

实验动物与比较医学



期刊网站

Shiyan Dongwu Yu Bijiao Yixue

双月刊 1981年9月创刊

第43卷 第1期 (总第197期)

2023年2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: 国内公开发发

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

主编卷首语

坚定信念, 继续推进期刊规范化和服务能力建设

吴宝金, 王健 1

人类疾病动物模型: 药学专题

间歇禁食法在改善奥氮平诱导小鼠代谢紊乱中的机制研究

李晗, 张笑瑞, 张成芳 3

转录组测序筛选大鼠滑膜炎差异表达基因及秦皮素治疗靶点的体外验证

杨凌, 庄迪, 金立伦 11

贝伐珠单抗注射液对食蟹猴皮肤伤口愈合的影响

杨平, 崔立, 俞诚, 温智越 21

消瘀散新组方修复膝骨关节炎模型兔的软骨损伤及MMP-13表达

崔若琳, 王庆, 杨玲, 冯文昌, 刘智伟, 滕蔚然, 马碧涛,

王乐杨, 秦丽萍, 金立伦 30

牛磺酸对苯扎氯铵损伤大鼠眼角膜内皮细胞无保护作用

葛健, 孙静芬, 吴永杰 39

实验动物资源开发与利用

SHJH^h小鼠部分生物学特性及衰老表型的测定与分析

唐慧青, 常书福, 于志锋, 张雷, 谈小倩, 瞿伟, 李亮,

钱珍, 顾坚忠, 徐平 44

SPF级雄性SD大鼠回肠与结肠菌群结构比较分析

许琴, 倪艳, 是文辉, 李建瑛, 刘江伟, 赵红琼, 徐新明 53

不同月龄长爪沙鼠的肾脏组织学特征

卢领群, 郭红刚, 石巧娟, 戴方伟, 褚晓峰 61

实验用猫的驯化及繁殖方法初步研究

何永平, 谢美贤, 庞智慧, 李庆秀, 何华红, 张讷敏, 李薇 67

动物实验技术与方法

虚拟现实在实验动物行为分析中的应用进展

张超超, 田雪松 73

实验动物管理

基于江苏省实验动物行政许可现状的安全管理对策

漆重阳, 陈林, 艾曼, 徐航, 张厚森 79

比较医学研究与报告规范

动物实验研究报告的国际指南 ARRIVE 2.0 介绍及期刊实施计划

张俊彦, 刘晓宇, 李垚, 陈国元, 卢晓, 白玉, 卢选成, 庞万勇, 吴宝金 86

实验动物与比较医学科创团队推介

中国科学院上海药物研究所实验动物中心 95

浙江中医药大学动物实验研究中心 97

江苏省医药动物实验基地 99

读者-作者-编者

《实验动物与比较医学》稿约 (2023 年版) 101

《实验动物与比较医学》被列入遵循 ICMJE 国际规范的期刊名单 66

《实验动物与比较医学》入选中国科协“科技期刊双语传播工程” 72

科普小知识:《关于加强科技伦理治理的意见》中“3R”原则解析 78

《实验动物与比较医学》2023 年征订启事 85

上海实验动物科普志愿者服务队 94

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会名单 前插 8

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*102*zh*P*¥ 30.00*2000*16* 2023-02

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

本期责任编辑 姚明

本期审稿专家 白玉 陈民利 代解杰 丁玉强 杜小燕 富群华 高耀 罕园园

黄冰 季樱红 邝高艳 李华 李垚 李长龙 彭诗宇 施爱民

施标 史利军 宋国华 宋宁宁 宋兴磊 孙茂民 王爽洁 王宇

王朝霞 吴宝金 肖君华 谢家骏 徐平 杨斐 姚明 于志锋

张周 赵微

本期责任编辑 张俊彦 丁宇菁

本期责任编辑 王伟民

本期中英文校对 富群华 陶启辰 刘晓宇 孙琛

本期实习编辑 洪怡 娄怡欣 任益凡 余儒洋 周培 周烁 赵宇朋 张亚菲

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981 Volume 43, Issue 1

February 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, YAO Ming

CONTENTS IN BRIEF

Animal Model of Human Disease: Pharmacology

Mechanism of Intermittent Fasting in Improving Olanzapine-induced Metabolic
Disorders in Mice

LI Han, ZHANG Xiaorui, ZHANG Chengfang 4

Screening of Differentially Expressed Genes in Rat Synovitis by Transcriptome
Sequencing and *in Vitro* Verification of Therapeutic Target of Fraxetin

YANG Ling, ZHUANG Di, JIN Lilun 11

Effects of Bevacizumab Injection on the Skin Wound Healing in Cynomolgus Monkeys

YANG Ping, CUI Li, YU Cheng, WEN Zhiyue 21

Repair Effects of Xiaoyusan New Formula on Cartilage Injury and MMP-13 Expression
in Knee Osteoarthritis Model Rabbits

*CUI Ruolin, WANG Qing, YANG Ling, FENG Wenchang, LIU Zhiwei, TENG Weiran,
MA Bitao, WANG Leyang, QIN Liping, JIN Lilun* 30

Taurine Has no Protective Effect on Rat Corneal Endothelial Cells Injured by
Benzalkonium Chloride

GE Jian, SUN Jingfen, WU Yongjie 39

Development and Utilization of Laboratory Animal Resources

Investigation on Biological Characteristics and Aging Phenotype of SHJH^{tr} Mice

*TANG Huiqing, CHANG Shufu, YU Zhifeng, ZHANG Lei, TAN Xiaoqian, QU Wei,
LI Liang, QIAN Zhen, GU Jianzhong, XU Ping* 44

Analysis on Ileum and Colon Microflora of SPF Male SD Rats based on High-
throughput Sequencing

*XU Qin, NI Yan, SHI Wenhui, LI Jianying, LIU Jiangwei, ZHAO Hongqiong,
XU Xinming* 53

Histological Characteristics of the Kidney in Mongolian Gerbils of Different Ages

LU Lingqun, GUO Honggang, SHI Qiaojuan, DAI Fangwei, CHU Xiaofeng 61

A Preliminary Study on the Domestication and Breeding Methods of Experimental Cats

*HE Yongping, XIE Meixian, PANG Zhihui, LI Qingxiu, HE Huahong, ZHANG Namin,
LI Wei* 67

Animal Experimental Techniques and Methods

Application of Virtual Reality in the Behavior Analysis of Laboratory Animal

ZHANG Chaochao, TIAN Xuesong 73

Laboratory Animal Management

Safety Management Countermeasures Based on the Status of Laboratory Animal
Administrative Licensing in Jiangsu Province

QI Chongyang, CHEN Lin, AI Man, XU Hang, ZHANG Housen 79

Guidelines for Comparative Medical Research and Reporting

Introduction to the International Guide for Animal Research Reporting ARRIVE 2.0,
and Its Implementation Plan in the Journal

*ZHANG Junyan, LIU Xiaoyu, LI Yao, CHEN Guoyuan, LU Xiao, BAI Yu,
LU Xuancheng, PANG Wanyong, WU Baojin* 86



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

实验动物与比较医学

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路15号 100038 www.istic.ac.cn

2022年12月



坚定信念，继续推进期刊规范化 和服务能力建设



刚刚过去的2022年，是本刊第七届编辑委员会换届后凝心聚力、踔厉奋发的第一年。

由中国科学院李劲松院士担任名誉主编，高诚等七位资深专家担任学术顾问，包含98位常规编委、44位青年编委和17位特邀审稿专家在内的新一届编委会团队将规范化建设作为本刊发展的首要抓手。主要工作包括：修订了编委会章程及工作制度，优化了当期责任编辑制度、同行评议政策、定稿会终审和常务编委会审议制度；进一步加强期刊出版伦理规范，高度重视学术诚信体系建设和实验动物福利伦理审查工作；并在优质稿源拓展和专题专栏出版方面群策群力、积极作为，除了常规的“人类疾病动物模型”“实验动物福利与伦理”“实验动物设施及管理”等栏目外，新推出“前沿文献述评”“实验动物与比较医学科创团队推介”两个专栏以及“实验动物麻醉专题”“实验动物与生物安全专题”“动物实验技术与方法专题”“实验室能力验证及认可专题”等多个行业热点专题。这些规范化建设工作均得到了广大作者、审稿专家、读者的热烈响应和大力支持，期刊出版论文质量稳步提高，行业内关注度和影响力均得到明显提升。2022年底，中国科学文献计量评价研究中心发布的中国学术期刊影响因子年报数据显示，本刊复合影响因子和综合影响因子连续3年稳步升高，特别是综合即年指标和Web即年下载率较上一年度的增幅分别达669.57%和84.29%，提示后续发展势头强劲！

此外，我们将数字化、国际化拓展作为期刊发展新方向。在2021年基础上逐步推进数字化转型，建立起由在线投审稿系统、在线排版云出版平台、中英文期刊官网、国内外数据库及主办单位微信公众号等推广平台组成的全流程数字出版体系，并进一步完善本刊官网的优先数字出版和开放获取数字服务等功能，使得编辑部在2022年4月和12月两次新冠病毒疫情冲击下依然能按时高质量出刊。同时，在出版政策及细则公开、英文长摘要撰写、字体及版式优化、图表中英文对照、参考文献引用、作者贡献及利益冲突声明、包括实验动物福利伦理在内的医学伦理声明等方面，遵循国际通行规范，并积极申请加入全球性的科学信息检索系统。截至2022年底，本刊已相继被美国Chemical Abstracts、美国Ulrichsweb、英国CAB Abstracts和Global Health、波兰ICI World of Journals和ICI Master List、瑞典DOAJ等数据库收录，并被国际医学期刊编辑委员会列入“遵循ICMJE推荐规范的期刊名单”，标志着本刊的数字化和国际化推广工作取得

重要进展。在此基础上，本刊顺利通过中国科学技术协会遴选，被纳入2022年“科技期刊双语传播工程”，“科创中国”网站已对本刊部分优秀原创性论文进行展示。

不积跬步，无以至千里。2023年是《实验动物与比较医学》实现“十四五”发展目标的关键一年。我们将继续勠力同心，坚定信念，稳中求进，守正创新，以习近平新时代中国特色社会主义思想为指导，以提高刊物学术水平、服务并引领行业发展为目标，坚持“百花齐放，百家争鸣”的办刊方针，进一步瞄准国内外学术前沿、国家科技创新实际需求，努力搭建更高质量、更好服务、更具特色的学术交流平台，持续推进期刊规范化、数字化、国际化以及服务能力建设，助力我国实验动物与比较医学科技创新、人才培养、学科发展和国际交流，为实现健康中国和科技强国贡献力量！

吴宝金(执行主编)， 王 健(主编)

(2023年1月，写于上海)

本刊收录情况：

中国科技论文与引文数据库（CSTPCD，即中国科技核心期刊目录）

中国医药卫生“核心期刊”目录

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（CAJCED）统计源期刊

中国超星期刊域出版平台

中国期刊网、万方医学网、中国知网，等

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（EBSCOhost）

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）

瑞典开放获取期刊目录（DOAJ）



张成芳, 同济大学在读博士研究生, 同济大学附属精神卫生中心主治医师, 同济大学医学院及上海健康医学院兼职教师。临床业务方面, 擅长老年期精神障碍、躯体疾病伴发精神障碍的诊治, 以及精神药理学的临床运用。教学方面, 获第一届同济大学医学院思政教学设计大赛二等奖、优秀思政案例奖, 获2022年同济大学医学与生命科学课程思政教研分中心课程思政教学设计大赛优秀思政案例奖。科研方面, 主要从事精神药理学基础研究, 尤其是动物模型构建和抗精神病药物代谢不良反应的机制探讨和临床防治研究。参与上海市科委、国家自然科学基金等多个科研项目, 以第一作者及通信作者身份发表科研论文7篇, 其中2018年以共同第一作者身份在 *Journal of Clinical Investigation* 期刊发表的研究论文首次报告了巨噬细胞迁移抑制因子在抗精神病药诱导的代谢紊乱中的作用及机制。2019年被列入上海市浦东新区优秀青年医学人才培养计划。

