实验动物与比较医学

Shiyan Dongwu Yu Bijiao Yixue

期刊网站

双月刊　1981年9月创刊　第43卷　第4期（总第200期）　2023年8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。2023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

华东会议优秀论文展

实验动物微生物、寄生虫学等级及监测标准的变化及与国外标准的比较
郭连香 …… 339

供应商来源的实验大鼠和小鼠微生物监测结果分析: 以复旦大学实验动物科学部为例
黄　缨，韦思羽，蔡　莉，强苏静，李冬婷，丁玉强 …… 347

食蟹猴分娩行为分析
卞新彦，陆　勇，王　燕，孙　强 …… 355

BALB/cA.Cg.SHJH^{hr}小鼠的培育及其相关遗传学特性分析
谈小倩，杨　颢，唐慧青，瞿　伟，李　亮，钱　珍，顾坚忠，肖君华，徐　平 …… 363

山羊先兆子痫疾病模型的构建及母体生物学特性评价
卢　今，王　剑，朱　莲，严国锋，马政文，李　垚，戴建军，朱寅秋，周　晶 …… 371

人类疾病动物模型

肺动脉高压动物模型及其在药物研究中的应用进展
俞佳慧，巩　倩，庄乐南 …… 381

痤疮动物模型建立及评价研究进展
张　睿，吕美豫，张建军，刘金莲，陈　彦，黄志强，刘　尧，周澜华 …… 398

皮肤光老化动物模型制备要素和受试物数据的文献分析
邓亚胜，林　江，甘池伶，曾官凤，黄嘉茵，邓慧芳，麻颖贤，韩丝银 …… 406

糖尿病小鼠模型的常见种类及其构建要素分析
王　雪，呼永河 …… 415

卵巢储备功能减退动物模型的造模方法评价与分析
黄　慧，邓亚胜，梁天薇，郑艺清，范燕萍，荣　娜，林　江 …… 422

基于VOSviewer的肌少症动物模型研究可视化分析
相　磊，景金珠，梁　震，阎国强，郭文峰，张　萌，张　威，刘亚军 …… 429

病例报告

一例树鼩毛发上皮瘤的诊断及细胞生物学特性观察

翟珊珊，梁　亮，曹颖颖，李竹欣，王　青，陶俊宇，运晨霞，冷　静，唐海波 …… 440

比较医学研究与报告规范

《动物研究：体内实验报告》即ARRIVE 2.0指南的解释与阐述（三）

刘晓宇，卢选成，师晓萌，张雨舟，吕　超，陈国元，卢　晓，白　玉，高　静，李　垚，刘永刚，陶雨风，庞万勇 …… 446

实验动物与比较医学科创团队推介

上海交通大学实验动物中心 …… 457

山西医科大学实验动物中心 …… 459

读者-作者-编者

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会名单 …… 前插8

《实验动物与比较医学》2023年征订启事 …… 354

《实验动物与比较医学》被WHO西太平洋地区医学索引（WPRIM）收录 …… 362

《实验动物与比较医学》被国际数据库EBSCO收录 …… 370

有关《食蟹猴缺血再灌注模型的建立及依达拉奉干预作用》一文的撤稿声明 …… 414

《实验动物与比较医学》有关更正与撤稿的政策说明 …… 421

《实验动物与比较医学》出版伦理声明 …… 428

谈家桢院士题词 …… 英文目次页后插页

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*122*zh*P*￥30.00*2000*15*2023-08

（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）

本期责任编委　王朝霞

本期审稿专家　蔡兆伟　陈　丽　陈民利　代解杰　丁玉强　杜小燕　范　薇　冯　洁
付　瑞　富群华　罕园园　和占龙　金　帆　李　峰　李　娜　李　垚
李长龙　卢　健　吕龙宝　乔世刚　邵奇鸣　沈如玲　史仍飞　宋晓明
孙　强　王朝霞　王含必　王　健　王玉珏　魏　强　吴宝金　徐　平
姚　明　张　璇　张　周　周晓辉　周正宇　朱滕滕　卓振建

本期责任编辑　张俊彦　丁宇菁

本期责任排版　王伟民

本期特邀编校　富群华　陶启辰　刘晓宇　孙　琛

本期实习编校　郭家欣　洪　怡　娄怡欣　陆佳雯　任益凡　王　艳　王艳君　吴昊晟
周　培　周　烁　周晓铧

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly Established in September, 1981 Volume 43, Issue 4 August 25, 2023

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© 2023 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 Editors for This Issue
ZHANG Junyan, WANG Zhaoxia

CONTENTS IN BRIEF

Excellent Papers at the East China Conference

Revision of Standards for Microbiological and Parasitological Grades in Laboratory Animals and Its Comparison to Foreign Standards
GUO Lianxiang ····· 339

Microbiological Monitoring Analysis of Laboratory Rats and Mice from Vendors: Department of Laboratory Animal Science of Fudan University as an Example
HUANG Ying, WEI Siyu, CAI Li, QIANG Sujing, LI Dongting, DING Yuqiang ····· 347

Analysis of the Birthing Behaviour of Cynomolgus Macaques
BIAN Xinyan, LU Yong, WANG Yan, SUN Qiang ····· 355

Creation and Analysis of Related Genetic Characteristics of BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} Mice
TAN Xiaoqian, YANG Hao, TANG Huiqing, QU Wei, LI Liang, QIAN Zhen, GU Jianzhong, XIAO Junhua, XU Ping ····· 363

Establishment of Preeclampsia Model in Goat and Evaluation on Maternal Biological Characteristics
LU Jin, WANG Jian, ZHU Lian, YAN Guofeng, MA Zhengwen, LI Yao, DAI Jianjun, ZHU Yinqiu, ZHOU Jing ····· 371

Animal Models of Human Diseases

Animal Models of Pulmonary Arterial Hypertension and Their Application in Drug Research
YU Jiahui, GONG Qian, ZHUANG Lenan ····· 381

Research Progress on Establishing and Evaluation of Acne Animal Models
ZHANG Rui, LÜ Meiyu, ZHANG Jianjun, LIU Jinlian, CHEN Yan, HUANG Zhiqiang, LIU Yao, ZHOU Lanhua ····· 398

Literature Analysis of the Preparation Elements of Animal Models of Skin Photoaging and the Data of Subjects
DENG Yasheng, LIN Jiang, GAN Chiling, ZENG Guanfeng, HUANG Jiayin, DENG Huifang, MA Yingxian, HAN Siyin ····· 406

Analysis of Common Types and Construction Elements of Diabetic Mouse Models
WANG Xue, HU Yonghe ····· 415

Evaluation and Analysis of Modeling Methods for Animal Models with Diminished Ovarian Reserve
HUANG Hui, DENG Yasheng, LIANG Tianwei, ZHENG Yiqing, FAN Yanping, RONG Na, LIN Jiang ····· 422

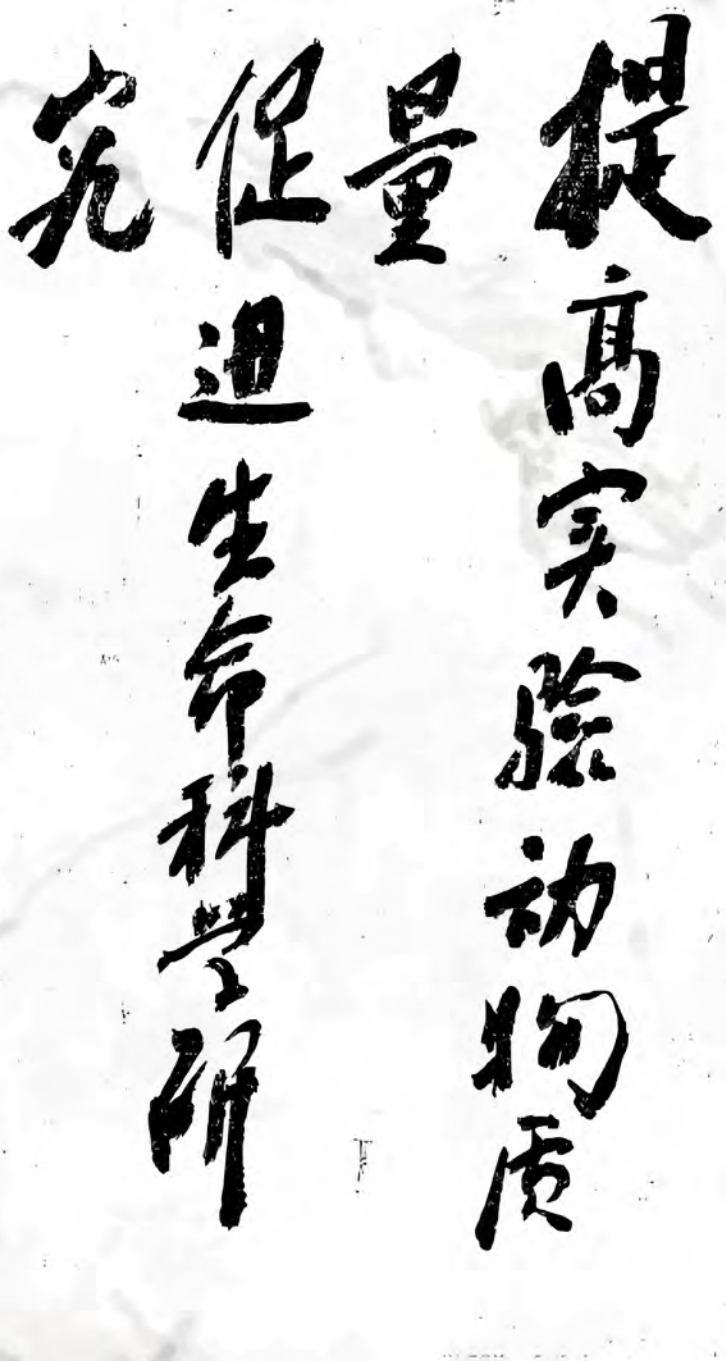
A Visual Analysis on Animal Model of Sarcopenia Based on VOSviewer
XIANG Lei, JING Jinzhu, LIANG Zhen, YAN Guoqiang, GUO Wenfeng, ZHANG Meng, ZHANG Wei, LIU Yajun ····· 429

Case Report

Diagnosis of Trichoepithelioma in a Tree Shrew and Observation of Cell Biological Characteristics
ZHAI Shanshan, LIANG Liang, CAO Yingying, LI Zhuxin, WANG Qing, TAO Junyu, YUN Chenxia, LENG Jing, TANG Haibo ····· 440

Guidelines for Comparative Medical Research and Reporting

Explanation and Elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—Reporting Animal Research and *In Vivo* Experiments (Ⅲ)
LIU Xiaoyu, LU Xuancheng, SHI Xiaomeng, ZHANG Yuzhou, LÜ Chao, CHEN Guoyuan, LU Xiao, BAI Yu, GAO Jing, LI Yao, LIU Yonggang, TAO Yufeng, PANG Wanyong ····· 446



——我国现代遗传学奠基人、本刊前名誉主编谈家桢院士的题词，
原刊登于本刊1986年第2期。

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.088

郭连香，苏州西山生物技术有限公司总经理，从事实验动物微生物检测和质量控制工作17年，多次赴美国病毒参考实验室（Virus Reference Laboratory，VRL）参与实验动物质量检测和控制相关培训。现任中国兽医协会实验动物分会副会长、灵长类实验动物协会理事、中国实验动物学会CRO（Clinical Research Organization）实验动物管理工作委员会委员等社会职务。参与修订了国家标准GB 14922—2022《实验动物微生物、寄生虫学等级及监测》，参与起草了行业标准SN/T 4291—2015《猴免疫缺陷病毒斑点酶免疫法检疫技术规范》、团体标准T/CLPBDA 0002—2022《猕猴疱疹病毒I型（B病毒）检测方法》和T/CLPBDA 0002—2022《猴感染结核分枝杆菌复合群的筛查方法》。参与了专业书籍《Perry小鼠实验标本采集》、《Perry小鼠实验实用解剖》、《实验动物疫病学》、《中国农业百科全书》部分章节的编撰工作。

实验动物微生物、寄生虫学等级及监测标准的变化及与国外标准的比较

郭连香

（苏州西山生物技术有限公司，苏州 215021）

[摘要] 2023年7月1日，新的国家标准GB 14922—2022《实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测》正式实施。本文是基于第十六届华东地区实验动物学术交流会上的报告演讲稿整理而成，内容主要是介绍和分析国家标准GB 14922—2022在修订前后的主要变化，同时将新的国家标准与国际上其他机构的实验动物质量控制标准或指南进行比较，并对我国实验动物设施运行主体在制定动物微生物质量监测方案时应该关注的重要问题做一简要讨论，以供同行交流与参考。

[关键词] 国家标准； 微生物； 实验动物； 质量监测方案

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)04-0339-08

Revision of Standards for Microbiological and Parasitological Grades in Laboratory Animals and Its Comparison to Foreign Standards

GUO Lianxiang

(Suzhou Xishan Biotech Inc. , Suzhou 215021, China)

Correspondence to: GUO Lianxiang (ORCID:0009-00009-9723-5001), E-mail: 15950006260@163.com

[ABSTRACT] The national standard, GB 14922-2022 on "Laboratory Animal Microbiological and Parasitical standards and monitoring " was implemented on July 1st, 2023. This article is compiled according to the speech of the 16th East China Laboratory Annual meeting, explores and critically analyzes the developments made to the revised standard and examines how this framework compares with quality control programs of other established international institutions. The key aspects of establishing quality monitoring programs for animal-associated microorganisms in laboratory animal facilities are briefly discussed.

[Key words] National standards; Microorganisms; Laboratory animals; Quality monitoring program

一直以来，实验动物微生物控制标准化是实验动物质量标准化的重要内容之一。为了实现这种标准化，业界一直在不断努力，经过一个多世纪的不断探索，摸索出了一套相对行之有效的实践经验。在此基础上，

[第一作者] 郭连香（1983—），女，学士，研究方向：实验动物质量检测、检测实验室建立和标准化。E-mail：15950006260@163.com。ORCID：0009-00009-9723-5001

欧洲实验动物联合会（Federation of European Laboratory Animal Science Associations，FELASA）、美国杰克逊实验室（Jackson Laboratory，JAX）、美国查士瑞华实验室（Charles River Laboratory，CRL）等机构和实验室都制定了实验动物微生物质量控制方案并定期或不定期更新[1-3]。与此同时，我国实验动物产业虽起步较晚，但发展迅速。除了保证实验动物研究结果的准确性和可靠性外，为提高实验动物科技产业的高质量发展水平，同样需要就动物微生物质量控制的多个方面展开深入讨论，不断优化现有体系，降低生物安全风险，有效促进我国实验动物质量提升[4]。

1994年，我国颁布了首个实验动物微生物质量控制国家标准，并于2001年和2010年分别进行了修订[5-6]；2022年12月，最新修订的国家标准《实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测》（GB 14922—2022）已经发布，并于2023年7月1日开始正式实施[7]。本文基于新版国家标准GB 14922—2022的内容，介绍和分析了这一标准在修订前后的主要变化，以及与国际上其他机构发布的实验动物质量控制标准或指南的比较差异，并且就实验动物设施运行主体在制定微生物质量监测方案时应该关注的重要问题进行简要讨论，以供同行交流与参考。

1 国家标准的主要修订内容

本次标准修订主要做了以下几个方面的变动：将《实验动物 寄生虫学等级及监测》（GB 14922.1—2001）和《实验动物 微生物学等级及监测》（GB 14922.2—2011）的内容进行了合并；取消了清洁级动物的术语、定义和监测项目要求；对各种级别实验动物的监测项目清单中部分病原体进行了删除、修改、增加和调整；增加了“选取哨兵动物作为检测用动物”[5-7]。

1.1 清洁级动物概念取消后的管理变更

“清洁级动物”是我国实验动物微生物标准化过程中曾作为普通级向无特定病原体（specific pathogen-free，SPF）级过渡的妥协产物。在过去较长的时间内，清洁级动物的等级划分为实验动物生产和使用单位提供了一个缓冲区，到现阶段它已经基本完成了其使命。本质上而言，清洁级动物是排除的病原体种类较少的SPF级动物。本次国家标准修订取消这一定义后，目前仍持有“清洁级”实验动物生产和使用许可证的单位应根据各自所在地区的主管部门的要求，将原证书取消或增加须排除的病原体检测后升级为“SPF级”许可证。这个过程中可能涉及设施改造、重新检测设施环境、对动物进行微生物质量检测、修改现有动物管理制度和操作规程、动物净化或重新引种等多方面的工作，需要根据各地实际情况来调整相关管理办法。

1.2 监测项目清单变化及与国外标准的比较

在监测项目清单方面，修改后的国家标准与之前的标准相比，变化内容包括：删除了小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠（即地鼠）、兔的兔脑原虫、小肠结肠炎耶尔森菌、皮肤病原真菌、念珠状链杆菌，以及小鼠和大鼠的假结核耶尔森菌；把小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔的金黄色葡萄球菌修改为必要时检测项；把小鼠的鼠痘病毒、大鼠的冠状病毒/涎泪腺炎病毒、猴的猴痘病毒修改为必要时检测项；此外，针对免疫缺陷小鼠，增加了牛棒状杆菌和小鼠诺如病毒（murine norovirus，MNV）作为必要时检测项目[5-7]。详见表1。

从以上变动可以看出，国家标准对监测项目清单“做减法”的同时，也在根据国内实际情况和国外实验动物设施管理经验进行了一定的更新。以小鼠病毒为例，与国外机构和组织的监测项目清单如FELASA的年度检测清单[1]、JAX的监测病原体清单[3]和CRL实验室的PRIA®（PCR Rodent Infectious Agents）全项套餐相比[2]，目前我国的国家标准的检测项目数量还比较少（表2）。这就需要实验动物使用单位根据自己的实际需求调整清单；实验动物生产单位为了满足各种类型客户的多样化需求，需要制定一个包含更多病原体的监测清单，以便在市场竞争中获得优势。除了检测项目数量外，还有一些检测种类上的差异，例如国家标准要求小鼠检测“支原体*Mycoplasma* spp.”，但欧美国家要求对小鼠检测“肺支原体*Mycoplasma pulmonis*”；再比如，国家标准中要求小鼠检测的鞭毛虫没有具体到种，而CRL的PRIA®全项套餐中则指定要求检测贾第鞭毛虫、鼠六鞭毛虫、唇鞭毛虫和毛滴虫[2,5-8]。

1.3 取消要求的项目说明

新版国家标准取消检测要求的几种病原体主要是基于多年来持续极低的检出率。例如，根据笔者所在的第三方检测机构苏州西山生物技术有限公司（下文简称西山生物）近五年的检测数据，小鼠的假结核耶尔森菌（n=951）、小肠结肠炎耶尔森菌（n=967）、皮肤病原真菌（n=959）、兔脑原虫（n=3 351）均未检测到阳性样本，小鼠腺病毒阳性率为0.41%（n=4 142）。不过也有例外，例如兔脑原虫在实验兔中尚有较高的

表1 国家标准GB 14922—2022中实验动物微生物和寄生虫监测项目变化

Table 1 The changes of microbiological and parasitological monitoring lists in national standard GB 14922-2022

变化类别 Change category	监测项目(微生物和寄生虫) Monitoring items (microorganisms and parasites)	动物种属 Animal species or genera
删除 Cancel	兔脑原虫 *Encephalitozoon cuniculi*	小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔
	小肠结肠炎耶尔森菌 *Yersinia enterocolitica*	
	皮肤病原真菌 *Pathogenic dermal fungi*	
	念珠状链杆菌 *Streptobacillus moniliformis*	
	假结核耶尔森菌 *Yersinia pseudotuberculosis*	小鼠、大鼠
变更为“必要时检测” Changed to 'Test if necessary'	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔
	鼠痘病毒 Ectromelia virus	小鼠
	大鼠冠状病毒/涎泪腺炎病毒 Rat coronavirus/sialodacryoadenitis virus	大鼠
	猴痘病毒 Monkeypox virus	猴
增加 Addition	牛棒状杆菌 *Corynebacterium bovis*	免疫缺陷小鼠
	小鼠诺如病毒 Mouse norovirus	
名称变更 Name change	猴痘病毒的英文名称从 Simian pox virus 变为 Monkeypox virus	猴
	卡氏肺孢子虫 *Pneumocystis carinii* 变更为肺孢子菌属 *Pneumocystis* spp.	小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔
	大肠埃希菌 *O115 a,C,K(B)* 变更为啮齿柠檬酸杆菌 *Citrobacter rodentium*	小鼠、大鼠

感染率（17.9%，n=526），但通常是隐性感染，发病率低。因此，本次标准修订将这个项目取消后，对于那些在研究中使用兔且需要排除这个病原体的实验设施，以及需要满足这类客户要求的生产单位而言，就需要制定个性化的监测项目清单。

1.4 改为必要时检测的项目说明

本次标准修订时将必须检测项目修改为必要时检测的有SPF级小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠和兔的金黄色葡萄球菌，SPF级小鼠的鼠痘病毒，SPF级大鼠的大鼠冠状病毒/涎泪腺炎病毒，SPF级猴的猴痘病毒。从西山生物2022年的检测数据看，大鼠中金黄色葡萄球菌有12.56%（n=1 154）的检出率，但小鼠中检出率较低，仅有0.28%（n=8 228）。此外，潘金春等[9]报告2013—2015年广东省实验小鼠的金黄色葡萄球菌检出率为0.7%（n=858），实验大鼠的金黄色葡萄球菌检出率为2.9%（n=104）。由于健康人体表有25%左右的金黄色葡萄球菌带菌率[10-12]，因此对于采用开放式笼具饲养的大鼠而言，金黄色葡萄球菌的控制尤为困难。在免疫功能正常的动物中，金黄色葡萄球菌的定植通常都是无症状的，但如果皮肤发生破损，则容易发生继发感染[13]。值得一提的是，金黄色葡萄球菌并非唯一可以定植并导致感染的葡萄球菌，木糖葡萄球菌、松鼠葡萄球菌等定植并导致动物出现皮肤病变在临床上也时有发生[14-15]。

另一个由“必须检测”修改为“必要时检测”的重要病原体是鼠痘病毒。该病毒感染小鼠后往往会造成较高的发病率和病死率，发病动物出现眼睑炎、皮肤破损，甚至四肢和尾部脱落等有特征性的病变[16]。随着管理水平的提升，很多实验动物机构已经多年未见动物感染该病毒，每年仅能从个别设施送检的样本中检测到阳性结果，例如2022年西山生物对该病毒的检测阳性率只有0.1%（n=7 822）。潘金春等[9]报告，2013—2015年广东省该病毒检出率为0.3%（n=875）。

大鼠冠状病毒/涎泪腺炎病毒、猴痘病毒也由必须检测项目修改为必要时检测项目。不过这种修改并不意味着设施管理者可以忽视这些病原的监测，在怀疑有本病流行、引入进口动物等情况下，还是应该检测确认。

1.5 新增检测项目说明

本次国家标准的监测项目清单中，虽然大多数变动是删除罕见病原体或将一些病原体从必须检测项目修改为必要时检测项目，但同时也根据啮齿类动物微生物检出情况以及这些病原体对动物和实验的影响程度，选择性地增加了免疫缺陷小鼠需要排除MNV和牛棒状杆菌两种病原体。

MNV是实验小鼠中感染率最高的病原体之一。西山生物2018—2022年检测数据显示MNV阳性率为13.96%（n=7 741）。刘芳妮等[17] 2023年对北京19家公司的5种品系共1 396份实验小鼠粪便样本进行MNV检测，结果显示不同品系小鼠的阳性率为10%～40%。美国CRL实验室2009年公布欧洲3年、北美5年的MNV阳性率32.37%[18]。免疫正常和大多数免疫缺陷小鼠感染MNV后不会表现临床症状，但干扰素α、β、γ受体和信号转导和转录激活因子1（signal transducers

表2 不同标准的小鼠病毒监测项目

Table 2 Mouse virus lists of different standards

病毒 Virus	国家标准[a] National standards		FELASA[b]	JAX[c]	CRL[d]
	2022	2011			
鼠痘病毒 Ect.	○	●	○	●	○
小鼠肝炎病毒 MHV	●	●	●	●	●
仙台病毒 SV	●	●	○	●	○
小鼠肺炎病毒 PVM	●	●	○	●	○
呼肠孤病毒Ⅲ型 Reo-3	●	●	○	●	●
小鼠微小病毒 MVM	●	●	●	●	●
汉坦病毒 HV	○	○	◎	●	○
淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 LCMV	○	○	○	●	●
小鼠脑脊髓炎病毒 TMEV(GDV Ⅱ)	○	○	●	●	●
小鼠腺病毒 MDA	取消	○	○	●	●
多瘤病毒 POLY	○	○	◎	●	○
小鼠轮状病毒 RRV			●	●	●
小鼠细小病毒1&2 MPV 1 & 2			●	●	●
小鼠诺如病毒 MNV	◎		●	●	●
小鼠胸腺病毒 MTV				●	●
K病毒 K virus				●	
小鼠巨细胞病毒 MCMV			◎	●	○
小鼠肾细小病毒 MKPV				●	●
乳酸脱氢酶升高病毒 LDV			◎	●	●
星状病毒 Astrovirus					○

注：[a]国家标准中，●必须检测项，○必要时检测项，◎免疫缺陷动物要求检测项；[b]欧洲实验动物联合会（FELASA）的小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、家兔繁殖和实验单元的健康监测指导意见的年度检测清单中，●季度检测，○年度检测，◎额外检测的病原体；[c]美国杰克逊实验室（JAX）的监测病原清单中，●要求排除的病原体；[d]美国查士瑞华实验室（CRL）动物健康监测计划中，●PCR啮齿类动物传染源（PRIA）年度检测，○PRIA全项。

Note: [a]In National standard, ● indicates mandatory items, ○ indicates optional detection items, ◎ indicates required items only for immunodeficient animals. [b]In Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, Guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units, ● indicates every three months, ○ indicates annually, ◎ indicates additional agents. [c]In Jackson Laboratory (JAX) list of agents monitored, ● indicates agents required to be excluded. [d]In Charles River Laboratory (CRL) animal health monitoring program, ● indicates annual PCR Rodent Infectious Agents (PRIA), ○ indicates comprehensive PRIA.

and activators of transcription 1，STAT1）缺失的小鼠感染MNV后会出现全身性疾病，死亡率高；MNV患病小鼠会出现体重减轻、竖毛和弓背等症状，129和C3H小鼠实验感染MNV-1还可出现轻度腹泻。MNV对巨噬细胞和树突状细胞的趋向性可能会改变免疫反应，影响免疫相关研究；MNV感染还可能会干扰肠道疾病的研究结果[19]。

牛棒状杆菌感染裸小鼠后通常有7～10 d的潜伏期，随后可能出现角化过度症，并持续2～3周，但症状消失后感染还会持续，且可能持续终生。重度联合免疫缺陷小鼠感染牛棒状杆菌后则会出现脱毛、皮肤角化过度、结膜炎等症状，甚至死亡[20]。免疫健全小鼠通常不感染牛棒状杆菌，或仅为一过性感染。但目前我们也发现，有些菌株感染裸小鼠后并不会引起角化过度症，而是更隐蔽地感染动物并影响实验结果。牛棒状杆菌在我国许多设施都曾爆发流行，2018—2021年西山生物总体检出率为3.07%～6.61%；2022年有数个单位发生污染，阳性率上升到22.84%（n=1 690）。2022年，美国CRL公布的数据显示，该菌在小鼠中属于“常见”的病原体，检出率为1%～5%[2]。

2 基于国家标准制定微生物质量监测方案时应关注的重要问题

2.1 监测项目清单中未修改但需要注意的病原体

在征求修改意见时有专家对有些病原体提出修改建议，但本次标准修订时没有对其作修改。例如国家

标准中对小鼠和大鼠支原体的要求是排除支原体属 *Mycoplasma* spp.。但迄今为止，从动物体内分离并鉴定出的支原体种类繁多，已超过200种，而且大部分对人和动物不致病，仅少数（约30种）可引起不同程度的疾病。其中可在小鼠和大鼠中定植的包括肺支原体（*M. pulmonis*）、关节炎支原体（*M. arthritidis*）、溶神经支原体（*M. neurolytium*）等几种[21-22]。在国际上其他同类标准中，被列入需排除病原体清单的仅有肺支原体（*M. pulmonis*）[1-3]。因此，在本版国家标准使用过程中，这种更大范围的支原体检测（特别是使用分子生物学方法时）也可能导致出现不必要的阳性报告。不过GB/T 14926.8—2001中明确指出，使用的抗原要求是肺支原体（*M. pulmonis*）、关节炎支原体（*M. arthritidis*）、溶神经支原体（*M. neurolytium*）[23]，因此选择ELISA方法进行检测可以在一定程度上避免这种麻烦。笔者也建议，在后续的标准修订过程中增加分子生物学检测方法时，仅检测可以在啮齿类动物中定植并造成危害和影响实验的几种病原体即可，而不是检测整个支原体属。

2017年，嗜肺巴斯德杆菌和亲缘性相近的啮齿类巴斯德菌科细菌被重新归类为啮齿类杆菌属（*Rodentibacter*），嗜肺巴斯德杆菌的Heyl和Jawetz生物型分别被定义为啮齿杆菌H型（*Rodentibacter heylii*）和嗜肺啮齿杆菌（*Rodentibacter pneumotropicus*）[24]。但现在国家标准中还是使用了嗜肺巴斯德杆菌这一名称，也没有对不同生物型作出明确定义和要求，因此需要在检测中注意不同型的差异，避免漏检或误判。

2.2 监测项目清单中未要求但应关注的病原体

国家标准对有些病原体未做要求，但是部分从业人员和相关研究者应该关注。例如肾细小病毒，2018年才被发现，可以在重度免疫缺陷小鼠肾脏中检测到；据报告，在实验小鼠中该病毒阳性率为5.8%，野生成年动物中阳性率可达62%，宠物中阳性率为23%，细胞系、肿瘤等生物材料中阳性率为4%。肾细小病毒可引起重度免疫缺陷小鼠的慢性肾小管间质性肾病、肾纤维化等，最终导致动物死亡[25-27]。由于该病毒感染可显著影响动物免疫功能和实验结果，特别是在那些和肾病研究相关的项目中尤其需要排除该病毒。国外CRL等供应商已经将该病毒列入自己的监测清单。尽管此次国家标准尚未要求检测肾细小病毒，但国内动物供应商和相关研究人员也应积极关注这类新发现病原，必要时进行及时监测和控制。

类似的还有螺杆菌，在国内外实验小鼠中检出率都非常高。2009年美国CRL报告，欧洲3年、北美5年的小鼠螺杆菌阳性率为16%[18]。2022年西山生物检测小鼠螺杆菌阳性率为10.01%（n=2 799）。潘金春等[9]报告，2013—2015年广东省实验小鼠中螺杆菌检出率为45.3%（n=203）。2020版中国药典三部“特定生物原材料/动物及辅料”中的“生物制品生产及检定实验动物质量检测”篇中，对生物制品生产和检定用的实验动物质量要求进行了更新，明确在检定用SPF级小鼠和生产用小鼠中必须排除螺杆菌。本次国家标准修订没有将其列入监测清单，这虽然给生产和使用单位留下了缓冲区，但相关人员应该根据自己的研究项目需要监测螺杆菌。

除了现有标准提及的各类病原体外，也有一些病原体已经被多篇文献报告对动物健康有危害。例如唐菖蒲伯克霍尔德菌，通常来自污染的水、肿瘤、细胞等材料，动物被其感染可出现中耳炎症状，甚至死亡，剖检可见肝脏表面有白色点状坏死[28-29]。这提示在遇到动物出现异常死亡时，一定要及时检测确认是否为唐菖蒲伯克霍尔德菌感染所致，同时也应重视生物材料的微生物质量监测。

3 国家标准与CRL健康监测方案在其他方面的比较

在与国外标准比较时，病原体监测清单固然是最重要的关注点，但是此外还有很多值得深入讨论的关键点。本文以国际实验啮齿类动物最大供应商CRL的动物健康监测方案（以下简称CRL标准）作为比较对象，简述我国国家标准与其异同。需要说明，这种比较并不是为了说明哪种标准更好，只是就这些异同讨论动物质量监测方案制定的要点，以帮助读者更好地制定适合自己设施的完整监测方案。而且国家标准的设置目的并非为了指导设施具体的做法，而是提出最终要达到的要求，因此并不会对具体做法加以详述；相应地，企业标准却是为了指导具体的质量控制工作，会阐述具体方法。这也是两种类型的标准出现差异的主要原因之一。

3.1 风险评估

国家标准中没有提及如何针对自己的设施开展风险评估工作，但是这一步其实是至关重要的，只有充分评估自己的设施后才有可能制定出更合适的监测方案。CRL标准就如何针对笼具系统、动物种类和免疫

状况、要开展的科研实验进行风险评估均做了描述，在风险评估的基础上确定自己设施的监测项目清单、检测对象、选用的检测方法、检测频率等。

3.2 监测方案

国家标准中监测方案涉及了直接抽检和哨兵鼠两种方案。其中，用直接抽检法时还规定了不同规模的种群的抽样数量，不过在实际工作中，考虑到成本问题，往往很难达到国家标准要求的抽样数量。而国家标准中关于哨兵鼠方案，仅增加了“选取哨兵动物作为检测用动物”的描述，没有对哨兵鼠设置方法和该方案的适用情况做具体要求。CRL标准中则针对哨兵鼠选择、设置、采样、监测效果等方面做了详细描述和讨论，并针对广泛应用的脏垫料哨兵鼠方案会出现的滞后性，以及对难以通过粪口途径传播的病原体（例如仙台病毒、部分螺杆菌、嗜肺巴斯德杆菌等）易产生漏检的特点，介绍了通过检测环境样本和通风口粉尘样本（exhaust air dust，EAD）补充或替代的方案。此外，CRL标准还就如何对进场动物进行检疫，描述了基于哨兵鼠的检疫方案和基于无哨兵鼠的PCR检测检疫方案，具有很强的可操作性。

3.3 检测方法

国家标准用GB/T 14926来补充等级监测标准，目前主要推荐使用的是血清学方法、培养法、镜检法，个别项目涉及PCR方法。CRL标准中PCR方法得到更广泛的应用。截至目前，我国已经建立了多种病原微生物的核酸检测方法，并以团体标准的形式发布实施[30]，也越来越受到设施管理者的认可。在实际使用过程中，应该结合自己实验室的具体情况，决定是否能开展PCR检测。由于PCR敏感性高，更容易发生气溶胶污染，因此如果自身的硬件或软件条件不满足PCR检测要求，则应该考虑委托专业实验室完成相关检测。国家标准和CRL标准都强调要对阳性结果进行确认，因为实验室报告的每一个阳性结果，都可能会给设施管理带来一连串的连锁反应，因此所有报告的阳性结果都必须慎重确认，并附加必要的结果解释和说明。

3.4 检测频率

就检测频率而言，不同的标准基本都是要求季度检测。CRL标准还建议对检出率高的项目可以调整更高的检测频率。FELASA对部分不常检出项目仅要求每年检测一次。尽管国家标准中没有相关描述，但在实际工作中，我国的许多设施管理者也会根据实际情况调整检测频率。

3.5 生物材料检测

对生物材料的微生物检测要求是防止动物设施发生污染的一个重要因素。2015年美国IDEXX公司在美国实验动物学会（American Association for Laboratory Science，AALAS）年会上公布的数据显示，人源生物制品中有较高携带率的病原体包括EB病毒（Epstein-Barr virus，EBV）（3.1%）、人乳头瘤病毒16型（human papillomaviruses 16 subtype，HPV16）（3.4%）、牛棒状杆菌（4.1%）等。而美国CRL检测约5 000份生物材料（主要是啮齿类动物来源样本，也包含人源样本）后发现，最常见的病原微生物有支原体属、细小病毒、多瘤病毒、乳酸脱氢酶升高病毒等，总污染率为0.2%～1%。国内陈国元等[31]也提出，该单位对进入屏障设施的生物材料进行检测后发现，2015—2019年细菌平均检出率为1.99%，支原体平均检出率为4.81%。因此，对进入设施的生物制品的质量控制也是防止设施内动物发生微生物感染的重要措施。

3.6 阳性动物处置

国家标准中没有提出对阳性动物处置要求。但CRL标准中介绍了动物感染范围的确认方法，并对必须保留且可以治疗的少数病原体感染动物的治疗方案做了简单介绍；针对大多数无法通过治疗清除的病原体，则要求通过胚胎移植、剖宫产等方法重新净化。

4 总结

本次国家标准修订以做“减法”为主，取消了“清洁级”动物的定义及相关要求，从监测项目中删除了部分检出率极低的病原体，也尝试把一些病原体从必须检测项调整为必要时检测项；同时根据微生物流行情况和对动物健康及研究的影响程度，适当在SPF级免疫缺陷小鼠必要时检测项中添加了牛棒状杆菌和MNV两种病原体。

尽管国家标准是全国范围内适用的基本要求，但是不同地区实验动物科技产业发展的不均衡性决定了同一套标准不可能适用于所有设施，对于那些实验动物产业相对发达的地区和管理要求更高的设施，应该根据自己地区和设施的实际情况，制定更适合自己的地方标准或企业标准，进一步规范实验动物设施管理，保障实验动物从业人员安全，完善实验动物健康监测体系，进而促进我国实验动物科技产业不断前进和发展。

致谢：感谢中国医学科学院医学实验动物研究所魏强研究员、军事医学研究院实验动物中心范薇研究员、中国科学院分子细胞科学卓越创新中心吴宝金研究员、上海市公共卫生临床中心周晓辉研究员在本文撰写及修改过程中提供的建议和意见。同时感谢GB 14922—2022标准修订组其他成员如向志光、付瑞、张钰、李文龙、刘恩岐、吕龙宝、袁宝、韩雪、吴旭颖等的工作。

[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] FELASA WORKING GROUP ON REVISION OF GUIDELINES FOR HEALTH MONITORING OF RODENTS AND RABBITS, MÄHLER CONVENOR M, BERARD M, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units[J]. Lab Anim, 2014, 48(3): 178-192. DOI: 10.1177/0023677213516312.

[2] A guide to modern strategies for infection surveillance of rodent populations [DB/OL]. (2022) [2023]. https://www.criver.com/resources/info-pi-rm-guidebook-strategies-infection-surveillance.

[3] Lists the organisms that are excluded from all Jackson Laboratory animal rooms[DB/OL]. (2022) [2023]. https://www.jax. org/jax-mice-and-services/customer-support/customer-service/animal-health/list-of-agents-monitored.

[4] 罗银珠, 闵凡贵, 王静, 等. 病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中的作用探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5):443-449. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2020.219.
LUO Y Z, MIN F G, WANG J, et al. Prevention and control of pathogenic microorganisms for the management and biosafety control in laboratory animal facilities[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(5):443-449.DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2020.219.

[5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物 寄生虫学等级及监测: GB 14922.1—2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Laboratory animal—Parasitology level and monitoring: GB 14922.1-2001 [S]. Beijing: China Standards Press, 2004.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 微生物学等级及监测: GB 14922.2—2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization administration. Laboratory animal—Microbiological standards and monitoring: GB 14922.2-2011 [S]. Beijing: China Standards Press, 2011.

[7] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物微生物、寄生虫学等级及监测: GB 14922—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal—Microbiological and parasitical standards and monitoring: GB 14922—2022[S]. Beijing: China Standards Press, 2022.

[8] 陶凌云, 周洁, 胡建华, 等. 国内外大鼠和小鼠微生物、寄生虫检测标准的比较[J]. 实验动物与比较医学, 2020,40(2):166-172. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.014.
TAO L Y, ZHOU J, HU J H, et al. Comparison of microbiological and parasitological monitoring of rats and mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2020,40(2):166-172. DOI:10.969/j.issn.1674-5817.2020.02.014.

[9] 潘金春, 赵维波, 陈梅玲, 等. 2013年~2015年广东地区实验小鼠和大鼠微生物学及寄生虫学调查[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2):64-69, 85. DOI: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.02.012.
PAN J C, ZHAO W B, CHEN M L, et al. Microbiological and parasitological investigation in laboratory mice and rats in Guangdong Province from 2013 to 2015[J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(2):64-69, 85. DOI: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.02.012.

[10] 陈南菊, 陈群. 大学生鼻腔金黄色葡萄球菌带菌状况及药敏检测[J]. 中国校医, 2000, 14(3):167-168. DOI: CNKI:SUN:XIYI.0.2000-03-004.
CHEN N J, CHEN Q. Nose *Staphylococcus aureus* carrier status and drug sensitivity testing among college students [J]. Chin J Sch Dr, 2000, 14(3):167-168. DOI: CNKI:SUN:XIYI.0.2000-03-004.

[11] 马笑雪, 罗恩杰. 社区分离金黄色葡萄球菌在健康人群中的分布及其分子生物学特点[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(8): 804-807. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.08.016.
MA X X, LUO E J. Distribution of *Staphylococcus aureus* strains colonized in healthy community population and molecular epidemiological characteristics for MRSA strains [J]. Chin J Epidemiol, 2011, 32(8): 804-807. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.08.016.

[12] 陈百计, 姚泽宇, 王彤, 等. 广州社区人群金黄色葡萄球菌鼻腔携带调查和分子流行特征[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(12):1583-1588. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3619.2017.12.004.
CHEN B J, YAO Z Y, WANG T, et al. Molecular and epidemiological characteristics of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among the general population in Guangzhou[J]. J Trop Med, 2017, 17(12): 1583-1588. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3619.2017.12.004.

[13] PERCY D H, BARTHOLD S W, GRIFFEY S M. Pathology of laboratory rodents and rabbits[M]. 4th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc., 2016.

[14] GOZALO A S, HOFFMANN V J, BRINSTER L R, et al. Spontaneous *Staphylococcus xylosus* infection in mice deficient in NADPH oxidase and comparison with other laboratory mouse strains[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(4):480-486. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2010.00953.x.

[15] KENGKOOM K, AMPAWONG S. *Staphylococcus sciuri* associated to subcutaneous abscess and dermatitis in ICR mouse[J]. Arq Bras Med Vet Zootec, 2017, 69(1):117-122. DOI: 10.1590/1678-4162-8563.

[16] LABELLE P, HAHN N E, FRASER J K, et al. Mousepox detected in a research facility: case report and failure of

mouse antibody production testing to identify Ectromelia virus in contaminated mouse serum[J]. Comp Med, 2009, 59 (2):180-186. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.10.106.

[17] 刘芳妮, 吕军苹, 柯跃华, 等. 北京地区实验小鼠诺如病毒流行情况[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2):205-211. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.126.
LIU F N, LU J P, KE Y H, et al. Prevalence of mouse Norovirus in experimental mice in Beijing[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 205-211. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.126.

[18] PRITCHETT-CORNING K R, COSENTINO J, CLIFFORD C B. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats[J]. Lab Anim, 2009, 43(2):165-173. DOI: 10.1258/la.2008.008009.

[19] SEAMONS A, TREUTING P. M, MEEKER S, et al. Obstructive lymphangitis precedes colitis in murine *Norovirus-infected* Stat1-deficient mice[J]. Am J Pathol, 2018, 188(7): 1536-1554. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.03.019.

[20] MANUEL C A, PEARSON E C, PUGAZHENTHI U, et al. A clinical scoring systems for the evaluation of *Corynebacterium bovis*-associated disease in NSG mice[J]. Comp Med, 2022, 72(6): 386-393. DOI: 10.30802/aalas-cm-22-000098.

[21] CASSELL G H, DAVIS J K, LINDSEY J R. Control of *Mycoplasma pulmonis* infection in rats and mice: detection and elimination vs. vaccination[J]. Isr J Med Sci, 1981, 17(7): 674-677. DOI: 10.1080/09668136.2014.912853.

[22] COLE B C, GOLIGHTLY-ROWLAND L, WARD J R. Arthritis of mice induced by *Mycoplasma arthritidis*. Humoral antibody and lymphocyte responses of CBA mice[J]. Ann Rheum Dis, 1976, 35(1):14-22. DOI: 10.1136/ard.35.1.14.

[23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物微生物学检测方法: GB/T 14926—2001 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Laboratory animal—Microbiological examination methods: GB 14922—2001[S]. Beijing: China Standards Press, 2001.

[24] ADHIKARY S, NICKLAS W, BISGAARD M, et al. *Rodentibacter* Gen. nov. including *Rodentibacter pneumotropicus* comb. nov., *Rodentibacter heylii* sp. nov., *Rodentibacter myodis* sp. nov., *Rodentibacter ratti* sp. nov., *Rodentibacter heidelbergensis* sp. nov., *Rodentibacter trehalosifermentans* sp. nov., *Rodentibacter rarus* sp. nov., *Rodentibacter mrazii* and two genomospecies[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67 (6):1793-1806. DOI: 10.1099/ijsem.0.001866.

[25] ROEDIGER, B. LEE Q, TIKOO S, et al. An atypical parvovirus drives chronic tubulointerstitial nephropathy and kidney fibrosis[J]. Cell, 2018, 175(2): 530-543. e24. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.013.

[26] WILLIAMS S H, CHE X Y, GARCIA J A, et al. Viral diversity of house mice in New York city[J]. mBio, 2018, 9(2): e01354-17. DOI: 10.1128/mbio.01354-17.

[27] CRIM M , BESCH-WILLIFORD, HART M L , et al. Mouse kidney parvovirus: A newly characterized parvoviral pathogen of research mice[C]. Prague: FELASA Congress, IBA-US 84-2 MKPV Poster, 2019.

[28] COLLYMORE C, GIULIANO F, BANKS E K. Head tilt in immunodeficient mice due to contamination of drinking water by *Burkholderia gladioli*[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2019, 58(2):246-250. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-18-000106.

[29] 王静, 袁文, 闵凡贵, 等. 实验动物病原PCR检测方法系列团体标准的编制[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 60-66. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.03.010.
WANG J, YUAN W, MIN F G, et al. Establishment of a series of social organization standards on a PCR method for pathogen detection in laboratory animals[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29 (3): 60-66. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.03.010.

[30] FOLEY P L, LIPUMA J J, FELDMAN S H. Outbreak of otitis media caused by *Burkholderia gladioli* infection in immunocompromised mice[J]. Comp Med, 2004, 54(1): 93-99. DOI: 10.1053/S1096-2867(03)00084-7.

[31] 陈国元, 康康, 李晓娴, 等. 实验材料检测在SPF级实验小鼠质量控制中的应用[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(1): 61-65. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.092.
CHEN G Y, KANG K, LI X X, et al. Application of experimental material inspection in quality control of SPF mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(1): 61-65. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.092.

（收稿日期：2023-06-27　修回日期：2023-08-08）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁）

[引用本文]

郭连香. 实验动物微生物、寄生虫学等级及监测标准的变化及与国外标准的比较[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 339-346. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.088.

GUO L X. Revision of standards for microbiological and parasitological grades in laboratory animals and its comparison to foreign standards[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 339-346. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.088.

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.060

黄 缨，医学博士，高级实验师，执业兽医资格（兽医全科类），现任复旦大学实验动物科学部实验动物质量监测和基因操作平台负责人。曾任美国洛克菲勒大学研究助理、英国阿伯丁大学医学院客座讲师。主要从事实验动物微生物质量监测、小鼠胚胎操作或转基因相关操作，以及疾病动物模型与神经系统疾病发生机制研究等工作，同时承担复旦大学实验动物学课程教学工作。主持国家自然科学基金青年项目1项，参与国家自然科学基金、科技部国家新药创制和科技部973计划等多个科研项目。作为第一作者或通信作者在*Molecular Psychiatry*、*Molecular Brain*等国内外学术期刊发表学术论文8篇，并以副主编身份参与编写教材《实验动物学》1部。

供应商来源的实验大鼠和小鼠微生物监测结果分析：以复旦大学实验动物科学部为例

黄 缨，韦思羽，蔡 莉，强苏静，李冬婷，丁玉强
（复旦大学实验动物科学部，上海 200032）

[摘要] 目的 对供应商来源的实验大鼠、小鼠进行常规微生物监测，为实验动物设施科学管理提供重要依据，确保相关实验结果的可靠性。**方法** 以复旦大学实验动物科学部为例，在2021年4月到2023年4月间，按照单纯随机抽样原则，对来自7家供应商的大鼠、小鼠进行微生物质量抽检。具体参照国家标准中SPF级实验动物必须排除的微生物指标及其检测方法进行。**结果** 抽检动物的检测总合格率为80.36%。其中SPF级大鼠抽检合格率为52.63%，SPF级近交系小鼠抽检合格率为82.76%，SPF级远交系小鼠抽检合格率为86.67%，SPF级免疫缺陷小鼠抽检合格率为86.36%。检测不合格的细菌学指标集中在金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌和啮齿杆菌H型，检出率分别为10.76%、3.16%、2.53%和0.63%。不合格的血清学指标为仙台病毒，发生率为2.53%。此外，除国家标准规定SPF级小鼠必须排除的微生物指标外，还在近交系小鼠中检测到阿米巴原虫和肠杆菌属菌株；在免疫缺陷小鼠中检测到产酸性克雷伯杆菌，检出率分别为1.15%、2.30%和4.55%。**结论** 供应商来源的大小鼠动物中存在一定的病原体感染发生率，相关动物设施有必要强化实验动物微生物监测，确保接收和饲养动物的质量，这对提高实验结果准确性和保护实验动物从业人员的职业健康具有重要意义。

[关键词] 微生物； 监测； 供应商； 实验动物质量； 大鼠； 小鼠
[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)04-0347-08

Microbiological Monitoring Analysis of Laboratory Rats and Mice from Vendors: Department of Laboratory Animal Science of Fudan University as an Example

HUANG Ying, WEI Siyu, CAI Li, QIANG Sujing, LI Dongting, DING Yuqiang
(Department of Laboratory Animal Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)
Correspondence to: HUANG Ying (ORCID: 0009-0001-4460-4311), E-mail: ying_huang@fudan.edu.cn

[ABSTRACT] Objective Conduct routine microbiological monitoring of laboratory rats and mice from vendors to provide an important basis for the scientific management of laboratory animal facility and ensure the reliability of relevant experimental data obtained from laboratory animals. **Methods** Taking the Department of Laboratory Animal Science of Fudan University as an example, between April 2021 and April 2023, rats and mice purchased from 7 vendors were sampled for microbiological quality according to the principle of simple random sampling on the arrival days of animal delivery. Then, surveillance tests were

[第一作者] 黄 缨(1974—)，女，博士，高级实验师，研究方向：疾病动物模型与神经系统疾病发生机制。E-mail：ying_huang@fudan.edu.cn。ORCID：0009-0001-4460-431

conducted to examine the microbiological contaminations according to the national standards of SPF laboratory animals. **Results** The total qualified rate was 80.36%, with 52.63% in SD rat, 82.76% in inbred mice, 86.67% in outbred mice and 86.36% in immunodeficient mice in details. The most frequent bacteria isolated were *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsilla pneumoniae* and *Rodentibacter heylii*, and their detection rates were 10.76%, 3.16%, 2.53% and 0.63%, respectively. Serological assays demonstrated the highest prevalence for virus was Sendai virus, and the detection rate was 2.53%. In addition to the pathogens those must be excluded from SPF rodents, E*ntamoeba muris* and *Enterobacter* spp. were also detected in inbred mice, and *Klebsiella oxytoca* was detected in immunodeficient mice, with the detection rates of 1.15%, 2.30% and 4.55%, respectively. **Conclusion** There are certain incidences of pathogen infections in laboratory rats and mice from vendors, and an efficient microbiological monitoring of laboratory animals should be implemented in animal facilities, in order to eliminate pathogen infections in laboratory animals, which is required for improving the accuracy of research results and protecting the occupational health of laboratory animal practitioners as well.

[Key words] Microbiology; Monitoring; Vendor; Laboratory animal quality; Rat; Mouse

病原体感染会对实验动物健康造成很大损害，也会给科学研究的结果分析带来不确定性。部分感染实验动物的病原体还可同时感染人，因此致病微生物的存在会给实验动物从业人员（包括所有使用实验动物的研究人员和接触实验动物的饲养人员、管理人员）带来健康风险和生物安全隐患[1-2]。实验动物微生物监测是指利用有效实验方法对实验动物微生物状态进行检测[3]，是实验动物行业管理中一个非常重要的环节，目前已有一系列的法律、法规和标准加以规范性约束和指导[4]。生物医学研究使用的实验动物中，有相当数量是购自具有一定生产规模和严格管理措施的实验动物供应商。为了更好地对研究者使用的实验动物进行质量评估，保证所用实验动物的健康质量以及减少潜在生物危害风险，复旦大学实验动物科学部对近3年来购自不同供应商的实验大鼠、小鼠，在购入当天进行随机抽样检测，旨在为加强设施内实验动物的微生物质量管理提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物标本来源及抽样方法

所有动物检测标本均随机抽取于2021年4月—2023年4月复旦大学实验动物科学部从7家实验动物供应商购入的实验大鼠、小鼠。这些供应商均具备实验动物生产许可证，其中4家位于上海，其余3家分别位于江苏、浙江和北京。

1.2 动物抽样包装、标本采集与检测项目

在收到订购动物的当天，单纯随机抽样，然后将所抽取的动物按SPF级别进行包装后，运送至标本采样实验室。参照国家标准GB 14922.1—2001《实验动物 寄生虫学等级及监测》及GB 14922.2—2011《实验动物 微生物学等级及监测》，挑选SPF级大鼠、小鼠必须排除项目，包括细菌、病毒和寄生虫指标。

1.3 检测方法与结果判定

体外寄生虫及体内蠕虫、原虫指标的检测和结果判定分别参照国家标准GB/T 18448.1—2001《实验动物 体外寄生虫检测方法》、GB/T 18448.6—2001《实验动物 蠕虫检测方法》、GB/T 18448.9—2001《实验动物肠道溶组织内阿米巴检测方法》和GB/T 18448.10—2001《肠道鞭毛虫和纤毛虫检测方法》进行。

细菌学指标检测分别参照GB/T 14926.1—2001《实验动物 沙门菌检测方法》、GB/T 14926.6—2001《实验动物 支气管鲍特杆菌检测方法》、GB/T 14926.9—2001《实验动物 鼠棒状杆菌检测方法》、GB/T 14926.12—2001《实验动物 嗜肺巴斯德杆菌检测方法》、GB/T 14926.13—2001《实验动物 肺炎克雷伯杆菌检测方法》、GB/T 14926.14—2001《实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法》和GB/T 14926.17—2001《实验动物 绿脓杆菌检测方法》进行标本采集和培养接种。采集气管分泌物或回盲肠部内容物，接种于特定培养基/板后（表1），37 ℃培养24 h，然后根据所检测指标的菌落生长特点（表1），再挑选可疑菌落接种于特定培养板（购自上海科玛嘉微生物技术有限公司、北京陆桥技术股份有限公司），放置于细菌培养箱（购自德国Memmert公司，型号IN110）之中，进行37 ℃增菌培养。24 h后提取菌落DNA，并利用细菌16 S rDNA序列特点结合分子生物学技术，对细菌进行种属鉴

表1 SPF级大鼠、小鼠必须排除细菌培养及相对应的菌落特征汇总

Table 1 Colony characteristics and Gram nature of bacteria excluded in SPF mice/rats on nutrient agar plates

细菌 Bacteria	采样动物 Animal	革兰染色 Gram staining	培养物质 Sample	第一天接种 Inoculation on day 1					第二天再接种 Inoculation on day 2	
				培养基 Culture medium	37 ℃ 培养24 h后的典型菌落特点 Colony characteristics after 24 h at 37 ℃				培养基 Culture medium	37 ℃培养24 h后是否β-溶血 β-Hemolytic reaction after 24 h at 37 ℃
					直径 Diameter/mm	颜色/色泽 Color/luster	溶血性 Hemolysis	其他 Other		
支气管鲍特杆菌 *Bordetella bronchiseptica*	大鼠	-	呼吸道分泌物	血平板	1	灰白色	轻微α-溶血	/	血平板	否
				DHL平板	2	无色半透明	/	/		
鼠棒状杆菌 *Corynebacterium kutscheri*	大鼠、小鼠	+	呼吸道分泌物	血平板	1	白色无光泽	γ-溶血	触之较硬，不易乳化	血平板	否
嗜肺巴斯德杆菌 *Pasteurella pneumotropica*	大鼠、小鼠	-	呼吸道分泌物	血平板	0.5 ~ 1	灰白色或露滴样	γ-溶血，或轻微α-溶血	聚集时质地似奶油	血平板	否
沙门菌 *Salmonella* spp.	大鼠、小鼠	-	回盲肠部内容物	DHL平板	2	无色半透明，带黑心或全黑	/	表面光滑湿润	血平板	否
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	大鼠、小鼠	+	回盲肠部内容物	高盐甘露醇	1	黄色凸起	/	周边培养基从红色变黄色	血平板	是（白或金黄圆形凸起菌落）
肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*	大鼠、小鼠	-	回盲肠部内容物	DHL平板	1 ~ 5	淡粉色,大而隆起	/	光滑湿润，呈黏液脓汁状	血平板	否
绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*	大鼠、小鼠	-	回盲肠部内容物	NAC液	1 ~ 3	浑浊均匀生长	/	菌落扁平，可产绿色色素	NAC平板	/

注：+，阳性；-，阴性；/，不适合或没有需要特别说明的特性；DHL，胆硫乳琼脂；NAC，N-乙酰-*L*-半胱氨酸。

Note：+, positive; -, negative; /, unsuitable or no special characteristics; DHL, deoxycholate hydrogen sulfide lactose; NAC, N-acetyl-*L*-cysteiner.

定[5]。针对16 S区域的特异性PCR引物正向引物序列为5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′，反向引物序列为5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′，对应扩增产物长度为1.5 kb。

其余检测指标参照GB/T 14926.50—2001《实验动物酶联免疫吸附试验》原理，采用CO_2吸入安乐死或戊巴比妥钠（购自美国Sigma公司）溶液腹腔注射（1%剂量，30 mg/kg体重）法深度麻醉动物后，采集动物血液，室温静置30 min后以4 000 r/min速率离心20 min，分离得到血清，再利用商用酶联免疫反应试剂盒（购自苏州西山生物技术有限公司）进行针对性检测操作，并利用酶标仪（购自德国Berthold Technologies公司，型号Tristar 5）扫描结果。

所有阳性标本都会进行二次检测以确认结果，排除意外因素产生的假阳性。本研究实验方案经复旦大学实验动物科学部动物伦理委员会审核批准（202304018Z）。

1.4 图片采集及作图

病原体图片由显微镜（购自日本Olympus公司，型号SC180或SZ61）采集拍摄。检测合格率=抽检合格动物数/抽检动物总数×100%。病原体检出率=携带有病原体的动物数/抽检动物总数×100%。通过GraphPad Prism 8和Adobe Photoshop CC 2019软件进行结果作图。

2 结果

2.1 抽检合格率

近3年一共抽检158只SPF级动物，其中SD大鼠19只，近交系小鼠87只，远交系小鼠30只，免疫缺陷

小鼠22只。检测了SPF级大鼠、小鼠必须排除的全部病原体指标，抽检动物检测总合格率为80.38%。其中，SD大鼠、近交系小鼠、远交系小鼠和免疫缺陷小鼠的抽检合格率分别为52.63%、82.76%、86.67%和86.36%。

2.2 各种病原体检出率

在对抽检动物进行体内外采样后，显微镜下未观察到体外节肢动物，也未发现有蠕虫、纤毛虫或鞭毛虫。

采用培养法及结合分子生物学方法对包括沙门菌、鼠棒状杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德杆菌（包括嗜肺啮齿杆菌和啮齿杆菌H型）和支气管鲍特杆菌这8种细菌学指标进行检测时，发现有17只动物体内检出金黄色葡萄球菌，5只动物检出绿脓杆菌，4只动物检出肺炎克雷伯杆菌，1只动物体内检测出啮齿杆菌H型，不合格指标的检出率分别为10.76%、3.16%、2.53%和0.63%（表2，图1）。其中，近交系小鼠中，肺炎克雷伯杆菌和金黄色葡萄球菌的检出率分别为2.30%和14.94%；远交系小鼠中，绿脓杆菌的检出率为13.33%；免疫缺陷小鼠中，肺炎克雷伯杆菌和绿脓杆菌的检出率分别为9.09%和4.55%；SD大鼠中，金黄色葡萄球菌和啮齿杆菌H型的检出率分别为21.05%和5.26%（表3）。

表2 2021—2023年供应商来源的SPF级大鼠、小鼠必须排除的病原体指标检测结果

Table 2 Pathogen test results of SPF mice/rats from vendors during 2021-2023 according to national standards

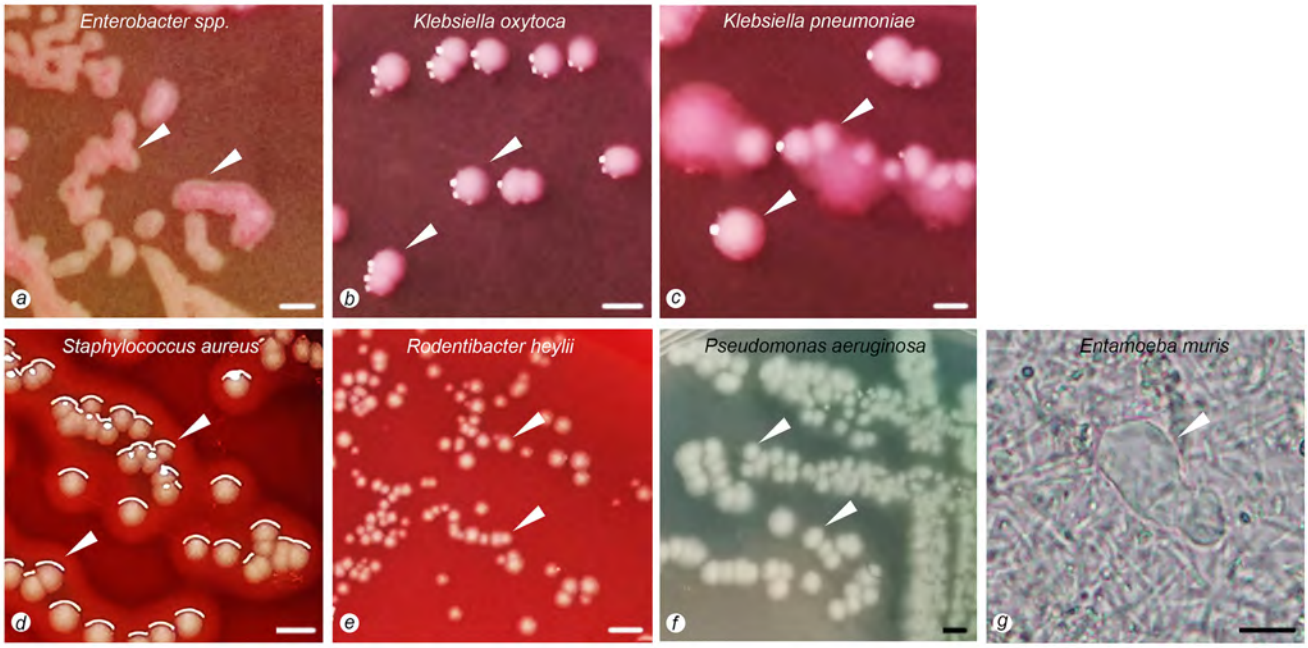
微生物检测指标 Pathogens tested		检测数 No. of tested animals	合格数（合格率/%） No. of qualified animals (rate/%)	检出数（检出率/%） No. of positive animals (rate/%)
寄生虫指标（镜检）Parasites (microscopic examination)				
体外 *In vitro*	节肢动物 Ectoparasites	158	158 (100)	0 (0)
体内 *In vivo*	蠕虫 All Helminths	158	158 (100)	0 (0)
	鞭毛虫 Flagellates	158	158 (100)	0 (0)
	纤毛虫 Ciliates	158	158 (100)	0 (0)
细菌学指标（培养/分子生物学方法）Bacteria (culture/molecular biology methods)				
支气管鲍特杆菌 *Bordetella bronchiseptica* *		19	19 (100)	0 (0)
鼠棒状杆菌 *Corynebacterium kutscheri*		158	158 (100)	0 (0)
嗜肺啮齿杆菌 *Rodentibacter pneumotropicus*		158	158 (100)	0 (0)
啮齿杆菌H型 *Rodentibacter heylii*		158	157 (99.37)	1 (0.63)
沙门菌 *Salmonella* spp.		158	158 (100)	0 (0)
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*		158	141 (89.24)	17 (10.76)
肺炎克雷伯杆菌 *Klebsiella pneumoniae*		158	154 (97.47)	4 (2.53)
绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*		158	153 (96.84)	5 (3.16)
病毒等指标（酶联免疫吸附实验）Viruses, etc (ELISA)				
汉坦病毒 Hantavirus *		19	19 (100)	0 (0)
小鼠肝炎病毒 Mouse hepatitis virus #		139	139 (100)	0 (0)
鼠痘病毒 Ectromelia virus #		139	139 (100)	0 (0)
仙台病毒 Sendai virus		158	154 (97.47)	4 (2.53)
小鼠肺炎病毒 Pneumonia virus of mice		158	158 (100)	0 (0)
呼肠孤病毒III型 Reovirus type 3		158	158 (100)	0 (0)
小鼠细小病毒 Minute virus of mice #		139	139 (100)	0 (0)
大鼠细小病毒 Rat parvovirus *	RV株	19	19 (100)	0 (0)
	H-1株	19	19 (100)	0 (0)
大鼠冠状病毒 Rat coronavirus *		19	19 (100)	0 (0)
支原体 *Mycoplasma* spp.		158	158 (100)	0 (0)
泰泽病原体 Tyzzer's organism		158	158 (100)	0 (0)
弓形体 *Toxoplasma gondii*		158	158 (100)	0 (0)

注：*只有大鼠检测的项目；#只有小鼠检测的项目；其余项目为大鼠、小鼠都检测的项目。

Note：* tested on rats; # tested on mice; the others tested on rats and mice.

利用酶联免疫方法对包括汉坦病毒、小鼠肝炎病毒、鼠痘病毒、仙台病毒、小鼠肺炎病毒、呼肠孤病毒III型、小鼠细小病毒、大鼠细小病毒RV株和H-1株、大鼠冠状病毒、支原体、泰泽病原体和弓形体这13种指标进行检测时，发现4只动物血清中有仙台病毒抗体存在，检出率为2.53%（表2），而其在SD大鼠中的检出率为21.05%（表3）。

此外，除国家标准中规定的SPF级小鼠必须排除的病原体指标外，还在近交系小鼠中检测到1只动物携带有阿米巴原虫，2只动物携带有肠杆菌属菌株，分别为神户肠杆菌（*Enterobacter kobei*）和阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*），并在1只免疫缺陷小鼠中检测到产酸克雷伯杆菌，检出率分别为1.15%、2.30%和4.55%（图1，表3）。



注：a～c分别为肠杆菌、产酸克雷伯杆菌、肺炎克雷伯杆菌在DHL琼脂平板上的生长情况（标尺大小为2 mm）；d～e分别为金黄色葡萄球菌、啮齿杆菌H型在血平板上的生长情况（标尺大小为2 mm）；f为绿脓杆菌在NAC琼脂平板上的生长情况（标尺大小为2 mm）；g为阿米巴原虫在回盲部内容物中的图片（标尺大小为10 μm）。三角箭头代表病原体菌落或虫体。

Note : a-c, Colonies of *Enterobacter* spp., *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae* growth on DHL agar plates,respectively; d-e, Colonies of *Staphylococcus aureus* and *Rodentibacter heylii* growth on blood plates, respectively; f, Colonies of *Pseudomonas aeruginosa* growth on NAC agar plates; g, Image of *Entamoeba muris* in the ileocecal region. Triangular arrow indicates the bacterial colony or amoeba body. Scale bar=2 mm (a-f), 10 μm (g).

图1 2021—2023年供应商来源的SPF级大鼠、小鼠细菌或寄生虫检测阳性代表图片

Figure 1 Representative images of positive bacteria or parasites detected in SPF mice/rats from vendors during 2021-2023

3 讨论

实验动物作为生命科学重要的研究工具和工作基础，被广泛应用于医学、药学等众多领域。但是实验动物所携带的一些病原微生物或寄生虫，不仅可能对动物本身健康造成伤害，也影响研究结果的准确性和可重复性，部分病原体还会传播给人并导致人体疾病。因此，对实验动物进行日常的微生物检测是非常必要的。

本次监测所抽检的供应商来源实验动物，整体合格率高于80%，且小鼠合格率高于大鼠，被检测出病原体感染的动物没有呈现明显的临床感染症状。本次检测的病原体中，以金黄色葡萄球菌的检出率最高（10.76%），其中SD大鼠的检出率最高（21.05%），其次为近交系小鼠（14.94%），免疫缺陷小鼠也有发现（4.55%）。金黄色葡萄球菌可引起动物和人的多种化脓性炎症，包括败血症等严重全身感染[6]。其他检测出的病原体还包括肺炎克雷伯杆菌、绿脓杆菌、啮齿杆菌H型和仙台病毒。肺炎克雷伯杆菌可引起动物或人的严重呼吸道感染[7-8]；本次监测中，这个病原体在2.30%的近交系和9.09%的免疫缺陷小鼠中都有检出。绿脓杆菌可对动物或人造成例如结膜炎、伤口化脓、

表 3 2021—2023 年供应商来源的 SPF 级大鼠、小鼠检出病原体在不同动物群中的分布情况

Table 3 Distribution of pathogens detected in different groups of SPF mice/rats from vendors during 2021-2023

项目 Pathogens	SD 大鼠 SD rats			近交系小鼠 Inbred mice			远交系小鼠 Outbred mice			免疫缺陷小鼠 Immunodeficient mice		
	检测数 No. of tested animals	检出数(率/%) No. of positive (rate/%)	合格率/% Rate of qualified/%	检测数 No. of tested animals	检出数(率/%) No. of positive (rate/%)	合格率/% Rate of qualified/%	检测数 No. of tested animals	检出数(率/%) No. of positive (rate/%)	合格率/% Rate of qualified/%	检测数 No. of tested animals	检出数(率/%) No. of positive (rate/%)	合格率/% Rate of qualified/%
检出总情况 Summary	19	9 (47.36)	52.63	87	15 (17.24)	82.76	30	4 (13.33)	86.67	22	3 (13.64)	86.36
国家标准规定必须排除病原体 Pathogens required free of animals in national standards												
肺炎克雷伯杆菌 *Klebsiella pneumoniae*	19	0 (0)	100	87	2 (2.30)	97.70	30	0 (0)	100	22	2 (9.09)	90.91
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus ureus*	19	4 (21.05)	78.95	87	13 (14.94)	85.06	30	0 (0)	100	22	0 (0)	100
绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*	19	0 (0)	100	87	0 (0)	100	30	4 (13.33)	86.67	22	1 (4.55)	95.45
啮齿杆菌 H 型 *Rodentibacter heylii*	19	1 (5.26)	94.74	87	0 (0)	100	30	0 (0)	100	22	0 (0)	100
仙台病毒 Sendai Virus	19	4 (21.05)	78.95	87	0 (0)	100	30	0 (0)	100	22	0 (0)	100
非国标规定检测病原体 Pathogens unrequired free of animals in national standards												
阿米巴原虫 *Entamoeba muris*	19	0 (0)	100	87	1 (1.15)	98.85	30	0 (0)	100	22	0 (0)	100
产酸克雷伯杆菌 *Klebsiella oxytoca*	19	0 (0)	100	87	0 (0)	100	30	0 (0)	100	22	1 (4.55)	95.45
肠杆菌属 *Enterobacter* spp.	19	0 (0)	100	87	2 (2.30)	97.70	30	0 (0)	100	22	0 (0)	100

胃肠道溃疡和败血症等症状[7–9]；本次监测中也有13.33%的远交系抽检小鼠检测到绿脓杆菌的存在。SD大鼠中除了检出有金黄色葡萄球菌存在外，还有5.26%的动物中检测到啮齿杆菌H型感染，21.1%的动物检测到仙台病毒感染。啮齿杆菌H型是属于嗜肺巴斯德杆菌中的一种[10]，可引起机体的化脓性炎症。仙台病毒则可引起机体的出血性肺部感染，而仙台病毒和啮齿杆菌H型的混合感染甚至可引起机体的致命性肺炎[7]。

此次在多家供应商的动物中都检测出病原体阳性指标，与之前北京地区供应商动物检测结果[11]比较，虽然不合格指标存在一定差异，但相同病原体（例如仙台病毒和金黄色葡萄球菌）的检出率都要低于北京地区，推测不同病原体的流行情况存在很大的地域或设施差异性。之前还有研究显示上海市的大鼠全部感染指数高于小鼠[3]，本次监测结果也显示大鼠的检测合格率明显低于小鼠。目前，实验小鼠的使用量明显高于大鼠，动物供应商更关注小鼠质量控制，这可能是大鼠合格率低于小鼠的主要原因。

本研究观察阶段正好包含新型冠状病毒肺炎在供应商所在地严重流行时期，虽然大量的动物生产人员出现健康异常可能会影响供应商的正常动物生产质量，但考虑到阳性指标检出日期实际上主要集中在2021年4月到2022年2月之间，而且在2022年上半年上海的新型冠状病毒疫情严重流行时期，复旦大学实验动物科学部也被迫暂停或极大减少了实验动物购买，相应的动物抽检及监测也随之暂停或减少。此外，对于检测出有阳性指标的大小鼠供应商，还会采取暂停数月

从该供应商处购买阳性动物相同品系动物的措施。所以，疫情所带来的不可抗力可能对本次研究相关动物检测的统计及分析结果没有很大影响。免疫缺陷动物由于自身特点，更容易受到病原体的感染并产生严重的临床症状。此次抽检发现免疫缺陷动物的合格率相对较高，可能也是因为供应商对此类动物的质量控制更严格。但需要指出的是，由于机体抗体的产生与T、B细胞的正常功能有很大关联[12]，在监测免疫缺陷动物的一些病原体携带情况时，如果单纯检测血清中抗体的水平，可能会因为动物本身免疫系统问题而出现假阴性结果。因此，在分析检测结果时，一定要结合动物体临床表征来进行综合分析，必要时采用其他检测方法，例如检测组织中特定抗原的水平或是特定核酸的含量，才能更好地反映此类动物的真实健康状况。

此外，少量抽检动物中还检测到有产酸克雷伯杆菌、肠杆菌属菌株和阿米巴原虫的存在。产酸克雷伯杆菌可引起实验动物化脓性中耳炎、肺炎等疾病[13]，并与肠杆菌属细菌、金黄色葡萄球菌等类似，都属于条件性致病菌，是医院患者发生院内感染的主要原因之一[14-15]。目前对于鼠内阿米巴原虫的致病性研究非常少。同属的内阿米巴属原虫的种类很多，但目前发现能引起人类致病的种类并不多，一般也被认为是条件性致病原体，可导致机体发生腹泻、侵袭性结肠炎、肝脓肿和转移性感染，严重时可致死[16-17]。实验动物科学研究中，通常会因为实验操作而使整个动物体处于亚健康状态。同时，一些实验动物本身就是免疫缺陷动物，其更容易受到病原体的侵蚀而表现出不良反应。虽然这3种检测到的病原体并不是国家标准规定的SPF级实验动物必须排除类别，但也应引起实验动物从业人员关注。

综上，从供应商购买的实验大鼠、小鼠中，有一定比例的动物存在细菌、病毒或寄生虫感染。为了确保科学研究的顺利进行和相关实验结果的准确性，以及更好保障实验动物从业人员的职业健康，实验动物饲养设施有必要对购入的实验动物进行检测，并设置一定时间的隔离检疫期。及早发现隐患并合理处置是首选的应对方式。同时，也有必要将检测结果反馈给动物供应商，以提醒和督促供应商强化动物的质量控制。通过实验动物使用方和生产供应方的密切合作，才能更好保证科学研究的顺利进行，提高相关生物安全性。

致谢：感谢本部负责订购和接收实验动物的沈园兴老师及黄灵红老师，也感谢中国科学院分子细胞卓越创新中心动物实验技术平台吴宝金老师、陈国元老师和纪文韬老师在本次实验动物检测工作中提供的帮助和建议。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物采样及检测实验过程严格遵守实验室管理制度，并通过复旦大学实验动物科学部动物伦理委员会审核批准（202304018Z）。

All samples of this study were collected in animals and tested strictly following laboratory regulations, and approved by the Animal Ethics Committee of the Department of Laboratory Animal Science at Fudan University (Approval No. 202304018Z).

