

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42卷 第3期 (总第193期)

2022年6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

王 健

执行主编

吴宝金

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

张俊彦

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: 国内公开发行

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30.00元, 全年180.00元

中国标准连续出版物号

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

版权声明

本刊为开放获取期刊, 遵从CC BY-NC-ND 4.0协议。2022年版权归《实验动物与比较医学》编辑部所有。

作者向本刊投稿, 即视为愿意将著作权 (包括但不限于信息网络传播权等) 授予本刊。不同意者请在投稿时声明。

除非特别说明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会及主办单位的观点。

目 次

前沿文献述评

脊髓CD11c⁺小胶质细胞在神经病理性疼痛中的最新功能研究进展

彭长庚, 富 研, 朱冯婷, 夏瑞龙, 夏 玮 171

人类疾病动物模型

不同时间APP/PS1模型小鼠嗅球病理和突触形态变化及美金刚干预作用

刘佳妮, 刘剑刚, 韦 云, 罗增刚, 李 浩, 王 怡, 李 琨 177

新型钠磷转运蛋白抑制剂DZ1462在5/6肾切除高磷血症模型大鼠中的

药效研究

卢 晓, 张 林, 李 辉, 江善祥 187

复方卡森糖浆缓解D-氨基半乳糖引起的小鼠急性化学性肝损伤

麦丽开·阿不力米提, 艾山·艾比布勒, 史 深, 阿不都沙拉木·

阿不都热依木, 艾尼瓦尔·塔力甫 194

不同方法建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型的比较研究

卢心鹏, 刘 蓉, 黄文博, 赵 瑾, 李洪涛 201

脓毒症动物模型的制备方法及影响因素

李 潇, 颜海鹏, 肖政辉 207

高脂血症动物模型肾功能损伤机制及干预研究进展

周晓丽, 张 倩, 钱智勇 213

溃疡性结肠炎动物模型研究进展

胡 宇, 兰昀羲, 陈晓晓, 熊 伟, 唐宋琪, 贾 波, 黄 巍 220

实验动物资源开发与利用

实验用英国短毛猫的组织结构特征及背景病变

王 宇, 高 丹, 彭娜娜, 航 艾, 沈 斌, 黄 坚, 唐黎明 229

实验动物设施及管理

CNAS实验动物机构认可与AAALAC认证的比较分析

吴孝槐, 肖巧喆, 庞万勇, 白 玉, 李 焱, 卢选成, 冯 涛 237

从评审角度讨论动物实验室文件管理中常见问题与解决办法

李海玉, 许虎峰 244

比较生物医学

胃癌类器官在精准医学研究中的应用

 巩淼淼, 周丽桂, 赵菊梅, 师长宏 248

语言的比较生物学研究

 李 慧 255

实验动物麻醉

不同剂量氯胺酮与赛拉嗪复合用于巴马小型猪短时间麻醉效果观察

 申 晨, 张宝杰, 王学民, 朱瑾彦, 张 敏, 李 彬 262

作者-读者-编者

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会名单 前插8

中国科技核心期刊收录证书——《实验动物与比较医学》- 英文目次页后插页

《实验动物与比较医学》2022年征订启事 193

《实验动物与比较医学》出版伦理声明 201

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明 206

《实验动物与比较医学》有关作者投稿必备信息和材料的说明 228

《实验动物与比较医学》2022年起论文格式新要求 236

《实验动物与比较医学》“前沿文献述评”——青年编委专栏邀请函 247

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表 261

《实验动物与比较医学》2022年刊务理事会名单 266

广告 封二, 前插 1~7, 后插 1~6, 封三, 封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*88*zh*P*¥ 30.00*2000*14*2022-06

(经方正字库授权, 本刊使用字体包括方正雅宋系列、方正兰亭黑pro global 系列、方正金陵系列、方正Capitolium 系列)

本期责任编辑 丁玉强

本期审稿专家 庞晓斌 白 玉 蔡兆伟 陈国元 丁玉强 富群华 高 诚 赖国旗

 黎 明 李 顺 李 垚 刘月环 卢 晓 庞晓斌 宋宁宁 孙 强

 王春霞 王 宇 吴宝金 徐 平 徐汪节 杨 陈 杨 斐 杨娜娜

 姚 明 张 周 周光兴 (以姓氏拼音排序)

本期责任编辑 张俊彦

本期责任排版 王伟民

本期中英文校对 富群华 丁宇菁 陶启辰 朱德才 孙 琛

本期实习编辑 崔占鼎 郭嘉欣 洪 怡 娄怡欣 余儒洋 张亚菲 周 培 周晓铎

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981

Volume 42, Issue 3

June 25, 2022

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

WANG Jian

Executive Editor-in-Chief

WU Baojin

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

ZHANG Junyan

Printed by

Shanghai Newcabo Business Printing
Co., Ltd.

Distributed by

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

Price

RMB 30.00 per issue

CSSN

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

Copyright© 2022 by the Editorial

Office of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*.

This is an open access journal under CC BY-NC-ND 4.0 license.

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 Editor for This Issue

ZHANG Junyan

CONTENTS IN BRIEF

Review of Frontier Literature

The Latest Research Progress of the Function of Spinal CD11c⁺ Microglia in
Neuropathic Pain

PENG Changgeng, FU Yan, ZHU Fengting, XIA Ruilong, XIA Wei 171

Animal Models of Human Diseases

Pathological and Synaptic Morphological Changes of the Olfactory Bulb in APP/PS1
Model Mice at Different Ages and the Intervention Effect of Memantine

LIU Jiani, LIU Jiangang, WEI Yun, LI Hao, LUO Zenggang, WANG Yi, LI Kun 178

Efficacy of DZ1462, a Novel Sodium-phosphate Transporter Inhibitor, on 5/6

Nephrectomy-induced Hyperphosphatemia Model Rats

LU Xiao, ZHANG Lin, JI Hui, JIANG Shanxiang 187

Compound Casson Syrup Alleviates Acute Chemical Liver Injury in Mice Caused by
D-galactosamine

Merika·Ablimiti, Aishan·Abibule, SHI Shen, Abdu-salamu·Abdu-reyimu, Enivar·Taleb
..... 194

A Comparative Study of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rat Models

Established by Different Methods

LU Xinpeng, LIU Rong, Huang Wenbo, ZHAO Jin, LI Hongtao 201

Construction Methods and Influencing Factors on Animal Model of Sepsis

LI Xiao, YAN Haipeng, XIAO Zhenghui 207

Research Progress on Mechanism and Intervention of Renal Function Injury in
Hyperlipidemia Animal Model

ZHOU Xiaoli, ZHANG Qian, QIAN Zhiyong 213

Research Progress in Animal Models of Ulcerative Colitis

HU Yu, LAN Yunxi, CHEN Xiaoxiao, XIONG Wei, TANG Songqi, JIA Bo,

HUANG Wei 220

Development and Utilization of Laboratory Animal Resources

Anatomical Characteristics and Background Lesions in Laboratory British-shorthair Cats

WANG Yu, GAO Dan, PENG Nana, HANG Ai, SHEN Bin, HUANG Jian,

TANG Liming 229

Facilities and Management for Laboratory Animals

A Comparative Analysis of CNAS Laboratory Animal Institutions Accreditation and
AAALAC Certification

WU Xiaohuai, XIAO Qiaozhe, PANG Wanyong, BAI Yu, LI Yao, LU Xuancheng,
FENG Tao 237

Discussion on the Problems and Methods of Animal Laboratory Documents

Management from the Perspective of Audit

LI Haiyu, XU Hufeng 244

Comparative Biomedicine

Application of Gastric Cancer Organoids in Precision Medicine Research

GONG Miaomiao, ZHOU Liqui, ZHAO Jumei, SHI Changhong 248

A Comparative Biological Study of Language

LI Hui 255

Laboratory Animal Anesthesia

Comparison of the Anesthetic Effects of Different Doses of Ketamine Hydrochloride

Combined Xylazine on Short-term Anesthesia in Bama Miniature Pigs

SHEN Chen, ZHANG Baojie, WANG Xuemin, ZHU jinyan, ZHANG Min, LI Bin 262



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

实验动物与比较医学

经过多项学术指标综合评定及同行专家
评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期
刊”(中国科技论文统计源期刊)。

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2021年12月





彭长庚, 博士, 同济大学医学院研究员、博士研究生导师, 中国生理学会转化神经分会委员, 《实验动物与比较医学》青年编委, 上海、澳门和江苏等地科技奖评审专家。研究慢性疼痛和帕金森病等神经疾病病理机制和相关神经发育19年, 相关成果以通信作者或第一作者发表在 *Science*、*Progress in Neurobiology*、*Journal of Neuroscience* 和 *Development* 等学术期刊, 获6项发明专利。2012年获慕尼黑工业大学优秀博士学位, 2012—2017在瑞典卡罗林斯卡医学院医学生化与生物物理系 Prof. Patrik Ernfors 课题组任博士后研究员。回国后的研究方向是利用前沿技术在转基因小鼠模型和疾病小鼠模型上研究神经发育与神经病理学机制以及探索新的治疗方法, 主要包括: 1) 研究疼痛基因网络调控和躯体感觉神经元分化的分子机制, 并筛选、发现抑制疼痛的药物; 2) 研究疼痛传导环路及中枢痛觉敏感的分子机制; 3) 研究中脑多巴胺神经元的存活、诞生数目调控的分子机制, 探寻帕金森病的早期诊断标志物和诊断方法。

脊髓CD11c⁺小胶质细胞在神经病理性疼痛中的最新功能研究进展

彭长庚¹, 富研^{1,2}, 朱冯婷^{1,3}, 夏瑞龙¹, 夏玮¹

(1. 同济大学医学院, 同济大学附属上海第一康复医院, 同济大学脑与脊髓研究中心, 同济大学转化医学高等研究院, 上海 200092; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 大理大学基础医学院, 大理 671000)

[摘要] 神经病理性疼痛困扰约10%的人群, 治疗该疾病的方法和药物效果均有限。脊髓中小胶质细胞在外周神经损伤诱导的神经病理性疼痛中起着重要而又相互矛盾的作用, 既有促进神经病理性疼痛发展的作用, 又有减缓疼痛的效果。2022年4月, *Science* 杂志发表了 Keita Kohno 等的一项研究成果, 提示外周神经损伤后小鼠脊髓中出现的CD11c⁺小胶质细胞是起缓解神经病理性疼痛和抑制疼痛复发作用的一类小胶质细胞。本文对这类镇痛小胶质细胞亚群的重要发现进行文献点评, 并对后续相关工作进行展望。

[关键词] 神经病理性疼痛; 小胶质细胞; CD11c; IGF1; 镇痛; 抗炎; 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0171-06

The Latest Research Progress of the Function of Spinal CD11c⁺ Microglia in Neuropathic Pain

PENG Changgeng¹, FU Yan^{1,2}, ZHU Fengting^{1,3}, XIA Ruilong¹, XIA Wei¹

(1. First Rehabilitation Hospital of Shanghai, School of Medicine, Advanced Institute of Translational Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China)

Correspondence to: PENG Changgeng (ORCID: 0000-0002-6707-2717), E-mail: changgeng.peng@tongji.edu.cn

[ABSTRACT] Neuropathic pain (NP) affects approximately 10% of the population, and treatments and drugs for NP have limited efficacy. Microglia in the spinal cord play important and paradoxical roles in peripheral nerve injury-induced NP, both promoting the development of NP and relieving NP. In April 2022, Keita Kohno et al. reported that after peripheral nerve injury, CD11c⁺ microglia appearing in the spinal cord

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目: 调控中脑黑质多巴胺神经元诞生数目的分子机制研究(32070977); 钛植入体在骨免疫和神经再生微环境的光致调控机制和效果研究(51971236); miR-183-96在中枢神经系统中调控急性和神经病理性疼痛的作用及机制研究(31871063)

[第一作者] 彭长庚(1979—), 男, 博士, 研究员, 从事疼痛和帕金森病的发病机制以及神经发育研究, E-mail: changgeng.peng@tongji.edu.cn. ORCID: 0000-0002-6707-2717

富研(1997—), 女, 硕士研究生, 从事神经病理性疼痛的分子和细胞机制研究, E-mail: fy15336095658@163.com. ORCID: 0000-0001-9154-2857

朱冯婷(1993—), 女, 硕士研究生, 从事神经病理性疼痛和肠炎研究, E-mail: 763719204@qq.com. ORCID: 0000-0002-8081-0112

of mice were a type of microglia that relieve NP and inhibited pain recurrence. In this commentary, we review the important findings of this type of analgesic microglia subset, and provide a perspective for future work related to this new finding.

[Key words] Neuropathic pain; Microglia; CD11c; IGF1; Analgesic; Anti-inflammatory; Mice

神经病理性疼痛是一种严重的慢性疼痛,影响约10%的人群。神经病理性疼痛的主要特征之一是机械痛觉敏感,其一线药物的疗效和有效率都有限。脊髓中小胶质细胞在外周神经损伤(peripheral nerve injury)诱导的神经病理性疼痛中起着重要而又相互矛盾的作用^[1-2]:在外周神经损伤后24 h可激活小胶质细胞,后者表达离子钙结合衔接分子1(ionized calcium binding adapter molecule 1, IBA1)和C-X3-C趋化因子受体1(C-X3-C motif chemokine receptor 1, CX3CR1);在损伤48 h内诱导小胶质细胞增生,后者表达CD11b,而CD11b是补体受体3(complement receptor 3, CR3)二聚体中的 α 亚基。这些损伤早期(14 d内)激活的和新生的小胶质细胞通过表达CX3CR1、P2X4、P2X7、P2Y12和TLR4等炎症相关受体,并分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1b、IL-6、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)等促炎症因子和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF),对神经损伤后的神经病理性疼痛起促进作用。阻断小胶质细胞的激活或阻止小胶质细胞的增生都能缓解神经病理性疼痛,但前期的研究也发现小胶质细胞还分泌Resolvins、Lipoxins、Maresins和Protectins等可抑制/终止炎症反应的因子,从而缓解神经病理性疼痛^[1-2]。

正是由于小胶质细胞具有双向调节炎症的两面性,使得临床药物研究的结果呈现不一致性,治疗效果不佳。比如,能抑制小胶质细胞激活的低剂量纳曲酮可减轻纤维肌肉疼痛症状^[3],但同样可抑制小胶质细胞激活的米诺环素未能减缓神经病理性疼痛^[4]。相反,Curtin等^[5]的研究发现口服米诺环素非但不能减少腕管综合征(一种神经病理性疼痛)患者在手部手术后的疼痛时间,甚至会延长创伤后应激障碍症状加重的患者的疼痛时间,这表明小胶质细胞在人类中也可能有促进疼痛缓解的功能。因此,厘清小胶质细胞缓解疼痛的功能对开发可能的相关镇痛药物至关重要。

1 CD11c⁺小胶质细胞亚群缓解疼痛功能的发现

2022年4月Science杂志发表Kohno等^[6]的研究报

告显示,小鼠脊髓中被外周神经损伤激活的CD11c⁺(又称*Itgax*)小胶质细胞通过分泌胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)来缓解神经病理性疼痛和抑制疼痛的复发。

该研究首先利用*Itgax-Venus*转基因小鼠,发现外周神经损伤14 d时,损伤同侧脊髓中出现增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)标记的CD11c⁺细胞,该细胞表达IBA1、CD11b和HEX2b,不表达胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)(星形胶质细胞标志物)、APC(少突胶质细胞标志物)和NeuN(神经元标志物),从而确定这些细胞是小胶质细胞的一个亚群。然后用流式细胞仪分选发现,CD11c⁺/CD11b⁺小胶质细胞数目的峰值出现在损伤后的第14天,而CD11c⁻/CD11b⁺小胶质细胞数目的峰值出现在第7天。进一步分析发现,高表达CD11c(CD11c^{high})的小胶质细胞数目从损伤后的第7天显著增加,在第35天时达峰值,在实验的最长时间点(第56天)还是维持在很高水平,这与神经病理性疼痛的缓解时程较吻合。

为验证CD11c⁺小胶质细胞能缓解神经病理性疼痛,该研究从外周神经损伤手术后第14天开始连续每周注射一次白喉毒素至*Itgax-DTR-EGFP*转基因小鼠的鞘内,白喉毒素可以选择性杀死表达白喉毒素受体(diphtherial toxin receptor, DTR)的CD11c⁺细胞。机械疼痛阈值检测发现,注射PBS的*Itgax-DTR-EGFP*小鼠的神经病理性疼痛在损伤后第14天发展至最严重,从第3周开始逐步恢复,到第4周时机械疼痛阈值恢复至接近手术前的阈值;但注射白喉毒素清除CD11c⁺小胶质细胞后,*Itgax-DTR-EGFP*小鼠的神经病理性疼痛的恢复能力基本被消除。这项白喉毒素-DTR杀死特定细胞的转基因小鼠模型的实验证实了CD11c⁺小胶质细胞是主要缓解神经病理性疼痛的一类小胶质细胞亚群。

随后,该研究利用流式细胞分选-RNA测序发现一些在外周神经损伤诱导的CD11c⁺小胶质细胞中差异表达的基因,从中选择了IGF1作为假定的关键的疼痛缓解因子。关于这一点,作者没有解释原因。笔者检索文献发现,2017年Wlodarczyk等^[7]报告,与健康成

年小鼠来源的或炎症激活的小胶质细胞相比, 新生小鼠大脑中小胶质细胞具有独特的髓鞘和神经元表型, 主要是CD11c⁺小胶质细胞亚群通过分泌IGF1促进神经元和胶质细胞的存活、迁移和分化, 并促进髓鞘化。另外, 研究已知新生几周内的小鼠小胶质细胞分泌抗炎因子如IL-10等, 能阻断外周神经损伤诱导神经病理性疼痛的发生^[8]。这两篇研究文献应该是激发Kohno等^[6]开展CD11c⁺小胶质细胞研究并聚焦于IGF1的线索, 但可能担心创新性的评价受损而未引用并感激前人的成果。笔者认为, 这可能是论文发表要求新颖性导致的一种畸形现象, 因为基于新颖性的引用评价体系如果使用不当就会抹杀很多重要发现的研究者应得的声誉, 也会阻碍相关成果后续转化研究的进展。

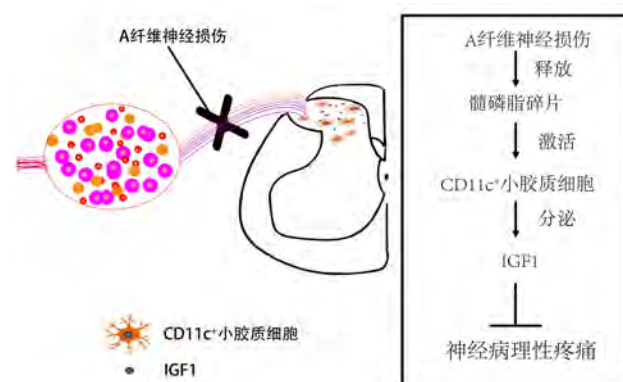
利用 *Itgax-Cre; Igfl^{fllox/fllox}* 细胞特异性敲除小鼠, Kohno等^[6]证实在CD11c⁺小胶质细胞中敲除 *Igfl* (即IGF1对应基因) 也同樣能消除小鼠神经病理性疼痛的恢复能力。为排除 *Itgax-Cre; Igfl^{fllox/fllox}* 小鼠敲除了 *Igfl* 对神经系统发育的潜在影响, 他们又构建了 *Cx3cr1^{CreERT2}; Igfl^{fllox/fllox}* 诱导型细胞特性敲除小鼠, 结果显示在成年后注射他莫昔芬清除小胶质细胞中的IGF1也同樣基本阻断了小鼠神经病理性疼痛的恢复能力。进一步研究发现, 鞘内注射IGF1抗体或重组IGF1能阻断神经病理性疼痛的恢复能力, 或短期抑制神经病理性疼痛。最后, Kohno等^[6]证明在外周神经损伤后第35天神经病理性疼痛接近恢复时, 诱导清除 *Itgax-DTR-EGFP* 小鼠的CD11c⁺小胶质细胞或诱导清除 *Cx3cr1^{CreERT2}; Igfl^{fllox/fllox}* 小鼠的CD11c⁺小胶质细胞中的IGF1, 都能让小鼠重新出现机械痛觉敏感。

为了确认CD11c⁺小胶质细胞的活化是由C纤维(C-fiber)还是A纤维(A-fiber)的损伤引起, Kohno等^[6]将霍乱毒素B亚基(Cholera toxin B subunit, CTB)或异凝集素B4(isolectin B4, IB4)结合的皂草素(CTB-Saporin、IB4-Saporin)注射至小鼠脚掌, 分别损伤背根神经节中A纤维神经元(髓鞘包裹)和C-纤维神经元(无髓鞘包裹), 发现只有损伤A纤维神经元能诱导出现CD11c⁺小胶质细胞, 但外周损伤不诱导已存在的CD11c⁺小胶质细胞增生。并且通过原代细胞培养和椎管内注射纯化的髓磷脂碎片实验证实, CD11c⁺小胶质细胞是由小胶质细胞在吞噬髓磷脂碎片后诱导表达CD11c。

2 结果点评

Kohno等^[6]利用多个基因条件性敲除小鼠和诱导

型细胞特异性敲除小鼠, 发现被A纤维感觉神经元损伤后释放的髓磷脂碎片激活的脊髓背角中小胶质细胞表达CD11c⁺, 此类CD11c⁺小胶质细胞亚群通过分泌IGF1来缓解外周神经损伤诱导的小鼠神经病理性疼痛, 并持续抑制异常机械疼痛的复发(图1)。



注: A纤维感觉神经元损伤释放髓磷脂碎片, 激活CD11c⁺小胶质细胞, 该细胞分泌IGF1, 进而缓解神经病理性疼痛。

Note: Cartoons illustrate that injured A-fiber sensory neurons release myelin debris to activate CD11c⁺ microglia in the spinal dorsal horn, and then CD11c⁺ microglia secrete IGF1 to alleviate neuropathic pain.

图1 CD11c⁺小胶质细胞缓解神经病理性疼痛的作用机制示意图
Figure 1 Schematic diagram of the mechanism by which CD11c⁺ microglia relieve neuropathic pain

此发现指明脊髓内CD11c⁺小胶质细胞亚群是被外周神经损伤激活的具有抗神经痛的胶质细胞, 表明开发选择性靶向CD11c⁺小胶质细胞、促进抗炎活性和(或)提高IGF1表达及分泌能力的小分子, 以及研发人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hIPSC)来源的CD11c⁺小胶质细胞, 有可能缓解临床上特定类型的外周神经损伤诱导的神经病理性疼痛。从该研究的结果看, IGF1可能是CD11c⁺小胶质细胞抑制疼痛的主要分子。但笔者深入分析该文中的差异表达基因(CD11c⁺小胶质细胞与CD11c⁻小胶质细胞相比)发现, CD11c⁺小胶质细胞中高表达的基因富集在细胞因子相关信号通路、趋化因子相关信号通路、生长因子结合信号通路和脂蛋白颗粒结合信号通路等潜在与炎症反应、疼痛相关的信号通路, 低表达的基因主要富集在代谢相关的信号通路(图2, 表1)。

笔者进一步利用STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)分析CD11c⁺小胶质细胞中高表达和低表达基因的相互作用网络, 发现高表达的抑制疼痛的基因除 *Igfl* 之外, 还有 *Sod2*、*Anax2* 和 *Adora1*; 高表达的促疼

痛的基因有 *Ccl5*、*Cd14*、*Cybb*、*Dtnbp1*、*Lgals1*、*Mif*、*Osm*、*Ptger4*、*Ptgs2*、*Spp1*、*Tlr2*和*Csf1*；抗炎性反应的基因还有*Il1rn*、*Lpl*、*Socs2*和*Cd44*；促炎性反应的基因还有*Ccl22*、*Ccl5*、*Ccl6*、*Cd36*、*Csf1*、*Cxcl10*、*Cxcr4*、*Il1b*、*Mif*、*Osm*、*Pdgfa*、*Areg*和*Spp1*；低表达

的基因中*Tlr9*是抑制疼痛的基因，没有促疼痛和与炎症相关的基因（图3）。从图2和图3可以看出，*Sod2*、*Anax2*和*Adora1*很可能也对CD11c⁺小胶质细胞抑制疼痛的功能有贡献。CD11c⁺小胶质细胞高表达一些促疼痛基因提示，CD11c⁺小胶质细胞可能还不是一个单一

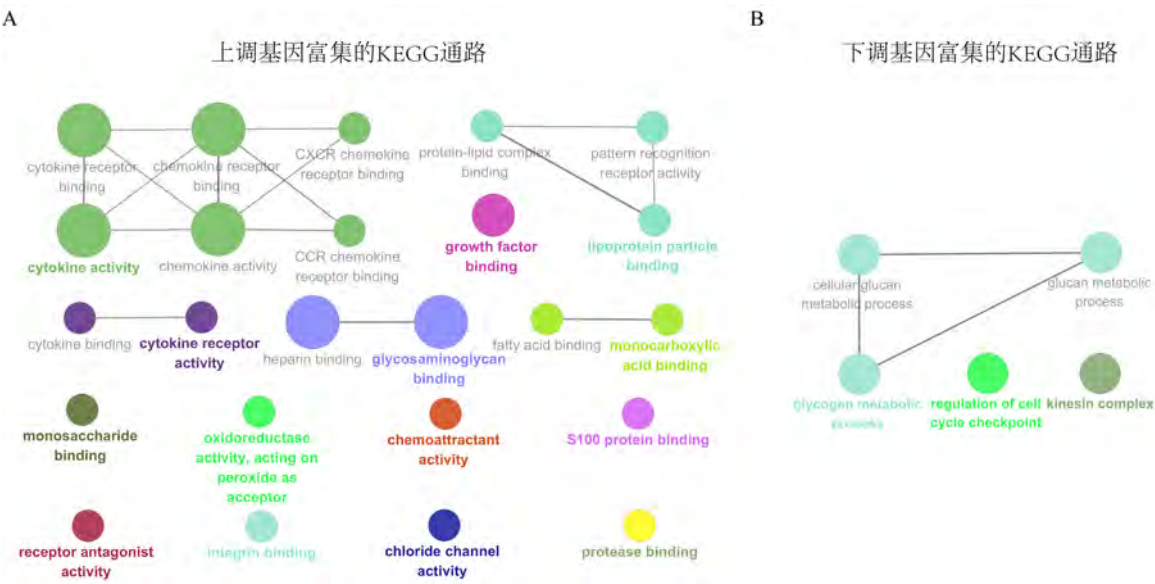
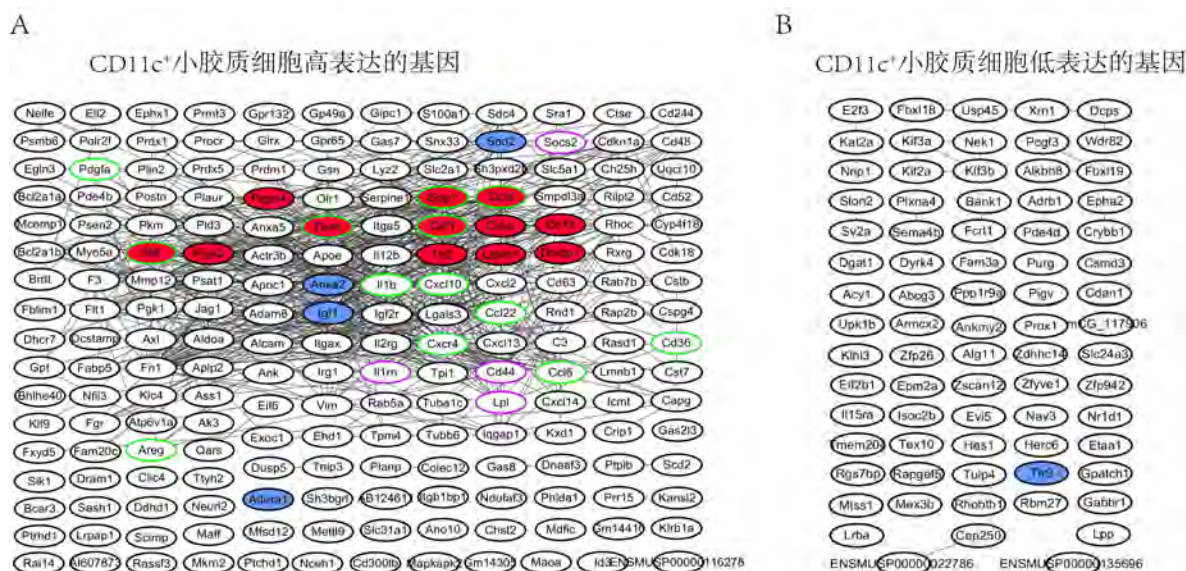


图2 CD11c⁺小胶质细胞中高表达(A)和低表达(B)基因的富集信号通路
Figure 2 Signaling pathways enriched for genes that were expressed highly (A) or lowly (B) in CD11c⁺ microglia

表1 CD11c⁺小胶质细胞中高表达基因富集的潜在与疼痛相关的信号通路
Table 1 Genes highly expressed in CD11c⁺ microglia were enriched in pain-related signaling pathways

基因本体论条目 GO Term	条目 P 值 Term P value	相关基因 Associated genes		
		数目 Number	所占比例 Proportion/%	基因名称 Name
Growth factor binding	0.000 146 6	4.82	8	<i>C3</i> , <i>Cd36</i> , <i>Cxcl13</i> , <i>Flt1</i> , <i>Igf2r</i> , <i>Il1rn</i> , <i>l2rg</i> , <i>Pdgfa</i>
Cytokine binding	0.002 029 6	4.20	6	<i>Cd36</i> , <i>Cd44</i> , <i>Cxcr4</i> , <i>Il12b</i> , <i>Il1rn</i> , <i>Il2rg</i>
Cytokine receptor activity	0.002 245 4	5.00	5	<i>Cd44</i> , <i>Cxcr4</i> , <i>F3</i> , <i>Il12b</i> , <i>Il2rg</i>
Lipoprotein particle binding	0.000 389 2	10.53	4	<i>Apoe</i> , <i>Cd36</i> , <i>Colec12</i> , <i>Lpl</i>
Cytokine receptor binding	0.000 000 7	4.36	15	<i>Ccl22</i> , <i>Ccl5</i> , <i>Ccl6</i> , <i>Cd44</i> , <i>Csf1</i> , <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl13</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Il12b</i> , <i>Il1b</i> , <i>Il1rn</i> , <i>Mif</i> , <i>Osm</i> , <i>Socs2</i>
Cytokine activity	<0.000 000 1	6.25	15	<i>Areg</i> , <i>Ccl22</i> , <i>Ccl5</i> , <i>Ccl6</i> , <i>Csf1</i> , <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl13</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Il12b</i> , <i>Il1b</i> , <i>Il1rn</i> , <i>Mif</i> , <i>Osm</i> , <i>Spp1</i>
Chemokine receptor binding	0.000 012 8	8.24	7	<i>Ccl22</i> , <i>Ccl5</i> , <i>Ccl6</i> , <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl13</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Cxcl2</i>
Chemokine activity	0.000 000 4	13.73	7	<i>Ccl22</i> , <i>Ccl5</i> , <i>Ccl6</i> , <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl13</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Cxcl2</i>
CXCR chemokine receptor binding	0.000 383 9	18.75	3	<i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl13</i> , <i>Cxcl2</i>
CCR chemokine receptor binding	0.002 199 9	6.67	4	<i>Ccl22</i> , <i>Ccl5</i> , <i>Ccl6</i> , <i>Cxcl13</i>



注：红色标记的是促疼痛的基因，蓝色标记的是抑制疼痛的基因，紫色圈标记的是抗炎性反应基因，绿色圈标记的是促炎性反应基因。

Note: Red marks pain-promoting genes, blue marks pain-suppressing genes, anti-inflammatory-related genes are circled in pink, and pro-inflammatory-related genes are circled in green.

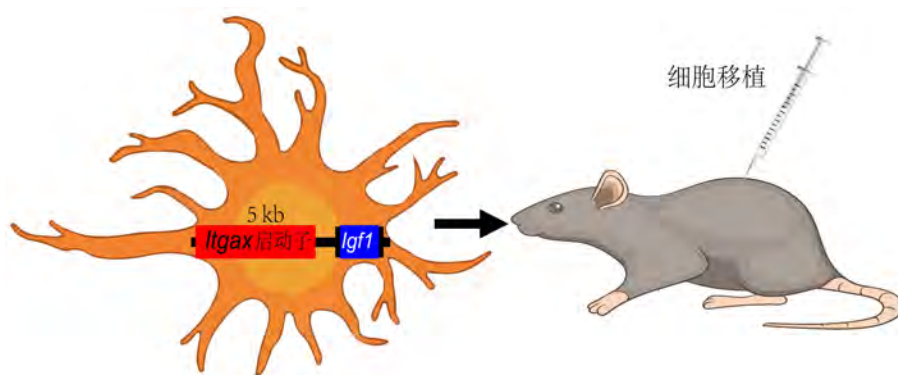
图3 CD11c⁺小胶质细胞中高表达的基因(196个)相互作用(A)和低表达的基因(75个)相互作用(B)

Figure 3 Interaction of highly expressed genes (196) (A) and lowly expressed genes (75) (B) in CD11c⁺ microglia

的亚群，可能存在一部分CD11c⁺小胶质细胞是促炎性反应和疼痛的，后续需要通过单细胞测序确认CD11c⁺小胶质细胞是否是单一的群体细胞类型。

Kohno等^[6]应用的*Itgax-Venus*和*Itgax-DTR-EGFP*转基因小鼠是由5 kb的*Itgax*（即CD11c对应基因）启动子驱动报告基因的表达，表明5 kb的*Itgax*启动子能

非常好地控制外源基因在小鼠小胶质细胞中表达^[9]。可以运用这5 kb的*Itgax*启动子来构建*Itgax-Igf1*敲入的小胶质细胞株（过表达IGF1），推测移植持续分泌IGF的*Itgax-Igf1*敲入的小胶质细胞株至鞘内会有与注射IGF1一样的缓解神经病理性疼痛的效果，而且缓解疼痛的有效时间更长（图4）。



注：*Itgax*即CD11c⁺，*Igf1*即胰岛素样生长因子-1基因。

Note: *Itgax* is CD11c⁺, and *Igf1* is insulin-like growth factor 1.

图4 *Itgax-Igf1*敲入的IGF1过表达的胶质细胞可用于镇痛研究

Figure 4 *Itgax-Igf1* knock-in glial cells with overexpressing IGF1 could be used for analgesic studies

3 研究展望

虽然Kohno等^[6]的发现给出了转化研究的方向，

但还是需要进一步的研究来夯实CD11c⁺小胶质细胞和IGF1成为药物开发靶点的依据。比如需要：（1）检测其他的外周神经损伤小鼠模型中CD11c⁺小胶质细胞激

活的数目, 以及CD11c⁺小胶质细胞在缓解神经病理性疼痛中的功能大小, 因为Tu等^[10]最新研究发现, 椎间盘髓核压迫坐骨神经造成的神经病理性疼痛不依赖小胶质细胞; (2) 确认CD11c⁺小胶质细胞是否也在大鼠、猴和人的脊髓中被外周神经损伤激活, 并且是胶质细胞中主要的起抗炎镇痛的亚群; (3) 确定临床的适应症是哪类神经病理性疼痛; (4) 探明外周神经损伤引起的长期慢性神经病理性疼痛是否会让脑内疼痛传导、感知核团中出现CD11c⁺小胶质细胞; (5) 检查健康的脑内是否存在CD11c⁺小胶质细胞, 如果存在, 那么利用小分子增强CD11c⁺小胶质细胞的功能时是否会对健康大脑产生不利影响, 比如过度抑制脑内炎症反应而不能快速有效地消灭侵入大脑的病原体; (6) 研究鞘内给予IGF1是否会对大脑的功能(如多巴胺神经元的功能)产生不良反应。

而且需要强调, 外周神经损伤诱导的神经病理性疼痛不止有小胶质细胞参与, 还有星形胶质细胞和直接传导疼痛信号的敏化了的外周和脊髓神经元参与, 比如本研究团队发现选择性切断神经(spared nerve injury, SNI)会降低miR-96在小鼠背根神经节和脊髓背角的神经元中的表达, 继而升高电压门控钠离子通道Nav1.7、Nav1.8和Nav1.9的表达, 从而敏化外周和脊髓神经元, 导致机械痛觉敏感^[11]。因此, 靶向CD11c⁺小胶质细胞的治疗药物应用于遗传背景复杂的患者, 其有效率和镇痛效果需要谨慎估算。

另外, 除了对疼痛治疗研究的启发外, Kohno等^[6]的发现也提示CD11c⁺小胶质细胞和IGF1可能抑制炎症相关的神经退行性疾病, 如帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症的发展。这些均值得进一步研究探讨。

[作者贡献 Author Contribution]

彭长庚检索文献、撰写和修改文稿; 富研分析差异表达基因, 制作图3和修改文稿; 朱冯婷制作图1和修改文稿; 夏瑞龙分析差异表达基因, 制作图2及表1, 修改文稿; 夏玮制作图4和修改文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] INOUE K, TSUDA M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(3):138-152. DOI:10.1038/nrn.2018.2.
- [2] CHEN G, ZHANG Y Q, QADRI Y J, et al. Microglia in pain: Detrimental and protective roles in pathogenesis and resolution of pain[J]. *Neuron*, 2018, 100(6): 1292-1311. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.11.009.
- [3] YOUNGER J, MACKEY S. Fibromyalgia symptoms are reduced by low-dose naltrexone: a pilot study[J]. *Pain Med*, 2009, 10(4):663-672. DOI:10.1111/j.1526-4637.2009.00613.x.
- [4] SUMITANI M, UEDA H, HOZUMI J, et al. Minocycline does not decrease intensity of neuropathic pain intensity, but does improve its affective dimension[J]. *J Pain Palliat Care Pharmacother*, 2016, 30(1):31-35. DOI:10.3109/15360288.2014.1003674.
- [5] CURTIN C M, KENNEY D, SUAREZ P, et al. A double-blind placebo randomized controlled trial of minocycline to reduce pain after carpal tunnel and trigger finger release[J]. *J Hand Surg*, 2017, 42(3):166-174. DOI:10.1016/j.jhsa.2016.12.011.
- [6] KOHNO K, SHIRASAKA R, YOSHIHARA K, et al. A spinal microglia population involved in remitting and relapsing neuropathic pain[J]. *Science*, 2022, 376(6588): 86-90. DOI: 10.1126/science.abf6805.
- [7] WLODARCZYK A, HOLTMAN I R, KRUEGER M, et al. A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain[J]. *EMBO J*, 2017, 36(22): 3292-3308. DOI: 10.15252/embj.201696056.
- [8] MCKELVEY R, BERTA T, OLD E, et al. Neuropathic pain is constitutively suppressed in early life by anti-inflammatory neuroimmune regulation[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(2): 457-466. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2315-14.2015.
- [9] BROCKER T, RIEDINGER M, KARJALAINEN K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes *in vivo*[J]. *J Exp Med*, 1997, 185(3):541-550. DOI:10.1084/jem.185.3.541.
- [10] TU Y S, MULEY M M, BEGGS S, et al. Microglia-independent peripheral neuropathic pain in male and female mice[J/OL]. *Pain*. (2022-04-04)[2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35384869/>. DOI:10.1097/j.pain.0000000000002643.
- [11] SUN L T, XIA R L, JIANG J W, et al. MicroRNA-96 is required to prevent allodynia by repressing voltage-gated sodium channels in spinal cord[J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 202:102024. DOI:10.1016/j.pneurobio.2021.102024.

(收稿日期:2022-05-23 修回日期:2022-06-17)

(本文特邀审稿专家:丁玉强,庞晓斌)

(本文编辑:张俊彦,富群华)



刘剑刚, 研究员, 博士生导师, 中国中医科学院西苑医院心血管病中心改善介入术后冠心病心肌缺血研究课题组长。兼任国家自然科学基金项目评审专家、科技部专项课题评审专家、北京市科委专项课题(奖励)评审专家、北京大学中文核心期刊评审专家, 以及中国中西医结合学会微循环专业委员会常务委员、中华中医药学会血栓病专业委员会委员、世界中医药学会联合会心血管病内科委员会理事等社会职务, 同时被聘为《中国药理学通报》和 *Cardiovasc Res* 等国内外多本期刊的编委及审稿专家。主要从事心血管药理学、中药药理学、生物力学和微循环的研究, 承担国家重点基础研究发展规划项目、国家自然科学基金面上项目和北京市 G20 工程创新研究-“十病十药”项目等课题研究, 获得北京市科学技术奖二等奖 3 次、中华中医药学会科学技术奖一等奖 1 次、中国中西医结合学会科学技术奖二等奖 3 次、国家发明专利 7 项(授权)、美国国家发明专利 1 项(授权)。至今在 *Front Cardiovasc Med*、*Neuropsychiatr Dis*

Treat 等国内外专业期刊发表学术论文 270 余篇, 多篇论文入选中国精品科技期刊顶尖学术论文。

不同时期 APP/PS1 模型小鼠嗅球病理和突触形态变化及美金刚干预作用

刘佳妮^{1,2,3}, 刘剑刚¹, 韦云¹, 罗增刚⁴, 李浩¹, 王怡³, 李琨⁵

(1. 中国中医科学院西苑医院, 中国中医科学院老年病研究所, 北京 100091; 2. 中国中医科学院研究生院, 北京 100700; 3. 天津中医药大学, 天津 301617; 4. 北京市中医管理局, 北京 100053; 5. 北京开放大学, 北京 100081)

[摘要] 目的 比较和探讨 6 月龄和 12 月龄的 APP/PS1 双转基因模型小鼠嗅球组织病理形态、超微结构特征、空间记忆能力的变化以及美金刚干预的作用。方法 将 SPF 级 3 月龄雄性 APP/PS1 小鼠按随机数字表法分为 6 月龄、12 月龄的模型组(分别为命名为 6-APP/PS1 组、12-APP/PS1 组)和盐酸美金刚(memantine hydrochloride, MEM)干预组(分别命名为 6-MEM 组、12-MEM 组, MEM 剂量均为 2.60 mg/kg/d), 每组 10 只。另设同龄 C57BL/6 小鼠作为空白对照组。MEM 连续(分别自 3 月龄和 9 月龄)灌胃 3 个月, 非 MEM 处理小鼠接受等容积纯净水灌胃。于 6 月龄和 12 月龄时进行 Morris 水迷宫实验检测, 固定取材进行 HE 染色后光学显微镜下观察嗅球病理组织形态, 超薄切片染色后透射电子显微镜下观察嗅球超微结构。结果 水迷宫结果显示, 与同龄的空白对照组比较, 6-APP/PS1 组和 12-APP/PS1 组小鼠的穿台次数、穿梭目标象限的时间及路程明显降低(均 $P < 0.05$), 且 12-APP/PS1 组比 6-APP/PS1 组的降低程度更明显(均 $P < 0.05$); 与同龄的模型组比较, 6-MEM 组和 12-MEM 组的穿台次数、目标象限停留时间及路程显著提高(均 $P < 0.05$)。组织病理学观察发现, 与同龄的空白对照组比较, 6-APP/PS1 组小鼠嗅球的神经细胞无明显萎缩变形且僧帽细胞数量显著减少($P < 0.05$), 12-APP/PS1 组小鼠嗅球的神经细胞萎缩变形且球周细胞、僧帽细胞数量显著减少(均 $P < 0.05$); 与同龄模型组比较, 6-MEM 组球周细胞无显著增多但僧帽细胞数量显著增多($P < 0.05$), 12-MEM 组球周细胞、僧帽细胞数量有增加趋势但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。超微结构观察显示, 与同龄的空白对照组比较, 6-APP/PS1 组突触结构出现肿胀, 突触后致密物厚度及非对称性突触数量减少; 12-APP/PS1 组突触结构肿胀, 非对称性突触及突触后致密物厚度无法观测。与同龄模型组比较, 6-MEM 组突触肿胀改善明显, 突触后致密物厚度及非对称性突触数量增加; 12-MEM 组突触肿胀改善不明显, 突触后致密物及非对称性突触无法观测。结论 随月龄增加, 不同时期 APP/PS1 小鼠出现了阿尔茨海默病相关的行为学改变, 同时伴随嗅球病理及突触特征的显著变化。MEM 干预不仅改善空间记忆能力, 还可增加 6-APP/PS1 小鼠嗅球的僧帽细胞数量, 减轻突触结构损伤, 早期干预的改善效果显著。

[关键词] 阿尔茨海默病; APP/PS1 转基因小鼠; 嗅球; 突触; 病理形态

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0177-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目: 参芎解毒方干预外泌体介导的 Tau 蛋白脑区扩散致阿尔茨海默病嗅觉及认知障碍的机制研究(81904194)

[第一作者] 刘佳妮(1992—), 女, 博士研究生, 研究方向: 老年病的中西医结合临床研究和基础研究。E-mail: liujiani1110@163.com

[通信作者] 刘剑刚(1963—), 男, 研究员, 研究生导师, 研究方向: 中药药理学及微循环学, 心血管病的中西医结合临床研究和基础研究。E-mail: liujiangang2002@sina.com。ORCID: 0000-0002-2313-4592

韦云(1981—), 女, 副主任医师, 医学博士, 研究生导师, 研究方向: 中西医结合老年病的临床研究和基础研究。E-mail: weiyun_0913@163.com。ORCID: 0000-0001-9270-2701

Pathological and Synaptic Morphological Changes of the Olfactory Bulb in APP/PS1 Model Mice at Different Ages and the Intervention Effect of Memantine

LIU Jiani^{1,2,3}, LIU Jiangang¹, WEI Yun¹, LI Hao⁴, LUO Zenggang¹, WANG Yi³, LI Kun⁵

(1. Xiyuan Hospital, Institute of Geriatrics, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Graduate School of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 4. Beijing Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053, China; 5. Beijing Open University, Beijing 100081, China)

Correspondence to: LIU Jiangang (ORCID: 0000-0002-2313-4592), E-mail: liujiangang2002@sina.com;

WEI Yun (ORCID: 0000-0001-9270-2701), E-mail: weiyun_0913@163.com

[ABSTRACT] Objective To compare and explore the histopathological and ultrastructural characteristics of the olfactory bulb in 6- and 12-month-old APP/PS1 double-transgenic mice and their spatial learning and memory ability, as well as the effects of memantine intervention. **Methods** Three-month-old SPF male APP/PS1 mice were randomly divided into 6- and 12-month-old model groups (named 6-APP/PS1 group and 12-APP/PS1 group, respectively) and memantine (MEM) groups (named 6-MEM group and 12-MEM group, respectively, the dose of MEM was 2.60 mg/kg/d), with 10 mice in each group. Age-matched C57BL/6 mice were used as the blank controls. The mice in the MEM groups were continuously administered MEM (from 3 months and 9 months, respectively) by gavage for 3 months, and the mice in the non-MEM group received equal volume of pure water for 3 months. The Morris water maze test was used to assess spatial learning and memory ability of those mice at 6 months and 12 months of age. After hematoxylin-eosin staining, the pathological morphology of the olfactory bulb was observed under an optical microscope, and the ultrastructure of the olfactory bulb was observed under a transmission electron microscope. **Results** The results of the water maze test revealed that the crossing numbers and the time spent in the target quadrant were significantly decreased in the 6-APP/PS1 and 12-APP/PS1 groups compared with the blank control group of the same age (all $P < 0.05$), whereas the 12-APP/PS1 group showed a more significant decrease than the 6-APP/PS1 group (both $P < 0.05$). Compared with the non-MEM group, the two parameters of the MEM treatment groups increased significantly (all $P < 0.05$). Histopathological observation showed that, compared with the age-matched blank group, the nerve cells in the olfactory bulb had no obvious atrophy and deformation, and the number of mitral cells was significantly reduced in the 6-APP/PS1 group ($P < 0.05$), while the nerve cells in the olfactory bulb were atrophic and deformed, and the number of periglomerular cells and mitral cells were significantly reduced in the 12-APP/PS1 group (all $P < 0.05$). Compared with the non-MEM group, the number of mitral cells were significantly increased in the 6-APP/PS1 group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the number of periglomerular cells and mitral cells in the 12-MEM group (all $P > 0.05$). Ultrastructural observation showed that, compared with the blank control group, the synaptic structure was swollen in the 6-APP/PS1 and 12-APP/PS1 groups, the thickness of the postsynaptic density was reduced and the number of asymmetric synapses decreased in the 6-APP/PS1 group, while the thickness of the postsynaptic density and the number of asymmetric synapses could not be observed clearly in the 12-APP/PS1 group. Compared with the non-MEM group, the synaptic swelling in the 6-MEM group was significantly improved, the thickness of the postsynaptic density and the number of asymmetric synapses increased, but the synaptic swelling in the 12-MEM group was not significantly improved, and the thickness of the postsynaptic density and the number of asymmetric synapses could not be observed. **Conclusion** Changes in the pathology and synaptic ultrastructural morphology of the olfactory bulbs in the APP/PS1 mice correlated with age, accompanied by behavioral alterations. MEM intervention not only improved spatial memory ability in the APP/PS1 mice, but also increased the number of mitral cells and alleviated the damage to the synaptic structure in the 6-APP/PS1 group, with significant improvement in early intervention.

[Key words] Alzheimer's disease; APP/PS1 transgenic mice; Olfactory bulb; Synapses; Pathological morphology

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者在淀粉样蛋白- β (amyloid beta, A β) 斑块沉积和学习记忆障碍开始之前, 往往会出现嗅觉功能障碍, 其典型特征是识别气味的能力下降^[1]。淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) /早老素1 (presenilin 1, PS1) 等双转基因模型AD小鼠也表现出嗅觉受损^[2]。嗅觉功能障碍被认为是AD的前驱症状, 已被提议作为认知障碍的预测因素^[3]。因此, 针对嗅觉功能障碍的干预可能有助于延缓AD患者认知障碍病程的进展。然而目前嗅觉减退的神经机制在很大程度上是未知的。由于通常不会对嗅觉结构进行神经病理学分析^[4], 所以其临床特征与潜在病理学之间的关系尚不清楚, 但有研究者提出AD患者嗅觉障碍可能是由嗅球 (olfactory bulb)、嗅球上皮或嗅皮质受损引起^[5]。

嗅球作为第一个处理嗅觉信息^[6]、最早积累A β 的大脑结构, 其病理变化已被证实可以显示AD的早期神经退行性变化, 便于早期发现、早期干预^[7]。已知嗅觉功能障碍症状会随着年龄的增长而逐渐加重^[8], 同时伴随A β 的沉积和扩散; 嗅球也随着年龄的增长会对A β 的影响变得更加敏感^[9], 更容易促进A β 的积累和释放^[10]。

盐酸美金刚 (memantine hydrochloride, MEM) 是首个经FDA批准应用于治疗中、重度AD的临床药物, 具有调节谷氨酸活性的作用, 属于N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂的代表药物^[11]。多项研究表明, 美金刚可以改善APP^{swe}/PS1 Δ E9 (APP/PS1) 转基因小鼠模型的学习记忆能力^[12-13]。然而, 美金刚对AD嗅觉系统的作用报告并不多见, 尚不清楚美金刚是否能改善APP/PS1小鼠模型的嗅球病理变化。

为了初步评估不同时程APP/PS1双转基因模型小鼠的空间记忆能力和嗅球病理变化, 以及美金刚的治疗作用, 本研究参考相关文献报告^[14], 选取6月龄 (成年期) 和12月龄 (中年期) 的APP/PS1小鼠, 比较美金刚对不同月龄APP/PS1小鼠嗅球病理和突触形态的干预作用, 为美金刚用于治疗AD嗅觉障碍提供初步的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级4周龄雄性APP/PS1双转基因小鼠40只, 4周龄雄性C57BL/6小鼠20只, 体质量均为13~15 g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供 [SCXK (京)

2019-0008], 动物质量合格证号为11401300070455。小鼠饲养于中国中医科学院西苑医院屏障环境实验动物室 [SYXK (京) 2018-0018], 室温控制在24~26 °C, 相对湿度为40%~70%。小鼠自由进食和饮水, 每日光照和黑暗各12 h, 待饲养到3月龄或9月龄后进入分组实验。实验过程中严格遵循实验动物3R原则, 按照国家科技部《关于善待实验动物的指导性意见》和北京市《实验动物福利伦理审查技术规范》的要求执行。本研究方案经过中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会审查通过 (伦理审批号为2018XLC012-2)。

1.2 主要试剂与仪器

MEM片 (H.Lundbeck A/S 丹麦灵北制药有限公司生产, 进口药品注册证号为H20120268、H20130372) 由中国中医科学院西苑医院药剂科提供; 丙酮 (批号20170411, 进口分装) 由国药集团化学试剂有限公司提供; Spon 812包埋剂 (批号ZB-S0060) 购自美国SPI公司; 戊巴比妥钠 (批号T860901, 进口分装) 由佛山市化工实验厂提供; 甲醛溶液 (批号C10561782) 购自上海麦克林生化科技有限公司。ZS-001型Morris水迷宫系统由北京众实迪创公司生产; H-7650型透射电镜由日立 (日本) 公司生产; BX43型光学显微镜由日本奥林巴斯公司生产; RM2245型半自动轮转式切片机、ASP200S型全自动脱水机、EG11型自动包埋机和EM UC6超薄切片机均由德国Leica公司生产。

1.3 动物模型和分组

APP/PS1双转基因小鼠常规饲养至3月龄时, 根据数字表法随机分为6月龄模型组 (6-APP/PS1组)、12月龄模型组 (12-APP/PS1组), 以及使用药物干预APP/PS1双转基因小鼠的6月龄MEM组 (6-MEM组)、12月龄MEM组 (12-MEM组)。另设空白对照组, 即常规饲养至3月龄时的C57BL/6小鼠分为6月龄C57组 (6-C57组)、12月龄C57组 (12-C57组)。以上每组各10只。空白组和模型组均以等体积纯净水灌胃, MEM组每日以MEM 2.6 mg/kg水溶液灌胃给药。两组小鼠分别在3月龄和饲养至9月龄时开始灌胃给药, 药液体积为0.1~0.2 mL/10 g, 均灌胃3个月, 分别至6月龄和12月龄时进行水迷宫行为学检测。

1.4 水迷宫法检测小鼠行为学变化

采用Morris水迷宫评估小鼠的空间学习记忆能力^[15]。Morris水迷宫由一个直径1 m、高0.6 m的圆形水池组成, 水位为35 cm, 水温保持在23 °C。添加脱脂奶粉使池水变得不透明。逃生平台位于水池的一个

象限内, 位于水面以下 1 cm 处。小鼠依次放置在其他 3 个不同象限的水池中, 每只小鼠有 90 s 的时间爬上平台, 并允许在平台上停留 5 s, 若小鼠找不到平台则引导其上到平台。通过每日 4 次、连续 5 d 的训练, 小鼠获得了关于逃生平台位置的空间记忆。第 5 天训练后 24 h, 移除平台, 再让小鼠在池中游 90 s, 记录和分析小鼠在原平台位置的穿越次数 (即穿台次数)、在目标平台象限的停留时间和路程 (即目标象限时间、目标象限路程), 以及总路程。

1.5 HE 染色观察小鼠嗅球病理形态

在 Morris 水迷宫测试后次日, 小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg 体重) 深度麻醉, 低温下快速取出嗅球。每组随机取 5 只小鼠的嗅球组织, 用质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定, 常温下保存。组织浸泡后, 包埋浸蜡, 切片脱蜡, 二甲苯浸洗 3 次, 每次 15 min; 100%、90%、80% 和 70% 梯度乙醇脱苯, 每次 3 min; 自来水冲洗 3 min, 去离子水漂洗 3 min; 苏木精染液染色 10 min 后水洗, 盐酸乙醇分色, 2 s 后水洗; 1% 伊红染液染色 1 min, 去离子水稍水洗; 100%、90%、80% 和 70% 梯度乙醇脱水, 每次 1 min; 二甲苯透明 3 次, 每次 15 min; 中性树胶封固后, 每张切片分别于 40 倍和 200 倍光学显微镜下观察嗅球病理组织形态, 并进行拍照, 采用 Image Pro Premier 图像分析系统进行分析。

1.6 超薄切片染色观察小鼠嗅球超微形态

另 5 只小鼠嗅球组织用 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液固定, 保存于 4 °C 冰箱。使用振动切片机将嗅球冠状切成厚度约 0.2 mm 的切片, 然后用 4% 戊二醛固定 2 h 以上, 再将嗅球组织切片暴露于 1% 锇酸固定液 2 h, 用 PBS 漂洗 3 次 (5 min/次), 50%、70%、90% 和 100% 梯度丙酮脱水 (每次 15 min), 然后梯度浸透 (丙酮和包埋剂比例依次为 2 : 1、1 : 1、0 : 1, 各 2 h), 烤箱烘干 (36 ~ 60 °C, 12 ~ 48 h) 形成包埋块。用超薄切片机行 70 nm 切片, 附于铜网上, 超薄切片分别用醋酸铀溶液和柠檬酸染液染色 30 min, 然后用透射电子显微镜观察嗅球中神经和突触的超微结构改变。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。数据进行正态分布检验, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较时采用单因素方差分析, 方差齐时采用 Tukey 检验, 方差不齐时采用 Games-Howell 检验。不符合正态分布的计量资料以中位数 (四分位数间距) 表示,

组间比较时使用非参数检验的 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

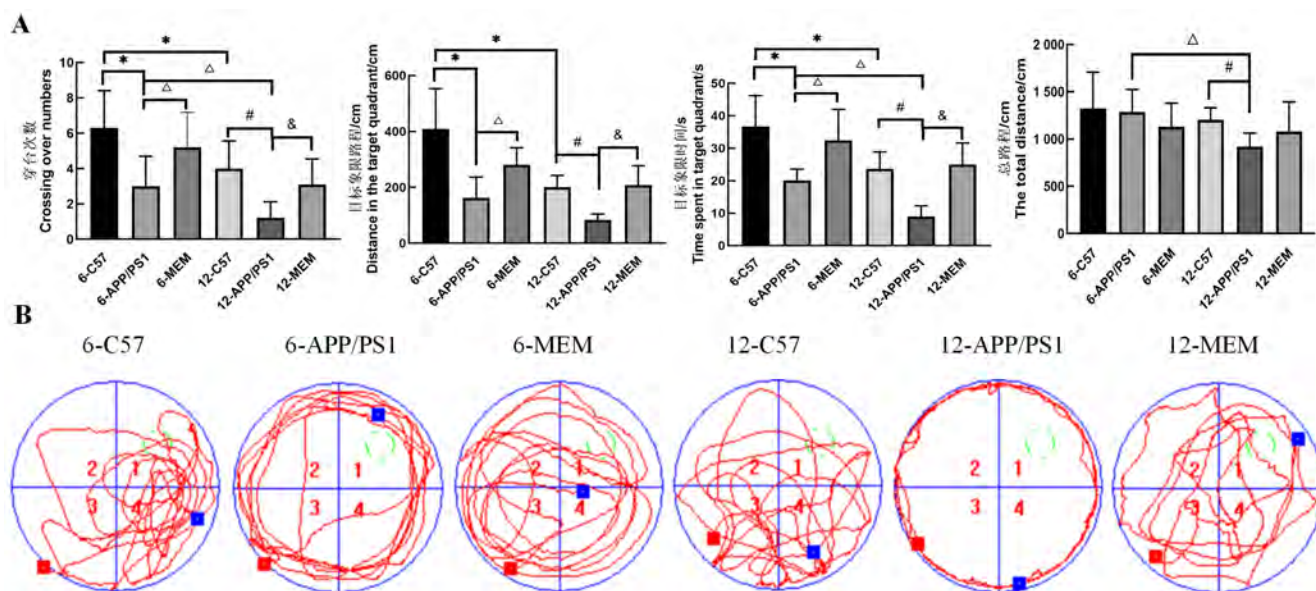
2.1 不同病程 APP/PS1 模型小鼠的空间记忆能力变化

连续 5 d 训练小鼠记住逃生平台的位置后, 对第 6 天小鼠空间探索实验的穿台次数、目标象限时间、目标象限路程和总路程进行分析。与 6-C57 组比较, 6-APP/PS1 组的穿台次数减少 ($P < 0.05$), 目标象限时间和路程缩短 ($P < 0.05$)。与 12-C57 组比较, 12-APP/PS1 组小鼠穿台次数明显减少 ($P < 0.05$), 目标象限时间和路程显著缩短 ($P < 0.05$)。与 6-C57 组比较, 12-C57 组小鼠穿台次数减少 ($P < 0.05$), 目标象限时间和路程缩短 ($P < 0.05$)。与 6-APP/PS1 比较, 经过 MEM (2.6 mg/kg) 干预后, 6-MEM 组穿台次数显著增加 ($P < 0.05$), 目标象限时间和路程明显延长 ($P < 0.05$)。和 12-APP/PS1 比较, 12-MEM 组穿台次数增加 ($P < 0.05$), 目标象限时间和路程明显延长 ($P < 0.05$)。总路程上, 6-C57 组和 6-APP/PS1 组无明显差异 ($P > 0.05$), 而 12-APP/PS1 组小鼠比 12-C57 组显著缩短 ($P < 0.05$), 其余各组无显著差异。实验结果表明, 美金刚治疗改善了 APP/PS1 小鼠的空间记忆能力。结果见图 1A。

在空间探索实验中, C57 组小鼠通常采用趋向平台式的搜索方式, 而 APP/PS1 组则多采用随机式或边缘式的搜索策略, 提示 APP/PS1 组小鼠空间记忆能力出现损伤; MEM 干预后的 APP/PS1 小鼠显示倾向使用趋向平台式的搜索方式, 说明 MEM 能提高 APP/PS1 小鼠的空间记忆能力。结果见图 1B。

2.2 不同病程 APP/PS1 模型小鼠的嗅球病理变化

HE 染色后光学显微镜下观察结果 (图 2) 显示, 6-C57 组小鼠的嗅球在低倍镜 ($\times 40$) 下呈卵圆形, 结构完整清晰, 内层可见大量神经元呈环状、层状排布, 规则紧密, 细胞核呈圆形, 自外向内依次可观察到嗅神经层、小球层 (glomerular layer)、外丛状层、僧帽细胞层、内丛状层和颗粒细胞层; 高倍镜 ($\times 200$) 下可见小球层紧致, 边界清楚, 呈球形排列, 每个突触小球周围的球周细胞 (periglomerular cells) 分布密集。外丛状层细胞深部可见僧帽细胞 (mitral cells) 胞体较大, 胞质丰富。



注：A 图示不同时期各组小鼠的穿台次数、目标象限路程、目标象限时间和总路程；B 图示各组小鼠在水迷宫中游泳轨迹（绿色线圈为原逃生平台位置，红色方块为入水点，蓝色方块为 90 s 截止录制点）。6-C57 指 6 月龄的空白对照组 C57BL/6 小鼠；6-APP/PS1 指 6 月龄的模型组 APP/PS1 双转基因小鼠；6-MEM 指从 3 月龄开始用 2.6 mg/kg 盐酸美金刚干预至 6 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠；12-C57 指 12 月龄的空白对照组 C57BL/6 小鼠；12-APP/PS1 指 12 月龄的模型组 APP/PS1 双转基因小鼠；12-MEM 指从 9 月龄开始用 2.6 mg/kg 盐酸美金刚干预至 12 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠。每组 10 只小鼠。与 6-C57 相比， $^*P < 0.05$ ；与 12-C57 相比， $^*P < 0.05$ ；与 6-APP/PS1 相比， $^{\Delta}P < 0.05$ ；与 12-APP/PS1 相比， $^{\&}P < 0.05$ 。

Note: Fig. A shows the crossing numbers, distance in the target quadrant, time spent in the target quadrant, and the total distance of mice in each group. Fig. B shows the swimming track of mice in each group in the water maze (the green circle represents the position of the original escape platform, the red dot represents the entry point, and the blue dot represents the 90 s cut-off point). 6-C57 refers to 6-month-old C57BL/6 mice in the blank control group. 6-APP/PS1 refers to 6-month-old APP/PS1 double transgenic mice in the model group; 6-MEM refers to APP/PS1 double transgenic mice treated with 2.6 mg/kg memantine hydrochloride from 3- to 6-month-old; 12-C57 refers to 12-month-old C57BL/6 mice; 12-APP/PS1 refers to 12-month-old APP/PS1 double transgenic mice; 12-MEM refers to APP/PS1 double transgenic mice treated with 2.6 mg/kg memantine hydrochloride from 9- to 12-month-old. Each group contained 10 mice. Compared with 6-C57, $^*P < 0.05$; compared with 12-C57, $^*P < 0.05$; compared with 6-APP/PS1, $^{\Delta}P < 0.05$; compared with 12-APP/PS1, $^{\&}P < 0.05$.