李 晗, 上海交通大学医学院附属精神卫生中心、上海市重性精神病重点实验室助理研究员, 主要从事实验动物行为学平台管理, 参与上海市科委、国家自然科学基金等多个科研项目, 以(并列)第一作者及通信作者在 *Frontiers in Cellular Neuroscience* 等杂志上发表科研论文3篇。



间歇禁食法在改善奥氮平诱导小鼠代谢紊乱中的机制研究

李 晗¹, 张笑瑞², 张成芳³

(1. 上海交通大学医学院附属精神卫生中心, 上海市重性精神病重点实验室, 上海 201108; 2. 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; 3. 同济大学附属精神卫生中心, 上海市浦东新区精神卫生中心, 同济大学精神疾病临床研究中心, 上海 200124)

[摘要] **目的** 探究间歇禁食 (intermittent fasting, IF) 对奥氮平诱导小鼠代谢紊乱的保护作用及其机制。**方法** 将 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组: 生理盐水+自由摄食组 (Saline+ Ad libitum)、生理盐水+间歇禁食组 (Saline+IF)、奥氮平给药+自由摄食组 (Olanzapine+ Ad libitum)、奥氮平给药+间歇禁食组 (Olanzapine+IF), 每组 8 只。其中间歇禁食组采用 5:2 方案, 即每周的周一、周四禁食, 其余时间自由摄食, 干预 12 周; 以自由摄食作为间歇禁食的对照 (Control), 以生理盐水灌胃作为奥氮平给药的对照 (Saline)。比较奥氮平处理组与对照组经过间歇禁食干预后小鼠体重、肝脏质量和附睾旁脂肪组织质量的差异, 并分别采用磁共振和 HE 染色法分析小鼠体脂、瘦素以及内脏脂肪浸润的变化; 同时, 分别采用葡萄糖氧化酶法和放射免疫法测定小鼠糖代谢过程中空腹血糖、胰岛素和胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 的水平差异, 分别采用 ELISA 和实时荧光定量 PCR 法测定 H_2O_2 含量和线粒体损伤相关标志物细胞色素 C (Cytochrome C) mRNA 水平。**结果** 分组处理 12 周后, 奥氮平诱导小鼠体重、体脂、瘦素和内脏脂肪浸润明显增加 ($P < 0.05$), 空腹血糖、胰岛素和胰岛素指数也明显增加 ($P < 0.05$); 然而间歇禁食可以使上述指标明显降低 ($P < 0.05$)。进一步研究表明: 间歇禁食处理后小鼠脂肪组织部位的 H_2O_2 释放和 Cytochrome C mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 间歇禁食可以减轻奥氮平引起的小鼠代谢紊乱, 其机制可能与抑制氧化应激水平和维持线粒体功能有关。

[关键词] 间歇禁食法; 肥胖; 氧化应激; 线粒体; C57BL/6J 小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0003-08



[基金项目] 上海市浦东新区优秀青年医学人才培养计划 (PWRq2020-19); 上海市浦东新区科技发展基金 (民生科研专项: 医药卫生) “间歇限制热量法在奥氮平诱导的胰岛素抵抗小鼠模型中的作用” (PKJ2018-Y27)

[第一作者] 李 晗 (1984—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 精神疾病模型研究。E-mail: erjunda140@126.com。ORCID: 0000-0003-3903-5254

[通信作者] 张成芳 (1987—), 女, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 抗精神病药物代谢不良反应的机制和临床防治。E-mail: callup1987@126.com。ORCID: 0000-0002-5977-0312

Mechanism of Intermittent Fasting in Improving Olanzapine-induced Metabolic Disorders in Mice

LI Han¹, ZHANG Xiaorui², ZHANG Chengfang³

(1. Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Psychotic Disorders, Shanghai 201108, China; 2. Animal Core Facility of Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 3. Clinical Research Center for Mental Disorders, Shanghai Pudong New Area Mental Health Center, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200124, China)

Correspondence to: ZHANG Chengfang (ORCID: 0000-0002-5977-0312), E-mail: callup1987@126.com

[ABSTRACT] Objective To explore the beneficial role and potential mechanism of intermittent fasting in olanzapine-induced metabolic disorders. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: Saline + ad libitum (Saline+Ad libitum), Saline + intermittent fasting (Saline +IF), olanzapine administration + ad libitum (Olanzapine+ Ad libitum), and olanzapine administration + intermittent fasting (Olanzapine+IF), with eight mice in each group. The IF group adopted the 5: 2 scheme, that is, fasting on Monday and Thursday every week, and eating freely in the rest of the time. Ad libitum feeding as the control of intermittent fasting, Saline gavage as the control of olanzapine administration. The experiment lasted for 12 weeks. The differences of body mass, liver mass and epididymal adipose tissue mass were compared between the olanzapine-treated group and the control group after IF intervention. The body fat mass, lean body mass, and visceral fat infiltration of mice were analyzed by nuclear magnetic resonance and HE staining, respectively. Furthermore, the levels of fasting blood glucose, insulin, and insulin resistance index (HOMA-IR) in the process of glucose metabolism were also measured by glucose oxidase method and radioimmunoassay, respectively. The effects of IF on H₂O₂ release and the level of cytochrome C mRNA, a marker related to mitochondrial damage, were detected by ELISA and real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** After 12 weeks of treatment, olanzapine induced a significant increase in body mass, body fat, lean body mass and visceral fat infiltration ($P<0.05$), as well as fasting blood glucose, insulin, and HOMA-IR ($P<0.05$); however, IF significantly reduced the above indicators ($P<0.05$). Further studies showed that the release of H₂O₂ and the expression of Cytochrome C mRNA in adipose tissue of mice after intermittent fasting treatment were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Intermittent fasting therapy can alleviate olanzapine-induced metabolic disorders in mice. The underlying mechanism may involve the inhibition of oxidative stress level and the maintenance of mitochondrial functions.

[Key words] Intermittent fasting therapy; Obesity; Oxidative stress; Mitochondria; C57BL/6J mice

精神分裂症是一种严重的慢性障碍疾病。流行病学调查表明，高达1%的人群饱受精神分裂症的折磨^[1]。目前，精神分裂症的病因机制尚未明确，临床治疗手段有限，主要是使用第二代抗精神药物奥氮平。奥氮平因其良好的治疗效果，可以显著改善阴性症状和认知障碍，成为临床治疗精神分裂症的一线用药^[2]。长期使用奥氮平虽然可以改善精神分裂症状，但是也显著加剧机体的脂质代谢和炎症反应，使患者出现肥胖等症状，罹患心血管疾病和糖尿病的风险骤然增加^[3]。遗憾的是，目前临床上缺乏有效的药物干预奥氮平诱导的不良反应，相关的致病机制研究仍然较少。

以往研究表明，心血管疾病和糖尿病均与炎症小体释放增加、炎症反应激活、能量代谢异常以及氧化应激密切相关^[4]。炎症小体是经典的炎性代谢感受器，负责感知多种病原体 and 损伤相关信号通路的变化^[5]。在糖尿病模型中，负责炎性因子调节的促炎细胞因子白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 和 IL-18 介导 caspase-1 活化，促进氧化应激，导致细胞死亡以及糖尿病和心血管系统的炎症反应^[6]。为了响应炎性刺激反应，炎症小体也会募集和重新分配能量代谢，以满足细胞在炎性状态下的能量稳态^[7-8]。此外，能量代谢产生的琥珀酸等小分子物质可以促进线粒体琥珀酸氧化和线粒体膜电位升高，共同驱动线粒体活性氧

(reactive oxygen species, ROS) 的产生, 进一步加剧线粒体ROS水平升高^[9]。

间歇禁食是近年来的研究热点之一, 其包括通过短期禁食或限制热量来控制进食, 达到改善机体结构和整体健康的一系列方式, 其本质不是减少总能量摄入, 而是通过改变进食时机达到改善代谢紊乱的目的。研究最广泛的3种间歇禁食方案是隔日禁食、5:2方案(每周有间隔开的2 d禁食或极低热量饮食, 其余时间自由摄食)和每日限时饮食, 其中5:2方案因对热量限制较低, 成为最流行的方案^[10]。一般认为, 通过间歇禁食可以有效抑制体质量增加、降低促炎因子浓度、减少代谢紊乱, 预防和治理心血管疾病和代谢性疾病。因而, 通过调节饮食方式降低炎症反应的策略受到极大关注。在大鼠高脂饮食模型的研究中, 间歇禁食通过调节炎症反应, 显著降低了胰岛素、血糖和胰岛素抵抗水平^[11]。此外, 间歇禁食能够调节线粒体活性和氧化应激水平。本研究以线粒体和氧化应激为切入点, 通过间歇禁食研究奥氮平诱导肥胖与氧化应激的关系, 进一步揭示间歇禁食调节奥氮平诱导肥胖的机制, 为临床干预奥氮平的不良反应提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠32只, 8周龄, 体质量20~22 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2021-0007]。小鼠饲养于上海睿太莫斯生物科技有限公司实验动物屏障设施[SYXK(沪)2018-0007], 温度22~25 °C, 相对湿度40%~70%, 12 h日夜交替照明。本研究项目中动物实验方案经上海睿太莫斯生物科技有限公司的实验动物使用与管理委员会审核批准(SHRTMOBIO-IACUC-PR01-20211115)。

1.2 主要仪器和试剂

奥氮平(美国Sigma公司), 血糖仪、血糖试纸(德国拜耳公司), H₂O₂ ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), 戊巴比妥钠粉末(美国Sigma公司)。TRIzol试剂和引物合成(美国Invitrogen公司), 反转录和实时荧光定量PCR试剂盒(日本TaKaRa公司), 实时荧光定量PCR仪(美国Abbott公司, 型号: m2000rt)。

1.3 实验分组及小鼠体质量监测

将C57BL/6J小鼠随机分为生理盐水+自由摄食组(Saline + Ad libitum)、生理盐水+间歇禁食组(Saline +

IF)、奥氮平给药+自由摄食组(Olanzapine + Ad libitum)、奥氮平给药+间歇禁食组(Olanzapine + IF), 每组8只。奥氮平给药+自由摄食组, 按每天3 mg/kg的剂量^[12]灌胃奥氮平溶液, 自由摄食; 奥氮平给药+间歇禁食组在给予奥氮平处理的同时, 每周2 d(周一、周四)禁食; 生理盐水+自由摄食组, 每天灌胃同等体积的生理盐水(即0.9%NaCl溶液), 自由摄食; 生理盐水+间歇禁食组, 每天灌胃同等体积的生理盐水, 每周2 d(周一、周四)禁食。预实验发现建模12周, 代谢表型比较稳定; 而且临床上针对奥氮平引起代谢紊乱的干预性研究周期多为12周。因此, 本实验周期为12周, 每周定时称量小鼠体质量。

1.4 样本收集

建模12周后, 小鼠禁食12 h, 按40 mg/kg的剂量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 将小鼠固定于操作台上, 消毒后解剖打开腹腔, 收集肝脏及附睾旁脂肪组织, 分别称肝脏质量、脂肪质量。收集的肝脏组织和脂肪组织一部分用于组织病理切片; 另一部分经液氮速冻后转-80 °C保存, 待测脂肪组织中基因表达水平。

