T cells of tumor-infiltration almost were CD4⁺ phenotype. The nonspecific immune response level represented by NK cells continued to decline, but the dendritic cells continued to accumulate in the tumor. The immunosuppressive action was further enhanced through the activation of arginase-1 (ARG1) and inducible nitric oxide synthetase (iNOS). Macrophage infiltration levels showed no significant change, but the gliding speed for the quantity of infiltrating type- I macrophages was obviously higher than that of type- II macrophages. The proportion of MDSCs per unit volume showed no decreasing trend, and the cells continued to accumulate in the tumor. G-MDSC infiltration level showed a steady decrease, while M-MDSC infiltration level showed an increasing trend, the proportion of M-MDSCs were higher than that of G-MDSCs. **Conclusion** After transplanting MC38 colon cancer cells in mice, the level of immune cell infiltration in the tumor tissue declined, tumor immunology gradually became dominant, thus promoting the development of colon cancer. The Th1/Th2 drift occurred in the tumor. Specific and nonspecific immune response levels were significantly decreased on an average, and the infiltrating monocytes and granulocytes were mainly Ly6C⁺. Tumor-associated dendritic cells and macrophages play an important immunosuppressive role. CD4⁺T cells and M-MDSCs might be the key for promoting tumor immunity.

[Key words] Colon cancer; Tumor-infiltrating immune cells; Tumor immune microenvironment; Mice

异质性是恶性肿瘤的重要特征。目前,研究者多从肿瘤本身探索肿瘤的发生发展机制,如肿瘤干细胞理论、肿瘤遗传学等,因此肿瘤曾一致被认为是细胞内突变的体细胞遗传病^[1]。近年来,肿瘤微环境免疫特征已经被列入肿瘤十大特征之一^[2]。探索肿瘤微环境与肿瘤发生的关系既能预测临床预后,亦可评价放化疗效果^[3-4]。随着单细胞测序和质谱流式细胞术等新技术的应用,多种新型免疫细胞亚群得到鉴定,肿瘤浸润免疫细胞成为了研究的热点之一。

肿瘤微环境主要是由免疫细胞、间充质细胞、内皮细胞和细胞外基质等构成复杂的细胞和分子调控网络,通过代谢重编程和低氧调控等方式促进肿瘤的发生和发展^[5]。肿瘤微环境中的免疫细胞主要分为淋巴系来源和骨髓来源,淋巴系来源的主要有CD8⁺T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)、CD4⁺T细胞(regulatory T cells, Ths)、自然杀伤(natural killer, NK)细胞和树突状细胞(dendritic cells, DC),主要发挥抗肿瘤作用。髓系来源的主要是肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)和髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC),主要发挥免疫抑制作用。肿瘤与其微环境之间的相互作用非常复杂,免疫浸润成分在每个肿

瘤阶段都发生了变化,特定的细胞对患者的生存影响深远。其中,T细胞一直是研究者关注的一个热点。多项研究表明,大多数T细胞密度随肿瘤进展而降低,T细胞的低密度浸润与不良预后相关^[6-7],这也是患者生存最重要的预测标准^[8-10]。过继T细胞治疗的新方法为患者带来了新的希望,但是肿瘤浸润免疫细胞是高度不均匀的。除了淋巴系来源细胞,大部分髓系成分同样具有代表性,然而分析Th1和CD8以外的免疫细胞如何影响临床效果时常常得出矛盾的结果^[6]。

目前,肿瘤与宿主免疫系统之间的关系尚不明确。通过绘制动态免疫图谱的方式,为患者定制免疫特征图谱,可以识别动态生物标志物,区分假性治疗进展,明确具有潜在反应的患者,为个性化精准治疗提供动态监测方案^[11]。本文采用流式细胞术对荷瘤小鼠不同时间节点的肿瘤浸润免疫细胞进行分析,动态观察结肠癌发展的细胞学变化,绘制免疫微环境的时空变化景观,以期寻找预后生物标志物和开发新的治疗方法提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雌性C57BL/6J小鼠24只,体质量为19~21 g,42~56日龄,来源于广东省医学实验

动物中心 [SCXK (粤) 2018-0002], 实验动物质量合格证号为 44007200068714。动物饲养于华南农业大学实验动物中心屏障环境 [SYXK (粤) 2019-0136]。本研究涉及的动物实验方案符合 3R 原则, 经华南农业大学动物福利与伦理委员会批准 (批号 2019D086)。

1.2 仪器设备和试剂

流式细胞仪 (型号: BD-LSRF fortessa) 购自美国 BD 公司, 小鼠结肠癌 MC38 细胞株来源于美国典型培养物保藏中心。RPMI 1640 (C11875500BT) 购自美国 Gibco 公司。大鼠抗小鼠 pefic blue-CD45 (48-0451-82)、pecy7-CD3 (25-0031-82)、percp5.5-CD4 (45-0042-82)、APC-CD8 (17-0081-83)、PE-NK1.1 (12-5941-82)、pecy7-CD11b (25-0112-82)、APC-Ly6G (17-9668-80)、PE-F4/80 (12-4801-82) 和 pey7-CD206 (25-2061-82) 单克隆抗体均购自美国 eBioscience 公司, FITC-Ly6C (553104) 单克隆抗体购自美国 BD 公司, percp5.5-CD11c (65-0114-U100) 和 APC-MHC II (20-5321-U100) 单克隆抗体购自美国 Tonbo Biosciences 公司。PBS 和 D-PBS 为实验室配制, 胶原酶 2 (V900892)、胶原酶 4 (V900893)、DNA 脱氧核糖核苷酸酶 1 (D4513) 和透明质酸酶 (H3884) 购自美国 Sigma 公司。

1.3 实验动物处理

调整小鼠结肠癌 MC38 细胞密度为 5×10^5 个/mL, 均于 C57BL/6J 小鼠右侧腹股沟处行一次性皮下注射 (0.1 mL/只)。24 只小鼠均可观察到肿瘤生长, 在肉眼可观测肿瘤大小 (大约荷瘤 1 周) 后, 每周观察一次并使用游标卡尺记录皮下肿瘤的长宽数值, 肿瘤体积 = 长 $\times$ 宽²/2。每周记录一次小鼠体质量。每周随机选取 6 只小鼠, 采用流式细胞术检测小鼠肿瘤内免疫细胞浸润水平。

1.4 肿瘤组织单细胞悬液的制备

采用脱颈椎法处死小鼠后, 剥离肿瘤组织, 冰浴 10 min, 用 1 $\times$ PBS 洗 2 次, 剪碎肿瘤, 加入胶原酶 2 (1 mg/mL)、胶原酶 4 (1 mg/mL)、透明质酸酶 (100 U/mL) 和 DNA 脱氧核糖核苷酸酶 1 (100 U/mL), 消化 30 min。70 μ m 筛网过滤肿瘤组织, 1 $\times$ PBS 洗 1 次, 终止消化。1 $\times$ PBS 洗

1 次, 吸取 10 μ L 细胞悬液用 1 $\times$ PBS 稀释 10 倍, 用于细胞计数。

1.5 流式细胞术检测肿瘤内免疫细胞浸润水平

将单细胞悬液调整至细胞密度为 1×10^7 个/mL, 每管吸取 100 μ L 细胞悬液准备流式染色。检测分 3 组, 先用抗小鼠 CD45 抗体 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min, 然后组 1 加入抗小鼠 CD3、CD4、CD8、NK1.1 抗体和相应的同型对照抗体, 组 2 加入抗小鼠 CD11b、Ly6C、Ly6G 抗体和相应的同型对照抗体, 组 3 直接加入抗小鼠 CD11c、F4/80、CD206、MHC II 抗体和相应的同型对照抗体。4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后, 1 $\times$ PBS 洗 1 次, 用于流式细胞仪检测。各免疫细胞分子标志定义如下: CD3⁺ T 细胞 (CD45⁺CD3⁺), CD4⁺ T 细胞 (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), CD8⁺ T 细胞 (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), NK 细胞 (CD45⁺CD3⁻NK1.1⁺), DC (CD45⁺CD11c⁺), 总的巨噬细胞 (macrophage, 后用 M ϕ 表示) (CD45⁺F4/80⁺), I 型 M ϕ (CD45⁺F4/80⁺MHC II⁺), II 型 M ϕ (CD45⁺F4/80⁺CD206⁺), MDSC (CD45⁺CD11b⁺), 单核 MDSC (M-MDSC) (CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺), 粒细胞 MDSC (G-MDSC) (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺)。流式数据使用 Flowjo-V10 软件分析处理, 单位体积浸润细胞数 = 各亚群细胞数/肿瘤体积。

1.6 统计学分析

实验数据使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行分析。将荷瘤 2~4 周时的数据分别与荷瘤 1 周时的数据进行比较, 所有计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用方差分析, 两组之间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷瘤小鼠肿瘤体积变化及肿瘤免疫细胞浸润变化

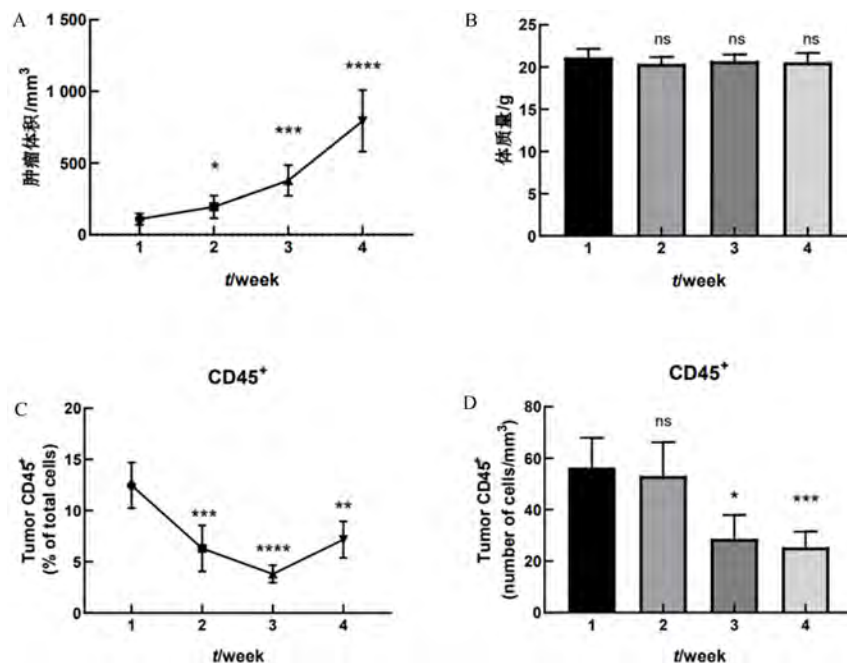
相比荷瘤 1 周, 荷瘤 2 周和 3 周时的小鼠肿瘤体积均明显增大 ($P < 0.05$), 荷瘤 4 周时显著增大 ($P < 0.0001$), 提示肿瘤体积迅速增长, 增长速率不断加快 (图 1A)。记录荷瘤 4 周的 6 只小鼠体质量, 结果显示在荷瘤 1~4 周时未见显著变化 (图 1B)。

从荷瘤 1 周时开始, 每周随机选择 6 只小鼠

剖检取材并进行流式检测。结果显示, $CD45^+$ 细胞比例在荷瘤2周时较1周时明显降低 ($P < 0.001$), 荷瘤3周时显著降低 ($P < 0.0001$), 荷瘤4周时虽明显降低 ($P < 0.01$), 但略有回升趋势 (图1C)。

为排除肿瘤大小差异对实验结果的影响, 计算单位体积内浸润细胞数 (各亚群细胞数/ mm^3) 以比较单位体积肿瘤内的细胞学变化。结果

显示, 单位体积肿瘤内 $CD45^+$ 细胞浸润数在荷瘤2周时无明显变化 ($P > 0.05$), 荷瘤3周时降低 ($P < 0.05$), 荷瘤4周时显著降低 ($P < 0.001$) (图1D)。CD45是白细胞共同抗原的标志, 在淋巴细胞的发育、功能调节及信号传递中具有重要意义, 被广泛用作浸润免疫细胞的整体标志物。检测发现, 荷瘤1~4周时 $CD45^+$ 细胞水平整体呈现骤降趋势, 但在荷瘤3周后趋于稳定 (图1D)。



注: A显示肿瘤体积变化; B显示荷瘤4周小鼠的体质量变化; C显示肿瘤浸润 $CD45^+$ 细胞比例变化; D显示单位体积肿瘤内 $CD45^+$ 细胞浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns表示差异无统计学意义, $n=6$ 。

图1 肿瘤生长曲线与免疫细胞浸润变化

Figure 1 Variations in tumor growth curves and immune cell infiltration

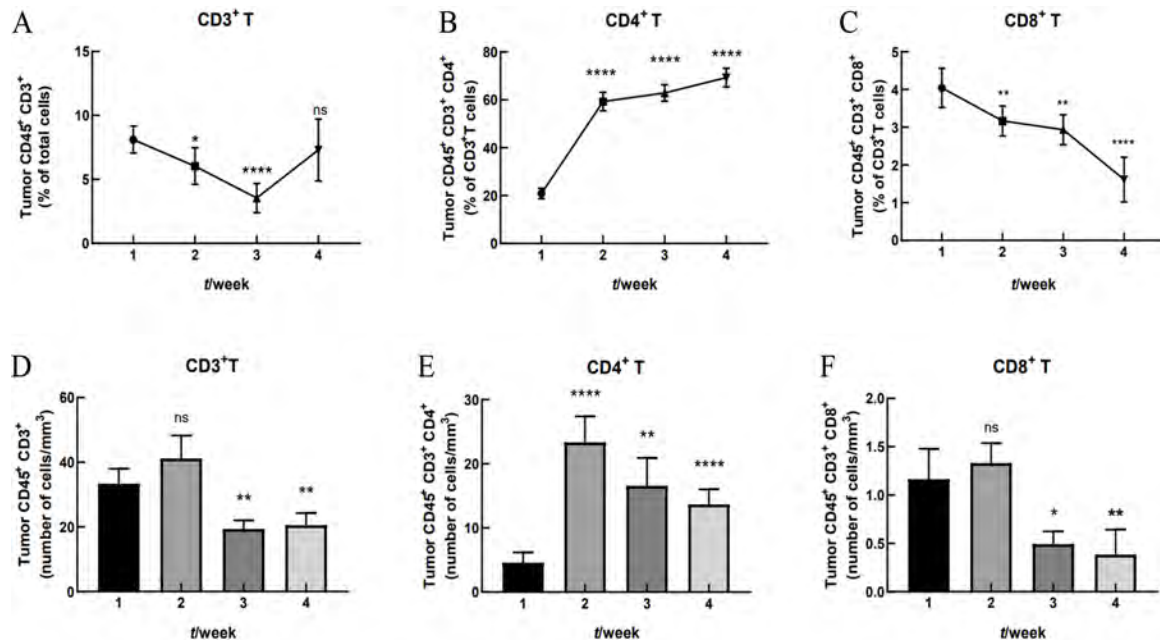
2.2 荷瘤小鼠肿瘤T细胞浸润变化

流式细胞术检测结果显示, 相比荷瘤1周时, 总 $CD3^+$ T细胞比例在荷瘤2周下降 ($P < 0.05$), 荷瘤3周时显著降低 ($P < 0.0001$), 荷瘤4周时有明显回升 ($P > 0.05$) (图2A); $CD4^+$ T细胞比例在荷瘤2~4周时均显著上升 ($P < 0.0001$, 图2B); $CD8^+$ T细胞比例在荷瘤2周及3周时显著下降 ($P < 0.01$), 荷瘤4周时下降极显著 ($P < 0.0001$) (图2C)。相比荷瘤1周时, 单位体积肿瘤内总 $CD3^+$ 细胞浸润数在荷瘤2周时

保持平稳 ($P > 0.05$), 荷瘤3周和4周时均显著降低 ($P < 0.01$) (图2D); 单位体积肿瘤内 $CD4^+$ 细胞浸润数在荷瘤2~4周时均显著上升 ($P < 0.01$, 图2E); 单位体积肿瘤内 $CD8^+$ 细胞浸润数在荷瘤2周时无明显变化 ($P > 0.05$), 荷瘤3周及4周时均降低 ($P < 0.05$) (图2F)。

2.3 荷瘤小鼠肿瘤NK细胞与DC浸润变化

流式细胞术检测结果显示, 相比荷瘤1周时, NK细胞比例在荷瘤2周及3周时无显著变化 ($P > 0.05$), 荷瘤4周时下降 ($P < 0.05$), 在荷瘤



注：A显示肿瘤浸润CD3⁺ T细胞比例变化；B显示肿瘤浸润CD4⁺ T细胞比例变化；C显示肿瘤浸润CD8⁺ T细胞比例变化；D显示单位体积肿瘤内CD3⁺ T细胞浸润数量变化；E显示单位体积肿瘤内CD4⁺ T细胞浸润数量变化；F显示单位体积肿瘤内CD8⁺ T细胞浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ ，ns表示差异无统计学意义， $n = 6$ 。

图2 荷瘤小鼠肿瘤浸润T细胞变化

Figure 2 Variations in the proportion of infiltrating T cells in the tumor

后总体呈现下降趋势（图3A）；DC比例在荷瘤2周及3周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时显著上升（ $P < 0.01$ ，图3B）。相比荷瘤1周时，单位体积肿瘤内NK细胞浸润数在荷瘤2周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤3周及4周时显著下降（ $P < 0.0001$ ，图3C）；单位体积肿瘤内DC浸润数在荷瘤后2周及3周时无明显变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时下降（ $P < 0.05$ ，图3D）。

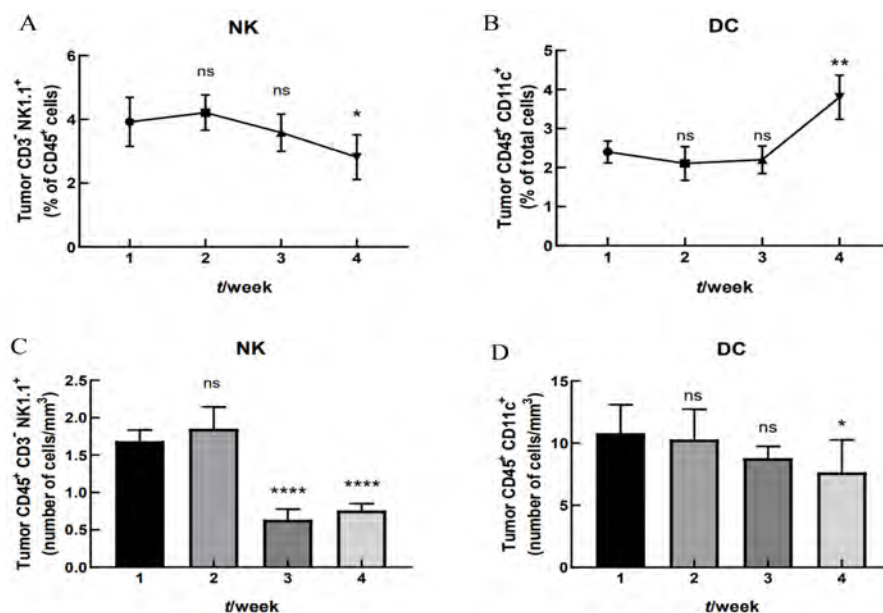
2.4 荷瘤小鼠肿瘤相关巨噬细胞浸润变化

流式细胞术检测结果显示，相比荷瘤1周时，总的巨噬细胞（用M ϕ 表示）比例在荷瘤1周~4周后无显著变化（ $P > 0.05$ ，图4A）；I型M ϕ 比例在荷瘤1周到4周无显著变化（ $P > 0.05$ ，图4B）；II型M ϕ 比例在荷瘤2周及3周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），但荷瘤4周时下降（ $P < 0.05$ ）（图4C）。相比荷瘤1周时，单位体积肿瘤内总M ϕ 浸润数在荷瘤2周时显著降低（ $P < 0.05$ ），荷瘤3周及4周时降低极显著（ $P < 0.0001$ ）（图

4D）；单位体积肿瘤内I型M ϕ 浸润数在荷瘤2周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤3周及4周时下降（ $P < 0.05$ ）（图4E）；单位体积肿瘤内II型M ϕ 浸润数在荷瘤2周及3周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时下降（ $P < 0.05$ ）（图4F）。

2.5 荷瘤小鼠肿瘤髓源性抑制细胞浸润变化

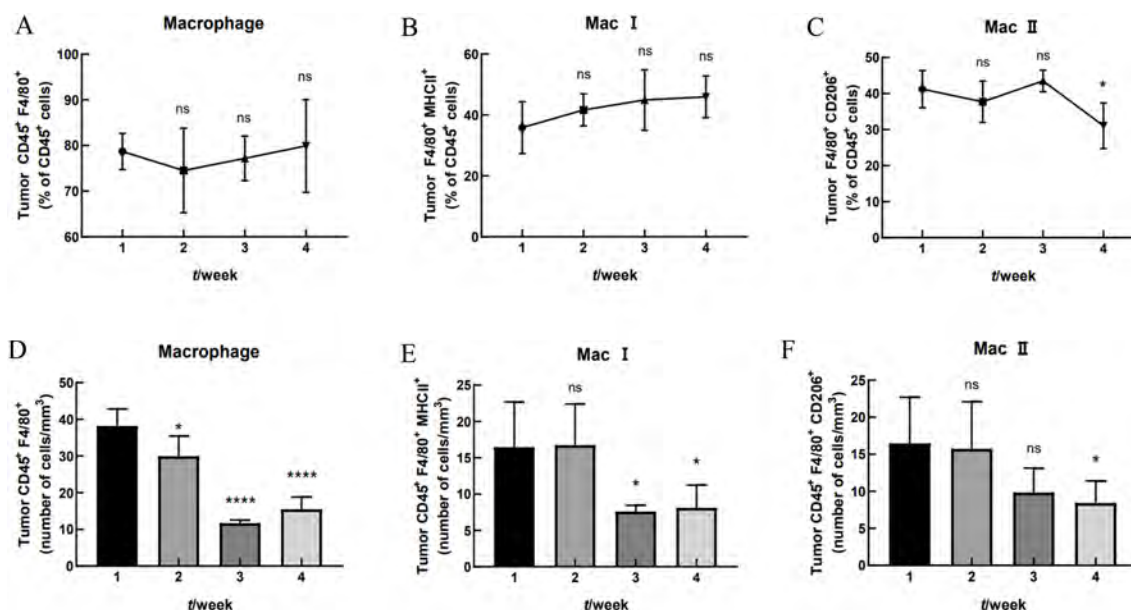
流式细胞术检测结果显示，相比荷瘤1周时，CD11b⁺细胞比例在荷瘤后总体未呈现明显变化（ $P > 0.05$ ，图5A）；M-MDSC比例在荷瘤2周和3周时无明显变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时明显上升（ $P < 0.05$ ），整体呈增长趋势（图5B）；G-MDSC比例在荷瘤后2周及4周均明显下降（ $P < 0.05$ ），整体呈下降趋势（图5C）。相比荷瘤1周时，单位体积肿瘤内CD11b⁺及M-MDSC细胞浸润数在荷瘤1周到4周时无显著变化（ $P > 0.05$ ，图5D和5E）；单位体积肿瘤内G-MDSC浸润数在荷瘤2周及3周时无明显变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时明显下降（ $P < 0.05$ ），总体呈下降趋势（图5F）。



注：A显示肿瘤浸润NK细胞比例变化；B显示肿瘤浸润DC比例变化；C显示单位体积肿瘤内NK细胞浸润数量变化；D显示单位体积肿瘤内DC细胞浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ ，ns表示差异无统计学意义， $n=6$ 。

图3 荷瘤小鼠肿瘤浸润自然杀伤(NK)细胞和树突状细胞(DC)变化

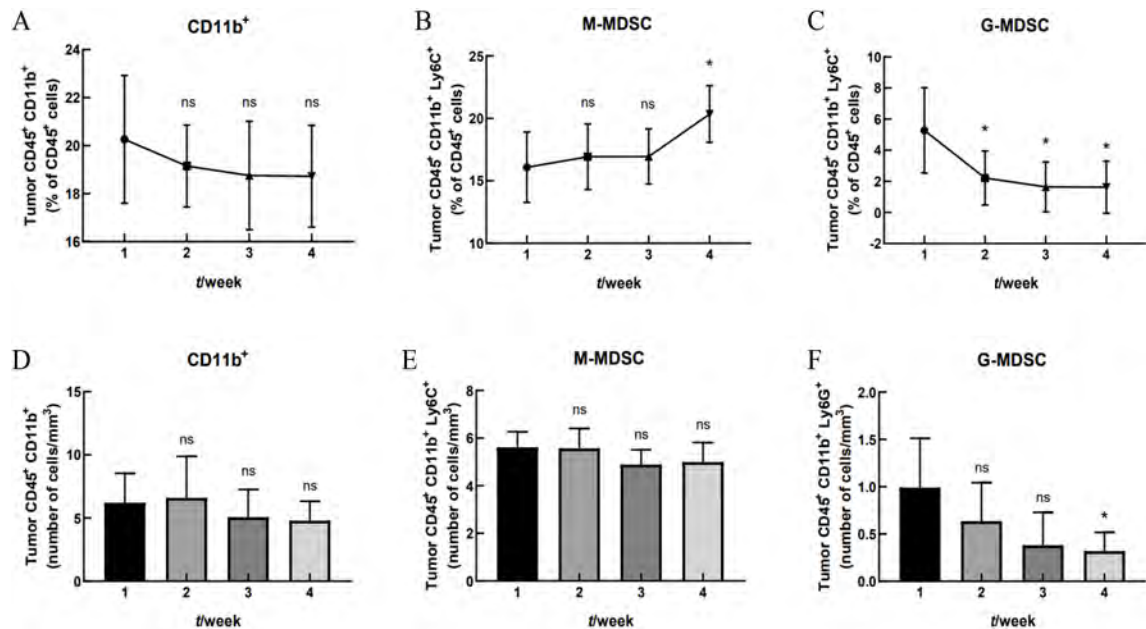
Figure 3 Variations of the infiltrating natural killer (NK) cells and dendritic cells (DCs) in the tumor



注：A显示肿瘤浸润总Mφ比例变化；B显示肿瘤浸润I型Mφ比例变化；C显示肿瘤浸润II型Mφ比例变化；D显示单位体积肿瘤内总Mφ浸润数量变化；E显示单位体积肿瘤内I型Mφ浸润数量变化；F显示单位体积肿瘤内II型Mφ浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ ，ns表示差异无统计学意义， $n=6$ 。

图4 荷瘤小鼠肿瘤中浸润的巨噬细胞(Mφ)变化比较

Figure 4 Comparison of variations in the proportion of infiltrating macrophages (Mφ) in the tumor



注：A显示肿瘤浸润CD11b⁺细胞比例变化；B显示肿瘤浸润M-MDSC比例变化；C显示肿瘤浸润G-MDSC比例变化；D显示单位体积肿瘤内CD11b⁺浸润数量变化；E显示单位体积肿瘤内M-MDSC浸润数量变化；F显示单位体积肿瘤内G-MDSC浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ ，ns表示差异无统计学意义， $n=6$ 。

图5 荷瘤小鼠肿瘤中浸润的髓源抑制性细胞(MDSC)变化比较

Figure 5 Comparison of changes in the proportion of infiltrating myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the tumor

3 讨论

大多数肿瘤都有一个分步进展的过程，包括一系列组织学、形态学和遗传学的变化，这些变化随着时间的推移而改变或累积^[12]。肿瘤微环境与肿瘤细胞之间复杂的相互作用贯穿了肿瘤发展全过程。目前，关于癌症免疫的研究主要集中在外周血、脾内或淋巴结，而对肿瘤内部免疫细胞浸润的复杂情形尚知之甚少。本研究检测几种具有代表性的免疫细胞浸润水平在结肠癌发展进程中的瘤内变化景观，旨在为结肠癌免疫学研究提供实验依据。

本实验数据显示，CD8⁺ T细胞水平稳步下降至不可逆的水平，个别样本浸润细胞数极低，而CD4⁺ T细胞比例在荷瘤早期就已迅速增长并持续累积，单位体积中浸润细胞数增长了近8倍。T细胞浸润水平在荷瘤1周及2周时有增长趋势，随后快速下降，这与CD4⁺ T细胞的飞速增长保持一致，肿瘤浸润的T细胞几乎都是CD4⁺表型。

已有研究表明，Th1细胞主要分泌白细胞介素(interleukin)-2、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)等，通过干扰内皮细胞增殖来抑制肿瘤生长。Th2细胞主要分泌IL-4等，诱导TAMs产生M2表型，并通过分泌抗炎细胞因子激活体液免疫，促进肿瘤生长。而调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)通过直接表达抑制性细胞因子，或间接消耗IL-2，抑制CD8⁺ T细胞的激活与增殖^[13]。而肿瘤内的Th2细胞浸润水平往往远高于Th1细胞，即产生了Th1/Th2漂移的现象^[14]。本研究结果支持CD4⁺ T细胞在肿瘤进展中产生Th1/Th2漂移的假设，所产生的免疫抑制状态严重影响了CD8⁺ T细胞和NK细胞的增殖和活化效率，并发现M-MDSC和CD4⁺ T细胞的高水平浸润与CD8⁺ T细胞和NK细胞水平的下降具有一定的相关性。另外，总T细胞比例在显著降低后出现反弹，这可能与NC细胞在荷瘤3周及4周的显著上升有关，这也体现了机体免疫在肿瘤发展整个过程中的顽强抗衡。然而尽管肿瘤体积飞速增

长,单位体积浸润DC细胞数也没有表现出急剧下跌的趋势。曾有报告称,肿瘤相关树突状细胞(tumor-associated dendritic cells, TADC)在抗原提呈、诱导同种异体反应性和分泌IL-2等方面的能力均显著下降,其表面分子以及联合转运蛋白和抗原加工相关转运体的表达也明显降低,相反它们具有促进MDSC累积和促使髓系细胞分化为F4/80⁺TAM的作用^[15]。事实上,大多数实体瘤都能通过产生IL-6、VEGF、CSF-1等细胞因子来抑制DC的分化和成熟,这种未成熟的TADC同样高表达CD11c,并在肿瘤内迅速累积,通过激活精氨酸酶1(arginase1, ARG1)和诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthetase, iNOS),进一步加深免疫抑制作用。

TAMs是占比最大的肿瘤浸润免疫细胞,也是肿瘤进展、转移和抗治疗的关键驱动因素。本研究发现,总M ϕ 的细胞比例始终维持在较高水平。通常认为,M1型巨噬细胞高表达肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、主要组织相容性复合体II(major histocompatibility complex-II, MHC II)分子等,发挥抗肿瘤作用;M2型巨噬细胞高表达ARG1和CD206等,发挥促肿瘤作用;然而肿瘤微环境中的I型巨噬细胞往往可转变为II型^[16]。本研究结果中巨噬细胞浸润数整体下降,但I型M ϕ 细胞数的下滑速度显著快于II型M ϕ ,未发现巨噬细胞的显著II型漂移现象。实际上,TAMs完全不同于普通巨噬细胞,其具有抑制T细胞功能发挥、促进巨噬细胞和单核细胞分化以及促肿瘤血管生成的作用,从而形成了促肿瘤生长的旁分泌循环。

MDSC与免疫逃逸机制密切相关,可通过分泌炎症因子促进肿瘤细胞的存活和肿瘤血管生成,但由于其异质性和非成熟性,目前对该细胞群的定义一直存在争议^[17]。本研究以CD11b⁺细胞标志肿瘤内浸润的MDSC,发现MDSC整体水平始终居高不下。于是本研究进一步分析G-MDSC和M-MDSC的浸润水平,发现G-MDSC浸润水平稳步下降,这可能是肿瘤内的趋化因子CXC缺失引起。值得注意的是,M-MDSC的浸润水平稳定上升,且占比远高于G-MDSC。由于G-MDSC和M-MDSC抑制T细胞生长增殖的途径