图1 Morris 水迷宫实验评估各组小鼠的行为学变化

Figure 1 Morris water maze test to evaluate the behavioral changes of mice in each group

与 6-C57 组相比，6-APP/PS1 组低倍镜 ($\times 40$) 下可见嗅球层状结构完整清晰，突触小球无明显变化；高倍镜 ($\times 200$) 下可见部分突触小球周围的球周细胞分布稀疏且数量稍减少，僧帽细胞萎缩且数量明显减少。

与 6-APP/PS1 组相比，6-MEM 组低倍镜 ($\times 40$) 下可见嗅球形态较好，各细胞层结构较完整，小球层稍松散但均匀分布，呈球形结构，数量较多；高倍镜 ($\times 200$) 下可见球周细胞数量稍增多，僧帽细胞数量则明显增多。

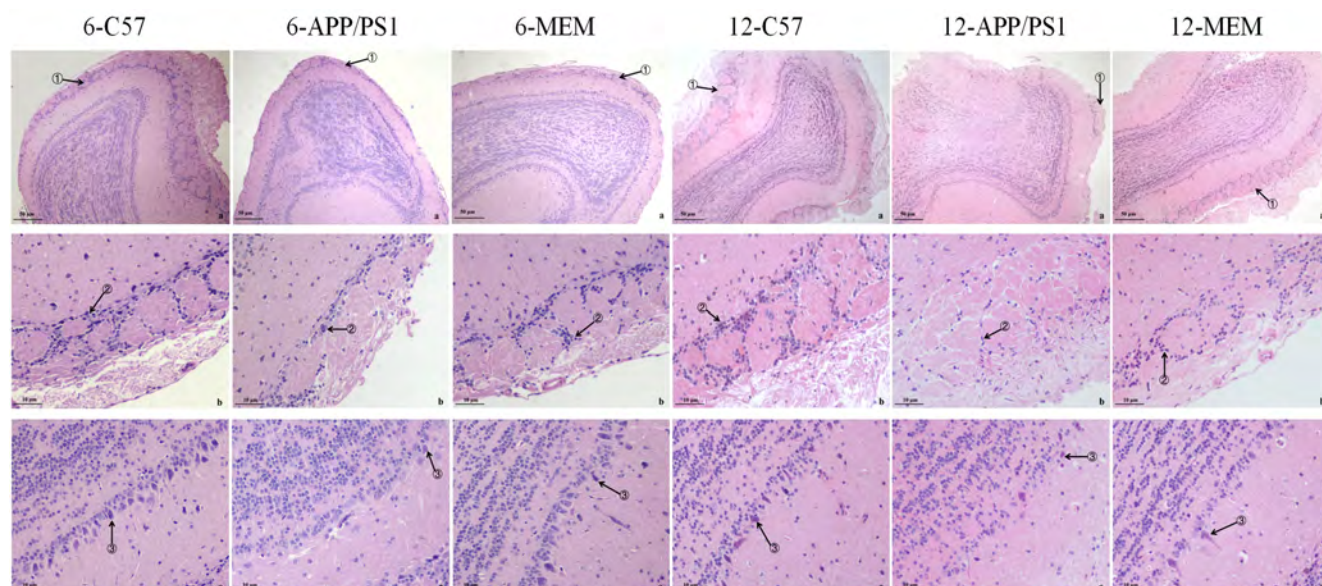
与 6-C57 组相比，12-C57 组低倍镜 ($\times 40$) 下可见嗅球形态出现轻度改变，各细胞层结构尚完整，小球层部分欠均匀分布，边界尚清楚；高倍镜 ($\times 200$) 下可见球周细胞稍减少，僧帽细胞密度下降。

与 12-C57 组相比，12-APP/PS1 组的部分嗅球层结构缺失，小球层松散且数量变少；高倍镜 ($\times 200$)

下突触小球数量减少伴有结构不清，周围的球周细胞明显减少，僧帽细胞数量大幅减少。

与 12-APP/PS1 组相比，12-MEM 组低倍镜 ($\times 40$) 下可见嗅球形态轻度变形，结构尚完整，小球层结构部分欠均匀分布，边界尚清楚；高倍镜 ($\times 200$) 下可见球周细胞和僧帽细胞数量稍增多。

统计分析各组小鼠嗅球中球周细胞和僧帽细胞的数量 (图 3)，结果发现 APP/PS1 小鼠 6 月龄时嗅球病理形态与 C57BL/6 小鼠无显著差异，僧帽细胞数量开始出现减少 ($P < 0.05$)；12 月龄可观察到嗅球的球周细胞和僧帽细胞数量均显著减少 ($P < 0.05$)。与同龄的 APP/PS1 小鼠相比，MEM 干预后，6 月龄时嗅球的僧帽细胞数量增加 ($P < 0.05$)，而 12 月龄时球周细胞及僧帽细胞数量无明显增加 ($P > 0.05$)。结果说明，MEM 有助于缓解嗅球病理学损伤，且在早期干预效果更加明显。



注：图a示低倍镜下嗅球（×40），图b示高倍镜下小球层（×200），图c示高倍镜下僧帽细胞层（×200）。箭头①为突触小球，箭头②为球周细胞，箭头③为僧帽细胞。6-C57指6月龄的空白对照组C57BL/6小鼠；6-APP/PS1指6月龄的模型组APP/PS1双转基因小鼠；6-MEM指从3月龄开始用2.6 mg/kg 盐酸美金刚干预至6月龄的APP/PS1双转基因小鼠；12-C57指12月龄的空白对照组C57BL/6小鼠；12-APP/PS1指12月龄的模型组APP/PS1双转基因小鼠；12-MEM指从9月龄开始用2.6 mg/kg 盐酸美金刚干预至12月龄的APP/PS1双转基因小鼠。每组5只小鼠。

Note: Fig. a is the olfactory bulb (×40); Fig. b is the glomerular layer (×200); Fig. c is the mitral cell layer (×200). Arrows ①, ②, and ③ show glomeruli, periglomerular, and mitral cells, respectively. 6-C57 refers to 6-month-old C57BL/6 mice in the blank control group; 6-APP/PS1 refers to 6-month-old APP/PS1 double transgenic mice in the model group; 6-MEM refers to APP/PS1 double transgenic mice treated with 2.6 mg/kg memantine hydrochloride from 3- to 6-month-old; 12-C57 refers to 12-month-old C57BL/6 mice; 12-APP/PS1 refers to 12-month-old APP/PS1 double transgenic mice; 12-MEM refers to APP/PS1 double transgenic mice treated with 2.6 mg/kg memantine hydrochloride from 9- to 12-month-old. Each group contained five mice.

图2 HE染色后光学显微镜观察各组小鼠的嗅球病理变化

Figure 2 Pathological changes of the olfactory bulb in mice in each group observed by optical microscopy after hematoxylin-eosin staining

2.3 不同时期APP/PS1模型小鼠的嗅球神经超微结构改变

超薄切片染色后透射电子显微镜观察结果（图4A）显示，6-C57组小鼠嗅球组织神经细胞形态正常，呈椭圆形，结构清晰；细胞膜完整；核仁明显，大小基本正常；染色质分布较均匀，偶有染色质凝聚。6-APP/PS1组小鼠嗅球神经元形态尚规则，少量胞体及细胞器肿胀；细胞核形态有改变，出现分叶；核膜凹陷形成核裂，染色质浓缩边集，部分核仁消失。6-MEM组小鼠嗅球神经元形态得到改善，形态较为规则，细胞膜偶有不连续；细胞核较为完整，可见部分细胞存在核仁；染色质部分边集，分布尚均匀。

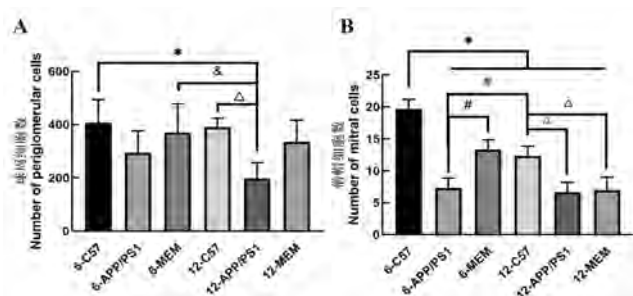
12-C57组小鼠嗅球组织神经细胞形态基本正常，部分结构不清晰，细胞膜尚连续，染色质出现边集趋势，细胞内脂褐素增多。12-APP/PS1组小鼠神经细胞失去正常形态，出现广泛水肿、变性和坏死，形态不规则；细胞核形态明显改变，染色质高度凝聚，细胞

核固缩、溶解或核仁消失。12-MEM组小鼠嗅球组织神经细胞异常形态较多，胞体水肿，部分细胞核形态改变，染色质边集。

随着月龄增加，APP/PS1小鼠的嗅球神经元变性程度逐渐加重，可见嗅球神经元形态不规则，尤其染色质会出现明显的凝聚边集现象。与APP/PS1小鼠相比，MEM可使细胞形态更规则完整，染色质边集情况一定程度减轻，且6-MEM比12-MEM改善更加明显。结果说明，MEM早期干预有助于改善APP/PS1模型小鼠嗅球神经元超微结构的损伤。

2.4 不同时期APP/PS1模型小鼠的嗅球突触超微结构改变

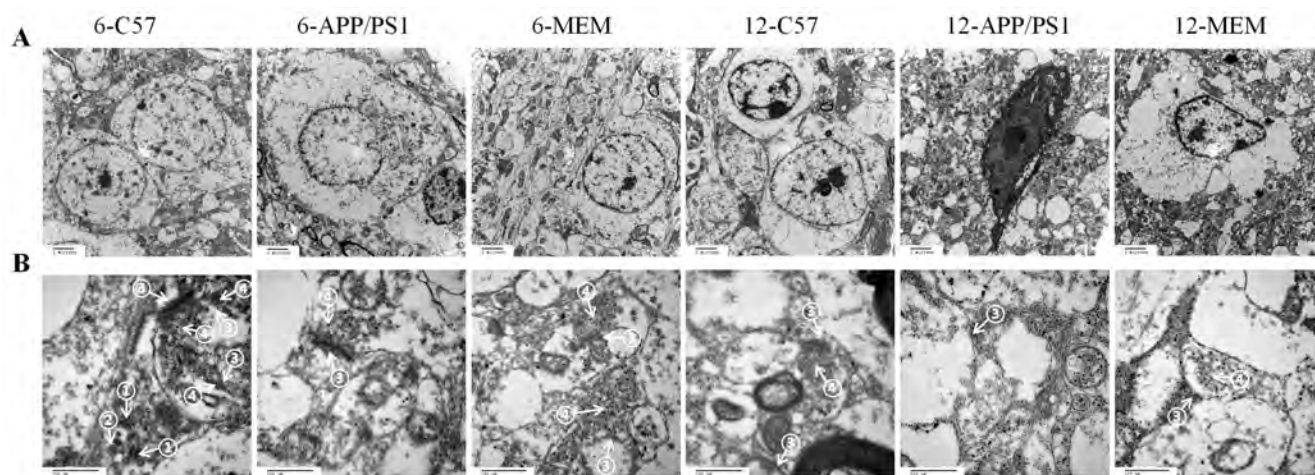
超薄切片染色后透射电子显微镜观察结果（图4B）显示，6-C57组小鼠嗅球组织突触结构正常，可见大量对称性突触（抑制性突触）和非对称性突触（兴奋性突触），突触界面完整清晰，突触膜后致密物（postsynaptic density, PSD）较厚，突触前囊内有大量



注: 6-C57指6月龄的空白对照组C57BL/6小鼠; 6-APP/PS1指6月龄的模型组APP/PS1双转基因小鼠; 6-MEM指从3月龄开始用2.6 mg/kg 盐酸美金刚干预至6月龄的APP/PS1双转基因小鼠; 12-C57指12月龄的空白对照组C57BL/6小鼠; 12-APP/PS1指12月龄的模型组APP/PS1双转基因小鼠; 12-MEM指从9月龄开始用2.6 mg/kg 盐酸美金刚干预至12月龄的APP/PS1双转基因小鼠。每组5只小鼠。与6-C57相比, * $P < 0.05$; 与12-C57相比, * $P < 0.05$; 与6-APP/PS1相比, Δ $P < 0.05$; 与12-APP/PS1相比, & $P < 0.05$ 。

Note: 6-C57 refers to 6-month-old C57BL/6 mice in the blank control group; 6-APP/PS1 refers to 6-month-old APP/PS1 double transgenic mice in model group; 6-MEM refers to APP/PS1 double transgenic mice treated with 2.6 mg/kg memantine hydrochloride from 3- to 6-month-old; 12-C57 refers to 12-month-old C57BL/6 mice; 12-APP/PS1 refers to 12-month-old APP/PS1 double transgenic mice; 12-MEM refers to APP/PS1 double transgenic mice treated with 2.6 mg/kg memantine hydrochloride from 9- to 12-month-old. Each group contained five mice. Compared with 6-C57, * $P < 0.05$; compared with 12-C57, * $P < 0.05$; compared with 6-APP/PS1, Δ $P < 0.05$; compared with 12-APP/PS1, & $P < 0.05$.

图3 美金刚对球周细胞(A)和僧帽细胞(B)的影响
Figure 3 Effects of memantine on periglomerular cells (A) and mitral cells (B)



注: 6-C57指6月龄的空白对照组C57BL/6小鼠; 6-APP/PS1指6月龄的模型组APP/PS1双转基因小鼠; 6-MEM指从3月龄开始用2.6 mg/kg 盐酸美金刚干预至6月龄的APP/PS1双转基因小鼠; 12-C57指12月龄的空白对照组C57BL/6小鼠; 12-APP/PS1指12月龄的模型组APP/PS1双转基因小鼠; 12-MEM指从9月龄开始用2.6 mg/kg 盐酸美金刚干预至12月龄的APP/PS1双转基因小鼠。每组5只小鼠。箭头①示对称性突触, 箭头②示突触小泡 (内含抑制性神经递质), 箭头③示非对称性突触, 箭头④示突触小泡 (内含兴奋性神经递质)。

Note: 6-C57 refers to 6-month-old C57BL/6 mice in the blank control group; 6-APP/PS1 refers to 6-month-old APP/PS1 double transgenic mice in model group; 6-MEM refers to APP/PS1 double transgenic mice treated with 2.6 mg/kg memantine hydrochloride from 3- to 6-month-old; 12-C57 refers to 12-month-old C57BL/6 mice; 12-APP/PS1 refers to 12-month-old APP/PS1 double transgenic mice; 12-MEM refers to APP/PS1 double transgenic mice treated with 2.6 mg/kg memantine hydrochloride from 9- to 12-month-old. Each group contained five mice. Arrows ① show symmetric synapses, arrows ② show synaptic vesicles (containing inhibitory neurotransmitters), arrows ③ show asymmetric synapses, and arrows ④ show synaptic vesicles (containing excitatory neurotransmitters).

图4 超薄切片染色后透射电子显微镜观察各组小鼠嗅球神经(A, ×7 000)和突触(B, ×60 000)细胞超微结构

Figure 4 Ultrastructure of the olfactory bulb nerve cells (A, ×7 000) and synapses (B, ×60 000) in each group observed by transmission electron microscope after ultrathin section staining

神经递质小泡, 突触小泡膜结构清晰正常。与6-C57组相比, 6-APP/PS1组突触结构出现肿胀, 突触界面损伤, PSD厚度减小, 对称性突触数量减少, 突触小泡膜结构损伤。与6-APP/PS1组相比, 6-MEM组突触形态有一定改善, 突触界面较清晰, 神经递质小泡较多, 对称性突触数量增多。

12-C57组小鼠嗅球组织突触数量略有减少, 非对称性突触膜结构欠清晰, 突触小泡数量减少。与12-C57组相比, 12-APP/PS1组突触结构损害加重, 形态不规则, 突触体广泛肿胀、变性, 镜下呈颗粒样, 突触界面和突触小泡无法分辨。与12-APP/PS1组相比, 12-MEM组突触改善不明显, 仍有部分肿胀, 突触界面不清晰, 突触数量及突触小泡数量无明显增加。其中12-APP/PS1组以及12-MEM组由于突触体肿胀和镜下颗粒样变化, 无法对突触、囊泡数量和PSD厚度进行准确计数以及长度测量。

结果显示不同月龄的C57BL/6、APP/PS1小鼠以及MEM干预后APP/PS1小鼠的嗅球突触超微结构改变, 表明在衰老过程中, APP/PS1小鼠显示出比与其年龄匹配的C57BL/6小鼠相对更显著的突触结构受损, 而MEM可以改善这种突触损害, 且早期干预的改善效果更明显。

3 讨论

AD是一种以进行性记忆缺陷和认知能力下降为特征的神经退行性疾病。针对AD的APP/PS1模型动物的认知缺陷在水迷宫测试中已经得到了证实^[16], APP/PS1小鼠空间记忆受损最早可在6月龄时出现^[17], 12月龄时认知和行为缺陷明显^[18], 且记忆损害会在该模型的后续生命发展中持续存在^[19]。本研究发现, 与6-C57组相比, 12-C57组小鼠的空间记忆能力有显著下降, 与以往文献报告^[20]相符。在6月龄时APP/PS1转基因小鼠的空间记忆障碍开始出现, 在12月龄时小鼠空间记忆功能严重受损。既往研究表明, 用美金刚治疗可以改善转基因AD小鼠模型的学习记忆缺陷以及突触神经传递^[21], 本研究给予APP/PS1小鼠美金刚灌胃治疗, 证明美金刚可以恢复不同月龄APP/PS1小鼠的空间记忆能力。此外, 本研究初步阐述了美金刚可能对AD嗅觉结构改善有作用。

嗅觉减退是AD常见的临床前驱症状^[22], 超过90%的AD患者都会存在嗅觉功能障碍^[23]。嗅觉功能障碍伴随着嗅觉结构的病理改变和细胞损伤, 其中嗅球对AD病理学高度敏感, 特别容易出现功能障碍, 也是最早积累A β 的大脑结构之一。Moriguchi等^[24]研究显示, 小鼠嗅球切除会引起认知缺陷, 并降低海马中的胆碱能活性, 说明嗅球与认知障碍密切相关。僧帽细胞是嗅球中最主要的投射神经元, 在嗅觉信息的传递和加工中具有重要作用, 而球周细胞会对僧帽细胞的电活动进行相关调控。本实验结果表明, 6月龄APP/PS1小鼠嗅球内开始出现僧帽细胞数量下降, 12月龄APP/PS1小鼠部分嗅球的神经细胞形态萎缩变形, 尤其球周细胞和僧帽细胞数量显著减少。既往实验证实, APP/PS1小鼠在6~10月龄时出现严重的嗅觉缺陷^[25]; 结合本研究结果推测, 这可能与嗅球神经细胞萎缩变形以及球周细胞和僧帽细胞数量减少有关, 而MEM的早期干预可以改善APP/PS1小鼠嗅球病理形态的变化, 增加僧帽细胞数量, 保护神经元结构的完整。

嗅球具有多种类型的神经递质, 其中谷氨酸和 γ -氨基丁酸等是最常见最重要的递质, 这些神经递质的改变被认为是记忆障碍的主要原因之一^[26]。僧帽细胞以谷氨酸作为神经递质^[27], 球周细胞以 γ -氨基丁酸和多巴胺作为神经递质^[28], 其中谷氨酸是中枢神经系统中一种重要的兴奋性神经递质, 通过特异性受体发挥作用, 例如N-甲基-D-天冬氨酸受体。谷氨酸兴奋性毒性会引发神经元持续性去极化, 造成神经功能异

常, 是AD进展的重要原因之一^[29]。而MEM属于非竞争性N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂, 可以阻断谷氨酸浓度病理性升高导致的神经元损伤^[30], 还可通过N-甲基-D-天冬氨酸受体减少不溶性A β 含量, 然后恢复AD动物模型中的谷氨酸稳态^[31]。笔者推测MEM干预后嗅球内病理形态改善、僧帽细胞数量增加可能与其减轻了嗅球中A β 的积累、减轻谷氨酸诱导的僧帽细胞损伤有关。

突触损伤是AD病理生理学中的早期和关键事件, 突触变化的可能后果就是学习和记忆功能受损^[32]。与A β 斑块、神经原纤维缠结或神经元丢失相比, 突触损伤与AD患者中观察到的认知缺陷更相关^[33]。目前AD突触研究大量集中在海马^[34]、皮质等领域, 极少涉及嗅球。有研究表明, 6~7月龄之后的APP/PS1转基因AD模型小鼠嗅球的树突棘密度显著降低, 突触小泡破损, PSD厚度降低^[35]。本研究发现, 6月龄APP/PS1小鼠突触结构出现肿胀, 12月龄小鼠的突触结构损伤更为严重, 突触界面无法分辨, 与以往文献报告结果相同。MEM干预3个月后可缓解APP/PS1小鼠的突触损伤, 早期(3月龄)较晚期(9月龄)时进行干预的改善效果更明显。异常的神经网络兴奋性是AD的一个普遍特征。Palop等^[36]研究表明, 中等水平的A β 可以增强突触前活动及突触传递, 而高水平的A β 会降低谷氨酸能突触传递并最终导致突触丢失。另外, Wesson等^[37]认为嗅球的早期神经元过度兴奋可能增强A β 的突触后释放。因此, 异常的神经网络兴奋性与A β 的产生、释放之间形成了恶性循环, 这种恶性循环可能加速AD的发病。笔者推测美金刚在A β 低浓度阶段的早期(3月龄)干预降低了嗅球神经元的过度兴奋及其对A β 的积累和传递, 从而改善了6-APP/PS1组小鼠的突触结构。

认知障碍主要是由与年龄相关的神经病变累积驱动^[38], 同时自然老化过程也是影响嗅觉功能的主要因素之一^[39]。有研究认为, 嗅觉功能障碍已被确定为老年人5年死亡率的最佳预测指标^[40]。本研究观察到, 与6-C57相比, 12-C57的僧帽细胞密度下降, 突触小泡数量减少, 说明随月龄增加, C57BL/6小鼠不仅会出现空间记忆能力的下降, 嗅球也会出现超微结构的早期改变, 提示老化是影响认知功能和嗅觉病理的重要因素。研究显示, APP/PS1转基因小鼠嗅球中A β 负荷呈年龄依赖性增加^[41], 而嗅觉系统中A β 沉积物会促进啮齿类动物的AD病理学改变^[42]。本实验发现, 与12-C57相比, 12-APP/PS1小鼠的空间记忆能力有

显著下降,球周细胞、僧帽细胞数量大幅减少,突触结构损害加重,突触体广泛肿胀、变性,说明 APP/PS1 小鼠在衰老过程中比正常同龄小鼠更容易出现认知功能障碍和嗅球病理改变,而嗅觉系统的显著病理改变可能是加重空间学习记忆障碍的重要原因。

美金刚可以减少嗅球神经元的损伤,增加僧帽细胞数量,改善突触结构。根据既往研究推测,美金刚可能通过阻断谷氨酸浓度的升高、减少 AD 早期嗅球神经元过度活跃,减少脑内 A β 的产生和传播,从而改善空间记忆能力。未来本研究组将重点研究 AD 模型小鼠空间记忆与嗅球内部神经震荡、神经元活动的相关性,以此探讨美金刚在 AD 嗅觉障碍临床应用中的潜在机制。此外,AD 嗅觉缺陷是由于中枢还是外周嗅觉神经系统的功能障碍所引起,目前这一问题仍不明确。大脑皮层和边缘系统都有可能是 AD 嗅觉障碍的原因。美金刚对嗅觉投射的大脑皮层(颞叶)、边缘系统(杏仁核、海马和下丘脑)等其他嗅觉系统及认知功能的影响,也需要更多的基础实验和临床试验来明确。

综上所述,本实验初步观察了不同时程 APP/PS1 双转基因小鼠嗅球病理和超微结构的变化,发现美金刚早期干预可能是改善 AD 嗅球病理改变的有效方法,但这一结果还需要进一步的研究加以证实。

【医学伦理声明 Medical Ethics Statement】

本研究涉及的所有动物实验均已通过中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会审查批准(No. 2018XLC012-2)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Medical Ethics Committee of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences (Approval Letter No. 2018XLC012-2), and all experimental protocols were carried out following the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892—2018), ARRIVE 2.0, IGP 2012 and IAVE 2010.

【作者贡献 Author Contribution】

刘佳妮负责具体的动物实验操作、数据统计与分析、文章撰写及修改;刘剑刚和韦云负责研究思路设计、实验课题申报、实验方案制定、部分实验操作、伦理委员会审批程序并提供文件信息,以及修改文章;罗增刚、李浩和王怡提供技术援助并负责论文审核及把关;李琨收集资料并辅助数据分析与核对。

【利益声明 Declaration of Interest】

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献 References】

- [1] DIBATTISTA M, PIFFERI S, MENINI A, et al. Alzheimer's disease: what can we learn from the peripheral olfactory system? [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 440. DOI: 10.3389/fnins.2020.00440.
- [2] CHEN M, CHEN Y N, HUO Q W, et al. Enhancing GABAergic signaling ameliorates aberrant gamma oscillations of olfactory bulb in AD mouse models [J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16(1): 14. DOI: 10.1186/s13024-021-00434-7.
- [3] XU Z P, YANG S L, ZHAO S, et al. Biomarkers for early diagnostic of mild cognitive impairment in type-2 diabetes patients: a multicentre, retrospective, nested case-control study [J]. *EBioMedicine*, 2016, 5: 105-113. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.02.014.
- [4] SAIZ-SANCHEZ D, FLORES-CUADRADO A, UBEDA-BAÑON I, et al. Interneurons in the human olfactory system in Alzheimer's disease [J]. *Exp Neurol*, 2016, 276: 13-21. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.11.009.
- [5] DOTY R L. Olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases: is there a common pathological substrate? [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(6): 478-488. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30123-0.
- [6] DAMMALI M, DEY G, MADUGUNDU A K, et al. Proteomic analysis of the human olfactory bulb [J]. *OMICS*, 2017, 21(8): 440-453. DOI: 10.1089/omi.2017.0084.
- [7] MURPHY C. Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(1): 11-24. DOI: 10.1038/s41582-018-0097-5.
- [8] ROUBY C, THOMAS-DANGUIN T, VIGOUROUX M, et al. The Lyon clinical olfactory test: validation and measurement of hyposmia and anosmia in healthy and diseased populations [J]. *Int J Otolaryngol*, 2011, 2011: 203805. DOI: 10.1155/2011/203805.
- [9] BALLEZA-TAPIA H, HUANOSTA-GUTIÉRREZ A, MÁRQUEZ-RAMOS A, et al. Amyloid β oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2010, 7(5): 453-462. DOI: 10.2174/156720510791383859.
- [10] DANDO S J, MACKAY-SIM A, NORTON R, et al. Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2014, 27(4): 691-726. DOI: 10.1128/cmr.00118-13.
- [11] MCSHANE R, WESTBY M J, ROBERTS E, et al. Memantine for dementia [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 3(3): CD003154. DOI: 10.1002/14651858.CD003154.pub6.
- [12] QIAO O, ZHANG X Y, ZHANG Y, et al. Cerebralcare Granule® enhances memantine hydrochloride efficacy in APP/PS₁ mice by ameliorating amyloid pathology and cognitive functions [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 47. DOI: 10.1186/s13020-021-00456-9.
- [13] LIU M Y, WANG S, YAO W F, et al. Memantine improves spatial learning and memory impairments by regulating NGF signaling in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Neuroscience*, 2014, 273: 141-151. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.011.
- [14] 金昊. APP/PS1 小鼠不同时期内嗅皮质、海马体积变化特征及对学习记忆能力的影响 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.
- JIN H. Changes of volume of entorhinal cortex and hippocampus in APP/PS1 mice at different stages and their effects on learning and memory ability [D]. Fuzhou: Fujian

- University of Chinese Medicine, 2018.
- [15] YUAN Z, ZHOU H Y, ZHOU N, et al. Dynamic evaluation indices in spatial learning and memory of rat vascular dementia in the Morris water maze[J]. *Sci Rep*, 2019, 9:7224. DOI:10.1038/s41598-019-43738-x.
 - [16] ZHANG X M, ZHAO F, WANG C F, et al. AVP(4-8) improves cognitive behaviors and hippocampal synaptic plasticity in the APP/PS₁ mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(3): 254-262. DOI: 10.1007/s12264-019-00434-0.
 - [17] KARUNAKARAN S. Unraveling early signs of navigational impairment in APPsw/PS1dE9 mice using Morris water maze [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:568200. DOI:10.3389/fnins. 2020. 568200.
 - [18] COLES M, WATT G, KREILAUS F, et al. Medium-dose chronic cannabidiol treatment reverses object recognition memory deficits of *APP Swe/PS1ΔE9* transgenic female mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:587604. DOI:10.3389/fphar.2020.587604.
 - [19] GIMÉNEZ-LLORT L, MARIN-PARDO D, MARAZUELA P, et al. Survival bias and crosstalk between chronological and behavioral age: age- and genotype-sensitivity tests define behavioral signatures in middle-aged, old, and long-lived mice with normal and AD-associated aging[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(6):636. DOI:10.3390/biomedicines9060636.
 - [20] LI M Q, SU S X, CAI W H, et al. Differentially expressed genes in the brain of aging mice with cognitive alteration and depression- and anxiety-like behaviors[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:814. DOI:10.3389/fcell.2020.00814.
 - [21] LI P, XU J, GU H H, et al. Memantine ameliorates cognitive deficit in AD mice via enhancement of entorhinal-CA1 projection[J]. *BMC Neurosci*, 2021, 22(1): 41. DOI: 10.1186/s12868-021-00647-y.
 - [22] DOTY R L. Olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases: is there a common pathological substrate? [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(6):478-488. DOI:10.1016/S1474-4422(17) 30123-0.
 - [23] UBEDA-BAÑON I, SAIZ-SANCHEZ D, FLORES-CUADRADO A, et al. The human olfactory system in two proteinopathies: Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1):22. DOI:10.1186/s40035-020-00200-7.
 - [24] MORIGUCHI S, INAGAKI R, FUKUNAGA K. Memantine improves cognitive deficits via K_{ATP} channel inhibition in olfactory bulbectomized mice[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2021, 117: 103680. DOI:10.1016/j.mcn.2021.103680.
 - [25] LI W Y, LI S S, SHEN L H, et al. Impairment of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb of APP/PS₁ mice[J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11:2. DOI:10.3389/fnagi.2019.00002.
 - [26] ZOU Y M, LU D, LIU L P, et al. Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016, 12:869-875. DOI:10.2147/NDT.S104886.
 - [27] DONG H W, ENNIS M. Activation of group II metabotropic glutamate receptors suppresses excitability of mouse main olfactory bulb external tufted and mitral cells[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 11:436. DOI:10.3389/fncel.2017.00436.
 - [28] RIBAK C E, VAUGHN J E, SAITO K, et al. Glutamate decarboxylase localization in neurons of the olfactory bulb[J]. *Brain Res*, 1977, 126(1):1-18. DOI:10.1016/0006-8993(77)90211-6.
 - [29] WANG R, REDDY P H. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4):1041-1048. DOI:10.3233/JAD-160763.
 - [30] PARSONS C G, STÖFFLER A, DANYSZ W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse[J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(6): 699-723. DOI: 10.1016/j. neuropharm.2007.07.013.
 - [31] ALBERDI E, SÁNCHEZ-GÓMEZ M V, CAVALIERE F, et al. Amyloid β oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors [J]. *Cell Calcium*, 2010, 47(3): 264-272. DOI: 10.1016/j. ceca. 2009.12.010.
 - [32] TERAISKIS P J, ASHE K H, LIAO D Z. The accumulation of tau in postsynaptic structures: a common feature in multiple neurodegenerative diseases? [J]. *Neuroscientist*, 2020, 26(5-6):503-520. DOI:10.1177/1073858420916696.
 - [33] LIMA CALDEIRA G, PEÇA J, CARVALHO A L. New insights on synaptic dysfunction in neuropsychiatric disorders[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2019, 57:62-70. DOI:10.1016/j.conb.2019.01.004.
 - [34] GARAD M, EDELMANN E, LEBMANN V. Impairment of spike-timing-dependent plasticity at schaffer collateral-CA1 synapses in adult APP/PS₁ mice depends on proximity of a β plaques[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1378. DOI: 10.3390/ijms22031378.
 - [35] LI W Y, LI S S, SHEN L H, et al. Impairment of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb of APP/PS₁ mice[J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11:2. DOI:10.3389/fnagi.2019.00002.
 - [36] PALOP J J, MUCKE L. Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(7): 812-818. DOI: 10.1038/nn.2583.
 - [37] WESSON D W, BORKOWSKI A H, LANDRETH G E, et al. Sensory network dysfunction, behavioral impairments, and their reversibility in an Alzheimer's β -amyloidosis mouse model[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(44): 15962-15971. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2085-11.2011.
 - [38] BOYLE P A, YANG J Y, YU L, et al. Varied effects of age-related neuropathologies on the trajectory of late life cognitive decline[J]. *Brain*, 2017, 140(3): 804-812. DOI:10.1093/brain/aww341.
 - [39] SCHUBERT C R, FISCHER M E, PINTO A A, et al. Sensory impairments and risk of mortality in older adults[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2016, 72(5): 710-715. DOI:10.1093/gerona/glw036.
 - [40] EKSTRÖM I, SJÖLUND S, NORDIN S, et al. Smell loss predicts mortality risk regardless of dementia conversion[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2017, 65(6):1238-1243. DOI:10.1111/jgs.14770.
 - [41] FRIESEN M, ZIEGLER-WALDKIRCH S, EGENOLF M, et al. Distinct A β pathology in the olfactory bulb and olfactory deficits in a mouse model of A β and α -syn co-pathology[J]. *Brain Pathol*, 2022, 32(3): e13032. DOI:10.1111/bpa.13032.
 - [42] WESSON D W, BORKOWSKI A H, LANDRETH G E, et al. Sensory network dysfunction, behavioral impairments, and their reversibility in an Alzheimer's β -amyloidosis mouse model[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(44): 15962-15971. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2085-11.2011.

(收稿日期:2022-01-04 修回日期:2022-03-25)

(本文编辑:张俊彦,富群华,周晓铨)



江善祥, 博士, 教授, 博士生导师, 现任南京农业大学动物医学院药理与毒理研究室主任、南京新兽药创制工程中心主任。兼任中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会副理事长, 中国动物药品学会副理事长, 江苏省新型兽药产业技术创新战略联盟化学药物部主任委员等职。主持承担了国家级、省部级课题20多项, 包括国家科技攻关、国家自然科学基金、公益性行业科研专项、国家重点研发计划等, 在新兽药及制剂的开发和研究等方面取得了显著成效; 曾获国家教委科技进步二等奖、教育部提名国家自然科学二等奖等, 参与制定多项兽药残留检测方法国家标准, 申请发明专利20余项, 获得发明专利授权12项。至今已培养硕士、博士研究生100多人; 在国内外学术刊物上发表论文200余篇, 其中SCI论文30余篇; 主编和参编著作10部。

卢晓, 迪哲医药有限公司运营部副主任、IACUC主席, 兼任国际实验动物评估认证委员会(AAALAC)亚洲区评审员、美国实验动物学会(AALAS)注册技术专家、上海实验动物学会理事、上海市科委专家库成员、中国毒理学会认证毒理学家、农业农村部注册兽医师。先后在药明康德、阿斯利康制药等药企工作, 有超过15年的实验动物行业从业经验, 在非人灵长类、犬、兔、大鼠和小鼠等实验动物方面有丰富的管理经验和兽医护理经验。



新型钠磷转运蛋白抑制剂DZ1462在5/6肾切除高磷血症模型大鼠中的药效研究

卢晓^{1,2}, 张林², 季辉¹, 江善祥¹

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 迪哲医药股份有限公司, 上海 201203)

[摘要] 目的 探讨新型肠道钠磷转运蛋白小分子抑制剂DZ1462在大鼠5/6肾切除高磷血症动物模型中的降磷效果。**方法** 首先随机选取156只Wistar大鼠, 分为4组: 第Ⅰ组6只为正常对照, 饲喂正常饲料; 第Ⅱ组60只, 经过5/6肾切除后饲喂正常饲料; 第Ⅲ组60只, 经过5/6肾切除后饲喂高磷饲料; 第Ⅳ组30只为假手术组, 即只打开腹腔, 不摘除肾脏, 闭合伤口后饲喂高磷饲料。造模周期为10周。每两周检测各组大鼠血清磷含量, 记录大鼠死亡数量, 并进行HE染色观察肾脏病理变化, 筛选高磷血症动物模型。选取符合入组标准的18只模型大鼠(均来源于第Ⅲ组), 随机分为3组: 模型对照组, 记为G2组; DZ1462给药组(每次30 mg/kg, 每日3次), 记为G3组; 商品化的降血磷药物碳酸司维拉姆片(Sevelamer)给药组(每次250 mg/kg, 每日3次), 记为G4组。每组6只, 连续给药21 d。另外设正常对照组, 记为G1组。运用无机磷检测试剂盒分析各组大鼠的血清磷水平变化。**结果** 在手术建模后的第8周和第10周, 5/6肾切除手术+高磷饲料饲喂的第Ⅲ组大鼠血清磷水平明显高于正常对照第Ⅰ组($P < 0.01$); 第Ⅲ组大鼠的肾脏出现了明显的肾小球硬化、肾小管萎缩、退化、间质炎症、纤维化和钙化, 与人慢性肾病并发的高磷血症相似, 提示肾性高磷血症动物模型建立成功。用药后, 在各测量时间点上, DZ1462组大鼠的血清磷抑制率显著高于Sevelamer组($P < 0.05$)。**结论** DZ1462作为一种新型肠道钠磷转运蛋白小分子抑制剂, 在大鼠高磷血症模型中能够有效抑制肠道磷离子的吸收, 有望成为临床上治疗高磷血症的一种潜在有效药物。

[关键词] 5/6肾切除手术; 高磷血症; 钠磷转运蛋白抑制剂; DZ1462; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0187-07

Efficacy of DZ1462, a Novel Sodium-phosphate Transporter Inhibitor, on 5/6 Nephrectomy-induced Hyperphosphatemia Model Rats

LU Xiao^{1,2}, ZHANG Lin², JI Hui¹, JIANG Shanxiang¹

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China; 2. Dizal Pharmaceuticals Co. Ltd., Shanghai 201203, China)

[第一作者] 卢晓(1981—), 男, 博士研究生, 主要从事实验动物和药理学研究。E-mail: frank.lu@dizalpharma.com。ORCID: 0000-0003-2236-027X

[通信作者] 江善祥(1966—), 男, 博士, 教授, 主要从事新兽药研发、药物代谢、环境生态毒理学研究。E-mail: jiangshanxiang@163.com

Correspondence to: JIANG Shanxiang, E-mail: jiangshanxiang@163.com

[ABSTRACT] Objective To study the efficacy of DZ1462, a novel sodium-phosphate transporter inhibitor, on rat hyperphosphatemia models established by 5/6 nephrectomy. **Methods** Totally 156 rats were randomly selected into four groups. Rats fed a normal diet were control group, named as group I ($n=6$); rats fed a normal diet after 5/6 nephrectomy were named as group II ($n=60$); rats fed a high phosphate diet after 5/6 nephrectomy were named as group III ($n=60$); rats fed a high phosphate diet after sham surgery were named as group IV ($n=30$). The molding cycle was 10 weeks. Serum Pi was detected and the number of animal deaths was recorded every two weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the change in kidney pathology, and to screen animal models with high phosphorus blood syndrome. Totally 18 model rats that met the inclusion criteria (all of group III) were selected and randomly assigned to three groups: the model control group recorded as the G2 group; the DZ1462 administration group (30 mg/kg, tid, 21 d) recorded as the G3 group; the Sevelamer administration group (250 mg/kg, tid, 21 d) recorded as the G4 group. In addition, the normal control group was set as the G1 group. Serum phosphate levels were measured using a kit. **Results** In the 8th and 10th weeks, compared to group I, serum phosphorus in group III showed a significant difference ($P < 0.01$). The kidneys in group III had obvious glomerular sclerosis, renal tubular atrophy, degeneration, interstitial inflammation, fibrosis, and calcification. Similarly to chronic kidney disease accompanied by hyperphosphatemia, the animal model was established successfully. At each time point, the serum phosphorus inhibition rate of the G3 group was significantly higher than that of the G4 group ($P < 0.05$). **Conclusion** DZ1462, as a novel small-molecule inhibitor of intestinal sodium and phosphorus transporter, can effectively inhibit intestinal phosphorus ion absorption in rat hyperphosphatemia model, and is expected to become a potential drug for the clinical treatment of hyperphosphatemia.

[Key words] 5/6 Nephrectomy; Hyperphosphatemia; Sodium-phosphate transporter inhibitors; DZ1462; Rats

大鼠和小鼠最常被用作人类疾病模型动物，这些动物与人类基因组同源性很高，易于操作，而且生命周期快，可短时间内得到治疗试验效果^[1-3]。根据预期研究的目的，通过外科手术、药物灌注或环境改变的操作来诱导疾病动物模型是重要且必要的^[4]。5/6肾切除动物模型因能够再现慢性肾病（chronic kidney disease, CKD）患者在临床中发生的代谢紊乱和骨病^[5-6]，已被用于研究肾脏疾病的发生机制、病理生理学及治疗策略等^[7-10]。

CKD患者的代谢废物（如磷酸盐等）无法通过泌尿系统排出体外，会累积并形成高磷血症^[11]，继而出现骨质疏松、软组织钙化，以及冠状动脉钙化等各种症状，给高磷血症患者带来巨大的痛苦和经济压力。肠道内90%以上的磷主动转运依靠钠磷转运蛋白（Na-phosphate transporter type 2b, NPT2b）。目前临床上治疗CKD引起的高磷血症应用最广的是离子交换结合剂盐酸司维拉姆（Sevelamer），但是往往服药量大，容易产生严重的肠胃不良反应，并且价格昂贵，因此该药物的临床使用受到一定限制。至今，临床上尚没有通过抑制肠道内NPT2b转运蛋白来控制血磷的药物。

DZ1462作为迪哲医药股份有限公司新研发的针对NPT2b转运蛋白的一种小分子抑制剂，预期能通过抑制NPT2b蛋白的活性降低肠道内磷的转运效率，从而改善高磷血症。本研究首先采用5/6肾切除联合高磷饲料喂养的方法构建了大鼠高磷血症模型，然后在该模型上比较DZ1462和Sevelamer的药物治疗效果，以期国产新药DZ1462应用于临床提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级Wistar大鼠购自北京维通利华实验动物有限公司[SCXK（京）2021-0006；SCXK（京）2012-0001]，5~7周龄，雄性；经过检疫合格后，通过恒温运输车运送至上海，进入迪哲医药股份有限公司[SYXK（沪）2018-0015]的屏障设施内饲养，适应1周后开始实验。本研究经迪哲医药股份有限公司实验动物伦理委员会审查批准（IACUC No.1404-RDS-01），所有动物实验操作符合实验动物3R原则及国内外相关的实验动物福利伦理标准要求。

动物饲养环境的温度控制在20~26℃，相对湿度

为40%~70%，相对外界大气压为30 Pa。正常的动物饲料为美国进口LabDiet颗粒饲料，动物饮用水为反渗透水，饲料容器及饮水瓶经高温高压灭菌冷却后使用。

1.2 主要试剂

舒泰50（货号为7WLEA）购于法国VIRBAC公司；DZ1462化合物（批号009）为迪哲医药股份有限公司实验室合成。特殊定制的高磷饲料（含1.2%磷）购自北京科奥协力饲料有限公司。Sevelamer（产品批号B4882B01）购自赛诺菲（杭州）制药有限公司。无机磷检测试剂盒（产品编号990-40091）购自绍兴市创烨生物科技有限公司。

1.3 5/6肾切除法构建CKD高磷血症大鼠模型

选取156只大鼠，随机分为4组：其中第Ⅰ组6只，设为正常对照，饲喂正常饲料且不手术；第Ⅱ组60只，经过5/6肾切除后饲喂正常饲料；第Ⅲ组60只，经过5/6肾切除后饲喂高磷饲料；第Ⅳ组30只，为假手术组，即只打开腹腔，不摘除肾脏，闭合伤口后饲喂高磷饲料。

5/6肾切除手术过程：使用舒泰50（60 mg/kg）腹腔注射麻醉大鼠，同时肌内注射痛立定（4 mg/kg）进行术前止痛；背部肾区剃毛备皮，手术刀切开皮肤，钝性分离肌肉，将左侧肾脏暴露；缝线结扎肾脏的上下各1/3并切除，止血棉压迫止血；观察确认没有出血后，将剩余肾脏放回体内，闭合伤口，碘酒消毒伤口。1周以后进行二次手术，完整切除右侧肾脏。手术后饲喂10周以模拟患者肾脏损伤的过程。

1.4 动物模型对DZ1462和Sevelamer的药效学研究

1.4.1 给药方法

与正常对照Ⅰ组大鼠比较，血清磷水平增加>50%，是高磷血症大鼠模型建立成功的判定标准。最终有18只符合条件的高磷血症模型大鼠（从第Ⅲ组中挑选）入组进行药效实验，随机分3组，每组6只。G2（模型对照）组，不给予任何药物，饲喂正常饲料；G3组灌胃给予DZ1462 30 mg/kg（给药体积为10 mL/kg体重），每天3次，同时饲喂高磷饲料；G4组灌胃给予碳酸Sevelamer 250 mg/kg（给药体积为10 mL/kg体重），每天3次，同时饲喂高磷饲料。连续用药3周（即21 d）。同时以第Ⅰ组大鼠继续作为正常对照，命名为G1组。

1.4.2 临床观察

手术后和用药后（D0表示给药前的当天）均观察

各组大鼠的精神状态、活动灵活性、体表被毛、采食量、体质量变化等一般情况，以及有无水肿、腹腔积液或瘫痪等病症。每天上下午各观察一次，每次观察时长约30 min。

1.4.3 血清磷含量检测

每周采集各组大鼠的血清样本，即尾静脉采血后，3 000 r/min，离心5 min，取血清后常温运送至上海达安医学检测中心有限公司，使用无机磷测定试剂盒在室温下利用紫外比色法测定血清磷含量。血磷抑制率（%）=（5/6肾切除手术后的血清磷含量-药物治疗后的血清磷含量）/（5/6肾切除手术后的血清磷含量-正常对照组的血清磷含量）×100%。

1.4.4 肾脏病理学观察

各组动物造模10周后经二氧化碳安乐死，解剖获得肾脏肾盂部分，用体积分数为40%的甲醛溶液固定后，进行病理切片，切片厚度约4 μm。然后使用自动染色机进行HE染色，光学显微镜下观察肾脏组织病理学变化，拍照后用Aperio系统进行分析。

1.5 统计学处理

各组实验所得数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用Graph Prism Version 10软件自带统计功能进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用LSD-*t*检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建模过程中各组大鼠的临床表现

第Ⅰ组正常对照大鼠活动灵便，精神状态良好，毛色亮泽。第Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组大鼠精神状态较差，有不同程度的毛脱落现象，不喜活动，饮水量减少；其中第Ⅲ组（5/6肾切除手术+高磷饲料喂养）比第Ⅱ组（5/6肾切除手术+正常饲料喂养）更严重。在第二次手术结束后观察10周，第Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组大鼠陆续出现死亡的情况，死亡大鼠存在腹腔积液和不同程度的水肿等现象；其中第Ⅱ组和第Ⅲ组的总体死亡率在第10周时分别为30%和40%，第Ⅳ组（假手术+高磷饲料喂养）则只有6%。第Ⅰ组大鼠没有出现死亡情况。第1、3、5、7、10周各组大鼠的死亡率见表1。

2.2 建模过程中各组大鼠的血清磷含量

与第Ⅰ组（不手术+正常饲料喂养的正常对照组）相比，第Ⅳ组（假手术+高磷饲料喂养）和第Ⅱ组（5/6肾切除手术+正常饲料喂养）大鼠随着饲养时间延长，大鼠的血清磷水平呈逐步下降的趋势，而第Ⅲ组

表1 各组大鼠在建模10周内的死亡率

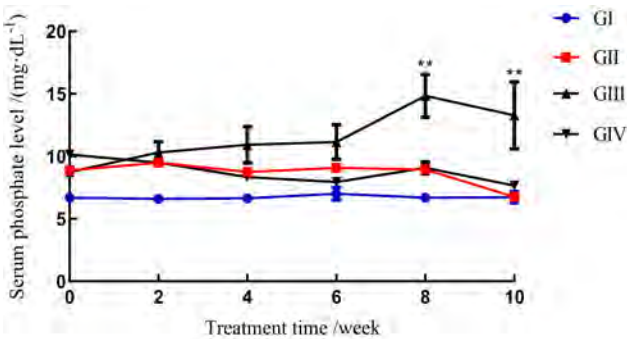
Table 1 Mortality of different group rats within 10 weeks after modeling

分组 Group	动物数量 Animal <i>n</i>	第1周 1 st Week		第3周 3 rd Week		第5周 5 th Week		第7周 7 th Week		第10周 10 th Week	
		No.	Rd%	No.	Rd%	No.	Rd%	No.	Rd%	No.	Rd%
I	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	60	6	10	3	15	0	15	6	25	5	30
III	60	8	13	2	16	2	20	2	23	10	40
IV	30	0	0	1	3	1	6	0	6	0	6

注:No.指死亡数, Rd%指死亡率。第 I 组不手术且饲喂正常饲料, 作为正常对照; 第 II 组经 5/6 肾切除手术后饲喂正常饲料; 第 III 组经 5/6 肾切除手术后饲喂高磷饲料; 第 IV 组只打开腹腔, 不摘除肾脏, 闭合伤口后饲喂高磷饲料, 作为假手术组。

Note: No., death number; Rd%, death rate. Group I consists of normal rats with a normal diet, set as the control group; Group II consists of 5/6 nephrectomy rats with a normal diet; Group III consists of 5/6 nephrectomy rats with a high Pi diet; Group IV consists of sham operation rats with a high Pi diet.

(5/6 肾切除手术+高磷饲料喂养) 的血清磷水平持续显著上升, 第 8 和第 10 周时与对照组相比的差异均有极显著的统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1)。



注: G I, 第 I 组正常大鼠饲喂正常饲料; G II, 第 II 组 5/6 肾切除大鼠饲喂正常饲料; G III, 第 III 组 5/6 肾切除大鼠饲喂高磷饲料; G IV, 第 IV 组假手术大鼠饲喂高磷饲料。*表示第 I 组和第 III 组在第 8 周和第 10 周时血清磷含量差异有极显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。

Note: G I, normal rats with a normal diet (group I); G II, 5/6 nephrectomy rats with a normal diet (group II); G III, 5/6 nephrectomy rats with a high Pi diet (group III); G IV, sham surgery rats with a high Pi diet (group IV). *Represent serum Pi has a highly significant difference between Group I and Group III at the 8th and 10th week ($P < 0.01$).

图1 不同组别大鼠血清磷测试结果

Figure1 Serum phosphorus levels in different groups of rats

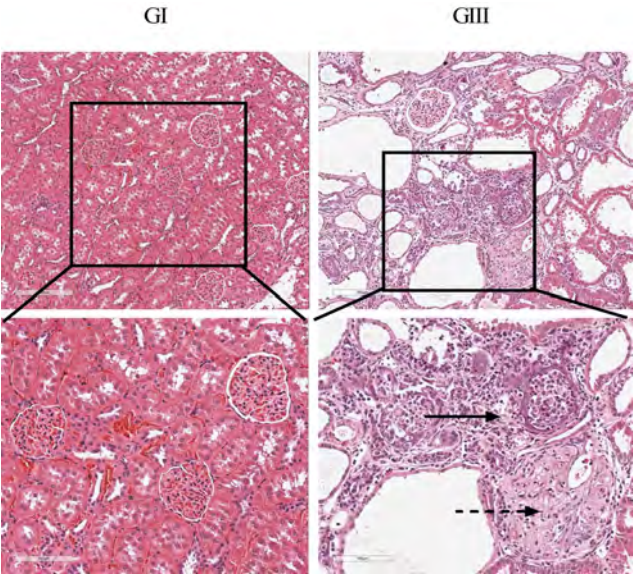
2.3 5/6 肾切除高磷血症模型的病理组织学评估

HE 染色观察各组大鼠的肾脏组织病理结果 (图 2) 显示, 与正常对照组 (GI) 大鼠相比, GIII 组 (5/6 肾切除手术+高磷饲料) 大鼠的剩余肾脏组织中有明显的

肾小球硬化, 肾小管萎缩、退化, 间质炎症、纤维化和钙化等病理现象。其肾损伤情况与 CKD 患者类似, 可以作为 CKD 动物模型。

2.4 不同化合物处理后大鼠血清磷水平的比较

在药物治疗后的第 7 天、第 14 天和第 21 天, 和未

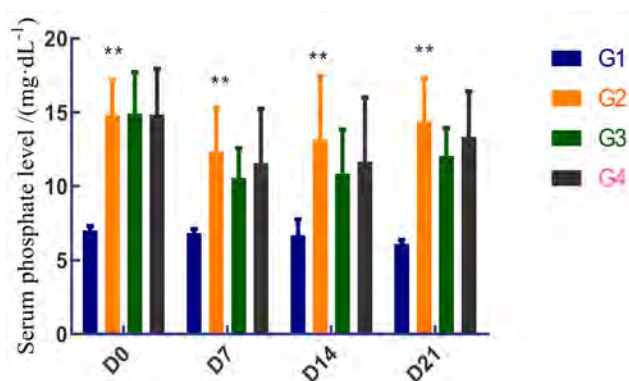


注: G I 为第 I 组正常大鼠饲喂正常饲料, G III 为第 III 组 5/6 肾切除高磷血症模型大鼠。上方图片放大倍数为 100, 下方图片放大倍数为 200; 实线箭头示间质炎症纤维化, 虚线箭头示肾小球硬化。

Note: G I is normal rats with a normal diet (group I), G III is 5/6 nephrectomy rats with a high Pi diet (group III). The magnification of the upper and the lower is 100 and 200, respectively. The solid arrow shows the interstitial fibrosis and inflammatory, and the dashed arrow shows glomerular sclerosis.