1.5 胰岛素抵抗水平测定

建模12周后, 小鼠禁食12 h, 按40 mg/kg的剂量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 经髂静脉取血; 用肝素抗凝管留取血液标本, 离心20 min(2 500 r/min), 收集血浆。采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖, 放射免疫法检测空腹胰岛素。计算胰岛素抵抗的稳态模型评估(homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)指数 = 空腹血糖(mmol/L) × 空腹胰岛素(mU/L) / 22.5。

1.6 小鼠身体组成成分分析

建模12周后, 用EchoMRI-100磁共振仪(美国Echo Medical System公司)分析小鼠附睾旁脂肪组织的脂肪及瘦素含量。

1.7 肝脏和脂肪组织染色

将收集到的小鼠肝脏组织和附睾旁脂肪组织置于质量分数为4%的多聚甲醛溶液中固定48 h, 常规石蜡包埋后切片(3~4 μm), 然后进行HE染色。光学显微镜下观察肝脏组织和脂肪组织的病理改变, 以细胞体积变化反映脂肪浸润程度。

1.8 ELISA检测H₂O₂含量

脂肪组织匀浆后收集上清液, 用ELISA试剂盒检测H₂O₂含量。按照试剂盒操作流程, 依次配制标准品, 加入样本上清液, 再加入试剂和显色试剂等, 酶标仪检测吸光度(A)值, 依次计算样本H₂O₂含量。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测细胞色素 C (Cytochrome C) 基因表达

采用 TRIzol 法提取脂肪组织中总 RNA，然后使用反转录试剂盒将其反转录成 cDNA，以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR。PCR 反应条件：95 °C 预变性 60 s；95 °C 变性 15 s，60 °C 退火 15 s，72 °C 延伸 45 s，共 40 个循环。引物序列包括：Cytochrome C 上游引物为 5'-ACTACAGCCACGTTTACCC-3'，下游引物为 5'-AGCCTTTTCACCCCCACAAA-3'；内参 GAPDH 上游引物为 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'，下游引物为 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'。统计循环阈值 (cycle threshold, Ct)，以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值反映 Cytochrome C 基

因的相对表达量。

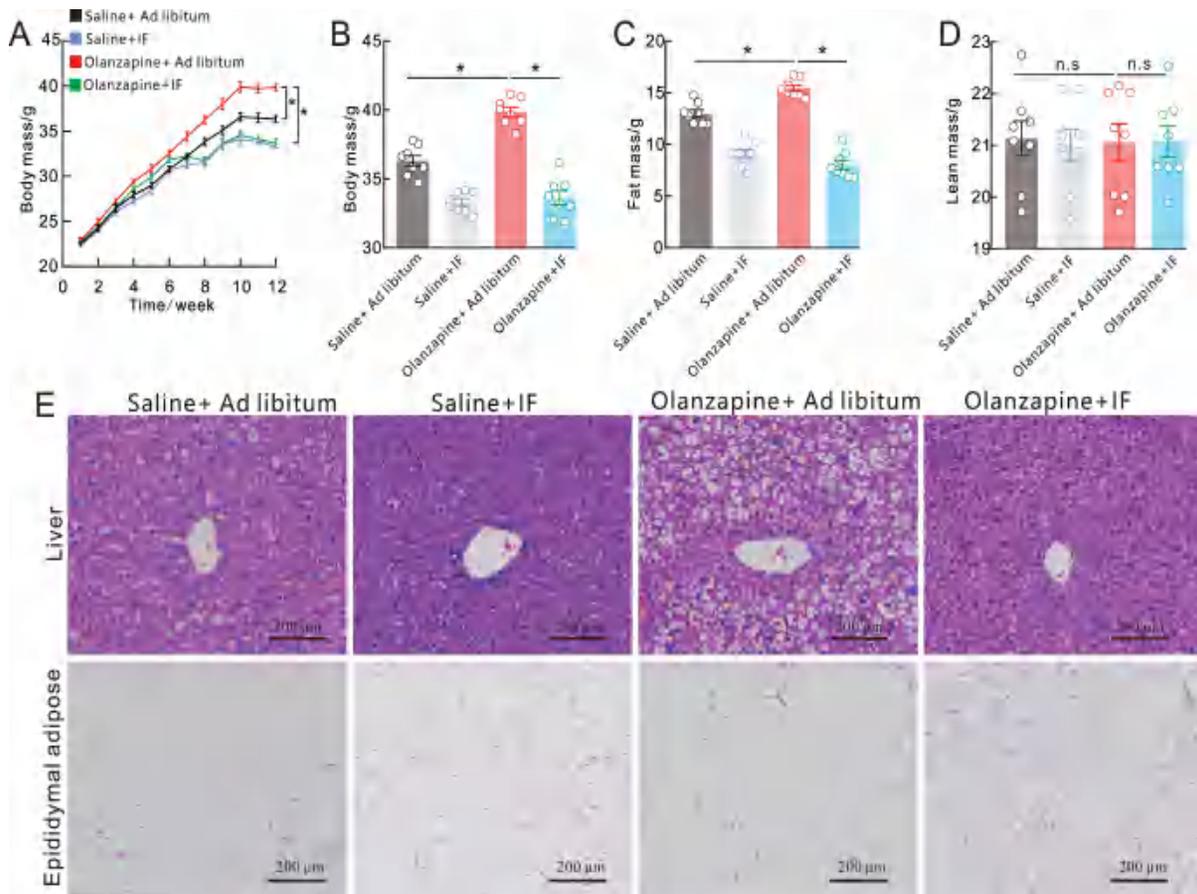
1.10 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析和双因素重复测量方差分析法进行组间比较，采用 Turkey 事后检验法进行校准。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 间歇禁食对摄入奥氮平小鼠体质量、体脂分布和内脏脂肪浸润的影响

8 周龄 C57BL/6J 雄鼠建模后，连续 12 周记录体质量，分析间歇禁食后小鼠体质量的变化 (图 1A)。与



注：A，连续 12 周记录不同处理组小鼠的体质量变化 ($^*F=161.20$, $P<0.001$)；B，奥氮平摄入 12 周后间歇禁食对小鼠体质量的影响 ($^*F=62.87$, $P<0.001$)；C，奥氮平摄入 12 周后小鼠脂肪含量的变化 ($^*F=0.027$, $P<0.001$)；D，奥氮平摄入 12 周后小鼠瘦素含量 ($^{ns}F=78.54$, $P=0.994$)；E，奥氮平摄入 12 周后小鼠肝脏和附睾旁脂肪细胞形态 (HE 染色，比例尺大小均为 200 μm)。

Note: A, Body mass changes of mice in different treatment groups for 12 consecutive weeks ($F=161.20$, $^*P<0.001$, two-way ANOVA followed by Turkey's post-test). B, Effect of intermittent fasting on body mass of mice with olanzapine diet for 12 weeks ($^*F=62.87$, $P<0.001$, one-way ANOVA followed by Turkey's post-test). C, The changes of fat mass in mice after olanzapine diet for 12 weeks ($^*F=0.027$, $P<0.001$, one-way ANOVA followed by Turkey's post-test). D, The changes of lean mass in mice after olanzapine diet for 12 weeks ($^{ns}F=78.54$, $P=0.994$, one-way ANOVA followed by Turkey's post-test). E, Liver and epididymal adipose morphology after olanzapine diet for 12 weeks (HE staining, the scale bar is 200 μm).

图 1 间歇禁食对奥氮平小鼠体质量、体脂分布和内脏脂肪浸润的影响

Figure 1 Effects of intermittent fasting on body mass, body fat distribution, visceral fat infiltration in olanzapine-induced mice

生理盐水+自由摄食组相比, 奥氮平给药+自由摄食组的小鼠体质量持续增高; 而间歇禁食干预后, 奥氮平给药+间歇禁食组小鼠的体质量显著降低 ($P<0.001$)。建模12周后, 与生理盐水+自由摄食组的小鼠体质量相比, 奥氮平给药+自由摄食组的小鼠体质量显著增高, 间歇禁食干预显著降低了奥氮平给药+间歇禁食组小鼠体质量 ($P<0.001$, 图1B)。

建模12周后, 与生理盐水+自由摄食组的小鼠肝脏体质量 (2.81 ± 0.32) g相比, 奥氮平给药+自由摄食组小鼠的肝脏质量 (3.51 ± 0.31) g显著增高, 而奥氮平给药+间歇禁食组小鼠的肝脏质量 (1.11 ± 0.51) g显著降低 ($P<0.001$)。与生理盐水+自由摄食组的小鼠附睾旁脂肪质量 (2.62 ± 0.22) g相比, 奥氮平给药+自由摄食组小鼠的附睾旁脂肪质量 (2.23 ± 0.33) g显著增高, 而奥氮平给药+间歇禁食组小鼠的附睾旁脂肪质量 (1.21 ± 0.41) g显著降低 ($P<0.001$)。

进一步通过磁共振分析体质量增加的具体成分, 结果表明, 与生理盐水+自由摄食组相比, 奥氮平给药+自由摄食组小鼠的脂肪含量显著增高; 而间歇禁食干预后, 奥氮平给药+间歇禁食组小鼠的脂肪含量显著

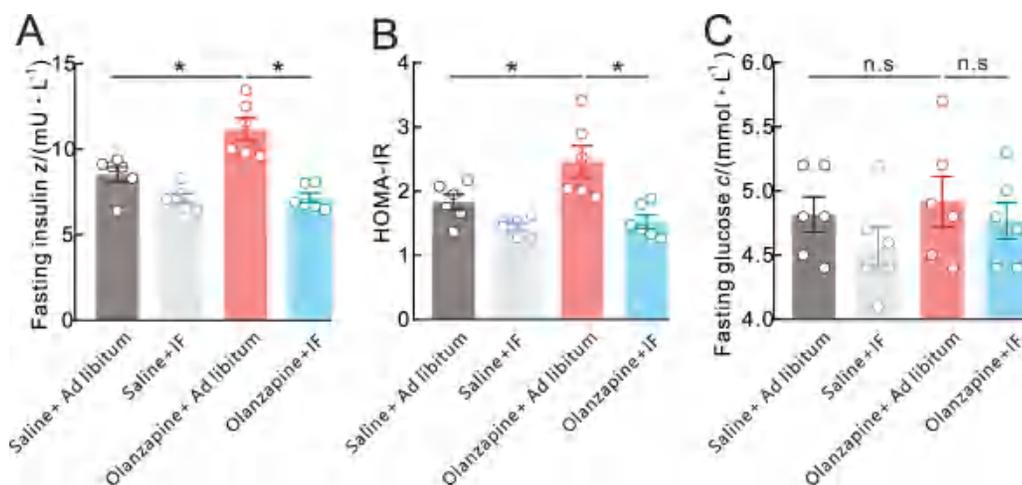
减少 ($P<0.001$, 图1C); 但是奥氮平处理和间歇禁食干预都不影响小鼠瘦素含量 ($P>0.05$, 图1D)。

此外, 内脏脂肪浸润是肥胖的主要特征。HE染色结果表明, 奥氮平干预小鼠的肝脏和附睾旁脂肪细胞体积明显增大, 间歇禁食处理后其细胞体积明显变小 (图1E)。

因此, 间歇性禁食对奥氮平摄入引起的小鼠肥胖, 尤其是内脏脂肪浸润, 有显著的改善作用。

2.2 间歇禁食对摄入奥氮平小鼠空腹血糖、胰岛素和胰岛素抵抗水平的影响

奥氮平连续干预12周后, 观察实验小鼠空腹血糖、血清中胰岛素水平和胰岛素抵抗水平 (即HOMA-IR) 的变化。与生理盐水+自由摄食组小鼠相比, 奥氮平给药+自由摄食组小鼠的空腹胰岛素水平和HOMA-IR显著增高, 而间歇禁食干预后, 奥氮平给药+间歇禁食组小鼠的空腹胰岛素水平 ($P<0.001$, 图2A) 和HOMA-IR ($P<0.001$, 图2B) 水平显著降低; 但4组小鼠空腹血糖水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$, 图2C)。结果表明, 间歇禁食可能通过调节胰岛素和胰岛素抵抗来改善奥氮平诱导的肥胖作用。



注: 间歇禁食干预12周后, 检测小鼠空腹胰岛素含量 (A) ($F=18.08$, $P<0.001$)、胰岛素抵抗的稳态模型评估 (HOMA-IR) 指数 [空腹血糖 (mmol/L) \times 空腹胰岛素 (mU/L) / 22.5] (B) ($F=9.707$, $P=0.0004$), 以及小鼠血糖含量 (C) ($F=0.860$, $P=0.477$)。

Note: After 12 weeks of intermittent fasting, detecting fasting insulin levels (A) ($F=18.08$, $P<0.001$, one-way ANOVA followed by Turkey's post-test), homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) (B) ($F=9.707$, $P=0.0004$, one-way ANOVA followed by Turkey's post-test), and fasting glucose levels (C) ($F=0.860$, $P=0.477$, one-way ANOVA followed by Turkey's post-test).