是相互独立的,笔者推测浸润的单核细胞和粒细胞主要是Ly6C⁺表型,M-MDSC可能是促瘤免疫和免疫逃逸的主角。

综上所述,笔者推测,癌细胞一旦接种于小鼠,机体迅速做出抗肿瘤和促肿瘤的免疫应答;肿瘤组织内免疫细胞浸润水平整体下降,CD8⁺T细胞和NK细胞水平的下降不断削弱机体抗肿瘤免疫效应。TADC和TAMs在促肿瘤免疫应答中发挥了重要作用,CD4⁺T细胞和M-MDSC可能是促肿瘤效应的关键点,促肿瘤免疫逐渐占据主导地位,从而促进结肠癌的发展。

参考文献:

- [1] ENGBLOM C, PFIRSCHKE C, PITTET M J. The role of myeloid cells in cancer therapies[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(7):447-462. DOI:10.1038/nrc.2016.54.
- [2] HUI L, CHEN Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil[J]. *Cancer Lett*, 2015, 368(1): 7-13. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.039.
- [3] MIYASHITA M, SASANO H, TAMAKI K, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8⁺ and FOXP3⁺ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study[J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17:124. DOI:10.1186/s13058-015-0632-x.
- [4] FENG W, LI Y, SHEN L, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with completely resected stage IIIA(N₂) non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 7227-7240. DOI: 10.18632/oncotarget.6979.
- [5] DE PALMA M, BIZIATO D, PETROVA T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(8): 457-474. DOI: 10.1038/nrc.2017.51.
- [6] BINDEA G, MLECNIK B, TOSOLINI M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. *Immunity*, 2013, 39(4): 782-795. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.10.003.
- [7] PAGÈS F, BERGER A, CAMUS M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(25): 2654-2666. DOI:10.1056/nejmoa051424.
- [8] ATREYA I, NEURATH M F. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic

- strategies[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8(4): 561-572. DOI:10.1586/14737140.8.4.561.
- [9] BINDEA G, MLECNIK B, FRIDMAN W H, et al. Natural immunity to cancer in humans[J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(2): 215-222. DOI: 10.1016/j.coi.2010.02.006.
- [10] PAGÈS F, KIRILOVSKY A, MLECNIK B, et al. *In situ* cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(35): 5944-5951. DOI: 10.1200/jco.2008.19.6147.
- [11] LESTERHUIS W J, BOSCO A, MILLWARD M J, et al. Dynamic versus static biomarkers in cancer immune checkpoint blockade: unravelling complexity[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(4): 264-272. DOI:10.1038/nrd.2016.233.
- [12] SHARMA P, WAGNER K, WOLCHOK J D, et al. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11):805-812. DOI:10.1038/nrc3153.
- [13] LAUEROVA L, DUSEK L, SIMICKOVA M, et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response[J]. *Neoplasma*, 2002, 49(3): 159-166.
- [14] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [15] 焦国慧, 杨荣存. 肿瘤相关免疫抑制细胞与免疫逃逸机制研究进展[J]. *癌症进展*, 2008, 6(2):147-151. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1535.2008.02.009.
- [16] DENARDO D G, RUFFELL B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(6):369-382. DOI:10.1038/s41577-019-0127-6.
- [17] MARVEL D, GABRILOVICH D I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3356-3364. DOI:10.1172/jci80005.
- (收稿日期: 2020-10-09 修回日期: 2021-02-22)

《中华人民共和国生物安全法》: 生物技术研究、开发与应用安全

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过, 自2021年4月15日起施行。

第四章 生物技术研究、开发与应用安全

第三十四条 国家加强对生物技术研究、开发与应用活动的安全管理, 禁止从事危及公众健康、损害生物资源、破坏生态系统和生物多样性等危害生物安全的生物技术研究、开发与应用活动。从事生物技术研究、开发与应用活动, 应当符合伦理原则。

第三十五条 从事生物技术研究、开发与应用活动的单位应当对本单位生物技术研究、开发与应用的安全负责, 采取生物安全风险防控措施, 制定生物安全培训、跟踪检查、定期报告等工作制度, 强化过程管理。

第三十六条 国家对生物技术研究、开发活动实行分类管理。根据对公众健康、工业农业、生态环境等造成危害的风险程度, 将生物技术研究、开发活动分为高风险、中风险、低风险三类。生物技术研究、开发活动风险分类标准及名录由国务院科学技术、卫生健康、农业农村等主管部门根据职责分工, 会同国务院其他有关部门制定、调整并公布。

第三十七条 从事生物技术研究、开发活动, 应当遵守国家生物技术研究开发安全管理规范。从事生物技术研究、开发活动, 应当进行风险类别判断, 密切关注风险变化, 及时采取应对措施。

第三十八条 从事高风险、中风险生物技术研究、开发活动, 应当由在我国境内依法成立的法人组织进行, 并依法取得批准或者进行备案。从事高风险、中风险生物技术研究、开发活动, 应当进行风险评估, 制定风险防控计划和生物安全事件应急预案, 降低研究、开发活动实施的风险。

第三十九条 国家对涉及生物安全的重要设备和特殊生物因子实行追溯管理。购买或者引进列入管控清单的重要设备和特殊生物因子, 应当进行登记, 确保可追溯, 并报国务院有关部门备案。个人不得购买或者持有列入管控清单的重要设备和特殊生物因子。

第四十条 从事生物医学新技术临床研究, 应当通过伦理审查, 并在具备相应条件的医疗机构内进行; 进行人体临床研究操作的, 应当由符合相应条件的卫生专业技术人员执行。

第四十一条 国务院有关部门依法对生物技术应用活动进行跟踪评估, 发现存在生物安全风险的, 应当及时采取有效补救和管控措施。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)

CD137 信号调控内皮细胞间质转化促进小鼠心脑血管新生

翁嘉懿^{1,2}, 马雪兴², 李 渊², 孙康云²

(1. 江苏大学附属医院心血管内科, 镇江 212000; 2. 苏州市立医院, 南京医科大学附属苏州医院心血管内科, 苏州 215000)

[摘要] 目的 探讨 CD137-CD137L 信号 (简称 CD137 信号) 是否通过调控内皮细胞间质转化 (endothelium-mesenchymal transition, End-MT) 促进心脑血管新生。方法 将小鼠脑微血管内皮细胞 (bEnd.3) 或小鼠胸主动脉环分为 3 组, 即对照组 [10 ng/mL 的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)]、CD137 刺激组 (10 ng/mL 的 TNF- α 和 5 mg/L 的 CD137L 激动型抗体) 和 CD137 抑制组 (200 nmol/L 的 IWR-1 预处理细胞 30 min 后, 再加入 10 ng/mL 的 TNF- α 和 5 mg/L 的 CD137L 激动型抗体), 以 CD137L 重组蛋白激动 CD137 信号。采用荧光定量 PCR 及蛋白质印迹法分别检测脑微血管内皮细胞中 CD31、血管内皮细胞钙黏蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-Cadherin)、肌动蛋白 α (α -smooth muscle actin, α -SMA)、成纤维细胞特异性蛋白-1 (fibroblast specific protein-1, FSP-1) 和 Wnt 蛋白的表达; 采用 Transwell 迁移实验检测穿膜细胞数目, 比较细胞迁移能力; 内皮细胞管腔形成实验检测各组小鼠脑微血管内皮细胞的管腔形成能力。动脉环血管新生实验检测各组小鼠胸主动脉环新生微血管的形成能力。结果 小鼠脑微血管内皮细胞 CD137 刺激组的 CD31、VE-Cadherin mRNA 及蛋白表达水平均低于对照组 ($P < 0.05$), FSP-1、Wnt 和 α -SMA mRNA 及蛋白表达水平均高于对照组 ($P < 0.05$); CD137 抑制组的 CD31、VE-Cadherin mRNA 及蛋白表达水平均高于 CD137 刺激组 ($P < 0.05$), FSP-1、Wnt 和 α -SMA mRNA 及蛋白表达水平均低于 CD137 刺激组 ($P < 0.05$)。CD137 刺激组的小鼠脑微血管内皮细胞迁移数量多于对照组 ($P < 0.05$), CD137 抑制组的细胞迁移数量少于 CD137 刺激组 ($P < 0.05$)。CD137 刺激组的小鼠脑微血管内皮细胞小管长度及分支数量均大于对照组 ($P < 0.05$), CD137 抑制组的细胞小管长度及分支数均小于 CD137 刺激组 ($P < 0.05$)。CD137 刺激组小鼠胸主动脉环的新生微血管数量多于对照组 ($P < 0.05$), CD137 抑制组的新生微血管数量少于 CD137 刺激组 ($P < 0.05$)。结论 CD137 信号可能通过调控 End-MT 促进小鼠血管新生。

[关键词] 动脉粥样硬化; 血管新生; 内皮细胞间质转化; CD137; Wnt; 小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0418-08

CD137 Signaling Promotes Cardio-cerebral Angiogenesis in Mice Through Regulating Endothelial-mesenchymal Transition

WENG Jiayi^{1,2}, MA Xuexing², LI Yuan², SUN Kangyun²

(1. The Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, China, 212000; 2. The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, China, 215000)

Correspondence to: SUN Kangyun, E-mail: kangyun_sun@126.com

[Abstract] **Objective** To explore whether CD137-CD137L signaling can promote cardio-cerebral

[基金项目] 苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2017040); 苏州市科技局项目(sys2018088); 镇江市心血管病临床医学研究中心开放课题(SS2018088-KF04); 苏州市卫健委重点病种项目(LCZX201912)

[作者简介] 翁嘉懿(1991—), 女, 主治医师, 硕士, 主要从事动脉粥样硬化发病机制研究。E-mail: wengjiayi129@126.com

[通信作者] 孙康云(1966—), 男, 主任医师, 硕士, 主要从事动脉粥样硬化发病机制研究。E-mail: kangyun_sun@126.com

angiogenesis in atherosclerotic plaques via endothelium-mesenchymal transition (End-MT). **Methods** Mouse brain-derived endothelial cells (Bend.3) and aortas from male mice were divided into the following groups: control (10 ng/mL TNF- α), CD137-activated (10 ng/mL TNF- α + 5 mg/L CD137L agonist antibody), and CD137-inhibited (pretreated with 200 nmol/L IWR-1 for 30 min + 10 ng/mL TNF- α + 5 mg/L CD137L agonist antibody) groups. CD137L agonist antibody was used to activate CD137-CD137L signaling. Fluorescent quantitative PCR was used to determine the expression of CD31, vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), fibroblast-specific protein-1 (FSP-1), Wnt, and α -smooth muscle actin (α -SMA) at the mRNA level. Western blotting was used to determine the expression of CD31, VE-cadherin, FSP-1, Wnt, and α -SMA at the protein level. A Transwell assay was used to observe the migration ability of endothelial cells. Matrigel tube formation ability of endothelial cells and mouse aortic ring angiogenesis assay were tested to detect the ability of angiogenesis. **Results** The expressions of CD31 and VE-cadherin at the mRNA levels in endothelial cells were significantly lower in the CD137-activated group than those in the control group, while the expression was significantly downregulated in the CD137-inhibited group. The expressions of FSP-1, Wnt, and α -SMA were opposite (all $P < 0.05$). The expressions of CD31 and VE-cadherin proteins in endothelial cells were significantly higher in the CD137-activated group than those in the control group, while the expression was significantly downregulated in the CD137 inhibited group. The expressions of FSP-1, Wnt, and α -SMA were opposite (all $P < 0.05$). Migration cell number was markedly higher in the CD137-activated group than that in the control group, while it was significantly lower in the CD137-inhibited group than that in the control group ($P < 0.05$). The values of the formation of the tube length ($P < 0.05$) and branch number ($P < 0.05$) were both significantly higher in the CD137-activated group than those in the control group, while these values were significantly lower in the CD137-inhibited group than those in the control group ($P < 0.05$). The number of microvessel outgrowths in the aortic rings was dramatically increased in the CD137-activated group than that in the control group, while it was reduced in the CD137-inhibited group ($P < 0.05$). **Conclusion** CD137-CD137L signaling can promote cardio-cerebral angiogenesis in atherosclerotic plaques by activating End-MT.

[Key words] Atherosclerosis; Angiogenesis; Endothelium-mesenchymal transition; CD137; Wnt; Mice

血管新生是从原血管以出芽方式形成新生微血管,是动脉粥样硬化(atherosclerosis)易损斑块的特征性病变。内皮细胞间质转化(endothelium-mesenchymal transition, End-MT)是介导炎性细胞浸润、血管新生、影响动脉粥样硬化斑块完整性,从而诱发动脉粥样硬化易损斑块破裂并导致一系列急性心脑血管事件的关键因素,是远期心血管事件可靠的独立预测因子^[1]。End-MT是内皮细胞在各种病理因素作用下向间充质细胞转化的过程,在该过程中内皮细胞逐渐失去其形态和功能,获得增殖、迁移和合成胶原等间充质细胞表型特点^[2]。在炎性浸润、缺氧等因素刺激下,动脉粥样硬化斑块内发生End-MT的内皮细胞一方面可促进胶原-基质金属蛋白酶合成,促使斑块纤维帽变薄;另一方面内皮细胞失去特异性抗原,获得间质细胞抗原,同时其功

能发生改变,获得较强的增殖、迁移能力,通过促进新生血管形成,导致斑块破裂和继发临床急性事件的发生^[3]。近期研究结果证实:冠状动脉易损斑块内End-MT细胞数量及新生血管数量显著增加^[4]。End-MT过程受多种刺激因素和Wnt信号通路调控,这些信号通路相互调节,从而激活多种转录基因,影响End-MT的发生和发展^[5-6]。目前,End-MT的具体调控机制仍在研究中,可能与干预因素、微环境变化及调控血管新生的关键分子有关。

CD137属肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族成员,在动脉粥样硬化不稳定斑块中高表达。CD137信号通路在血管新生及动脉粥样硬化进展过程中起着至关重要的作用^[7]。CD137分子与其配体结合可作为共刺激分子,促进T淋巴细胞激活,进一步加速炎

性因子释放而加重炎症反应,从而促进动脉粥样硬化进展。新近研究表明,CD137信号在动脉粥样硬化斑块形成中起重要作用,动脉粥样硬化斑块中存在CD137高表达,而CD137基因敲除小鼠的粥样斑块明显减少^[8-9]。本课题组前期研究发现,CD137信号可以促进动脉粥样硬化斑块内新生血管的形成^[10]。本研究在此基础上进一步观察CD137信号是否通过调控内皮细胞End-MT促进血管新生,即通过分别激动CD137信号和在抑制End-MT相关信号的基础上激动CD137信号,观察End-MT及内皮细胞管腔形成能力和动脉环血管新生能力。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要实验材料

SPF级别8周龄C57BL/6J雄性小鼠20只,体重20~22 g,由江苏大学动物实验中心[SCXK(苏)2018-0012]提供,饲养于江苏大学动物实验中心[SYXK(苏)2018-0053],根据实验动物相关管理规定进行操作和处理。动物实验经江苏大学动物福利伦理委员会批准(UJS-IACUC-2019102902)。CD137L重组蛋白、PCR上下游引物均由上海生工生物工程有限公司设计并合成;胎牛血清、高糖培养基(DMEM)、双抗、胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)购自美国PeproTech公司;兔抗鼠CD31、血管内皮细胞钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-Cadherin)、成纤维细胞特异性蛋白-1(fibroblast specific protein-1, FSP-1)、Wnt和肌动蛋白 α (α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体,以及内参GAPDH单克隆抗体均购自德国Cell Signaling Technology公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自美国Invitrogen公司;Wnt信号抑制剂(IWR-1)购自安诺伦(北京)生物科技有限公司;RNA提取试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒均购自日本TaKaRa公司;蛋白提取试剂盒和反转录试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;ECL化学发光试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;基质胶购自武汉艾美捷科技有限公司;小鼠脑微血管内皮细胞bEnd.3购自美国标

准培养物保藏中心;II型胶原酶购自美国Sigma公司;鼠尾I型胶原购自德国Millipore公司;眼科手术器械购自北京中兴名业科技发展有限公司。

1.2 细胞及动脉环的培养

小鼠脑微血管内皮细胞bEnd.3^[11]在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,然后置于37℃培养箱中,待细胞融合度为80%~90%时,以0.25%胰蛋白酶消化后离心细胞,常规传代。

以颈椎脱臼法处死小鼠,取下胸主动脉后,置于质量浓度为2 g/L的II型胶原酶中,并放入37℃培养箱中消化6~7 min以去除外膜。然后,将血管均匀地剪成约0.5 mm长的动脉环,放入无血清培养基中,在37℃培养箱中饥饿过夜。将预处理过的动脉环包埋入质量浓度为1 g/L的鼠尾I型胶原包被的96孔板中。96孔板在室温平衡10 min后,放入37℃培养箱孵育30 min。待胶原凝固后,加入含2.5%胎牛血清的DMEM 100 μ L/孔覆盖胶原表面,隔天换液。

1.3 实验分组及干预

细胞分组:将密度为 2×10^5 个/孔的bEnd.3细胞接种于6孔板,加入质量浓度为10 ng/mL的TNF- α 刺激24 h进行预处理(诱导内皮细胞表达CD137)。按随机数字表法将预处理后的内皮细胞分为3组:(1)对照组,即培养基中加入质量浓度为10 ng/mL的TNF- α ;(2)CD137刺激组,即培养基中加入质量浓度为10 ng/mL的TNF- α 和质量浓度为5 mg/L的CD137抗体;(3)CD137抑制组,即培养基中加入浓度为200 nmol/L的IWR-1预处理细胞30 min后,再加入质量浓度为10 ng/mL的TNF- α 和质量浓度为5 mg/L的CD137抗体。各组内皮细胞均置于37℃培养箱中培养,24 h后提取细胞蛋白或RNA备用。

动脉环分组:以鼠尾I型胶原(质量浓度为1 g/L)包被96孔板后,将动脉环按1个/孔包埋入96孔板,干预措施同上。

1.4 荧光定量PCR检测内皮细胞中CD31、VE-Cadherin、FSP-1、Wnt和 α -SMA mRNA水平

经不同组处理后的细胞按照TRIzol法提取总RNA,并用反转录试剂盒反转录为cDNA,以反转录产物为模板,GAPDH为内参,用SYBR法检测CD31、VE-Cadherin、FSP-1、Wnt和 α -SMA

的mRNA表达。PCR反应体系总体积为20 μ L反应,依次加入TaKaRa Taq Premix 10 μ L,上下游引物(浓度10 nmol/L,引物序列见表1)各1 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR反应条件:预变性95 $^{\circ}$ C 5 min;变性95 $^{\circ}$ C 5 s,退火60 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算各基因相对表达量。

1.5 蛋白质印迹法检测CD31、VE-Cadherin、FSP-1、Wnt和 α -SMA蛋白表达水平

各组内皮细胞分别按照RIPA裂解液及组织蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白,分装后在-20 $^{\circ}$ C保存待用。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,以350 mA恒流120 min转印至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)。PVDF膜置于质量分数为5%的脱脂牛奶TBST缓冲液中,37 $^{\circ}$ C封闭1 h,再分别加入相应的兔抗鼠CD31(1:1 000)、VE-Cadherin(1:1 000)、FSP-1(1:1 000)、 α -SMA(1:1 000)、Wnt(1:1 000)和GAPDH抗体(1:3 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日用TBST洗涤3次,采用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:7 000),37 $^{\circ}$ C孵育1 h, TBST洗涤3次,ECL显色系统定影显色,使用LANE-1D图像分析软件对扫描灰度值进行相对定量分析。

1.6 Transwell迁移实验检测内皮细胞迁移能力

各组内皮细胞经预处理培养24 h后,消化收集细胞并计数,将收获细胞配制成1.5 $\times$

10⁶个细胞/mL的悬液,按1 $\times$ 10⁵个细胞/孔加入Transwell小室上室(分组干预措施见1.3节)。12 h后取出小室,用棉签拭去聚碳酸酯膜上室侧细胞,下室侧细胞经固定,结晶紫染色,漂洗和拍照。每组设置3个复孔,实验重复3次。用Image-ProPlus 6.0软件计算每组下室侧细胞数量,分别取各组细胞数量的平均值,然后计算CD137刺激组与对照组及CD137抑制组与对照组细胞数量的比值。

1.7 内皮细胞管腔形成实验检测管腔形成能力

各组内皮细胞经预处理培养24 h后,消化收集细胞并计数,将收获细胞配制为1.5 $\times$ 10⁵个细胞/mL的悬液,按1.5 $\times$ 10⁴个细胞/孔接种于基质胶包被的96孔板,每孔覆盖100 μ L培养基(分组干预措施见1.3节)。24 h后拍照,通过Image-ProPlus 6.0软件分析各组内皮细胞形成小管的长度及分支数量。每组设置4个复孔,实验重复3次以上。

1.8 小鼠主动脉环血管新生实验检测新生血管形成能力

以约80 μ L/孔鼠尾胶原包被预冷的96孔板,将动脉环包埋入液态基质胶。96孔板在室温平衡10 min后放入37 $^{\circ}$ C培养箱孵育30 min,待胶原凝固后加入100 μ L/孔培养基(分组干预措施见1.3节)覆盖胶原表面,隔天换液。7 d后在倒置显微镜下观察动脉环新生微血管的数量和分支。每组设置5个复孔,实验重复3次以上。

表1 实时荧光定量PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR

基因名称	引物序列	产物大小/bp
CD31	上游:5'-CTCCCAGAACATGGATGTGGAGTA-3'	112
	下游:5'-GTGCATCTGCCTTGGCTGTC-3'	
VE-Cadherin	上游:5'-TGCTCCTACTGTTTCTACG-3'	111
	下游:5'-CTTCTCCACCTCCCTCTT-3'	
FSP-1	上游:5'-GTCCACCTTCCACAAATACT-3'	118
	下游:5'-TTCGTCTGTCTTCTCTCC-3'	
Wnt	上游:5'-CAGGAGCCACGAGTTTGGATGTT-3'	92
	下游:5'-GATTGGGTTGGGTTGGAGGT-3'	
α -SMA	上游:5'-AGCCAGTCGCCATCAGGAAC-3'	90
	下游:5'-CCGGAGCCATTGTCACACAC-3'	
GAPDH	上游:5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	114
	下游:5'-CTCAGCACCAGCATCACC-3'	

注:CD31是内皮细胞标志物之一;VE-Cadherin为血管内皮细胞钙黏蛋白; α -SMA为肌动蛋白 α ,FSP-1为成纤维细胞特异性蛋白-1;Wnt为上皮间质转化相关信号分子;GAPDH为内参基因。

1.9 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 16.0 进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两两比较采用 *t* 检验；多组间均数比较采用单因素方差分析，组间比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

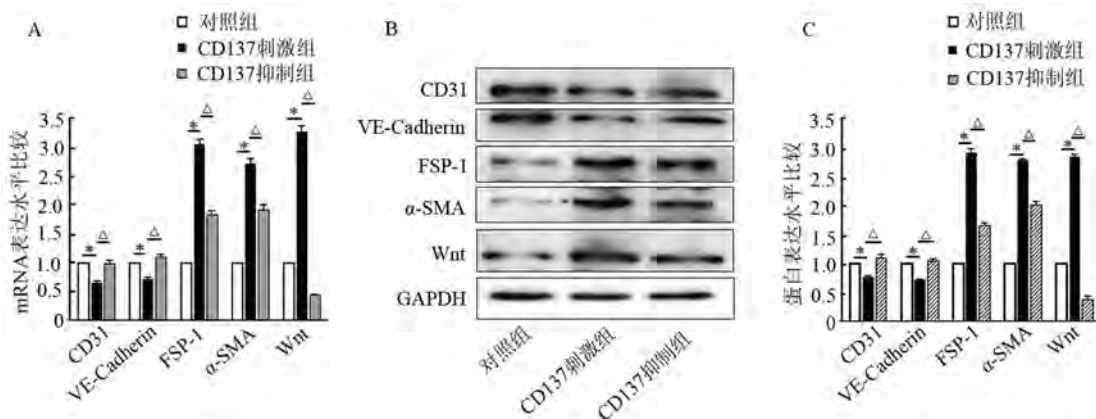
2 结果

2.1 小鼠内皮细胞中 CD31、VE-Cadherin、FSP-1、 α -SMA、Wnt mRNA 及蛋白表达水平

荧光定量 PCR 结果见图 1A。与对照组比较，CD137 刺激组的内皮细胞中 CD31 和 VE-Cadherin mRNA 表达水平较低 (P 值均 < 0.05)，

FSP-1、 α -SMA 和 Wnt 表达水平较高 (P 值均 < 0.05)；与 CD137 刺激组比较，CD137 抑制组的内皮细胞中 CD31 和 VE-Cadherin mRNA 表达水平较高 (P 值均 < 0.05)，FSP-1、 α -SMA 和 Wnt 表达水平较低 (P 值均 < 0.05)。

蛋白质印迹法检测结果见图 1B。与对照组比较，CD137 刺激组的内皮细胞中 CD31 和 VE-Cadherin 蛋白表达水平较低 (P 值均 < 0.05)，FSP-1、 α -SMA 和 Wnt 蛋白表达水平较高 (P 值均 < 0.05)；与 CD137 刺激组比较，CD137 抑制组的内皮细胞中 CD31 和 VE-Cadherin 蛋白表达水平较高 (P 值均 < 0.05)，FSP-1、 α -SMA 和 Wnt 蛋白表达水平较低 (P 值均 < 0.05)。



注：A，荧光定量PCR检测mRNA水平；B，蛋白质印迹法检蛋白表达。对照组即用10 ng/mL TNF- α 预处理；CD137刺激组即用10 ng/mL TNF- α 和5 mg/L CD137抗体联合干预；CD137抑制组即先用200 nmol/L Wnt信号抑制剂IWR-1预处理30 min后，再用10 ng/mL TNF- α 和5 mg/L CD137抗体联合干预。CD31是内皮细胞标志物之一；VE-Cadherin为血管内皮细胞钙黏蛋白； α -SMA为肌动蛋白 α ，FSP-1为成纤维细胞特异性蛋白-1；Wnt为上皮间质转化相关信号分子。相对表达水平即目的mRNA与内参GAPDH的灰度值之比。与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与CD137刺激组比较， $\Delta P < 0.05$ ； $n = 3$ ， $\bar{x} \pm s$ 。

图1 小鼠脑微血管内皮细胞中CD31、VE-Cadherin、FSP-1、 α -SMA、Wnt mRNA及蛋白表达水平比较

Figure 1 Comparison of the expression of CD31, VE-cadherin, FSP-1, α -SMA, Wnt at the mRNA and protein levels in cardio-cerebral endothelial cells in the three groups

2.2 小鼠内皮细胞的迁移能力

Transwell 细胞侵袭实验结果见图 2A。CD137 刺激组小鼠内皮细胞的迁移数量 (1.21 ± 0.13) 多于对照组 (1.00 ± 0.00)，CD137 抑制组小鼠内皮细胞迁移数量少于 CD137 刺激组 (0.83 ± 0.07)，差异均有统计学意义 (P 值均 < 0.05)。

2.3 小鼠内皮细胞管腔形成能力

内皮细胞管腔形成实验结果见图 2B。CD137 刺激组的内皮细胞小管长度 [(5.97 ± 0.23) mm]

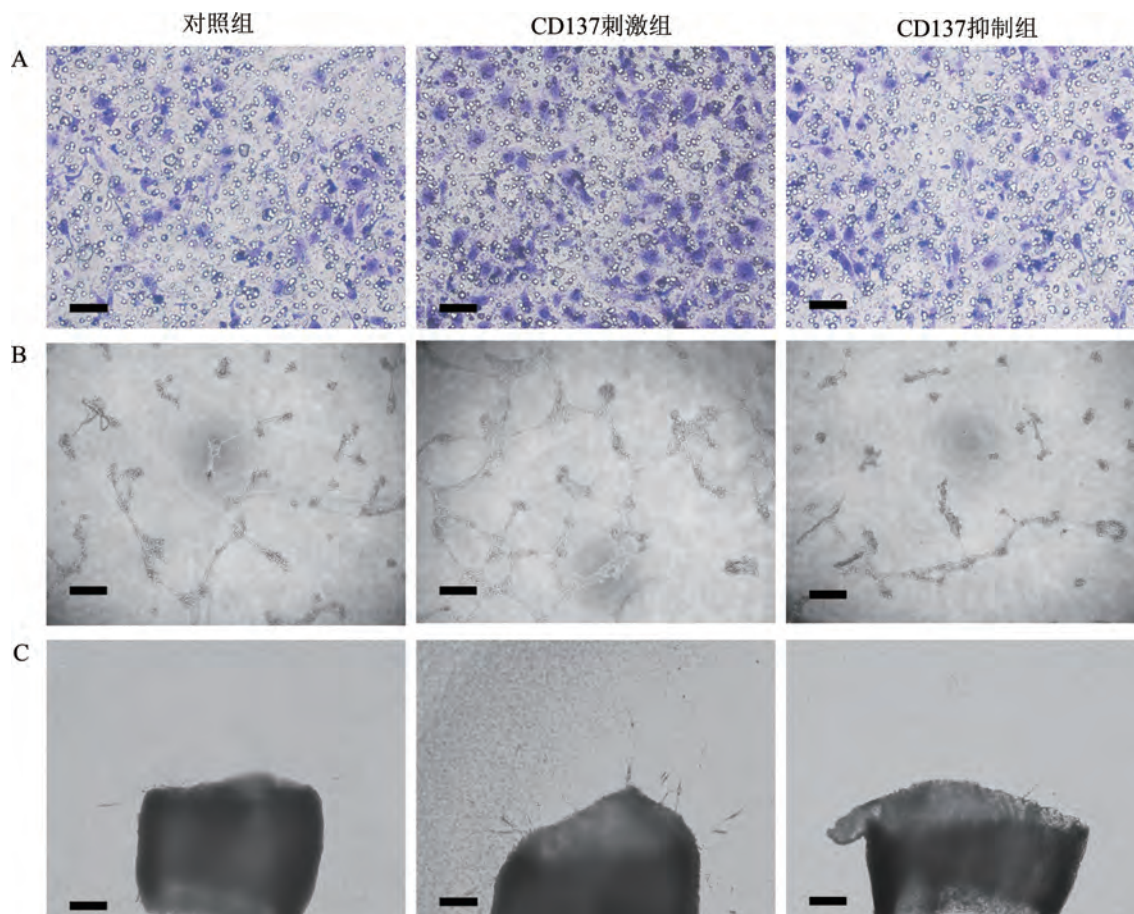
大于对照组 [(4.16 ± 0.14) mm]，分支数量 (31.58 ± 1.43) 多于对照组 (24.11 ± 1.10) 个，差异均有统计学意义 (P 值均 < 0.05)；而 CD137 抑制组内皮细胞小管长度 [(2.03 ± 0.09) mm] 和分支数 (7.68 ± 0.93 个) 均小于 CD137 刺激组 (P 值均 < 0.05)。

2.5 小鼠主动脉环血管新生情况

动脉环新生血管形成实验结果见图 2C。小鼠主动脉环 CD137 刺激组的新生微血管数量

(23.82 ± 5.12) 多于对照组 (2.14 ± 1.80), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 CD137 抑制组新生微