图2 5/6 肾切除手术模型大鼠的肾脏组织病理评估(HE 染色)
Figure 2 Pathological evaluation of kidney tissue in 5/6 nephrectomy model rats (HE staining)

经药物处理的5/6肾切除高磷血症模型对照组(G2)相比,DZ1462治疗组(G3)和Sevelamer治疗组(G4)大鼠的血清磷含量均有所降低,并且DZ1462的降磷效果优于市售药物Sevelamer;但DZ1462给药组与Sevelamer给药组相比,血清磷的绝对值差异尚无统计学意义($P > 0.05$,图3)。而在经DZ1462和Sevelamer药物治疗后的第7、14、21天时,DZ1462给药组大鼠的血清磷抑制率分别为 $(65 \pm 27)\%$ 、 $(61 \pm 13)\%$ 、 $(44 \pm 16)\%$,Sevelamer给药组大鼠的血清磷抑制率分别为 $(22 \pm 13)\%$ 、 $(47 \pm 15)\%$ 、 $(28 \pm 11)\%$,各时间点两组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



注: G1为不手术+正常饲料喂养的正常对照大鼠; G2为5/6肾切除高磷血症模型对照组大鼠饲喂正常饲料; G3为5/6肾切除高磷血症模型大鼠经灌胃给予DZ1462 30 mg/kg并饲喂高磷饲料; G4为5/6肾切除高磷血症模型大鼠经灌胃给予盐酸酸司维拉姆(Sevelamer) 250 mg/kg并饲喂高磷饲料。**表示G2组大鼠在用药第0、7、14、21天(即D0、D7、D14、D21)血清磷水平平均与G1正常对照组显著增高($P < 0.01$)。

Note: G1 is normal rats with a normal diet; G2 is 5/6 nephrectomy and high diet model rats received a normal diet; G3 is 5/6 nephrectomy and high diet model rats received a high Pi diet and DZ1462 30 mg/kg; G4 is 5/6 nephrectomy and high diet model rats received a high Pi diet and Sevelamer 250 mg/kg. **Represent serum Pi in G2 is significantly higher than that in G1 on days 0, 7, 14, and 21 ($P < 0.01$).

图3 用药后不同组大鼠血清磷水平的比较

Figure 3 Comparison of serum phosphorus levels among different groups of rats after drug treatment

3 讨论

利用5/6肾切除术建造动物模型已被广泛用于CKD的药理药效学研究^[12-14],其机制主要是通过手术切除大部分肾脏,导致剩余的肾脏代偿性运转,肾小球过度劳作增生,且随着病情的进展,肾实质转变为失代

偿期,病理表现为肾小管萎缩、肾小管间质纤维化、肾小球硬化和局灶性肥大,最终形成CKD。5/6肾切除术造模后动物的精神状态、饮食、体质量等方面下降明显,与人类CKD后期的临床症状非常相似^[15-19]。本研究所建立的5/6肾切大鼠模型的肾脏病理结果与上述文献报告一致。

在动物品系选择上,Hamzaoui等^[20]比较了2个品系小鼠129/Sv和C57BL/6Jrj中利用5/6肾切术进行心血管和肾脏造模的结果,发现5/6肾切12周后,129/Sv和C57BL/6Jrj雄性小鼠的血浆肌酐水平均显著升高,但129/Sv小鼠在多尿、肾脏组织学损害和蛋白尿增加方面比C57BL/6Jrj小鼠表现更明显,提示5/6肾切对129/Sv小鼠心血管和肾脏的影响比C57BL/6Jrj小鼠更明显。由此可见,不同品系小鼠的造模结果不同。本研究选择Wistar大鼠,是因为大鼠手术操作比较容易,而且可以从尾静脉多次重复采集血样;相比而言,小鼠眼眶采血的量受限制,且眼眶多次采血不符合动物福利要求。

本实验造模时第Ⅱ和Ⅲ组大鼠经5/6肾切手术后,分别饲喂正常饲料和高磷饲料。结果发现,第Ⅲ组大鼠在造模第8周和第10周时血清磷水平显著上升,出现典型的CKD症状及磷代谢紊乱;与正常对照组大鼠相比,5/6肾切+高磷饲料建模大鼠出现了明显的肾小球硬化,肾小管萎缩、退化,间质炎症、纤维化和钙化现象,表明高磷饲料有助于5/6肾切模型的构建;这与以往文献报道^[17, 21-23]的结果基本一致,提示本实验成功构建了大鼠CKD模型,可以应用于后续DZ1462的药效学研究。本研究随后制定了入选药效研究的高磷血症模型动物标准,即与正常大鼠比较,血清磷含量增加大于50%。最终有18只大鼠被选择继续进行药效实验。

DZ1462是本实验室新合成的针对NPT2b的特异性小分子抑制剂。目前市面上尚没有针对NPT2b靶点的药物。本实验目的是研究DZ1462能否通过调节体内血清磷水平,缓解CKD患者的钙磷代谢异常,改善肾功能,减轻临床症状。本研究利用5/6肾切高磷血症大鼠模型,对DZ1462及临床上应用的阴离子树脂结合剂Sevelamer的药效进行比较。结果表明,DZ1462(30 mg/kg)和Sevelamer(250 mg/kg)每天3次口服给药21 d的治疗后大鼠血清磷含量均有所减少,且DZ1462的降磷效果优于Sevelamer,但两者的绝对值比较差异无统计学意义($P > 0.05$);进一步统计分析发现,两

者的血清磷抑制率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

目前全球范围内在研的针对 NPT2b 的小分子抑制剂有日本 Astella 公司的 ASP3325 和 Daiichi Sankyo 公司的 DS2330b。两家公司公布的 I 期临床试验结果表明, ASP3325 和 DS2330b 均不能改善 CKD 患者的高血磷状态^[24-25], 这与本研究结论有差异。根据已公布的数据推测, ASP3325 和 DS2330b 这两个化合物治疗失败的原因可能是其作用靶点的特异性不够, 同时药物暴露时间不足, 两个化合物的体内暴露量也远超 DZ1462, 同时不同物种间磷的转运机制也可能有所不同, 这些都是需要重点考虑的因素。总之, 口服特异性小分子 NPT2b 抑制剂治疗高磷血症的作用仍然难以确定, 值得继续研究。

需要说明, 本研究尚存在一定的局限性, 包括没有测试更多的指标, 如成纤维细胞生长因子 23 (fibroblast growth factor 23, FGF23), 以及未进行心脏肥大、主动脉钙化、次生海绵体区的海绵骨分析等, 未能判断 DZ1462 对大鼠心脏、组织钙化和骨质疏松等方面的影响。本课题组今后将在动物模型上检测更多的肾脏相关指标, 并通过建立更有效的人源化动物模型来研究 DZ1462 对高磷血症的治疗效果。

综上所述, 本研究利用大鼠 5/6 肾切手术联合饲喂高磷饲料的方式成功建立了高磷血症模型。使用该模型对 DZ1462 的药效学进行验证, 同时与临床上应用广泛的 Sevelamer 进行了药效比较; 结果表明, DZ1462 对大鼠血清磷的抑制率显著高于 Sevelamer, 表明在大鼠 5/6 肾切模型上, DZ1462 具有良好的降磷效果。本研究结果提示, DZ1462 作为一种全新的 NPT2b 抑制剂, 能够部分阻断肠道磷离子的吸收, 有着与 Sevelamer 完全不同的作用机制, 有望成为高磷血症患者的另外一个用药选择。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过迪哲医药股份有限公司实验动物伦理委员会审查批准 (IACUC No.1404-RDS-01)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Dizhe Pharmaceutical Co., Ltd. (IACUC No. 1404-RDS-01), and all experimental protocols were carried out following the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892—2018), ARRIVE 2.0, IGP 2012 and IAVE 2010.

[作者贡献 Author Contribution]

卢晓参与并负责 DZ1462 化合物的前临床研发项目中体内部分实验, 并撰写论文; 张林参与 DZ1462 化合物体内部分实验及论文修改; 季辉负责文章内容的校对和审核; 江善祥指导整个实验研究及论文审核。

[利益声明] Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] CHINYERE I R, MOUKABARY T, HUTCHINSON M D, et al. Progression of infarct-mediated arrhythmogenesis in a rodent model of heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2021, 320(1): H108-H116. DOI:10.1152/ajpheart.00639.2020.
- [2] FOURNIER M L, CLÉMENT T, AUSSUDRE J, et al. Contusion rodent model of traumatic brain injury: controlled cortical impact[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2193: 49-65. DOI:10.1007/978-1-0716-0845-6_6.
- [3] MARRA A. Animal models for drug development for MRSA[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2069: 253-266. DOI: 10.1007/978-1-4939-9849-4_17.
- [4] YOUNG F G. Growth and diabetes in normal animals treated with pituitary (anterior lobe) diabetogenic extract[J]. *Biochem J*, 1945, 39(5):515-536. DOI:10.1042/bj0390515.
- [5] SARKAR D, AGRAWAL A, PAL D K. Clinical assessment of stabilisation of renal function after nephrectomy[J]. *Urologia*, 2021, 88(3):223-226. DOI:10.1177/0391560320987799.
- [6] CHANTLER C, LIEBERMAN E, HOLLIDAY M A. A rat model for the study of growth failure in uremia[J]. *Pediatr Res*, 1974, 8(2): 109-113. DOI:10.1203/00006450-197402000-00007.
- [7] CZÉH B, SIMON M. Benefits of animal models to understand the pathophysiology of depressive disorders[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 106: 110049. DOI:10.1016/j.pnpbp.2020.110049.
- [8] PÉREZ-LÓPEZ L, BORONAT M, MELIÁN C, et al. Animal models and renal biomarkers of diabetic nephropathy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1307:521-551. DOI:10.1007/978-1-0716-0845-6_6.
- [9] MCCARRON A, PARSONS D, DONNELLEY M. Animal and cell culture models for cystic fibrosis: which model is right for your application? [J]. *Am J Pathol*, 2021, 191(2): 228-242. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.10.017.
- [10] ROBINSON N B, KRIEGER K, KHAN F M, et al. The Current state of animal models in research: a review[J]. *Int J Surg*, 2019, 72:9-13. DOI:10.1016/j.ijsu.2019.10.015.
- [11] GUO W, WANG L Y, HAN X, et al. Effect of parathyroid hormone on intestinal mucosal sodium dependent phosphorus transporter[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2021, 1(1):48-55.
- [12] ASKARI H, SEIFI B, KADKHODAEI M. Evaluation of renal-hepatic functional indices and blood pressure based on the progress of time in a rat model of chronic kidney disease[J]. *Nephrourol Mon*, 2016, 8(3): e37840. DOI:10.5812/numonthly.37840.
- [13] LEVEY A S, STEVENS L A, CORESH J. Conceptual model of

- CKD: applications and implications[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 53(3 Suppl 3): S4-S16. DOI:10.1053/j.ajkd.2008.07.048.
- [14] HAN Y, LU J S, XU Y, et al. Rutin ameliorates renal fibrosis and proteinuria in 5/6-nephrectomized rats by anti-oxidation and inhibiting activation of TGF β 1-smad signaling[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5):4725-4734.
- [15] GHOSH S S, MASSEY H D, KRIEG R, et al. Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: role of inflammation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(5): F1146-F1157. DOI:10.1152/ajprenal.90732.2008.
- [16] JING W H, NUNES A C F, FARZANEH T, et al. Phosphate binder, ferric citrate, attenuates *Anemia*, renal dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in 5/6 nephrectomized CKD rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2018, 367(1):129-137. DOI:10.1124/jpet.118.249961.
- [17] 王婷玉. 虫草保肾颗粒对5/6肾切除大鼠钙磷代谢的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2019.
- WANG T Y. Effect of Chongcao Baoshen Granules on calcium and phosphorus metabolism with 5/6 nephrectomy rats[D]. Harbin: Heilongjiang College of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [18] BAO Y W, YUAN Y, CHEN J H, et al. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets[J]. Zool Res, 2018, 39(2): 72-86. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.055.
- [19] RANI L, GAUTAM N K. *Drosophila* renal organ as a model for identification of targets and screening of potential therapeutic agents for diabetic nephropathy[J]. Curr Drug Targets, 2018, 19(16): 1980-1990. DOI: 10.2174/1389450119666180808114533.
- [20] HAMZAOU M, DJERADA Z, BRUNEL V, et al. 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6J mice[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):1524. DOI:10.1038/s41598-020-58393-w.
- [21] 李鑫宇, 李丹, 赵学智. 一步法5/6肾切除大鼠加高磷饮食快速建立肾衰竭致血管钙化动物模型法[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(10): 862-864, 后插二. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2010.10.006.
- LI X Y, LI D, ZHAO X Z. One-step approach of 5/6 nephrectomy plus high phosphorus diet to rapidly establish rat models of vessel calcification induced by renal failure[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2010, 11(10): 862-864. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2010.10.006.
- [22] RADLOFF J, LATIC N, PFEIFFENBERGER U, et al. A phosphate and calcium-enriched diet promotes progression of 5/6-nephrectomy-induced chronic kidney disease in C57BL/6 mice[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 14868. DOI: 10.1038/s41598-021-94264-8.
- [23] TSAO C W, HSU Y J, CHANG T C, et al. A high phosphorus diet impairs testicular function and spermatogenesis in male mice with chronic kidney disease[J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2624. DOI:10.3390/nu12092624.
- [24] LARSSON T E, KAMEOKA C, NAKAJO I, et al. NPT- II b inhibition does not improve hyperphosphatemia in CKD[J]. Kidney Int Rep, 2017, 3(1):73-80. DOI:10.1016/j.ekir.2017.08.003.
- [25] MARUYAMA S, MARBURY T C, CONNAIRE J, et al. NaPi- II b inhibition for hyperphosphatemia in CKD hemodialysis patients[J]. Kidney Int Rep, 2020, 6(3):675-684. DOI:10.1016/j.ekir.2020.12.017.
- (收稿日期: 2021-08-17 修回日期: 2021-11-05)
(本文编辑: 张俊彦, 丁宇菁)

《实验动物与比较医学》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,是我国实验动物科学及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,刊登实验动物科学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,铜版纸,彩色印刷;全年出版6期,每期定价30元/本,全年定价180元/套。读者可在各地邮局订阅,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



艾尼瓦尔·塔力甫, 博士, 主任药师, 新疆医科大学研究生导师, 国家中医药管理局“临床维药学”重点学科带头人, “临床维药学”重点专科学术带头人, 兼任中国民族医药学会科研分会常务理事、新疆药学会药物临床试验专业委员会副主任委员、新疆医院协会药事管理专业委员会副主任委员、药物临床试验机构办公室主任等。主要研究方向是维吾尔药制剂质量控制与新药研发, 近五年主要学术成果包括: 以第一作者或通信作者发表学术论文35篇; 主持课题项目6项, 其中国家级2项、省部级4项; 参编专著2部; 发明专利2项; 主持与参与维药“祖卡木颗粒”等14个品种注册申报, 研发“塔都清血胶囊”等13个制剂, 优化提高“艾维西木口服液”等80种制剂的工艺及其标准。此外, 培养硕士生3名。

复方卡森糖浆缓解 *D*-氨基半乳糖引起的小鼠急性化学性肝损伤

麦丽开·阿不力米提¹, 艾山·艾比布勒¹, 史 深¹, 阿不都沙拉木·阿不都热依木², 艾尼瓦尔·塔力甫³

(1. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆维吾尔自治区中医医院老年病科, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆维吾尔自治区维吾尔医院, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的** 探讨复方卡森糖浆对 *D*-氨基半乳糖 (*D*-galactose) 致小鼠急性化学性肝损伤的保护作用。**方法** 通过腹腔注射 *D*-氨基半乳糖 800 mg/kg 建立小鼠化学性肝损伤模型。根据服用药物及剂量不同分为模型对照组 (不服用药物), 复方卡森糖浆低剂量组、中剂量组、高剂量组, 炎消迪娜儿糖浆阳性对照组, 同时设立正常对照组。每组8只。复方卡森糖浆 (8 mL·kg⁻¹·d⁻¹) 与炎消迪娜儿糖浆 (12 mL·kg⁻¹·d⁻¹) 分别灌胃后, 检测小鼠血清生化、肝功能及肝损伤免疫学指标的变化, 并通过 HE 染色观察肝组织病理学改变。**结果** 与正常对照组相比, 模型组小鼠肝脏指数升高 ($P < 0.05$), 提示肝损伤。与模型组比较, 复方卡森糖浆治疗后血清生化、肝功能指标均有所下降 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏匀浆中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性增高 ($P < 0.05$), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 复方卡森糖浆各剂量组小鼠 SOD 活性均升高 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, 复方卡森糖浆组的小鼠肝脏炎性细胞浸润、变性、坏死等肝损伤病理现象有所改善。**结论** 复方卡森糖浆能有效缓解 *D*-氨基半乳糖诱导的小鼠肝损伤状态, 对肝脏有一定的保护作用。

[关键词] 复方卡森糖浆; 急性化学性肝损伤; 保肝作用; 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0194-07

Compound Casson Syrup Alleviates Acute Chemical Liver Injury in Mice Caused by *D*-galactosamine

Merika-Ablimiti¹, Aishan-Abibule¹, SHI Shen¹, Abdu-salamu-Abdu-reyimu², Enivar-Taleb³

(1. Xinjiang Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830002, China; 2. Department of Geriatrics, Xinjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, China; 3. Xinjiang Uyghur Hospital, Urumqi 830000, China)

Correspondence to: Enivar-Taleb, E-mail: 154914729@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the protective effect of compound Casson syrup on acute chemical liver injury induced by *D*-galactose in mice. **Methods** The chemical liver injury model was

[基金项目] 少数民族科技人才特殊培养计划科研项目: 复方卡森糖浆对化学性及免疫性肝损伤的保护作用研究 (2017D03009)

[第一作者] 麦丽开·阿不力米提 (1977—), 女, 高级实验师, 研究方向: 从事实验动物研究。E-mail: 928312699@qq.com。ORCID: 0000-0003-0875-1477

[通信作者] 艾尼瓦尔·塔力甫 (1973—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 药物临床试验研究。E-mail: 154914729@qq.com

established by intraperitoneal injection of *D*-galactose 800 mg/kg. The experiment was divided into 6 groups, including normal control group, model control group, positive control group of Yanxiaodinar syrup, and compound Casson syrup low-dose, medium-dose and high-dose groups, with 8 rats in each group. After intragastric administration of compound Casson syrup ($8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Yanchaudinar syrup ($12 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the changes of serum biochemistry, liver function and immunological indexes of liver injury were detected, and the pathological changes of liver tissue were observed. **Results** Compared with the normal control group, the liver index of model group was increased ($P < 0.05$), suggesting liver injury. Compared with model group, serum biochemical and liver function indexes were decreased after treatment with compound Casson syrup ($P < 0.05$). Compared with normal control group, the activities of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver homogenate of model group were increased ($P < 0.05$), and the activity of superoxide dismutase (SOD) was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, SOD activity in compound Casson syrup groups was increased ($P < 0.05$). HE staining showed the inflammatory cell infiltration, degeneration, necrosis and other pathological phenomena of mouse liver caused by *D*-galactose were reversed after Casson syrup treatment. **Conclusion** Compound Casson syrup can effectively relieve the liver injury induced by *D*-galactose, and has a certain protective effect on liver.

[Key words] Compound Casson syrup; Acute chemical liver injury; Liver protection; Mice

维吾尔医药是中国传统医药的重要组成部分,也是我国四大民族医药之一^[1],在临床上广泛用于炎症疾病的治疗^[2]。研究表明,维吾尔医学常用药材之一的毛菊苣提取物对小鼠肝纤维化具有一定的保护作用^[3]。在维吾尔语中毛菊苣又名卡森(كاسن),新疆地区维吾尔医学应用中主要取卡森地上部分和根入药,味微苦、咸,性凉,清肝利胆,用于治疗湿热黄疸、胃痛食少及水肿尿少^[4-6]。

复方卡森糖浆由茴香根皮、菊苣根、玫瑰花、黄瓜子、小茴香、菊苣子、葫芦子仁7味药材组成,具有通滞利肝、利尿消肿等功能,用于胆液质过盛而引起的各种疾病。目前,临床上该药主要用于肝炎、肝硬化、胆囊炎、带状疱疹、荨麻疹、关节炎等疾病的治疗^[7]。虽然相关临床资料已经表明“复方卡森糖浆”具有治疗肝病的效果^[8-9],但进一步研究该制剂的保肝作用机制可为复方卡森糖浆的临床应用提供更多理论基础,并为新药开发奠定基础。

本研究以复方卡森糖浆的保肝作用为切入点,建立*D*-氨基半乳糖致小鼠急性化学性肝损伤模型,探讨复方卡森糖浆对小鼠血清生化肝功能指标及免疫学水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性ICR小鼠,体质量为18~22 g,由上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2017-0005]

提供,动物质量合格证编号为20170005007808,饲养于新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心实验动物屏障设施[SYXK(新)2016-0001]。动物在实验前一周进行适应性喂养,相对湿度为40%~60%,温度为20~24℃,12 h光照交替,自由饮用净化水,摄食小鼠标准颗粒饲料(江苏省协同医药生物工程有限公司提供的SPF级大鼠小鼠维持饲料)。本研究中动物实验方案经新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心实验动物福利与伦理委员会审查批准(2020-002),所有动物实验操作符合实验动物3R原则及国内外相关的实验动物福利伦理标准要求。

1.2 主要药品与试剂

复方卡森糖浆和炎消迪娜儿糖浆参考标准物均由新疆维吾尔自治区维吾尔医医院制药厂生产,批准文号分别为新药文号M20041581、国药准字Z65020183,规格均为200 mL/瓶。*D*-氨基半乳糖购自美国Sigma公司。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)检测用ELISA试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测用ELISA试剂盒均购自武汉酶免生物科技有限公司。血清谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。HE染色液购自珠海贝索生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

AccuteTBA-40FR 东芝全自动生化分析仪为日本东

芝公司产品; BS323S 电子天平为德国 Sartorius 公司产品; SCIENTZ-48 高通量组织研磨器购自宁波新芝生物科技股份有限公司; 721 型分光光度计购自上海第三分析仪器厂。

1.4 动物分组、模型建立及药物处理

按小鼠体质量随机分组, 分别为正常对照组、模型对照组、炎消迪娜儿糖浆阳性对照组及复方卡森糖浆低、中、高剂量组, 共 6 组, 每组 8 只。复方卡森糖浆低、中、高剂量组分别按原药液的 50%、100%、200% (即用恒温水浴锅加热原药液使之蒸发水分 50%, 药物浓度增加至原来的一倍) 配制药液, 按 $8\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, 连续 7 d^[5]。为了证明复方卡森糖浆 (新药) 的有效性, 将炎消迪娜儿糖浆 (国药) 作为阳性对照标准品。阳性对照组按 $12\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 给予炎消迪娜儿糖浆灌胃, 连续 7 d。正常对照组和模型对照组给予同体积的生理盐水。

末次给药 1 h 后, 除正常对照组外, 其他各组小鼠均腹腔注射给予 *D*-氨基半乳糖 800 mg/kg, 建立急性化学性肝损伤模型。然后观察各组小鼠的肝损伤病理变化及血清生化水平。

1.5 用药后小鼠血清生化及免疫学指标测定

肝损伤模型建立 24 h 后, 腹腔注射戊巴比妥钠 (150 mg/kg) 麻醉小鼠。眼球取血^[10-11], 常规分离血清并使用试剂盒测定 ALT、AST、ALP 活性, 以此反映肝功能。另外取肝脏组织块 (0.1~0.2 g), 放入匀浆

管中, 冰水浴条件下用机械式匀浆机 8 000~10 000 r/min 匀浆, 10 s/次, 间隙 30 s, 连续 3~5 次。将制备好的 10% 匀浆液用普通离心机 (2 500 r/min) 离心 10~15 min, 取上清液, 采用 ELISA 法测定 SOD、GSH-Px、MDA 含量, 以反映肝细胞损伤程度。

1.6 用药后小鼠肝脏组织病理学观察

动物分组前、解剖前各测量一次体质量, 解剖后测量肝脏和脾脏质量, 并计算肝脾指数 (小鼠肝脏或脾脏质量/小鼠体质量×100%)。解剖后各组小鼠的肝脏组织经质量分数为 4% 的中性甲醛溶液固定, 常规制片。HE 染色法观察各组小鼠肝组织病理学变化。

1.7 统计分析

采用 SPSS 22 软件对各实验结果数据进行分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组样本均数比较, 首先采用单因素方差分析, 再采用 LSD-*t* 检验进行两两比较。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脾指数测定

与正常对照组相比, 模型组小鼠的肝脏指数及脾脏指数均有升高, 其中肝脏指数升高具有统计学意义 (*P* < 0.05)。与模型组相比, 复方卡森糖浆低、中剂量组小鼠的脾脏指数 (0.26±0.05)、炎消迪娜儿糖浆阳性对照组小鼠的肝脏指数 (4.42±0.75) 均显著下降 (*P* < 0.05), 详见表 1。

表1 复方卡森糖浆对 *D*-氨基半乳糖所致小鼠肝、脾指数的影响
Table 1 Effect of compound Casson syrup (CCS) on liver and spleen indexes of mice induced by *D*-galactose

$(\bar{x} \pm s, n=8)$					
组别 Group	剂量 Dose/(mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	实验前体质量 Pre-test body mass/g	解剖前体质量 Preanatomic body mass/g	肝脏指数 Liver index/(mg·g ⁻¹)	脾脏指数 Spleen index/(mg·g ⁻¹)
正常对照 Normal control	-	24.00±1.07	29.19±1.70	4.95±0.61	0.30±0.07
模型对照 Model control	-	25.00±2.39	28.85±4.88	5.93±0.84 [*]	0.36±0.01
炎消迪娜儿糖浆对照 YS control	12	20.13±3.31	27.16±2.98	4.42±0.75 [#]	0.32±0.05
低剂量复方卡森糖浆 Low-dose of CCS	4	27.50±0.76	30.99±1.36	4.50±0.38	0.26±0.05 [#]
中剂量复方卡森糖浆 Medium-dose of CCS	8	22.88±3.36	28.91±1.75	5.35±0.83	0.28±0.06 [#]
高剂量复方卡森糖浆 High-dose of CCS	16	26.13±0.99	28.66±1.81	4.64±0.29	0.32±0.06

注: 炎消迪娜儿糖浆用作复方卡森糖浆的阳性对照药物。与对照组比较, ^{*}*P* < 0.05; 与模型组比较, [#]*P* < 0.05。
Note: Yanxiaodinar syrup (YS) was used as the positive control of compound Casson syrup (CCS). Compared with control group, ^{*}*P* < 0.05; compared with model group, [#]*P* < 0.05.

2.2 肝功能评估

与正常对照组比较, 模型组小鼠的血清 ALT、AST和ALP水平显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 复方卡森糖浆和炎消迪娜儿糖浆各给药组小鼠的血清AST、ALT水平均有所下降; 而各给药组之间虽有波动, 但无显著性差异。与模型组比较, 各给药组的血清ALP水平显著下降 ($P<0.05$), 详见表2。结果提示D-氨基半乳糖可致小鼠肝功能下降, 而复方卡森糖浆对肝功能具有一定的保护作用。

2.3 抗氧化状态评估

与正常对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织匀浆中MDA和GSH-Px含量增高 ($P<0.05$), SOD含量明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 复方卡森糖浆各剂量组小鼠肝脏SOD含量增高 ($P<0.05$), 其中高剂量组增高明显 ($P<0.01$); 而MDA和GSH-Px含量出现不同程度的降低, 有些剂量组的差异有统计学意义 ($P<0.05$), 详见表3。结果提示复方卡森糖浆对D-氨基半乳糖导致的肝细胞损伤具有一定的拮抗作用。

表2 复方卡森糖浆对D-氨基半乳糖所致化学性肝损伤小鼠血清ALT、AST、ALP的影响

Table 2 Effects of compound Casson syrup on serum ALT, AST and ALP of mice with chemical liver injury caused by D-galactose

($\bar{x} \pm s, n=8$)					
组别 Group	剂量 Dose/(mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	ALT z/(U·L ⁻¹)	AST z/(U·L ⁻¹)	AST/ALT	ALP z/(U·L ⁻¹)
正常对照 Normal control	-	34.63±1.41	144.50±27.30	4.18±0.84 [#]	171.50±20.10 [#]
模型对照 Model control	-	101.13±51.3 [*]	241.25±41.04 [*]	2.39±1.69	217.50±81.39 [*]
炎消迪娜儿糖浆对照 YS control	12	53.60±10.43	216.20±50.45	4.19±1.47	157.80±17.30 [#]
低剂量复方卡森糖浆 Low-dose of CCS	4	59.63±37.74	182.63±56.29	3.44±0.99	169.13±28.98 [#]
中剂量复方卡森糖浆 Medium-dose of CCS	8	45.25±17.80	159.13±31.84	3.79±0.95	173.38±27.64 [#]
高剂量复方卡森糖浆 High-dose of CCS	16	38.80±4.76	145.80±13.03	3.83±0.75	149.60±24.81 [#]

注: 炎消迪娜儿糖浆用作复方卡森糖浆的阳性对照药物。ALT为谷丙转氨酶, AST为谷草转氨酶, ALP为碱性磷酸酶。与对照组比较, ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。

Note: Yanxiaodinar syrup (YS) was used as the positive control of compound Casson syrup (CCS). ALT is alanine aminotransferase; AST is aspartate aminotransferase; ALP is alkaline phosphatase. compared with control group, ^{*} $P<0.05$; compared with model group, [#] $P<0.05$.

表3 复方卡森糖浆对D-氨基半乳糖所致化学性肝损伤小鼠肝组织MDA、GSH、SOD的影响

Table 3 Effects of compound Casson syrup on MDA, GSH, SOD in liver tissues of mice with chemical liver injury caused by D-galactose

($\bar{x} \pm s, n=8$)				
组别 Group	剂量 Dose/(mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	MDA $\rho/(\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1})$	GSH-Px $\rho/(\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1})$	SOD z/(U·mg ⁻¹)
正常对照组 Normal control	-	0.79±0.10	25.60±7.79	12.23±3.21 ^b
模型对照 Model control	-	0.82±0.14 [*]	32.13±9.24 [*]	4.37±3.94 ^{**}
炎消迪娜儿糖浆对照 YS control	12	0.74±0.09 [#]	27.27±9.03	5.78±1.56 [#]
低剂量复方卡森糖浆 Low-dose of CCS	4	0.56±0.18 [#]	30.34±6.51	7.30±1.53 [#]
中剂量复方卡森糖浆 Medium-dose of CCS	8	0.67±0.12 [#]	26.33±10.05	5.89±1.64 [#]
高剂量复方卡森糖浆 High-dose of CCS	16	1.09±0.09	19.82±16.44 [#]	20.16±5.17 ^{##}

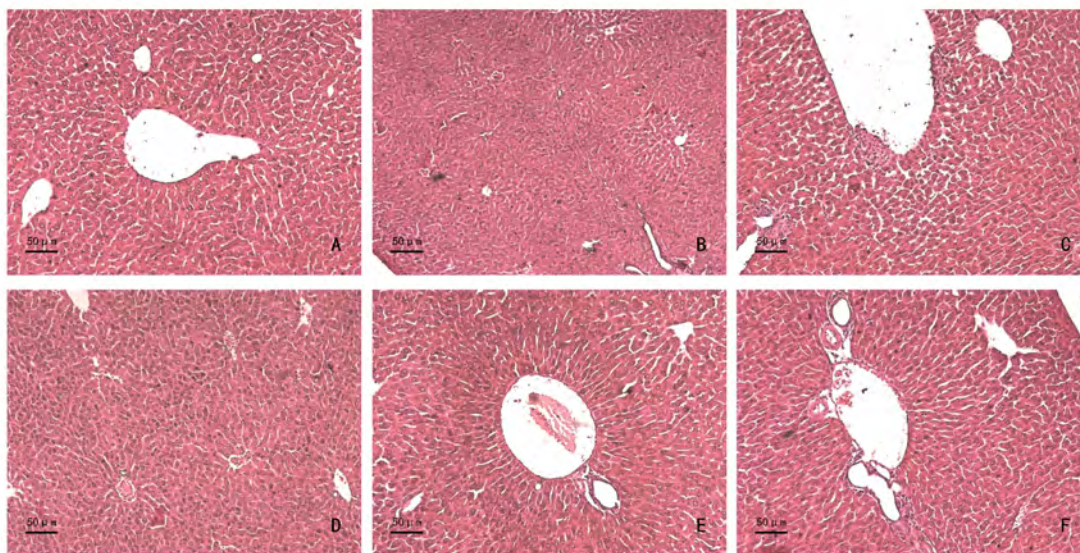
注: 炎消迪娜儿糖浆用作复方卡森糖浆的阳性对照药物。MDA为丙二醛, GSH-Px为谷胱甘肽过氧化物酶, SOD为超氧化物歧化酶; 与对照组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。与模型组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。

Note: Yanxiaodinar syrup (YS) was used as the positive control of compound Casson syrup (CCS). MDA is malondialdehyde; SOD is superoxide dismutase; GSH-Px is glutathione peroxidase; compared with the control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; compared with model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

2.4 组织病理学评估

对照组小鼠的肝小叶结构清晰完整,肝细胞无异常(图1A)。模型组小鼠的肝索结构紊乱,有明显的肝细胞灶性坏死,周围有炎性细胞浸润,表明存在急性肝组织损伤(图1B)。阳性组小鼠的局部肝细胞轻

度肿大,肝小叶结构无明显异常,提示肝组织损伤得到明显改善(图1C)。与模型组比较,复方卡森糖浆低、中、高剂量组小鼠的肝组织病理损伤得到明显改善(图1D、E、F),表现为肝小叶结构较完整,无明显炎性细胞浸润。



注: A为正常对照组; B为模型对照组; C为炎消迪娜儿糖浆阳性组; D、E和F分别为复方卡森糖浆低、中、高剂量组。

Note: A is normal control group; B is model control group; C is Yanxiaodinar syrup positive group; D, E and F are compound Casson syrup low-dose, medium-dose and high-dose groups, respectively.

图1 复方卡森糖浆对D-氨基半乳糖所致化学性肝损伤小鼠肝组织病理学影响(HE染色, ×200)

Figure 1 Effect of compound Casson syrup on liver tissue caseology of D-galactose induced chemical liver injury mice (HE staining, ×200)

3 讨论

近年来,由于不良生活习惯和现代社会生活和工作环境,如高压、久坐、熬夜加班、长期酗酒、摄入高热量食品及慢性病药物的长期使用等因素,药物性肝病、酒精性肝病的发病率明显上升。据统计,2015年我国酒精性脂肪性肝病患者约2 463.5万人,其中40多岁年龄段的人群的酒精性肝病发病率最高,为10%以上^[12];另外,约有25%的人存在非酒精性脂肪肝^[13]。化学性有害物质通过胃肠道和血液循环进入肝脏进行代谢,因此肝脏容易受到这些毒性物质的损害,造成化学性肝损伤。肝损伤动物模型类似于人类肝炎发生的病理生理过程,是筛选保肝药物较为理想的研究模型之一。因此,应加强实验与临床应用的结合,注重整体观念与辨证论治,从而充分体现传统医药治

疗化学性肝损伤的优势及广阔前景^[14]。

本研究通过D-氨基半乳糖诱导建立了ICR小鼠急性化学性肝损伤模型,模型组小鼠的肝、脾脏指数均显著升高,说明肝脏和脾脏均受到化学物质的影响。其中,炎消迪娜儿糖浆阳性对照组小鼠的脾脏指数偏低应不是毒性反应,而是与当时动物体质量偏小相关。肝功能指标检测数据表明,复方卡森糖浆各剂量组具有保肝作用。本研究表明,复方卡森糖浆给药组小鼠血清中ALT和AST水平均明显低于肝损伤模型组,说明中药在降低ALT、AST以及保护肝细胞方面起到了一定的作用;该结果与以往文献结论^[15-16]相一致。进一步评估各组小鼠的抗氧化状态,结果显示模型组小鼠肝组织匀浆中MDA、GSH-Px值升高,SOD含量明显降低,并且HE染色后观察发现模型组小鼠的肝组织发生了病理学改变,说明化学性肝损伤模型建立

成功。

复方卡森糖浆对肝损伤的修复作用, 是因为复方卡森糖浆通过影响肝脏代谢机能, 增强抗氧化作用, 调节机体免疫, 保护受损肝细胞。复方卡森糖浆和炎消迪娜儿糖浆都是临床上用于炎症疾病治疗的主要中药制剂。本研究中同时使用炎消迪娜儿糖浆作为阳性对照, 可以证明动物实验具有检验灵敏性, 即能够证明阳性药物的有效性。

本实验结果表明, 复方卡森糖浆可以有效缓解D-氨基半乳糖引起的小鼠急性化学性肝损伤。本实验以复方卡森糖浆的保肝作用为切入点, 研究该制剂的保肝作用可为复方卡森糖浆的临床应用提供理论基础, 并为新药开发奠定基础。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心实验动物福利与伦理委员会实验动物伦理委员会审查批准 (No. 2020-002)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Welfare and Ethics Committee of Xinjiang Center for Disease Control and Prevention (Approval Letter No. 2020-002), and all experimental protocols were carried out following the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892—2018), ARRIVE 2.0, IGP 2012 and IAVE 2010.

[作者贡献] Author Contribution]

麦丽开·阿不力米提负责文献查阅和整理, 以及文章撰写与修改; 艾山·艾比布勒和史深协助完成动物实验, 并整理分析数据; 阿不都沙拉木·阿不都热依木参与文章思路及整体内容的讨论; 艾尼瓦尔·塔力甫负责实验设计与审核, 并对全文内容进行指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 代云云, 谢晓蓉, 王茂鹤, 等. 我国四大民族医药体系概述[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3):1522-1525.
DAI Y Y, XIE X R, WANG M H, et al. Overview of four national medicine system[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(3):1522-1525.
- [2] 刘燕, 张莉, 黄华. 具抗炎作用维药的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9):1714-1720. DOI:10.4268/cjcmm20140933.
LIU Y, ZHANG L, HUANG H. Advance in studies on anti-inflammatory effect of Uygur medicine[J]. China J Chin Mater

- Med, 2014, 39(9):1714-1720. DOI:10.4268/cjcmm20140933.
- [3] 张晓恒, 姚佳, 秦冬梅. 毛菊苣提取物对小鼠肝纤维化的保护作用[J]. 世界华人消化杂志, 2020, 28(3):86-91.
ZHANG X H, YAO J, QIN D M. Protective effects of *Cichorium glandulosum* Boiss extracts against liver fibrosis in mice[J]. World Chin J Dig, 2020, 28(3):86-91.
- [4] 阿吉艾克拜尔·艾萨, 信学雷, 吴涛, 等. 毛菊苣功能成分及药理作用研究[Z]. 国家科技成果, 2017.
Aji-Ekbel-Isa, XIN X L, WU T, et al. Study on functional constituents and pharmacological effects of Chicory hairy [Z]. National Scientific and Technological Achievements, 2017.
- [5] 吴晓琴, 宋晓琳, 彭瀛, 等. 花脸蘑多糖水提取物对D-氨基半乳糖致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 延边大学医学学报, 2013, 36(1):22-24. DOI:10.16068/j.1000-1824.2013.01.005.
WU X Q, SONG X L, PENG Y, et al. Protective effects of water extract of the *Lepista sordida* polysaccharides for D-galactosamine-induced acute liver injury in mice[J]. J Med Sci Yanbian Univ, 2013, 36(1):22-24. DOI:10.16068/j.1000-1824.2013.01.005.
- [6] 信学雷, 吴汉夔, 吕俏莹, 等. 维吾尔药毛菊苣提取物降糖活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(2):234-238. DOI:10.16333/j.1001-6880.2012.02.024.
XIN X L, WU H K, LV Q Y, et al. Hypoglycemic effect of extracts from *Cichorium glandulosum*[J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24(2):234-238. DOI:10.16333/j.1001-6880.2012.02.024.
- [7] 古力米拉·买买提衣明, 古力那孜·阿不都热合满. 维药清热卡森颗粒治疗脂肪肝61例观察[J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(1):12-13. DOI:10.16041/j.cnki.cn15-1175.2014.01.011.
Gulimila-Maimaitiyiming, Gulnaz-Abudu Rehman. Observation on 61 cases of fatty liver treated with weiqingre Casson Granule[J]. J Med Pharm Chin Minor, 2014, 20(1):12-13. DOI:10.16041/j.cnki.cn15-1175.2014.01.011.
- [8] 王晓杰, 吾买尔江·牙合甫, 阿丽米热·买买提, 等. 菊苣多糖对小鼠药物性肝损伤保护作用的筛选[J]. 现代畜牧兽医, 2021(4):9-13.
WANG X J, Yakup-Omar, Mamat-Almira, et al. Screening of the protective effect of *Cichorium intybus* L. polysaccharide on drug-induced liver injury[J]. Mod J Animal Husb Vet Med, 2021(4):9-13.
- [9] 秦冬梅, 胡利萍, 文志萍, 等. 维药毛菊苣提取物对小鼠四氮化碳急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8):1180-1181. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2012.08.032.
QIN D M, HU L P, WEN Z P, et al. Protective effects of *Cichorium glandulosum* Boiss extracts on experimental liver injury in mice[J]. Chin Pharmacol Bull, 2012, 28(8):1180-1181. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2012.08.032.
- [10] 张权林, 罗玉琴, 杨伟俊, 等. 刺山柑胶囊对肝损伤模型小鼠的保护作用及对大鼠胆汁分泌的影响[J]. 中国药房, 2014, 25(19):1747-1750. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.06.
ZHANG Q L, LUO Y Q, YANG W J, et al. Protective effects of caper capsules on liver injury model mice and bile secretion of rats[J]. China Pharm, 2014, 25(19):1747-1750. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.06.
- [11] 万晓莉, 谢笑龙, 刘杰, 等. 口服齐墩果酸对D-氨基半乳糖致小鼠

- 急性肝损伤的保护作用[J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(1):26-29. DOI:10.13375/j.cnki.wcjps.2016.01.008.
- WAN X L, XIE X L, LIU J, et al. Hepatoprotective effect of oleanolic acid on D-galactosamine- induced acute liver injury in the mice[J]. West China J Pharm Sci, 2016, 31(1):26-29. DOI: 10.13375/j.cnki.wcjps.2016.01.008.
- [12] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1998:157.
- Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Drug Standards of the Ministry of Health of the People's Republic of China: Uygur medicine volume[S]. Urumqi: Xinjiang People's Medical Publishing House, 1998:157.
- [13] 代小佩. 我国病毒性肝炎发病率下降 其他类型肝炎有所上升[N]. 科技日报, 2021-07-29(2).
- DAI X P. The incidence of viral hepatitis decreased and other types of hepatitis increased in China[N]. Science and Technology Daily, 2021-07-29(2).
- [14] 熊亚茹, 张莹莹, 崔鲁炜, 等. 某复方口服液对小鼠酒精性肝损伤的辅助保护作用研究[J]. 预防医学情报杂志, 2021, 37(8):1164-1167.
- XIONG Y R, ZHANG Y Y, CUI L W, et al. Auxiliary protection of A compound oral liquid on alcoholic liver injury in mice[J]. J Prev Med Inf, 2021, 37(8):1164-1167.
- [15] 付双楠, 朱平生, 高达. 中医药防治化学性肝损伤的研究进展[J]. 中医学报, 2017, 32(3):449-454. DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2017.03.116.
- FU S N, ZHU P S, GAO D. Progress of TCM studies in TCM treatment of liver injury due to chemical factors[J]. Acta Chin Med, 2017, 32(3):449-454. DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2017.03.116.
- [16] CHEN M J, VIJAY V, SHI Q, et al. FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury[J]. Drug Discov Today, 2011, 16(15-16):697-703. DOI:10.1016/j.drudis.2011.05.007.
- (收稿日期:2021-03-16 修回日期:2021-07-21)
(本文编辑:张俊彦, 富群华, 周培)

《实验动物与比较医学》出版伦理声明

为加强科研诚信与学术道德建设, 树立良好学风和期刊形象, 建立和维护公平、公正的学术交流生态环境, 《实验动物与比较医学》承诺严格遵守并执行国家有关科研诚信和学术道德的政策与法规。同时, 为促进我国实验动物科学与比较医学科研成果的国际交流与认可, 本刊参照并遵循国际出版伦理委员会(Committee on Publication Ethics, COPE)和国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE)等国际通行的出版伦理规范。因此, 本刊根据目前实际情况, 特做以下声明, 借此规范作者、同行评议专家、期刊编辑等在投稿、审稿、编辑出版全流程中的行为, 并接受学术界和全社会的监督。

1. 所有来稿必须是作者的原创作品, 如文中使用先前发表的资料(如图、表格), 需要提供相关的版权及许可证明。
2. 本刊坚决抵制第三方代写或代投、抄袭(即剽窃)、造假(包括伪造及篡改)等学术不端行为。一经发现, 编辑部立即撤稿, 该文所有作者均会被列入黑名单。
3. 本刊不接受重复发表文章(包括不同语种), 也不允许作者一稿多投(包括同时或错时)。稿件一旦受理, 编辑部将即时处理。若作者有加急需求, 可第一时间联系编辑部寻求帮助。
4. 作者投稿前须确认署名及顺序, 所有作者均须对该文的科研诚信负责。投稿时应登记所有署名作者的基本信息, 并在文末附作者贡献说明及利益冲突声明。
5. 若来稿有过投稿他刊的经历, 本刊鼓励作者第一时间如实说明, 并提供以往的审稿意见及修改情况(包括补充论据或解释说明)。这样的诚信行为有利于该稿在本刊的审稿速度和录用概率。
6. 本刊实行严格的三审制度, 所有来稿均需通过编辑部初审、同行评议专家外审和主编定稿会终审共3个审稿环节, 才决定录用与否。
7. 本刊审稿专家和编辑均需公正、尽责对待所有来稿, 对学术不端行为不姑息、不偏袒, 努力维护期刊学术声誉, 并在文章未发表前不随意公开研究内容, 以保障作者的首发权。
8. 所有来稿中若涉及学术不端行为(《CY/T 174—2019: 学术出版规范 期刊学术不端行为界定》), 均须由作者本人负责。本刊对已发现的学术不端作者, 保留通报其所在单位及同领域期刊社的权利。

《实验动物与比较医学》编辑部



李洪涛, 教授, 硕士研究生导师, 现任广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室实验动物部主任, 广州医科大学附属第一医院实验动物伦理委员会主任, 中国实验动物学会实验小型猪专业委员会副主任委员, 广东省实验动物学会常务理事。1987年毕业于中山大学生物系动物学专业, 2008年取得南方医科大学医学博士学位, 长期从事实验动物学的教学、科研工作。近年来主要从事西藏小型猪实验动物化, 以及呼吸系统疾病如肺动脉高压、肺纤维化、慢阻肺动物模型的研究工作, 尤其在呼吸系统疾病动物模型的病理生理研究和药物筛选方面取得了一定的成绩。主持完成广东省科技厅项目多项, 获得授权治疗肺纤维化中药国家发明专利1项, 荣获广东省科技进步三等奖1项, 同时作为副主编参与编写《医学实验动物学》(第3版)等教材。

不同方法建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型的比较研究

卢心鹏, 刘 蓉, 黄文博, 赵 瑾, 李洪涛

(广州医科大学附属第一医院, 呼吸疾病国家重点实验室, 广州呼吸健康研究院, 广州 510120)

[摘要] 目的 比较烟草烟雾暴露 (cigarette smoke exposure, CSE) 及其联合细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 气道内滴注两种方法建立大鼠慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 模型的效果及特点。方法 将SD大鼠随机分为对照组、CSE组和CSE+LPS组, 每组10只, 分别给予正常环境饲养、熏烟箱CSE、熏烟箱CSE联合LPS气道内滴注。建立大鼠COPD模型后24周检测大鼠肺功能, HE染色观察气道和肺组织病理变化, ELISA检测血清白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 含量。结果 CSE+LPS组和CSE组大鼠肺功能结果显示, 气道阻力、静态肺顺应性、功能残气量均高于对照组, 而潮气量、每分钟通气量、第50 ms用力呼气容积与用力呼气容积比均低于对照组 (均 $P < 0.05$), 而CSE+LPS组比CSE组大鼠的肺功能明显下降 (均 $P < 0.05$)。CSE组和CSE+LPS组肺泡腔均呈代偿性扩张, LPS+CSE组可见部分间隔变薄、断裂, 形成肺大泡。CSE+LPS组和CSE组大鼠血清IL-8和TNF- α 含量均明显高于对照组 (均 $P < 0.05$), 而且CSE+LPS组大鼠TNF- α 表达水平明显高于CSE组 ($P < 0.05$)。结论 应用CSE联合气管滴注LPS的方法建立的COPD大鼠模型更接近于人类疾病的临床表现, CSE+LPS联合方法优于单纯CSE的方法。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 脂多糖; 烟草烟雾; 肺功能; 大鼠模型

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0201-06

A Comparative Study of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rat Models Established by Different Methods

LU Xinpeng, LIU Rong, Huang Wenbo, ZHAO Jin, LI Hongtao

(Guangzhou Institute of Respiratory Health, State Key Lab of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

Correspondence to: LI Hongtao (ORCID: 0000-0002-2694-0514), E-mail: gyhongtao@126.com

[ABSTRACT] **Objective** To compare the effects and characteristics of cigarette smoke exposure (CSE) alone and CSE combined with airway instillation of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Male SD rats were randomly divided into control, CSE, and CSE+LPS groups, with 10 rats in each group. After 24 weeks, the models were established and the lung function of the rats was measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the pathological

[基金项目] 广东省2014年度公益研究与能力建设专项资金项目: 大鼠慢阻肺动物模型的标准化研究 (2014A030304069)

[第一作者] 卢心鹏 (1984—), 女, 硕士, 研究方向: 呼吸疾病动物模型研究。E-mail: luxinpeng817@163.com。ORCID: 0000-0002-3476-3394

[通信作者] 李洪涛 (1964—), 研究生导师, 教授, 研究方向: 呼吸疾病动物模型及病理生理学研究。E-mail: gyhongtao@126.com。ORCID: 0000-0002-2694-0514

changes in the airway and lung tissue. The ELISA method was used to detect the level of serum interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in peripheral blood. **Results** Airway resistance (RI), functional residual capacity (FRC), and chord compliance (Cchord) of the CSE and LPS+CSE groups were higher than those of the control group (all $P < 0.05$), while the tidal volume (TV), minute volume (MV), and forced expiratory volume in 50 ms (FEV50) / forced vital capacity (FVC) of the CSE and LPS+CSE groups were lower than those of the control group (all $P < 0.05$). HE staining of lung tissue showed that the average alveolar intercept and thickness of the small airway walls were higher in the CSE and LPS+CSE groups than those in the control group. Compensatory enlargement was evident in the alveolar cavity of the CSE and CSE+LPS groups, and the alveolar septum widened, with a fusion of pulmonary alveoli in the CSE+LPS group. The levels of IL-8 and TNF- α in serum of the CSE and CSE+LPS groups were higher than those of the control group (all $P < 0.05$). The level of TNF- α in serum of the CSE+LPS group was higher than that of the CSE group ($P < 0.05$). **Conclusion** The CSE combined with LPS method is superior to CSE alone for establishing the COPD rat model, and the combined model is closer to clinical manifestations.

[Key words] Chronic obstructive pulmonary disease; Lipopolysaccharide; Cigarette smoke; Lung function; Rat models

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 简称慢阻肺, 是一种气流受限不完全可逆、呈进行性发展的疾病, 以气道、肺实质和肺血管的慢性炎症为主要特征。随着发达国家人口老龄化进展、发展中国家吸烟人数上升和生物燃料污染严重, 世界卫生组织预计未来 COPD 的发病率将持续升高, 到 2060 年可能将有超过 540 万人/年死于 COPD 及相关疾病^[1]。我国 COPD 的发病状况也相当严重, 40 岁以上人群 COPD 的死亡率达到 13.7%^[2]。作为一种高致残率和高病死率的疾病, COPD 的防治始终是临床和基础研究的重点之一。建立与临床患者疾病发生发展及病理变化相符合的动物模型, 是研究 COPD 发病机制与治疗药物的基础。目前建立 COPD 动物模型的常见方法有两种, 即烟草烟雾暴露 (cigarette smoke exposure, CSE) 以及 CSE 联合细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 暴露 (CSE+LPS)^[3-5], 但尚未有关于这两种方法建立大鼠 COPD 模型的对比研究报告。本研究对 CSE 和 CSE 联合气道内滴注 LPS 两种方法建立的大鼠 COPD 模型进行评价和对比分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 140~160 g, 购于浙江维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (浙) 2019-0001]。大鼠饲养于广州医科大学实验动物中心屏障环境 [SYXK (粤) 2020-0227], 温度 22~25 °C, 湿度恒定, 12 h 日夜交替照明。本实验所涉及的动物实验操作均经过广州医科大学附属第一

医院实验动物伦理委员会批准 (No. 202040A)。

1.2 主要仪器和试剂

小动物有创肺功能仪 (BUXCO, 美国), 自制小动物密封熏烟箱 (规格为 100 cm×60 cm×60 cm), 全波长多功能酶标仪 (Thermo, 美国)。红玫牌香烟 (广东中烟工业有限责任公司, 焦油量 12 mg, 烟碱量 1.1 mg, 一氧化碳量 15 mg), 细菌脂多糖 (Sigma, 美国), 使用时用生理盐水 (即 0.9% NaCl 溶液) 配制成 1 mg/mL 溶液。大鼠 IL-8 和 TNF- α 检测用 ELISA 试剂盒 (R&D, 美国)。

1.3 大鼠 COPD 模型制备

将 SD 大鼠随机分为对照组、CSE 组和 CSE+LPS 组, 每组 10 只。分别采用 CSE 法和 CSE 联合 LPS 气管滴注法制备大鼠 COPD 模型^[6-7]。方法如下: CSE 组大鼠置于熏烟箱, 点燃 10 支香烟进行烟雾暴露 1 h, 每天上午和下午各 1 次, 中间间隔 6 h; 每周熏烟 6 d, 共 24 周。CSE+LPS 组大鼠熏烟方式与 CSE 组相同, 并于第 9、10、12 周的第一天, 将大鼠用 2% 异氟烷麻醉, 固定于自制固定板上, 在喉镜下经大鼠气道滴注 LPS, 每只大鼠每次给药 0.2 mg/kg; 给予 LPS 当天不熏烟^[7-8]。对照组大鼠在正常环境下饲养。

1.4 大鼠肺功能指标测定

造模结束后, 大鼠按体质量给予 3% 戊巴比妥钠麻醉, 仰卧位固定行气管插管, 连接小动物有创肺功能仪, 测定大鼠有创肺功能指标, 包括: 气道阻力 (airway resistance, RI)、潮气量 (tidal volume, TV)、静态肺顺应性 (chord compliance, Cchord)、功能残气量 (functional residual capacity, FRC)、每分钟通气量

(minute volume, MV)、第50 ms用力呼气容积(forced expiratory volume in 50 ms, FEV50)和用力呼气容积比(forced vital capacity, FVC)等参数, 计算FEV50/FVC。

1.5 肺组织病理学观察

肺功能测定完成后, 打开大鼠胸腔, 暴露心脏取血, 然后取左肺叶组织, 用质量分数为4%的多聚甲醛溶液固定24 h后, 常规依次脱水、石蜡包埋、切成4 μm 的薄片, 并用苏木精-伊红(HE)染色, 光学显微镜(100倍视野)下观察肺组织病理学变化。

1.6 大鼠血清IL-8和TNF- α 测定

各组大鼠心脏取血, 室温静置1 h, 3 000 r/min离心10 min, 分离血清。采用ELISA法以酶标仪检测IL-8、TNF- α 水平。具体步骤按照试剂盒说明书操作。

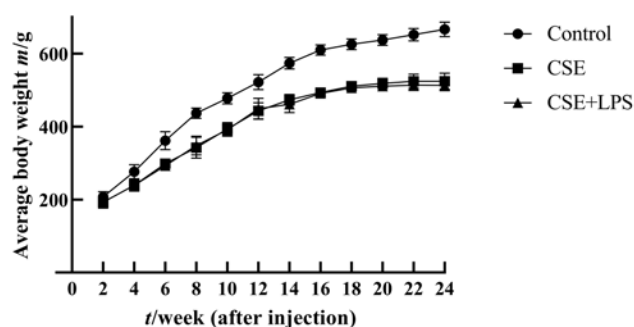
1.7 统计学方法

采用SPSS 16.0统计学软件进行实验结果数据分析。计量材料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本比较先进行单因素方差分析, 有统计学意义时, 组内两组间两样本再采用LSD- t 检验进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

对照组大鼠精神良好, 饮食正常, 毛发有光泽, 呼吸平稳, 无气促。CSE组和CSE+LPS组大鼠在造模期间均出现精神萎靡、咳嗽、气促、毛发枯黄等症状, 而且进食饮水量减少。造模结束后, CSE组和CSE+LPS组大鼠平均体质量分别为(524 $\pm$ 21) g和(513 $\pm$ 14) g, 与对照组[(666 $\pm$ 19)g]相比有明显差异($P < 0.05$), 而CSE组和CSE+LPS组之间无明显差异, 见图1。



注: Control指正常环境下饲养的对照组, CSE指烟草烟雾暴露组, CSE+LPS指烟草烟雾暴露联合细菌脂多糖气道内滴注组。每组10只大鼠。

Note: Control, rats in the control group raised in a normal environment; CSE, rats in the cigarette smoke exposure group; CSE+LPS, rats in the intratracheal LPS instillation combined with CSE group. There were 10 rats in each group.