图2 间歇禁食对奥氮平小鼠空腹血糖、胰岛素和胰岛素抵抗水平的影响

Figure 2 Effects of intermittent fasting on fasting blood glucose, insulin, and HOMA-IR, in olanzapine-induced mice

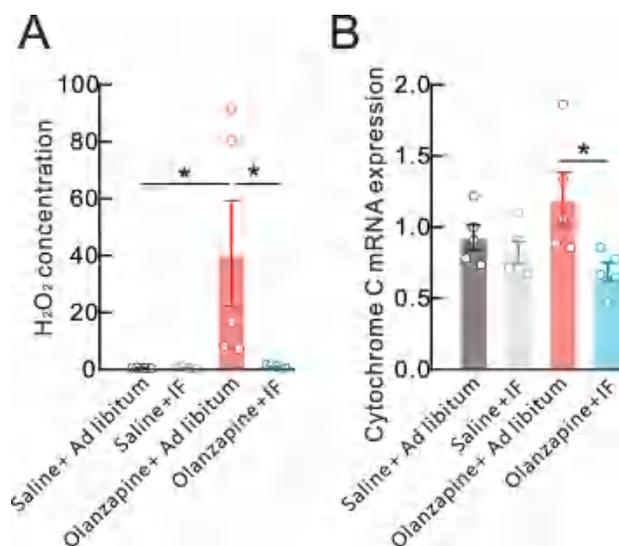
2.3 间歇禁食对氧化应激因子 H₂O₂ 和 Cytochrome C 的影响

动物实验和临床研究均表明, 脂肪组织慢性炎症

反应与氧化应激和线粒体功能异常密切相关。如图3所示, 与生理盐水+自由摄食组小鼠相比, 奥氮平给药+自由摄食组小鼠的H₂O₂释放量明显增多, 同时线

粒体标志物 Cytochrome C 的 mRNA 转录水平明显升高 ($P < 0.05$); 而奥氮平给药+间歇禁食组小鼠的 H_2O_2 释放量和 Cytochrome C mRNA 转录水平均明显低于奥氮平给药+自由摄食组 ($P < 0.05$)。

因此, 间歇禁食有助于缓解奥氮平诱导的氧化应激水平和线粒体功能异常。



注: 间歇禁食 12 周后, ELISA 检测小鼠 H_2O_2 释放量 (A) ($F=4.633$, $P=0.016$), 实时定量 PCR 检测 Cytochrome C 的 mRNA 转录水平 (B) ($F=3.605$, $P=0.031$)。

Note: Hydrogen peroxide release was detected by ELISA (A) ($F=4.633$, $P=0.016$), and the transcriptional level of Cytochrome C mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (B) ($F=3.605$, $P=0.031$) after 12 weeks of intermittent fasting treatment in mice.

图 3 间歇性禁食对奥氮平小鼠氧化应激因子和线粒体功能的影响

Figure 3 Effects of intermittent fasting on oxidative stress, mitochondrial function in olanzapine-induced mice

3 讨论

精神分裂症是严重困扰大众的精神疾病之一, 患者主要表现出阳性症状 (包括幻想、思维混乱、感觉异常等)、阴性症状 (包括情感淡漠、动机缺乏、社交功能退化等) 和认知障碍等症状, 涉及多维度的认知和情绪障碍^[12]。研究表明, 单纯的药物治疗对患者认知提升和恢复的效果甚微^[13], 因此需要配合全方位的呵护。此外, 长期的药物摄入也会极大影响新稳态的建立。本研究证明, 奥氮平摄入会增加机体罹患糖尿病和心血管疾病的风险, 配合间歇禁食疗法可显著降低奥氮平不良反应的发生程度, 同时也缓解了代谢紊

乱带来的不良后果。

间歇禁食法不仅在心血管疾病和糖尿病等代谢性疾病中起到调节作用, 而且参与调节线粒体能量稳态^[14]。在脑卒中模型中, 间歇禁食增高了脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、抗氧化应激因子热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 和抗炎细胞因子的水平, 显著抑制炎症因子的表达, 减少组织损伤, 改善功能^[15]。高脂饮食诱导的肥胖能够被间歇禁食疗法所逆转, 使用炎症小体通路的激动剂也可发挥相似的效应, 提示其相互之间存在紧密的联系^[16]。总之, 间歇禁食能够最大限度地提高机体面对应激和炎症反应的自我修复水平, 极大提升机体的自我修复能力。一方面, 间歇禁食或者饥饿可导致多种生物体 (主要有线虫和果蝇等) 的长寿效应。在酵母细胞中, 糖类和脂肪分解产生葡萄糖、乙酸和乙醇的过程中, 也会加速细胞衰老过程; 在人群研究中, 特定类型脂肪 (中链与中长链脂肪) 的摄入量也很重要。长链脂肪酸等替代碳水化合物和蛋白质, 会影响糖异生和葡萄糖水平, 从而促进衰老和疾病发生。而间歇禁食能够改善肠道运动, 增强肝细胞对胰岛素的敏感性, 从而在整体上降低氧化应激和炎症反应水平, 这对优化中枢和外周神经系统的能量代谢至关重要^[17]。另一方面, 间歇禁食对机体有强大的修复能力, 能够诱导机体对胰岛素更敏感, 降低血压、代谢和炎症反应水平, 改善心肌梗死、糖尿病、中风、阿尔茨海默病和帕金森病的发生与发展。总的结果是触发细胞适应性反应, 诱导机体面对压力更强的适应性和免疫力, 保护细胞免受 DNA 损伤, 抑制细胞生长, 增强受损细胞的凋亡^[18]。因此, 间歇禁食有望成为非常重要的临床干预策略。

一般认为炎症小体通过骨架蛋白被内源性/外源性刺激激活, 导致炎症小体组装。炎症小体形成后, 前体半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 可以自我激活, 紧接着 Caspase-1 将细胞因子前体切割成成熟的细胞因子, 这些细胞因子在细胞外分泌, 加剧 IL-1 β 和 IL-18 的释放^[14]。而相关途径又涉及线粒体活性氧和腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) -Unc-51 样激酶-1 (Unc-51-like kinase 1, ULK1) 自噬信号级联。脂肪细胞中的炎症小体激活后, 会损害几个靶组织中的胰岛素信号, 从而降低糖耐量和胰岛素敏感性。此外, IL-1 β 通过肿瘤坏死因子非依赖性和依赖性途径影响胰岛素敏感性^[19-20]。本

研究中动物实验进一步表明：间歇禁食疗法缓解奥氮平诱导肥胖的机制也与小鼠血糖、胰岛素和胰岛素抵抗有关，同时显著抑制了肝脏和附睾旁脂肪垫脂肪细胞的脂肪堆积，在动物整体水平上显著缓解了动物肥胖的发展。总之，间歇禁食可能有效缓解长期使用奥氮平引发的肥胖等不良症状。

线粒体是细胞三磷酸腺苷（adenosine-triphosphate triphosphate, ATP）合成的主要场所，通过ATP释放推动细胞能量代谢和新陈代谢。一般来说，线粒体功能变化包括线粒体形态、活性、生物合成、分解和代谢需求。本研究结果证明：奥氮平摄入会极大地提高机体葡萄糖和游离脂肪酸的水平，糖耐

量水平也显著增高。葡萄糖和游离脂肪酸一旦持续性处于高水平，会进一步刺激线粒体氧化应激反应，包括 H_2O_2 和ROS水平升高，诱发机体炎性反应和核因子 κB （nuclear factor kappa-B, NF- κB ）的磷酸化水平升高。此外，过量产生的 H_2O_2 和ROS也会损伤线粒体能量平衡，最终诱发机体陷入炎性反应的恶性循环之中。本研究中，间歇禁食减少了 H_2O_2 的释放量，并且降低了线粒体功能重要标志物Cytochrome C的转录水平。根据现有的实验结果，笔者推断，间歇禁食法改善奥氮平引起小鼠代谢紊乱的潜在通路模式如图4所示。总之，间歇禁食可能通过维持线粒体功能和炎性因子水平，发挥调节代谢的作用。

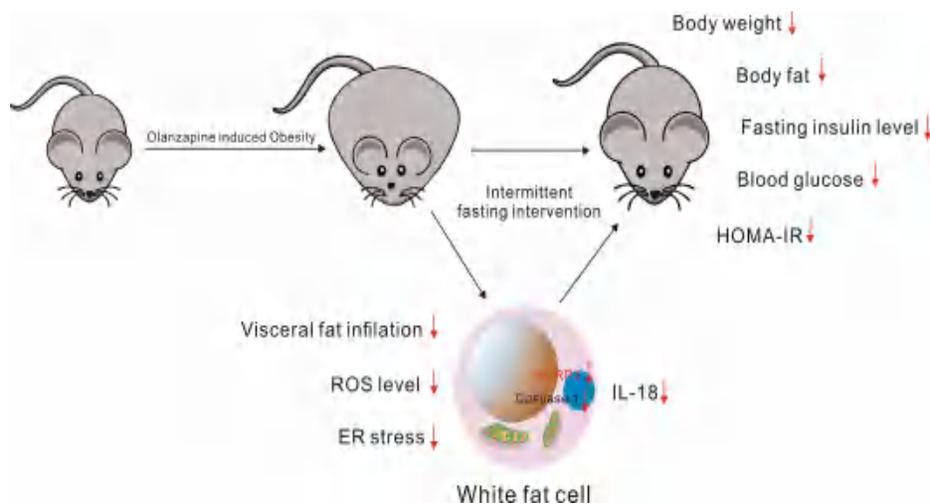


图4 间歇禁食法改善奥氮平诱导小鼠代谢紊乱的潜在通路模式图

Figure 4 Schematic illustration of potential pathways underlying the mechanism of intermittent fasting in ameliorating olanzapine-induced metabolic disorders in mice