血管数量 (3.16 ± 1.10) 少于 CD137 刺激组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: A 为 Transwell 小室法侵袭实验 (结晶紫染色), B 为内皮管腔形成实验, C 为动脉环新生血管形成实验, 图中比例尺大小均为 $100 \mu\text{m}$ 。对照组即用 10 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ 预处理; CD137 刺激组即用 10 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ 和 5 mg/L CD137 抗体联合干预; CD137 抑制组即先用 200 nmol/L Wnt 信号抑制剂 IWR-1 预处理 30 min 后, 再用 10 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ 和 5 mg/L CD137 抗体联合干预。

图2 小鼠脑微血管内皮细胞的迁移能力、管腔形成能力和动脉环新生血管形成能力比较

Figure 2 Comparison of the migration and tube formation abilities of cardio-cerebral endothelial cells as well as the angiogenesis ability of mouse aortic rings in the three groups (the scale is $100 \mu\text{m}$)

3 讨论

冠状动脉粥样硬化性心脏病已成为人类死亡率最高的疾病之一, 尤其是动脉粥样硬化诱发的急性心肌梗死的致残及致死率极高, 已成为国民“头号杀手”。心脑血管疾病共同的病理基础是动脉粥样硬化。多项回顾性研究均显示在冠状动脉易损斑块内检测到新生微血管密度显著增加, 绝大多数动脉粥样硬化斑块内的新生血管在炎症浸

润、缺氧等因素刺激下, 随着斑块发展而数量增多, 为炎症介质浸润提供了通道, 有助于斑块脂核形成及扩大, 促进斑块内出血, 更容易导致斑块破裂和临床急性事件如心肌梗死的发生^[12], 这一点近期也被关于人类斑块血管新生的一项前瞻性研究结果所证实^[13-14]。我们前期研究证实, 伴随着 CD137 信号激活, 小鼠动脉粥样硬化斑块内新生血管形成数量增加, 内皮细胞增殖、迁移及管腔形成能力增加^[15], 提示 CD137 信号可能

促进动脉粥样硬化斑块内血管新生并导致斑块不稳定。

但是CD137信号如何促进动脉粥样硬化中血管新生的机制目前尚不清楚,血管新生过程受多种血管生成刺激和抑制因子的双重调控。Chen等对43例不同严重程度的冠心病患者的冠状动脉进行检测,发现冠状动脉病变严重程度与内皮成纤维细胞生长因子受体FGFR1表达缺失,Wnt信号转导增加、End-MT的发生程度密切相关^[16]。动脉粥样硬化病变早期,Wnt信号通路激活导致End-MT增加,产生未完全成熟的成纤维细胞,促进End-MT过程引起的新生血管形成,并在动脉粥样硬化斑块晚期促进斑块的钙化,而当这一信号被抑制时,End-MT程度降低,新生内膜形成减少^[17-18]。这些结果提供了强有力的证据:End-MT这一过程有助于动脉粥样硬化新生血管形成,进而促进病变发生和进展,更容易导致斑块破裂和继发临床急性事件的发生。

CD137信号是否通过End-MT调控动脉粥样硬化血管新生呢?现有的研究尚不能回答这个问题。故本实验分别从细胞和离体实验两方面分别观察激活CD137信号通路并抑制Wnt信号,观察对End-MT及新生血管形成的影响。在细胞实验中,我们前期实验已证实CD137信号激活,内皮细胞增殖、迁移、成管能力显著增强,可促进血管新生,但其中机制尚不明确。本实验中,我们发现激活CD137信号通路,伴随着内皮细胞形成管腔长度、分支数量增加,动脉环新生微血管数量增加,内皮细胞内Wnt信号激活,CD31、VE-Cadherin内皮细胞表型蛋白表达减少,间充质细胞表型FSP-1和 α -SMA表达增加。综合国内外研究进展及前期工作,我们提出CD137信号通路可能通过调控内皮细胞内皮-间质细胞转化促进血管新生的假说,为验证该假说,本研究通过Wnt信号抑制剂抑制End-MT相关信号通路激活,再次激活CD137信号,检测内皮细胞迁移及管腔形成能力,观察小鼠动脉环新生血管形成能力。结果显示,激活CD137信号,内皮细胞内皮细胞表型CD31、VE-Cadherin表达下降,间充质细胞表型FSP-1和 α -SMA表达增加,Wnt信号激活,同时内皮细胞增殖、迁移等管腔形成能力增加,

形成小管长度及分枝增加,小鼠动脉环新生血管形成能力增加,不仅如此,抑制Wnt信号后,再刺激CD137信号,与CD137刺激组比较,内皮细胞内皮细胞表型CD31、VE-Cadherin表达升高,间充质细胞表型FSP-1和 α -SMA表达下降,同时内皮细胞增殖、迁移等管腔形成能力减弱,形成小管长度及分枝减少,小鼠动脉环新生血管数量显著减少。综上所述,本次研究结果提示,CD137信号通路通过End-MT介导新生血管的形成。然而,EndMT目前在体水平缺乏明确的功能学定义与生物学标志物,本研究在动物水平的研究中对End-MT的定义也较为模糊,内皮细胞标志蛋白与间充质细胞特异性蛋白的细胞表达定位有待进一步证实,CD137信号激活Wnt信号后是如何传递信息与相应靶基因结合促发End-MT的形成?CD137信号轴如何调控Wnt信号及其与该信号通路间的相互作用以及各自在诱发End-MT进程中发挥多大作用,其具体机制如何,均需要深入探讨。

综上所述,CD137信号通路可能通过End-MT促进小鼠动脉粥样硬化斑块内的血管新生。本实验为了解CD137-CD137L信号通路与新生血管形成的相关性提供了理论基础,也为预防和治疗动脉粥样硬化提供了新思路。

参考文献:

- [1] LI A, PENG W X, XIA X D, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: a potential mechanism for atherosclerosis plaque progression and destabilization [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(11): 883-891. DOI: 10.1089/dna.2017.3779.
- [2] LOVISA S, ZEISBERG M, KALLURI R. Partial epithelial-to-mesenchymal transition and other new mechanisms of kidney fibrosis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(10): 681-695. DOI: 10.1016/j.tem.2016.06.004.
- [3] CHEN P Y, QIN L, BAEYENS N, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(12):4514-4528. DOI:10.1172/jci82719.
- [4] QI Z, LI M, ZHU K, et al. Si-Miao-Yong-An on promoting the maturation of Vasa Vasorum and stabilizing atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice: an

- experimental study[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 114:108785. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108785.
- [5] BRAVI L, MALINVERNO M, PISATI F, et al. Endothelial cells lining sporadic cerebral cavernous malformation cavernomas undergo endothelial-to-mesenchymal transition[J]. Stroke, 2016, 47(3): 886-890. DOI:10.1161/strokeaha.115.011867.
- [6] KOSTINA A S, USPENSKY V E, IRTYUGA O B, et al. Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(4): 733-740. DOI: 10.1016/j.bbdis.2016.02.006.
- [7] NAKANO M, FUKUMOTO Y, SATOH K, et al. OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through Vasa vasorum neovascularization[J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(3): 539-546. DOI: 10.1093/cvr/cvq211.
- [8] OLOFSSON P S, SÖDERSTRÖM L A, WÄGSÄTER D, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice[J]. Circulation, 2008, 117(10): 1292-1301. DOI: 10.1161/circulationaha.107.699173.
- [9] JEON H J, CHOI J H, JUNG I H, et al. CD137 (4-1BB) deficiency reduces atherosclerosis in hyperlipidemic mice[J]. Circulation, 2010, 121(9):1124-1133. DOI:10.1161/circulationaha.109.882704.
- [10] WENG J Y, WANG C P, ZHONG W, et al. Activation of CD137 signaling promotes angiogenesis in atherosclerosis via modulating endothelial Smad1/5-NFATc₁ pathway[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(3): e004756. DOI:10.1161/jaha.116.004756.
- [11] WANG X, ABRAHAM S, MCKENZIE J A G, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling[J]. Nature, 2013, 499(7458):306-311. DOI:10.1038/nature12345.
- [12] VAN DER VEKEN B, DE MEYER G R Y, MARTINET W. Axitinib attenuates intraplaque angiogenesis, haemorrhages and plaque destabilization in mice[J]. Vascul Pharmacol, 2018, 100: 34-40. DOI: 10.1016/j.vph.2017.10.004.
- [13] JOO S P, LEE S W, CHO Y H, et al. Vasa vasorum densities in human carotid atherosclerosis is associated with plaque development and vulnerability[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2020, 63(2): 178-187. DOI: 10.3340/jkns.2019.0077.
- [14] DE VRIES M R, QUAX P H. Plaque angiogenesis and its relation to inflammation and atherosclerotic plaque destabilization[J]. Curr Opin Lipidol, 2016, 27(5): 499-506. DOI:10.1097/mol.0000000000000339.
- [15] 翁嘉懿, 严金川, 陈瑶, 等. CD137-CD137L 信号通路通过活化 T 细胞核因子 c1 促进小鼠动脉粥样硬化斑块内血管新生[J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(12): 1040-1046. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2016.12.010.
- [16] XIE Y, LIAO J, YU Y, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in human idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1):961-969. DOI:10.3892/mmr.2017.8013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29115553/>
- [17] ANBARA T, SHARIFI M, ABOUTALEB N. Endothelial to mesenchymal transition in the cardiogenesis and cardiovascular diseases[J]. Curr Cardiol Rev, 2020, 16(4): 306-314. DOI: 10.2174/1573403X15666190808100336.
- [18] LI H R, ZHAO Q F, CHANG L P, et al. LncRNA MALAT1 modulates ox-LDL induced EndMT through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Lipids Heal Dis, 2019, 18(1):62. DOI:10.1186/s12944-019-1006-7.
- (收稿日期: 2020-12-14 修回日期: 2021-07-23)

咽立爽口含滴丸对慢性咽炎家兔免疫细胞亚群及 NF- κ B 信号通路的影响

唐 焱¹, 喻国冻², 何星辰³, 王 佳³, 张 田²

[1. 长沙市中医医院(长沙市第八医院)耳鼻咽喉头颈外科, 长沙 410100; 2. 贵州医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学, 贵阳 550025]

[摘要] 目的 探究咽立爽口含滴丸对慢性咽炎家兔模型的作用效果及机制。方法 健康新西兰白兔42只, 随机分为7组: 空白组, 模型组, 慢严舒柠清喉利咽颗粒组(9 g/kg), 咽立爽口含滴丸低(0.025 g/kg)、中(0.05 g/kg)、高(0.1 g/kg)剂量组和雾化组(0.025 g/kg)。除空白组外, 其余家兔均采用化学刺激法建立慢性咽炎动物模型。造模成功后第2天起, 5个治疗组每日分别以慢严舒柠清喉利咽颗粒、咽立爽口含滴丸相应剂量进行不同治疗, 而空白组和模型组以蔗糖(0.025 g/kg)置于家兔口腔, 连续给药7 d。从造模第3天开始, 每天观察家兔咽喉壁局部情况, 给药结束后进行采血, 处死家兔后采样待检。HE染色观察咽喉壁黏膜组织病理学变化; 流式细胞术检测血液CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺, 计算CD4⁺/CD8⁺水平; ELISA检测血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C反应蛋白(CRP)和总抗氧化能力(T-AOC)水平; 蛋白质印迹法检测咽喉壁黏膜组织IL-6、IL-1、TNF- α 、核转录因子 κ B(NF- κ B p65)、核转录因子- κ B抑制因子(I κ B- α)蛋白表达; 实时荧光定量PCR检测咽喉壁黏膜组织NF- κ B p65、I κ B- α mRNA表达。结果 与空白组比较, 慢性咽炎家兔咽喉壁黏膜病理组织损伤; CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺和T-AOC水平显著降低, CD8⁺、IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、NF- κ B p65和I κ B- α 水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 不同治疗组均可不同程度减轻咽喉壁黏膜组织病理损伤; 咽立爽口含滴丸高剂量组及雾化组CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺和T-AOC水平显著升高, CD8⁺、IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、NF- κ B p65和I κ B- α 水平均降低($P < 0.05$), 效果优于低、中剂量及慢严舒柠清喉利咽颗粒组。结论 咽立爽口含滴丸可显著改善慢性咽炎家兔模型的炎性指标, 减轻组织病理损伤, 调节NF- κ B信号通路相关因子表达, 且雾化用药的效果更明显。

[关键词] 慢性咽炎; 慢严舒柠清喉利咽颗粒; 咽立爽口含滴丸; 家兔

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0426-09

Effects of Pharyngeal Refreshing Pills on Immune Cell Subsets and NF- κ B Signaling Pathway in Chronic Pharyngitis

TANG Yi¹, YU Guodong², HE Xingchen³, WANG Jia³, ZHANG Tian²

[1. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Changsha Hospital of Traditional Chinese Medicine (Changsha Eighth Hospital), Changsha 410100, China; 2. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China]

Correspondence to: YU Guodong, E-mail: ygd.1224@163.com

[Abstract] **Objective** To explore the effect and mechanism of pharyngeal refreshing pills on an animal model of chronic pharyngitis. **Methods** A total of 42 healthy New Zealand white rabbits were randomly

[基金项目] 贵阳市科学技术局资助项目(20173024)

[作者简介] 唐 焱(1990—), 男, 硕士, 住院医师, 从事耳鼻喉研究。E-mail: tangyi67890@126.com

[通信作者] 喻国冻(1965—), 男, 教授, 主任医师, 从事耳鼻咽喉头颈外科研究。E-mail: ygd.1224@163.com

divided into seven groups: control, model, manyanshuning granules (9 g/kg), pharyngeal refreshing pills at low- (0.025 g/kg), medium- (0.05 g/kg), high- (0.1 g/kg) doses, and atomization (0.025 g/kg) groups. Animal models of chronic pharyngitis were established by chemical stimulation in all rabbits except the control group. From the second day after successful modeling, the five treatment groups were administered with manyanshuning granules and different doses of pharyngeal refreshing pills every day, while the control and model groups were fed with white sugar (0.025 g/kg) for 7 days. From the third day after successful modeling, the local condition of the pharyngeal wall of each rabbit was observed every day. Blood samples were collected at the end of drug administration and examined. Histopathological changes in the pharyngeal wall mucosa were examined by hematoxylin-eosin staining, and the levels of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ were detected by flow cytometry. The levels of interleukin-6 (IL-6), IL-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α), C-reactive protein (CRP), and total antioxidant capacity (T-AOC) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting was used to detect the expression of IL-6, IL-1, TNF- α , nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 and NF- κ B inhibitor (I κ B- α) at the protein level in the pharyngeal wall mucosa. qRT-PCR was used to detect NF- κ B p65 and I κ B- α mRNA expression in the pharyngeal wall mucosa. **Results** Compared with the control group, the pathological tissues of the posterior pharyngeal mucosa of rabbits with chronic pharyngitis were significantly damaged; the levels of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, and T-AOC were significantly decreased, while the levels of CD8⁺, IL-6, IL-1, TNF- α , CRP, NF- κ B p65, and I κ B- α were significantly increased (all $P < 0.01$). Compared with the model group, the pathological injury of pharyngitis could be alleviated to different degrees in the treatment group; the levels of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, and T-AOC in the pharyngeal refreshing pills at high dose and atomization groups were significantly increased, while the levels of CD8⁺, IL-6, IL-1, TNF- α , CRP, NF- κ B p65, and I κ B- α were significantly decreased (all $P < 0.05$). The effect of high-dose pharyngeal refreshing pill administration was better than that of low-dose and middle-dose pharyngeal refreshing pills, and manyanshuning granules. **Conclusion** The pharyngeal refreshing pills can significantly improve the inflammatory index of chronic pharyngitis, reduce pathological injury, affect the expression of NF- κ B signaling pathway-related factors, and the effect of atomization dose is more obvious.

[Key words] Chronic pharyngitis; Manyanshuning granules; Pharyngeal refreshing pills; Rabbit

慢性咽炎 (chronic pharyngitis, CP) 是多见于成年人的耳鼻喉科常见疾病, 可由细菌、病毒、酗酒、过度使用声音、吸烟等引起, 主要表现为咽部轻微疼痛、灼热、干痒、吞咽困难、咳嗽、有异物感等症状, 易反复发作^[1]。根据 2015 年流行病学数据, 全世界至少有 20% 的成年人患有慢性咽炎, 严重影响着患者的生活及工作^[2]。慢性咽炎是黏膜下、咽黏膜及淋巴组织的慢性炎症。炎性反应能够激活核转录因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)。NF- κ B 的持续激活能够增强一些细胞因子及黏附因子的表达, 使炎性反应细胞产生活性氧, 损伤咽黏膜周围上皮细胞, 引起咽黏膜组织的炎性损害^[3]。

在慢性咽炎的各种治疗策略中, 抗炎药物通

常被用来减轻喉部肿胀, 调节病理生理过程, 改善患者的舒适度^[4]。研究表明, 咽立爽口含滴丸 (pharyngeal refreshing pills) 对慢性咽炎有显著的治疗效果^[6]。咽立爽口含滴丸的主要成分为艾纳香草、薄荷素油、天然冰片和薄荷脑, 其中艾纳香草经蒸馏升华提制的艾纳香油具有较强的抗菌、抗炎、消肿、解毒、疏散风热和止痛的作用^[4]。然而, 咽立爽口含滴丸对慢性咽炎的作用机制尚不清楚。本研究拟探究咽立爽口含滴丸对家兔慢性咽炎的影响及其抗炎机制, 以期慢性咽炎的治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康普通级新西兰白兔 42 只 (雌雄各半),

体质量为2.0~2.5 kg, 购于成都达硕实验动物有限公司 [SCXK (川) 2020-030]。家兔饲养于贵州医科大学动物实验中心 [SYXK (黔) 2021-0007], 环境温度为20~25 °C, 湿度为(50±5) %, 自由饮水。研究方案经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准 (IACUC 2001325), 并按照实验动物使用3R原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

阳性对照药物慢严舒柠清喉利咽颗粒 (批号: Z20053117) 购自山西桂龙医药有限公司; 咽立爽口含滴丸 (批号: Z20025286) 购自贵州黄果树立爽药业有限公司; FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) (ZC-52826)、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) (ZC-52815)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (ZC-52984)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) (ZC-36085)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) (ZC-37662) 用 ELISA 试剂盒购自上海茁彩生物科技有限公司; IL-6 (sc-57315)、IL-1 (sc-52012)、TNF- α (sc-52746)、NF- κ B p65 (sc-8008)、核转录因子- κ B 抑制因子 (nuclear factor-kappa B inhibitor, I κ B- α) (sc-1643) 相关抗体购自美国 Santa Cruz 公司; TRIzol 试剂和 RNA 提取试剂盒 (14105) 购自美国 Invitrogen 公司; PCR 扩增试剂盒 (AK9906) 购自日本 TaKaRa 公司; PCR 引物用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由北京擎科科技有限公司合成; 实时定量 PCR 仪购自美国 Bio Rad 公司。

1.3 慢性咽炎家兔模型构建

家兔适应性饲养 7 d 后, 随机分为 7 组 (每组 6 只): 空白组 (Con), 模型组 (CP), 慢严舒柠清喉利咽颗粒组 (CP+MYS), 咽立爽口含滴丸低剂量组 (CP+Pha L)、中剂量组 (CP+Pha M)、高剂量组 (CP+Pha H)、雾化组 (CP+Pha A)。除 Con 组外, 其余各组采用氨水松节油复合因素造模方法刺激咽部, 诱导造慢性咽炎家兔模型^[7]。操作方法: Con 组第 1~15 天用蒸馏水喷雾咽部; 其余各组每天 2 次 (总共 600 μ L) 将 2.5% 氨水喷入家兔的咽部黏膜, 持续 15 d, 在第 8 天开始将 0.5 mL 松节油注入家兔的咽黏膜中, 操作

完成后 30 min 禁止饮水。观察家兔口部抓痕、喷喉后半小时饮水、口咽分泌物量及每天的食量变化情况, 并于第 15 天在硬性鼻内镜下观察造模组家兔的咽部黏膜情况。家兔搔抓口部频繁、饮水量及频次明显下降、口腔分泌物黏稠, 咽部黏膜呈暗红色, 光泽度欠佳, 说明造模成功。

1.4 给药方法

造模成功后, 连续给药 7 d。CP+MYS 组: 每日按 2.5 g/kg 将慢严舒柠清喉利咽颗粒置于家兔口腔。CP+Pha L 组、CP+Pha M 组和 CP+Pha H 组: 将咽立爽口含滴丸研磨成粉末状, 每日分别以相当于成人剂量 2.5、5、10 倍的咽立爽口含滴丸粉末 (0.025 g/kg、0.05 g/kg、0.1 g/kg) 置于家兔口腔。CP+Pha A 组: 每日捻磨咽立爽口含滴丸 (0.025 g/kg) 成粉末状, 与灭菌生理盐水 5 mL 配制为悬浊液, 置于雾化机内用于雾化治疗。Con 组和 CP 组: 每日以与低剂量用药组等量的蔗糖 (0.025 g/kg) (具有高渗透性, 作为对照) 置于家兔口腔。以上给药量均以人: 兔为 1: 5~1: 10 计算, 参照苗明三^[8]主编的《实验动物与动物实验技术》。

1.5 样本采集

治疗结束后, 各组家兔均采集耳中央动脉血 4 mL。其中 3 mL 血静置后经 3 000 r/min 低温离心 15 min, 取血清, -80 °C 冰箱保存; 另 1 mL 血加入抗凝管后, 立即进行后续流式细胞检测。采血结束后, 于家兔腹腔注射 1% 戊巴比妥钠, 采用 CO₂ 吸入法处死家兔, 迅速解剖家兔口咽部, 取出咽喉壁黏膜组织, 用预冷的生理盐水迅速冲净, 分成两份, 一份经质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定, 另一份于 -80 °C 低温保存。

1.6 家兔一般情况观察

从造模第 3 天开始, 每天观察家兔行为、肛温、状态、摄食、饮水量和大小便等情况, 观察咽喉壁局部情况有无肿胀、色泽、分泌物及搔抓颈部等。

1.7 组织病理观察

将固定的咽喉壁黏膜按常规方法制备石蜡切片, 然后进行苏木精染色, 盐酸乙醇分化, 50 °C 温水或弱碱性水溶液返蓝, 85% 乙醇溶液脱水, 伊红染色, 梯度乙醇溶液脱水, 二甲苯透

明,中性树胶封固,镜检观察具体病变。按以下标准进行病变程度分级:正常结构为“-”;咽部充血,炎症较轻为“+”;咽部炎症局限,有钉突形成成为“++”;咽部炎症较弥漫,上皮钉突明显为“+++~++++”。

1.8 血液相关因子检测

取抗凝血 100 μ L 加入流式测定管中,分别加入 5 μ L APC 标记的 CD3 McAb、5 μ L FITC 标记的 CD4 McAb、5 μ L PE 标记的 CD8 McAb 后混匀,避光孵育约 20 min;加 2 mL 溶血素,避光孵育约 10 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;加 PBS 洗 2 遍,弃上清液,用 PBS 缓冲液,调整细胞密度至 1×10^6 个细胞/mL,用 FACSCalibur 流式细胞仪检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞所占百分比,计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

ELISA 试剂盒测定血清 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、T-AOC 水平,具体操作按照试剂盒说明进行。

1.9 蛋白质印迹法检测

提取咽喉壁黏膜组织样本蛋白,进行 10%SDS-PAGE 凝胶电泳。将目的蛋白条带转印至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉封闭后,分别加入一抗 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α (均按 1:500 稀释)和 β -actin,4 $^{\circ}$ C 振荡孵育过夜,TBST 洗涤 3 次。然后加入二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,膜上加入 ECL 化学发光试剂。取出 PVDF,化学发光法获得胶片后进行图像采集,目标条带的 A 值采用 Quantity One 凝胶图像软件分析,以目标条带与 β -actin 条带的 A 值的比值反映活性 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 的相对表达水平。

1.10 实时荧光定量 PCR 法检测

依据组织 RNA 提取试剂盒说明提取咽喉壁黏膜组织总 RNA,反转录合成 cDNA。采用 SYBR Green 1 real-time PCR 方法检测 mRNA 的相对表达量, β -actin 作为内参。NF- κ B p65 上游引物序列为 5'-GGCAGCACTCCTTATCAAC-3',下游引物序列为 5'-GGTGTCTGTCCTTATCGTAG-3'; I κ B- α 上游引物序列为 5'-CATGAAGAGAAGACACTGACCATGGAA-3',下游引物序列为 5'-TGGATAGAGGCTAAGTGTAGACACG-3'; β -actin 上游引物序列为 5'-ATGGATGAC

GATATCGCTGC-3',下游引物序列为 5'-CTTCTGACCCATACCCACCA-3'。用实时定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 检测,PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,40 个循环。记录 Ct 值,并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析咽喉壁黏膜组织中 NF- κ B p65、I κ B- α mRNA 相对表达水平。

1.11 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔一般情况

造模第 3 天起,大部分家兔逐渐出现精神疲乏、饮水纳食减少、口腔分泌物增多、搔抓颈部、咽部呈现充血及微肿胀等情况;局部注射松节油后,上述症状加重且分泌物较黏稠;造模 15 d 后,上述症状越加明显。Con 组实验动物未见异常。

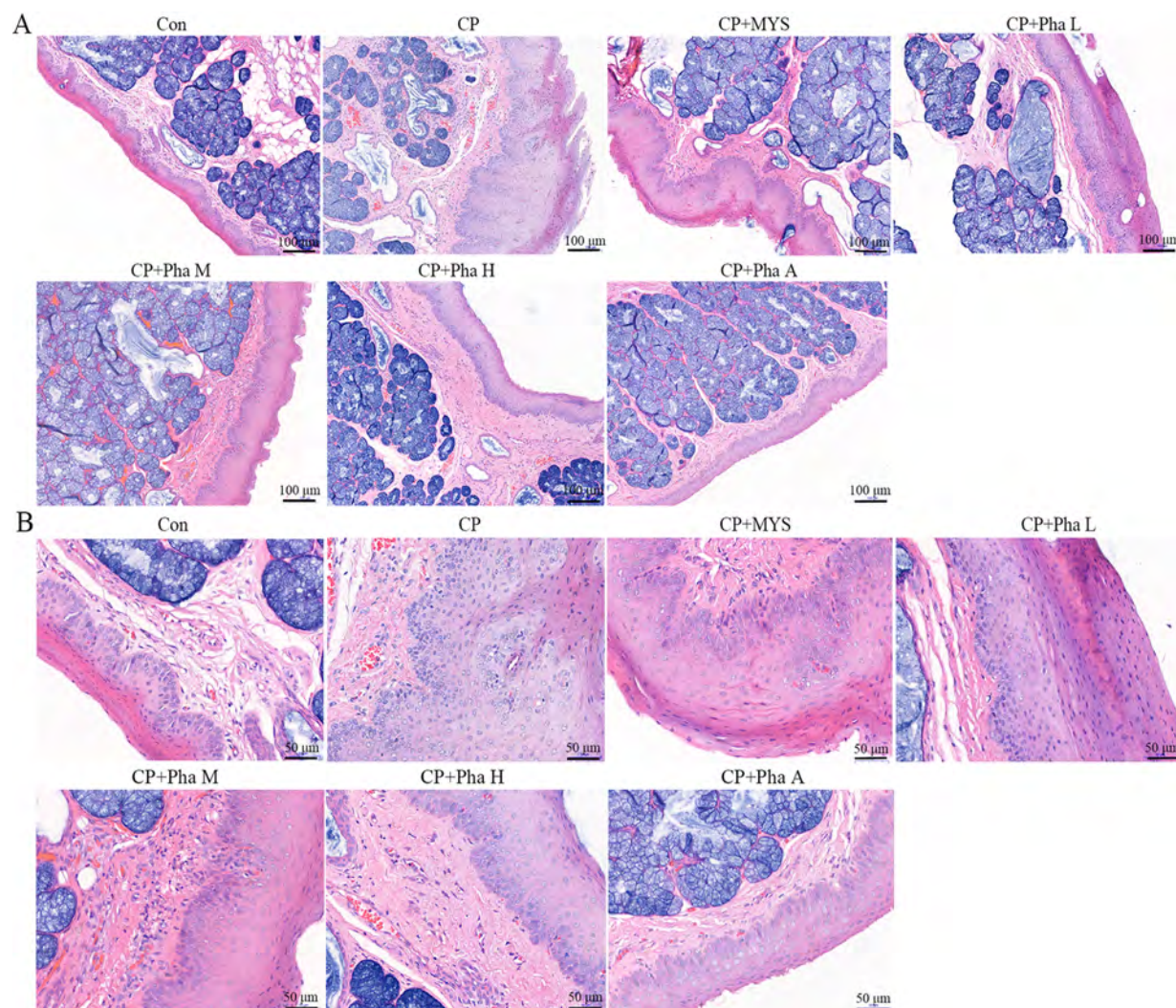
2.2 各组家兔咽喉壁黏膜的病理组织学观察

HE 染色结果(表 1、图 1)显示,Con 组咽

表 1 咽立爽口含滴丸治疗后家兔咽喉黏膜病变程度分级
Table 1 Grading degree of laryngopharyngeal mucosa lesions of rabbits after treatment with pharyngeal refreshing pills

分组	咽喉黏膜病变程度分级 (n)				
	-	+	++	+++	++++
Con	6	-	-	-	-
CP	-	1	1	4	-
CP+MYS	-	3	1	2	-
CP+Pha L	-	3	2	1	-
CP+Pha M	1	4	1	-	-
CP+Pha H	2	3	1	-	-
CP+Pha A	4	2	-	-	-

注:Con 为空白组;CP 为模型组;CP+MYS 为慢严舒柠清利咽颗粒组;CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组;CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组;CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组;CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。-为正常结构;+为咽部充血,炎症较轻;++为咽部炎症局限,有钉突形成;+++为咽部炎症较弥漫,上皮钉突明显;++++为咽部炎症弥漫,上皮钉突明显。每组 6 只新西兰白兔。



注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。A 为 HE 染色 (100 $\times$); B 为 HE 染色 (400 $\times$)。

图1 光学显微镜下家兔咽喉壁黏膜组织病理学改变

Figure 1 Pathological examination of the posterior pharyngeal wall mucosa of rabbits under a light microscope

喉壁黏膜组织未见明显病变; CP 组黏膜上皮细胞增生明显, 且增生形成指状突起, 细胞排列较为紊乱, 黏膜固有层见较多腺体分布, 固有层结缔组织内轻度出血, 有炎细胞浸润, 钉突形成, 红细胞溢出血管分布于固有层内; CP+MYS 组黏膜上皮层结构较完整, 排列较规则, 黏膜固有层偶见中性粒细胞浸润、局部轻微出血, 可见红细胞溢出血管; CP+Pha L 组和 CP+Pha M 的病变基本相同, 黏膜上皮层结构较完整, 黏膜上皮细胞点状坏死, 可见胞核固缩、碎裂、轻度炎细胞浸润、局部轻微出血, 比模型组炎性反应明显减轻。

CP+Pha H 和 CP+Pha A 组的病变基本相同, 咽部黏膜表面上皮组织未见明显变性及炎性病变, 固有膜内见轻度慢性炎细胞浸润, 黏膜下层及肌层均未见明显病理变化。另外, CP+Pha H 和 CP+Pha A 组咽喉部病变程度明显好于模型组。

2.3 各组家兔血液 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺水平

流式细胞法检测结果 (表2) 显示: 与 Con 组比较, CP 组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺细胞所占百分比明显降低, CD8⁺细胞所占百分比明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CP+Pha M、CP+

Pha H 和 CP+Pha A 组的 CD3⁺、CD4⁺细胞所占百分比和 CD4⁺/CD8⁺比值均明显升高, CD8⁺细胞所占百分比明显降低 ($P<0.05$)。