图1 造模后各组大鼠的体质量生长曲线图

Figure 1 Body weight growth curve of rats in each group after modeling

2.2 各组大鼠肺功能参数比较

大鼠肺功能测定结果显示, CSE组和CSE+LPS组大鼠的RI、Cchord、FRC值均明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), TV、MV、FEV50/FVC均明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 和CSE组比较, CSE+LPS组的RI、FRC值显著升高, FEV50/FVC显著下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见表1。

2.3 各组大鼠肺组织病理学形态

HE染色后光学显微镜下观察大鼠肺组织切片肺泡及小气道周围炎症情况, 结果发现: 对照组大鼠肺组织肺泡结构完整连续, 未见明显炎症细胞浸润, 肺泡间隔整齐无断裂; CSE组大鼠小气

表1 造模后各组大鼠的肺功能指标

Table 1 Lung functions of rats in each group after modeling

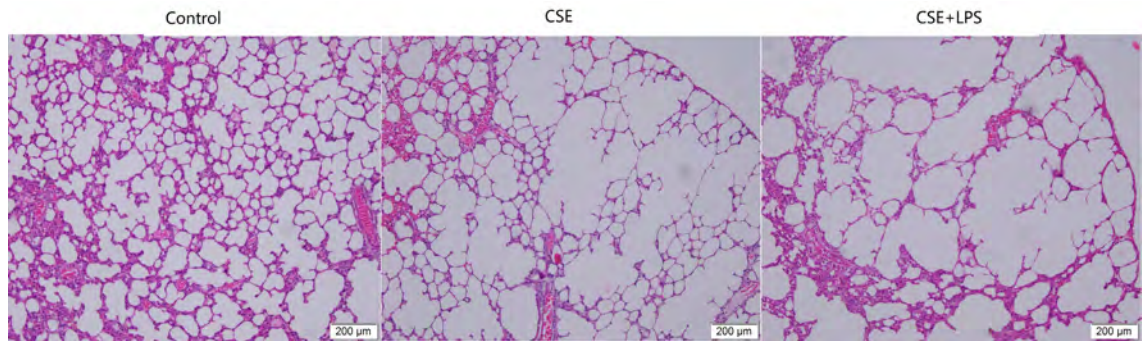
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	RI/($\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TV/mL	Cchord/($\text{mL} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1}$)	FRC/mL	MV/mL	FEV50/(FVC/%)
Control	0.250 $\pm$ 0.026	3.90 $\pm$ 0.19	1.210 $\pm$ 0.042	5.29 $\pm$ 0.51	233.98 $\pm$ 11.40	0.155 $\pm$ 0.041
CSE	0.315 $\pm$ 0.018*	3.64 $\pm$ 0.10*	1.310 $\pm$ 0.071*	5.88 $\pm$ 0.59*	218.72 $\pm$ 5.18	0.118 $\pm$ 0.030*
CSE+LPS	0.348 $\pm$ 0.025*#	3.57 $\pm$ 0.14*	1.395 $\pm$ 0.120*	6.58 $\pm$ 0.44*#	214.12 $\pm$ 8.60*	0.099 $\pm$ 0.035*#

注: Control指正常环境下饲养的对照组, CSE指烟草烟雾暴露组, CSE+LPS指烟草烟雾暴露联合细菌脂多糖气道内滴注组。RI即气道阻力, TV即潮气量, Cchord即静态肺顺应性, FRC即功能残气量, MV即每分钟通气量, FEV50/FVC即第50 ms用力呼气容积和用力肺活量之比。*表示与Control组比较, $P < 0.05$; #表示与CSE组比较, $P < 0.05$ 。

Note: Control, rats in the control group raised in a normal environment; CSE, rats in the cigarette smoke exposure group; CSE+LPS, rats in the intratracheal LPS instillation combined with CSE group. There were 10 rats in each group. RI, airway resistance; TV, tidal volume; Cchord, chord compliance; FRC, functional residual capacity; MV, minute volume; FEV50/FVC, forced expiratory volume in 50 ms VS forced vital capacity. *Represent significant differences compared to the control group, $P < 0.05$; #Represent significant differences compared to the CSE group, $P < 0.05$.

道支气管壁增厚，气道周围炎性细胞浸润，肺泡间隔增宽且炎性细胞浸润，邻近肺组织、肺泡腔呈代偿性扩张；CSE+LPS组大鼠肺组织与CSE组大鼠类似，除了支气管壁增厚、肺组织间隙存在炎性细胞浸润、肺泡间隔扩大外，还可见部分肺泡间隔变薄、断裂，形成肺大泡（图2）。



注：Control指正常环境下饲养的对照组，CSE指烟草烟雾暴露组，CSE+LPS指烟草烟雾暴露联合细菌脂多糖气道内滴注组。
Note: Control, rats in the control group raised in a normal environment; CSE, rats in the cigarette smoke exposure group; CSE+LPS, rats in the intratracheal LPS instillation combined with CSE group.

图2 各组大鼠肺组织病理形态变化(HE染色, ×100)
Figure 2 Pathological changes of lung tissues of rats in each group (HE staining, ×100)

2.4 各组大鼠血清IL-8和TNF-α含量

与对照组比较，CSE组和CSE+LPS组大鼠血清中IL-8含量均明显升高（ $P < 0.05$ ），CSE组和CSE+LPS组之间差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。与对照组比较，CSE组和CSE+LPS组的TNF-α含量也均明显升高（ $P < 0.05$ ），而且CSE+LPS组TNF-α含量明显高于CSE组（ $P < 0.05$ ）。各组数据详见表2。

表2 各组大鼠血清中IL-8和TNF-α含量
Table 2 Serum contents of IL-8 and TNF-α in different groups of rats

($\bar{x} \pm s$, $n=10$)		
Group	IL-8 ρ /(pg·mL ⁻¹)	TNF-α ρ /(pg·mL ⁻¹)
Control	77.48±11.65	57.43±9.30
CSE	162.87±17.95*	109.35±13.78*
CSE+LPS	160.72±33.04*	141.10±18.82*#

注：Control指正常环境下饲养的对照组，CSE指烟草烟雾暴露组，CSE+LPS指烟草烟雾暴露联合细菌脂多糖气道内滴注组。与Control组比较，* $P < 0.05$ ；与CSE组比，# $P < 0.05$ 。
Note: Control, rats in the control group raised in a normal environment; CSE, rats in the cigarette smoke exposure group; CSE+LPS, rats in the intratracheal LPS instillation combined with CSE group. There were 10 rats in each group. *Represent significant differences compared to the control group, $P < 0.05$; #Represent significant differences compared to the CSE group, $P < 0.05$.

3 讨论

COPD是一种常见的呼吸系统疾病，其特征是持续气流受限同时伴有支气管慢性炎症增加。目前COPD

发生发展的确切原因并不明确。吸烟是COPD高度相关的危险因素，烟草中含有多种有害化学成分和细小颗粒，能引起肺部炎性反应、气道阻塞和肺泡结构改变^[2]。建立符合临床实际的COPD动物模型，是研究COPD发病机制的重要基础，也是深入研究COPD的重要部分。理想的COPD动物模型应具有与人类疾病相一致的临床特征，满足以气流受限为特征的肺功能改变、气道损伤和肺内炎症细胞增多等条件^[9]。大鼠、小鼠、豚鼠、猪、马、兔、比格犬等动物均可用于建立COPD模型。其中，大鼠因基因组序列与人类基因组类似，容易进行基因调控，而且繁殖周期短、饲养成本低等特点，成为最常用的COPD模型动物。与小鼠模型相比，大鼠的取材也更加方便。

目前常见的COPD动物造模方法有多种，如CSE^[6, 10]、可吸入颗粒物暴露^[11-12]、气管注射LPS^[13]等。本研究选择了CSE和CSE联合气管滴注LPS所诱导的COPD大鼠模型，并对这两种方法建立的模型进行比较评价。

肺功能检测和肺组织病理检查是目前公认的评价COPD动物模型建立是否成功的标准。本研究结果显示，单纯CSE方法和CSE联合气管滴注LPS方法建立的COPD模型大鼠的肺功能均比对照组明显下降，肺部炎性细胞明显增多，出现肺泡结构紊乱和气道黏液高分泌等慢阻肺症状，这与用CSE联合LPS气管滴注法建立小鼠COPD模型和用单纯CSE法建立老年（22周龄）大鼠COPD模型显示的肺功能和肺组织病理学变化^[7-8, 14]是一致的，表明本研究中两种方法建立的

COPD大鼠模型均成功。

LPS是革兰阴性细菌细胞壁的主要促炎性糖脂,进入肺脏后能刺激单核细胞、内皮细胞及中性粒细胞,合成释放一系列炎症介质,导致肺部急性感染,从而形成肺气肿^[15]。在本研究中,CSE联合气管滴注LPS的方法旨在模拟感染引起COPD急性发作从而导致肺功能急剧下降及气道黏液高分泌的特点。

气道炎性反应在COPD的发生及发展过程中具有重要作用。IL-8和TNF- α 是重要的促炎因子,在机体免疫应答中也发挥作用。促炎因子IL-8在烟草烟雾诱导的肺部炎症调节方面发挥着关键作用^[16]。TNF- α 可以促进中性粒细胞向肺组织趋化、黏附和渗出,释放弹性蛋白酶,增强氧化反应,从而损伤上皮细胞,导致肺气肿^[17]。TNF- α 水平能够反映肺组织的损伤程度,其表达水平的升高与COPD患者的气道炎症增加和肺功能下降有关,会增加COPD的病死率,因此可将其作为评价肺损伤的可靠指标^[18]。

本实验结果显示,以CSE和CSE联合气管滴注LPS的方法建立COPD模型后,大鼠血清中IL-8和TNF- α 表达水平均显著升高,肺功能明显下降,RI、Cchord、FRC均显著升高,TV、MV、FEV50/FVC则均显著降低($P < 0.05$)。肺组织病理切片的HE染色结果进一步证实支气管存在炎性细胞浸润,肺泡壁变薄,肺泡腔有不同程度的扩张和断裂;这些结果均证明这两种方法建立的COPD大鼠模型均成功。而且与单纯烟雾暴露组相比,CSE联合气管滴注LPS组大鼠血清中的IL-8和TNF- α 表达水平升高更为显著,肺功能下降更加明显,气道壁增厚更加显著,气道炎症更明显,肺泡腔扩张、断裂更为明显。这表明CSE联合气管滴注LPS的方法更能促进炎症细胞浸润,导致肺组织气管壁增厚,气流受限,通气能力下降。

综上所述,本实验采用两种方法都能够成功建立COPD大鼠模型,而且CSE联合气管滴注LPS方法建立COPD模型后大鼠肺功能损害、肺组织炎症与人类慢阻肺的临床病理特点更加接近,提示该方法建立的COPD模型可以更好地模拟慢阻肺的病理变化。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过广州医科大学附属第一医院实验动物伦理委员会审查批准(No. 202040A)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Guangzhou

Medical University (Approval Letter No. 202040A), and all experimental protocols were carried out following the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892—2018), ARRIVE 2.0, IGP 2012 and IAVE 2010.

[作者贡献 Author Contribution]

卢心鹏负责实验操作、分析数据、文章写作;刘蓉负责动物实验操作、给药等;黄文博负责分子生物学实验,数据分析;赵瑾负责动物病理分析;李洪涛负责实验设计指导,文章修改及把关。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 Reference]

- [1] World Health Organization. Projection of mortality and cause of death, 2016 to 2060 [EB/OL]. [2019-10-14]. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/.
- [2] WANG C, XU J Y, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health[CPH]study): a national cross-sectional study[J]. *Lancet*, 2018, 391(10131):1706-1717. DOI:10.1016/S0140-6736(18)30841-9.
- [3] 李征途,徐小明,巩雪芳,等.应用熏烟联合脂多糖方法建立慢性阻塞性肺疾病相关肺动脉高压小鼠模型[J]. *国际呼吸杂志*, 2014, 34(1):27-30, 封3.
LI Z T, XU X M, GONG X F, et al. Cigarette smoking plus airway LPS inhalation induced COPD-PAH in mouse[J]. *Int J Respir*, 2014, 34 (1): 27-30. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X. 2014.01.005.
- [4] LI D F, WANG J, SUN D J, et al. Tanshinone IIA sulfonate protects against cigarette smoke-induced COPD and down-regulation of CFTR in mice[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 376. DOI: 10.1038/s41598-017-18745-5.
- [5] LU W J, LI D F, HU J Y, et al. Hydrogen gas inhalation protects against cigarette smoke-induced COPD development in mice [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(6):3232-3243. DOI:10.21037/jtd.2018.05.93.
- [6] LI Y, LI S Y, LI J S, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(10):1752-1760. DOI:10.1248/bpb.b12-00407.
- [7] 周凤,李德富,袁良,等.两种不同方法建立的小鼠慢性阻塞性肺疾病模型的比较研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2019, 42(5): 367-371.
ZHOU F, LI D F, YUAN L, et al. A comparative study of two chronic obstructive pulmonary disease mouse models established by different methods[J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2019, 42(5): 367-371. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2019.05.010.
- [8] SHU J Z, LI D F, OUYANG H P, et al. Comparison and evaluation of two different methods to establish the cigarette smoke exposure mouse model of COPD[J]. *Sci Rep*,

- 2017, 7(1):15454. DOI:10.1038/s41598-017-15685-y.
- [9] WRIGHT J L, CHURG A. A model of tobacco smoke-induced airflow obstruction in the Guinea pig[J]. Chest, 2002, 121(5 Suppl):188S-191S. DOI:10.1378/chest.121.5_suppl.188s.
- [10] LIU X Y, MA C Q, WANG X Y, et al. Hydrogen coadministration slows the development of COPD-like lung disease in a cigarette smoke-induced rat model[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12:1309-1324. DOI:10.2147/COPD.S124547.
- [11] HE F, LIAO B L, PU J D, et al. Exposure to ambient particulate matter induced COPD in a rat model and a description of the underlying mechanism[J]. Sci Rep, 2017, 7:45666. DOI:10.1038/srep45666.
- [12] 王光艳, 刘菁, 刘学东. 烟熏 PM_{2.5} 颗粒建立 COPD 大鼠模型[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(21):1610-1613. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2017.21.002.
- WANG G Y, LIU J, LIU X D. Rat model of COPD established by inhalation with PM_{2.5}[J]. Int J Respir, 2017, 37(21): 1610-1613. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2017.21.002.
- [13] VERNOOY J H J, DENTENER M A, VAN SUYLEN R J, et al. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 26(1):152-159. DOI:10.1165/ajrcmb.26.1.4652.
- [14] HU Y X, CUI H, FAN L, et al. Resveratrol attenuates left ventricular remodeling in old rats with COPD induced by cigarette smoke exposure and LPS instillation[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2013, 91(12): 1044-1054. DOI: 10.1139/cjpp-2012-0464.
- [15] 庞宝森, 李远红, 张洪玉. 慢性阻塞性肺疾病动物模型的研究进展[J]. 心肺血管病杂志, 2005, 24(1):45-46. DOI:10.3969/j.issn.1007-5062.2005.01.016.
- PANG B S, LI Y H, ZHANG H Y. Research progress on animal models of emphysema[J]. Journal of Cardiovascular & Pulmonary Diseases, 2005, 24(1): 45-46. DOI: 10.3969/j. issn. 1007-5062.2005.01.016.
- [16] UNG T T, NGUYEN T T, LIAN S, et al. Nicotine stimulates IL-6 expression by activating the AP-1 and STAT-3 pathways in human endothelial EA.hy926 cells[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4):5531-5541. DOI:10.1002/jcb.27837.
- [17] 王妍, 朱虹江, 和春芳, 等. 清肺化痰颗粒对慢性阻塞性肺疾病急性加重期大鼠相关炎症因子及氧化应激反应的影响研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(12):1271-1276, 1281. DOI:10.3969/j. issn.1008-8849.2021.12.004.
- WANG Y, ZHU H J, HE C F, et al. Effects of Qingfei Huatan granules on related inflammatory factors and oxidative stress reaction in rats with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2021, 30(12): 1271-1276, 1281. DOI: 10.3969/j. issn. 1008-8849.2021.12.004.
- [18] 肖长栓, 刘娅平, 杨景哲. 雾化吸入和腹腔注射依达拉奉对烟雾吸入性损伤肺模型大鼠保护作用的比较研究[J]. 中国药房, 2021, 32(1):70-76. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.13.
- XIAO C S, LIU Y P, YANG J Z. Comparative study of protective effects of atomization inhalation and intraperitoneal injection of edaravone on smoke inhalation lung injury model rats[J]. China Pharmacy, 2021, 32(1):70-76. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.13.
- (收稿日期: 2021-07-14 修回日期: 2021-11-22)
(本文编辑: 张俊彦)

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

本刊是我国实验动物科学与比较医学领域的一本专业学术期刊, 严格遵守国家实验动物相关法律、法规和标准, 包括但不限于《实验动物管理条例》(2017年3月1日修订版) 和《实验动物 福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018) 等, 同时参考借鉴国际生物医学期刊关于动物实验研究报告的相关指南共识 (如 ARRIVE 2.0、IGP 2012、IAVE Guidelines 2010 等)。因此, 本刊对所有涉及动物实验的来稿均需审查实验动物福利与伦理相关内容。现将一些具体要求说明如下:

1. 涉及动物实验的来稿, 需提供实验动物生产许可证和质量合格证, 以及动物实验场所的实验动物使用许可证。以上证明须与使用动物种类及动物实验单位名称相匹配, 并在正文中列出其对应的许可证编号。

2. 涉及动物实验的来稿, 需在考虑 3R (替代、减少和优化) 原则的基础上设计动物实验, 并提供作者单位实验动物福利伦理委员会 (或相关机构) 出具的实验动物福利伦理审查批件。批件中所列内容须与投稿文章相吻合, 并在正文中列出对应的批准编号。

3. 实验动物的用药, 尤其是麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂, 特别是当涉及存活手术的动物实验时。鉴于无法确定非药用级麻醉剂 (如三溴乙醇、水合氯醛等) 的相关性状及对实验动物的影响, 从而不能保障实验动物福利及研究结果的可靠性, 而且目前已有更优的市售麻醉药剂可供选择, 因此本刊不建议使用上述试剂。如确需使用, 请提供充足理由说明及相应的批准文件。

4. 涉及肿瘤动物模型的研究, 本刊参考国内及国际通用准则, 建议单个肿瘤体直径不超过 20 mm (小鼠) 或 40 mm (大鼠) 且不出出现明显的肿瘤溃疡。如投稿文章有超出上述标准的研究内容, 需提交作者单位相关肿瘤动物模型研究的指导原则文件, 以及从科学角度判断肿瘤体积合理性的依据材料。

《实验动物与比较医学》编辑部

脓毒症动物模型的制备方法及其影响因素

李 潇, 颜海鹏, 肖政辉

(南华大学儿科学院, 湖南省儿童医院重症医学科, 长沙 410007)

[摘要] 脓毒症是常见的急危重症, 其致病机制复杂, 常涉及全身多个器官、系统, 其中炎症反应、免疫功能紊乱、凝血功能障碍等多种因素联结成相互联系、相互影响的网络系统, 加重病情进展。目前脓毒症病死率约25%, 严重威胁人类健康。建立稳定可靠的脓毒症实验动物模型是了解感染早期宿主防御调控机制、病情进展期宿主反应失调机制及研究新型药物治疗效果的重要手段。目前脓毒症动物模型的建立方法种类繁多, 且影响因素较多。本文就脓毒症动物模型的制备方法及其影响因素进行综述, 以期为研究者选择合适的动物模型提供参考。

[关键词] 脓毒症; 动物模型; 盲肠结扎穿孔术; 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0207-06

Construction Methods and Influencing Factors on Animal Model of Sepsis

LI Xiao, YAN Haipeng, XIAO Zhenghui

(Academy of Pediatrics of University of South China, Department of Pediatric Intensive Care Unit of Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China)

Correspondence to: XIAO Zhenghui (ORCID: 0000-0003-2056-8798), E-mail: xiaozh888@126.com

[ABSTRACT] Sepsis is a common acute and critical illness, and its pathogenic mechanism is complex, often involving multiple organs and systems in the body. Various factors such as inflammatory response, immune dysfunction, and coagulation dysfunction are connected into an interconnected and mutually influencing network system, aggravating the severity of the disease. At present, the case fatality rate of sepsis is about 25%, which is a serious threat to human health. Establishing a stable and reliable experimental animal model of sepsis is an important means to understand the mechanism of host defense regulation in the early stage of infection, the mechanism of host response disorder in the stage of disease progression and to study the therapeutic effect of new therapeutic drugs. At present, there are many methods to establish animal models of sepsis, and there are many influencing factors. Therefore, this paper reviewed the preparation methods and influencing factors of animal models of sepsis, in order to provide some references for researchers to select suitable animal models.

[Key words] Sepsis; Animal models; Cecal ligation and puncture; Mice

脓毒症 (sepsis) 是宿主对感染的反应失调而引起的危及生命的器官功能障碍^[1]。全球流行病学调查数据显示, 脓毒症和严重脓毒症住院病死率分别为17%和26%; 国内多项流行病学调查结果也与之相似, 该病是困扰重症监护病房医生的棘手问题之一^[2-3]。脓

毒症病程受多种因素的影响。为了更好地研究脓毒症的病理机制, 寻找更加合理的临床诊疗措施, 学者们尝试建立各种脓毒症动物模型以模拟人类脓毒症的病程。然而脓毒症的临床前动物模型很难完全复制临床上人类脓毒症的复杂性, 并受到多种因素的影响和制

[基金项目] 湖南省重点实验室和工程技术研究中心组建项目: 儿童急救医学湖南省重点实验室(2018TP1028)。湖南省科技创新重大项目: 湖南省急危重症急救能力提升与突发公共卫生应急救治关键技术协同创新工程-创伤后脓毒症、休克的早期预警、诊疗能力提升及关键技术研究(2020SK1014-3)。湖南省儿童医院院级课题(2019C38)

[第一作者] 李 潇(1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事儿童急救医学研究, E-mail: lixiaost@163.com

[通信作者] 肖政辉(1967—), 女, 博士, 教授, 主要从事儿童急救医学研究, E-mail: xiaozh888@126.com。ORCID: 0000-0003-2056-8798

约, 现将这些因素综述如下。

1 脓毒症模型的建立方法

结合近些年研究可知, 现有的脓毒症动物模型制备方法大致分为四类: (1) 注射外源性毒素模型; (2) 注射外源性活菌模型; (3) 腹腔感染模型; (4) 腹腔外脓毒症模型。其中前三种最为常用。

1.1 注射外源性毒素模型

向动物体内注射外源性毒素可建立脓毒症动物模型。例如内毒素或脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可诱导机体产生炎症因子, 通过介导适应性免疫或产生放大的级联反应, 促使全身炎症反应发生。可通过静脉、腹腔等不同途径向动物体内输注 LPS, 根据剂量和方法不同, 分为小剂量一次性输注、小剂量持续输注和大剂量一次性输注。小剂量单次输注 LPS, 引起宿主的器官功能损伤较轻, 自愈率较高。大剂量单次输注 LPS 通常会导致心输出量降低, 血管阻力正常化或增加, 与脓毒症早期高排低阻改变 (即全身血管阻力下降, 并伴有高心排血量) 不符, 引起的宿主炎症反应过重, 死亡率过高, 且致死的原因非脓毒症而是毒血症, 与研究目的不符^[4]。持续小剂量输注可较好地模拟人类早期高动力和晚期低动力的变化, 同时伴有免疫系统的激活, 能达到与临床脓毒症相似的死亡率, 适于研究抗炎复合物如炎症小体的作用以及炎症级联反应的激活机制。但注射 LPS 导致细胞因子短期急速升高, 与人类脓毒症病程中产生低而持久可检测的细胞因子水平不符, 有一定局限性^[5]。

1.2 注射外源性活菌模型

脓毒症是细菌及其细胞壁成分 LPS 释放入血导致的全身炎症反应。通过腹腔或静脉注射细菌如大肠埃希菌, 能引起机体炎症介质如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 和白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 快速升高, 产生的宿主反应与毒素中毒模型相似, 且腹腔内给药产生的炎症反应较静脉给药途径减弱。输注外源细菌可导致弥散性血管内凝血, 并参与微血管内皮细胞的活动, 扰乱抗凝机制, 同时可引起低血压休克, 适于研究宿主对病原体的反应机制, 探讨针对组织因子及其受体途径的干预方法^[5-6]。但该模型缺少类似于临床脓毒症的感染源, 且脓毒症通常是多菌性的, 单一菌株的使用不能很好地反映脓毒症的表现。

1.3 腹腔感染模型

腹腔感染是脓症患者最常见的感染源, 且腹腔感染模型操作简便, 可重复性高, 得到了广泛应用。有研究发现, 64% 的高被引脓毒症动物相关研究使用了盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP)^[7]。CLP 模型通过将盲肠结扎穿孔, 使腹腔内少量持续溢入混有多种细菌的肠内容物, 重现了多菌性腹膜炎的临床特点, 同时可呈现出促炎和抗炎免疫反应的激活、持续的炎症反应、早期高动力和晚期低动力循环状态、多器官功能障碍及细胞因子反应的类似动力学变化。且通过控制结扎盲肠的长度及穿孔所用针头大小、穿孔数目等因素可调控脓毒症模型动物的死亡率, 适于评估腹腔内感染^[5, 8-9]。但 CLP 模型可形成腹腔内脓肿和腹膜炎两种情况, 模型的坏死组织也缺少像临床上手术切除的干预方式, 所以有研究者提出可通过建立升结肠支架植入腹膜炎 (colon ascendens stent peritonitis, CASP) 模型解决这个问题。

CASP 模型是将一个固定管径的支架植入升结肠, 使肠内容物持续渗漏到腹腔中, 造成急性多菌性脓毒症性腹膜炎。脓毒症的严重程度可通过改变支架直径或在二次手术中移除支架并缝合肠穿孔来调节^[10-11]。研究发现, 当支架在 3 h 内被移除时, 小鼠预后较佳, 而当支架植入超过 9 h 后被移除, 小鼠死亡率增加。该模型血流动力学较稳定, 炎症因子水平稳步、持续增长, 常引起多器官功能障碍, 适用于弥漫性腹膜炎新治疗方法的评价。但也有研究发现, 随着细胞因子的快速升高, 大鼠模型肝脏中促炎因子表达较多, 抗炎因子表达较少, 与肺中促炎因子表达较少而抗炎因子表达较多的情况相反, 可能出现全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 和代偿性抗炎反应综合征 (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS) 在不同部位同时发生^[12]。有学者提出盲肠结扎和切口 (cecal ligation and incision, CLI) 模型能更好地模拟脓毒症的急性发作, 适用于脓毒症血流动力学改变和血气分析的短期研究^[5]。但 CLI 模型的应用还不广泛, 其代谢、血流动力学和免疫反应的特征尚未充分阐明。

将实验动物盲肠内容物腹腔注射到其他动物体内的盲肠浆液注射模型 (cecal slurry injection, CS) 是诱导多微生物脓毒症的另一种方法。新生小鼠器官体积小, 肠道发育不完全, 盲肠结扎和穿刺难度高, 故 CS 模型适用于研究新生儿脓毒症, 且避免了手术模型造

成组织损伤和缺血的影响^[13]。

1.4 腹腔外脓毒症模型

有60%的临床前脓毒症模型采用的是腹腔感染模型,但在测试新的治疗方法时,腹腔外脓毒症模型也很重要。通过向气管或鼻腔内注入细菌,进而诱发肺部感染的动物模型,可用于研究脓毒症的局部病理情况。该模型的实验操作简单且可重复性高,能引起多器官损伤;但其细胞因子水平具有菌株特异性,病程受所选菌株和接种剂量、抗生素的影响,存在一定局限性^[5, 14]。

2 建立脓毒症模型的考虑因素

2.1 实验动物种类和品种品系

脓毒症动物模型在进一步了解脓毒症复杂病理生理机制方面具有重要作用,其中动物的选择是动物模型建立的首要问题,关系到模型能否成功复刻临床。虽然许多物种与人类有共同的发病途径,但在脓毒症方面,物种间的差异是显著的。

目前可用于建立模型的动物种类较多,学者们根据不同动物种类各自的特点,将其用于不同目的的研究。大型哺乳动物如猪、犬和灵长类,其遗传背景、生理特点与人类相似,可对血液和组织进行连续取样、连续监测器官功能状态,适于观察疾病发生发展过程,研究脓毒症的基本机制,但成本昂贵,常用于新治疗药物和治疗模式的最终试验。如灵长类动物黑猩猩,对于评价脓毒症免疫炎症反应具有重要价值。猪、犬多用于研究多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),也可进行离体细胞培养。小型哺乳动物如大鼠、小鼠、豚鼠等啮齿类动物,价格低廉,操作方便,易于进行转基因或基因敲除,用于观察脓毒症的病理生理变化,进行生存率及基因相关疾病机制研究^[15-16]。

目前94%的脓毒症模型相关研究使用了啮齿类动物,其中小鼠模型占79%^[17]。关于脓毒症建模的现有文献中,大多数实验选择了C57BL/6小鼠。但小鼠总血容量过少,难以连续采集血液或组织样本以评估病理过程的时间依赖性,且有创性监测如血流动力学技术的使用受限,难以评估脓毒症的严重程度及所处阶段。

2.2 动物年龄

流行病学调查表明,年龄是脓症患者死亡率的独立预测因素,是决定脓毒症风险和预后的关键因素,

而且在成年人群中脓毒症病死率随着年龄的增长呈线性增加。有研究者通过回顾性分析发现,年龄是小儿脓毒症严重程度的决定因素,年龄越小,病死率越高,3岁前婴幼儿死亡率高于3岁后的儿童和青少年^[18-19]。小鼠生长周期可分为新生期(1周龄)、幼龄期(3~8周)、成熟期(2~4月龄)和中老年期(>4月龄),可根据实验目的与方法选择合适发育周期的小鼠进行实验。

目前新生小鼠脓毒症造模推荐选用CS模型,通过腹腔注射盲肠浆液(1.1~1.3 mg/g)模拟新生儿肠穿孔引起的多微生物脓毒症,其死亡率具有全身炎症和剂量依赖性的特点。对于幼龄期、成熟期及中老年期小鼠,大多采用注射外源性毒素模型及腹腔感染脓毒症模型,无论是CLP、CASP还是CS、LPS,既依赖于剂量,也受多种因素如穿孔数目、植入支架直径等影响。目前大多数实验选用6~12周龄小鼠。在CLP及LPS模型中均发现老年小鼠死亡率更高(65% vs 20%),IL-6和TNF- α 等炎症细胞因子水平更高,对抗炎性刺激的免疫反应能力更低,抗生素疗效愈差的特点^[5, 13, 20]。

2.3 动物性别

性别差异影响脓毒症的发病率和预后。对2001—2012年包括6 134例成人脓症患者数据的回顾性分析表明,男性脓症患者90 d和1年死亡率及住院期间死亡率均较女性高,分别为45.1%比42.1%,55.6%比51.4%,33.8%比31.3%,女性临床结局优于男性患者的原因可能与激素的分泌、调节相关^[21],也可能与X染色体上一些基因参与调节免疫相关蛋白质编码、mRNA转录有关,还可能因为多态性X-连锁基因与细胞嵌合能使女性更好地对抗感染。同时睾酮可通过激活非基因组途径调节的丝裂原活化蛋白激酶信号等机制起到免疫抑制作用^[22-24]。

研究发现,雌激素水平低下组小鼠巨噬细胞释放IL-1 β 和IL-6的量与正常组小鼠相比明显降低,提示雌激素有利于免疫功能的维持^[25]。相对于雌激素变化明显的雌鼠来说,雄鼠可能更适合大多数脓毒症建模相关研究,而对于研究性激素作用及妊娠、卵巢切除术后对感染的易感性及其病理生理机制研究,则雌鼠更具价值。

2.4 辅助治疗

临床前脓毒症模型为了更接近临床,应尽量使用基本的辅助治疗,也可根据实验目的而定。脓毒症常会导致血压下降和组织灌注不足。2016年的脓毒症和

脓毒性休克管理国际指南建议,在确诊脓毒症或脓毒性休克后1 h内应开始经验性静脉注射抗生素,3 h内静脉注射至少30 mL/kg的等渗晶体液。早期积极的液体复苏可显著增强脓毒症小鼠模型的临床相关性,并且将CLP小鼠术后4 d的存活率提高60%。而早期液体复苏不足可能无法复制临床脓毒症中出现的血流动力学异常状态。实验动物可通过静脉、皮下和腹腔内给药,为了密切模拟临床,液体复苏应通过静脉途径进行,但在静脉通路有限的小动物模型中,优先选择腹腔内给药,因此需结合模型的类型和研究目的选择合适的给药途径^[26-27]。

抗生素的使用是早期治疗脓毒症及脓毒性休克的关键步骤,能提高CLP术后实验动物存活率,但不是脓毒症模型中炎症反应和预后的主要决定因素。而且抗生素剂量需根据具体实验模型选择,目前尚无统一的给药方案。脓毒症和脓毒性休克管理国际指南建议,经验性使用广谱抗生素或基于模型和可能或已知的病原体选用抗生素。如对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌可用 β -内酰胺类治疗,对大肠埃希菌用第二代或第三代头孢菌素或氨基糖苷治疗;对多种微生物感染,如肠穿孔(如CLP和CASP模型),可以使用广谱抗生素如碳青霉烯,或覆盖G⁺和G⁻需氧菌和厌氧菌的药物组合治疗。有学者曾对190项小鼠脓毒症研究进行回顾性分析,结果显示 β -内酰胺类使用最频繁(90%)。另外,感染部位也影响抗生素的选择,不能有效穿过血脑屏障的抗生素不适用于中枢神经系统感染。在大多数小型啮齿类动物脓毒症研究中,抗生素为皮下给药,大型哺乳动物的研究中推荐静脉注射给药^[26, 28]。

2.5 并发症

脓症患者临床上常伴有如肝肾疾病、糖尿病等慢性病。研究表明脓症患者平均伴有1.07个并发症。目前动物模型基本使用健康、年轻的动物,而理想的脓毒症动物模型应能模拟临床脓毒症的特点。但合并肾损伤的CLP模型血管通透性增加,细菌清除率下降,脓毒症程度比简单CLP模型更重,且脓毒症存在凝血障碍会影响肝素治疗的效果。因此,可能复杂的脓毒症动物模型更适于评价药物疗效,研究有并发症的脓毒症动物模型更具临床意义^[29]。

3 建立CLP模型的影响因素

大多数研究采用CLP建立脓毒症模型,而在CLP手术操作过程中还有许多值得考虑的因素。

3.1 镇痛、镇静方式选择

在动物模型中,疼痛能影响动物行为和免疫系统功能。脓毒症模型推荐使用镇痛药物,镇痛药成为影响脓毒症模型存活率及炎症反应的重要因素。目前对于临床脓症患者使用镇痛药的类型及剂量尚无具体建议,且在临床前脓毒症研究中也较少提及。丁丙诺啡是啮齿类动物模型中最常用的镇痛药,在小鼠CLP模型中,通常是腹腔内或皮下注射,且尚无推荐剂量,大部分研究所使用剂量为0.05~0.1 mg/kg。研究发现,在脓毒症免疫相关机制的研究中应用丁丙诺啡对小鼠存活率、细胞因子水平的影响不大,相比于易导致细菌移位及促进细菌生长的吗啡,免疫抑制作用较弱的阿片类药物可能更适用于脓毒症炎症相关的研究^[30]。

动物实验常需对动物进行麻醉。有研究表明,挥发性麻醉剂可增强巨噬细胞的吞噬作用,并降低TNF- α 、IL-1 β mRNA的表达,在一定程度上保护了体内缺血再灌注损伤的组织器官,缩短术后恢复时间,延长脓毒症小鼠的生存期^[31-32]。而水合氯醛的麻醉效果仅为催眠镇静作用,依据动物伦理目前已不推荐腹腔注射水合氯醛用于动物麻醉^[33]。Herrmann等^[32]发现异氟烷麻醉在小鼠CLP模型中对器官功能损伤、生存率的改变不明显,未显著影响预后。七氟醚、地氟醚麻醉可显著提高7 d生存率,减轻器官损伤,降低组织损伤标志物的表达。

目前在脓毒症模型中,镇痛镇静方式的选择、剂量选定、适用研究方面的文献不多,还待进一步研究摸索。

3.2 盲肠结扎长度及穿刺针的大小、数量

在CLP模型中,盲肠结扎长度、穿刺针型号、穿孔数量都被认为与脓毒症模型损伤严重程度相关,且作为影响模型死亡率的重要因素。研究发现,在穿刺针大小和穿孔数量等影响因素一致的情况下,盲肠结扎穿孔长度是脓毒症严重程度的独立决定因素;结扎距离大于盲肠长度的5%时(约0.3 cm)才开始出现死亡,脓毒症严重程度及死亡率随结扎长度增加而提高^[5, 34]。但也有学者提出,盲肠结扎长度对脓毒症小鼠72 h生存率无明显影响,生存率取决于盲肠体积而不是长度。因实验动物的盲肠形状不规则,盲肠长度在结扎穿刺过程中易发生变化,所以盲肠体积相对于长度来说能够更精确地控制感染灶大小^[35]。

使用不同型号的针头,小鼠7 d死亡率也不同,18 G为100%,21 G为50%,25 G为5%,脓毒症的严

重程度随穿刺针头直径增加而加重。随着穿刺针直径增大和穿孔数增多,粪便流入腹腔的速度越快,感染越重。因此,实验中通过把控盲肠结扎长度、穿刺针型号、穿孔数量等因素可能使CLP模型的器官损伤、炎症反应、死亡率等得到控制^[36]。

4 结语

综上所述,腹腔感染模型(如CLP)及注射外源性毒素模型(如注射LPS)是目前较为常用的脓毒症病理生理机制研究模型。建立稳定的动物模型的影响因素包括动物种类、品种品系、年龄、性别、辅助治疗等。通过动物模型能够系统研究脓毒症期间许多炎症介质、通路的作用以及阻止其产生、传递后的影响,但其临床前模型的预测价值有限,可能与动物和人类对感染反应程度不同、细胞的转录和表达相关性差、模型全身炎症反应不重及未出现MODS等因素有关。脓毒症在中后期可出现长期免疫抑制状态,这时的死亡率较高,应为脓毒症治疗重点。目前,临床前实验研究尚缺乏针对脓毒症致MODS的病理生理过程及临床特点的研究模型。有学者提出使用CLP模型结合二次打击模型,即最初的创伤或感染发作后诱导继发感染,更接近临床上脓毒症晚期的实际免疫抑制状态,有助于阐明CLP改变免疫功能的机制。也可尝试将严重疾病中出现的人类患者来源的病原体植入实验小鼠,模拟关键宿主的病原体相互作用^[37-38]。但这些研究成果尚未转化为有效的新疗法,期待在后续模型研究中能实现评估脓毒症治疗新策略的突破。

[作者贡献 Author Contribution]

李潇提出文章思路,撰写、修订文章;颜海鹏对文章思路有重要建议,对文章框架及内容作批评性审阅;肖政辉对文章的知识性内容作批评性审阅,指导性支持。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] FERNANDO S M, REARDON P M, ROCHWERG B, et al. *Sepsis-3 septic shock criteria and associated mortality among infected hospitalized patients assessed by a rapid response team*[J]. Chest, 2018, 154(2): 309-316. DOI: 10.1016/j.chest.2018.05.004.
- [2] FLEISCHMANN C, SCHERAG A, ADHIKARI N K, et al. *Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated Sepsis. current estimates and limitations*[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(3): 259-272. DOI: 10.1164/

rccm.201504-0781oc.

- [3] 江伟, 杜斌. 中国脓毒症流行病学现状[J]. 医学研究生学报, 2019, 32(1):5-8. DOI:10.16571/j.cnki.1008-8199.2019.01.002.
JIANG W, DU B. Epidemiology of sepsis in China[J]. J Med Postgrad, 2019, 32(1): 5-8. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2019.01.002.
- [4] TAVEIRA DA SILVA A M, KAULBACH H C, CHUIDIAN F S, et al. Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of *Salmonella* endotoxin[J]. N Engl J Med, 1993, 328(20):1457-1460. DOI:10.1056/nejm199305203282005.
- [5] KORNEEV K V. Mouse models of *Sepsis* and septic shock[J]. Mol Biol, 2019, 53(5):704-717. DOI:10.1134/S0026893319050108.
- [6] KINGSLEY S M K, BHAT B V. Differential paradigms in animal models of *Sepsis*[J]. Curr Infect Dis Rep, 2016, 18(9):26. DOI: 10.1007/s11908-016-0535-8.
- [7] CARPENTER K C, HAKENJOS J M, FRY C D, et al. The influence of pain and analgesia in rodent models of *Sepsis*[J]. Comp Med, 2019, 69(6): 546-554. DOI: 10.30802/aalas-cm-19-000004.
- [8] MISHRA S K, CHOUDHURY S. Experimental protocol for cecal ligation and puncture model of polymicrobial *Sepsis* and assessment of vascular functions in mice[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1717:161-187. DOI:10.1007/978-1-4939-7526-6_14.
- [9] BURAS J A, HOLZMANN B, SITKOVSKY M. Animal Models of sepsis: setting the stage[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(10): 854-865. DOI:10.1038/nrd1854.
- [10] MURANDO F, PELOSO A, COBIANCHI L. Experimental abdominal *Sepsis*: sticking to an awkward but still useful translational model[J]. Mediat Inflamm, 2019, 2019: 8971036. DOI:10.1155/2019/8971036.
- [11] NICOLAI O, PÖTSCHKE C, SCHMOECKEL K, et al. Antibody production in murine polymicrobial *Sepsis*—kinetics and key players[J]. Front Immunol, 2020, 11: 828. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00828.
- [12] ZANTL N, UEBE A, NEUMANN B, et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis[J]. Infect Immun, 1998, 66(5): 2300-2309. DOI: 10.1128/IAI.66.5.2300-2309.1998.
- [13] RINCON J C, EFRON P A, MOLDAWER L L, et al. Cecal slurry injection in neonatal and adult mice[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2321:27-41. DOI:10.1007/978-1-0716-1488-4_4.
- [14] LEWIS A J, SEYMOUR C W, ROSENGART M R. Current murine models of *Sepsis*[J]. Surg Infect, 2016, 17(4): 385-393. DOI: 10.1089/sur.2016.021.
- [15] NAKAJIMA R, HAGIHARA H, MIYAKAWA T. Similarities of developmental gene expression changes in the brain between human and experimental animals: rhesus monkey, mouse, Zebrafish, and *Drosophila*[J]. Mol Brain, 2021, 14(1): 135. DOI:10.1186/s13041-021-00840-4.
- [16] BURAS J A, HOLZMANN B, SITKOVSKY M. Animal Models of sepsis: setting the stage[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(10): 854-865. DOI:10.1038/nrd1854.
- [17] ZINGARELLI B, COOPERSMITH C M, DRECHSLER S, et al.

- Part I: Minimum quality threshold in preclinical sepsis studies (MQTiPSS) for study design and humane modeling endpoints [J]. Shock, 2019, 51(1): 10-22. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001243.
- [18] RAYMOND S L, LÓPEZ M C, BAKER H V, et al. Unique transcriptomic response to sepsis is observed among patients of different age groups[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0184159. DOI:10.1371/journal.pone.0184159.[PubMed]
- [19] STORTZ J A, HOLLEN M K, NACIONALES D C, et al. Old mice demonstrate organ dysfunction as well as prolonged inflammation, immunosuppression, and weight loss in a modified surgical Sepsis model[J]. Crit Care Med, 2019, 47(11): e919-e929. DOI:10.1097/CCM.0000000000003926.[PubMed]
- [20] TURNBULL I R, WLZOREK J J, OSBORNE D, et al. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture[J]. Shock Augusta Ga, 2003, 19(4): 310-313. DOI: 10.1097/00024382-200304000-00003.
- [21] Xu J, Tong L, YAO J, et al. Association of sex with clinical outcome in critically ill sepsis patients: A retrospective analysis of the large clinical database MIMIC-III[J]. Shock, 2019 52(2):146-151. DOI:10.1097/SHK.0000000000001253.
- [22] MEGE J L, BRETTELL F, LEONE M. Sex and bacterial infectious diseases[J]. New Microbes New Infect, 2018, 26: S100-S103. DOI:10.1016/j.nmni.2018.05.010.
- [23] GAY L, MELENOTTE C, LAKBAR I, et al. Sexual dimorphism and gender in infectious diseases[J]. Front Immunol, 2021, 12: 698121. DOI:10.3389/fimmu.2021.698121.
- [24] LEFÈVRE N, CORAZZA F, VALSAMIS J, et al. The number of X chromosomes influences inflammatory cytokine production following toll-like receptor stimulation[J]. Front Immunol, 2019, 10:1052. DOI:10.3389/fimmu.2019.01052.
- [25] Knöferl M W, Angele M K, DIODATO M D, et al. Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis[J]. Ann Surg, 2002, 235(1): 105-112. DOI: 10.1097/00000658-200201000-00014.
- [26] HELLMAN J, BAHRAMI S, BOROS M, et al. Part III: Minimum quality threshold in preclinical sepsis studies (MQTiPSS) for fluid resuscitation and antimicrobial therapy endpoints[J]. Shock, 2019, 51(1):33-43. DOI:10.1097/SHK.0000000000001209.
- [27] BYRNE L, VAN HAREN F. Fluid resuscitation in human sepsis: time to rewrite history? [J]. Ann Intensive Care, 2017, 7(1): 4. DOI:10.1186/s13613-016-0231-8.
- [28] EVANS L, RHODES A, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021[J]. Intensive Care Med, 2021, 47(11):1181-1247. DOI:10.1007/s00134-021-06506-y.
- [29] ESMON C T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? [J]. Crit Care Med, 2004, 32(5 suppl): S219-S222. DOI:10.1097/01.ccm.0000127036.27343.48.
- [30] CARPENTER K C, HAKENJOS J M, FRY C D, et al. The influence of pain and analgesia in rodent models of Sepsis[J]. Comp Med, 2019, 69(6): 546-554. DOI: 10.30802/aalas-cm-19-000004.
- [31] LEE H T, EMALA C W, JOO J D, et al. Isoflurane improves survival and protects against renal and hepatic injury in murine septic peritonitis[J]. Shock, 2007, 27(4):373-379. DOI: 10.1097/01.shk.0000248595.17130.24.
- [32] HERRMANN I K, CASTELLON M, SCHWARTZ D E, et al. Volatile anesthetics improve survival after cecal ligation and puncture[J]. Anesthesiology, 2013, 119(4): 901-906. DOI: 10.1097/aln.0b013e3182a2a38c.
- [33] BAXTER M G, MURPHY K L, TAYLOR P M, et al. Chloral hydrate is not acceptable for anesthesia or euthanasia of small animals[J]. Anesthesiology, 2009, 111(1): 209; author reply 209-209; author reply 210. DOI:10.1097/ALN.0b013e3181a8617e.
- [34] SINGLETON K D, WISCHMEYER P E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat[J]. Eur Surg Res, 2003, 35(6):486-491. DOI: 10.1159/000073387.
- [35] SONG T Z, YIN H L, CHEN J T, et al. Survival advantage depends on cecal volume rather than cecal length in a mouse model of cecal ligation and puncture[J]. J Surg Res, 2016, 203(2):476-482. DOI:10.1016/j.jss.2016.03.019.
- [36] DEJAGER L, PINHEIRO I, DEJONCKHEERE E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? [J]. Trends Microbiol, 2011, 19(4): 198-208. DOI:10.1016/j.tim.2011.01.001.
- [37] CAVAILLON J M, SINGER M, SKIRECKI T. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads[J]. EMBO Mol Med, 2020, 12(4): e10128. DOI:10.15252/emmm.201810128.
- [38] ALVERDY J C, KESKEY R, THEWISSEN R. Can the cecal ligation and puncture model Be repurposed to better inform therapy in human Sepsis? [J]. Infect Immun, 2020, 88(9): e00942-e00919. DOI:10.1128/iai.00942-19.

(收稿日期:2021-07-19 修回日期:2021-11-22)

(本文编辑:张俊彦,富群华,郭嘉欣)

高脂血症动物模型肾功能损伤机制及干预研究进展

周晓丽, 张倩, 钱智勇

(天津市疾病预防控制中心毒理科, 天津 300011)

[摘要] 高脂血症与肾功能损伤密切相关, 两者相互影响。脂质沉积于肾脏, 通过直接和间接的作用, 影响肾小球、肾小管的功能和结构, 导致肾功能损伤。而肾功能损伤进一步影响机体脂质代谢, 又加剧了高脂血症的进程。目前, 除了合成药物以外, 还有很多非合成药物在高脂血症动物模型肾功能损伤的干预治疗中取得了很好的疗效。本文概述近年来国内外利用高脂血症动物模型研究肾功能损伤机制及其相关干预治疗的最新进展。

[关键词] 高脂血症; 肾功能损伤; 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(2022)03-0213-07

Research Progress on Mechanism and Intervention of Renal Function Injury in Hyperlipidemia Animal Model

ZHOU Xiaoli, ZHANG Qian, QIAN Zhiyong

(Department of Toxicology, Tianjin Center for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China)

Correspondence to: QIAN Zhiyong (ORCID: 0000-0002-8161-4797), E-mail: qzyong@sohu.com

[ABSTRACT] Hyperlipidemia is closely related to renal function damage, and they influence each other. Lipid deposition in the kidney affects the function and structure of glomerulus and renal tubules directly and indirectly, resulting in renal function injury. On the contrary, renal function damage further affects lipid metabolism and aggravates the progress of hyperlipidemia. At present, besides synthetic drugs, there are many non-synthetic drugs which have been well verified in the intervention of kidney injury in hyperlipidemia animal model. In this paper, the research progress in the mechanism of renal function damage and the related intervention using hyperlipidemia animal model at home and abroad in recent years were summarized.

[Key words] Hyperlipidemia; Kidney injury; Animal model

高脂血症 (hyperlipidemia) 严重危害人类健康, 是由于长期血脂过高引发机体代谢紊乱, 进而可引起心脑血管相关疾病。开发高效低毒的调节血脂药物需要选择适合的高脂血症动物模型进行研究。建立成功的高脂血症动物模型是开发安全有效的降脂药物的关键环节。目前, 高脂血症动物模型主要有先天性、化学物质诱导和转基因高脂血症动物模型。先天性高脂血症动物模型是在自然条件下发生的, 可以很好地模拟人类疾病的发生、发展过程, 应用价值高, 缺点是来源比较少, 不能大量应用^[1], 常用于药物的筛选及验证。化学物质诱发的高脂血症动物模型主要有两种: 一种是高脂饲料或高脂乳剂作用一段时间后形成的慢

性高脂血症动物模型, 另一种是通过一次性注射化学物质形成的急性高脂血症动物模型。目前, 化学物质诱发的高脂血症动物模型在研究高脂血症时使用最多。转基因高脂血症动物模型是将外源重组基因转染并整合到动物受体细胞基因组中, 从而形成在体内表达外源基因的动物。转基因动物模型是从细胞学角度验证, 适合研究细胞转化、变异中某个致癌基因, 缺点是只能用于特定实验目的, 而且技术难度较大, 成本较高^[2]。

早在1982年, Moorhead首次正式提出“脂代谢异常肾毒性”假说, 指出高脂血症对肾脏疾病的发生、发展具有重要影响^[3]。相关研究发现, 高脂血症可以

[第一作者] 周晓丽(1987—), 女, 硕士, 主管技师, 主要研究方向: 复合维生素与高脂血症。E-mail: zxl88224@126.com

[通信作者] 钱智勇(1971—), 男, 硕士, 主任技师, 研究方向: 转基因食品安全评价。E-mail: qzyong@sohu.com。ORCID: 0000-0002-8161-4797

作为独立危险因素参与肾脏疾病的发生发展,造成肾脏结构进行性改变,进而肾功能衰退^[4]。高脂血症在诱导肾功能损伤中起着重要作用,而肾功能损伤反过来也影响脂质代谢。高脂血症对肾脏的损害是一个慢性积累过程,可能长期没有出现临床症状,即使已经发生了肾功能衰竭,从临床表现也很难与原发肾脏疾病伴高脂血症相区别;因此相关的临床试验并不多,动物实验研究却相对较多^[5]。张维忠等^[6]通过对2009—2010年成都铁路职工健康体检中有完整资料的2 578例高脂血症患者罹患慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的情况及相关危险因素进行分析,发现高脂血症患者的白蛋白尿、血尿和肾功能下降发生率分别为14.08%、2.37%和3.26%,高胆固醇和三酰甘油水平均与尿微量白蛋白/肌酐比值呈正直线相关性;该人群中CKD的患病率为17.73%,CKD患病率较普通人群高,主要症状表现为白蛋白尿。另外,血脂异常等原因导致的心血管疾病严重影响CKD患者的预后,已成为终末期肾脏疾病患者的首位死因^[7]。因此,深入探讨高脂血症导致肾功能损伤的发生机制,寻找更为有效的能够保护肾脏的脂代谢调节药物,对于减少CKD的发生和改善CKD患者的预后具有十分重要的临床意义。近年来高脂血症引起肾功能损伤的因果关系还没有得到广泛的重视,脂质异常对肾功能损伤作用的相关机制研究还不够深入和系统。本文旨在总结近年来利用高脂血症动物模型进行肾功能损伤机制及干预治疗方面的研究进展,为相关科研工作者提供一定的理论基础。

1 运用动物模型研究高脂血症与肾功能损伤的关系

高脂血症不仅在心血管疾病的发生进展中起到重要作用,与慢性肾脏病同样密切相关,并加剧肾脏疾病的发展^[8]。研究证实,高脂饮食可引发高脂血症,高脂血症使得肾小球系膜增厚,小管间质明显损伤,从而使肾小球硬化,病变损伤可累及整个肾脏^[9]。动物实验研究发现,原发脂代谢紊乱引起肾功能损伤的临床表现主要为蛋白尿,病理表现主要为局灶性节段性肾小球硬化。通过对单肾高血脂组和双肾高血脂组的尿微量白蛋白含量比较,发现单肾高血脂组的尿微量白蛋白水平更高,且有显著性差异,推测单侧肾脏受损的大鼠对尿微量白蛋白更敏感^[10]。Liang等^[11]用雄性金黄仓鼠通过腹腔注射链脲佐菌素建模,发现严重的高脂血症可加速1型糖尿病早期发展中的肾功能

损伤。樊爱英等^[12]研究发现,高脂血症组大鼠的血清胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白、尿蛋白和肾脏病理积分比肾脏疾病组高,肾脏免疫组织化学也显示高脂饮食组细胞凋亡及死亡受体(death receptor, Fas)和死亡受体配体(death receptor ligand, Fas L)表达高于肾脏疾病组,由此可以判断高脂血症可加剧肾小球损伤和肾脏细胞凋亡,而且Fas和Fas L可能参与其发病过程。

2 运用高脂血症动物模型研究肾功能损伤机制

脂质引起肾功能损伤的病理机制主要包括脂质诱导血管内皮增加、低密度脂蛋白沉积和氧化加速、单核巨噬细胞浸润增加及活动病变区域内“泡沫细胞”的形成、系膜细胞增生及系膜基质增多以及肾小管间质的病变^[13]。下面将从脂蛋白沉积、肾小球损伤和炎症反应3个方面分别展开介绍。

2.1 脂蛋白沉积作用

脂代谢紊乱是肾功能损伤的重要加重因素,尤其是低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)对肾脏的损害最大,研究也最多。Ox-LDL通过增加血栓烷A2(thromboxane A2, TX-A2)和内皮素促进系膜细胞增殖和肾小球硬化。Ox-LDL还可通过刺激超氧阴离子的产生,诱导内皮细胞凋亡^[14]。脂质运载蛋白(lipocalin)家族成员载脂蛋白M(apolipoprotein M, ApoM),相对分子质量大小约为2 000,常在肾脏中表达,通过调节 β -高密度脂蛋白的形成和总胆固醇的反向转运,影响脂质和脂蛋白代谢。在高脂血症患者血清中也检测到ApoM水平普遍升高^[15]。此外,ApoM通过与巨蛋白结合阻止了巨蛋白介导的胞吞作用,导致蛋白尿肾功能损伤。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是存在于多种器官的分泌型糖蛋白,既能促进各种类型细胞粘附、趋化和信号转导,又能在肾小球肾炎、肾小管间质性等相关疾病的肾功能损伤中发挥重要作用。Pei等^[16]评估OPN对高胆固醇血症引起的肾功能不全的影响,发现载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)敲除的小鼠经高胆固醇饮食后肾小球中出现较多的脂质沉积,然而在OPN敲除的小鼠中血脂水平显著降低,且肾小球中凝集素样氧化的低密度脂蛋白受体-1表达也降低。这些结果表明,OPN可增加高胆固醇血症引起的肾功能损伤,OPN可能是高胆固醇血症引起肾功能损伤的重要因子。

2.2 肾小球损伤

2.2.1 肾小球损伤与脂质沉积

近十年来研究表明,肾脏中的脂质积聚可导致肾功能损伤^[17-18]。肾脏中脂质沉积可损伤肾皮质微血管,引起小动脉狭窄和球微循环、肾小球扩张以及肾间质肿胀,导致肾皮质缺血缺氧,最终通过肾素-血管紧张素-醛固酮系统形成全身钠潴留和微循环障碍^[19]。脂质在肾脏中的沉积使得肾脏中胶原纤维和纤维连接蛋白的合成增加,导致肾小球硬化。过滤的血脂沉积在肾小球,引起肾小球膜细胞从静止型转变为增生型或者分泌型,并在此过程中获得类似肌纤维的特征,肾小管上皮细胞也可能转化为其他表型,可能导致肾纤维化,进而导致肾功能损伤。同样有研究证实,通过高脂饮食饲养诱导的高脂血症能够导致肾组织内皮细胞和微血管功能紊乱,引起炎症浸润的发生和肾纤维化进展^[20]。

2.2.2 肾小球损伤与氧化应激

在啮齿动物的相关实验中发现,与高脂血症相关的氧化应激增加可引起肾小球毛细血管内皮功能障碍,加剧脂质肾小球沉积相关的肾小球硬化发展^[21]。Gwinner等^[22]在慢性肾小球肾炎和长期高脂血症并存的大鼠模型中发现,黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)促进了氧自由基生成的增加,并加重了肾小管间质的损伤,表明XO在高脂血症相关肾功能损伤的早期阶段发挥了重要作用,其通过氧化还原反应上调单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)表达,介导巨噬细胞的浸润。脂质以脂滴的形式存在于肾小球细胞或者基质中,发生氧化修饰,引起肾小管上皮细胞损害和基底膜通透性增加,从而发生蛋白尿。Sastre等^[23]发现,高脂血症能够诱导炎症反应并促进氧化应激;通过高脂喂养ApoE敲除小鼠后发现该小鼠的克老素基因(Klotho)表达下调,而且其机制可能是ox-LDL通过激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)和核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B),使得肾脏中Klotho的表达下调,推测Klotho是血脂调节和肾脏疾病中的关键蛋白。

2.2.3 肾小球足细胞损伤

肾小球中的足细胞是一种修复再生能力有限的功能细胞。Nephrin蛋白是构成足细胞裂孔隔膜的主要结构蛋白,在控制肾小球滤过屏障通透性方面起关键性

作用;足细胞损伤后,肾小球滤过屏障破坏并且无法修复,临床表现主要为蛋白尿^[24]。高脂血症引起肾小球渗透性增加,表现为蛋白尿,其机制之一可能是因为足细胞足突骨架相关蛋白即LIM结构域蛋白2(pdlim2)表达降低,导致足突融合,引起蛋白尿^[5]。褚宇东等^[25]通过细胞培养研究高脂血症诱导的足细胞内质网应激及可能机制,发现高脂血症可能通过诱导蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)和真核细胞起始因子2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)的磷酸化,激活活化转录因子4(activated transcription factor 4, ATF4)转录,以及诱导CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CAAT/enhancer binding protein homologous protein, CHOP)高表达,引起足细胞内质网应激,而阿司匹林可能部分阻断PERK通路,进而对足细胞具有保护作用。

2.3 炎症反应

脂质代谢紊乱的另一个结局是大量炎症反应的发生,加剧了肾功能损伤^[26]。研究发现,炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)可以影响肾小球滤过膜中总胆固醇介导的低密度脂蛋白受体的调节,提示炎症因子通过影响肾小球中脂质代谢而改变肾功能^[27]。另有研究发现,高脂饮食喂养后慢性炎症小鼠的肾脏脂肪变性严重,肾小球和肾小管损伤明显,血小板糖蛋白IV(即CD36)表达增加,推测炎症应激通过激活CD36通路加重肾功能损伤,提示这种机制可能在患有慢性炎症的肥胖个体中起作用,使它们更容易发生CKD^[28]。在免疫复合物介导的肾炎期间,富三酰甘油脂蛋白(triglyceride rich lipoprotein, TGRL)状态可能比低密度脂蛋白驱动的高胆固醇血症对肾脏更有害,推测高TGRL环境使肾脏在炎症损伤后肾功能损伤加重,同时巨噬细胞积聚增加,这可能对介导损伤起关键作用^[29]。