综上所述，奥氮平被临床广泛应用于精神分裂症的治疗，但是长期使用会造成机体多层次的功能损伤，并且常常伴随糖耐量异常、炎症小体和线粒体功能紊乱等损伤，患者出现肥胖和糖尿病的风险陡然增加，最终引发器质性损害。间歇禁食与传统医学药物治疗不同，摒弃了药物可能的不良反应，可以多层次缓解炎症小体产生、线粒体功能变化和糖耐量异常。目前已经有大量的研究从多维度解析炎症反应与肥胖的关系。本研究结果进一步提示，间歇禁食对奥氮平诱导的代谢紊乱具有治疗作用，而且这种治疗机制可能与抑制炎症反应有关。因此，本研究通过探讨间歇禁食对奥氮平诱导性代谢紊乱的影响，以期为奥氮平诱导的代谢紊乱找到防治的突破点，推动新的治疗策略和新方法的产生。

[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睿太莫斯生物科技有限公司实验动物使用与管理委员会批准（批号：SHRTMOBIO-IACUC-PR01-20211115）。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 experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Animal Care and Use Committee in Shanghai RAT&MOUSE BIOTECH CO., LTD (Approval Letter No. SHRTMOBIO-IACUC-PR01-20211115), and all experimental protocols were carried out in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

李晗: 负责实验操作、文章写作;

张笑瑞: 负责数据分析;

张成芳: 负责实验设计指导, 文章修改及把关。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] STĘPNICKI P, KONDEJ M, KACZOR A A. Current concepts and treatments of schizophrenia[J]. *Molecules*, 2018, 23(8): E2087. DOI:10.3390/molecules23082087.
- [2] JOHNSEN E, KROKEN R A, LØBERG E M, et al. Amisulpride, aripiprazole, and olanzapine in patients with schizophrenia-spectrum disorders (BeSt InTro): a pragmatic, rater-blind, semi-randomised trial[J]. *Lancet Psychiatry*, 2020, 7(11): 945-954. DOI:10.1016/S2215-0366(20)30341-2.
- [3] CHENG Z, YUAN Y B, HAN X, et al. An open-label randomised comparison of aripiprazole, olanzapine and risperidone for the acute treatment of first-episode schizophrenia: eight-week outcomes[J]. *J Psychopharmacol*, 2019, 33(10): 1227-1236. DOI:10.1177/0269881119872193.
- [4] POZNYAK A, GRECHKO A V, POGGIO P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5):1835. DOI:10.3390/ijms21051835.
- [5] STANCU I C, CREMERS N, VANRUSSELT H, et al. Aggregated Tau activates NLRP3-ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo[J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 137(4): 599-617. DOI:10.1007/s00401-018-01957-y.
- [6] BARRA N G, HENRIKSBO B D, ANHÊ F F, et al. The NLRP3 inflammasome regulates adipose tissue metabolism[J]. *Biochem J*, 2020, 477(6):1089-1107. DOI:10.1042/BCJ20190472.
- [7] MEYERS A K, ZHU X W. The NLRP3 inflammasome: metabolic regulation and contribution to inflammaging[J]. *Cells*, 2020, 9(8):1808. DOI:10.3390/cells9081808.
- [8] LIU Q Y, ZHANG D Y, HU D Y, et al. The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Mol Immunol*, 2018, 103:115-124. DOI:10.1016/j.molimm.2018.09.010.
- [9] MILLS E L, KELLY B, LOGAN A, et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 457-470. e13. DOI:10.1016/j.cell.2016.08.064.
- [10] ANTONI R, JOHNSTON K L, COLLINS A L, et al. Effects of intermittent fasting on glucose and lipid metabolism[J]. *Proc Nutr Soc*, 2017, 76(3): 361-368. DOI: 10.1017/S0029665116002986.
- [11] LIANG B J, LIAO S R, HUANG W X, et al. Intermittent fasting therapy promotes insulin sensitivity by inhibiting NLRP3 in inflammasome in rat model[J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(5): 5299-5309. DOI:10.21037/apm-20-2410.
- [12] HUANG Y Q, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(3): 211-224. DOI:10.1016/S2215-0366(18)30511-X.
- [13] 徐若愚, 李献云. 精神分裂症认知行为治疗的研究进展[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2022, 22(5):342-346.
- [13] XU R Y, LI X Y. Research progress of cognitive behavioral therapy for schizophrenic[J]. *J Neurosci Ment Health*, 2022, 22(5):342-346.
- [14] CARTERI R B, MENEGASSI L N, FELDMANN M, et al. Intermittent fasting promotes anxiolytic-like effects unrelated to synaptic mitochondrial function and BDNF support[J]. *Behav Brain Res*, 2021, 404:113163. DOI:10.1016/j.bbr.2021.113163.
- [15] MATTSON M P, LONGO V D, HARVIE M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 39:46-58. DOI:10.1016/j.arr.2016.10.005.
- [16] WU K K L, CHEUNG S W M, CHENG K K Y. NLRP3 inflammasome activation in adipose tissues and its implications on metabolic diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11):4184. DOI:10.3390/ijms21114184.
- [17] ROTHMAN S M, GRIFFIOEN K J, WAN R Q, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1264(1):49-63. DOI:10.1111/j.1749-6632.2012.06525.x.
- [18] LONGO V D, MATTSON M P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications[J]. *Cell Metab*, 2014, 19(2): 181-192. DOI:10.1016/j.cmet.2013.12.008.
- [19] ZHANG W J, CHEN S J, ZHOU S C, et al. Inflammasomes and fibrosis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 643149. DOI: 10.3389/fimmu.2021.643149.
- [20] KAWAI T, AUTIERI M V, SCALIA R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(3):C375-C391. DOI:10.1152/ajpcell.00379.2020.

(收稿日期:2022-06-20 修回日期:2022-07-21)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,姜怡欣)

[引用本文]

李晗, 张笑瑞, 张成芳. 间歇禁食法在改善奥氮平诱导小鼠代谢紊乱中的机制研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(1):3-10. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.089.

LI H, ZHANG X, ZHANG C. Mechanism of intermittent fasting in improving olanzapine-induced metabolic disorders in mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(1): 3-10. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.089.



金立伦, 主任医师, 硕士研究生导师, 现任上海交通大学医学院附属新华医院中医科主任, 并担任上海市中医药学会第四届综合性医院中医药工作委员会副主任委员、上海市中医药学会第二届针刀分会副主任委员及上海市中医药学会第十届骨伤科分会常务委员等职务。从事中医临床工作三十年, 擅长运用内服、外治、针刀手法等各类中医适宜技术治疗各种骨伤科疾病。作为金氏中医经方派第五代传人, 传承全国首批五百名老中医药专家学术经验继承导师上海名老中医金明渊的学术思想, 擅用传统经方诊治各类内科杂病, 注重中西医结合, 倡导整体治疗理念。其主持的“魏氏伤科消瘀散治疗膝关节炎基础及临床研究”获2016上海市中医药科技三等奖, “基于活血散瘀外治法治疗膝关节炎的规范化研究及其机制探讨”获2017年上海中西医结合科学技术奖二等奖; 其整理先祖金明渊撰写的《伤寒方历代治案》获华东地区科技出版社优秀科技图书一等奖、2013年度全国优秀古籍图书奖二等奖。发表论文40余篇。主持上海市科委等基金项目10余项, 获国家专利2项。

转录组测序筛选大鼠滑膜炎差异表达基因及秦皮素治疗靶点的体外验证

杨凌¹, 庄迪², 金立伦¹

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院中医科, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院麻醉科, 上海 200092)

[摘要] **目的** 基于转录组测序分析碘乙酸钠 (monosodium iodoacetate, MIA) 诱导的膝关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 大鼠相比于正常组大鼠滑膜组织中的表达差异基因, 并初步筛选出秦皮素 (fraxetin) 治疗滑膜炎的靶点。**方法** 将SD大鼠分为KOA模型组和对照组, 采用MIA膝关节注射法制备大鼠右膝KOA模型。造模4周后, 取各组大鼠右膝滑膜组织进行转录组测序, 获得了KOA模型组与对照组大鼠滑膜组织中mRNA差异表达情况, 然后进行差异基因表达分析、GO富集分析、KEGG功能富集分析和PPI蛋白网络互作分析。同时将巨噬细胞Raw264.7分为对照组、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 干预组和LPS+60 μmol/L秦皮素联合干预组, 并采用实时荧光定量PCR法对转录组测序后的差异基因分析结果进行验证。**结果** 转录组测序后的差异基因表达分析显示, KOA模型组与对照组相比, 共有1730个上调基因和1546个下调基因, 其中显著上调的基因有mmp12、Acod1、Acan、Col2a1和Atp6v0d2等 [$|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 1$, 校正后 $P < 0.01$]。KEGG聚类分析和GO聚类分析显示, 差异基因主要参与调节炎症及免疫代谢过程, 例如三羧酸循环、线粒体功能。LPS干预后的Raw264.7细胞中Acod1与Atp6v0d2显著高表达 ($P < 0.0001$), 而且相较于LPS干预组, LPS+秦皮素联合干预后的Raw264.7细胞中Atp6v0d2表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。**结论** MIA诱导KOA建模后, 大鼠膝关节滑膜组织中中介炎症及免疫代谢的巨噬细胞相关基因mmp12、Acod1和Atp6v0D2等高表达, 提示KOA的发生、发展过程中可能存在由滑膜巨噬细胞介导的免疫代谢改变。LPS干预后巨噬细胞Raw264.7中Acod1和Atp6v0d2表达增高可初步证实这一结果。其中Atp6v0D2可能是秦皮素治疗滑膜炎的一个潜在靶点, 这为KOA治疗提供了新的思路。

[关键词] 骨关节炎; 转录组测序; 免疫代谢; 滑膜巨噬细胞; 秦皮素

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0011-10



[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目“消瘀散新组方治疗KOA的临床规范化研究”(19401932000); 上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划项目“北部区域中医骨关节病专病联盟建设”[ZY(2021-2023)-03-02-25]

[第一作者] 杨凌(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 膝关节炎的发病机制与中药干预。E-mail: yangli4141@163.com

[通信作者] 金立伦(1967—), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 膝关节炎的发病机制与中药干预。E-mail: jinlilun@xinhuaamed.com.cn. ORCID: 0000-0001-9840-836X

Screening of Differentially Expressed Genes in Rat Synovitis by Transcriptome Sequencing and *in Vitro* Verification of Therapeutic Target of Fraxetin

YANG Ling¹, ZHUANG Di², JIN Lilun¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Department of Anesthesiology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Correspondence to: JIN Lilun (ORCID: 0000-0001-9840-836X), E-mail: jinlilun@xinhuamed.com.cn

[ABSTRACT] Objective Using transcriptome sequencing to screen the differentially expressed genes between the synovial tissue of rats with knee osteoarthritis (KOA) induced by monosodium iodoacetate (MIA) and that of normal rats, and then screen the target of fraxetin in the treatment of synovitis. **Methods** SD rats were divided into KOA group and the negative control (NC) group. Rat right knee KOA model was prepared by MIA knee joint injection in KOA group and none treatments in NC group. Four weeks after modeling, the right knee synovial tissue of rats in each group was taken for transcriptome sequencing. Then the differential gene expression analysis, GO enrichment analysis, KEGG function enrichment analysis and PPI protein network interaction analysis were performed. The synovial macrophage Raw264.7 cells were divided into the control group, lipopolysaccharide (LPS) intervention group and LPS+60 $\mu\text{mol/L}$ fraxetin intervention group, then RNA-sequencing results were verified by qRT-PCR in the three groups. **Results** The results of differential gene-expression analysis showed that there were 1 730 up-regulated genes and 1 546 down-regulated genes in the KOA group compared with the control group, among which the significantly up-regulated genes were *mmp12*, *Acod1*, *Acan*, *Col2a1*, *Atp6v0d2* ($|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 1$, adjusted $P < 0.01$). KEGG cluster analysis and GO cluster analysis showed that differential genes were mainly involved in the regulation of inflammation and immune metabolism, such as tricarboxylic acid cycle and mitochondrial function. The expressions of *Acod1* and *Atp6v0d2* in Raw264.7 cells after LPS intervention were significantly higher. Compared with the LPS intervention group, the expression level of *Atp6v0d2* in Raw264.7 cells after LPS+fraxetin combined intervention was significantly lower. **Conclusion** After modeling KOA induced by MIA, macrophage-related genes *mmp12*, *Acod1* and *Atp6v0d2*, which mediate inflammation and immune metabolism, were highly expressed in the synovial tissue of rats, suggesting that there might be immune metabolism changes mediated by synovial macrophages during the occurrence and development of KOA. The increased expression of *Acod1* and *Atp6v0d2* in macrophages Raw264.7 after LPS intervention can preliminarily confirm this result. Among them, *Atp6v0d2* may be a potential target of fraxetin in the treatment of synovitis, which provides a new idea for KOA treatment.