2.4 各组家兔血清 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、T-AOC 水平

ELISA 法检测结果 (表 3) 显示: 与 Con 组比较, CP 组 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP 水平明显升高, T-AOC 水平明显降低 ($P<0.01$); 与 CP 组比较, CP+Pha H 组及 CP+Pha A 组 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP 水平明显降低, T-AOC 水平明显升高 ($P<0.05$)。

2.5 各组家兔咽喉壁黏膜 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 水平

蛋白质印迹法检测结果 (图 2) 显示: CP 组的 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 水平较 Con 组明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 CP 组比较, CP+Pha H 组和 CP+Pha A 组的 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.6 各组家兔咽喉壁黏膜 NF- κ B p65、I κ B- α mRNA 水平

实时荧光定量 PCR 检测结果 (表 4) 显示:

表 2 各组家兔血液 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺水平比较
Table 2 Levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺/CD8⁺ in the blood of rabbits in each group

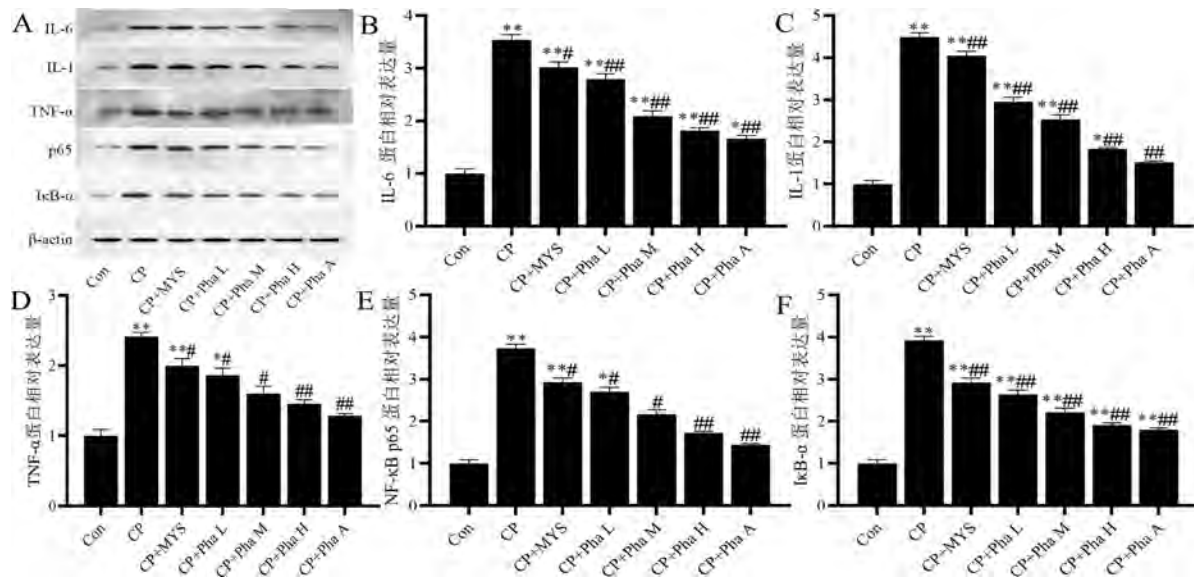
分组	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Con	73.87±4.15	56.89±1.98	9.71±1.47	5.95±0.91
CP	44.81±3.69**	39.05±2.26**	33.97±3.20**	1.15±0.05**
CP+MYS	52.63±2.20***	51.10±6.25**	32.18±5.82**	1.61±0.20**
CP+Pha L	53.73±2.68***	44.36±3.41**	24.34±3.75***	1.87±0.43**
CP+Pha M	65.90±3.31***	48.87±6.38*	19.09±3.98***	2.65±0.74***
CP+Pha H	71.12±3.89**	55.96±0.94**	13.04±2.10**	4.37±0.75***
CP+Pha A	72.83±4.04**	56.38±4.42**	11.18±1.20**	5.06±0.34**
F value	43.319	8.018	25.350	32.570
P value	<0.001	0.001	<0.001	<0.001

注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。其余组与空白组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 治疗组与模型组比较, *** $P<0.01$, ** $P<0.05$ 。

表 3 各组家兔血清 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、T-AOC 水平比较
Table 3 Levels of IL-6, IL-1, TNF- α , CRP, and T-AOC in the serum of rabbits in each group

分组	IL-6 $\rho/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-1 $\rho/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	TNF- α $\rho/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	CRP $\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	T-AOC/ ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Con	52.02±0.78	27.02±2.64	66.84±0.44	87.75±0.97	16.74±0.42
CP	59.43±0.83**	34.93±2.17**	73.04±2.65**	95.74±0.71**	13.47±1.37**
CP+MYS	55.50±1.24	30.91±3.71	72.34±1.78**	90.60±4.21*	14.92±0.80*
CP+Pha L	55.36±3.54*	30.57±1.85	72.96±1.23**	90.95±3.15*	14.54±0.44*
CP+Pha M	54.99±3.70*	29.99±3.41*	69.98±2.43	90.71±1.04*	15.31±1.03*
CP+Pha H	53.14±2.36**	28.37±3.49*	68.79±3.34*	89.85±1.06**	15.76±1.32**
CP+Pha A	52.46±1.62**	26.55±0.94**	67.76±1.96**	89.46±1.07**	15.89±0.58**
F value	3.591	3.167	4.224	3.932	3.868
P value	0.023	0.035	0.012	0.016	0.017

注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。其余组与空白组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 治疗组与模型组比较, *** $P<0.01$, ** $P<0.05$ 。



注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。其余组与空白组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 治疗组与模型组比较, ### $P<0.01$, # $P<0.05$ 。

图2 各组家兔咽喉壁黏膜 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 蛋白表达

Figure 2 Expression of IL-6, IL-1, TNF- α , NF- κ B p65, and I κ B- α at the protein level in the pharyngeal mucosa of rabbits in each group

表4 各组家兔咽喉壁黏膜 NF- κ B p65、I κ B mRNA 水平比较

Table 4 Expression of NF- κ B p65 and I κ B at the mRNA level in the posterior pharyngeal wall mucosa of rabbits in each group

($\bar{x} \pm s$, $n=6$)		
分组	NF- κ B p65	I κ B- α
Con	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.05
CP	1.78 $\pm$ 0.24**	1.93 $\pm$ 0.03**
CP+MYS	1.69 $\pm$ 0.07**	1.65 $\pm$ 0.12**
CP+Pha L	1.73 $\pm$ 0.05**	1.66 $\pm$ 0.31**
CP+Pha M	1.48 $\pm$ 0.09**	1.59 $\pm$ 0.05**
CP+Pha H	1.40 $\pm$ 0.25**	1.48 $\pm$ 0.12**
CP+Pha A	1.21 $\pm$ 0.10**	1.07 $\pm$ 0.03**
F value	11.356	18.071
P value	<0.001	<0.001

注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。其余组与空白组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 治疗组与模型组比较, ### $P<0.01$, # $P<0.05$ 。

与 Con 组比较, CP 组 NF- κ B p65、I κ B- α mRNA 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 CP 组比较, CP+Pha H 组和 CP+Pha A 组 NF- κ B p65、I κ B- α mRNA 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

3 讨论

不良的生活环境及工作压力增大会导致 CP 发病率增加。目前, 医药干预是治疗 CP 的主要方法^[9]。研究表明, 氨水+松节油建立的 CP 模型与临床 CP 相似, 符合 CP 动物模型的生物学特征^[10]。咽立爽口含滴丸的主要成分为艾纳香草蒸馏升华提制的艾纳香油, 以及天然冰片、薄荷素油和薄荷脑, 具有消肿止痛的作用^[11]。郭裕^[6]用咽立爽口含滴丸超声雾化治疗急性单纯性咽炎, 发现超声雾化吸入治疗有效可行。慢严舒柠清喉利咽颗粒可用于急慢性咽炎、扁桃体炎、咽喉发干、声音嘶哑等咽部症状的治疗, 临床疗效明显, 可作为阳性对照药物^[12]。由此, 本实验建立 CP 家兔模型, 并使用咽立爽口含滴

丸干预模型,以期寻找CP的潜在治疗药物。结果显示:与CP模型组比较,咽立爽口含滴丸各干预组家兔咽黏膜上皮结构较完整,排列较规则,偶见中性粒细胞浸润和局部轻微出血。另外,咽立爽口含滴丸高剂量与雾化组家兔咽黏膜上皮组织未见明显变性炎症性病变,黏膜下层及肌层均未见明显病理变化。上述结果表明,咽立爽口含滴丸能减轻慢性咽炎家兔咽部黏膜组织病理损伤,缓解病情进展,可能对CP发挥防治作用。

慢性咽炎患者咽部黏膜炎症反应强烈,多数炎症因子处于高表达状态,如血清TNF- α 、IL-6等。TNF- α 是由T淋巴细胞分泌的细胞因子,生物活性较为广泛,可参与其他生物因子协同作用,在炎症反应中发挥重要作用。IL-6是由成纤维细胞、活化T细胞分泌的细胞因子,属于趋化因子,可在感染引发的炎症反应中诱导炎症反应相关反应蛋白的合成与分泌,进而促进炎症反应^[13]。此外,T淋巴细胞亚群主要包括辅助性T细胞和抑制性T细胞,CD4⁺增多表示机体清除病毒、细菌的能力及机体免疫功能增强,而CD8⁺增多往往表示机体清除病毒、细菌的能力及免疫功能受到抑制^[14-15]。慢性咽炎患者病情进展过程中,CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺的降低可刺激B细胞的分泌,从而增强体液免疫,诱发产生免疫复合物的黏附与沉积,使病情加重^[16-17]。本研究结果显示:与空白组比较,模型组CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平,明显降低;咽立爽口含滴丸高剂量及雾化组CD8⁺水平明显降低,CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平明显升高。这些结果提示咽立爽口含滴丸影响免疫细胞亚群,进而影响咽炎病情进展。

NF- κ B信号通路能调控大量炎症细胞因子的生物学活动,广泛参与炎症反应、细胞增殖及免疫调节等病理生理过程。已有研究证实,未激活的NF- κ B通常与I κ B家族成员结合成无活性细胞质复合物而存在,当强烈的外界信号(如TNF- α 、IL-6、IL-1)诱导刺激细胞时,NF- κ B p65与I κ B相分离致使NF- κ B信号通路激活,诱导大量炎症因子转录,发挥转录调控作用^[18]。研究显示,用卵清蛋白刺激可选择性抑制NF- κ B活化的

I κ B- α 基因突变小鼠,制造变应性气道疾病模型,发现突变小鼠变应性炎症反应较对照组明显减轻,气道嗜酸性粒细胞及黏液分泌减少,血清IgE水平及促炎症反应的细胞因子表达也有所下降,表明NF- κ B在气道变应性炎症反应中起到重要调节作用^[19]。高斐宏等^[20]也通过动物实验发现,鼻炎大鼠鼻黏膜中NF- κ B高表达可使促炎症因子TNF- α 、IL-6表达上升。其中TNF- α 作为多功能炎症细胞因子,能介导黏附分子表达及细胞因子释放,促进炎症细胞的浸润和活化。以上研究结果提示,NF- κ B可激发多种炎症因子表达,同时也受相关炎症因子的反激活,是促使炎症效应进一步放大的关键。

CP是咽黏膜、黏膜下及淋巴组织的慢性炎症反应,炎症反应过程能够激活NF- κ B p65,持续激活的NF- κ B p65能够增强一些细胞因子(如IL-1 β 、TNF- α)和一些黏附因子(如VCAM-1、ICAM-1)的表达,使炎症反应细胞产生活性氧,损伤咽黏膜周围上皮细胞,引起咽黏膜组织的炎症损害^[21]。因此,抗炎作用的一个解释可能是抑制NF- κ B的激活,从而降低炎症标志物的水平。本研究显示,与空白组比较,模型组IL-1、IL-6、TNF- α 、CRP表达及NF- κ B p65、I κ B- α 蛋白和mRNA表达明显升高,T-AOC表达明显降低;而咽立爽口含滴丸雾化组和高剂量组IL-1、IL-6、TNF- α 、CRP表达及NF- κ B p65、I κ B- α 蛋白和mRNA表达明显降低。这些研究结果提示,咽立爽口含滴丸可有效抑制NF- κ B炎症通路活性及促炎因子表达,增强机体的抗氧化能力,从而抑制慢性咽炎的炎症反应。

综上所述,咽立爽口含滴丸具有较好的抗炎及增强免疫作用,可影响NF- κ B信号通路,有效缓解慢性咽炎症状。

参考文献:

- [1] XU C Y, YUE R S, LV X, et al. The efficacy and safety of Banxia-Houpo-Tang for chronic pharyngitis: a protocol for systematic review and meta analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(30): e19922. DOI: 10.1097/MD.00000000000019922.
- [2] LEONE C A, CARUSO A A, ALLOCCA V, et al. Pilot study on the effects of high molecular weight sodium

- hyaluronate in the treatment of chronic pharyngitis[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2015, 28(4): 532-538. DOI:10.1177/0394632015586497.
- [3] RAISH M, AHMAD A, ANSARI M A, et al. *Momordica charantia* polysaccharides ameliorate oxidative stress, inflammation, and apoptosis in ethanol-induced gastritis in mucosa through NF- κ B signaling pathway inhibition[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 193-199. DOI: 10.1016/j.ijbiomac. 2018. 01.008.
- [4] 陈其冰, 王燕, 李芬, 等. 慢性咽炎病因和发病机制研究进展[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2019, 27(2): 224-228. DOI:10.3969/j.issn.1006-7299.2019.02.029.
- [5] 吴思恩, 李清明, 曹火太. 咽立爽口含滴丸治疗慢性咽炎的效果观察[J]. *中国当代医药*, 2015, 22(20): 81-83.
- [6] 郭裕. 咽立爽口含滴丸超声雾化治疗急性单纯性咽炎疗效观察[J]. *世界临床药物*, 2006, 27(7): 431-432, 442. DOI:10.3969/j.issn.1672-9188.2006.07.012.
- [7] 何强亮, 刘元献, 杨龙, 等. 慢性咽炎动物模型的建立及相关指标观察分析[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2017, 25(1): 17-20. DOI: 10.16542/j.cnki.issn.1007-4856.2017.01.005.
- [8] 苗明三. *实验动物和动物实验技术*[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997.
- [9] CHEN J J, YIN S K, LIU S X, et al. A multicenter randomized controlled study on the treatment of acute and chronic pharyngitis with Binglianqingye Spray[J]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2018, 32(1): 1-6. DOI:10.13201/j.issn.1001-1781.2018. 01.001.
- [10] 温雯, 张颖, 邹桂欣, 等. 兔慢性咽炎模型实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(6): 1313-1315. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2018.06.060.
- [11] 谢雪艳, 李天珍, 王万林, 等. 不同产源艾纳香油化学成分及其抗炎活性研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(9): 1069-1076. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2019.09.008.
- [12] 王立英, 刘强, 曹震. 清喉利咽颗粒联合克拉霉素治疗慢性咽炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(2): 300-303. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515. 2020. 02.022.
- [13] 王艺, 张玲, 周家璇. 咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠咽黏膜修复作用的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(15): 1600-1602. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849. 2015.15.002.
- [14] 贺敏. 逍遥散联合半夏厚朴汤治疗慢性咽炎的效果及对患者血清炎症标志物及T淋巴细胞亚群的影响[J]. *中医临床研究*, 2020, 12(13): 69-71. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2020.13.023.
- [15] 曹敏, 向钦, 刘阳, 等. CBA/CaJ小鼠脏器重量、血液生理生化指标及免疫细胞的比例[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4): 418-423. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.002.
- [16] 张礼来, 张志琴, 周凤玲. 益气通窍中药灌洗辅助治疗鼻内镜术后鼻源性慢性咽炎疗效及对炎症细胞因子、T淋巴细胞亚群、SIgA水平的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(9): 959-962. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849. 2018.09.013.
- [17] 雷剑波, 荣堃, 杨丽, 等. 养阴利咽饮联合玉液散吹喉治疗阴虚肺燥型慢性咽炎效果及对血清炎症因子水平的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(27): 3041-3044. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849. 2016. 27.028.
- [18] ZHOU Z X, MOU S F, CHEN X Q, et al. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF κ B in animal models of acute pharyngitis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1269-1274. DOI:10.3892/mmr.2017.7933.
- [19] 徐佳莉, 王莹, 陈鹏. 高剂量PM_{2.5}诱导卵清蛋白致哮喘小鼠肺损伤及其机制[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(10): 1297-1302. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.008444.
- [20] 高斐宏, 李林, 卢炆, 等. 蒙药十三味红花密诀丸对过敏性鼻炎大鼠鼻黏膜ICAM-1、VCAM-1、TLR4、NF- κ Bp65表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(9): 4143-4145.
- [21] ZHU C, ZHANG S, SONG C, et al. Selenium nanoparticles decorated with *Ulva lactuca* polysaccharide potentially attenuate colitis by inhibiting NF- κ B mediated hyper inflammation[J]. *J Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 20. DOI: 10.1186/s12951-017-0252-y.
- (收稿日期: 2021-01-04 修回日期: 2021-03-11)

多囊卵巢综合征-胰岛素抵抗大鼠子宫组织中PPARs异常表达与胰岛素抵抗的关系

魏巍¹, 陈艺华¹, 张秀智¹, 冷义福¹, 李纯¹, 尹天晓²

(1. 大连大学附属中山医院生殖医学中心, 大连 116001; 2. 大连大学, 大连 116001)

[摘要] 目的 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 在 多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 伴胰岛素抵抗大鼠模型子宫组织中异常表达与胰岛素抵抗的关系。方法 将 40 只雌性 SD 大鼠随机分为正常对照组和 PCOS-胰岛素抵抗模型组, 采用胰岛素+人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, hCG) 皮下注射法建立大鼠 PCOS-胰岛素抵抗模型, 正常对照组注射等量生理盐水 (即 0.9%NaCl 溶液)。应用 ELISA 检测两组大鼠空腹胰岛素和空腹血糖水平, 并计算胰岛素抵抗指数。取大鼠子宫组织行 HE 染色, 免疫组织化学法检测 PPARs 表达水平, 蛋白质印迹法检测 PPARs、胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS)、葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT-4) 和胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) 等蛋白表达。结果 模型组大鼠血清空腹胰岛素、空腹血糖和稳态胰岛素评价指数显著高于正常对照组 ($P<0.05$)。子宫组织 HE 染色提示, 正常对照组大鼠子宫组织形态正常, 模型组大鼠子宫内膜出现不同程度的增生性改变, 腺腔变小, 腺体数目减少, 排列松散。免疫组织化学显示, PPARs 的 3 种亚型 PPAR α 、PPAR β 及 PPAR γ 在大鼠子宫组织中均有表达, 模型组 PPAR α 和 PPAR γ 的表达下调 ($P<0.05$), PPAR β 在两组间的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。蛋白质印迹法检测结果显示, 模型组大鼠子宫组织 PPAR α 、PPAR γ 、IRS 和 GLUT-4 的表达显著低于正常对照组 ($P<0.05$), 而 IGF-1 表达高于正常对照组 ($P<0.05$)。结论 在 PCOS-胰岛素抵抗大鼠子宫组织中 IRS、GLUT-4 表达下调, 而 IGF-1 表达上调, 证实子宫组织层面存在胰岛素抵抗, 可能与 PCOS 大鼠子宫组织 PPAR α 、PPAR γ 表达下调相关。

[关键词] 过氧化物酶体增殖物激活受体; 多囊卵巢综合征; 胰岛素抵抗; 子宫组织; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R711.75 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0435-08

Relationship Between the Abnormal Expression of PPARs and Insulin Resistance in Uterus of Rats with Polycystic Ovary Syndrome and Insulin Resistance

WEI Wei¹, CHEN Yihua¹, ZHANG Xiuzhi¹, LENG Yifu¹, LI Chun¹, YIN Tianxiao²

(1. Reproductive Medicine Center, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, China;

2. Dalian University, Dalian 116001, China)

Correspondence to: CHEN Yihua, E-mail: yihua5297@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between abnormal expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and insulin resistance in the uterine tissues of rats with polycystic ovary syndrome and insulin resistance (PCOS-IR). **Methods** Forty female SD rats were randomly divided into normal control and PCOS-IR model groups. PCOS-IR models were established by subcutaneous injection

[基金项目] 大连市医学科学研究计划项目(1811101)

[作者简介] 魏巍(1972—), 女, 博士, 副主任医师。从事专业: 生殖医学。E-mail: visa0451@163.com

[通信作者] 陈艺华(1989—), 女, 硕士, 主治医师。从事专业: 生殖医学。E-mail: yihua5297@163.com

of insulin and human chorionic gonadotropin (INS+hCG) method, and rats in the normal control group were injected with equal amounts of normal saline. Fasting insulin (FINS) and fasting plasma glucose (FPG) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. Uterine tissues of rats were stained with hematoxylin-eosin (HE), PPARs were detected by immunohistochemistry, and the expressions of PPARs, insulin receptors (IRS), glucose transporter 4 (GLUT-4), and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) were detected by Western blotting. **Results** FPG and FINS levels and HOMA-IR in the model group were significantly higher than those in the normal control group ($P < 0.05$). HE staining of uterine tissues showed that the endometrium of the normal control group was normal, and the endometrium of the model group showed different degrees of proliferative changes, the glandular cavity became smaller, the number of glands decreased, and the arrangement was loose. Immunohistochemistry showed that three subtypes of PPARs (PPAR α , PPAR β , and PPAR γ) were expressed in the rat uterus. The expression of PPAR α and PPAR γ in the rat uterus was down-regulated in the model group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the expression of PPAR β between the two groups ($P > 0.05$). Western blotting results showed that the expression of PPAR α , PPAR γ , IRS, and GLUT-4 in the rat uterus of the model group was significantly lower than that of the normal control group ($P < 0.05$), while the expression of IGF-1 was higher than that of the normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of IRS and GLUT-4 is down-regulated and the expression of IGF-1 is up-regulated in the uterine tissue of PCOS-IR rats. The existence of IR is confirmed in the uterine tissue of PCOS-IR rats, and it may be related to the down-regulation of PPAR α and PPAR γ expression in the uterine tissues.

[Key words] Peroxisomal proliferator-activated receptors; Polycystic ovary syndrome; Insulin resistance; Uterine tissue; Rat

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种影响生殖和代谢的内分泌紊乱性疾病^[1]。除了稀发排卵或无排卵、高雄激素等表现, PCOS 患者常伴有胰岛素抵抗 (insulin resistance), PCOS 合并胰岛素抵抗的患者比例高达 50%~70%^[2]。PCOS 患者排卵障碍和内分泌异常可影响子宫内膜正常的周期性变化, 导致子宫内膜分泌反应不良, 甚至表现为不同程度的增生, 从而影响胚胎着床, 导致妊娠率降低和流产率升高, 患子宫内膜癌的风险增加^[3-4]。应用胰岛素增敏剂是目前临床治疗 PCOS-胰岛素抵抗的有效手段。过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisomal proliferator-activated receptors, PPARs) 是胰岛素增敏剂噻唑烷二酮 (thiazolidinedione, TZD) 类药物的作用靶点, 是一种核受体转录因子, 包含 3 种亚型: PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 。近年研究发现 PPARs 在人类生殖系统中表达, 可调节卵泡的发生、排卵和黄体发育, 参与胚胎发育及调节胎盘功能、维持妊娠等^[5]。本文以 PCOS-胰岛素抵抗大鼠模型为研究对象, 探讨在子宫组织中 PPARs 异常表达与胰岛素抵抗之间的关系, 为 PPARs 调节剂药

物研发及安全有效地用于 PCOS-胰岛素抵抗治疗提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 SPF 级 6 周龄雌性 SD 大鼠 40 只, 体重 180~220 g, 由大连医科大学动物中心 [SCXK (辽) 2013-0003] 提供。每笼 2 只大鼠, 于大连大学附属中山医院实验动物中心屏障环境 [SYXK (辽) 2018-0005] 适应性饲养 1 周。室内安静, 通风良好, 温度为 22~26 °C, 相对湿度为 40%~70%, 人工控制光照昼夜 12 h/12 h, 自由饮食, 垫料 1 周更换 2 次。本研究通过大连大学附属中山医院实验动物福利伦理委员会审查 (2019130), 所有操作均符合实验动物伦理学要求。

1.2 主要试剂和仪器

人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 购自宁波人健药业集团股份有限公司; 胰岛素注射液 (商品名为诺和灵, 规格 10 mL: 300 U) 购自诺和诺德 (中国) 制药有限公司; ELISA 试剂盒购自上海朗顿生物技术有限公司, 罗氏活力型血糖仪购自德国罗氏诊

断有限公司;免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PPAR α (兔单抗)、PPAR β (鼠单抗)、PPAR γ (兔单抗)、胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) (兔多抗)、葡萄糖转运蛋白4 (glucose transporter 4, GLUT-4) (兔单抗)、胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) (兔单抗)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,所有试剂盒的质控均符合要求。

1.3 动物分组及模型建立

40只雌性大鼠随机分为正常对照组和模型组,各20只。模型组采用胰岛素+hCG法造模^[6]:于第1~21日颈背部皮下注射胰岛素2.0 U/d,生理盐水(即0.9%NaCl溶液)稀释至0.2 mL,每日1次。第11~21日,皮下注射hCG 3.0 U/d,每日2次,以5%葡萄糖溶液替代日常饮水。从用药第10日起,每日将大鼠进行阴道涂片检查,1%瑞特蓝染色后在显微镜下观察阴道脱落细胞形态。于实验第22天,大鼠失去动情周期超过7 d,且处死后显微镜下观察可见卵巢形态呈现多囊样改变,血睾酮及空腹胰岛素升高,即视为造模成功^[6]。对照组大鼠每日皮下注射生理盐水0.2 mL,连续21 d。

1.4 标本采集

于实验第22天(禁饮食12 h后),全部大鼠经麻醉后称体质量。经大鼠尾静脉取血,用于检测空腹血糖。然后处死大鼠,于腹主动脉取血5~7 mL,离心后取上清液,-80℃冻存备用。取大鼠子宫组织,一部分用甲醛溶液固定,另一部分用于提取蛋白。

1.5 血清代谢指标检测

采用ELISA法测定空腹胰岛素水平,具体操作步骤按照ELISA试剂盒说明进行。然后结合空腹血糖值,计算稳态胰岛素评价指数(insulin resistance index, HOMA-IR)。HOMA-IR=空腹胰岛素 $\times$ 空腹血糖/22.5。

1.6 子宫组织相关检测

采用HE染色法观察大鼠子宫组织形态学变化,采用免疫组织化学法检测子宫组织中PPARs的表达,操作过程包括组织石蜡包埋、切片、脱蜡、抗原修复、血清封闭、免疫杂交及显色、脱水封固及ImagePro-Plus软件分析,具体操作按照试剂盒说明书进行。以平均吸光度值之比表示目的蛋白的相对表达水平。采用蛋白质印迹法检测PPARs、IRS、GLUT-4、IGF-1蛋白表达水平,以 β -Actin为内参,操作过程包括蛋白质样品制备-蛋白质定量-SDS-PAGE电泳-转膜-免疫杂交反应及显影-凝胶成像分析系统,具体步骤参考试剂盒说明书。

1.7 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的计量资料比较采用 t 检验;稳态胰岛素评价指数不符合正态分布,采用自然对数法转换为正态资料后再采用 t 检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA结果

与正常对照组相比,模型组大鼠空腹血清中胰岛素含量和稳态胰岛素评价指数均明显增高($P < 0.05$),而空腹血糖含量在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

2.2 HE染色结果

正常对照组大鼠的子宫内腺腔大、腺体多且呈簇状排列;模型组大鼠的子宫内腺腔出现不同程度的增生性改变,腺腔变小,腺体数目减少,且排列松散(图1)。

2.3 免疫组织化学结果

PPAR α 、PPAR β 及PPAR γ 3种亚型在大鼠子宫组织中均有表达。模型组大鼠PPAR α 、PPAR γ

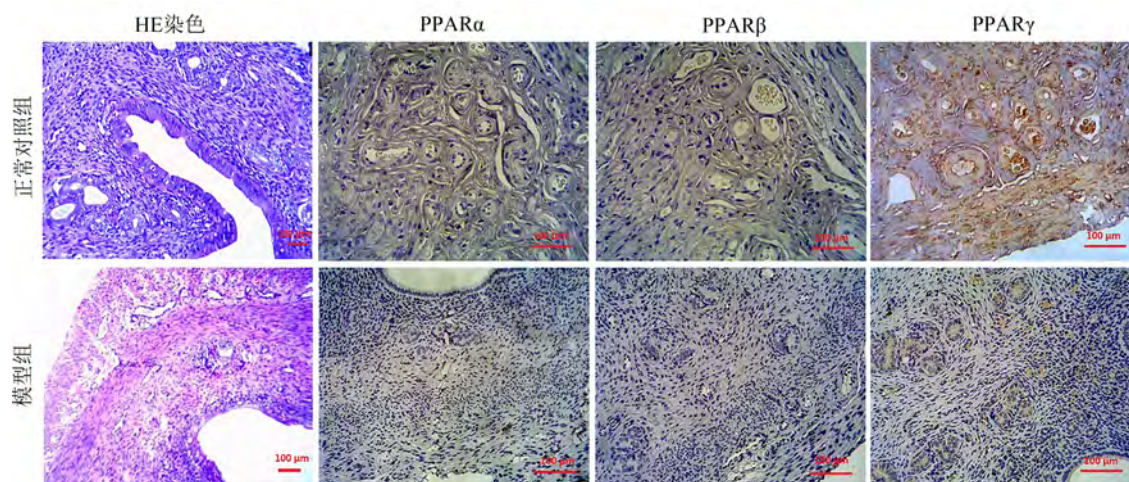
表1 大鼠空腹胰岛素、空腹血糖及稳态胰岛素评价指数比较

Table 1 Comparison of serum fasting insulin and fasting plasma glucose levels and insulin resistance index in rats

($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	空腹胰岛素/(mU·L ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)	稳态胰岛素评价指数
正常对照组	20	27.58 $\pm$ 0.92	4.05 $\pm$ 0.12	4.92 $\pm$ 0.36
模型组	20	48.19 $\pm$ 1.24	4.22 $\pm$ 0.25	9.04 $\pm$ 0.73
<i>P</i> 值		0.001	0.100	0.001

注:正常对照组注射等量生理盐水;模型组注射胰岛素+人绒毛膜促性腺激素,建立多囊卵巢综合征-胰岛素抵抗模型。



注：正常对照组注射等量生理盐水；模型组注射胰岛素+人绒毛膜促性腺激素，建立多囊卵巢综合征-胰岛素抵抗模型。PPAR α 、PPAR β 及PPAR γ 分别为过氧化物酶体增殖物激活受体的3种亚型。

图1 HE染色($\times 100$)和免疫组织化学染色法($\times 200$)分别检测大鼠子宫组织形态及PPAR蛋白表达情况

Figure 1 HE staining ($\times 100$) and immunohistochemistry staining of rat uterine tissues ($\times 200$)

在子宫组织中表达下调，与正常对照组大鼠相比的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；PPAR β 在两组之间的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$ ，图1，表2)。