[作者贡献 Author Contribution]

黄缨负责实验设计、采样、实验操作、实验指导、文章写作；
韦思羽、蔡莉、强苏静和李冬婷负责采样及实验操作；
丁玉强负责文章修改及建议。

[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] 袁喆, 王纯睿, 罗华婷, 等. 感染性疾病研究新进展述评及展望[J]. 西部医学, 2023, 38(1): 1-5, 13. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2023.01.001.
YUAN Z, WANG C R, LUO H T, et al. Review and prospect of new progress in research on infectious diseases[J]. Med J West China, 2023, 38(1): 1-5, 13. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2023.01.001.

[2] LIBERTUCCI J, YOUNG V B. The role of the microbiota in infectious diseases[J]. Nat Microbiol, 2019, 4(1): 35-45. DOI: 10.1038/s41564-018-0278-4.

[3] 冯丽萍, 陶凌云, 周洁, 等. 上海地区实验动物病原体感染指数分析[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 309-312. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.018.
FENG L P, TAO L Y, ZHOU J, et al. Analysis of laboratory animal pathogen infection indexes in Shanghai area[J]. Acta Lab Animals Sci Sin, 2016, 24(3): 309-312. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.018.

[4] 罗银珠, 闵凡贵, 王静, 等. 病原微生物防控在实验动物设施管理与生物安全控制中的作用探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 443-449. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.219.
LUO Y Z, MIN F G, WANG J, et al. Prevention and control of pathogenic microorganisms for the management and biosafety control in laboratory animal facilities[J]. Lab Animal Comp Med, 2021, 41(5): 443-449. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.219.

[5] ROSSHART S P, HERZ J, VASSALLO B G, et al. Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses[J]. Science, 2019, 365(6452): eaaw4361. DOI: 10.1126/science.aaw4361.

[6] AHMAD-MANSOUR N, LOUBET P, POUGET C, et al. *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their

pathogenic properties and potential treatments[J]. Toxins, 2021, 13(10):677. DOI: 10.3390/toxins13100677.

[7] FOX J G, COHEN B J, LOEW F M. Laboratory animal medicine [M]. Orlando, Fla.: Academic Press, 1984.

[8] MARTIN R M, BACHMAN M A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004.

[9] JURADO-MARTÍN I, SAINZ-MEJÍAS M, MCCLEAN S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6):3128. DOI: 10.3390/ijms22063128.

[10] ADHIKARY S, NICKLAS W, BISGAARD M, et al. *Rodentibacter* gen. nov. including *Rodentibacter pneumotropicus* comb. nov., *Rodentibacter heylii* sp. nov., *Rodentibacter myodis* sp. nov., *Rodentibacter ratti* sp. nov., *Rodentibacter heidelbergensis* sp. nov., *Rodentibacter trehalosifermentans* sp. nov., *Rodentibacter rarus* sp. nov., *Rodentibacter mrazii* and two genomospecies[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67(6): 1793-1806. DOI: 10.1099/ijsem.0.001866.

[11] 魏杰, 黄健, 刘文菊, 等. 2017—2019年北京地区实验动物质量抽检结果分析[J]. 实验动物科学, 2021, 38(5): 19-27, 58. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.05.005.
WEI J, HUANG J, LIU W J, et al. Analysis of random testing results of laboratory animals in Beijing area from 2017 to 2019 [J]. Lab Animal Sci, 2021, 38(5): 19-27, 58. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.05.005.

[12] CANO R L E, LOPERA H D E. Introduction to T and B lymphocytes [M/OL].//Autoimmunity: From bench to bedside. Bogota (Colombia): El rosario university press, 2013: 92-111 (2013-07-18)[2023-05-02]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/.

[13] BLEICH A, KIRSCH P, SAHLY H, et al. *Klebsiella oxytoca*: opportunistic infections in laboratory rodents[J]. Lab Anim, 2008, 42(3):369-375. DOI: 10.1258/la.2007.06026e.

[14] NEOG N, PHUKAN U, PUZARI M, et al. *Klebsiella oxytoca* and emerging nosocomial infections[J]. Curr Microbiol, 2021, 78(4): 1115-1123. DOI: 10.1007/s00284-021-02402-2.

[15] DAVIN-REGLI A, LAVIGNE J P, PAGÈS J M. E*nterobacter spp.*: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(4): e00002-e00019. DOI: 10.1128/CMR.00002-19.

[16] MENDOZA CAVAZOS C, HEREDIA M Y, OWENS L A, et al. Using *Entamoeba muris* to model fecal-oral transmission of *Entamoeba* in mice[J]. mBio, 2023, 14(1): e0300822. DOI: 10.1128/mbio.03008-22.

[17] LEAL DOS SANTOS D, CHAÚQUE B J M, VIRGINIO V G, et al. Occurrence of *Naegleria fowleri* and their implication for health: a look under the One Health approaches[J]. Int J Hyg Environ Health, 2022, 246: 114053. DOI: 10.1016/j. ijheh. 2022. 114053.

（收稿日期：2023-05-09　修回日期：2023-08-03）

（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁）

[引用本文]

黄缨, 韦思羽, 蔡莉, 等. 供应商来源的实验大鼠和小鼠微生物监测结果分析：以复旦大学实验动物科学部为例[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 347-354. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.060.

HUANG Y, WEI S Y, CAI L, et al. Microbiological monitoring analysis of laboratory rats and mice from vendors: Department of Laboratory Animal Science of Fudan University as an example[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 347-354. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.060.

****

《实验动物与比较医学》2023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），并被瑞典DOAJ、美国Chemical Abstracts和Ulrichsweb、英国CAB Abstracts和Global Health、波兰ICI World of Journals和ICI Master List、WHO西太平洋地区医学索引（WPRIM）和美国EBSCO数据库，以及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

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.086

孙　强，研究员，博士生导师，中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心非人灵长类研究平台主任。系国家杰出青年基金获得者、科技部中青年科技创新领军人才，并且荣获2018年谈家桢生命科学创新奖、2019年国务院政府特殊津贴、2020年药明康德生命化学研究奖-学者奖。同时是中国实验动物学会灵长类实验动物专业委员会常务理事，上海市实验动物学会理事，上海市实验动物学会生物安全专业委员会委员。长期致力于实验动物管理和模式动物构建及相关技术的研发工作，发表SCI论文22篇。2007年获得中国首批“试管食蟹猴”，其后利用慢病毒转染和基因编辑技术先后构建了多种实验猴疾病模型，建立了基于精巢异种移植和激素注射的实验猴成熟加速技术，并在国际上首次得到体细胞克隆猴。

食蟹猴分娩行为分析

卞新彦，陆　勇，王　燕，孙　强
（中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心，上海 200031）

[摘要]　目的　观察分析食蟹猴分娩行为，建立食蟹猴分娩发生的判定标准，进而结合兽医助产以提高食蟹猴活产率。**方法**　通过对2017—2021年112只孕期140 d以上的围产期食蟹猴的监控视频进行回溯分析，观察记录分娩时食蟹猴的主要行为学表现，包括努责、摸舔产道、趴卧或躺卧、身体辗转和翻滚等行为。在此基础上建立分娩相关的行为指标的权重，详尽分析30只食蟹猴围产期的行为表现，以进行分娩判定。**结果**　30只食蟹猴的围产期行为学验证结果显示，努责、摸舔产道、趴卧或躺卧、身体辗转和翻滚的行为指标均以不同的频次出现，其中努责和趴卧/躺卧的权重最高，权重值分别为35.5%和27.2%。可以依据这两个行为对食蟹猴的分娩发生做出精准判定。精准判定分娩发生并经兽医助产的食蟹猴平均活产率达到87.1%，明显高于无辅助自然分娩的平均活产率63.5%，二者具有显著差异（$P<0.05$）。**结论**　精准的食蟹猴分娩判定结合兽医助产可显著提高实验用食蟹猴的活产率。

[关键词] 食蟹猴；分娩行为；监控视频；活产率
[中图分类号] Q95-33；R-332　[文献标志码] A　[文章编号] 1674-5817(2023)04-0355-08

Analysis of the Birthing Behaviour of Cynomolgus Macaques

BIAN Xinyan, LU Yong, WANG Yan, SUN Qiang
(Center for Excellence in Brain Science and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)
Correspondence to: SUN Qiang (ORCID: 0000-0002-3359-9465), E-mail: qsun@ion.ac.cn

[ABSTRACT]　Objective　Observing and analyzing the delivery behaviour of cynomolgus macaques, to establish the criteria for determining the occurrence of delivery in cynomolgus macaques, and then combining with veterinary assistance in order to improve the live birth rate of cynomolgus macaques. **Methods**　By backtracking and analyzing the surveillance videos of 112 perinatal cynomolgus macaques with a gestation period of 140 d or more from 2017 to 2021, we observed and recorded the main behavioural manifestations of the cynomolgus macaques during labour, including Valsalva's maneuver, touching and licking the birth canal, lying on their backs or stomachs, and rolling and tumbling of the body. On this basis, we established the weights of delivery-related behavioural indicators and exhaustively analysed the perinatal behavioural performances of 30 cynomolgus macaques for delivery determination. **Results**　The

[基金项目] 国家重点研发计划-基础科研条件与重大科学仪器设备研发“灵长类实验动物育种、繁育、SPF猴培育及资源保护研究”（2022YFF0710900）；中国科学院战略生物资源计划实验动物平台项目（KFJ-BRP-005）
[第一作者] 卞新彦（1996—），女，大专，助理实验师，研究方向：非人灵长类实验动物饲养管理、外科手术。E-mail：xybian@ion.ac.cn
[通信作者] 孙　强（1973—），男，博士，研究员，研究方向：辅助生殖与模式动物构建，实验动物管理。E-mail：qsun@ion.ac.cn。ORCID：0000-0002-3359-9465

perinatal behavioural validation results of the 30 cynomolgus macaques showed that the behavioural indicators of Valsalva's maneuver, touching and licking the birth canal, lying on the stomach or on the floor, body rolling and tumbling occurred with different frequencies, among which Valsalva's maneuver and lying on the stomach or on the back were the most important, with weight values of 35.5% and 27.2%, respectively. These two behaviours can be used to accurately determine the onset of parturition in cynomolgus macaques. The average live birth rate of the monkeys that were accurately determined to have given birth and were assisted by veterinarians reached 87.1%, which was significantly higher than that of the monkeys that had unassisted spontaneous deliveries, which was 63.5%, and there was a significant difference between these two rates (P<0.05). **Conclusion** The combination of accurate birth determination and veterinary assisted delivery can significantly increase the live birth rate of experimental cynomolgus macaques.

[Key words] Cynomolgus macaques; Delivery behaviour; Video monitoring; Live birth rate

非人灵长类动物在生理、认知功能、神经解剖、社会行为、繁殖和发育等方面都与人类高度相似，与人类遗传物质的同源性也高达75%～98.5%[1]。这种同源性在基础研究和生物医学中发挥着重要作用。近年来，常用的食蟹猴、恒河猴等非人灵长类实验动物资源紧张、供不应求，促使养殖企业希望通过扩大繁殖种群和提升繁殖成功率来增加产能。同时，随着转基因、基因编辑和体细胞克隆技术的发展和进步，促进和推动了非人灵长类模式动物构建的应用与研究进程。食蟹猴作为有月经、单胎生殖的实验动物，在采取胚胎移植技术构建非人灵长类模式动物的研究中经常会遇到因怀双胎、胎位不正或脐带绕颈等因素导致动物难产和死产的情况。如果能及时发现和确定孕猴的分娩启动时间，并辅以兽医助产或对难产动物实施剖宫产，显然会提升食蟹猴的活产率。由于孕猴自然分娩行为多数发生在夜间，导致兽医难以及时发现难产等情况。而在大笼群养的猴群中，大量动物进入围产期并即将分娩时，采取24 h全天候巡视显然也是不现实的。因此，通过视频监控辅助，对孕猴的分娩行为进行分析，建立精准的视频监控分娩判定体系，对分娩行为进行判定，及时将信息传递给值班兽医以进行干预和处置，显然是一个既可节约人力，又能提升食蟹猴活产率的可行性方案。但要建立精准的视频监控分娩判定体系，首先就需要对孕猴的分娩行为做出准确判断。

本研究首先采用回溯分析分娩中食蟹猴行为学视频监控录像的方式，确定围产期孕猴分娩时的行为范式，并以这些行为范式出现的频次进行量化，引入权重这一概念。权重是指该指标在整体评价中的相对重要程度[2]。以此建立了孕猴分娩行为视频监控评估指标。然后通过数据分析验证食蟹猴分娩行为指标可以精准判断孕猴的分娩发生时间，结合兽医助产和护理显著提升了食蟹猴的活产率，也为后期开发食蟹猴分娩自动监控报警系统奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验对象均为雌性食蟹猴，来自中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心非人灵长类研究平台［SCXK（沪）2020-0001］。其中，2011—2016年未监控组115只，年龄分布在4～13岁。2017—2021年监控组238只，年龄分布在4～14岁，包含单胎和多胎；其中112只为顺产单胎孕猴，用来分析食蟹猴分娩发生的时间分布。2022年3月—2022年9月监控组30只，年龄分布在4～14岁，均为顺产单胎孕猴，用来建立权重并分析分娩时长。所有孕猴的饲养管理方式相同，健康状态与妊娠状况良好。每天分别于早上8点和下午3点饲喂孕猴两次生长繁殖饲料，实验猴生长繁殖饲料来自江苏省邳州市小河科技发展有限公司［苏饲预（2021）03006］。每天上午10点投喂青饲料，以满足食蟹猴每天对维生素的摄入[3]。实验猴的饮水方式是通过按压水嘴进行自由饮水[4]。

1.2 饲养环境条件

食蟹猴怀孕个体均是通过辅助生殖技术受孕，在孕期140 d转至分娩监控笼中进行视频监控。监控设备安装于笼具外正前方3 m，且距离笼具顶部的高度为0.75 m。笼具购自苏州猴皇有限公司，为特殊设计的分娩监控笼（长1.4 m×宽0.8 m×高0.9 m），分为两个部分。笼具一侧带有玻璃门，方便行为观察；另一侧是不锈钢网格门，方便抓取保定动物；两侧之间有隔板，

可随时进行隔断（图1）。每只食蟹猴单独饲养，室内通风与光照（昼夜时间比为12 h/12 h）均符合美国国家学术出版社出版的《实验动物饲养管理和使用指南》[5] 和中国科技部制定的国家标准GB/T 14925—2010《实验动物 环境及设施》中关于非人灵长类实验动物饲养环境的规定[6]。整个饲养环境设施位于中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心非人灵长类研究平台［SYXK（沪）2021-0003］。所有动物实验均通过中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心生命科学伦理委员会的审核批准（ION-2019043R02），在2022年3月份开展。

图1 食蟹猴分娩监控笼

Figure 1 Birth monitoring cage of cynomolgus macaques

1.3 实验设备

彩色多普勒超声仪（型号：西门子ACUSON NX3 Elite）购自德国Siemens公司，用于孕检和胎位判定。夜视监控摄像头（型号：海康威视DS-2CD3346WDV 3-1）购自上海亿洪网络工程有限公司，结合监控电脑及软件构成监控系统，用于分娩行为监控。监控系统的详细参数见表1。

表1 监控设备配置表

Table 1 Monitor device configuration table

品名 Description	规格 Specification	数量 Quantity
芯片 Central processing unit	英特尔I7-10700	1
主板 Mainboard	华硕Z190-H	1
内存 Random access memory	金士顿16G-2666	2
散热器 Heat sink	九州风神400静音风扇	1
硬盘1 Hard disk 1	英特尔512G-SSD	1
硬盘2 Hard disk 2	希捷8TB企业级	1
机箱 Crate	九州风神DS-7716N-14/16P	1
电源 Power supply	华硕ROG-1200W	1
显卡 Video card	华硕ROG RTX2080TI-11G	1
显示器 Computer monitor	AOC AG322FCX	1

1.4 实验方法

通过回溯分析2017—2021年112只顺产单胎母猴分娩行为的视频录像，分析食蟹猴分娩发生时间分布和分娩行为特征；然后利用该特征对2022年3月—2022年9月的30只食蟹猴分娩发生进行验证，并建立食蟹猴分娩行为指标权重；在精准判定食蟹猴分娩发生的基础上，对生产困难个体采取兽医助产，并比较助产有无对食蟹猴活产率的影响。

1.4.1 食蟹猴分娩时间分布统计

通过回溯视频录像，人工记录2017—2021年112只顺产单胎母猴的分娩发生时间，结果通过Excel软件进行统计。

1.4.2 食蟹猴分娩行为特征观察统计

录像回溯2022年3月—2022年9月30只食蟹猴分娩时的行为表现，从首次出现分娩行为开始连续记录20次行为，并比较各行为出现的频次，进行量化得出权重值最高的行为。

1.4.3 食蟹猴分娩时长记录

记录从出现分娩行为到分娩完成所用时长，为兽医判断是否需要进行胎位检查及助产提供参考。

1.4.4 产前孕检和兽医助产

对于出现明显分娩行为的孕猴，兽医将进行B超检查，检查项目包括头围、腹围、胎心、胎位、胎盘、羊水这6项[7]。临产B超检查过程中，针对其他指标正常但胎猴胎位不正的现象，接产兽医会采取人工转胎位的方式尝试将胎猴转至头位[8]；若转胎位失败，则通过剖宫产方式帮助孕猴分娩[9]。针对胎盘前置以及孕猴大出血的情况，立即采取剖宫产的方式帮助胎猴娩出[10]。针对宫缩乏力或是超出预产期10～15 d的孕猴，则通过注射催产素的方式来助产[11]。在阴道

分娩时，如果胎猴头围过大或者是存在肩难产时，为防止胎猴在产道内缺氧，进行产道侧切术使其迅速娩出[12]。

1.4.5 活产率统计

分别统计2017—2021年经监控助产和2011—2016年自然生产食蟹猴的活产率（存活胎儿数/怀胎儿总数），并比较二者之间的差异。

1.5 统计学处理

本研究所有数据均采用Excel进行初步整理。各行为权重采用SPSSAU软件中的层次分析法（计算方法为和积法）进行分析[13-14]，需要通过构造判断矩阵、确定各层次指标权重、指标权重一致性检验3个过程。对数据进行一致性检验，通常情况下CR值越小，则说明判断矩阵一致性越好；一般情况下CR值<0.1，则判断矩阵满足一致性检验，计算所得权重具有一致性。采用GraphPad Prism 9.0软件对食蟹猴分娩时长进行统计分析，其统计结果以均值±标准差表示。分析监控有无对食蟹猴活产率的影响时，采用独立样本t检验，以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 食蟹猴分娩时间分布

本研究统计了2017—2021年内112只顺产单胎母猴的分娩时间分布。从统计结果来看，分娩高峰期发生在19：00到次日7：00的时间段，共分娩101例，占比90%（101/112）；而在7：00—19：00时间段共分娩11例，占比10%（11/112）。通过以上数据分析，得知食蟹猴多数在夜间分娩，缩短了兽医白天对食蟹猴孕猴的监控时间，同时提示兽医需要增加夜间对孕猴的关注度，以便及时采取接产和护理等措施。

2.2 食蟹猴分娩行为权重指标

视频分析发现，112只分娩的食蟹猴出现的行为包括摸舔产道、趴卧或躺卧、身体辗转、翻滚和双后肢弯曲身体下蹲并腹部用力的努责行为，其中努责行为与文献报告的奶牛分娩过程中行为表现[15]类似。通过随机选取2022年3月—2022年9月期间30只食蟹猴分娩的监控视频进行上述行为指标的验证和权重统计分析，结果显示，努责行为权重最高，权重值为35.5%；趴（躺）卧行为次之，权重值为27.2%，二者一般交替出现；摸舔产道行为权重次于以上两种行为之后（24.8%），身体辗转和翻滚二者的权重较低分别为10.5%和2.0%，并且仅有2只孕猴出现翻滚行为，分析原因可能是由于首次分娩导致该行为的发生，详见表2～3（以及期刊官网的增强出版视频）。其中，努责和趴（躺）卧这两个行为的权重值最高，所以当以上两个行为出现时代表孕猴已经开始分娩，此时接产兽医应对其进行B超检查，监测胎猴情况以及母猴是否具备顺产条件。

2.3 食蟹猴分娩时长

随机选取并统计了30只顺产单胎母猴从出现上述分娩行为指标开始到分娩结束所用的分娩时间，结果显示分娩时长从53 min到5.18 h不等，大多数食蟹猴的分娩行为持续时长在1.50～3.42 h，分娩行为持续的平均时长为2.52 h（图2）。因此，当分娩行为持续时间超出3.42 h后，提示兽医应增加孕猴和胎猴的B超监测频率，防止胎儿宫内窘迫的发生。

2.4 监控后助产可提高活产率

对非监控下115只（怀单胎98只，怀双胎16只，怀三胎1只）和监控下238只（怀单胎206只，怀双胎31只，怀三胎1只）临产期母猴成功分娩且仔猴活产的数据进行统计，结果发现非监控下怀孕足月母猴的仔猴平均活产率为63.5%，监控下配合兽医护理的仔猴平均活产率为87.1%，二者差异有统计学意义（P<0.05，表4）。在238只监控下的临产猴当中，经视频监控发现有108只出现了不同程度的生产困难，结合兽医助产促进分娩成功的有92只。由此可见，通过认识食蟹猴分娩行为，精准判定分娩的发生，并对生产困难猴采取合适助产措施结合兽医护理，可以显著提高食蟹猴仔猴的生产存活率。

3 讨论

目前行业内，大部分猴场对于食蟹猴分娩行为和分娩时机的掌握是缺少经验的。例如，兽医通常是在白天发现小食蟹猴后才知母猴已分娩结束，对分娩时间和分娩过程无法进行回溯。当兽医发现食蟹猴分娩结束时，通常有以下3种分娩结局：仔猴存活、仔猴死亡、母猴难产。由于无法在准确的时期对分娩困难的孕猴进行助产，往往导致不必要的死产发生。本文通过视频录像回溯的方式，发现孕猴分娩时的5种行为特征。定量统计30只孕猴首次出现分娩行为后连续的20次分娩行为，采用层次分析方法计算出每种行为的权重值（详见表3），从而建立了一种准确判断食蟹猴分娩发生的方法。统计本实验室2017—2022年238只怀孕食蟹猴，在有监控并结合兽医助产的条件下，

表2 定量统计30只单胎顺产孕猴的分娩行为频次

Table 2 Quantifying the frequency of parturition behaviour in 30 singleton parous pregnant monkeys

动物编号 Animal ID	努责/次 Valsalva's maneuver/times	摸舔产道/次 Touching and licking the birth canal/times	趴卧/躺卧/次 Lying down/ times	身体辗转/次 Body rolls/times	翻滚/次 Tumbling/times	定量/次 Quantity/times
844#	3	15	0	2	0	20
889#	17	1	1	1	0	20
903#	8	0	7	4	1	20
908#	3	5	10	2	0	20
922#	5	0	12	3	0	20
940#	7	1	4	8	0	20
943#	8	2	10	0	0	20
975#	12	2	5	1	0	20
1017#	9	7	4	0	0	20
729#	4	15	0	1	0	20
640#	2	11	7	0	0	20
655#	12	7	0	1	0	20
706#	5	5	10	0	0	20
708#	15	3	2	0	0	20
727#	6	0	10	4	0	20
730#	8	0	8	3	1	20
778#	4	16	0	0	0	20
784#	0	0	14	0	6	20
816#	5	1	11	3	0	20
818#	14	0	1	5	0	20
059#	0	19	0	1	0	20
0170#	3	0	17	0	0	20
362#	15	1	1	3	0	20
425#	4	3	8	5	0	20
475#	15	0	4	1	0	20
550#	3	3	6	4	4	20
553#	16	1	2	1	0	20
594#	9	0	2	9	0	20
596#	1	19	0	0	0	20
625#	0	12	7	1	0	20
总和/次 Total/times	213	149	163	63	12	600
平均值 Average	7.10	4.97	5.40	2.10	0.40	/

仔猴出生后平均存活率达到87.1%；而2011—2016年115只怀孕食蟹猴，在无监控和兽医辅助的情况下，仔猴出生后平均存活率仅有63.5%。对2017—2021年112只围产期怀单胎顺产食蟹猴的分娩时间进行统计，显示90%的分娩发生在晚19点到次日7点之间。分娩多数发生在兽医和饲养人员休息的夜间，这让兽医很难及时发现难产猴并实施助产。在人力资源有限的前提下，24 h全天候跟踪孕猴显然也不可行。因此，要通过监控精准地判定出食蟹猴何时出现分娩迹象，需对其分娩时的行为进行分析，以找出哪些行为出现后预示该猴发生分娩，从而建立食蟹猴的分娩行为体系，这应该是一种可行的能够解决上述困境的有效方案。

本研究通过录像回溯112只孕期140 d以上的食蟹猴行为学特征，发现食蟹猴在分娩前会出现摸舔产道、趴卧或躺卧、辗转身体、翻滚和以双后肢弯曲身体下蹲腹部用力为特征的努责行为。根据上述行为特征，对另外30只临产猴的分娩行为进行验证，统计发现其分娩时以上行为均有不同频次的出现（详见表2）。后续统计发现，努责和趴（躺）卧这两个行为出现频次最高，代表以上两种行为在整体中权重最高，权重值分别为35.5%和27.2%（详见表3），因此以上两种行为频繁出现时代表孕猴分娩发生。结合以上信息，本研究统计了30只食蟹猴从出现分娩行为到仔猴娩出所用时间，结果显示大多数食蟹猴的分娩行为持续时长在

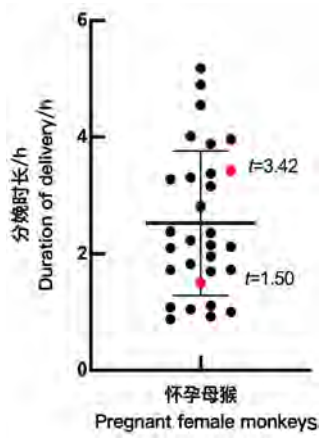
表3 孕猴常见分娩行为的层次分析和一致性检验结果

Table 3 Hierarchical analysis and consistency test results of common birth behaviours in pregnant monkeys

分娩行为/项 Delivery behaviour/item	特征向量 Eigenvector (math.)	权重值/% Weight value/%	最大特征值 Maximum eigenvalue	*CI*值 *CI* value	*RI*值 *RI* value	*CR*值 *CR* value	一次性检验结果 Test results
努责 Valsalva's maneuver	1.775	35.5	5	0	1.12	0	通过
摸舔产道 Touching and licking the birth canal	1.242	24.8					
趴卧/躺卧 Lying down	1.358	27.2					
身体辗转 Body rolls	0.525	10.5					
翻滚 Tumbling	0.100	2.0					

注：层次分析法计算权重时，首先需要构建判断矩阵（SPSSAU自动构建）；判断矩阵构建方式为，计算出各分析项的平均值，接着利用平均值大小相除得到判断矩阵；平均值越大意味着重要性越高，权重也会越高。CI为一致性指标；RI为随机一致性指标；CR为一致性比值。

Note: The Analytic Hierarchy Process (AHP) of calculating weights first requires the construction of a judgment matrix (automatically constructed by SPSSAU); the judgment matrix is constructed by calculating the average value of each analyzed item, and then using the average size to divide to get the judgment matrix; A larger average means more importance and will be weighted higher. CI, Consistency indicators; RI, Random coherence indicators; CR, Consistency ratio.



注：数据统计处理方式是平均数±标准误，*n*=30。图中红点和黑点均代表每只孕猴的分娩时长，两个红点对应的*t*值表示大多数孕猴在该时长范围内分娩。

Note: Data are presented as mean ± standard error, *n*=30. Both red and black dots in the figure represent the length of labor for each pregnant monkey, and the *t*-values corresponding to the two red dots indicate that the majority of pregnant monkeys gave birth within that length of time.

图2 30只单胎顺产食蟹猴的分娩时长统计结果

Figure 2 Statistical results of labour duration in 30 cynomolgus macaques with natural birth

1.5.0～3.42 h，平均分娩时长在2.52 h；而且在上述分娩行为中，努责和趴（躺）卧的权重值最高。因此，这两个指标可作为食蟹猴分娩发生的行为判定依据。通过视频监控判定分娩发生时间，兽医再介入，并根据B超检查结果判定临产孕猴是否需要助产。本研究对比了监控和非监控下食蟹猴活产率的数据，通过视频监控兽医对难产食蟹猴实施助产，可以将食蟹猴的仔猴平均活产率提升23.6个百分点（87.1% *vs* 63.5%），多存活了近70只仔猴。因此，通过对分娩的食蟹猴进行视频监控，观察记录食蟹猴的分娩行为学特征，从而准确判断其分娩发生时机，并在可能出现生产困难的情况下，对其进行人工助产干预，是一种可以显著提高食蟹猴生产存活率的手段。

国内对动物分娩行为的相关报道多见于西藏猪[16]、陕北白绒山羊[17]和伊犁马等一些农用动物[18]，但是对于非人灵长类分娩行为的研究尚不清晰。1982年来自日本实验动物中心的MASAYUKI ADACHI发布了一篇关于恒河猴分娩行为的报告[19]，研究人员观察了7只怀孕恒河猴的4种分娩行为，但是未对分娩行为进行统计分析。本实验室首次建立了食蟹猴分娩行为体系，除努责、趴（躺）卧行为基本一致外，还观察到食蟹猴分娩时表现的摸舔产道、翻滚、身体辗转行为，其中摸舔产道行为的权重在整体中占比排第三（权重值为24.8%）。同时本实验室统计了食蟹猴分娩时长，有利于兽医根据分娩行为及分娩时长发现生产困难的孕猴，及时采取相应的助产措施，在最大程度上减少难产给孕猴带来的疼痛，从而提升动物福利以及仔猴的存活率。

需要说明，现有的视频监控手段可以对实验用食蟹猴的分娩行为进行有效监测，从而帮助兽医及时判断分娩时机和分析生产进程，但是它需要兽医夜间不间断地观测完成，因此仍然存在着占用人力和不够智能的缺陷。后续本课题组实验室将结合现有的视频监控系统，建立食蟹猴分娩行为的自动报警系统，以提高检测分娩行为的精确性，同时减少大量人力资源的占用。

表 4 非监控与监控对食蟹猴活产率的影响

Table 4 The effect of non-monitored versus monitored on the live birth rate of cynomolgus macaques

组别 Groups	年份 Certain year	孕猴/只 Pregnant monkeys *n*	怀胎数/只 Pregnancies *n*	助产/只 Midwifery *n*	存活仔猴/只 Surviving monkeys *n*	活产率/% Live birth rate/%	平均活产率/% Average live birth rate/%
监控 Control	2017	36	47	20	36	76.7	87.1*
	2018	31	37	28	34	91.9	
	2019	54	57	28	49	86.0	
	2020	64	72	17	62	86.1	
	2021	53	58	15	55	94.8	
未监控 Unmonitored	2011	14	15	/	8	53.3	63.5
	2013	29	40	/	15	37.5	
	2014	33	35	/	28	80.0	
	2015	16	19	/	12	63.2	
	2016	23	24	/	20	83.3	

注：与未监控组相比，*P<0.05。

Note: Compared to unmonitored group, *P<0.05.

[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科学院脑科学与智能技术卓越创新中心生命科学伦理委员会的审核批准（项目审批号：ION-2019043R02）。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have passed the examination and approval of Life Science Ethics Committee of Center for Excellence and Innovation in Brain Science and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences (project serial number: ION-2019043R02). All experiments were conducted in accordance with the relevant laws, regulations and regulations of China on experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

卞新彦负责实验操作，包括食蟹猴胚胎移植，食蟹猴孕检和产检，剖宫产和夜间接产，数据记录，统计分析，以及论文写作和修改；

陆勇负责行为观察笼具的设计与采购，监控设备的采购、安装与调试；

王燕负责食蟹猴胚胎移植，食蟹猴孕检和产检，剖宫产和夜间接产，数据收集整理；

孙强负责课题设计、论文写作及修改。

[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] 田朝阳, 杨守凯. 非人灵长类动物在医学科学实验中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(6):74-77. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2009.06.018.
TIAN Z Y, YANG S K. The use of non-human primates in medical scientific experiments[J]. Chin J Comp Med,2009, 19 (6):74-77. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2009.06.018.

[2] 林俊,王永,袁明园.路段服役质量评价指标权重确定方法[J]黑龙江交通科技,2023,46(5):151-153. DOI: 10.3969/j.issn.1008-3383.2023.05.050.
LIN J, WANG Y, YUAN M Y. Method of determining the weight of service quality evaluation index of road section[J] Commun Sci Technol Heilongjiang, 2023, 46(5):151-153. DOI: 10.3969/j.issn.1008-3383.2023.05.050.

[3] 张鹏, 渡边邦夫. 饲养条件下非人灵长类的营养需求[J]. 兽类学报, 2010, 30(1):87-98.
ZHANG P, WATANABE K. Nutritional requirement of captive non-human primates[J]. Acta Theriologica Sinica, 2010, 30(1): 87-98.

[4] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 福利通则: GB/T 42011—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
State Administration of Market Supervision and Administration, Standardization Administration of China. General Rules for the Welfare of Laboratory Animals: GB/T 42011-2022[S]. Beijing: China Standard Press, 2022.

[5] 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.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物环境及设施: GB/T 14925—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China; China National Standardization Administration. Laboratory animal: Requirements of environment and housing facilities: GB/T 14925-2010 [S]. Beijing: China Standards Press, 2010.

[7] 王素兰. 超声诊断在产前检查中的应用价值[C]//中华医学会2004超声医学新进展学术会议论文集, 2004-09-09.
WANG S L. Application value of ultrasound diagnosis in prenatal examination [C]// Proceedings of 2004 Chinese Medical Association New Progress in Ultrasound Medicine Academic Conference, 2004-09-09.

[8] 高薇, 蒋晓敏, 周曙光, 等. 分析臀位外倒转术的妊娠结局及与成功率相关的影响因素[J]. 安徽医学, 2021, 42(6):608-612. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2021.06.005.
GAO W, JIANG X M, ZHOU S G, et al. Analysis onpregnancy outcome of external cephalic version for term breech presentation and its influencing factors affecting success [J]. Anhui Med J, 2021, 42(6): 608-612. DOI: 10.3969/j. issn. 1000-0399. 021.06.005.

[9] 王宏, 陈永昌, 司维, 等. 猕猴剖宫产及术后护理[J]. 黑龙江畜牧兽医(下半月), 2015(9): 168-169. DOI: 10.3969/j.issn.0250-3263.2001.05.019
WANG H, CHEN Y C, SI W, et al. Cesarean section and postoperative nursing care of rhesus monkeys[J]. Heilongjiang Animal Sci Vet Med, 2015(9): 168-169. DOI: 10.3969/j.issn.0250-3263.2001.05.019.

[10] 李儒芝, 李笑天. 胎盘前置状态与前置胎盘的病理和诊断问题[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2011, 27(6):403-405.
LI R Z, LI X T. Placenta previa symptom, pathology and diagnosis[J]. China Ind Econ, 2011, 27(6):403-405.

[11] 汝萍, 刘铭. 缩宫素在催引产中的规范化应用[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(9):907-911. DOI: 10.19538/j.fk2021090106.
RU P, LIU M. Standardized application of oxytocin in induced labor[J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2021, 37(9): 907-911. DOI: 10.19538/j.fk2021090106.

[12] 林新容. 会阴侧切术后切口感染的原因分析及护理[J]. 全科护理, 2009, 7(14):1255-1256. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4748.2009.14.026.
LIN X R. Cause analysis and nursing care of incision infection after perineal lateral incision[J]. Fam Nurse, 2009, 7(14):1255-1256. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4748.2009.14.026.

[13] 谭跃进. 定量分析方法[M]. 北京: 中国人民大学出版社, 2012.
TAN Y J. Quantitative analysis methods [M]. Beijing: Renmin University of China Press, 2012.

[14] 韩利, 梅强, 陆玉梅, 等. AHP-模糊综合评价方法的分析与研究[J]. 中国安全科学学报, 2004, 14(7):86-89. DOI: 10.3969/j.issn.1003- 3033.2004.07.022.
HAN L, MEI Q, LU Y M, et al. Analysis and study on AHP-fuzzy comprehensive evaluation method[J]. China Safsci, 2004, 14(7):86-89. DOI: 10.3969/j.issn.1003- 3033.2004.07.022.

[15] 谷国林, 周忠坤, 李法科. 简议奶牛分娩过程的三要素[J]. 畜牧兽医科技信息, 2015(8):71. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-6027. 2015.08.050.
GU G L, ZHOU Z K, LI F K. Brief discussion on three elements in the delivery process of dairy cows[J]. Chin J Animal Husb Vet Med, 2015(8): 71. DOI: 10.3969/J. ISSN. 1671-6027.2015.08.050.

[16] 李瑜鑫, 王宏辉, 王建洲, 等. 西藏猪分娩行为特征的研究[J]. 当代畜牧, 2006(9):37-39.
LI Y X, WANG H H, WANG J Z, et al. A Study on the characteristics of delivery behavior of Tibetan pigs[J]. Contemp Animal Husb, 2006(9):37-39.

[17] 刘艳秋, 武佩, 张永安, 等. 母羊分娩前后不同时期行为时间分配和活动节律研究[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2020(15):75-78, 86, 172, 173.
LIU Y Q, WU P, ZHANG Y A, et al. Study on behavior time allocation and activity rhythm of ewes in different periods before and after delivery[J]. Heilongjiang Animal Sci Vet Med, 2020(15):75-78, 86, 172, 173.

[18] 李云涛, 姚新奎, 曾亚琦, 等. 不同年龄段伊犁马分娩前后的行为特征差异性分析[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(9)227-231. DOI: 10.19556/j.0258-7033.20201113-03.
LI Y T, YAO X K , ZENG Y Q , et al. Analysis on the differences of behavioral characteristics of Ili horses of different ages before and after delivery[J]. Chin J Animal Sci, 2021, 57(9)227-231. DOI: 10.19556/j.0258-7033.20201113-03.

[19] ADACHI M, SAITO R, TANIOKA Y. Observation of delivery behavior in the rhesus monkey[J]. Primates, 1982, 23(4):583-586. DOI: 10.1007/BF02373971.

（收稿日期：2023-06-26 修回日期：2023-08-05）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁）

[引用本文]
卞新彦, 陆勇, 王燕, 等. 食蟹猴分娩行为分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 355-362. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.086.
BIAN X Y, LU Y, WANG Y, et al. Analysis of the birthing behaviour of cynomolgus macaques[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 355-362. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.086.

****

《实验动物与比较医学》被WHO西太平洋地区医学索引（WPRIM）收录

2023年8月，《实验动物与比较医学》（*Laboratory Animal and Comparative Medicine*，LACM）（ISSN 1671-5817，CN 31-1954/Q）通过WHO西太平洋地区期刊评审委员会评审，被WHO西太平洋地区医学索引（Western Pacific Region Index Medicus，WPRIM）收录。

WPRIM依托于WHO西太平洋区域办事处与其成员国若干机构合作的项目，是全球健康图书馆（GHL）的一个重要组成部分，主要收录世界卫生组织西太平洋地区成员国出版的覆盖生物医学、卫生健康领域的期刊文献资源，以实现该地区医疗卫生领域相关信息的全球共享，促进世界范围内医学相关信息的传播利用。截至目前，已收录期刊约800种。

截至目前，《实验动物与比较医学》已被瑞典开放获取期刊目录（DOAJ）、美国《化学文摘》（Chemical Abstracts）、美国《乌利希国际期刊指南》（Ulrichsweb Global Serials Directory）、美国史蒂芬斯数据库（EBSCO）、国际农业与生物科学研究中心文摘（CAB Abstracts）、全球健康数据库（Global Health）、哥白尼期刊数据库（ICI World of Journals）、哥白尼精选期刊数据库（ICI Master List）和WPRIM共9种国际知名数据库收录。

（《实验动物与比较医学》编辑部）

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.055

徐　平，研究员，现任上海吉辉实验动物饲养有限公司首席科学家/研发总监。长期从事实验动物资源开发、保存和资源共享工作，擅长实验动物遗传育种和实验动物设施的运行管理。主持或承担国家科技攻关项目、国家科技支撑计划项目、国家科技基础条件平台建设项目以及上海市科研计划项目等30余项；发表论文80余篇，主编出版实验动物著作4部，副主编3部；取得国家专利16项、软件著作权1项；获市级科技进步奖和攻关奖4项。曾担任中国科学院上海实验动物中心主任，国家啮齿类实验动物种子中心、国家兔类实验动物种子中心项目负责人。曾多次赴日本和美国进修及合作研究，并受聘为日本鹿儿岛大学、新日本科学株式会社访问学者，日本熊本大学高级访问学者、客座教授。

肖君华，复旦大学遗传学博士，美国德州大学人类遗传中心博士后。先后在北京博宁生物科技有限公司、华东理工大学任教。目前担任东华大学生物科学与技术研究所分子遗传课题组长、教授、博士生导师。同时兼任中国遗传学会理事、动物遗传专业委员会委员、产业促进委员会委员；上海市遗传学会副理事长、科普专业委员会主任委员；上海翼和应用生物技术有限公司首席科学家。研究方向包括小鼠遗传学，即利用野生小鼠遗传资源构建染色体替换系品系，并进行功能基因的定位与克隆；二代测序技术的开发，即利用二代测序平台，开展大规模的SNP、STR分型、高通量候选基因重测序、高通量候选基因表达水平检测等。曾主持4个国家自然科学基金，2个重点研发计划的子课题，10多项上海市重点项目。发表SCI论文30多篇，获批专利10多项。

BALB/cA. Cg. SHJH^{hr}小鼠的培育及其相关遗传学特性分析

谈小倩[1]，杨　颢[2]，唐慧青[1]，瞿　伟[1]，李　亮[1]，钱　珍[1]，顾坚忠[1]，肖君华[2]，徐　平[1]

(1. 上海吉辉实验动物饲养有限公司，上海 201611；2. 东华大学生物科学与技术研究所，上海 201620)

[摘要]　目的　将自发突变培育的SHJH^{hr}小鼠的突变*Hr*基因导入到遗传背景清晰的BALB/cAShjh近交系小鼠，通过突变基因筛查和遗传学特性分析为后续研究*Hr*基因突变导致异常表型的分子机制以及该模型的推广应用提供依据。**方法**　采用在表型监测指导下回交-互交的育种方法，将自发突变培育的SHJH^{hr}小鼠的突变基因以同源突变导入方式导入到近交系BALB/cAShjh小鼠，经10代后培育成BALB/cA.Cg.SHJH^{hr}（简称C.Cg.SHJH^{hr}）小鼠。通过多重PCR建库后二代测序的方法，分析C.Cg.SHJH^{hr}小鼠中随机分布于基因组上的90个单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）检测位点基因型。然后按照GB/T 14927.1—2008的方法，对C.Cg.SHJH^{hr}小鼠中14个生化位点标记基因进行检测。最后利用全基因组外显子测序技术，检测该小鼠的突变基因。**结果**　自2018年5月至2022年3月，共进行了10代的回交-互交，完成了C.Cg.SHJH^{hr}小鼠品系的构建。在检测的90个SNP位点中，除了rs13484115、rs13484116两个位点不同外，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的其他位点基因型均与受体小鼠BALB/cAShjh相同；生化位点标记基因检测结果显示，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的14个位点全部与受体小鼠相同；全基因组外显子测序发现，该小鼠相比受体小鼠品系存在109个位点突变，包括同义突变71个，终止密码子增加1个，错义突变37个，涉及蛋白质序列改变的基因20个（包括已报告的*Hr*基因）。**结论**　成功培育了突变导入系C.Cg.SHJH^{hr}小鼠，通过全基因组外显子测序分析发现了3个主要引起表型变异的*Hr*突变基因及关联突变基因，为该小鼠在生物医学研究中的拓展应用提供了基础数据。

[关键词] BALB/cA.Cg.SHJH^{hr}小鼠；　外显子测序；　突变基因；　遗传学特性

[中图分类号] R-332；Q95-33　[文献标志码] A　[文章编号] 1674-5817(2023)04-0363-08

[基金项目] 上海市科技创新行动计划项目“自发性早衰小鼠的种群建立及相关机制研究”(21140909100)

[第一作者] 谈小倩(1982—)，女，执业兽医师，研究方向为实验动物模型和实验动物疾病。E-mail：xiaoqian_tan@163.com

[通信作者] 徐　平(1964—)，男，研究员，研究方向为实验动物资源和低温生物学。E-mail：pingxu@jh-labanimal.com。ORCID：0000-0001-6744-8908；

肖君华(1968—)，男，教授，研究方向为小鼠遗传学。E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-1977-372X

Creation and Analysis of Related Genetic Characteristics of BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} Mice

TAN Xiaoqian[1], YANG Hao[2], TANG Huiqing[1], QU Wei[1], LI Liang[1], QIAN Zhen[1], GU Jianzhong[1], XIAO Junhua[2], XU Ping[1]

(1. Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co. , Ltd. , Shanghai 201611, China; 2. Institute of Biological Science and Technology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Correspondence to: XU Ping (ORCID: 0000-0001-6744-8908), E-mail: pingxu@jh-labanimal.com;
XIAO Junhua (ORCID: 0000-0002-1977-372X), E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

[ABSTRACT] Objective To introduce the *Hr* gene of spontaneously mutated SHJH^{hr} mice into BALB/cAShjh inbred mice with clear genetic background, and provide a basis for study on the molecular mechanism of *Hr* gene mutation-induced abnormal phenotype and the application of this model. **Methods** Using a backcross-intercross breeding method guided by phenotypic monitoring, mutant genes from SHJH^{hr} mice bred by spontaneous mutation were introduced into inbred BALB/cAShjh mice by homozygous mutation introgression, and the mice were bred into BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} (abbreviated as C.Cg.SHJH^{hr}) mice after 10 generations. The genotypes of 90 single nucleotide polymorphism (SNP) detection sites were analyzed in C.Cg.SHJH^{hr} mice by multiplex PCR library construction followed by next generation sequencing. Then 14 biochemical locus marker genes were detected in C.Cg.SHJH^{hr} mice according to the method of GB/T 14927.1-2008. Finally, whole genome exon sequencing was utilized to detect the mutated genes in this mouse. **Results** From May 2018 to March 2022, a total of 10 generations of backcross-intercross were conducted to complete the construction of the C.Cg.SHJH^{hr} mouse line. Among the 90 SNPs loci detected, except for rs13484115 and rs13484116, all the other loci had the same genotype as the recipient mice BALB/cAShjh. The results of biochemical marker gene detection showed that all the 14 loci of the mouse were the same as those of the recipient mouse. Whole genome exon sequencing found that the mouse had 109 site mutations compared with the recipient mouse strain, including 71 synonymous mutations, 1 stopgain, 37 missense mutations, and 20 genes involved in protein sequence alterations (including the reported *Hr* gene). **Conclusion** C.Cg.SHJH^{hr} mice were created. Through exon sequencing and genetic analysis, three *Hr* mutated genes and associated mutated genes that mainly cause phenotypic variations were identified, which provides a basis for expanding the application of C.Cg.SHJH^{hr} mice in biomedical research.

[Key words] BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} mice; Exon sequencing; Mutation; Genetic characteristics

无毛（*Hr*）基因中现有的等位基因突变形成了一系列动物模型，这些模型通过多种哺乳动物部分或完全丧失*Hr*功能而出现脱毛[1-7]，为皮肤病、衰老、毛囊生物学研究等提供了丰富的资源。本研究组于2017年10月在远交群ICR小鼠生产群中偶然发现一种表型与*Hr*突变体（Hr^{rh-R}）犀牛型小鼠[8]惊人相似的无毛突变小鼠，通过突变鼠与亲代ICR小鼠回交，建立了无毛远交群小鼠（SHJH：ICR-Hr^{hr}）并定名为SHJH^{hr}。将SHJH^{hr}小鼠的核心群分成16组，采用完全循环交配的方式保持一定的基因杂合度，维持基因多态性。在随后的群体表型观察中发现，SHJH^{hr}小鼠的体重明显低于ICR小鼠，生存期比正常小鼠缩短近一半，另外还存在繁育性能降低、部分血液生理生化指标以及骨与软骨组织病理变化等表型特征[9-10]。为了弄清基因突变与表型改变相关的机制，本研究试图通过回交-互交的方式将SHJH^{hr}小鼠的突变基因导入到遗传背景清晰的近交系BALB/cAShjh小鼠中，培育成BALB/cA.Cg.SHJH^{hr}（简称C.Cg.SHJH^{hr}）小鼠并对其进行突变基因筛查和遗传学检测分析，为后续研究*Hr*基因突变导致的一系列异常表型的分子机制以及该模型的推广应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SHJH^{hr}小鼠和BALB/cAShjh小鼠，均来自上

海吉辉实验动物饲养有限公司［SCXK（沪）2022-0009)］，饲养在大型隔离器内，环境温度20～24 ℃，相对湿度50%±10%，12 h明暗交替，饲喂上海吉辉JH-MD01配方γ线辐照（35 kGy）饲料［委托上海舟虞生物技术有限公司生产，沪饲证（2021）04027］，自由采食和饮水。本研究在上海吉辉实验动物饲养有限公司的屏障环境中进行，研究方案经上海吉辉实验动物饲养有限公司实验动物组织与管理委员会审核批准（批号SHJH-YF-2020-002），相关检测委托第三方进行。

1.2 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠育种方案

参照Flaherty等[11]的NX system育种流程（1981年出版），通过将来自同一窝的3只雄性SHJH^{hr}隐性纯合子小鼠（*hr*/*hr*）与6只来自核心群的雌性近交系BALB/cAShjh小鼠（+/+）交配（*hr*/*hr*3♂×+/+6♀），得到的杂合子小鼠（+/*hr*）并进行互交，产生回交-互交一代（N1）子鼠；然后选择N1的雄性隐性纯合子小鼠（*hr*/*hr*），继续与雌性近交系BALB/cAShjh小鼠（+/+）交配，并依次回交-互交10代（N10），育成BALB/cA.Cg.SHJH^{hr}（简称C.Cg.SHJH^{hr}）小鼠；最后采用近交系的5笼保种法建立核心群。具体的培育方案示意见图1。

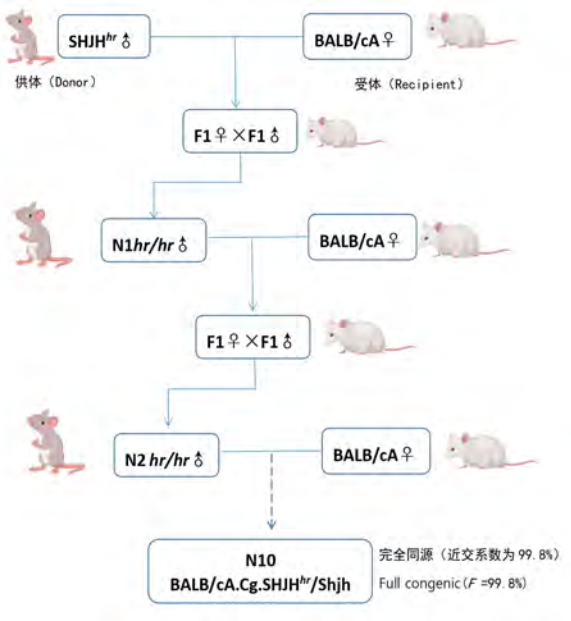


图1 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的培育方案示意图

Figure 1 Creation schemes of C.Cg.SHJH^{hr} mouse

1.3 SNP分型

用N10代C. Cg. SHJH^{hr}纯合子小鼠（*hr*/*hr*）和BALB/cAShjh小鼠各6只（均雌雄各半），参考文献［12］，从SNP公共数据库中挑选分布于每条常染色体和性染色体的90个SNP位点（这些是受体小鼠的特异性位点），使用动物基因组DNA快速提取试剂盒［天根生化（北京）有限公司］提取基因组DNA，吸取1 μL抽提好的DNA，在1%琼脂糖凝胶电泳中检测其浓度，然后将所有的DNA样本标化到质量浓度为30 ng/μL，−20 ℃储存备用。多重引物Mix配置购自上海翼和应用生物技术有限公司，并委托该公司进行多重PCR扩增，检测目的片段DNA序列，然后在Illumina测序仪上分析PCR产物，确定各SNP检测位点的基因型，并进行两种小鼠之间的比较。

1.4 生化位点标记基因检测

用N10代C. Cg. SHJH^{hr}纯合子小鼠（*hr*/*hr*）和BALB/cAShjh小鼠各2只（均雌雄各半），按照GB/T 14927.1—2008《实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》，委托上海市实验动物质量监督监测站对14个生化位点标记基因*Car*2、*Ce*2、*Es*1、*Es*3、*Es*10、*Gpd*1、*Gpi*1、*Hbb*、*Idh*1、*Mod*1、*Akp*1、*Pgm*1、*Trf*和*Pep*3进行检测，并进行两种小鼠之间的比较。

1.5 外显子区段捕获测序

用N10代C. Cg. SHJH^{hr}纯合子小鼠（*hr*/*hr*）和BALB/cAShjh小鼠各6只（均雌雄各半），提取基因组DNA；电泳检测合格后经Covaris随机打断成150～220 bp的片段，采用SureSelectXT试剂盒和SureSelect鼠全外显子V6试剂盒［购自安捷伦科技（中国）有限公司］进行建库和捕获；DNA片段经过末端修复、加ployA尾、加测序接头、纯化、磁珠捕获、PCR扩增等步骤，完成文库构建。文库检验合格后委托上海欧易生物医学科技有限公司利用测序仪进行双端测序，获得的测序序列比对到参考基因组上，比对结果使用GATK4软件的Haplotypecaller模块进行SNP和InDel（插入与缺失）变异检测；用CNVkit软件检测样本的拷贝数变异（copy number variation，CNV），用Lumpy软件对样本进行结构变异（structure varianitions，SVs）信息检测，用PolyPhen-2软件预测基因突变是否有害（可自动计算得分，0～1数字表示碱基变化可能引起突变表型的关联度，数据越大关联度越大），综合分析和解读样本的变异信息。

2 结果

2.1 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠品系成功建立

由于SHJH^{hr}小鼠和BALB/cAShjh小鼠的杂交后代

无法区分，因此利用突变等位基因*Hr*纯合时的特殊表型（脱毛→无毛），通过回交-互交的育种方案，使变异等位基因在交替世代中产生纯合子（*hr*/*hr*）。根据Snell等[13]建议的近交系数计算公式（$F=[1-(1/2)^{N-1}]$）可知，N10代小鼠的近交系数$F=[1-(1/2)^{N-1}]=[1-(1/2)^{10-1}]=99.81\%$，提示回交-互交至第10代时，除了所选的突变等位基因外，后代基因组绝大部分与受体小鼠相同（图2）。

2.2 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠表型

观察培育至N10代的子代表型，发现C.Cg.SHJH^{hr}小鼠已经稳定了等位基因*Hr*纯合时的特殊表型，其脱毛→无毛、皮肤随年龄增大而快速老化并出现丘疹等特征与供体小鼠相同；但该鼠的指甲，随着年龄增加，其指甲长度增加迅速，约6个月龄时指甲过度生长，10月龄后指甲长度不一，且无序卷曲，该特征与供体鼠、受体鼠均不同（图3）。

2.3 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的SNP位点基因型

SNP位点基因型检测结果显示，N10代的C.Cg.SHJH^{hr}小鼠基因分型无杂合子，在检测的90个SNP位点中，除了rs13484115（A→G）、rs13484116（T→G）两个位点不同外，其他位点基因型均与受体BALB/cAShjh小鼠相同。结果表明来自远交群SHJH^{hr}小鼠的*Hr*突变基因已导入受体BALB/cAShjh小鼠，建立了近交系C.Cg.SHJH^{hr}小鼠。

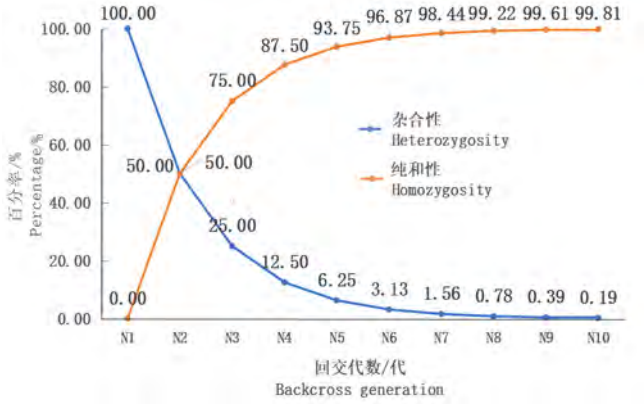


图2 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠培育过程中每代的基因组纯合度与杂合度

Figure 2 Genomic homogeneity and heterogeneity during the creation of C.Cg.SHJH^{hr} mice

注：A，SHJH^{hr}小鼠2月龄；B，SHJH^{hr}小鼠6月龄；C，BALB/cAShjh小鼠2月龄；D，BALB/cAShjh小鼠4月龄；E，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠2月龄；F，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠6月龄；G，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠12月龄。

Note: A, 2-month-old SHJH^{hr} mice; B, 6-month-old SHJH^{hr} mice; C, 2-month-old BALB/cAShjh mice; D, 4-month-old BALB/cAShjh mice; E, 2-month-old C.Cg.SHJH^{hr} mice; F, 6-month-old C.Cg.SHJH^{hr} mice; G, 12-month-old C.Cg.SHJH^{hr} mice.

图3 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠与供体小鼠、受体小鼠不同年龄段的表型比较

Figure 3 Comparison of phenotype of C.Cg.SHJH^{hr} and SHJH^{hr}, BALB/cAShjh at different ages

2.4 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的生化标记基因

为了进一步验证N10代C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的主要基因组来自受体BALB/cAShjh小鼠，对N10代C.Cg.SHJH^{hr}小鼠和BALB/cAShjh小鼠的14个生化标记基因进行检测，结果显示C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的14个生化标记基因与近交系BALB/cA小鼠完全相同（表1）。

2.5 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的全基因组外显子突变情况

全基因组外显子检测发现，与BALB/cAShjh小鼠

表1 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠与BALB/cAShjh小鼠生化标记基因的差异

Table 1 Differences in biochemical marker genes between C.Cg.SHJH^{hr} mice and BALB/cAShjh mice

位点Loci	C.Cg.SHJH^{hr}	BALB/cA
Car2	b	b
Ce2	a	a
Es1	b	b
Es3	a	a
Es10	a	a
Gpd1	b	b
Gpi1	a	a
Hbb	d	d
Idh1	a	a
Mod1	a	a
Akp1	b	b
Pgm1	a	a
Trf	b	b
Pep3	a	a

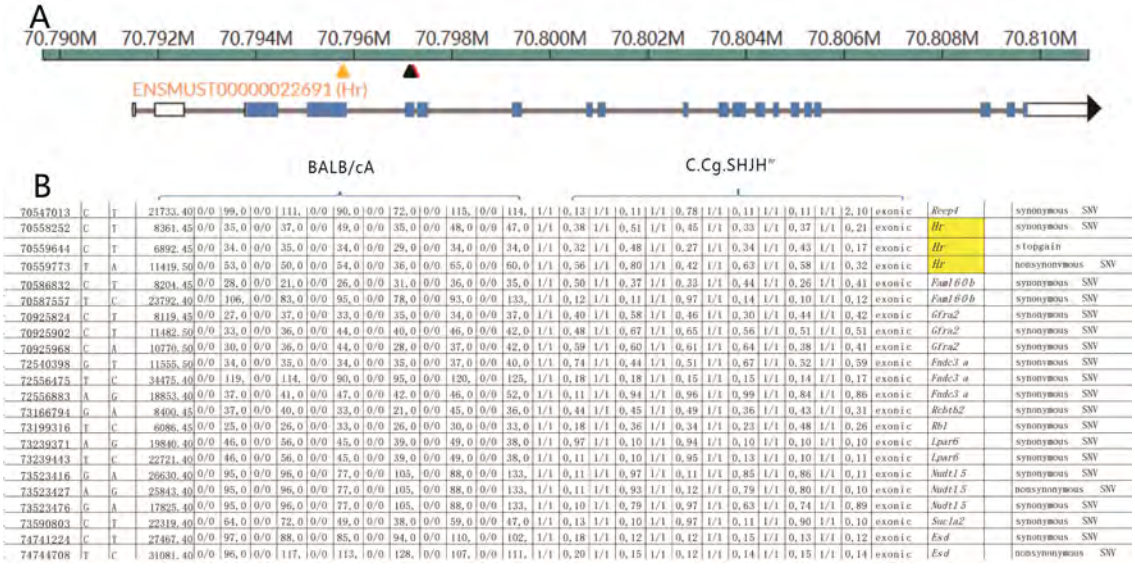
注：每个位点的a和b所表示的生化标记是不一样的，具体解释请见GB/T 14927.1—2008《实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》。

Note: The biochemical markers represented by a and b at each site are different, and their specific explanations can be found in the Chinese standard GB/T 14927.1-2008 "*Laboratory Animals: Methods for Biochemical Markers of Inbred Mice and Rats*".

比对，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠共测到109个突变位点，涉及32个基因。生物信息学分析发现，这些突变集中位于14号染色体上从70547013到99302109的区段。其中，同义突变（synonymous）71个，错义突变（nonsynonymous）37个，引起蛋白质氨基酸序列变化的位点涉及20个基因（表2），终止密码子增加（stopgain）1个。测序分析检测发现C.Cg.SHJH^{hr}小鼠中与脱毛相关的*Hr*基因共有3个突变，分别为同义突变（70558252 C>T）、错义突变（70559773 T>A）和无义突变（70559644 C>T）各1个（图4）。

3 讨论

表型的变异通常是因为基因的改变。将一个特异性等位基因导入到一个遗传背景非常清晰的近交系后进行基因组测序是鉴定突变基因的重要手段。本研究将远交群ICR小鼠中发现的无毛小鼠的无毛基因，按照NX system育种方案[11]，通过与近交系BALB/cAShjh小鼠回交-互交10代，在每一代中只有那些在差异位点上获得供体等位基因的后代才被选择进行下一轮回交。根据孟德尔遗传分离定律，这些回交后代动物基因位点的50%随机携带受体等位基因，剩余的50%随机携带供体等位基因，即每一代中杂合性水平降低约50%。依据Snell等[13]的公式［1-（1/2）$^{N-1}$］，在N5代，仅经过4次回交-互交后，其子代中约94%的基因组与受体近交系完全相同；到N10代时，近交系数已增加到99.81%。也就是说除了0.19%来自供体外，其他等位基因均与受体相同，即完成突变导入系



注：A，*Hr*基因测序得到3个位点；B，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠和BALB/cAShjh小鼠位于外显子区段的差异化位点（部分）。

Note: A, Three locations obtained from *Hr* gene sequencing; B, Differentiated locations in exon regions of C.Cg. SHJH^{hr} mice and BALB/cAShjh mice.

图4 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠和BALB/cAShjh小鼠的基因组外显子测序所得突变

Figure 4 Mutations resulting from genomic exon sequencing between C.Cg.SHJH^{hr} mice and BALB/cAShjh mice

表2 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠外显子测序发生错义突变的基因分析

Table 2 Analysis of genes with missense mutations by exon sequencing in C.Cg.SHJH^{hr} mice

突变位置 Mutation position	碱基变化 Base alteration	基因 Gene	涉及疾病/细胞功能 Related diseases/cell functions	下游信号通路调控 Signal pathway regulation	PolyPhen-2计算得分 PolyPhen-2 scores
70559773	C→T	*Hr*	全身性脱毛,伴有丘疹性病变的心房颤动	是	1.000
73523427	A→G	*Nudet*15	造血干细胞和祖细胞急性损失	是	0.000
74744708	T→C	*esd*	甲醛分解代谢	是	0.505
74811692	T→C	*Lrch*1	细胞对趋化因子的反应	否	0.047
74813612	T→C				
75031916	G→A	5031414*D*18*Rik*	自噬体成熟、糖原、脂质代谢过程的调节	否	0.022
75032403	C→A				
75036145	A→G				
75125178	A→G	*Lrrc*63	膜蛋白	否	-
75224148	C→T	*Lcp*1	肌动蛋白丝束组件	否	0.166
78510551	C→G	*Akap*11	体型缩小,活动能力减退	否	0.997
79401743	G→A	*Mtrf*1	线粒体翻译终止;耳聋,痉挛性共济失调	否	0.959
79401763	G→T	*Mtrf1*			
79406608	A→G				
79427505	C→G	*Kbtbd*	蛋白酶体介导的泛素依赖蛋白的分解代谢	是	0.006
79452831	G→C				
79573278	A→G	*Elf*1	RNA聚合酶Ⅱ转录的正调控	是	0.000
79595387	G→A	*Sugt*1	参与动粒功能	是	0.000
79637996	C→G	*Lect*1	内皮细胞增殖负调控	否	0.005
79656659	A→G				
79656692	T→C				
86966512	G→A	*Diaph*3	遗传性听神经病变,先天性造血障碍性贫血	是	0.958
96201334	G→T	*Klhl*1	肌动蛋白结合蛋白	否	0.001
88469236	C→G	*Pcdh*20	细胞黏附	否	0.000
99046045	G→C	*Mzt*1	微管蛋白复合体组成	是	-
99061539	G→C	*Bora*	蛋白激酶活性的激活,细胞周期过程的调控,蛋白质定位的调节	是	0.995
99068023	C→T	*Bora*			
99068337	G→C				
99068407	C→G				
99068529	A→G				
99068542	A→G				
99072637	T→A				
99072704	G→A				
99084109	C→A	*Dis*3	CUT分解代谢,RNA加工,rRNA分解代谢	是	0.000
99099549	G→T				
99101172	A→G	*Pibf*1	有丝分裂核分裂,细胞因子产生,蛋白质磷酸化	否	0.982

的培育。

为了验证突变基因导入近交系后的遗传学特性，本研究从SNP公共数据库中挑选90个分布于每条常染色体和性染色体的SNP位点，对小鼠进行SNP位点检测。结果显示，N10代C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的90个SNP位点中，除rs13484115（A→G）、rs13484116（T→G）两个位点不同外，其他位点基因型均与BALB/cAShjh小鼠相同。同时，采用生化标记检测法对该小鼠的14个生化位点标记基因进行检测，结果进一步验证了C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的纯合性，并与受体BALB/cAShjh小鼠完全一致。以上结果证明突变基因完全导入到了受体近交系小鼠。

同源突变导入近交系C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的建立，为皮肤、毛发等相关的药物、化妆品、护肤品等药理学、毒理学研究提供了一个新的研究工具，同时与SHJH^{hr}小鼠系列延伸品系等一起，后续或可广泛地应用于肿

瘤学、生理学、免疫学、核医学、衰老等研究。

全外显子组测序是一种广泛使用的新一代测序方法，涉及基因组蛋白质编码区域的测序。哺乳类动物外显子组所占基因组的比例为1.0%～1.5%，但它包含了约85%的已知与疾病相关的变异[14-15]。C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的全基因组外显子检测共获得了109个突变位点，相对于受体BALB/cAShjh小鼠，共筛选到20个发生错义/无义突变的基因。因为这些突变引起了编码氨基酸的改变，有可能导致基因功能的改变。除了已经报道过的直接影响毛发生长和犀牛样皮肤病变的*Hr*基因外[16-22]，本研究中生物信息学分析发现，部分基因如*Akap*11、*Mtrf*1、*Diaph*3、*Bora*、*Pibf*1等的PolyPhen-2得分均大于0.9，说明可能引起突变表型的关联度较大，涉及突变小鼠疾病表型，这与前期测得的生理生化数据[10-11]相关；进一步的外显子测定中，一系列突变基因均涉及下游信号通路，并通过模拟计算提示突变小鼠表达谱与受体小鼠转录组存在差异。

本研究还发现，与供体SHJH^{hr}小鼠相同，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠出生后12～14 d时首先从在鼻尖部开始脱毛，然后扩散至全身，除触须正常外，全身毛发在30～35 d完全脱落，这是所有*Hr*等位基因突变小鼠的共同特征[23]。但随着年龄的增长，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的指甲长度增加迅速，约6月龄时指甲过度生长，至10月龄后指甲长度不一并无序卷曲，这与SHJH^{hr}小鼠有所不同，但与Liu等[8]描述的犀牛样小鼠表型完全相同。此外，大体观察发现C.Cg.SHJH^{hr}小鼠在表皮皱褶、活动状态、繁殖性能等方面（尚未发表）也与Gao等[10]和Li等[24]报道的SHJH^{hr}小鼠特性有一定差异，这有待于进一步研究。

综上，本研究通过将SHJH^{hr}突变小鼠和BALB/cAShjh近交系小鼠回交-互交的繁育方式，经过10代的同源突变导入，培育了C.Cg.SHJH^{hr}小鼠；通过生化标记基因和SNP检测分析，确认其基因的纯合度以及与受体小鼠基因的一致性；通过全外显子测序发现了引起表型变异的突变基因及关联的系列突变基因，为进一步研究该小鼠在生物医学研究中的作用奠定了基础。

[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上海吉辉实验动物饲养有限公司实验动物组织与管理委员会(IACUC)审核批准(No. SHJH-YF-2020-002)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co, Ltd (Approval Letter No. SHJH-YF-2020-002). All experiments were carried out in accordance with China's laws and regulations on experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

谈小倩收集资料，并负责数据分析及论文撰写；
杨颢收集资料，并负责全基因外显子测序、多重PCR建库后二代测序及数据分析；
唐慧青负责生化位点标记基因检测及数据分析；
瞿伟和李亮负责动物繁育；
钱珍负责动物繁育及种群建立；
顾坚忠收集资料，并负责突变小鼠模型培育指导；
肖君华负责外显子测序方案设计及把控；
徐平负责课题实验设计及本论文的审核把关。

[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 References]

[1] AHMAD W, FAIYAZ UL HAQUE M, BRANCOLINI V, et al. Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene[J]. Science, 1998, 279(5351): 720-724. DOI: 10.1126/science.279.5351.720.

[2] AHMAD W, RATTERREE M S, PANTELEYEV A A, et al. *Atrichia* with papular lesions resulting from mutations in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) hairless gene[J]. Lab Anim, 2002, 36(1):61-67. DOI: 10.1258/0023677021911777.

[3] BALE S J. Of hairless mice and men: the genetic basis of congenital alopecia universalis/congenital atrichia[J]. J Cutan Med Surg, 1999, 3(6): 309-311. DOI: 10.1177/120347549900300607.

[4] BERGMAN R, SCHEIN-GOLDSHMID R, HOCHBERG Z, et al. The alopecias associated with vitamin D-dependent rickets type IIA and with hairless gene mutations: a comparative clinical, histologic, and immunohistochemical study[J]. Arch Dermatol, 2005, 141(3): 343-351. DOI: 10.1001/archderm.141.3.343.

[5] PANTELEYEV A A, PAUS R, AHMAD W, et al. Molecular and functional aspects of the hairless (hr) gene in laboratory rodents and humans[J]. Exp Dermatol, 1998, 7(5): 249-267. DOI: 10.1111/j.1600-0625.1998.tb00295.x-i1.

[6] SUNDBERG J P, PRICE V H, KING L E Jr. The hairless gene in mouse and man[J]. Arch Dermatol, 1999, 135(6):718-720. DOI: 10.1001/archderm.135.6.718.

[7] ZLOTOGORSKI A, HOCHBERG Z, MIRMIRANI P, et al. Clinical and pathologic correlations in genetically distinct forms of atrichia[J]. Arch Dermatol, 2003, 139(12): 1591-1596. DOI: 10.1001/archderm.139.12.1591.

[8] LIU Y, SUNDBERG J P, DAS S, et al. Molecular basis for hair loss in mice carrying a novel nonsense mutation (Hr$^{rh\text{-}R}$) in the hairless gene (Hr)[J]. Vet Pathol, 2010, 47(1):167-176. DOI: 10.1177/0300985809352970.

[9] 唐慧青, 常书福, 于志锋, 等. SHJH^{hr}小鼠部分生物学特性及衰老表型的测定与分析[J]. 实验动物与比较医学,2023, 43(1):44-52.

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.069.
TANG H Q, CHANG S F, YU Z F, et al. Investigation on biological characteristics and aging phenotype of SHJH^{hr} mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 44-52. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.069.

[10] GAO J F, LI Y C, GUAN Y L, et al. The accelerated aging skin in rhino-like SHJH^{hr} mice[J]. Exp Dermatol, 2022, 31(10): 1597-1606. DOI: 10.1111/exd.14632.

[11] FOSTER H L, DAVID SMALL J, FOX J G. The Mouse in biomedical research[M]. New York: Academic Press, 1981.

[12] 钱强, 徐园, 王亚恒, 等. 基于多重PCR靶向二代测序的近交系小鼠遗传质量监测方法建立[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(2): 111-117. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.02.008.
QIAN Q, XU Y, WANG Y H, et al. Mouse genetic quality monitoring method establishment based on next-generation sequencing through multiplex PCR[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(2): 111-117. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.02.008.