Fang等^[30]发现,高脂血症通过激活的Toll样受体4(toll like receptor 4, TLR-4)诱导非受体酪氨酸激酶(non receptor tyrosine kinase, c-Src)磷酸化,形成c-Src/表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)复合物,该复合物又激活苏氨酸激酶(threonine kinase, AKT)和ERK,使得NF- κ B通路激活,进而促进有关炎症反应和氧化应激的关键基因表达上调,造成肾功能损伤。此外,TLR4主要通过

c-Src/EGFR 复合物的磷酸化来调节 EGFR 通路激活。这些结果证实, EGFR 在肥胖相关性肾脏疾病发病机制中具有不利作用, 为高脂血症/血清游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 诱导 EGFR 活化的机制提供了新的认识, 并支持 EGFR 抑制剂应用于肥胖性肾脏疾病治疗。

研究还发现, 炎症因子抑瘤素-M (inflammatory factor tumor suppressor-M, OSM) 在高脂饮食大鼠肾脏中的表达水平随着高脂饮食时间延长而呈进行性增高; 应用酶联免疫吸附实验法检测高脂饮食大鼠血清中 OSM 水平明显增高, 且变化趋势与肾组织表达趋势一致; 进一步对 OSM 表达与肾功能、血脂、24 h 尿蛋白水平进行相关性分析, 结果显示 OSM 表达与血清肌酐浓度 (serum creatinine, SCr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、三酰甘油、总胆固醇及 24 h 尿蛋白均呈正相关, 与高密度脂蛋白和低密度脂蛋白无明显相关, 提示 OSM 可能在脂质性肾功能损伤中发挥重要作用^[31]。最近, 有报告称血管生成素样蛋白 3 (angiopoietin like protein 3, ANGPTL3) 基因敲除小鼠与野生型小鼠相比, 血脂水平明显降低, 提示 ANGPTL3 可能与高脂血症肾功能损伤有关^[32]。

3 运用高脂血症动物模型研究肾功能损伤的干预治疗

3.1 合成药物的干预

他汀类药物通过阻断羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (hydroxymethylglutaryl CoA reductase, HMG CoA-R) 与底物结合位点, 降低产物总胆固醇的生成, 同时代偿性促进低密度脂蛋白受体合成, 加速低密度脂蛋白降解; 而发挥降脂功能的机制主要是降低体内胆固醇水平, 从而减轻高脂血症所致直接肾功能损伤, 其不依赖于降脂作用的肾脏保护作用近年来得到了一些学者的关注^[33]。研究发现, 在高脂饮食喂养的小鼠体内应用他汀类药物的降脂作用较体外减弱, 即体内出现“他汀类抵抗”; 通过小鼠皮下注射酪蛋白使体内处于炎症反应状态时造模成功, 发现他汀类药物的降脂作用较对照组减弱, 同时肾功能损伤程度较对照组严重^[34]。通过体外实验研究发现, 在肾小球系膜细胞培养基中加入 IL-1 β , 能增加 HMG-CoA 的活性, 抑制阿托伐他汀的降脂作用。他汀类药物因其能有效降低胆固醇成为了目前临床上应用最广泛的降脂药物。随着他汀类药物的广泛应用, 其安全性也受到越来越多的关注, 有学者推测认为, 他汀类降脂药物不良反应的发生与药物相互作用之间存在重要关联^[35]。

3.2 非合成药物的干预

丹参是中国和韩国等亚洲国家最受欢迎的草药之一。在亚洲传统医学中, 丹参味苦、微寒, 对心肝经络能够发挥治疗作用。因此, 丹参及其有效成分已被用于控制与心血管疾病相关的症状。Lim 等^[36]研究了丹参甲醇提取物 (salvia miltiorrhiza methanol extract, SRme) 对高脂血症小鼠的作用及其分子靶点, 即采用高脂饮食诱导小鼠高脂血症, 然后测定血胆固醇和三酰甘油水平, 从而评价 SRme 对高脂血症小鼠的影响; 结果发现 SRme 对高脂血症小鼠增重无明显影响, 但血清中三酰甘油含量明显降低, 提示 SRme 可能通过抑制血清中三酰甘油水平升高, 改善高脂饮食喂养小鼠的高脂血症。另研究证明微小染色体维持蛋白 (mini chromosome maintenance protein, Mcm) 家族在 DNA 复制中起关键作用, 已被确定为改善高脂血症的分子靶点。Fatma 等^[37]研究丹参精油 (salvia miltiorrhiza essential oil, SEO) 和辛伐他汀对高脂血症小鼠的影响, 发现 SEO 和辛伐他汀能抑制高脂饮食小鼠体重增加, 改善高脂血症和肝肾功能紊乱, 并降低活性氧生成; 此外, 与高脂饮食小鼠相比, 总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白和胆固醇水平以及天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶、 γ -谷氨酰转肽酶和乳酸脱氢酶活性均明显降低, 而粪便脂质含量增加, 而且 SEO 的降脂效果优于辛伐他汀。这项研究结果强调了 SEO 在治疗高脂血症方面效果显著, 而且不会产生不良反应, 证明植物精油降低血脂和改善抗氧化状态比合成药物的效果更好。

核黄素又称维生素 B₂, 主要参与呼吸链能量产生, 氨基酸和脂类氧化, 嘌呤碱转化为尿酸, 芳香族化合物的羟化, 蛋白质与某些激素的合成, 铁的转运、储存及动员, 参与叶酸、吡多醛和尼克酸的代谢等, 在人体正常生理功能中发挥着重要作用。Song 等^[38]通过建立高脂大鼠模型, 测定血清尿酸 (serum uric acid, SUA)、SCr、BUN 水平, 以及血清和肝脏黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD)、腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, ADA) 活性, 镜下观察肾脏组织学改变; 结果发现, 与高脂血症模型组相比, 中、高剂量叶黄素组血清尿酸水平明显降低, 肝 XOD 和 ADA 活性明显降低, 血清 BUN 水平明显降低, 推测适当剂量的叶黄素可改善高脂饮食诱导的高尿酸血症和肾功能不全。本课题组前期验证了核黄素可能通过降低 HMGR 的水平来调节肝脂水平, 从而影响脂质代谢^[39]。进一步研究发现, 适量亚硒酸钠与核黄素联合暴露可以拮抗高

脂饮食所致雄性大鼠血脂及血清肝生化指标的升高^[40]。这些证据说明,核黄素在干预高脂血症动物模型中具有一定的研究价值,其可能通过降低血脂水平,改善高脂血症对肾功能的损伤。由此,本课题组进一步推测硒在高脂血症中也具有一定的改善作用。周晓丽等^[41]探讨了富硒酵母对高脂血症大鼠脂代谢的影响及调节机制,通过高脂血症模型研究发现富硒酵母可以抑制高脂饲料引起的大鼠体质量增加,具有降血脂和抗动脉粥样硬化作用,并对高脂血症大鼠的肝脏组织具有明显的修复功能,并且其机制主要是通过下调HMG-CoA-R mRNA表达水平来调节脂代谢。Zhang等^[42]在高脂血症动物模型中发现,口服硒镁联合补充剂可抑制高脂饮食诱导的脂质、肝脏结构和肝功能指数增加,并增强抗氧化酶活性。因此,推测硒与镁联合是一种很有前途的治疗策略,具有降低血脂和抗氧化作用,能够保护肝脏免受高脂血症的影响。

白藜芦醇是多酚类化合物,主要来源于花生、葡萄(红葡萄酒)、虎杖、桑椹等植物。白藜芦醇是一种生物活性很强的天然多酚类物质,又称芪三酚。有研究证明白藜芦醇在高脂血症肾功能损伤中发挥一定的干预作用。Takeshi等^[43]发现白藜芦醇可显著抑制肾炎引起的高脂血症,其降低三酰甘油的作用比降低胆固醇的作用更为显著。有研究者认为白藜芦醇是一种有效的抗肾小球肾炎食物因子,能够同时抑制蛋白尿、低蛋白血症和高脂血症。许伶等^[44]建立了高脂血症小鼠模型,不仅检测血脂、体质量和肾功能,而且采用HE染色、过碘酸雪夫染色(schiff periodate staining, PAS)和免疫组织化学法检测肾组织形态学变化,并进一步采用蛋白质印迹法和反转录-聚合酶链反应检测小鼠肾组织中氧化应激和内质网应激相关蛋白的表达;结果发现白藜芦醇能够明显降低高脂饮食小鼠的体质量、血脂和尿酸水平,改善肾小球系膜增生和肾小管纤维化,减少肾小球糖原沉积,下调纤维黏连蛋白(fibronectin, FN)的表达;而且白藜芦醇能够明显上调抗氧化相关蛋白沉默信息调节因子2相关酶1(silent information regulator factor 2 related enzyme 1, SIRT1)、超氧化物歧化酶2(superoxide dismutase 2, SOD2)和谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPx4)的表达,下调内质网应激分子标志葡萄糖调节蛋白78(glucose regulatory protein 78, GRP78)和CHOP mRNA表达。以上研究结果提示,白藜芦醇通过抑制肾组织纤维化、氧化应激和内质网应激,可减轻高脂饮食导致的慢性肾功能损伤。

4 结语

综上所述,大量高脂血症动物模型研究肾功能损伤的实验证实了高脂血症可以影响肾功能损伤的发生发展,与机体脂质代谢密切相关。在脂质诱导肾功能损伤的分子机制方面,相关研究内容还不够深入和系统,如肾功能损伤过程中信号转导通路和相关基因表达等还需要进一步探讨。尽管越来越多的高脂血症干预靶点被学者们发现,但多数干预仅限于实验阶段,还没有进行到临床试验,距临床应用还有相当一段距离;而且靶点干预后对机体其他系统的作用和影响的相关研究还比较少。

高脂血症动物模型实验研究治疗药物的最终目标是为了能够在患者身上体现良好的效果。尽管他汀类药物仍然是干预高脂血症的主要合成药物,但随着非合成药物的研究日益广泛和深入,越来越多的学者们注意到,未来非合成药物有可能在干预高脂血症的作用中发挥独特的降脂效果,既能达到理想的降低血脂的目的,又能最大限度地降低对人体的不良影响,同时还能促进机体其他脏器的功能。因此,通过对高脂血症动物模型引起肾功能损伤机制以及干预的进一步深入研究,可能为高脂血症导致肾功能损伤在患者身上的研究和应用提供一定的理论基础和实践指导,同时也为未来高脂血症动物试验的研究提供理论支持。

[作者贡献 Author Contribution]

周晓丽提出文章写作总体方向;钱智勇对文章进行总体的审阅和修改;张倩对文章中相关内容进行文献的查阅和整理。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 赵媛媛,覃骊兰,郝二伟.高脂血症动物模型研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(18):215-221. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20181829.
ZHAO Y Y, QIN L L, HAO E W. Progress of research on animal model of hyperlipidemia[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(18):215-221. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20181829.
- [2] 刁婷婷,闵清.高脂血症动物模型研究进展[J].湖北科技学院学报(医学版),2018,32(6):541-545. DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2018.06.0541.
DIAO T T, MIN Q. Research progress of hyperlipidemia animal model[J]. J Hubei Univ Sci Technol Med Sci, 2018, 32(6):541-545. DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2018.06.0541.
- [3] MOORHEAD J F, EL-NAHAS M, CHAN M K, et al. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulointerstitial disease[J]. Lancet, 1982, 320(8311):1309-1311. DOI:

- 10.1016/S0140-6736(82)91513-6.
- [4] 彭兰, 范能全, 杜晓刚. 高脂血症大鼠肾脏 Angptl4 变化及辛伐他汀的保护作用[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2014, 31(3): 88-92. DOI:10.11721/cqnuj20140318.
PENG L, FAN N Q, DU X G. The changes of Angptl4 in the kidney of hyperlipidemic rats and the protective effect of simvastatin[J]. J Chongqing Norm Univ Nat Sci, 2014, 31(3):88-92. DOI:10.11721/cqnuj20140318.
 - [5] 彭兰. Pdlim2 在高脂血症大鼠肾小球足细胞中的表达改变及意义[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
PENG L. Expression and significance of Pdlim2 in the glomerular podocyte of hyperlipidemic rats[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2014.
 - [6] 张维忠, 郭宗琳, 钱泉, 等. 2578 例高脂血症者慢性肾脏病分析[J]. 现代临床医学, 2016, 42(1):55-56, 58. DOI:10.11851/j.issn.1673-1557.2016.01.019.
ZHANG W Z, GUO Z L, QIAN Q, et al. Analysis of prevalence rate and relating risk factors of chronic kidney disease with hyperlipidemia in 2 578 cases[J]. J Mod Clin Med, 2016, 42(1): 55-56, 58. DOI:10.11851/j.issn.1673-1557.2016.01.019.
 - [7] VAZIRI N D. Lipotoxicity and impaired high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport in chronic kidney disease[J]. J Ren Nutr, 2010, 20(5): S35-S43. DOI:10.1053/j.jrn.2010.05.010.[LinkOut]
 - [8] FALKE L L, GHOLIZADEH S, GOLDSCHMEDING R, et al. Diverse origins of the myofibroblast—implications for kidney fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2015, 11(4):233-244. DOI:10.1038/nrneph.2014.246.
 - [9] 徐国宾, 朱立华, 夏铁安, 等. 实验性高脂血症对大鼠肾脏的损伤作用[J]. 北京医科大学学报, 1994, 26(5): 370.
XU G B, ZHU L H, XIA T A, et al. Damage of experimental hyperlipidemia on kidney in rats[J]. J Beijing Med Univ, 1994, 26(5): 370.
 - [10] 姚俊成, 牟艳, 窦科. 高血脂对单肾和双肾大鼠肾功能影响分析[J]. 实用医院临床杂志, 2018, 15(1):4-6. DOI:10.3969/j.issn.1672-6170.2018.01.002.
YAO J C, MOU Y, DOU K. Effect of hyperglycemia on renal function in rats with single kidney or double kidneys[J]. Pract J Clin Med, 2018, 15(1):4-6. DOI:10.3969/j.issn.1672-6170.2018.01.002.
 - [11] LIANG H, LILI H, XIN F, et al. Severe hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia accelerating renal injury: a novel model of type 1 diabetic hamsters induced by short-term high-fat / high-cholesterol diet and low-dose streptozotocin [J]. BMC Nephrology, 2015, 16(1).
 - [12] 樊爱英, 韩子明, 张贺. 细胞凋亡及 Fas 和 FasL 在高脂肾损害中的作用[J]. 陕西医学杂志, 2004, 33(4):303-305, 311. DOI:10.3969/j.issn.1000-7377.2004.04.005.
FAN A Y, HAN Z M, ZHANG H. Effect of cell apoptosis and Fas and FasL on rat renal injury in dietary hyperlipidemia[J]. Shaanxi Med J, 2004, 33(4): 303-305, 311. DOI:10.3969/j.issn.1000-7377.2004.04.005.
 - [13] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
WANG H. Nephrology (3rd Edition)[M]. Beijing: People Health Publishing House, 2008.
 - [14] RUAN X Z, VARGHESE Z, FERNANDO R, et al. Cytokine regulation of low-density lipoprotein receptor gene transcription in human mesangial cells[J]. Nephrol Dial Transplant, 1998, 13(6):1391-1397. DOI:10.1093/ndt/13.6.1391.
 - [15] HE L G, WU P F, TAN L, et al. Characteristics of lipid metabolism including serum apolipoprotein M levels in patients with primary nephrotic syndrome[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1):167. DOI:10.1186/s12944-017-0556-9.
 - [16] PEI Z W, OKURA T, NAGAO T, et al. Osteopontin deficiency reduces kidney damage from hypercholesterolemia in Apolipoprotein E-deficient mice[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28882. DOI:10.1038/srep28882.
 - [17] 刘彤, 李龙. 单独应用贝特类降脂药治疗高脂血症肾损害大鼠的机制探讨[J]. 中南药学, 2015, 13(7):716-719. DOI:10.7539/j.issn.1672-2981.2015.07.011.
LIU T, LI L. Mechanism of fibrate alone for hyperlipidemia kidney damage in rats[J]. Central South Pharm, 2015, 13(7): 716-719. DOI:10.7539/j.issn.1672-2981.2015.07.011.
 - [18] 吴晓静. 高脂喂养大鼠肾脏 NF- κ B 及炎症因子表达变化及利拉鲁肽的干预研究[D]. 承德: 承德医学院, 2017.
WU X. Expression of NF-nuclear factor kappa B and inflammatory factors in kidney of high fat diet rats and intervention of liraglutide[D]. Chengde: Chengde Medical University, 2017.
 - [19] 陈荟婷, 柳洁. 高脂血症对大鼠心肌与肾皮质微细结构的影响[J]. 中国临床研究, 2016, 29(5):577-580. DOI:10.13429/j.cnki.cjcr.2016.05.001.
CHEN H T, LIU J. Influence of hyperlipemia on micro-structures of myocardium and renal cortex in rats[J]. Chin J Clin Res, 2016, 29(5): 577-580. DOI:10.13429/j.cnki.cjcr.2016.05.001.
 - [20] ZIAEIAN B, FONAROW G C. Epidemiology and aetiology of heart failure[J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(6): 368-378. DOI:10.1038/nrcardio.2016.25.
 - [21] MACK M, YANAGITA M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis[J]. Kidney Int, 2015, 87(2): 297-307. DOI:10.1038/ki.2014.287.
 - [22] GWINNER W, SCHEUER H, HALLER H, et al. Pivotal role of xanthine oxidase in the initiation of tubulointerstitial renal injury in rats with hyperlipidemia[J]. Kidney Int, 2006, 69(3): 481-487. DOI:10.1038/sj.ki.5000121.
 - [23] SASTRE C, RUBIO-NAVARRO A, BUENDÍA I, et al. Hyperlipidemia-associated renal damage decreases Klotho expression in kidneys from ApoE knockout mice[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83713. DOI:10.1371/journal.pone.0083713.
 - [24] WEN H X, KUMAR V, LAN X Q, et al. APOL1 risk variants cause podocytes injury through enhancing endoplasmic reticulum stress[J]. Biosci Rep, 2018, 38(4): BSR20171713. DOI:10.1042/BSR20171713.
 - [25] 褚宇东, 李荣山, 田渊, 等. 阿司匹林阻断高脂血症诱导的足细胞内质网应激的机制[J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36(2):139-144. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2020.02.007.
CHU Y D, LI R S, TIAN Y, et al. Aspirin intervenes in hyperlipidemia kidney damage by blocking endoplasmic reticulum stress in podocytes[J]. Chin J Nephrol, 2020, 36(2):

- 139-144. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2020.02.007.
- [26] 吴静, 罗朋立. 代谢综合征合并肾损害时血脂变化[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(34):36, 38. DOI:10.16282/j.cnki.cn11-9336/r.2020.34.025.
- WU J, LUO P L. Changes of blood lipid in metabolic syndrome complicated with renal damage[J]. Cardiovasc Dis Electron J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 8(34):36, 38. DOI:10.16282/j.cnki.cn11-9336/r.2020.34.025.
- [27] 张敏, 高震. 高脂血症导致慢性肾脏病机制的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2020, 9(1):61-65. DOI:10.3969/j.issn.2095-3097.2020.01.017.
- ZHANG M, GAO X. Advances in research on the mechanism of chronic kidney disease caused by hyperlipidemia[J]. Transl Med J, 2020, 9(1): 61-65. DOI: 10.3969/j. issn. 2095-3097.2020.01.017.
- [28] YANG P, XIAO Y Y, LUO X, et al. Inflammatory stress promotes the development of obesity-related chronic kidney disease via CD36 in mice [J]. J Lipid Res, 2017, 58(7):1417-1427. DOI:10.1194/jlr.M076216.
- [29] SAJA M F, COOK H T, RUSEVA M M, et al. A triglyceride-rich lipoprotein environment exacerbates renal injury in the accelerated nephrotoxic nephritis model[J]. Clin Exp Immunol, 2018, 192(3):337-347. DOI:10.1111/cei.13111.[LinkOut]
- [30] FANG Q L, ZOU C P, ZHONG P, et al. EGFR mediates hyperlipidemia-induced renal injury via regulating inflammation and oxidative stress: the detrimental role and mechanism of EGFR activation[J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 24361-24373. DOI:10.18632/oncotarget.8222.
- [31] 孟梅霞, 张锦华, 朱小静, 等. 高脂饮食对大鼠肾组织抑瘤素-M表达的影响[J]. 现代医学, 2017, 45(10):1427-1430. DOI:10.3969/j.issn.1671-7562.2017.10.009.
- MENG M X, ZHANG J H, ZHU X J, et al. Effects of high-fat diet on the expression of oncostatin-M in rat kidney[J]. Mod Med J, 2017, 45(10): 1427-1430. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-7562.2017.10.009.
- [32] LIM G B. ANGPTL3: a therapeutic target for atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(7): 381. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.91.
- [33] 石晓玲, 曹灵. 他汀类药物对慢性肾功能衰竭中脂代谢异常的研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(19):2987-2990. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2016.19.038.
- SHI X L, CAO L. Research progress of statins on abnormal lipid metabolism in chronic renal failure[J]. Guangdong Med J, 2016, 37(19):2987-2990. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2016.19.038.
- [34] CHEN Y, ZHAO L, LI Q, et al. Inflammatory stress reduces the effectiveness of statins in the kidney by disrupting HMGCoA reductase feedback regulation[J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(10):1864-1878. DOI:10.1093/ndt/gfu203.
- [35] VINICIUS F F, CAMILA P L, GERSON A P, et al. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2014, 947-948 (1):8-16. DOI:10.1016/j.jchromb.2013.12.002.
- [36] LIM C, LIM S, LEE B, et al. Effect of methanol extract of *Salviae miltiorrhizae Radix* in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice[J]. Chin Med, 2017, 12: 29. DOI: 10.1186/s13020-017-0150-0.
- [37] KOU BAA-GHORBEL F, CHAËBANE M, TURKI M, et al. The protective effects of *Salvia officinalis* essential oil compared to simvastatin against hyperlipidemia, liver, and kidney injuries in mice submitted to a high-fat diet[J]. J Food Biochem, 2020, 44(4): e13160. DOI:10.1111/jfbc.13160.
- [38] 宋春蕾, 王玲, 赵永芳, 等. 叶黄素对高脂膳食大鼠尿酸代谢及肾脏功能的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(17):344-347. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.17.059.
- SONG C L, WANG L, ZHAO Y F, et al. Effects of lutein on serum uric acid and renal function in high-fat-diet induced hyperlipidemia rats[J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(17):344-347. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.17.059.
- [39] 顾清, 周朋辉, 张静姝, 等. 核黄素对高脂血症大鼠脂质代谢的影响[J]. 中国慢性病预防与控制, 2015, 23(1):34-36. DOI:10.16386/j.cjpcd.issn.1004-6194.2015.01.022.
- GU Q, ZHOU P H, ZHANG J S, et al. The effects of riboflavin on lipid metabolism in rats with hyperlipidemia[J]. Chin J Prev Control Chronic Dis, 2015, 23(1):34-36. DOI:10.16386/j.cjpcd.issn.1004-6194.2015.01.022.
- [40] 张大龙, 钱智勇, 张倩, 等. 亚硒酸钠与核黄素联合暴露对高脂饮食大鼠血脂及血清肝生化指标的影响[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(7):579-582. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2017.07.005.
- ZHANG D L, QIAN Z Y, ZHANG Q, et al. Effects of combined supplementation by sodium selenite and riboflavin on blood lipid and liver biochemical indicators in rats with high-fat diet [J]. J Environ Health, 2017, 34(7):579-582. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2017.07.005.
- [41] 周晓丽, 张倩, 张大龙, 等. 富硒酵母对高脂血症大鼠脂代谢的影响[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2017, 37(6):361-366, 封3. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.06.001.
- ZHOU X L, ZHANG Q, ZHANG D L, et al. Effects of selenium enriched yeast on lipid metabolism in rats with hyperlipidemia[J]. Int J Endocrinol Metab, 2017, 37(6):361-366, 封3. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.06.001.
- [42] ZHANG Q, QIAN Z Y, ZHOU P H, et al. Effects of oral selenium and magnesium co-supplementation on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in rats fed a high-fat diet[J]. Lipids Health Dis, 2018, 17(1):165. DOI:10.1186/s12944-018-0815-4.
- [43] NIHEI T, MIURA Y, YAGASAKI K. Inhibitory effect of resveratrol on proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia in nephritic rats[J]. Life Sci, 2001, 68(25):2845-2852. DOI:10.1016/S0024-3205(01)01061-X.
- [44] 许伶, 凌梦玉, 陈超, 等. 白藜芦醇减轻高脂饮食小鼠肾损伤的作用及机制[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(10):1521-1525. DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.005.
- XU L, LING M Y, CHEN C, et al. Effect and mechanism of resveratrol on chronic kidney injury induced by high-lipid diet in mice[J]. Acta Univ Med Anhui, 2019, 54(10):1521-1525. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.005.

(收稿日期: 2021-07-08 修回日期: 2021-09-17)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 张亚菲)

溃疡性结肠炎动物模型研究进展

胡 宇¹, 兰昀羲¹, 陈晓晓¹, 熊 伟², 唐宋琪³, 贾 波¹, 黄 巍¹

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 成都岐黄博恩生物科技有限公司, 成都 611139; 3. 海南医学院, 海口 571199)

[摘要] 作为一种炎症肠病, 溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的发病机制尚未被完全揭示, 其治疗策略仍需继续探索。动物模型是疾病研究中不可或缺的工具。因此, 建立与人类UC发病机制、病理表现类似的动物模型有利于对该疾病进行充分研究。本文梳理了UC动物模型的研究进展, 发现化学药物诱导是迄今为止最常用的UC造模方法; 基于基因组学技术的发展, 基因编辑或基因敲除诱导的自发性结肠炎则是未来动物模型研究的重要方向; 评价UC动物模型造模结果的指标仍需进一步探索。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 动物模型; 发病机制; 基因敲除; 评价指标

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0220-09

Research Progress in Animal Models of Ulcerative Colitis

HU Yu¹, LAN Yunxi¹, CHEN Xiaoxiao¹, XIONG Wei², TANG Songqi³, JIA Bo¹, HUANG Wei¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Chengdu Qihuang Boen Bio-technology Co., Ltd., Chengdu 611139, China; 3. Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

Correspondence to: HUANG Wei (ORCID: 0000-0003-1216-5884), E-mail: gracehw@126.com

[ABSTRACT] Ulcerative colitis (UC) is a chronic, idiopathic inflammatory bowel disease. Its pathogenesis has not been fully revealed. Moreover, the lack of effective and safe treatment strategies is an obstacle for UC treatment currently. Animal models are essential tools in disease research. Therefore, the establishment of animal models with pathological manifestations similar to human UC is conducive to the full study of this disease. In this review, we reviewed the research progress of animal models of UC, and found that chemical induction is the most commonly used method for modeling UC. Based on the development of genomics technology, gene editing or knockout-induced spontaneous colitis is a vital direction for animal models research in the future. In addition, the indexes for evaluating the modeling results of UC animal models need to be further explored.

[Key words] Ulcerative colitis; Animal model; Pathogenesis; Gene knockout; Evaluation Indicators

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因不明, 波及结肠与直肠的慢性、特发性炎症肠病^[1]。据世界胃肠病学组织描述, UC在30~70岁人群中发病率基本稳定, 性别间发病率也基本持平。但从整体人群而言, 该病在世界范围内发病率正在不断上升, 在我国等新兴工业化国家和地区这一表现更为显著^[2]。虽有大量研究证明UC是由遗传、饮食等危险因素诱发的宿主异常免疫反应导致的一种炎症肠病,

但目前对于其发病机制仍然缺乏全面的认识。因此, 仍需要更多的动物实验研究来深入探讨UC发生发展机制。

迄今为止, UC动物模型造模方法较多、机制各异^[3], 并且缺乏标准统一的评价指标。虽然已有文献对UC动物模型进行了一定的综述, 但多集中在对不同动物模型的介绍及原理阐述方面, 往往忽略了具体造模方法的整合与对比, 对于研究者选择动物模型时的

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目: 基于异功散中陈皮对肠吸收动力学影响的“补而不滞”配伍机制研究(81860816)。国家自然科学基金资助项目: 逆流挽舟法调控 tuft 细胞促肠干细胞增殖修复溃疡性结肠炎黏膜的机制研究(82074327)

[第一作者] 胡 宇(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 脾胃病证的方剂配伍理论与临证运用研究。E-mail: 2020ks035@stu.cdutcm.edu.cn

[通信作者] 黄 巍(1974—), 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 方剂配伍规律的研究。E-mail: gracehw@126.com。ORCID: 0000-0003-1216-5884

参考意义有限。同时,评价指标的选取是检验动物模型有效性的必要依据,对于评价指标体系的总结尚不完善。因此,本文通过对现有UC模型动物的选择、动物模型的建立方法以及评价指标的选取进行文献综述,以期UC动物实验中模型选取提供较为全面的参考依据,同时为动物模型和评价指标的优化提供理论基础。

1 造模方法及模型动物的选取

UC的主要特征表现为结肠及直肠长期反复发作的慢性炎性反应,其发病机制与机体免疫系统的紊乱和异常的免疫反应密切相关^[4]。因此,通过药物对动物肠道产生一定的化学刺激或直接损伤,模拟肠道局部的炎性反应损伤,是目前UC动物模型最常用的造模方法^[5]。除此以外,通过异体抗原诱发动物肠道的异常免疫反应,也是较为常用的造模方法。而得益于基因组学的进步和技术发展,基因工程技术诱导动物出现自发性结肠炎也成为现今动物模型发展的重要趋势。

1.1 化学药物、异体抗原或二者联合使用

化学药物诱导是最经典且最为常用的UC动物模型建立方法。可用于诱导动物UC的化学药物种类较多^[6]。葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)、2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS)、噁唑酮(oxazolone, OXA)以及乙酸是最为常用的化学诱导药物,而2,4-二硝基氯苯、甲醛等药物同样也在不同研究中被选用。由于自身的化学特性,不同药物对于动物UC的诱导机制、病理改变、恢复情况不尽相同。

DSS诱导的动物模型具有造模方法简单的特点,只需将一定浓度的DSS溶液予以动物自由饮用便可成功诱发动物结肠炎性反应,且研究者可根据实验需求选择合适的药物浓度及给药时间。DSS可破坏动物结肠上皮细胞,损害上皮屏障功能,使肠腔中炎性物质入侵固有层及黏膜下层,以诱发动物异常的免疫反应^[7]。但DSS所诱导的动物结肠炎性反应多为急性表现,炎性反应在停药8~9 d后便可恢复^[8],这可能会对开展常规研究造成一定的局限性。而在DSS长期给药后,动物又可能出现结肠上皮萎缩,增加癌症的发生率,因此其慢性给药诱发的动物模型更适用于UC相关性结直肠癌的评价和研究。

TNBS作为一种半抗原,在给药时往往需要同一定浓度的乙醇溶液相混合,再通过灌肠给药。乙醇可直接对动物黏膜屏障造成破坏,而TNBS通过与大分子物

质结合形成全抗原诱导免疫反应,导致促炎细胞因子释放,诱发局部炎性反应^[9]。在TNBS和乙醇的共同作用下,动物结肠炎性反应由急性炎性反应向慢性炎性反应转变,更接近于人类UC的临床表现^[10]。但TNBS所诱导的动物免疫反应以Th1/Th17反应为主,被认为更接近于克罗恩病^[11]。因此,TNBS所诱导的动物模型是否能够代表人类UC的发病机制仍然存在争议。

OXA与TNBS同为半抗原药物,同样需与乙醇联用。但与TNBS不同,OXA可诱发动物Th2细胞介导的免疫反应,这与人类UC发病机制更加接近^[12]。但在造模时动物的高死亡率^[13]及病变明显的自限性导致其并未成为最广泛使用的造模药物。

乙酸所诱导的动物模型虽然具有操作简单、成本低廉等优势,但其诱发的动物结肠炎性反应与单纯性结肠急性炎性反应更相似^[14],因此乙酸在对人类UC发病机制、潜力药物机制评估等方面研究并不具备优势。

化学药物诱导的UC动物模型经过较长时间的发展,造模方法已相对成熟,且具有方法简单、操作简便、重复性强和价格低廉的特点,因此也成为目前最广泛使用的UC动物模型。但同时,也有学者认为单纯使用化学药物诱导的动物结肠炎性反应多为急性发作,不符合人类UC病程长、慢性发作的特点,不适合应用于慢性疾病的研究^[15]。异体抗原多采用其他动物的结肠组织以对造模动物致敏而诱发其免疫功能紊乱,在此基础上通过化学药物刺激肠道局部进一步导致动物异常炎性反应,该方法既可模拟人类UC免疫紊乱的特点,又可体现急性结肠炎的病理改变,被认为更具有人类UC的代表性^[8]。因此,化学药物与异体抗原联合诱导的动物模型得以发展。但由于该方法需对模型动物进行前期致敏,造模方法较复杂,实验周期较长,且后期实验过程中动物死亡率较高^[14],不可避免对实验的正常开展造成一定影响。

在具体的实验动物选择方面,大鼠及小鼠是较为常用的UC造模动物。大鼠的常用品种SD大鼠与Wistar大鼠,在不同化学药物或异体抗原等诱导下皆可出现结肠炎症,且结肠黏膜肌层、杯状细胞丢失,隐窝形态不规则、排列紊乱以及溃疡面深达肌层等病理改变也与人类UC较为接近^[15],因此是较为常用的实验动物。常见的大鼠UC动物模型造模方法^[7-9, 15-29]见表1。

同实验大鼠一致,不同品种品系的小鼠亦可在化学药物的诱导下出现实验性结肠炎。但是不同品

表1 常见的大鼠溃疡性结肠炎模型造模方法及评价指标

Table 1 The modeling methods and evaluation indicators of ulcerative colitis models in rats

造模方式 Modeling method	动物品系 Animal	造模过程 Modeling process	采样部位 Sample site	评价指标 Evaluation index	参考文献 Reference
TNBS	SD大鼠、Wistar大鼠	100~120 mg/kg的TNBS融入50%乙醇,注入大鼠结肠以诱导大鼠UC;灌肠3 d以诱导大鼠重症UC;每7 d灌肠一次,以诱发大鼠慢性UC	结肠组织	DAI评分、结肠组织肉眼评分、组织病理学评分	[9, 15-17]
DSS	SD大鼠	连续7 d自由饮用或灌胃5%的DSS溶液	结肠组织	DAI评分、大鼠结肠组织损伤大体形态学评分、组织病理学改变、组织病理学评分	[7, 18]
乙酸 Acetic acid	SD大鼠、Wistar大鼠	10%的乙酸溶液灌肠	外周血、结肠组织	组织病理学改变、组织病理学评分、TNF- α 、IL-1、IL-6	[19-22]
2,4-二硝基氯苯 2,4-Dichloronitrobenzene	Wistar大鼠	20 g/L的2,4-二硝基氯苯丙酮液滴背致敏,持续14 d。第15~18天以0.1%的2,4-二硝基氯苯乙醇溶液0.3 mL灌肠	腹主动脉血、结肠组织	组织病理学改变、IL-4、IL-6	[23]
TNBS+抗原 TNBS + antigen	SD大鼠、Wistar大鼠	以新西兰兔结肠黏膜制作抗原液,于不同时间在大鼠颈、背部皮下或足跖、腹股沟处注射抗原液致敏。后按100 mg/kg的TNBS融入50%乙醇溶液后灌肠	腹主动脉血、结肠组织	DAI评分、组织病理学改变、组织病理学评分、TNF- α	[24-25]
乙酸+抗原 Acetic acid + antigen	Wistar大鼠	取家兔新鲜结肠黏膜层制成抗原液,不同时间注射于大鼠足跖内以致敏。以5%乙酸1 mL灌肠	结肠组织	组织病理学改变、组织病理学评分	[8]
	SD大鼠	灭活大肠埃希菌悬液注射于大鼠不同部位以致敏,再以5%乙酸2 mL灌肠	血清、结肠组织	DAI评分、组织病理学评分、TNF- α 、IL-6	[26]
TNBS+DSS	Wistar大鼠	4 mL/kg的TNBS注入结肠。第11、16天分别予以5% DSS溶液自由饮用24 h	结肠组织	DAI评分、组织病理学改变、结肠黏膜损伤指数	[27]
2,4-二硝基氯苯+乙酸 2,4-Dichloronitrobenzene + acetic acid	Wistar大鼠	2%的2,4-二硝基氯苯丙酮液滴皮肤致敏,连续14 d。第15天以0.1% 2,4-二硝基氯苯乙醇溶液0.25 mL灌肠。第16天在同部位注入0.1%乙酸溶液2 mL	结肠组织	结肠病理学改变、MMP-1、MMP-2水平	[28]
甲醛溶液+抗原 Formaldehyde solution + antigen	SD大鼠	取家兔新鲜结肠黏膜层制成抗原液,不同时间于大鼠足跖、腹股沟、腹腔及背部注射抗原液致敏。1.5%甲醛溶液2 mL灌肠,留置1 h后用生理盐水冲洗干净,再用抗原液2 mL(含抗原8 mg),不加佐剂灌肠	眼眶血、结肠组织	组织病理学改变、IL-4、IL-5、IL-13	[29]

注: TNBS即2,4,6-三硝基苯磺酸; DSS即葡聚糖硫酸钠; UC指溃疡性结肠炎; DAI指疾病活动指数; MMP指基质金属蛋白酶; IL指白细胞介素; TNF- α 指肿瘤坏死因子- α 。

Note: TNBS, 2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid; DSS, dextran sodium sulfate; UC, ulcerative colitis; DAI, disease activity index; MMP, matrix metalloproteinase; IL, interleukin; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

系小鼠对化学药物的易感性存在争议。有学者发现在相同浓度的DSS自由饮用5 d后, C57BL/6小鼠表现出实验性结肠炎的病理改变, BALB/c小鼠的病理改变则已恢复, 这提示不同品系小鼠对DSS的易感性可能不同^[30]。此外, 与大鼠相比, 小鼠生命力较为脆弱, 故在面对使用TNBS造模时所需的长期侵入式操作, 小鼠

耐受力较大鼠更弱, 死亡率也更高。因此, 在使用化学药物或异体抗原进行UC动物模型诱发时, 大鼠是更为常用和推荐的实验动物。但迅速发展的基因工程技术与较完善的小鼠全基因组测序数据使得基因敲除所诱发的小鼠UC越发成为研究者首要选择的模型。常见的小鼠UC模型造模方法^[31-44]见表2。

表2 常见的小鼠溃疡性结肠炎模型造模方法及评价指标

Table 2 The modeling methods and evaluation indicators of ulcerative colitis models in mice

造模方式 Modeling method	动物品系 Animal	造模过程 Modeling process	采样部位 Sample site	评价指标 Evaluation index	参考文献 Reference
DSS	BALB/c、C57BL/6、Swiss、昆明小鼠	2%~5%的DSS溶液予以小鼠自由饮用5~7 d	结肠、直肠组织	DAI评分、组织病理学改变、MPO、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6	[31-41]
	C57BL/6小鼠	2% DSS溶液自由饮用5 d后停药14 d。给药3轮, 共43 d诱导慢性UC模型	血液、结肠组织	DAI评分、组织病理学评分、IFN- γ 、IL-4、IL-17	[42]
TNBS	BALB/c小鼠	5% TNBS 150 mg/kg与乙醇溶液以4:1的比例进行混合后灌肠	眼眶血、结肠组织	DAI评分、结肠黏膜肉眼评分、组织病理学评分、IL-6、IL-8、TNF- α	[43]
OXA	BALB/c小鼠	丙酮:橄榄油=4:1比例, 加入200 μ L 3%的噁唑酮, 涂抹于小鼠背部致敏。第8天, 将1%噁唑酮100 μ L溶于50%乙醇溶液, 注入小鼠直肠	结肠组织	DAI评分、组织病理学评分、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17A、TGF- β 1	[44]

注: DSS即葡聚糖硫酸钠; TNBS即2, 4, 6-三硝基苯磺酸; OXA即噁唑酮; UC指溃疡性结肠炎; DAI指疾病活动指数; MPO指髓过氧化物酶; IFN- γ 指 γ 干扰素; TNF- α 指肿瘤坏死因子- α ; IL指白细胞介素; TGF- β 1指转化生长因子- β 1。

Note: DSS, dextran sodium sulfate; TNBS, 2, 4, 6-trinitro-benzenesulfonic acid; OXA, oxazolone; UC, ulcerative colitis; DAI, disease activity index; MPO, myeloperoxidase; IFN- γ , interferon- γ ; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL, interleukin; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

除了大鼠、小鼠外, 也有学者使用猕猴^[45]、实验兔^[46-47], 甚至斑马鱼^[48]来诱发实验性结肠炎(表3)。但受实验成本控制、造模技术成熟度等因素影响, 上述实验动物仅被少数研究者用于UC的造模, 其是否能够成为具有研究意义的动物模型仍需进一步探索。

1.2 基因敲除

随着基因工程技术的深入研究与发展, 基因敲除或转基因诱导已成为一类重要的UC动物模型建立方法。黏蛋白2(mucin 2, Muc2)由杯状细胞分泌, 是产生黏液、构成上皮屏障的重要蛋白。通过将Muc2基因敲除, 导致上皮屏障缺陷, 可成功诱发小鼠自发性

表3 其他动物溃疡性结肠炎造模方法与评价指标

Table 3 The modeling methods and evaluation indicators of ulcerative colitis models in the other animals

造模方式 Modeling method	动物种类 Animal	造模过程 Modeling process	采样部位 Sample site	评价指标 Evaluation index	参考文献 Reference
DSS	猕猴	0.25%~1%的DSS溶液自由饮用10 d或14 d, 持续6~8个周期, 以诱导急性或慢性UC	结肠组织	体质量变化、肠道蛋白质组学分析	[45]
乙酸 Acetic acid	新西兰白兔	5%乙酸2 mL一次性灌肠	结肠组织	DAI评分、组织病理学改变	[46]
乙酸+抗原 Acetic acid + antigen	新西兰白兔	在实验兔腹部皮下及足底分别注射2%结晶卵蛋白1.5 mL。之后每日1次用1%甲醛溶液加2%乙酸混合液4 mL灌肠, 共3次	结肠组织	组织病理学改变	[47]

注: DSS即葡聚糖硫酸钠; UC指溃疡性结肠炎; DAI指疾病活动指数。

Note: DSS, dextran sodium sulfate; UC, ulcerative colitis; DAI, disease activity index.

结肠炎^[49-50]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是经典的促炎细胞因子, 其缺失可能导致小鼠白细胞介素 (interleukin, IL) - 1β 大量增加, 再加之 Muc2 缺失诱发小鼠上皮屏障受损, 可以自发诱导实验性结肠炎^[30]。IL-10 本身是一个重要的抗炎细胞因子, 而小鼠 IL-10 基因缺失可以引起 IL-10 抗炎作用丧失, 进一步导致结肠单核吞噬细胞介导的免疫反应, 由此引发结肠炎^[51]。此外, IL-10 除了作为抗炎细胞因子, 还可抑制内质网应激, 促进肠道黏液产生。尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 1 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1, Nox1) 可调控结肠杯状细胞及吸收细胞间平衡, 且 Nox1 表达水平与肠道黏液厚度呈正相关。对小鼠 IL-10 和 Nox1 基因双敲除则可使小鼠出现与人类 UC 相类似的炎性反应和组织学表现^[52]。小鼠多药耐药基因 1a (multidrug resistance gene 1a, MDR1a) 表达与 UC 密切相关。MDR1a 缺失会导致上皮屏障缺陷, 进一步引起肠道微生物群相关产物积累, 从而诱发 T 细胞亢进并识别抗原, 产生免疫反应^[53]。

上述研究往往以被证实与 UC 发病密切相关的蛋白、因子或相关通路介质为靶点, 将实验动物目标基因进行敲除, 以诱导动物自发出现结肠炎性反应, 因此基因敲除的动物模型适用于对关键基因导致发病机制的研究^[54]。但也正因如此, 基因敲除所诱导的 UC 动物模型无法对疾病完整发病机制进行模拟, 同时其操作方法复杂, 实验费用昂贵, 具有明显的局限性。

2 UC 动物模型评价指标

评价指标不仅对动物模型的造模效应评估十分关键, 也是研究者实验过程中必要的支撑。评价 UC 动物模型是否建立成功, 目前尚缺乏标准, 研究者多采用疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分、

组织病理学改变及组织病理学评分, 以及结肠组织肉眼评分等指标进行判断。DAI 评分以实验动物的体重、大便性状改变及隐血作为指标, 在造模前后不同时间段进行评估, 最终通过评分改变以判断造模是否成功, 这是在 UC 动物模型建立中最常用的评价指标^[9]。具体的评分方法^[42, 55]见表 4。

表 4 溃疡性结肠炎动物模型的疾病活动指数评分方法
Table 4 The disease activity index (DAI) scoring method for animal models of ulcerative colitis

分值 Score	体质量 Weight	大便形状 Stool form	血便 Bloody stool
0	无下降	正常	大便隐血阴性
1	下降 1% ~ 5%	轻微软便	大便隐血阳性
2	下降 6% ~ 10%	明显软便	肉眼可见轻微便血
3	下降 11% ~ 15%	腹泻	肉眼可见明显便血
4	下降 $\geq 15\%$		

注: 从造模第一天开始至造模结束, 每日评分, 每项分值分别相加。
Note: Daily scoring from the first day to the end of modeling, with each score added up separately.

组织病理学改变及评分是将动物结肠组织经 HE 染色后, 光学显微镜下观察结肠结构破坏、炎性细胞浸润等情况并进行综合评分, 从而评估造模效果。这也是评价模型是否建立成功较常用的一项指标。具体评分方法^[56]见表 5。

此外, 结肠组织肉眼评分、结肠组织大体形态损伤评分^[57]则是通过对实验动物结肠组织肉眼观察, 以结肠粘连、局部水肿、溃疡形成及病变范围等为标准进行评估。

DAI 评分、组织病理学评分等评分方法作为评价指标被众多相关研究广泛使用, 且国内外专家和学者仍在不断对具体评分细则进行完善及更新, 但这也意味着目前对于评分的标准尚未得到统一。而结肠组织肉眼评分、结肠组织大体形态损伤评分则仅在肉眼观

表 5 溃疡性结肠炎动物模型的组织病理学评分方法
Table 5 The histopathological scoring method for animal models of ulcerative colitis

分数 Score	炎症反应程度 Inflammation level	病变深度 Lesion depth	隐窝损伤 Crypt damage	损伤范围 Lesion range
0	无炎症	无病变	无损伤	无损伤
1	轻微炎症	至黏膜层	基部 1/3 受损	1% ~ 25%
2	中度炎症	至黏膜层和黏膜下层	基部 2/3 受损	26% ~ 50%
3	严重炎症	穿透肠壁	仅上皮细胞完好	51% ~ 75%
4			隐窝、上皮细胞全部丢失	76% ~ 100%

注: 结肠组织染色后镜下观察以评分。
Note: Colon tissue staining followed by microscopic observation for scoring.

察的基础上对组织损伤程度进行评价,较组织病理学评分而言可参考度较低,因此并未成为目前主流的模式评价指标。此外,上述评分均基于实验者参照一定依据对实验动物的症状改变及病理表现进行主观评分,缺乏一定的客观性。值得注意的是,由于异常炎症反应在UC发病机制中的关键作用已被证实,关键炎症反应信号通路介导的炎症细胞、促炎细胞因子也开始成为UC动物模型造模评价的关键指标^[58]。如李霞等^[26]、Catinean等^[20]将大鼠血清IL-6水平及结肠黏膜中TNF- α 表达作为指标进行检测,以评价造模是否成功。此外,IL-4、IL-8、IFN- γ 等被认为是与人类UC发生相关的细胞因子,也被不同的研究纳入作为评价指标^[42-44]。但由于目前UC的完整发病机制仍未揭示,上述炎症细胞因子是否真正是UC发生的关键,同样需要进一步证明。

由于基因敲除动物模型具有较为稳定的遗传学特征,对基因敲除或其他基因工程编辑动物模型的靶基因进行总结,有利于UC动物模型评价指标的规范化。例如,IL-10作为重要的抗炎细胞因子,在UC发生期间表达降低,且缺失IL-10可诱发小鼠出现自发性结肠炎,说明其可以作为评价UC动物模型的潜在指标^[51, 59]。此外,黏液屏障是保护机体结肠免受肠道内共生微生物及潜在病原微生物定植入侵的重要防线,而分泌黏液的Muc2蛋白缺失也是UC患者肠道屏障失调的典型特征,因此Muc2同样可能作为评估UC动物模型的另一潜在指标^[49-50, 60]。总之,形成标准的评价指标体系,有利于UC动物实验研究的规范,而基于基因工程的UC动物模型对推进评价指标体系的发展具有明显优势。

3 结论

本文对UC动物模型进行了文献分析,发现目前UC动物模型的建立方法较多且各有优劣。研究者在进行动物实验时需根据自身的实验目的、实验成本、实验周期、预期结果等因素进行考量,以选择相应的动物模型。同时,当下UC动物模型仍然存在许多不足,仍然缺乏与人类UC具有高度模拟性的动物模型,而且动物模型评价系统也尚未完善。操作性强、造模成本低、模拟程度高且评价系统完善的动物模型可能成为揭示UC发病机制、探索高效治疗策略的关键工具。因此,在UC的进一步研究中,理想动物模型的探索仍需不断深入。

【作者贡献 Author Contribution】

胡宇负责选题、论文检索、论文撰写;兰昀羲负责论文检索与整理;陈晓晓、熊伟负责阅读整理论文、表格汇总;唐宋琪、贾波、黄巍负责论文审阅、修改。

【利益声明 Declaration of Interest】

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献 References】

- [1] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
- [2] BERNSTEIN C N, FRIED M, KRABSHUIS J H, 等. 2010年世界胃肠病学组织关于炎症性肠病诊断和治疗的实践指南[J]. 胃肠病学, 2010, 15(9): 548-558. DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2010.09.011.
BERNSTEIN C N, FRIED M, KRABSHUIS J H, et al. 2010 World Gastroenterology Organization practice guidelines for the diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease[J]. Chin J Gastroenterol, 2010, 15(09): 548-558. DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2010.09.011.
- [3] 张丽瑶, 陈敏. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2021, 40(6): 158-161. DOI: 10.16040/j.cnki.cn15-1101.2021.06.090.
ZHANG L Y, CHEN M. Research progress of ulcerative colitis animal model[J]. Inn Mong J Tradit Chin Med, 2021, 40(6): 158-161. DOI: 10.16040/j.cnki.cn15-1101.2021.06.090.
- [4] CHANG J T. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases [J]. N Engl J Med, 2020, 383(27): 2652-2664. DOI: 10.1056/NEJMra2002697.
- [5] MARTÍN R, CHAIN F, MIQUEL S, et al. Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions[J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(Supp_1): S49-S70. DOI: 10.1093/femsre/fux035.
- [6] 石磊, 李军祥, 史瑞, 等. 溃疡性结肠炎的动物模型研究进展[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(12): 107-112. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2020.12.025.
SHI L, LI J X, SHI R, et al. Research progress of animal model of ulcerative colitis[J]. Med Pharm J Chin People Liber Army, 2020, 32(12): 107-112. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2020.12.025.
- [7] 杨敏杰, 刘伟, 涂宏飞, 等. 藏红花素保护溃疡性结肠炎模型大鼠的作用及相关机制[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(29): 4673-4679. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2817.
YANG M J, LIU W, TU H F, et al. Protective effect of crocin in ulcerative colitis rats and its related mechanism[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(29): 4673-4679. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2817.
- [8] 李海龙, 程小丽, 董晓丽, 等. NF- κ B和ICAM-1在溃疡性结肠炎大鼠结肠中表达及中药干预的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(9): 1594-1596. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2011.09.043.
LI H L, CHENG X L, DONG X L, et al. The expression of NF- κ B and ICAM-1 in the colon of ulcerative colitis rats and the effect of traditional Chinese medicine intervention[J]. Chin J Gerontol, 2011, 31(9): 1594-1596. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.