2.4 蛋白质印迹结果

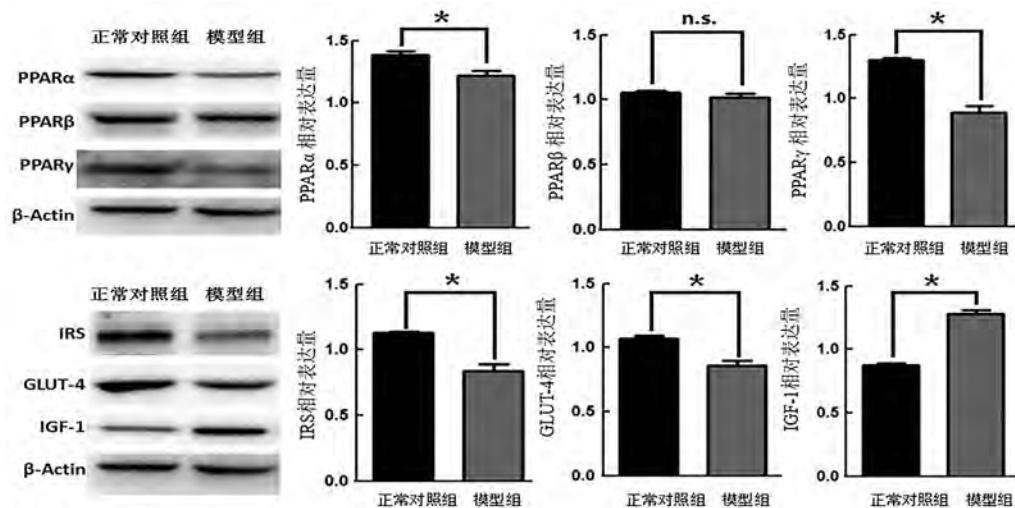
模型组大鼠子宫组织中PPAR α 、PPAR γ 、IRS和GLUT-4表达下调，IGF-1表达上调，与正常对照组大鼠比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PPAR β 的表达在两组之间无显著差异 ($P > 0.05$ ，图2)。

表2 大鼠子宫组织过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)平均吸光度值比较

Table 2 Comparison of average absorbance value of peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) in rat uterine tissues

($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	PPAR α	PPAR β	PPAR γ
正常对照组	20	60.05 $\pm$ 0.92	45.58 $\pm$ 1.02	63.40 $\pm$ 1.21
模型组	20	45.55 $\pm$ 1.09	44.78 $\pm$ 1.47	47.20 $\pm$ 0.58
P值		0.001	0.180	0.001

注：PPAR α 、PPAR β 及PPAR γ 分别为过氧化物酶体增殖物激活受体的3种亚型。



注：PPAR α 、PPAR β 及PPAR γ 分别为过氧化物酶体增殖物激活受体的3种亚型；IRS为胰岛素受体，GLUT-4为葡萄糖转运蛋白4，IGF-1为胰岛素样生长因子-1； β -Actin为内参；与正常对照组比较，n.s.为差异无统计学意义，* $P < 0.05$ 指差异有统计学意义， $n=20$ 。

图2蛋白质印迹法检测大鼠子宫内膜组织中各蛋白相对表达

Figure 2 Comparison of relative expression of various proteins in rat uterine tissues

3 讨论

临床上针对PCOS以药物治疗为主,很少采用外科手术治疗,故PCOS患者的卵巢、子宫等组织取材比较困难,因此选用一种能准确反映PCOS病理生理特征动物模型对于PCOS相关研究至关重要。目前,国内外建立PCOS-胰岛素抵抗动物模型的主要方法有:雄激素造模法、雌激素造模法、胰岛素联合hCG造模法、来曲唑造模法、孕激素联合hCG造模法、脱氢表雄酮联合胰岛素造模法、雄激素联合hCG造模法等^[6-10]。以上这些造模方法大多采用人源性激素诱导,但原理不尽相同,各有优缺点^[7-8]。其中胰岛素+hCG造模法(Poretsky造模法)是一种经典的造模方法。Poretsky等^[9]和李轶等^[10]均通过该方法成功诱导出PCOS-胰岛素抵抗动物模型,该模型具有卵巢多囊样改变、高雄激素血症、胰岛素抵抗、糖脂代谢异常等特点。本实验小组在前期研究中也发现该造模法为优选的PCOS-胰岛素抵抗造模方法^[6],能很好模拟出PCOS的病理生理特点,动物模型与PCOS患者临床表现的吻合率比较好,且该方法造模成功率可达90%以上。故本研究采用胰岛素+hCG造模法诱导PCOS-胰岛素抵抗大鼠模型。

本研究中,模型组大鼠失去明显的动情周期,表现糖代谢异常;ELISA结果表明,模型组与对照组相比,大鼠血清中空腹胰岛素和稳态胰岛素评价指数均增高($P<0.05$),说明模型组大鼠外周血存在胰岛素抵抗;HE染色显示,模型组大鼠子宫内膜腺体数目减少,为单个腺体松散排列,腺腔小而直;蛋白质印迹结果表明,模型组大鼠子宫组织中IRS、GLUT-4表达下调,而IGF-1表达上调,提示模型组大鼠在外周血及子宫组织存在胰岛素抵抗。

胰岛素抵抗是指外周组织对胰岛素的敏感性降低,对糖代谢的调节作用减弱,胰岛素代偿性分泌增加,形成高胰岛素血症。目前认为,胰岛素抵抗是PCOS主要的病理表现和发病机制,机体发生胰岛素抵抗后导致PCOS发生的主要原因包括,继发高胰岛素血症导致卵巢功能障碍、抑制排卵、雄激素分泌增加、引发高雄激素血症

等^[11]。而高雄激素血症是PCOS的特征性临床表现之一。PCOS患者的高雄激素血症与高胰岛素血症存在相互作用^[12],高雄激素血症又可直接和间接诱导机体胰岛素抵抗^[13]。本研究证实,PCOS-胰岛素抵抗大鼠的子宫组织存在胰岛素抵抗。Chang等^[14]发现,胰岛素抵抗患者的着床率和临床妊娠率比非胰岛素抵抗患者低。另有研究表明,胰岛素抵抗及高胰岛素血症可促进子宫内膜增生及癌变,增加了非妊娠女性患子宫内膜癌的风险^[15]。

应用胰岛素增敏剂改善胰岛素抵抗对PCOS患者的治疗效果明确^[16-17]。胰岛素增敏剂可以调节糖脂代谢,降低高胰岛素水平,减少血清雄激素水平,并可促进正常卵泡的发育和成熟卵子的排出,改善子宫内膜容受性,增加妊娠率,降低自然流产发生率,从而改善PCOS患者的生殖功能^[18-19]。

PPARs是一类由配体激活的核转录因子,属于核受体超家族,目前有3种亚型:PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ ^[19]。PPARs是胰岛素增敏剂的作用靶点,在维持机体正常的生理功能中起重要作用,包括生长发育、新陈代谢、细胞分化等,与癌症、不育、肥胖、糖尿病等疾病的发生有关^[20-21]。PPARs主要是通过配体结合活化后,激活下游基因的转录水平,调节能量平衡和卵巢功能,包括卵母细胞成熟、排卵、黄体形成等^[22]。

PPARs与生殖的关系密切。在卵巢层面,PPAR α 和PPAR γ 通过调控一些蛋白酶来参与排卵及黄体形成^[19],而关于PPAR β 在卵巢组织中的功能研究还尚无报告。PPAR γ 在动物及人类卵巢颗粒细胞、卵细胞中均有表达,参与性激素生成、卵巢各种细胞的分化和增殖^[23]。有研究发现,PPAR γ 激动剂罗格列酮在饮食诱导的大鼠模型中可以明显提高卵巢功能^[24]。另有实验发现,在小鼠卵巢组织中敲除PPAR γ 会导致生育能力下降^[25]。在子宫层面,有研究发现将大鼠PPAR α 敲除,大鼠流产率明显增加^[26];缺乏PPAR β 的大鼠的胎盘发育出现缺陷^[27];PPAR γ 在大鼠及人类胎盘中均有表达^[28-29];PPAR γ 失活将导致胚胎滋养细胞分化缺陷、早期胚胎死亡,

以及严重的胎盘发育损伤^[30]。

此外,PPARs的异常表达与PCOS发病密切相关。有研究发现,PPAR γ 在PCOS大鼠脂肪组织基质细胞上的表达强度明显降低^[31]。另有报道,PPAR γ 基因Pro12Ala多态性可能是PCOS多种发病机制中的重要因素之一,等位基因Ala的存在与胰岛素敏感性增高及PCOS-胰岛素抵抗减弱密切相关^[32]。

本研究结果证实,PPAR α 、PPAR β 及PPAR γ 在大鼠子宫组织中均有表达;免疫组织化学及蛋白质印迹结果一致,均显示模型组的PPAR α 、PPAR γ 表达水平均低于对照组,PPAR β 表达与对照组无明显差异,说明PCOS大鼠子宫内膜中PPAR α 、PPAR γ 呈现低表达,其与胰岛素抵抗有一定的联系。之前也有研究发现,PCOS患者卵巢颗粒细胞中PPAR γ mRNA的表达水平明显低于正常人组^[33],这与本研究结果相吻合。

在PPARs的3种亚型中,目前有关PPAR γ 的报告最多。PPAR γ 是胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物的作用靶点,可通过激活胰岛素受体亚单位上的酪氨酸激酶,使酪氨酸磷酸化,从而改善胰岛素抵抗,降低血糖及胰岛素水平,提高PCOS患者的排卵率及妊娠率^[34]。但长期服用PPAR γ 激动剂可引起肥胖、水肿,并增加罹患心肌梗死的风险,同时还会产生肝毒性等不良反应,因此不能大量及长期服用^[35]。PPAR α 是贝特类药物的作用靶点,主要是通过调控脂肪酸代谢相关基因来调节脂类代谢,还能改善免疫应答,调节炎症反应,改善胰岛素的耐受性^[36];此外,长期应用贝特类降血脂药物会增加患胆结石的风险,引起肌肉毒性等^[37]。另有研究表明,PPAR β 激动剂通过上调PPAR γ 辅激活子1 α 表达,增强线粒体 β 氧化和能量代谢能力,从而改善胰岛素敏感性^[38]。本研究中并未发现PPAR β 与胰岛素抵抗的确切关系。

综上所述,本研究发现在PCOS-胰岛素抵抗大鼠子宫组织中IRS、GLUT-4表达下调,而IGF-1表达上调,证实在子宫组织层面存在胰岛素抵抗,其机制可能与PCOS大鼠子宫组织PPAR α 、PPAR γ 表达下调相关。并且本研究证实,在子宫层面上不仅有PPAR γ 的表达,也有

PPAR α 和PPAR β 表达。已知PPARs单靶点药物存在缺陷,而PPAR α /PPAR γ 双激动剂或PPAR α /PPAR β /PPAR γ 泛调节剂的治疗效果好,弊端少,是后续进行胰岛素增敏剂开发的热点之一,也是未来治疗PCOS和胰岛素抵抗药物研究的一个重要方向。目前本研究小组相关的临床研究正在进行中,期待后续研究结果能为PPARs在PCOS-胰岛素抵抗疾病诊疗领域提供新的思路。

参考文献:

- [1] 中华医学会妇产科学分会内分泌学组及指南专家组. 多囊卵巢综合征中国诊疗指南[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(1): 2-6. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2018.01.002.
- [2] 张春梅, 赵越, 乔杰. 多囊卵巢综合征合并代谢综合征临床特点及治疗进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2016, 32(9):915-918.
- [3] BANU J, FATIMA P, SULTANA P, et al. Association of infertile patients having polycystic ovarian syndrome with recurrent miscarriage[J]. Mymensingh Med J, 2014, 23(4):770-773.
- [4] HAOULA Z, SALMAN M, ATIOMO W. Evaluating the association between endometrial cancer and polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2012, 27(5):1327-1331. DOI:10.1093/humrep/des042.
- [5] SZCZEPAŃSKA A A, ŁUPICKA M, SOCHA B M, et al. The influence of arachidonic acid metabolites on PPAR and RXR expression in bovine uterine cells[J]. Gen Comp Endocrinol, 2018, 262:27-35. DOI:10.1016/j.ygcen.2018.03.009.
- [6] 魏巍, 徐泰安, 王秋实, 等. 两种多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型的比较研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2019, 53(1):12-16. DOI:CNKI:SUN:HYDX.0.2019-01-003.
- [7] 李轶, 梁晓燕. 多囊卵巢动物模型的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 27(6): 380-383. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1889.2008.06.014.
- [8] 陈如枫, 刘新敏. 多囊卵巢综合征胰岛素抵抗动物模型构建方法的研究概况[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(5):733-736. DOI:10.13935/j.cnki.sjzx.180536.
- [9] PORETSKY L, PIPER B. Insulin resistance, hypersecretion of LH, and a dual-defect hypothesis for the pathogenesis of polycystic ovary syndrome[J]. Obstet Gynecol, 1994, 84(4):613-621.
- [10] 李轶, 梁晓燕, 杨星, 等. 胰岛素和人绒毛膜促性腺激素建立高雄激素多囊卵巢大鼠模型[J]. 国际生殖健

- 康/计划生育杂志, 2008, 27(1):54-57. DOI:10.3969/j.issn.1674-1889.2008.01.019.
- [11] 谢来娣, 张伊娜, 龚丽芬, 等. 多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗相关发病机制研究[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(8): 1926-1929. DOI: 10.7620/zgfybj. j. issn. 1001-4411. 2019.08.75.
- [12] 许良智, 单丹. 多囊卵巢综合征——一种代谢障碍性全身性疾病在卵巢的表现[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2011, 7(5):321-325.
- [13] 杨嘉琦, 郭雪桃, 周梦, 等. 育龄期伴高雄激素多囊卵巢综合征临床特征及代谢异常相关因素分析[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(6): 789-792. DOI: 10.11655/zgywylc2017.06.004.
- [14] CHANG E M, HAN J E, SEOK H H, et al. Insulin resistance does not affect early embryo development but lowers implantation rate in *in vitro* maturation-in vitro fertilization-embryo transfer cycle[J]. Clin Endocrinol, 2013, 79(1):93-99. DOI:10.1111/cen.12099.
- [15] 宋学茹, 张慧英, 张艳芳, 等. 细胞外信号调节激酶在多囊卵巢综合征患者子宫内膜中的活化及意义[J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(10):767-771. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2010.10.011.
- [16] 王菊. 胰岛素抵抗与多囊卵巢综合征育龄妇女生育功能的关系[J]. 中国实用医药, 2018, 13(26):70-71. DOI:10.14163/j.cnki.11-5547/r.2018.26.038.
- [17] 李扬璐, 阮祥燕, MUECK A O. 多囊卵巢综合征对妊娠结局的影响研究进展[J]. 首都医科大学学报, 2016, 37(4): 449-453. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-7795.2016.04.007.
- [18] PATEL R, SHAH G. Insulin sensitizers modulate GnRH receptor expression in PCOS rats[J]. Arch Med Res, 2018, 49(3):154-163. DOI:10.1016/j.arcmed.2018.08.001.
- [19] VITTI M, DI EMIDIO G, DI CARLO M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in female reproduction and fertility[J]. PPAR Res, 2016, 2016: 4612306. DOI:10.1155/2016/4612306.
- [20] ALTSHULER D, HIRSCHHORN J N, KLANNEMARK M, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes[J]. Nat Genet, 2000, 26(1): 76-80. DOI: 10.1038/79216.
- [21] UNLUTURK U, HARMANCI A, KOCAEFE C, et al. The genetic basis of the polycystic ovary syndrome: a literature review including discussion of PPAR-gamma[J]. PPAR Res, 2007, 2007:49109. DOI:10.1155/2007/49109.
- [22] WANG M H, TAFURI S. Modulation of PPARgamma activity with pharmaceutical agents: treatment of insulin resistance and atherosclerosis[J]. J Cell Biochem, 2003, 89(1):38-47. DOI:10.1002/jcb.10492.
- [23] 梁秀文, 季新梅, 马娟. 多囊卵巢综合征患者外周血单个核细胞中RPS 26及PPAR γ 基因的表达[J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9(1):55-58. DOI:10.3969/j.issn.1674-4020.2017.01.14.
- [24] MINGE C E, BENNETT B D, NORMAN R J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality[J]. Endocrinology, 2008, 149(5):2646-2656. DOI:10.1210/en.2007-1570.
- [25] CUI Y, MIYOSHI K, CLAUDIO E, et al. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility[J]. J Biol Chem, 2002, 277(20):17830-17835. DOI:10.1074/jbc.m200186200.
- [26] KADAM L, KOHAN-GHADR H R, DREWLO S. The balancing act - PPAR- γ 's roles at the maternal-fetal interface[J]. Syst Biol Reprod Med, 2015, 61(2):65-71. DOI:10.3109/19396368.2014.991881.
- [27] NADRA K, ANGHEL S I, JOYE E, et al. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(8): 3266-3281. DOI: 10.1128/MCB.26.8.3266-3281.2006.
- [28] ASAMI-MIYAGISHI R, ISEKI S, USUI M, et al. Expression and function of PPARgamma in rat placental development[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(2): 497-501. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.01.074.
- [29] FOURNIER T, TSATSARIS V, HANDSCHUH K, et al. PPARs and the placenta[J]. Placenta, 2007, 28(2-3): 65-76. DOI:10.1016/j.placenta.2006.04.009.
- [30] PARAST M M, YU H, CIRIC A, et al. PPARgamma regulates trophoblast proliferation and promotes labyrinthine trilineage differentiation[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e8055. DOI:10.1371/journal.pone.0008055.
- [31] 李巍巍, 贾莉婷, 张展. PAI-1在多囊卵巢综合征大鼠脂肪组织中的表达及意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(12): 28-31. DOI: CNKI: SUN: ZYYA. 0.2008-12-012.
- [32] HARA M, ALCOSER S Y, QAADIR A, et al. Insulin resistance is attenuated in women with polycystic ovary syndrome with the Pro(12)Ala polymorphism in the PPARgamma gene[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002,

- 87(2):772-775. DOI:10.1210/jcem.87.2.8255.
- [33] 胡卫红, 陈琳, 同军, 等. PPAR γ mRNA 在卵巢颗粒细胞的表达调节及与多囊卵巢综合征的相关性[J]. 北京大学学报(医学版), 2013, 45(6):859-863. DOI:10.3969/j.issn.1671-167X.2013.06.007.
- [34] 姜慧洁, 张晓静, 张慧, 等. 基于 PPARs 靶标改善胰岛素抵抗的中药活性成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(22): 4355-4358. DOI: 10.4268/cjcm.20152207.
- [35] 赵博文, 陈艳昆, 张栩, 等. 基于 PPAR γ -LXR α -ABCA1 通路的中药降脂成分研究[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(2): 131-139. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2018.02.007.
- [36] 张秀红, 宣姣, 元志刚. PPAR α , γ 和 δ : 胰岛素抵抗治疗的靶点[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(6):543-548. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2014.06.004.
- [37] WARREN J D, BLUMBERGS P C, THOMPSON P D. Rhabdomyolysis: a review[J]. Muscle Nerve, 2002, 25(3):332-347. DOI:10.1002/mus.10053.
- [38] 秦春焕, 曹衡, 李红莉. PPAR β / δ 在兔动脉粥样硬化模型中的表达及作用[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2014, 14(5): 1080-1084. DOI: 10.16563/j.cnki.1671-6272.2014.05.001.
- (收稿日期: 2020-12-07 修回日期: 2021-04-25)

《中华人民共和国生物安全法》: 防控重大新发突发传染病、动植物疫情

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过, 自2021年4月15日起施行。

第三章 防控重大新发突发传染病、动植物疫情

第二十七条 国务院卫生健康、农业农村、林业草原、海关、生态环境主管部门应当建立新发突发传染病、动植物疫情、进出境检疫、生物技术环境安全监测网络, 组织监测站点布局、建设, 完善监测信息报告系统, 开展主动监测和病原检测, 并纳入国家生物安全风险监测预警体系。

第二十八条 疾病预防控制机构、动物疫病预防控制机构、植物病虫害预防控制机构(以下统称专业机构)应当对传染病、动植物疫病和列入监测范围的不明原因疾病开展主动监测, 收集、分析、报告监测信息, 预测新发突发传染病、动植物疫病的发生、流行趋势。国务院有关部门、县级以上地方人民政府及其有关部门应当根据预测和职责权限及时发布预警, 并采取相应的防控措施。

第二十九条 任何单位和个人发现传染病、动植物疫病的, 应当及时向医疗机构、有关专业机构或者部门报告。医疗机构、专业机构及其工作人员发现传染病、动植物疫病或者不明原因的聚集性疾病的, 应当及时报告, 并采取保护性措施。依法应当报告的, 任何单位和个人不得瞒报、谎报、缓报、漏报, 不得授意他人瞒报、谎报、缓报, 不得阻碍他人报告。

第三十条 国家建立重大新发突发传染病、动植物疫情联防联控机制。发生重大新发突发传染病、动植物疫情, 应当依照有关法律法规和应急预案的规定及时采取控制措施; 国务院卫生健康、农业农村、林业草原主管部门应当立即组织疫情会商研判, 将会商研判结论向中央国家安全领导机构和国务院报告, 并通报国家生物安全工作协调机制其他成员单位和国务院其他有关部门。发生重大新发突发传染病、动植物疫情, 地方各级人民政府统一履行本行政区域内疫情防控职责, 加强组织领导, 开展群防群控、医疗救治, 动员和鼓励社会力量依法有序参与疫情防控工作。

第三十一条 国家加强国境、口岸传染病和动植物疫情联合防控能力建设, 建立传染病、动植物疫情防控国际合作网络, 尽早发现、控制重大新发突发传染病、动植物疫情。

第三十二条 国家保护野生动物, 加强动物防疫, 防止动物源性传染病传播。

第三十三条 国家加强对抗生素药物等微生物药物使用和残留的管理, 支持应对微生物耐药的基础研究和科技攻关。县级以上人民政府卫生健康主管部门应当加强对医疗机构合理用药的指导和监督, 采取措施防止抗微生物药物的不合理使用。县级以上人民政府农业农村、林业草原主管部门应当加强对农业生产中合理用药的指导和监督, 采取措施防止抗微生物药物的不合理使用, 降低在农业生产环境中的残留。国务院卫生健康、农业农村、林业草原、生态环境等主管部门和药品监督管理部门应当根据职责分工, 评估抗微生物药物残留对人体健康、环境的危害, 建立抗微生物药物污染物指标评价体系。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)

病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中的作用探讨

罗银珠, 闵凡贵, 王 静, 何丽芳, 潘金春

(广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663)

[摘要] 生物安全管理是实验动物设施管理的重要环节。随着我国生物医药研究快速发展, 动物实验及实验动物设施建设需求不断增大。规范实验动物设施管理, 保障实验动物从业人员安全, 加强实验动物健康监测体系建设, 是目前行业良性发展的必然需要。病原微生物控制是实验室生物安全管理的核心, 是评价实验室良好运行及其规范管理的一个重要指标。动物实验室因涉及动物活体实验或病原微生物感染实验, 其潜在的生物安全风险更大。病原微生物控制是降低职业暴露风险和减少实验室获得性感染的有效途径。笔者总结多年的实验动物设施管理及生物安全控制经验, 从病原微生物防控角度分析实验动物设施管理中的生物安全控制关键环节和注意事项, 为提升实验动物设施管理及生物安全控制水平提供参考。

[关键词] 实验动物; 病原微生物; 设施管理; 获得性感染; 职业暴露; 生物安全

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0443-07

Prevention and Control of Pathogenic Microorganisms for the Management and Biosafety Control in Laboratory Animal Facilities

LUO Yinzhu, Min Fangui, WANG Jing, HE Lifang, PAN Jinchun

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Correspondence to: MIN Fangui, E-mail: minfangui@aliyun.com

[Abstract] Appropriate biosafety management is a critical component of the successful operation of laboratory animal facilities. Standardizing the management of laboratory animal facilities, protecting staff, and strengthening the construction of laboratory animal health monitoring system are inevitable needs for the benign development of the laboratory animal industry. The control of microbial pathogens is a core component of laboratory biosafety management, and it is an important index for the evaluation of laboratory operation and management. The potential biosafety risk of animal laboratories is high owing to the experimentations with live animals, or pathogenic microorganisms. The control of microbial pathogens is an effective measure to reduce the risk of occupational exposure and acquired infections in laboratories. This study discusses microbial pathogen control strategies in laboratory animal facilities for promoting laboratory animal facility management and biosafety control.

[Key words] Laboratory animal; Pathogenic microorganism; Facility management; Acquired infection; Occupational exposure; Biosafety

近年来, 新发传染病和再发传染病在全球不断增加。人兽共患疾病可通过直接接触动物或食

物、水 and 环境, 从动物传播给人类^[1]。实验动物从业人员时刻面临着两个职业健康挑战: 一是生

[基金项目] 广东省基础与应用研究基金项目(2020A1515010757); 广东省科技计划项目(2018B030317001); 广州市科技计划项目(201904010093)

[作者简介] 罗银珠(1983—), 女, 硕士, 高级兽医师, 从事动物设施管理和生物安全控制。E-mail: yinzhu Luo@qq.com

[通信作者] 闵凡贵(1980—), 男, 硕士, 副研究员, 从事动物质量控制和监测工作。E-mail: minfangui@aliyun.com

物性危害,二是生物安全防护。国内外时而报告的动物实验室获得性感染、实验动物病原微生物污染、实验室病毒泄露、携带危险病原样品丢失等事件均给生物安全管理敲响了警钟。把生物安全管理作为实验动物设施管理的核心要素进行贯彻落实,将是我国实验动物行业发展的一个重要环节^[2]。本文围绕实验动物设施相关生物安全管理现状及相关法律、法规和标准、病原微生物污染来源和控制、生物安全管理及体系建设等方面进行分析阐述,旨在为实验动物设施管理及生物安全控制、公共卫生体系建设提供参考。

1 病原微生物防控的公共卫生属性

病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中起到关键作用,具有独特的公共卫生属性。实验动物病原微生物防控的公共卫生属性主要包括4个方面:

一是保障实验从业者安全。动物病原微生物暴露是动物实验从业者的主要职业暴露之一。全球已知的人类传染病有60%来自动物,已发现人兽共患病有200多种^[1]。据报告,每年都有在动物设施中因职业暴露而发生实验室获得性感染的事件。病原微生物控制对从源头上保证动物和人员健康安全起着关键作用。

二是保护实验动物健康。实验动物疫病众多,直接影响实验动物质量。有效保障实验动物质量,降低动物因病死亡率,减少因动物异常导致的实验失败等问题,需要良好的病原微生物防控体系,需要设施管理者或兽医制定和实施病原微生物控制计划。

三是保证科学研究实验结果可靠。影响科研实验结果的三大因素包括实验环境、技术人员技术水平及实验动物质量。2019年底爆发并流行至今的新型冠状病毒肺炎疫情更加凸显了实验动物在动物模型构建、病毒感染机制研究和药物筛选上的重要性。

四是保障环境安全。实验室特别是从事一、二类病原微生物动物感染实验室的污水、废气、样品尸体,以及实验操作过程中产生的固体废物(包括高效过滤器、防护用品)等均是威胁环境安全的潜在生物安全因子。识别这些潜在的环境安全威胁因子,采取相应防控措施,并加强重点管控,是提升实验室应对公共卫生事件能力的重要内容。

2 当前我国实验动物病原微生物防控和生物安全管理现状

实验动物的生物安全管理是对实验动物可能产生的潜在风险,或动物实验过程中可能产生的对人或动物的潜在风险或现实危害的防范和控制。国家一直高度重视实验动物的安全使用和规范利用,相关法律体系基本形成(表1~2)。但个别机构仍然出现实验动物从业人员对生物安全重视度不够、在岗培训流于形式,生物安全管理体系尚不完善或可执行性差、责任不明确、落实不到位,动物实验过程缺乏生物安全监管和指导、动物病原微生物控制水平和知识不足,动物实验室生物安全风险管控缺位等现象,不利于实验动物设施乃至整个行业的良性发展,给生物安全管理带来了一定的风险。

3 实验动物病原微生物危害和风险

已知实验动物病原微生物危害主要包括对人员健康的危害,对动物健康的危害,对科学研究的影响,以及对环境的影响。

国内外报告的实验动物微生物种类包括细菌、病毒和真菌共两百多种^[3]。实验室获得性感染的来源以及可能引起感染的途径链中,吸入具有传染性的气溶胶,通过飞溅、触摸或溢出与黏膜接触,或经皮途径感染即咬伤、割伤、意外的自我接种等都是潜在的感染途径。目前有报告的情况包括:实验人员因为抓取不当,或使用锐器割伤,或动物实验时意外针刺,感染结核分支杆菌^[4];在动物实验中暴露伤口,感染肾综合征出血热^[5];解剖时防护不足,导致淋巴细胞性脉络膜脑膜炎病毒感染^[6];给小鼠接种痘苗病毒后,尝试重新盖好针头时刺穿手套,感染痘苗病毒^[7];因个人防护不当,感染牛痘^[8];使用未经检疫大鼠,或未严格穿戴防护用品,感染流行性出血热^[9];工作后发现防护衣服撕裂,形成埃博拉病毒感染风险^[10];被带有埃博拉病毒的豚鼠血液注射器意外扎伤导致感染,医治无效死亡^[11]。但在大多数的实验室获得性感染案例中,潜在的感染路径仍然没有明确^[12-13],需要研究人员提高风险识别和评估能力,包括对实验动物设施病原微生物污染源(表3),以及对实验动物设施病原微生物污染风险的识别及控制措施(表4),并严

表1 实验动物安全使用和规范利用的相关法规/标准/指南/办法及其侧重点

Table 1 Legislations, regulations, and policies regarding the use of laboratory animals

序号	颁发部门	颁发年份		文件名称	领域/内容侧重点
		首次	现行		
1	国家科学技术委员会	1988	1988	《实验动物管理条例》	实验动物管理
2	国家科学技术委员会、国家技术监督局	1997	1997	《实验动物质量管理办法》	实验动物质量管理
3	国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会	1994	2010	《实验动物环境及设施》	实验动物设施环境技术要求
4	国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会	1994	2011	《实验动物 微生物等级及监测》	实验动物微生物控制
5	国家质量监督检验检疫总局	1994	2001	《实验动物 配合饲料卫生标准》	实验动物饲料卫生控制
6	中国实验动物学会	2017	2017	《实验动物 动物实验生物安全通用要求》	动物实验生物安全
7	国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会	2004	2008	《实验室生物安全通用要求》	生物安全通用要求
8	住房和城乡建设部、国家质量监督检验检疫总局	2004	2011	《生物安全实验室建筑技术规范》	实验室建筑要求
9	国务院	2004	2018	《病原微生物实验室生物安全管理条例》	实验室生物安全管理
10	农业农村部	2005	2005	《高致病性动物病原微生物实验室生物安全管理审批办法》	实验室生物安全管理审批办法
11	国家环境保护总局	2006	2006	《病原微生物实验室生物安全环境管理办法》	实验室生物安全环境管理
12	国家环境保护总局	2006	2006	《病原微生物实验室生物安全环境管理办法》	实验室生物安全环境管理
13	国家卫生健康委员会	2006	2006	《人间传染的高致病性病原微生物实验室和实验活动生物安全审批管理办法》	实验室和实验活动审批管理
14	农业农村部	2008	2008	《农业部关于进一步规范高致病性动物病原微生物实验活动审批工作的通知》	实验活动审批
15	科学技术部	2011	2018	《高等级病原微生物实验室建设审查办法》	实验室建设审查办法
16	农业农村部	2020	2020	《关于加强动物病原微生物实验室生物安全管理的通知》	实验室生物安全管理
17	中华人民共和国主席令(第五十六号)	2020	2020	中华人民共和国生物安全法	国家生物安全法律文件

表2 需在不同等级生物安全动物实验室开展的病原微生物分类和数量

Table 2 Classification and number of pathogenic microorganisms conducted in animal laboratories of different biosafety levels

制定部门	一或二类动物病原微生物种类		三类动物病原微生物种类	四类动物病原微生物种类	依据
	ABSL-4	ABSL-3	ABSL-2	ABSL-1	
国家卫生健康委员会	20	79	277	6	《人间传染的病原微生物名录》 ^a
农业农村部	-	19	104	-	《动物病原微生物实验活动生物安全要求细则》 ^b
总数	20	98	381	6	