[13] SNELL G D. Congenic resistant strains of mice[M]//Origins of inbred mice. Amsterdam: Elsevier, 1978:119-156. DOI: 10.1016/b978-0-12-507850-4.50016-0.

[14] POSEY J E, O'DONNELL-LURIA A H, CHONG J X, et al. Insights into genetics, human biology and disease gleaned from family based genomic studies[J]. Genet Med, 2019, 21(4): 798-812. DOI: 10.1038/s41436-018-0408-7.

[15] LUPSKI J R. Clinical genomics: from a truly personal genome viewpoint[J]. Hum Genet, 2016, 135(6): 591-601. DOI: 10.1007/s00439-016-1682-6.

[16] KURAMOTO T, KUWAMURA M, TAGAMI F, et al. Kyoto rhino rats derived by ENU mutagenesis undergo congenital hair loss and exhibit focal glomerulosclerosis[J]. Exp Anim, 2011, 60(1):57-63. DOI: 10.1538/expanim.60.57.

[17] CICHON S, ANKER M, VOGT I R, et al. Cloning, genomic organization, alternative transcripts and mutational analysis of the gene responsible for autosomal recessive universal congenital alopecia[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(11):1671-1679. DOI: 10.1093/hmg/7.11.1671.

[18] ZLOTOGORSKI A, AHMAD W, CHRISTIANO A M. Congenital atrichia in five Arab Palestinian families resulting from a deletion mutation in the human hairless gene[J]. Hum Genet, 1998, 103(4):400-404. DOI: 10.1007/s004390050840.

[19] HSIEH J C, SISK J M, JURUTKA P W, et al. Physical and functional interaction between the vitamin D receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 38665-38674. DOI: 10.1074/jbc.M304886200.

[20] PANTELEYEV A A, CHRISTIANO A M. The Charles River hairless rat mutation is distinct from the hairless mouse alleles[J]. Comp Med, 2001, 51(1):49-55.

[21] POTTER G B, BEAUDOIN G M, DERENZO C L, et al. The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor[J]. Genes Dev, 2001, 15(20):2687-2701. DOI: 10.1101/gad.916701.

[22] THOMPSON C C, BOTTCHER M C. The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(16):8527-8532. DOI: 10.1073/pnas.94.16.8527.

[23] SUNDBERG J P, DUNSTAN R W, COMPTON J G. Hairless mouse, HRS/J$^{hr/hr}$[M]//Integument and mammary glands. Berlin, Heidelberg: Springer, 1989:192-197. DOI: 10.1007/978-3-642-83749-4_32.

[24] LI Y C, GAO J F, GUAN Y L, et al. Novel rhino-like SHJH^{hr} mice with thyroid dysfunction[J]. Zool Res, 2021, 42(6):734-738. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.211.

（收稿日期：2023-04-28　修回日期：2023-06-08）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，娄怡欣）

[引用本文]
谈小倩, 杨颢, 唐慧青, 等. BALB/cA.Cg.SHJH^{hr}小鼠的培育及其相关遗传学特性分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 363-370. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.055.
TAN X Q, YANG H, TANG H Q, et al. Creation and analysis of related genetic characteristics of BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 363-370. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817.2023.055.

****

《实验动物与比较医学》被国际数据库EBSCO收录

2023年2月，《实验动物与比较医学》（*Laboratory Animal and Comparative Medicine*，LACM）（ISSN 1671-5817，CN 31-1954/Q）被美国EBSCO学术数据库预收录；同年8月，编辑部收到其正式收录证书，收录起始时间为2023年第1期。

EBSCO Information Services是全球最大的出版物搜索平台之一。目前，EBSCO收录全球期刊8万多种，选用EBSCO产品及服务的全球机构（包括知名学府）超11.5万家，其平台上每天检索数可达1.8亿次。其中，与EBSCO签约合作的国内期刊约400种。

借助EBSCO等国际数据库，本刊发表的论文会有更高的国际显示度及传播广度，相关作者及单位在国际上的学术知名度和影响力将有更大提升，这将有助于推动中文优秀学术成果的国际认可与交流。

（《实验动物与比较医学》编辑部）

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.036

山羊先兆子痫疾病模型的构建及母体生物学特性评价

卢 今[1], 王 剑[1], 朱 莲[1], 严国锋[1], 马政文[1], 李 垚[1], 戴建军[2], 朱寅秋[1], 周 晶[1]
(1. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025; 2. 上海市农业科学研究院畜牧兽医研究所, 上海 201106)

[摘要] 目的 建立山羊先兆子痫动物模型，并收集该疾病模型各项生理指标和母体的生物学特性数据，与人类该疾病的发生发展特征相对照，为防治人类先兆子痫疾病的发生提供参考。**方法** 将23头雌性崇明白山羊分为3组，其中对照组妊娠母羊临产期前不进行任何手术操作；假手术组在母羊妊娠（100±5）d时行先兆子痫假手术造模，仅暴露并游离其子宫体动脉；手术组于母羊妊娠（100±5）d时，在其一侧子宫体动脉上放置银质血管夹，夹闭动脉部分内径，制作先兆子痫模型。对妊娠100 ~ 140 d的对照组和手术组母羊连续监测其心率和后肢血压，并利用血流仪结合血流探头、动物生理信号采集仪采集假手术组母羊的子宫动脉侧支内血流数据，以及手术组母羊在放置血管夹前后子宫动脉侧支内的血流变化情况。在预期分娩日期前，取母羊颈静脉血进行血常规、肌酐、尿素氮和血液离子分析；同时采集各组母羊尿液，进行尿蛋白、尿肌酐分析。所有实验组均于母羊妊娠（140±5）d时行剖宫取胎术，然后取各组母羊的肝、肾、子宫和胎盘组织进行苏木精-伊红染色，以进行病理学观察。**结果** 手术造模15 min后手术组母羊的子宫体动脉血流量保持稳定，血流流量差相对于对照组和假手术组均降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。相较于对照组，手术组母羊在产前出现血清渗透压升高、血红蛋白降低、血糖和血清尿素氮值升高，以及钙、钠、氯离子含量增高等变化（均$P < 0.05$），并出现蛋白尿，尿肌酐及尿蛋白肌酐比均明显高于对照组和假手术组（均$P < 0.05$）。手术组动物的手术侧子宫体动脉弹力层较对侧增厚，但结构松散；手术侧胎盘出现细胞间质肿胀、炎性细胞浸润等病理变化。以上生理指标特征均与人类先兆子痫的临床指标较为一致。**结论** 通过血流仪验证，以及妊娠后期母羊各项生理指标检测证明，本实验成功构建了山羊先兆子痫模型，并获得了该模型的相关生理指标数据，进一步验证了先兆子痫疾病与子宫动脉病变的相关性。

[关键词] 先兆子痫；动物模型；血流分析；生物学特性；山羊
[中图分类号] R-332；Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)04-0371-10

Establishment of Preeclampsia Model in Goat and Evaluation on Maternal Biological Characteristics

LU Jin[1], WANG Jian[1], ZHU Lian[1], YAN Guofeng[1], MA Zhengwen[1], LI Yao[1], DAI Jianjun[2], ZHU Yinqiu[1], ZHOU Jing[1]
(1. Department of Laboratory Animal Science, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Institution of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai 201106, China)
Correspondence to: ZHOU Jing (ORCID: 0009-0005-2626-1561), E-mail: zj2008@shsmu.edu.cn

[ABSTRACT] Objective Establish an animal model of preeclampsia in goats, collect data on various physiological indicators and maternal biological characteristics of the disease model to compare with clinical feature of the disease in humans, provide reference for the prevention and treatment of preeclampsia in humans. **Methods** Twenty-three goats bred in Chongming district were divided into three groups: Control group, no surgical procedure was performed on animals of this group; sham group, ewes in this group underwent the sham operation on the 100±5th day of gestation, and only the uterine artery was

[基金项目] 上海市科学技术委员会科技创新行动计划“崇明白山羊先兆子痫及乳腺发育疾病模型的生物学特性评价”(19140900103)；上海高校教师培养计划-实验技术队伍建设计划“周晶”
[第一作者] 卢 今(1990—)，女，兽医学硕士，实验师，研究方向：实验动物医学。E-mail：ashleelu@shsmu.edu.cn
[通信作者] 周 晶(1985—)，女，生物工程硕士，实验师，研究方向：实验动物医学。E-mail：zj2008@shsmu.edu.cn。ORCID：0009-0005-2626-1561

exposed and dissociated; surgical group, a silver vascular clamp was clipped on one side of the uterine body artery of the ewe to narrow the inner diameter of the artery at the same gestation period (100±5) days. Heart rate and hindlimb blood pressure were continuously monitored in control and surgical ewes from 100 to 140 d of gestation, and blood flow data within the lateral branches of the uterine arteries of ewes in the sham group were collected using a hemodynamometer in combination with a hemodynamic probe and an animal physiological signal collector, as well as changes in blood flow within the uterine arteries in the lateral branches of the uterine arteries of the surgical group before and after placement of vascular clips in the surgical ewes. At the expected date of delivery, jugular vein blood was taken from ewes for routine blood test, creatinine, urea nitrogen, and blood ion analysis; urine was also collected from ewes in each group for analysis of urinary protein and urinary creatinine. All experimental groups were subjected to cesarean section on the 140±5th day of gestation in ewes, and then liver, kidney, uterus and placenta tissues were taken from ewes in each group and stained with HE for pathological observation. **Results** After 15 minutes of preeclampsia modeling surgery, blood flow volume remained stable in the vessel stenosis segment and the volume differential was relatively reduced in comparison to the control group and sham group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group, the ewes in the surgical group showed prenatal changes such as increased serum osmolality, decreased hemoglobin, increased blood glucose and urea nitrogen values, as well as increased levels of calcium, sodium, and chloride ions (all $P<0.05$) and proteinuria, with urinary creatinine and urinary protein-creatinine ratios were significantly higher than those in the control group and sham group (all $P<0.05$). The elastic lamina of the uterine body arteries on the operated side of the animals in the surgical group was thicker than that on the opposite side, but the structure was loose. The placenta on the operated side showed pathological changes such as cell interstitial swelling and inflammatory cell infiltration. The above physiological index characteristics were more consistent with the clinical features of human preeclampsia disease. **Conclusion** In this experiment, we successfully constructed a goat preeclampsia model and obtained data on relevant physiological indexes of this model, which further verified the correlation between preeclampsia disease and uterine artery lesions.

[Key words] Preeclampsia; Animal model; Blood flow analysis; Biological characteristics; Goat

先兆子痫（又称子痫前期）是一种常见的妊娠期高血压疾病。孕妇中发生该疾病的比例约为3%～5%[1]，但除了终止妊娠外，目前尚没有确切的治疗手段[2]。该疾病的临床特征主要表现为无高血压史的孕妇出现血压升高，并且在妊娠中后期血压持续升高，出现蛋白尿，提示肾功能受损，同时胎儿生长受限，胎盘功能出现异常[3]。此外，血小板减少、肝功能障碍、肺水肿及神经症状都是诊断先兆子痫的临床指征[2]。先兆子痫的发病率和死亡率都较高，但其发病机制和病理病因仍未被人们充分了解[2,4]。有研究认为，先兆子痫的发生与血管内皮功能障碍、螺旋动脉重构不足和免疫失衡有关[3,5-6]。本实验旨在寻找合适的疾病动物模型，以便对先兆子痫的病因及发病机制进行更深入的研究。

以往文献报道的先兆子痫动物模型建立方法多样，有环境刺激法、化学药物干扰法、免疫应答法、转基因法和手术干预法[5,7]，这与先兆子痫是一种多因素引发的疾病的假设相符合。其中，通过人为方法使妊娠母体动脉宽度变窄，从而降低母体子宫动脉灌注压（reduced uterine perfusion pressure，RUPP），这是目前较为常见的先兆子痫造模方法[5]。RUPP造模的优势在于模型动物的临床表现和生理学特征与人类较为一致[6]，例如模型动物会出现高血压、蛋白尿、肾功能异常、炎性细胞因子肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）以及$CD4^+$T细胞比例升高、抗血管生成因子可溶性FMS样酪氨酸激酶1（soluble fms-like tyrosine kinase 1，sFLT-1）升高、子代发育受限等临床表现[5-6,8-10]。该方法建立的动物模型多被用于胎盘缺血与母体先兆子痫综合征相关的研究[10]。

RUPP造模多使用大鼠和非人灵长类动物作为模型动物[6,10]。然而大鼠的胎仔数与人类差异较大，研究

窗口期短，即造模成功后仅几天大鼠即面临分娩，并且制作该模型需要在子宫动脉、腹主动脉和肾动脉上均放置血管夹，对大鼠造成的损伤较大[6,10]。非人灵长类的生殖系统和滋养层细胞浸润情况与人类更接近，然而受到成本和实验动物伦理的限制，无法大规模用于RUPP造模研究[5-6]。已知山羊的妊娠期在150 d左右，产仔数在1～2头[11]。本实验率先将山羊作为研究对象，使用选择性RUPP手术造模的方法——仅使母体子宫动脉血管狭窄，减少子宫胎盘血流灌注，成功制作山羊先兆子痫模型，以期为先兆子痫疾病研究提供一种经济且可重复性强的动物模型选择。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、材料与仪器

血流仪（型号TS420，美国Transonic公司）；动物生理信号采集分析系统（型号Powerlab16/35，澳大利亚AD Instruments公司）；血流仪探头（型号2.5PSB，美国Transonic公司）；气体麻醉机（美国VetEquip公司）；石蜡切片机（型号RM2235，德国Leica公司）；兽用血压计［型号08A-VET，康泰医学系统（秦皇岛）股份有限公司］；流式血细胞分析仪（型号ProCyte，美国IDEXX公司）；生化分析仪（型号Catalyst One，美国IDEXX公司）。999银制血管夹是本实验室自制，规格为5.4 mm×5.4 mm（长×宽），外径3.2 mm，内径0.9 mm。

盐酸氯胺酮（福建古田药业有限公司）；硫酸阿托品（天津药业集团新郑股份有限公司）；氟尼辛葡甲胺（山东鲁抗舍里乐药业有限公司）；布托啡诺（江苏恒瑞医药股份有限公司）；伊红染色液及苏木精染色液（深圳贝索生物技术有限公司）；异氟烷（中牧实业股份有限公司）；血常规及生化实验所用染色包及干式生化检测片（美国IDEXX公司）。

1.2 实验用动物

选用23头处于妊娠期的初产雌性崇明白山羊，12～15月龄，体重30～35 kg，由上海市农业科学院崇明山羊实验站繁育。该批动物饲喂全价颗粒粮，并且在实验前进行布鲁杆菌病、棘球蚴、孢子虫、山羊口疮、羊痘、口蹄疫和小反刍兽疫检测，结果均为阴性。该研究获得上海交通大学医学院实验动物饲养管理与使用委员会批准（实验计划注册号码：A-2020-007）。

1.3 实验分组

实验分3组：对照组（11头）妊娠母羊在临产期前不进行任何手术操作；假手术组（4头）在母羊妊娠（100±5）d时，行先兆子痫假手术造模，即仅暴露并游离其子宫体动脉；手术组（8头）于母羊妊娠（100±5）d时，在其一侧子宫体动脉上放置银质血管夹，夹闭动脉部分内径，制作先兆子痫模型。所有母羊均于妊娠（140±5）d时行剖宫取胎术。

1.4 手术造模方法

1.4.1 动物麻醉准备及实施

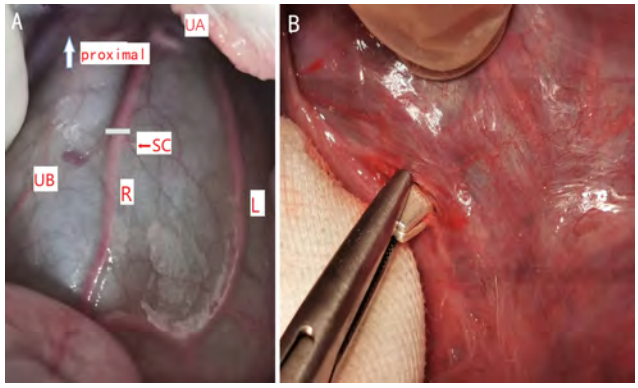
（1）场地准备：因手术均在冬季实施，室外温度较低，所以在动物麻醉前，将麻醉准备室和手术室的室温控制在25 ℃，手术床温度设置在37 ℃，以防动物麻醉后失温。（2）动物准备：母羊术前禁食禁水36～48 h。术前30 min，在母羊的耳缘静脉处建立静脉通路，给予母羊0.05 mg/kg盐酸阿托品、布托啡诺0.2 mg/kg和氟尼辛葡甲胺2 mL/kg肌内注射[13]。（3）麻醉设备准备：提前检查麻醉气体挥发系统的气密性和通气性。（4）镇静及麻醉：肌内注射15 mg/kg盐酸氯胺酮以诱导麻醉，待母羊进入浅镇静状态后，采用仰卧位，颈部自然伸直状态，用7号插管行插管术，然后以2.5 L/min氧通气量与2%异氟烷维持麻醉[14]。

1.4.2 子宫动脉狭窄手术模型制作

妊娠（100±5）d的手术组母羊经麻醉后，呈仰卧位四肢固定在手术台上，腹部及会阴部剃毛备皮。手术消毒后，沿腹中线脐部至耻骨正中处依次切开皮肤层、筋膜层、肌层和腹膜，暴露子宫。抬起手术台靠近动物尾端的一侧，使腹腔内脏器因重力自然滑向头侧。适度松解子宫阔韧带，探查子宫动脉至左右两侧子宫体动脉。随机选取一侧子宫体动脉作为造模侧，并做记录。切开子宫系外膜，游离目标侧子宫体动脉3 cm，在子宫体动脉距离子宫动脉左右支分叉远端2 cm处夹上银质血管夹（图1A），夹闭银夹的开口端，使血管直径狭窄至原来的2/3左右（图1B），最后关腹。手术结束及术后第2天给予布托菲诺0.2 mg/kg肌内注射各1次镇痛。假手术组的手术入路与手术组一致，仅暴露并游离子宫体动脉约3 cm，不放置血管夹，关腹后及术后第2天给予布托菲诺0.2 mg/kg肌内注射各1次镇痛。

1.5 子宫体动脉血管内血流测定

测量假手术组动物子宫体动脉的血流情况。在放置血管夹的术前和术后，分别测定手术组动物子宫体动脉手术侧的血流情况，并以此调整血管夹的狭窄程度。使用TS420血流仪结合血流探头收集各组母羊子



注：A为子宫腹侧面血管走向示意图（proximal，近心端；UA，子宫动脉；UB，子宫体；R，右侧子宫体动脉；L，左侧子宫体动脉；SC，银夹位置）；B为银夹部分夹闭子宫体动脉。

Note: A, Anterior exposure of uterine arteries (UA, uterine artery; UB, uterine body; R, right uterine body artery; L, left uterine body artery; SC, placement of silver clamp); B, Uterine body artery been partially closed by silver clamp.

图1 子宫腹侧面血管走向和子宫体动脉上银夹放置位置示意图

Figure 1 Anterior exposure of uterine arteries and the position of the silver clamp placement on uterine body artery

宫动脉血管上的血流信号，探头型号为PSB2.5。使用PowerLab生理信号收集仪采集并翻译收集到的血流电信号，并用LabChart软件（7.2版本）分析血流数据。其中，血流流量差 = 收缩血流量−舒张血流量。

1.6 动物血压测定

手术造模后，每隔5 d，监测手术组母羊的血压，直至其临产［即妊娠（140±5）d］；同时监测同期对照组母羊的血压情况。使用兽用血压计连接3号袖带，测定母羊后肢股动脉处的收缩压、舒张压、心率等指标，并计算压差。血压差=收缩压−舒张压。每次测量重复3次，取平均值。

1.7 血常规、血生化、尿蛋白和尿肌酐测定

在母羊术后5 d［即妊娠（105±5）d］以及预期的分娩日期前［即妊娠（140±5）d］，从颈静脉采集血液至EDTA管，用Procyte Dx流式血细胞分析仪检测各组母羊的血常规指标。于预期的分娩日期前［即妊娠（140±5）d］，从颈静脉采集血液至肝素管中，静置2 h后，3 000 r/min离心10 min，取血清，用Catalyst One生化分析仪检测手术组和对照组动物的血清肌酐、尿素氮、钙、磷、钠、钾、氯离子和血糖指标。

在剖宫产前，对麻醉后的母羊行膀胱穿刺术，无菌采集各组母羊的尿液样本，用Catalyst One生化分析仪检测尿蛋白和尿肌酐指标，并计算尿蛋白肌酐比（即尿蛋白与尿肌酐的比值）。

1.8 组织病理学检测

于母羊妊娠（140±5）d，行剖宫取胎术。然后取母体的肾脏和肝脏组织，以及血管夹放置位置近心端和远心端侧的子宫体动脉血管、对侧子宫体动脉血管、子宫壁近端和远端组织；同时，取子体胎盘组织。将以上组织标本固定于质量分数为4%的多聚甲醛溶液中，并进行苏木精−伊红染色，然后用光学显微镜观察比较各组织病理学变化。

1.9 统计学方法

采用Minitab 20软件进行统计学分析。统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，3组间均数比较采用单因素方差分析，组间采用SNK−q检验；手术组与对照组之间比较采用t检验，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术造模中山羊血流变化

手术组母羊在放置血管夹后的5 min内，子宫体动脉内平均血流量较血管夹放置前显著下降（P<0.01，图2A），与假手术组相比也明显降低（P<0.05）；约15 min后，动脉血管内血流情况基本稳定，此时平均血流量较刚放置血管夹5 min时显著升高（P<0.01），与血管夹放置前和假手术组相比均无统计学差异（P > 0.05）。

在放置血管夹5 min内，手术组动物的被测血管受到血管分离和放置银夹等动作的物理刺激，局部痉挛，腔内血流量骤减，因此血流峰值升高。约15 min后，手术组动物的血流流量差较刚放置血管夹5 min时明显降低（P<0.05，图2A），且与假手术组相比的血流流量差降低更显著（P<0.01）。

2.2 手术造模后山羊血压变化

妊娠（100±5）d且血管夹闭造模后，手术组和对照组母羊的收缩压无明显差异（P > 0.05）。手术组母羊的舒张压在术后10 d内较对照组显著降低（P<0.05），随后差异消失（图2B）。两组动物的血压差和心率在术后均有极显著差异（P<0.01），如图2C、2D所示。

按妊娠时间统计，在妊娠100～115 d，手术组母羊的血压差较对照组显著升高（P<0.05），而在120 d后差异逐渐缩小，如图2C所示。在母羊妊娠100～120 d，手术组动物的心率较对照组显著升高（P<0.05），在125 d后差异逐渐缩小，如图2D所示。手术

组母羊出现这种血压和心率的变化现象，提示先兆子痫造模成功。妊娠后期血压和心率差异减小，可能与这时期母羊的心率和压差出现生理性升高有关。

2.3 手术造模后山羊血常规变化

母羊于术后5 d即妊娠105 d以及产前即妊娠140 d的血常规情况如表1所示。假手术组动物的血常规数据不完整，已有数据与对照组基本相似，故仅对手术组和对照组的数据做统计分析。结果显示，分娩前手术组母羊的红细胞、血红蛋白、血细胞压积和平均红细胞压积与对照组相比表现为下降状态（P <0.05）；而手术组母羊于分娩前的平均血红蛋白浓度和平均血红蛋白量较对照组显著升高（P<0.000 1）。以上血细胞变化特征与先兆子痫患病人群易出现溶血或血液浓缩等临床特征[14]相符。

2.4 手术造模后山羊血液生化指标变化

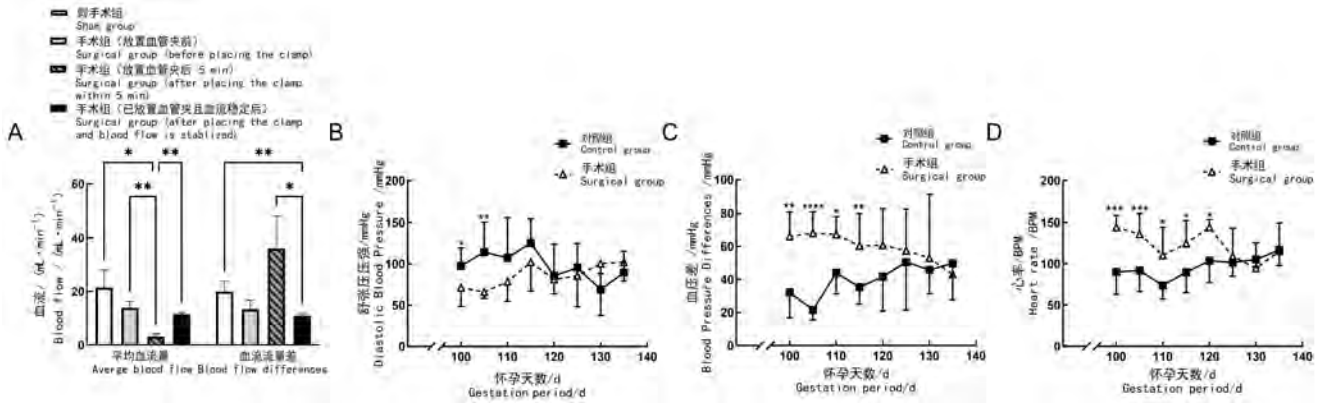
于产前即妊娠（140±5）d采血，分别检测手术组和对照组母羊的血糖、肌酐、尿素氮、钙、磷、钠、钾和氯离子等指标。结果显示，手术组母羊的血糖水平明显高于对照组（P<0.05，图3A）；肾功能指标中，手术组的血清尿素氮值较对照组明显升高（P<0.05，图3B），而血清肌酐、肌酐/尿素氮比值与对照组相比略高，但差异无统计学意义（P > 0.05），证明手术组肾功能异常[15]。两组母羊的血清钙、钠、氯离子含量有显著差异，手术组明显高于对照组（P<0.01，P<0.001，P<0.001）；手术组的血清渗透压也明显高于对照组（P<0.001，图3C）。上述血清学结果证明，手术组母羊的糖代谢异常，肾功能异常，血液离子紊乱，这些结果与人类先兆子痫疾病的临床特征[14]相吻合。

2.5 手术造模后山羊尿蛋白和肌酐水平变化

采血同期行膀胱穿刺术，无菌采集各组母羊的尿液，分析其尿蛋白、尿肌酐指标。如图3D、3E所示，手术组母羊出现蛋白尿，尿肌酐及尿蛋白肌酐比均明显高于对照组和假手术组（P<0.05）。上述尿液生化结果显示，手术组母羊的肾脏功能异常，这与人类先兆子痫疾病的临床特征[15]相吻合。

2.6 手术造模后山羊胎盘组织病理学变化

于母羊妊娠（140±5）d进行剖宫取胎术，对手术组母羊所产子体的两侧胎盘组织结构进行自体比较，发现非手术侧附着的胎盘绒毛细胞排列整齐，绒毛叶状结构清晰（图4A～C）；手术侧附着的胎盘绒毛囊出现破损，绒毛细胞肿胀，部分绒毛细胞破裂，细胞核脱出细胞外（图4D～F）。与非手术侧胎盘间质相比，手术侧的胎盘间质层可见细胞肿胀，间质胶原增多，大量炎性细胞浸润，叶状绒毛结构不清晰（图4B、4E）。



注：A，子宫体动脉血管内血流变化；B，后肢舒张压变化；C，后肢血压差压变化；D，心率变化（BPM即次/min）。对照组（n=11）妊娠母羊在临产期前不进行任何手术操作；假手术组（n=4）在母羊妊娠100 d时，行先兆子痫假手术造模，即仅暴露并游离其子宫体动脉；手术组（n=8）于母羊妊娠100 d时，在其一侧子宫体动脉上放置银质血管夹，夹闭动脉部分内径，制作先兆子痫模型。组间比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001，$^{****}P$<0.000 1。

Note: A, Blood flow changes of uterine body artery; B, Changes of hind limb diastolic blood pressure; C, Changes of hind limb pulse pressure; D, Change of heart rate (BPM, beat per min). In control group (n=11), no surgical operation was done on animals; in sham group (n=4), sham surgery was performed on the 100th day of gestation, to be specific, only their uterine body arteries were exposed and freed; in surgical group (n=8), preeclampsia modeling was performed by placing silver vascular clamps on one of the uterine body arteries of the animals on the 100th day of gestation to close their internal diameters partially. For comparison between groups, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001, $^{****}P$<0.000 1.

图2 先兆子痫造模后妊娠山羊的血流量、血压及心率情况

Figure 2 Blood flow, blood pressure and heart rate of pregnant goats after preeclampsia modelling

表1 先兆子痫山羊模型的血常规组间比较

Table 1 Comparison of blood routine between groups in preeclampsia goat model

（$\bar{x} \pm s$）

项目 Item	手术组（n=8） Surgical group (n=8)		对照组（n=11） Control group (n=11)
	术后5 d Postoperation 5 d	产前 Before parturition	
白细胞计数/($10^3 \cdot \mu L^{-1}$) White blood cell count/($10^3 \cdot \mu L^{-1}$)	38.26±2.81	34.00±2.99	40.62±1.70
淋巴细胞百分比/% Lymphocyte/%	58.68±2.28	58.42±4.22	60.94±2.05
中间细胞百分比/% Intermediate cell/%	7.20±1.07	7.60±1.09	6.61±0.73
粒细胞百分比/% Granulocyte/%	34.12±1.77	33.98±3.18	32.45±1.63
淋巴细胞计数/($10^3 \cdot \mu L^{-1}$) Lymphocyte count/($10^3 \cdot \mu L^{-1}$)	22.50±1.86	20.13±2.85	24.81±1.44
粒细胞计数/($10^3 \cdot \mu L^{-1}$) Granulocyte count/($10^3 \cdot \mu L^{-1}$)	12.90±0.81	11.30±0.64	13.06±0.68
红细胞计数/($10^6 \cdot \mu L^{-1}$) Red blood cell count/($10^6 \cdot \mu L^{-1}$)	1.14±0.14	0.65±0.04*	1.58±0.17
血红蛋白计数/($g \cdot L^{-1}$) haemoglobin count/($g \cdot L^{-1}$)	101.40±4.24	87.75±4.71*	117.27±5.32
血细胞压积/% Packed cell volume/%	4.52±0.62	2.50±0.16*	6.49±0.76
平均红细胞压积/fL Mean corpuscular volume/fL	40.18±0.31	39.53±0.30*	41.16±0.30
平均红细胞血红蛋白量/pg Mean corpuscular hemoglobin/pg	94.00±10.30	135.18±6.02****	77.99±4.33
平均红细胞血红蛋白浓度/($g \cdot L^{-1}$) Mean corpusular hemoglobin concerntration/($g \cdot L^{-1}$)	2 397±286	3 526±154****	1 924±118
红细胞分别宽度变异系数/% coefficient variation of red blood cell volume distribution width/%	17.26±0.61	16.33±0.69	17.41±0.43
中间细胞计数/($10^3 \cdot \mu L^{-1}$) Intermediate cell count/($10^3 \cdot \mu L^{-1}$)	2.58±0.44	2.40±0.22	2.99±0.34

注：与对照组相比，*P<0.05，****P<0.000 1。

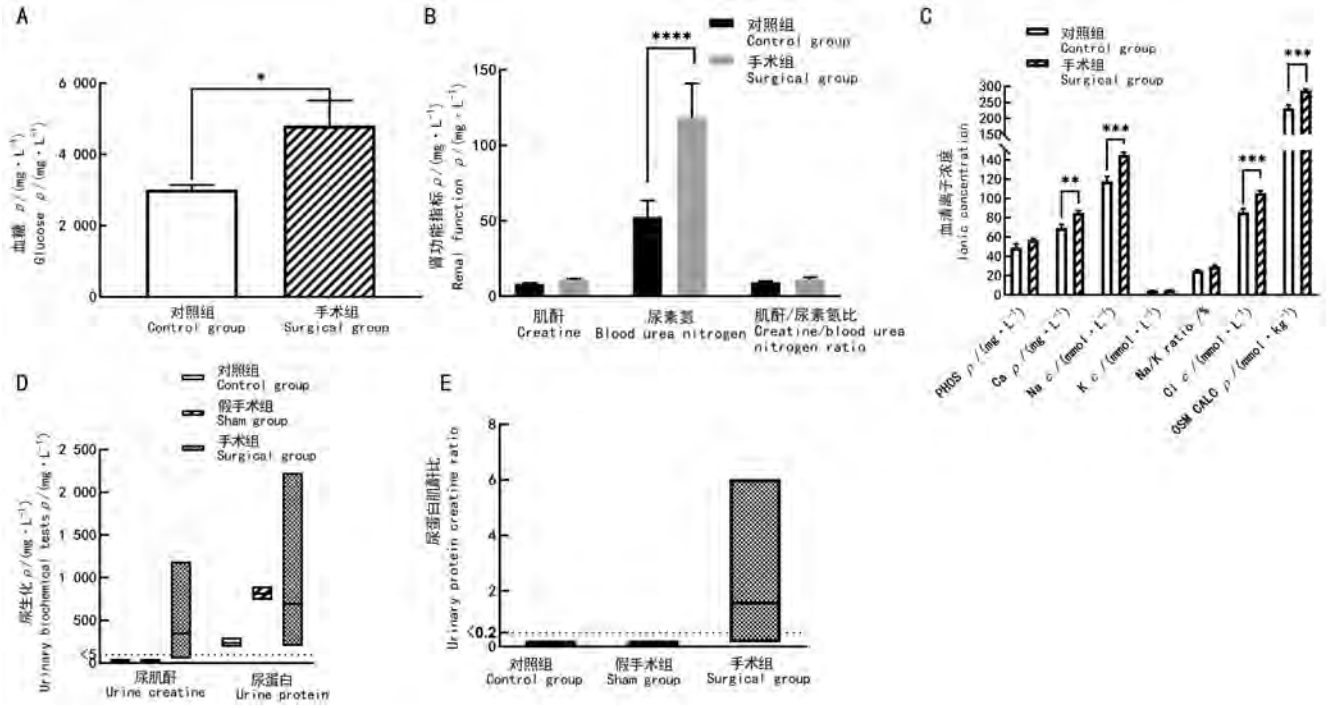
Note: Compared with control group, *P<0.05, ****P<0.000 1.

2.7 手术造模后山羊子宫动脉病理学变化

解剖可见手术侧子宫体动脉血管明显狭窄于对侧动脉，且动脉内血流量明显不足（图5A）。进一步比较手术组两侧子宫体动脉血管的病理变化，发现手术组母羊正常侧子宫动脉内膜光滑，外膜有致密的弹力层包裹（图5B）；手术侧近心端动脉血管的内膜层细胞核变大，细胞质多见裂解，平滑肌较正常侧变薄，且细胞质出现空腔（图5C）；而手术侧远心端血管的弹力层增厚，但结构疏松（图5D）。造模手术侧近心端、远心端和对照侧的血管中膜厚度分别为120 μm、106 μm和200 μm。

3 讨论

先兆子痫是一种多系统进展性疾病，其临床指征主要包括妊娠伴有高血压、蛋白尿以及子体在子宫内发育不足等妊娠疾病[16]。此外，先兆子痫患者还可能出现血小板减少、肝功能障碍、肺水肿和神经症状等临床症状[2]。控制不良的先兆子痫孕妇可能发展成子痫，造成母体癫痫、多器官衰竭，以及子体发育不良，严重者可能流产[16]。截至目前，该疾病确切的致病机制和发病原因不明[2]，可能的致病原因是滋养细胞浸润不足，以及螺旋动脉没有充分重构。胚胎缺血会导



注：A，血糖；B，肾功能指标；C，血清离子指标（PHOS指磷离子；Ca即钙离子；Na即钠离子；K即钾离子；Na/K指钠钾离子的比值；Cl即氯离子；OSM CALC指血浆渗透压；PHOS和Ca的浓度单位1 mg/L=884 μmol/L）；D，尿肌酐及尿蛋白；E，尿蛋白肌酐比。对照组（n=11）妊娠母羊在临产期前不进行任何手术操作；假手术组（n=4）在母羊妊娠100 d时，行先兆子痫假手术造模，即仅暴露并游离其子宫体动脉；手术组（n=8）于母羊妊娠100 d时，在其一侧子宫体动脉上放置银质血管夹，夹闭动脉部分内径，制作先兆子痫模型。组间比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001，$^{****}P$<0.000 1。

Note: A, Blood glucose; B, Renal functional indicators; C, Serum iron indicators (PHOS, phosphate; Ca, calcium; Na, Sodium; K, potassium; Na/K, sodium potassium ratio; Cl, chlorine; OSM CALC, osmotic pressure); D, Urinary creatinine and urinary total protein; E, Creatinine/protein ratio. In the control group (n=11), no surgical operation was done on animals; in sham group (n=4), sham surgery was performed on the 100th day of gestation, to be specific, only their uterine body arteries were exposed and freed; and in surgical group (n=8), preeclampsia modeling was performed by placing silver vascular clamps on one of the uterine body arteries of the animals on the 100th day of gestation to close some of their internal diameters. Comparison between groups, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001, $^{****}P$<0.000 1.

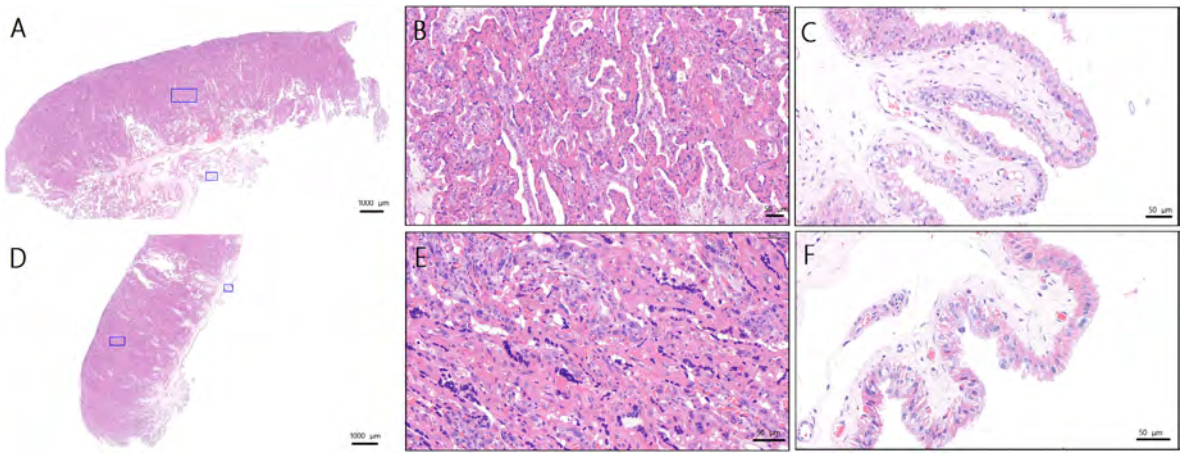
图3 先兆子痫造模后妊娠山羊的血液及尿液生化指标检测结果

Figure 3 Blood and urinary biochemical results of preeclampsia modeling goat before parturition

致血管生成因子（如sFLT-1和sEng）升高[17]。先兆子痫患者体内辅助性T细胞转变成Th1型致炎表型，白细胞介素、$CD19^{+}$、$CD5^{+}$、淋巴细胞和自然杀伤细胞比例升高[18]。以上免疫功能障碍也会导致滋养细胞无法充分浸润，最终引起胎盘缺血[11]。针对先兆子痫，目前尚无有效的治疗手段，唯一的疾病控制手段是终止妊娠[19]。因此，亟需构建合适的先兆子痫动物模型，用于对该疾病的病因、发病机制和治疗方法进行更深入的研究。

常见的手术干预方法多选用啮齿类动物，通过手术使妊娠母体的子宫体动脉、子宫总动脉以及肾动脉血管管径狭窄，导致母体的子宫动脉灌注压降低[7]。该方法即称为RUPP造模法[20]。其优势在于，RUPP造模动物在分娩后会持续存在肾功能和心功能损伤的情况，符合先兆子痫的临床特点[21]；与此同时，RUPP造模动物的子代与人类先兆子痫患者分娩出的胎儿类似，也会存在一定的心功能损伤概率[5]。RUPP造模法的局限性在于，造模动物的研究窗口期短，不适用于早期滋养层细胞浸润、免疫失衡机制和血管重构异常等研究[6]；另外，造模动物出现蛋白尿、肾小球内皮增生和胎盘发育异常等临床症状也存在个体差异[6]。

已知由于种属差异，啮齿类动物在胎仔数量、子宫结构等方面与人类存在较大差异。而且RUPP造模需要在啮齿类动物的子宫动脉、腹主动脉和肾动脉上均放置血管夹才能达到造模要求[20]，因此手术对啮齿

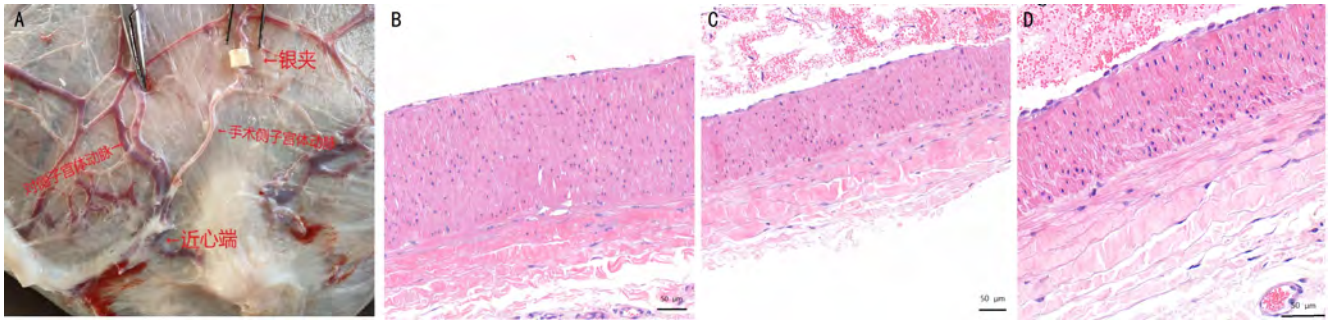


注：A，对照组母羊正常胎盘（×1.1；蓝色方框为B、C图的取样位置）；B，对照组母羊正常侧胎盘滋养层（×16.9）；C，对照组母羊正常侧胎盘绒毛间质（×27.2）；D，手术组母羊手术侧胎盘（×1.1；蓝色方框为E、F图的取样位置）；E，手术组母羊手术侧胎盘滋养层（×28.7）；F，手术组动物手术侧胎盘绒毛间质（×34.3）。A和D图的比例尺大小为1 000 μm；B、C、E和F图的比例尺大小为50 μm。

Note: A, Normal placenta of ewes in control group (×1.1, the blue squares are the sampling sites for figure B and C); B, Trophoblasts of normal placenta in control group (×16.9); C, Villous stroma of normal placenta in control group (×27.2); D, Surgical side placenta of ewes in surgical group (×1.1, the blue squares are the sampling sites for figure E and F); E, Trophoblasts of surgical side placenta of ewes in surgical group (×28.7); F, Villous stroma of surgical side placenta of ewes in surgical group (×34.3). Scale bars of figure A and D are 1 000 μm. Proportional scales of figure B, C, E and F are 50 μm.

图4 先兆子痫造模后妊娠山羊生产时的手术侧与非手术侧胎盘病理变化(苏木精-伊红染色)

Figure 4 Pathologic changes in the placenta on the operated and non-operated side during parturition in goats after preeclampsia modeling(HE staining)



注：A，妊娠140 d的母羊子宫及动脉示意图（银夹放置在一侧子宫体动脉上）；B～D，苏木精-伊红染色观察子宫体动脉病理组织切片（B，非手术侧子宫动脉；C，手术侧造模位置近心端子宫动脉；E，手术侧造模位置远心端子宫动脉）。B～D图的比例尺大小为50 μm。

Note: A, Schematic diagram of the uterus and uterine arteries of ewes on the 140th day of gestation (silver clips were placed on one side of the uterine body arteries); B-D, HE-stained histopathologic sections of the uterine body arteries (B, uterine arteries of the nonsurgical side; C, uterine arteries proximal to the surgical side ; E, uterine arteries distal from the surgical side). The scale bars figure B-D are 50 μm.

图5 先兆子痫造模后妊娠山羊生产时的两侧子宫体动脉外观及病理比较

Figure 5 Comparison of the appearance and pathology of the uterine body arteries on surgical and non-surgical side of the uterus at the time of parturition in pregnant goats after preeclampsia modeling

类动物的损伤较大，对心脏、胃、肠道和骨骼肌血流的影响大于脑、肝等器官血流的影响[6]。本实验选择崇明白山羊为造模动物。相较于啮齿类动物，山羊的体型更接近于人类，而且每次产羔1～2头，以1头羔羊居多，也和人类更相近。本研究采取选择性血管狭窄致母体子宫动脉灌注压降低的造模方法，即利用银夹使妊娠母羊的子宫体动脉管径部分狭窄，降低子宫动脉的血流量，造成母体出现类先兆子痫的临床症状。结果发现，仅结扎妊娠母羊的子宫体动脉，就可使其表现出与人类先兆子痫相似的生理情况。

本实验中，经RUPP造模后，手术组山羊的血压压差明显高于对照组。按妊娠时间统计，压差差异在妊娠第100天至第115天最为明显，随后两组差异逐渐缩小，这可能与本实验方法仅通过手术狭窄子宫动脉，

而未狭窄腹主动脉及肾动脉有关。本实验不足之处在于，未采集足够的假手术组血压数据，因此无法就假手术组的血压情况与手术组相比较。血常规实验显示，母羊血细胞于术后5 d（妊娠105 d）无组间差异；而在分娩前阶段，手术组的红细胞与血红蛋白含量相较对照组明显降低。这一血常规结果与先兆子痫进展性的疾病特点[14]相吻合。较低的红细胞与血红蛋白浓度也会增加母体供氧压力，且造成子体发育不良[22]。生化指标检测结果表明，手术组的血清尿素氮水平升高，证明手术组母羊出现肾功能异常[15]。此外，手术组的尿肌酐及尿肌酐/蛋白比值均明显高于对照组和假手术组，同时提示手术组动物肾脏出现衰竭，该指标也与临床先兆子痫患者出现急性肾衰竭和蛋白尿的临床症状[23]相对应。除肾功能指标外，手术组的血糖、血清钠离子、钙离子、氯离子及血浆渗透压均明显高于对照组，这可能是因急性肾衰导致血液内氯化物排出减少。血浆渗透压增高会使动物的细胞液向血液渗出，加剧动物的心衰程度[24]。以上术后血压升高、血红蛋白降低、肾功能异常、血糖和离子紊乱，以及蛋白尿的出现等实验结果，均证实山羊在仅结扎其子宫体动脉的情况下，可模拟人类先兆子痫的疾病特征。

本实验创新性地使用了血流信号采集分析系统，在手术造模过程中，实时测量了假手术组的子宫体动脉血流数据。实施RUPP造模时，在放置血管夹前、放置血管夹后5 min的急性期，以及血流稳定期，测量动物子宫动脉血流数据。结果显示，放置血管夹5 min后，平均血流量和血管流量差的变化最为显著。血流稳定后，血管夹远端的平均血流量与术前相比无明显差异，此时的血流流量差低于放置血管夹前的水平。在平均血流量不变的情况下，血流流速与血管直径成反比。因此，血流稳定后血管流速变快。这可能是因为母体为维持子宫供血量，保持了较高的左心室收缩强度[25]。因实验条件所限，本实验未能测量动物的心功能情况；但笔者推测与人类先兆子痫疾病后期出现心衰的临床症状相符[16]。在放置血管夹后，血流流量差先显著增加，随后减少；待血流稳定后，血流流量差显著低于放置血管夹前水平，推测银夹远端血管弹性下降。HE染色后的病理观察结果显示，血管夹远端的血管平滑肌变薄，且弹性层结构疏松，也证实了这一推测。

需要指出，经典的啮齿类动物RUPP手术模型需要在结扎目标血管时，平行放置一根一定直径的不锈钢针管，以此来量化狭窄程度。对于大型动物，需要在目标血管上固定一个一定规格的银质血管夹，并在手术期间由术者使用止血钳部分夹闭银夹开口处，以此导致目标血管部分狭窄。此方法非常依赖术者的经验技术。过分狭窄的血管会导致母羊很快流产，而血管狭窄不足则无法改变子宫动脉血流量，这两种情况均会导致造模失败。通过应用血流信号采集分析系统，可以在手术期间调整血管的狭窄程度，将该手术模型的动脉狭窄程度限制在一定范围，从而提高了模型的制作准确度和稳定性。

综上所述，本实验采用RUPP手术造模方法，成功制作了山羊先兆子痫模型，其临床症状、生理生化指标符合人类先兆子痫疾病的病理特征和发生规律。此外，本实验创新性地利用了血流探头，配合生理信号记录仪，量化了手术时山羊子宫动脉的狭窄程度，提高了该模型的制作稳定性和成功率。该山羊先兆子痫疾病模型可为研究人类先兆子痫疾病的发病机制及治疗手段提供有效的帮助。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验均已通过上海交通大学医学院实验动物饲养管理与使用委员会批准（批准号为A-2020-007）。各实验过程均遵照中国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 Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (IACUC No: A-2020-007). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

卢今负责稿件写作和修改、图表绘制；
严国锋负责实验设计和实验操作；
王剑、朱寅秋负责数据分析；
朱莲、马政文参与数据的有效性验证；
李垚和戴建军负责白山羊项目管理；
周晶负责实验方法设计、论文的关键性修改和把关。

[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 References]

[1] FILIPEK A, JUREWICZ E. Preeclampsia - a disease of pregnant women[J]. Postepy Biochem, 2018, 64(4): 232-229. DOI: 10.18388/pb.2018_146.

[2] IVES C W, SINKEY R, RAJAPREYAR I, et al. Preeclampsia—pathophysiology and clinical presentations: JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(14): 1690-1702. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.08.014.

[3] CRAICI I M, WAGNER S J, WEISSGERBER T L, et al. Advances in the pathophysiology of pre-eclampsia and related

podocyte injury[J]. Kidney Int, 2014, 86(2): 275-285. DOI: 10.1038/ki.2014.17.

[4] ROBERTS J M, KING T L, BARTON J R, et al. Care plan for individuals at risk for preeclampsia: shared approach to education, strategies for prevention, surveillance, and follow-up[J]. Am J Obstet Gynecol, 2023: S0002-9378(23)00260. DOI: 10.1016/j.ajog.2023.04.023.

[5] GATFORD K L, ANDRAWEERA P H, ROBERTS C T, et al. Animal models of preeclampsia: causes, consequences, and interventions[J]. Hypertension, 2020, 75(6): 1363-1381. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14598.

[6] LI J, LAMARCA B, RECKELHOFF J F. A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 303(1): H1-H8. DOI: 10.1152/ajpheart.00117.2012.

[7] 肖仲琳, 杨青, 张键, 等. 子痫前期动物模型的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2016, 43(6): 563-569. DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0011
XIAO Z L, YANG Q, ZHANG J, et al. Research progress of animal models of preeclampsia[J]. Prog Biochem Biophys, 2016, 43(6): 563-569. DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0011.

[8] UZUN M, GENCER M, TURKON H, et al. Effects of melatonin on blood pressure, oxidative stress and placental expressions of TNFα, IL-6, VEGF and sFlt-1 in RUPP rat model of preeclampsia[J]. Arch Med Res, 2017, 48(7): 592-598. DOI: 10.1016/j.arcmed.2017.08.007.

[9] SHI M T, YANG X F, SUN L, et al. Comparison of different modified operations in the reduced uteroplacental perfusion pressure rat model of preeclampsia[J]. J Reprod Immunol, 2023, 156:103815. DOI: 10.1016/j.jri.2023.103815.

[10] BAKRANIA B A, GEORGE E M, GRANGER J P. Animal models of preeclampsia: investigating pathophysiology and therapeutic targets[J]. Am J Obstet Gynecol, 2022, 226(2S): S973-S987. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.025.

[11] PEAKER M. Gestation period and litter size in the goat[J]. Br Vet J, 1978, 134(4): 379-383. DOI: 10.1016/s0007-1935(17)33441-3.

[12] SMITH M C, SHERMAN D M. Goat Medicine[M]. 2nd ed. Hoboken: Blackwell Pub Professional, 2009.

[13] 吴正一. 实验外科技术: 羊的全身麻醉方法[J]. 上海口腔医学, 2000, 9(1): 42-44. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7248.2000.01.015.
WU Z Y. Techniques in experimental surgery—general anesthesia of the goat[J]. Shanghai J Stomatol, 2000, 9(1): 42-44. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7248.2000.01.015.

[14] PRACTICE A C O O. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2002, 77(1):67-75.

[15] JACKSON P, COCKCROFT P. Clinical examination of farm animals[M]. Hoboken: Blackwell Science Ltd, 2002.

[16] 杨怡珂, 漆洪波. 美国妇产科医师学会(ACOG)"妊娠期高血压和子痫前期指南2019版"要点解读(第一部分)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(8):895-899. DOI: 10.19538/j.fk2019080112.
YANG Y K, QI H B. Interpretation of the American college of obstetricians and gynecologists (ACOG) guidelines for pregnancy-induced hypertension and preeclampsia (2019 edition) (part I)[J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2019, 35(8): 895-899. DOI: 10.19538/j.fk2019080112.

[17] PHIPPS E A, THADHANI R, BENZING T, et al. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(5):275-289. DOI: 10.1038/s41581-019-0119-6.

[18] MILLER D, MOTOMURA K, GALAZ J, et al. Cellular immune responses in the pathophysiology of preeclampsia[J]. J Leukoc Biol, 2021, 111(1): 237-260. DOI: 10.1002/JLB.5RU1120-787RR.

[19] JUNG E, ROMERO R, YEO L, et al. The etiology of preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2022, 226(2S): S844-S866. DOI: 10.1016/j.ajog.2021.11.1356.

[20] 周晶, 严国锋, 罗章源, 等. 子痫前期大鼠模型建立及相关指标监测[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(6): 448-452. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.06.004.
ZHOU J, YAN G F, LUO Z Y, et al. Establishment of preeclampsia model in rat and detection on related indicators[J]. Lab Anim Comp Med, 2015, 35(6): 448-452. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.06.004.

[21] PAAUW N D, JOLES J A, SPRADLEY F T, et al. Exposure to placental ischemia impairs postpartum maternal renal and cardiac function in rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2017, 312(5): R664-R670. DOI: 10.1152/ajpregu.00510.2016.

[22] CORDINA M, BHATTI S, FERNANDEZ M, et al. Maternal hemoglobin at 27-29 weeks' gestation and severity of pre-eclampsia[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2015, 28(13):1575-1580. DOI: 10.3109/14767058.2014.961006.

[23] Anon. Gestational hypertension and preeclampsia: ACOG practice bulletin, number 222[J]. Obstet Gynecol, 2020, 135(6): e237-e260. DOI: 10.1097/AOG.0000000000003891.

[24] HEIDA K Y, BOTS M L, DE GROOT C J, et al. Cardiovascular risk management after reproductive and pregnancy-related disorders: a Dutch multidisciplinary evidence-based guideline [J]. Eur J Prev Cardiol, 2016, 23(17): 1863-1879. DOI: 10.1177/2047487316659573.

[25] RICHARDS C, SESPEREZ K, CHHOR M, et al. Characterisation of cardiac health in the reduced uterine perfusion pressure model and a 3D cardiac spheroid model, of preeclampsia[J]. Biol Sex Differ, 2021, 12(1):31. DOI: 10.1186/s13293-021-00376-1.

（收稿日期：2023-03-21　修回日期：2023-06-06）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，周晓铧）

[引用本文]
卢今, 王剑, 朱莲, 等. 山羊先兆子痫疾病模型的构建及母体生物学特性评价[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 371-380. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.036.
LU J, WANG J, ZHU L, et al. Establishment of preeclampsia model in goat and evaluation on maternal biological characteristics[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 371-380. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.036.

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.048

庄乐南，研究员，博士生导师。2011年博士毕业于中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所，2013年赴美国国立卫生研究院（NIH）糖尿病消化与肾病研究所（NIDDK）从事表观遗传与代谢疾病相关研究，2018年赴美国德州大学西南医学中心（UTSW）从事表观遗传与肌肉和心脏疾病相关研究。目前担任浙江大学动物科学学院动物医学系副主任，*Life*、*Medicine*、*Journal of Veterinary and Marine Research*等多种学术期刊的编委或学术编辑，中国畜牧兽医学会生理生化学分会及动物遗传育种学分会理事。主要利用基因编辑猪模型研究心血管代谢与疾病的表观遗传学与转录调控机制。主持国家自然科学基金项目2项，国家重点研发计划课题1项，浙江大学校长专项前沿基础研究计划1项。在*Nature*、*Circulation*、*Nature Communications*、*Biomaterials*、*JCI*、*PNAS*等国际高水平期刊上发表学术论文30余篇。

肺动脉高压动物模型及其在药物研究中的应用进展

俞佳慧[1]，巩　倩[1]，庄乐南[1,2,3]

(1. 浙江大学动物科学学院动物医学系，杭州 310058；2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院心内科，浙江省心血管介入与再生修复研究重点实验室，杭州 310016；3. 浙江大学动物科学学院动物遗传育种与繁殖研究所，杭州 310058)

[摘要] 肺动脉高压是一种由肺血管重构引起血管阻力增大的临床综合征，若不治疗将导致右心衰竭，甚至死亡。目前关于肺动脉高压的病理机制尚未明确，且临床治疗方法未能有效改善预后或降低死亡率。为了深入研究肺动脉高压的发病机制并开发更加安全有效的药物，建立合适的疾病动物模型在临床前研究中必不可少。本文概述了肺动脉高压的病理特征，并总结了各类肺动脉高压动物模型，同时阐述了近5年内肺动脉高压动物模型在3种治疗途径及相关药物研究中的应用进展，以期为肺动脉高压动物模型的选择和研究应用提供参考。

[关键词] 肺动脉高压；动物模型；药物评估

[中图分类号] R-332；Q95-33　**[文献标志码]** A　**[文章编号]** 1674-5817(2023)04-0381-17

Animal Models of Pulmonary Arterial Hypertension and Their Application in Drug Research

YU Jiahui[1], GONG Qian[1], ZHUANG Lenan[1,2,3]

(1. Department of Veterinary Medicine, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Department of Cardiology, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Key Laboratory of Cardiovascular Intervention and Regeneration Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou 310016, China; 3. Institute of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Correspondence to: ZHUANG Lenan (ORCID: 0000-0001-9561-8396), E-mail: zhuangln@zju.edu.cn

[ABSTRACT] Pulmonary arterial hypertension is a clinical syndrome characterized by pulmonary vascular remodeling causing increased vascular resistance, which will lead to right heart failure and even death if left untreated. The pathogenesis of pulmonary arterial hypertension has not yet been clarified, and clinical treatments have not been effective in improving prognosis or reducing mortality. To investigate the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension and to develop and evaluate more effective and safer drug treatments, establishing related animal disease models is very important. This paper outlines the pathological characteristics of pulmonary arterial hypertension and summarizes the various types of

[基金项目] 国家重点研发计划发育编程及其代谢调节重点专项“重大人类发育性疾病猪模型的建立及发病机理研究”(2021YFA0805902)；国家自然科学基金项目“Txlnb通过调控Parkin促进心肌细胞线粒体自噬与稳态维持的机制研究”(32270884)

[第一作者] 俞佳慧(2001—)，女，本科生，专业方向：动物医学专业。E-mail：3190101359@zju.edu.cn

[通信作者] 庄乐南(1983—)，男，博士，研究员，研究方向：心血管疾病。E-mail：zhuangln@zju.edu.cn。ORCID：0000-0001-9561-8396

animal models of pulmonary arterial hypertension, as well as describes the progress of the application of these models in three therapeutic pathways and related drug research in the past five years, with a view to providing a reference for the selection of animal models of pulmonary arterial hypertension and research applications.

[Key words] Pulmonary arterial hypertension; Animal models; Drug evaluation

肺动脉高压（pulmonary arterial hypertension，PAH）是一种以肺血管过度收缩和重构为特征的临床综合征[1]。由肺动脉内皮细胞（pulmonary artery endothelial cells，PAECs）、肺动脉平滑肌细胞（pulmonary artery smooth muscle cells，PASMCs）和成纤维细胞增生以及炎性细胞过度浸润等因素引起的肺血管重构[2]，将导致肺血管阻力和肺动脉压力异常升高；如不及时治疗，右心室后负荷持续增加会引发右心衰竭而致死[1]。PAH是一种特别严重的渐进性疾病，其动脉病变的程度使PAH区别于肺高压（pulmonary hypertension，PH）[3]。近年来，探寻PAH的病理机制和治疗靶点一直是该研究领域的热点。

研究指出，PAH的分子机制涉及血管活性物质失衡、细胞增殖与血管重构、内皮修复与血管生成、炎性反应、血栓形成等多个方面[1]。在高通量测序技术的迅速发展下，许多与PAH相关的致病基因，如骨形态发生蛋白受体2（bone morphogenetic protein receptor Ⅱ，*BMPR*2）、激活素受体Ⅱ型样蛋白1（activin receptor type Ⅱ-like 1，*ACVRL*1，也称为*ALK*1）、内皮糖蛋白（endoglin，*ENG*）、母亲抗十肽同系物9（mothers against decapentaplegic homolog 9，*SMAD*9）、钾亚家族K成员3（potassium subfamily K member 3，*KCNK*3）等得以被发现[4]，但引发PAH的机制仍未能被完全揭示。尽管药物治疗在一定程度上改善了患者的症状并减缓了疾病的恶化，但PAH仍然无法从根本上被治愈[2,5,8-9]。目前针对PAH的药物治疗主要是联合应用靶向治疗血管内皮紊乱的特异性药物[5-7]，但尚无法逆转血管重构[2]。因此，深入了解PAH的病理改变和发病机制对开发和优化治疗策略具有指导性意义。

在研究PAH病理机制、发现新型治疗靶点的过程中，PAH疾病动物模型发挥着重要作用[2]，但值得注意的是，尚没有一种模型能够充分模拟临床重度PAH的病理特征[1,3,10]。因此，开发更加理想的PAH疾病动物模型将会是推进PAH病理学研究和治疗评估的关键。本文旨在通过总结并比较多种PAH动物模型的特点及其在药物研究方面中发挥的作用，为PAH疾病动物模型的构建及其在药物评估中的应用提供参考与指导。

1 PAH的病理特征

PAH是一种毛细血管前型PH，其特征是肺毛细血管前动脉阻力增加导致肺动脉压升高[2,7]。PAH的病理学特征包括肺小动脉的内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞过度增殖，血管重构，炎性细胞浸润等[6]，进一步引起丛状病变、内膜增生以及血管肌化[11]，这些严重的特异性血管病变主要出现在重度PAH患者中。肺小动脉内的细胞异常增殖会引发血管重构，加之炎性细胞浸润，使得肺毛细血管近端肺动脉发生闭塞，综合血管收缩、原位血栓形成等因素[3]，引起肺血管阻力和肺动脉压力增加，从而极大地增加了右心室后负荷，导致右心室代偿性肥大和右心衰竭[4]。虽然PAH的病理学机制非常复杂，涉及多种方面，如内皮功能紊乱、平滑肌细胞增生、血管炎症、免疫失调等，但最终都会引起血管的过度收缩以及肺血管细胞表型向抗凋亡、促增殖的方向改变[5]。

内皮损伤是肺血管炎和阻塞性肺血管重构的初始触发因素，组织学研究显示病变的肺血管存在内膜增生、中膜肥大、外膜增厚以及PAECs凋亡增加、PASMCs增殖和抵抗凋亡等特征[10]。在PAH中，肺血管内皮功能紊乱不仅代表着血管舒张功能受损，从而引发血管过度收缩，同时也代表着血管生成和修复机制受损，后者在血管重构中起着关键作用[2]，但其原因和潜在机制仍未完全清楚。Humbert等[2]指出，深入了解肺内皮细胞通信的转变将有利于更好地理解PAH的发病机制。在肺血管内皮细胞通讯中，内皮素（endothelin，ET）、一氧化氮（nitric oxide，NO）、前列环素（prostacyclin，PGI）相关的信号通路具有调节血管收缩舒张的功能，因此血管扩张剂成为近几十年来用于治疗PAH的主要药物，用以恢复失调的内皮信号通路，调节过度收缩的血管，从而减缓PAH的恶化

速度。

2 PAH动物模型

2.1 单因素病理损伤动物模型

2.1.1 野百合碱诱导的PAH动物模型

野百合碱（monocrotaline，MCT）是来源于植物大托叶猪屎豆（*Crotalaria spectabilis*）的生物碱，以能够引起肝毒性和PAH闻名[10]。在肝脏中，MCT经细胞色素P450酶代谢后形成野百合碱吡咯（monocrotaline pyrrole，MCTP），引发肺血管内皮损伤[10]，但目前关于MCT/MCTP如何引起肺血管内皮损伤的机制尚不明确[9]。近期Xiao等[12]证明了MCT能够聚集并激活肺动脉内皮细胞的钙敏感受体（calcium-sensing receptor，CaSR），这可能是MCT引起内皮损伤的重要机制。由于MCT引起的反应在不同的物种、品种品系以及细胞色素P450酶中存在差异[3]，目前构建MCT诱导PAH的动物主要是Sprague Dawley（SD）大鼠，构建方法通常是采用单次皮下注射或腹腔注射MCT（60～80 mg/kg）[10]。

MCT诱导的PAH动物模型具有可重复性强、成本低、无需复杂操作的优点，能够较好地帮助人们理解肺血管重构的过程和病理生理学变化[10]。目前该模型已广泛应用于研究突变基因在PAH中的影响、肺血管细胞（包括PAECs和PASMCs）增殖与凋亡机制的调控以及基因治疗与细胞治疗等[10]。Maarman等[10]指出在MCT诱导的动物模型中，TGF-β-SMAD和BMPR2信号通路引起的损伤特点与人类PAH一致。在研究葛根素-V对PAH的疗效时，Chen等[13]利用SD大鼠构建的MCT诱导型PAH动物模型表现出BMPR2/SMAD信号下调的特征，证实了文献［10］的观点。Su等[14]则在该动物模型的肺组织中观察到长链非编码RNA（long non-coding RNA，lncRNA）*H*19高表达，并指出敲除lncRNA *H*19基因能够通过减缓PASMCs增殖速度，对PAH模型中的肺血管细胞起到保护作用。近期Omura等[15]则利用SD大鼠构建MCT诱导的PAH动物模型来模拟右心室衰竭的发展过程，发现lncRNA *H*19可作为阻止适应性右心室血管重构发展的治疗靶点。

炎性反应作为一种介导PAH血管重构的触发因素，在PAH患者和实验性PAH动物模型中发挥了关键作用，此外，由病毒感染和血吸虫感染引发的PAH均与炎性反应相关[1]。Schermuly等[1]指出炎症细胞因子与趋化因子在PAH发生发展中具有重要作用：在PAH患者体内检测到细胞因子循环水平增加，其中白细胞介素（interleukin，IL）-6水平的升高会抑制BMPR2表达，增加PAH的易感性；趋化因子则会在患者肺部募集炎症细胞，这些细胞可能会持续释放炎症介质和生长因子，促使血管重构的形成，但目前研究尚未阐明炎症是如何诱发PAH的。在MCT诱导的PAH动物模型中，发现巨噬细胞、树突细胞、肥大细胞与IL-6、IL-1等在肺血管重构早期均起到了重要作用[10]，提示该模型可以用于探究炎性反应在PAH中的关键作用和致病机制，是炎症介导的良好PAH模型[16]。另外值得关注的是，Yamazato等[17]利用自体骨髓干细胞经气管内注射改善了MCT诱导的SD大鼠模型的肺血管重构和肺部炎症，指出干细胞治疗或可以通过恢复或替代损伤的肺血管细胞来达到治疗PAH的目的[10]，该研究为开展PAH相关的细胞治疗提供了新策略。

MCT诱导的PAH动物模型被认为是一种急性毒性模型，除了MCT及其代谢产物的肺毒性[18]外，该模型的PAH表型通过实验干预或者药物治疗几乎可以被逆转，这一点与人类PAH病理特征并不符合[3]，因此在药物评价中使用MCT诱导的大鼠模型有一定局限性。

2.1.2 慢性低氧诱导的PAH动物模型

慢性低氧（chronic hypoxia，CHP）诱导的动物模型与MCT诱导的动物模型均为经典的PAH动物模型[3]，在PAH研究中已应用了相当长的时间，能帮助人们更好地理解PAH的发展过程，为目前的PAH治疗奠定了基础[19]。CHP能够引起啮齿类动物肺血管收缩，持续性CHP暴露的环境会导致近端和远端肺血管的肌化程度增加，导致肺血管阻力升高[19]；低氧还会诱导早期肺血管的炎性反应，趋化因子早于炎症细胞（主要是单核）出现，并且血管周围出现持续的炎症细胞浸润[3]；此外CHP诱导的模型造模成本低、方法简便、实验可预测性和可重复性强，常被应用于研究PAH，该模型还是评估基因编辑小鼠PAH易感性的重要工具[19-20]。

许多物种在缺氧时会产生上述类似的病理变化，但物种间对CHP的反应具有差异性，这种差异同样受到动物年龄的影响，处于肺快速成熟阶段的年轻个体往往更易感[3]。在物种的选择上，Stenmark等[3]指出暴露于CHP下的小鼠尽管出现了肺动脉压力升高，但只有最小的肺动脉出现重构，病变严重程度远不及大鼠；而且CHP诱导在SD大鼠中具有明显促进增殖基因

表达上调和凋亡相关基因表达下调的现象，而在小鼠中并没有出现这些变化[3]。有趣的是，不同品种的大鼠对CHP的反应也存在明显差异。在常见的两个品种中，SD大鼠要比Wistar大鼠表现出更严重的PAH症状，如右心室重量与肺血管阻力明显增加；而Fischer大鼠则在很大程度上对CHP耐受[20]。因此，CHP诱导PAH模型选用SD大鼠进行造模比较合适。

CHP诱导的大鼠模型会出现血管重构、高血压以及右心室肥厚（right ventricle hypertrophy，RVH）[9]的特征，但该模型并不会出现不可逆的内膜纤维化、丛状病变以及右心衰竭，并且其低氧性肺结构的改变涉及低氧以外的更多因素[3,9-10]。CHP诱导的动物模型相比于人类PAH在血管上的病变具有较为温和的表型，被视为是第三类PH的模型[10]。因此，CHP诱导的动物模型并不能充分复制人类PAH患者的肺血管损伤[10]，但在研究较不严重的第三类PH时该模型能发挥更好的作用[20]。

值得一提的是，Fawn-hooded（FH）大鼠作为一种对低氧极为敏感的大鼠品种，其特征是具有遗传性血小板储存障碍，血小板对血清素的摄取不足；FH大鼠的肺部发育不全，从出生起到成年都会伴随着肺泡逐渐减少；此外其1号染色体的异常破坏了线粒体活性氧-缺氧诱导因子α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）-钾离子通道通路，从而引发PAH[3,10]。FH大鼠在4周龄时便会发展出轻度PAH，CHP暴露会加剧其严重程度[3]。FH大鼠被认为可以模拟PAH模型状态[21]，其病理特征与人类PAH接近，如FH大鼠的PASMCs也具有血管收缩和增生性特征，血小板异常以及血管对血清素的收缩反应增强等。FH大鼠模型在阐述PAH发生过程中PASMCs促增殖/抗凋亡表型的改变以及验证Warburg假说方面发挥重要作用[10]。Rehman等[22]在FH大鼠模型中观察到超氧化物歧化酶-2（superoxide dismutase-2，SOD-2）的下调，以及HIF-1α和丙酮酸脱氢酶激酶（pyruvate dehydrogenase kinase，PDK）的激活，认为调控SOD-2、HIF-1α和PDK可能是新的治疗靶点。近年来，Archer等[23]利用FH大鼠进行体内研究发现，线粒体SOD-2的表观遗传缺陷可通过损害氧化还原信号，刺激PASMCs形成促增殖、抗凋亡表型，启动并维持可遗传的PAH，而DNA甲基转移酶抑制剂能够逆转FH大鼠的PAH，提示SOD-2可作为PAH表观遗传成分提供新的治疗靶点。Piao等[24]则利用FH大鼠发现FOXO1介导PDK-4上调，并导致生物能量障碍与右心室功能障碍，而慢性口服二氯乙酸盐具有抑制PDK-4上调的治疗效益。由于PASMCs过度增殖和抗凋亡的表型转变导致了类癌的出现，Boucherat等[25]对应激状态下恶性生长和增殖直接相关的分子伴侣90（heat shock protein 90，HSP90）展开研究，阐释HSP90在PAH-PASMCs中能起到抗应激的保护作用，促进PASMCs增殖和抵抗凋亡以及血管重构，并测试了抑制剂Gamitrinib的治疗潜力。虽然FH大鼠模型在研究与PAH代谢相关的机制与药物评估方面具有一定的优势，但FH大鼠会发展出在人类PAH患者上并不常见的系统性高血压，这点需要引起注意[3]。

2.1.3 分流手术诱导的PAH动物模型

PAH是先天性心脏病（congential heart disease，CHD）左向右分流型的常见并发症[26]。在PAH的分类中，先天性心脏病相关的PAH（PAH associated with congential heart disease，CHD-PAH）是一种被广泛研究的亚型[6]。CHD-PAH患者如不及时治疗，持续性地暴露于高血流量与高血压下会导致阻塞性肺小动脉病，甚至引发艾森曼格综合征[3]。Stenmark等[3]指出分流型PAH可在大动物与啮齿类动物中得到较好的模拟。目前采用外科手术进行体内分流是构建模型的主要手段，主要分为体肺分流（systemic-to-pulmonary shunt，SPS）型与动静脉分流（arteriovenous shunt，AVS）型两种。SPS模型可以通过外科手术对小型猪的主动脉干-肺动脉[27-28]、SD大鼠的左颈总动脉-左颈外静脉[29-30]等进行吻合而构建；AVS模型则多采用啮齿类动物腹主动脉-下腔静脉吻合[28-32]的方法，其中Zhang等[26]首次构建了动静脉分流诱导PAH的C57BL/6J小鼠模型。

分流手术诱导的PAH动物模型利用大小动脉或动静脉之间的压力差制造肺部的高血流量，使得肺动脉压力持续性升高，从而引起肺血管重构。然而关于高肺血流量是如何诱导产生PAH的分子机制，目前尚未明确。有研究利用SD大鼠构建AVS模型，指出钙激活氯通道（calcium-activated chloride channel，CACC）是分流诱导模型形成PAH的潜在治疗靶点[31]。近期Shang等[33]和Liu等[34]则利用SD大鼠的AVS模型，探讨了Anoctamin-1（也称跨膜成员16A，transmembrane member 16A，TMEM16A）在分流型PAH中对PASMCs增殖的调控作用，后者则进一步提出p38MAPK/ERK信号通路也参与其中。

最近有研究表明，炭疽毒素受体2（anthrax toxin receptor 2，ANTXR2）[35]、毛细血管形态发生基因（capillary morphogenesis gene 2，*CMG2*）[30]的缺失会加剧SPS诱导的血管重构，C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白9（C1q/TNF-related protein 9，CTRP9）能够调节血管内皮的炎性反应与内皮功能紊乱，从而改善肺血管重构和血管狭窄[36]。这些研究发现不仅为分流手术诱导的PAH模型应用开拓了新的方向，更为CHD-PAH提供了新的治疗途径。在一项关于分流手术诱导产生PAH仔猪模型的研究中，Wang等[27]通过改良Blalock-Taussing分流手术，构建了自左侧无名动脉至肺动脉的大白仔猪模型，术后3个月观察到明显的病理变化，包括肺动脉中膜增厚、内膜纤维化和RVH。总的来说，分流手术模型是目前应用于大动物诱导PAH的主要方法，能帮助人们更好地理解高肺血流量导致PAH的病理生理过程和潜在机制，为更有效地治疗CHD-PAH提供新方法。

肺动脉环缩（pulmonary arterial banding，PAB）诱导的大鼠模型以进行性肺动脉狭窄和RVH为特征，目前尚无报道称该模型具有PAH或血管重构的病理变化。但值得注意的是，PAB诱导后SD大鼠出现了由于压力超负荷导致的RVH，这有利于研究与开发实现心脏保护的新型疗法，在优化PAH辅助性治疗中具有重要意义[10]。

肺动脉狭窄伴随着肺血管阻力和肺动脉压力的渐进性升高，从而引起右心室发生结构和功能的改变，早期以向心性肥厚、收缩力增强和维持心输出量为特征的右心室代偿阶段表现为右心室重构，但右心室适应能力有限，不可避免地会过渡到失代偿阶段，从而引发死亡[37]。然而导致这两种阶段转化的机制尚未明确[8]。右心室功能是临床上PAH患者预后和生存的主要决定因素[8]，目前已批准的药物主要是治疗肺动脉血管过度收缩，尽管肺循环血流动力学状况有所改善，但右心室功能持续受损的患者预后依然很差。Shimauchi等[37]研究认为，PAB模型具备右心室对压力超负荷反应的优势，能够在不影响肺血管的情况下研究潜在治疗RVH的方法，并发现聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1（poly adenosine diphosphate-ribose polymerase 1，*PARP*1）和丙酮酸激酶肌肉同工酶2（pyruvate kinase muscle isozyme 2，*PKM*2）的表达上调是右心室失代偿的共同特征，因此，靶向PARP1/PKM2信号可能是一个维持PAH中右心室功能的有效途径。在确定LncRNA *H*19作为右心室衰竭的生物标志物研究中，Omura等[15]同样构建了PAB模型来探讨H19抑制剂GapmeR的效用，以观察PAB右心衰竭模型中*H*19表达的变化，以及抑制*H*19对心脏的保护作用。Akazawa等[38]通过比较MCT诱导、Sugen5416（一种血管内皮生长因子受体2抑制剂）和低氧双重诱导、PAB诱导模型的右心室病理生理变化，发现PAB模型能够产生由右心室机械压力超负荷引起的不适应性右心室重构。因此，PAB模型可用于研究在独立于肺血管系统病理影响的条件下，右心室压力超负荷时右心室功能障碍的病理机制，以及评估心脏保护治疗的效果。

表1详细归纳了常见的几种单因素病理损伤PAH模型的特征，包括各种模型的构建方式、优势以及局限性。

2.2 多因素病理损伤动物模型

许多研究表明，单一因素造成的病理损伤模型并不能模拟严重的PAH[3,10,39]，尤其是典型的MCT诱导模型和CHP诱导模型[7]被认为仅能模拟PAH早期轻/中度病理变化[10]。然而患者在被诊断出PAH时多数已处于具有严重血管病变特征（如新生内膜形成和丛样病变）的晚期[3]，这些病变在单因素病理损伤模型中很少也很难被观察到，其原因可能是啮齿类动物在进展到重度PAH发生前就已经死亡。因此，为了模拟更加符合临床PAH病理变化的严重程度，在单因素病理损伤模型的基础上，研究人员通过叠加不同的损伤因素加剧肺动脉的损伤，从而构建出具有严重PAH病理特征的多因素病理损伤模型。下文主要介绍近年来应用较多的模型及相关研究。

2.2.1 MCT-左全肺切除术诱导的PAH动物模型

单纯的全肺切除术（pneumonectomy，PNT）通常是指通过结扎肺门处的肺动脉、肺静脉和支气管后切除单侧（一般是左侧）全肺的手术，在术后无其他损伤的情况下虽然会增加肺动脉血流量，但仅导致肺动脉压力小幅度上升，并不会引起严重的血管重构和PAH，这种情况在人类和动物模型中没有差异，人类临床数据显示单侧PNT后尽管肺动脉压力会有小幅度上升，但若对侧肺部正常，患者能够建立持久的良好耐受[3,39]。当PNT合并MCT/MCTP时，PNT带来的肺动脉血流变化和压力小幅度增加却足以诱导远端肺动脉的内膜重构[3]。而在啮齿动物中PNT通常在左肺进行，因为其左肺只有1个肺叶，而右肺有4个肺叶，如果切除右肺，将无法弥补呼吸功能不全[4]。由于过高

表1 常见的单因素病理损伤肺动脉高压动物模型的特点归纳

Table 1 Summary of characteristics of single pathological injury- induced pulmonary arterial hypertension (PAH) models

模型类型 Model type	动物 Animal	构建方式 Establishment method	优点 Advantage	局限性 Limitation	疾病类型 Disease type
野百合碱 Monocrotaline (MCT)	SD大鼠	单次皮下注射/腹腔注射MCT（60～80 mg/kg）。造模时间为3～4周	操作简便，可重复，成本低。mPAP升高、PVR升高、右心室肥大、中膜肥厚，主要用于炎症相关的PAH研究[16]	实验性治疗效果过度改善（出现逆转）；倾向死于MCT综合征（肺间质水肿、心肌炎、肝小静脉闭塞症），病理终点与人类肺高压无关；无严重的血管闭塞性病变（丛状病变和内膜增生）；疾病进展为死亡的时间可能太短，无法形成代偿机制	PAH（Group 1）
慢性低氧 Chronic hypoxia	SD、FH大鼠	低压氧舱10%供氧量或者380 mmHg低压环境暴露。造模时间为3～4周	可重复性好，造模时间3～4周，FH大鼠可诱导重度肺高压	无严重的血管闭塞性病变（丛状病变和内膜增生）；该模型在常氧下可逆；低氧舱设备昂贵；对低氧的反应受动物年龄影响；低氧肺结构的改变受多种因素影响（不仅是低氧）；属于轻/中度肺高压，与低氧所致的肺高压相关（第三类肺高压）	肺部疾病/低氧所致的肺高压（Group 3）
分流手术 Shunt surgery	SD大鼠/仔猪	SPS型主动脉-肺动脉吻合术[39]；AVS型腹主动脉-下腔静脉分流手术[32]。造模时间：大鼠3～4周，仔猪3月以上[27]	可模拟先天性心脏病相关的PAH病理变化，大动物模型具有独特优势	手术操作复杂，造模技术难度大；动物术后死亡率较高；难以确定增加的血流量，手术风险高，并发症多；大动物饲养成本高；造模时间相对较长	CHD-PAH（Group 1）
肺动脉环缩手术 Pulmonary arterial banding	SD大鼠	通过左侧开胸从主动脉分离肺动脉，并沿肺动脉放置18号针头，针头和肺动脉周围紧紧捆绑一根丝线，将针取出以产生与针直径成正比的固定肺动脉收缩[38]。造模时间约5周	不影响肺血管情况下产生右心室重构和功能障碍	操作较复杂，技术要求较高；可作为右心衰竭模型，但不会出现肺血管重构和PAH；动物术后死亡率相对高	右心衰竭（PAH晚期症状）

注：mPAP，平均肺动脉压力；PVR，肺血管阻力；SPS，体肺分流；AVS，动静脉分流；CHD-PAH，先天性心脏病相关的PAH。

Note: mPAP, mean pulmonary artery pressure; PVR, pulmonary vascular resistance; SPS, systemic-to-pulmonary shunt; AVS, arteriovenous shunt; CHD-PAH, PAH associated with congential heart disease.