- 2011.09.043
- [9] 孙载鑫, 李欣, 武喜健, 等. UC模型大鼠造模方法建立和探讨[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(12):1717-1718, 1719.
SUN Z X, LI X, WU X J, et al. Establishment and discussion of UC model rat model method[J]. J Qiqihar Med Univ, 2015, 36(12):1717-1718, 1719.
- [10] 王宝家, 杨宇, 唐洪屈, 等. TGF- β 1/Smads 信号蛋白在溃疡性结肠炎大鼠肺损害中的表达及意义[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12):3966-3969.
WANG B J, YANG Y, TANG H Q, et al. Expression and significance of TGF- β 1/Smads signal proteins in rats with lung injury induced by ulcerative colitis[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(12):3966-3969.
- [11] 焦文超, 罗慧, 苏聪平, 等. 3种溃疡性结肠炎动物模型的对比[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11):5821-5823.
JIAO W C, LUO H, SU C P, et al. Comparison of three animal models of ulcerative colitis[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11):5821-5823.
- [12] LOW D, NGUYEN D D, MIZOGUCHI E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research[J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 7: 1341-1357. DOI: 10.2147/DDDT.S40107.
- [13] KOJIMA R, KURODA S, OHKISHI T, et al. Oxazolone-induced colitis in BALB/C mice: a new method to evaluate the efficacy of therapeutic agents for ulcerative colitis[J]. J Pharmacol Sci, 2004, 96(3): 307-313. DOI: 10.1254/jphs.fp0040214.
- [14] 刘亚, 李兴广. 常用溃疡性结肠炎动物模型的探讨及比较[J]. 价值工程, 2012, 31(1): 290-291. DOI: 10.14018/j.cnki.cn13-1085/n.2012.01.104.
LIU Y, LI X G. Discussion and comparison on theory of several ulcerative colitis animal models[J]. Value Eng, 2012, 31(1):290-291. DOI:10.14018/j.cnki.cn13-1085/n.2012.01.104.
- [15] 刘佳丽, 杨坤, 徐爱玲, 等. 不同造模次数对2, 4, 6-三硝基苯磺酸/乙醇诱导重症溃疡性结肠炎模型大鼠的影响[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(27): 4363-4368. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.1386.
LIU J L, YANG K, XU A L, et al. Effect of different modeling times on the rat models of severe ulcerative colitis induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid/ethanol[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2019, 23(27): 4363-4368. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.1386.
- [16] 安贺军, 王新月, 于玫, 等. 抗溃结复发方对UC模型大鼠结肠黏膜形态的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(6):24-26. DOI: 10.13194/j.jlunivtcm.2011.06.26.anhj.118.
AN H J, WANG X Y, YU M, et al. Influence of ulcerative colitis contra-relepe prescription in colon tissue pathological change of ulcerative colitis model in rat[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2011, 13(6): 24-26. DOI: 10.13194/j.jlunivtcm.2011.06.26.anhj.118.
- [17] 惠毅, 闫曙光, 李京涛, 等. 大鼠慢性溃疡性结肠炎模型建立方法探讨[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(10):62-65. DOI:10.13194/j.issn.1673-842x.2013.10.074.
HUI Y, YAN S G, LI J T, et al. Discussion on establishment method of rats model of chronic ulcerative colitis[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2013, 15(10): 62-65. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2013.10.074.
- [18] MARTIN J C, BÉRIOU G, JOSIEN R. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis in the rat[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1371:197-203. DOI:10.1007/978-1-4939-3139-2_12.
- [19] 杨永刚, 王丹丹, 张艳秋, 等. 基于线粒体膜电位改变的猴头菇子实体多糖抗溃疡性结肠炎作用机制探讨[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1):27-29.
YANG Y G, WANG D D, ZHANG Y Q, et al. Mechanism of *Hericium erinaceus* fruiting body polysaccharide against ulcerative colitis based on mitochondrial membrane potential change[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(1):27-29. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2020.01.008.
- [20] CATINEAN A, NEAG M A, KRISHNAN K, et al. Probiotic *Bacillus* spores together with amino acids and immunoglobulins exert protective effects on a rat model of ulcerative colitis[J]. Nutrients, 2020, 12(12):3607. DOI:10.3390/nu12123607.
- [21] BAHRAMI G, MALEKSHAHI H, MIRAGHAEE S, et al. Improving animal model of induced colitis by acetic acid in terms of fibrosis and inflammation incidence in the colon[J]. J Invest Surg, 2022, 35(1): 214-222. DOI: 10.1080/08941939.2020.1821844.
- [22] BOSHAGH M A, FOROUTAN P, MOLOUDI M R, et al. ELR positive CXCL chemokines are highly expressed in an animal model of ulcerative colitis[J]. J Inflamm Res, 2019, 12:167-174. DOI:10.2147/JIR.S203714.
- [23] 马明江, 鲍秀琦. 5-ASA对大鼠溃疡性结肠炎NF- κ B表达的影响[J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(1):7-8. DOI:10.3969/j.issn.1008-0104.2013.01.004.
MA M J, BAO X Q. The influence of 5-ASA on the expression of NF- κ B in ulcerative colitis of rats[J]. Heilongjiang Med Pharm, 2013, 36(1): 7-8. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0104.2013.01.004.
- [24] 康宜兵, 吕永慧, 吴宇金, 等. 免疫复合型溃疡性结肠炎大鼠模型的实验研究[J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(10):55-57. DOI:10.16254/j.cnki.53-1120/r.2015.10.029.
KANG Y B, LV Y H, WU Y J, et al. An experimental study of immune complexes ulcerative colitis rat model[J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med, 2015, 36(10):55-57. DOI:10.16254/j.cnki.53-1120/r.2015.10.029.
- [25] 杨霞, 刘俊, 任宏宇. 益生菌对实验性结肠炎大鼠 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. 临床消化病杂志, 2012, 24(4):198-201. DOI:10.3870/lcxh.j.issn.1005-541X.2012.04.02.
YANG X, LIU J, REN H. Effect of probiotic on the expression of TLR4 in the experimental colitis rat[J]. Chin J Clin Gastroenterol, 2012, 24(4):198-201. DOI:10.3870/lcxh.j.issn.1005-541X.2012.04.02.
- [26] 李霞, 金纯, 金照, 等. 溃疡性结肠炎模型的建立与评价[J]. 温州医学院学报, 2011, 41(2):116-121. DOI:10.13771/j.cnki.33-1386/r.2011.02.009.
LI X, JIN C, JIN Z, et al. Establishment and assessment of the ulcerative colitis models in rat[J]. J Wenzhou Med Coll, 2011,

- 41(2):116-121. DOI:10.13771/j.cnki.33-1386/r.2011.02.009.
- [27] 孙晓萍, 侯丽娟, 王晓红, 等. 大鼠慢性溃疡性结肠炎模型的建立及操作规范探讨[J]. 天津中医药, 2012, 29(3):270-273.
SUN X P, HOU L J, WANG X H, et al. Reproducing chronic ulcerative colitis in rats and its procedure conformity[J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2012, 29(3):270-273.
- [28] 王海强, 郑丽红, 刘朝霞, 等. 肠愈宁颗粒对溃疡性结肠炎大鼠抑制因子 MMP-1、MMP-2 表达影响的实验研究[J]. 中医药学报, 2016, 44(5):53-55. DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.2016.05.015.
WANG H Q, ZHENG L H, LIU C /Z/X, et al. Experimental study on the effect of changyuning granule on the expression of inhibitors MMP-1 and MMP-2 in ulcerative colitis rats[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2016, 44(5):53-55. DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.2016.05.015.
- [29] 吴先哲, 熊益群, 邢国良. 黄芪多糖对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-4、IL-5 和 IL-13 水平的影响[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(4):23-25. DOI:10.3969/j.issn.1002-1108.2011.04.10.
WU X Z, XIONG Y Q, XING G L. Effect of *Astragalus* polysaccharide on serum IL-4, IL-5 and IL-13 levels in rats with ulcerative colitis[J]. J Guiyang Coll Tradit Chin Med, 2011, 33(4):23-25. DOI:10.3969/j.issn.1002-1108.2011.04.10.
- [30] DE SANTIS S, KUNDE D, GALLEGIANTE V, et al. TNF α deficiency results in increased IL-1 β in an early onset of spontaneous murine colitis[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8):e2993. DOI:10.1038/cddis.2017.397.
- [31] 陈声波, 刘逸, 智发朝, 等. MAWPB 在急性溃疡性结肠炎模型中的作用[J]. 现代消化及介入诊疗, 2016, 21(3):375-378. DOI:10.3969/j.issn.1672-2159.2016.03.001.
CHEN S B, LIU Y, ZHI F C, et al. The effect of MAWPB on acute colitis model in mice[J]. Mod Dig Interv, 2016, 21(3):375-378. DOI:10.3969/j.issn.1672-2159.2016.03.001.
- [32] GANCARIKOVA S, LAUKO S, HRCKOVA G, et al. Innovative animal model of DSS-induced ulcerative colitis in pseudo germ-free mice[J]. Cells, 2020, 9(12): 2571. DOI: 10.3390/cells9122571.
- [33] TIAGO F C P, PORTO B A A, RIBEIRO N S, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 in experimental model of inflammatory bowel disease[J]. Benef Microbes, 2015, 6(6):807-815. DOI:10.3920/BM2015.0018.
- [34] 陈晶, 李巧霞, 李玮, 等. Allicin 对 DSS 诱导的小鼠结肠炎的治疗作用及可能机制[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(7):1039-1041, 1049. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2016.07.024.
CHEN J, LI Q X, LI W, et al. Therapeutical effect of Allicin for colitis mice induced by DSS and its possible mechanisms[J]. Chin J Immunol, 2016, 32(7):1039-1041, 1049. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2016.07.024.
- [35] CHEN Y R, ZHANG P, CHEN W R, et al. Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Immunol Lett, 2020, 225: 9-15. DOI: 10.1016/j.imlet.2020.06.005.
- [36] KIM J J, SHAJIB M S, MANOCHA M M, et al. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD[J]. J Vis Exp, 2012(60):3678. DOI:10.3791/3678.
- [37] NUNES N S, CHANDRAN P, SUNDBY M, et al. Therapeutic ultrasound attenuates DSS-induced colitis through the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. EBioMedicine, 2019, 45:495-510. DOI:10.1016/j.ebiom.2019.06.033.
- [38] HUANG X L, ZHANG X, FEI X Y, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(22):5201-5210. DOI:10.3748/wjg.v22.i22.5201.
- [39] SHAO J X, LIU Z H, WANG L, et al. Screening of the optimized prescription from Suqingwan in terms of its therapeutic effect on DSS-induced ulcerative colitis by its regulation of inflammatory and oxidative mediators[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 202:54-62. DOI:10.1016/j.jep.2017.03.006.
- [40] MEURER M C, MEES M, MARIANO L N B, et al. Hydroalcoholic extract of *Tagetes erecta* L. flowers, rich in the carotenoid lutein, attenuates inflammatory cytokine secretion and improves the oxidative stress in an animal model of ulcerative colitis[J]. Nutr Res, 2019, 66:95-106. DOI: 10.1016/j.nutres.2019.03.005.
- [41] CORDEIRO N, FREITAS R H C N, FRAGA C A M, et al. Therapeutic effects of anti-inflammatory N-acylhydrazones in the resolution of experimental colitis[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2020, 374(3):420-427. DOI:10.1124/jpet.120.000074.
- [42] LI Y H, XIAO H T, HU D D, et al. Berberine ameliorates chronic relapsing dextran sulfate sodium-induced colitis in C57BL/6 mice by suppressing Th17 responses[J]. Pharmacol Res, 2016, 110:227-239. DOI:10.1016/j.phrs.2016.02.010.
- [43] GONG Y X, NIU W, TANG Y P, et al. Aggravated mucosal and immune damage in a mouse model of ulcerative colitis with stress[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3): 2341-2348. DOI:10.3892/etm.2019.7162.
- [44] HUANG Z, JIANG Y C, YANG Y, et al. 3, 3'-Diindolylmethane alleviates oxazolone-induced colitis through Th2/Th17 suppression and Treg induction[J]. Mol Immunol, 2013, 53(4): 335-344. DOI:10.1016/j.molimm.2012.09.007.
- [45] MCQUEEN P, BUSMAN-SAHAY K, RIEDER F, et al. Intestinal proteomic analysis of a novel non-human primate model of experimental colitis reveals signatures of mitochondrial and metabolic dysfunction[J]. Mucosal Immunol, 2019, 12(6):1327-1335. DOI:10.1038/s41385-019-0200-2.
- [46] 孙茂庆, 卜平. 化学刺激致溃疡性结肠炎兔模型的建立[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(3):296-298, 308. DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.2011.03.009.
SUN M Q, BU P. Chemical stimulation induced ulcerative colitis in rabbit models[J]. J Hainan Med Univ, 2011, 17(3):296-298, 308. DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.2011.03.009.
- [47] 董福轮, 季蓓. 泄福音灌肠剂治疗溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 中国中医急症, 2011, 20(10):1623-1624. DOI:10.3969/j.issn.1004-745X.2011.10.040.
DONG F L, JI B. Experimental study on the treatment of ulcerative colitis with Xiefuyin enema[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2011, 20(10):1623-1624. DOI:10.3969/j.issn.1004-745X.2011.10.040.
- [48] SOLIS C J, HAMILTON M K, CARUFFO M, et al. Intestinal

- inflammation induced by soybean meal ingestion increases intestinal permeability and neutrophil turnover independently of microbiota in zebrafish[J]. Front Immunol, 2020, 11:1330. DOI:10.3389/fimmu.2020.01330.
- [49] WENZEL U A, MAGNUSSON M K, RYDSTRÖM A, et al. Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100217. DOI:10.1371/journal.pone.0100217.
- [50] ALKADHI S, KUNDE D L, CHELUVAPPA R, et al. The murine appendiceal microbiome is altered in spontaneous colitis and its pathological progression[J]. Gut Pathog, 2014, 6: 25. DOI:10.1186/1757-4749-6-25.
- [51] JOHANSSON M E V, GUSTAFSSON J K, HOLMÉN-LARSSON J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis[J]. Gut, 2014, 63(2):281-291. DOI:10.1136/gutjnl-2012-303207.
- [52] TRÉTON X, PEDRUZZI E, GUICHARD C, et al. Combined NADPH oxidase 1 and interleukin 10 deficiency induces chronic endoplasmic *Reticulum* stress and causes ulcerative colitis-like disease in mice[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101669. DOI:10.1371/journal.pone.0101669.
- [53] BILSBOROUGH J, FIORINO M F, HENKLE B W. Select animal models of colitis and their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis[J]. Expert Opin Drug Discov, 2021, 16(5):567-577. DOI:10.1080/17460441.2021.1851185.
- [54] 何育佩, 杜正彩, 侯小涛, 等. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(2):423-433. DOI:10.11842/wst.20190102006.
- HE Y P, DU Z C, HOU X T, et al. Research progress of animal models of ulcerative colitis[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2020, 22(2):423-433. DOI:10.11842/wst.20190102006..
- [55] XIE Y, ZHOU L Y, YAO X J, et al. Protective effects of *Clostridium butyricum* in a murine model of dextran sodium sulfate-induced colitis that involve inhibition of the TLR2 signaling pathway and T helper 17 cells[J]. Am J Med Sci, 2020, 360(2):176-191. DOI:10.1016/j.amjms.2020.05.021.
- [56] LIU J L, GAO Y Y, ZHOU J, et al. Changes in serum inflammatory cytokine levels and intestinal flora in a self-healing dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis murine model[J]. Life Sci, 2020, 263: 118587. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118587.
- [57] 李凯, 郑丰杰, 袁坤, 等. 参青方对TNBs诱导溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜影响的研究[J]. 中医学报, 2013, 28(6):847-849. DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2013.06.050.
- LI K, ZHENG F J, YUAN K, et al. Impact of shenqing prescription in treating TNBs induced ulcerative colitis model rats[J]. China J Chin Med, 2013, 28(6):847-849. DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2013.06.050.
- [58] HART A L, AL-HASSI H O, RIGBY R J, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases[J]. Gastroenterology, 2005, 129(1): 50-65. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.05.013.
- [59] NEURATH M F. Cytokines in inflammatory bowel disease[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(5):329-342. DOI:10.1038/nri3661.
- [60] GERSEMAN M, BECKER S, KÜBLER I, et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. Differentiation, 2009, 77(1): 84-94. DOI: 10.1016/j.diff.2008.09.008.
- (收稿日期:2021-09-22 修回日期:2022-01-21)
(本文编辑:富群华,张俊彦,余儒洋)

《实验动物与比较医学》有关作者投稿必备信息和材料的说明

《实验动物与比较医学》是我国实验动物科学与比较医学领域创刊最早的专业性学术期刊, 执行严格的同行评议和三甲三校制度。为提高稿件审理效率, 以及规范作者投稿行为, 本刊加大初审力度。从2021年4月起, 作者从本刊官网 (<http://www.slarc.org.cn/dwyx>) 投稿时, 除提交Word格式的完整论文外, 还需提供以下必备信息和材料:

1. 所有署名作者的信息, 包括最高学历、职称、研究方向、E-mail和电话等。
2. 第一作者单位盖章的论文审查表或介绍信扫描件, 需承诺本文符合科研诚信要求。
3. 涉及动物实验的研究性文章还需提供实验动物的生产许可证和质量合格证、实验场所的实验动物使用许可证、该研究的实验动物福利伦理审查表的扫描件。文中注明以上三证一表的准确编号。
4. 填写作者贡献及利益冲突声明表, 并在文末说明。
5. 研究如有基金资助, 请提供与本文内容相符的基金立项证明。

以上2~5材料均请打包后, 作为附件上传本刊投审稿系统。若材料不齐或信息造假, 编辑部将直接退稿。

详情可见本刊官网首页的“政策指南”-“投稿指南”和“政策细则”-“稿件要求细则”。相关模板可至“政策细则”-“附件模板下载”获取。

《实验动物与比较医学》编辑部



唐黎明, 硕士生导师, 主任药师, 现任上海市食品药品检验研究院药理毒理室主任, 药物安全评价中心机构负责人。兼任国家药典委员会委员, 国家食品药品监督管理局化妆品和保健食品审评专家, 上海市科委专家库专家, 上海市浦东新区科学技术委员会专家库专家, 中国药理学学会药检药理专业委员会副主任委员, 上海市毒理学会副理事长, 中国毒理学会药物毒理与安全性评价专业委员会常务委员, 中国药理学学会安全药理学专业委员会委员, 中国毒理学会中药与天然药物毒理专业委员会委员, 上海市药学会药理专业委员会委员, 上海市药理学学会毒理专业委员会委员, 国家级 GLP 检查员。负责和参与国家重点研发计划 1 项, 国家自然科学基金面上项目 2 项, 国家药典委员会药品标准提高项目 3 项, 转基因生物新品种培育重大专项项目 1 项, 上海市科委科研项目 5 项。参与标准制修订 7 项, 在国内外期刊发表论文 70 余篇, 在各大专业学术会议上获奖

14 项, 参与编写论著 4 部, 申请专利 2 项。

王 宇, 博士, 主管药师。现为上海市食品药品检验研究院药物安全性评价中心病理部负责人, 主要从事药理学、兽医病理学、实验病理学及毒性病理学的工作。兼任《实验动物与比较医学》青年编委。参与重大新药创制、科技部重大及上海市科委等多项课题, 相关研究课题入选中国毒理学会青年论文优秀奖和中国药检药理学会优秀奖等。发表论文 20 余篇, 其中 SCI 论文 10 余篇, 申请中国专利 2 项。



实验用英国短毛猫的组织结构特征及背景病变

王 宇, 高 丹, 彭娜娜, 航 艾, 沈 斌, 黄 坚, 唐黎明

(上海市食品药品检验研究院, 上海 201203)

[摘要] 目的 对实验用英国短毛猫 (简称英短猫) 解剖结构特征和背景病变进行收集与分析, 为该类动物的实验研究、标准建立和商业应用提供有效依据。**方法** 对 14 只英短猫 (雌雄各半) 进行大体系统剖检和组织病理学检查, 收集并分析其区别于其他实验动物的组织结构特征和背景病变数据。**结果** 大体剖检发现成年雄性英短猫体质量高于雌性 ($P < 0.05$), 雌性英短猫脾脏脏器指数低于雄性 ($P < 0.01$), 雌性英短猫胸腺和脑脏器指数高于雄性 ($P < 0.05$), 英短猫睾丸、心脏、甲状腺、幕骨解剖结构与常用啮齿类及犬类动物有所不同。组织病理学检查发现英短猫心脏、胰腺和脾脏等器官的组织结构较上述常用实验动物有所差异, 另可见英短猫多发肝脏肝细胞空泡变性 (9/14), 同时还发现部分动物偶发的肾脏、脑和淋巴组织等背景病变。**结论** 英短猫体质量、脾脏、胸腺和脑的脏器指数存在性别差异性, 同时具有肝脏空泡变性和部分动物偶发的背景病理改变。

[关键词] 英国短毛猫; 大体剖检; 组织病理学检查; 解剖特征; 背景病变

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0229-08

Anatomical Characteristics and Background Lesions in Laboratory British-shorthair Cats

WANG Yu, GAO Dan, PENG Nana, HANG Ai, SHEN Bin, HUANG Jian, TANG Liming

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Correspondence to: TANG Liming (ORCID: 0000-0003-4449-8333), E-mail: tangliming@smda.sh.cn

[ABSTRACT] **Objective** To investigate anatomical characteristics and background lesions in laboratory British-shorthair cats (BSCs) through gross and histopathological examination, and provide effective basis for the research and application, standard establishment and market promotion of this experimental animal. **Methods** Gross system dissection and histopathological examination were performed on 14 adult

[基金项目] 上海市科技创新行动计划实验动物专项课题: 实验用猫主要实验用途及基本生理学特性研究(19140900203)

[第一作者] 王 宇(1983—), 男, 博士, 主管药师, 研究方向: 实验和毒性病理学。E-mail: ohyue@163.com

[通信作者] 唐黎明(1964—), 男, 硕士生导师, 主任药师, 研究方向: 药物毒理学。E-mail: tangliming@smda.sh.cn。ORCID: 0000-0003-4449-8333

BSCs (half male and half female), and the histological characteristics and background pathological data were collected and analyzed. **Results** The body weight and organ index of spleen of BSCs was higher in males than females ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the organ coefficients of brain and thymus in BSCs were lower in males than females ($P < 0.05$). The anatomical structure of testicles, heart, thyroid gland and tentorium of BSCs is different from that of rodents and canine. Furthermore, histopathological examinations revealed that the structures of heart, pancreas, spleen in BSCs differed from two experimental animals mentioned above. In addition, there were multiple hepatic cell vacuolar degeneration in BSCs (9/14), and occasional renal, brain and lymphoid tissues were also found in some animals. **Conclusion** There were six differences in body weight, and organ-coefficient of spleen, thymus, and brain in BSCs, while the hepatocyte phospholipidosis of liver and background lesion in BSCs were found.

[Key words] British-shorthair Cat; Gross autopsy; Histopathological examination; Anatomic characteristic; Background lesion

目前,猫是降压物质检查法(中国药典2020版)中唯一指定的实验动物(体质量2 kg以上)^[1],同时欧洲药典(8.0th)中降压物质检查法的指定实验动物也是猫^[2]。另外,实验猫还可应用于多种疾病模型研究,如糖尿病^[3]、脊髓损伤^[4]、心脏病^[5]、肿瘤^[6]和病毒病^[7]等。20世纪70年代,美国大量猫(5.5万只/年)应用于医学研究,然而规范化养殖的商用实验猫用量不足8%^[8]。基于猫在降压物质检查及疾病模型研究中不可替代的作用,中国每年(2015年)也有超过5 000只猫用于科学研究^[9]。现阶段我国大陆地区仅有3家公司(2019年)具有实验猫的生产许可证^[10]。河北、吉林、黑龙江和四川省颁布了实验用猫的地方标准,而基于相关标准的实验猫标准化养殖机构却较为稀缺。

目前商用实验猫的产量不能满足现阶段需求,实验用猫获取大多只能依靠野外动物捕获和个人捐赠^[10]。然而,相关机构对用于降压物质检查的实验猫进行疾病筛查时,发现其弓形虫阳性率达21.7%^[11]。一项针对上海闵行区流浪猫(80只)的寄生虫检测发现华支睾吸虫(阳性率51.11%)、孟氏迭宫绦虫(阳性率35.56%)、带绦虫(阳性率24.44%)和弓首蛔虫(阳性率55.56%)4种人兽共患病寄生虫^[12]。猫作为人类伴侣型动物,可感染多种人兽共患传染病,如全球流行的新型冠状病毒(COVID-19)在宠物猫和猫科动物体内均有检出记录^[13]。在非标准化养殖情况下,猫作为实验动物存在生物安全性风险。因此,标准化养殖过程中进行人工干预的实验猫防疫和生产,可从根本上杜绝多种疫病发生。

虽然猫作为伴侣型宠物已有数千年驯化史^[14],但猫性情急躁,具有神经质体质,对事物谨慎^[15],较难

驯化为实验用动物。复旦大学从遗传数据清晰和良好人工培育背景猫种源中,选择从美国引种的英国短毛猫(以下简称英短猫)进行实验动物驯化研究^[16]。本实验所用实验猫为从美国引种并封闭繁殖二代的英短猫,对其种群中成年雌雄猫进行系统大体剖检和组织病理学检查,统计并分析该猫种的解剖学特征及背景病变,以期为英短猫实验研究、标准建立和商业应用提供有效依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养情况

英短猫14只,雌雄各半,于2020年4月至2021年7月单只多次购自瑞特培斯生物科技启东有限公司,其中6~12月龄9只、12~16月龄2只、35~36月龄3只。本研究选用英短猫均为性成熟动物,雌猫无妊娠史。上述动物饲养于上海市食品药品检验研究院实验动物设施内[SYXK(沪)2016-0018]。本实验通过上海市食品药品检验研究院动物伦理委员会审核,动物伦理批准号为IACUC-SIFDC-21105。

英短猫单笼饲养,环境温度20~24℃,环境相对湿度44%~67%,光照周期为昼夜12 h更替,饲料为法国皇家(Royal Canin)室内成猫粮(i27),可自由采食,饮水不限量,每天清洁,保持笼具清洁、干燥。

1.2 实验动物处置

英短猫进入本单位动物设施后由兽医进行检疫检查,结果显示无明显异常。适应性饲养3 d后,舒泰50(批号6W9K)15 mg/kg肌内注射麻醉。对英短猫进行降压检查后,对其实施安乐死,之后进行系统性大体剖检。

1.3 大体检查和解剖

剖检按照下列顺序进行：动物外观整体观察→剥开皮肤（检查皮肤和肌肉组织）→腹腔及盆腔剖检→胸腔（包括颈部位置）剖检→颅腔剖检。各个腔体检查结束后及时摘取脏器，置于10%中性福尔马林（即质量分数为4%的甲醛溶液）中固定。主要脏器称质量，并计算脏器指数。脏器指数=〔脏器质量（g）÷动物体质量（g）〕×100%。

1.4 组织病理学检查

对主要脏器进行组织病理学检查，经过脱脂（70%、80%乙醇溶液）、骨组织脱钙（25%甲酸脱钙液）、脱水（无水乙醇）、透明（二甲苯）、浸蜡（62℃液态石蜡）、石蜡包埋、切片、HE（hematoxylin and eosin）染色后，进行显微镜下观察，诊断并分析各脏器特征性结构和病理性改变。

1.5 数据处理

主要对英短猫体质量（kg）和脏器质量（g）进行数据采集，统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用GraphPad Prism 5.01软件进行统计分析并制图，不同性别的指标均数比较采用非配对 t 检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 英短猫的外观特征和大体检查

本研究所用英短猫背部毛色大多为银灰色，少数（2/14）为纯白色，尾部被毛横条纹（深灰色）状，腹部被毛呈纯白色；与中国本土猫（Chinese domestic cat）相比头身比较大，鼻部较短，眼大且虹膜呈翠绿

色，大体情况可见图1A和B。

英短猫全身麻醉后进行大体检查。被毛及皮肤检查：被毛皮肤完整，无缺损，无外生（增生）物，未见寄生虫和皮肤病等异常病变。

外部整体检查：眼、鼻、口、耳、肛门、乳腺组织及外生殖器无明显的缺失损伤，未见分泌物产生；颈部、腋下、大腿内侧淋巴结未见明显肿大和萎缩等异常改变。

腹腔和盆腔检查：腹腔内无明显渗出液和出血，消化道及相关消化腺未见明显增生和萎缩等异常改变，生殖器官也未见明显异常改变；雄性英短猫睾丸于阴囊内，解剖过程中需剪开阴囊进行摘取，同时睾丸和附睾紧密连接，解剖过程中一同摘取称重和固定；膀胱内充满尿液，膀胱下为前列腺组织，无精囊腺组织，详见图1C。

胸腔检查：胸腔内无积液，胸腺成长条状，该组织周围被脂肪组织包裹（图1D）；心脏心包组织较厚，心包组织内无渗出液，心脏未见明显异常改变（图1D）；剖开胸腔同时可见肺脏暂时性皱缩，数秒后逐渐舒展，肺脏呈粉色（图1D）；颈部淋巴组织和唾液腺无明显肿大和萎缩等病理性改变；甲状腺位于环状软骨近心端下1 cm左右位置，藏于气管背侧，手指轻托漏出后检查。

头部和颅腔检查：颅腔内未见明显渗出液，嗅球和小脑分别与大脑海间均存在幕骨（图1E），垂体位于大脑下鞍背内（图1E），上述组织均未见明显异常改变；骨骼组织和坐骨神经组织未见明显异常改变。

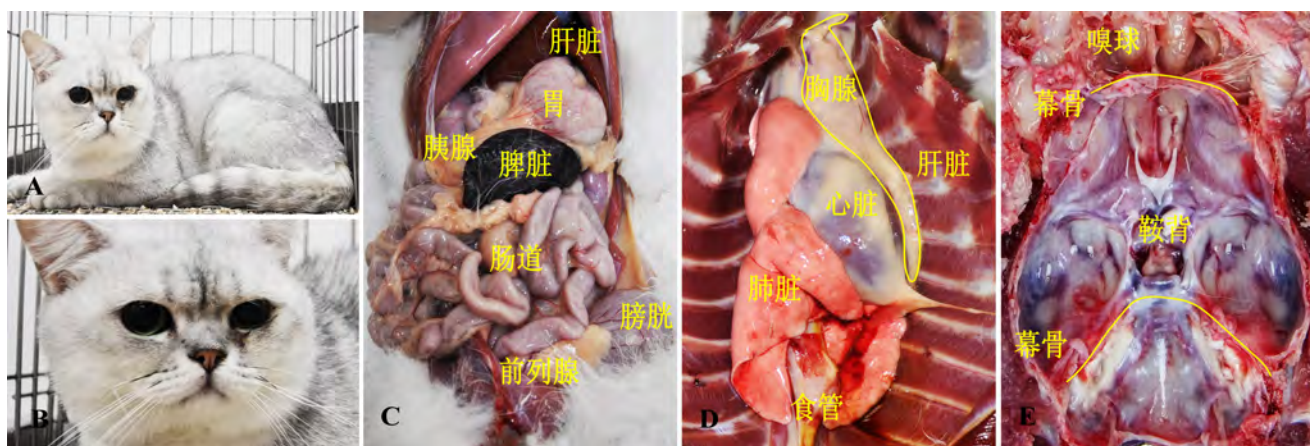


图1 实验用英国短毛猫的大体情况(A)和面部情况(B)以及腹腔(C)、胸腔(D)、颅腔(E)解剖情况

Figure 1 The general appearance (A), facial view (B), abdominal cavity (C), thoracic cavity (D) and cranial cavity (E) of laboratory British-shorthair cats

2.2 英短猫的体质量和脏器指数

雄性英短猫的体质量范围为3.3~5.1 kg, 中位数为3.9 kg, 平均体质量为(3.9±0.6) kg; 雌性英短猫的体质量范围为2.3~3.5 kg, 中位数为2.5 kg, 平均体质量为(2.6±0.4) kg。与雄性英短猫相比, 雌性英短猫

的平均体质量明显较低 ($P<0.05$)。

与雄性英短猫相比, 雌性英短猫的脾脏指数明显较低 ($P<0.01$), 而雌性胸腺和脑指数明显较高 ($P<0.05$)。其他脏器指数在雌、雄英短猫之间比较, 无明显差异 ($P>0.05$)。具体脏器数据详见表1。

表1 雄性和雌性实验用英国短毛猫的脏器数据
Table 1 Organ index of male and female laboratory British-shorthair cats

($\bar{x} \pm s, n=7$)

脏器 Organ	雄性 Male		雌性 Female	
	脏器平均质量 Organ weight/g	脏器指数 Organ index/%	脏器平均质量 Organ weight/g	脏器指数 Organ index/%
心脏 Heart	17.72 ± 1.92	0.46 ± 0.09	10.35 ± 2.36	0.40 ± 0.02
肝脏 Liver	103.34 ± 9.79	2.70 ± 0.50	69.32 ± 118.19	2.68 ± 0.57
脾脏 Spleen	6.41 ± 0.46	0.71 ± 0.10	4.53 ± 1.16	0.18 ± 0.05**
肺脏 Lung	21.14 ± 1.61	0.55 ± 0.10	15.59 ± 1.36	0.61 ± 0.04
肾脏 Kidney	38.30 ± 1.35	1.00 ± 0.15	23.72 ± 5.82	0.91 ± 0.08
脑 Brain	27.40 ± 0.82	0.71 ± 0.10	26.71 ± 0.23	1.05 ± 0.13*
胸腺 Thymus	1.23 ± 0.43	0.03 ± 0.01	1.23 ± 0.43	0.05 ± 0.02*
肾上腺 Adrenal	0.65 ± 0.05	0.02 ± 0.00	0.71 ± 0.12	0.03 ± 0.01
甲状腺 Thyroid	0.38 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.38 ± 0.03	0.01 ± 0.00
睾丸 Testis	3.71 ± 0.28	0.10 ± 0.02	-	-
卵巢 Ovary	-	-	0.72 ± 0.08	0.03 ± 0.00
子宫 Uterus	-	-	3.50 ± 0.33	0.14 ± 0.02

注: 脏器指数=脏器质量(g)/动物体质量(g)×100%。与雄性实验猫相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note: Organ index=organ weight (g)/body weight (g)×100%. Compared with male cats, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.3 英短猫的组织病理学特点

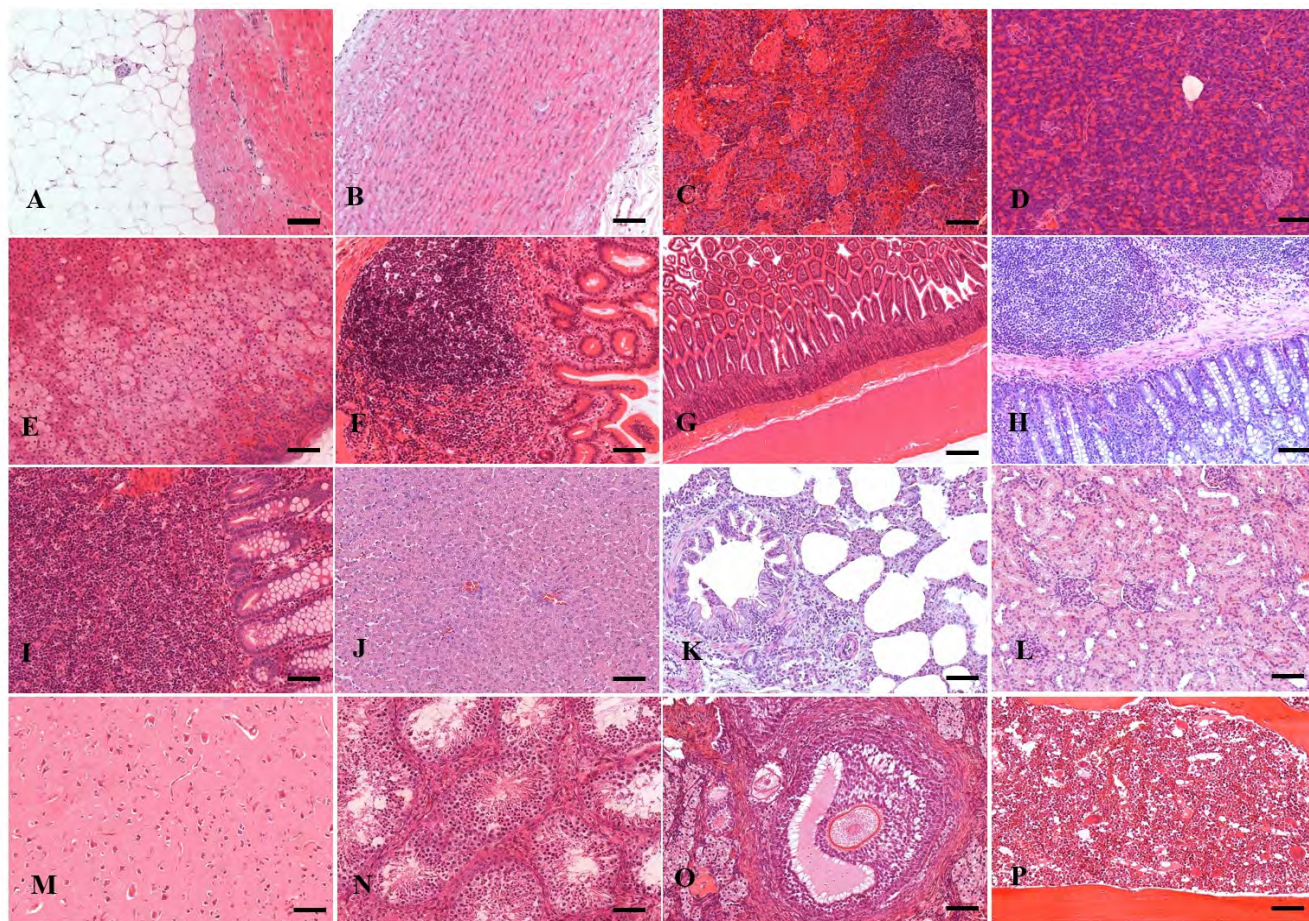
对英短猫的主要组织器官进行组织病理学检查(HE染色), 结果发现其组织学特点包括: 心脏的心外膜有较多脂肪组织分布(图2A); 主动脉壁较厚, 内膜细胞含量较多, 内膜下组织存在一层较厚的弹力蛋白(图2B); 脾脏的脾小梁结构丰富(图2C); 胰腺的胰岛体积较小且数量少(图2D); 肾上腺皮质区束状带较宽(图2E); 胃黏膜下分布较多淋巴组织(图2F); 空肠黏膜下肌层组织较厚(图2G); 回肠的派伊尔节发达, 黏膜下肌层较厚, 黏膜层较多杯状细胞分布(图2H); 盲肠-结肠-直肠的黏膜下分布较多淋巴组织(图2I); 肝脏的肝细胞未见明显异常改变(图2J); 肺脏的肺泡及肺内支气管未见明显异常改变(图2K); 肾脏的肾髓质皮质部未见明显异常改变(图2L); 大脑皮层组织未见明显异常改变(图2M); 睾丸的曲细精管未见明显异常改变(图2N); 卵巢的各级卵泡未见明显异常改变(图2O); 胸骨及骨髓组织未见明显异常改变(图2P)。

以上所述组织学特点在其他种属猫中也有所发现,

并非本文英短猫所独有。未描述器官的组织学特点与其他常见实验动物(如啮齿类、犬类、非人灵长类等)相似。

2.4 英短猫的背景性病变

在对英短猫进行组织学检查过程中, 发现下述背景性病变: 1只动物的心脏心外膜周围心肌组织脂肪变性, 部分脂肪组织侵袭心肌组织, 并挤压周围心肌组织(图3A); 4只动物的皮质区肾小管不同程度空泡变性(图3B), 其中1只动物急性肾损伤, 肾小管变性坏死, 炎性细胞浸润, 间质纤维化(图3C); 9只动物的肝脏中存在肝细胞不同程度的空泡(脂肪)变性(图3D), 其中6~12月龄5只(共9只), 12~16月龄2只(共2只), 35~36月龄2只(共3只); 1只动物的食管旁淋巴结淋巴窦内充血(图3E); 1只动物的小脑局部组织空泡变性(图3F), 另有1只动物的脑干细胞空泡变性(图3G); 1只动物的肾上腺结构异形, 束状带分布混乱, 组织增生(图3H); 1只动物的肺脏内部分支气管内脓液聚集(图3I)。本实验中背景病变并无性别归一性, 因此将雌雄英短猫的病变更并统计。



注: A为心脏, B为主动脉, C为脾脏, D为胰腺, E为肾上腺, F为胃, G为空肠, H为回肠, I为盲肠, J为肝脏, K为肺脏, L为肾脏, M为脑, N为睾丸, O为卵巢, P为胸骨。除G图为HE染色50倍(比例尺=1 000 μm)外, 其余图片均为HE染色放大200倍(比例尺=200 μm)。

Note: A is heart, B is aorta, C is spleen, D is pancreas, E is adrenal, F is stomach, G is jejunum, H is ileum, I is cecum, J is liver, K is lung, L is kidney, M is brain, N is testis, O is ovary, P is sternum. The scale of G is 1 000 μm , and the other images scale are 200 μm .

图2 实验用英国短毛猫的主要组织器官的HE染色组织病理学特点

Figure 2 The histopathological characteristics of the main tissues and organs of the laboratory British-shorthair cats detected by HE staining

3 讨论

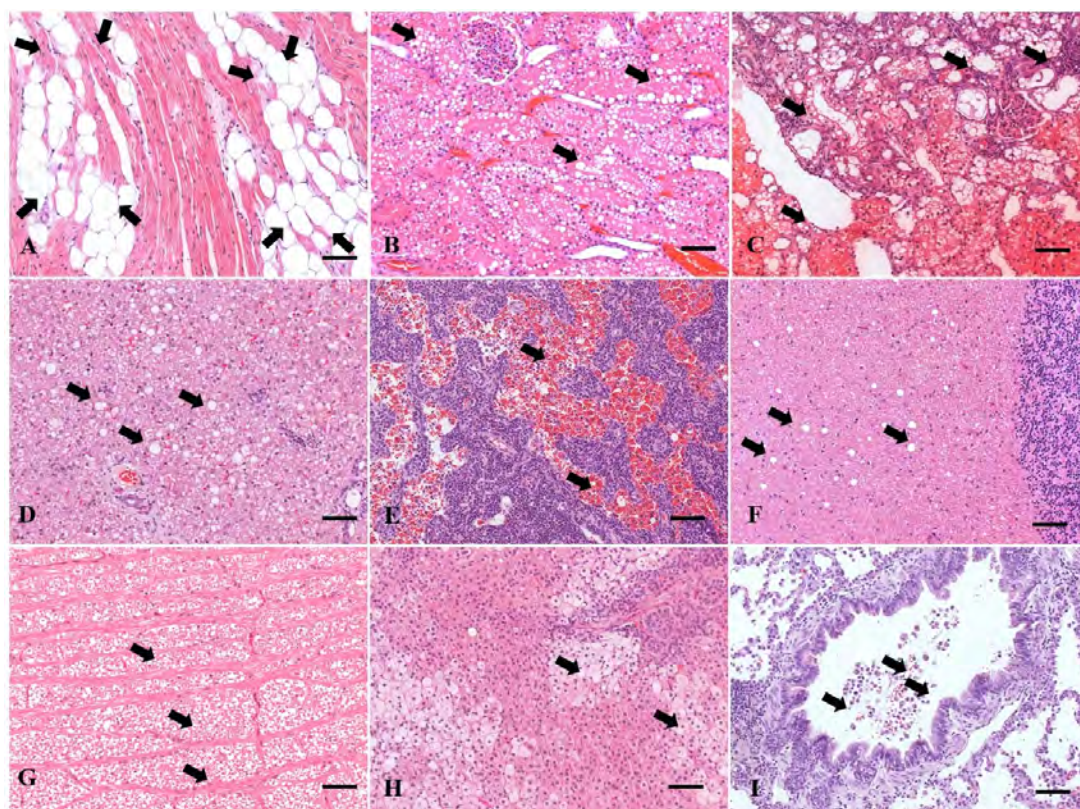
3.1 英短猫大体情况和剖检分析

虽然英短猫被毛较短, 但猫科动物极易感染多种皮肤寄生虫、细菌和真菌^[17]。英短猫作为实验动物, 其日常护理(如梳毛、洗澡及除虫)极为重要^[18]。同时, 对实验用猫进行检阅和观察时, 应注意其体表大体情况观察。本实验中, 英短猫在规范化的饲养环境下养殖, 无明显的被毛、皮肤和体表器官异常。

解剖过程是从英短猫盆腔开始, 上行至颅腔结束。在检查雄性生殖系统发现睾丸和附睾由韧带组织紧密连接, 很难对其分离, 因此后期称重及组织病理学检查过程中并未对其分离。上述睾丸和附睾的连接特

征有别于啮齿类、犬类和非人灵长类。因英短猫的心包膜周围被较厚的脂肪组织包裹, 所以在组织病理学检查过程中偶见心外膜周围心肌组织脂肪变性, 可能为心包周围脂肪组织侵袭心肌组织所致。通常哺乳动物甲状腺位于环状软骨两侧^[15], 而英短猫的甲状腺位于环状软骨近心端下1 cm左右位置, 且藏于气管背侧。猫科动物的大脑和小脑中间有一幕骨结构, 该结构为猫科动物特有的骨组织结构^[19]。上述睾丸、心脏、甲状腺和幕骨特殊解剖结构应当引起注意, 避免在解剖和取材过程中误操作而导致实验结果有误。

英短猫的生长发育与其他常用实验动物相似^[15], 性成熟后雄猫体质量大于雌猫。本实验中雄猫的脾脏系数高于雌猫, 而组织病理学观察并未见雄雌英短猫



注: A为心脏, B和C为肾脏, D为肝脏, E为颈淋巴结, F为小脑, G为脑干, H为肾上腺, I为肺脏。图A、B、D、F、G中黑色箭头所指均为空泡变性区域, 图C中黑色箭头所指为损伤后的肾小管上皮, 图E中黑色箭头所指为淋巴窦内充血区域, 图H中黑色箭头所指为束状带分布混乱区域, 图I中黑色箭头所指为支气管内脓液。所有图片均为HE染色, 放大200倍(比例尺=200 μm)。

Note: Histopathological characteristics in the heart (A), kidney (B and C), liver (D), lymphonodi cervicales (E), cerebellum (F), brainstem (G), adrenal (H) and lung (I) of laboratory British-shorthair cats stained with H & E (Scale=200 μm). Arrows in A, B, D, F and G show the vacuolation (fatty) degeneration; arrows in C show the damaged tubular of kidney; arrows in E show the passive congestion of lymph sinus; arrows in H show the disorder structure of the zona fasciculata in the adrenal gland; arrows in I show the bronchus abscess in the lung.

图3 实验用英国短毛猫的背景性病变情况

Figure 3 Background lesions of laboratory British-shorthair cats

的脾脏组织结构有明显异常。英短猫脾脏质量的性别差异问题有待后续进行探究, 目前尚无相关报告说明其缘由。同时, 研究发现雄猫的胸腺和脑组织脏器指数低于雌猫, 推测可能是由于胸腺和脑组织均为动物早发育的器官^[15], 而在性成熟阶段后到达稳定状态, 雄猫体质量高于雌猫, 所以造成上述两个脏器指数的差异性。

3.2 英短猫组织病理学检查分析

饲养管理不当(如进食量和活动频率异常)可引起动物肥胖, 从而造成脂肪肝等病理性改变^[15]。本实验所见心脏心外膜有较多脂肪组织分布、肾小管空泡变性和肝细胞空泡(脂肪)变性, 均为动物体内脂肪含量过高所致。另外, 宠物猫的脂肪肝状况较为常见^[20], 表明在舒适环境下猫科动物较易储存脂类成

分, 并引起机体脂质成分代谢异常^[21]。此外, 6~36月龄各阶段英短猫均可见该病变, 且病变与英短猫月龄呈正相关性, 随英短猫月龄的增大, 脂肪成分在体内储存越多, 所以推测该病变应和英短猫饮食和生活习性相关。因此, 在猫科动物作为实验动物繁育的过程中, 更应对其饲料及每日活动量进行人工干预和监测, 避免因饲养不当引起的病理性改变。

本实验中发现英短猫胰脏内胰岛数量较少, 且体积较小, 表明英短猫分泌胰岛素的能力可能存在不足。已有研究者证实猫糖尿病模型应用的可行性^[22], 但造成猫肥胖和糖尿病的相关机制仍有待研究。此外, 本实验还发现, 英短猫动脉壁较厚, 内膜细胞含量较多, 内膜下组织存在一层较厚的弹力蛋白。本实验中英短猫可见肝脏脂肪变性, 以往研究中表明甚至在脂肪肝

和糖尿病的情况下,也未发现血管内动脉粥样硬化^[3, 22]。猫对降压物质的敏感性,也是其他动物无法比拟的^[23-24]。所以,实验用猫在降压物质检查和疾病模型研究中有独特且重要的地位。

另外,本实验观察到英短猫的胃肠道组织中均分布着丰富的淋巴组织。猫科动物胃肠道特有的丰富淋巴组织可能与猫的饮食习惯有关,部分猫科动物喜食较硬的物件和较多毛发类成分,这种异食特性与其胃肠道分布有丰富淋巴组织相关^[25]。本实验中还观察到脑、肺脏、肾脏、肾上腺的背景病变,这些病理性改变并非英短猫所独有,应为该动物单发偶发的背景病变。因此,暂将上述病理改变记为英短猫的背景病变,推测这些可能与动物的遗传、饮食、饲养和环境等因素相关^[26]。

综上所述,对猫科动物进行实验动物化繁育的先例并不多,得到一个遗传信息清晰、种属繁殖稳定、适宜实验环境研究的实验用猫种系更为不易。即使在北京、上海等实验动物科技发展较好的地区,目前也尚无成熟公司进行实验猫的商业化、规模化运作^[8]。因此,英短猫的繁育、生理指标和组织病理学检查等项目的研究对该种属的实验动物化进程起着决定作用。虽然本研究中各年龄段英短猫的样本数量不足,但实验结果可为今后科学研究和猫科动物临床研究提供一些背景数据,对实现英短猫饲养管理、疾病诊断、科学应用的标准化具有参考意义。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海市食品药品检验研究院实验动物伦理委员会审查批准(IACUC-SIFDC-21105)。All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai Institute for Food and Drug Control (Approval Letter No. IACUC-SIFDC-21105)。

[作者贡献 Author Contribution]

王宇负责实验设计、实验动物解剖、组织病理学检查、数据收集和统计,以及论文撰写和修改;高丹、彭娜娜和沈斌负责组织病理学切片制作,以及实验辅助;航艾参与数据收集、实验动物麻醉和解剖;黄坚参与实验设计、数据收集和文章修改;唐黎明给予实验指导,负责论文审核和修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 182-183.

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2020:82-183.
- [2] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia[S]. 10.0 edition. Stropean Directorate for Quality Medicines, 2019: 185.
- [3] SAMAHA G, BEATTY J, WADE C M, et al. The Burmese cat as a genetic model of type 2 diabetes in humans[J]. Anim Genet, 2019, 50(4):319-325. DOI:10.1111/age.12799.
- [4] ROSSIGNOL S, CHAU C, GIROUX N, et al. The cat model of spinal injury[J]. Prog Brain Res, 2002, 137:151-168. DOI:10.1016/s0079-6123(02)37014-6.
- [5] FREEMAN L M, RUSH J E, STERN J A, et al. Feline hypertrophic cardiomyopathy: a spontaneous large animal model of human HCM[J]. Cardiol Res, 2017, 8(4):139-142. DOI: 10.14740/cr578w.
- [6] PAULIN M V, COURONNÉ L, BEGUIN J, et al. Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease[J]. BMC Vet Res, 2018, 14(1):306. DOI:10.1186/s12917-018-1635-5.
- [7] COATS K S. The feline immunodeficiency virus-infected cat: a model for lentivirus-induced placental immunopathology and reproductive failure (mini-review) [J]. Am J Reprod Immunol, 2005, 54(4): 169-185. DOI: 10.1111/j. 1600-0897.2005.00296.x.
- [8] 方远书, 何忠平, 裴颖儿. 实验用猫研究现状和发展趋势探讨[J]. 山东畜牧兽医, 2017, 38(10):62. DOI:10.3969/j.issn.1007-1733.2017.10.044.
- FANG Y S, HE Z P, QIU Y E. Research status and development trend of laboratory cats[J]. Shandong J Animal Sci Vet Med, 2017, 38(10):62. DOI:10.3969/j.issn.1007-1733.2017.10.044.
- [9] 刘明慧, 袁宝, 陈健, 等. 猫实验动物标准化的研究进展及探讨[J]. 吉林畜牧兽医, 2015, 36(2):29-30, 32. DOI:10.3969/j.issn.1672-2078.2015.02.008.
- LIU M H, YUAN B, CHEN J, et al. Research progress and discussion on standardization of cat laboratory animals[J]. Jilin Animal Husb Vet Med, 2015, 36(2):29-30, 32. DOI:10.3969/j.issn.1672-2078.2015.02.008.
- [10] 滑志民, 张似青, 陈菊红, 等. 实验用猫的历史、发展现状及发展前景[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019(1):27-29. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2019.01.007.
- HUA Z M, ZHANG S Q, CHEN J H, et al. History, development status and development prospect of experimental cats[J]. Shanghai J Animal Husb Vet Med, 2019(1):27-29. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2019.01.007.
- [11] 何忠平, 王宜祥, 尤卫民, 等. 浙江省实验用猫弓形虫感染情况检测[J]. 浙江畜牧兽医, 2010, 35(3):36. DOI:10.3969/j.issn.1005-7307.2010.03.022.
- HE Z P, WANG Y X, YOU W M, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* infection in experimental cats in Zhejiang Province[J]. Zhejiang J Animal Sci Vet Med, 2010, 35(3):36. DOI:10.3969/j.issn.1005-7307.2010.03.022.
- [12] 邢涛, 周光胜, 张敏, 等. 上海闵行区犬猫胃肠道寄生虫虫卵检测情况[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(12):83-86.
- XING T, ZHOU G S, ZHANG M, et al. Detection of

- gastrointestinal parasite eggs in dogs and cats from Minhang District of Shanghai[J]. Chin J Vet Med, 2020, 56(12):83-86.
- [13] HAAKE C, COOK S, PUSTERLA N, et al. Coronavirus infections in companion animals: virology, epidemiology, clinical and pathologic features[J]. Viruses, 2020, 12(9):1023. DOI:10.3390/v12091023.
- [14] MURPHY W J. The feline genome[J]. Genome Dyn, 2006, 2:60-68. DOI:10.1159/000095093.
- [15] 秦川. 医学实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 113-117. QIN Chuan. Medical Laboratory Animal Science[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 113-117.
- [16] 胡樱, 杨斐, 陈鸿婷. 英国短毛实验猫部分血液生理生化特性分析[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(6):450-454. HU Y, YANG F, CHEN H T. Study on hematological and biochemical characteristics in laboratory British-shorthair cats[J]. Lab Animal Comp Med, 2018, 38(6):450-454.
- [17] 景园园, 张明亮, 师航, 等. 郑州市猫皮肤病流行病学调查报告[J]. 当代畜牧, 2019(8):39-41. JING Y Y, ZHANG M L, SHI H, et al. Epidemiological investigation report of cat dermatosis in Zhengzhou City[J]. Contemp Animal Husb, 2019(8):39-41.
- [18] 辛萍萍. 英国短毛猫的日常洗护[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(8):132-133, 152. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2019.08.0126. XIN P P. Daily care of British short-haired cats[J]. Heilongjiang Animal Sci Vet Med, 2020(8):132-133, 152. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2019.08.0126.
- [19] BOYD J S. 犬猫临床解剖彩色图谱[M]. 2版. 董军, 陈耀星, 译. 北京: 中国农业出版社, 2007: 11-13. BOYD J S. Color atlas of clinical anatomy of the dog & cat[M]. 2nd ed. Translated by DONG J, CHEN Y X. Beijing: China Agricultural University Press, 2007: 11-13.
- [20] 肖宁宁. 深圳部分地区猫脂肪肝的临床调查与分析[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2021: 14-18. XIAO N N. Clinical investigation and analysis of fatty liver in cats in some areas of Shenzhen [D]. Alar: Tarim University, 2021: 14-18.
- [21] 叶妍琳, 白正广, 张斌恺, 等. 犬、猫肥胖症病因分析及管理[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015(1):62-63. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2015.01.028. YE Y L, BAI Z G, ZHANG B K, et al. Etiological analysis and management of obesity in dogs and cats[J]. Shanghai J Animal Husb Vet Med, 2015(1):62-63. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2015.01.028.
- [22] HOENIG M. The cat as a model for human obesity and diabetes[J]. J Diabetes Sci Technol, 2012, 6(3):525-533. DOI:10.1177/193229681200600306.
- [23] 嵇扬, 张葵荣, 姜春来. 比格狗与猫对组胺降压作用敏感性的比较研究[J]. 中国药品标准, 2004, 5(2):38-39. DOI:10.19778/j.chp.2004.02.012. JI Y, ZHANG G R, JIANG C L. Study of comparison between beagles and cats on decrease blood pressure sensitivity to his tamine[J]. Drug Stanoaros China, 2004, 5(2):38-39. DOI:10.19778/j.chp.2004.02.012.
- [24] 黎家敏, 马佳丽, 杨春, 等. 实验兔和猫在降压物质检查中的比较研究[J]. 实验动物科学, 2020, 37(5):1-8. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2020.05.001. LI J M, MA J L, YANG C, et al. Comparative study on the laboratory rabbits and cats in the test for depressor substances[J]. Lab Animal Sci, 2020, 37(5):1-8. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2020.05.001.
- [25] LINTON M, NIMMO J S, NORRIS J M, et al. Feline gastrointestinal eosinophilic sclerosing fibroplasia: 13 cases and review of an emerging clinical entity[J]. J Feline Med Surg, 2015, 17(5):392-404. DOI:10.1177/1098612X14568170.
- [26] BOLON B. Book review: background lesions in laboratory animals: a color atlas[J]. Toxicol Pathol, 2012, 40(4):700. DOI:10.1177/0192623312438230.
- (收稿日期: 2021-09-14 修回日期: 2022-01-04)
(本文编辑: 富群华, 张俊彦, 姜怡欣)

《实验动物与比较医学》2022年起论文格式新要求

从2022年第3期起, 为实现中文期刊的国内外科技交流目标, 《实验动物与比较医学》对刊发论文的格式新增要求如下:

1. 通讯作者除邮箱外, 还需提供科研人员唯一学术标识, 即开放研究者与贡献者身份识别码 (Open Researcher and Contributor ID, ORCID)。
 2. 关键词尽量选用美国国立医学图书馆设立的医学主题词表 MeSH 中的主题词, 至少3个。其余可用自由词。
 3. 研究报告类型的论著文章中, 图表的标题和注解需中英文对照表达, 图表内容也用中英文对照或全英文呈现。
 4. 文末列出作者贡献、利益声明和医学伦理声明, 内容需中英文对照。
 5. 文后参考文献若来源于中文, 需同时提供其相应的英文, 均列在同一序号之下。
- 请所有在投稿作者积极配合完善以上内容。

《实验动物与比较医学》编辑部



冯 涛, 中国合格评定国家认可中心高级工程师。2002年起在实验室认可一线工作, 目前主要从事实验室生物安全、司法鉴定、实验动物等领域的管理和技术研究。主持、参与国家科技攻关项目、国家科技支撑计划、科技重大专项等各类研究课题6项, 公开发表论文10余篇。获得质检总局科技兴检进步三等奖1项, 中国检验学会科技一等奖1项、二等奖1项。同时是7项生物安全、司法鉴定相关标准的起草人, 长期参与实验室生物安全、司法鉴定、实验动物等相关的政策咨询、标准制订等工作。

吴孝槐, 博士, 高级工程师, 中国合格评定国家认可委员会实验动物和 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 实验动物机构认可与 AAALAC 认证的比较分析

吴孝槐¹, 肖巧喆², 庞万勇³, 白 玉⁴, 李 焱⁵, 卢选成⁶, 冯 涛¹

(1. 中国合格评定国家认可中心, 北京 10062; 2. 中国认证认可协会, 北京 100020; 3. 赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台, 北京 100022; 4. 北京诺和诺德医药科技有限公司, 北京 102206; 5. 上海交通大学医学院, 上海 200240; 6. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206)

【摘要】 中国合格评定国家认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 实验动物机构认可是我国实验动物管理的重要制度, 是致力于保障我国实验动物质量和福利的一项具有中国特色的第三方评价制度。美国实验动物饲养管理评估认证协会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC) 认证是为全球实验动物管理和使用机构提供动物福利和伦理认证服务的一种评价活动。本文从 CNAS 与 AAALAC 的性质、CNAS 认可和 AAALAC 认证本质、评价依据和文件、评审流程、评审人员管理、结果采信等方面进行了比较分析, 探讨两项实验动物机构评价制度的差异与特点。

【关键词】 实验动物机构; 认可; 认证; 动物福利

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-5817(2022)03-0237-07

A Comparative Analysis of CNAS Laboratory Animal Institutions Accreditation and AAALAC Certification

WU Xiaohuai¹, XIAO Qiaozhe², PANG Wanyong³, BAI Yu⁴, LI Yao⁵, LU Xuancheng⁶, FENG Tao¹

(1. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China; 2. China Certification and Accreditation Association, Beijing 100020, China; 3. Translational In Vivo Model Research Platform, Sanofi G&D, Beijing 100022, China; 4. Beijing Novo Nordisk Pharmaceutical Technology Co., LTD, Beijing 102206, China; 5. School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 6. Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Correspondence to: FENG Tao, E-mail: fengt@cnas.org.cn

【基金项目】 中国合格评定国家认可委员会科技项目 (2019 CNAS12)

【第一作者】 吴孝槐 (1973—), 男, 高级工程师, 研究方向: 认证认可、GLP、实验动物。E-mail: wuxh@cnas.org.cn

【通信作者】 冯 涛 (1965—), 男, 高级工程师, 研究方向: 认证认可。E-mail: fengt@cnas.org.cn

[ABSTRACT] China National Accreditation Service for Conformity Assessment (CNAS) laboratory animal institutions accreditation is an important system for the management of laboratory animals in China. It is a third-party evaluation on Chinese characteristics dedicated to ensuring the quality and welfare of laboratory animals in China. The American Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) certification provides global services about animal welfare evaluation and ethical certification, which are important for management and use of laboratory animals. This study compared and analyzed the nature of CNAS and AAALAC, the nature of CNAS accreditation and AAALAC certification, the evaluation principles, required documents, the evaluation process, the management of reviewers, and the acceptance of results, and discussed the differences and characteristics of the two evaluation systems for laboratory animal institutions.