[Key words] Osteoarthritis; Transcriptome sequencing; Immunometabolism; Synovial macrophage; Fraxetin

近年来骨关节炎在全球高度流行，影响了全球大约7%的人口，是导致关节畸形等残疾的主要原因，往往对患者的身心造成负面影响^[1]。骨关节炎病变可累及软骨、滑膜、关节韧带和软骨下骨^[2]。其中，滑膜炎多发生于早期，可能早于软骨损伤^[3]，其严重程度与局部软骨损伤及疼痛相关^[4]。滑膜组织中包含大量的巨噬细胞，且在关节炎中起到关键作用，其中激活的M1型巨噬细胞促炎，而激活的M2型抗炎^[5]。而且滑膜巨噬细胞与软骨细胞降解有着一定的联系^[6]。目

前，骨关节炎尚不可根治，西医临床多于早期给予非甾体类抗炎药以改善症状^[7]，或于晚期使用手术关节置换法进行治疗^[8]，这些均会引起一定的不良反应，且患者不易耐受^[9]。

膝骨关节炎（knee osteoarthritis, KOA）是常见的骨关节炎类型。中医药在治疗KOA方面具有独特优势^[10]，其创伤小，价格低，疗效确切，且不良反应小，受到越来越多的关注。为探索中医药治疗KOA的明确机制，本课题组前期研究发现中药单体秦皮素

(fraxetin) 对大鼠骨关节炎有明显的缓解作用, 其可能通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路来调节软骨细胞凋亡和基质降解^[11], 从而改善滑膜炎。另有研究表明, 其他一些中医药及活性成分如升麻素苷^[12]、当归^[13]等, 可通过 NF- κ B 及丝裂原活化蛋白激酶通路, 或通过调节炎症反应、免疫及脂肪因子等途径缓解骨关节炎症状。

疾病的发生、发展是一个复杂的过程, 因而从单一基因或单一通路来探究疾病的发生发展因素、寻求治疗靶点是片面且困难的。本研究采用碘乙酸钠关节腔注射法^[14-15]建立 KOA 大鼠模型, 通过高通量转录组测序方式筛选出正常组大鼠和 KOA 模型大鼠滑膜组织中差异表达基因, 并对差异表达基因进行生物信息学分析, 找出参与 KOA 发生发展的关键基因和显著相关信号通路; 然后选用巨噬细胞 Raw264.7, 经脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 以及 LPS+秦皮素联合干预, 验证测序所得关键基因与秦皮素治疗是否相关, 进而为治疗 KOA 提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

2月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只, 体质量 280~320 g, 购自上海吉辉实验动物饲养有限公司 [SCXK (沪) 2017-0012]。质量合格证号为 20170012021517。实验动物饲养于上海交通大学医学院附属新华医院实验动物屏障设施 [SYXK (沪) 2018-0038], 室温 (22±2) °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 明/暗循环, 且提供标准的实验动物过滤灭菌饮用水及钴 60 辐照灭菌饲料 (由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供)。动物实验方案获得上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会审查批准 (XHEC-F-2022-060), 遵循实验动物 3R 原则。

小鼠来源巨噬细胞系 Raw264.7 来自美国 ATCC 公司, 使用高糖完全培养基 (10% 胎牛血清+90% 高糖培养基) 于 CO₂ 细胞培养箱进行培养, 并保存于 -80 °C 超低温冰箱。

1.2 主要试剂和仪器

碘乙酸钠 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号: Lot# C10867051); 戊巴比妥钠 (美国 Sigma-Aldrich 公司, P3761); 脂多糖 (美国 Sigma 公司, L2880-10MG); 秦皮素 (美国 MCE 公司, HY-N0580); 胎牛血清及高糖培养基购自美国 Gibco 公司; PCR 所需引物

序列由上海华津生物科技有限公司设计并合成; CO₂ 窒息安乐死设备为本院动物房配置; 实时荧光定量 PCR 所用仪器 QuantStudio 和 -80 °C 超低温冰箱购自美国 Thermo 公司; CO₂ 细胞培养箱购自美国 Health Force 公司。

1.3 大鼠模型制备

SD 大鼠经 1 周适应性饲养后, 采用简单随机化法将其分为对照组和 KOA 模型组, 每组 5 只。依据前期造模方法^[11], 对照组不做处理, KOA 模型组采用碘乙酸钠注射法造模, 具体方法: SD 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉 (0.3 mL/100 g) 后, 剔除大鼠右膝关节处毛发, 屈膝, 从髌韧带中点偏右侧垂直进针, 待针尖明显突破后, 于膝关节腔注射 30 mg/mL 的碘乙酸钠 0.1 mL, 后反复屈伸膝关节, 使药物均匀分布。处理完成后将两组大鼠饲养于同一环境下, 4 周后进行滑膜组织取材。

1.4 大鼠滑膜组织取材

造模后大鼠饲养 4 周, 采用过量 CO₂ 窒息法安乐死。大鼠取仰卧位置于操作台上, 消毒备皮, 切开膝关节处皮肤, 手术刀剔除关节四周肌肉组织, 层层剥离髌骨周围软组织, 直至暴露出半透明状光滑的滑膜组织, 后用齿镊提起髌骨, 完整剥离其周围滑膜组织游离端并取出, 放入 RNALater 组织保存液中, 置于 -20 °C 冰箱冷冻保存, 用于后续测序分析。

1.5 高通量测序

滑膜组织样品从 -20 °C 冰箱取出后, 进行总 RNA 提取与质检, 后经 mRNA 富集、双链 cDNA 合成、PCR 富集与文库纯化与库建后, 开展高通量 Illumina 测序分析。测序部分由上海生因生物科技有限公司实施。

1.6 生物信息学分析

生物信息学分析按照“高通量测序→数据质控→参考基因组比对→基因表达水平分析→聚类分析→GO/KEGG 富集→蛋白互作网络分析”的技术路线开展。

1.6.1 样品间相关性检验和主成分分析

分析样品间基因表达水平可以检测实验与样品选择是否可靠合理, 以相关系数来表示样品间表达模式的相似程度。而样品间基因表达量主成分分析, 用于评估生物重复性和处理条件间的整体差异, 以及实验样本的分组情况和实验设计的合理性。

1.6.2 基因差异表达分析

火山图可直观体现差异基因分布情况, 将阈值设

为 $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 1$ 且校正后 $P < 0.01$, 将对照组和KOA模型组中的差异基因进行筛选。之后根据差异表达基因的表达量, 取以2为底的对数, 利用分层聚类法(Hierarchical Cluster)将功能相同或相近的基因进行聚类分析, 结果以热图的形式展示。

1.6.3 差异表达基因功能分析

采用GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.jp/>)数据库分别对差异表达基因(表达上调基因和表达下调基因)进行GO富集分析和KEGG功能富集分析, 并用气泡图将结果进行展示。

1.6.4 蛋白互作网络分析

选择Top 500的表达差异基因, 从STRING蛋白质互作数据库(<http://string-db.org/>)中提取出目标基因集的互作关系, 构建网络, 进行PPI (protein-protein interaction)分析。分析结果用差异基因蛋白互作网络示意图来展示。

1.7 差异表达基因分析

对于没有生物学重复的样本, 使用DEGseq R包(1.28.0)对两种条件进行差异表达分析; 对于具有生物学重复的样本, 使用DESeq2 R包(1.26.0)对两种条件进行差异表达分析。其中, $P < 0.05$ 和 $|\text{FoldChange}| \geq 2$ 被设为显著表达差异的阈值。

1.8 细胞体外验证实验

将Raw264.7巨噬细胞分为3组: 对照组、LPS干预组(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和LPS+秦皮素组(60 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。对照组不做特殊干预, LPS+秦皮素组用秦皮素提前干预2 h后, 将该组与LPS组同时加入LPS干预24 h。其中, 用LPS干预来模拟KOA滑膜炎状态下的巨噬细胞。采用实时荧光定量PCR法对测序中发现显著高表达且与巨噬细胞介导免疫代谢相关的Acod1 (IRG1)、Atp6v0d2基因的表达量进行验证。通过对比对照组与LPS干预组中的基因表达量, 验证测序结果中KOA模型组大鼠相对于正常组大鼠的滑膜组织中高表达基因; 同时通过对比LPS+秦皮素联合干预组与LPS干预组中的基因表达量, 筛选出中药单体秦皮素治疗KOA模型大鼠滑膜炎的潜在作用靶点。每个样品设3个复孔, PCR实验重复3次。

PCR所需的引物序列如下: 内参GAPDH的正向引物为5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 反向引物为5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'; Atp6v0d2基因的正向引物为5'-GAGATGGAAGCTGTCAACAT-3', 反向引物为5'-TCTGCCACTCTTTCATCTG-3'; Acod1基因

的正向引物为5'-ACTCAGACTAAGCCCCTTCAT-3', 反向引物为5'-GGAAGCTCTTAAAGGCCACAT-3'。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值反映目的基因的mRNA相对水平。

1.9 统计学方法

实验数据采用GraphPad Prim软件进行统计分析, 计量资料采用平均数 \pm 标准差的形式表示。多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验与样品可靠性