剂量（300 mg/kg）的MCT会造成严重的肝毒性，Lanchant等[40]预先以左肺切除术处理SD大鼠，然后给予低剂量（50～60 mg/kg）的MCT，发现可以引起肺部选择性而非全身性的血管损伤，因此左肺切除术合并低剂量MCT被认为是一种较为稳健的造模方法。在PNT-MCT模型中，90%以上的手术动物均发生了新生内膜重构[41]。Katz等[41]和Bisserier等[42]详细阐述了利用该手术造模的操作方法。研究表明，在MCT损伤内皮的情况下，手术产生的剪切应力（shear stress）可能是新生内膜形成的主要原因[3,29]，因此在术后1周，使用MCT进行二次“hit”诱导内皮损伤将产生严重的肺动脉病变。但关于该模型形成新生内膜的分子机制尚不清楚，Yan等[43]指出HIF-1α可能是该模型中造成新生内膜形成的关键因子。

研究发现PNT-MCT诱导模型经转谷氨酰胺酶2（transglutaminase 2，TG2）抑制剂干预后，PI3K/Akt信号通路可能在抑制肺血管重构中起到重要作用，这为进一步探索PAH相关的病理机制提供了新的视角[44]。

Medarametla 等[45]利用 PNT-MCT 诱导模型研究发现，相比于选择性抑制 α 受体的伊马替尼（Imatinib），吸入血小板衍生生长因子受体（platelet-derived growth factor receptor，PDGFR）α/β 非选择性抑制剂 PK10453 更具有治疗价值。此后 Sitapara 等[46]也用该模型研究发现，PDGFR α/β 抑制剂 GB002 可有效地预防 PAH 进展和病理性肺重构，该药物目前已进入临床开发阶段。Bisserier 等[47]则利用该模型发现联合肌浆/内质网 Ca^{2+}ATP 酶 2a（sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2a，SERCA2a）基因转移技术与信号转导和转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）抑制剂的方法可通过限制 STAT3 活性来恢复 *BMPR2* 的表达，为治疗重度 PAH 提供了新的潜在干预措施。研究指出，PNT-MCT 诱导模型创造了与 PAH 临床相关的病理条件，可作为药物、细胞、基因、蛋白质递送的平台，还能有助于研究对侧肺组织代偿性生长的机制，以及开发治疗右心室衰竭的方法等[41]。

2.2.2 MCT-分流(shunt)诱导的 PAH 动物模型

近年来，对 PAH 病理生理的研究重点逐渐转向血管重构的机制。肺血管重构具有不同阶段，表现为早期中膜肥厚、后期新生内膜病变和肺小血管进行性闭塞[48]。肺血流量增加被认为是肺血管重构发生发展的重要触发因素[41]。通过在腹主动脉和腔静脉之间建立分流可以诱导肺血流量增加，尽管左侧 PNT 或 SPS 均能增加肺血流量，但 PNT 会引起剩余肺代偿性生长并激活适应性通路，而 SPS 中吻合肺动脉会造成医源性肺血管损伤，两者均混淆了肺血流量增高的概念，因此构建 MCT-shunt 高肺血流量模型应采用 AVS 手术[48]。

在 Lewis 或 Wistar 大鼠注射 MCT（60 mg/kg）引起内皮损伤后，通过实施腹主动脉-下腔静脉分流手术增加肺血流量，从而诱发实验性重度 PAH[48]，该方法创建了一个模拟人类进行性重度 PAH 的 MCT-shunt 动物模型。MCT-shunt 诱导的动物模型具有不同的疾病阶段，Lewis 或 Wistar 大鼠诱导后 1 周正常非肌化血管开始形成肌性中膜层，3 周出现新生内膜病变，4～5 周发生右心衰竭并死于后遗症[48]，该特征使得 MCT-shunt 模型在研究疾病进展过程中不同阶段的特征和不同干预手段的效果方面具有极大的利用价值。Ven der Feen 等[48-50]使用 Lewis 和 Wistar 大鼠构建该模型，指出 BET 抑制剂 RVX208 在 PAH 啮齿类动物模型中可逆转血管重构，改善肺血流动力学；同时指出细胞衰老会损害 PAH 的可逆性，认为血流动力学卸载（hemodynamic unloading，HU）可逆转 CHD-PAH，并提出抗衰老药物 ABT263 是 PAH 终末期治疗的新方向[51]。此外，近年来有研究者利用 SD 大鼠构建 MCT-shunt 诱导的动物模型，分别指出 Nestin 可能增强 Wnt/β-catenin 信号通路[52]，圆柱瘤病去泛素化酶（deubiquitinase cylindromatosis，CYLD）可能调节 p38/ERK 信号通路[53]，凝胶转化蛋白可能增强 TGF-β1 信号通路[54]，Synemin 联丝蛋白表达[55]可促进 PASMCs 表型转化、增殖和迁移，而钙周期素结合蛋白/Siah-1 相互作用蛋白（calcyclin-binding protein/Siah-1-interacting protein，CasyBP/SIP）可改善 PASMCs 的功能紊乱[56]，这些结果均为后续开发和研究治疗 CHD-PAH 的药物提供了可借鉴的数据。

2.2.3 Sugen5416-低氧(Sugen-hypoxia，SuHx)诱导的 PAH 动物模型

血管表皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）及其受体在 PAH 患者的丛状病变中表达，这说明在 PAH 的病理变化中 VEGF 发挥一定作用，但其精确的作用机制尚存在争议[1]。在 SD 大鼠体内，抑制 VEGF 受体（VEGF receptor，VEGFR）将导致肺间质细胞凋亡和肺气肿形成；然而当结合 CHP 时，大鼠会出现重度 PAH，并伴有血管增生性病变[1]。Taraseviciene-Stewart 等[57]将 CHP 暴露与 VEGFR2 拮抗剂 Sugen5416 联合，构建了具有严重的肺血管重构、丛状病变以及右心室衰竭的 SD 大鼠模型。不同于 CHP 模型的是，该模型的病理变化在恢复至常氧状态时并不可逆。构建 SuHx 诱导的动物模型的常用方法是对 SD 大鼠采用单次皮下注射 Sugen5416（20 mg/kg）后进行 3～4 周的低氧（10% 氧气）暴露，再恢复到常氧环境 3～5 周[58]；对小鼠（通常是 8 周龄）也用同样的剂量注射，但方法是连续 5 周暴露在低氧条件下，每周进行一次 Sugen5416 注射。Dignam 等[20]指出 VEGFR2 在内皮细胞中发挥着促存活的作用，血管重构的触发因素可能是 Sugen5416 诱导 PAECs 选择性死亡。VEGFR 被 Sugen5416 阻断后引起 PAECs 凋亡，CHP 暴露可进一步刺激具有抵抗凋亡表型的 PAECs 大量增殖，从而形成类似于丛状病变的血管闭塞性病变[3]。

相较于上述两种需要采取复杂手术的多因素病理损伤模型来说，SuHx 诱导的动物模型的操作较简单。

SuHx诱导的动物模型比CHP诱导的动物模型呈现出的PAH病变更为稳定，并能够模拟重度PAH的病理特征，同时Sugen5416仅局限于影响肺部[3]，因此该模型是目前应用较为广泛的多因素病理损伤模型。在研究PAH相关的病理机制方面，Hurst等[58]利用雄性SD大鼠构建了SuHx模型，发现并确定了骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMP）和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）在疾病中的作用机制，证明了抗TNF-α的免疫治疗可逆转疾病进展，恢复正常的BMP/Notch信号通路。Wu等[59]使用C57BL/6J小鼠构建SuHx模型，观察到泛素特异性蛋白酶（ubquitin-specific protease 15，USP15）的上调，并在该模型中敲低*USP*15基因表达以揭示USP15在PAH进展中的调节作用。同样地，Shen等[60]利用C57BL/6小鼠建立该模型，并发现癌蛋白鼠双微体-2（murine double minute 2，MDM2）在其肺组织中水平升高，指出MDM2通过泛素化血管紧张素转化酶2（angiotensin-converting enzyme 2，ACE2）参与了ACE2的翻译后修饰和PAH的发生。

加深对PAH病理机制的理解有助于疾病治疗领域的发展，近年来许多基于SuHx诱导动物模型的研究不断发现潜在的新型治疗药物以及治疗策略。研究人员在SuHx诱导的啮齿类动物模型中发现，血管紧张素Ⅱ受体阻滞剂/脑啡肽酶抑制剂Sacubitril/Valsartan[61]、青蒿素及其衍生物[62]、烟酸[63]均可延缓PAH进展。同样，新型治疗策略的研究也在不断更新与发展，例如有研究指出髓系细胞糖酵解关键酶*PFKBF*3基因的抑制或敲除可以减轻或避免SuHx诱导C57BJ/6J小鼠形成PAH[64]，靶向HIF2α异源二聚化可降低SuHx诱导SD大鼠的肺血管血流动力学和肺血管重构[65]，激活中小电导Ca^{2+}激活的K^+通道（IK/SK）可降低SuHx诱导C57BJ/6J小鼠的肺动脉压力[66]等，这都说明了SuHx诱导动物模型在研究PAH的病理机制、开发新型药物和创新治疗策略中具有重要的使用价值。

值得注意的是，在SuHx模型中，啮齿类动物品种与品系的选择对模型构建具有较大的影响。研究指出小鼠发生PAH必须要连续3周给予Sugen（每周1次）[20]，其原因可能是小鼠比大鼠对Sugen的代谢能力更强。Fischer大鼠在SuHx条件下7～8周会迅速出现RV衰竭，其死亡率接近100%，而SD大鼠可以存活13周[20]。Suen等[67]研究指出Fischer大鼠对右心室后负荷增加的适应能力较低，其高死亡率可能与血管生成、代谢以及先天免疫的基因调节有关。

表2详细归纳了几种常见的多因素病理损伤模型的特征，其中列举了各类模型匹配的动物物种、构建方式、优点以及局限性，还补充了目前研究应用较少但构建方式较为简单的MCT-低氧模型[68]。

2.3 基因工程动物模型

自2000年在家族性PAH中发现*BMPR*2杂合种系突变是其主要的分子遗传基础[69]以来，随着高通量测序方法不断发展以及基因编辑技术的广泛普及，许多研究开始关注PAH的分子遗传机制。在这些研究中，常利用C57BL/6小鼠来构建PAH基因工程模型，以研究其病因机制，开发新型治疗策略。近年来，也有研究开始关注利用大鼠等动物模型构建基因工程模型，以求获得更加符合PAH病理变化的新型动物模型。

前述各种病理损伤因素导致的PAH动物模型主要是模拟了在外界环境伤害下继发的PAH，而在一些家族遗传性PAH或特发性PAH患者中，相关基因产生的突变或表达失调是非常重要的内源性因素，往往会在外源性因素（如炎症、低氧等）刺激下引起发病。基因编辑技术作为研究工具对探究PAH病因学发生机制具有重要意义。目前已有的基因工程PAH动物模型主要聚焦于基因敲除或者条件性敲除的PAH动物模型，以及条件性基因过表达的PAH动物模型。

2.3.1 基因敲除的PAH模型

目前已发现16种以上基因突变与PAH的发生发展存在关联[4]，其中*BMPR*2杂合突变导致的功能缺失最常见，发生在53%～86%的家族性PAH和14%～35%的特发性PAH患者中，提示BMPR2信号通路在PAH发病机制中具有重要作用[70]。此外，Lau等[5]指出携带有*BMPR*2突变的女性PAH患者疾病外显率是男性的3倍，但同时男性PAH患者显示出更差的生存率，可能与男性患者的右心室适应性有关。研究表明，遗传性PAH患者中*BMPR*2单倍体不足是其主要的分子机制[4,71]，这为构建*BMPR*2等位基因杂合子突变的小鼠模型提供了前提条件。2004年Beppu等[72]建立了*BMPR*2第4和第5外显子缺失（$BMPR2^{+/-}$）的C57BL/6小鼠模型，该模型在基础状态下仅表现轻度PAH，且缺乏RVH的特征。随后Long等[73]构建了导致内源性BMPR2第899位氨基酸（R899X）发生突变的$BMPR2^{+/R899X}$基因敲入C57BL/6小鼠模型，尽管该模型依旧缺乏RVH，但是能自发形成年龄相关的PAH。

表2 常见的多因素病理损伤肺动脉高压动物模型的特点归纳

Table 2 Summary of characteristics of multifactorial pathological injury- induced pulmonary arterial hypertension (PAH) models

模型类型 Model type	动物 Animal	构建方式 Establishment method	优点 Advantage	局限性 Limitation	疾病类型 Disease type
野百合碱-全肺切除术 MCT- PNT	SD大鼠[41-42]	左侧全肺切除术[38]，术后1周皮下注射MCT（60 mg/kg）	可模拟重度PAH，具有新生内膜形成和丛状病变的病理特点	操作较复杂，造模难度大，动物死亡率高；可能出现血管周围增生性病变	PAH（Group 1）
野百合碱-分流 MCT-shunt	Lewis/Wistar[48]、SD大鼠[52]	MCT诱导处理后采用主动脉腔静脉分流[32]	触发疾病的病理生理，具有新生内膜病变与右心室衰竭的特征；具有阶段性进行性病理变化	手术难度大、风险高，术后死亡率高、并发症多；大动物饲养成本高；无法实现体内分流关闭	CHD-PAH（Group 1）
Sugen5416 - 低氧 Sugen5416-hypoxia	SD大鼠	单次皮下注射Sugen（20 mg/kg）后进行3～4周低氧暴露（10%氧气），再恢复常氧3～5周	可诱导重度PAH，出现丛样病变和右心室衰竭；该模型置于常氧后不会出现逆转；病变器官局限于肺部	血管周围未出现炎性细胞（巨噬/单核细胞）浸润；仅少数基因的表达与人类患者肺部变化相同；物种间（大鼠和小鼠）、品系间（Fischer大鼠和SD大鼠）实验性PAH的差异较大	PAH（Group 1）
野百合碱 - 低氧 MCT-hypoxia	SD大鼠	单次皮下注射MCT（60 mg/kg）后暴露于低氧环境中3～4周左右	操作简单，造模时间较短；出现重度PAH的组织学病理特征；具有炎性反应（巨噬细胞浸润）、血栓形成的特点[68]	物种间造模效果差异较大，目前主要选择SD大鼠；目前研究应用较少	PAH（Group 1）

注：MCT，野百合碱；PNT，全肺切除术；CHD-PAH，先天性心脏病相关的肺动脉高压。

Note: MCT, monocrotaline; PNT, pneumonectomy; CHD-PAH, pulmonary arterial hypertension associated with congential heart disease.

Boucherat等[19]指出*BMPR2*$^{+/-}$小鼠在长期低氧、脂氧合酶介导或脂多糖引发的炎症、IL和慢性5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）输注等应激条件下更容易发生PAH，这些结果验证了*BMPR2*杂合突变在携带者中的不完全外显率（10%～20%），证实了杂合*BMPR2*突变本身不足以触发疾病，需要结合更加复杂的环境因素和遗传背景才能解释PAH的临床表现[3]。

鉴于大鼠作为模式生物对研究PAH发展比小鼠具有更敏感的优势，加之近年来基因编辑技术的快速发展，Hautefort等[74]利用锌指核酸酶法构建了新型*BMPR2*突变（第1个外显子单等位基因缺失71 bp）的SD大鼠模型，发现该模型能够自发形成与年龄相关的PAH，具有与人类相似的低外显率以及关键细胞和分子功能障碍。在另一项研究中，Tian等[75]通过腺病毒表达全长的人5-脂氧化酶（5-lipoxygenase，5-LOX）来介导*BMPR2*$^{+/-}$大鼠模型的肺部炎症，发现原本表型沉默的*BMPR2*$^{+/-}$大鼠出现了内膜病变和重度PAH，该研究解释了环境损伤会诱发*BMPR2*突变潜在的破坏力。

综上所述，*BMPR2*基因敲除模型对研究PAH分子机制和遗传病因具有重要价值。最近一项研究表明，在单核细胞谱系特异性*BMPR2*敲除的小鼠模型中，促炎细胞因子显著增加且炎性细胞浸润明显，提示巨噬细胞的*BMPR2*功能失调会通过增加促炎细胞因子来影响肺血管重构和血管细胞表型转化[76]。而Long等[73]则利用其创新的*BMPR2*$^{+/R899X}$以及MCT和SuHx诱导的小鼠模型发现，体内递送BMP9能够逆转小鼠PAH病变，认为BMP9会抑制多种PAH相关药物诱导的内皮通透性，提出可以将BMP配体作为PAH治疗的新靶点。Theilmann等[77]利用内皮选择性*BMPR2*敲除C57BL/6J小鼠模型（*BMPR2*$^{EC-/-}$）进一步研究BMP9治疗的机制，发现*BMPR2*缺失会逆转内皮细胞对BMP9的反应，引起异常增殖。

除了*BMPR2*基因敲除模型外，与PAH相关的其他基因（通常涉及TGF-β家族和BMP信号通路）突变的小鼠模型在近5年来更倾向于功能基因组学的研究应用。Boucherat等[19]总结指出，并非全部*Alk1*$^{+/-}$、*Eng*$^{+/-}$、*Cav*-1$^{-/-}$小鼠都能够表现出PAH的迹象（包括右心室收缩压显著升高、RVH以及外周动脉重塑相关

的病理变化）。但这些致病基因相关的动物模型对深入研究PAH发病机制具有重要的作用。Morena等[78]研究发现，*Cav*-1$^{-/-}$小鼠（C57BL/6J）模型的动脉僵硬度增加，这一结果进一步拓展了人们对PAH动脉重构中*Cav*-1作用的认识。近年来通过全外显子测序筛查发现，*KCNK3*基因在遗传性或特发性PAH患者中存在功能缺失[79,19]。Lambert等[79]利用成簇的规律间隔的短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR）/CRISPR相关蛋白核酸酶9（CRISPR-associated nuclease 9，Cas9）技术敲除了*KCNK3*基因的第一个外显子，首次构建了*KCNK3*突变的SD大鼠模型，该模型可随年龄增长出现自发性PAH，且在MCT或CHP诱导下发生严重的PAH病理变化。在另一项研究*KCNK3*突变导致PAH的报告中，研究者将*KCNK3*$^{flox/flox}$小鼠与Ubiquitin-Cre/Ert2小鼠杂交得到*KCNK3*条件性敲除小鼠模型，并将其暴露于低氧、代谢饮食和低剂量脂多糖条件下，发现*KCNK3*功能缺失能够通过改变免疫功能、引发炎性反应来影响血管张力等各种生理过程[80]，这使人们对该基因功能缺失在PAH发病机制中发挥着什么样的作用有了更深的理解。

此外，许多研究将目光聚焦于其他能够引起PAH的基因敲除动物模型的构建，以用于针对性地研究各种药物的治疗效果和安全性评估。内皮素受体B（endothelin B receptor，ET_B）基因缺陷大鼠经过低压低氧暴露后可出现严重的PAH，有助于开发内皮素受体拮抗剂（如波生坦）及其安全性评估[10]；载脂蛋白E（apolipoprotein-E，*ApoE*）基因敲除小鼠可用于研究脂联素在治疗肺血管重构和血管张力方面具有的潜在作用，可能解释胰岛素抵抗或者肥胖与PAH之间的关系[10]；血管活性肠肽（vasoactive intestinal peptide，*VIP*）基因敲除小鼠可自发出现重度PAH，支持了外源性VIP治疗PAH的概念，对全面表征VIP类似物（如阿肽地尔）的疗效具有很大的帮助[10]。

近年来，一些新的基因敲除模型也为探索PAH的病理机制和治疗策略提供了新视角。Tu等[81]构建*BMP9*$^{-/-}$小鼠（C57BL/6）模型以研究BMP9在PAH中的作用，发现选择性抑制BMP9对实验性PAH具有部分保护作用，这在一定程度上补充了Long等的研究结果。Bouvard等[82]通过比较*BMP9*和*BMP10*基因单敲除和双敲除小鼠（C57BL/6）模型研究两者在心血管稳态和PAH中的作用，发现*BMP9*参与CHP诱导的肺血管重构，而*BMP10*在CHP诱导的C57BL/6小鼠心脏重构中发挥着作用。近期，Zhang等[83]构建了一种全新的基因双敲除模型——对线粒体脱乙酰酶Sirt3和解偶联蛋白Ucp2进行双基因敲除的C57BL/6小鼠模型，该模型表现出类似人类自发性重度PAH，具有其他PAH模型不具备的人类疾病特征，可用于研究与代谢相关的PAH病理机制。基因双敲除或者联合敲除模型丰富了基因敲除模型的类型，为开发PAH动物模型提供了一种新的思路。

2.3.2 基因过表达的PAH动物模型

在PAH相关的基因过表达动物模型中，较早构建应用的是*S100A4/Mst*-1小鼠模型[3,10]，S100A4/Mts-1是钙结合蛋白家族中的一种促转移蛋白，其功能包括调节细胞增殖、分化、凋亡以及细胞骨架动力学作用，此模型出现新生内膜增厚和丛状病变的PAH血管变化特征，且在小鼠中表现出明显的性别差异[84,10]。在人类PAH中，女性发病风险更高，研究显示62%～80%的PAH患者为女性，但目前关于性激素对PAH的影响或解释PAH性别差异的机制尚未完全清楚[5]。Maarman等[10]指出不同于雄性小鼠，过表达*S100A4/Mst*-1的雌性小鼠表现出丛状病变、远端肺小动脉Mst-1蛋白增加与右心室收缩压增加，因此该模型可被用于研究性别差异与PAH发病的潜在关系。除此之外也有人利用该模型研究S100A4/Mts-1引发肺血管重构的潜在机制和病毒感染相关的PAH[10,21]。

血清素转运体（5-hydroxytryptamine transporter，5-HTT）过表达转基因小鼠（C57BL/6）模型在CHP条件下出现RVH和肺血管重构[21,10]，引起了人们对5-HTT抑制剂治疗PAH的兴趣[10]。尽管该模型并未表现出严重的PAH或组织学变化[21]，但仍旧为人们研究5-HTT通路的作用机制及新型药物的疗效提供了可供选择的平台。Maarman等[10]指出许多5-HT受体拮抗剂在离体细胞和动物模型中被证明具有一定的疗效，并强调了同时靶向5-HT转运体和受体可能为PAH提供新的治疗方案。2022年PH协会国际学术会议上，Robert Frantz指出5-HTT通路将会是PAH治疗的可能途径，并且作用于该通路的外周色氨酸羟化酶1抑制剂Rodatristat已进入临床Ⅱ期试验研究[51]。

血管生成素-1（angiopoietin-1，ANG-1）过表达Fischer大鼠模型表现出明显的平均肺动脉压上升、小动脉中膜变厚和血管闭塞，使得人们关注血管生成失调和血管重构的病理特征，有利于进一步研究ANG-1

在PAH中的作用[10]。Schermuly等[1]指出，血管生成失调与内皮修复障碍可能与PAH病理机制相关，此外，内皮祖细胞、血管生成因子、促血管生成治疗等已然成为新的研究热点。

IL-6主要由T细胞和巨噬细胞产生，可发挥促炎作用并调节造血、免疫和肿瘤发生过程。IL-6水平升高可能与PAH的严重程度和死亡率相关[10]。Steiner等[3]利用非特异性过表达*IL-6*转基因小鼠，研究了常氧和慢性低氧条件下IL-6在肺血管疾病发病机制中的作用，发现该模型小鼠的右心室收缩压升高，出现RVH，伴有血管病变，远端动脉血管中还出现了伴有炎症的增生性小动脉病变，但并未发现丛状病变。该模型反映了IL-6在促进肺血管重构形成方面的作用，提示IL-6可能与激活内皮细胞过度增殖和抗凋亡蛋白表达的信号通路相关。因此有人尝试使用IL-6受体拮抗剂托珠单抗治疗PAH[10]。*IL-6*过表达模型不仅有助于PAH病程中IL-6功能的探究，更有利于PAH治疗中抗炎疗法的发展[10]。

近期的一些研究构建了其他基因过表达模型，这些模型均有利于推动PAH病理机制和疾病治疗的发展。例如MSX1是一种在胚胎发育过程中表达的转录因子，病理条件下MSX1过表达会引起细胞去分化或凋亡。West等[85]建立了约4倍过表达*MSX1*的转基因小鼠模型，将该小鼠暴露于CHP下，发现肺血管病变程度成倍增加，同时*MSX1*过表达在低氧条件下会加剧肺血管的丢失，这为开展靶向肺血管重构和血管生成失调的治疗途径提供了新的思路，而MSX1在肺血管中的作用机制有待进一步研究。Xue等[86]构建了内皮细胞特异性过表达亲环素A（cyclophilin A，*CYPA*）的转基因小鼠，历时3个月观察到了PAH表型，发现细胞外CYPA能够通过刺激内皮细胞凋亡、氧化还原应激和炎性反应等引起PAH，提出抑制细胞外CYPA分泌是新的治疗方法。随后将该模型进一步创新，与ROSAmT/mG小鼠交配得到能够细胞特异性地表达绿色荧光蛋白的*CYPA*过表达小鼠，该模型中绿色荧光蛋白能够表达并定位于所有内皮细胞来源的细胞，以用于谱系追踪显示肺内皮细胞中间充质标志物的表达；研究指出CYPA（尤其是乙酰化形式）通过增加内皮间质转化，细胞因子释放，内皮细胞迁移、增殖和线粒体功能障碍等机制促进PAH[87]。这些研究结果不仅为PAH分子机制探讨开辟了新的视角，更拓展了PAH模型构建和应用的新思路。

3 PAH动物模型在药物研究中的应用

目前的PAH治疗策略主要是针对肺血管系统中功能失调的信号通路。在PAH中，内皮功能紊乱会影响ET-1、PGI_2与NO信号通路的正常运作[8]。已有5类针对这3条内皮信号通路功能失调的药物获得FDA批准上市[5]，包括内皮素受体拮抗剂（endothelin receptor antagonists，ERAs）、磷酸二酯酶5型（phosphodiesterase type 5，PDE5）抑制剂、可溶性鸟苷酸环化酶（soluble guanylate cyclase，sGC）刺激剂、前列环素类似物、前列环素IP受体激动剂[5,8-9,88]。这些血管扩张剂的功效主要是抑制ET-1通路、刺激NO-cGMP通路或者增强PGI_2对受体的作用[9]，从而纠正内皮功能紊乱。在药物研究方面，MCT诱导的PAH动物模型已用于研究多种药物（包括ERAs、前列环素类似物、PDE5抑制剂、他汀类药物、Rho激酶抑制剂等[9-10]）对实验性PAH的预防和治疗作用，是目前研究PAH最常用的动物模型；SuHx诱导的PAH模型具有不可逆的重度PAH病理特征和血管闭塞性病变[19]，在评估PGI_2途径相关药物治疗以及新型抗血管重构药物的疗效中发挥着重要作用。

3.1 内皮素途径

PAECs分泌的ET-1作用于PASMCs上的内皮素受体A（endothlin A receptor，ET_A）与ET_B，ET_A可引起血管收缩并促进PASMCs增殖，ET_B则使血管扩张并抑制PASMCs增殖；位于内皮细胞上的ET_B还能局部清除ET-1，促进NO与PGI_2释放，从而舒张血管[5-6]。ERAs主要作用于ET_A与ET_B，分为双重内皮素受体拮抗剂（如波生坦Bosenta、马西替坦Macitentan）与选择性ET_A受体拮抗剂（如安贝生坦Ambrisentan）[5,8-9,88]。

近年来，ERAs逐渐从理论转向临床，已经是较为成熟的PAH治疗药物[8,88]。Kim等[89]根据马西替坦能够降低晚期PAH患者发病率和死亡率的结论，利用MCT诱导的PAH大鼠进行研究，发现使用马西替坦能够明显改善早期实验性PAH的血流动力学以及组织病理学变化，包括显著降低了右心室收缩末期/舒张末期容积、肺动脉收缩压、收缩末期压力容积关系等，同时减轻了右心室肥大、心脏和肺部肌纤维化，右心室/（左心室+室间隔）重量比和肺重量都更接近正常小鼠，说明马西替坦的早期治疗对PAH也具有较好的疗效。Lee等[90]则利用MCT诱导的PAH大鼠模型评估了安

贝生坦在分子水平层面的作用效果，发现低剂量的安贝生坦能够抑制MCT诱导的PAH大鼠肺组织中ET-1和ET_A的水平，并提高内皮型一氧化氮合酶（endothelial isoform of nitric oxide synthase，eNOS）的水平，指出需要进一步研究确定安贝生坦的最佳剂量以及评估其在低剂量治疗中的剂量依赖效应。Noveli等[91]利用MCT诱导的PAH大鼠模型首次比较了注射Rho激酶抑制剂Y-27632和马西替坦的药效差异，发现Y-27632对改善RV收缩压、RV和肺小动脉重构的积极影响比马西替坦更明显，但其主要的局限性在于外周血管舒张作用显著，可能会导致过度的降压效果。在另一项研究中，MCT和SuHx诱导的PAH大鼠模型被用于评估波生坦和缬沙坦LCZ696联合治疗的效果，发现对实验性PAH的血管重构具有保护作用[92]。最近，一种新合成的内皮素受体拮抗剂派珀生坦（Pipersentan）也被报道可有效对抗ET-1对PASMCs增殖、迁移的影响，并有效改善MCT和CHP诱导大鼠的RVH和PAH[93]。内皮素受体拮抗剂从基础理论研究转向临床应用的过程中，PAH动物模型，尤其是MCT诱导的大鼠模型发挥了非常重要的作用。

3.2 NO途径

在PAECs中，eNOS催化精氨酸合成瓜氨酸和NO，后者作用于PASMCs的sGC（NO受体），从而生成第二信使cGMP，传递血管扩张和抑制PASMCs增殖的信号，而PDE5会降解cGMP为GMP[8]。sGC刺激剂（利奥西呱Riociguat）使得sGC能够独立于NO释放cGMP，PDE5抑制剂（西地那非Sildenafil、他达拉非Tadalafil、伐地那非Vardenafil）能够抑制PDE5降解为cGMP，从而舒张过度收缩的肺动脉[8,88]。Velasova等[94]指出，利奥西呱可使MCT诱导的实验性PAH大鼠体内血清素相关基因和肾损伤标志物的表达正常化。然而Xu等[95]利用低压CHP诱导的大鼠模型研究发现，利奥西呱的治疗效果甚微，提示利奥西呱可能在治疗低氧损伤诱导的PH上效果不如马西替坦、Selexipag等药物，但具体的原因尚未被阐明。此外，一项关于联合PDE5抑制剂洛地那非（Lodenafil）和人脐带间充质干细胞治疗的研究在SuHx诱导的大鼠模型中展开，该联合治疗策略逆转了SuHx诱导大鼠模型中的RVH以及间质细胞浸润，被认为是一种潜在的PAH治疗策略[96]。

3.3 前列环素途径

PGI_2自PAECs释放后作用于PASMCs的IP受体，IP受体可促进腺苷酸环化酶（adenylate cyclese，AC）合成第二信使cAMP，从而引起血管舒张并抑制PASMCs增殖。主要的PGI_2类似物包括依前列醇（Epoprostenol）、伊洛前列素（Iloprost）与曲前列尼尔（Treprostinil）[88]，而IP受体激动剂Selexipag是一种对IP受体具有高度选择性的新型PAH治疗药物[5]。

研究针对PGI_2途径的药物时主要选择SuHx诱导的PAH大鼠模型，该模型可表现出一种慢性严重PAH的病理特征，有利于评估该类药物对重度PAH的治疗效果。2018年Chaudhary等[97]指出曲前列尼尔可通过降低血管阻力、改善心脏结构和功能对SuHx诱导的大鼠发挥治疗作用，但无法改善血管重构。2022年Vanderpool等[98]利用SuHx大鼠模型进一步验证实验性PAH对PGI_2的潜在反应，该研究强调了曲前列尼尔能够逆转RVH和功能障碍，并进一步阐明了曲前列尼尔对心肺功能的改善作用，为未来研究PGI_2及其类似物激活心肌特异性保护途径打开了新大门。由于PGI_2类似物会引起腿痛等不良反应，Morrison等[99]利用SuHx诱导的大鼠模型研究发现，相比传统的PGI_2类似物，服用Selexipag可能可以减轻PAH患者的腿痛，Selexipag是更适合临床投入使用的PAH治疗药物。近期一项研究同样利用SuHx诱导的大鼠模型，验证了Selexipag用于治疗重度实验性PAH时对RVH和右心室衰竭的积极作用[100]。除此之外，SuHx诱导的PAH大鼠模型还被用于比较长效吸入性肺血管扩张剂前药（treprostinil palmitil，TP）、吸入和静脉注射曲前列尼尔和口服Selexipag的疗效，最终发现TP干粉在抑制该模型的病理生理变化方面优于后两者[101]，这为创新临床药物开发提供了新见解。

4 总结与展望

为了更好地探究PAH的发病机制和病理变化，许多动物模型经过设计和检验得以构建，并在PAH的病理特征、分子机制以及治疗方案的研究中发挥了非常重要的作用。虽然目前还没有能够完全模拟人类PAH的临床前动物模型，但恰当地利用典型和新型的PAH动物模型能够极大地帮助我们寻找分子靶点和观察表型转化的过程。MCT诱导的大鼠模型是典型的炎症介导的PAH模型，CHP诱导的大鼠模型更适合研究轻度慢性肺部疾病相关的PH，FH大鼠是唯一能够自发形成PAH的动物类型；SuHx诱导的大鼠模型则被认为是一种更适合研究闭塞性PAH的模型，其具有与人类

PAH相似的重度病变特征。鉴于右心衰竭是PAH的主要致死原因，PAB诱导的大鼠模型是评估右心衰竭的理想模型，可有效避免低氧、VEGF抑制剂和MCT毒性对右心室的潜在影响。需要注意的是，啮齿动物的品系差异会对模型构建的效果产生影响，如在SuHx诱导下，SD大鼠具有良好的生存能力，Fischer大鼠能反映右心室适应后负荷增加的特征，而Lewis大鼠则并不适合使用该方法[16]。此外，雌性动物通常对低氧和MCT诱导并不敏感，但在基因工程模型中却表现出比雄性更加复杂和严重的症状[16]。

在药物研究的应用上，MCT和SuHx诱导的大鼠模型是多数PAH研究选择的动物模型，MCT诱导的PAH模型与内皮毒性相关，以肺部炎症为标志；而SuHx诱导的PAH模型以肺血管增生病变为特征，在应用时应考虑到MCT的毒性作用以及注射Sugen的大鼠品系[16]。需要指出的是，如果首要目标是研究导致右心衰竭的分子机制或者是评估保护心脏的新方法，应优先考虑MCT或PAB诱导的模型[19]。目前关于PAH的治疗方法和策略在不断更新与创新，其中涉及表观遗传学、细胞衰老以及肠道微生物群治疗等方面[51]，同时新型药物和治疗方法也在陆续出现，如索他韦尔（Sotatercept）、吸入式Seralutinib、高剂量的马西替坦联合拉林帕、BET抑制剂、衰老药物、肠道菌群移植等[51]，在正式进入临床试验前，这些新型治疗均需要利用合适的动物模型进行药效评估和安全性研究。

目前针对PAH的治疗方法是利用血管扩张剂改善肺动脉压力的升高，但逆转血管重构和改善右心室功能障碍依旧是较大的治疗难题。由于基因突变或表达失调能调控肺血管细胞增生和抗凋亡，从而参与PAH发病，因此开发安全有效的基因治疗方法以恢复或下调致病基因的表达可作为一种重要的新型PAH治疗策略；此外，沉默致病基因、表达治疗性蛋白或使用基因编辑技术为这种疾病提供了新的治疗范式[102]。Rai等[102]指出基因治疗发展过程中，关键是解决转染方法的效率和安全性问题，其综合分析了非病毒输送系统与病毒传递系统在PH治疗应用方面的情况，并指出基于纳米颗粒和腺相关载体给药的方式是目前具有较好前景的基因治疗递送方法。Bisserier等[11]研究指出，气管内递送腺相关病毒血清型1的肺靶向*SIN*3*a*基因治疗可能是治疗PAH的新策略，该方法可以通过*SIN*3*a*上调*BMPR*2表达，从而恢复实验性PAH动物模型中*BMPR*2的表达，减弱肺血管和右心室重构。另有研究表明，再生细胞疗法、基因治疗以及表观遗传药物将会为PAH治疗提供新的视角[103]，而以内皮祖细胞、间充质细胞以及诱导多能干细胞为主的干细胞疗法能够修复内皮损伤和内皮功能紊乱，治疗远端肺脉管病变；*BMPR*2、*SERCA*2*a*、*PGIS*、*IL*-10、*ANG*-1等相关的基因治疗[102-103]通过调控基因表达来恢复相关通路信号分子的功能；BET抑制剂、DNA甲基转移酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂[103]等表观遗传药物在临床前研究中显示出良好的效果，有待临床转化医学的进一步研究。这些新的治疗策略与药物均具有较好的临床应用前景与价值，是未来人类攻克PAH进程中非常重要的方面。

选择合适的PAH模型是开展研究的关键，不仅要考虑造模方法引起的病理改变和发病机制，还要考虑不同动物种类和性别对造模方法的不同反应。动物模型的选择应以研究目的为依据，有效地组合典型和新型造模手段。在条件允许的情况下，在多个模型中开展测试将极大地提高临床转化成功率，同时可采用人类患者的肺组织细胞进行体外研究，以弥补动物模型与人类患者之间的差距。在新型特异性药物的开发治疗与评估策略中，比如三联药物治疗策略、基因治疗（递送系统安全性评估）、干细胞治疗、肺动脉去神经支配、特异性药物（Rho激酶抑制剂、ANG-1抑制剂、弹性蛋白酶抑制剂等）方面，如何合理应用和优化这些实验性PAH动物模型以得到可靠有效的研究结论，将成为未来研究PAH机制和治疗时需要首先攻克的问题之一。

[作者贡献 Author Contribution]

俞佳慧查找及筛选相关文献，撰写初稿并修改；
巩倩参与文稿修订，给予修改意见；
庄乐南审核文稿并给予指导。

[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] SCHERMULY R T, GHOFRANI H A, WILKINS M R, et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(8): 443-455. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.87.

[2] HUMBERT M, GUIGNABERT C, BONNET S, et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives[J]. Eur Respir J, 2019, 53(1): 1801887. DOI: 10.1183/13993003.01887-2018.

[3] STENMARK K R, MEYRICK B, GALIE N, et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(6): L1013-L1032. DOI: 10.1152/

ajplung.00217.2009.
[4] SOUTHGATE L, MACHADO R D, GRÄF S, et al. Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(2): 85-95. DOI: 10.1038/s41569-019-0242-x.
[5] LAU E M T, GIANNOULATOU E, CELERMAJER D S, et al. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(10): 603-614. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.84.
[6] HASSOUN P M. Pulmonary arterial hypertension[J]. N Engl J Med, 2021, 385(25):2361-2376. DOI: 10.1056/NEJMra2000348.
[7] RUOPP N F, COCKRILL B A. Diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension: a review[J]. JAMA, 2022, 327 (14):1379-1391. DOI: 10.1001/jama.2022.4402.
[8] HUETSCH J C, SURESH K, BERNIER M, et al. Update on novel targets and potential treatment avenues in pulmonary hypertension[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 311 (5):L811-L831. DOI: 10.1152/ajplung.00302.2016.
[9] SZTUKA K, JASIŃSKA-STROSCHEIN M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals[J]. Pharmacol Res, 2017, 125(Pt B):201-214. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.08.003.
[10] MAARMAN G, LECOUR S, BUTROUS G, et al. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet?[J]. Pulm Circ, 2013, 3(4):739-756. DOI: 10.1086/674770.
[11] BISSERIER M, MATHIYALAGAN P, ZHANG S H, et al. Regulation of the methylation and expression levels of the *BMPR2* gene by SIN3a as a novel therapeutic mechanism in pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2021, 144(1): 52-73. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047978.
[12] XIAO R, SU Y, FENG T, et al. Monocrotaline induces endothelial injury and pulmonary hypertension by targeting the extracellular calcium-sensing receptor[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(4):e004865. DOI: 10.1161/JAHA.116.004865.
[13] CHEN D, ZHANG H F, YUAN T Y, et al. Puerarin-V prevents the progression of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rodent models[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(9): 2325-2339. DOI: 10.1038/s41401-022-00865-y.
[14] SU H, XU X L, YAN C, et al. LncRNA H19 promotes the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells through AT1R via sponging let-7b in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension[J]. Respir Res, 2018, 19(1):254. DOI: 10.1186/s12931-018-0956-z.
[15] OMURA J, HABBOUT K, SHIMAUCHI T, et al. Identification of long noncoding RNA H19 as a new biomarker and therapeutic target in right ventricular failure in pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2020, 142(15): 1464-1484. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047626.
[16] WU X H, MA J L, DING D, et al. Experimental animal models of pulmonary hypertension: development and challenges[J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(3): 207-216. DOI: 10.1002/ame2.12220.
[17] YAMAZATO Y, YAMAZATO M, ISHIDA A, et al. Intratracheal administration of autologous bone marrow-derived cells ameliorates monocrotaline-induced pulmonary vessel remodeling and lung inflammation in rats[J]. Lung, 2018, 196 (2):147-155. DOI: 10.1007/s00408-017-0075-5.
[18] CARMAN B L, PREDESCU D N, MACHADO R, et al. Plexiform arteriopathy in rodent models of pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Pathol, 2019, 189(6): 1133-1144. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.02.005.
[19] DIGNAM J P, SCOTT T E, KEMP-HARPER B K, et al. Animal models of pulmonary hypertension: getting to the heart of the problem[J]. Br J Pharmacol, 2022, 179(5): 811-837. DOI: 10.1111/bph.15444.
[20] BOUCHERAT O, AGRAWAL V, LAWRIE A, et al. The latest in animal models of pulmonary hypertension and right ventricular failure[J]. Circ Res, 2022, 130(9): 1466-1486. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319971.
[21] RYAN J, BLOCH K, ARCHER S L. Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH[J]. Int J Clin Pract Suppl, 2011(172):15-34. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2011.02710.x.
[22] REHMAN J, ARCHER S L. A proposed mitochondrial-metabolic mechanism for initiation and maintenance of pulmonary arterial hypertension in fawn-hooded rats: the Warburg model of pulmonary arterial hypertension[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 661: 171-185. DOI:10.1007/978-1-60761-500-2_11.
[23] ARCHER S L, MARSBOOM G, KIM G H, et al. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target[J]. Circulation, 2010, 121(24): 2661-2671. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916098.
[24] PIAO L, SIDHU V K, FANG Y H, et al. FOXO1-mediated upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4) decreases glucose oxidation and impairs right ventricular function in pulmonary hypertension: therapeutic benefits of dichloroacetate[J]. J Mol Med, 2013, 91(3): 333-346. DOI: 10.1007/s00109-012-0982-0.
[25] BOUCHERAT O, PETERLINI T, BOURGEOIS A, et al. Mitochondrial HSP90 accumulation promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198(1): 90-103. DOI: 10.1164/rccm.201708-1751OC.
[26] ZHANG M J, FENG Z Y, HUANG R, et al. Characteristics of pulmonary vascular remodeling in a novel model of shunt-associated pulmonary arterial hypertension[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:1624-1632. DOI: 10.12659/msm.905654.
[27] WANG L P, GUO L L, ZHU L M, et al. Characteristics of pulmonary vascular remodeling in a porcine model of shunt-associated pulmonary arterial hypertension[J]. Pediatr Cardiol, 2020, 41(4):669-676. DOI: 10.1007/s00246-019-02275-0.
[28] JIANG Y Y, HE G W. Early diagnostic features of left-to-right shunt-induced pulmonary arterial hypertension in piglets[J]. Ann Thorac Surg, 2018, 106(5): 1396-1405. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2018.05.052.
[29] MENG L K, TENG X, LIU Y, et al. Vital roles of gremlin-1 in pulmonary arterial hypertension induced by systemic-to-pulmonary shunts[J]. J Am Heart Assoc, 2020, 9(15): e016586. DOI: 10.1161/jaha.120.016586.
[30] MENG L K, YUAN W, CHI H J, et al. Genetic deletion of CMG2 exacerbates systemic-to-pulmonary shunt-induced pulmonary arterial hypertension[J]. FASEB J, 2021, 35(4): e21421. DOI: 10.1096/fj.202000299R.

[31] WANG K, CHEN C S, MA J F, et al. Contribution of calcium-activated chloride channel to elevated pulmonary artery pressure in pulmonary arterial hypertension induced by high pulmonary blood flow[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1): 146-154.

[32] GARCIA R, DIEBOLD S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat[J]. Cardiovasc Res, 1990, 24(5):430-432. DOI: 10.1093/cvr/24.5.430.

[33] SHANG L F, WANG K, LIU D L, et al. TMEM16A regulates the cell cycle of pulmonary artery smooth muscle cells in high-flow-induced pulmonary arterial hypertension rat model[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(5): 3275-3281. DOI: 10.3892/etm.2020.8589.

[34] LIU D L, WANG K, SU D Y, et al. TMEM16A regulates pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation via p38MAPK/ERK pathway in high pulmonary blood flow-induced pulmonary arterial hypertension[J]. J Vasc Res, 2020, 58(1):27-37. DOI: 10.1159/000511267.

[35] LIU X Y, MENG L K, YUAN W, et al. Evidence for ANTXR2 as a therapeutic target on systemic-to-pulmonary shunt induced pulmonary arterial hypertension[J]. Eur Heart J, 2019, 40 (Suppl_1):ehz746.0733. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz746.0733.

[36] GUAN H, YANG X F, SHI T, et al. CTRP9 mitigates the progression of arteriovenous shunt-induced pulmonary artery hypertension in rats[J]. Cardiovasc Ther, 2021, 2021: 4971300. DOI: 10.1155/2021/4971300.

[37] SHIMAUCHI T, BOUCHERAT O, YOKOKAWA T, et al. PARP1-PKM2 axis mediates right ventricular failure associated with pulmonary arterial hypertension[J]. JACC Basic Transl Sci, 2022, 7(4):384-403. DOI: 10.1016/j.jacbts.2022.01.005.

[38] AKAZAWA Y, OKUMURA K, ISHII R, et al. Pulmonary artery banding is a relevant model to study the right ventricular remodeling and dysfunction that occurs in pulmonary arterial hypertension[J]. J Appl Physiol (1985), 2020, 129(2): 238-246. DOI: 10.1152/japplphysiol.00148.2020.

[39] MENG L K, LIU X Y, ZHENG Z, et al. Original rat model of high kinetic unilateral pulmonary hypertension surgically induced by combined surgery[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 146 (5):1220-1226.e1. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.01.018.

[40] LACHANT D J, MEOLI D F, HAIGHT D, et al. Low dose monocrotaline causes a selective pulmonary vascular lesion in male and female pneumonectomized rats[J]. Exp Lung Res, 2018, 44(1):51-61. DOI: 10.1080/01902148.2017.1422157.

[41] KATZ M G, FARGNOLI A S, GUBARA S M, et al. The left pneumonectomy combined with monocrotaline or sugen as a model of pulmonary hypertension in rats[J]. J Vis Exp, 2019 (145):10.3791/59050. DOI: 10.3791/59050.

[42] BISSERIER M, BOUCHERAT O, BONNET S, et al. Intra-airway gene delivery for pulmonary hypertension in rodent models [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2573:263-278. DOI: 10.1007/978-1-0716-2707-5_20.

[43] YAN J, SHEN Y, WANG Y, et al. Increased expression of hypoxia-inducible factor-1α in proliferating neointimal lesions in a rat model of pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Med Sci, 2013, 345(2):121-128. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31824cf5a2.

[44] DUAN Y, WANG T, WU S S, et al. The role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway in the pulmonary vascular remodeling of pulmonary arterial hypertension in rats[J]. ScienceAsia, 2023, 49(1): 56. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2023.130.

[45] MEDARAMETLA V, FESTIN S, SUGARRAGCHAA C, et al. PK10453, a nonselective platelet-derived growth factor receptor inhibitor, prevents the progression of pulmonary arterial hypertension[J]. Pulm Circ, 2014, 4(1): 82-102. DOI: 10.1086/674881.

[46] SITAPARA R, SLEE D, SALTER-CID L, et al. Abstract 12947: *In vivo* efficacy of a novel, inhaled Pdgfra/b inhibitor, Gb002, in the rat monocrotaline and pneumonectomy model of pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2019, 140 (Suppl_1): A12947. DOI:10.1161/circ.140.suppl_1.12947.

[47] BISSERIER M, KATZ M G, BUENO-BETI C, et al. Combination therapy with STAT3 inhibitor enhances SERCA2a-induced BMPR2 expression and inhibits pulmonary arterial hypertension[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17):9105. DOI: 10.3390/ijms22179105.

[48] VAN DER FEEN D E, WEIJ M, SMIT-VAN OOSTEN A, et al. Shunt surgery, right heart catheterization, and vascular morphometry in a rat model for flow-induced pulmonary arterial hypertension[J]. J Vis Exp, 2017(120): 55065. DOI: 10.3791/55065.

[49] VAN DER FEEN D E, KURAKULA K, TREMBLAY E, et al. Multicenter preclinical validation of BET inhibition for the treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(7):910-920. DOI: 10.1164/rccm.201812-2275OC.

[50] VAN DER FEEN D E, BOSSERS G P L, HAGDORN Q A J, et al. Cellular senescence impairs the reversibility of pulmonary arterial hypertension[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(554): eaaw4974. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaw4974.

[51] ALAMRI A K, SHELBURNE N J, MAYEUX J D, et al. Pulmonary hypertension association's 2022 international conference scientific Sessions overview[J]. Pulm Circ, 2023, 13(1): e12182. DOI: 10.1002/pul2.12182.

[52] ZHOU J J, LI H, QIAN Y L, et al. Nestin represents a potential marker of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2020, 149: 41-53. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2020.09.005.

[53] ZHOU J J, LI H, LI L, et al. CYLD mediates human pulmonary artery smooth muscle cell dysfunction in congenital heart disease-associated pulmonary arterial hypertension[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(9):6297-6311. DOI: 10.1002/jcp.30298.

[54] ZHOU J J, YANG J, LI L, et al. Transgelin exacerbates pulmonary artery smooth muscle cell dysfunction in shunt-related pulmonary arterial hypertension[J]. ESC Heart Fail, 2022, 9(5):3407-3417. DOI: 10.1002/ehf2.14080.

[55] ZHOU J J. Synemin promotes pulmonary artery smooth muscle cell phenotypic switch in shunt-induced pulmonary arterial hypertension[J]. ESC Heart Fail, 2022, 9(5): 3221-3231. DOI: 10.1002/ehf2.14048.

[56] ZHOU J J, LI F R, YANG Y C. Protective effects of calcyclin-binding protein against pulmonary vascular remodeling in flow-associated pulmonary arterial hypertension[J]. Respir Res, 2022, 23(1):223. DOI: 10.1186/s12931-022-02137-z.

[57] TARASEVICIENE-STEWART L, KASAHARA Y, ALGER L, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic

hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension[J/OL]. FASEB J, 2001, 15(2): 427-438. DOI:10.1096/fj.00-0343com.

[58] HURST L A, DUNMORE B J, LONG L, et al. TNFα drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling[J]. Nat Commun, 2017, 8:14079. DOI: 10.1038/ncomms14079.

[59] WU Z H, ZHU L, NIE X R, et al. USP15 promotes pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension in a YAP1/TAZ-dependent manner[J]. Exp Mol Med, 2023, 55(1):183-195. DOI: 10.1038/s12276-022-00920-y.

[60] SHEN H, ZHANG J, WANG C, et al. MDM2-mediated ubiquitination of angiotensin-converting enzyme 2 contributes to the development of pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2020, 142(12): 1190-1204. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048191.

[61] CLEMENTS R T, VANG A, FERNANDEZ-NICOLAS A, et al. Treatment of pulmonary hypertension with angiotensin II receptor blocker and neprilysin inhibitor sacubitril/valsartan [J]. Circ Heart Fail, 2019, 12(11): e005819. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.005819.

[62] BAO C L, HE Q, WANG H, et al. Artemisinin and its derivate alleviate pulmonary hypertension and vasoconstriction in rodent models[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022:2782429. DOI: 10.1155/2022/2782429.

[63] JIA D L, BAI P Y, WAN N F, et al. Niacin attenuates pulmonary hypertension through H-PGDS in macrophages[J]. Circ Res, 2020, 127(10):1323-1336. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316784.

[64] WANG L N, ZHANG X Y, CAO Y P, et al. Mice with a specific deficiency of Pfkfb3 in myeloid cells are protected from hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(5):1055-1072. DOI: 10.1111/bph.15339.

[65] MACIAS D, MOORE S, CROSBY A, et al. Targeting HIF2α -ARNT hetero-dimerisation as a novel therapeutic strategy for pulmonary arterial hypertension[J]. Eur Respir J, 2021, 57 (3):1902061. DOI: 10.1183/13993003.02061-2019.

[66] DANEVA Z, CHEN Y L, TA H Q, et al. Endothelial IK and SK channel activation decreases pulmonary arterial pressure and vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. Pulm Circ, 2023, 13(1):e12186. DOI: 10.1002/pul2.12186.

[67] SUEN C M, CHAUDHARY K R, DENG Y P, et al. Fischer rats exhibit maladaptive structural and molecular right ventricular remodelling in severe pulmonary hypertension: a genetically prone model for right heart failure[J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(4):788-799. DOI: 10.1093/cvr/cvy258.

[68] MORIMATSU Y, SAKASHITA N, KOMOHARA Y, et al. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension[J]. J Vasc Res, 2012, 49(1):33-42. DOI: 10.1159/000329594.

[69] INTERNATIONAL PPH CONSORTIUM, LANE K B, MACHADO R D, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension[J]. Nat Genet, 2000, 26(1):81-84. DOI: 10.1038/79226.

[70] DANNEWITZ PROSSEDA S, ALI M K, SPIEKERKOETTER E. Novel advances in modifying BMPR2 signaling in PAH[J]. Genes, 2020, 12(1):8. DOI: 10.3390/genes12010008.

[71] MACHADO R D, PAUCIULO M W, THOMSON J R, et al. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension[J]. Am J Hum Genet, 2001, 68(1):92-102. DOI: 10.1086/316947.

[72] BEPPU H, ICHINOSE F, KAWAI N, et al. BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(6): L1241-L1247. DOI: 10.1152/ajplung.00239.2004.

[73] LONG L, ORMISTON M L, YANG X D, et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Med, 2015, 21(7): 777-785. DOI: 10.1038/nm.3877.

[74] HAUTEFORT A, MENDES-FERREIRA P, SABOURIN J, et al. Bmpr2 mutant rats develop pulmonary and cardiac characteristics of pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2019, 139(7): 932-948. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033744.

[75] TIAN W, JIANG X G, SUNG Y K, et al. Phenotypically silent bone morphogenetic protein receptor 2 mutations predispose rats to inflammation-induced pulmonary arterial hypertension by enhancing the risk for neointimal transformation[J]. Circulation, 2019, 140(17): 1409-1425. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040629.

[76] WEST J D, CHEN X P, PING L, et al. Adverse effects of BMPR2 suppression in macrophages in animal models of pulmonary hypertension[J]. Pulm Circ, 2019, 10(1): 2045894019856483. DOI: 10.1177/2045894019856483.

[77] THEILMANN A L, HAWKE L G, HILTON L R, et al. Endothelial BMPR2 loss drives a proliferative response to BMP (bone morphogenetic protein) 9 via prolonged canonical signaling [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(11): 2605-2618. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.313357.

[78] MORENO J, ESCOBEDO D, CALHOUN C, et al. Arterial wall stiffening in caveolin-1 deficiency-induced pulmonary artery hypertension in mice[J]. Exp Mech, 2021, 61(1): 217-228. DOI: 10.1007/s11340-020-00666-6.

[79] LAMBERT M, CAPUANO V, BOET A, et al. Characterization of Kcnk3-mutated rat, a novel model of pulmonary hypertension [J]. Circ Res, 2019, 125(7): 678-695. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314793.

[80] WEST J D, AUSTIN E D, RIZZI E M, et al. KCNK3 mutation causes altered immune function in pulmonary arterial hypertension patients and mouse models[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9):5014. DOI: 10.3390/ijms22095014.

[81] TU L, DESROCHES-CASTAN A, MALLET C, et al. Selective BMP-9 inhibition partially protects against experimental pulmonary hypertension[J]. Circ Res, 2019, 124(6): 846-855. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313356.

[82] BOUVARD C, TU L, ROSSI M, et al. Different cardiovascular and pulmonary phenotypes for single- and double-knock-out mice deficient in BMP9 and BMP10[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(7):1805-1820. DOI: 10.1093/cvr/cvab187.

[83] ZHANG Y N, ZERVOPOULOS S D, BOUKOURIS A E, et al. SNPs for genes encoding the mitochondrial proteins Sirtuin3 and uncoupling protein 2 are associated with disease severity, type 2 diabetes, and outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension and this is recapitulated in a new mouse model lacking both genes[J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(23):e020451. DOI: 10.1161/JAHA.120.020451.

[84] DEMPSIE Y, NILSEN M, WHITE K, et al. Development of

pulmonary arterial hypertension in mice over-expressing S100A4/Mts1 is specific to females[J]. Respir Res, 2011, 12(1): 159. DOI: 10.1186/1465-9921-12-159.

[85] WEST J, RATHINASABAPATHY A, CHEN X P, et al. Overexpression of Msx1 in mouse lung leads to loss of pulmonary vessels following vascular hypoxic injury[J]. Cells, 2021, 10(9):2306. DOI: 10.3390/cells10092306.

[86] XUE C, SOWDEN M, BERK B C. Extracellular cyclophilin A, especially acetylated, causes pulmonary hypertension by stimulating endothelial apoptosis, redox stress, and inflammation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(6): 1138-1146. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309212.

[87] XUE C, SENCHANTHISAI S, SOWDEN M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition and inflammation play key roles in cyclophilin A-induced pulmonary arterial hypertension[J]. Hypertension, 2020, 76(4): 1113-1123. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14013.

[88] GALIÈ N, HUMBERT M, VACHIERY J L, et al. 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): endorsed by: association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [J]. Eur Heart J, 2016, 37(1):67-119. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv317.

[89] KIM K H, KIM H K, CHAN S Y, et al. Hemodynamic and histopathologic benefits of early treatment with macitentan in a rat model of pulmonary arterial hypertension[J]. Korean Circ J, 2018, 48(9):839-853. DOI: 10.4070/kcj.2017.0394.

[90] LEE H, YEOM A, KIM K C, et al. Effect of ambrisentan therapy on the expression of endothelin receptor, endothelial nitric oxide synthase and NADPH oxidase 4 in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model[J]. Korean Circ J, 2019, 49(9):866-876. DOI: 10.4070/kcj.2019.0006.

[91] NOVELLI D, FUMAGALLI F, STASZEWSKY L, et al. Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: time-course of injury and comparative evaluation of macitentan and Y-27632, a Rho kinase inhibitor[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 865: 172777. DOI: 10.1016/j. ejphar. 2019. 172777.

[92] CHAUMAIS M C, DJESSAS M R A, THUILLET R, et al. Additive protective effects of sacubitril/valsartan and bosentan on vascular remodelling in experimental pulmonary hypertension[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(5): 1391-1401. DOI: 10.1093/cvr/cvaa200.

[93] ZHANG Z Y, LIU C L, BAI Y Y, et al. Pipersentan: a *de novo* synthetic endothelin receptor antagonist that inhibits monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 920222. DOI: 10.3389/fphar. 2022.920222.

[94] VELASOVA E, LELKOVA K, VETESKOVA J, et al. Riociguat normalizes altered lung expression of serotonin-related genes and renal damage markers in experimental pulmonary hypertension[J]. Eur Heart J, 2022, 43(Suppl2): ehac544.1922. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac544.1922.

[95] XU X, LI H L, WEI Q X, et al. Novel targets in a high-altitude pulmonary hypertension rat model based on RNA-seq and proteomics[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 742436. DOI: 10.3389/fmed.2021.742436.

[96] SILVA M M C D, ALENCAR A K N, SILVA J S D, et al. Therapeutic benefit of the association of lodenafil with mesenchymal stem cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats[J]. Cells, 2020, 9(9): 2120. DOI: 10.3390/cells9092120.

[97] CHAUDHARY K R, DENG Y P, SUEN C M, et al. Efficacy of treprostinil in the SU5416-hypoxia model of severe pulmonary arterial hypertension: haemodynamic benefits are not associated with improvements in arterial remodelling[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(20): 3976-3989. DOI: 10.1111/bph.14472.

[98] VANDERPOOL R R, GORELOVA A, MA Y R, et al. Reversal of right ventricular hypertrophy and dysfunction by prostacyclin in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10):5426. DOI: 10.3390/ijms23105426.

[99] MORRISON K, HAAG F, ERNST R, et al. Selective prostacyclin receptor agonist selexipag, in contrast to prostacyclin analogs, does not evoke paradoxical vasoconstriction of the rat femoral artery[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2018, 365(3): 727-733. DOI: 10.1124/jpet.117.246058.

[100] HONDA Y, KOSUGI K, FUCHIKAMI C, et al. The selective PGI2 receptor agonist selexipag ameliorates Sugen 5416/hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. PLoS One, 2020, 15(10):e0240692. DOI: 10.1371/journal.pone.0240692.

[101] CORBOZ M R, PLAUNT A J, MALININ V S, et al. Assessment of inhaled treprostinil palmitil, inhaled and intravenous treprostinil, and oral selexipag in a sugen/hypoxia rat model of pulmonary arterial hypertension[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2022, 383(1):103-116. DOI: 10.1124/jpet.122.001174.

[102] RAI N, SHIHAN M, SEEGER W, et al. Genetic delivery and gene therapy in pulmonary hypertension[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(3):1179. DOI: 10.3390/ijms22031179.

[103] BISSERIER M, PRADHAN N, HADRI L. Current and emerging therapeutic approaches to pulmonary hypertension[J]. Rev Cardiovasc Med, 2020, 21(2): 163-179. DOI: 10.31083/j.rcm.2020.02.597.

（收稿日期：2023-04-07 修回日期：2023-05-28）

（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，吴昊晟）

[引用本文]

俞佳慧, 巩倩, 庄乐南. 肺动脉高压动物模型及其在药物研究中的应用进展[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 381-397. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.048.

YU J H, GONG Q, ZHUANG L N. Animal models of pulmonary arterial hypertension and their application in drug research[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 381-397. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817.2023.048.

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.021

痤疮动物模型建立及评价研究进展

张 睿[1]，吕美豫[1]，张建军[1]，刘金莲[1]，陈 彦[2]，黄志强[2]，刘 尧[2]，周澜华[3]
(1. 北京中医药大学中医学院，北京 102488；2. 北京中医药大学中药学院，北京 102488；3. 北京京城皮肤医院皮肤科，北京 100192)

[摘要] 近年来学者们根据对痤疮发生机制的认识建立了痤疮炎症动物模型、移植人皮痤疮动物模型和天然痤疮动物模型，其中炎症模型主要由细菌感染、化学药物涂抹和异物注射诱导，天然痤疮动物模型包括某些对激素敏感的动物和某些具有类似痤疮临床表现的动物。选择合适的模型动物和造模方法，对不同程度、不同机制的痤疮干预产品研发很有必要。目前我国的祛痤疮保健功能只有人体评价标准，无动物评价标准，一定程度上影响了痤疮发病机制的深入研究以及祛痤疮产品的研发进度。本文对痤疮产生的条件、人类皮肤特点、痤疮丙酸杆菌对人体皮肤的双向作用、痤疮动物模型、常用的观察与评价指标进行归纳总结，为痤疮发病机制研究、祛痤疮保健和治疗产品研发提供参考。

[关键词] 痤疮；动物模型；研究进展
[中图分类号] R-332；Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)04-0398-08

Research Progress on Establishing and Evaluation of Acne Animal Models

ZHANG Rui[1], LÜ Meiyu[1], ZHANG Jianjun[1], LIU Jinlian[1], CHEN Yan[2], HUANG Zhiqiang[2], LIU Yao[2], ZHOU Lanhua[3]
(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 3. Department of dermatology, Beijing Jingcheng Skin Hospital, Beijing 100192, China)
Correspondence to: ZHANG Jianjun (ORCID: 0000-0003-3855-3359), E-mail: zhangjianjun@bucm.edu.cn;
ZHOU Lanhua (ORCID: 0000-0002-5660-8301), E-mail: 319950076@qq.com

[ABSTRACT] According to understanding of the pathogenesis of acne, scholars have established animal models of acne inflammation, animal models of grafting human skin acne, and natural acne animal models. The acne inflammation model is mainly induced by bacterial infection, chemical drug application, and foreign matter injection. Natural acne animal models include animals that some are sensitivity to hormones and some have clinical symptoms of acne. It is necessary to select appropriate model animals and replicate model methods for the development of acne intervention products with different degrees and mechanisms. At present, there are only human evaluation standards of acne health functions in China, but no animal evaluation standards, which has affected the in-depth study of the pathogenesis of acne as well as the research and development progress of acne products. This article summarizes the conditions for the occurrence of acne, the characteristics of human skin, the bidirectional effect of *Cutibacterium acnes* on human skin, acne animal models, and commonly used observation and evaluation indicators, providing the reference for studying the pathogenesis of acne, promoting acne treatment and health care, and developing treatment products.