[Key words] Laboratory animal institution; CNAS accreditation; AAALAC certification; Welfare of laboratory animals

当今世界,科学、人道地对待和使用实验动物已经成为共识。只有建立在完备的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得到世界范围内的广泛认可。西方一些发达国家和地区如英美等国已经在科研项目的立项、科研成果的评定甚至科研论文的发表方面都建立了实验动物福利和动物实验伦理审查制度。实验动物福利和动物实验伦理审查工作的质量已经成为影响上述各项工作开展的重要且首要因素。

目前世界各国对实验动物质量和福利所采取的管理模式,主要有两种。一种是采取实验动物许可证制度模式(如中国、英国),另一种是采取社会第三方认可制度模式。近年来,第三方认可制度的模式相对而言更公正,更受到实验动物业界人士的推崇。在国际上比较有影响力的第三方认可是由美国实验动物饲养管理评估认证协会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)实施的认证即AAALAC认证。在我国,对实验动物机构管理普遍实行的是许可证管理制度,其作为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)于2017年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。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管理规范和管理体系的完善,推动我国实验动物科学和生物医药行业的发展。

CNAS实验动物机构认可制度参考借鉴了国际先进国家实验动物管理的成熟经验与做法,同时结合了我

国多年的现行实验动物许可管理和实验室认可制度的经验,是一项不仅符合中国国情,而且与国际接轨的实验动物机构认可制度。

1 CNAS与AAALAC的性质

CNAS是根据《中华人民共和国认证认可条例》的规定,由国家认证认可监督管理委员会(Certification and Accreditation Administration of the People's Republic of China, CNCA)于2006年3月批准设立并授权的国家认可机构,统一负责对认证机构、实验室和检验机构等的认可工作。CNAS秘书处是CNAS的常设机构,负责CNAS认可工作的具体运作。中国合格评定国家认可中心是CNAS秘书处的法律实体机构,是国家市场监督管理总局直属事业单位,负责建立并运行合格评定机构国家认可体系,统一开展认证机构、实验室、检验机构、审定核查机构及相关机构的认可评价活动。目前,CNAS开展的主要认可业务包括3大认可门类(含认证机构认可、实验室认可和检验机构认可)、15项基本认可制度、38个专项认可制度和48个分项认可制度。CNAS实验动物机构认可制度是隶属于实验室认可门类下的一项基本认可制度。

AAALAC是一个非政府、非营利性组织,是全球第一个,也是目前唯一为科研、检测和教学所涉及的动物饲养管理和使用提供全球认证服务的组织。其前身是1965年成立的美国实验动物管理认可协会(The American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care),到1996年多数西方发达国家参加了认证活动,美国实验动物管理认可协会改为国际组织,并于2016年2月正式更名为国际AAALAC(AAALAC International,以下简称AAALAC)。

2 CNAS认可和AAALAC认证的本质

《合格评定 词汇和通用原则》(GB/T 27000/ISO/IEC 17000)对认可和认证,以及认可机构和认证机构进行了明确定义和区分。认可(accreditation)是正式表明合格评定机构具备实施特定合格评定工作能力的第三方证明;认证(certification)是与产品、过程、体系或人员有关的第三方证明。认可机构是实施认可的权威机构(认可机构的权力通常来自政府);认证机构是运作认证方案的第三方合格评定机构^[1]。AAALAC International在更名以前,实验动物界将其中文全名通常翻译为“实验动物管理评估与认证协会”,将AAALAC开展的活动称为“AAALAC认证”,视为一种认证活动,虽然在其英文名称中有accreditation,但与《合格评定 词汇和通用原则》(GB/T 27000/ISO/IEC 17000)中accreditation对应的中文专用名词“认可”并不一致。

认可作为市场经济运行的基础制度安排,既是国家技术基础的组成部分,又是符合世界贸易组织(World Trade Organization, WTO)规则的技术性贸易措施。CNAS依据国际标准《合格评定 认可机构通用要求》(GB/T 27011/ISO/IEC 17011)建立了国际化与中国化相结合的认可制度。CNAS开展的认可活动与AAALAC开展的认证活动有明显的区别。CNAS开展认可活动有来自CNCA的授权,具有政府授权的权威性,并且代表中国加入了国际实验室认可合作组织(International Laboratory Accreditation Cooperation, ILAC)和亚太认可合作组织(Asia Pacific Accreditation Cooperation, APAC)等国际组织,签署了国际互认协议。AAALAC开展的认证活动是一种非政府市场行为,没有加入ILAC等国际互认组织。CNAS依据《实验动物机构质量和能力的通用要求》(GB/T 27416—2014)国家标准开展认可活动。CNAS实验动物机构认可体现了认可制度的特点,以管理体系为核心,关注实验动物机构保障动物福利和质量的能力。AAALAC认证类似于一种管理体系认证,认证以动物管理和使用计划(animal care and use program)(简称计划)为核心,该计划包含一个机构内进行的所有对动物健康福利有直接影响的活动,包括动物和兽医保健、政策和操作程序、个人和项目的管理和监督、职业卫生与安全、动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)

功能以及动物设施的设计和管理^[2]。二者的权威性和核心关注点存在较大差异。

3 评价依据及文件

3.1 CNAS实验动物机构认可文件

CNAS开展实验动物机构认可的主要依据为《实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则》(CNAS-CL06),该准则主要技术内容与国家标准《实验动物机构质量和能力的通用要求》(GB/T 27416—2014)基本相同,是CNAS对实验动物机构认可的基本要求和主要认可依据。CNAS-CL06共包括六大部分550余项条款,包括管理体系、动物设施、动物饲养、动物医护、职业健康与安全、IACUC的职责与管理要求等方面内容。此外,CNAS-CL06规定了实验动物机构的设施、管理和运行在质量、安全、动物福利和职业健康等方面应达到的基本要求^[3]。

为确保认可活动的规范性,CNAS还制定了《实验动物饲养和使用机构认可规则》(CNAS-RL08)。CNAS-RL08主要规定CNAS实验动物机构认可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、CNAS和获认可的实验动物机构的权利和义务^[4]。

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。

3.2 AAALAC认证文件

AAALAC认证的主要依据是以下3个文件,即《实验动物管理和使用指南》(简称《指南》,NRC 2011);《农业动物在研究和教学中的管理和使用指南》(简称《农业指南》,FASS 2020)和《欧洲委员会保护用于实验和其他科学目的的脊椎动物公约》(ETS 123)。此外,还有其他被业界广泛接受的指导方针。

为了获得AAALAC认证,机构必须满足其所在地所有适用的国家和地方性法规,以及《指南》或《农业指南》和/或ETS 123的标准,这些标准均超过相关法律所要求的最低标准。以《实验动物管理和使用指南》为例,其主要内容包括关键概念、动物管理和使用计划、动物的环境、饲养和管理、动物设施总体规划等。

4 评审流程

4.1 CNAS实验动物机构评审流程

CNAS实验动物机构认可评审周期为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^[5]。从CNAS受理申请到发证,可分为评审策划、现场评审、评定、发证与公布这四个阶段。

4.1.1 评审策划

CNAS正式受理申请后会组建评审组并指定评审组长。评审组长按《实验动物机构认可资料审查通知单》的要求进行文件评审,并和项目主管协商后出具《认可资料审查通知单》,通知被评审方进一步说明问题、补充相关资料或进行修改,申请机构于10 d内回复。评审组长须对实验动物机构补充提交的资料和(或)修改材料进行审查,审查合格后,方可建议实施现场评审。项目主管收到评审组长的认可资料审查通知单后,根据组长建议和机构情况组建评审组。评审组长负责拟定《现场评审日程表》(CNAS-PD14-09),并于现场评审前3个工作日发给待认可机构及各位评审员,评审组成员就自己负责的评审范围进行详细的评审策划。在开始现场评审前,评审组长召集评审组成员召开评审预备会,沟通准备情况、明确评审任务,签署《现场评审人员公正性、保密及廉洁自律声明》(CNAS-PD14-10)。

4.1.2 现场评审

CNAS现场评审通常持续2~3 d,根据机构规模和类型,评审专家组一般由3~5名评审专家组成。现场评审包括首次会议、现场巡查、文件审核、专家组会议和末次会议等流程。在首次会议上,机构负责人介绍机构基本情况和内审情况;评审组长介绍评审流程、人员分工和注意事项等;首次会议结束后会进入现场巡查,进入饲养和实验区设施,评审员根据各自分工安排,对照《实验动物机构认可评审核查表》的要求进行核查;现场巡查结束后,评审专家会结合现场巡查的情况进行文件审核,审核内容包括机构的管理体系文件、内审报告、管理评审报告、IACUC审核报告、各种记录和文档,内容涵盖CNAS-CL06认可准则的全部条款。在评审期间,评审组通常在每天下午现场评审结束后召开评审组内部沟通会,对现场评审发现和需要解决的问题进行沟通和讨论。在评审最后一天,评审组将和机构的管理层和关键人员举行一次沟通会,

通报评审基本情况和评审发现的主要问题,并听取机构的反馈。和管理层沟通后,召开有机构全体成员参加的末次会议,通报并确认评审过程中发现的不符合项和观察项,并宣布CNAS的评审结论和建议。

现场评审结束后进入机构整改阶段,被评审方在明确整改要求后需制定纠正措施计划,并在3个月内完成。评审组长负责对纠正措施的有效性进行验证,验证后连同现场评审资料一同报CNAS秘书处。

4.1.3 评定

CNAS秘书处负责将评审报告及其推荐意见提交给评定委员会,评定委员会对申请人与认可要求的符合性进行评价并作出评定结论。评定结论分为4种,分别是予以认可、部分认可、不予认可和补充证据或信息后再行评定。

4.1.4 发证与公布

CNAS秘书处向获准认可的实验动物机构颁发认可证书及认可决定书,认可证书有效期为5年。

4.2 AAALAC认证流程

AAALAC认证评审周期为3年。与CNAS实验动物机构认可的流程基本类似,AAALAC认证基本流程包括认证前准备、现场认证、机构整改和认证决定。

4.2.1 认证前准备

AAALAC办公室确认受理申请后,通常会指定一位认证委员会委员来组队进行认证。该委员将与被认证单位联系安排现场认证日程。委员通常会邀请一名或以上AAALAC兼职专家组成现场认证小组。

4.2.2 现场认证

现场认证从“简要介绍”(brief introduction)开始,即机构的主要成员与现场认证小组会面,讨论认证流程。在简要介绍之后,现场认证小组将与所在机构的代表们讨论“项目描述”(program description, PD),即认证申请书。认证人员可对特定问题进行询问或查阅文件。之后,认证小组巡查观察机构的动物设施。在动物设施巡查结束后进行文件核查,其间认证小组可能会就巡查发现的问题,进一步询问机构有关实验动物具体项目或程序的信息。在以上流程结束后,现场认证小组将单独举行“闭门会议”(closed session)。在这个过程中,认证小组会讨论关键的观察结果和希望与被认证机构分享的信息。认证最后阶段,召开机构所有成员参加的认证简报会。在简报会上,现场认证小组会分享他们的主要评估认证结果,以及认证小组打算向AAALAC认证委员会提出的认证建议。

4.2.3 机构整改

现场认证结束后, 认证小组将正式地通过邮件给机构发送“简报会议纪要”, 即评估发现的问题和建议。机构需要在2个星期内以书面形式回复简报纪要中所提出的问题, 发送给AAALAC办公室并抄送现场认证小组。

现场认证小组将向AAALAC的内网主页上传认证报告, 包括现场评估小组所提出的重大问题和建议项, 并简述机构所做的努力和整改措施, 以及评价整改是否解决了问题。完成认证报告后, 另外两位委员和所在分委员会的组长和副组长会对认证报告进行同行评议。带队认证的委员可根据评议结果进行认证报告修改, 或提出不同的看法。

4.2.4 认证决定

有关认证的所有最终决定均由AAALAC认证委员会作出。委员会及理事会每年召开三次会议(分别于1月、5月和9月), 因此机构的评估报告将在现场评估后的最早一次理事会会议上审议。带队认证的委员进行陈述, 分委员会进行讨论(委员会主席、副主席以及AAALAC办公室代表将列席并参与讨论), 带队委员提出认证结果建议, 由分委员会全体委员(回避的委员除外)投票决定结果。最后, 汇总该结果并报理事会投票通过。

AAALAC的初次认证结果分为4种, 即完全认证(Full Accreditation)、有条件的认证(Accreditation with Condition)、临时认证(Provision Status)和不予认证(Withhold Accreditation)。前两种情况授予“认证牌”。如果机构取得有条件的认证, 要在本年度报告或委员会指定的时间对AAALAC要求进行的整改措施进行说明, 由认证委员会裁决, 以确定被认证机构能否取得完全认证。复审的可能结果则有5种, 即持续完全认证、有条件的认证、延迟认证、考察和取缔认证, 其中前4种情况保留“认证牌”。当取缔认证时, AAALAC将会提供上诉的机会。

5 评审人员管理

5.1 CNAS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, 也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秘书处根据需要定期举办评审员培训班, 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以及认可品牌的高端、权威和公信力, 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“中国合格评定国家认可委员会实验室专门委员会实验动物专业委员会”。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, 以及其他实验动物管理部门、高校、生物医药企业等机构, 都是我国实验动物领域的权威专家和知名学者。

CNAS评审人员为聘用考核制, 由评审员管理部统一管理。对认可评审员, 评审员管理部每3年会安排一次见证。CNAS项目负责人或CNAS主任评审员作为见证人, 对评审组长、实习组长(非独立评审组长)进行见证, 填写《实验室/检验机构评审组长现场见证报告》(CNAS-PD10-07), 交评审员管理部。同时, 评审组长在每次评审结束后对评审组成员进行评价, 并验证其专业判断能力水平, 填写《实验室/检验机构评审人员评价表》(CNAS-PD10-06), 交评审员管理部。

5.2 AAALAC委员和专家

AAALAC拥有约400多名临时顾问或专家(统称为兼职专家), 协助认证委员会委员评估动物饲养管理和使用计划。要成为顾问/专家, 必须提交申请, 以供认证委员会遴选。AAALAC成立有专家遴选委员会(Specialist Selection Committee)对申请人进行审核, 再通过该委员会投票以决定最终人选。专家任期为3年, 可无限连任。设有委员提名委员会(Council Member Nominating Committee), 接受委员会现任委员的推荐, 亦接受自荐。委员候选人的要求是至少担任专家2年, 与至少2位委员进行过至少6次现场评审且表现良好。有效委员候选人经各分委员会投票决定, 至少获50%票数。投票产生的人选经委员会联系, 如有意愿即可获任。委员每届3年, 一般最多可任4届。在每次现场评估结束后, 带队的委员对参与的顾问专家进行打分和评价, 具体形式以在线填写表格为主, 主要内容包括: 个人基本情况、所擅长的领域及专业知识, 在现场访问过程中的行为举止表现、对问题的发现, 以及在认证报告审阅和文件审阅过程中所起到的作用, 与申请机构的交流情况, 现场认证后在报告形成过程中所发挥的作用和表现, 整体表现及评价, 以及是否有意愿成为委员会委员或是否推荐其他委员参加现场访问。

为确保认证质量和认证结果的一致性,在每年三次的会议上,全体委员会集中学习一些新的法律法规和文献,以求与时俱进。同时,委员将对出现“不一致”(Non-consistency)意见的问题进行学习(有专门的委员小组对“不一致”问题进行研讨),以确保认证在全球的一致性。

6 结果采信

6.1 CNAS实验动物机构认可效力及影响力

CNAS是中国大陆地区唯一的认可机构。国际互认是认可工作的一个重要特征,认可结果的采信和国际互认既是认可工作的核心目标,也是经济全球化背景下国际贸易的需求。CNAS作为国际上多个互认协议的签署方,其认可结果在国际上得到了广泛承认。CNAS与国际认可论坛(International Accreditation Forum, IAF)和ILAC等国际组织签署了多项多边互认协议,获CNAS认可的实验室和机构可以使用IAF、ILAC的国际互认标志,其出具的合格评定结果在多边互认协议签约认可机构所在国家或经济体具有相互承认的效力。目前实验动物机构认可还未纳入ILAC的多边互认协议体系,但CNAS已开始探索与其他开展实验动物机构认可的国家和地区开展双边互认的可能性。

CNAS实验动物机构认可可是CNAS实验室认可门类下的一项自愿性认可制度。不同于我国实验动物许可证制度的强制性要求,在《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,因此CNAS实验动物机构认可的采信缺乏有力的法律法规支撑。我国实验动物界的专家和学者已经关注到这一问题,开始着手在实验动物相关法律法规的修订过程中建议将实验动物机构认可作为鼓励性条款纳入。随着CNAS实验动物机构认可体系的逐步完善,国内越来越多有影响力的实验动物机构开始申请认可^[5],实验动物机构认可的采信和影响力在实验动物行业和生命科学领域日益增强。

6.2 AAALAC认证效力及影响力

AAALAC的认证没有法定效力,属于自愿性第三方评价,但其认证活动得到了来自世界各地的专业协会的支持。具体来说,由69个科学组织、兽医组织和其他团体组成的AAALAC理事成员单位,为AAALAC的愿景和发展方向提供建议,旨在为研究、检测和教学等领域促进动物福利。为保证实验动物福利和动物实验质量,欧美生物医药巨头通常倾向于把其医药产

品的非临床评价研究外包给有AAALAC认证的单位完成。另外,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认证的结果^[6]。

7 结论

通过对CNAS实验动物机构认可和AAALAC认证从制度的本质、认可和认证依据、评审流程和结果采信等方面进行比较分析,可以得出以下基本结论:

(1) CNAS认可制度是受国家认证认可监督管理委员会授权建立,CNAS实验动物机构认可具有政府授权的权威性。AAALAC认证是由国外非政府组织开展的一种社会第三方评价活动。

(2) CNAS实验动物机构认可的主要依据为《实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则》(CNAS-CL06)。AAALAC认证的主要依据为3个行业指南性文件和公约。二者在关注机构的动物设施、动物福利、动物饲养和医护以及职业健康安全方面具有共同点;但CNAS实验动物机构认可以管理体系为核心(体现了认可制度的特点),而AAALAC认证以动物使用和管理计划为核心,二者的着力点有所不同。

(3) CNAS依据国际标准ISO/IEC 17011的要求建立了各项认可制度,CNAS实验动物机构认可制度的公正性、评审流程管理、认可管理体系(包括文件、记录、内审和管理评审)和评审资源管理等方面完全按照ISO/IEC 17011的要求进行管理和运作。CNAS实验动物机构认可制度的规范运行受到国家市场监督管理总局和国家认证认可监督管理委员会的监督管理。AAALAC认证对其公正性、认证流程、认证人员等方面也有明确的规定,但AAALAC认证的规范性更多依靠同行评议以及认证机构的内部核查或自律性。

(4) CNAS制定了一套完整的认可流程文件和现场评审作业指导文件,从申请受理、评审组组建、评审策划、现场评审安排、机构整改、评定和证后监管都有明确详细的规定,同时建立了一套高效的信息化认可业务系统,所有认可业务都可在该业务系统内完成。AAALAC认证也有一套成熟的认证管理程序和现场认证的作业文件,这些文件在AAALAC的网站上可以公开查阅。在现场评审时,CNAS评审专家需按照分工对照认可准则的550余个条款逐条核查,确认机构是否满足每个条款的要求,弹性空间较小。AAALAC认证时评审专家按照认证指南和公约的要求进行核查,在

很多情况下需要凭借专家经验,因此专家的能力、经验和视角对认证质量和认证结果有较大影响。同时AAALAC有一套机制来尽可能地保证其在世界不同地区的认证结果具有一致性,譬如每次认证讨论时均有整个认证委员会的主席、副主席参加,另外还设有一致性小组,而且认证委员会成员在每年3次的全会(plenary session)上进行集中学习。

(5) AAALAC 认证经过 50 余年的发展,在国内外生命科学界和医药研究领域有广泛的影响力和认知度,全球已有千余家制药生物技术公司、大学、医院和其他研究机构获得了 AAALAC 认证。2017 年开始的 CNAS 实验动物机构认可制度作为一项新生的实验动物管理制度,到目前为止,只有 12 家机构获得认证证书,在国内外的影响力还非常有限,在机构数量、认可采信和知名度上与 AAALAC 相比有很大的差距。CNAS 需要进一步加强与国内外实验动物管理部门、学会、相关认可和认证机构的交流与合作,从而推广壮大 CNAS 实验动物机构认可。

[作者贡献 Author Contribution]

吴孝槐主笔撰写,并组织讨论和修改;肖巧喆、庞万勇、白玉、李焱、卢选成和冯涛均参与讨论修改及论文定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 中国国家标准化管理委员会. 合格评定词汇和通用原则: GB/T 27000—2006/ISO/IEC 17000:2004[S].
China National Standardization Administration. Conformity assessment—Vocabulary and general principles: GB/T 27000—2006/ISO/IEC 17000:2004[S].
- [2] 美国实验动物资源研究所, 美国生命科学委员会, 美国国家学术研究委员会. 实验动物饲养管理和使用指南[M]. 8 版. 王建飞, 周艳, 刘吉宏, 等译. 上海: 上海科学技术出版社, 2012.
Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals[M]. 8th ed. Translated by WANG J F, ZHOU Y, LIU J H, et al. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2012.
- [3] 中国合格评定国家认可委员. 实验动物饲养和使用机构能力认可准则: CNAS-CL06[A]. 2018.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Accreditation criteria for the quality and competence of laboratory animal institutions for care and using: CNAS-CL06[A]. 2018.
- [4] 中国合格评定国家认可委员. 实验动物饲养和使用机构能力认可规则: CNAS-RL08[A]. 2017.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Rules for the accreditation of laboratory animal institutions for care and using: CNAS-CL08[A]. 2017.
- [5] 吴孝槐. CNAS 实验动物机构认可进展[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5):384-391. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.141.
WU X H. Progress on the accreditation for laboratory animal institutions of CNAS[J]. Lab Animal Comp Med, 2021, 41(5): 384-391. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.141.
- [6] 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.
National Technical Committee on Certification and Accreditation of Standardization Administration. Understanding and Implementation of the national standard: Laboratory animal institutions-General requirements for quality and competence: GB/T 27416-2014[M]. Beijing: China Standards Press, 2015.

(收稿日期:2022-03-23 修回日期:2022-05-12)

(本文编辑:张俊彦,洪怡)

从评审角度讨论动物实验室文件管理中常见问题与解决办法

李海玉, 许虎峰

(首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050)

[摘要] 医院建立一个良好的动物实验平台, 需配套建立一套完善的动物实验管理体系。其中, 文件管理是一个关键环节。笔者从中国合格评定国家认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 实验室认可与检测机构认可评审员的角度出发, 讨论动物实验室文件管理中常见问题, 并探讨完善策略, 为相关从业人员的管理水平提升提供参考。

[关键词] 文件管理; 动物实验室; 评审; CNAS 认可

[中图分类号] Q95-33; R-332; C931.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0244-04

Discussion on the Problems and Methods of Animal Laboratory Documents Management from the Perspective of Audit

LI Haiyu, XU Hufeng

(Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Correspondence to: XU Hufeng, E-mail: xu_hufeng@163.com

[ABSTRACT] Hospital established a good animal experiment platform and a complete set of animal experiment management systems. In good operation, document management is a key element. This paper aimed to improve the management of animal laboratory documents from the perspective of the laboratory accreditation and testing institution accreditation auditor of the China National Accreditation Service for Conformity Assessment (CNAS), and provides a reference for the improvement of the management level of relevant practitioners.

[Key words] File management; Animal laboratory; Review; CNAS accreditation

良好运行的动物实验平台对于研究型医院的发展极为重要, 不仅需要建立整套完善的管理体系, 而且要确保体系有效持续运行。文件管理作为体系有效运行的证实性材料有着重要的意义, 也是实验室从事检测活动、质量管理的根据^[1]。如何保存并使用好相关文件, 把文件用活, 使之成为体系管理的源泉, 这就是文件管理的意义。笔者作为中国合格评定国家认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 检测机构实验室认可评审员, 自2012年至今, 参与了广东省医学实验动物中心比较医学实验室 (监督+扩项评审)、苏州西山生物技术有限公司 (复评+扩项目评审)、北京维通利华实

验动物技术有限公司 (复评+扩项+变更评审)、广州市药品检验所 (实验室认可专项监督评审) 等多项评审工作, 积累了一定的评审经验。本文从评审角度对文件的编撰、识别、编目、分发、保存、使用等有效管理方面进行论述, 以期对同行有所启迪。

1 实验室评审中发现文件管理的一些问题

1.1 文件起草问题

很多实验室管理体系文件的起草大多有生搬硬套的痕迹, 这在新申请的实验室中表现得非常明显。管理体系文件应该随着管理体系的运行、持续改进及其环境的变化而调整^[2]。有的实验室照搬认可文件的条

[第一作者] 李海玉 (1990—), 男, 本科, 技术员, 研究方向: 动物实验室设施设备管理。E-mail: haiyu0430@126.com

[通信作者] 许虎峰 (1974—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物管理, 实验室管理。E-mail: xu_hufeng@163.com。

文,未作解读,甚至连句式都不曾改动。也有的是借鉴同类型实验室的文件,但明显的问题是,两个实验室连硬件条件都不尽相同,很多在指导下一层级的文件上是应该有区别的,照抄过来的文件在实际操作中很难适用。

1.2 文件授权问题

有的实验室建立了授权的列表,有的是在每一个扉页上有授权识别。其实,文件的授权并不在于形式,而在于要每个实验室的工作人员都应该知道实验室的相关文件不是拿来就用的,而是要经过一定的程序被授权,且在一定范围内使用^[3]。有的实验室文件有很大的随意性,今天生成一个表格拿来就用,明天觉得不适用,随手就改了,再觉得不好,可能又改了。改来改去,无法形成最终确定的有效版本。

1.3 文件兼容性问题

很多实验室处于发展阶段,业务范围不断拓展,为了增加更多的业务量和实验室的影响力,实验室决策者要求实验室在管理方面通过并获得相应资质,如生物安全实验室认可、实验动物检测机构认可、实验动物设施认可等。2018年开始的CNAS实验动物机构认可,在众多的认证/认可条款中,体系文件的侧重点不尽相同,但务必求同存异。编撰者要深刻领会不同体系文件的要素和精神,用以指导自己实验室的体系文件编撰工作。为了应对评审而准备的体系文件和相关配套表格,其实施的效果是事倍功半的,具体的实验人员会被淹没在无数的表格中,其错误率随之增高。

1.4 形成性文件的收集问题

实验室文件应该是活的文件,这体现在日常工作中有各种各样的形成性文件,譬如人员进出记录、温湿度和压力梯度记录、实验动物验收记录、日常工作卫生记录、动物饲喂和清洁记录、高压灭菌记录、卫生消毒记录、动物护理记录等。这些文件都应该在一定时间内由专人收集并归档,作为实验室运行的证据,一旦发生质量问题可以追溯原因和波及范围。

1.5 文件载体的形式问题

记录可储存于任何适当的媒介,包括形成电子文件^[4]。随着办公自动化水平的日益提高,纸版不再是唯一的文件载体,电子化的形式越来越普遍,硬盘、光盘、云端,都是不错的选择^[5-6]。在动物实验室中大部分文件均为即时填写类文件,如实验室内即时的温湿度和压差、测量的实验动物体质量指标或观测的动物行为评分指标等。纸质文件相较于电子文件有着

实验数据不易篡改性,说明纸版文件在动物实验室仍有其不可替代的优势。将有不篡改优势的纸质文件和易于调阅优势的电子文件相结合使用,是目前文件管理中最常用的方法。而在纸版文件保存方面,活页装帧是不错的选择,因为文件有一定的查阅、追溯和修改变更频率。活页便于及时存取、更新,减少重复打印等工作量,同时也更加低碳环保。当然胶粘装帧也是可以采用的,一般用于永久保存不做修改的文件。电子版文件则需要建立和保持数据完整性、正确性和保密性的保护程序,且需要定期维护计算机,保持其功能正常^[7]。

2 杜绝问题的一些办法

2.1 选择合适的起草人,适时升级管理文件,并用活体系文件

文件的起草应该是管理层,而且是精通业务的人员为宜。文件起草者的专业程度及水平将直接影响文件对工作的针对性和可实施性。熟悉质量体系运行的人员应该起草体系文件,熟悉实验室技术的人员应该起草实验室的相关标准操作程序(standard operating procedure, SOP),熟悉设备运行维护的人员应该起草设备运行维护的相关SOP,熟悉动物饲养和疫病诊治的兽医应该起草相关饲养和管理制度。没有人是全才,各司其职又互有合作,这样的文件起草团队出台的文件才是能够有效实施的适用的管理文件。

以本院(首都医科大学附属北京友谊医院)实验动物中心为例,在实验动物管理手册(第一版)发布实施6年后,随着实验动物中心不断发展,人员和设备增加,办公、实验条件不断改善,以及各种制度不断变化,原版的实验动物管理手册已经不能完全适用于现时实验动物中心的运行模式,于是对管理手册进行了必要的修改和升级。这一次体系文件的升级用时13 d,共有7人参与修改管理手册的相关工作,对原版管理手册提出了70条修改意见,经商讨采纳,其中58条作为正式修改项,并新增了11条管理项目及记录表格。修改后的管理手册弥补了原版手册中与现行实验动物中心管理、工作、运行中的不足,大大提高了管理的有效性,对现行实验动物中心的工作提供了更加细化、量化和优化的管理方案,提升了工作效率和质量。

2.2 明确管理体系和组织架构才可以明确授权

动物实验室文件按照来源区分,可分为内部文件与外部文件两部分。如实验室内部编纂、发布的文件,

包括质量手册、操作规程、工作表格等,可以归类于内部文件;而类似于购入实验动物的实验动物质量合格证、动物实验项目伦理审查证明等可以对外提供给课题组的文件,可归类于外部文件。应当明确文件的标识、批准、发布、变更和废止,防止使用无效、作废的文件^[7]。通常内部文件仅可作为实验室工作人员内部使用,不对外发放。外部文件的发放、查阅、使用、复制等权利,一定要明确实验室究竟要什么样的管理体系,确定好组织架构,安排好各自的责、权、利,这样文件的授权就自然而然明晰了。本院实验动物中心在文件起草、修改与使用中就根据责、权、利明确了审核人及批准人,做到了授权明确。

2.3 文件的发放、查阅、使用及复制需明确规定

不仅是文件的起草和授权,文件在发放、查阅、使用、复制及销毁中的细节都必须有明确的规定^[8]。责任落实到人,这样文件才不会误用,不会引起实验室的质量事故。具体工作包括文件发放应建立发放记录,并注明受控状态,且所有管理体系的文件应在发布前经过授权人员的审核与批准^[4]。如实验室SOP文件,发放至实验室员工手中,需领用人按照SOP文件编号签字领取。打印、复制使用已经批准发放的文件,需将清单上报实验动物中心主任,相关文件加盖受控章,禁止未经授权私自翻印使用文件。以本院实验动物中心为例,如遇到课题组发表文章或申请课题经费,需领取实验动物使用伦理批件或开具动物伦理审查证明时,均需通过实验室负责人签字授权后复印发放给课题组。作废文件由实验动物中心文件管理员负责收回,销毁前必须有醒目标记以防止误用,销毁时需填写销毁记录。

2.4 对形成性文件进行分类和识别并及时归档

实验室一旦运转,会随着工作的不断深入产生大量的形成性文件。这便需要实验室建立对记录进行识别、收集、索引、访问、存放、维护及安全处置的程序^[4]。本院实验动物中心以文件编号作为文件的唯一性标识,避免了文件存档时出现错误的可能。这样的文件必须有专人负责收集与识别,及时整理归档,把实验室点点滴滴的工作分门别类收集整理,动态维持文件清单控制记录,并可以识别现行有效的文件版本及发放情况^[4]。

文件归档则需要根据实验室形成文件频率和文件类别规定归档时间。例如实验室人员进出记录、实验室温湿度和压差记录等文件,由于每日均需填写且需

随时观察记录变化,因此可以每月月底对此类文件进行归档;员工体检记录、人员业绩档案等文件,则可以每年年底进行归档;实验室会议纪要、检查记录等临时形成的文件,则需文件形成后即时存档。

这些实验室最原始的数据随着实验室成长不断积累,最终将成为实验室最宝贵的财富。

3 小结

实验室有良好的文件管理,不仅能够证实实验室在有效运行,而且对实验室工作改进而言是最基础的数据支持,能够为实验室管理者进行决策提供最可靠的依据。因为实验室的业绩、运行情况及工作量均可以由实验室文件形成的数据表现出来。例如,实验人员进出记录、实验动物验收记录、实验项目评审数量等均能体现出实验动物中心的工作量;各类设施设备维护记录、实验室各功能间的温湿度、压差记录等则可以体现出实验室运行情况。因此,无论实验室是否参与评审工作,良好的文件管理都是实验室管理能力提升的必由之路。

[作者贡献 Author Contribution]

李海玉负责文章的文献查阅、文章撰写与修改;许虎峰提出方案,负责文章思路、架构撰写及对全文内容进行修改指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 刁奇志,左永艳,曾强,等.医学实验室ISO15189质量管理体系文件的建立及文档的规范管理[J].中国医药导报,2016,13(32):174-176,180.
DIAO Q Z, ZUO Y Y, ZENG Q, et al. Establishing document on ISO15189 quality management system of medical laboratory and standard document management[J]. China Med Her, 2016, 13(32):174-176, 180.
- [2] 肖镜,王青,陈旻,等.药品检验机构实验室文件控制的研究[J].中国卫生质量管理,2016,23(2):76-79. DOI:10.13912/j.cnki.chqm.2016.23.2.25.
XIAO J, WANG Q, CHEN M, et al. Laboratory document control in pharmaceutical inspection institutions[J]. Chin Health Qual Manag, 2016, 23(2):76-79. DOI:10.13912/j.cnki.chqm.2016.23.2.25.
- [3] 李婷婷,齐红.文件管理风险评估[J].中国食品药品监管,2006,145(2):66-69.
LI T T, QI H. Risk assessment of document management[J]. China Food Drug Administration, 2006, 145(2):66-69.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会.实验动物饲养和使用机构质量和能力认可准则:CNAS-CL06[S].2018-03-01.

- China National Accreditation Committee for Qualification Assessment. Accreditation criteria for the quality and competence of laboratory animal institutions for care and using: CNAS-CL06[S]. 2018-03-01.
- [5] 欧阳熊妍, 黎美君, 骆展鹏, 等. 质量体系文件管理信息系统的应用体会[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(15): 2285-2285, 2289. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.076.
- OUYANG X Y, LI M J, LUO Z P, et al. Application experience of quality system document management information system [J]. Int J Lab Med, 2015, 36(15): 2285-2285, 2289. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.076.
- [6] 欧阳能良, 黄福达, 兰海丽, 等. ISO15189 质量管理体系电子化文件管理模块的建立与应用[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(3): 219-221. DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2016.03.17.
- OUYANG N L, HUANG F D, LAN H L, et al. Construction and application of management module for electronic documents based on ISO15189 quality management system[J]. Chin J Clin Lab Sci, 2016, 34(3): 219-221. DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2016.03.17.
- [7] 中国国家认证认可监督管理委员会. 检验检测机构资质认定能力评价检验检测机构通用要求: RB/T 214—2017[S]. 2017-10-16. Certification and Accreditation Administration of the P. R. C. Competence assessment for inspection body and laboratory mandatory approval-General requirements for inspection body and laboratory: RB/T 214—2017[S]. 2017-10-16.
- [8] 余海燕. 2010 版 GMP 中企业文件管理的研究与分析[J]. 健康大视野, 2018(1): 95, 94. DOI:10.3969/j.issn.1005-0019.2018.01.062.
- YU H Y. Research and analysis of enterprise document management in 2010 GMP[J]. Health Perspective, 2018(1): 95, 94. DOI:10.3969/j.issn.1005-0019.2018.01.062.
- (收稿日期: 2021-06-30 修回日期: 2021-11-30)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 崔占鼎)

《实验动物与比较医学》“前沿文献述评” ——青年编委专栏邀请函

2022年1月,《实验动物与比较医学》在第七届编委会改选之际新成立了青年编委会。本刊青年编委会由46位年龄在45周岁以下、职称在副高以上(或博士学位以上)的青年专家组成,任期2年。为鼓励青年编委在自身能力提升的基础上,增强参与国内外学术交流及期刊建设的积极性和使命感,本刊特开辟针对实验动物与比较医学研究前沿的文献述评专栏。

本专栏来稿的第一作者一般是本刊青年编委。文章要求针对某一重点、热点或新兴研究领域的突破性进展,以国内外最新(3个月内)发表的1~3篇优秀文献为基础,进行方法学介绍、结果点评或类比研究展望。文章内容必须是作者感兴趣的或与所在团队的研究相关,鼓励作者结合本团队的相关研究提出自己的观点和思考,鼓励采用方法学流程图或简略醒目的图片展示结果及作者观点,以便读者学习,字数一般控制在5000字以内。

本专栏的宗旨是普及与提高,并助力青年科研团队建设。因此,也欢迎本刊资深编委专家或国内外高水平研究学者(具有高级职称)积极参与本专栏的撰写工作,也可提供热点资讯或推荐优质青年作者,为我国实验动物与比较医学的科技发展、人才培养及学术交流平台建设做出积极贡献。

本专栏来稿一律走绿色通道,快审、快编校、快数字出版。发表周期一般控制在2个月。

投稿要求同常规论文,咨询电话:021-50793657。

联系邮箱:bjb50793657@163.com。

投稿地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

2022年5月
《实验动物与比较医学》编辑部



师长宏, 教授, 医学博士, 博士生导师, 空军军医大学(原第四军医大学)实验动物中心主任, 陕西省实验动物质量监督检测中心主任。获全国优秀科技工作者、军队育才银奖和中国实验动物学会青年人才奖。兼任中国实验动物学会常务理事、全军实验动物专业委员会副主任委员、陕西省实验动物学会副理事长。主要从事人源化动物模型研究, 重点围绕肿瘤模型的制备、影像学评估和应用等方向开展研究工作。近5年, 以第一作者或通信作者发表SCI论文10余篇, 刊于 *Cancer Cell*、*Biomaterials* 和 *Nano Research* 等期刊。先后承担国家“863”专项、军队和省重大科技项目10余项。获省科技进步二等奖和省教学成果一等奖各1项。

胃癌类器官在精准医学研究中的应用

巩淼淼^{1,2}, 周丽桂³, 赵菊梅¹, 师长宏²

(1. 延安大学医学院, 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 广州中医药大学实验动物中心, 广州 510405)

[摘要] 类器官是利用干细胞或来源于患者组织建立起来的一种体外三维培养系统。运用该培养技术, 正常胃类器官和胃癌类器官均可建立起来。类器官具有高保真性, 尤其是可保留其来源组织中的分子结构、功能特征和遗传信息等, 可用于治疗靶点筛选和药物反应预测及验证, 为胃癌精准医学研究及实验动物替代研究提供了新的思路。本文综述了目前胃癌类器官模型的建立情况, 以及类器官与精准医学的发展前景等, 为胃癌类器官应用于精准医学研究提供理想的体外模型参考。

[关键词] 胃癌; 类器官; 精准医学; 药物筛选; 个性化治疗; 替代

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0248-07

Application of Gastric Cancer Organoids in Precision Medicine Research

GONG Miaomiao^{1,2}, ZHOU Ligui³, ZHAO Jumei¹, SHI Changhong²

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China; 2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Laboratory Animal Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Correspondence to: SHI Changhong (ORCID: 0000-0001-7490-3593), E-mail: changhong@fmmu.edu.cn;

ZHAO Jumei (ORCID: 0000-0002-7813-8224), E-mail: jzm2003.stu@163.com

[ABSTRACT] Organoid is an *in vitro* three-dimensional culture system of stem cells or tissues derived from patients. Both normal gastric organoids and gastric cancer organoids can be established through this culture technique. Organoid possesses high fidelity, it grows with the similar molecular structures, functional characteristics, and genetic information as its tissue-of-origin. According to above, organoid can perform therapeutic targets screen, facilitate drug responses prediction and verification. Meanwhile, it also provides a new idea for precision medicine research of gastric cancer and replacement research of laboratory animals. This paper reviewed the establishment of organoid model of gastric cancer and the development of application of organoid in precision medicine, to provide ideal *in vitro* models reference for precision medicine research of gastric cancer.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目: 基于临床肿瘤标本的胃癌个体化转移模型的建立及评估(317725461004896)

[第一作者] 巩淼淼(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 类器官模型的构建与评价。E-mail: gongmiaomiaomail@163.com

[通信作者] 师长宏(1973—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向: 肿瘤模型的制备与评价。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn。ORCID: 0000-0001-7490-3593

赵菊梅(1970—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物。E-mail: jzm2003.stu@163.com。ORCID: 0000-0002-7813-8224

[Key words] Gastric cancer; Organoid; Precision medicine; Drug screening; Individualized treatment; Replacement

胃癌 (gastric cancer) 在全球癌症发病率中位居第五, 是全球第四大癌症死亡原因^[1]。我国胃癌的发病率较高, 占全球胃癌患者总数的44.21%, 且患者从发病到死亡所损失的全部健康寿命年即伤残调整生命年 (disability adjusted life year, DALYs) 从1990年到2019年增加了19.11%^[1-2]。目前胃癌的治疗方式主要包括手术和药物治疗, 不幸的是大多数患者都会出现耐药反应。

在过去的几十年里, 研究人员在大量抗癌药物的筛选和临床前药物研发过程中采用到多种重要的模型^[3-6], 例如二维 (2D) 标准细胞系模型、胃癌肿瘤发生的基因工程小鼠模型 (genetically engineered mouse models, GEMM)、人源肿瘤细胞系移植模型 (cell derived xenograft, CDX) 和人源肿瘤组织异种移植模型 (patient derived xenograft, PDX), 这些模型尽管在胃癌发病机制和药物研究中发挥了一定的作用, 然而因其均不能很好地表达肿瘤相关遗传背景和异质性, 导致大多数药物在临床研究中都失败^[7-8], 研究结果的临床应用价值有限。

近年来, 患者来源肿瘤类器官 (patient-derived organoid, PDO) 因更接近其来源组织的生理结构, 保留来源组织的特定功能, 并且可以得到与临床患者更加相似的药物反应, 因此进入研究人员的视野。大量研究表明, PDO模型可以有效评估癌症患者的特异性反应^[9-12], 同时与患者个体化治疗的结果有很高的相似性^[13]。由此可见, PDO模型可作为临床前药物筛选的理想模型, 替代繁琐的动物体内实验研究, 这对胃癌患者的个性化治疗和精准医学研究有着重要的意义。

1 胃癌类器官模型建立情况

1.1 胃癌类器官模型的发展概况

胃类器官大多通过成人胃干细胞扩增和人功能干细胞 (pluripotent stem cells, PSCs) 的定向分化来建立。首例胃类器官是在2010年利用多功能干细胞建立的^[14], 之后人类开始尝试利用患者来源的组织建立胃癌类器官^[10]。有研究者报告, 胃癌类器官建立成功率在50%~74%^[15-16]。也有报告, 胃癌患者大多都会做食道、胃、十二指肠镜检查 (esophagogastroduodenoscopy, EGD), 从而可以利用活检组织建立充足的胃癌

类器官^[17]。研究已证实, 胃癌类器官的建立率在组织病理学亚型之间没有显著差异^[16]。

2020年日本研究者先建立起10例来源于患者的胃癌类器官, 从中选取了对5-氟尿嘧啶相对敏感的4例^[18], 接着不断对建立起来的胃癌类器官用不同浓度的5-氟尿嘧啶进行处理, 成功建立起对5-氟尿嘧啶有耐药性的类器官模型, 发现*KHDRBS3*与药物治疗的耐药性有关。Loryn等^[19]为了研究幽门螺杆菌诱导胃上皮细胞程序性死亡配体1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 表达的机制, 将患者来源的类器官和自体免疫细胞共培养, 建立了一个体外模型来研究胃上皮细胞和T淋巴细胞之间的相互作用以应对感染, 发现感染幽门螺杆菌的胃上皮高表达PD-L1, 并抑制细胞毒性T淋巴细胞的增殖, 这表明感染了表达PD-L1的幽门螺杆菌的胃上皮细胞受到保护, 进而免除了免疫反应的影响, 导致癌前病变发展为胃癌。Dani等^[20]发现, *Troy*⁺细胞是一种完全分化的细胞, 具有充当多能干细胞的能力, 同时证明了单个*Troy*⁺主细胞可以形成胃类器官。有研究者用*Troy*作标志物来验证胃癌类器官^[21], 结果表明可以通过检测*Troy*来确定是否为胃癌类器官。

除此之外, 胃癌转移性标本的类器官模型也被建立起来。例如Georgios等^[9]建立了来自参与I/II期临床试验的新鲜活组织检查的转移性胃肠癌患者的PDO生物库, 并通过识别类器官中的基因型-药物表型相关性, 将这些癌症类器官的药物反应与实际患者的反应进行了比较, 证明类器官模型可预测转移性胃肠癌患者对治疗的反应。李杰等^[22]建立了胃癌恶性腹腔积液衍生类器官 (malignant ascites derived organoid, MADO) 的集合, 成功率为92%, 而且经过传代, 其形态和基因组没有任何变化, 可以对常规化疗药物的多药耐药性进行筛选。

1.2 胃癌类器官模型的组织学特征和分子分型

胃癌分类方法大体有两种。一种是组织形态学分类系统: 按照通用的Lauren分类法, 将胃癌分为肠型胃癌和弥漫型胃癌两种组织学亚型^[23]; 另外世界卫生组织还提出另一种组织分类方法, 将胃癌分为乳头状癌、管状癌、黏液癌 (胶体癌) 和低黏附性癌^[24]。虽然组织形态学分类系统在临床上具有通用性和广泛的

应用,但不足以反映胃癌的分子和遗传特征,也不足以在精确医学时代制定个性化的治疗策略。另一种是分子分类系统,通过基因组技术和高通量分析进一步对胃癌进行分类。2014年TCGA研究网络组将胃癌分为4种遗传亚型:EB病毒(epstein-barr virus, EBV)阳性型、微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)型、染色体不稳定(chromosomal instability, CIN)型和基因组稳定(genome stable, GS)型^[25]。大多数肠道和弥漫性胃癌的组织学亚型分别属于CIN和GS亚型^[25],这种分型是目前应用最多的分子分型。

依据胃癌的组织学特征和TCGA分类的分子分型可建立比较精准的胃癌类器官。例如,Therese等^[10]建立了20种人胃癌类器官,选择了4种进行全面分析,使用全基因组测序对类器官与胃癌分子亚型进行了相匹配,其中1例与GS亚型相匹配,1例与CIN亚型相匹配,2例与MSI亚型相匹配。按照分子分型建立起类器官后可进行一系列基因层面的研究,这将有助于推动胃癌精准医学和个性化治疗的研究^[10, 15, 26]。

1.3 胃癌类器官的优点和不足

胃癌PDO模型与传统细胞系、CDX、PDX、GEMM相比较,具有显著的优势(表1)。胃癌PDO一般3 d左右可进行一次传代^[10],与动物模型相比,可以快速地高通量筛选^[15]。由于PDO直接来源于患者,与传统细胞系相比,具有很高的临床相关性,并用于个性化治疗^[13];在基因编辑方面,PDO同样可以满足^[27]。但类器官大多数以上皮细胞为主,缺少研究上皮细胞和非上皮细胞之间持续的相互作用,与动物模型相比,在肿瘤微环境相关研究中存在劣势(表1);但这一局限性正在通过培养方法的改变来改善,例如将人工生长因子梯度作用于类器官^[28]、免疫细胞共培养方法^[19]和气液界面交换法^[29]。总之,类器官模型在肿瘤研究中具有广阔的应用前景。

2 胃癌类器官在精准医学研究中的应用

目前,尽管已经广泛开展针对癌症患者基因型特征的精准医学研究,用于促进癌症治疗并改善患者预后^[30]。然而,由于人类肿瘤细胞的分子异质性和可塑性,基于基因型的癌症治疗预测并不明确,这为个性化精准医学研究提出了新的挑战。随着类器官模型的药物试验成功,为个性化精准医学这一问题的解决提供了新的手段。比如,可以先建立胃癌类器官模型,然后对肿瘤组织进行分类分型,可利用基因测序技术

表1 不同胃癌模型的比较

Table 1 Comparison of different models of gastric cancer

特点 Characteristic	CL	CDX	PDX	GEMM	PDO
周期 Period	+++	++	++	+	+++
基因编辑 Genome editing	+++	+++	-	+++	+++
高通量筛选 High throughput screening	+++	-	-	-	+++
价格 Price	+++	++	++	+	++
临床相关性 Clinical interrelation	-	++	+++	++	+++
肿瘤微环境 Tumor microenvironment	-	++	++	+++	+
个性化治疗 Individualized treatment	-	+	++	+	+++

注:CL指细胞系;CDX指人源肿瘤细胞系移植模型;PDX指人源肿瘤组织异种移植模型;GEMM指基因工程小鼠;PDO指肿瘤人源类器官。最合适(+++),合适(++),可以实现(+),不合适(-)。Note:CL refers to cell line;CDX refers to cell derived xenograft;PDX refers to patient derived xenograft;GEMM stands for genetically engineered mouse models;PDO refers to patient-derived organoid. Most suitable(+++), suitable(++), can achieve(+), not suitable(-)

获得驱动基因,之后再利用类器官对关键驱动基因的捕获找到相关靶点,通过肿瘤药物资料库对药物进行筛选和预测,也可与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、幽门螺杆菌感染相结合,最后进行匹配,找到个性化治疗策略。总之,将基因组数据与患者肿瘤样本的药物筛选相结合,可确定针对不同患者的个体化治疗方案(图1)。

2.1 研究生态位因子对胃癌产生的影响

胃癌类器官的培养离不开干细胞“生态位(Niche)因子”的特殊组合,即Wnt激活剂(Wnt-3A和R-spondin)、受体酪氨酸激酶配体[表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)10]、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)抑制剂(Noggin)和转化生长因子-β(transforming growth factor beta, TGF-β)抑制剂(A83-01)^[14, 31]。研究生态位因子对胃癌产生的影响时,类器官模型无疑是一种好的选择。

Nanki等^[16]利用胃癌患者组织细胞建立类器官生物标本库来研究胃癌的发生发展分子机制,利用CRISPR-Cas9技术对类器官进行基因编辑,再通过生

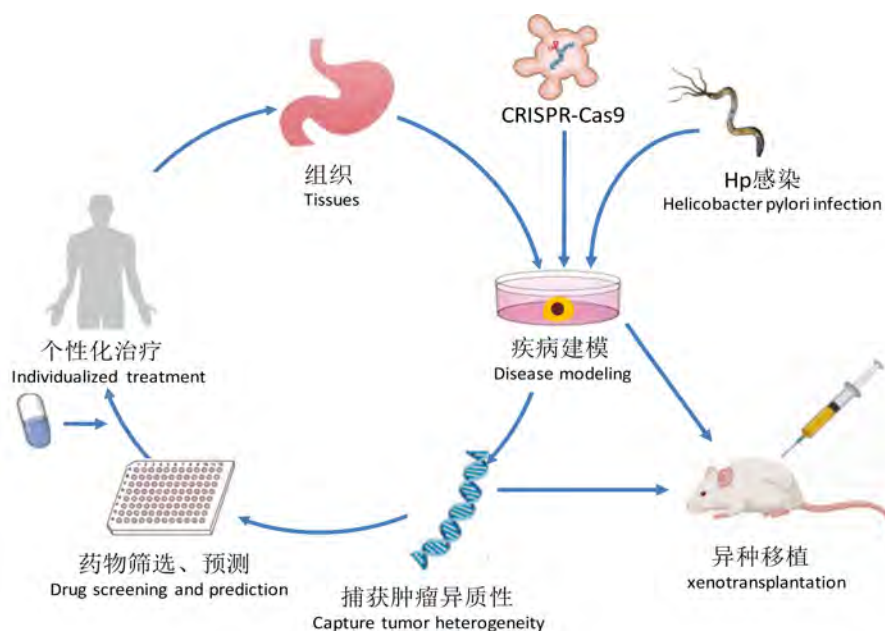


图1 类器官在精准医学研究中的应用策略

Figure 1 Application strategy of organoid in precision medicine research

态位因子依赖与基因突变来进一步研究胃癌中的基因型-表型相关性。将建立的胃癌类器官分为EGF依赖、EGF非依赖以及EGFR抑制剂抵抗等，发现*ERBB3*或*PTEN*突变的胃癌类器官依赖于生长因子EGF和FGF，但*ERBB2*和*ERBB3*扩增的胃癌类器官不再依赖EGF和FGF。同时发现了肿瘤激活Wnt通路的多种途径，之后通过胃癌类器官的异种移植进一步确定了Wnt靶向治疗Wnt依赖性胃癌的可行性^[16]。

2.2 探索胃癌发生的关键驱动基因

目前关于胃癌具体的发病机制仍不明确，需要对其进行多方面的探索，也有研究者通过建立捕获关键驱动基因的模型对其机制进行研究。例如，香港大学研究者建立了一个原发性胃癌类器官生物标本库，包括17个正常胃类器官和46个胃癌类器官^[15]。分析了大多数已知的分子亚型，包含EBV、MSI、肠型/CIN和弥漫型/GS，具有*CLDN18-ARHGAP6*或*CTNND1-ARHGAP26*融合或*RHOA*突变，并获取了胃癌的异质性和遗传特征。此外，该团队也通过类器官进行了药物敏感性的测试。

此外，胃癌类器官与关键驱动基因相结合，可以进一步推动精准医学的研究。Lincoln等^[32]发现胃癌原发肿瘤*FGF*受体2 (FGF receptor 2, *FGFR2*) 基因扩增，但转移瘤并不表现*FGFR2*扩增，而是具有TGF- β 受体2 (TGF- β receptor 2, *TGFBR2*) 独特双等位基因

的改变；之后在体细胞*CDH1*和*TP53*突变的类器官背景下，将类器官中的*TGFBR2*敲低，发现类器官中存在发育异常且具有侵袭性；同时进行体内实验以验证*TGFBR2*是否有潜在转移，结果表明*TGFBR2*是弥漫型胃癌的驱动突变基因，解决了寻找弥漫性胃癌转移的遗传驱动因素的问题。以上研究均表明，类器官可以通过不同的方法对胃癌机制进行探索，并找到相应的靶点为下一步研究提供帮助。

2.3 揭示幽门螺杆菌感染在胃癌发生中的作用

幽门螺杆菌感染是导致胃癌发生的首要独立危险因素^[33]。关于幽门螺杆菌的模型在体内体外均有研究，其中类器官模型是近期最受关注的模型之一^[34]。相关研究表明，类器官为评估癌细胞与癌相关成纤维细胞^[35]或病原体^[36-37]的共培养系统提供了一种理想的方法。将幽门螺杆菌感染的人胃类器官与宿主免疫细胞共培养，发现感染了表达PD-L1的幽门螺杆菌的细胞受到保护，可能会免受免疫反应的影响^[19]。

研究表明，类器官模型在研究幽门螺杆菌和胃癌的发生发展机制中发挥着重要作用。有研究者在幽门螺杆菌感染的胃类器官中观察到NF- κ B信号的强烈激活和胃上皮细胞增殖的增强，这是幽门螺杆菌感染的标志，从而验证了在传统细胞培养中幽门螺杆菌感染的潜在机制^[31, 38-39]。也有研究者将3D原代类器官培养物通过球体剪切的方法，接种到胶原涂层孔中转化

成2D培养物,利用3D类器官作为无限细胞源,在2D培养物中能够概括幽门螺杆菌的主要特征和发病机制,包括“蜂鸟”-表型、细胞空泡化和CagA磷酸化。相比于3D培养物,转化为2D培养物更容易处理,并可以提供可靠的感染条件^[36]。但目前这些方法大多用于基础研究,相信随着类器官技术的成熟,将来可用于疾病阶段的诊断和药物筛选,为个性化治疗应用提供帮助。

2.4 高通量药物筛选

类器官是预测药物疗效和药物发现的新型工具,适用于高通量药物筛选。肿瘤类器官已经作为药物发现的临床前癌症模型,在预测胃癌患者靶向治疗效果方面有着巨大的潜力^[40]。目前针对类器官进行的研究大多数都是基于形态学、荧光读数或基于ATP的细胞活力的测定。肿瘤类器官的药物筛选方案一般是将肿瘤类器官种植在384孔板或96孔板中并用药物处理3~6 d,然后根据CellTiter-Glo®测试类器官的活性^[41]。Therese等^[10]将胃癌类器官暴露于5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康、多西他赛和表柔比星,并记录了每种药物的不同反应,发现显示*ERBB2*基因扩增的1例PDO仅在高浓度时对5-氟尿嘧啶显示出反应,且对除伊立替康以外的大多数应用药物显示出抗性;该研究还建立了代表人类胃癌典型特征和改变途径的人和小鼠癌症类器官,证明了类器官在测试个体患者的治疗反应和耐药性方面具有潜在用途。

此外,也可创建胃癌转移的相关类器官模型进行药物筛选。Georgios等^[9]用转移性癌症类器官进行了药物筛选,用I-III期临床试验或临床实践中的55种药物库进行了为期两周的筛选分析,结果验证了使用来自转移性癌症的PDO作为药物筛选工具的可行性。李杰等^[22]用恶性腹腔积液肿瘤细胞建立了11个胃癌转移的MADO(恶性腹腔积液是晚期胃癌常见的常见症状),用奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、顺铂、多西他赛、伊立替康、表柔比星和紫杉醇对MADO进行药物筛选,每种药物以6个不同浓度对MADO进行作用,测试药物的半数抑制浓度,判断药物的敏感性。结果显示,对于胃癌恶性腹腔积液和胃癌转移性疾病都能成功地用类器官进行药物筛选。用类器官进行体外药物实验将缩短药物研究的成本,能够个性化筛选有效的药物。

2.5 替代动物体内实验预测胃癌患者的临床反应和预后

体外类器官的药物敏感性或耐药性测试是否可以

真正代表患者的结果,需要将临床前模型中的药物反应与患者的实际反应进行比较。在2019年发表的一项研究中,首次在I/II期临床试验中招募转移性结直肠癌和胃食管癌患者,对他们建立相应的PDO生物库,研究证明类器官在个性化医疗中的预测价值^[9]。这为利用类器官开展胃癌患者药物敏感性测试提供了依据。

Georgios等^[9]用类器官在21例胃癌患者的临床反应中测试了它们的临床预测价值,比较了紫杉醇敏感的胃癌患者治疗前后建立的连续类器官与两名紫杉醇耐药的肝转移胃癌患者的类器官对紫杉醇的反应,从紫杉醇浓度和细胞周期中分析,发现耐药性类器官和紫杉醇难治性类器官表现出相同的剂量反应曲线,紫杉醇治疗后出现显著的细胞凋亡,与临床观察到的结果一致。最终得出类器官预测患者对靶向药物或化疗的反应敏感性为100%,特异性为93%,阳性预测值为88%,阴性预测值为100%^[9]。胃癌类器官可帮助预测患者对靶向治疗(如*HER2*抑制)的反应,每个类器官可帮助确定患者对哪种药物有效或耐药,甚至对可能引起不良反应或几乎没有治疗反应的药物进行预测^[13]。

以上结果说明,胃癌类器官可以通过化疗药物的反应来预测患者的预后情况,也可以预测靶向治疗效果。类器官值得在癌症患者的前瞻性临床试验中进一步评估,更好地预测化疗药物和靶向治疗的成功或失败,从而进一步开发潜在的药物。

2.6 实现胃癌患者的个性化治疗

每个胃癌患者对相同的治疗方案可能有不同的疗效,对每种化疗药的耐药程度也不相同。随着个性化治疗被提出,开发个性化治疗需要捕捉肿瘤遗传异质性的特点^[13]。由于类器官具有高保真性和快速建模的特征,胃癌类器官在预测患者的药物敏感性方面显示出很高的临床效用,患者组织来源的类器官模型有助于胃肠癌的个性化治疗^[42-43]。有研究者把患者来源的类器官直接接种在96孔板上培养,并在患者手术后3 d内对类器官进行药物测试,依据结果在手术后5~6 d内告知临床医生预先的治疗方案是否可行^[13]。这说明来源于患者的类器官有助于个性化治疗的深入研究。

目前有研究者正在对一项人体临床试验(OPPOSITE试验:NCT03429816^[44])进行评估,用患者来源的胃癌建立类器官,患者与体外建立的类器官将接受相同的新辅助全身治疗,体外细胞毒性将与体内反应相关;该研究预计将在2022年完成,目前结

果尚不清楚, 预计可形成从寻找肿瘤驱动基因到靶向药物, 再到个性化治疗的匹配模式。未来胃癌个性化医疗将与临床紧密结合, 可测试各种药物并预测晚期胃癌个体患者的最佳治疗方案。

3 展望

胃癌类器官可预测药物对患者是否有效, 避免抗癌药物的盲目使用, 减少不良反应, 提高治疗效果。每个疑似胃癌的患者几乎都会接受EGD活检, 因此可以从活检中创建类器官生物样本库来丰富人类生物材料, 为胃癌的个性化治疗提供有效的实验工具^[17]。随着类器官模型培养技术的不断完善, 有可能替代动物模型在肿瘤研究中发挥重要作用。未来可通过胃癌分子分型和组织表型相结合, 精确预测患者的预后, 并制定个体化治疗方案, 即通过规范性、个体化的手术治疗联合放化疗、靶向治疗和免疫治疗, 进一步改善胃癌的治疗效果, 提高胃癌患者治愈率, 使更多的胃癌患者获益。

尽管如此, 胃癌类器官模型用于精准化治疗仍存在一定的局限性: (1) 目前建立的胃癌类器官模型中EBV亚型比较少见, 大部分没有检测到这种亚型阳性^[10], 少数研究者报告建立的胃癌类器官又可以捕捉到这一亚型^[15]; 也有研究者表明在胃类器官中EBV亚型不能表达, 而在胃癌类器官中可以表达^[45]。这可能说明EBV亚型在胃癌类器官表达中存在一定的不确定性, 还需要进一步研究确认。(2) 胃癌患者组织来源获取的细胞量不稳定, 这可能与肿瘤组织的状态和新鲜程度有很大关系, 如何获取最大量的细胞并在基质胶内保留最大活性仍需要进一步探索。随着实验技术的不断改进和相关研究的不断探索, 相信类器官一定在胃癌临床应用研究中发挥重要作用。

[作者贡献 Author Contribution]

巩淼淼负责文献查阅和整理, 以及文章撰写与修改; 周丽桂负责部分文献资料查阅及讨论; 赵菊梅提供文章整体内容的修改建议; 师长宏对全文内容进行修改指导。

[利益声明 Declaration of interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[2] HE Y, WANG Y, LUAN F, et al. Chinese and global burdens of gastric cancer from 1990 to 2019[J]. Cancer Med, 2021, 10(10): 3461-3473. DOI:10.1002/cam4.3892.

[3] KERSTEN K, DE VISSER K E, VAN MILTENBURG M H, et al. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine[J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(2):137-153. DOI:10.15252/emmm.201606857.

[4] KIM J, KOO B K, KNOBLICH J A. Human organoids: model systems for human biology and medicine[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(10):571-584. DOI:10.1038/s41580-020-0259-3.