注:表中动物病原微生物包括病毒、细菌、放线菌、衣原体、支原体、立克次体、螺旋体、真菌和感染性蛋白质;^a:中华人民共和国卫生部颁发,2006版;^b:《农业部关于进一步规范高致病性动物病原微生物实验活动审批工作的通知》(农医发(2008)027号),2008年颁布。

格执行相关的病原微生物等级要求管理标准。

为减少污染源,近20年来国家及各地陆续制定了不同品种实验动物的病原微生物等级要求标准,明确了所需排除的病原微生物种类(表5),这为识别和降低实验动物设施病原微生物来源和危害提供了重要的依据。

4 实验动物设施病原微生物控制的对策和建议

4.1 加强行业内病原微生物控制意识和能力,优化从业人员的生物安全培训体系

在一项探究实验室获得性感染的数量与污染潜在原因的国际调查中发现,人为错误在实验室获得性感染病例中占有很大比例^[14],提示病原微生物控制意识亟待加强,生物安全培训体系建

设势在必行。

探索适合我国国情的实验动物从业人员专业性培训模式,提高从业人员对病原微生物防控的整体认知水平,可以从以下几个方面着手。一是培训渠道多元化,可结合现代网络化技术,组织开展线上、线下多形式跨地域的在职教育培训。二是培训形式多样化,如理论培训、实践培训、购买服务、专家上门培训、短期集中培训等。三是培训体系系统化,建立一套完善的人员知识水平评估体系,针对不同人群设定不同培训方式,并对培训效果进行评价和总结改善。

为改变以往培训过程中对病原微生物防控及生物安全重要性强调不足的问题,应聘请具有丰富的病原微生物防控及生物安全管理经验的人员,分岗位特点和对象,有侧重点地进行细化

表3 实验动物设施中病原微生物污染源

Table 3 Sources of pathogenic microorganisms in laboratory animal facilities

序号	一次污染	二次污染
1	工作人员不严格遵守穿戴及卫生要求,携带人畜共患病毒进入实验室	由工作人员带出设施
2	新引进或购入的动物存在微生物污染或携带	排出未经完全过滤的实验室废气
3	污染或携带有微生物的实验材料,尤其是生物材料,如细胞培养物、肿瘤组织、生物制品等	实验动物组织、样品
4	未经严格灭菌消毒的垫料、笼具、饲料、水等	污染废弃物、污水
5	被感染的实验动物的污染物,如污染针头、废弃物、垫料、尸体、解剖器械和组织样品等	未经彻底消毒灭菌的垫料、尸体等
6	设备故障导致的病原微生物泄露	造成暴露和实验室泄露

表4 实验动物设施中病原微生物污染风险的识别及控制措施

Table 4 Identification and control measures of pathogenic microorganism contamination in laboratory animal facilities

项目	非感染动物实验设施	感染动物实验设施
防范侧重点	防止病原微生物输入	防止病原微生物输出
污染风险源	动物源、人源、水源、食物源、生物样品来源等	污水、废气、动物尸体等废弃物,感染实验样品传递,实验人员携带出实验室
控制措施	1. 从正规渠道购买质量合格的动物 2. 规范隔离检疫、定期动物健康监测,发现阳性,及时处理 3. 严格控制人流、物流,加强人员培训,严禁带病工作 4. 定期对动物饮用水进行微生物检测 5. 购买来自可靠单位的饲料,并定期检测 6. 生物样品的微生物背景筛查 7. 实验用品尽可能经高压灭菌后再进入动物设施,不能高压灭菌的需用足量紫外线消毒或消毒液浸泡 8. 阻止野生啮齿动物和昆虫媒介进入动物设施 9. 个人防护用品性能完好,并能够正确使用	1. 对病原进行危害性风险评估,实施针对性的灭菌验证 2. 对关键消毒灭菌设备进行性能评价 3. 废水风险控制及评估 4. 加强人员培训体系建设,持续在岗职业培训 5. 严格个人防护PPE,防止动物刮伤、咬伤,以及污染源的皮肤接触或气溶胶传播 6. 感染动物的排泄物、尸体,以及解剖器械和污染垫料、笼具须经彻底消毒灭菌

表5 常用实验动物所需排除的病原微生物数量
Table 5 Number of pathogenic microorganisms should be eliminated in commonly used laboratory animals

分类	普通级动物	清洁级动物	无特定病原体级动物
小鼠 ^a	-	7/7	7/5
大鼠 ^a	-	7/6	7/5
豚鼠 ^a	2/4	6/4	13/5
仓鼠 ^a	2/4	6/4	12/6
兔 ^a	2/3	4/3	10/5
犬 ^a	7/1	-	9/3
猴 ^a	5/0	-	9/2
牛 ^b	3/3	-	20/0
羊 ^c	4/2	-	12/1
小型猪 ^d	6/1	11/1	15/4
鸡 ^e	-	-	18/1
猫 ^f	5/2	-	10/2
雪貂 ^g	4/4	-	-
树鼩 ^h	3/0	-	6/5

注:表格中数据为必须检测项目数量/必要时检查项目数量;^a:参照国家标准《实验动物 微生物学等级及监测》(GB 14922.2—2011);^b:参照黑龙江地方标准《实验动物 牛微生物学等级及监测》(DB23/T 2057.5—2017);^c:参照黑龙江省地方标准《实验动物 羊微生物学等级及监测》(DB23/T 2057.10—2017);^d:参照北京市地方标准《实验用小型猪 第1部分:微生物学等级及监测》(DB11/T 828.1—2011);^e:参照国家标准《SPF鸡 微生物学监测 第1部分:SPF鸡 微生物学监测总则》(GB/T 17999.1—2008);^f:参照黑龙江地方标准《实验动物 猫微生物学等级及监测》(DB23/T 2057.2—2017);^g:参照江苏省地方标准《实验用雪貂 第3部分:遗传、微生物和寄生虫控制》(DB32/T 2731.3—2015);^h:参照云南省地方标准《实验树鼩 第1部分:微生物学等级及监测》(DB53/T 328.1—2010)。

培训。例如,针对辅助人员,主要是强调动物污染粪便的规范收集和处理,以及处理污染物时正确做好个人防护,并注意消毒剂的正确配制和有效期内使用、合理使用灭菌高压锅等;而针对占比最大的技术人员,则应侧重防范动物抓咬、动物唾液尿液喷溅、个人防护、手术刀和针头等锐器的规范使用处理;针对涉及病原微生物感染实验的人员,则更加强调个人防护用品的完整和规范穿戴,注重病原微生物领用、灭活销毁污染动物的操作和处理,以及微生物危害及风险知识储备等^[15]。

4.2 健全动物健康监测体系,改变病原微生物防控被动局面

动物实验室获得性感染事件警示我们,实验动物能成为某种传染性疾病的传染源。因此,建

立执行性好且完善的动物健康监测系统是提高实验动物设施病原微生物防控能力的有效措施。动物引入设施前,必须对动物进行传染病的卫生安全检疫和兽医临床检查,检疫期需强化实验室生物安全防护。对设施内常在动物群体应定期抽检,疑似异常的实验动物应及时送检^[16]。对超过3个月长期实验,实验期间应定期进行人兽共患病监测^[17]。合理选择病原监测方法,特别是对于肿瘤移植类实验、基因工程动物实验,需要设施管理人或兽医给予更多关注。传统的血清学、PCR分析和尸检对脏垫料哨兵动物进行病原微生物监测被越来越多的研究者证明在某些病原监测中存在弊端^[18-19]。随着分子及宏基因组检测技术的发展,越来越多的报告显示,环境样品材料监测,特别是排风口粉尘(exhaust air dust, EAD)检测,与传统的哨兵监测相比更优越^[20]。

近年来,实验动物新疾病不断出现,病原体检测技术不断更新完善。目前国内在成熟、主流的血清抗体监测体系基础上,又建立了多种病原微生物的核酸检测体系^[21]。设施管理者或兽医需根据本设施内流行病情况及监测重点选择不同的检测方法,通过创新病原体监测手段和模型,自检或购买监测服务等,实现从传染病传播角度即传染源、传播途径、易感动物/人群进行控制预防,监测可能存在的潜在危险。不同技术的联合使用可充分发挥各技术的优势以及协同作用,能够提高病原体检测和处理效果,是控制病原微生物的重要技术发展方向。

4.3 更新生物风险评估观念,提升病原微生物污染/感染风险的识别能力

生物风险评估是生物安全管理的核心,主要是对具有传染性物质的风险识别与鉴定,制定降低风险的方案,并执行与再评估,其意义在于确定生物安全防护水平^[22]。实验动物使用过程中的病原微生物风险是一个不容忽视的问题^[23]。新购动物携带病原体背景评估、防范野鼠的病原微生物和遗传污染、实验人员携入病原微生物污染、饲养环境条件异常激发传染病爆发、动物异常表现或突然死亡等均是生物风险评估和识别的重点。

目前阻碍实验动物设施内相关生物安全措施应用的因素包括缺少具体的生物安全保障技术性

文件、生物安全技能及培训不到位、使用不合格的实验室耗材、人员重视程度不够,以及生物风险评估工作减少等,这些均使得实验室危害持续存在,生物安全脆弱性增加^[24]。面向整个机构人员建立风险评估和风险控制观念,成立专门的风控风评小组来进行科学评估,建立一套涵盖对实验室水、电、通风、空调、气流流向、相邻房间压差、核心硬件设备性能、预防气溶胶散逸和污染措施、消毒效果验证过程、突发事件应急预案、应急事件处理方案、污染样品管理规范(保藏、运输、灭活、销毁)、菌毒种及含活毒样品的领用和监管、潜在危害分析与意外事故处理程序,个人防护及微生物操作程序等的科学评估体系^[22]。

4.4 发挥管理委员会作用,加强生物安全监督和职业健康指导

实验动物机构的生物安全监督主要是通过实验动物管理委员会、职业健康及安全委员会和(或)生物安全委员会进行。实验动物管理委员会对拟开展的动物实验方案具有风险评估审核和监督职责。职业健康及安全委员会的工作则是实验动物机构申请国际实验动物管理评估与认证协会(Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care international, AAALAC)认证时的重要审查环节,旨在考核机构在实验动物从业人员健康和安全保障方面的成效。生物安全委员会是动物生物安全实验室备案及中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)进行生物安全实验室认可的重要考量部分,在涉及病原微生物实验及操作方面发挥监督作用。然而,目前国内不少实验动物机构的这些委员会建设尚未完善或停留于表面,未切实发挥监督和监管作用,常因为缺少实际操作、制度不明确、责权不清、人员管理缺位、缺少专业的职业健康管理人才、从业人员对职业危害缺乏认识等,并未发挥委员会应有的作用,使制度落实不到位,给生物安全和职业健康管理带来了巨大隐患^[24]。

实验动物从业人员是发生职业暴露、感染人兽共患病的高危人群。组织生物安全专业人员进行风险评估审查,由具备职业健康管理经验的人

建立职业健康与安全计划,充分发挥管理委员会在动物设施生物安全管理和职业健康指导中的作用,建立和落实实验室生物安全自查制度,完善不符合生物安全要求的工作程序,提高实验室生物安全和职业健康管理能力。

4.5 完善实验动物设施的生物安全管理体系建设

实验动物不可避免会携带微生物,实验人员面临各种潜在的职业健康危害。建立良好的微生物规范(good microbiological practices, GMPs),加大对接触动物的人员的工作规范指导和生物安全管理,可以有效减少职业暴露,最大程度地降低人员受伤或患病风险,保护人员安全,这是病原微生物控制的重要内容^[25]。建立完善的生物安全管理制度性文件,包括生物安全手册、程序文件、实验室生物安全、技术规范和操作规程、生物危害评估制度、实验室感染应急处置预案、生物安全监督机制等,以增强实验动物设施的自查防范能力。

4.6 发挥兽医在病原微生物防控中的作用

兽医因其职业特点和专业技术背景,熟悉流行病学和动物习性及其生物学特性,在实验动物的生产管理、疾病的预防和治疗、动物实验技术的推广与应用、动物福利监管和生物安全保障等工作中都可发挥着不可替代的重要作用^[26]。实验动物机构应充分发挥兽医在动物检疫、动物健康监测、动物疫病应急处理中的主导作用。另外,社会对兽医职业风险的关注程度也需要提高。2010年美国国家公共卫生兽医协会制定了兽医工作者(动物密切接触者)人兽共患病预防纲要,即兽医标准预防措施(veterinary standard precautions, VSP),旨在降低兽医工作者的人兽共患病发生风险。建议我国也尽快制定实验动物兽医的病原微生物防控工作相关指南,提高执业兽医在设施管理和生物安全控制中的话语权,让他们能有足够的平台发挥专业技术优势,应对设施内可能出现的感染风险。

参考文献:

- [1] MCARTHUR D B. Emerging infectious diseases[J]. Nurs Clin N Am, 2019, 54(2):297-311. DOI:10.1016/j.

- cnur.2019.02.006.
- [2] 卢胜明, 赵德明. 中国实验动物产业化发展现状及方向研究[J]. 实验动物科学, 2008, 25(4):33-44.
- [3] 田克恭, 贺争鸣, 刘群. 实验动物疫病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [4] 陆兵, 刘秋焕, 王荣, 等. 结核分枝杆菌实验室获得性感染事件分析[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(5):333-335.
- [5] KAWAMATA J, YAMANOUCI T, DOHMAE K, et al. Control of laboratory acquired hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Japan[J]. Lab Anim Sci, 1987, 37(4):431-436.
- [6] VENTER M, STEYL J, HUMAN S, et al. Transmission of West Nile virus during horse autopsy [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(3): 573-575. DOI: 10.3201/eid1603.091042.
- [7] HSU CH, FARLAND J, WINTERS T, et al. Laboratory-acquired vaccinia virus infection in a recently immunized person—Massachusetts, 2013[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015, 64(16): 435-438.
- [8] LU B, CUI L B, GU M H, et al. Outbreak of vaccinia virus infection from occupational exposure, China, 2017[J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(6): 1192-1195. DOI:10.3201/eid2506.171306.
- [9] 尹萍, 李志军. 实验室人员因动物实验感染流行性出血热九例[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(7): 428-429. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1001-9391. 2007. 07.019.
- [10] Center for Infectious Disease Research and Policy. Canadian lab worker released from Ebola quarantine[A/OL]. News Scan for Nov 29, 2016. <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2016/11/news-scan-nov-29-2016>.
- [11] Ebola, lab accident death-Russia (Siberia): 20040522. 1377[A/OL]2004-05-22<https://promedmail.org/promed-posts/?archiveid=20040522.1377&submit=Search>.
- [12] LIU X Y, XUE K N, RONG R, et al. Fault tree analysis: investigation of epidemic hemorrhagic fever infection acquired in animal laboratories in China[J]. Biomed Environ Sci, 2016, 29(9): 690-695. DOI: 10.3967/bes2016.093.
- [13] PENG H S, BILAL M, IQBAL H. Improved biosafety and biosecurity measures and/or strategies to tackle laboratory-acquired infections and related risks[J]. Int J Environ Res Public Heal, 2018, 15(12): 2697. DOI: 10.3390/ijerph15122697.
- [14] WURTZ N, PAPA A, HUKIC M, et al. Survey of laboratory-acquired infections around the world in biosafety level 3 and 4 laboratories[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(8): 1247-1258. DOI: 10.1007/s10096-016-2657-1.
- [15] 夏菡, 黄弋, 马海霞, 等. 美国高等级生物安全实验室人员培训体系及其启示[J]. 实验室研究与探索, 2019, 38(12):252-255. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-7167. 2019. 12.058.
- [16] 中国实验动物学会. 实验动物 动物实验生物安全通用要求: T/CALAS7—2017[S]. 2017-05-18.
- [17] 王静, 袁文, 闵凡贵, 等. 实验动物病原PCR检测方法系列团体标准的编制[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3):60-66.
- [18] LUCHINS K R, BOWERS C J, MAILHIOT D, et al. Cost comparison of rodent soiled bedding sentinel and exhaust air dust health-monitoring programs[J]. J Am Assoc Lab Animal Sci, 2020, 59(5): 508-511. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-20-000003.
- [19] MAILHIOT D, OSTDIEK AM, LUCHINS KR, et al. Comparing mouse health monitoring between soiled-bedding sentinel and exhaust air dust surveillance programs[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2020, 59(1): 58-66. DOI:10.30802/AALAS-JAALAS-19-000061.
- [20] BUCHHEISTER S, BLEICH A. Health monitoring of laboratory rodent colonies—talking about (R)evolution [J]. Animals, 2021, 11(5): 1410. DOI: 10.3390/ani11051410.
- [21] 刘艳, 王琰. 动物实验活动中病原微生物危害风险评估体系的建立[J]. 实验动物科学, 2015, 32(1):37-40. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2015.01.009.
- [22] 刘芳. 浅谈病原微生物实验室生物安全管理工作中心风险评估的作用[J]. 中国卫生产业, 2017, 14(30):22-23. DOI:10.16659/j.cnki.1672-5654.2017.30.022.
- [23] BAYOT ML, LIMAIE M F. Biosafety guidelines[M/OL]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30725895/>
- [24] 邵奇鸣, 窦木林. 实验动物设施的职业健康管理体系的建立与实施初探[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):1-6.
- [25] VONESCH N, TOMAO P, DI RENZI S, et al. Biosafety in laboratories concerning exposure to biological agents[J]. G Ital Med Lav Ergon, 2006, 28(4):444-456.
- [26] 杜小燕, 王超, 陈振文. 兽医在实验动物工作中的主要作用[J]. 实验动物科学, 2012, 29(6):48-51.
- (收稿日期: 2020-12-24 修回日期: 2021-02-18)

医学院校实验动物及实验室安全培训的实践探索

宋国英, 许 燕, 朱美霖, 张宏伟, 李 沛

(郑州大学基础医学院实验教学中心, 郑州 450001)

[摘要] 医学院校实验动物及实验室安全管理是教学实验室运行的基本保障, 是实验室顺利完成教学任务的重要环节。郑州大学基础医学院实验教学中心针对常用实验动物及实验室的安全现状, 对医学新生进行了实验动物特性及实验室安全知识的培训。采用PPT课件、短视频及翻转课堂方式进行线下培训, 培训内容分别为实验动物的正确使用与安全管理及实验室安全常识。培训后经过问卷星线上考试, 1 061名新生合格率达99.90%。经试卷分析发现, 新生对微生物及危险化学品知识的错误率较高, 分别为20.35%和14.89%, 提示今后要加强这两方面的培训。通过培训, 医学新生掌握了实验动物的正确使用方法, 增加了实验室安全方面的知识, 这为预防实验室安全事故的发生打下坚实基础。

[关键词] 实验动物; 实验室; 安全培训; 医学新生

[中图分类号] R95-33;G482;R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0450-05

Practice and Exploration of Laboratory Animal and Laboratory Safety Training for Medical Freshmen

SONG Guoying, XU Yan, ZHU Meilin, ZHANG Hongwei, LI Pei

(Experimental Teaching Center of Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Correspondence to: LI Pei, E-mail: lipeifreemai@zzu.edu.cn

[Abstract] Laboratory animal and laboratory safety management in medical colleges and universities is the basic guarantee for the safe operation of teaching laboratories and serves as an important link for the successful completion of teaching tasks in laboratories. Aiming at the safety status of common experimental animals and laboratories, the Experimental Teaching Center of Basic Medical College of Zhengzhou University trained medical freshmen on the characteristics of experimental animals and laboratory safety knowledge. PowerPoint courses, short video lectures, and flipped classrooms were used for offline training. The training contents included the correct use of experimental animals, safety management and laboratory safety knowledge. After training, an online examination was conducted, which 1 061 freshmen passed, and the passing rate was 99.90%. According to the analysis of the answers of the freshmen in the examination, the error rates of knowledge on microorganisms and dangerous chemicals were 20.35% and 14.89%, respectively. This suggests that training should be strengthened in these two aspects in the future. Through the training, the new medical students mastered the correct use of experimental animals, and their knowledge of laboratory safety increased. This will help to prevent future laboratory accidents.

[Key words] Laboratory animals; Laboratory; Safety training; Medical freshmen

医学类高校实验室是进行医学实验教学和大
学生科研创新的重要基地, 是培养学生动手能力、

实验技能、创新思维能力的必需场所。而实验动
物是基础医学实验教学所需的重要实验材料, 所

[基金项目] 河南省高等教育教学改革研究与实践重点项目(2019SJGLX038); 郑州大学实验室安全管理专项(2020ZZUSYSLX014)

[作者简介] 宋国英(1965—), 女, 本科, 高级实验师, 主要研究方向为医学遗传学。E-mail: songguoying226@zzu.edu.cn

[通信作者] 李 沛(1972—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为肿瘤分子病理学。E-mail: lipeifreemai@zzu.edu.cn

涉及的专业有临床医学、口腔医学、药学、预防医学、医学检验、医学影像和护理专业等。近年来,随着招生人数逐年增加以及大学生创新实验基地的建设,走入实验室的医学类学生越来越多,实验室的使用频率越来越高,实验动物的使用量也不断增加,同时带来了实验室安全隐患的增加,实验室安全事故时有发生,例如高校诺如病毒感染事件、实验室火灾和危险化学品中毒等。为此,各高校加强了对学生实验室的管理工作,对学生使用实验动物的管理也越来越严格,以提高医学院校实验室安全管理水平^[1]。本文以郑州大学基础医学院(下文简称本校)实验教学中心为例,就实验动物使用和实验室安全隐患问题,以及相关的安全管理措施与培训实践进行探讨,以期为国内医学类学生实验室的安全管理提供参考。

1 实验动物使用的安全隐患

1.1 实验动物实验前逃逸的问题

医学院校的实验室常年担负着医学实验的教学任务,所有医学类学生都需要进入实验室完成实验课程,如细胞生物与医学遗传学、医学病原学与免疫学、药理学、生理学、病理生理学等。其中,实验动物使用的品种及数目相对较多。以本校实验教学中心为例,实验动物的具体使用情况和用量见表1。

由于学生人数较多,一次同时开启多个实验室,实验动物使用较为集中,数量相对较大,因此需要提前领取动物。这使得实验动物短期周转时的安全及饲养成为隐患,经常有动物在课前逃出笼外,发生动物丢失现象,给实验室的生物安全带来隐患。

1.2 实验动物的基本操作问题

实验动物是生命科学研究的主要材料,是培养医学生动手能力的主要对象。医学新生由于对实验动物非常陌生,在上基础医学课程时,有些学生心理上害怕实验动物,在抓取小鼠时常会被小鼠咬伤,对大鼠更是不敢捉拿;而有些学生操作不规范,经常在捉拿家兔时去揪兔耳朵,没有用手托住家兔臀部,导致家兔因疼痛而挣扎,致使学生被家兔抓伤。这些都是医学教学实验中经常发生的基本操作问题。

表1 郑州大学基础医学院实验教学中心的实验动物使用情况

Table 1 Use of experimental animals in the Experimental Teaching Center of Basic Medical College of Zhengzhou University

(只/年)

组别	乳鼠	昆明小鼠	大鼠	家兔	牛蛙
形态组	700	800	-	-	-
机能组	-	5 600	300	1 726	3 700
合计	700	6 400	300	1 726	3 700

注:形态组指医学病原学、组织胚胎学、细胞生物与遗传学实验室;机能组指生理学、药理学和病理生理学实验室。乳鼠指刚出生的大鼠和小鼠。

1.3 实验动物福利问题

动物福利主要包括善待活着的动物,尽量减少对动物的伤害,减轻动物的痛苦,并在实验课后采取安乐的方式处死动物^[2]。受教学时数的影响,医学教学实验一般以验证性实验为主,综合性和设计性实验相对较少,而教学用动物一般在普通实验室里完成,课后使用过的实验动物当天都会处死。在本校基础医学院实验教学中心授课过程中发现有些学生不愿意做动物实验,有些学生还戏弄动物,完成实验课后对实验动物产生的粪便、血液及动物尸体漠不关心;另外,小鼠脱颈椎处死不完全而导致小鼠挣扎时,存在学生对此无动于衷的现象,提示许多学生对实验动物福利知之甚少。这些问题的存在对培养医学生的道德和心理健康极为不利。

2 实验室安全隐患问题

2.1 常见的安全隐患

医学实验室是高校水、电、化学试剂、仪器设备集中使用的地方,教学实验室更是常年运行,常见安全问题见表2。

2.2 环境污染

学生在进入实验室时经常会将具有污染性强且具有致畸变的试剂从实验区带入普通工作区,污染了防护级别较低的普通实验区域,进而对该区域内其他工作人员造成伤害。例如,在分子生物学实验中经常使用EB,而EB有很强的致畸变作用,如果操作不当,会导致实验区域的污染,造成对他人的危害;EB还会在空气中形成气溶胶,对环境也会造成污染^[3];实验后未将含EB

表2 实验室常见安全问题
Table 2 Common laboratory safety problems

种类	常见问题	结果
水	停水后忘关水龙头,管道破裂	跑水,仪器被泡受损
电	线路老化、电插板过多	易引起火灾
仪器设备	仪器老化,功率过大	易引起火灾
化学试剂	管理不规范,使用记录不完整	易引起火灾及中毒事件
医疗垃圾	随意丢弃	引发生物安全问题

的琼脂糖凝胶、污染的手套放在医疗垃圾袋内,而是随意将凝胶丢入普通垃圾袋中,或是继续戴着污染的手套触摸仪器设备及其他物品,造成二次污染。此外,使用后的化学试剂随意倒入下水道,造成水源污染等问题时有发生。

2.3 生物安全

有些学生进入生物实验室不穿工作服,且将饮用水和食物带入实验室。有些女生披长发做实验,而长发接触实验台,污染自身。有些学生使用注射器抽取有污染的样品后,又将针头重新套回针头套中,而不是将针头置于利器盒内收集起来,导致针头刺伤自己手指造成自身伤害。微生物实验课中,有些学生因操作不当,导致微生物外泄,造成上课学生甚至校园内发生微生物感染的问题偶有发生。形态学实验课使用完小鼠后,时常有学生将小鼠尸体投入垃圾桶内,致使小鼠尸体腐败而发出异常恶臭,导致实验室环境污染。机能学实验课使用家兔后,习惯由养殖公司回收实验后家兔尸体,但后续公司对家兔尸体如何处置并不清楚,这可能会给社会食品安全带来隐患。根据2021年4月15日国家颁发的生物安全法相关规定,单位和个人应做好生物安全风险防控和应急处置工作,这对本校生物安全的管理提出了更高的要求。

2.4 废弃物危害

实验室产生的废弃物也是一个重要问题。由于实验废弃物繁多,成分复杂,且其中有动物尸体、有毒的化学试剂、血液、尖锐物品等,如果处理不当,会对教师及卫生工人带来伤害^[4]。常见的事件包括:学生将注射器、手术刀片、破碎的玻璃皿丢入垃圾桶内,导致清洁工人在收集垃圾时不知道里面有尖锐物而划伤手指;实验中使用的有害试剂如二甲苯、镜油、染料随普通垃圾

扔到室外,致使接触人员健康受到危害;实验后大鼠、小鼠及乳鼠尸体和垫料一起倒入室外垃圾箱,其中垫料带有大量动物粪便,可能含有多种病原微生物,如大肠埃希菌、志贺菌、沙门菌等,这些动物尸体及垫料在遭到野猫及野鼠咬食、苍蝇叮咬后,容易造成病原微生物的传播。

3 实验室安全管理措施及培训内容

针对医学生对实验动物及实验室的安全认识问题,本校实验教学中心对入校新生开展了实验动物及实验室安全培训课程,将实验动物正确使用和实验室安全常识培训工作前移,使学生未进入实验室就已了解实验动物的基本特性,掌握实验室安全守则。为此,本中心开展了3个方面的培训实践工作。

3.1 建立实验室准入制度

学生进入实验室前未经过实验室安全培训时,对实验室安全是没有概念的^[5],尤其是对实验动物的特性不了解。学生关心的只是做什么实验,忽视了在实验中需要注意哪些安全问题,遇到紧急突发事件时不知该如何处理,所以对学生进行实验室安全培训是非常重要的工作。通过安全培训考试合格后,学生方能进入实验室开展实验学习活动;考试不合格者,给予第二次培训机会,直到考试合格为止。推行实验室准入制度,将对医学生进入实验室学习起到铺垫的作用^[6]。

3.2 加强实验动物的安全管理工作

实验动物的安全管理对确保学生的人身安全非常重要。为此,本校实验教学中心制定了相应的管理措施,以推进实验室的安全管理工作。首先,在购买实验动物时严格执行合格证制度,杜绝无质量合格证的动物流入校园。同时,加大实验动物管理人员从业资格证的管理,定期组织教师和相关的工作人员进行培训,达到参与动物实

验的人员均有实验动物从业人员培训证,参与短期饲养的工人均有实验动物培训合格证。此外,建设配套的实验动物饲养室,为动物提供合适的清洁饮水和饲料,并且合理分配饲养盒内动物的数量,避免动物之间因饥饿和拥挤而相互撕咬;同时,控制饲养室的温度和湿度,使室内环境舒适。其次,做好短期周转时实验动物的饲养及生物安全保障,扎实贯彻实验动物“3R”原则,以保证动物实验教学结果的可靠性和可重复性^[7]。另外,每个实验室都配有一个急救箱,箱内备有各种急救药品和工具,如纱布、剪刀、镊子、碘伏、云南白药、创可贴等。一旦发生人员及动物被咬伤或抓伤,可紧急处理伤情。急救箱由实验室管理员定期检查补充所需物品。最后,要求学生实验后第一时间将动物尸体放入专用冰柜,杜绝饲养公司回收实验后家兔尸体,防范食品安全问题,并且和相关公司签订协议,无害化处理动物尸体。

3.3 培训医学生有关实验室常规安全意识

有关实验室安全常识方面,首先着重培训学生消防安全相关知识。实验室配有齐全的消防设施,包括灭火毯、灭火器等。设施的使用方法由实验室技术人员在实验室现场传授。逃生通道标识明确,安全通道常年保持畅通状态,紧急情况快速疏散图在一楼有明确标牌。这些安全指示以及紧急疏散楼梯通道的位置均列入安全培训课程中。

近年来由于实验教学快速发展,一个实验内容需要两周时间才能完成相应的教学任务,实验室大量的仪器设备处于高频率的使用和运转状态,急需对新生进行实验设施使用的安全培训。例如:高压蒸汽灭菌器的操作人员需持证上岗,高速离心机在操作时稍有不慎就可能导致人员伤害,射线类设备如荧光显微镜和紫外透视仪等若操作不当均可能对人体有害。因此,本校实验教学中心对学生常用的仪器设备进行了培训,并在仪器旁标注了安全使用注意事项,避免学生因操作失误导致安全事故^[8]。

化学类试剂均有安全标识,但是新生并不理解标识图有什么意义。根据此现象,针对化学品上的标识图制备成PPT图片,培训新生识别化学品危险标识,使学生能够看到标识就知道该化学

品的危害程度。另外,根据化学试剂的不同特性,配备了存储设施,如试剂存储盒,将有挥发性及腐蚀性的化学品装入专用试剂存储盒以防渗漏和挥发,而化学品溢出处理箱用于紧急处理强酸强碱的泄漏,为学生后期从事创新性科研实验时正确存储化学试剂打下了基础。