[基金项目] 国家重点研发计划项目“基于辨证保健的中药复方保健产品评价技术体系研究及示范研发平台的建立”(2018YFC1706800)
[第一作者] 张 睿(1988—)，男，博士研究生，研究方向：中医优势病种防治及用药规律研究。E-mail：zhangrui@bucm.edu.cn。ORCID：0000-0002-6500-6556
[通信作者] 张建军(1965—)，女，博士，教授，研究方向：中医优势病种防治及用药规律研究。E-mail：zhangjianjun@bucm.edu.cn。ORCID：0000-0003-3855-3359；
周澜华(1975—)，女，硕士，副主任医师，研究方向：损容性皮肤病。E-mail：319950076@qq.com。ORCID：0000-0002-5660-8301

[Key words] Acne; Animal models; Research progress

痤疮是一种多发于毛囊皮脂腺密度高部位的慢性炎性皮肤疾病[1]。近年来，全球痤疮患者人数超过6.4亿[2]。截至2023年3月，我国仅有71种保健食品和36种中成药与痤疮治疗相关。痤疮病因复杂，发生机制尚未完全阐明，尽管可以有许多种治疗方式，但迄今为止尚未找到公认的理想方案。学者们根据痤疮的不同发生机制建立了细菌感染、化学药物涂抹和异物注射诱导的痤疮炎症动物模型，移植人皮痤疮动物模型，以及激素敏感和具有类似痤疮临床表现的天然痤疮动物模型。选择合适的模型动物和造模方法，对研发不同程度、不同机制的痤疮干预产品很有必要。痤疮治疗契合大健康时代的发展需求，在养生保健、提高生活质量方面具有重要意义[3]。目前我国针对祛痤疮保健功能只有人体评价标准，无动物评价标准，影响了该类产品作用机制的深入研究以及产品研发。

本文对痤疮产生条件、人类皮肤特点、痤疮丙酸杆菌对人体皮肤的双向作用、痤疮动物模型、常用的观察与评价指标进行归纳总结，为研究痤疮发病机制、祛痤疮保健和治疗产品研发提供参考。

1 痤疮发生机制

1.1 痤疮产生的条件

痤疮作为一种人体常见皮肤病，几乎是人类特有的疾病，仅侵犯少量动物（如猫、犬等）[4]。动物痤疮的发病机制与人类大不相同，其中痤疮丙酸杆菌（*Cutibacterium acnes*，以前被称为*Propionibacterium acnes*[5]）仅存在于人体皮肤表面[6]。痤疮的产生与汗腺和毛孔相关。哺乳动物为维持恒定体温需要进行热量传导，依靠不明显的蒸发或者明显流汗，带走热量，用以维持生产活动中体温的恒定[7]。大多数哺乳动物在进化过程中由于基因的选择性表达，汗腺相关的基因作用减弱，使得毛发旺盛，汗腺较少，且大多是小汗腺[8]。为防止皮肤皲裂，汗腺分泌油脂以减少皮肤表面水分蒸发，这种油脂由顶泌汗腺分泌的不饱和脂肪酸组成，经毛孔渗出到皮肤表面。汗腺和毛孔的产生分别为痤疮丙酸杆菌的生长提供了所需营养和环境。

1.2 人类皮肤的特点

人体皮肤包括表皮、真皮和皮下组织，其中表皮由20种细胞类型组成[9]；表皮最外层的角质层中40%~50%的皮脂是由神经酰胺构成，可以防止异物侵入，还可保持皮肤水分[10]。如果缺少神经酰胺，人体皮肤抵抗外部刺激的能力就会减弱。位于真皮层的汗腺分为外泌汗腺和顶泌汗腺，其中外泌汗腺直接开口于皮肤表面的汗孔[11]。皮肤有分泌和排泄功能，机体产生的很多代谢物如无机盐和尿素，会通过皮肤排泄。人类之所以被痤疮丙酸杆菌选为宿主，主要是由于人体皮肤拥有较多的汗腺和较小的毛孔。大量的汗腺为细菌繁衍供给足够的营养，而较小的毛孔使之不易随汗液脱离宿主，且毛孔较小导致氧气供应不充沛，有利于这种厌氧型细菌的生长。

1.3 痤疮丙酸杆菌对人体皮肤的双向作用

痤疮丙酸杆菌作为体表皮肤常见菌和优势菌，与人类是共生关系，属于条件致病菌，对人体皮肤具有双向作用。一方面，痤疮丙酸杆菌通过分泌释放水解酶和多种致炎物质，诱导表皮组织产生炎性反应，间接加强体表肌肤的防御能力，发挥皮肤屏障功能；还可以代谢产生短链脂肪酸，限制其他病原体生长，积极调节炎性反应发展，对皮肤提供有益影响[6]。另一方面，痤疮丙酸杆菌在油脂供应充足且处于厌氧环境时过度繁殖，产生低分子多肽，作为趋化因子使白细胞集中于毛囊皮脂腺单位，并产生大量水解酶，进而造成毛囊壁渗漏、破裂，引起皮肤产生剧烈的炎性反应[12]。

2 痤疮动物模型建立

由于其他哺乳动物的毛囊和皮脂腺的特点、组成以及寄生优势菌群等与人类不同，很难用动物模型完全模拟痤疮的发病过程。虽然目前现有的痤疮模型具有较大局限性，但是仍可以根据研究中实验要求选择较为合适的动物模型，并将其应用于痤疮的发病机制、临床药物疗效和产品研发。各种痤疮造模方法的优缺点以及动物种类应用范围和优缺点，汇总见表1和表2。应根据实验目的，选择合适的实验动物来尽量模拟人类痤疮的临床特点，以进行科学研究。

2.1 家兔模型

家兔在实验诱导下会患痤疮。常用的造模方式有两种。一种是单独应用化学物质诱导，即Kligman法，

表1 建立痤疮动物模型的常见方法及其使用药物、动物和优缺点

Table 1 Common methods of establishing animal models of acne and their advantages and disadvantages

造模方法 Establishment method	造模药物或材料 Establishment drugs or materials	适用动物 Target animals	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
细菌感染致炎 Bacterial inflammation	痤疮丙酸杆菌菌液、金黄色葡萄球菌菌液	家兔、大鼠、小鼠	最接近痤疮发病过程	痤疮丙酸杆菌无法大量繁殖；金黄色葡萄球菌产生的致炎物质与人类痤疮发病过程中的致炎物质不一致
化学诱导致炎 Induced by chemical drugs	巴豆油、二甲苯、角叉菜胶、二硝基氯苯、油酸、睾酮	家兔、大鼠、小鼠	操作简单；致炎明显	与痤疮发病致炎机制不同；更接近于皮炎
异物注射或移植 Foreign matter injecting or grafting	人角质细胞、人皮脂腺细胞、人类皮肤组织	豚鼠、裸鼠	致炎物质与人类角质细胞微环境相同；造模周期短	存在免疫排斥反应；移植操作复杂
天然模型 Natural acne models	—	金黄仓鼠、犀牛小鼠、京都犀牛大鼠、墨西哥无毛犬、小型猪	无需造模；可用于痤疮药物筛选	部分模拟痤疮发病状态；不太适用于痤疮治疗和发病机制研究

表2 痤疮模型的动物种类、应用范围和优缺点

Table 2 Animal species, application range, advantages and disadvantages of acne models

模型动物 Model animals	应用范围 Application range	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
家兔 Rabbits	对粉刺、角质化异常的疗效评价；痤疮治疗、改善角质化的机制研究	研究最成熟的痤疮模型；兔的毛囊与人类相似；实验操作简单、易成模	兔耳皮肤的优势菌群与人类不同；无法做大量抗痤疮药物的筛选
大鼠 Rats	对炎症、角质化异常的疗效评价；抗炎、改善角质化的机制研究	研究较成熟的痤疮模型；炎性反应明显	无法形成黑头粉刺
小鼠 Mice	对炎症、角质化异常的疗效评价；抗炎、改善角质化的机制研究	体积小，成本低；炎性反应明显	耳廓注射操作不易；无法形成黑头粉刺；毛囊细胞类型与人类不同
豚鼠 Guinea pigs	对炎症、角质化异常的疗效评价；抗炎、改善角质化的机制研究	致炎物质与人类角质细胞的微环境相同	致炎机制与人类痤疮炎性反应不同
裸鼠 Nude mice/rats	抗皮脂腺增生的疗效评价；皮脂代谢的机制研究	皮脂腺分布均匀	成本高；毛囊退化，缺少菌群生长环境；移植后死亡率高
金黄仓鼠 Golden hamsters	抗雄激素、抗皮脂腺增生的疗效评价；激素代谢和皮脂腺代谢的机制研究	可用于建立天然模型，对激素敏感	不易感染，无法做感染和炎性反应研究
犀牛小鼠 Rhino mice	对粉刺的疗效评价	可用于建立天然模型，能够自发产生类似人类粉刺的痤疮	与人类角质不同，无法继发炎性反应；国内研究较少
墨西哥无毛犬 Mexican hairless dogs	对粉刺的疗效评价	可用于建立天然模型，能够自发产生类似人类粉刺的痤疮；可以在身上不同部位筛选外用药	成本高；研究较少
小型猪 Miniature pigs	皮脂腺代谢的机制研究	可用于建立天然模型，与人类皮脂腺的氨基酮戊酸代谢一致	成本高；研究较少

是公认的最为经典、常用的痤疮粉刺造模方法，1989年被美国皮肤病学会制定为痤疮造模的规范方法，具有可靠性高、重复性好的优势。该方法主要是通过在兔右耳内侧耳道开口处2 cm×2 cm范围，连续14 d每天1次均匀涂布2%煤焦油或50%油酸0.2～0.5 mL，从而建立痤疮动物模型。另一种是向兔耳内侧注射痤疮丙酸杆菌菌液或表皮葡萄球菌菌液复合涂抹油脂类物质，模拟人类痤疮毛孔堵塞，通过每天或隔日向右耳皮内注射对数生长期的痤疮丙酸杆菌菌液30～100 μL，菌液浓度经0.5号麦氏比浊仪核定为1×10^8 CFU/mL（CFU即菌落形成单位，colony-forming unit）或在635 nm波长下吸光度为0.08～0.13，注射后均匀涂布2%煤焦油

或50%油酸0.2～0.5 mL，左耳不做任何处理作为对照，连续14～28 d可制备兔耳痤疮模型。这种模式允许家兔体内的雄性激素在一定程度上刺激皮脂腺，并且在兔耳上涂抹油酸以堵塞毛囊口，为细菌繁殖提供良好的厌氧环境，促进兔耳痤疮模型形成角化。同时，将痤疮的病原菌——痤疮丙酸杆菌注射到兔耳皮肤中使其感染，最终导致痤疮的形成[13]。如吴亚梅等[14]选用雄性日本大耳白兔，在兔右耳道口外每日涂厚度约为0.5 mm的煤焦油一次，连续3周建立痤疮模型。OU-YANG等[15]应用雄性新西兰白兔，隔日注射100 μL/耳的痤疮丙酸杆菌菌液，并且每天涂抹0.5 mL的煤焦油，连续14 d成功建立兔耳痤疮模型。

2.2 大鼠模型

大鼠痤疮模型是国内研究痤疮治疗药物抗炎抑菌机制的常用动物模型。常用造模方式有两种，一种为单独涂抹油酸或煤焦油，连续7～21 d；另一种为注射痤疮丙酸杆菌菌液复合涂抹油脂类物质，通过向大鼠单侧耳廓注射对数生长期的痤疮丙酸杆菌菌液30～50 μL，菌液浓度经0.5号麦氏比浊仪核定为1×10^8 CFU/mL或在635 nm波长下吸光度为0.08～0.13，并涂布煤焦油或油酸0.2～0.5 mL，连续7～21 d，诱导其形成具有肉芽肿性炎症的痤疮模型。该模型主要用于研究痤疮炎症损伤的发病机制，并评估抗痤疮药物的抗菌效果。建模后主要观察大鼠注射部位的解剖结构，以及巨噬细胞、淋巴细胞的浸润情况。毛囊的皮脂腺位于炎症上方，皮脂腺消失成为浸润中心，该模型与痤疮丙酸杆菌的特异性和注射部位发生痤疮样病变的结构有关[13]。在向耳廓皮肤注射痤疮丙酸杆菌时，可以选择厚度1 cm的聚苯乙烯泡沫塑料辅助注射，即将大鼠侧脸贴在聚苯乙烯泡沫塑料侧边，头倾斜后耳朵会处于聚苯乙烯泡沫塑料平面上，沿耳廓表面0～10°进针以实现耳廓注射。如于坤良等[16]应用雌性Wistar大鼠，双耳内侧每天每次涂抹0.5 mL油酸，连续3周可建立痤疮大鼠模型。王亚红等[17]用雌雄各半的Wistar大鼠，隔日向右耳廓注射丙酸杆菌液50 μL并每日涂抹100%油酸0.5～1 mL，连续3周建立痤疮大鼠模型。CAO等[18]应用雄性SD大鼠，每日左耳注射痤疮丙酸杆菌液并涂抹人工混合皮脂，连续28 d建立痤疮大鼠模型。

2.3 小鼠模型

与家兔和大鼠相比，小鼠具有容易获取、体型小、饲养成本低等优势，然而，小鼠耳朵毛囊所含的细胞类型与人类毛囊情况并不相同，特别是小鼠痤疮模型难以模拟人类痤疮的黑头粉刺症状[19]。常用造模方式有两种。一种是注射痤疮丙酸杆菌菌液到耳部或背部或腹部，通过每日或隔日向小鼠耳廓皮内或颈背部皮肤注射痤疮丙酸杆菌菌悬液0.05～0.1 mL，菌液浓度经0.5号麦氏比浊仪核定为1×10^8 CFU/mL或在635 nm波长下吸光度为0.08～0.13，连续1～10 d，模拟痤疮外部表现及炎性反应；另一种是致炎化学物质涂抹耳部，通过每日体外涂抹巴豆油、二甲苯、角叉菜胶、二硝基氯苯，诱导小鼠炎性反应[19-21]。这类模型更多的是模拟皮炎，尽管与人类痤疮的炎症机制有所不同，但仍可部分模拟痤疮的炎性反应。如陈茜等[22]用雌性ICR小鼠，刘洪君等[23]用雄性C57BL/6小鼠，向小鼠左耳内注射痤疮丙酸杆菌菌液24 h，制备痤疮炎症模型。Nakatsuji等[24]将人类皮脂腺细胞包裹的真皮植入ICR小鼠腹部皮下7 d后，注射痤疮丙酸杆菌菌液，模拟人的痤疮微环境。黄晋权等[25]应用雌性昆明小鼠，于背部皮下隔日注射痤疮丙酸杆菌混悬液0.1 mL，连续10 d造痤疮模型。Nakayama等[26]应用雌性HR-1小鼠，背部皮下注射浓度为1×10^8 CFU/mL的痤疮丙酸杆菌菌液50 μL一次，建立痤疮模型。

2.4 豚鼠模型

注射人角质形成细胞至豚鼠腹部皮下可以模拟痤疮炎症发生，还可以用于评估临床痤疮药物的有效性。通过每天将5 mg/mL人足部角蛋白悬浮液0.1 mL注射到豚鼠的侧腹部，连续7 d，制备豚鼠痤疮模型。建模后，豚鼠的侧腹部可产生炎性丘疹，其特征是早期聚集多形核白细胞和后期出现肉芽肿，该特征可用于抗痤疮药物对炎症、角质化异常的疗效评价。如Dalziel等[27]连续7 d每天将5 mg/mL的人角质层悬浮液0.1 mL注射到豚鼠脱毛侧皮肤，建立痤疮模型。Salimi等[28]应用雌性豚鼠评价抗痤疮药物壬二酸对皮肤渗透性的影响。

2.5 裸鼠模型

裸小鼠可以接受异源皮肤移植，且移植物存活时间长，常用于研究局部抗痤疮药物的疗效。该模型在人类皮脂腺生理、病理研究中具有重要应用价值，可用于研究雄激素诱导痤疮的机制和抗痤疮药物的有效性，特别是皮脂腺相关研究[19]。犀牛小鼠是具有无毛hairless（*Hr*）基因突变的无毛小鼠，在4月龄时，由于毛发退化期的缺陷，会出现不可逆的永久性脱毛。京都犀牛大鼠由乙基亚硝基脲诱变产生，表现与犀牛

小鼠相似[29]，毛囊的皮脂腺逐渐被皮脂和角质形成细胞过度堆积所压缩，形成类似于人类黑头粉刺的生理结构，称为假粉刺。成年犀牛小鼠的毛囊漏斗扩张，角蛋白聚积，形成了类似于人体无炎症痤疮的结构。这些皮肤上的假粉刺源自原始毛囊单位，其间充满角质形成细胞沉积和皮脂。因此犀牛小鼠是一个天然的痤疮模型动物。犀牛小鼠痤疮动物模型被用于评估药物对粉刺的溶解作用[30]，但近年来对该鼠模型的研究应用较少。如Petersen等[31]移植痤疮整容手术后患者皮肤残留物到成年去势雄性CD-1裸小鼠皮肤上，并注射雄激素，建立人皮脂腺的裸小鼠痤疮模型。Otulakowski等[32]移植人胸部皮肤至裸小鼠背部和尾巴底部，观察了抗痤疮常用药维A酸（即视黄酸）对皮肤的作用。Odorisio等[33]应用雌雄各半的犀牛小鼠评价抗痤疮药物对粉刺的溶解能力。Ramezanli等[34]观察到阿达帕林凝胶可以溶解犀牛小鼠粉刺。

2.6 金黄仓鼠模型

金黄仓鼠（又称叙利亚仓鼠）有两个雄激素依赖性皮脂区，一个是腹部腺，另一个是耳朵。腹部腺是一对直径为3～5 mm的乳头状隆起物，包含皮脂腺。皮脂腺细胞和黑色素细胞对体内雄激素反应敏感，在雄激素升高时可形成深色区域，毛囊管里的角化细胞可以形成角栓。耳朵部位由于脂肪组织较少，更有利于形态学测量以及组织学和生化分析。金黄仓鼠对雄激素敏感，被认为是一种研究雄激素对皮脂腺和毛发影响的天然痤疮模型动物[35]，用于观察或寻找抗雄激素药物，同时可以用于检查雄激素异常引起皮脂腺形状和功能的变化[36]。但金黄仓鼠不易感染细菌，不能作为研究感染及炎症的模型动物。如张娟娟等[37]观察抗痤疮药物对金黄仓鼠腹部两侧皮脂腺斑面积大小的影响，以评价抗皮脂腺增生能力。任威威等[38]用0.1 mg/mL双氢睾酮溶液5 μL均匀涂布于金黄仓鼠内耳廓中2/3处，连续18 d，建立痤疮模型。

2.7 犬模型

墨西哥无毛犬的胸腺在早期退化，无毛，且身上有很多粉刺。这些粉刺的开口是开放性的，直径只有几毫米。与目前大多数使用化合物刺激的动物模型不同，这些粉刺与人类粉刺相似，是自发形成的。虽然犬的皮肤上仅有较少的皮脂腺，且皮脂腺无法分泌足够的脂肪酸，但仍可被认为是一个天然的痤疮模型，可以用于评价局部抗痤疮药物溶解粉刺的功效[30]。如Schwartzman等[39]观察了抗痤疮外用药对一只雌性墨西哥无毛犬的面部、颈部、大腿、胸部粉刺的影响。

2.8 猪模型

小型猪和人类的皮肤不仅组织结构相似，在皮脂腺的解剖学结构、上皮修复再生性、皮下脂肪层和烧伤后内分泌与代谢的改变方面也十分相似。研究发现2～3月龄小型猪的皮肤解剖特点与人类最接近，对氨基酮戊酸的代谢也与人一致，提示小型猪是一个合适的痤疮模型动物[40]。如Lu等[41]应用雌雄各半的广西巴马小型猪，观察抗痤疮外用药物对剃毛后背部皮肤8个独立区域的影响。

3 痤疮模型的观察与评价指标

3.1 表观指标

表观指标是评价痤疮最直接和最重要的指标，也是评估痤疮模型是否制备成功的关键[13]。主要包括：（1）造模部位皮肤可见丘疹或脓疱；（2）局部组织增厚和硬化；（3）毛囊口有黑色的角栓，形成黑头或粉刺；（4）毛囊口的开口扩大，毛囊的面积和皮脂腺的直径增加。

3.2 病理指标

病理指标可用来更直接、客观地评价痤疮的具体情况，是评估痤疮模型是否制备成功的标准。在成功制备痤疮模型动物上，可以在光学显微镜下观察到的主要指标包括：（1）造模部位表皮增厚，伴有角化过度；（2）棘细胞层明显增厚；（3）毛囊皮脂腺明显增大，毛囊漏斗部呈壶状且充满角质化物质。

3.3 生化指标

生化指标是评价痤疮的间接指标，可以监测机体在痤疮发生、发展、痊愈过程中的反应，但缺乏特异性。常见的生化指标包括血清和皮肤组织中的睾酮（T）和雌二醇（E_2）水平、雄雌激素含量比（A/E）[42]；炎症细胞因子白细胞介素（interleukin，IL）-1α、IL-1β、IL-2、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）等和抗炎细胞因子IL-4、IL-10、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）等的表达变化。造模后T与A/E水平可能升高，E_2水平可能下降，炎症因子表达可能增高，抗炎细胞因子表达可能下降[43]。

4 总结

现存痤疮动物模型包括细菌感染、化学诱导、异物注射、移植人体皮肤方法建立的动物模型，以及某些对激素敏感的动物和某些具有类似痤疮临床表现的天然痤疮动物模型。其中细菌感染联合化学诱导（痤

疮丙酸杆菌菌液+油酸或煤焦油）致炎是最常用的造模方式，家兔、大鼠、小鼠、金黄仓鼠是我国最常用的动物模型。

大多数动物不会产生足够的三酰甘油来滋生痤疮丙酸杆菌[44]。例如，犬的皮脂腺中检测不到三酰甘油，而小鼠、兔和金黄仓鼠的三酰甘油浓度都很低。因此，在创建含有痤疮丙酸杆菌的动物模型时需要外部注射痤疮丙酸杆菌，现有的各种痤疮研究动物模型往往都使用这种策略，其中兔耳和犀牛小鼠常用于确定痤疮病变的复合致粉刺性[24,45]。然而，兔耳模型不包括细菌定植[30]，因此不适，用于需要大量药物筛选和疫苗接种的方案。在以前的小鼠痤疮模型研究中，通常将痤疮丙酸杆菌注射到耳朵中，但由于小鼠耳朵脆弱，炎性反应引起继发性变化出现是有限的。因此，部分实验将痤疮丙酸杆菌注射到小鼠背部和颈后皮肤，在一定程度上可以更好地观察到炎症性痤疮的初始过程[19]。裸小鼠痤疮模型所用的移植皮肤源于美容医疗机构产生的人类废用皮肤，往往受到伦理限制，而且移植后裸鼠死亡率高，也是一个技术限制。犀牛小鼠与墨西哥无毛犬虽然是天然的痤疮模型，但由于该模型动物成本高，国内应用较少，仅用于研究外用药对“假粉刺”的改善角质作用，对研发痤疮新药、判定痤疮新药疗效产生一些限制。小型猪也由于高成本和仅适用于皮脂腺代谢机制研究而在应用上受到一定限制。

截至目前，痤疮的动物模型虽然很多，但尚不能够完全模仿人类痤疮的临床表现和病理变化，只能部分模拟痤疮的表现和病理变化。现存的动物模型主要存在如下问题：（1）人类痤疮的产生依赖于毛囊脂质的分泌，动物皮脂腺分泌皮脂的成分与人类不同，人类皮脂成分的变化与毛囊皮脂腺角化异常有关；（2）痤疮动物模型中粉刺发生机制与人类不同；（3）部分痤疮动物模型通过外用化学物质导致炎性反应，其炎性反应的诱发因素与人类痤疮不同。

综上，本文总结分析了现有的痤疮动物模型的研究进展、适用范围和观察及评价指标，结果提示以某一方式模拟人体痤疮的动物模型不能很好地满足所有实验要求，需根据实验目的选择合适的痤疮动物模型。

[作者贡献 Author Contribution]

张睿撰写并修改论文；
吕美豫、刘金莲、陈彦、黄志强和刘尧收集资料，参与论文写作；
张建军指导论文核定文稿，是基金获取者；
周澜华构建论文框架。

[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] MUSTAFA A I, EBRAHIM A A, ABEL HALIM W A L, et al. Serum soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): a novel potential biomarker in severe acne Vulgaris[J]. Indian J Dermatol, 2022, 67(5):512-517. DOI: 10.4103/ijd.ijd_387_21.

[2] DAGNELIE M A, POINAS A, DRÉNO B. What is new in adult acne for the last 2 years: focus on acne pathophysiology and treatments[J]. Int J Dermatol, 2022, 61(10): 1205-1212. DOI: 10.1111/ijd.16220.

[3] 张睿, 侯新娟, 张毅, 等. 祛痤疮中药保健食品和中成药组方规律及特点分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(13):3234-3239. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210120.406.
ZHANG R, HOU X J, ZHANG Y, et al. Analysis on formulation regularity and characteristics of acne-relieving Chinese medicinal health products and Chinese patent medicines[J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(13): 3234-3239. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210120.406.

[4] 付珍娜, 王婷, 白明, 等. 基于中西医临床病症特点的痤疮动物模型分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6):1288-1291. DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20180104.001.
FU Z N, WANG T, BAI M, et al. Analysis of acne animal model based on Chinese and western medicine clinical symptoms characteristic[J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(6): 1288-1291. DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20180104.001.

[5] CHILICKA K, ROGOWSKA A M, RUSZTOWICZ M, et al. The effects of green tea (*Camellia sinensis*), bamboo extract (*Bambusa vulgaris*) and lactic acid on sebum production in young women with acne vulgaris using sonophoresis treatment[J]. Healthcare (Basel), 2022, 10(4):684. DOI: 10.3390/healthcare10040684.

[6] BRÜGGEMANN H, SALAR-VIDAL L, GOLLNICK H P M, et al. A Janus-faced bacterium: host-beneficial and-detrimental roles of *Cutibacterium acnes*[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 673845. DOI: 10.3389/fmicb.2021.673845.

[7] WANG L J, YIN H, DI Y H, et al. Human local and total heat losses in different temperature[J]. Physiol Behav, 2016, 157: 270-276. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.02.018.

[8] PATTERSON ROSA L, WALKER N, MALLICOTE M, et al. Genomic association of chronic idiopathic anhidrosis to a potassium channel subunit in a large animal model[J]. J Invest Dermatol, 2021, 141(11): 2639-2645. e3. DOI: 10.1016/j.jid.2021.05.014.

[9] HO C Y, DREESEN O. Faces of cellular senescence in skin aging[J]. Mech Ageing Dev, 2021, 198: 111525. DOI: 10.1016/j.mad.2021.111525.

[10] 王一淇, 张廷志, 徐筱群. 基于皮肤本态的中国年轻人肌肤特点研究[J]. 中国化妆品, 2023(1):91-95.
WANG Y Q, ZHANG T Z, XU X Q. Study on skin characteristics of Chinese young people based on skin intrinsic state[J]. China Cosmet Rev, 2023(1):91-95.

[11] 夏晶晶, 钟倩, 魏情珍, 等. 皮肤上的"生态系统": 皮肤微生物组

[J]. 科学(上海), 2022, 74(1):7-11. DOI: 10.3969/j.issn.0368-6396.2022.01.003.
XIA J J, ZHONG Q, WEI Q Z, et al. The "ecosystem" on the skin: skin microbiome[J]. Science (Shanghai), 2022, 74(1):7-11. DOI: 10.3969/j.issn.0368-6396.2022.01.003.

[12] NAKASE K, MOMOSE M, YUKAWA T, et al. Development of skin sebum medium and inhibition of lipase activity in *Cutibacterium acnes* by oleic acid[J]. Access Microbiol, 2022, 4(10): acmi000397. DOI: 10.1099/acmi.0.000397.

[13] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 痤疮动物模型制备规范(草案)[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(1):197-200. DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.01.005.
Traditional Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee, China Association of Chinese Medicine.Specification for preparation of acne animal model (draft)[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(1):197-200. DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.01.005.

[14] 吴亚梅, 华桦, 黄志芳. 复方白蔹面膜对兔耳痤疮模型治疗作用的实验研究[J]. 四川中医, 2016, 34(8): 43-46. DOI: 10.3969/j.issn.1008-6455.2012.03.083.
WU Y M, HUA H, HUANG Z F. Experimental study on the therapeutic effect of compound ampelopsis mask on rabbit ear acne model[J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2016, 34(8): 43-46. DOI: 10.3969/j.issn.1008-6455.2012.03.083.

[15] OU-YANG X L, ZHANG D, WANG X P, et al. Nontargeted metabolomics to characterize the effects of isotretinoin on skin metabolism in rabbit with acne[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:963472. DOI: 10.3389/fphar.2022.963472.

[16] 于坤良, 王思农, 郭斐斐, 等. 基于皮肤含水量、经皮失水量及血清VEGF含量探讨三黄消痤面膜对痤疮的治疗作用与机制[J]. 中医药信息, 2021, 38(11):53-57. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.20211110.
YU K L, WANG S N, GUO F F, et al. Effect and mechanism of Sanhuang Xiaocuo mask in treating acne based on skin water content, transdermal water loss and serum content of VEGF[J]. Inf Tradit Chin Med, 2021, 38(11):53-57. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.20211110.

[17] 王亚红, 王思农. 加味黑布膏对大鼠耳廓复合痤疮模型外周血清IL-1α、IL-4水平的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2023, 8(1):15-17. DOI: 10.19347/j.cnki.2096-1413.202301004.
WANG Y H, WANG S N. Influences of modified Heibu ointment on IL-1αand IL-4 levels in peripheral blood of rats with auricle compound acne model[J]. Clin Res Pract, 2023, 8(1):15-17. DOI: 10.19347/j.cnki.2096-1413.202301004.

[18] CAO J J, XU M F, ZHU L F, et al. Viaminate ameliorates *Propionibacterium acnes*-induced acne via inhibition of the TLR2/NF-κB and MAPK pathways in rats[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023, 396(7):1487-1500. DOI: 10.1007/s00210-022-02379-0.

[19] 陈尔净, 刘晓伟, 卢丹, 等. 小鼠痤疮模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10):117-121. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.10.020.
CHEN E J, LIU X W, LU D, et al. Progress in the use of mouse models of acne[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(10): 117-121. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.10.020.

[20] 杨丽晗, 张志毕, 杨晖, 等. 两种血竭凝胶抗炎抗菌效果比较[J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(1): 6-11. DOI: 10.12259/j.issn.2095-610X.S20210134.
YANG L H, ZHANG Z B, YANG H, et al. Comparative study on anti-inflammatory and antimicrobial effects for two kinds of the resin gel[J]. J Kunming Med Univ, 2021, 42(1): 6-11. DOI: 10.12259/j.issn.2095-610X.S20210134.

[21] KIM K M, KIM S Y, MONY T J, et al. *Moringa concanensis* L. alleviates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated IL-1β in BALB/c mice[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15(10): 1217. DOI: 10.3390/ph15101217.

[22] 陈茜, 江阳, 吕静, 等. 复方桑叶消痤凝胶对ICR小鼠痤疮模型炎性改善作用及抗炎机制初探[J]. 云南中医中药杂志, 2021, 42(11):65-70. DOI: 10.3969/j.issn.1007-2349.2021.11.019.
CHEN Q, JIANG Y, LV J, et al. A preliminary study on the inflammation improvement effect and anti-inflammatory mechanism of compound Sangye Xiaocuo gel on ICR mice with acne model[J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med, 2021, 42(11):65-70. DOI: 10.3969/j.issn.1007-2349.2021.11.019.

[23] 刘洪君, 孙雪美, 孙明强, 等. 蒲公英甾醇通过TGF-β/Smad通路对小鼠痤疮模型炎症因子水平、胸腺组织形态的影响[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(7): 810-814, 869. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2020.07.015.
LIU H J, SUN X M, SUN M Q, et al. Effects of taraxasterol on inflammatory factor levels and morphology of thymus in acne model of mice through TGF-β/Smad pathway[J]. J Hebei Med Univ, 2020, 41(7): 810-814, 869. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2020.07.015.

[24] NAKATSUJI T, SHI Y, ZHU W H, et al. Bioengineering a humanized acne microenvironment model: proteomics analysis of host responses to *Propionibacterium acnes* infection *in vivo*[J]. Proteomics, 2008, 8(16): 3406-3415. DOI: 10.1002/pmic.200800044.

[25] 黄晋权, 曾智文, 张东淑. 自血穴注疗法对痤疮小鼠Th1/Th2免疫偏移的调节作用[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(8):1529-1533.
HUANG J Q, ZENG Z W, ZHANG D S. Regulation effect of autohemotherapy on Th1/Th2 immune deviation in acne mice [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2020, 37(8):1529-1533.

[26] NAKAYAMA E, KUSHIBIKI T, MAYUMI Y, et al. Optimal blue light irradiation conditions for the treatment of acne vulgaris in a mouse model[J]. J Photochem Photobiol B, 2023, 239: 112651. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2023.112651.

[27] DALZIEL K, DYKES P J, MARKS R. The effect of tetracycline and erythromycin in a model of acne-type inflammation[J]. Br J Exp Pathol, 1987, 68(1):67-70.

[28] SALIMI A, SHARIF MAKHMAL ZADEH B, GODAZGARI S, et al. Development and evaluation of azelaic acid-loaded microemulsion for transfollicular drug delivery through Guinea pig skin: a mechanistic study[J]. Adv Pharm Bull, 2020, 10(2):239-246. DOI: 10.34172/apb.2020.028.

[29] YOSHIMASU T, KURAMOTO T, KAMINAKA C, et al. Efficacy

of 0.1% adapalene in a non-inflammatory Kyoto Rhino Rat acne model. J Dermatol Sci. 2014, 76(2):143-8. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.08.001.

[30] MIRSHAHPANAH P, MAIBACH H I. Models in acnegenesis[J]. Cutan Ocul Toxicol, 2007, 26(3): 195-202. DOI: 10.1080/15569520701502815.

[31] PETERSEN M J, ZONE J J, KRUEGER G G. Development of a nude mouse model to study human sebaceous gland physiology and pathophysiology[J]. J Clin Invest, 1984, 74(4): 1358-1365. DOI: 10.1172/JCI111546.

[32] OTULAKOWSKI G, ZHOU L, FUNG-LEUNG W P, et al. Use of a human skin-grafted nude mouse model for the evaluation of topical retinoic acid treatment[J]. J Invest Dermatol, 1994, 102(4):515-518. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12373180.

[33] ODORISIO T, DE LUCA N, VESCI L, et al. The atypical retinoid E-3- (3'-Adamantan-1-yl-4'-methoxybiphenyl-4-yl) -2-propenoic acid (ST1898) displays comedolytic activity in the rhino mouse model[J]. Eur J Dermatol, 2012, 22(4): 505-511. DOI: 10.1684/ejd.2012.1778.

[34] RAMEZANLI T, MICHNIAK-KOHN B B. Development and characterization of a topical gel formulation of adapalene-TyroSpheres and assessment of its clinical efficacy[J]. Mol Pharm, 2018, 15(9): 3813-3822. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00318.

[35] VEGA-NAREDO I, TOMAS-ZAPICO C, COTO-MONTES A. Potential role of autophagy in behavioral changes of the flank organ[J]. Autophagy, 2009, 5(2): 265-267. DOI: 10.4161/auto.5.2.7619.

[36] 刘文彬, 王晖. 痤疮模型的研究现状[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(2):209-215. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8783.2010.02.027.
LIU W B, WANG H. Review on statue quo of acne vulgaris models[J]. J Guangdong Pharm Univ, 2010, 26(2):209-215. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8783.2010.02.027.

[37] 张娟娟, 张曦, 杨逸璇, 等. 加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏对湿热痰瘀型金黄地鼠痤疮模型脂质组学的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(10):1641-1649. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2022.10.009.
ZHANG J J, ZHANG X, YANG Y X, et al. Effects of combining Modified Sanren Decoction and Pomegranate Peel Polyphenol Cream on lipidomics of golden hamsters acne model of damp-heat and phlegm-stasis type[J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan, 2022, 42(10):1641-1649. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2022.10.009.

[38] 任威威, 薛兵, 方惠敏, 等. 基于 AR/SREBP-1/ACC1 信号通路探讨雄激素诱导金黄地鼠皮脂代谢异常的发病机制[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(8):1010-1014. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2020.08.006.
REN W W, XUE B, FANG H M, et al. Mechanism of androgen induced abnormal lipid metabolism in golden hamster skin based on AR/SREBP-1/ACC1 signaling pathway[J]. J Pract Med, 2020, 36(8):1010-1014. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2020.08.006.

[39] SCHWARTZMAN R M, KLIGMAN A M, DUCLOS D D. The Mexican hairless dog as a model for assessing the comedolytic and morphogenic activity of retinoids[J]. Br J Dermatol, 1996, 134(1):64-70.

[40] SAKAMOTO F H, TANNOUS Z, DOUKAS A G, et al. Porphyrin distribution after topical aminolevulinic acid in a novel porcine model of sebaceous skin[J]. Lasers Surg Med, 2009, 41(2):154-160. DOI: 10.1002/lsm.20734.

[41] LU Y T, HU Z L, SHAO F X, et al. Simultaneous determination of tazarotene, clindamycin phosphate and their active metabolites in Bama mini-pig skin by LC-MS/MS: Application to the development of a tazarotene/clindamycin phosphate cream[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2021, 1162:122455. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122455.

[42] ZHANG R, ZHOU L H, LV M Y, et al. The relevant of sex hormone levels and acne grades in patients with acne vulgaris: a cross-sectional study in Beijing[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2022, 15: 2211-2219. DOI: 10.2147/CCID.S385376.

[43] CAO Y Q, LIANG J F, WANG C G, et al. Investigating material basis and molecular mechanism of Qing Cuo formula in the treatment of acne based on animal experiments, UPLC-LTQ-Orbitrap-MS and network pharmacology[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1):973-985. DOI: 10.1080/13880209.2023.2225546.

[44] WEBSTER G F, RUGGIERI M R, MCGINLEY K J. Correlation of *Propionibacterium acnes* populations with the presence of triglycerides on nonhuman skin[J]. Appl Environ Microbiol, 1981, 41(5):1269-1270. DOI: 10.1128/aem.41.5.1269-1270.1981.

[45] NAKANO K, KIYOKANE K, BENVENUTO-ANDRADE C, et al. Real-timereflectance confocal microscopy, a noninvasive tool for *in vivo* quantitative evaluation of comedolysis in the rhino mouse model[J]. Skin Pharmacol Physiol, 2007, 20(1):29-36. DOI: 10.1159/000096169.

（收稿日期：2023-02-17　修回日期：2023-04-10）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，娄怡欣）

[引用本文]

张睿, 吕美豫, 张建军, 等. 痤疮动物模型建立及评价研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 398-405. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.021.

ZHANG R, LÜ M Y, ZHANG J J, et al. Research progress on establishing and evaluation of acne animal models[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 398-405. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.021.

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.026

皮肤光老化动物模型制备要素和受试物数据的文献分析

邓亚胜，林 江，甘池伶，曾官凤，黄嘉茵，邓慧芳，麻颖贤，韩丝银
(广西中医药大学基础医学院，南宁 530200)

[摘要] 目的 分析皮肤光老化动物模型的造模要素和受试物情况，为该动物模型的制备和完善提供参考，也为科学评价受试物提供依据。**方法** 通过在中国知网、万方、PubMed数据库中检索收集2010—2022年皮肤光老化动物模型制备的相关文献，对文献中记载的模型动物种类、性别、造模方法、造模周期、辐射光源与造模部位距离、累计辐射量、检测指标、受试物（药物或治疗手段）内容进行整理归纳，建立数据库后进行统计分析。**结果** 筛选出257篇符合纳入标准的文献，其中模型动物使用最多的是SKH-1无毛小鼠，其次为SD大鼠和KM小鼠；动物的性别选择以单一雌性为主，常采用中波紫外线（ultraviolet B，UVB）作为辐射光源，辐射光源与造模部位的距离多为30 cm，造模周期多控制在40 ~ 60 d；长波紫外线（ultraviolet A，UVA）累计照射剂量在100 ~ 150 J/cm^{2}的所占比例最大，中波紫外线（ultraviolet B，UVB）累计照射剂量在5 ~ 10 J/cm^{2}的所占比例最大。模型建立后采用的检测指标为皮肤组织病理检查、皮肤组织匀浆、纤维染色、免疫印迹检查等。受试物包括中药、中药提取物、中成药、中药复方、化学药、生物制剂以及其他治疗手段，同时皮肤光老化动物模型还应用于中医外治、物理疗法、阳性对照药方面的临床疗效研究。**结论** 皮肤光老化动物实验常选用SKH-1雌性无毛小鼠，采用UVB作为辐射光源，造模周期多控制在40 ~ 60 d，UVB累计照射剂量在0 ~ 10 J/cm^2，按照最小红斑量（minimum erythema dose，MED）逐周递增方式进行造模，具有成模率高、重现性好以及与临床疾病高度吻合等优点。

[关键词] 皮肤光老化；动物模型；造模要素；受试物；SKH-1无毛小鼠；中波紫外线
[中图分类号] Q95-33；R-332 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)04-0406-09

Literature Analysis of the Preparation Elements of Animal Models of Skin Photoaging and the Data of Subjects

DENG Yasheng, LIN Jiang, GAN Chiling, ZENG Guanfeng, HUANG Jiayin, DENG Huifang, MA Yingxian, HAN Siyin
(School of Basic Medical Sciences, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)
Correspondence to: HAN Siyin (ORCID: 0000-0001-8562-7723), E-mail: 1715252639@qq.com

[ABSTRACT] Objective To analyze the modeling elements and subjects of the animal model of skin photoaging, and to provide a reference for the preparation and improvement of the model and a basis for the scientific evaluation of the subject. **Methods** By searching and collecting relevant literature on the preparation of animal models of skin photoaging from 2010 to 2022 in the China National Knowledge Infrastructure, Wanfang Database, and PubMed database, the model animal species, gender, modeling method, modeling cycle, radiation source and its distance from the modeling site, cumulative radiation volume, detection indicators, and subjects (drugs or treatments) recorded in the literature were collated

[基金项目] 广西自然科学基金项目“合浦珍珠提取液对中波紫外线诱导人皮肤角质形成细胞光老化干预机制的基础研究”(2020GXNSFBA159039)；广西高校中青年教师科研基本能力提升项目“水解南珠粉对人体皮肤美白及抗衰老作用机制的研究”(2019KY0312)；广西中医药大学引进博士科研启动基金项目“南珠粉及水解成分的美白活性物质初探和合成筛查研究”(2018BS013)；2021年国家级大学生创新创业训练计划项目“南珠粉对Ⅱ级烫伤小鼠皮肤的修复作用研究”(202110600005)；2019年广西中医药大学校级科研青年基金项目“南珠提取物对光老化人皮肤细胞的干预作用研究”(2019QN003)

[第一作者] 邓亚胜(1993—)，男，硕士研究生，研究方向：特色方剂的配伍及成药化研究。E-mail：1440362586@qq.com
[通信作者] 韩丝银(1991—)，女，博士，副教授，研究方向：海洋药物研究及产品开发工作。E-mail：1715252639@qq.com。ORCID：0000-0001-8562-7723

and summarized, and a database was established for statistical analysis. **Results** 257 articles that met the inclusion criteria were selected. Among them, the most common animal model was SKH-1 hairless mice, followed by SD rats and KM mice; the gender of animals was mainly female, medium-wave ultraviolet B (UVB) was often used as the radiation source, the distance between the radiation source and the modelling site was mostly 30 cm, and the modelling period was usually 40-60 days. The cumulative dose of long-wave ultraviolet A (UVA) was between 100-150 J/cm^2, and the cumulative dose of UVB was between 5-10 J/cm^2. The tests used after model establishment were skin histopathological examination, skin tissue homogenization, fibre staining, immunoblotting, etc. Subjects included Chinese herbal medicines, Chinese herbal extracts, Chinese patent medicines, Chinese herbal compound medicines, chemical drugs, biological agents and other treatments, while the animal model of skin photoaging was also used for clinical efficacy studies of external Chinese medicine, physiotherapy and positive control drugs. **Conclusion** In skin photoaging animal experiments, female SKH-1 hairless mice are often used, and UVB is used as the radiation source. The modeling period is usually 40-60 days, and the minimum erythema dose (MED) is incremented week by week. The cumulative UVB irradiation dose ranges from 0 to 10 J/cm^2, which has the advantages of high success rate, good reproducibility and high similarity with clinical disease.

[Key words] Skin photoaging; Animal model; Modeling element; Subject; SKH-1 hairless mice; Ultraviolet B (UVB)

皮肤光老化是指在紫外线（ultraviolet，UV）辐射下，表皮生长因子受体和细胞因子受体被激活后发生的一系列激酶级联反应，导致皮肤弹性下降、变粗糙、皱纹形成的过程[1]。皮肤光老化发病的主要外在诱导因素是UV辐射，其次为环境污染物[2-3]。UV辐射对人体的损害主要来自长波紫外线（UVA，波长315～400 nm）和中波紫外线（UVB，波长280～315 nm）。UV辐射引起皮肤光老化的机制主要表现在炎性反应、DNA损伤、氧化应激、免疫抑制、细胞凋亡、细胞老化等方面[3-4]。临床上，皮肤光老化主要表现为肤色丧失、色素斑驳、表皮粗糙增厚、皱纹增多，同时与痤疮、脂溢性角化、色素斑及皮肤肿瘤等疾病的产生紧密相关[5-6]。皮肤光老化不仅会使患者产生严重的心理负担，也会严重影响患者正常的生活社交与工作，皮肤光老化导致的皮肤肿瘤等疾病出现甚至会对患者家庭和经济造成巨大负担，已经成为21世纪最严重的公共卫生问题之一[7-8]。

近年来，防晒霜等护肤品被广泛应用于防治UV辐射，具备预防皮肤光老化、色素沉着、DNA损伤和光致癌方面的功效，但其在逆转皮肤光老化方面的效用不够显著[9]。维甲酸、5-氟尿嘧啶以及抗氧化剂等药物对逆转光损伤皮肤起到一定程度的作用，但作用有限，并伴有诸多使用条件限制及毒副作用[10-11]。因此，进一步扩大和加深对皮肤光老化病理机制发生发展的研究，通过药物干预皮肤光老化进展从而减轻疾病症状是现阶段研发药物的重点，而合适的动物模型是防治和研究皮肤光老化疾病的重要基础。本文对近13年来涉及皮肤光老化动物模型制备的文献进行综合分析，旨在为皮肤光老化动物模型建立的动物种属及性别选择、造模方法（包括造模周期、辐射光源与造模部位距离、累计辐射量）、检测指标等综合因素提供参考。

1 文献检索及分析方法

1.1 文献检索

利用PubMed数据库、中国知网数据库、万方数据库检索2010年1月1日至2022年1月1日国内外公开发表的有关皮肤光老化动物模型的相关文献。中文数据库以“皮肤光老化”并且“动物模型”或“鼠”或“猪”或“兔”或“犬”或“猴”为主题词进行检索，在PubMed数据库中以“Skin Photoaging” AND “Animal Model” OR “Mouse” OR “rat” OR “Pig” OR “Rabbit” OR “Dog” OR “Monkey”为主题词进行检索。

1.2 文献纳入及排除标准

纳入标准：选取皮肤光老化动物模型造模方法完整及过程清晰的文献。排除标准：排除文献中造模方法不全、皮肤光老化合并其他疾病、体外细胞实验、硕博士论文、会议论文、文献研究、科技成果等文献。

1.3 资料提取与处理

采用Note Express软件对录入文献进行管理。初步

检索获得中国知网199篇、万方219篇、PubMed 816篇，共1 234篇相关文献。经查重后排除176篇，入选1 058篇。进一步通过阅读题目、摘要、全文信息，根据排除标准删除与纳入标准不符的文献801篇，最终纳入257篇文献。将文献中涉及的模型动物种属、性别、造模方法、造模周期、辐射光源与造模部位的距离、累计辐射量、检测指标等信息录入Microsoft Excel 2019软件，建立皮肤光老化动物模型数据集，对录入的数据进行整合、统计和分析，总结造模要素和受试物数据。

2 皮肤光老化动物模型的制备要素

2.1 动物种类和性别

对257篇文献进行统计分析，发现模型制备过程中使用动物频次最多的是小鼠（187次，72.76%），其中SKH-1无毛小鼠60次（占比23.34%）、KM小鼠52次（占比20.23%）、BALB/c小鼠23次（占比8.95%），其次为大鼠（64次，24.9%），其中SD大鼠53次（占比20.62%）。动物种类及频次分布详见表1。需要说明，文献检索时不局限于鼠、猪两个物种，同时也对兔、犬、猴等动物进行检索，结果显示使用兔的中外文文献共42篇，但阅读全文后发现均被排除标准所剔除，而犬、猴等动物的检索结果为0。此外，纳入文献中单独使用雌性动物122篇（47.47%），单独使用雄性动物74篇（28.79%），雌雄各半29篇（11.28%），雌雄不限6篇（2.33%），雌雄不详26篇（10.12%）。

2.2 辐射光源与造模周期

根据文献统计数据结果，257篇文献中皮肤光老化动物模型制备的辐射光源中，UVB使用频次最多（120，46.89%），UVA使用频次为17次（占比6.62%），而UVA+UVB联用的频次为118次（占比45.91%），具体辐射光源不详的2次（占比0.78%）。

皮肤光老化动物模型的造模周期较长，通常采用的造模时长可分为6个时间段：≤20 d、21～40 d、41～60 d、61～80 d、81～100 d、≥100 d，各时间段的频次分别为34、38、62、37、58和19，其中主要分布在41～60 d（占比24.12%）和81～100 d（占比22.50%），使用这两种造模周期进行造模的总占比达46.69%；另外，造模周期信息不详的有9次（占比3.50%）。

2.3 辐射光源与造模部位的距离以及辐射剂量

符合纳入标准的257篇文献中，109篇描述了辐射光源与模型动物造模部位之间的照射距离，辐射光源与造模部位距离最常见为30 cm（36次，33.03%），其次为40 cm（21次，19.27%），详见表2。

表1 皮肤光老化模型的动物选择种类及频次分布

Table 1 Species and frequency distribution of skin photoaging model animals

动物种类 Animal species	品种品系 Breed or strain	频次（所占百分比） Frequency (percentage/%)
小鼠 Mouse	SKH-1无毛小鼠	60 (23.34)
	KM小鼠	52 (20.23)
	BALB/c小鼠	23 (8.95)
	HR-1无毛小鼠	22 (8.56)
	ICR小鼠	20 (7.78)
	C57BL/6小鼠	3 (1.17)
	Swiss小鼠	3 (1.17)
	HRM-2无毛小鼠	2 (0.78)
	未知种类无毛小鼠	2 (0.78)
大鼠 Rat	SD大鼠	53 (20.62)
	Wistar大鼠	8 (3.11)
	F344大鼠	2 (0.78)
	HWY/Slc无毛大鼠	1 (0.39)
豚鼠 Guinea pig	未知种类	4 (1.56)
猪 Pig	广西巴马小型猪	2 (0.78)

在257篇文献中有86篇对紫外线累计照射剂量进行了说明，其中UVA占9篇，UVB占20篇，UVA+UVB占57篇。将辐射光源UVA+UVB进行分开统计，文献中采用UVA作为辐射光源的频次为66次，采用UVB作为辐射光源的频次为77次。模型制备过程中UVA累计照射剂量在100～150 J/cm^{2}的所占比例最大（20，30.30%），UVB累计照射剂量在5～10 J/cm^{2}的所占比例最大（24，31.17%），详见表2。

3 皮肤光老化动物模型的评价指标

将257篇文献的全部检测指标进行标准化分类处理。例如，皮肤组织过氧化氢酶（catalase，CAT）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、羟脯氨酸（hydroxyproline，Hyp）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）和谷胱甘肽过氧化酶（glutathione peroxidase，GSH-PX）等检测统一分类为皮肤组织匀浆检测。同时将弹性纤维和胶原性纤维的染色检查统一分类为纤维染色，包括皮肤胶原纤维染色使用的三色染色（Masson）、维多利亚蓝染色（Van Gieson）、天狼星红染色（Sirius Red）等，皮肤弹力纤维染色使用的铁苏木素染色法（Verhoeff）、间苯二酚品红染色（Weigert）。皮肤外观观察包括皮肤粗糙程度、有无脱屑、皮肤松弛情况、红斑等变化；皮肤含水量变化包

表2 皮肤光老化动物模型的辐射光源与造模部位距离以及紫外线累计照射剂量

Table 4 Distance between the radiation source and the modelling site as well as cumulative UV exposure doses in the animal model of skin photoaging

辐射光源与造模部位距离/cm Distance between the radiation source and the moulding site/cm	频次（所占百分比/%） Frequency (percentage/%)	累计照射剂量/（J·cm^2） Cumulative exposure dose/（J·cm^2）	频次（所占百分比/%） Frequency (percentage/%)
2	1 (0.92)	UVA≤50	6 (9.09)
6.5	1 (0.92)	50 < UVA≤100	13 (19.70)
10	4 (3.67)	100 < UVA≤150	20 (30.30)
15	6 (5.50)	150 < UVA≤200	13 (19.70)
18	2 (1.84)	200 < UVA≤250	0 (0.00)
20	11 (10.09)	250 < UVA≤300	5 (7.58)
22	1 (0.92)	UVA > 300	9 (13.63)
23	2 (1.83)	UVB≤5	12 (15.58)
25	3 (2.75)	5 < UVB≤10	24 (31.17)
30	36 (33.03)	10 < UVB≤15	8 (10.39)
35	10 (9.17)	15 < UVB≤20	2 (2.60)
40	21 (19.27)	20 < UVB≤25	10 (12.99)
42	2 (1.84)	25 < UVB≤30	1 (1.30)
50	6 (5.50)	UVB > 30	20 (25.97)
100	3 (2.75)		

注：UVA，长波紫外线（波长315 ~ 400 nm）；UVB，中波紫外线（波长280 ~ 315 nm）。
Note: UVA, long-wave ultraviolet light (wavelength 315 ~ 400 nm); UVB, medium-wave ultraviolet light (wavelength 280-315 nm).

括经皮水分损失（transepidermal water loss，TEWL）、角质层含水量测定等。对统计结果中出现5次以上的检测指标进行归纳，详见表3。

4 皮肤光老化动物模型的受试范围

国内外学者在上述动物模型建立的基础上，进行了中药、中药提取物、中成药、中药复方、化学药、生物制剂等多种受试物的治疗效果评价，以及作用机制方面的研究，为后续皮肤光老化防治的药物研发及应用提供了一定的实验基础。此外，皮肤光老化动物模型还应用于中医外治疗法、物理疗法、阳性对照药物治疗等方面的临床疗效和作用机制研究。

4.1 中药及中药提取物

中药及中药提取物对于皮肤光老化具有确切的临床疗效[12-13]。基于上述方法制备的动物模型，在明确中药及其提取物疗效的基础上可进一步开展与其相关的作用机制研究，为中药活性成分的进一步挖掘研究提供基础。经文献分析可知，具有抗皮肤光老化的中药及中药提取物有益母草、珍珠粉、玉竹提取物、葛根素、人参皂苷、枸杞多糖、黄芪提取物、黄芪甲苷、黄芪多糖、灵芝多糖、芦荟多糖、黑木耳多糖、水母雪莲多糖、黄芩苷、黄芩素、柚皮素、金合欢素、柚皮苷、槲皮素、木犀草素、芹黄素、姜黄素、紫薯花青素、圣草酚、丹皮酚、桑白皮多酚、白藜芦醇、光甘草定、水飞蓟宾、甘草酸、甘草黄酮、红景天苷、反式肉桂酸、灯盏花素、鹿茸提取物、山楂多酚提取物、红参提取物、万寿菊提取物、迷迭香提取物、绞股蓝提取物、杜仲提取物、辣木叶多酚提取物、乳香提取物、核桃蛋白水解物等。

4.2 中成药及中药复方

中药复方可最大限度地发挥方中各组成药物的相互作用，部分中药复方及中成药在临床抗皮肤光老化治疗中已取得确切疗效[14-15]。通过制备动物模型进行中药复方或中成药的作用机制研究，为临床探索中医药治疗皮肤光老化的新手段奠定基础。经文献分析可知，基于上述动物模型开展研究所使用的中成药及中药复方包括玉屏风散、玉屏风凝胶、沙参麦冬汤、十精丸、桃红四物汤、加味茵陈蒿汤、加减滋水清肝饮、康复新液、敦煌养颜面脂、益智油雪花膏、积雪苷霜软膏、人参花软膏、黄芪甲苷乳膏等。

4.3 化学药物

基于上述动物模型开展的药效学研究文献分析表明，存在多种化学药物具备抗皮肤光老化疗效，包括视黄酸（即维甲酸）、A型肉毒毒素、芜菁挥发油、花椒精油、虾青素、黄皮果果核挥发油、左旋维生素C、丹酚酸B乳剂、雷帕霉素、羟基乙酸、0.1%激动素乳

表3 皮肤光老化动物模型的检测指标及分类

Table 3 Testing indicators and classification of skin photoaging animal models

分类 Classification	检测指标 Testing indicators	频次(所占百分比/%) Frequency(percentage/%)
皮肤外观特征 Skin appearance features	皮肤外观观察	80 (9.06)
	皮肤(表皮、真皮)厚度	46 (5.21)
	皱纹测定	31 (3.51)
	皮肤弹性	9 (1.02)
皮肤含水量变化 Skin moisture content change	经皮水分损失	41 (4.64)
	皮肤(角质层)水合作用测定	14 (1.58)
	皮肤含水量测定	5 (0.57)
皮肤病理检查 Dermatologic examination	皮肤组织病理检查	173 (19.59)
	纤维染色	99 (11.21)
	免疫组化	64 (7.26)
	免疫荧光	9 (1.02)
皮肤组织匀浆检测 Skin tissue homogenisation	丙二醛、羟脯氨酸、过氧化氢酶活性、透明质酸、超氧化物歧化酶活性、谷胱甘肽过氧化酶活性、皮肤组织总抗氧化能力	108 (12.23)
免疫检测 Immunity testing	免疫印迹	81 (9.17)
	酶联免疫吸附试验	26 (2.94)
PCR分析 PCR analysis	反转录PCR	30 (3.40)
	实时荧光PCR	19 (2.15)
血液检查 Blood examination	血清	19 (2.15)
	全血或血浆	6 (0.68)
其他 Others	β-半乳糖苷酶染色	8 (0.91)
	体重变化	9 (1.02)
	活性氧定量分析/髓过氧化物酶活性测定	6 (0.68)

膏、氟芬那酸丁酯软膏、松脂醇二葡萄糖苷、富勒烯亮肤精华液、锌制剂（柠檬酸锌）等。通过动物模型进行化学药物临床疗效的确认，为后续药物的临床应用提供参考价值。

4.4 生物制剂

对于抗皮肤光老化的研究，目前国内外不断研究开发新的治疗手段。文献分析结果表明，生物制剂在抗皮肤光老化方面效果显著，包括真皮成纤维细胞、脂肪干细胞、富血小板血浆凝胶、基质血管成分胶、骨髓间充质干细胞、真皮多能干细胞、干细胞外泌体、罗非鱼皮多肽、胶原蛋白肽、浓缩生长因子制剂、南极磷虾肽、鸡卵清白蛋白多肽、黑豆乳清多肽、葵粕多肽、大豆低聚肽等。

4.5 中医外治

中医外治疗法抗皮肤光老化是近年的研究热点。能够制备稳定可靠的动物模型是开发皮肤光老化新型防治方法的重要保障和基础。国内外学者常采用上述动物模型开展外治疗法抗皮肤光老化的研究，主要采用的中医外治方法包括针刺、电针、微针、艾灸等疗法。

4.6 物理疗法

近年来，物理疗法作为皮肤光老化的治疗手段发展迅速。在上述制备的动物模型基础上，国内外学者采用的抗皮肤光老化物理治疗手段包括光动力疗法[5-氨基酮戊酸（光敏剂）]、激光（点阵CO_2激光、皮秒激光等）、强脉冲光、射频技术、等离子技术、发光半导体等。结果表明，此类物理疗法对于抗皮肤光老化具有显著的疗效，为临床研究中与其他治疗手段联合应用的开展奠定了基础。

4.7 阳性对照药

现阶段，国内外学者普遍认为维生素E对于皮肤光老化的治疗具有确切疗效[16-17]，因此部分实验为确保实验结果的可靠性，一般采用维生素E（滴剂/胶丸/软膏）作为阳性对照药物。

4.8 其他治疗

伴随医学科学技术的进步，国内外学者对于皮肤光老化的研究开发较为深入、广泛，所采取的有效治疗手段众多，除上述抗皮肤光老化方法外，还有注射填充治疗（肉毒素注射、皮肤填充术）以及手术治疗等手段。

5 分析与讨论

皮肤光老化是目前临床上常见的皮肤疾病。抗皮肤光老化的新药物、新疗法的开发仍是近年来的研究热点之一。构建与临床疾病高度吻合的动物模型是研究皮肤光老化发病机制及治疗手段的重要基础。通过挖掘分析文献得知，皮肤光老化动物模型的制备与动物种类、性别、辐射光源选择、累计照射剂量、造模周期以及辐射光源与模型动物造模部位的距离等因素紧密相关。

5.1 常用实验动物的种类、性别选择分析

由文献分析可知，皮肤光老化动物的使用频次由高到低分别为SKH-1无毛小鼠、SD大鼠、KM小鼠、BALB/c小鼠、HR-1无毛小鼠、ICR小鼠、Wistar大鼠等。动物种属常选用啮齿类，与其具有易饲养、易繁殖、成模周期短和易操作的优势相关，同时鼠类与人类基因序列高度相似，存在很多基因互补的抗体和探针酶，为研究皮肤光老化相关基因的表达提供了很大的便利[18-20]。

皮肤光老化动物模型的构建多选用单一的雌性动物，雄性或者雌雄各半的动物占比偏低，这主要是与雌性动物体内雌激素含量多有关。因为有研究表明，皮肤是雌激素最重要的非生殖靶器官之一，雌激素在皮肤光老化进程中具有抗氧化、抗炎症作用[21-22]。另外，雌激素可以增强皮肤的水合作用，通过合成透明质酸、糖胺聚糖和皮脂，增加皮肤弹性、真皮厚度，并促进角质形成细胞和成纤维细胞的增殖[23-24]。再者，雌激素可以增加细胞活力和细胞外基质成分，如增加组织基质金属蛋白酶抑制剂（tissue inhibitors of metalloproteinases，TIMPs）、纤维蛋白含量以及抑制基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）表达，通过其抗氧化特性抑制氧自由基（reactive oxygen species，ROS）和氧化应激（oxidative stress，OS）反应，促使其他抗氧化剂和解毒酶的表达增加[23,25-26]。因此，皮肤光老化动物模型制备过程中，应尽可能排除雌激素因素及其他性别二态性差异等因素对实验研究造成的偏差。

5.2 造模方法的要素分析

皮肤光老化动物模型的制备要素除了与模型动物的种类及性别选择、模型制备过程的辐射光源选择、累计照射剂量、造模周期、辐射光源与模型动物造模部位的距离等要素密切相关以外，也与是否使用光敏剂、照射部位等要素有关。经上述文献分析可知，皮肤光老化动物模型的制备辐射光源常选用UVB，造模周期多控制在40～60 d，UVA累计照射剂量常在100～150 J/cm^2，UVB累计照射剂量常在5～10 J/cm^2，辐射光源与模型动物造模部位的最佳距离为30 cm，可以有效地提高造模效率。部分实验通过采用8-甲氧基补骨脂素（8-methoxypsoralen，8-MOP）作为光敏剂可有效缩短造模周期。研究表明，背部组织是最容易发生脆性损伤的部位之一，故模型的制备多选择动物背部进行[27]。

模型制备过程中，缩短辐射光源与造模部位的距离、加大辐射光源强度、增加辐射频率等方法虽可以在一定程度上缩短成模时间，但较高的辐射强度会导致皮肤出现急性光损伤，大大降低成模率，故研究时应综合考虑辐射光源与造模部位的距离、辐射强度以及辐射频率等因素。因此在实验过程中通常采用MED逐周递增的照射方式进行实验，MED可以充分考虑辐射光源、辐射光源与造模部位的距离、造模时间、造模部位皮肤对光源的敏感程度等因素，既能够保证辐射剂量的充足稳定，避免皮肤出现破溃、糜烂等情况，同时也保证UV辐射能够扩散到皮肤组织中一定深度，确保制备出与皮肤光老化疾病病理特征吻合度更高的动物模型[28]。

5.3 辐射光源的选择分析

UV辐射是引起皮肤产生炎性反应、DNA损伤、氧化应激、免疫抑制、细胞凋亡、细胞老化等光老化损伤的主要原因，故常选择UV作为制备皮肤光老化动物模型的辐射光源[4,8,29-30]。造模辐射光源的选择应与研究内容紧密联系。

UVB是目前使用最广泛的造模辐射光源。研究表明，UVB会破坏皮肤细胞中的DNA和蛋白质结构，主要以高能量形式被表皮完全吸收，作用于皮肤的表皮层，其致病特点是引起晒伤细胞的出现和皮肤细胞中环丁烷嘧啶二聚体（cyclobutane pyrimidine dimer，CPD）的产生，以及急性炎性反应和脂质膜、线粒体、DNA、蛋白质等细胞成分的氧化损伤[31-32]。UVB会诱发红斑、晒伤、增生、增殖、炎症、氧化应激、DNA损伤、p53突变、免疫抑制以及PI3K/AKT和NF-κB细胞存活信号通路的改变[33-35]，因此选择UVB作为造模辐射光源对于DNA损伤、黑色素合成、炎性反应、皮肤含水量及皮肤屏障功能、抗氧化酶表达等方面的研究较为重要[36-38]。

UVA较UVB穿透力更强，作用于皮肤的真皮层，可以诱导氧化应激及细胞外基质（extracellular matrix，ECM）降解。UVA会导致基质金属蛋白酶的过量产生，从而降解ECM成分，包括胶原蛋白以及成纤维细胞和其他类型的细胞，使皮肤弹性降低且皱纹形成增加[39]。此外，UVA可通过诱导ROS产生和DNA损伤来激活下游信号和炎性细胞因子的释放，造成皮肤损伤，并通过刺激ROS的产生，直接诱导并进一步损伤DNA[8]。故采用UVA作为辐射光源造模对于研究皮肤炎性反应、DNA损伤、氧化应激反应、基质金属蛋白酶表达、胶原蛋白表达、皮肤皱纹测定等较为重要[40-42]。

UVA+UVB作为辐射光源可最大限度地还原人体皮肤光老化的致病环境，使光老化动物模型的宏微观指标与人类皮肤光老化具有较高的重现性；同时UVA与UVB对诱发皮肤光老化具备协同作用，可缩短造模周期，多用于研究皮肤光老化疾病的炎性反应、皮肤含水量、氧化应激、DNA损伤、基质金属蛋白酶表达、胶原蛋白及弹性蛋白表达等指标[43-45]。

5.4 受试物分析

现阶段，抗皮肤光老化治疗手段众多，包括中药、中药提取物、中成药、中药复方、化学药物、生物制剂等。各类受试物通过相同或不同的作用机制发挥抗皮肤光老化的作用，如果在受试物作用机制清楚的情况下，可根据各受试物以及老化皮肤的特点选择具有针对性的治疗手段，能够取得较好的治疗效果。但总体来说，抗皮肤光老化采用单一的治疗措施还是难以取得满意的疗效。因此，临床上探究新的抗皮肤光老化治疗手段仍是未来研究的主要方向，合适的动物模型可以为后续开展抗皮肤光老化治疗手段的研究奠定基础。

6 总结

综上所述，模型制备过程中应注意模型动物的种类、性别、辐射光源选择、累计照射剂量、造模周期以及辐射光源与模型动物造模部位的距离等诸多要素的影响。实验中应根据研究目的选择适宜的模型制备方法和检测指标，充分考虑模型各制备要素之间的关系，以期构建出重现性好、成功率高、与临床疾病高度吻合的皮肤光老化动物模型，为提高动物模型构建效率、科学评价受试物提供参考。

通过本次文献分析，笔者建议在后续开展皮肤光老化模型的制备时，选择以下适宜的造模方法：选用雌性SKH-1无毛小鼠，采用UVB作为辐射光源，造模周期多控制在40～60 d，UVB累计照射剂量在0～10 J/cm^2，按照MED逐周递增方式进行造模。

[作者贡献 Author Contribution]

邓亚胜负责论文设计、收集资料和论文写作；
甘池伶、曾官凤收集数据、协助完成论文内容；
黄嘉茵、邓慧芳、麻颖贤负责收集资料；
林江负责文章审核及修改；
韩丝银负责课题及本论文审核与修改定稿。

[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] CHEN X, YANG C S, JIANG G. Research progress on skin photoaging and oxidative stress[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2021, 38(6):931-936. DOI: 10.5114/ada.2021.112275.

[2] BOCHEVA G, SLOMINSKI R M, JANJETOVIC Z, et al. Protective role of melatonin and its metabolites in skin aging [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3):1238. DOI: 10.3390/ijms23031238.

[3] PARRADO C, MERCADO-SAENZ S, PEREZ-DAVO A, et al. Environmental stressors on skin aging. mechanistic insights [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 759. DOI: 10.3389/fphar.2019.00759.

[4] SALMINEN A, KAARNIRANTA K, KAUPPINEN A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin[J]. Inflamm Res, 2022, 71(7):817-831. DOI: 10.1007/s00011-022-01598-8.

[5] SWIADER A, CAMARÉ C, GUERBY P, et al. 4-hydroxynonenal contributes to fibroblast senescence in skin photoaging evoked by UV-A radiation[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(3): 365. DOI: 10.3390/antiox10030365.

[6] KANG M K, KIM D Y, OH H, et al. Dietary collagen hydrolysates ameliorate furrowed and parched skin caused by photoaging in hairless mice[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 6137. DOI: 10.3390/ijms22116137.

[7] JIN X X, ZHANG X D, LI Y B, et al. Long-acting microneedle patch loaded with adipose collagen fragment for preventing the skin photoaging in mice[J]. Biomater Adv, 2022, 135: 212744. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.212744.

[8] CHEN Q Y, ZHANG H Y, YANG Y M, et al. Metformin attenuates UVA-induced skin photoaging by suppressing mitophagy and the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13):6960. DOI: 10.3390/ijms23136960.

[9] GUAN L L, LIM H W, MOHAMMAD T F. Sunscreens and Photoaging: A Review of Current Literature[J]. Am J Clin Dermatol, 2021, 22(6): 819-828. DOI: 10.1007/s40257-021-00632-5.

[10] POON F, KANG S, CHIEN A L. Mechanisms and treatments of photoaging[J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2015, 31(2): 65-74. DOI: 10.1111/phpp.12145.

[11] LIANG Y, SIMAITI A, XU M, et al. Antagonistic Skin Toxicity of Co-Exposure to Physical Sunscreen Ingredients Zinc Oxide and Titanium Dioxide Nanoparticles[J]. Nanomaterials (Basel), 2022, 12(16). DOI: 10.3390/nano12162769.

[12] 丁苗苗, 魏玲, 陈春宇, 等. 中药有效成分抗皮肤光老化作用及其机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(14): 3709-3717. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20220415.601.
DING M M, WEI L, CHEN C Y, et al. Anti-photoaging effects and mechanisms of active ingredients of Chinese medicine: a review[J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(14): 3709-3717. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20220415.601.

[13] 朱姗, 赵志月, 王子静, 等. 皮肤老化分子机制及中药防治皮肤老化研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(4): 431-439. DOI: 10.11656/j.issn.1673-9043.2021.04.06.
ZHU S, ZHAO Z Y, WANG Z J, et al. Research progress of molecular mechanism of skin aging and prevention of skin aging with traditional Chinese medicine[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2021, 40(4): 431-439. DOI: 10.11656/j. issn. 1673-9043.2021.04.06.

[14] 王璐, 李中平, 曹艳亚, 等. 沙参麦冬汤对皮肤光老化模型小鼠的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(6): 1628-1631. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.06.091.
WANG L, LI Z P, CAO Y Y, et al. Protective effect of Shashen Maidong Decoction on skin photoaging model mice[J]. Chin J Gerontol, 2015, 35(6): 1628-1631. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-9202.2015.06.091.

[15] 张宇, 曹南开, 张小卿, 等. 桃红四物汤对光老化小鼠皮肤组织中MMP-1、MMP-3 mRNA及血清中TNF-α、IL-1含量表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(4): 919-921,后插8. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2015.04.048.
ZHANG Y, CAO N K, ZHANG X Q, et al. Effect of Taohongsiwu Decoction on expressions of MMP-1, MMP-3 mRNA in skin tissue and TNF-a, IL-1 in blood serum of photoaged mice[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2015, 33(4): 919-921,10008. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2015.04.048.

[16] SHAMLOUL N, HASHIM P W, NIA J J, et al. The role of vitamins and supplements on skin appearance[J]. Cutis, 2019, 104(4): 220-224.

[17] 邓映, 杜宇, 刘萍, 等. 氧化应激在皮肤光老化中的作用[J]. 中国医疗美容, 2020, 10(8): 117-122. DOI: 10.19593/j.issn.2095-0721.2020.08.030.
DENG Y, DU Y, LIU P, et al. The role of oxidative stress in skin photoaging[J]. Chin Med Cosmetol, 2020, 10(8): 117-122. DOI: 10.19593/j.issn.2095-0721.2020.08.030.

[18] CHENOUARD V, REMY S, TESSON L, et al. Advances in genome editing and application to the generation of genetically modified rat models[J]. Front Genet, 2021, 12: 615491. DOI: 10.3389/fgene.2021.615491.

[19] MEEK S, MASHIMO T, BURDON T. From engineering to editing the rat genome[J]. Mamm Genome, 2017, 28(7): 302-314. DOI: 10.1007/s00335-017-9705-8.

[20] 王诗萌, 李甜, 杨田野, 等. 紫外线照射实验动物的皮肤光老化模型研究进展[J]. 中国美容医学, 2018, 27(7): 146-150. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2016.30.160.
WANG S M, LI T, YANG T Y, et al. Progressof skin photoaging models of ultraviolet irradiated experimental animals[J]. Chin J Aesthetic Med, 2018, 27(7): 146-150. DOI: 10.14163/j. cnki. 11-5547/r.2016.30.160.

[21] RUIZ-LARREA M B, MARTÍN C, MARTÍNEZ R, et al. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens[J]. Chem Phys Lipids, 2000, 105(2): 179-188. DOI: 10.1016/S0009-3084(00)00120-1.

[22] LEPHART E D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms[J]. Ageing Res Rev, 2016, 31:36-54. DOI: 10.1016/j.arr.2016.08.001.

[23] LEPHART E D, NAFTOLIN F. Menopause and the skin: old Favorites and new innovations in cosmeceuticals for estrogen-deficient skin[J]. Dermatol Ther (Heidelb), 2021, 11(1): 53-69. DOI: 10.1007/s13555-020-00468-7.