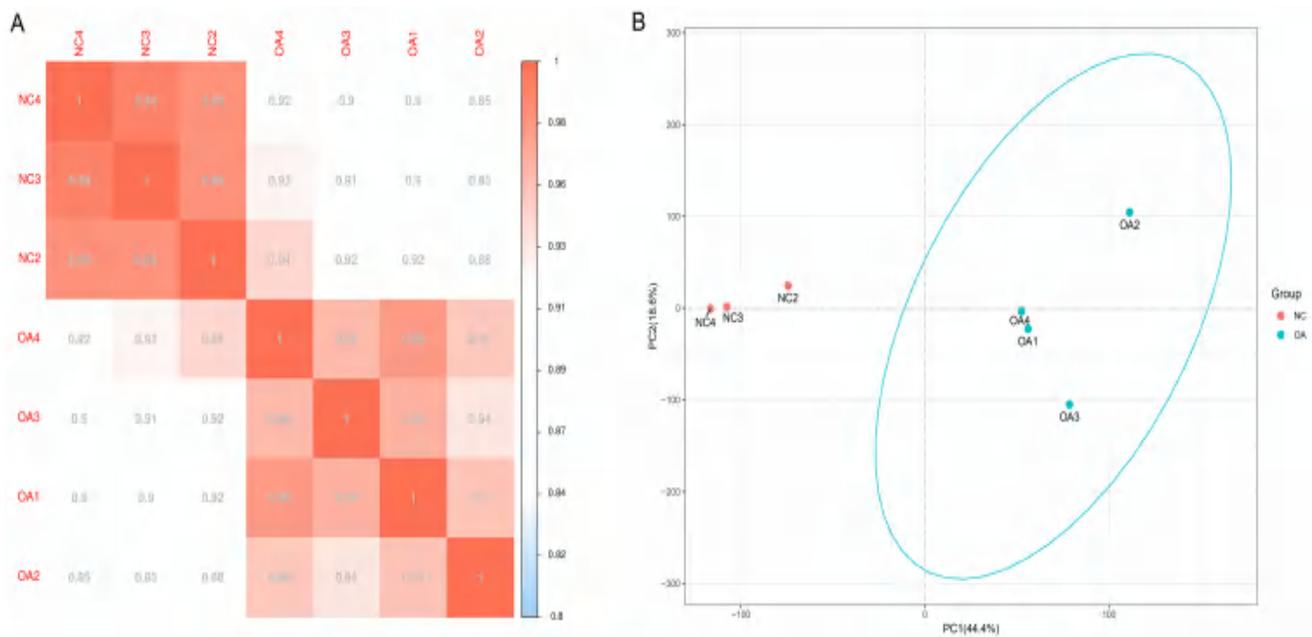
Illumina测序后相关性检验如图1A所示, 对照组与KOA模型组之间差异明显, 而组内相似度较高。在主成分分析的平面直角坐标系(图1B)中, 每个点代表一个样本, 共计7个样本(10只大鼠的10个样本中去除不合格样本3个); 横坐标是PC1 (44.4%), 为第一主成分; 纵坐标为PC2 (18.6%), 为第二主成分。主成分分析显示, 同一分组中的样本聚在一起, 表明实验操作有可重复性; 不同分组间的样本距离较远, 表明两组间具有较大的基因型差异。

2.2 差异表达基因筛选和聚类分析

与对照组相比, KOA模型组大鼠滑膜组织有1 730个基因表达上调, 有1 546个基因表达下调($|\text{FoldChange}| \geq 2$, $P < 0.05$)。表1中显示了差异基因表达排名靠前的上调和下调mRNA, 其中显著上调的基因有mmp12、Acod1、Acan、Col2a1和Atp6v0d2等。根据样本的FPKM值, 用R包中的pheatmap工具和ggplot工具分别实现图2A与图2B所示的差异基因火山图(volcano plot)和聚类热图(heapmap), 并展现对照组与KOA模型组滑膜组织中的mRNA表达差异情况。

2.3 GO与KEGG富集分析

GO富集分析气泡图与差异基因KEGG富集气泡图分别见图3A~C和图3D, 横坐标为富集系数, 纵坐标为通路条目, 气泡大小表示富集数目, 颜色表示显著性。GO富集分析中的3个本体(ontology)分别表示“分子功能(MF)”、“细胞组分(CC)”以及“生物过程(BP)”。进一步的KEGG分析显示, 差异基因与MF的代谢通路(metabolic pathway)显著相关, 与CC的线粒体(mitochondrion)显著相关, 与BP的三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle)和细胞迁移(cell migration)显著相关。



注：A为相关性检验，相关系数越接近1表明样本相似性越高，图中对照组（NC）与膝骨关节炎模型组（OA）的各组内系数均接近于1，表明组内更为相近而组间差异较为显著。B为主成分（PC）分析，图中同一分组中的样本聚在一起，表明测序数据质量可靠。

Note: A, showed the correlation test, the closer the correlation coefficient is to 1, the higher the sample similarity is. In the negative control group (NC) and knee osteoarthritis model group (OA), the intra-group samples are more similar than inter-group samples. B, performed a principal component (PC) analysis, samples from the same group packed together in the figure, which indicates that the sequencing data are of reliable quality.

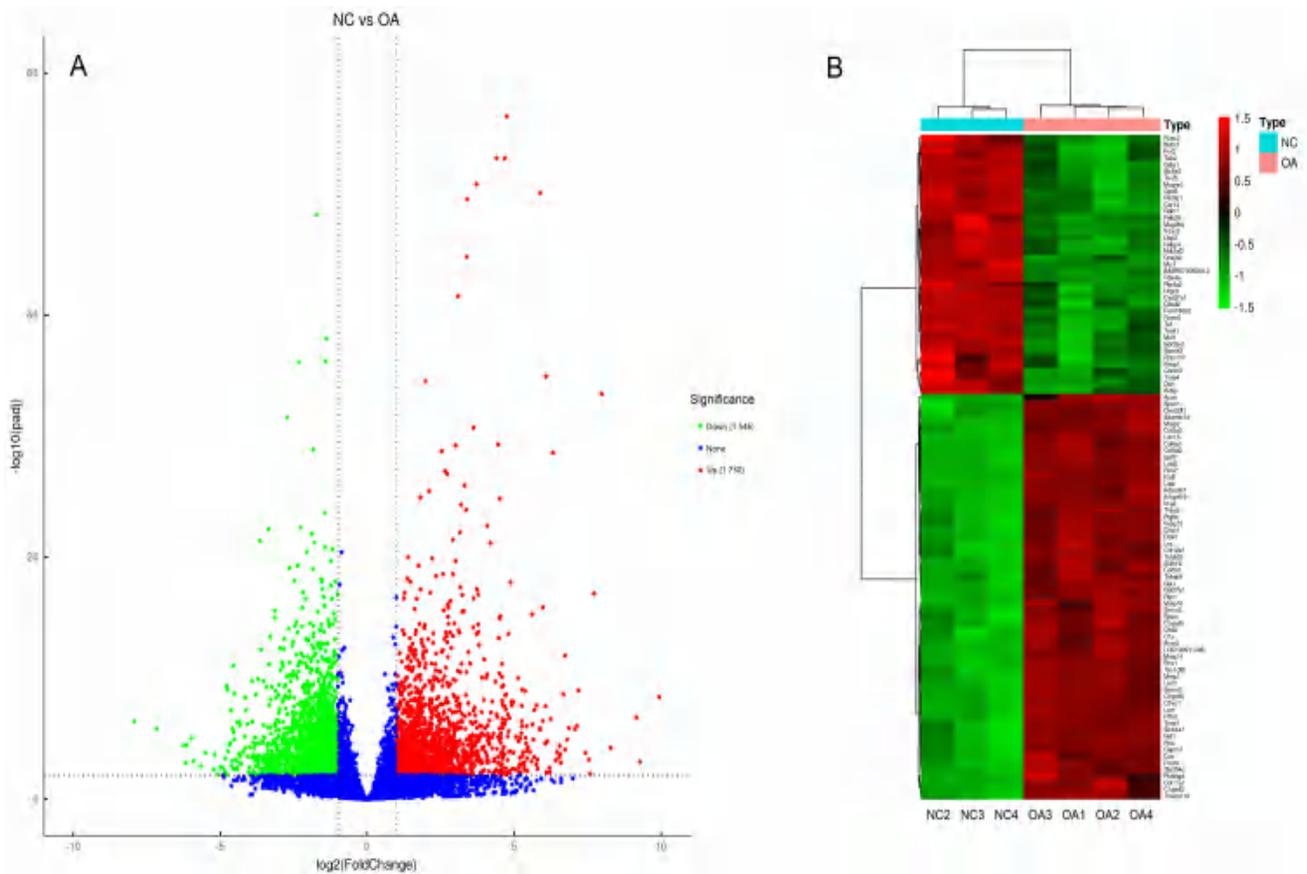
图1 样品间基因表达量相关性检验(A)和主成分分析(B)

Figure 1 Gene expression correlation analysis (A) and principal components analysis (B) between the samples

表1 碘乙酸钠诱导的膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织中显著上调基因和显著下调基因

Table 1 Genes up-regulated and down-regulated in synovial tissues of knee osteoarthritis model rats induced by monosodium iodoacetate

差异 Difference	基因 Gene	log2FC	P值 P value	校正 P值 P _{adj} value
上调 Up-regulated	Mmp12	9.933 625 864	9.132 91×10 ⁻¹¹	3.537 83×10 ⁻⁹
	Acod1	9.272 106 280	0.000 127 507	0.000 802 842
	Col2a1	9.153 847 197	7.690 69×10 ⁻⁹	1.807 62×10 ⁻⁷
	Atp6v0d2	8.282 894 807	5.603 80×10 ⁻⁶	5.607 99×10 ⁻⁵
	Fbn2	7.973 227 345	2.921 38×10 ⁻³⁷	3.387 43×10 ⁻³⁴
	Acan	7.718 643 189	4.203 11×10 ⁻²⁰	1.015 34×10 ⁻¹⁷
	Ocstamp	7.591 893 578	0.001 876 497	0.007 726 778
	LOC103690326	7.546 217 455	7.903 40×10 ⁻⁵	0.000 529 726
	Cxcl2	7.422 908 965	1.713 86×10 ⁻⁵	0.000 145 198
	Mmp9	7.188 248 072	2.374 04×10 ⁻¹¹	1.027 150×10 ⁻⁹
下调 Down-regulated	Plekha2	-1.000 555 825	1.696 39×10 ⁻⁵	0.000 143 999
	Nudt7	-1.001 123 965	5.602 09×10 ⁻⁵	0.000 395 268
	Cdc42bpg	-1.002 206 901	0.000 106 010	0.000 684 033
	Mtus1	-1.002 219 197	0.000 139 053	0.000 863 768
	Ppp1r37	-1.002 289 468	4.948 870×10 ⁻²⁰	1.179 120×10 ⁻¹⁷
	Oard1	-1.003 517 453	0.000 375 535	0.002 019 066



注：A，横坐标为基因表达倍数变化，纵坐标为表达量变化差异的统计显著性，红色点和绿色点分别表示上调与下调基因，而无显著性差异表达的基因用蓝点表示。B，横坐标为样品名称，纵坐标为基因名称，红色表示高表达基因，绿色表示低表达基因。NC，对照组；OA，膝关节炎模型组。

Note: A, the abscissa is \log_2FC , the ordinate is $-\log_{10}(\text{adjusted } P)$. Red or green dots indicate significantly up-regulated and down-regulated genes, respectively. While, genes with no significantly differentially expressed are indicated with blue dots. B, Gene heat map, the abscissa is sample names, the ordinate is gene names, red indicates high gene expression, while green indicates low expression. NC, negative control group; OA, knee osteoarthritis model group.