微生物安全问题是引发社会疫情的重要问题。我国根据实验室处理对象的危害程度和采取的防护措施,采用国际标准,将实验室生物安全防护水平分为四个等级,其中一、二级实验室为基础实验室,三、四级实验室为高等级生物安全实验室^[9]。医学类高校学生实验室一般为基础实验室,学生实验所用菌种传染性通常较低,致病性较弱,且实验结束后即进行高压灭菌处理。但是即便如此,实验室也常年保存多种微生物菌种,若操作管理不当,仍会造成危害。尤其是现在,新型冠状病毒在全球流行后,我国卫生管理部门更加注重实验室的安全管理。为了防范病原微生物外泄事件的发生,本校实验教学中心建设了专业菌种库,并实行双人保管制度,切实做到从源头管好菌种;并且在实验中严格按规范操作,实验后及时处理病原菌,把安全工作做扎实。同时,将整个管理和操作流程培训到每个新生,使学生在开始实验课前就已经了解了生物安全性问题,从而防范了实验生物安全问题导致的校园安全问题。

此外,对教学实验室产生的垃圾进行分类处理^[10]。医疗垃圾必须装黄色垃圾袋;所有的玻璃制品必须放入事先准备好的容器中,贴好标签注明重量,放置在指定的地方,由实验室管理科定期清理。这些知识点均列入新生实验室安全培训课程中。

4 实验动物及实验室安全常识培训的方式与成效

实验动物安全使用培训,采用制作PPT课件结合网络短视频等的形式进行授课。例如:本中心收集制作了家兔及大鼠小鼠捉拿、大鼠小鼠颈椎脱臼处死、家兔耳静脉采血、大鼠尾静脉注射等一系列短视频播放给学生看,使学生在实验学习前对实验动物有了初步的认识。实验室安全常

识培训,采用案例式教学和翻转课堂方式进行授课。例如:让学生在手机上搜索火灾事故,并让学生讲解火灾原因,实现翻转式教学效果。这些教学方法使学生直观地看到了实验动物的基本特性,掌握使用实验动物的正确方法,增加学生对实验动物的爱护意识;同时增强学生对安全培训的兴趣,提高学生防范安全事故和自我保护的能力^[11]。

为达到教学目的,课后采用问卷星的形式进行在线考试。2020年共培训新生1 061名,在线考试合格率达99.90%(仅1人未合格,后经辅导亦达到合格),具体情况见表3。经试卷分析发现,新生对微生物及危险化学品知识的错误率较高,分别为20.35%和14.89%,提示今后要加强这两方面的培训,以达到更好的培训效果。

表3 2020级新生实验动物及实验室安全培训考试情况
Table 3 Experimental animals and laboratory safety training examination of the 2020 batch of freshmen

分值	人数	占百分比/%	合格率/%
90分以上	841	79.27	
81~90分	158	14.89	
71~80分	54	5.09	
61~70分	7	0.66	
60分以下	1	0.09	
合计	1 061		99.90

5 结束语

实验动物及实验室安全培训是一件任重而道远的工作,随着医学院校教学质量的不断提高,实验室建设的不断更新,进入实验室的人员不断增加,新的实验教学项目陆续开设,实验室安全问题和风险点也在不断出现。未来的实验室安全发展仍然面临着很多问题,作为实验室的管理者应对实验室安全问题有足够的认识^[12],时刻将实验室安全问题作为工作中的重要部分而加以管理,并加强实验室教师的培训,调动实验室工作人员的责任感,提升实验室工作人员的整体素质^[13]。另外,实验动物和实验室安全培训工作是

一个动态的过程,需要在实施过程中不断总结、更新和完善培训内容,以提高培训效果,做到实验动物管理可靠,实验室安全制度执行规范化和常态化,为实验教学的顺利开展提供可靠保障。

参考文献:

- [1] 孙书洪,李华,元树艳,等."双一流"建设背景下高校生物实验室安全管理现状与对策[J]. 实验室研究与探索, 2018, 37(11):298-302.
- [2] 冶冬阳,孙静,李日飞,等. 实验动物福利实施研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(2): 166-170. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.02.016.
- [3] 支琴,郭金超. 分子生物学实验室安全管理浅谈[J]. 实验室研究与探索, 2017, 36(4):280-283.
- [4] 刘霞. 我校机能学实验室废弃物处理现状及改进建议[J]. 卫生职业教育, 2017, 35(10):70-71.
- [5] 李运书,徐健,姜霞,等. 医学生对实验室生物安全认知情况调查[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(1):73-77. DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2017.01.017.
- [6] 袁哲,李鹏,徐飞. 高校实验室安全准入模式的探索[J]. 高教研究与实践, 2016, 35(2):71-75.
- [7] 孙玉芳,单立冬,戈志强. 基于3R原则的医学生理学实验教学整合与优化[J]. 基础医学教育, 2019, 21(2): 140-142. DOI:10.13754/j.issn2095-1450.2019.02.17.
- [8] 陈一星,吴兵,董君枫,等. 高等医学院校实验室安全管理信息系统的设计与实践[J]. 中国医学装备, 2016, 13(4):54-57.
- [9] 张永斌,郭学军. 高校实验动物与生物安全[J]. 畜牧与饲料科学, 2016, 37(2):91-93. DOI:10.16003/j.cnki.issn1672-5190.2016.02.034.
- [10] 陈春英,朱怀红. 某医学院教师对医疗废物处理认知现状分析与对策[J]. 环境卫生学杂志, 2017, 7(1):28-31. DOI:10.13421/j.cnki.hjwsxzz.2017.01.007.
- [11] 彭垠婷,蒋海洋,郑幼镭,等. 高校实验室安全培训考试系统的探索与实践[J]. 中医教育, 2018, 37(2):48-50.
- [12] 程悦,吕佳,答嵘,等. 叙事医学视角下学科交叉融合的医学类实验室安全管理特征探析[J]. 医学教育研究与实践, 2019, 27(4): 567-569, 600. DOI: 10.13555/j.cnki.c.m.e.2019.04.008.
- [13] 马雪娇,卢耀勤,刘涛. 实验室生物安全管理研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2018, 19(3):238-241. DOI: 10.16506/j.1009-6639.2018.03.012.

(收稿日期: 2021-01-05 修回日期: 2021-03-17)

医学实验教学动物尸体二维码信息管理系统建立的设想

金 悠¹, 王晨晨¹, 余上斌¹, 罗隽宇², 周顺长³

(1. 华中科技大学基础医学国家级实验教学示范中心, 武汉 430030; 2. 武汉脉博信息技术有限公司, 武汉 430030; 3. 华中科技大学同济医学院实验动物中心, 武汉 430030)

[摘要] 实验动物是医科院校开展实验教学工作的重要载体。本文系统阐述了建立实验动物尸体二维码信息管理系统的必要性, 针对实验教学动物使用的特点, 设计了一种依托微信小程序的实验动物尸体二维码信息管理系统。通过参与人员的无缝对接, 对实验教学动物的尸体从产出、收集、转运、冻存及处理等过程实施动态监管, 以期切实推动实验教学管理工作的规范化, 杜绝实验动物尸体乱抛现象的发生, 维护校园生物安全。

[关键词] 医学实验教学; 动物尸体; 二维码; 动态信息化管理; 生物安全

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0455-04

Design of Two-dimensional Code Information Management System for Animal Corpses in Medical Experimental Teaching

JIN You¹, WANG Chenchen¹, YU Shangbin¹, LUO Junyu², ZHOU Shunchang³

(1. National Demonstration Center for Experimental Basic Medical Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Wuhan Maibo Information Technology Limited Company, Wuhan 430030, China; 3. Laboratory Animal Center, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Correspondence to: ZHOU Shunchang, E-mail:893398891@qq.com

[Abstract] Experimental animals serve as an important tools for experimental teaching in medical colleges. This study systematically expounds the necessity of establishing a two-dimensional code information management system for the disposal of experimental animal corpses. According to the characteristics of experimental teaching animals, a two-dimensional code information management system for experimental animal corpses based on WeChat applet was designed. Through the seamless connection of participants, the dynamic real-time supervision of the production, collection, transportation, freezing, and treatment of corpses of experimental teaching animals was implemented. In order to effectively promote the standardization of experimental teaching, eliminate the phenomenon of random disposal of experimental animal corpses, and maintain the biological safety of the campus.

[Key words] Medical experimental teaching; Animal corpse; Two-dimensional code; Dynamic information management; Biosecurity

实验动物是医科院校实验教学工作必不可少的工具。医科院校一般建有动物尸体中转站或处理中心, 然而由于学校对动物尸体回收监管力度

不够, 以及部分学生环保意识淡薄、安全观念不强, 随意丢弃动物尸体^[1-3], 从而导致实验动物中心发放的教学用动物不能全部回收^[1]。因此,

[作者简介] 金 悠(1972—), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 药理学。E-mail:jinyou81@163.com

[通信作者] 周顺长(1968—), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 动物学。E-mail:893398891@qq.com

只有加强对实验动物尸体的规范化管理^[4],才能更有效地防止疫病传播,维护社会公共卫生安全^[5]。随着网络技术的发展,动物信息管理系统日益健全,但目前该系统功能主要侧重于繁殖^[6]、科研^[7]和疫病监测^[8]等,并不适用于教学实验动物尸体的管理。

本文在探讨相关管理法规的基础上,提出对教学实验动物尸体实行二维码网络信息管理,以便杜绝教学实验动物尸体乱抛现象,同时提高教学管理工作规范化程度。

1 建立教学实验动物尸体二维码信息管理系统的必要性

我国实验动物管理法规起步较晚。1988年国家科委签发了我国第一部实验动物管理行政法规《实验动物管理条例》,该条例中对实验动物的饲养环境和质量保证等制定了严格的执行标准,是实验动物研究、保种、饲养、管理和监督的执法依据^[9]。2003年由国务院卫生行政主管部门和环境保护行政主管部门共同颁布的《医疗废物管理条例》把医学实验动物尸体归属于病理性废物,并禁止在运送过程中丢弃。2017年农业部发布了《病死及病害动物无害化处理技术规范》,该规范没有明确提及实验动物尸体,但在“适用范围”中提到了“其他应当进行无害化处理的动物及动物产品”,并对病死及病害动物尸体的收集转运、无害化处理等方法制定了详细的管理细则。

根据以上条例、法规及省市级相关规定,目前国内各高校均拟定了实验动物尸体的转运及无害化处理管理办法,如西北农林科技大学在实验课结束后将实验动物尸体分类收集在专用容器中,密封后交至该校实验动物中心处理^[10]。然而由于动物尸体运输过程存在监管漏洞,多所高校依然存在实验动物尸体被随意丢弃的现象^[1-3]。

目前,二维码技术因便捷、安全、准确等优势被应用于诸多领域。笔者设想通过建立动物尸体运输过程的二维码信息管理系统,加强教学实验室(产出环节)与动物尸体处理中心(处理环节)之间的联系,不仅可以防止乱丢动物尸体,而且可以记录动物使用的具体信息,规避纸质文档不宜保存的风险。

2 教学实验动物尸体二维码信息管理系统的设计

2.1 二维码信息管理系统的设计内容

二维码信息管理系统是一种手机微信小程序,由管理实验室的技术人员、任课老师、学生、教学中心安全员和专业动物尸体处理人员一起配合实施,具体设计示意图1。它具有以下功能。(1)信息齐全:技术人员录入的动物相关信息可包括动物品系、性别、周龄、数量、日期及质量合格证编号,同时录入实验课程的相关信息,包括课程名称、任课老师姓名及联系方式、学生班级、动物使用时间、是否是感染性实验等。(2)数量自查:实验课结束后学生收集动物尸体并录入系统,若学生录入的数量有误,会显示不停闪烁的红标。(3)系统检查:若学生没有在规定时间内把实验动物尸体送到处理中心,或上传的二维码与该次实验课动物二维码不一致,则教学中心安全员立即收到连续三次警告提示,督促尽快联系学生解决。(4)历史列表:系统自动统计相关信息,生成动物使用情况的相关报表。(5)二维码是动物健康码的补充:国内有研究者曾提出对实验动物实行健康码管理,让每一只动物都拥有一个健康码^[11];而动物尸体二维码信息系统是针对某实验室某次实验课所用的一批动物进行管理,目的是防止动物尸体随意丢弃。因此,动物尸体二维码信息系统是对动物从使用到处理环节的监管,是动物健康码的补充。

2.2 二维码信息管理系统的特点

二维码系统具有以下特点。(1)微信扫描:所有使用者均可在微信上直接扫码进入小程序,录入信息或者审核,无需下载安装。(2)两条路径:所有使用者均可通过线下扫描二维码或线上点击短信链接进入小程序,使用便捷。(3)及时提醒:每一步完成后,下一位参与者将在1 min内收到短信提醒。而当送达过程出现意外时,安全员马上会收到连续三次警告提示,真正做到全程环环相扣。(4)使用权限分类:技术人员、任课老师等教职工均可看见该批实验动物的所有信息,但学生只可看见自己填写的信息,从而有效防止遗漏动物尸体。(5)有据可查:在小程序

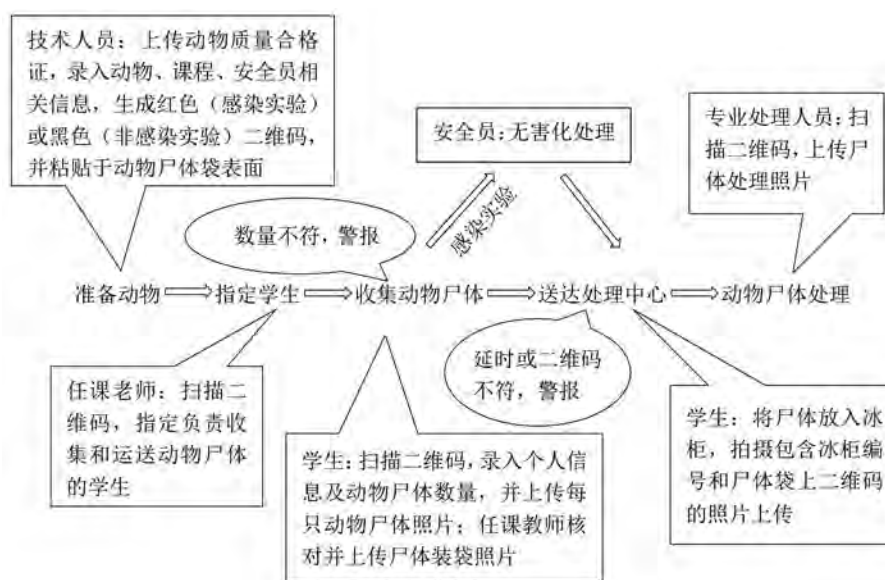


图1 教学实验动物二维码信息管理系统

Figure 1 Two-dimensional code information management system for the corpses of experimental teaching animals

中,从信息录入、动物尸体收集到处理,每一步都有照片为证,可实现全程动态监管。

与文献[11]报告的实验动物健康码(简称健康码)相比,教学实验动物尸体二维码信息管理系统(简称二维码)也是一种微信小程序,二者均可通过线下扫描使用,但是它们之间也有一定区别。(1)单位不同:健康码是以动物为单位,每只动物均有一个健康码;而二维码则以教学实验室为单位,由于该实验室某次实验课所有学生学习同一个实验,故可以一起收集动物尸体集中处理。(2)提醒内容不同:健康码是在动物运输时间过长或没有进入有使用许可证的设施时变为黄色或红色。而二维码的提醒有两种:一种是事务提醒,除技术人员外,每一位参与者都会收到短信提醒,以便及时做好动物尸体处理各环节的衔接;另一种是警告提醒,如学生录入的动物尸体数量有误时不停闪烁红标。(3)作用不同:健康码可以提高实验动物生产、运输、使用过程中的管理效率,而二维码能够确保动物尸体都送达处理中心。

3 教学实验动物尸体二维码信息管理系统的运行

可以通过实施业绩考核制度,推动教学实验

动物尸体二维码信息管理系统的有效施行。技术人员、老师、学生、安全员及处理人员分别负责动物尸体处理的各个环节,严格落实动物尸体收集、运送和处理的管理和监督职责,实行各环节责任人负责制度。对学生,将实验动物尸体的收集、运送工作纳入实验课平时成绩考核内容;对职工,将实验动物尸体清点、核对、处理工作纳入年度考核范围,从根本上保障教学实验动物尸体处理的规范化。

运行教学实验动物尸体二维码管理系统具有实时性、可监控性及专人专责性,可有效避免动物尸体被随意丢弃,确保社会公共卫生安全。应用该系统可以实现以下目标:(1)防止疾病传播。动物尸体极易被野猫、野鼠啃食^[12],且蚊虫叮咬残尸后易引发虫媒传染病,如流行性出血热^[13]。该系统建立后可全程监控动物尸体的运送及处理,杜绝动物尸体被随意丢弃,避免生物安全危害事件发生。(2)防止实验动物尸体流入市场,保障食品安全。大动物尸体被随意丢弃后,容易被不良商贩加工成为食品,进入人们的日常生活。该系统的建立可以有效避免此类事件的发生。(3)遵循动物伦理,保障实验动物福利。遵循实验动物伦理和福利是进行实验教学的前提^[14]。本系统的建立可确保实验动物尸体被

妥善处理保障了实验动物福利。

在新型冠状病毒肺炎疫情中,实验动物涉及的生物安全问题已成为公众关注的焦点之一。教学实验动物尸体二维码信息管理系统利用互联网、二维码、移动终端等技术,通过参与人员的无缝对接,可实现教学实验动物信息的动态实时监管,确保实验动物尸体从产出、收集、转运、冻存及处理过程无管理漏洞,杜绝乱抛实验动物尸体,阻断虫媒流行病的源头,保障公共卫生安全。但是二维码信息管理系统对于教学实验动物管理而言,目前尚是一个比较新的事物,国内尚未见报道。本系统由基础医学国家级实验教学示范中心(华中科技大学)与武汉脉博信息技术有限公司联合设计,目前尚在研发和测试过程中,后续运营效果尚待观察。预计通过该系统可以轻松完成从购进实验动物到收集齐动物尸体的全过程监管,但在使用初期可能存在以下难点:(1)本系统参与人员较多,增加了管理难度,需要安全员实时核查,督促动物尸体的及时运送;(2)纸质二维码在冰柜中容易折叠损坏,导致处理人员扫描困难,因此后期可以改用硬质吊牌贴二维码;(3)夜间实验课后感染性实验动物尸体的处理比较棘手(夜间下课时间最晚是21点),建议此时实验动物尸体经无害化处理后先暂时冻存,第二天再送至处理中心。

4 总结和展望

医学实验教学过程中,运用二维码信息管理系统可以对实验动物尸体的产出、收集、转运、冻存及处理等过程实施动态监管,从而切实推动实验教学管理工作的规范化,杜绝实验动物尸体乱抛现象发生,维护校园生物安全。本文阐述了教学实验动物尸体二维码管理系统的设计构想和预期效果,但具体的实施操作情况还有待后期探讨,并且针对实际运行过程中遇到的困难,不断加以改进和调整。相信在不远的未来,随着二维码信息管理系统的不断升级,医学实验动物教学过程中很多问题都会逐步解决,医学院校教学实验动物的管理水平也会不断得到提升。

参考文献:

- [1] 李莉,赵善民,崔淑芳.高等院校实验动物管理中面临的问题及对策[J].实验动物与比较医学,2018,38(1):65-68. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2018.01.014.
- [2] 赖红,曹永实,陈菊辉.药理学本科实验教学中实验动物管理规范化的现状分析[J].华西药学杂志,2019,34(5):545-548. DOI:10.13375/j.cnki.wcjps.2019.05.022.
- [3] 杨永倩,王伟华.实验动物尸体无害化处理的现状与管理[J].黑龙江畜牧兽医,2019(4):37-39. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2018.06.0010.
- [4] 金树兴,王纯耀.促进动物实验规范化管理的探索与尝试[J].实验动物与比较医学,2007,27(4):264-266. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2007.04.017.
- [5] 江涛,郭姣,张锦红,等.浅谈我院实验动物尸体、废弃物无害化处理的经验[J].实验动物科学,2009,26(1):65-66,69. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2009.01.020.
- [6] 胡永艳,陶迎红,孔申申.一种基于互联网的实验动物管理系统介绍[J].实验动物与比较医学,2020,40(3):257-261. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2020.03.015.
- [7] 李松涛,李大鹏,李松琳.高等医学院校学生动物实验信息管理系统的设计研究[J].实验动物科学,2018,35(3):82-85. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2018.03.016.
- [8] 李琛,林汉亮,林福滨,等.新疆动物卫生监督实验室信息管理系统的建立与应用[J].中国动物检疫,2016,33(10):66-69. DOI:10.3969/j.issn.1005-944X.2016.10.018.
- [9] 谈永萍.高校实验动物的管理与生物安全的优化措施[J].大学教育,2018(9):4-6.
- [10] 李蓉,乔海莲,蒿彩菊.动物医学实验室废弃物的安全管理[J].家畜生态学报,2013,34(2):88-89,93.
- [11] 姜鲲,汤逸雯,刘延滨,等.实验动物健康码管理的架构设计[J].实验动物与比较医学,2021,41(1):66-69. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2020.075.
- [12] 贺春萌,郑宇峰,汪冠群.病死动物尸体及其产品的危害及无害化处理现状与对策[J].畜牧兽医科技信息,2014(3):31-32. DOI:10.3969/j.issn.1671-6027.2014.03.017.
- [13] 杨怀伟.动物尸体的危害及管理对策[J].中国兽医杂志,2004,40(8):44-46.
- [14] 金成文,陆洪英,王建英,等.动物实验教学中贯彻动物福利理念措施分析[J].实验动物与比较医学,2018,38(4):307-309. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2018.04.013.

(收稿日期:2020-12-15 修回日期:2021-07-28)

高校实验动物集中采购系统的建设与应用实践： 以首都医科大学为例

刘晓楠, 张伟, 孟霞, 卢静

(首都医科大学实验动物部, 北京 100069)

[摘要] 高校实验动物集中采购体系网络信息化平台的建立使实验动物中心的库存供应、结算管理等变得更系统、便捷、科学。通过首都医科大学实验动物部的实际运用, 结果显示, 建立明确清晰的集中采购管理模块可以大大节约人工和时间, 提高了采购供应人员的工作效率和规范度, 提示高校实验动物集中采购体系网络信息化是十分必要的。

[关键词] 实验动物; 集中采购; 出入库管理; 结算管理

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0459-07

Design and Application of an Online Centralized Procurement System for Laboratory Animals in Universities: Capital Medical University as an Example

LIU Xiaonan, ZHANG Wei, MENG Xia, LU Jing

(Department of Laboratory Animals, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Correspondence to: LU Jing, E-mail: lujing@ccmu.edu.cn

[Abstract] The establishment of a network information platform for a centralized procurement system for laboratory animals in colleges and universities has made the inventory supply and settlement management of laboratory animals centers more systematic, convenient, and scientific. The application of this system in the Laboratory Animals Department of Capital Medical University was examined, and the results showed that the establishment of a clear centralized procurement management module could greatly save labor and time, improve the work efficiency, and standardize procurement and supply personnel. The findings strongly suggested that the network informatization of the centralized procurement system of laboratory animals in colleges and universities is necessary.

[Key words] Laboratory animals; Centralized purchasing; Warehousing management; Settlement management

随着高校建设规模的不断扩大和科研水平的迅猛发展, 高校对实验动物的采购品种、数量的需求越来越大, 同时对动物资源供应管理要求也逐渐增高。随着网络信息技术的不断革新与普及, 实验动物中心信息化建设已成为提升管理水平的必由之路^[1]。

作者曾对实验动物集中采购管理的优势进行

过阐述^[2]。在实验动物集中采购管理体制下, 高校实验动物信息化^[3]建设中实验动物的订购、出入库、收费、结算、统计应建立明确清晰的管理模块。本文介绍作者所在单位即首都医科大学(下文简称本校)的实验动物集中采购体系在运行管理过程中积累的相关经验, 以为国内实验动物智能化管理系统的进一步完善提供参考。

[作者简介] 刘晓楠(1988—), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事实验动物资源供应工作。E-mail: xiaonan@ccmu.edu.cn

[通信作者] 卢静(1969—), 女, 教授, 主要从事实验动物模型研究与实验动物管理工作。E-mail: lujing@ccmu.edu.cn

1 实验动物网络信息化平台管理

实验室信息管理系统的雏形最早出现于1960年代末,1973年后作为一门新兴学科在国际上开始了研究和应用^[4-5]。现阶段,国内外的实验动物网络信息化平台已经有很多相对成熟的系统,这些系统使实验动物中心可实现一体化的管理,包括考核、伦理、协议、饲养、采购供应、结算等。许多文章对此类实验动物网络信息化平台建设的阐述很详细,但基本都是全局介绍整个实验动物网络平台体系的功能和结构,而对于详细的模块细节和流程的分享相对较少,基本没有涉及到实验动物集中采购管理模块的深入探究。下面

重点介绍本校实验动物网络信息化平台的一些细节情况。

1.1 实验动物网络信息化平台系统

本校的实验动物信息化平台结合需求分析的具体情况,通过信息网络化系统将信息化建设与实验动物订购管理工作有机结合,全面构建高校实验动物信息化管理平台。系统的设计采用B/S模式,其主要特点是方便易用,零客户端维护,基于Web2.0框架和三层结构开发,具有良好的开放性和扩展性,基于大型数据库开发,通用性强,网络共享能力强且信息交流快捷。其网络拓扑图见图1。

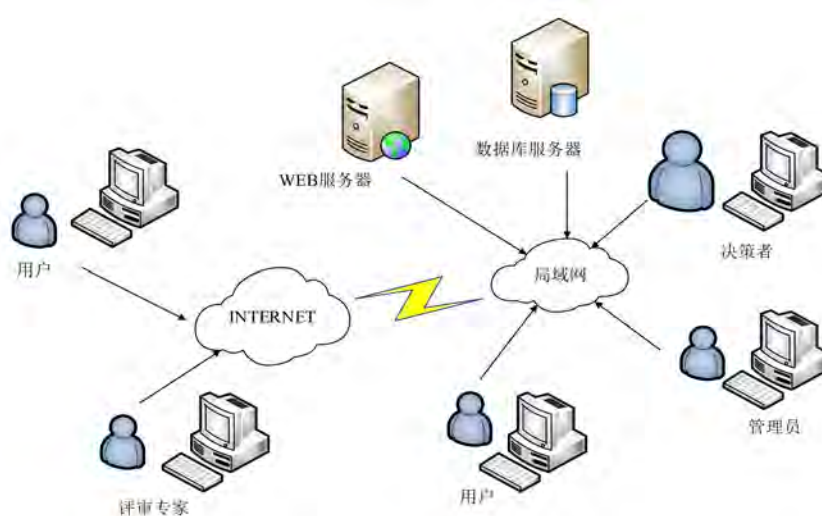


图1首都医科大学的实验动物信息化平台的网络拓扑图

Figure 1 Network topology of the laboratory animal information platform of Capital Medical University

首都医科大学的实验动物信息化建设侧重于实用,故选择了相对成熟稳定的配置。开发平台为Microsoft.NET平台,采用C#开发语言、SQL结构化查询语言,数据库为Microsoft SQL Server 2008。C#语言安全稳定,语法简洁,操作能力强大,是.NET开发的首选语言。SQL结构化查询语言是一种特殊目的的编程语言,即一种数据库查询和程序设计语言,用于存取数据以及查询、更新和管理关系数据库系统,它具有极大灵活性和强大功能;Microsoft SQL Server 2008是一个全面的数据库平台,具有使用方便、可伸缩性好,以及与其他软件集成程度高等优点。

1.2 实验动物网络信息化平台流程

2018年9月颁布的《实验动物福利伦理审查

指南》(GB/T35892—2018)对动物实验伦理审查机构、原则、内容、程序、规则等均做出了明确的要求^[6]。根据该文件,本校优化了实验动物伦理审查表,完善了网上申报、审批机制,实验动物的实际使用规格、数量必须与《实验动物福利伦理申请》一致,才能够真正落实实验动物的福利伦理。这就对实验动物的采购提出了更高要求,在申请动物订购前需要先完成《实验动物福利伦理申请》的申报与审批。因此,在实验动物集中采购网络系统建设时,应首先与实验动物福利伦理进行关联,再根据用户需求,集中采购实验动物并分发到相应的地点。具体流程见实验动物信息化平台系统的流程图(图2)。

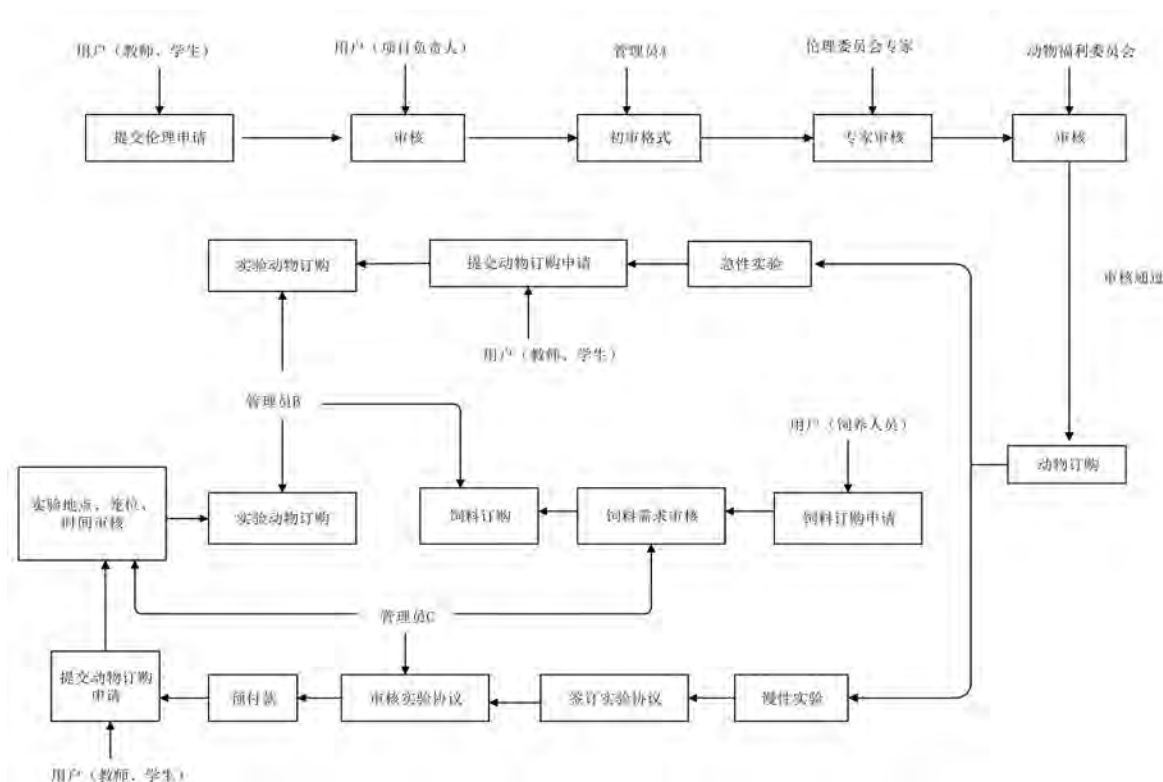


Figure 2 Flow diagram of the laboratory animal information platform system of Capital Medical University

2 实验动物集中采购信息化平台管理

实验动物及饲料的采购供应是实验动物中心的重要功能之一，实验动物供应管理水平直接关系到整个实验动物中心的后续运转。本校实验动物集中采购的管理模块分为订购管理、出入库管理、结算管理共3个模块。订购模块是指实验动物的采购和饲料的采购；出入库模块包含了动物入库、动物出库、饲料入库、饲料出库；结算模块包含了收费管理和计算管理。这几大模块涵盖了实验动物中心集中采购管理的几个核心工作，其详细功能模块见图3。