[24] PARK H M, CHO M H, CHO Y, et al. Royal jelly increases collagen production in rat skin after ovariectomy[J]. J Med Food, 2012, 15(6):568-575. DOI: 10.1089/jmf.2011.1888.

[25] LEPHART E D. A review of the role of estrogen in dermal aging and facial attractiveness in women[J]. J Cosmet Dermatol, 2018, 17(3):282-288. DOI: 10.1111/jocd.12508.

[26] LEPHART E D, NAFTOLIN F. Factors influencing skin aging and the important role of estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs) [J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2022, 15:1695-1709. DOI: 10.2147/CCID.S333663.

[27] LI W G, LUO X Y. An invariant-based damage model for human and animal skins[J]. Ann Biomed Eng, 2016, 44(10): 3109-3122. DOI: 10.1007/s10439-016-1603-9.

[28] 陶丛敏, 马文宇. 光老化的动物模型研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2018, 47(6): 386-388. DOI: 10.16761/j. cnki. 1000-4963.2018.06.017.
TAO C M, MA W Y. Research progress of animal model of skin photoaging[J]. J Clin Dermatol, 2018, 47(6): 386-388. DOI: 10.16761/j.cnki.1000-4963.2018.06.017.

[29] GUO K K, LIU R, JING R R, et al. Cryptotanshinone protects skin cells from ultraviolet radiation-induced photoaging via its antioxidant effect and by reducing mitochondrial dysfunction and inhibiting apoptosis[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:1036013. DOI: 10.3389/fphar.2022.1036013.

[30] 孔悦, 郭砚. 皮肤光老化小鼠模型的构建及效果评估[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(2): 116-121. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817.2020.191
KONG Y, GUO Y. Construction and evaluation of skin photoaging mouse model[J]. Lab Animal Comp Med, 2021, 41 (2):116-121. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.191.

[31] GENDRISCH F, ESSER P R, SCHEMPP C M, et al. Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation[J]. Biofactors, 2021, 47(2):170-180. DOI: 10.1002/biof.1699.

[32] ZAMARRÓN A, LORRIO S, GONZÁLEZ S, et al. Fernblock prevents dermal cell damage induced by visible and infrared A radiation[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8): 2250. DOI: 10.3390/ijms19082250.

[33] CHOI K S, KUNDU J K, CHUN K S, et al. Rutin inhibits UVB

radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets[J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 559: 38-45. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.016.

[34] KUNDU J K, CHANG E J, FUJII H, et al. Oligonol inhibits UVB-induced COX-2 expression in HR-1 hairless mouse skin: AP-1 and C/EBP as potential upstream targets[J]. Photochem Photobiol, 2008, 84(2): 399-406. DOI: 10.1111/j. 1751-1097.2007.00277.x.

[35] PAL H C, ATHAR M, ELMETS C A, et al. Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/AKT/NFκB signaling pathways in SKH-1 hairless mice[J]. Photochem Photobiol, 2015, 91(1): 225-234. DOI: 10.1111/php.12337.

[36] MOON N R, KANG S, PARK S. Consumption of ellagic acid and dihydromyricetin synergistically protects against UV-B induced photoaging, possibly by activating both TGF-β1 and Wnt signaling pathways[J]. J Photochem Photobiol B Biol, 2018, 178:92-100. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.004.

[37] TSUKAHARA K, MORIWAKI S, FUJIMURA T, et al. Inhibitory effect of an extract of Sanguisorba officinalis L. on ultraviolet-B-induced photodamage of rat skin[J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(9):998-1003. DOI: 10.1248/bpb.24.998.

[38] TANG Z T, TONG X L, HUANG J H, et al. Research progress of keratinocyte-programmed cell death in UV-induced Skin photodamage[J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2021, 37(5):442-448. DOI: 10.1111/phpp.12679.

[39] Oh J H, KARADENIZ F, LEE J I, et al. Antiphotoaging Effect of (2'S) -Columbianetin from Corydalis heterocarpa in UVA-Irradiated Human Dermal Fibroblasts[J]. App Sci, 2020, 10(7): 2568. DOI:10.3390/app10072568.

[40] VATS K, KRUGLOV O, MIZES A, et al. Keratinocyte death by ferroptosis initiates skin inflammation after UVB exposure[J]. Redox Biol, 2021, 47:102143. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102143.

[41] RANA S, FATIMA N, YAQOOB S, et al. Probing photoprotection properties of lipophilic chain conjugated thiourea-aryl group molecules to attenuate ultraviolet-A induced cellular and DNA damages[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 20907. DOI: 10.1038/s41598-022-25515-5.

[42] ZAMARRÓN A, MOREL E, LUCENA S R, et al. Extract of *Deschampsia antarctica* (EDA) prevents dermal cell damage induced by UV radiation and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1356. DOI: 10.3390/ijms20061356.

[43] ATALAY S, GĘGOTEK A, WROŃSKI A, et al. Therapeutic application of cannabidiol on UVA and UVB irradiated rat skin. A proteomic study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 192: 113656. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113656.

[44] KHAN A Q, TRAVERS J B, KEMP M G. Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis[J]. Environ Mol Mutagen, 2018, 59(5): 438-460. DOI: 10.1002/em.22176.

[45] KHAN A, BAI H L, KHAN A, et al. Neferine prevents ultraviolet radiation-induced skin photoaging[J]. Exp Ther Med, 2020, 19 (5):3189-3196. DOI: 10.3892/etm.2020.8587.

（收稿日期：2023-02-24　修回日期：2023-04-11）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，吴昊晟）

[引用本文]

邓亚胜, 林江, 甘池伶, 等. 皮肤光老化动物模型制备要素和受试物数据的文献分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 406-414. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.026.

DENG Y S, LIN J, GAN C L, et al. Literature analysis of the preparation elements of animal models of skin photoaging and the data of subjects[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 406-414. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.026.

****

有关《食蟹猴缺血再灌注模型的建立及依达拉奉干预作用》一文的撤稿声明

潘梦鲜等发表于本刊2023年第2期的《食蟹猴缺血再灌注模型的建立及依达拉奉干预作用》一文（DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.165），日前被广西盛思蓝生物医药技术有限公司来信质疑部分内容不属实——未经该公司立项及伦理审批。后经三方沟通确认，作者投稿时提交的实验动物福利伦理审批件不规范。为避免潜在的版权及其他法律纠纷，本刊编辑部决定对其进行撤稿处理，并从即日起终止该文献的网络传播。

特此声明！

附原文信息：

潘梦鲜, 黄晓姣, 黄中理, 等. 食蟹猴缺血再灌注模型的建立及依达拉奉干预作用[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 136-144. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.165.

PAN M X, HUANG X J, HUANG Z L, et al. Establishment of ischemia-reperfusion model in cynomolgus macaques and effects of edaravone intervention[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 136-144. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.165.

《实验动物与比较医学》编辑部
2023年8月25日

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.031

糖尿病小鼠模型的常见种类及其构建要素分析

王 雪[1]，呼永河[2]
(1. 成都中医药大学临床医学院，成都 610072；2. 中国人民解放军西部战区总医院，成都 610083)

[摘要] 糖尿病是一种以胰岛素绝对或相对缺乏导致高血糖为特征的疾病，其高发病率和并发症对患者生活产生极大的影响。动物模型被广泛运用于研究糖尿病及其并发症的发生机制及治疗方案。由于糖尿病类型的不同，其发病机制和发病特征也不同，导致治疗方案不同。动物实验除了考虑动物的遗传因素与生理特征（性别、年龄）外，还需要考虑实验方案及各种应对方案，这些因素对实验数据、实验结果的可重复性和稳定性有着重要影响。因此，糖尿病研究需要选择合适的动物模型进行实验：1型糖尿病以胰岛素绝对缺乏为特征，现有的1型糖尿病小鼠模型包括化学（STZ诱导）诱导型和自发性糖尿病模型（NOD小鼠）等；2型糖尿病以胰岛素抵抗和葡萄糖耐量受损为主，现有的2型糖尿病动物模型包括高脂饮食诱导型、自发性（包括单基因肥胖小鼠和多基因肥胖小鼠）模型和遗传修饰小鼠模型。本综述主要总结了糖尿病小鼠模型的常见种类和构建要素，以及选用时需考虑的关键因素，并探讨了这些因素对糖尿病研究的影响，以期为相关研究提供参考。

[关键词] 糖尿病；动物模型；建模因素；小鼠
[中图分类号] R587.1；R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)04-0415-07

Analysis of Common Types and Construction Elements of Diabetic Mouse Models

WANG Xue[1], HU Yonghe[2]
(1. School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China; 2. The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083,China)
Correspondence to: HU Yonghe (ORCID: 0000-0001-5666-8577), E-mail: huyonghezyy@163.com

[ABSTRACT] Diabetes mellitus is a disease characterized by absolute or relative lack of insulin, which leads to hyperglycemia, and its high mobidity and complications have a great impact on the lives of patients. Animal models are widely used to study the pathogenesis and treatment of diabetes and its complications. Different types of diabetes, with different pathogenesis and pathognomonic features, have different treatment options. In animal experimental, in addition to considering the genetic factors and physiological characteristics of the animal (such as sex and age), it is also necessary to consider the experimental protocol and various response options, which have a great impact on the experimental data, the reproducibility and stability of the experimental results. Therefore, it is necessary to select suitable animal models for experiments in the study of diabetes. Type 1 diabetes is characterized by absolute insulin deficiency, and existing mouse models of type 1 diabetes include chemically (STZ-induced) induced and spontaneous diabetes model (NOD mice), etc. Type 2 diabetes, characterized by insulin resistance and impaired glucose tolerance, is established in both obese and non-obese animal models, including diet-induced (high-fat diet induced), spontaneous diabetes (including monogenic and polygenic obese mice) models, and genetically modified mouse models. In this review, we discussed the common types of diabetic mouse models and analyzed the elements of their construction, the key factors that should be considered in the selection of diabetic mouse models, and explore the impact of these factors on the research of diabetes.

[基金项目] 四川省科技计划重点研发项目“高糖环境对心肌细胞线粒体Maxi K通道改变的影响及其机制研究”(18ZDYF0492)、“超稳态空化效应重建糖尿病足微循环及神经网络的应用研究”(2020YFS0122)
[第一作者] 王 雪(1996—)，女，硕士，主要从事中医内科学研究。E-mail：WX_020@163.com
[通信作者] 呼永河(1968—)，男，博士，主任医师，主要从事中医内科学研究。E-mail：huyonghezyy@163.com。ORCID：0000-0001-5666-8577

[Key words] Diabetes mellitus; Animal Model; Modeling factors; Mouse

国际糖尿病联盟（The International Diabetes Federation，IDF）发布的第10版《IDF全球糖尿病地图》显示，全球有5.37亿成年人（20～79岁）患有糖尿病，预计到2030年糖尿病患者人数将增至6.43亿，2045年将增至7.84亿[1]。糖尿病（diabetes mellitus）是一种慢性疾病，以胰岛素的绝对或者相对缺乏为特点，涉及多个器官和系统，有复杂的病理生理学机制，可导致多种并发症，例如神经病变、血管病变和心脏病变，并增加患心血管疾病的发生风险。小鼠在葡萄糖动态平衡方面与人类相似，常被用于制作模拟人类糖尿病的动物模型。此外，转基因小鼠也常被用于分析正常和疾病状态下的分子机制通路研究。当进行实验设计前，必须考虑小鼠造模时的影响因素，以确保结果的稳定性和可重复性。本篇综述讨论了常用的糖尿病小鼠模型及其特点，以及选用时需要考虑的影响因素，希望供研究者参考。

1 1型糖尿病模型的构建方法及考虑因素

1型糖尿病是自身免疫性疾病，常见于儿童和青少年，由β细胞被破坏导致胰岛素分泌不足引起。1型糖尿病小鼠模型经常通过破坏β细胞实现，包括化学诱导模型和自发性模型。下文通过文献分析，总结这两种1型糖尿病小鼠模型的构建方法及考虑因素。

1.1 化学诱导模型

化学诱导的1型糖尿病小鼠模型通过破坏胰岛β细胞使内源性胰岛素减少，导致小鼠血糖增高和体重减轻。四氧嘧啶（alloxan）和链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）是最常用于诱发糖尿病的两种化合物[2]。虽然两者都用于诱导高血糖，但STZ的低种属选择性及低毒性使得其更受欢迎，常被用于各种糖尿病动物造模[2]。STZ通过腹腔或静脉注射给药，可单次高剂量注射（100～200 mg/kg）或多次低剂量注射（20～40 mg/kg）[3]。STZ给药通常是1型糖尿病快速造模的首选方法。小鼠一般在高剂量注射STZ 48 h后出现高血糖，72 h后出现多饮、多食、多尿等症状。但是，此种造模方法建立的模型稳定性较低，需要在实验后确认高血糖诱导是否成功。大多数研究者选择在注射STZ后5～7 d对小鼠血糖水平进行观察。需要说明，单次高剂量注射STZ只破坏胰岛β细胞但不导致胰腺炎，这种方法诱导的糖尿病模型为无炎性1型糖尿病模型；多次低剂量注射STZ能成功诱导炎性1型糖尿病模型，更接近人类的慢性胰岛炎和胰岛素缺乏，但是并未完全使胰岛素缺乏，所以需要建立对照组，以便更准确地描述药物的治疗作用[4–5]。此外，高剂量注射STZ比低剂量注射STZ能更快速、更可靠地诱发小鼠高血糖，但有较高的死亡率，需监测小鼠的健康状况或体重变化[6]。

在使用STZ诱导1型糖尿病时需考虑STZ试剂的使用、毒性、易感性及应对措施。STZ化学结构与葡萄糖相似，二者可以相互竞争，因此往往对动物禁食12 h后注射STZ，此时敏感性更高，能显著提高造模成功率。由于小鼠是夜间进食并活动的动物，若在夜间对小鼠禁食，那么禁食的时间会远远多于12 h，因此建议小鼠禁食时间为凌晨4点至下午6点[4]。STZ容易挥发，需要避光冷藏，应在低温条件下配制STZ溶液，并即配即用。注射STZ之前，适应性喂养1周可以最大限度地减少或消除饮食变量引起的葡萄糖代谢差异[7]。小鼠对STZ的易感性随小鼠的品系不同而不同，在选择STZ诱导糖尿病之前要考虑小鼠品系和给药方案。有研究发现，对常用的非胰岛素依赖型糖尿病ddY、BALB/c和C57BL/6等不同品系的小鼠进行STZ诱导时，ddY小鼠最敏感，[8]。雌性小鼠对STZ的敏感性比雄性小鼠更低，可能与雌激素的释放有关。总体而言，建议使用敏感品系的雄性小鼠，而非增加STZ的剂量，因为STZ存在非特异性毒性的风险。一天中不同时间使用STZ也会影响糖尿病诱导的效果，例如雌性C3H/HeN（C3H）小鼠的最高诱导率出现在下午4点，最低诱导率出现在上午8点[9]。还有一个重要的考虑因素是STZ对胰岛β细胞以外的器官和组织可能是有毒的，如肝毒性和肾毒性[10]。一些动物在注射STZ后的48 h内，出现大量的胰岛β细胞坏死和胰岛素突然释放，导致低血糖，从而迅速死亡。为了防止这种情况发生，可以在STZ诱导后常规给动物提供10%的蔗糖水。

1.2 自发性小鼠模型

目前，最常用的1型糖尿病小鼠自发性模型是非肥胖糖尿病（non-obese diabetes，NOD）小鼠。NOD小鼠在3～4周龄会出现自发性胰腺炎，12～14周龄有明显高血糖[10]。NOD小鼠与人类1型糖尿病中的自身免疫反应有许多相似之处，包括胰岛特异性自身抗体

的产生及胰岛细胞被CD4⁺和CD8⁺ T细胞浸润[11]。此外，NOD小鼠表达的主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）-Ⅱ类分子在结构上与人类相似，赋予NOD小鼠与人类相似的对疾病的抵抗力和易感性，这对于剖析1型糖尿病背后的一些机制和治疗途径非常有用[12]。1型糖尿病有自身免疫缺陷，容易被环境影响。NOD小鼠也容易患上其他免疫性疾病，包括免疫性甲状腺炎、唾液腺炎等[13]。虽然NOD小鼠模型与1型糖尿病有众多相似之处，但也有不同的地方。NOD动物模型对胰岛的浸润范围广，甚至涉及整个胰岛，但在人类患者中没有观察到这些特征，或仅在部分胰岛中观察到，并且并非在所有情况下都能观察到对胰岛的浸润[14]。实验发现一些药物对NOD小鼠效果显著，但对人类效果不明显，这表明药物在动物模型与人类之间的转换是有限的。这种现象可能与干预的时间点有关，实验中通常在NOD小鼠发生糖尿病的早期阶段进行药物干预[15]。自身抗原特异性免疫耐受是治疗1型糖尿病的核心目标，因此研究NOD小鼠模型是探究自身抗原对自身免疫性疾病调节的有效手段。此外，NOD小鼠也可用于自身免疫的复发模型，在无胰岛素的NOD供体小鼠体内制备胰岛，并移植到糖尿病NOD小鼠的肾囊，可使实验模型在最多15 d内再次患糖尿病[16]。

使用NOD小鼠虽然不需要再进行糖尿病造模，但仍需考虑环境、性别以及小鼠状态，这有助于提高实验数据的稳定性和结果的可靠性。NOD小鼠的糖尿病发病率与微生物暴露呈负相关，因此NOD小鼠需要保持在无特定病原体（specific pathogen-free，SPF）环境下以维持糖尿病发病率[13]。NOD小鼠不可预测的疾病发病率也是一个难题，雌性小鼠的发病率在60%～90%，而雄性小鼠的发病率在10%～30%[17]。实验期间，NOD小鼠严重的高血糖和体重减轻症状在给药后很快得到缓解，但给病人治疗却未达到效果，因此如何将药物从小鼠给药剂量转换成人类使用剂量也是一个需要解决的问题。与化学诱导胰腺炎模型相比，NOD模型与人类遗传所致1型糖尿病的发病机制更接近，但维护成本更高，花费更多。虽然NOD小鼠模型有局限性，但目前仍被广泛使用，因为它与人类1型糖尿病中的自身免疫反应有许多相似之处，并且帮助确定了许多可能导致1型糖尿病的遗传因素和信号通路。

2 2型糖尿病模型的构建方法及考虑因素

2型糖尿病小鼠模型主要模拟人类胰岛素抵抗和葡萄糖耐量受损。2型糖尿病的动物模型是以肥胖为主，反映了肥胖与2型糖尿病密切相关的人类疾病状况。最常用的2型糖尿病小鼠模型包括单基因肥胖小鼠模型和饮食所致肥胖小鼠模型。下文通过文献分析，总结这两种2型糖尿病小鼠模型的构建方法及考虑因素。

2.1 自发性小鼠模型

人类肥胖很少是由单基因突变引起，但肥胖单基因突变通常被用于2型糖尿病的研究。小鼠肥胖性2型糖尿病模型的构建主要是使瘦素信号转导缺乏。瘦素是一种脂肪衍生激素，主要通过激活厌食性神经元通路以及靶细胞上的受体来调节能量平衡，瘦素信号转导在控制饱腹感方面十分重要，动物体内缺乏瘦素会导致暴食和肥胖[18]。这些小鼠模型包括：瘦素缺乏型小鼠（ob/ob小鼠）和瘦素受体缺乏型小鼠（db/db小鼠）[19]。

ob/ob小鼠是使C57BL/6J小鼠体内瘦素基因突变，导致其瘦素缺乏以获得相关表型。该小鼠体重在2周龄时开始增加，并且出现高胰岛素血症；到4周龄时，高血糖明显，血糖浓度持续上升；3～5个月龄时，血糖浓度达到高峰；之后随着小鼠年龄的增长而下降[20]。ob/ob小鼠模型并未使β细胞完全衰竭，能够代偿胰岛素抵抗，并且仅发生与胰腺肥大和增生相关的轻度短暂性高血糖，不能完全代表人类2型糖尿病。当使用C57BLKS/J小鼠进行ob/ob小鼠造模时，出现胰腺退化、早期死亡率高和严重的糖尿病[21]。

db/db小鼠通常用C57BLKS/J小鼠建模，一般患有高血压症、肥胖症、高胰岛素血症和高血糖，其中肥胖从3～4周龄开始明显，高胰岛素血症在2周龄左右开始明显，高血糖在4～8周龄开始出现[22]。用C57BLKS/J小鼠进行db/db小鼠建模时，胰腺组织萎缩导致胰岛素分泌下降和严重高血糖，出现明显的葡萄糖耐量受损情况，β细胞衰竭会导致酮症酸中毒，从而缩短小鼠寿命（只有8～10个月）[23]。

与单基因模型相比，多基因模型能够更准确地模拟人类2型糖尿病。目前，肥胖、葡萄糖耐受不良和高血糖的多基因小鼠模型已十分成熟，可以观察疾病的不同基因型及易感性。但是，多基因模型多为雄性小鼠，在模拟人类女性2型糖尿病方面略显不足，这些模型主要包括KK-Ay小鼠、Tallyho/Jng小鼠和TSOD小鼠。

KK小鼠是从日本ddY小鼠（远亲杂交系小鼠，为自发性IgA肾病小鼠）衍生而来，患有严重的高胰岛

素血症，表现出胰岛素抵抗表型。将黄色肥胖基因（Ay基因）转移到KK小鼠即可得到KK-Ay小鼠，与KK小鼠相比，此种模型表现出明显的肥胖和葡萄糖耐量降低[24]。KK-Ay小鼠在10周龄时胰岛细胞肥大，到了14周龄时出现明显的胰岛改变和更严重的高胰岛素血症。当保持正常饮食25周或更长时间时，KK-Ay小鼠的葡萄糖耐量会出现年龄依赖性改善，故使用这种模型时需要注意饮食的影响[25]。

Tallyho/Jng小鼠是Theler原始小鼠的近交群体，雄性和雌性都出现体重及脂肪质量增加、高瘦素血症、高胰岛素血症和高脂血症，但葡萄糖耐受不良和高血糖仅见于雄性[26]。Tallyho/Jng小鼠在10～14周龄时出现明显肥胖，以及血浆中三酰甘油、胆固醇和游离脂肪酸水平升高[27]。尽管已经有研究者使用这个模型来研究2型糖尿病的冠状动脉微血管病变，但仅应用Tallyho/Jng小鼠并不能完全表现出糖尿病并发症的发病特征，故不建议用于糖尿病并发症的研究。

TSOD小鼠是通过对肥胖的ddY品系雄性小鼠进行选择性育种而建立，以胰岛素抵抗为主要特征[28]。TSOD雄性小鼠表现为暴饮暴食和逐渐肥胖，在5周龄时发生肥胖和高胆固醇血症，但血糖并未升高；11周龄时具有2型糖尿病症状，包括葡萄糖耐量受损、肥胖、高胆固醇血症和高血糖症[29]。

2.2 饮食所致肥胖小鼠模型

高脂肪饮食诱导的小鼠肥胖模型和胰岛素抵抗模型是由环境造成，而非基因引起，常用于更准确地模拟人类2型糖尿病。高脂饮食喂养可导致小鼠出现肥胖、高胰岛素和高血糖。幼鼠常喂以高脂饲料（high-fat diet，HFD）或高脂-高糖饲料（high-fat-high-sugar，HFHS）约12～16周进行肥胖模型造模。胰岛素抵抗型小鼠在饮食诱导1周时就出现葡萄糖耐受和胰岛素抵抗[30]。与单基因肥胖型小鼠不同的是，高脂饮食诱导模型小鼠的高血糖并不明显。对小鼠进行连续血糖监测发现，HFD喂养雄性小鼠的血糖浓度只比正常食物喂养的小鼠血糖浓度高0.4 mmol/L［（7.6±0.2）mmol/L *vs*（7.2±0.2）mmol/L］[31]。雄性和雌性小鼠在喂以HFD或HFHS后的1～2周内都会出现糖耐量异常，但敏感度存在显著的性别差异，雄性小鼠出现更加明显的肥胖、胰岛素抵抗和葡萄糖耐量受损表型[32]。不同品系之间也有差异，C57BL/6J和AKR/J小鼠容易饮食诱导肥胖，但C57BL/6J小鼠比AKR/J小鼠对胰岛素更敏感，更容易出现高血糖[33]。

目前，常通过高脂喂养与STZ注射联合运用以诱导2型糖尿病。这种造模方法是将小鼠先用HFD喂养以诱导胰岛素抵抗、葡萄糖耐受和高胰岛素血症，随后给予多次低剂量STZ注射（30～40 mg/kg）以损伤β细胞，最终诱导出2型糖尿病[6]。该模型的优点是可以定制高脂肪饮食和STZ给药方案，能更好地模拟2型糖尿病发病期间发生的代谢特征的变化。

选择合适的HFD是一个重要的考虑因素，因为饲料的脂肪含量、脂肪来源和蔗糖含量不同，都会对最终模型的研究结果产生影响。60%或45%脂肪含量的饲料在目前最常用，60%脂肪的HFD可以更快的速度导致更严重的肥胖，但是45%脂肪的HFD更能代表人类的脂肪摄入量[34]。鉴于蔗糖在新陈代谢中的作用，故蔗糖含量也应考虑。脂肪含量会影响蔗糖含量，60%脂肪的高脂饮食通常比45%脂肪的高脂饮食含有更少的蔗糖。在进行HFHS喂养时，有研究者通过将蔗糖溶解在动物饮用水中来增加喂养量中的蔗糖[35]。与固体糖摄入相比，液态蔗糖摄入会导致体内脂肪增加，但以这种方式摄入的蔗糖量无法控制，只能通过监测饮水量来衡量。此外，蔗糖溶液可能会粘在动物的皮毛上，导致皮炎，容易产生动物福利问题。

3 遗传修饰小鼠模型的构建方法及考虑因素

研究1型和2型糖尿病的特定基因或蛋白时，常常用到遗传修饰小鼠，例如用于研究人胰岛淀粉样蛋白多肽对2型糖尿病影响的HIAPP小鼠，排除种属差异直接进行人类免疫研究的1型糖尿病人源化NOD小鼠，HU-PBMC-NOD/SCID小鼠（将成熟淋巴细胞经腹腔或静脉注射到NOD/SCID小鼠体内进行造模）和人源化SIRT6转基因小鼠（对内皮细胞SIRT6进行转基因诱导获得）[36-38]。遗传修饰小鼠是研究糖代谢和糖尿病发病机制的关键模型，通过全基因敲除或敲入可用于测量小鼠在新陈代谢、生育率、发病率和死亡率方面的变化[39]。对小鼠进行组织特异性基因敲除的造模方法已被证明在研究胰岛素信号通路时具有重要作用，例如脂肪或肝脏的组织特异性基因敲除可以用于研究其对β细胞功能的间接影响[40]。需要注意的是，在特定组织内的基因功能可能会被来自其他组织的间接表型效应所覆盖，导致一个基因的作用被忽略，或者一个基因的相对重要性被高估。选择不同品种品系的小鼠也对转基因模型的构建有影响，85%的C57BL/6小鼠在6个月时出现明显糖尿病症状，而129Sv和DBA小鼠的发病率则低得多，分别为2%和6.4%[41]。

尽管遗传修饰小鼠的选择越来越多，但在使用前仍需要对动物品系进行适当的调查及谨慎选择。在对实验数据解释时，要考虑到转基因小鼠因为品系、品种的不同导致的肥胖和血糖稳态改变不同。此外，还需要考虑同一品系同一基因的改变也会导致不同的实验结果。例如对于胰腺启动子，有研究者提出RIP-Cre小鼠为胰腺组织特异性小鼠，本身有糖耐量障碍[42]；但另一项研究指出，并没有在RIP-Cre小鼠中发现任何代谢异常[43]。据推测，这可能与遗传差异有关，因此现在多以C57BL/6小鼠作为遗传修饰造模小鼠，同时将RIP-Cre小鼠纳入实验也很有必要。

4 结论

本文总结了目前我国常用的1型糖尿病和2型糖尿病小鼠模型的特点、动物品种品系、适用范围及选择模型时的考虑因素（表1）。

选择1型或2型糖尿病小鼠模型进行实验时需要考虑的因素主要与研究目的有关，可选择多种不同的模型来代表人类糖尿病的多样性。在1型糖尿病中，选择小鼠动物模型的主要决定因素是自身免疫性；对于2型糖尿病，则重点考虑高血糖以及疾病相关机制，包括胰岛素抵抗和β细胞衰竭。2型糖尿病小鼠模型以肥胖模型为主，无论是源于遗传还是饮食，通常伴随着各种相关的病理变化（如血脂异常和动脉硬化），虽然这些并发症在2型糖尿病患者中很常见，但它只代表了糖尿病人群的一部分。应该注意的是，并非所有的糖尿病小鼠模型都会出现糖尿病并发症，如果实验需要研究的是糖尿病并发症，如神经病变、血管病变和心脏病变，则需要谨慎选择合适的模型。

表1 1、2型糖尿病小鼠模型的主要特征和适用范围汇总

Table 1 Summary of key features and applicability of mouse models of type 1 and 2 diabetes mellitus

疾病模型种类 Disease model type	构建小鼠 Modeling mice	主要特征 Main characteristic	适用范围 Scope of application
化学诱导1型糖尿病模型 Chemically induced T1DM	单次高剂量STZ诱导小鼠	单纯性高血糖	开发新型治疗1型糖尿病胰岛素
	多次低剂量STZ诱导小鼠	诱导性胰腺炎，高血糖	β细胞功能受损的1型糖尿病的治疗
自发性1型糖尿病模型 Spontaneous T1DM	NOD小鼠	胰岛被白细胞浸润，β细胞受损	自身免疫系统受损所致1型糖尿病的治疗
自发性2型糖尿病模型 Spontaneous T2DM	ob/ob小鼠	一过性高血糖（4周龄～20周龄），低代谢，食欲旺盛	肥胖为主、高血糖不严重的2型糖尿病及Ⅰ、Ⅱ期肥胖症的治疗
	db/db小鼠	严重的高胰岛素血症、高血糖和肥胖	β细胞功能受损的2型糖尿病及其并发症的治疗
	KK小鼠	2～3月龄开始肥胖，食欲旺盛，高胰岛素血症	非胰岛素依赖型2型糖尿病的治疗
	KK-Ay小鼠	8周龄开始肥胖，30周龄出现高血糖	肥胖为主非胰岛素依赖型2型糖尿病，糖尿病肾病及脑病等并发症的治疗
	Tallyho/Jng小鼠	高血糖，胰岛肥大，葡萄糖耐受不良，高胰岛素血症较轻微	基因所致肥胖型2型糖尿病的治疗
	TSOD小鼠	严重的高胰岛素血症、高血糖和肥胖	自发性肥胖型2型糖尿病的治疗
饮食诱导2型糖尿病模型 Diet-induced T2DM	高脂饮食所致肥胖小鼠	高血糖不明显，喂养持续时间久	改善胰岛素的治疗方法

注：T1DM，1型糖尿病；T2DM，2型糖尿病；STZ，链脲佐菌素。

Note: T1DM, diabetes mellitus type 1; T2DM, diabetes mellitus type 2; STZ, streptozotocin.

[作者贡献 Author Contribution]

王雪提出写作方案、思路，并负责文献检索、整理分析及初稿撰写；

呼永河负责论文架构及全文的修改指导和定稿。

[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] HASSANEIN M, AFANDI B, AHMEDANI M Y, et al. Diabetes and Ramadan: practical guidelines 2021[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 185:109185. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109185.

[2] RADENKOVIĆ M, STOJANOVIĆ M, PROSTRAN M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: the current state of the art[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2016, 78: 13-31. DOI: 10.1016/j. vascn. 2015.

11.004.

[3] 易承学, 闫曼, 钱欣. 链脲佐菌素联合高脂饮食制备糖尿病小鼠模型研究[J]. 镇江高专学报, 2021, 34(4):67-69. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8148.2021.04.016.
YI C X, YAN M, QIAN X. A study on the preparation of diabetic mouse model with streptozotocin and high fat diet[J]. J Zhenjiang Coll, 2021, 34(4): 67-69. DOI: 10.3969/j. issn. 1008-8148.2021.04.016.

[4] FURMAN B L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats[J]. Curr Protoc, 2021, 1(4): e78. DOI: 10.1002/cpz1.78.

[5] DIENER J L, MOWBRAY S, HUANG W J, et al. FGF21 normalizes plasma glucose in mouse models of type 1 diabetes and insulin receptor dysfunction[J]. Endocrinology, 2021, 162(9): bqab092. DOI: 10.1210/endocr/bqab092.

[6] LIU S, MA L L, REN X Y, et al. A new mouse model of type 2 diabetes mellitus established through combination of high-fat diet, streptozotocin and glucocorticoid[J]. Life Sci, 2021, 286:120062. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120062.

[7] LAFFERTY R A, MCSHANE L M, FRANKLIN Z J, et al. Sustained glucagon receptor antagonism in insulin-deficient high-fat-fed mice[J]. J Endocrinol, 2022, 255(2): 91-101. DOI: 10.1530/JOE-22-0106.

[8] HAYASHI K, KOJIMA R, ITO M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(6):1110-1119. DOI: 10.1248/bpb.29.1110.

[9] DEEDS M C, ANDERSON J M, ARMSTRONG A S, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models[J]. Lab Anim, 2011, 45(3):131-140. DOI: 10.1258/la.2010.010090.

[10] ANDERSON M S, BLUESTONE J A. THE NOD MOUSE: a model of immune dysregulation[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23:447-485. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643.

[11] YU F, ZHOU X, JIN X, et al. Rational construction of controllable autoimmune diabetes model depicting clinical features[J]. PLoS One, 2022, 17(1): e0260100. DOI: 10.1371/journal.pone.0260100.

[12] MCNEILLY A D, MCCRIMMON R J. Impaired hypoglycaemia awareness in type 1 diabetes: lessons from the lab[J]. Diabetologia, 2018, 61(4): 743-750. DOI: 10.1007/s00125-018-4548-8.

[13] AUBIN A M, LOMBARD-VADNAIS F, COLLIN R, et al. The NOD mouse beyond autoimmune diabetes[J]. Front Immunol, 2022, 13:874769. DOI: 10.3389/fimmu.2022.874769.

[14] VELD P I. Insulitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models[J]. Semin Immunopathol, 2014, 36(5):569-579. DOI: 10.1007/s00281-014-0438-4.

[15] HARRISON L C . The dark side of insulin: a primary autoantigen and instrument of self-destruction in type 1 diabetes[J]. Mol Metab, 2021, 52: 101288. DOI: 10.1016/j.molmet.2021.101288.

[16] TOKUDA K, IKEMOTO T, YAMASHITA S, et al. Syngeneically transplanted insulin producing cells differentiated from adipose derived stem cells undergo delayed damage by autoimmune responses in NOD mice[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 5852. DOI: 10.1038/s41598-022-09838-x.

[17] ALDRICH V R, HERNANDEZ-ROVIRA B B, CHANDWANI A, et al. NOD mice-good model for T1D but not without limitations [J]. Cell Transplant, 2020, 29:963689720939127. DOI: 10.1177/0963689720939127.

[18] GENCHI V A, D'ORIA R, PALMA G, et al. Impaired leptin signalling in obesity: is leptin a new thermolipokine?[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12):6445. DOI: 10.3390/ijms22126445.

[19] GAULT V A, KERR B D, HARRIOTT P, et al. Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 121(3):107-117. DOI: 10.1042/CS20110006.

[20] DUONG M, UNO K, NANKIVELL V, et al. Induction of obesity impairs reverse cholesterol transport in ob/ob mice[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0202102. DOI: 10.1371/journal.pone.0202102.

[21] MARCHETTI P. Islet inflammation in type 2 diabetes[J]. Diabetologia, 2016, 59(4): 668-672. DOI: 10.1007/s00125-016-3875-x.

[22] WANG F, ZHANG C, DAI L N, et al. Bafilomycin A1 accelerates chronic refractory wound healing in db/db mice[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020:6265701. DOI: 10.1155/2020/6265701.

[23] GOOSSENS G H, BLAAK E E. Unraveling the pathophysiology of obesity-related insulin resistance-a perspective on adipose tissue inflammation is directly linked to obesity-induced insulin resistance, while gut dysbiosis and mitochondrial dysfunction are not required[J]. Function (Oxf), 2020, 1(2): zqaa021. DOI: 10.1093/function/zqaa021.

[24] CHAKRABORTY G, THUMPAYIL S, LAFONTANT D E, et al. Age dependence of glucose tolerance in adult KK-Ay mice, a model of non-insulin dependent diabetes mellitus[J]. Lab Anim (NY), 2009, 38(11):364-368. DOI: 10.1038/laban1109-364.

[25] OHTOMO T, INO K, MIYASHITA R, et al. Chronic high-fat feeding impairs adaptive induction of mitochondrial fatty acid combustion-associated proteins in brown adipose tissue of mice[J]. Biochem Biophys Rep, 2017, 10:32-38. DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.02.002.

[26] DENVIR J, BOSKOVIC G, FAN J, et al. Whole genome sequence analysis of the TALLYHO/Jng mouse[J]. BMC Genom, 2016, 17(1):1-15. DOI: 10.1186/s12864-016-3245-6.

[27] PARKMAN J K, SKLIOUTOVSKAYA-LOPEZ K, MENIKDIWELA K R, et al. Effects of high fat diets and supplemental tart cherry and fish oil on obesity and type 2 diabetes in male and female C57BL/6J and TALLYHO/Jng mice[J]. J Nutr Biochem, 2021, 94:108644. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2021.108644.

[28] SHAO W H, JARGALSAIKHAN O, ICHIMURA-SHIMIZU M, et al. Spontaneous occurrence of various types of hepatocellular adenoma in the livers of metabolic syndrome-associated steatohepatitis model TSOD mice[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19):11923. DOI: 10.3390/ijms231911923.

[29] ISHIBASHI K, TAKEDA Y, NAKATANI E, et al. Activation of PPARγ at an early stage of differentiation enhances adipocyte differentiation of MEFs derived from type II diabetic TSOD mice and alters lipid droplet morphology[J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(6): 852-859. DOI: 10.1248/bpb. b17-00030.

[30] NAGY C, EINWALLNER E. Study of in vivo glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT)[J]. J Vis Exp, 2018(131):56672. DOI: 10.3791/56672.
[31] INGVORSEN C, KARP N A, LELLIOTT C J. The role of sex and body weight on the metabolic effects of high-fat diet in C57BL/6N mice[J]. Nutr Diabetes, 2017, 7(4): e261. DOI: 10.1038/nutd.2017.6.
[32] GUERRA-CANTERA S, FRAGO L M, COLLADO-PÉREZ R, et al. Sex differences in metabolic recuperation after weight loss in high fat diet-induced obese mice[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12:796661. DOI: 10.3389/fendo.2021.796661.
[33] DROZ B A, SNEED B L, JACKSON C V, et al. Correlation of disease severity with body weight and high fat diet in the FATZO/Pco mouse[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179808. DOI: 10.1371/journal.pone.0179808.
[34] SPEAKMAN J R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity[J]. Int J Obes, 2019, 43(8):1491-1492. DOI: 10.1038/s41366-019-0363-7.
[35] CHAIX A, DEOTA S, BHARDWAJ R, et al. Sex- and age-dependent outcomes of 9-hour time-restricted feeding of a Western high-fat high-sucrose diet in C57BL/6J mice[J]. Cell Rep, 2021, 36(7):109543. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109543.
[36] ROHAM P H, SAVE S N, SHARMA S. Human islet amyloid polypeptide: a therapeutic target for the management of type 2 diabetes mellitus[J]. J Pharm Anal, 2022, 12(4):556-569. DOI: 10.1016/j.jpha.2022.04.001.
[37] KING M, PEARSON T, SHULTZ L D, et al. Development of new-generation HU-PBMC-NOD/SCID mice to study human islet alloreactivity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1103:90-93. DOI: 10.1196/annals.1394.011.
[38] RIGOLLI M, WHALLEY G A. Heart failure with preserved ejection fraction[J]. J Geriatr Cardiol, 2013, 10(4):369-376. DOI: 10.3969/j.issn.1671-5411.2013.04.011.
[39] MIYACHI Y, MIYAZAWA T, OGAWA Y. HNF1A mutations and beta cell dysfunction in diabetes[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(6): 3222. DOI: 10.3390/ijms23063222.
[40] SMITH L I F, HILL T G, BOWE J E. Generating beta-cell-specific transgenic mice using the cre-lox system[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2128:181-205. DOI: 10.1007/978-1-0716-0385-7_13.
[41] MILLERSHIP S J, TUNSTER S J, VAN DE PETTE M, et al. Neuronatin deletion causes postnatal growth restriction and adult obesity in 129S2/Sv mice[J]. Mol Metab, 2018, 18:97-106. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.09.001.
[42] SINGHA A, PALAVICINI J P, PAN M X, et al. Leptin receptors in RIP-Cre25Mgn neurons mediate anti-dyslipidemia effects of leptin in insulin-deficient mice[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11:588447. DOI: 10.3389/fendo.2020.588447.
[43] FEX M, WIERUP N, NITERT M D, et al. Rat insulin promoter 2-Cre recombinase mice bred onto a pure C57BL/6J background exhibit unaltered glucose tolerance[J]. J Endocrinol, 2007, 194(3):551-555. DOI: 10.1677/JOE-07-0161.

（收稿日期：2023-02-28 修回日期：2023-05-08）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，洪怡）

[引用本文]
王雪, 呼永河. 糖尿病小鼠模型的常见种类及其构建要素分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 415-421. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.031.
WANG X, HU Y H. Analysis of common types and construction elements of diabetic mouse models[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 415-421. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.031.

****

《实验动物与比较医学》有关更正与撤稿的政策说明

一般情况下，在线发表或印刷出版的文章均被视为最终版本。本刊一般不对已发表的文章进行更正或撤稿。在确有必要的情况下，方可更正或撤稿。具体说明如下：

1. 更正：如果文章内存在无意的科学性错误，并且不会对文章的结果和结论造成重大影响，作者提交更正申请（写明更正篇目、错误原因及内容、更正后正确内容，所有作者签名）后，编辑部会尽快在期刊上发表更正启事，详细说明对原文所做的更改，并注明文章的出处。

必要时，本刊可能会发布更正后的新版本的论文，并在新版中详细说明对原文章的改动，注明更新日期。更改前的版本也会存档，读者可以直接获取，但引用时应取最新版本的文章。

2. 撤稿：在以下情况下，编辑部会对文章进行撤稿处理并发表撤稿声明。（1）当文章内有严重的科学性错误，以至于文章的结果和结论不可靠。（2）对于涉嫌抄袭、数据或材料造假等学术不端行为的文章，编辑部会协同相关单位的科研管理部门启动调查，并发表声明告知读者该文章存在风险。调查结束后，结果将被公开。如果确认该文章存在学术不端行为，编辑部会采取撤稿措施，并发表撤稿声明。

撤稿流程及说明：

1）调查流程完成后，将结果告知作者。
2）作者向编辑部提交撤稿申请文件（PDF），说明撤稿篇目及撤稿原因，所有署名作者亲笔签名，第一作者单位盖章。
3）编辑部在最新一期刊物上发布撤稿声明。
4）期刊官网撤销该文献的数字版本，同时提请中国知网、DOAJ等数据库下线该数字文献。
5）视情节严重程度，相关作者和单位会被列入本刊灰名单（新投稿将被重点审查），甚至黑名单（通告批评+拒稿）。
6）已产生的审稿费和版面费等不予退还。

《实验动物与比较医学》编辑部

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.032

卵巢储备功能减退动物模型的造模方法评价与分析

黄 慧，邓亚胜，梁天薇，郑艺清，范燕萍，荣 娜，林 江
（广西中医药大学基础医学院，南宁 530200）

[摘要] 目的 分析卵巢储备功能减退动物模型的造模特点，为卵巢储备功能减退动物模型制备的规范化提供参考。**方法** 通过检索卵巢储备功能减退动物模型的相关文献，用Microsoft Excel 2010软件归纳文献中记载的实验动物种类、造模方法、造模周期、高频检测指标和阳性药物种类等，并通过NoteExpress软件对数据结果进行评价与分析。**结果** 纳入符合标准的93篇卵巢储备功能减退动物模型相关文献，其中动物种类多选用SD大鼠（68次，73.12%），其次为C57BL/6小鼠（13次，13.98%）；造模方法多选用雷公藤制剂造模法（38次，40.86%），其次为环磷酰胺造模法（28次，30.11%）；高频检测指标为阴道脱落细胞学检测（93次，23.97%）、HE染色观察组织病理变化（72次，18.56%）；在含有阳性对照药物的64篇文献中，西药使用频数最多的是雌激素（50次，62.50%），中药以坤泰胶囊（2次，2.50%）用药频数最高。**结论** 当前卵巢储备功能减退动物模型的建立多采用雷公藤制剂造模法和环磷酰胺造模法，模型动物常选取SD大鼠，能有效地提高实验效率；应综合卵巢组织病理、血清生化指标等多种检测结果进行模型评价。

[关键词] 卵巢储备功能减退；动物模型；文献分析；模型评价；大鼠；小鼠
[中图分类号] R-332；Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)04-0422-07

Evaluation and Analysis of Modeling Methods for Animal Models with Diminished Ovarian Reserve

HUANG Hui, DENG Yasheng, LIANG Tianwei, ZHENG Yiqing, FAN Yanping, RONG Na, LIN Jiang
(School of Basic Medical Sciences, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China)
Correspondence to: LIN Jiang (ORCID: 0009-0009-6182-2335), E-mail: 1713552545@qq.com

[ABSTRACT] Objective To analysis the modeling characteristics of diminished ovarian reserve (DOR) animal models, and provide the reference for the standardization of DOR animal models. **Methods** The research articles on DOR animal models were retrieved. Microsoft Excel 2010 software was used to summarize the experimental animal species, modeling methods, modeling cycles, high-frequency detection indexes and types of positive drugs documented in the literature, and the data results were evaluated and analyzed by NoteExpress software. **Results** A total of 93 research articles on DOR that met the criteria were enrolled. And it was found that, SD rat was the most frequently used animal type (68 times, 73.12%), followed by C57BL/6 mouse (13 times, 13.98%), while the tripterygium wilfordii treatment was the most frequently used modeling method (38 times, 40.86%), followed by the cyclophosphamide treatment (28 times, 30.11%) for DOR animal models. The high frequency detection indicators were vaginal exfoliation cytology detection (93 times, 23.97%) and HE staining to observe histopathological changes (72 times, 18.56%). Among these 64 research articles containing positive control drugs, the most frequently used western drug was estrogen (50 times,62.50%) and Chinese Traditional medicine was Kuntai capsules (2 times, 2.50%). **Conclusions** SD rats are mostly used to induce modeling in animal experiments on DOR

[基金项目] 全国高校黄大年式教师团队——广西中医药大学中西医基础课程教师团队（教育部教师函〔2022〕2号）；广西一流学科建设项目——广西中医药大学中医学（桂教科研〔2022〕1号）；广西中医药多学科交叉创新团队项目“中医药活性传承的广西海洋健康产业产品与装备创新团队”（GZKJ2302）；广西中医药大学研究生教育创新计划项目“南珠蜂蜜液治疗卵巢储备功能下降的组方原理及作用机制研究”（YCSY2023001）

[第一作者] 黄 慧（1998—），女，硕士研究生，研究方向：特色方剂的配伍及成药化研究。E-mail：1054889509@qq.com
[通信作者] 林 江（1963—），女，博士，教授，博士生导师，研究方向：方剂组方原理、临床应用及实验研究。E-mail：1713552545 @qq.com。ORCID：0009-0009-6182-2335

through tripterygium wilfordii and cyclophosphamide, which can effectively improve the experimental efficiency. It is recommended to integrate the results of ovarian histopathology and serum biochemical indexes for model assessment.

[Key words] Diminished ovarian reserve; Animal model; Literature analysis; Model evaluation; Rat; Mouse

卵巢储备功能减退（diminished ovarian reserve，DOR）也称卵巢储备功能下降，是指卵巢内卵母细胞质量和（或）数量下降，并伴有血清卵泡刺激素（follicle-stimulating hormone，FSH）升高和抗米勒管激素（anti-Müllerian hormone，AMH）降低[1]。流行病学调查结果显示，国内外成年女性DOR的发病率约为26%[2]，且有逐年上升并呈年轻化的趋势。该病是一种发病机制复杂且卵巢功能呈渐进性退化的疾病，若不及早进行干预治疗，可能会逐渐演变成卵巢早衰（premature ovarian failure，POF）[3]。西医治疗DOR的方法主要是采用激素替代、促排卵联合辅助生殖技术等，短期疗效较为理想且肯定，但长时间使用会产生诸多不良反应，并增加激素依赖性肿瘤的发病风险[4]。因此，亟需研发针对DOR的新的治疗药物及方法。其中，建立可靠的动物模型是药物研发过程中不可或缺的环节。

目前报告的各类DOR动物模型使用的动物种属、造模方法等不尽相同，虽然在表型上有一定的相似之处，但它们在病理机制和药物作用途径等方面存在差异。为此，本研究拟通过检索中国知网、万方数据库、维普数据库和PubMed数据库获取相关文献资料，从造模动物选择、造模方法、药物剂量、高频检测指标、阳性药种类等方面进行评价与分析，从而为规范DOR动物模型的制备和应用提供参考依据，促进DOR病理机制和干预技术的有效研究。

1 DOR动物模型相关文献分析

1.1 检索策略

计算机检索中国知网、万方数据库、维普数据库和PubMed数据库，均为高级检索，时间从2002年1月1日至2022年10月27日。在中国知网、万方、维普数据库，以“卵巢储备功能下降”或“卵巢储备功能减退”或“卵巢储备功能”并且“动物模型”或“鼠”或“猪”或“兔”或“犬”为主题词，检索中文文献；在PubMed数据库，以“diminished ovarian reserve” AND “animal model”为主题词，检索英文文献。

1.2 筛选标准

纳入标准：研究DOR的造模成功的全部动物实验性报告，而且造模时长和药物剂量等信息完整的文献。排除标准：剔除DOR合并其他疾病或症状的文献；剔除临床试验、检测方法未说明清楚，以及属于毕业论文、会议论文、综述类型的文献；并且剔除重复文献和无法获取全文的文献。

根据文献纳入与排除标准，由两位研究者独立筛选文献，并提取纳入文献信息；若遇意见不统一，则进行讨论或寻求第三方意见。

1.3 筛选流程及资料提取与处理

经初步检索，中国知网获得文献1 057篇，万方数据库获得文献122篇，维普数据库获得文献116篇，PubMed数据库获得文献44篇，共计1 339篇文献，其中以“猪”或“兔”或“犬”为主题词获得文献0篇。通过题目、摘要和全文阅读，删除不符合纳入标准的文献1 124篇，其中包括学位论文和会议论文572篇、综述型论文327篇、临床观察性研究133篇、无法获取原文的文献92篇，查重后再排除122篇，最终共纳入93篇DOR动物模型相关的研究文献。

从纳入的93篇文献中，提取各研究涉及的实验动物种类、造模方法、造模周期、检测指标和阳性药物种类等信息，用Microsoft Excel 2010软件整理成数据集，然后运用NoteExpress软件进行归纳和分析。其中，动物名称和种类参照《常用医药研究动物模型》[5]进行规范。

2 建立DOR动物模型的要素分析

2.1 动物种类

纳入的DOR动物模型相关的93篇文献中，所用实验动物均为大鼠或小鼠，其中大鼠模型70篇，小鼠模型23篇，其余动物种类的文献为0。其中，SD大鼠使用频数为68，占比73.91%；C57BL/6小鼠使用频数为13，占比14.13%；BALB/c小鼠使用频数为4，占比4.35%；ICR小鼠使用频数为4，占比4.35%；Wistar大鼠使用频数为2，占比2.17%；KM小鼠使用频数为1，占比1.09%。另外有1篇文献提及的动物种类为SD小鼠，但在国际小鼠品系资源库以及其他资料中均未查找到。

2.2 造模方法

对93篇文献中93次动物实验进行造模方法的统计分类，可归纳为医源、环境、应激、自然老化、复合因素造模、病证结合和免疫性七大类，再细分为14种，其中使用频数排名前三的依次为雷公藤制剂造模法（40.86%）、环磷酰胺造模法（30.11%）和去氧乙烯基环己烯造模法（6.45%）。具体的造模方法概况见表1。

表1 卵巢储备功能减退动物模型的造模方法概况

Table 1 Summary of modeling methods of diminished ovarian reserve animal models

造模因素 Modeling factor	造模方法 Modeling method	模型原理 Models principle	造模周期 Modeling cycle	动物 Animal	药物剂量及使用频次 Dose/(mg·kg^{-1})×frequency	造模总频次（占比） Total modeing frequency（percentage/%）
医源性 Iatrogenic	雷公藤制剂造模法	抑制卵泡颗粒细胞的活性，促使卵巢功能减退的发生[6]	14 ~ 30 d	大鼠	50×28; 75×4; 55×2; 5×2; 75×1	38 (40.86)
				小鼠	40×1	
	环磷酰胺造模法	环磷酰胺具有明显的卵巢毒性，可以严重影响卵巢的结构及细胞增殖，对卵巢产生不可逆性的损伤，导致卵巢原始卵泡减少，卵泡永久性闭锁[7]	1 ~ 14次	大鼠	75×16; 90×1; 50×2; 50×1+8×1	28 (30.11)
				小鼠	1.8×1	
	顺铂造模法	顺铂对卵巢具有毒性作用，其主要损害卵巢皮质和颗粒细胞，诱导卵母细胞凋亡，导致卵泡数减少，加速卵泡闭锁[8]	单次	大鼠	5×1	2 (2.15)
				小鼠	3×1	
	环磷酰胺联合白消安	抑制DNA、RNA和蛋白质的合成，对卵巢功能造成损伤[9]	单次	小鼠	环磷酰胺12×1+白消安1.2×1	1 (1.08)
	连续超促排法	随着排卵周期的重复，消耗卵巢内始基卵泡数量，卵母细胞的数量显著减少，减少线粒体DNA的含量等[10]	10个周期（3次注射为一个完整超排周期）	小鼠	孕马血清促性腺激素5×1+人绒毛膜促性腺激素5×1+前列腺素$F_{2\alpha}$ 25×1[a]	1 (1.08)
	氢化可的松造模法	卵巢皮质始基卵泡和各级卵泡稀少，正常形态的卵泡也较少，闭锁卵泡明显增多，细胞间隙增大[11]	15 d	大鼠	20×1	1 (1.08)
环境 Environment	去氧乙烯基环己烯造模法	去氧乙烯基环己烯有特异性卵巢毒性，能够通过加速原始卵泡到初级卵泡的募集，降低抗米勒管激素的（AMH）表达水平[12]	15 d	大鼠	80×4; 160×1	6 (6.45)
				小鼠	160×1	
	双酚A造模法	双酚A暴露会影响卵泡的生长发育，降低卵母细胞的质量，干扰颗粒细胞类固醇激素的分泌，造成卵巢功能减退[13]	每天1次，每周连续染毒5d，共12周	大鼠	100×1	1 (1.08)
应激 Stress	不可预知性慢性应激	通过不可预知性慢性应激，使得动情周期延长，并造成卵巢和子宫的损伤，发现原始卵泡、窦前卵泡以及黄体的数量显著减少等[14]	56 d	小鼠	/	3 (3.23)
自然老化 Natural aging	自然年龄老化动物模型法	随着年龄增大，卵泡数量急剧下降，卵泡闭锁加速，卵巢储备功能下降[15]		小鼠	/	5 (5.38)
				大鼠	/	
复合因素造模 Multiple factors	序贯连续超排卵以及臭氧吸入	序贯连续超排卵消耗卵巢内始基卵泡数量，同时再结合强氧化剂，即臭氧吸入的方法，增加体内氧化应激压力，从而使卵泡质量降低[16]	10个周期（3次注射为一个完整超排周期）	小鼠	孕马血清促性腺激素5×3+人绒毛膜促性腺激素5×3+前列腺素$F_{2\alpha}$ 25×3+臭氧浓度2.8×3[ab]	3 (3.23)
病证结合 Disease–syndrome combination	雷公藤多苷片联合慢性不可预知温和刺激法	具有肾虚肝郁倾向，可在一定程度上反映本病的临床特征[17-18]	21 d	大鼠	50×1; 75×1	2 (2.15)
	半乳糖联合制动应激法	从动物的宏观表征中评价动物证候属性，说明颈背注射半乳糖联合制动应激可以制备肝郁脾虚型卵巢储备功能减退模型[19]	14 d	小鼠	20 000×1	1 (1.08)
免疫性 Immune	免疫强化试剂	卵母细胞透明带形态异常是影响卵子质量的一个重要因素[20]	14 d	小鼠	免疫试剂0.15×1; 免疫强化试剂0.15×1[c]	1 (1.08)

注：[a]孕马血清促性腺激素、人绒毛膜促性腺激素和前列腺素$F_{2\alpha}$的单位为U；[b]臭氧浓度单位为mg /m^3；[c]免疫试剂和免疫强化剂单位为mL。

Note: [a]The unit of pregnant mare serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin and prostaglandin $F_{2\alpha}$ are U; [b]the unit of ozone concentration is mg /m^3; [c]the unit of immune reagent and immunopotentiator are mL.

2.3 造模周期

由表1可知，雷公藤制剂与环磷酰胺造模法的造模周期多样，故对二者相关的66篇文献中的66次实验进行造模周期统计，结果显示在38次的雷公藤制剂造模法实验中以11～15 d的造模周期最多，共27次，其余是21～25 d有5次，26～30 d有4次，16～20 d有2次，0～10 d为0次；在28次的环磷酰胺造模法实验中，0～5 d的造模周期最多，共22次，其余是6～10 d、11～15 d和26～30 d各有2次，16～25 d为0次。

2.4 检测方法

统计纳入标准的93篇文献中DOR动物模型的检测指标，若同一组织检测手段相同，如用酶联免疫吸附法（ELISA）同时检测卵巢组织匀浆中生长分化因子-9（growth differentiation factor 9，GDF-9）、脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）及白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF）的含量，则归为一类；若同一组织检测手段为不同类型，如免疫组织化学法和蛋白质免疫印迹法（Western blot）法检测卵巢组织相关蛋白等指标，则分开计算。通过对检测指标的梳理，选取频数≥5次的指标列入表2。其中，阴道脱落细胞学检测频数最高，为93次，占高频检测指标总数（388次）的23.97%；其次为HE染色观察组织病理变化和ELISA法检测血清性激素水平，频数分别为72次和65次，分别占高频检测指标总数（388次）的18.56%和16.75%。

2.5 阳性对照药物

统计分析涉及阳性对照药物的文献共64篇，其中有12篇文献应用了2种阳性药，2篇文献应用了3种阳性药，故阳性药物使用频数为80次。西药以雌激素［（包括戊酸雌二醇、雌二醇（estradiol，E_2）和结合雌激素］的用药频数最高，为50次，占阳性药物使用总频数（80次）的62.50%；其次为脱氢表雄酮、孕酮和地屈孕酮，用药频数分别为11次（占13.75%）、9次（占11.25%）和5次（占6.25%）；枸橼酸氯米芬药使用2次（占2.5%）。中药以坤泰胶囊的用药频数最高，为2次，占阳性药物使用总频数（80次）的2.50%；此外是六味地黄方，用药频数为1次（占1.25%）。

表2 卵巢储备功能减退动物模型的高频检测方法统计

Table 2 Statistics of high-frequency detection methods in diminished ovarian reserve animal model

用于模型评价的检测方法 Detection methods for model evaluation	总频次（占比/%） Total frequency（percentage/%）
阴道脱落细胞学检测 Vaginal exfoliation cytology detection	93 (23.97)
HE染色观察组织病理变化 HE staining to observe histopathological changes	72 (18.56)
ELISA法检测血清性激素水平 ELISA to detect the serum sex hormone levels	65 (16.75)
免疫组织化学法检测卵巢组织中相关蛋白表达 Immunohistochemistry to detect the expression of related protein in ovarian tissue	33 (8.51)
蛋白质印迹法检测卵巢组织中相关蛋白表达量 Western blot to detect the expression of related protein in ovarian tissue	30 (7.73)
计算卵巢系数 Ovarian coefficient	25 (6.44)
观察一般情况 General situations	24 (6.19)
实时荧光定量PCR法检测卵巢组织相关mRNA表达 qRT-PCR to detect the expression of related mRNA in ovarian tissue	15 (3.87)
反转录PCR检测大鼠卵巢组织相关mRNA转录水平的变化情况 RT-PCR to detect the changes of mRNA transcription levels in ovarian tissue	13 (3.35)
放射免疫法检测血清激素水平变化 Radioimmunoassay to detect changes in serum hormone levels	12 (3.09)
ELISA法检测卵巢组织中生长生化因子等的含量 ELISA to detect the growth biochemical factor levels in ovarian tissue	6 (1.55)
合计 Sum	388 (100)

3 DOR动物造模及评价方法讨论

3.1 常用实验动物

目前用于制备DOR的动物主要是大鼠和小鼠，有SD大鼠、C57BL/6小鼠、BALB/c小鼠、ICR小鼠、Wistar大鼠和KM小鼠。由于鼠类动物成本低、易获得，繁殖周期短，有固定的动情周期，故DOR动物模型的选择基本以鼠类为主，其中选用SD大鼠居多，可能与其较其他鼠类品系生长发育快、对性激素敏感性强有关[21]。

3.2 常用造模方式

目前常用雷公藤多苷片和环磷酰胺制备DOR大/小鼠模型，通过灌胃此类药物使其对卵巢产生明显的毒性和不良反应。相应地，动情周期紊乱，E_2和AMH降低，FSH和促黄体生成素（luteinizing hormone，LH）升高，卵巢指数降低，卵泡细胞数量减少，颗粒细胞完整性破坏，是判断DOR动物模型成功的评价指标。

3.3 高频检测指标

在高频检测指标中，通过阴道脱落细胞学检测了解动情周期是判断DOR模型成功建立的初步指标。在检测相关生化指标中，以ELISA法检测血清为主，通常检测以性激素FSH、LH和E_2为主。有相关研究表明，这些激素的分泌水平能够有效地反映卵巢功能正常与否，DOR模型主要表现为E_2和AMH的分泌水平降低，FSH和LH的分泌水平升高[6,22]。性激素水平是评价卵巢功能是否健全的重要指标。在检测相关病理指标中，以HE染色法观察卵巢组织病理变化为主，卵泡发育情况可直接反映出卵巢的功能变化。当出现卵巢功能下降，则会有卵巢萎缩、卵泡数量显著减少、排卵能力下降、黄体数量减少和闭锁卵泡增多等情况发生。因此，卵巢的结构和功能变化是卵巢储备功能减退最直接的评价指标。

3.4 阳性药物种类

在阳性对照药物的使用方面，西药以选用雌激素为主，这是临床常用的DOR治疗方法。实验表明，雌激素能明显增加原始卵泡、窦状卵泡和黄体的数量，能在一定程度上促进卵泡发育[23]。而目前DOR动物模型选用中药作为阳性对照药物的实验较少，坤泰胶囊和六味地黄方是目前选用最多的中药，坤泰胶囊是仲景名方“黄连阿胶汤”化裁而来，由熟地黄、黄连、白芍、阿胶、黄芩、茯苓组成，具有滋阴清热、安神除烦、交通心肾的作用，可改善卵巢储备功能低下患者的卵巢功能[24]。六味地黄方的主要药物为熟地、山药、山萸肉、泽泻、丹皮、茯苓，共奏滋阴补肾之效。

4 总结

通过对以上4方面的文献分析可以得知，DOR动物模型以鼠类为主要来源，其中大鼠以SD为主，小鼠以C57BL/6为主；造模方法以雷公藤多苷片制备DOR动物模型居多，成功率高且简便易行；在高频检测指标中，以阴道脱落细胞学检测和HE染色观察组织病理变化为主；在阳性对照药物中，西药以选用雌激素为主，中药选用坤泰胶囊为主。

通过整理文献发现，DOR动物模型造模方法多种多样，但存在一些问题：第一，大部分文献采用动情周期延长或紊乱作为判断造模成功的标准，但未对其延长或紊乱的时间和程度作出统一规范，而且动情周期紊乱是通过阴道脱落细胞细胞学特征来判定的，存在一定的主观性。笔者建议在今后的实验中可通过观察卵巢组织病理变化和检测性激素水平等来反映卵巢功能变化及造模成功与否，以此增加DOR模型的可靠性。第二，缺乏统一的模型评定标准。DOR与早发性卵巢功能不全、POF等相关疾病的造模方法基本相似，后续研究可在模型构建成功后，借助相关检测指标结果来探究区分这几种疾病动物模型的标准。第三，缺乏病证结合模型，建立中医模型表征观察的文献仅有3篇。建议在证型模型制备方面也应有相关的证型标准评分来确定证型是否建立成功，以期推动中医病证结合模型的建立。

综上所述，本文通过对DOR动物模型的相关文献分析与讨论，提出针对性意见和建议，以期为促进DOR动物模型制备的规范化，以及今后研究者建立更具有可行性、可重复性的DOR动物模型提供参考，也为后续开展中医药机制研究奠定扎实的基础。

[作者贡献 Author Contribution]

黄慧负责论文设计、筛选文献和论文写作；
邓亚胜、梁天薇负责筛选文献，汇总纳入文献信息，并整理成数据集；
郑艺清、范燕萍、荣娜负责纳入文献信息核对，并进行归纳；
林江负责课题及本论文的审核与把关。

[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 References]

[1] PASTORE L M, CHRISTIANSON M S, STELLING J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR[J]. J Assist Reprod

Genet, 2018, 35(1):17-23. DOI: 10.1007/s10815-017-1058-4.

[2] DEVINE K, MUMFORD S L, WU M, et al. Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181, 536 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System[J]. Fertil Steril, 2015, 104(3): 612-619. e3. DOI: 10.1016/j. fertnstert. 2015. 05.017.

[3] 梁程程, 杨红, 齐聪, 等. 氧化应激对卵巢储备功能下降的影响及中西医抗氧化治疗研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(7):885-889. DOI: 10.7661/j.cjim.20201120.370.
LIANG C C, YANG H, QI C, et al. Effect of oxidative stress on the decline of ovarian reserve function and research progress of antioxidant therapy in traditional Chinese and western medicine[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2021, 41(7):885-889. DOI: 10.7661/j.cjim.20201120.370.

[4] 辛明蔚, 李玛建, 何军琴, 等. 资坤汤治疗卵巢储备功能下降月经后期阴虚血燥证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13):138-143. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201329.
XIN M W, LI M J, HE J Q, et al. Clinical observation of zikun decoction in treatment of syndrome of Yin deficiency and blood dryness in delayed menorrhea cycle due to decreasing ovarian reservation[J]. China Ind Econ, 2020, 26(13): 138-143. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201329.

[5] 苗明三, 朱飞鹏. 常用医药研究动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
MIAO M S, ZHU F P. Commonly used animal models for pharmaceutical research[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2007.

[6] 顾仁艳, 何丽, 张秋梅, 等. 滋阴温阳序贯方对卵巢功能减退动物模型的调节作用[J]. 吉林中医药, 2022, 42(10):1189-1194. DOI: 10.13463/j.cnki.jlzyy.2022.10.018.
GU R Y, HE L, ZHANG Q M, et al. Regulatory effect of the prescription for nourishing Yin and warming Yang in a sequential way on the animal model of ovarian[J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2022, 42(10): 1189-1194. DOI: 10.13463/j. cnki. jlzyy.2022.10.018.

[7] VERMA S, GOLDAMMER T, AITKEN R. Cloning and expression of activation induced cytidine deaminase from *Bos taurus*[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 134(3-4):151-159. DOI: 10.1016/j.vetimm.2009.08.016.

[8] SPEARS N, LOPES F, STEFANSDOTTIR A, et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection[J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(6): 673-693. DOI: 10.1093/humupd/dmz027.

[9] 张双, 周惠芳, 刘玉楠, 等. 加味地黄汤调控 Bcl-2 相关线粒体凋亡信号通路改善小鼠卵巢储备功能的研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(24): 6493-6501. DOI: 10.19540/j. cnki. cjcmm. 20210823.401.
ZHANG S, ZHOU H F, LIU Y N, et al. Modified Dihuang Decoction improves ovarian reserve in mice by regulating Bcl-2-related mitochondrial apoptosis pathway[J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(24):6493-6501. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210823.401.

[10] MIYAMOTO K, SATO E F, KASAHARA E, et al. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(4): 674-681. DOI: 10.1016/j. freeradbiomed.2010.05.025.

[11] 罗小光, 夏佩, 胡选霞. 穴位埋线和中药预防治疗雌性大鼠卵巢储备功能下降及卵巢早衰的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2):423-426.
LUO X G, XIA P, HU X X. Experimental study on prevention and treatment of decline in ovarian reserve or premature ovarian failure in female rats with catgut implantation at acupoint and Chinese medicine[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(2):423-426.

[12] 俞舒丹, 何欣, 史航毓, 等. 不同时机电针对卵巢损伤大鼠卵巢储备功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(8):1254-1258. DOI: 10.3969/j.issn.2095-8552.2021.03.039.
YU S D, HE X, SHI H Y, et al. Effects of electroacupuncture on ovarian reserve function of ovarian injury rats at different time-point[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2022, 28(8): 1254-1258. DOI: 10.3969/j.issn.2095-8552.2021.03.039.

[13] 陈宝红. 双酚 A 与早发性卵巢功能不全相关性的研究进展[J]. 安徽医学, 2022, 43(11): 1348-1351. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2022.11.024.
CHEN B H. Research progress on the correlation between bisphenol A and early-onset ovarian insufficiency[J]. Anhui Med J, 2022, 43(11): 1348-1351. DOI: 10.3969/j. issn. 1000-0399. 2022.11.024.

[14] GAO L Y, ZHAO F G, ZHANG Y, et al. Diminished ovarian reserve induced by chronic unpredictable stress in C57BL/6 mice[J]. Gynecol Endocrinol, 2020, 36(1): 49-54. DOI: 10.1080/09513590.2019.1631274.

[15] 程萌, 孔令伶俐, 许良智, 等. 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识解读[J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(10): 743-745. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2022.04.001.
CHENG M, KONG L L L, XU L Z, et al. Interpretation of expert consensus on clinical diagnosis and treatment of ovarian reserve hypofunction[J]. J Pract Obstet Gynecol, 2022, 38(10): 743-745. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2022.04.001.

[16] 崔丹丹, 马雯雯, 文露, 等. 归肾丸对卵巢储备功能低下小鼠卵巢 Oct-4、MVH 及 Egr-1 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(1): 76-80. DOI: 10.7661/CJIM.2015.01.0076.
CUI D D, MA W W, WEN L, et al. Effect of Guishen pill on expression of oct-4, MVH and egr-1 in ovary of mice with low ovarian reserve function[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2015, 35(1): 76-80. DOI: 10.7661/CJIM.2015.01.0076.

[17] 李艳华, 姜威, 刘君, 等. 补肾疏肝方联合五行音乐对卵巢储备功能减退大鼠的实验研究[J]. 天津中医药, 2021, 38(5):648-653. DOI: 10.11656/j.issn.1672-1519.2021.05.22.
LI Y H, JIANG W, LIU J, et al. Experimental study on Bushen Shugan Decoction combined with five elements music on rats with decreased ovarian reserve[J]. Tianjin J of Tradit Chin Med, 2021, 38(5): 648-653. DOI: 10.11656/j. issn. 1672-1519.2021. 05.22.

[18] 刘柳青, 刘雁峰, 潘雪, 等. 补肾调肝方对卵巢储备功能下降大鼠卵巢/海马功能及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响[J]. 环球中医药, 2021, 14(5):822-829. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-1749.2021. 05.008.
LIU L Q, LIU Y F, PAN X, et al. Effects of Bushen Tiaogan formula on ovarian and hippocampal function and PI3K/AKT/mTOR signal pathway in rats with diminished ovarian reserve [J]. Global Tradit Chin Med, 2021, 14(5):822-829. DOI: 10.3969/j. issn.1674-1749.2021.05.008.

[19] 蒋姗珊, 王亚静, 庞俏燕, 等. 当归芍药散对卵巢储备功能下降小鼠 PI3K/AKT/FOXO3a 信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(6):1335-1338. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.06.15.
JIANG S S, WANG Y J, PANG Q Y, et al. Effect of Danggui Shaoyao Powder on PI3K/AKT/FOXO3a signal pathway in mice with decreased ovarian reserve function[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(6):1335-1338. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.06.15.

[20] 冯桂玲, 李静, 周小琳. 补肾健脾方对免疫性卵巢功能衰退小鼠性激素及卵子质量的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57(16):1416-1420. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.16.017.
FENG G L, LI J, ZHOU X L. Effect of *Bushen Jianpi Fang*(补肾健脾方)on sex hormone and oocyte quality in mice with immune ovarian function decline[J]. J of Tradit Chin Med, 2016, 57(16):1416-1420. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.16.017.

[21] 秦川, 魏泓. 实验动物学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
QING C, WEI H. Laboratory animal science[M]. 2nd ed.Beijing: People's Health Publishing House, 2015.

[22] 陆星星, 任豆豆, 徐华洲, 等. 资癸益冲方对卵巢储备功能下降模型大鼠卵巢氧化损伤的影响及其作用机制[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(7):561-568. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2020.07.007.
LU X X, REN D D, XU H Z, et al. Effects of Zigui Yichong Formula on ovarian oxidative damage in rats with diminished ovarian reserve and its mechanism[J]. J of Beijing Univ of Tradit Chin Med, 2020, 43(7):561-568. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2020.07.007.

[23] 陈燕霞, 袁苑, 马堃, 等. 定坤丹对雷公藤多苷诱导卵巢储备功能低下小鼠性激素和卵泡计数的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14):78-84. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201339.
CHEN Y X, YUAN Y, MA K, et al. Effect of dingkundan on sex hormone and follicle count in mice of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides induced diminished ovarian reserve[J]. China Ind Econ, 2020, 26(14): 78-84. DOI: 10.13422/j. cnki. syfjx. 20201339.

[24] 卢君, 何玉婷. 知柏地黄丸联合坤泰胶囊治疗卵巢储备功能低下患者的临床观察[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(20):2401-2405. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.20.004.
LU J, HE Y T. Clinical observation of Zhibai Dihuang pill combined with Kuntai capsule in the treatment patients of low ovarian reserve[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(20): 2401-2405. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.20.004.

（收稿日期：2023-03-07　修回日期：2023-06-05）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，周烁）

[引用本文]
黄慧, 邓亚胜, 梁天薇, 等. 卵巢储备功能减退动物模型的造模方法评价与分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 422-428. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.032.
HUANG H, DENG Y S, LIANG T W, et al. Evaluation and analysis of modeling methods for animal models with diminished ovarian reserve[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 422-428. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.032.