[5] RISBRIDGER G P, LAWRENCE M G, TAYLOR R A. PDX: moving beyond drug screening to versatile models for research discovery[J]. J Endocr Soc, 2020, 4(11): bvaa132. DOI: 10.1210/jendso/bvaa132.

[6] CORRÒ C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 319(1): C151-C165. DOI:10.1152/ajpcell.00120.2020.

[7] KAMB A. What's wrong with our cancer models?[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(2):161-165. DOI:10.1038/nrd1635.

[8] CAPONIGRO G, SELLERS W R. Advances in the preclinical testing of cancer therapeutic hypotheses[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(3):179-187. DOI:10.1038/nrd3385.

[9] VLACHOGIANNIS G, HEDAYAT S, VATSIOU A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers[J]. Science, 2018, 359(6378):920-926. DOI:10.1126/science.aao2774.

[10] SEIDLITZ T, MERKER S R, ROTHE A, et al. Human gastric cancer modelling using organoids[J]. Gut, 2019, 68(2):207-217. DOI:10.1136/gutjnl-2017-314549.

[11] JABS J, ZICKGRAF F M, PARK J, et al. Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations[J]. Mol Syst Biol, 2017, 13(11): 955. DOI: 10.15252/msb.20177697.

[12] ABBASI J. Patient-derived organoids predict cancer treatment response[J]. JAMA, 2018, 319(14):1427. DOI:10.1001/jama.2018.3760.

[13] STEELE N G, CHAKRABARTI J, WANG J, et al. An organoid-based preclinical model of human gastric cancer[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019, 7(1): 161-184. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.09.008.

[14] BARKER N, HUCH M, KUJALA P, et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units *in vitro*[J]. Cell Stem Cell, 2010, 6(1):25-36. DOI:10.1016/j.stem.2009.11.013.

[15] YAN H H N, SIU H C, LAW S, et al. A comprehensive human gastric cancer organoid biobank captures tumor subtype heterogeneity and enables therapeutic screening[J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(6): 882-897. e11. DOI: 10.1016/j.stem.2018.09.016.

[16] NANKI K, TOSHIMITSU K, TAKANO A, et al. Divergent routes toward wnt and R-spondin niche independency during human gastric carcinogenesis[J]. Cell, 2018, 174(4): 856-869. e17. DOI:10.1016/j.cell.2018.07.027.

[17] GAO M, LIN M, RAO M, et al. Development of patient-derived gastric cancer organoids from endoscopic biopsies and surgical tissues[J]. Ann Surg Oncol, 2018, 25(9): 2767-2775. DOI:10.1245/s10434-018-6662-8.

- [18] UKAI S, HONMA R, SAKAMOTO N, et al. Molecular biological analysis of 5-FU-resistant gastric cancer organoids; KHDRBS₃ contributes to the attainment of features of cancer stem cell [J]. *Oncogene*, 2020, 39(50): 7265-7278. DOI: 10.1038/s41388-020-01492-9.
- [19] HOLOKAI L, CHAKRABARTI J, BRODA T, et al. Increased programmed death-ligand 1 is an early epithelial cell response to *Helicobacter pylori* infection[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(1): e1007468. DOI:10.1371/journal.ppat.1007468.
- [20] STANGE D E, KOO B K, HUCH M, et al. Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium[J]. *Cell*, 2013, 155(2): 357-368. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.008.
- [21] XIAO X, CHEN W, WEI Z W, et al. The anti-tumor effect of nab-paclitaxel proven by patient-derived organoids[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:6017-6025. DOI:10.2147/ott.s237431.
- [22] LI J, XU H, ZHANG L, et al. Malignant ascites-derived organoid (MADO) cultures for gastric cancer *in vitro* modelling and drug screening[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(11):2637-2647. DOI:10.1007/s00432-019-03004-z.
- [23] LAUREN P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification[J]. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1965, 64:31-49. DOI:10.1111/apm.1965.64.1.31.
- [24] BOSMAN F T, CARNEIRO F, HRUBAN R H, et al. WHO classification of tumours of the digestive system[M]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer Press, 2010.
- [25] CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 202-209. DOI: 10.1038/nature13480.
- [26] WANG K, YUEN S T, XU J, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(6): 573-582. DOI:10.1038/ng.2983.
- [27] LO Y H, KOLAH K, DU Y, et al. A CRISPR/Cas9-engineered *ARID1A*-deficient human gastric cancer organoid model reveals essential and non-essential modes of oncogenic transformation[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(6):1562-1581. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1109.
- [28] WANG Y, KIM R, GUNASEKARA D B, et al. Formation of human colonic crypt array by application of chemical gradients across a shaped epithelial monolayer[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(2): 113-130. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2017.10.007.
- [29] WANG X, YAMAMOTO Y, WILSON L H, et al. Cloning and variation of ground state intestinal stem cells[J]. *Nature*, 2015, 522(7555):173-178. DOI:10.1038/nature14484.
- [30] NAKAGAWA H, FUJITA M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(3):513-522. DOI:10.1111/cas.13505.
- [31] BARTFELD S, BAYRAM T, VAN DE WETERING M, et al. *In vitro* expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1):126-136.e6. DOI:10.1053/j.gastro.2014.09.042.
- [32] NADAULD L D, GARCIA S, NATSOULIS G, et al. Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffuse gastric cancer[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(8):1-18. DOI:10.1186/s13059-014-0428-9.
- [33] GRAHAM D Y. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(4):719-31.e3. DOI:10.1053/j.gastro.2015.01.040.
- [34] BURKITT M D, DUCKWORTH C A, WILLIAMS J M, et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from *in vivo* and *ex vivo* models[J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(2):89-104. DOI:10.1242/dmm.027649.
- [35] ÖHLUND D, HANDLY-SANTANA A, BIFFI G, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(3):579-596. DOI: 10.1084/jem.20162024.
- [36] SCHLAERMANN P, TOELLE B, BERGER H, et al. A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection *in vitro*[J]. *Gut*, 2016, 65(2):202-213. DOI:10.1136/gutjnl-2014-307949.
- [37] SCANU T, SPAAPEN R M, BAKKER J M, et al. *Salmonella* manipulation of host signaling pathways provokes cellular transformation associated with gallbladder carcinoma[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(6):763-774. DOI:10.1016/j.chom. 2015. 05.002.
- [38] MCCracken K W, CATÁ E M, CRAWFORD C M, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 400-404. DOI:10.1038/nature13863.
- [39] SCHUMACHER M A, FENG R, AIHARA E, et al. *Helicobacter pylori*-induced sonic hedgehog expression is regulated by NFκB pathway activation: the use of a novel *in vitro* model to study epithelial response to infection[J]. *Helicobacter*, 2015, 20(1):19-28. DOI:10.1111/hel.12152.
- [40] WEEBER F, OOF S N, DIJKSTRA K K, et al. Tumor organoids as a pre-clinical cancer model for drug discovery[J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(9): 1092-1100. DOI: 10.1016/j.chembiol. 2017.06.012.
- [41] FRANCIES H E, BARTHORPE A, MCLAREN-DOUGLAS A, et al. Drug sensitivity assays of human cancer organoid cultures [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1576:339-351. DOI:10.1007/7651_2016_10.
- [42] ABERLE M R, BURKHART R A, TIRIAC H, et al. Patient-derived organoid models help define personalized management of gastrointestinal cancer[J]. *Br J Surg*, 2018, 105(2):e48-e60. DOI: 10.1002/bjs.10726.
- [43] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 407-418. DOI: 10.1038/s41568-018-0007-6.
- [44] HAAG G M. OPPOSITE: Outcome prediction of systemic treatment in esophagogastric carcinoma (OPPOSITE) [EB/OL]. [2019-02-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03429816>.
- [45] WALLASCHEK N, REUTER S, SILKENAT S, et al. Ephrin receptor A2, the epithelial receptor for Epstein-Barr virus entry, is not available for efficient infection in human gastric organoids[J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(2): e1009210. DOI:10.1371/journal.ppat.1009210.

(收稿日期: 2021-10-14 修回日期: 2022-01-12)

(本文编辑: 富群华, 张俊彦, 郭嘉欣)

语言的比较生物学研究

李 慧

(北京师范大学人文和社会科学高等研究院, 珠海 519000)

[摘要] 比较分析是生物学的基本工具。比较生物语言学强调认知的基础构件在广泛物种间的共性, 通过比较人类、动物、古人类交流机制的保守性和差异, 可以洞察人类言语、语言和社交的本质。本文通过回顾现代人群中、现代人类与古人类之间、发声学习的动物模型中的比较生物语言学研究进展, 从基因组、神经遗传学、动物行为学等水平揭示比较生物学对发育性语言障碍、语言演化等研究的重要意义。

[关键词] 比较生物语言学; 发声学习; 发育性交流障碍; 语言演化; 动物模型

[中图分类号] Q594; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0255-07

A Comparative Biological Study of Language

LI Hui

(Institute of Advanced Studies in Humanities and Social Sciences, Beijing Normal University, Zhuhai 519000, China)

Correspondence to: LI HUI (ORCID: 0000-0002-4911-1321), E-mail: huiisp@163.com

[ABSTRACT] Comparative analysis is a fundamental tool in biology. Comparative biolinguistics emphasizes that the foundations of cognition are shared between a wide range of species and provides insights into the nature of human speech, language, and social interaction by comparing the communication mechanisms of humans, animals, and hominins. This paper reviewed comparative biolinguistic studies in the modern population (between modern humans and hominins, and in model animals of vocal learning) to reveal the significance of comparative biology in the study of developmental language disorders and language evolution at the levels of genome, neurogenetics, and ethology.

[Key words] Comparative biolinguistics; Vocal learning; Developmental communication disorder; Language evolution; Animal models

人类语言是以发声解剖结构和神经认知为基础构件, 可实现声音与意义相互映射的一整套机能。因此, 我们对语言的理解, 不仅应借鉴语言学的数据和理论, 更应来源于生物学研究。调控广泛物种发育的基因集合、蛋白质序列和细胞机制在进化过程中具有广泛的保守性, 这激发了人们使用模式生物来研究更复杂的系统。而识别种间差异对于探索人类的特性以及生物多样性的产生至关重要。近二十年来, 许多模式生物的基因组计划相继完成, 大量的基因组数据被存入数据库, 涉及的物种种类不断增加, 其中包括两种灭绝的古人类——尼安德特人和丹尼索瓦人, 为比较生物语言学的实证研究提供了重要机遇。

目前, 将比较生物学方法运用于语言研究已形成

共识, 即利用动物模型、古人类研究的数据来帮助分析人类关键特征的机制和进化基础。例如叉头框P (forkhead box P, FOXP) 转录因子是一个古老的蛋白质亚家族, 在脊椎动物体内协调多个器官系统的发育。研究发现FOXP基因与神经发育障碍相关联, 人们开始特别关注该基因在脑中的表达模式和功能。研究FOXP在人脑中的表达以及在脊椎动物脑发育中的作用, 为了解认知行为背后的分子路径和脑回路提供了重要的参考。通过靶向不同脑回路来挽救动物模型中的行为缺陷是未来该领域研究的一个重要方向^[1]。

人类独特的语言能力是通过对古老的神经、生理和解剖系统以新型配置的方式组合在一起而产生的, 这一观点已得到比较生物语言学研究的支持。例如

Lieberman^[2]提出,产生言语的基本节奏频率模式的解剖学器官——肺和喉有着深刻的进化史。连接皮层、基底神经节和其他皮层下结构的神经回路组织可执行运动和认知行为,从而产生言语、吟唱的节奏。本文将从现代人群中语言的比较遗传学、现代人类与古人类的比较遗传学和发声学习的动物模型这三个方面讨论语言的比较生物学研究进展,为理解语言等复杂、高级的认知行为可能涉及的神经机制、遗传变异和进化历程提供见解。

1 现代人群中语言的比较遗传学研究

研究人类个体发育、特异性和进化起源等问题的核心是了解其遗传机制。研究人类如何获得复杂的言语和语言能力对遗传学家构成了挑战,因为发现其中的关键遗传机制必须依赖于对“我们”的研究,即把人群视为一种自然实验对象来寻找基因型和表型之间的联系。长期以来,语言学家把语言视为在“现代人类”中恒定的特征,专注于对语言“普遍性”的研究。尽管语言研究中包含了研究病理语言学的观点,但并未大力开发人群中差异化的语言资源,因此,目前并没有得到相关表型变异程度的完全图示。然而,比较分析已成为在多种水平上揭示生物学机制的强有力的实证工具。目前,我们对语言分子遗传水平的“保守”与“变异”有了更多的认识。

1.1 罕见变异与常见变异

现代人群中包含一系列的基因组变异,如大规模的染色体重排、基因拷贝数变化和DNA单个碱基变化。变异范围从非常常见的“多态性”到特定家庭或个人的极为罕见的突变。基因组中许多突变属于沉默突变,对基因功能及表型影响不明显。然而,如果变异发生在基因的编码区序列,这可能改变编码蛋白的氨基酸序列,从而影响蛋白功能。如果变异位于调控区,也能改变蛋白质编码基因表达的方式。在发育或成熟的生物体中,蛋白质何时何地表达以及表达的数量多少,可对神经元增殖、迁移、连接和可塑性等过程产生影响,从而导致发育和功能的改变。这些原则、方法和技术也适用于研究包括言语和语言在内的人类认知和行为特征。如研究者已发现一些罕见的基因突变有巨大的效应,如FOXP2突变导致儿童言语失用。

此外,对特异性语言损伤(specific language impairment, SLI)病例的研究揭示了语言损伤与常见基因变异之间复杂的联系。如当SLI儿童中ATP酶2C2

(ATP2C2)和/或c-Maf诱导蛋白(C-Maf inducing protein, CMIP)(16号染色体上的两个相邻基因)发生常见基因变异时,在重复无义单词等语言能力测试中显示出成绩偏低^[3]。有时同一基因的不同变体会促成不同类型的障碍。如接触蛋白相关蛋白样2(contactin-associated protein-like 2, CNTNAP2)的常见基因变体是SLI的风险因子,而其罕见的编码区突变可与脑皮质发育不全伴病灶性癫痫综合征(cortical dysplasia-focal epilepsy syndrome, CDFES)、智力障碍(intellectual disability, ID)等神经发育障碍相关^[4]。

1.2 语言遗传基础的鉴定

随着分子生物学的发展,人们对基因和基因组之间的差异有了比较全面的了解。但是如何寻找言语和语言相关机能的潜在遗传学基础,还需要不断探索。

首先从发育性交流障碍着手。有5%~10%的儿童存在永久性获得的严重的口语和书面语障碍^[5],足以影响其教育与社交发展。其中一些病例是在认知功能相对保留以及有充分语言输入的背景下,其感知和产生语言的能力受限,例如耳聋和腭裂。另有一些病例是在更广泛的认知缺陷的背景下出现言语和语言问题,如脑创伤、ID或者是自闭症谱系障碍(autistic spectrum disorder, ASD)。还有相当一部分儿童在没有任何明显的解释性原因的情况下存在言语和语言问题。以上问题统一称为“发育性交流障碍”^[6]。在行为水平上,不同的言语和语言障碍之间,“语言特异(language specific)”障碍与影响更广泛的认知功能的障碍之间,以及“障碍”与“偏低的正常能力”之间,都鲜有清晰的界限,其部分原因是障碍的诊断基于心理测量和对交流能力的临床观察,在正常与异常表现之间没有绝对的分界线。此外,每一儿童有独特的缺陷谱系,随着儿童发育而变化,大多数障碍都存在高水平的“共病”现象。其固有原因是:言语、语言和阅读大致依赖于共同的认知过程,同时也与其他认知系统密不可分。因此,每种发育性交流障碍都是一个笼统的术语,它不仅涵盖了许多表型变异,也有巨大的基因型差异。例如罕见的言语和语言障碍是由单一基因促成。但常见形式的障碍都是非孟德尔遗传形式,来源于大量常见变体的累加效应。也许最典型的场景是:多种罕见和常见变体组合起来决定了风险的水平,后者又受到环境影响以及神经发育中随机过程的调控^[6]。

再者从正常的语言变异以及非凡的语言能力着手。在非语言损伤人群中鉴定语言能力的个体间变异,最

近在语言学研究中得到了重视。过去倾向于集中鉴定语言获得和处理过程中“普遍性”的方面。其中一些变异是由于环境因素以及神经发育中的随机效应。但双生子研究和双生子收养研究显示, 很大比例的语言变异是可遗传的, 例如在口语和书面语获得的发育轨迹、词汇量等参数的最终成就水平, 以及儿童期过后的语言学习能力等方面^[7]。因此, 语言能力的正常变异也是言语和语言遗传基础研究的新型资源, 目前正在使用全基因组关联 (genome-wide association studies, GWAS) 进行研究。未来, 人们通过探索语言能力谱系的最高端 (在口语和书面语获得以及有优异语言能力的成年人中该研究尤其成功), 将会对语言的遗传基础有更深入的了解。还有一些经常发生在ASD背景下, 且伴随其他认知区域损伤的异常卓越的语言能力 (如阅读早慧与通晓数种语言)^[6] 的病例, 也是亟待发掘的语言遗传研究资源。

鉴定语言遗传基础可为实证研究人类语言的演化提供重要线索。把语言相关基因的DNA和蛋白质序列与不同动物物种的相应序列进行比对, 有可能重构该基因的进化史, 从而判断其出现的时间段、在不同世系中如何改变, 以及在人类最近的祖先中是否表现出独特的变化特征。另外, 在发育人群以及成年人群脑的不同组织结构中, 确定该基因产物何时何地具有活性, 并把它的神经表达模式与其他物种进行比较。如果在目标基因中探测到潜在的进化差异, 可用模型系统评估其功能影响。例如比较研究发现^[8], FOXP2远非人类独有, 其有深远的进化史, 且在远缘脊椎动物物种中以同源的形式存在。该基因不仅在DNA/蛋白质序列水平, 而且在神经表达模式上都相对保守。在鸣禽中其同源基因 (*FoxP2*) 似乎通过影响特定脑区 (如X区) 参与鸣曲学习和可塑性, 而小鼠*Foxp2*影响运动协调、学习、超声发声 (ultrasonic vocalizations) 以及脑发育, 显示该基因在包括皮层、基底核和小脑某些回路的发育和功能中有着古老的作用, 也与感觉运动整合和运动技能学习有关; 当把关键的进化氨基酸变化序列插入到小鼠中时, 小鼠在皮层基底回路中显示出更高水平的突触可塑性; 相反, 持KE家族*Foxp2*基因突变的鼠在皮层基底回路中显示出更低水平的突触可塑性。这些研究结果提示FOXP2具有重要的进化意义。

1.3 精神疾病相关的言语交流缺陷动物模型

ASD是一种神经发育障碍, 其特征是社交障碍以及受限和重复的行为模式。虽然语言和社会交际方面

的缺陷是自闭症谱系障碍的一个显著特征, 但结构语言能力, 尤其是语义和句法, 存在显著的个体差异^[9]。使用动物模型来分析分子通路, 并将其与认知障碍的行为内表型联系起来, 已被证明是开发和测试疾病相关疗法的有效方法。最近开发出与ASD相关的脆性X智力低下蛋白1 (fragile X mental retardation1, Fmr1)、神经配蛋白3 (neuroligin-3, Nlgn3) 和神经突触黏附分子1- α (neurexin1- α , Nrnx1- α) 的基因敲除大鼠模型。虽然Fmr1或Nlgn3敲除大鼠表现出与ASD相关的一些行为改变, 但在幼鼠社交互动中的超声发声没有显著差异。相比之下, Fmr1 KO大鼠表现出对听觉刺激的反应减弱, 与在脆性X综合征患者中听觉皮层反应异常相一致^[10]。此外, 比较常见的非遗传动物模型是产前或产后早期给药的丙戊酸钠 (valproic acid, VPA) 诱导的大鼠和小鼠ASD模型^[11]。虽然在人类ASD病例中, 只有少数与产前暴露于VPA相关, 但VPA动物模型仍然是探讨ASD病因学中基因-环境相互作用的有价值的研究工具, 尤其是在表观基因组修饰的背景下^[12]。目前的动物模型对进一步了解与ASD相关的行为缺陷、基因突变和生理学方面非常有价值, 为开发出新的治疗策略提供了条件。但ASD核心症状的动物模型仍面临着缺乏生物标志物、症状严重程度的异质性和适当的评价终点等问题。尽管如此, 来自动物模型的研究数据已经促使几种药物进入临床试验^[13]。

语言障碍是精神分裂症临床诊断的重要方面, 但它或许是语言功能的特定缺陷, 例如句法理解准确性损伤, 而非非整体性认知缺陷, 或作为普遍思维障碍的指征, 而非言语或语言上的特定缺陷。除了少数基因之外, 精神分裂症领域一直缺乏研究与这种疾病有关的生物学和大脑回路的遗传模型^[10]。然而, 最近一项大规模的全基因组关联研究已经确认, 精神分裂症相关108个基因位点集中于大约90个基因。一些诱发大鼠精神分裂症样症状的药理学模型已被用于研究发声效果。例如甲基氧化偶氮甲醇 (methyl azoxy methanol, MAM) 会使DNA甲基化, 明显增加足底电击诱发的超声发声等应激反应, 从而使啮齿动物的超声发声及其他行为和神经解剖学特征发生类似于精神分裂症的变化^[10]。

2 现代人类与古人类的比较遗传学研究

两种灭绝的古人类基因组高质量测序结果, 已经并继续革新着人们对人类进化的理解。现代人类、人

类祖先、尼安德特人、丹尼索瓦人和类人猿的完整基因组序列的获得对描述人类特征的起源发挥了巨大价值。在古DNA证据出现之前,通常认为人类语言是相对新近的特征,出现于大约5~10万年前;语言的出现是单个、骤然的突变导致形成的完整的“现代装备”。尼安德特人缺乏特异的言语装备、更高水平的语言适应以及有效利用语言的整体认知灵活性。例如Pinker等^[14]曾提出,语言是为了实现交流的自然选择压力下进化的复杂适应系统,语言演化的时间段是在过去5万年间。Chomsky^[15]认为,大约在10万年前,第一个问题(为什么会有语言?)并没有出现,因为没有语言,而脑的重构仅仅发生在“我们”这个物种中的某一个体中,生成了无限合并的操作,运用于具有错综复杂(而鲜少了解的)属性的概念中。而认为“尼安德特人缺乏语言,而使用某种形式的原语言”的证据包括:首先,尼安德特人与现代人类的整体解剖结构差异提示,他们之间有相当大的进化距离,尼安德特人的强健身形被认为是力量对受限的智力的补偿;其二,早期对古DNA的提取和分析专注于线粒体DNA,从而认为现代人与尼安德特人的基因组有显著区别,所以他们是不同的物种;其三,复原的部分声道和听力系统的化石也显示两者之间在言语能力上存在重要差异;第四,两者之间的文化产品存在差距,这似乎也可从语言是否有缺陷中得到解释^[16]。

遗传学的最新进步使人们能够从古人类化石上提取和分析DNA。如前所述,对复原的尼安德特人线粒体DNA进行分析,结果似乎支持了它们对现代人类基因多样性没有贡献的观点;可能原因包括,他们与现代人类完全没有杂交,或仅是最初有低水平的杂交,而后来消失了。然而随着下一代测序技术的进步,完整的尼安德特人和丹尼索瓦人的基因组序列得以发布,揭示了3种古人类支系之间的复杂交错的遗传史。Dan等^[16]总结了3种古人类基因组的比较数据,并进行了详尽的分析,认为:

(1)“我们”的进化史远非单一世系的简单而持续的进程,而是反映了一个网状的历史,包含至少3种紧密相关的支系之间(反复)互换基因的可能。随着古人类化石的进一步发现,这一网络也许会变得更复杂。由于在不同的现代人类个体中发现了不同的尼安德特人基因,说明了两之间基因组混合的机会并不是非常少。也许一些尼安德特人和丹尼索瓦人的基因在“走出非洲”后被赋予了强大的选择优势,尤其是在免疫系统方面,从而对现代人群有了高频率的基因

贡献,其中包括在人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)系统中的免疫系统基因、STAT2基因和OAS基因簇。尼安德特人和丹尼索瓦人有现代人言语和语言的基本遗传基础,可能现代人在一些参数上会更胜一筹(也许是言语声音或言语的快速,句法的复杂度、词汇量大小等)。

(2)语言是把声音映射于意义的全套能力,包含了支持它的基础设施(如声道结构、神经认知、交流行为学和心智理论等)。这些先决条件发生在深度时间内。因此,言语和语言是古老的,存在于50多万年前尼安德特人和现代人的共同祖先中,即从直立人进化而来的海德堡古人类。现代语言的时间深度应该是在语言科学文献中经常提到时间深度(典型的是5~10万年)的约10倍,而这样一个错综复杂的系统不可能仅仅在几千代内进化出来。在海德堡人之后,生物和文化进化在每一人类支系中继续着,一个在非洲,一个在非洲外,从而导致文化的累积。当然还有支持言语和语言的一些微小的生物差异。因此,简化的突变论不再成立。人们必须从语言认知能力累积的进化轨迹来思考,语言演化在今天仍然在延续。

(3)言语和语言两者之间大致是协同进化的机能。研究言语的生成与理解应以研究呼吸、舌、腭帆和声带的皮层控制为核心,而非过度强调句法,因为前者给予了更多了解语言进化的线索和实证理据。例如,镜像神经元的发现使“人类语言最初经历了一个手势语言的阶段”的观点再度流行起来;这是因为发现类人猿缺乏皮层和喉之间直接联系的侧皮层系统,从而判断类人猿的手势与意向性交流相关,而其发声更多的是本能反应。

(4)人类基因和语言多样性之间有着充分的相互影响。某些参与脑生长和发育的基因如异常纺锤体样小头畸形相关蛋白基因(abnormal spindle microtubule assembly, ASPM)和小脑症基因(microcephalin)的频率与声调语言的流行有相关性,说明人群基因中微小的差异可充当文化的“引子”,使某种语言类型更可能散布,称为“遗传偏向性”。随着对它们功能以及它们在人群中变体功能的了解不断加深,可推测它们在语言的文化进化中发挥着特定作用。

3 发声学习的动物模型

广义上讲,发声学习是在经验基础上改变发声输出的能力。区分发声能力的一种依据是:一些发声是

天生的, 不需依赖经验; 另一些发声不仅依赖天生技能, 也依赖经验。前者为大多数动物所常见, 例如哭和笑。后者相对不广泛, 大致包含3种亚型: (1) 将声音与行为反应联系起来的能力, 如犬对人的命令的回应; (2) 学习“发声语境”的能力, 例如长尾猴对捕食者的发声回应; (3) 根据经验修改发声的能力, 可以与发声模型偏离或趋同, 例如鸟鸣, 该能力称为声音产生学习 (vocal production learning), 简称为发声学习 (vocal learning)^[17]。发声学习并非人类所独有, 其存在于多种远缘物种中。到目前为止, 已经无可争议地确认了鲸目动物、鳍足类动物、大象、某些蝙蝠物种、三目鸟类 (鸣禽、鹦鹉和蜂鸟) 和人类一样均具有发声学习能力^[18]。

发声学习的研究有助于阐明感觉运动通路、发声运动控制和听觉运动整合机制。Tyack等^[19]对不同的发声动物模型进行了分类, 认为人类和一些鸣禽通过聆听声音来学习语言或鸣唱, 形成听觉模板, 然后产生与模板匹配的声音。这些类群已经进化出专门的端脑通路来完成这种复杂的发声学习形式。还有许多哺乳动物和鸣禽, 可以通过倾听同类的声音或噪音来调整遗传的声音运动模式的声学特征。这些有限形式的发声学习可能涉及不同于复杂声乐学习的神经机制, 如脑干、中脑和/或端脑网络。相比之下, 大多数动物发声的声学结构是由特定物种脑干中的发声运动程序产生的, 不需要听觉反馈, 不属于发声学习的范畴。要理解人类语言的基础——复杂的发声学习, 需要仔细分析哪些物种具备哪些形式的发声学习能力。选择多种动物模型来比较产生这些不同学习形式的神经通路, 将了解复杂发声学习的进化和其神经机制提供更丰富的观点。在研究人类语言神经机制时成功采用的非侵入性方法应广泛应用于发声学习的其他分类群。另外, 许多有发声学习能力的物种都濒临灭绝, 或受到威胁或列于保护范围内, 因此发声学习的研究不应野生种群产生负面影响。

发声学习物种也用于研究人类言语的进化。Martins等^[20]认为, 语言进化应为镶嵌式, 不同的语言组分有各自的进化模式。最近他们在发声学习“连续体 (continuum)”的概念之上提出了发声学习“联合体 (contiguum)”的概念。“联合体”是“连续体”的延伸, 在这一形态空间内, 有不同的力让一个物种接近某种行为或远离它。“连续体”可视为“联合体”的向量。该模型主张从多维视角研究发声学习, 使对发声学习特征的描述更加复杂, 也更加准确, 并能促

进一步的比较生物学研究。

驯化和发声学习物种可作为研究人类世系中应激性攻击减少和语言出现的模型生物。越来越多的证据表明, 驯化可以改变不同物种的发声技能。在人类和鸣禽中, 发声学习似乎依赖于共享的神经生物学基质, 这也许是趋同进化的结果。白腰文鸟和驯化的孟加拉雀之间的鸣曲对比研究可为人类物种的自我驯化和发声学习演化机制提供线索^[18]。最近O'Rourke等^[18]把研究重点放在驯化的孟加拉雀上, 孟加拉雀的鸣曲比野生的白腰文鸟更复杂。O'Rourke等^[18]对这种效应的解释围绕谷氨酸神经递质系统展开, 认为谷氨酸信号与鸣曲学习有关, 它控制对发声学习至关重要的神经回路中的多巴胺活动, 调节应激反应和驯化后攻击行为的减弱, 而应激相关神经回路的兴奋减弱可通过多巴胺能信号的改变来增强发声学习能力。

4 讨论与展望

比较生物语言学强调了认知系统的保守性和语言发育的可塑性, 而只有足够了解其他物种的认知体系以及人类非语言认知区域的特征才能对现代语言机能的构建作出合理的推断。通过比较现代人群语言中的罕见变异与常见变异, 研究人类交流障碍, 将对教育、科学、经济和社会进步都有重要意义, 而对其潜在风险因子的了解有利于早鉴定、早干预和早治疗。在ASD、ID、癫痫失语谱系障碍 (epileptic-aphasia spectrum, EAS) 病例中, 遗传学研究已经革新了人们对这些障碍病因的理解, 而且开启了从“表型为先”到“基因型为先”的诊断转型。分子生物学技术进步正在加速研究语言障碍中基因型-表型之间联系的步伐, 其中一个关键进步是高通量基因分型DNA芯片的生产。通过DNA芯片, 每人只需几百美元, 就可在基因组中同时筛查百万个不同的遗传标记, 靶向到每一基因内所有已知的变异位点^[21]。因此研究者可以开展全基因组关联的大规模筛查, 从而揭示特定基因与目标表型之间的新型关联。然而这种研究需要成百甚至成千的人群才能取得充分的数据效能。全基因组关联筛查已经使用于常见语言相关障碍研究, 但由于较之人类基因学其他领域来说样本规模太小, 因此需招募大量的受试者以及描述其语言机能, 而且不同领域的国际合作才能获得成功。此外还需要实验研究来确定基因变体对蛋白质功能的影响, 这些实验包括分子和细胞生物学实验、动物模型实验和脑成像实验等。脑

成像遗传学实验是一项用非侵入性神经成像技术评估基因组变体与脑结构和功能之间关联的新兴技术。例如 ProcessGeneLists (PGL) 通过使用与疾病相关的基因并计算这些基因在每个大脑区域的标准化 mRNA 表达平均值, 将遗传学和人类大脑成像联系起来。这些基因表达最多的共同脑区域成为感兴趣区域, 用于在有或没有疾病的受试者中进行脑成像, 从而减少了多重比较^[22]。

基因组大数据的涌入也为语言进化研究者提供了独特的新希望。许多现存物种以及不断增加的灭绝动物(包括古人类)的丰富的遗传数据都可在网上自由取用。这些数据之间相互参考对于在语言进化的多因子背景下确定哪些候选基因显示出人类祖先中有趣的变化模式很有价值。古人类遗传学研究类似时光机器, 可重构人类交流的起点, 从而使语言起源研究从“推测”和“假说”过渡到实证科学。发声学习是人类语言的一个重要特征, 显示发声学习能力的物种是有关人类语言本质和进化的重要信息来源, 尤其是关于语音方面。

同时参与语言进化研究的有认知神经科学、考古学、行为学、计算机科学、人类学和理论语言学等。这种跨学科的讨论对于语言学家来说可能是一个警钟, 因为语言学界长期从事内部专业化的理论研究, 这可能成为一道阻碍跨学科合作的防火墙。然而大数据的涌入以及学科的异质性对研究也造成了挑战。例如, 需要在极为异质的实证证据中找到一个趋同点, 能集中多学科知识, 妥协一些对立的立场, 排除仅仅在单一学科内适用的解决办法, 从而实现对语言进化的全面了解。而且不同学科领域的交流需要一个共同的基础, 即一个可以在多样性学科中构建联系的共享概念空间。共享概念空间的建立需通过每种学科各自的不断发展以及构建, 能够对不同数据提供统一视角的动态开放解释性模型。比较生物语言学着力在人类语言与其他生物的认知构件中寻找普遍性和变异性, 已成为生物语言学繁荣的动因。这可能为语言研究提供一个共享的概念区, 用以处理异质的数据, 实现语言跨学科研究的深入发展。

[利益声明 Declaration of Interest]

作者声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] CO M, ANDERSON A G, KONOPKA G. FOXP transcription factors in vertebrate brain development, function, and

- disorders[J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2020, 9(5): e375. DOI:10.1002/wdev.375.
- [2] LIEBERMAN P. The antiquity and evolution of the neural bases of rhythmic activity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2019, 1453(1): 114-124. DOI:10.1111/nyas.14199.
- [3] NEWBURY D F, WINCHESTER L, ADDIS L, et al. CMIP and ATP2C2 modulate phonological short-term memory in language impairment[J]. Am J Hum Genet, 2009, 85(2): 264-272. DOI:10.1016/j.ajhg.2009.07.004.
- [4] POOT M. Connecting the CNTNAP2 networks with neurodevelopmental disorders[J]. Mol Syndromol, 2015, 6(1): 7-22. DOI:10.1159/000371594.
- [5] SANFILIPPO J, NESS M, PETSCHER Y, et al. Reintroducing dyslexia: early identification and implications for pediatric practice[J]. Pediatrics, 2020, 146(1): e20193046. DOI: 10.1542/peds.2019-3046.
- [6] GRAHAM S A, DERIZIOTIS P, FISHER S E. Insights into the genetic foundations of human communication[J]. Neuropsychol Rev, 2015, 25(1):3-26. DOI:10.1007/s11065-014-9277-2.
- [7] CHRISTOPHER M E, HULSLANDER J, BYRNE B, et al. Modeling the etiology of individual differences in early reading development: evidence for strong genetic influences [J]. Sci Stud Read, 2013, 17(5):350-368. DOI:10.1080/10888438.2012.729119.
- [8] FRENCH C A, FISHER S E. What can mice tell us about Foxp2 function?[J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 28:72-79. DOI:10.1016/j.conb.2014.07.003.
- [9] FRIEDMAN L, STERLING A. A review of language, executive function, and intervention in autism spectrum disorder[J]. Semin Speech Lang, 2019, 40(4):291-304. DOI:10.1055/s-0039-1692964.
- [10] KONOPKA G, ROBERTS T F. Animal models of speech and vocal communication deficits associated with psychiatric disorders[J]. Biol Psychiatry, 2016, 79(1): 53-61. DOI: 10.1016/j.biopsych.2015.07.001.
- [11] ORNOY A, WEINSTEIN-FUDIM L, ERGAZ Z. Prevention or amelioration of autism-like symptoms in animal models: will it bring us closer to treating human ASD?[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5):1074. DOI:10.3390/ijms20051074.
- [12] KONG Y, ZHOU W, SUN Z. Nuclear receptor corepressors in intellectual disability and autism[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(10):2220-2236. DOI:10.1038/s41380-020-0667-y.
- [13] CHADMAN K K, FERNANDES S, DILIBERTO E, et al. Do animal models hold value in Autism spectrum disorder (ASD) drug discovery?[J]. Expert Opin Drug Discov, 2019, 14(8):727-734. DOI:10.1080/17460441.2019.1621285.
- [14] PINKER S, BLOOM P. Natural language and natural selection [J]. Behav Brain Sci, 1990, 13(4): 707-727. DOI: 10.1017/s0140525x00081061.
- [15] CHOMSKY N. Some simple evo Devo theses: how true might they be for language? [M]//LARSON R K, DEPREZ V, YAMAKIDO H. eds. The Evolution of Human Language. Cambridge: Cambridge University Press, 2010 : 45-62. DOI: 10.1017/cbo9780511817755.003.

- [16] DAN D D, LEVINSON S C. On the antiquity of language: the reinterpretation of Neandertal linguistic capacities and its consequences[J]. *Front Psychol*, 2013, 4: 397. DOI: 10.3389/fpsyg.2013.00397.
- [17] MARTINS P T, BOECKX C. Vocal learning: Beyond the continuum[J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(3): e3000672. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000672.
- [18] O'ROURKE T, MARTINS P T, ASANO R, et al. Capturing the effects of domestication on vocal learning complexity[J]. *Trends Cogn Sci*, 2021, 25(6): 462-474. DOI: 10.1016/j.tics. 2021. 03.007.
- [19] TYACK P L. A taxonomy for vocal learning[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2020, 375(1789): 20180406. DOI: 10.1098/rstb.2018.0406.
- [20] MARTINS P T, BOECKX C. Vocal learning: Beyond the continuum[J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(3): e3000672.
- [21] FISHER S E, VERNES S C. Genetics and the language sciences[J]. *Annu Rev Linguist*, 2015, 1(1): 289-310. DOI: 10.1146/annurev-linguist-030514-125024.
- [22] POBLETE G F, GOSNELL S N, MEYER M, et al. Process genes list: an approach to link genetics and human brain imaging[J]. *J Neurosci Methods*, 2020, 339: 108695. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2020.108695.

(收稿日期: 2021-08-13 修回日期: 2021-12-16)

(本文编辑: 富群华, 张俊彦, 周培)

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表

英文缩略词	英文全称	中文全称(备注)
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
FDA	Food and Drug Administration	食品药品监督管理局(美国)
SPF	specific pathogen-free	无特定病原体
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
CT	computerized tomography	计算机断层摄影
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
CCK-8	cell counting kit-8	细胞计数试剂盒-8
MTT	thiazolyl blue	噻唑蓝(细胞增殖活性检测试剂)
BCA	bicinchoninic acid	二辛可宁酸(蛋白浓度测定试剂)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
SP	streptavidin-peroxidase	链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶
HE	hematoxylin and eosin	苏木精-伊红
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
ddH ₂ O	distillation-distillation H ₂ O	双蒸水
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
PBST	phosphate-buffered saline with Tween-20	含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液
TBST	Tris-buffered saline with Tween-20	含 Tween-20 的 Tris 盐酸缓冲液
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PE	phycoerythrin	藻红蛋白
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
RIPA	radio immunoprecipitation assay	放射免疫沉淀法
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
PI	propidium iodide	碘化丙啶
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2 基因
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(内参)
Ras	rat sarcoma gene	大鼠肉瘤基因
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
cDNA	complementary DNA	互补(反向转录)DNA
siRNA	small interfering RNA	小干扰 RNA
miRNA	microRNA	微 RNA

《实验动物与比较医学》编辑部

不同剂量氯胺酮与赛拉嗪复合用于巴马小型猪短时间麻醉效果观察

申 晨, 张宝杰, 王学民, 朱瑾彦, 张 敏, 李 彬

(中国医学科学院北京协和医学院阜外医院心血管在体实验研究与评价中心, 心血管植入材料临床前研究与评价北京市重点实验室, 动物实验中心, 北京 102308)

[摘要] **目的** 对小型猪行盐酸氯胺酮及赛拉嗪复合麻醉, 并分析药物剂量高低对麻醉效果的影响。**方法** 将36头巴马小型猪随机分为3组: A组应用氯胺酮10 mg/kg+赛拉嗪2 mg/kg行肌肉注射麻醉; B组应用氯胺酮10 mg/kg+赛拉嗪1.5 mg/kg行肌肉注射麻醉; C组应用氯胺酮5 mg/kg+赛拉嗪2 mg/kg行肌肉注射, 然后记录麻醉监测指标。**结果** A组及B两组之间麻醉起效时间和清醒时间均无明显差异 ($P > 0.05$), A组及B组麻醉清醒时间明显长于C组 ($P < 0.05$)。**结论** 应用氯胺酮10 mg/kg复合赛拉嗪1.5~2 mg/kg肌肉注射麻醉, 起效较快, 麻醉深度稳定, 体动不明显, 安全性满意, 可应用于短时间的手术和诊疗处置。

[关键词] 氯胺酮; 赛拉嗪; 巴马小型猪; 复合麻醉

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)03-0262-04

Comparison of the Anesthetic Effects of Different Doses of Ketamine Hydrochloride Combined Xylazine on Short-term Anesthesia in Bama Miniature Pigs

SHEN Chen, ZHANG Baojie, WANG Xuemin, ZHU jinyan, ZHANG Min, LI Bin

(Center for Cardiovascular Experimental Study and Evaluation of Fuwai Hospital, Beijing Key Laboratory of Preclinical Research and Evaluation for Cardiovascular Implant Materials, Animal Experimental Centre, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 102308, China)

Correspondence to: LI Bin (ORCID: 0000-0002-7614-8488), E-mail: shenchen@fuwai.com

[ABSTRACT] **Objectives** To perform the combined anesthesia of ketamine hydrochloride and xylazine in miniature pigs, and to analyze the effect of drug dose on anesthesia. **Methods** Thirty-six Bama miniature pigs were randomly divided into three groups. Group A was administered with ketamine hydrochloride (10 mg/kg) + xylazine (2 mg/kg). Group B was administered with ketamine hydrochloride (10 mg/kg) + xylazine (1.5 mg/kg). Group C was administered with ketamine hydrochloride (5 mg/kg) + xylazine (2 mg/kg), and anesthesia monitoring indexes were recorded. **Results** There were no significant differences in anesthesia onset time and awake time between groups A and B ($P > 0.05$), and the awake time of anesthesia in groups A and B was significantly longer than that in group C ($P < 0.05$). **Conclusion** Ketamine hydrochloride (10 mg/kg) combined with xylazine (1.5–2 mg/kg) anesthesia has a rapid effect, stable anesthesia depth, no obvious movement, and satisfactory safety. It can be used in short procedures, diagnoses, and treatments.

[Key words] Ketamine hydrochloride; Xylazine; Bama miniature pig; Combined anesthesia

[第一作者] 申 晨(1997—), 大学专科, 技士, 研究方向: 动物麻醉。E-mail: shenchen@fuwai.com

[通信作者] 李 彬(1987—), 硕士, 助理研究员, 研究方向: 生物医学工程、医疗器械临床前评价。E-mail: libin@fuwai.com。ORCID: 0000-0002-7614-8488

巴马小型猪是科学研究中常用的大型动物,目前研究人员已用其建立了一系列正常生理及内外科疾病模型^[1]。因为猪对研究刺激尤其敏感,易躁动挣扎,影响实验操作进行,因此很多疾病模型实验都需要动物在麻醉状态下进行。氯胺酮,是一种拟交感麻醉药物,无肌松作用,可维持较短时间麻醉。赛拉嗪是一种强效 α_2 肾上腺素受体激动剂,具有镇静、镇痛和肌松作用^[2]。在动物实验中,常使用氯胺酮和赛拉嗪复合麻醉后保定动物并进行短时间手术或处置^[3]。但目前不同动物实验中心多根据经验给药,无统一给药标准,麻醉有效性及安全性无循证依据保证。因此,本研究拟将36只巴马小型猪根据不同麻醉药物剂量分成3组,探讨不同剂量氯胺酮和赛拉嗪复合麻醉巴马小型猪的麻醉有效性及对肝肾功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性巴马小型猪36只,平均体质量为 (31.0 ± 2.8) kg $(28 \sim 37$ kg),均由中国科学院动物研究所[SCXK(京)2018-0005]提供,质量合格证编号为110350211100004441、110350211100003858。所有动物均健康状况良好,检疫合格。实验动物饲养于中国医学科学院阜外医院动物实验中心[SYXK(京)2019-0041]。

1.2 实验设计

本实验选取36只巴马小型猪,随机分成3组,采用不同剂量的麻醉药物诱导麻醉。探究不同剂量的氯胺酮和赛拉嗪诱导麻醉的麻醉效果。动物实验均在心血管植入材料临床前研究评价北京市重点实验室完成(依托单位为中国医学科学院阜外医院动物实验中心),并经中国医学科学院阜外医院实验动物管理与使用委员会批准[伦理批号为0102-1-36-HX(X)-32]。

1.3 麻醉药品与实验仪器

盐酸氯胺酮注射液[每2 mL含100 mg,购自江苏中牧倍康药业有限公司];盐酸赛拉嗪注射液[每2 mL含200 mg,购自长沙拜特生物科技研究所有限公司];兽用全自动生化分析仪(型号Catalyst One,美国IDEXX公司)。

1.4 实验分组

36只巴马小型猪采用随机数字表法随机分成3组,每组12只,使用不同剂量的麻醉药物:A组为氯胺酮

10 mg/kg + 赛拉嗪2 mg/kg; B组为氯胺酮10 mg/kg + 赛拉嗪1.5 mg/kg; C组为氯胺酮5 mg/kg + 赛拉嗪2 mg/kg。

1.5 麻醉方法

根据动物体质量及分组计算两种麻醉药物用量,将药物混合后对3组巴马小型猪进行肌肉注射麻醉诱导,注射部位为颈后肌肉。不进行任何维持麻醉。

1.6 观察指标

观察麻醉诱导时间、麻醉维持时间和麻醉清醒时间。麻醉诱导时间是指自肌肉注射麻醉药物至动物卧卧安静、眼睑反射消失的时间;麻醉维持时间是指无外界刺激的情况下,自动卧卧安静、眼睑反射消失至动物眼睑反射恢复、肢体恢复自主活动的时间;麻醉清醒时间是指在无外界刺激的情况下,自动卧卧安静、眼睑反射消失至动物可以完全站立并自主运动的时间。

同时记录动物在麻醉过程中的体动情况,标准为麻醉过程中出现的任意可观察到的自主肌肉运动。

1.7 血液生化检测

待巴马小型猪无反抗能力时,穿刺前腔静脉,采集静脉血3 mL,应用兽用全自动生化分析仪进行血液生化指标检测,以反映动物肝肾功能变化。

1.8 统计学分析

使用SPSS 26.0统计学软件进行统计分析。应用Shapiro-Wilk检验数据分布正态性。所有连续性变量均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分类变量使用计数(百分比)表示。正态分布的两组数据采用 t 检验比较,正态分布的多组数据采用单因素方差分析比较;非正态分布的多组数据采用Kruskal-Wallis H 检验比较。多组比较后,两两比较均采用Bonferroni法进行校正。所有比较均采用双侧检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 麻醉效果评估

3组巴马小型猪均存在自主呼吸。A组及B组动物均侧卧,提示进入麻醉状态;C组动物均趴卧,提示麻醉深度较浅。给药后A组及B组麻醉诱导时间短于C组($P = 0.001$ 及 $P = 0.021$, Bonferroni法两两比较)。

由于C组动物诱导后一直存在自主肌肉活动,难以判断C组动物是否“可以自主活动的时间”,因此未记录C组动物麻醉维持时间。A组及B组麻醉维持时间

差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

A 组及 B 组麻醉清醒时间明显长于 C 组 ($P < 0.001$ 及 $P = 0.001$, Bonferroni 法两两比较)。

A 组及 B 组所有动物均未出现明显体动; C 组动物均在麻醉过程中出现体动, 其中明显体动发生率为 41.7% (5/12), 见表 1。

表 1 三种剂量的组合麻醉药物诱导巴马小型猪的麻醉效果

Table 1 Anesthetic effects of three doses of combined anesthetics on Bama miniature pigs

项目 Items	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	P 值 P value
诱导成功时间 Induction time/min	5 ± 2	6 ± 2	10 ± 3	0.001
麻醉维持时间 Anesthesia maintenance time/min	50 ± 13	45 ± 7	-	0.317
麻醉清醒时间 Anesthesia awake time/min	70 ± 14	62 ± 9	35 ± 10	<0.001

注: C 组动物诱导后一直存在自主肌肉活动, 难以定义 C 组动物 “可以自主活动的时间”, 因此未记录 C 组动物麻醉维持时间。
Note: Animals in group C have always had voluntary muscle activity after induction. The "time when animals can move on their own" in group C is difficult to define, therefore, the anesthesia maintenance time of the animals in group C was not recorded.

2.2 麻醉动物肝肾功能相关指标的检测结果

评估 3 种剂量麻醉药物诱导后巴马小型猪肝肾功能的变化 (表 2), 发现 3 组动物肌酐及尿素氮水平无显著差异, 表明 3 种麻醉药物对肾功能无明显影响;

然而 3 组动物谷丙转氨酶存在明显差异 ($P = 0.031$), 但两两比较未发现任意两组间存在统计学差异 ($P > 0.05$, Bonferroni 法两两比较)。综上, 结果表明, 3 种剂量的麻醉药物对动物肝肾功能的影响无明显差异。

表 2 三种剂量的组合麻醉药物诱导后巴马小型猪的肝肾功能影响

Table 2 Impact of three doses of combined anesthetics on hepatic and renal function of Bama miniature pigs

项目 Items	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	P 值 P value
肌酐 Creatinine $c/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	66.25 ± 10.08	70.25 ± 13.10	70.58 ± 13.00	0.627
尿素氮 Urea nitrogen $c/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	2.73 ± 1.00	2.83 ± 1.01	2.16 ± 0.83	0.181
谷丙转氨酶 Alanine aminotransferase $z/(\text{U}\cdot\text{L}^{-1})$	71.17 ± 12.81	84.42 ± 15.10	85.08 ± 13.51	0.031
谷草转氨酶 Aspartate aminotransferase $z/(\text{U}\cdot\text{L}^{-1})$	48.83 ± 25.51	47.83 ± 15.07	52.33 ± 17.23	0.600
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase $z/(\text{U}\cdot\text{L}^{-1})$	114.50 ± 73.07	99.42 ± 48.44	103.67 ± 39.21	0.806
总胆红素 Total bilirubin $c/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	4.00 ± 0.95	3.83 ± 1.03	4.17 ± 1.99	0.934

3 讨论

在动物实验中, 常使用氯胺酮和赛拉嗪复合麻醉后进行动物保定, 采血送检, 血压、心电图、超声心动图检查等短时间操作。目前各动物实验中心多根据经验给药: 龚宝勇等^[4]按照盐酸氯胺酮注射液 10 mg/kg 和赛拉嗪注射液 1 mg/kg 的剂量麻醉藏麻小型猪, 探究复合麻醉对猪血压和脉搏的影响, 结果表明盐酸氯胺酮与赛拉嗪复合麻醉对藏麻小型猪血压、脉搏变化无明显影响; 焦昆等^[5]将氯胺酮和速眠新按照 2 mL: 1.5 mL 比例混合, 认为 0.3 ~ 0.4 mL/kg 可以作为安全剂

量用于小型猪的麻醉; 黄佩娣等^[6]在实验猪经自然腔道内窥镜手术中分别应用速眠新 II (2 mL) 或氯胺酮 (2~3 mg/kg) 复合丙泊酚, 比较麻醉效果, 结果表明速眠新 II 或氯胺酮诱导复合丙泊酚麻醉用于实验猪内窥镜手术可获得安全麻醉效果。本研究将 36 只巴马小型猪分为 3 组, 采用不同剂量的氯胺酮与赛拉嗪复合, 希望可以得到满足麻醉效果要求且对动物影响最低的麻醉剂量。结果显示, A 组联合应用氯胺酮 10 mg/kg 及赛拉嗪 2 mg/kg 可维持平均 (50±13) min 的麻醉时间, B 组联合应用氯胺酮 10 mg/kg 及赛拉嗪 1.5 mg/kg 可维持平均 (45±7) min 的麻醉时间, 每组 12 只动物

的麻醉维持时间符合正态分布, 可认为数据较为稳定, 可为科研工作人员根据所需维持时间选择麻醉药物剂量提供参考。

氯胺酮是一种分离麻醉药, 可在抑制部分大脑皮层的同时兴奋另一部分, 如可兴奋交感神经中枢并提高心率, 同时抑制大脑联络途径和丘脑的兴奋性神经递质, 以产生麻醉效果; 其主要用于不需要肌肉松弛的麻醉、短时间的手术和诊疗处置。而赛拉嗪是一种镇痛性化学保定药物, 作用于中枢, 可呈现良好的镇静、镇痛和肌松作用^[2, 7]。本研究结果发现, C组麻醉药物剂量无法维持稳定的麻醉效果, 表明在不改变赛拉嗪剂量的情况下, 将氯胺酮剂量减半难以得到满意的麻醉效果。氯胺酮在肝脏内主要经脱甲基和羟基化代谢, 代谢物及原形药物随尿液排出。赛拉嗪经肾脏部分代谢。本研究检测血液生化指标中肝肾功能指标时, 未在3组间发现具有统计学意义的明显差异。因此可认为, 氯胺酮5~10 mg/kg复合赛拉嗪1.5~2 mg/kg不会对肝肾代谢产生显著性影响。

需要指出, 本研究未进行有创动脉血压及心电图监测, 无血压、心率等生命体征数据, 因此结果需辩证讨论; 另外, 本研究仅设置3组麻醉药物剂量, 在今后研究中可考虑设置药物剂量梯度, 以期得到最佳剂量。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究设计的所有动物实验均已通过中国医学科学院阜外医院实验动物管理与使用委员会批准(伦理批号为0102-1-36-HX(X)-32)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences [IACUC No. 0102-1-36-HX(X)-32], and were carried out following the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892—2018), ARRIVE 2.0, IGP 2012 and IAVE Guideline 2010.

[作者贡献 Author Contribution]

李彬负责实验思路构思、审核并修改终稿; 申晨负责实验实施、数据整理及初稿撰写; 张宝杰与王学民负责实验实施; 朱瑾彦与张敏负责数据记录与数据分析。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] RUBIC-SCHNEIDER T, CHRISTEN B, BRES D, et al. Minipigs in translational immunosafety sciences: a perspective[J]. *Toxicol Pathol*, 2016, 44(3): 315-324. DOI: 10.1177/019262331-5621628.
- [2] 邓小明, 姚尚龙, 于布为. 现代麻醉学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 476-483, 503-509.
DENG X M, YAO S L, YU B W, et al. *Modern anesthesiology* [M]. 4th edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2014: 476-483, 503-509.
- [3] 李博岩, 陆曼. 猪麻醉方法浅谈[J]. *中国动物保健*, 2015, 17(5): 20-21. DOI: 10.3969/j.issn.1008-4754.2015.05.013.
LI B Y, LU M. Discussion on anesthesia methods of pigs[J]. *China Animal Health*, 2015, 17(5): 20-21. DOI: 10.3969/j.issn.1008-4754.2015.05.013.
- [4] 龚宝勇, 杨镇宇, 刘晓霖, 等. 噻拉嗪和氯胺酮复合麻醉对苏麻小型猪血压和脉搏的影响[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2016, 41(6): 24-26. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8567.2016.06.007.
GONG B Y, YANG Z Y, LIU X L, et al. Effects of blood pressure and pulse in Juema minipigs with xylazine-ketamine combined anesthesia[J]. *Guangdong J Animal Vet Sci*, 2016, 41(6): 24-26. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8567.2016.06.007.
- [5] 焦昆, 朱力鸣, 卢静. 氯胺酮和速眠新 II 复合麻醉剂量对巴马小型猪的麻醉效果及影响[J]. *实验动物科学*, 2016, 33(5): 57-60. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2016.05.011.
JIAO K, ZHU L M, LU J. The anesthesia effects of ketamine and sumianxin II on Bama MiniPig[J]. *Lab Animal Sci*, 2016, 33(5): 57-60. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2016.05.011.
- [6] 黄佩娣, 李海文, 郑焕填, 等. 陆眠宁 II 与氯胺酮复合丙泊酚用于实验猪经自然腔道内窥镜手术的效果观察[J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(3): 242-247. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.03.012.
HUANGPD, LIHW, ZHENGHT, et al. Observation of lumingning II or ketamine combined with propofol in experimental pigs undergoing natural orifice transluminal endoscopic surgery [J]. *Lab Animal Comp Med*, 2020, 40(3): 242-247. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.03.012.
- [7] 李荣誉, 王笃学, 崔耀明. 兽医药理[M]. 4版. 郑州: 河南科学技术出版社, 2012.
LI R Y, WANG D X, CUI Y M. *Veterinary pharmacology* [M]. 4th Edition. Zhengzhou: Henan

(收稿日期: 2021-07-27 修回日期: 2022-03-07)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 崔占鼎)

《实验动物与比较医学》创刊于1981年,是我国实验动物科学领域内第一本专业性学术刊物,主要报道实验动物与比较医学方面的最新研究成果、实验方法和技术。为加强产学研合作,以期刊为媒介凝聚行业力量,促进国内实验动物和比较医学领域有关科研单位及技术企业的横向交流和科技创新,自2006年起成立《实验动物与比较医学》刊务理事会。

2022年《实验动物与比较医学》刊务理事会理事长由《实验动物与比较医学》编辑部法人代表担任,秘书长由《实验动物与比较医学》编辑部负责人担任。秘书长在理事会领导下负责日常工作。秘书处设在《实验动物与比较医学》编辑部。本会以自愿参加为原则,随时接纳新的申请单位,欢迎全国各地企事业单位加盟,共谋实验动物与比较医学行业大发展。

《实验动物与比较医学》2022年刊务理事会名单

理 事 长

范 春 主任 上海实验动物研究中心

副理事长

赵 勇 副部长 上海实验动物研究中心科研管理部

周正宇 主任 苏州大学实验动物中心

夏长友 主任 哈尔滨兽医研究所

王靖宇 主任 大连医科大学实验动物中心

袁 进 副主任 南方医科大学实验动物中心

理 事

李 焱 主任 上海交通大学医学院实验动物科学部

王德军 主任 浙江中医药大学动物实验研究中心

王 刚 主任 广东省医学实验动物中心

李 娜 高级工程师 中国科学院上海药物研究所实验动物室

刘恩歧 主任 西安交通大学医学院实验动物中心

刘忠华 主任 华南农业大学实验动物中心

应华忠 主任 浙江省实验动物中心

顾美儿 副主任 杭州师范大学实验动物中心

张 泉 主任 扬州大学比较医学中心

王可洲 常务副主任 山东省实验动物中心

施 恩 总经理 上海斯莱克实验动物有限责任公司

汪亚兵 总经理 上海开纯洁净室技术工程有限公司

吴 强 总经理 江苏苏净集团苏州苏净节能科技有限公司

吴征宏 总经理 安维迪生命科学(浙江)有限公司

魏 然 总经理 泰尼百斯实验室设备贸易(上海)有限公司

崔锦鹏 总经理 上海开上生物医学科技有限公司

刘建中 总经理 上海业腾机电工程有限公司

秘 书 长

张俊彦 《实验动物与比较医学》编辑部