2.1 订购模块

订购管理模块是整个集中采购流程的核心，根据动物和饲料订购需要分为：动物订购审核、动物订购确认、动物订购数据回写、饲料订购审核、饲料订购确认、饲料订购数据回写。根据用户（实验人员、饲养人员）的订单，动物供应人员进行集中采购，实验人员及饲养人员需提前3个工作日提交订单。动物供应人员根据订单记

录,提取相关信息,汇总成详细的订购单,然后分别发给供应商进行采购。由于实验动物的特殊性,采购产品到货后还应进行订购数据的回写。订购模块流程见图4。

实验动物订购单信息应设置：学院名称，PI 团队负责人，项目名称，经费卡号，经费来源，申请时间，动物品种、品系、微生物级别、年龄或体质量、数量，使用日期，使用人，经办人及联系电话，项目负责人及联系电话、上岗证号，实验动物送达地点、备注等。饲料订购单信息应设置：饲料名称，订购单位，数量，送货时间，送货地址，订购人，备注等。汇总实验动物及饲料信息，导出汇总表，发送给供应商。汇总效果见图5。

2.2 出入库模块

实验动物、饲料集中采购过程中,完善的库存信息是实验动物采购工作科学管理的重要内容之一,而出入库模块是网络信息化系统建设的重要内容。实验动物、饲料的库存管理主要分为动物入库、动物出库、饲料入库、饲料出库共4个

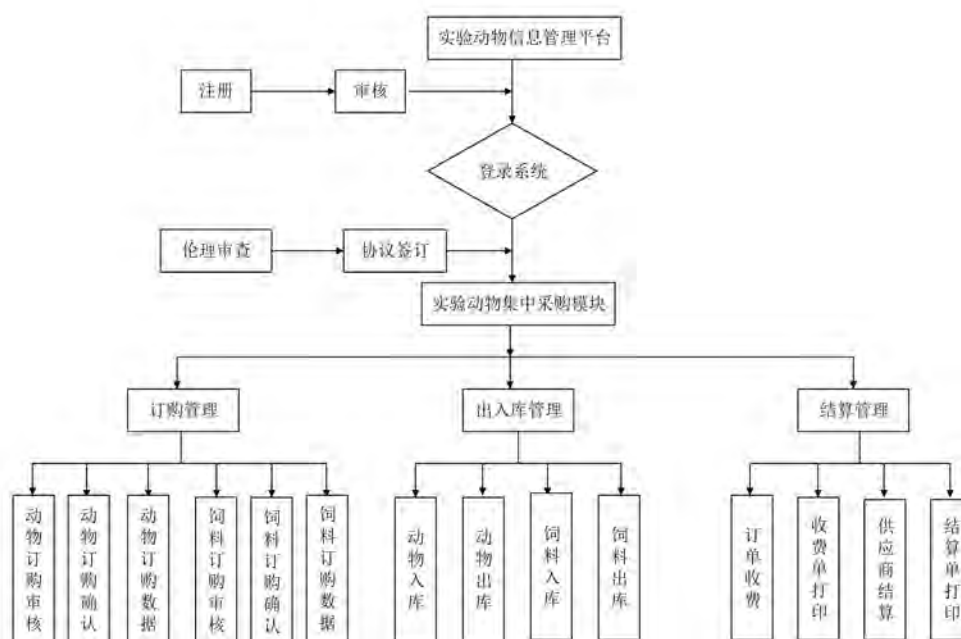


图3首都医科大学实验动物集中采购信息化平台的功能模块图

Figure 3 Functional module diagram of the centralized procurement information platform for laboratory animals of Capital Medical University

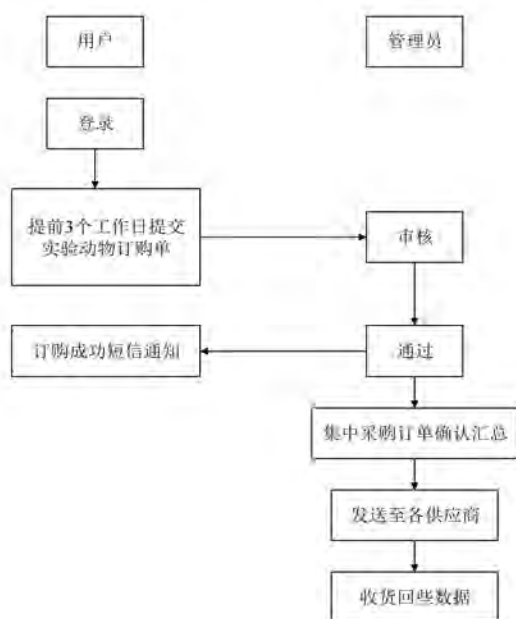


图4首都医科大学实验动物集中采购信息化平台的订购模块流程图

Figure 4 Flow diagram of ordering module of the centralized procurement information platform for laboratory animal of Capital Medical University

模块。采购供应人员根据需求采购实验动物、饲料，收货后进行入库工作，再根据不同的实验类型进行动物、饲料的出库，生成出库单，并交予对应的出库人核对、发放、签字。出入库模块流程见图6A。

入库项目信息应设置供应商、入库时间、入库人，以及入库商品的名称、单位、数量、单价、总价等。出库单项目信息应设置供应商、订购单位及联系电话、订购商品（包括规格、数量、单价、总价），以及实验地点、使用时间、出库人和领用人等。

2.3 订购结算模块

实验动物订购结算的工作量非常大。建立完备的结算模块能够快捷有效地提取数据，进行统计总结。订购结算模块分为收费管理和结算管理。

收费管理是指采购人员需根据实验动物订购单来按季度、学期向订购动物的项目负责人、教学教研室收取动物、特殊饲料等的相关费用。采购供应人员通过选择收费的时间段和项目负责人



首都医科大学
Capital Medical University

实验动物管理信息平台

首页

伦理查询

订购审核

短信平台

出入库

下载中心

账户信息

退出系统

动物订购申请查询

记录总数: 1232 条

查看	伦理号	订单号	供应单位	价格	使用日期	动物品种	动物品系	动物级别	规格	数量
【查看】	AEEI-2019-142		维通利华	420	2021/10/8	小鼠	C57 BL/6	SPF	2月龄 20-25g 雄	10
【查看】	AEEI-2020-142		维通利华	420	2021/10/8	小鼠	C57BL/6NCrl	SPF	8周 23g 雄	10
【查看】	AEEI-2019-046		维通利华	540	2021/10/8	小鼠	C57BL/6J	SPF	新生鼠 雌雄不限	15
【查看】	AEEI-2019-014		维通利华	1260	2021/10/8	小鼠	C57BL/6	SPF	成年 雌雄不限	35
【查看】	AEEI-2021-202		维通利华	216	2021/9/28	小鼠	ICR	SPF	20±2 g 雄	12
【查看】	AEEI-2019-137		维通利华	344	2021/9/28	小鼠	BALB/c	SPF	6-8周 雌	8
【查看】	AEEI-2018-010		维通利华	2300	2021/9/28	小鼠	BALB/c裸鼠	SPF	4-6周龄 15-20克 雌	20
【查看】	AEEI-2021-051		维通利华	3450	2021/9/28	小鼠	BALB/c Nude	SPF	5周左右 雌雄不限	30

图5 首都医科大学实验动物集中采购信息化平台的实验动物订购汇总表

Figure 5 Summary of orders of the centralized procurement information platform for laboratory animals of Capital Medical University

的名字，即可导出课题组的订购信息，生成收费单。收费系统应能将收费单直接发送给项目负责人，通过收费单明细使项目负责人可以清晰迅速地了解课题组实验人员在实验动物这方面的经费使用情况。课题组进行统一核对，核对无误后进行校内转账工作。其详细流程见图6B。

结算管理是指采购供应人员需根据实验动物信息管理平台的实际订单来按季度或学期跟各个招标单位的供应商进行核对结算。采购人员通过选择结算时间段和供应单位名称，即可导出在该供应商订购的详细信息，生成结算单。与招标单位供应商所提供的对账单进行核对，无误后，招标单位供应商开具产品发票并进行结算(图6C)。

3 实验动物数据统计模块

本校实验动物信息化平台对实验动物的统计功能是建立在上述模块的基础上，对订购信息进行统计分析，为实验动物中心提供决策支持，可

以根据统计信息，进行数据分析，计算一年中教学、科研的大概用量和对动物品种、品系的需求。由于动物的特殊性，采购供应人员在采购动物时可能会遇到动物短缺、体质量不足等不确定性，有了网络信息平台的统计功能，进行数据分析，可以提前与招标单位进行相关的预留和协商。但是，目前此功能只是初步运行，未完全开发完毕，若得以拓展可以方便保证教学和部分科研的供应。

4 总结

本校实验动物集中采购系统上线将近5年，使用期间处理实验动物、饲料采购订单将近10 654笔，涉及课题约1 100个。针对使用过程中遇到的问题，该系统经过了多次修改、更新而不断完善。最终，本校的实验动物采购完全实现了全网络化和信息化，系统操作方式便捷，人机交互良好，使全校的实验动物供应工作取得不错的效果。

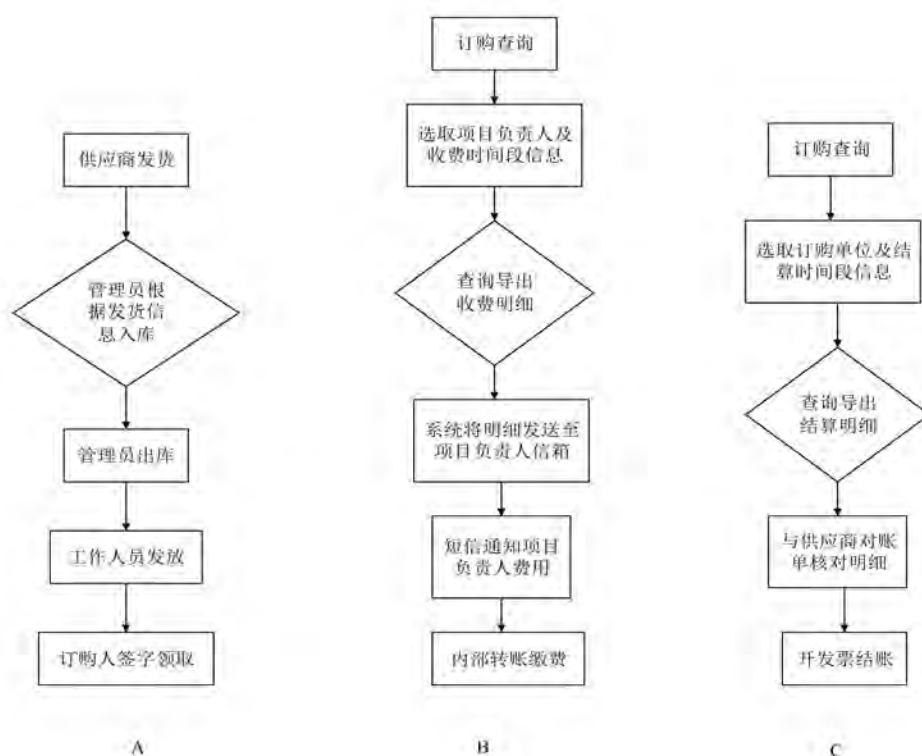


图6 首都医科大学实验动物集中采购信息化平台的出入库模块流程图(A)、收费流程图(B)和结算流程图(C)
Figure 6 Flow diagram of the warehousing module (A), charging, (B) and settlement, (C) of the centralized procurement information platform for laboratory animals of Capital Medical University

4.1 提升服务效能

系统上线后,利用信息化手段,提供了高效便捷的服务。实验人员无需递交纸质版订单,可随时随地提交网络订单,而且通过系统查询状态、逐级审批通过后也会收到短信,有效地提升了服务效能。

4.2 优化管理程序

系统的使用令管理层级更加明确,简化了工作流程,提升了管理效率。通过网络化的流程,采购人员根据提取订单采购,避免了以前的纸质版录入错误,保障了科研实验的有序进行。

4.3 完善信息化建设

实验动物的信息化管理平台建设可促进实验动物伦理管理、实验协议管理、集中采购管理、出入库管理、结算管理等管理一体化,推进一站式服务,提升服务水平。实验动物及饲料从订购、入库、审核、出库、签收、结算,全程信息化管理,信息规范透明,查询统计方便,大幅提升了管理水平。使高校实验动物集中采购工作在

科学化、规范化、制度化的良性轨道上运行。

实验动物信息化平台的数据采集功能还存在着一些不足,数据统计模块仍需完善,同时信息安全防护体系还需要进一步完善,以降低风险,提高系统的安全可靠性。

综上所述,高校实验动物集中采购管理体系网络信息化是十分必要的^[7],明确清晰的集中采购管理模块大大节约了人工和时间,提高了采购供应人员的工作效率,同时也加强了对采购供应人员业务的监控,防止不正当的交易行为,使实验动物采购供应流程更规范、科学、完善,实现了高校实验动物集中采购工作的公平、公正、公开。本文分享首都医科大学信息网络化平台的实验动物集中采购模块或可对相关实验动物机构网络信息化管理系统的建立有所启发。

参考文献:

- [1] 张永斌,赵文光,黄海定,等.基于“互联网+”的高校实验动物中心管理[J].实验室研究与探索,2016,35(6):

- 233-236. DOI:10.3969/j.issn.1006-7167.2016.06.055.
- [2] 刘晓楠, 彭博雅, 杜小燕, 等. 高校实验动物资源供应管理的优化模式研究[J]. 中国医学装备, 2016, 13(10): 121-124. DOI:10.3969/J.ISSN.1672-8270.2016.10.036.
- [3] 李莉, 赵善民, 崔淑芳. 医科院校实验动物信息化管理工作的探讨与实践[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 149-153. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-5817.2018. 02.014.
- [4] 王萍, 邱晖, 周子荣. 上海市黄浦区实验室信息管理系统平台建设的思考[J]. 中国卫生信息管理杂志, 2012, 9(2): 89-94. DOI: 10.3969/j. issn. 1672-5166.2012. 02.020.
- [5] 邹岩柏, 刘福生, 赵明海, 等. 动物实验管理系统的特点分析[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(8): 72-74. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2013.08.016.
- [6] 孙德明, 李蔚鸥, 王天奇, 等. 实验动物福利伦理审查的标准化与我国新国标解读[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 133-137. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-7856.2018.10.023.
- [7] 徐孝平, 张利棕, 潘永明, 等. 基于浏览器/服务器模式架构的高校动物实验管理系统开发与应用[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(3): 239-243. DOI: 10.3969/j. issn.1674-5817.2019.03.012.
- (收稿日期: 2021-04-26 修回日期: 2021-09-10)

《中华人民共和国生物安全法》:病原微生物实验室生物安全

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过,自2021年4月15日起施行。

第五章 病原微生物实验室生物安全

第四十二条 国家加强对病原微生物实验室生物安全的管理,制定统一的实验室生物安全标准。病原微生物实验室应当符合生物安全国家标准和要求。从事病原微生物实验活动,应当严格遵守有关国家标准和实验室技术规范、操作规程,采取安全防范措施。

第四十三条 国家根据病原微生物的传染性、感染后对人和动物的个体或者群体的危害程度,对病原微生物实行分类管理。从事高致病性或者疑似高致病性病原微生物样本采集、保藏、运输活动,应当具备相应条件,符合生物安全管理规范。具体办法由国务院卫生健康、农业农村主管部门制定。

第四十四条 设立病原微生物实验室,应当依法取得批准或者进行备案。个人不得设立病原微生物实验室或者从事病原微生物实验活动。

第四十五条 国家根据对病原微生物的生物安全防护水平,对病原微生物实验室实行分等级管理。从事病原微生物实验活动应当在相应等级的实验室进行。低等级病原微生物实验室不得从事国家病原微生物目录规定应当在高等级病原微生物实验室进行的病原微生物实验活动。

第四十六条 高等级病原微生物实验室从事高致病性或者疑似高致病性病原微生物实验活动,应当经省级以上人民政府卫生健康或者农业农村主管部门批准,并将实验活动情况向批准部门报告。对我国尚未发现或者已经宣布消灭的病原微生物,未经批准不得从事相关实验活动。

第四十七条 病原微生物实验室应当采取措施,加强对实验动物的管理,防止实验动物逃逸,对使用后的实验动物按照国家规定进行无害化处理,实现实验动物可追溯。禁止将使用后的实验动物流入市场。病原微生物实验室应当加强对实验活动废弃物的管理,依法对废水、废气以及其他废弃物进行处置,采取措施防止污染。

第四十八条 病原微生物实验室的设立单位负责实验室的生物安全管理,制定科学、严格的管理制度,定期对有关生物安全规定的落实情况进行检查,对实验室设施、设备、材料等进行检查、维护和更新,确保其符合国家标准。病原微生物实验室设立单位的法定代表人和实验室负责人对实验室的生物安全负责。

第四十九条 病原微生物实验室的设立单位应当建立和完善安全保卫制度,采取安全保卫措施,保障实验室及其病原微生物的安全。国家加强对高等级病原微生物实验室的安全保卫。高等级病原微生物实验室应当接受公安机关等部门有关实验室安全保卫工作的监督指导,严防高致病性病原微生物泄漏、丢失和被盗、被抢。国家建立高等级病原微生物实验室人员进入审核制度。进入高等级病原微生物实验室的人员应当经实验室负责人批准。对可能影响实验室生物安全的,不予批准;对批准进入的,应当采取安全保障措施。

第五十条 病原微生物实验室的设立单位应当制定生物安全事件应急预案,定期组织开展人员培训和应急演练。发生高致病性病原微生物泄漏、丢失和被盗、被抢或者其他生物安全风险,应当按照应急预案的规定及时采取控制措施,并按照国家规定报告。

第五十一条 病原微生物实验室所在地省级人民政府及其卫生健康主管部门应当加强实验室所在地感染性疾病医疗资源配置,提高感染性疾病医疗救治能力。

第五十二条 企业对涉及病原微生物操作的生产车间的生物安全管理,依照有关病原微生物实验室的规定和其他生物安全管理规范进行。涉及生物毒素、植物有害生物及其他生物因子操作的生物安全实验室的建设和管理,参照有关病原微生物实验室的规定执行。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)

大鼠血清葡萄糖测定分析的影响因素

李红¹, 敬海明¹, 林长缨¹, 郭婧¹, 张勤¹, 张超¹, 高珊¹, 余儒洋²

(1. 北京市疾病预防控制中心/北京市预防医学研究中心, 北京 100013; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100083)

[摘要] 目的 探讨大鼠血清葡萄糖测定分析的影响因素。方法 分别用两台生化分析仪、两种方法的试剂或不同保存条件的大鼠血清样品检测葡萄糖水平。结果 两台生化分析仪测定大鼠血清葡萄糖的结果差异无统计学意义 ($P>0.05$), 相关性良好 (相关系数 r 为 0.994); 两种方法的试剂测定结果差异显著 ($P<0.01$), 但相关性良好 (相关系数 r 为 0.999); 血清即刻测定与 4 °C 冷藏保存 4 h、24 h 测定的结果差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 相关性良好 (相关系数 r 为 0.999); 血清即刻测定与 -20 °C、-80 °C 冷冻保存 1 个月的测定结果差异显著 ($P<0.01$), 相关性良好 (相关系数 r 为 0.999)。结论 进行大鼠血清葡萄糖测定相关动物实验时, 应注意所使用的检测仪器设备、试剂方法、样品保存条件的一致性, 保证样品检测过程分析阶段的质量。

[关键词] 大鼠血清; 葡萄糖; 全面质量控制

[中图分类号] R446; Q95-33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0466-03

血糖是指血液中葡萄糖 (glucose)。血糖含量异常升高可引发糖尿病 (diabetes mellitus, DM)。DM 是以高血糖为特征的代谢性疾病, 糖尿病肾病、糖尿病足和眼部疾病等一系列并发症严重危害人类健康。关于影响大鼠血糖异常的相关因素^[1-6]、血糖异常的中药治疗^[7-8]等已有较多研究报告。作为临床诊断依据的血糖水平, 实验室检测结果的质量非常重要。

对样品检测实施严格的全面质量控制, 包括样品分析前、分析中和分析后 3 个阶段。样品送到实验室进入分析中的这个阶段, 检测系统涉及仪器、试剂、校准品、质控品和分析人员等, 探讨分析中使用的检测仪器、试剂对大鼠血清葡萄糖测定的影响, 以及比较收到送检血样即刻检测与不同条件放置再检测之间的差异, 对于保证样品检测过程的质量具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

7600-日立全自动生化分析仪、7170-日立全自动生化分析仪均购自日本日立高新技术有限公司。

1.2 试剂、校准品和质控系统

葡萄糖氧化酶法血糖测定试剂、校准品和质控血清均购自中生北控生物科技股份有限公司, 己糖激酶法血

糖测定试剂、复合校准品和质控血清购自日本和光纯药工业株式会社。

1.3 大鼠血样

本中心生化分析实验室收到送检清洁级 Wistar 大鼠血清样品, 均由军事医学科学院实验动物中心提供 [SCXK-(军) 2012-0004、SYXK(京) 2013-0033], 分别包括比较两台生化分析仪测定的 71 只大鼠 (体质量为 160~200 g) 血样, 比较两种方法所用试剂测定的 90 只大鼠 (体质量为 200~250 g) 血样, 以及比较不同保存条件下测定的 140 只大鼠 (体质量为 408~799 g) 血样。

1.4 实验方法

在 7600-P 模块-日立生化分析仪和 7170-日立全自动生化分析仪上使用己糖激酶法试剂同时检测 71 只大鼠血清葡萄糖水平。在 7600-P 模块-日立生化分析仪上分别用葡萄糖氧化酶法、己糖激酶法试剂检测 90 只大鼠血清葡萄糖水平。

将另外 140 只大鼠血样编号, 每个血样分装 5 个冻存管并立刻加盖, 冻存管放入冻存盒保存, 在 7600-P 模块-日立生化分析仪上使用己糖激酶法试剂分别即刻检测, 以及 4 °C 冷藏保存 4 h、24 h 后, -20 °C 与 -80 °C 冷冻保存 1 个月后检测血清葡萄糖水平。具体操作按照试剂盒及仪器使用说明进行。

[基金项目] 国家重点研发计划(2019YFC1604901;2018YFC1602705)

[作者简介] 李红(1968—), 女, 副主任技师, 主要从事生化分析工作。E-mail:benlih@sina.com

[通信作者] 高珊(1970—), 女, 主任医师, 主要从事毒理安全性研究及模式生物线虫研究。E-mail:gaoshan@bjcdc.org

1.5 统计学方法

采用SPSS 20.0软件包进行统计处理。组间比较采用配对 t 检验,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清葡萄糖水平检测结果

71只大鼠血清使用两台生化分析仪检测的葡萄糖水平差值为0.03 mmol/L。采用己糖激酶法和葡萄糖氧化酶法试剂检测90只大鼠血清中葡萄糖水平,结果显示前者比后者低0.35 mmol/L。4℃冷藏分别保存4 h、24 h后的检测结果与即刻检测140只大鼠血清中葡萄糖结果一致,−20℃和−80℃分别冷冻1个月后测定结果降低。具体检测结果数据见表1。

2.2 检测结果的相关性分析

两台生化分析仪、即刻检测与4℃冷藏分别保存4 h和24 h检测结果的差异无统计学意义($P>0.05$)。两种方法的试剂、即刻检测与−20℃和−80℃分别冷冻1个

月检测的结果差异明显($P<0.05$)。比对各结果的相关性均良好,具体的统计学分析数据见表2。

表1 不同方法检测大鼠血清葡萄糖含量

Table 1 The serum glucose content in rats detected by different methods

样品数量	比对内容	葡萄糖含量/ (mmol·L ⁻¹)
71只大鼠	仪器-7600	6.18±1.17
	仪器-7170	6.21±1.16
90只大鼠	葡萄糖氧化酶法	8.33±1.86
	己糖激酶法	7.98±1.80
140只大鼠	0 h(即刻)	5.31±1.49
	4℃冷藏保存4 h	5.32±1.49
	4℃冷藏保存24 h	5.31±1.48
	−20℃冷冻保存1个月	5.22±1.47
	−80℃冷冻保存1个月	5.25±1.48

表2 大鼠血清葡萄糖检测结果的相关性

Table 2 Relationship of detected results for serum glucose content in rats between different methods

比较对象	t 值	P 值	相关系数 r	回归方程
两台生化分析仪	−1.958	0.054 0	0.994	$Y=0.982\ 7x+0.136\ 1$
两种方法试剂	34.576	0.000 1	0.999	$Y=0.965\ 7x-0.068\ 8$
0 h与4℃冷藏保存4 h	−1.767	0.079 0	0.999	$Y=0.994\ 9x+0.036\ 1$
0 h与4℃冷藏保存24 h	−0.496	0.621 0	0.999	$Y=0.991\ 9x+0.045\ 6$
0 h与−20℃冷冻保存1个月	15.091	0.000 1	0.999	$Y=0.984\ 1x-0.005\ 3$
0 h与−80℃冷冻保存1个月	9.557	0.000 1	0.999	$Y=0.992\ 1x-0.020\ 6$

3 讨论

依据美国临床实验室标准协会(CLSI)文件EP9-A2中的要求,使用两台仪器检测时,结果差异应无统计学意义,且有良好的相关性[$r\geq 0.975$,或 $r^2\geq 0.95$][⁹]。血糖测定有全自动、半自动仪器和快速血糖仪等多种检测方式,不同仪器生产厂家、不同检测速度的仪器等都会造成检测结果的差异[¹⁰⁻¹¹]。比色杯材质为石英玻璃或塑料,水浴是循环恒温水浴或恒温液控制,进样方式为轨道式或圆盘式,反应时间为固定或可选择模式,试剂加入可添加2种或者4种等,均可影响检测结果[¹²]。设计生产的差别可造成仪器精密度和准确度的差异,检测系统涉及的仪器设备是分析中实验室检测的基础,做好仪器设备日常维护保养是检测工作质量的另一保证。

已有文献报告,不同的血糖检测方法其结果有差异性[¹³]。本研究中两种试剂测定结果差异有统计学意义,但两个结果相关性良好。另外,血清即刻测定与4℃冷藏保存4 h、24 h测定结果的差别无统计学意义,且相关性良好;与−20℃和−80℃冷冻保存1个月测定结果差

异均有统计学意义,但相关性良好。实验室收到血样后离心分离血清,尽量及时检测,不能及时检测的样品应加盖密封保存并在24 h内进行检测。国家卫生健康委临床检验中心各实验室之间质量评价葡萄糖水平的可接受范围为 ± 0.33 mmol/L或 $\pm 10\%$ [¹⁴]。实验室条件不同,有些检测结果的差异虽然没有临床意义,但是动物实验比对应尽量保持一致性。因此,需要严格控制检测过程分析中的每个环节,保证动物实验结果的准确性。

参考文献:

- [1] 余丽芝,罗嘉惠,张华,等.持续光照对大鼠血糖和体重的影响[J].中外医学研究,2018,16(12):15-16. DOI:10.14033/j.cnki.cfmr.2018.12.006.
- [2] 裴瑜,董旭,唐心一,等.咖啡酸对2型糖尿病大鼠血糖浓度的影响[J].中国当代医药,2018,25(25):16-18,22. DOI:10.3969/j.issn.1674-4721.2018.25.005.
- [3] 李培培,黄庆德,许继取,等.部分脱脂亚麻籽粉对高脂高糖饮食大鼠血糖的影响[J].食品科学,2018,39(21):183-188. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201821028.

- [4] 陈文文, 余强, 王志远, 等. 不同pH值饮用水对SD大鼠生长发育及血清生化影响[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(1): 61-64, 70. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.01.013.
- [5] 陈建康, 艾必燕, 樵星芳, 等. 27周龄Wistar大鼠饮用酸化水生物学特性的观察 I. 血液学指标的测定[J]. 实验动物科学, 2010, 27(6): 75-77. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2010.06.020.
- [6] 徐云鹏, 郝敏, 常晓彤. 诱发性肥胖对未成年SD大鼠糖脂类代谢的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(2): 97-100. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.02.003
- [7] 刘凯, 李淑玲, 李应东. 黄芪乌梅配方颗粒对GK大鼠血糖及胰岛素敏感性的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(1): 5-10. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2020.01.002
- [8] 闫丽, 王晓婷, 高慧. 盐知母醇提物对2型糖尿病模型大鼠血糖血脂的影响[J]. 中国药业, 2019, 28(10): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4931.2019.10.001
- [9] The National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2: Method comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline [S]. 2nd Ed. USA: NCCLS, 2002.
- [10] 张晓钊, 吴新来, 符丽珍, 等. 正常大鼠和2型糖尿病大鼠血糖值检验中快速血糖仪与生化仪的对比研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(81): 84-86, 124. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2018.81.061.
- [11] 常凡, 侯永彬, 黄利君, 等. 日立7600-210检测系统对血糖检测的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(2): 192-195. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.017
- [12] 周新, 涂植光. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 496-502.
- [13] 沈卫, 唐志慧, 刘况廷, 等. 3种不同血糖检测方法的比较研究[J]. 糖尿病新世界, 2018, 21(5): 185-187. DOI: 10.16658/j.cnki.1672-4062.2018.05.185.
- [14] 卫生部临床检验中心. 2013年临床检测室间质量评价计划[A/OL].
- (收稿日期: 2020-07-14 修回日期: 2021-06-18)

《中华人民共和国生物安全法》: 生物安全能力建设

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过, 自2021年4月15日起施行。

第八章 生物安全能力建设

第六十六条 国家制定生物安全事业发展规划, 加强生物安全能力建设, 提高应对生物安全事件的能力和水平。县级以上人民政府应当支持生物安全事业发展, 按照事权划分, 将支持下列生物安全事业发展的相关支出列入政府预算: (1) 监测网络的构建和运行; (2) 应急处置和防控物资的储备; (3) 关键基础设施的建设和运行; (4) 关键技术和产品的研究、开发; (5) 人类遗传资源和生物资源的调查、保藏; (6) 法律法规规定的其他重要生物安全事业。

第六十七条 国家采取措施支持生物安全科技研究, 加强生物安全风险防御与管控技术研究, 整合优势力量和资源, 建立多学科、多部门协同创新的联合攻关机制, 推动生物安全核心关键技术和重大防御产品的成果产出与转化应用, 提高生物安全的科技保障能力。

第六十八条 国家统筹布局全国生物安全基础设施建设。国务院有关部门根据职责分工, 加快建设生物信息、人类遗传资源保藏、菌(毒)种保藏、动植物遗传资源保藏、高等级病原微生物实验室等方面的生物安全国家战略资源平台, 建立共享利用机制, 为生物安全科技创新提供战略保障和支撑。

第六十九条 国务院有关部门根据职责分工, 加强生物基础科学研究人才和生物领域专业技术人才培养, 推动生物基础科学学科建设和科学研究。国家生物安全基础设施重要岗位的从业人员应当具备符合要求的资格, 相关信息应当向国务院有关部门备案, 并接受岗位培训。

第七十条 国家加强重大新发突发传染病、动植物疫情等生物安全风险防控的物资储备。国家加强生物安全应急药品、装备等物资的研究、开发和技术储备。国务院有关部门根据职责分工, 落实生物安全应急药品、装备等物资研究、开发和技术储备的相关措施。国务院有关部门和县级以上地方人民政府及其有关部门应当保障生物安全事件应急处置所需的医疗救护设备、救治药品、医疗器械等物资的生产、供应和调配; 交通运输主管部门应当及时组织协调运输经营单位优先运送。

第七十一条 国家对从事高致病性病原微生物实验活动、生物安全事件现场处置等高风险生物安全工作的人员, 提供有效的防护设施和医疗保障。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)