****

《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，编辑部将第一时间处理。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。职务作品投稿前还应经过作者所在单位审批同意。

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

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.015

基于VOSviewer的肌少症动物模型研究可视化分析

相 磊[1]，景金珠[1]，梁 震[1]，阎国强[1]，郭文峰[1]，张 萌[1]，张 威[1]，刘亚军[2]
(1. 北京市创伤骨科研究所动物实验室，北京 100035；2. 首都医科大学附属北京积水潭医院脊柱外科，北京 100035)

[摘要] 目的 分析肌少症动物模型研究的现状、热点及发展趋势，为肌少症动物模型研究提供方向与基础资料。**方法** 检索Web of Science（WOS）核心合集数据库中1900-01-01至2022-12-31的肌少症动物模型研究英文文献，以及中国知网（CNKI）数据库中1915—2022年的肌少症动物模型研究中文文献。应用文献计量分析软件VOSviewer分析发文量、发文国家/地区、机构、作者、期刊及关键词，以揭示该领域研究的主要国家和机构以及热点和前沿方向。**结果** 从WOS核心合集数据库共检索到肌少症动物模型相关文献2 819篇，第1篇文献发表于1995年；美国是肌少症动物模型研究最多的国家，发文量为1 105篇；发文机构最多的是美国佛罗里达大学，发文量为69篇；香港大学是我国发文量最多的机构，共发文20篇；美国学者Holly V R的发文量最多，发表50篇；肌少症动物模型研究刊文量最多的学术期刊是美国的*FASEB Journal*，刊文量为196篇。CNKI数据库共检索到文献423篇，中文发文量最多的作者是李柱一，共发文19篇。WOS检索文献的关键词共现聚类分析发现，肌少症动物模型研究的热点可概括为肌少症与代谢相关性研究，肌少症动物模型细胞学及再生医学研究，肌少症动物模型与骨、肌肉和神经研究，以及肌少症与运动治疗研究。CNKI数据库检索发现失神经性肌少症模型研究最为广泛，中药对肌少症的作用研究也多有报告。文献阅读发现肌少症动物模型主要包括自然衰老模型、遗传修饰模型、高脂饮食诱导模型、失用性肌少症模型、激素诱导模型及其他疾病复合性的肌少症模型。**结论** 肌少症动物模型是近年来国内外研究的一个热点，文献计量分析在研究方向及热点、模式动物选择、动物模型制作、国内外交流与合作等方面可为肌少症动物模型研究提供基础。

[关键词] 肌少症；动物模型；文献计量；可视化分析
[中图分类号] R-332；Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)04-0429-11

A Visual Analysis on Animal Model of Sarcopenia Based on VOSviewer

XIANG Lei[1], JING Jinzhu[1], LIANG Zhen[1], YAN Guoqiang[1], GUO Wenfeng[1], ZHANG Meng[1], ZHANG Wei[1], LIU Yajun[2]
(1. Animal Laboratory of Beijing Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Beijing 100035, China; 2. Department of Spine Surgery of Beijing Jishuitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100035, China)
Correspondence to: LIU Yajun (ORCID:0000-0002-0514-6055), E-mail: drliuyajun@163.com

[ABSTRACT] Objective Analyze the current situation, hotspots and development trends of sarcopenia animal model to provide research direction and basic information for sarcopenia animal model research. **Methods** English literature of research on animal models of sarcopenia was retrieved from the Web of Science core data (WOS) set from 1900-01-01 to 2022-12-31. Chinese literature related to animal models of sarcopenia was retrieved from CNKI database between 1915 and 2022. The bibliometric analysis software VOSviewer was used to explore the countries, orgonizations, authors, hotspots and frontier directions in these studies. **Results** A total of 2 819 articles on animal models of sarcopenia were retrieved from WOS core database. The first paper was published in 1995. The United States has the largest number of animal model studies of sarcopenia with 1 105 articles. The institution with the most published articles is the University of Florida in the United States, with 69 articles. The University of Hong Kong has the highest

[第一作者] 相 磊(1982—)，男，博士，高级兽医师，主要从事实验动物研究。E-mail：xianglei-322@163.com。ORCID：0000-0002-8652-5099
[通信作者] 刘亚军(1975—)，男，博士，主任医师，教授，主要从事脊柱外科研究。E-mail：drliuyajun@163.com。ORCID：0000-0002-0514-6055

number of publications in China, with 20 articles. American author Van Remmen H, with 50 publications, is the author of the most articles. The journal with the largest number of articles published on animal models of sarcopenia is the American journal called *FASEB Journal*, with 196 articles. In total, 423 articles on animal models of sarcopenia were retrieved from the CNKI database. Author LI Zhuyi has published 19 articles, and is the author of the most articles in China. The keyword co-occurrence clustering analysis of WOS literature search found that the research focus on animal model of sarcopenia can be summarized as the correlation between sarcopenia and metabolism, cytology and regenerative medicine of sarcopenia animal models, the study of sarcopenia animal models in bone, muscle, nerve and exercise therapy. The retrieval results of CNKI database revealed that the most extensive research was about on the model of denervated sarcopenia, and researches on the effects of Chinese medicine on sarcopenia were also widely reported. Through reading the full articles or abstracts of the literature, the animal models of sacopenia mainly include natural aging model, genetic modification model, high-fat diet induction model, disuse model, hormone induction model and complex sarcopenia models of other diseases. **Conclusion** In recent years, the study on animal model of sarcopenia has become a hotspot at home and abroad. The bibliometric analysis provides a basis for the research of animal models of sarcopenia in terms of research direction, hotspots, model animal selection, animal model making, and domestic and international communication and cooperation.

[Key words] Sarcopenia; Animal model; Bibliometrics; Visual analysis

肌少症（sarcopenia）又被称为少肌症、肌肉衰减症、骨骼肌减少症、肌肉衰减综合征。2010年欧洲老年肌少症工作组（European Working Group on Sarcopenia in Old People，EWGSOP）定义肌少症是与增龄有关的进行性全身肌量减少、肌肉强度降低或身体功能减退的一种综合征，其特征是骨骼肌质量和力量进行性和全面性丧失[1]。后来EWGSOP于2018年又对肌少症的诊断及治疗等做了相应的修订，指出测量肌肉功能最可靠的指标是肌力，肌少症中的低肌力被认为是诊断肌少症的主要参考指标[2]。目前根据系统性分析及EWGSOP的报告，全球范围内肌少症患病率为6%～12%，65岁及以上的老年人患病率为14%～33%，而失能和住院患者中肌少症患病率则高达78%。亚洲肌少症工作组（Asian Working Group for Sarcopenia，AWGS）2019年报告，亚洲老年人群肌少症患病率为5.5%～25.7%，男性比女性更为显著（男性为5.1%～21.0%，女性为4.1%～16.3%）[3]。近年来，肌少症的发病机制及治疗措施研究越来越受到社会关注。

实验动物作为人类疾病研究的替代者，可以模拟肌少症的发生及发展过程，是了解肌少症发病机制、制定疾病治疗措施、进行组织工程研究的有效手段。因此，相关实验动物模型是将肌少症研究成果转化为临床应用的重要桥梁。然而，随着肌少症动物模型研究资料的不断丰富，相关研究成果的不断涌现，如何在大量文献报告中及时了解、掌握该领域的研究全貌、前沿与热点是开展肌少症动物模型研究的基础。2010年荷兰莱顿大学发布的VOSviewer软件能够对海量文献资料进行可视化分析，是了解某项研究全貌与方向的有效手段。它是一种基于网络数据图谱的可视化软件，能够基于共引或共现数据库构建作者、期刊、关键词、机构等可视化图片，展示某领域的研究全貌、研究热点和前沿方向[4-5]。利用VOSviewer进行癌症、神经科学、传染病、心血管、骨科学、免疫学等多个领域的文献计量分析已多有报告[6-11]。然而，肌少症动物模型研究相关的文献计量分析还未见报道。本研究采用VOSviewer软件对肌少症动物模型研究相关文献进行可视化分析，以期为后续研究工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 文献检索

在Web of Science（WOS）核心合集数据库内进行主题词检索，时间范围为1900-01-01至2022-12-31，检索策略为［TS=（sarcopenia or sarcopenic） AND TS=（mouse or mice or dog or rabbit or swine or pig or rat or sheep or monkey or fish or flies or eelworm or "laboratory animal" or "experiment animal"）］，检索数据范围包含了数据库内所有的英文文献类型。在中国知网（CNKI）

数据库中进行主题词检索，时间范围为1915年至2022年，检索式为SU=（肌少症+肥胖型肌少症+老年肌少症+原发性肌少症+糖尿病肌少症+肌肉疾病+MHD肌少症）AND SU=（鼠+兔+犬+猪+羊+猴+鱼+线虫+实验动物+动物实验），检索数据范围为中文文献类型。

1.2 分析方法

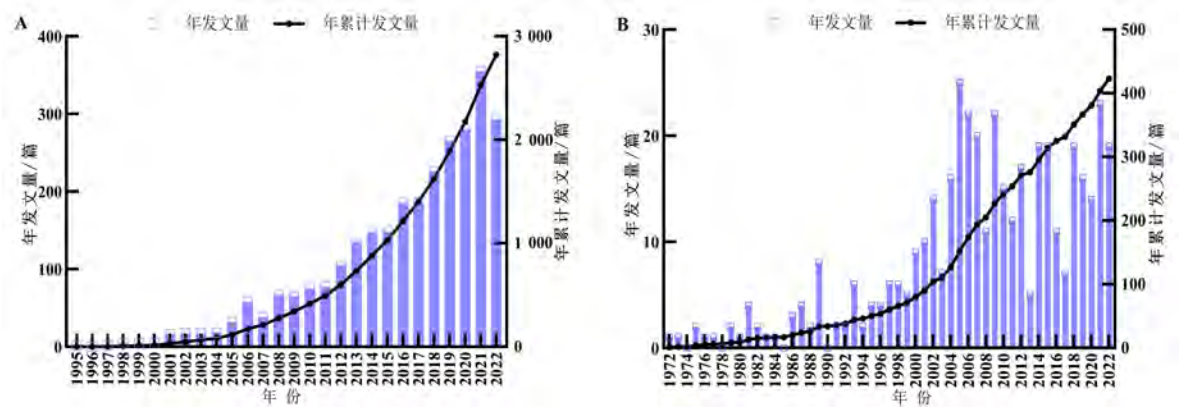
将WOS核心合集数据库检索出的文献设置为“全记录与引用的参考文献”，以“纯文本”格式导出，通VOSviewer软件对国家（中国含台湾）、机构、作者、期刊及关键词进行可视化分析。将CNKI检索到的数据保存为Endnote格式，导入VOSviewer用于作者与关键词的可视化分析，并绘制相关的可视化图谱，以分析肌少症动物模型研究热点。

2 结果

2.1 发文量统计

从WOS核心合集数据库共检索到肌少症动物模型相关文献2 819篇，第1篇文献发表于1995年。统计显示，应用动物模型开展肌少症研究的发文量呈逐年增长趋势，近10年的年均发文量均在100篇以上；近5年更是肌少症动物模型相关研究的繁荣时期，年均发文量达到了284篇（2018年226篇，2019年265篇，2020年280篇，2021年355篇，2022年293篇），这表明应用动物模型开展肌少症研究是近年来的一个热点（图1A）。通过文献全文与摘要阅读发现，在众多的肌少症实验动物中，大鼠和小鼠的应用范围最为广泛，其他用于肌少症研究的实验动物还包括秀丽隐杆线虫、斑马鱼、果蝇、猪和非人灵长类动物等。

CNKI数据库检索发现1915—2022年肌少症动物模型相关文献共423篇，发文量也呈现逐年增长的趋势，特别是在2000年后发文量呈繁荣趋势（图1B）。然而与英文文献相比，中文发文量要远低于英文发文量。中英文文献阅读发现，肌少症动物模型主要包括自然衰老模型、加速衰老模型、遗传修饰模型、高脂饮食诱导模型、激素诱导模型、失用性模型以及其他疾病复合肌少症动物模型。



注：A，英文发文量统计（WOS核心合集数据库）；B，中文发文量统计（CNKI数据库）。

Note: A, Statistics on the number of articles published in English (Web of Science core data); B, Statistics on the number of articles published in Chinese (CNKI database).

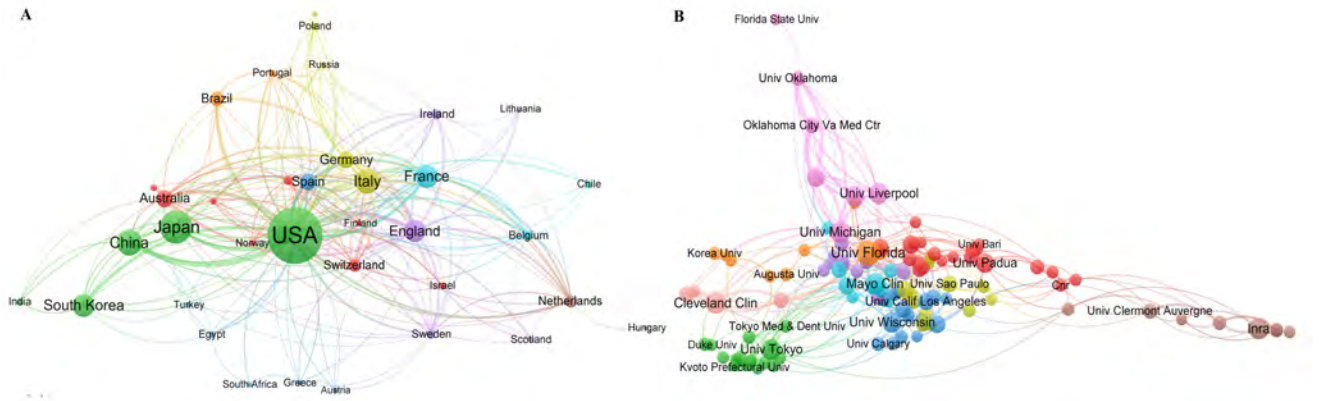
图1 肌少症动物模型研究的发文量统计

Figure 1 Statistics of the quantities of research articles on animal models of sarcopenia

2.2 发文国家和机构统计

通过VOSviewer的发文国家（或地区）共现分析发现，肌少症动物模型研究在美国最为广泛，发文量为1 105篇；其次是日本，发文量为369篇；我国（含港澳台）肌少症动物模型的发文量位居世界第3位，发文量为278篇（图2A，表1）。这些文献的引用频次方面，美国发表的文献共引用45 206次，位列第一；排在第二、第三位的是意大利和日本；虽然我国的发文量排世界第3位，但在引用频次方面却位列世界第8位（表1）。

将发文量大于10篇以上的机构进行共现分析（图2B）后发现，发文量排前10位的机构（表1）中，美国占据了7家，发文量最多的机构是佛罗里达大学发文量为69篇，引用频次为4 549；在我国，香港大学发文量最多，有20篇，位居世界第29位，引用频次为324次。



注：圆圈与标签组成一个单元，不同颜色的单元组成不同的簇。不同国家（或地区）和机构之间按不同颜色分类，节点的大小表示发文频次的多少，机构之间距离越近反映合作越密切。

Note: Circles and labels form a unit, and units of different colors form different clusters. The countries (or regions) and institutions are classified according to different colors, and the size of the nodes indicates the frequency of publishing articles. The closer the distance between the institutions, the closer the cooperation.

图2 肌少症动物模型研究的国家(或地区)和机构共现可视化图谱

Figure 2 Co-occurrence visualization map of institutions and countries/ regions for sarcopenia animal model research

表1 不同国家和机构的肌少症动物模型研究发文量与引用统计(前10位)

Table 1 The number of articles and citations statistics of sarcopenia animal models in different countries and institutions (top 10)

排名 Sort	国家 Countries	发文量 Documents	引用频次 Citations	排名 Sort	机构 Organizations	发文量 Documents	引用频次 Citations
1	美国	1 105	45 206	1	美国佛罗里达大学	69	4 549
2	日本	369	6 570	2	美国克利夫兰诊所	49	931
3	中国(含港澳台)	278	3 677	3	美国妙佑医疗国际	46	958
4	意大利	211	9 291	4	法国农业科学研究院	45	1 889
5	法国	179	5 879	5	美国密歇根大学	45	2 280
6	韩国	177	2 107	6	英国利物浦大学	42	1 117
7	英国	170	5 506	7	日本东京大学	40	1 232
8	加拿大	127	4 111	8	美国威斯康星大学	40	2 582
9	德国	96	2 267	9	美国得克萨斯大学	37	2 067
10	西班牙	95	3 917	10	美国俄克拉何马医学院	36	688

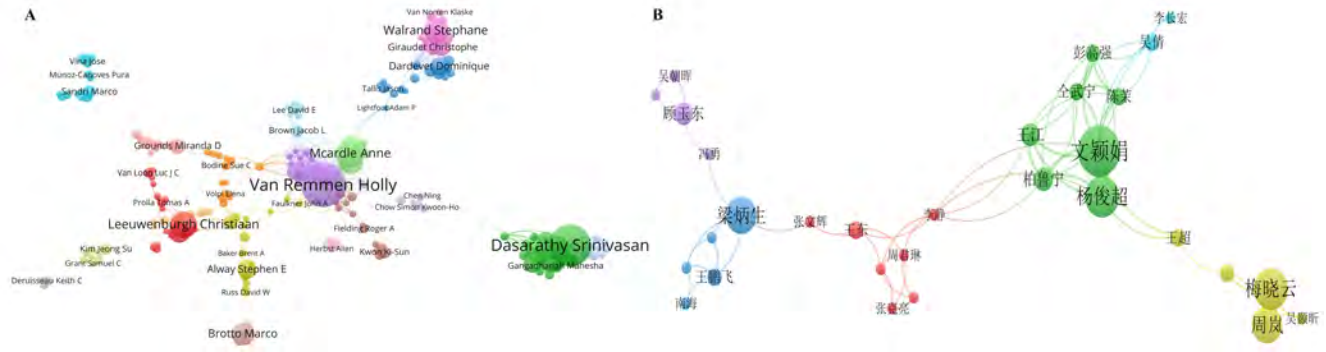
2.3 发文作者统计

WOS核心合集数据库检索数据通过VOSviewer分析时，设置每篇文章参与作者最多25人，每位作者发文量最少5篇，作者共现分析发现（图3 A），在众多文献中Holly V R共计发文50篇，引用频次为1 606，排名第一；紧跟其后的Srinivasan D发文量为48篇，引用频次为883；排名第三的作者是Avinash K，发文共计31篇，引用频次为237（表2）。

CNKI数据库检索数据通过VOSviewer分析时设置每篇文章参与作者最多25人，每位作者发文量最少2篇，作者共现分析发现，发文量排前3位的作者分别为李柱一（发文19篇）、李圣刚（发文15篇）、王云甫（发文15篇）（表2），而文颖娟、梁炳生与杨俊超与其他作者间合作最为紧密（图3B）。

2.4 期刊发文情况

对肌少症动物模型发文期刊进行耦合网络（Bibliographic coupling）分析，统计刊文5篇以上的期刊共计657种，形成了109个聚类（图4A），排名前10的杂志共发表文献778篇。表3列出了肌少症动物模型相关研究刊文量排名前十的期刊，其中*FASEB Journal*为刊文量最多的杂志，有196篇，发表文献的共引频次为3 020；其次为*Experimental Gerontology*，刊文量为111篇，共引频次为3 906；排名第三的是*Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*，刊文量为107，共引频



注：A，英文文献发文作者共现；B，中文文献发文作者共现。圆圈和标签组成一个单元，不同颜色的单元组成不同的簇。作者之间按不同颜色分类，分别代表不同的研究团队，节点的大小表示作者出现的频率高低。作者间无相互关联性，图中均不呈现。

Note: A, The co-occurrence of the authors in the English literature; B, The co-occurrence of the authors in Chinese literature. Circles and labels form a unit, and units of different colors form different clusters. The authors are classified according to different colors that represent different research teams. The size of the node indicates the frequency of the occurrence of the authors. There is no correlation between the authors, and these authors are not shown in the figure.

图3 肌少症动物模型研究的作者共现可视化图谱

Figure 3 Co-occurrence map of the authors in the study of animal model of sarcopenia

表2 中外作者在肌少症动物模型研究中的发文量统计（前10位）

Table 2 Statistics of the number of articles published by Chinese and foreign authors in the study of animal models of sarcopenia (top 10)

排名 Sort	Web of Science核心合集数据库（WOS）		CNKI数据库（CNKI）	
	作者 Authors	发文量 No. of published articles	作者 Authors	发文量 No. of published articles
1	Van remmen Holly	50	李柱一	19
2	Dasarathy Srinivasan	48	孙圣刚	15
3	Kumar Avinash	31	王云甫	15
4	Mcardle Anne	29	曹学兵	14
5	Leeuwenburgh Christiaan	28	文颖娟	10
6	Walrand Stephane	26	孟繁平	9
7	Davuluri Gangarao	25	杨俊超	8
8	Sieck Gary C	24	梅晓云	8
9	Vasilaki Aphrodite	24	何国厚	7
10	Brotto Marco	23	刘　睿	7

次为1 963，该期刊的影响因子最高，为8.9（2023年）。

2.5 关键词分析

WOS检索的文献中重复20次以上的关键词共有43个，利用VOSviewer软件进行关键词共现聚类分析，形成可视化图谱（图4B）。圆圈和标签组成一个单元，不同颜色的单元组成不同的簇，不同颜色分别代表不同的研究方向，在关键词可视化图谱中高频词出现的次数越多，节点也相对较大。关键词中共现频率次排名见表4。

VOSviewer软件的关键词共现分析对重现频率在20次以上的关键词进行了聚类分析（表5），聚类1反映了肌少症动物模型与代谢方面的内容，其主要关键词有“body composition”“insulin resistance”“sarcopenia obesity”等；聚类2反映肌少症动物模型在细胞学方面的研究，主要关键词包括“atrophy”“hypertrophy”“regeneration”“satellite cells”；聚类3反映了肌少症动物模型在肌肉形态与再生方面的研究，主要关键词有“apoptosis”“autophagy”“mitochondria”

表3 肌少症动物模型研究期刊发表文献的共引用统计(前10位)

Table 3 Co-citation statistics of articles published in animal model research journals of sarcopenia (top 10)

排名 Sort	杂志名称 Journal	影响因子(2023) Impact factor	发文量/篇 Documents	共引用频次/次 Citations
1	*FASEB Journal*	4.8	196	3 020
2	*Experimental Gerontology*	3.9	111	3 906
3	*Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*	8.9	107	1 963
4	*Nutrients*	5.9	67	1 140
5	*Aging Cell*	7.8	58	2 770
6	*Aging-Us*	5.2	52	1 486
7	*International Journal of Molecular Sciences*	5.6	50	356
8	*Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical*	5.1	48	2 295
9	*Journal of Applied Physiology*	3.3	45	1 803
10	*Frontiers in Physiology*	4.0	44	652

等；聚类4反映了肌少症动物模型与骨之间的研究内容，主要关键词包括“bone”“osteoporosis”等；聚类5主要反映肌少症动物模型在运动、营养治疗方面的研究内容，主要关键词包括“exercise”“frailty”“nutrition”等；聚类6反映肌少症动物模型与神经系统的相关性研究；聚类7反映了肌少症动物模型中的肌肉量变化的相关研究。通过关键词共现与聚类分析发现，肌少症动物模型研究热点可概括为肌少症动物模型与代谢相关性研究，肌少症动物模型细胞学及再生医学研究，肌少症动物模型与骨、肌肉以及神经研究，肌少症动物模型与运动预防、治疗研究。

CNKI数据库检索数据重复5次以上的关键词共有47个，利用VOSviewer软件进行关键词共现聚类分析，形成可视化图谱（图4C）。关键词可视化图谱中高频词出现的次数越多，节点也相对较大，如“重症肌无力”“肌萎缩”“大鼠”“肌少症”“去乙酰胆碱受体”等（表4）。VOSviewer软件的关键词共现分析对重现频率在5次以上的关键词进行了聚类分析，共得到9个聚类（表5）。在这些聚类中发现，神经相关的肌少症研究占据主导地位，中医肌少症治疗研究多有报道；与英文文献关键词分析对比，中文文献中肌少症发病机制研究相关的文献报告较少。

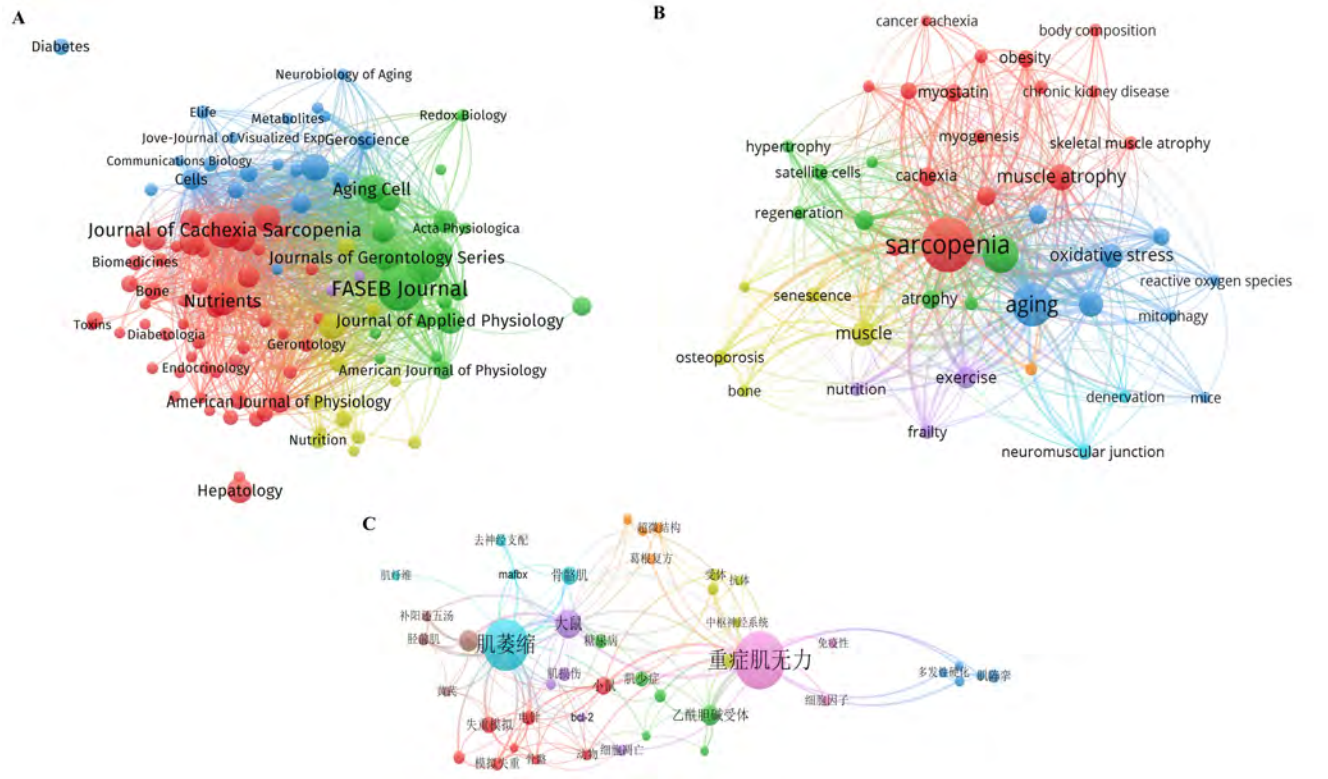
3 讨论

本研究使用文献计量学分析可视化软件VOSviewer，对WOS核心合集数据库（1900—2022年）与CNKI数据库（1915—2022年）中肌少症动物模型研究相关中英文文献进行了对比分析。发文量统计表明，肌少症动物模型相关研究的发文量呈逐年上升的趋势，说明肌少症动物模型研究日益受到广大研究者的重视。中英文发文量对比分析发现，中文发文量远低于英文发文量，表明肌少症动物模型研究中高质量中文文献的发表存在巨大潜力。

表4 肌少症动物模型研究中的中英文关键词分析(前10位)

Table 4 English and Chinese keywords analysis in the study of animal model of sarcopenia (top 10)

排名 Sort	英文关键词 English keywords	共现频率 Co-occurrence frequency	排名 Sort	中文关键词 Chinese keywords	共现频率 Co-occurrence frequency
1	sarcopenia	961	1	重症肌无力	153
2	aging	590	2	肌萎缩	124
3	skeletal muscle/muscle	529	3	大鼠	41
4	muscle atrophy	239	4	失神经	23
5	mitochondria	142	5	乙酰胆碱受体	21
6	oxidative stress	123	6	骨骼肌	17
7	exercise	93	7	小鼠	16
8	inflammation	75	8	失重模拟	14
9	autophagy	70	9	肌少症	13
10	cachexia	68	10	乙酰胆碱受体抗体	11



注：A，发表期刊的共现分析；B，英文文献关键词共现；C，中文文献关键共现。圆圈和标签组成一个单元，不同颜色的单元组成不同的簇，不同颜色分别代表不同的杂志或研究方向，节点的大小表示杂志刊文的频次高低或关键词出现的频率高低。

Note: A, co-occurrence analysis of published journals; B, Co-occurrence of key words in English literature; B, Co-occurrence of key words in Chinese literature. Circles and labels form a unit, units of different colors form different clusters, different colors represent different magazines or different research directions, and the size of nodes indicates the frequency of magazine articles or keyword occurrence.

图4 肌少症动物模型相关研究发表期刊及中英文文献中关键词共现聚类图谱

Figure 4 Published journals and keywords co-occurrence cluster map in animal model study of sarcopenia in Chinese and English literature

通过阅读检索到的文献内容发现，啮齿类动物的体型适中、繁殖速度快、遗传背景清晰、品种品系多，便于遗传修饰，且与人类一样具有卫星细胞[12]，是肌少症研究的主要实验动物。尽管啮齿类动物在肌少症研究中具有巨大优势，但是大鼠和小鼠的肌肉组成与人类还存在较大差异。哺乳动物具备两种不同收缩率和代谢活动的纤维类型（Ⅰ型和Ⅱ型纤维），Ⅱ型肌纤维又分为2A、2B与2X纤维；肌少症的发生主要与Ⅱ型肌纤维相关，与Ⅰ型肌纤维相关性不大[13]。尽管大鼠和小鼠的肌肉构成主要由Ⅱ型（快速肌肉）纤维组成，Ⅰ型（慢速肌肉）纤维含量很少，但是大鼠和小鼠的肌肉主要由富含氧化酶的2X和2B纤维组成，而来自人类等大型哺乳动物的肌肉则由含低水平氧化酶的Ⅰ型和2A型纤维构成[14]。这些差异无疑延缓了肌少症动物模型的研究进展。除啮齿类动物外，还有关于果蝇、线虫与斑马鱼作为模式动物开展肌少症研究的报告[15-16]，这些动物的优势是成本低、寿命短（如线虫18～21 d）。肌少症是一种增龄性疾病，利用这些动物能够在较短时间内模拟出随年龄增长产生的肌少症疾病模型特征（线虫7 d）。另外，利用这些动物还便于分子生物学与遗传学相关研究等[12]。然而，这些模式动物由于体型较小，与人在遗传学以及亲缘关系上差异较大，样本组织不利于后续实验研究，这些弊端在一定程度上限制了其作为肌少症模式动物的应用。另外，非人灵长类动物的生理学与解剖学特点虽然与人最为相近，但因其来源受限、价格昂贵、动物实验伦理等要求，其在肌少症研究中的应用也受到一定限制。猪由于在解剖学、生理学、代谢特征、胃肠道结构、营养吸收、脂肪代谢等方面与人一致性较高，近年来逐渐成为肥胖型肌少症研究的良好模型[17]。在肌少症动物模型研究中应根据不同动物的特点，选择合适的模式动物开展相关研究。

表5 英文和中文文献中肌少症动物模型研究关键词聚类分析

Table 5 Cluster analysis of key words in animal model of sarcopenia in English and Chinese literature

聚类 Clusters	英文文献关键词 Keywords in English literature	中文文献关键词 Keywords in Chinese literature
1	body composition, cachexia, cancer cachexia, chronic kidney disease, inflammation, insulin resistance, metabolism, muscle atrophy, muscle regeneration, muscle wasting, myogenesis, myostatin, obesity, sarcopenia, sarcopenia obesity, skeletal muscle atrophy	动物、失重模拟、小鼠、模拟失重、比目鱼肌、电针、肌、骨骼
2	aging, atrophy, hypertrophy, motor, protein synthesis, regeneration, satellite cells, skeletal muscle	乙酰胆碱受体、兔、动物模型、实验性自身免疫性重症肌无力、糖尿病、肌少症
3	aging, apoptosis, autophagy, mice, mitochondria, mitophagy, oxidative stress, reactive oxygen species	多发性硬化、帕金森病大鼠、肌阵挛、阿尔茨海默病
4	bone, muscle, osteoporosis, senescence, vitamin D	中枢神经系统、乙酰胆碱受体抗体、受体、抗体、胆碱能
5	Exercise, frailty, nutrition	Bcl-2、大鼠、细胞凋亡、肌损伤、腓肠肌
6	denervation, neuromuscular junction	MAFBX、去神经支配、肌纤维、肌萎缩、骨骼肌
7	muscle mass	咬肌、线粒体、葛根复方、超微结构
8		失神经、胫前肌、补阳还五汤、黄芪
9		免疫性、细胞因子、重症肌无力

WOS核心合集数据库统计发现，肌少症动物模型研究中，美国发文量占到全部发文量的39.2%（1 105篇/2 819篇）；我国（含港澳台）发文量约占1%（278篇/2 819篇），位居世界第3位，然而我国发文的引用频次低于美国、日本、意大利、法国、英国、加拿大与西班牙，位居世界第8位。在发文机构统计方面，排名前10的有7个机构均位于美国，我国发文量最多的香港大学位居世界第29位。此外，按2023年期刊影响因子数据显示，在肌少症动物模型研究领域发表相关文章较多的前10本期刊中，*Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*的影响因子最高（8.9），其次是*Aging Cell*（7.8）和*Nutrients*（5.9）。而CNKI数据库中检索到发表中文文献最多的前3位作者共发文49篇。由此可见，肌少症动物模型研究的主要国家是美国，目前处于世界领先地位；我国的肌少症研究相对较分散，还未形成以肌少症动物模型研究为特色的研究机构，虽然总发文量位居世界第3位，但是高引用文献较少，提示我国肌少症动物模型研究还有巨大潜力有待挖掘。

文献的核心合集主题和重要内容往往通过关键词予以表现，综合聚类分析可显示相关领域的研究热点。本研究中WOS核心合集数据库中关键词可视化与聚类分析表明，肌少症动物模型研究的热点涉及肌肉代谢，诸如肥胖、高脂饮食引起的胰岛素抵抗、炎性反应与氧化应激等可能与肌少症的形成存在密切关系[18]。其中高脂饮食是致衰老的一个风险因素，目前已形成共识。国内外学者用高脂饲料诱导啮齿类动物与猪均建立了肌少症动物模型[17-19]，研究结果表明高脂饲料诱导的肌少症动物出现了肌肉横截面积减少、肌肉内脂肪组织浸润、肌肉量下降等肌少症病理学特点。另外，随着遗传修饰技术的发展，大量与代谢相关的基因与信号通路逐渐被发掘出来，通过基因敲除或转基因技术建立了大量的肌少症动物模型，如*IGF*-1*r*、*Akt*1/*Akt*2、*FOXO*、*Zmpste*24、*Ku*80、*IL*-10、*SOD*、*TNF*-α、*Asnsd*1、*Mip*、*HtrA*2等基因敲除后均可形成肌少症动物模型[20-23]。

在关键词可视化聚类分析中还发现，年龄与肌少症是共现高频的词汇；文献阅读也证实，通过筛选老年动物可以直接选取到肌少症动物模型。例如，选取22年龄以上的非人灵长类动物和18月龄以上的大鼠，发现动物存在肌少症的病理特征；22月龄的小鼠骨骼肌活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平明显升高，比目鱼肌呈现典型的肌少症特征；24月龄大鼠的细胞外基质代谢失衡，导致胶原纤维增多，骨骼肌质

量和功能下降，从而发生肌少症[24-28]。老年动物模型往往能模拟肌少症的发病过程，但是观察周期长，在科研项目实验周期内难以实现这种长时间的观察。为了缩短肌少症动物模型的成模时间，1968美国杰克逊实验室与日本东京大学在AKM系小鼠中培育了快速衰老小鼠（senescence accelerated mouse，SAM），经过几代筛选繁育，发现SAMP6和SAMP8是建立小鼠骨骼肌衰老的理想模型；后续研究表明，SAMP8小鼠相较SAMP6小鼠的肌肉量和肌肉力量下降速度更快，开始出现下降的时间也更早，SAMP8小鼠在8月龄出现症状，10月龄出现明显的肌肉功能下降，Ⅱ型纤维明显减少[29-32]。另一种加速衰老的肌少症动物模型为POLG小鼠。因POLG是哺乳动物中唯一一种线粒体DNA（mtDNA）聚合酶，对线粒体DNA的复制和修复起到十分重要的作用，POLG缺失会导致线粒体功能的紊乱。POLG加速衰老模型小鼠在6月龄后即表现出肌肉流失，提示这可能也是一种理想的肌少症小鼠模型[33]。

关键词可视化聚类分析中还发现，肌少症与骨质疏松具有相关性，诸如地塞米松等糖皮质激素，长期注射会使动物体重增加、肌肉萎缩、脂肪向心性堆积，最终由于糖皮质激素促进蛋白质分解而诱发出肌少症[34-37]。雌激素的缺乏可能会引起骨质疏松症，因此雌性动物卵巢摘除后，诱发骨质疏松，骨骼肌的代谢水平随之发生变化，出现肌肉质量和功能的减退，最终形成肌少症[38-40]。除以上肌少症动物模型外，还有失用性肌少症模型与其他疾病复合肌少症动物模型。其中失用性造模法是将实验动物后肢进行悬吊或固定[41-43]，这种肌少症动物模型与增龄性肌少症的病理特征不一致，主要表现是Ⅰ型（慢速）肌纤维的减少比Ⅱ型（快速）肌纤维的减少更明显，该模型适合于与运动无关的肌少症研究。其他疾病复合肌少症动物模型是在其他疾病造模过程中，伴随发生了肌少症的病理学特征，如右旋糖酐硫酸钠（dextran sulfate sodium salt，DSS）诱发结肠炎[44]、5-二乙氧羰基-1，4-二氢胆碱（5-diethoxycarbonyl-1，4-dihydro-collidine，DDC）诱发慢性肝病[45-46]、肾切除以及腺嘌呤诱发尿毒症[47-48]等模型中均合并出现了肌少症的病理学特征。

CNKI数据库检索中发现神经相关肌少症动物模型研究较为广泛，如重症肌无力、帕金森病、阿尔茨海默病等神经性疾病均伴有肌少症的病理特征。在肌少症发病机制相关研究中，乙酰胆碱、细胞凋亡等神经相关发病机制导致肌少症是中文文献研究的热点；另外，中药在肌少症治疗中的应用也是近年来的一个研究热点[49-50]。阅读文献与摘要内容后发现，肌少症动物模型的造模方法丰富多样，研究者应根据自身的研究目的选择合适的模型制作方法。

本文运用VOSviewer软件对WOS核心合集数据库与CNKI数据库中肌少症动物模型研究相关文献进行了可视化分析，直观地展示了近年来肌少症动物模型研究现状，初步揭示了对该研究做出突出贡献的国家、作者，以及该领域的研究热点及发文期刊排名，并且通过文献阅读发掘了各类肌少症模型动物的优缺点以及肌少症动物模型的造模方法，能够为肌少症动物模型研究提供参考。需要指出，本研究的一个缺点是CNKI数据库应用VOSviewer分析未实现研究机构、引用频次以及发文期刊的可视化分析。相信随着肌少症研究的不断深入，文献计量学分析可以为肌少症动物模型研究提供更为坚实的理论基础和参考依据。

[作者贡献 Author Contribution]

相磊负责论文构思及初稿撰写；
景金珠和郭文峰负责英文数据库文献检索；
梁震和张萌负责中文数据库文献检索；
阎国强和张威负责VOSviewer数据库分析；
刘亚军负责研究思路设计和论文修改。

[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] CRUZ-JENTOFT A J, BAEYENS J P, BAUER J M, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People[J]. Age Ageing, 2010, 39(4): 412-423. DOI: 10.1093/ageing/afq034.

[2] CRUZ-JENTOFT A J, BAHAT G, BAUER J, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis[J]. Age Ageing, 2019, 48(4):601. DOI: 10.1093/ageing/afz046.

[3] CHEN L K, WOO J, ASSANTACHAI P, et al. Asian working group for sarcopenia: 2019 consensus update on sarcopenia diagnosis and treatment[J]. J Am Med Dir Assoc, 2020, 21(3): 300-307. e2. DOI: 10.1016/j.jamda.2019.12.012.

[4] VAN ECK N J, WALTMAN L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping[J]. Scientometrics, 2010, 84(2):523–538. DOI: 10.1007/s11192-009-0146-3.

[5] ARRUDA H, SILVA E R, LESSA M, et al. VOSviewer and bibliometrix[J]. J Med Libr Assoc, 2022, 110(3): 392-395. DOI: 10.5195/jmla.2022.1434.

[6] XU D, WANG Y L, WANG K T, et al. A scientometrics analysis and visualization of depressive disorder[J]. Curr Neuro-

pharmacol, 2021,19(6):766-786. DOI: 10.2174/1570159X18666200905151333.

[7] SHEN J M, SHEN H, KE L X, et al. Knowledge mapping of immunotherapy for hepatocellular carcinoma: a bibliometric study[J]. Front Immunol, 2022, 31(13): 815575. DOI: 10.3389/fimmu.2022.815575.

[8] MA D, YANG B, GUAN B Y, et al. A bibliometric analysis of pyroptosis from 2001 to 2021[J]. Front Immunol, 2021, 12: 731933. DOI: 10.3389/fimmu.2021.731933.

[9] AGEEL M. Pandemic critical care research during the COVID-19 (2020-2022): a bibliometric analysis using VOSviewer[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 8564649. DOI: 10.1155/2022/8564649

[10] 刘玉旋, 史大卓, 高铸烨, 等. 基于CiteSpace和VOSviewer可视化分析心房颤动与电重构研究的热点与趋势[J]. 中国医药导报, 2023, 20(20):91-96. DOI:10.20047/j.issn1673-7210.2023.20.19.
LIU Y X, SHI D Z, GAO Z Y, et al. Hotspots and trends in visual analysis of atrial fibrillation and electrical remodeling based on CiteSpace and VOSviewer[J]. China Med Her, 2023, 20(20): 91-96. DOI:10.20047/j.issn1673-7210.2023.20.19.

[11] 王亚洁, 宋心宇, 徐霞. 基于VOSviewer软件的神经根型颈椎病护理研究热点分析[J]. 华南预防医学杂志, 2020, 34(2):78-81, 95. DOI: 10.13730/j.issn.1009-2595.2020.02.002.
WANG Y J, SONG X Y, XU X. Hot spot analysis of nursing research on cervical spondylotic radiculopathy based on VOSviewer software[J]. Mil Med J South China, 2020, 34(2):78-81, 95. DOI: 10.13730/j.issn.1009-2595.2020.02.002.

[12] CHRISTIAN C J, BENIAN G M. Animal models of sarcopenia [J]. Aging Cell, 2020, 19(10):e13223. DOI: 10.1111/acel.13223.

[13] PARKS R J, FARES E, MACDONALD J K, et al. A procedure for creating a frailty index based on deficit accumulation in aging mice[J]. J Gerontol Ser A, 2012, 67A(3): 217-227. DOI: 10.1093/gerona/glr193.

[14] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Fiber types in mammalian skeletal muscles[J]. Physiol Rev, 2011, 91(4): 1447-1531. DOI: 10.1152/physrev.00031.2010.

[15] HERNDON L A, SCHMEISSNER P J, DUDARONEK J M, et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*[J]. Nature, 2002, 419: 808-814. DOI: 10.1038/nature01135.

[16] GERHARD G S. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research[J]. Exp Gerontol, 2003, 38 (11-12):1333-1341. DOI: 10.1016/j.exger.2003.10.022.

[17] GARCIA-CONTRERAS C, VAZQUEZ-GOMEZ M, TORRES-ROVIRA L, et al. Characterization of ageing- and diet-related swine models of sarcopenia and sarcopenic obesity[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3):823. DOI: 10.3390/ijms19030823.

[18] CHOW S K H, VAN MOURIK M, HUNG V W Y, et al. HR-pQCT for the evaluation of muscle quality and intramuscular fat infiltration in ageing skeletal muscle[J]. J Pers Med, 2022, 12 (6):1016. DOI: 10.3390/jpm12061016.

[19] KOB R, FELLNER C, BERTSCH T, et al. Gender-specific differences in the development of sarcopenia in the rodent model of the ageing high-fat rat[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2015, 6(2):181-191. DOI: 10.1002/jcsm.12019.

[20] FERNÁNDEZ A M, KIM J K, YAKAR S, et al. Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes[J]. Genes Dev, 2001, 15(15): 1926-1934. DOI: 10.1101/gad.908001.

[21] MAVALLI M D, DIGIROLAMO D J, FAN Y, et al. Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(11):4007-4020. DOI: 10.1172/JCI42447.

[22] LIU J P, BAKER J, PERKINS A S, et al. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)[J]. Cell, 1993, 75(1):59-72. DOI: 10.1016/S0092-8674(05)80084-4.

[23] ROMANICK M, THOMPSON L V, BROWN-BORG H M. Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2013, 1832(9):1410-1420. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.03.011.

[24] HAMBRIGHT W S, NIEDERNHOFER L J, HUARD J, et al. Murine models of accelerated aging and musculoskeletal disease[J]. Bone, 2019, 125:122-127. DOI: 10.1016/j.bone. 2019.03.002.

[25] COLMAN R J, MCKIERNAN S H, AIKEN J M, et al. Muscle mass loss in Rhesus monkeys: age of onset[J]. Exp Gerontol, 2005, 40(7):573-581. DOI: 10.1016/j.exger.2005.05.001.

[26] SHETH K A, IYER C C, WIER C G, et al. Muscle strength and size are associated with motor unit connectivity in aged mice [J]. Neurobiol Aging, 2018, 67: 128-136. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.03.016.

[27] 郭丹, 温旭, 吴丹妮, 等. 增龄性肌肉减少症小鼠肌肉组织抗氧化能力的特点[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(5): 1209-1215. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20220514.
GUO D, WEN X, WU D N, et al. Characteristics of antioxidant capacity of muscle tissue in aging sarcopenia mice[J]. J Jilin Univ Med Ed, 2022, 48(5): 1209-1215. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20220514.

[28] 朱师宇, 吕安康, 赵宇星, 等. 基质金属蛋白酶-1、金属蛋白酶组织抑制因子-1在老年肌少症大鼠中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(1): 104-109. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.01.17.
ZHU S Y, LÜ A K, ZHAO Y X, et al. Expressions of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in skeletal muscles of aged rats with sarcopenia[J]. J South Med Univ, 2020, 40(1): 104-109. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.01.17.

[29] ZHANG N, CHOW S K, LEUNG K S, et al. An animal model of co-existing sarcopenia and osteoporotic fracture in senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) [J]. Exp Gerontol, 2017, 97:1-8. DOI: 10.1016/j.exger.2017.07.008.

[30] HIROFUJI C, ISHIHARA A, ROY R R, et al. SDH activity and cell size of tibialis anterior motoneurons and muscle fibers in SAMP6[J]. Neuroreport, 2000, 11(4): 823-828. DOI: 10.1097/00001756-200003200-00033.

[31] NISHIKAWA T, TAKAHASHI J A, MATSUSHITA T, et al. Tubular aggregates in the skeletal muscle of the senescence-

accelerated mouse; SAM[J]. Mech Ageing Dev, 2000, 114(2): 89-99. DOI: 10.1016/s0047-6374(00)00088-9.

[32] DERAVE W, EIJNDE B O, RAMAEKERS M, et al. Soleus muscles of SAMP8 mice provide an accelerated model of skeletal muscle senescence[J]. Exp Gerontol, 2005, 40(7):562-572. DOI: 10.1016/j.exger.2005.05.005.

[33] TRIFUNOVIC A, WREDENBERG A, FALKENBERG M, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase[J]. Nature, 2004, 429(6990): 417-423. DOI: 10.1038/nature02517.

[34] ARU M R, ALEV K, PEHME A, et al. Changes in body composition of old rats at different time points after dexamethasone administration[J]. Curr Aging Sci, 2019, 11(4): 255-260. DOI: 10.2174/1874609812666190114144238.

[35] CHIU C S, WEBER H, ADAMSKI S, et al. Non-invasive muscle contraction assay to study rodent models of sarcopenia[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2011, 12: 246. DOI: 10.1186/1471-2474-12-246.

[36] CLEGG A, HASSAN-SMITH Z. Frailty and the endocrine system[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018, 6(9): 743-752. DOI: 10.1016/s2213-8587(18)30110-4.

[37] 王丛丛, 李军, 鲁飞翔, 等. 尿石素B对地塞米松诱导小鼠肌萎缩的改善作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(8): 1963-1966. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2018.08.070.
WANG C C, LI J, LU F X, et al. Effect and mechanism of urushin B on dexamethasone-induced muscle atrophy in mice[J]. Chin J Gerontol, 2018, 38(8): 1963-1966. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2018.08.070.

[38] DAMAS F, PHILLIPS S, VECHIN F C, et al. A review of resistance training-induced changes in skeletal muscle protein synthesis and their contribution to hypertrophy[J]. Sports Med, 2015, 45(6): 801-807. DOI: 10.1007/s40279-015-0320-0.

[39] NAKAOKA K, YAMADA A, NODA S, et al. Influence of dietary vitamin D deficiency on bone strength, body composition, and muscle in ovariectomized rats fed a high-fat diet[J]. Nutrition, 2019, 60:87-93. DOI: 10.1016/j.nut.2018.09.001.

[40] 鲁飞翔, 李军, 周仙杰, 等. 地塞米松诱导少肌性肥胖小鼠模型的建立与评价[J]. 中华灾害救援医学, 2017, 5(3): 152-156. DOI: 10.13919/j.issn.2095-6274.2017.03.008.
LU F X, LI J, ZHOU X J, et al. Evaluation and establishment of a sarcopenic obesity mouse model induced by dexamethasone[J]. Chin J Disaster Med, 2017, 5(3): 152-156. DOI: 10.13919/j.issn.2095-6274.2017.03.008.

[41] MOREY-HOLTON E R, GLOBUS R K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects[J]. J Appl Physiol, 2002, 92(4): 1367-1377. DOI: 10.1152/japplphysiol.00969.2001.

[42] GOLDSPINK D F, MORTON A J, LOUGHNA P, et al. The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat[J]. Pflügers Arch, 1986, 407(3):333-340. DOI: 10.1007/BF00585311.

[43] OHIRA Y, YOSHINAGA T, OHARA M, et al. The role of neural and mechanical influences in maintaining normal fast and slow muscle properties[J]. Cells Tissues Organs, 2006, 182(3-4):129-142. DOI: 10.1159/000093963.

[44] SAUL D, KOSINSKY R L. Dextran sodium sulfate-induced colitis as a model for sarcopenia in mice[J]. Inflamm Bowel Dis, 2020, 26(1):56-65. DOI: 10.1093/ibd/izz127.

[45] CAMPOS F, ABRIGO J, AGUIRRE F, et al. Sarcopenia in a mice model of chronic liver disease: role of the ubiquitin-proteasome system and oxidative stress[J]. Pflugers Arch, 2018, 470(10):1503-1519. DOI: 10.1007/s00424-018-2167-3.

[46] AGUIRRE F, ABRIGO J, GONZALEZ F, et al. Protective effect of angiotensin 1-7 on sarcopenia induced by chronic liver disease in mice[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 3891. DOI: 10.3390/ijms21113891.

[47] SATO E, MORI T, MISHIMA E, et al. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease[J]. Sci Rep, 2016, 6: 36618. DOI: 10.1038/srep36618.

[48] 吴永耀, 余日臻, 孙京华, 等. 尿毒症大鼠肌少症模型的造模方法及评价[J]. 现代实用医学, 2022, 34(8)1006-1008. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2022.08.010.
WU Y Y, YU R Z, SUN J H, et al. Modeling method and evaluation of sarcopenia model in uremia rats[J]. Mod Pract Med, 2022, 34(8)1006-1008. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2022.08.010.

[49] 黄研, 邢三丽, 胡怡然, 等. 补肾还精方通过调节铁死亡干预小鼠肌少症的效应和机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(7): 74-82. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2022.2107040.
HUANG Y, XING S L, HU Y R, et al. Effect and mechanism of Bushen Huanjing recipe on sarcopenia in mice by regulating iron death[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2022, 56(7): 74-82. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2022.2107040.

[50] 左祥宇, 姚荣飞, 赵麟毅, 等. 中药土党参激活PI3K/AKT/mTOR信号通路并减少2型糖尿病大鼠骨骼肌减少症[J]. 针灸和草药(英文), 2022(2):99-108.
ZUO X Y, YAO R F, ZHAO L Y, et al. Campanumoea javanica Bl. activates the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and reduces sarcopenia in a T2DM rat model[J]. Acupunct Herb Med, 2022(2):99-108.

（收稿日期：2023-02-13　修回日期：2023-04-21）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，任益凡）

[引用本文]
相磊, 景金珠, 梁震, 等. 基于VOSviewer的肌少症动物模型研究可视化分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 429-439. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.015.
XIANG L, JING J Z, LIANG Z, et al. A visual analysis on animal model of sarcopenia based on VOSviewer[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 429-439. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.015.

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.173

·病例报告·
Case Report

一例树鼩毛发上皮瘤的诊断及细胞生物学特性观察

翟珊珊[1]，梁　亮[1]，曹颖颖[1]，李竹欣[1]，王　青[1]，陶俊宇[1,2]，运晨霞[1,3]，冷　静[1,2,3]，唐海波[1,2]
(1. 广西中医药大学，南宁 530200；2. 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室，南宁 530200；3. 广西特色实验动物模型重点实验室，南宁 530200)

[摘要]　目的　观察实验动物树鼩的原发性肿瘤，为研究毛发上皮瘤的发生机制及防治措施提供基础。**方法**　将常规自然饲养过程中发现胸腹部长有肿块的1例树鼩麻醉后，手术摘除肿块，肿块组织经石蜡切片后行HE染色及免疫组织化学染色，并对肿瘤细胞进行分离和传代培养。分离获得的肿瘤细胞接种至健康树鼩及裸小鼠皮下。每天观察1次肿瘤细胞的体内成瘤情况，裸小鼠连续观察2个月，树鼩观察6个月以上。**结果**　HE染色显示发病树鼩腹部肿块组织中真皮内基底样细胞整体排列似串花瓣样，形成巢状及条索状且边缘界限清晰的肿瘤；进一步放大倍数后观察发现肿瘤细胞呈栅栏状、基底状排列，核染色深，细胞质少。免疫组织化学染色显示，肿瘤细胞中CK蛋白强阳性表达，ki-67蛋白呈低比例阳性表达；肿瘤细胞间质中Vimentin强阳性表达，Bcl2和CD10呈低比例阳性表达。分离获得的肿瘤细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养液中生长良好，可传代培养。健康树鼩及裸小鼠皮下接种肿瘤细胞后，均未见肿瘤形成。**结论**　结合肿瘤发生部位、大体形态结构、病理切片HE染色及免疫组织化学结果，综合诊断该例树鼩胸腹部肿块为毛发上皮细胞瘤。

[关键词] 树鼩；　毛发上皮瘤；　诊断；　肿瘤细胞移植；裸小鼠
[中图分类号] R-332；Q95-33　[文献标志码] A　[文章编号] 1674-5817(2023)04-0440-06

Diagnosis of Trichoepithelioma in a Tree Shrew and Observation of Cell Biological Characteristics

ZHAI Shanshan[1], LIANG Liang[1], CAO Yingying[1], LI Zhuxin[1], WANG Qing[1], TAO Junyu[1,2], YUN Chenxia[1,3], LENG Jing[1,2,3], TANG Haibo[1,2]
(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine for Treating High-Incidence Infectious Diseases with Integrative Medicine, Nanning 530200, China; 3. Key Laboratory of Characteristic Experimental Animal Models of Guangxi, Nanning 530200, China)
Correspondence to: LENG Jing (ORCID: 0000-0001-6115-2153), E-mail: lj986771558@163.com;
TANG Haibo (ORCID: 0000-0002-1815-699X), E-mail: thb514@163.com

[ABSTRACT]　Objective　To observe the primary tumor of tree shrews and to provide a basis for studying the pathogenesis and prevention of trichoepithelioma. **Methods**　A tumor was discovered in the chest and abdomen of a tree shrew during natural cultivation. The tree shrew was anesthetized, and the tumor was surgically removed. Hematoxylin and eosin (HE) staining and immunohistochemical staining were performed on the tumor tissue after paraffin section, and the tumor cells were isolated and cultured by passage. The isolated tumor cells were subcutaneously injected into healthy tree shrews and nude mice. The tumorigenesis of tumor cells *in vivo* was observed once a day, with nude mice continuously observed for 2 months and tree shrews observed for more than 6 months. **Results**　HE staining showed that the

[基金项目] 广西自然科学基金项目“基于树鼩模型探索TLR8在狂犬病发病过程中的作用机理”(2020GXNSFAA297188)；广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划“广西中医药大学-唐海波”(第三期)[桂教师范(2019)81号]；广西中医药大学高层次人才培育创新团队“冷静团队”(2022B006)；2023年广西中医药多学科交叉创新团队项目“中医药生物新材料关键技术研究与智能装备开发学科交叉创新团队”(GZKJ2303)
[第一作者] 翟珊珊(1996—)，女，硕士，主要从事抗感染免疫研究。E-mail：zhaishanshan369@126.com
[通信作者] 冷　静(1963—)，女，博士，教授，研究方向：天然免疫。E-mail：lj986771558@163.com。ORCID：0000-0001-6115-2153；
唐海波(1983—)，男，博士，副研究员，研究方向：抗感染免疫。E-mail：thb514@163.com。ORCID：0000-0002-1815-699X

basal cells in the dermis were arranged as a whole, like a string of petals, forming nests and stripe-like structures with clear boundaries. The observation results after magnification revealed that the tumor cells were arranged in a pallisade-like and basal pattern, with deep nuclear staining and minimal cytoplasmic. Immunohistochemical staining showed the high expression of CK protein and low proportion expression of ki-67 protein in tumor cells, as well as the high expression of vimentin and low expressions of Bcl2 and CD10 in tumor cell mesenchyme. The isolated tumor cells grew well in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum and could be cultured by passage, but no tumor formation was observed in healthy tree shrews and nude mice inoculated with tumor cells. **Conclusion** Combined with the location of the tumor, overall morphology, HE staining, and immunohistochemical results, the thoracoabdominal mass of the tree shrew was diagnosed as a trichoepithelioma.

[Key words] Tree shrew; Trichoepithelioma; Diagnosis; Tumor cell transplantation; Nude mice

毛发上皮瘤（trichoepithelioma）也称为腺样囊性上皮瘤、良性多囊性上皮瘤和多毛上皮瘤，在人类多发于面部，是一种具有毛囊分化的良性皮肤肿瘤，分为孤立型（单发）和遗传型（多发），两种类型的组织学特征是相同的。多发性的毛发上皮瘤与遗传因素有关，多以常染色体显性方式遗传，而单发性的毛发上皮瘤则没有家族史[1]。毛发上皮瘤的典型变异主要是由均匀的基底样细胞组成，排列成大小不等的巢状、小梁状或筛状，位于成纤维细胞组织的间质中[2-3]。虽然毛发上皮瘤是一种罕见的良性附件肿瘤，但毛发上皮瘤病变可转变成恶性基底细胞癌。在单纯的HE染色下，基底细胞癌和毛上皮瘤会有多种重叠组织病理学特征，临床上根据皮损表现也很难鉴别，因此研究毛发上皮瘤免疫组织化学标志在毛发上皮瘤中的表达强度，可为临床鉴别毛发上皮瘤和基底细胞癌提供良好的依据。

树鼩（tree shrew，拉丁学名为 *Tupaia belangeri*）主要生活在亚热带和热带地区，作为一种新兴的实验动物，具有体型小、经济易得、繁殖周期短、生育能力强等优点。树鼩全基因组与人、猕猴及小鼠基因组比较分析证实，树鼩与灵长类亲缘关系最为接近[4]。此外，树鼩的组织器官、生化代谢、生理机能等与灵长类动物具有高度相似性，且具有独特的遗传学、分子生物学和组织学表型，可用于建立更接近人类疾病特性的动物模型[5-6]。目前，已通过各种方式诱导建立了乳腺癌、肺癌、肝癌等树鼩肿瘤模型，但有关树鼩原发性肿瘤的相关报告较少，且以树鼩原发性肿瘤细胞移植方法建立树鼩肿瘤模型的报告也不多[7]。本文报告1例自然培育过程中发现的原发性毛发上皮瘤树鼩，分析其病理变化及肿瘤细胞形态特性，为后续毛发上皮瘤的发生发展机制研究及模型建立提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

树鼩（饲养编号DXw06），雌性，2018年12月由昆明医科大学引进后在广西中医药大学树鼩驯化养殖实验中心［SYXK（桂）2019-0001］饲养，引进时约12月龄，体质量110.3 g；驯化养殖至2020年6月（约30月龄）时，发现其腹部自发肿块。10只BALB/c裸小鼠，雌性，6～8周龄，体质量为（20±2）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司［SCXK（湘）2019-0004］。肿瘤细胞接种及其对照所用的8只健康树鼩为12月龄，雌性，购自昆明医科大学［SCXK（滇）K2020-0004］。所有动物均按照广西特色实验动物模型重点实验室标准方法进行饲养，实验遵循3R原则，并经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审批同意（批准编号DW20200527-274）。

1.2 主要试剂及仪器

抗CD10抗体（克隆号MX002）、抗CD34抗体（克隆号QBEnd/10）、抗肌酸激酶（creatine kinase，CK）抗体（多克隆抗体）、抗波形蛋白（Vimentin）抗体（克隆号V9）、抗Bcl2抗体（克隆号MX022）和抗ki-67抗体（克隆号MIB-1）均为鼠抗人抗体，以及辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗（产品编号KIT-5001），均购自福建迈新生物技术开发有限公司。胎牛血清、DMEM培养液、0.25%胰蛋白酶均购自美国Gibco公司；Ⅱ型胶原酶购自北京索莱宝科技有限公司；其他常规试剂均为分析纯。包埋机（HistoStar）购自ThermoFisher（美国）；切片机（RM2245）和免疫组织化学染色机（型号BOND MAX）均购自德国Leica公司。

1.3 自发肿块取材

DXw06树鼩在饲养过程中观察到其胸腹部长出一个鸽子蛋大小的肿块，经2%～4%异氟烷吸入麻醉后，手术摘除肿块。一部分肿块组织于－80 ℃保存，一部分于质量分数4%的中性多聚甲醛溶液中固定备用，另取1 g左右的肿块组织行肿瘤细胞原代培养。

1.4 石蜡切片及HE染色

将固定好的肿块组织，进行常规石蜡包埋切片，切片厚度控制在6 μm。将石蜡切片先后用苏木精和伊红进行常规HE染色后，盖上盖玻片，树胶封固。细胞核大并深染为蓝色，且细胞形状不规则、呈梭形或栅栏状排列，即判断为肿瘤细胞。

1.5 免疫组织化学观察

组织切片经抗原修复后，按抗体使用说明书分别加入稀释好的抗CD10、CD34、CK、Vimentin、Bcl2、ki-67一抗以及相应的即用型酶标羊抗小鼠二抗孵育，PBS-T溶液洗涤3次；DAB染色5 min，自来水冲洗以终止反应；苏木精对比染色细胞核3 min，自来水冲洗1 min；1%盐酸乙醇分化20 s，自来水冲洗1 min；1%稀氨水返蓝30 s，自来水冲洗30 s；不同浓度梯度的乙醇溶液脱水，烘干；二甲苯透明，中性树胶封片。50、100、200倍显微镜下观察见细胞核或细胞质着棕黄色即判断为肿瘤标志蛋白表达阳性。

1.6 肿瘤细胞原代培养

无菌条件下，用含青霉素、链霉素但无Ca^{2+}和Mg^{2+}的PBS缓冲液充分冲洗肿块组织样本。用眼科组织剪取1 g左右的组织小块，剪成小碎块后转移至无菌的100 mL三角烧瓶中。加入0.1% Ⅱ型胶原酶溶液20 mL后，将三角瓶放入37 ℃恒温振荡器中消化15 min。使用200目不锈钢筛网过滤后，1 000 r/min离心5 min，轻轻弃去上清液。加入新鲜培养液，充分吹打重悬混匀后，进行细胞计数并调整细胞密度为1×10^4个/mL。将6×10^4个细胞接种到培养瓶中，加入适量含10%胎牛血清的培养液，放入37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱中培养。待细胞生长至培养瓶的80%～90%时，即可进行肿瘤细胞的传代培养，传代方法参见文献[8]。

1.7 肿瘤细胞接种树鼩及裸小鼠实验

将分离培养的第3代肿瘤细胞消化后，用含2%胎牛血清的DMEM培养液重悬，并进行细胞计数。调整细胞密度至5×10^6个/mL，接种至树鼩右前肢腋下，每只树鼩接种0.2 mL共1×10^6个肿瘤细胞，共接种4只树鼩；对照组4只树鼩注射相同体积的含2%胎牛血清的DMEM培养液。裸小鼠接种实验同树鼩，每只裸小鼠皮下接种1×10^5个肿瘤细胞，共接种5只裸小鼠；对照组5只裸小鼠注射相同体积的含2%胎牛血清的DMEM培养液。每天观察1次肿瘤细胞的体内成瘤情况，裸小鼠连续观察2个月，树鼩观察6个月以上。

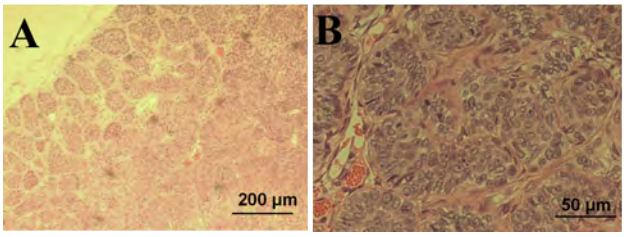
2 结果

2.1 自发肿块的树鼩整体状态及肿块形态肿瘤大小

编号为DXw06的树鼩在驯化养殖过程中，饲养人员发现其胸腹部生长出一个鸽子蛋大小的肿块。这时树鼩约30月龄，整体精神状态良好，饮食正常，且肿块处皮毛完整，未出现溃烂。将该树鼩麻醉后，称量其总体质量为133.7 g，手术摘除肿块并进行腹部缝合。剥离的肿块约12.5 g，占树鼩体质量的9.35%。手术后树鼩恢复良好，连续观察半年以上仍未见有肿块复发。

2.2 肿块的组织形态学结构

HE染色结果显示，该树鼩的肿块组织中真皮内基底样细胞整体排列呈类似串花瓣样，形成巢状及条索状的边缘界限清晰的肿瘤（图1A，放大50倍）。进一步放大200倍视野后观察发现，肿瘤细胞形状不规则，呈栅栏状、基底状排列，细胞核大且染色深，细胞质少（图1B）。



注：A，50倍视野（比例尺大小为200 μm）下，肿块组织边缘轮廓清晰，细胞呈条索状、栅栏状排列；B，200倍视野（比例尺大小为50 μm）下，肿瘤细胞呈基底细胞样，核深染，胞质少。

Note: A, The edge of the tumor tissue was clearly outlined and the tumor cells were arranged in a striated and palisade pattern (×50); B, HE-stained tumor cells were basal cell-like with deep nuclear staining and minimal cytoplasm (×200).

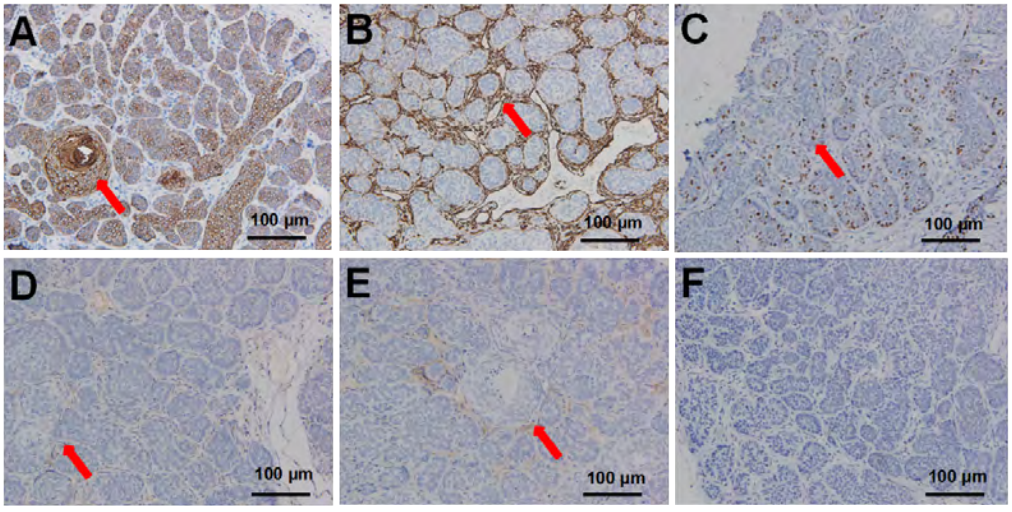
图1 树鼩原发肿瘤组织病理学变化（HE染色）

Figure 1 Histopathological changes of primary tumor in the tree shrews (HE staining)

2.3 肿瘤组织的免疫组织化学结果

免疫组织化学染色结果显示，自发肿块的肿瘤细胞中CK蛋白呈强阳性、弥漫性表达；ki-67阳性表达，阳性细胞占少量且分布于瘤体周边，阳性率约5%～

8%；肿瘤细胞间质中 Vimentin 呈强阳性表达，Bcl-2 和 CD10 呈低比例阳性表达，CD34 表达阴性（图 2）。以上肿瘤标志分子的免疫组织化学结果与人的毛发上皮瘤相似。



注：A，肿瘤细胞中 CK 强阳性表达（红色箭头所示）；B，肿瘤细胞间质中 vimentin 呈强阳性表达（红色箭头所示）；C，肿瘤细胞中 ki-67 低指数阳性表达（红色箭头所示）；D，肿瘤细胞间质中 Bcl2 呈低比例阳性表达（红色箭头所示）；E，肿瘤细胞间质中 CD10 呈低比例阳性表达（红色箭头所示）；F，肿瘤细胞中 CD34 表达呈阴性。

Note：A，Strongly positive expression of CK in tumor cells（As indicated by the red arrow）；B，Strongly positive expression of vimentin in tumor cell mesenchyme（as indicated by the red arrow）；C，Low index expression of ki-67 in tumor cells（as indicated by the red arrow）；D，Low positive expression of Bcl2 in tumor cell mesenchyme（as indicated by the red arrow）；E，Low proportion expression of CD10 in tumor cell mesenchyme（as indicated by the red arrow）；F，Negative expression of CD34 in tumor cells.

图 2 树鼩毛发上皮瘤的免疫组织化学染色结果（DAB 染色，×100）

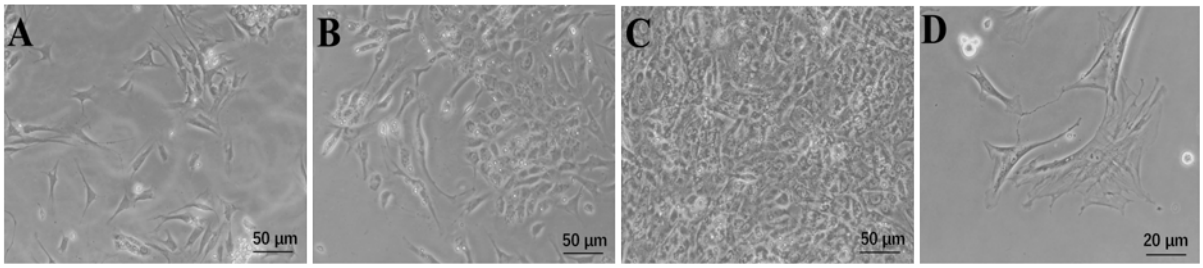
Figure 2 Immunohistochemistry of trichoepithelioma from a tree shrew（DAB staining，×100）

2.4 肿瘤细胞分离与传代

自发肿块的树鼩肿瘤细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中生长良好，可传代培养。连续传代 15 代次后细胞仍生长良好，4～5 d 即可长满单层，长满单层后细胞生长缓慢，未见多层细胞形成。肿瘤细胞呈多形性、异型性，部分有触角，符合上皮细胞瘤的特点（图 3）。

2.5 肿瘤细胞接种树鼩及裸小鼠后的成瘤情况

将分离培养的第 3 代肿瘤细胞接种至 4 只健康树鼩和 5 只裸小鼠。每只树鼩右前肢腋下接种 1×10^6 个肿瘤细胞，连续观察半年以上，均未见肿瘤形成。每只裸小鼠皮下接种 1×10^5 个肿瘤细胞，连续观察 2 个月，也未见肿瘤形成。



注：A～C，肿瘤细胞分离培养后第 1 天、第 2 天、第 5 天（×100）。D，肿瘤细胞呈多形性、不规则、有触角（×400）。

Note：A，Day 1 after tumor cell isolation and culture（×100）；B，Day 2 after tumor cell isolation and culture（×100）；C，Day 5 after tumor cell isolation and culture（×100）. D，Tumor cells were pleomorphic，irregular，and tentacled（×400）.

图 3 树鼩自发性毛发上皮瘤原代肿瘤细胞分离培养及形态特征观察

Figure 3 Culture of primary tumor cells from a tree shrew trichoepithelioma and morphological observation

3 讨论

本研究发现树鼩自发肿块为真皮内基底样细胞形成的巢状及条索状、界限清晰的肿瘤，整体结构类似串花瓣样；肿瘤细胞呈窗状、基底状排列，核染色深，细胞质少；免疫组织化学结果显示，肿瘤细胞中CK强阳性表达，ki-67低比例阳性表达，而Vimentin阳性表达于肿瘤细胞间质，Bcl2和CD10低比例阳性表达于瘤细胞间质，CD34表达阴性，综合大体解剖及病理观察结果，诊断本例原发性树鼩肿瘤为毛发上皮瘤。

毛发上皮瘤来源于毛囊外根鞘，又名囊性腺样上皮瘤、多发性毛发上皮瘤。基底细胞癌（basal cell carcinoma）又称基底细胞上皮瘤，常发生于皮肤的表皮或附属物，通常生长缓慢，很少转移，是全世界最常见的皮肤癌[9]，约占恶性皮肤肿瘤的70%[10]，全球发病率每年持续上升[11]。基底细胞癌在临床上最常见的组织分型是结节溃疡型，高达70.83%[12]。基底细胞癌和毛发上皮瘤有多种重叠的临床和组织病理学特征，如基底细胞、外周栅栏等，两者于皮疹早期较难区分，当取材的标本太浅或组织太少时，两者的组织病理学特征差异并不明显，但是两者的临床处理方法及预后有着显著的不同[13]。因此，为避免潜在的误诊，准确诊断本研究中树鼩原发肿瘤的类型，需要进行关键组织学特征的识别，包括免疫组织化学检测。为了区分基底细胞癌和毛发上皮瘤，过去十多年来学者们发现了几种免疫标志物，如雄激素受体、Ki67、CD10、Bcl-2、CD34和Ber-EP4，但没有一种被证明是区分这两种肿瘤的唯一标志物。因此，需要鉴定两种或两种以上免疫标志物来解决这一困境[14]。

Smoller等[15]研究发现人类毛发上皮瘤的肿瘤巢中表达Bcl-2，且染色仅限于最外层的基底样细胞。Swanson等[16]发现，72.7%（24/33）的人类毛发上皮瘤中，Bcl-2表达于肿瘤巢周边肿瘤细胞。另一些学者则认为Bcl-2在毛发上皮瘤中广泛表达[17]。刘金丽等[18]对20例毛发上皮瘤标本中Bcl-2表达进行免疫组织化学染色观察，发现Bcl-2阳性18例，且均为肿瘤巢周边肿瘤细胞表达。而本研究发现，树鼩中Bcl-2阳性表达于肿瘤细胞间质，与人类毛发上皮瘤中常表达于肿瘤巢周边肿瘤细胞的模式有所差异。

CD10是广泛分布于造血细胞及其肿瘤中，目前用于血液学和一些实体肿瘤的诊断和预后。AsriAslani等[19]评估了CD10在区分诊断基底细胞癌和毛发上皮瘤时的有效性，证实了CD10是区分这两种肿瘤的有效辅助标志物，即CD10阳性基底细胞主要见于基底细胞癌；而CD10阳性间质细胞在毛发上皮瘤基底巢周围凝聚，因此通过观察肿瘤外周间质细胞表达CD10的情况有利于诊断毛发上皮瘤。Astarci等[20]证实，毛发上皮瘤中基质CD10染色明显高于基底细胞癌，而基底细胞癌中外周CD10染色明显高于毛发上皮瘤。刘金丽等[18]对20例毛发上皮瘤标本进行了CD10的免疫组织化学染色，结果发现均有间质细胞CD10阳性表达。本研究中CD10在肿瘤外周间质细胞中呈阳性表达，而肿瘤基底细胞中表达呈阴性，阳性细胞分布于瘤体周边细胞且占少量，该结果与人毛皮上皮瘤相符。

目前，树鼩作为人类肿瘤疾病模型动物的研究报告较少。本文为树鼩原发性肿瘤的研究提供了背景资料，但研究深度有待加强。例如，本研究中树鼩毛发上皮瘤的细胞系已基本建立成功，后续将进一步进行细胞生物学鉴定及生物特性相关的研究。此外，本研究发现该肿瘤细胞接种后不容易形成肿瘤，其是否具有成瘤性，需要进一步增加接种肿瘤细胞的数量或选择联合免疫抑制方法及其他免疫缺陷动物来开展相关研究。

[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西中医药大学实验动物福利伦理委员会审批同意（批准编号DW20200527-274）。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of Guangxi University of Chinese Medicine (Approval No. DW20200527-274). All experiments were conducted in accordance with the requirements of Chinese laws and regulations on laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

翟珊珊负责肿瘤细胞传代及论文撰写；
梁亮负责免疫组织化学检测；
曹颖颖负责肿瘤细胞分离培养；
王青负责组织石蜡切片及HE染色；
陶俊宇和李竹欣负责肿瘤细胞接种树鼩和裸小鼠实验；
运晨霞负责免疫组织化学结果分析；
冷静和唐海波指导整个实验设计、论文修改与审核。

[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] KARIMZADEH I, NAMAZI M R, KARIMZADEH A.

Trichoepithelioma: a comprehensive review[J]. Acta Dermatovenerol Croat, 2018, 26(2):162-165.

[2] ALSAAD K O, OBAIDAT N A, GHAZARIAN D. Skin adnexal neoplasms: part 1: an approach to tumours of the pilosebaceous unit[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(2):129-144. DOI: 10.1136/jcp.2006.040337.

[3] SMOLLER B R. Lever's histopathology of the skin, 10th edition [J]. J Cutan Pathol, 2009, 36(5): 605. DOI: 10.1111/j. 1600-0560.2008.01213.x.

[4] YE M S, ZHANG J Y, YU D D, et al. Comprehensive annotation of the Chinese tree shrew genome by large-scale RNA sequencing and long-read isoform sequencing[J]. Zool Res, 2021, 42(6):692-709. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.272.

[5] 曾雯, 雷玲, 赵铖. 树鼩用于构建自身免疫性疾病动物模型展望[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(15):1918-1921. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.15.024.
ZENG W, LEI L, ZHAO C. Prospects of tree shrews used to establish animal models of autoimmune diseases[J]. Chin J Immunol, 2022, 38(15): 1918-1921. DOI: 10.3969/j. issn. 1000-484X.2022.15.024.

[6] LI R F, ZANIN M, XIA X S, et al. The tree shrew as a model for infectious diseases research[J]. J Thorac Dis, 2018, 10(S9): S2272-S2279. DOI: 10.21037/jtd.2017.12.121.

[7] 贾杰, 代解杰. 树鼩在生物医学研究中的优势与挑战[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(1):3-8. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.01.002.
JIA J, DAI J J. Advantages and challenges of tree shrews in biomedical research[J]. Lab An Comp Med, 2019, 39(1): 3-8. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.01.002.

[8] 徐新峰. 犬乳腺肿瘤细胞的分离、培养及鉴定[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
XU X F. Isolation, culture and identification of canine breast tumor cells[D]. Shihezi: Shihezi University, 2014.

[9] MIGDEN M R, CHANG A L S, DIRIX L, et al. Emerging trends in the treatment of advanced basal cell carcinoma[J]. Cancer Treat Rev, 2018, 64:1-10. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.12.009.

[10] PATTERSON J W. Weedon's skin pathology[M]. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2015.

[11] LEAR J T, CORNER C, DZIEWULSKI P, et al. Challenges and new horizons in the management of advanced basal cell carcinoma: a UK perspective[J]. Br J Cancer, 2014, 111(8):1476-1481. DOI: 10.1038/bjc.2014.270.

[12] 孙彩虹, 张彩萍, 丁克云, 等. 基底细胞癌 72 例临床特征分析[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2015, 22(2): 99-101. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8468.2015.02.004.
SUN C H, ZHANG C P, DING K Y, et al. Analysis of the clinical feature of 72 cases with basal cell carcinoma[J]. J Diagn Ther Derm Venereol, 2015, 22(2): 99-101. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-8468.2015.02.004.

[13] 吴海建. BCL-2 和 CK15 在毛发上皮瘤和基底细胞癌中的表达及其意义[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
WU H J. Expression and significance of BCL-2 and CK15 in trichoepithelioma and basa cell carcinoma[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.

[14] CARRASQUILLO O Y, CRUZVAL-O'REILLY E, SÁNCHEZ J E, et al. Differentiation of basal cell carcinoma and trichoepithelioma: an immunohistochemical study[J]. Am J Dermatopathol, 2020, 43(3): 191-197. DOI: 10.1097/dad.0000000000001783.

[15] SMOLLER B R, VAN DE RIJN M, LEBRUN D, et al. Bcl-2 expression reliably distinguishes trichoepitheliomas from basal cell carcinomas[J]. Br J Dermatol, 1994, 131(1): 28-31. DOI: 10.1111/j.1365-2133.1994.tb08453.x.

[16] SWANSON P E, FITZPATRICK M M, RITTER J H, et al. Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens[J]. J Cutan Pathol, 1998, 25(3):153-159. DOI: 10.1111/j.1600-0560.1998.tb01708.x.

[17] ARITS A H M M, PARREN L J M T, VAN MARION A M W, et al. Basal cell carcinoma and trichoepithelioma: a possible matter of confusion[J]. Int J Dermatol, 2008, 47(Suppl 1):13-17. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2008.03951.x.

[18] 刘金丽, 张弛, 薛浩伟, 等. 127 例皮肤基底细胞癌患者的临床观察[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(4):659-662. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.031.
LIU J L, ZHANG C, XUE H W, et al. Analysis of clinical feature of basal cell carcinoma in 127 patients[J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(4):659-662. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.031.

[19] SARI ASLANI F, AKBARZADEH-JAHROMI M, JOWKAR F. Value of CD10 expression in differentiating cutaneous basal from squamous cell carcinomas and basal cell carcinoma from trichoepithelioma[J]. Iran J Med Sci, 2013, 38(2):100-106.

[20] ASTARCI H M, GURBUZ G A, SENGUL D, et al. Significance of androgen receptor and CD10 expression in cutaneous basal cell carcinoma and trichoepithelioma[J]. Oncol Lett, 2015, 10 (6):3466-3470. DOI: 10.3892/ol.2015.3804.

（收稿日期：2022-11-08　修回日期：2023-04-20）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁，王艳君）

[引用本文]
翟珊珊, 梁亮, 曹颖颖, 等. 一例树鼩毛发上皮瘤的诊断及细胞生物学特性观察[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 440-445. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.173.
ZHAI S S, LIANG L, CAO Y Y, et al. Diagnosis of trichoepithelioma in a tree shrew and observation of cell biological characteristics[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 440-445. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.173.

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.039

庞万勇，兽医学博士，中国实验动物学会认证的实验动物高级医师，美国实验动物医学会认证的实验动物专科兽医师（DACLAM），以及中国兽医病理学家分会认证的兽医病理师。中国实验动物学会常务理事、实验动物医师工作委员会主任委员、实验动物福利伦理专业委员会秘书长，中国合格评定国家认可委员会（CNAS）实验动物专业委员会委员，中华医学会医师培训工程——中华医学人文培训工程专家委员会委员，国际AAALAC认可委员会委员，世界兽医协会（WVA）理事（代表实验动物专科兽医师）。本科和硕士毕业于中国农业大学动物医学院，博士毕业于爱尔兰国立都柏林大学兽医学院，曾在丹麦哥本哈根大学从事实验动物医学博士后研究。现任赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台总监，负责该公司在全球范围内动物实验外包和合作业务的动物福利合规事务，并协调该公司在中国的临床申报项目中的临床前研究部分。发表文章36篇，其中SCI文章20篇。

陶雨风，日本京都大学博士，中国合格评定国家认可委员会（CNAS）高级工程师。CNAS兽医领域实验室认可高管，动植物检疫专业委员会委员及秘书，主任评审员。国家认监委认证认可国际组织人才库专家，亚太认可合作组织（APAC）国际同行评审员。参与国家重点研发计划重点专项“食品安全检验在线质控系统研究2018YFC1603400”、基础科研条件与重大科学仪器设备研发2022年度重点专项“实验动物共性关键质量评价技术标准研究2022YFF0711000”等研究工作。主持制定认可文件CNAS-CL01-A013《检测和校准实验室能力认可准则在动物检疫领域的应用说明》、CNAS-CL01-A023《检测和校准实验室能力认可准则在实验动物检测领域的应用说明》和CNAS-CL01-A012、CNAS-CL01-A014、CNAS-GL043、CNAS-GL041等。近5年发表核心期刊论文15篇，主要研究方向为实验室认可技术及质量控制。

卢选成，研究员。本硕博毕业于中国农业大学动物医学院。2003年入职中国疾病预防控制中心，先后在设备与实验室管理处、实验室管理处、实验动物中心工作。2007年曾赴瑞典传染病控制所高等级生物安全实验室交流学习，2014年任中国疾病预防控制中心实验室管理处副处长兼实验动物中心主任，2019年任中国疾病预防控制中心实验动物中心副主任（主持工作），2023年任实验动物中心主任。主译美国兽医协会《动物安乐死指南》（2013、2020版），参编（译）著作10余部，发表论文40余篇。主要学术兼职有北京实验动物学学会生物安全专业委员会主任委员、中国实验动物学会理事，《实验动物科学》副主编等。2016年获中国实验动物学会科学技术奖优秀青年人才奖。

刘晓宇，病原生物学博士，毕业于中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。现于中国疾病预防控制中心职业卫生所动物室工作，并是本所实验动物管理与福利伦理审查委员会委员，以及本中心实验动物福利伦理委员会委员。专注实验动物福利伦理的理论和技术研究，致力于3Rs原则的推广和落实。同时，兼任北京实验动物学会理事，《实验动物科学》杂志编委，《实验动物与比较医学》期刊特邀云学术编辑。参与《动物实验人道终点评审指南》（RB/T 173—2018）、《动物实验安乐死技术规范》（RB/T 061—2021）等多项行业标准的起草，以及《实验动物管理与使用委员会工作手册》和《美国兽医协会动物安乐死指南》等书籍的翻译与审稿工作，在国内核心期刊发表多篇实验动物技术及实验动物福利相关论文。

《动物研究：体内实验报告》即ARRIVE 2.0指南的解释与阐述（三）

刘晓宇[1]，卢选成[2]，师晓萌[2]，张雨舟[2]，吕 超[2]，陈国元[3]，卢 晓[4]，白 玉[5]，高 静[6]，李 垚[7]，刘永刚[8]，陶雨风[9]，庞万勇[10]

[基金项目] 国家重点研发计划“实验动物共性关键质量评价技术标准研究”（2022YFF0711000）；中国科学技术期刊编辑学会2023年翰笔计划医学中青年编辑科研项目“动物实验医学研究及报告规范化的国际对标（指南汉化推广）”（HBJH-2023-A16）

[第一作者] 刘晓宇（1979—），女，病原生物学博士，副研究员，研究方向：实验动物医学。E-mail：liuxy@niohp.chinacdc.cn；
卢选成（1977—），男，兽医博士，研究员，研究方向：实验动物与生物安全。E-mail：luxc@chinacdc.cn

[通信作者] 陶雨风（1970—），女，博士，高级工程师，研究方向：分子免疫学。E-mail：taoyf@cnas.org.cn。ORCID：0000-0003-1925-1048；
庞万勇（1974—），男，博士，研究方向：实验动物医学。E-mail：pang1yong@outlook.com。ORCID：0000-0002-0724-2016

(1. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050; 2. 中国疾病预防控制中心实验动物中心, 北京 102206; 3. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台, 上海 200031; 4. 迪哲医药股份有限公司, 上海 201203; 5. 北京诺和诺德医药科技有限公司, 北京 102206; 6. 上海交通大学医学院临床研究中心, 上海 200025; 7. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025; 8. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001; 9. 中国合格评定国家认可中心, 北京 100062; 10. 赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台, 北京 100022)

[摘要] 提高生物医学研究结果的可重复性是一项重大挑战，研究人员透明且准确地报告其研究过程有利于读者对该研究结果的可靠性进行评估，进而重复该实验或在该成果的基础上进一步探索。ARRIVE 2.0指南是英国国家3Rs中心（NC3Rs）于2019年组织发布的一份适用于任何与活体动物研究报告相关的指导性清单，用以提高动物体内实验设计、实验实施和实验报告的规范性，以及动物实验结果的可靠性、可重复性和临床转化率。ARRIVE 2.0指南的使用不仅可以丰富动物实验研究报告的细节，确保动物实验结果信息被充分评估和利用，还可以使读者准确且清晰地了解作者所表述的内容，促进基础研究评审过程的透明化和完整性。目前，ARRIVE 2.0指南已经被国际生物医学期刊广泛采纳。本文是在国际期刊遵循ARRIVE 2.0指南的最佳实践基础上，对2020年发表于*PLoS Biology*期刊上的ARRIVE 2.0指南完整解读版（原文请见https://arriveguidelines.org）进行中文编译（第三部分包括“关键10条”里的第8~10条：“实验动物”、“实验步骤”和“结果”部分），以期促进国内研究人员充分理解并使用ARRIVE 2.0指南，提高实验动物研究及报告的规范性，助推我国实验动物科技与比较医学研究的高质量发展。

[关键词] 动物实验； ARRIVE 2.0指南； ARRIVE关键10条； 实验动物； 实验步骤； 实验结果
[中图分类号] R-332；Q95-33 **[文献标志码]** E **[文章编号]** 1674-5817(2023)04-0446-11

Explanation and Elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—Reporting Animal Research and *In Vivo* Experiments (Ⅲ)

LIU Xiaoyu[1], LU Xuancheng[2], SHI Xiaomeng[2], ZHANG Yuzhou[2], LÜ Chao[2], CHEN Guoyuan[3], LU Xiao[4], BAI Yu[5], GAO Jing[6], LI Yao[7], LIU Yonggang[8], TAO Yufeng[9], PANG Wanyong[10]

(1. National Institute for Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China; 2. Laboratory Animal Centre, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 3. Animal Core Facility, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China; 4. Dizal Pharmaceuticals Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 5. Novo Nordisk Research Centre China, Beijing 102206, China; 6. Clinical Research Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 7. Department of Laboratory Animal Science, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 8. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 9. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China; 10. Translational in Vivo Model Research Platform, Sanofi G&D, Beijing 100022, China)

Correspondence to: TAO Yufeng (ORCID: 0000-0003-1925-1048), E-mail: taoyf@cnas.org.cn;
PANG Wanyong (ORCID: 0000-0002-0724-2016), E-mail: pang1yong@outlook.com

[ABSTRACT] Improving the reproducibility of biomedical research results is a major challenge. Researchers reporting their research process transparently and accurately can help readers evaluate the reliability of the research results and further explore the experiment by repeating it or building upon its findings. The ARRIVE 2.0 guidelines, released in 2019 by the UK National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs), provide a checklist applicable to any *in vivo* animal research report. These guidelines aim to improve the standardization of experimental design, implementation, and reporting, as well as the reliability, repeatability, and clinical translatability of animal experimental results. The use of ARRIVE 2.0 guidelines not only enriches the details of animal experimental research reports, ensuring that information on animal experimental results is fully evaluated and utilized, but also enables readers to understand the content expressed by the author accurately and clearly, promoting the transparency and integrity of the fundamental research review process. At present, the ARRIVE 2.0 guidelines have been widely adopted by international biomedical journals. This article is a

Chinese translation based on the best practices of international journals following the ARRIVE 2.0 guidelines in international journals, specifically for the complete interpretation of the ARRIVE 2.0 guidelines published in the *PLoS Biology* journal in 2020 (original text can be found at https://arriveguidelines.org). The third part of the article includes the items 8-10 of ARRIVE 2.0 Essential 10, which covers "experimental animals" "experimental procedures" and "results". Its aim is to promote the full understanding and use of the ARRIVE 2.0 guidelines by domestic researchers, enhance the standardization of experimental animal research and reporting, and promote the high-quality development of experimental animal technology and comparative medicine research in China.

[Key words] Animal experiment; ARRIVE 2.0 guidelines; ARRIVE essential 10; Experimental animals; Experimental procedures; Experimental results

PLoS Biology 期刊于2020年发表了ARRIVE 2.0指南完整解读版（原文请见https://arriveguidelines.org）。该解读版是一份适用于与活体动物研究报告相关的，用以指导实验设计、实施、报告等整个动物实验研究过程规范性的内容清单和详解说明。《实验动物与比较医学》于2023年第43卷第1～3期分别介绍了动物实验研究报告的国际指南ARRIVE 2.0基本情况及期刊实施计划[15]，ARRIVE 2.0指南即《动物研究：体内实验报告》的解释和阐述第1～2部分[103-104]，后者是基于国际期刊遵循ARRIVE 2.0指南的最佳实践，对该指南解读版原文前言和“关键10条”里的条目1～7进行了中文编译。本文将继续对“关键10条”里的条目8～10，包括“实验动物”、“实验步骤”和“实验结果”等部分进行相应编译介绍，以期促进国内研究人员充分理解并使用ARRIVE 2.0指南，提高动物实验研究及报告的规范性。

1.8 条目8：实验动物

1.8.1 子条目8a：提供使用动物种类的详细资料，包括物种、品系、亚系、性别、年龄或发育阶段，以及重量（若相关）

解释：动物的种属、品系、亚系、性别、体重、年龄是影响大多数实验结果的关键因素[105-109]。报告所使用动物的特征相当于报告标准化的人类患者人口学数据；这些数据支持研究结果的内部和外部有效性，有助于其他研究人员对实验进行重复，以及对研究结果进行汇总分析。此外，报告实验动物种类还使读者能够评估实验所选动物的特征是否与研究目标相关。

文章中对动物年龄和体重进行阐述时，应包括每个实验组的汇总统计数据（如平均值及标准差），若可能，还应说明个体的基线数据（可作为补充信息或可访问的公共数据库链接）。由于动物体重的数据会随实验进程而变化，因此应注明体重测量的具体时间。对于大多数动物，准确说明实验动物的年龄比描述其发育状态能包含更多的信息量，例如被称为成年小鼠的界定范围可能从6～20周龄不等[110]。然而，在某些情况下，具体阐明动物的发育阶段比实际年龄包含的信息可能更多，例如幼年非洲爪蟾的发育程度可通过孵化温度来控制[111]。

并不是所有研究项目都可以准确报告所使用动物的体重和性别。如对于某些动物而言，其胚胎或幼体的性别可能是未知的；对某些水生动物，测量其体重可能造成严重应激。如果预期可以获得动物及实验环境的上述特征信息，却在文中未描述的，需说明理由。

报告示例1：“本实验共使用119只雄性小鼠：C57BL/6 OlaHsd小鼠（*n*=59）以及BALB/c OlaHsd小鼠（*n*=60），均来自Harlan实验室（荷兰Horst）。进行高架十字迷宫（the elevated plus maze，EPM）测试时，两种品系的小鼠均为13周龄，体重分别为（27.4±0.4）g及（27.8±0.3）g（平均值±标准误）”[112]。

报告示例2：“爪蟾原肠胚的组蛋白甲基化谱和转录组分析时，使用针对三甲基化的H3K4和H3K27特异性抗体，采用染色质免疫沉淀技术（chromatin immunoprecipitation，ChIP）制作爪蟾的原肠胚（Nieuwkoop-Faber分期11～12阶段）表观遗传谱，然后进行深度测序。此外，对polyA-选择的Nieuwkoop-Faber分期10～13阶段原肠胚RNA进行反转录和测序”[113]。

1.8.2 子条目8b：提供进一步的相关信息，如动物来源、健康/免疫状态、基因修饰状态、基因型和任何在先前实验中的使用情况等

解释：动物来源、动物健康或免疫状况，以及该动物之前是否进行过其他测试或实验，这些情况均可

能对动物的生理与行为产生影响，也会影响它们经实验处理所产生的反应，从而对研究结果造成影响。如不同来源的同一品系动物，或同一来源但不同时间获得的动物，其基因可能是有差异的[16]。动物的免疫状况或携带微生物状况也会对动物福利、实验变异性及科学结果造成影响[114-116]。

应报告所使用动物的健康状况及其曾经接受的所有实验研究。例如，若所使用动物为无特定病原体（specific pathogen-free，SPF）级动物，应列举该动物的哪些病原体为阴性。如无法明确其健康状况或未进行检测，则应予以说明。

对基因修饰动物，应描述其基因修饰状态（如敲除或过表达）、基因型（如纯合或杂合）、所操作的基因、用于创建该动物的遗传学方法和技术、基因修饰是如何确认的，以及对照组动物的相关情况（如同窝对照[117]）。

报告正确的动物命名对于理解数据和确保研究可被发现及可重现是至关重要的[118-120]。对于不同动物的标准命名法，相关资源库如下：（1）小鼠——国际标准化遗传命名委员会（https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature）；（2）大鼠——大鼠基因组和命名委员会（https://rgd.mcw.edu/）；（3）斑马鱼——斑马鱼信息网（http://zfin.org/）；（4）非洲爪蟾——非洲爪蟾数据库（http://www.xenbase.org/entry/）；（5）果蝇——果蝇数据库（http://flybase.org/）；（6）秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）——线虫数据库（https://wormbase.org/）。

报告示例1：“设计了一个结构体，用于将miR-128（miR-128-3p）基因敲入Rosa26位点。Rosa26基因组DNA片段（分别为~1.1 kb和~4.3 kb位置的5′和3′同源臂）是从C57BL/6 BAC小鼠的DNA中扩增而来，通过融合克隆技术（in-fusion cloning）依次克隆到pBasicLNeoL载体上，并通过测序确认。miR128基因（在tetO的最小启动子控制下）也被克隆到载体中，位于两个同源臂之间。此外，靶向结构体还包含了1个位于新霉素抗性基因盒侧翼的loxP位点（用于阳性筛选），以及1个白喉毒素A亚基（diphtheria toxin A，DTA）基因盒（用于阴性筛选）。使用ClaI线性化载体，以电穿孔的方法转入C57BL/6N小鼠的胚胎干细胞（embryonic stem cells，ES）。在G418筛选后，通过PCR筛选，从121个G418抗性克隆中鉴定出了7个阳性克隆。扩增了其中6个阳性克隆，使用Southern印迹杂交法进一步分析，其中4个克隆的单拷贝整合被检定为打靶正确。委托美国Cyagen Bioscience公司将靶向正确的ES细胞克隆注入囊胚，并将该囊胚植入假孕小鼠体内，用以产生嵌合体小鼠。将雄性嵌合体小鼠与Jackson实验室的Cre缺失C57BL/6小鼠进行交配，以期得到无新霉素敲入的小鼠。PCR分析证实了miR-128基因盒的正确敲入和新霉素基因盒的成功去除，所使用的引物见于补充列表”[121]。

报告示例2：“C57BL/6J（Jackson）小鼠由Charles River实验室提供。C57BL/6JOlaHsd（Harlan）小鼠由Harlan实验室提供。α-突触核蛋白敲除小鼠由英国卡迪夫大学某某教授提供，是回交12代的同类C57BL/6JCrl小鼠。TNFα$^{-/-}$小鼠由北爱尔兰贝尔法斯特女王大学某某博士提供，与最初来自Bantin & Kingman的纯合C57BL/6J品系小鼠近交，通过打靶C56BL/6小鼠的ES细胞而产生。T286A小鼠由加州大学洛杉矶分校某某教授提供，这些小鼠最初是回交5代的同类C57BL/6J小鼠，然后近交繁殖（近亲交配）14年以上，其间在3个不同场合与C57BL/6JOlaHsd小鼠进行杂交”[122]。

1.9 条目9：实验步骤

对于每个实验组（包括对照组），详细描述足够的实验细节有助于其他研究人员重复该实验，包括：

1.9.1 子条目9a：内容（做了什么）、方法（怎么做的）、材料（用了什么）

解释：手稿中需描述的基本信息有：造模流程（如疾病的诱导）、结果测量流程、实验前和实验后的操作流程（包括动物抓取、福利监测和安乐死）。动物抓取是动物应激的可能来源，所用的特定方法（如通过抓尾巴或用手捧来抓取小鼠）会影响研究结果[61,123-124]。有关该流程中基本的动物护理和监测的详细信息，将在推荐11条的第6项“动物照护和监测”中进一步详细讨论。应提供足够的操作细节，使其他人能重复这些方法，并强调所使用的质量保证和质量控制措施[125-126]。建议使用含有时间表的实验流程示意图，可以清楚地概述研究是如何进行的。表2示例描述了不同类型的干预措施及其使用资源的相关信息。

建议将实验所使用的试剂和工具用其研究资源识别码（research resource identifier，RRID）（如果有）进行标记[128-129]。RRID唯一且稳定，可以明确识别研究

表2 报告特定类型的实验流程和资源时要包含的信息示例

Table 2 Examples of information to include when reporting specific types of experimental procedures and resources

编号 No.	实验流程 Procedures	实验资源 Resources
1	药理研究(包括干预和对照)	细胞系
	● 药物配方	● 鉴别
	● 剂量	● 来源
	● 体积	● 验证和认证
	● 浓度	● RRID[128-129]
	● 给药部位和途径	
	● 给药频率	
	● 溶媒或载体溶液的配方和体积	
	● 任何可以表明所使用的药剂到达靶组织的证据	
2	外科手术(包括假手术)	试剂(如抗体、化学品)
	● 手术过程描述	● 制造商
	● 使用的麻醉剂(包括上文药理研究部分所列剂量及信息)	● 供应商
	● 术前和术后镇痛方案	● 目录号
	● 术前程序(如禁食)	● 批号(如适用)
	● 无菌术	● 药物纯度(如适用)
	● 监测(如评估手术麻醉状况)	● RRID
	● 流程是否是终末性质的	
	● 术后程序	
	● 手术持续时间和麻醉持续时间	
	● 测量的身体指标	
3	病原体感染(包括干预和对照)	设备和软件
	● 传染性病原体	● 制造商
	● 感染最高剂量	● 供应商
	● 溶媒或载体溶液的配方和体积	● 型号/版本号
	● 感染部位和途径	● 校准程序(如适用)
	● 感染时间或频率	● RRID
4	安乐死	
	● 安乐死方法,包括该方法遵循的人道标准,如AVMA[127]	
	● 药剂(如使用)(包括上文药理研究部分所列剂量及信息)	
	● 安乐死前或安乐死期间为减轻疼痛和痛苦而采取的任何措施	
	● 安乐死的时间	
	● 安乐死后收集的组织及其时间	

注：AVMA，美国兽医协会；RRID，研究资源识别码（https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411.t001）。

Note: AVMA, American Veterinary Medical Association; RRID, Research Resource Identifier (https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411.t001).

中使用的试剂或工具，从而帮助其他研究人员重复这些实验。

详细步骤也可在线保存和共享，如使用Protocols.io平台[130]。该平台为研究方案分配了数字对象标识符（digital object identifier，DOI），并允许在研究方案与出版物之间交叉引用。

报告示例1：“图4显示了器材准备、稳定、休克/损伤和复苏的时间轴。动物（猪）在手术前禁食18 h，但可自由饮水。手术当天早上，猪在猪圈中使用噻他胺-唑拉西泮（Telazol®；5～8 mg/kg肌内注射；购自美国Kalamazoo MI的Zoetis Inc.公司）镇静，称重后用异氟醚（3%，平衡100%O_2）面罩麻醉，送至实验室。耳缘静脉设置留置针，注射阿托品（0.02 mg/kg静脉滴注；购自美国Lenexa KS的Sparhawk实验室）和丁丙诺啡（3 mg/ml静脉注射；购自美国Laramie WY的ZooPharm公司）进行预防镇痛。应用眼药膏（Puralube®购自美国Fera Pharmaceuticals公司）防止角膜干燥。动物背卧位插管，使用带套囊的6或7 Fr气管插管。异氟醚维持麻醉（1%～1.5%；21%～23%O_2，平衡N_2）。在口腔内放置兽医脉搏血氧测量仪（购自美国Irvine CA的Masimo公司，型号：Radical-7）来监测血氧饱和度（saturation of peripheral oxygen，SpO_2）和心率（heart rate，HR）。用直肠探头监测核心温度，并通过在动物身下放置用微处理器控

制的反馈式水毯（Blankertrol ®Bll 购自美国 Cincinnati OH 的 Cincinnati Sub-Zero 公司），使核心温度保持在 36.5 ~ 38 ℃。实验期间，每 5 min 通过反射（角膜触诊、踏板屈曲、冠状动脉夹片）反应和监测重要生命体征（SpO_2、心率、核心温度）评估麻醉深度”[131]。

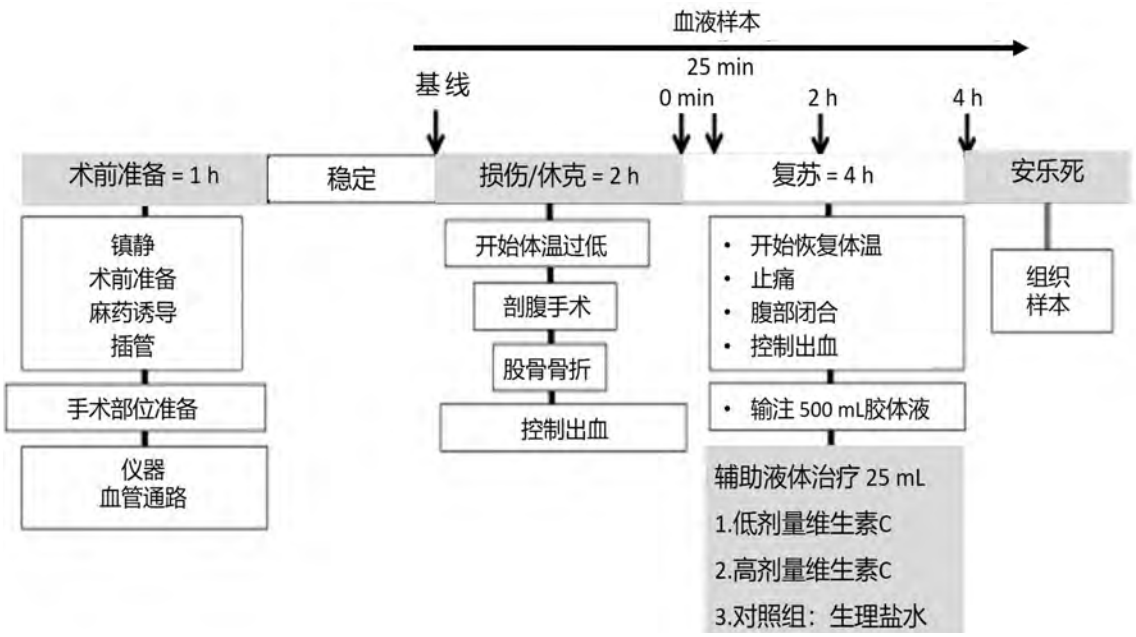


图 4 参考文献[131]的实验安排时间轴

Figure 4 Experimental time line in reference [131]

报告示例 2：“对于饮食诱导的肥胖模型（diet-induced obsisity，DIO），8 周龄的雄性小鼠可随意饮水，并饲喂标准脂肪饲料（standard fat diet，SFD）（10.9 kJ/g）或西式高脂饲料（western high-fat diet，HFD）（22 kJ/g）；热量中 42% 来自脂肪，43% 来自碳水化合物，15% 来自蛋白质；E15721-34，德国 Soest 的 Ssniff 公司）持续 15 周”[132]。

报告示例 3：“将冷冻的肾组织溶解后，使用 Pierce BCA 测定试剂盒（目录号 23225；购自美国 Rockford IL 的 Thermo Fisher Scientific 公司）测定蛋白质浓度。在 6% ~ 12% 的 SDS-PAGE 凝胶上分离了总共 100 ~ 150 μg 蛋白，然后将这些蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。在室温下用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h，并与针对以下蛋白质的一抗在 4 ℃孵育过夜：增殖细胞核抗原（proliferation cell nuclear antigen，PCNA）（Cat# 2586，RRID：AB_2160343），磷酸化单磷酸腺苷活化蛋白激酶（adenosine monophosphate-activated protein kinase，AMPK）（Cat#2531，RRID：AB_330330），磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）（Cat# 2971，RRID：AB_330970）购自美国 Danvers MA 的 Cell Signaling Technology 公司。β-肌动蛋白（Cat# A5441，RRID：AB_476744）抗体是从美国 Sigma 公司获得。随后用稀释比例为 1∶1 000 的辣根过氧化物偶联抗小鼠（Cat# A0216）或抗兔 IgG（Cat# A0208；购自中国北京的 Beyotime Biotechnology 公司）检测印迹。通过增强化学发光显示免疫反应条带，并使用 Image J 软件（RRID：SCR_003070，Bio-Rad 实验室）进行密度测定”[133]。

1.9.2 子条目 9b：时间和频次

解释：清楚地报告实验流程和测量的频次和时间，包括明暗周期（如 12 明 ∶ 12 暗）、昼夜节律时间线（如上午 8 ∶ 00 点亮灯）和实验时间顺序（如基线和每次测量之间的间隔，或程序和测量之间的间隔）。除了先天的昼夜节律，这些变量也会影响实验动物研究结果，例如行为、生理和免疫学参数[134-135]。除此之外，还需报告评估动物福利的时间和频次，同时考虑动物正常的活动模式（参见推荐 11 条的第 6 项“动物照护和监测”）。如夜间活动的动物可能不会在白天表现出不适的行为迹象[136]。

如果实验流程或测量时间因动物而异，可将每只动物的这类信息在补充表中列出。

报告示例 1：“每 5 min 记录一次血压、心率、血氧

饱和度和采血量。在基线（受伤前）、0 min（受伤后立即）以及30 min和60 min后抽取血样”[137]。

报告示例2：“在禁食5 h（上午7：30—12：30）后，清醒和自由活动的小鼠被随机分配，如上述。对同一只小鼠进行3次连续的保定测量，每次高胰岛素血症/低血糖组（mHypo，n=6）或高胰岛素血症/正常血糖组（mEugly，n=4）保定测量后恢复2 d”[138]。

1.9.3 子条目9c：地点（包括任何适应期的细节）

解释：在应激事件（如在供应商、动物设施、手术室和实验室之间运输）后、实验开始前的适应期可稳定动物的生理反应[139-140]。适应方案因物种、品系和检测指标而异，例如不同动物运输后的生理适应可能需要24 h到1周以上的时间不等[141]。实验操作前的适应可使动物在经历非常规操作、新环境和之前程序（如保定）后的反应得到稳定，否则会诱发行为和生理变化[142-143]。

标准的适应期可能因实验室而异，读者无法推断出此信息。因此，还应说明进行研究的地点（如专用实验室或动物设施、动物原本的笼盒、开放场地、水迷宫），以及生理/程序适应期是否包含在研究方案中（包括其类型和持续时间）。如果研究涉及多个地点，则明确说明每个实验和样本分析是在哪里进行的。如开展研究的实验室须为被认证实验室，应说明实验室的认证情况（如样品送到商业实验室进行分析）。

报告示例1：“鱼被单独饲养1周后，在调节箱内连续适应饲养2 d。调节水箱由一个尺寸为20 cm（宽）×15 cm（高）×30 cm（长）的不透明水箱组成，其中装有2.5 L的水族箱水，水箱两端的壁上有明显的视觉提示（斑点或条纹）。在适应饲养过程中，每条鱼都被放置在调节水箱中20 min，鱼可自由进入两个隔间，然后回到其原来的水箱中”[144]。

1.9.4 子条目9d：原因（提供进行这些程序的理由）

解释：对于任何给定的研究问题，可能有许多不同的研究方法。因此，解释为何选择某一特定研究程序或技术很重要。当程序新颖，或是某个实验室特有的，又或是受动物模型或实验设备限制（如由动物大小决定给药途径[145]），这时做原因说明就更加重要。

报告示例1：“由于小鼠尾静脉很细，尾静脉内注射时常出现部分静脉旁注射。这可能会使不同条件下^{18}F-氟代脱氧葡萄糖（^{18}F-flurodeoxyglucose，^{18}F-FDG）生物分布的比较产生显著的偏差。因此，本研究使用腹腔注射^{18}F-FDG的方法进行实验，以评估动物处理对^{18}F-FDG生物分布的影响”[146]。

报告示例2：“由于非洲爪蟾的卵母细胞比受精胚胎具有更高的同源重组潜力，我们接下来测试了宿主转移方法是否可有效地用于同源重组修复（homology-directed repair，HDR）介导的基因敲入。本研究以非洲爪蟾Ctnnb1（β连环蛋白，这是一个关键的细胞骨架蛋白，也是典型的Wnt通路的效应物）的c端为目标；因为之前研究表明，在c端添加表位标签不会影响所产生的融合蛋白的功能。将规律成簇间隔短回文重复序列（clusterd regularly interspaced short palindromic repeat，CRISPR）成分注射到非洲爪蟾卵母细胞中，然后进行宿主移植或胚胎注射”[147]。

1.10 条目10：实验结果

对于实施的每个实验，包括独立重复性实验，应报告：

1.10.1 子条目10a：对每个实验组的总结/描述性统计。如果适用，应报告变异度［如均值和标准差，或中位数和范围（即极差/全距）］

解释：总结/描述性统计可对数据提供快速而简单的描述；它们可以轻松地传达量化结果，有助于可视化呈现。对于连续性数据，这些描述集中趋势的指标（如平均值、中位数）以及描述变异度的指标（如四分位数、极差/全距和标准差），可以帮助读者评估所收集数据的精确性。分类数据可以表示为计数、频率或是比例。

应报告所有实验的数据。如果在不同日期或不同条件下进行重复性实验，则报告所有重复性实验的结果，而不是从代表性实验中选择性报告。报告每组实验单元的确切数量，以便读者可以评估结果的可靠性（见关键10条的条目2“样本量”和条目3“纳入和排除标准”）。应以文本、表格或图表的形式清晰地呈现数据，以便今后对信息进行评估或提取，以及荟萃分析（Meta-analyses）[148]。报告描述性统计量时，应同时报告各组明确的变异性指标。示例1展示了以平均值和标准差形式汇总的数据，括号中为全距（表3）。示例2以中位数和四分位间距作箱形图，这是呈现连续数据的一种实用方法（图5）。

报告示例1：“新种类微小型科菲林微蟾（Cophyline microhylids）是科学家在印尼婆罗洲岛屿雨林中发现的新青蛙物种，表3列出了各种类微小型科菲林微蟾的生物声学参数”[149]。

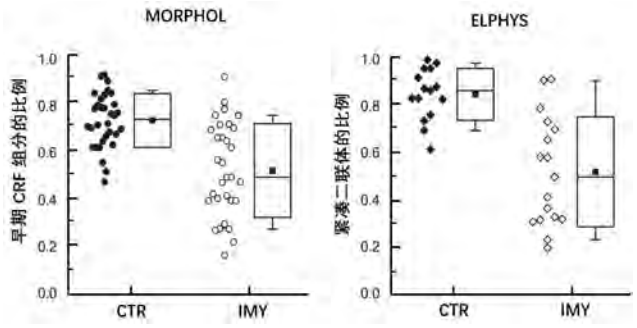
表 3 新种类微小型科菲林微蟾的生物声学参数 (译自参考文献[149])

Table 3 Bioacoustic parameters of new species of miniaturised cophyline microhylids (reproduced from reference [149])

新种类 New species	主频率 Dominant frequency/Hz #	鸣声时间 Call duration/ ms#*	鸣声间隔 Inter-call interval /ms#	音节持续时间 Note duration /ms*	音节间隔 Inter-note interval/ms/	音节次数 Notes per serics	分析注释 Notes analysed*
最小迷你蛙 *Mini mum* gen. et sp. nov.	8 089±140 (7 676~8 306)	74.8±7.0 (57~87)	4 299.8±1 604.9 (3 136~10 139)		na	na	*n*=35
极小迷你蛙 *Mini scule* gen. et sp. nov.	6 675±64 (6 549~6 768)	121.9±8.7 (108~140)	1 905.1±398.3 (1 589~4 122)		na	na	*n*=51
比例钻蛙 *Rhombophryne proportionalis* sp. nov.	5 460±117 (5 166~5 732)	1 328.0±284.1 (905~1 765, *n* = 6)	62 753±20 613 (38 952~74 744, *n* = 3)	45.4±8.2 (27~60)	63.0±9.0 (45~88)	13±3 (9~17, *n*=6)	*n*=79
卓越无齿蛙 *Anodonthyla eximia* sp. nov.	8 406±78 (8 349~8 540)	59.6±6.5 (53~68)	3 749.0±1 149.9 (2 654~5 172)		na	na	*n*=5
米埃尔蓝蛙 *Stumpffia miery*	8 057±137 (7 751~8 225)	73±12 (51~88)	3 102±456 (2 679~4 247)		na	na	*n*=10

注：na指不适用；#数据以平均值±标准差表示，括号中为全距；*指在除 *R.proportionalis*外的所有物种中，鸣叫都由单个音节组成。因此在这些物种中，鸣声持续时间与音节持续时间是相同的。

Note: na, not applicable; #The data is represented by mean±standard deviation, with full range in parentheses; *In all species except R. proportionalis calls consist of a single note according to the definition herein, and in these species call duration is therefore synonymous with note duration.



注：CRF，钙释放通量。MORPHOL，通过电子显微镜图像的形态测定法估计的紧密二分体分数。ELPHYS，通过拟合积分荧光信号记录估计的早期CRF组分的分数。CTR，对照组大鼠心肌；IMY，损伤组大鼠心肌。箱形图显示25%、50%和75%百分位数；晶须显示10%和90%百分位数。实心正方形表示平均值。

Note: CRF, calcium release flux. MORPHOL, fractions of compact dyads estimated by morphometry from electron microscopic images. ELPHYS, fractions of the early CRF components estimated by fitting records of integral fluorescence signals. CTR, control myocardium; IMY, injured myocardium. Box plots show the 25%, 50% and 75% percentiles; whiskers show 10% and 90% percentile. Solid squares denote the means.

图5 参考文献[150]所示心肌细胞钙释放中未受干扰成分的分数

Figure 5 Fractions of the unperturbed elements of calcium release in cardiac myocytes reproduced from reference [150]

报告示例2：“心脏兴奋–收缩耦合依赖于‘偶联物’，即心肌细胞的细胞内钙突触，质膜接触肌浆网后，电兴奋触发钙释放。配对钙离子通道蛋白的形态和局部钙释放的动力学变化很大。使用两因素方差分析检验偶联物结构和功能之间的相关性”[150]。

1.10.2 子条目10b：如果适用，应报告效应量及其可信区间

解释：在使用推断统计学的假设检验研究中，研究者经常将统计学显著性和小的P值与生物学或临床重要性混淆[151]。统计学显著性通常被量化，并根据预先指定的阈值进行评估，通常情况下以$P < 0.05$作为判断标准。但是，统计学显著性受样本量和数据变异性的影响很大（见关键10条中条目2“样本量”）。研究者须考虑观察到的效应大小以及是否是生物学相关的变化。

动物研究中经常不报告效应大小，但其与探索性研究和假设检验研究均相关。效应量是估计组间差异大小或变量间关系强度的定量指标，可用于评估所收集数据的模式，并对样本来源的更广泛群体作出推断。效应量的置信区间表明了效应估计的精确度，并向读者展示效应强度[152]。在统计功效较低和/或假设检验不适当的研究中，提供效应量和置信区间能够表明效应可能的实际大小，使读者判断数据的生物学意义[153–154]。报告效应量和置信区间也有助于读者提取有用数据，用于系统综述和荟萃分析。当荟萃分析中

包含的多项独立研究显示相似的效应量大小时，即使各个研究在统计学上都不显著，但也提供了强有力的证据表明这种相关性是“真实的”（尽管很小）。

应报告开展的所有分析，即使是那些无统计学意义的结果，也应报告效应量以表明研究中组间差异的大小，并报告置信区间来表明效应量估计值的精确度。

报告示例1：“针对所有认为是Usp47$^{tm1b\ (EUCOMM)\ Wtsi}$品系小鼠（MGI：5605792）基因型效应的显著特征，以下是不同性别的小鼠标准化基因型效应及95%置信区间的比较（图6），未进行多重性校正。为使变量之间可进行比较，将基因型估计值除以在野生型群体中观察到的信号，从而实现标准化。蓝色显示不具有统计学差异的估计值”[29]。

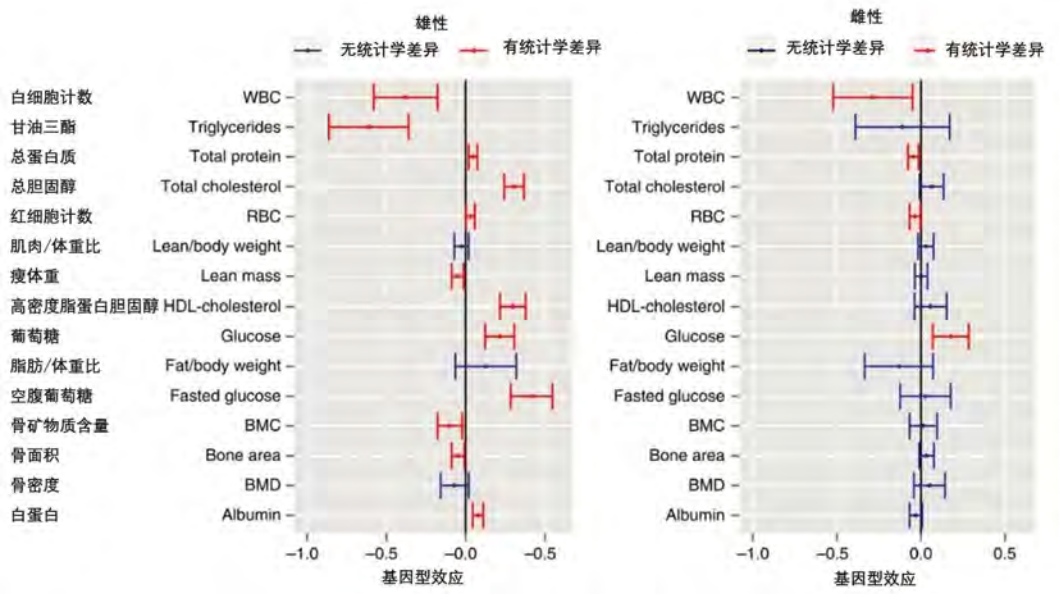


图6 参考文献[29]所示不同性别Usp47$^{tm1b(EUCOMM)Wtsi}$品系小鼠的显著基因型效应

Figure 6 Significant genotype effects in different sexes of the Usp47$^{tm1b(EUCOMM)Wtsi}$ line reproduced from reference [29]

（未完待续）

[作者贡献 Author Contribution]

刘晓宇、卢选成负责ARRIVE 2.0指南完整版第三部分即“关键10条”第8～10条内容的编译初稿和修改，二者贡献相等，为共同第一作者；

师晓萌、张雨舟和吕超参与ARRIVE 2.0指南完整版“关键10条”第8～10条内容的编译初稿写作；

陈国元、卢晓、白玉和刘永刚负责对ARRIVE 2.0指南完整版“关键10条”中第8~10条的编译内容提出关键性修改建议；

高静负责ARRIVE 2.0指南完整版中统计学概念及阐述的翻译审定；

李垚负责ARRIVE 2.0指南完整版中文编译工作的策划、组织，以及提出关键性修改建议；

陶雨风负责对ARRIVE 2.0指南完整版“关键10条”中第8~10条的编译内容提出关键性修改建议，并提供基金支持；

庞万勇负责ARRIVE 2.0指南完整版中文编译工作的指导，以及全部内容的审定。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明不存在利益冲突。

补充说明：文中参考文献[15][16][29]和[61]请见文献[103-104]。

[参考文献 References]

[103] 王剑, 卢今, 马政文, 等.《动物研究：体内实验报告》即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述（一）[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 213-224. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.043.
WANG J, LU J, MA Z W, et al. Explanation and elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—reporting animal research and in vivo experiments (Ⅰ)[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 213-224. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.043.

[104] 陈国元, 卢晓, 白玉, 等.《动物研究：体内实验报告》即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述（二）[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 323-331. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.042.
CHEN G Y, LU X, BAI Y, et al. Explanation and elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—reporting animal research and in vivo experiments (Ⅱ)[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 323-331. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.042.

[105] CLAYTON J A, COLLINS F S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies[J]. Nature, 2014, 509(7500):282-283. DOI: 10.1038/509282a.

[106] SHAPIRA S, SAPIR M, WENGIER A, et al. Aging has a complex effect on a rat model of ischemic stroke[J]. Brain Res, 2002,

925(2):148-158. DOI: 10.1016/s0006-8993(01)03270-x.

[107] VITAL M, HARKEMA J R, RIZZO M, et al. Alterations of the murine gut microbiome with age and allergic airway disease [J]. J Immunol Res, 2015, 2015: 892568. DOI: 10.1155/2015/892568.

[108] BOUWKNECHT J A, PAYLOR R. Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains[J]. Behav Brain Res, 2002, 136(2): 489-501. DOI: 10.1016/S0166-4328(02)00200-0.

[109] SIMON M M, GREENAWAY S, WHITE J K, et al. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains[J]. Genome Biol, 2013, 14(7): R82. DOI: 10.1186/gb-2013-14-7-r82.

[110] JACKSON S J, ANDREWS N, BALL D, et al. Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes[J]. Lab Anim, 2017, 51(2):160-169. DOI: 10.1177/0023677216653984.

[111] KHOKHA M K, CHUNG C, BUSTAMANTE E L, et al. Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development [J]. Dev Dyn, 2002, 225(4):499-510. DOI: 10.1002/dvdy.10184.

[112] ÕKVA K, NEVALAINEN T, POKK P. The effect of cage shelf on the behaviour of male C57BL/6 and BALB/c mice in the elevated plus maze test[J]. Lab Anim, 2013, 47(3): 220-222. DOI: 10.1177/0023677213489280.

[113] AKKERS R C, VAN HEERINGEN S J, JACOBI U G, et al. A hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 acquisition in spatial gene regulation in Xenopus embryos[J]. Dev Cell, 2009, 17(3): 425-434. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.08.005.

[114] FELASA WORKING GROUP ON REVISION OF GUIDELINES FOR HEALTH MONITORING OF RODENTS AND RABBITS, MÄHLER CONVENOR M, BERARD M, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, Guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units[J]. Lab Anim, 2014, 48(3): 178-192. DOI: 10.1177/0023677213516312.

[115] BAKER D G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(2):231-266. DOI: 10.1128/CMR.11.2.231.

[116] VELAZQUEZ E M, NGUYEN H, HEASLEY K T, et al. Endogenous *Enterobacteriaceae* underlie variation in susceptibility to *Salmonella* infection[J]. Nat Microbiol, 2019, 4(6): 1057-1064. DOI: 10.1038/s41564-019-0407-8.

[117] HOLMDAHL R, MALISSEN B. The need for littermate controls [J]. Eur J Immunol, 2012, 42(1): 45-47. DOI: 10.1002/eji.201142048.

[118] MALLAPATY S. In the Name of reproducibility[J]. Lab Animal, 2018, 47(7):178-181. DOI: 10.1038/s41684-018-0095-7.

[119] SUNDBERG J P, SCHOFIELD P N. Commentary: mouse genetic nomenclature[J]. Vet Pathol, 2010, 47(6): 1100-1104. DOI: 10.1177/0300985810374837.

[120] MONTOLIU L, WHITELAW C B. Using standard nomenclature to adequately name transgenes, knockout gene alleles and any mutation associated to a genetically modified mouse strain [J]. Transgenic Res, 2011, 20(2): 435-440. DOI: 10.1007/s11248-010-9428-z.

[121] HUANG W, FENG Y L, LIANG J L, et al. Loss of microRNA-128 promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 700. DOI: 10.1038/s41467-018-03019-z.

[122] RANSON A, CHEETHAM C E J, FOX K, et al. Homeostatic plasticity mechanisms are required for juvenile, but not adult, ocular dominance plasticity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(4):1311-1316. DOI: 10.1073/pnas.1112204109.

[123] CLARKSON J M, DWYER D M, FLECKNELL P A, et al. Handling method alters the hedonic value of reward in laboratory mice [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):2448. DOI: 10.1038/s41598-018-20716-3.

[124] HURST J L, WEST R S. Taming anxiety in laboratory mice[J]. Nat Methods, 2010, 7(10):825-826. DOI: 10.1038/nmeth.1500.

[125] HEWITT J A, BROWN L L, MURPHY S J, et al. Accelerating biomedical discoveries through rigor and transparency[J]. ILAR J, 2017, 58(1):115-128. DOI: 10.1093/ilar/ilx011.

[126] ALMEIDA J L, COLE K D, PLANT A L. Standards for cell line authentication and beyond[J]. PLoS Biol, 2016, 14(6): e1002476. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002476.

[127] LEARY S, UNDERWOOD W, ANTHONY R, et al. J K. AVMA guidelines for the euthanasia of animals[J]. Anim Welf, 2013, 22(3):412. DOI: 10.1017/ s0962728600005492.

[128] BANDROWSKI A E, MARTONE M E. RRIDs: a simple step toward improving reproducibility through rigor and transparency of experimental methods[J]. Neuron, 2016, 90(3): 434-436. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.04.030.

[129] BANDROWSKI A, BRUSH M, GRETHE J S, et al. The resource identification initiative: a cultural shift in publishing[J]. Neuroinform, 2016, 14(2): 169-182. DOI: 10.1007/s12021-015-9284-3.

[130] TEYTELMAN L, STOLIARTCHOUK A. Protocols. io: Reducing the knowledge that perishes because we do not publish it[J]. Inf Serv Use, 2015, 35(1-2):109-115. DOI: 10.3233/isu-150769.

[131] REYNOLDS P S, FISHER B J, MCCARTER J, et al. Interventional vitamin C: a strategy for attenuation of coagulopathy and inflammation in a swine multiple injuries model[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2018, 85(1S Suppl 2): S57-S67. DOI: 10.1097/TA.0000000000001844.

[132] BAUTERS D, BEDOSSA P, LIJNEN H R, et al. Functional role of ADAMTS5 in adiposity and metabolic health[J]. PLoS One, 2018,13(1): e0190595. DOI:10.1371/journal.pone.0190595.

[133] LIAN X Y, WU X Y, LI Z X, et al. The combination of metformin and 2-deoxyglucose significantly inhibits cyst formation in miniature pigs with polycystic kidney disease[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(5):711-724. DOI: 10.1111/bph.14558.

[134] BARTLANG M S, NEUMANN I D, SLATTERY D A, et al. Time matters: pathological effects of repeated psychosocial stress during the active, but not inactive, phase of male mice[J]. J Endocrinol, 2012, 215(3):425-437. DOI: 10.1530/JOE-12-0267.

[135] PAUL A K, GUEVEN N, DIETIS N. Morphine dosing strategy plays a key role in the generation and duration of the produced antinociceptive tolerance[J]. Neuropharmacology,

2017, 121:158-166. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.034.

[136] HAWKINS P, MORTON D B, BURMAN O, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement[J]. Lab Anim, 2011, 45(1): 1-13. DOI: 10.1258/la.2010.010031.

[137] HAGEMO J S, JØRGENSEN J J, OSTROWSKI S R, et al. Changes in fibrinogen availability and utilization in an animal model of traumatic coagulopathy[J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2013, 21:56. DOI: 10.1186/1757-7241-21-56.

[138] EMERY M, NANCHEN N, PREITNER F, et al. Biological characterization of gene response to insulin-induced hypoglycemia in mouse retina[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0150266. DOI: 10.1371/journal.pone.0150266.

[139] HOLMES A M, EMMANS C J, COLEMAN R, et al. Effects of transportation, transport medium and re-housing on Xenopus laevis (Daudin)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2018, 266: 21-28. DOI: 10.1016/j.ygcen.2018.03.015.

[140] CONOUR L A, MURRAY K A, BROWN M J. Preparation of animals for research: issues to consider for rodents and rabbits[J].ILARJ,2006,47(4):283-293.DOI:10.1093/ilar.47.4.283.

[141] OBERNIER J A, BALDWIN R L. Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals[J]. ILAR J, 2006, 47(4): 364-369. DOI: 10.1093/ilar.47.4.364.

[142] KRAHN D D, GOSNELL B A, MAJCHRZAK M J. The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures[J]. Biol Psychiatry, 1990, 27(10): 1094-1102. DOI: 10.1016/0006-3223(90)90046-5.

[143] PITMAN D L, OTTENWELLER J E, NATELSON B H. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation [J]. Physiol Behav, 1988, 43(1): 47-55. DOI: 10.1016/0031-9384(88)90097-2.

[144] BROCK A J, GOODY S G, MEAD A N, et al. Assessing the value of the zebrafish conditioned place preference model for predicting human abuse potential[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2017, 363(1):66-79. DOI: 10.1124/jpet.117.242628.

[145] TURNER P V, BRABB T, PEKOW C, et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50(5):600-613.

[146] FUEGER B J, CZERNIN J, HILDEBRANDT I, et al. Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice[J]. J Nucl Med, 2006, 47(6):999-1006.

[147] ASLAN Y, TADJUIDJE E, ZORN A M, et al. High efficiency non-mosaic CRISPR mediated knock-in and mutations in F0 Xenopus[J]. Development, 2017: 144(15): 2852-2858. DOI: 10.1242/dev.152967.

[148] MICHEL M C, MURPHY T J, MOTULSKY H J. New author guidelines for displaying data and reporting data analysis and statistical methods in experimental biology[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2020, 372(1):136-147. DOI: 10.1124/jpet.119.264143.

[149] SCHERZ M D, HUTTER C R, RAKOTOARISON A, et al. Morphological and ecological convergence at the lower size limit for vertebrates highlighted by five new miniaturised microhylid frog species from three different Madagascan Genera[J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0213314. DOI: 10.1371/journal.pone.0213314.

[150] NOVOTOVÁ M, ZAHRADNÍKOVÁ A Jr, NICHTOVÁ Z, et al. Structural variability of dyads relates to calcium release in rat ventricular myocytes[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 8076. DOI: 10.1038/s41598-020-64840-5.

[151] WASSERSTEIN R L, SCHIRM A L, LAZAR N A. Moving to a world beyond "p<0.05"[J]. Am Stat, 2019, 73(sup1): 1-19. DOI: 10.1080/00031305.2019.1583913.

[152] ALTMAN DSC D G. Why we need confidence intervals[J]. World J Surg, 2005, 29(5): 554-556. DOI: 10.1007/s00268-005-7911-0.

[153] MOHER D, HOPEWELL S, SCHULZ K F, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials[J]. Int J Surg, 2012, 10(1):28-55. DOI: 10.1016/j.ijsu.2011.10.001.

[154] NAKAGAWA S, CUTHILL I C. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2007, 82(4): 591-605. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2007.00027.x.

（收稿日期：2023-03-29　修回日期：2023-07-21）
（本文编辑：张俊彦，富群华，丁宇菁）

[引用本文]

刘晓宇, 卢选成, 师晓萌, 等.《动物研究：体内实验报告》即 ARRIVE 2.0 指南的解释与阐述（三）[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 446-456. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.039.

LIU X Y, LU X C, SHI X M, et al. Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0—reporting animal research and *In Vivo* experiments (Ⅲ)[J]. Lab Anim Comp Med 2023, 43(4): 446-456. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.039.

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.084

上海交通大学实验动物中心

1 中心介绍

上海交通大学实验动物中心隶属于上海交通大学分析测试中心，位于上海交通大学闵行校区，是校级服务平台，由上海交通大学实验动物管理委员会、学术委员会以及伦理委员会共同进行监督管理。2013年获得上海市科学技术委员会批准的《实验动物使用许可证》后正式开始运行，许可范围为SPF级大鼠、小鼠以及普通级猴、兔，同时获得国家重点保护野生动物驯养繁殖许可证。

上海交通大学实验动物中心面向校内外院所及企业开放，为生、农、医、药等众多学科及化学、材料等交叉学科提供专业的动物饲育及动物实验服务，全年无休。本中心始终按照国际、国内高标准，严格规范操作规程，不断提高管理水平，重视实验动物福利，提升各项服务能力，保证实验动物生存条件以及实验数据的有效性、科学性，更好地服务于校内外大生命学科及交叉学科领域的科研工作。

实验动物中心现有工作人员44名，其中技术人员18人，均具有硕士或博士学位，具有良好的学术背景和精湛的技术能力，是一支高水平的科研支撑技术队伍。在服务科研的同时，积极探索设施管理、实验技术新方法，主持科研项目十余项，发表学术论文数十篇。2022年，研究成果获得上海市分析测试协会科学技术奖。

2 饲养设施条件

上海交通大学实验动物中心现有设施面积约2 500 m^2，配备小鼠独立通风笼具（individually ventilated cages，IVC）笼位4 000余个，大鼠IVC笼位200个，大动物饲养区配备猴、兔等饲养笼位40个。此外，新的实验动物大楼建筑面积约13 130 m^2，即将投入运行，屏障设施可满足3.5万笼的SPF级小鼠、大鼠及无菌小鼠的饲养需求。新设施饲养区域分为生物净化室、隔离检疫室、饲养区、转基因小鼠保种区等，采用IVC笼具、数字化独立通气笼（digital ventilated cages，DVC）智能笼具及隔离包等饲养器具，配备全自动化隧道式洗笼机、步入式笼架清洗机、真空脉动高压灭菌器、过氧化氢低温消毒舱等洗涤消毒设备。本实验动物中心具备标准化的饲养规程、全面的微生物监测体系、专业的兽医技术支持和完善的管理流程，为用户提供规范化的实验动物饲育服务。此外，本中心还可提供合笼交配、给药、采血、取材等全流程技术服务。

3 实验技术能力

上海交通大学实验动物中心配备了齐全的仪器设备和专业的技术团队，搭建了综合性的动物实验技术平台，包括表型分析检测平台、基因工程平台、动物模型开发平台；同时，在国家转化医学重大基础设施建设发展过程中，还成立了模式动物技术中心，提供定制化技术服务和个性化解决方案。

3.1 表型分析检测平台

涵盖行为学、代谢、病理、成像、检测等多技术领域。

代谢笼

病理切片扫描仪

小动物 Micro-CT

全自动生化分析仪

显微操作系统

X-ray 辐照仪

行为学模块：配备步态分析、震惊反射、穿梭避暗系统及多类迷宫等六大类，近30种仪器，可用于研究探索学习记忆、焦虑抑郁、运动、疼痛等行为表型，分析能力全面；

代谢模块：配备小动物体成分分析仪、实验动物监测系统、微透析采样系统、多通道数据采集系统等设备，可用于动态了解疾病发生发展过程中各指标的变化及表型联系；

病理模块：配备组织脱水机、染封一体工作站、全自动石蜡切片机、病理切片扫描仪等全自动化设备，提供病变标本取材、制片、切片、观察分析等全流程的病理诊断服务；

成像模块：配备小动物微型计算机断层扫描（Micro-CT）、三维光学成像、近红外Ⅱ区成像等设备，联合上海交通大学转化医学生物医学影像技术中心的磁共振成像（MRI）、正电子发射型计算机断层扫描（PET/CT）、单光子发射型计算机断层扫描（SPECT/CT）等大型高端成像仪器，全方位满足实验动物分子影像研究需求；

检测模块：配备全自动生化分析仪、血细胞分析仪、尿液分析仪、流式细胞分析仪等全套设备，提供标准化的生理生化指标检测服务，从分子、细胞、组织等不同水平探索疾病发生发展过程。

3.2 基因工程平台

配备显微操作系统、拉针仪、磨针仪等设备，提供载体构建、体外受精、胚胎移植、快速扩繁及精子/胚胎冻存保种等实验技术，并可制备基因编辑动物模型，协助研究人员更好地探究疾病发生机制以及确定治疗方案等多方位的动物在体研究。

3.3 动物模型开发平台

配备X-ray辐照仪、激光多普勒血流仪、小动物生理监测系统等设备，提供外科手术、诱导、人源肿瘤细胞系异种移植（CDX）、人源肿瘤异种移植（PDX）等动物模型构建服务，可促进大生命科学与生物医药研究的长足发展，不断满足科研一线进行相关疾病药物的临床前研究的要求。

4 服务与合作

目前，上海交通大学实验动物中心为校内的生、农、医、药、化工、材料等16个学院及11家附属医院，共计近500个课题组提供服务，支撑科研团队在*Science*、*Cell*、*Cancer Cell*、*Advanced Materials*、*Circulation*等顶级期刊发表高水平论文；支撑国家重点研发计划、国家科技重大专项、国家自然科学基金等若干重点科研项目开展；支撑科学家获得国家自然科学奖二等奖、教育部自然科学奖一等奖、上海市自然科学奖一等奖、上海市科技进步奖一等奖等重要科学技术奖项，以及“东方心血管大会”东方新星优胜奖、中国卒中学会优秀科技工作者等专业领域奖项。

同时面向校外用户，本中心在新设施开放前以承接整体项目为主，截至目前，已独立承接完成数十个校外动物实验项目，从科研需求对接、制定实验方案，到完成动物实验并出具实验结果报告，可实现动物实验整体委托服务。

新设施开放后，本中心将具备充足的空间与能力，为校内外用户提供实验动物饲养、表型分析检测、基因工程研究、动物模型开发等全方位的服务，同时仍以承接整体实验为特色服务项目，致力于打造硬件设施完善、动物种类齐全、技术能力全面的动物实验服务中心，为医学生命科学研究、疾病发病机制研究和创新药物研发与评价提供有力的技术支撑。

图文：马倩、戚梦婷

审核：王朝霞

DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.103

山西医科大学实验动物中心

1 中心介绍

山西医科大学实验动物中心（以下简称“本中心”）成立于1987年，是山西省科技厅批准的山西省实验动物研发基地、山西省卫健委批准的山西省医学实验动物中心挂靠单位，同时也是山西省实验动物学会挂靠单位。本中心作为山西省实验动物资源服务平台、实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室，主要承担科研、教学和校内外动物实验技术服务工作。自2004年以来，本中心负责承担山西省实验动物从业人员岗位资格培训工作；同时为本省医药相关企事业单位供应实验动物及动物实验服务；并结合国内实验动物发展趋势，为山西省实验动物发展规划和法治化管理提供智力支持。

本中心在山西医科大学迎泽校区的设施面积约3 000 m^2，在中都校区的设施面积约14 000 m^2，包括动物生产室、动物实验室、病理实验室、分子生物学实验室、转基因动物实验室和细胞培养室等，具备小动物行为学、动物影像学、血液生化和分子生物学检测等相关仪器设备。中心现有在编专业技术人员20人，其中高级职称7人，博士生导师3人、硕士生导师4人，博士学位7人、硕士学位12人。

2 研究方向

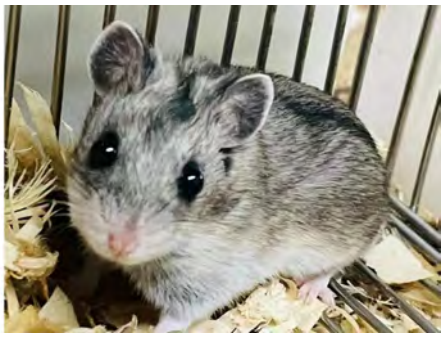
2022年山西省科技厅批准本中心建设了“实验动物新资源创制与利用山西省人才创新团队”。创建该团队的主要目标是：为推进实验动物资源增量，加强实验动物资源技术能力，提升存量资源和服务水平；加强技术研发和评价体系，创建“趋真性”的精准动物模型；研发具有重要应用价值的系列化基因编辑动物模型；稳定和吸引高水平优秀人才，加强团队的竞争优势，建立更加高效、稳定的科研团队。本中心围绕实验动物资源，在开展实验动物资源种质基因研究的同时，针对品种发掘和创新、疾病动物模型建立、药物筛选、成果转化等方面，积极推进产–学–研–用全链条协同创新。目前已形成了实验动物资源种质特性及相关基因功能研究、人类重大疾病动物模型创建及标准化评价体系研究、基因编辑动物模型制备及表型分析等相对稳定的研究方向。

近年来，本中心已成功培育多种基因编辑动物模型，主要包括绿色荧光蛋白（GFP）过表达小鼠、甘丙肽（GAL）过表达小鼠、微RNA（miR）-31过表达小鼠、脂滴包被蛋白（Plin1）

基因敲除小鼠、miR-504敲除小鼠、miR-181a敲除小鼠及卷曲同源物6（FZD6）基因突变小鼠；同时建立了一系列恶性肿瘤、心血管疾病、糖尿病、神经系统疾病等多种人类常见疾病的自发性、诱导性或转基因动物模型，为相关领域的研究提供技术支撑和实验材料。此外，本中心在实施实验动物资源创新与利用一体化平台的管理及运行的基础上，加强人才队伍建设，推动各学科人才培养及学科建设。

3 科研成果

本中心保存有自主培育的国内唯一的中国特色实验动物资源——近交系中国仓鼠。相关研究多次获得国家科技支撑计划项目、国家重点研发项目，以及国家自然科学基金项目资助。本中心的科研团队多年来一直致力于中国仓鼠的开发与应用研究，深入探析了该群体的基本生物学特性、生殖繁育、遗传特点及其检测方法，实现了中国仓鼠的生物学净化，使其达到了实验动物清洁级国家标准。相关成果获山西省科学技术奖2项；同时，制定并发布实施8个中国仓鼠山西省地方标准，为中国仓鼠的推广应用奠定了一定基础。



本中心还培育出了具有自主知识产权的近交系中国仓鼠2型糖尿病（T2DM）动物模型，并在此基础上探索T2DM的发病机制；开展了中国仓鼠口腔癌模型的创制及疾病发生机制的研究工作，相关成果已在*Free Radical Biology and Medicine*、*Journal of Proteomics*、*Endocrine*、*Molecular Carcinogenesis*、*International Journal of Biochemistry & Cell Biology*、*Scientific Reports*等期刊发表多篇论文；建立了一系列自发性、诱导性及基因工程疾病动物模型，对山西省乃至全国实验动物模型资源进行了补充和提升，为相关领域的研究提供技术支撑和实验材料。

近年来，本中心科研团队共承担国家科技支撑计划和国家重点研发项目子课题3项，国家自然科学基金6项，省部级科研项目25项，发表论文200余篇，其中SCI收录论文30余篇。相关成果获山西省科技进步二等奖2项、三等奖3项，山西省高校科技进步一等奖2项，中国实验动物学会科学技术二等奖1项、三等奖2项。团队成员获评中国实验动物学会优秀青年人才2人次。

4 教学工作

本中心承担山西医科大学本科生和研究生的“实验动物学”“动物实验技术”“人类疾病动物模型”等课程的教学工作，授课对象覆盖学校基础医学、临床医学等相关专业的本科生和研究生，每年累计授课达到800余课时。其中“动物实验技术”被列为学校研究生精品课程建设项目。2008年起，本中心获批动物学硕士点，同时挂靠基础医学博士点招收博士研究生，目前在读博士研究生5人、在读硕士研究生16人，现已毕业的硕士研究生35人。

5 发展方向

本中心依托于实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室与山西省实验动物资源共享服务平台，未来会继续致力于实验动物资源种质基因研究、实验动物新品系的发掘与创新、实验动物转化应用研究；同时，力争通过科学研究创新团队的建设，推进实验动物资源增量，创建精准医学动物模型，加强技术研发和评价体系建立，提升存量资源和服务水平。本中心将集合高校与本省医药企业的人才、技术、资金、市场等优势，建成产-学-研用紧密结合的研发团队，推动山西省实验动物及相关生物医药学事业的发展。

图文：宋国华

审核：陈朝阳