图2 表达差异基因火山图(A)和聚类热图(B)

Figure 2 Volcano plots (A) and heat map (B) of differentially expressed genes

2.4 差异表达基因的PPI分析

针对差异表达基因Top500，从STRING数据库中提取目的基因集的互作关系，构建PPI网络图（图4）。KOA模型组相比于对照组，Col5a-1、Col1a-1、Col3a-1、Cennpe、Ccna2、Ncaph和Cdk1等基因表达显著上调，且节点连接数目较多。

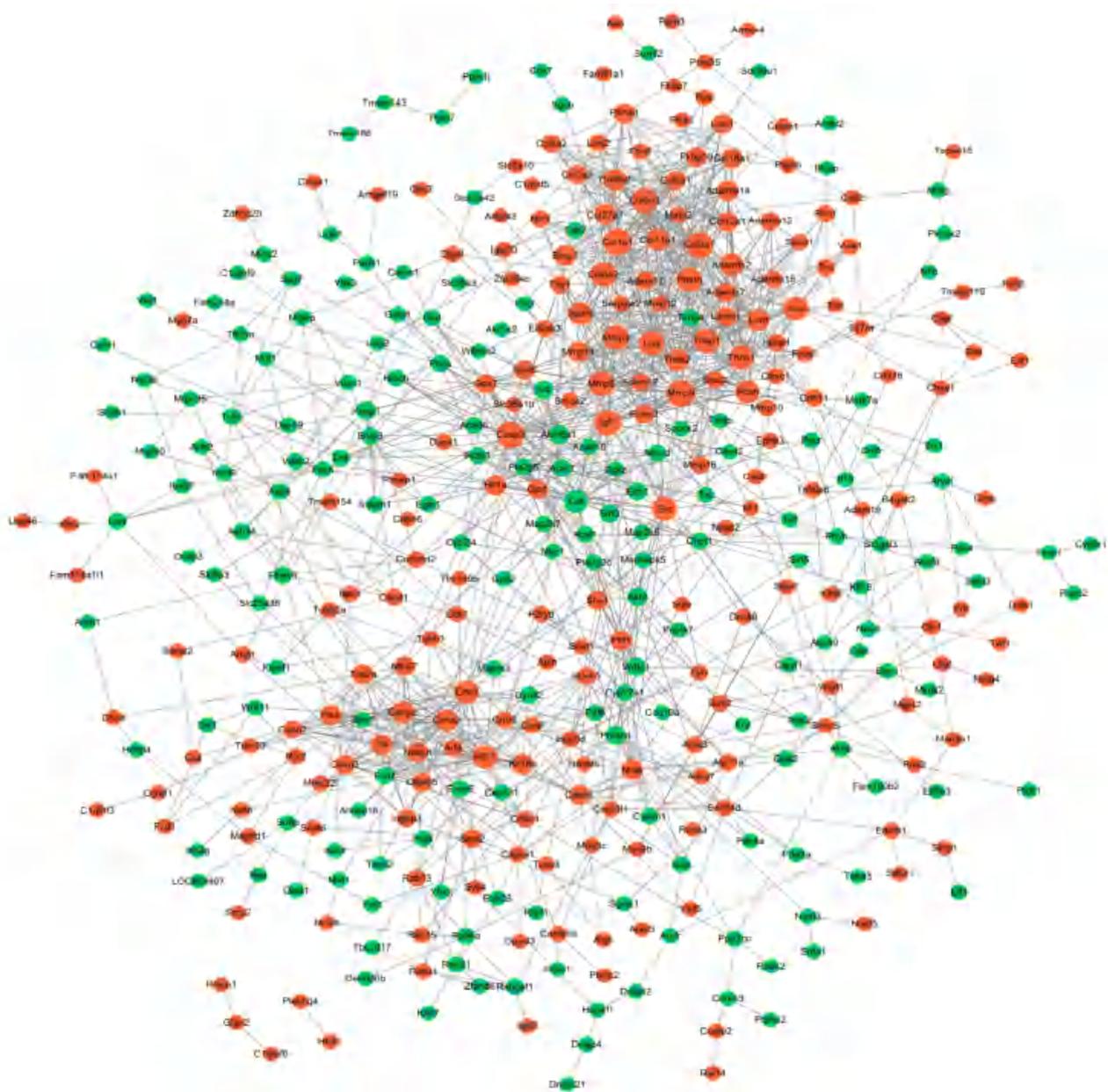
2.5 体外细胞实验验证结果

采用实时荧光定量PCR法对测序结果进行验证，结果见图5。与对照组相比，LPS干预后巨噬细胞RAW264.7中的Atp6v0d2与Acod1均显著高表达（ $P < 0.0001$ ），提示LPS干预诱导炎症过程中存在巨噬细胞的激活和免疫代谢的改变。与LPS干预组相比，LPS+秦皮素联合干预后巨噬细胞RAW264.7中

Atp6v0d2表达量显著下降（ $P < 0.001$ ），提示秦皮素可能通过调节滑膜巨噬细胞中Atp6v0d2基因表达来治疗滑膜炎。

3 讨论

在骨关节炎中，软骨细胞和滑膜细胞等关节细胞往往从一种代谢途径转换到另一种代谢途径，以此来适应炎症微环境的改变，例如从氧化磷酸化转换到糖酵解^[16]。这些途径的转换与免疫代谢有关，并从静止状态改变到高度代谢激活的状态^[17]，涉及线粒体功能障碍、厌氧糖酵解、脂质与氨基酸代谢及三羧酸循环。氧化磷酸化和糖酵解之间的转换主要由AMP活化蛋白激酶和雷帕霉素途径进行调节。因此，关键免疫代谢



注：圆点大小代表节点 (node) 的度 (degree)，与此节点连接数目越多，节点越大；点内填充红色代表该节点基因表达量上调，绿色代表该节点基因表达量下调。

Note: The size of the points means the degree of the node. The more protein connects with the node, the bigger the node will become. The red notes mean the up-regulated genes, the green ones mean down-regulated genes.

图4 差异表达基因的蛋白网络互作图

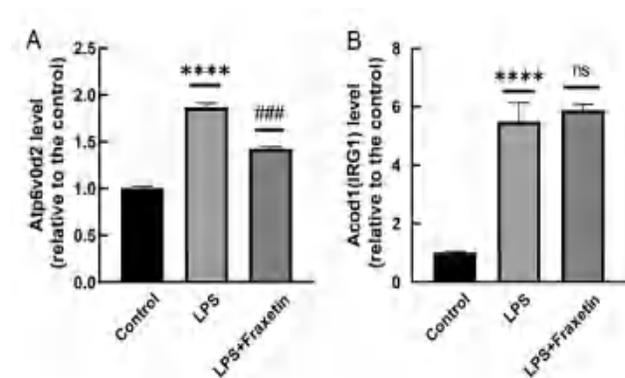
Figure 4 The protein-protein interaction (PPI) networks of differentially expressed genes

途径和免疫代谢相关介质可能是未来治疗 KOA 的突破口。

秦皮素是秦皮的主要成分之一，前期研究发现其有抗炎抗菌抗感染等作用^[18]。鉴于秦皮及秦皮素具有清热化湿、抗炎镇痛等功效^[19]，与中医药治疗 KOA 的原则一致，故本研究对其开展作用机制研究。另外，本课题组前期已初步证实，秦皮素可抑制 KOA 中软骨

降解^[11]，并通过促进滑膜巨噬细胞向 M2 型转化来减轻滑膜炎（待发表）。因此，本研究通过高通量测序，从整体角度全面分析秦皮素治疗 KOA 滑膜炎的可能靶点和作用机制。

本研究中，高通量测序结果显示，与对照组相比，碘乙酸钠诱导的 KOA 模型组大鼠滑膜组织中有 1 730 个基因表达上调，有 1 546 个基因表达下调，其中显著



注：与未处理对照组（Control）相比，**** $P < 0.0001$ ；与LPS干预组相比，### $P < 0.001$ 。ns表示差异无统计学意义。 $n=3$ 。

Note: Compared with the control group, **** $P < 0.0001$; Compared with the LPS group, ### $P < 0.001$. ns indicated none statistically significant differences. $n=3$.

图5 实时荧光定量PCR检测脂多糖(LPS)和秦皮素联合干预后巨噬细胞RAW264.7中Atp6v0d2和Acod1基因的表达情况

Figure 5 Atp6v0d2 and Acod1 gene expression in synovial macrophage RAW264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS) and Fraxetin detected by real-time fluorescence quantitative PCR

上调的基因有 mmp12、Acod1、Acan、Col2a1 和 Atp6v0d2 等。GO 富集分析结果显示，KOA 模型组与对照组大鼠滑膜组织中表达差异基因在细胞组分中与线粒体相关，在所参与的生物学过程中与三羧酸循环及细胞迁移相关。KEGG 结果显示，差异表达基因与代谢途径相关。这些结果提示免疫代谢调节可能参与了碘乙酸钠诱导的大鼠 KOA 的发生和发展。

已有研究报告表明，mmp12 是巨噬细胞相关基因，可介导宫颈癌免疫浸润，且在宫颈癌中高表达^[20]。本研究发现 mmp12 在 KOA 模型大鼠的滑膜组织中高表达，提示滑膜巨噬细胞可能处于激活状态。Acod1（或称 IRG1）是炎症反应和感染过程中的免疫代谢调节因子，其在激活的免疫细胞（如巨噬细胞和单核细胞）中表达上调^[21]。本研究发现 Acod1 表达增高，提示 KOA 大鼠滑膜组织中可能存在免疫代谢改变。Acan 与 Col2a1 在保护关节软骨中发挥重要作用，而滑膜的炎症反应可影响关节软骨代谢^[22]。另外，巨噬细胞的特异性 V-ATP 亚单位 Atp6v0d2 可通过促进自噬体-溶酶体融合来限制炎症反应和感染^[23]，其表达增加也提示了滑膜巨噬细胞及炎症反应状态在大鼠 KOA 发生发展过程中发挥作用。以上文献均提示，KOA 大鼠滑膜组织中可能存在着免疫代谢改变，且滑膜巨噬细胞极有

可能参与该过程并调节炎症反应状态。

本研究通过 LPS 诱导模拟 KOA 滑膜炎条件下的滑膜巨噬细胞状态，将大鼠滑膜组织测序结果在巨噬细胞 Raw264.7 中进行验证。结果证实，炎症反应状态下，巨噬细胞中的免疫代谢调节因子 Acod1 与 Atp6v0d2 的表达发生显著改变；但用秦皮素联合干预后，Atp6v0d2 的表达水平较 LPS 干预组显著降低，而 Acod1 的表达量未见明显差异，提示秦皮素通过调节巨噬细胞介导的免疫代谢来改善 KOA 滑膜炎的作用靶点是 Atp6v0d2。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

该研究涉及的所有实验动物均已通过上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会的伦理审查批准 (No. XHEC-F-2022-060)，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 Ethics Committee of Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine (Approval Letter No. XHEC-F-2022-060). All experiment procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

杨 凌: 负责方案策划、实验操作、数据分析、软件处理、初稿写作及修改；

庄 迪: 负责方法设计、提供动物组织、软件处理；

金立伦: 负责有效验证、项目管理、监督指导和提供资源。

[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]

- VINA E R, KWOH C K. Epidemiology of osteoarthritis: literature update[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2018, 30(2):160-167. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000479.
- ABRAMOFF B, CALDERA F E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options[J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2):293-311. DOI: 10.1016/j.mcna.2019.10.007.
- EYMARD F, PIGNET A, CITADELLE D, et al. Knee and hip intra-articular adipose tissues (IAATs) compared with autologous subcutaneous adipose tissue: a specific phenotype for a central player in osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(6):1142-1148. DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-210478.
- NEOGI T, GUERMAZI A, ROEMER F, et al. Association of joint

- inflammation with pain sensitization in knee osteoarthritis: the multicenter osteoarthritis study[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(3):654-661. DOI: 10.1002/art.39488.
- [5] KEMBLE S, CROFT A P. Critical role of synovial tissue-resident macrophage and fibroblast subsets in the persistence of joint inflammation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 715894. DOI: 10.3389/fimmu.2021.715894.
- [6] LOPES E B P, FILIBERTI A, ALI HUSAIN S, et al. Immune contributions to osteoarthritis[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15(6):593-600. DOI: 10.1007/s11914-017-0411-y.
- [7] 马振源, 莫蕙. 中医贴敷治疗膝骨关节炎的研究进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(6):926-930. DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0926.
- MA Z Y, MO H. Research progress of traditional Chinese medicine sticking therapy in the treatment of knee osteoarthritis[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2020, 36(6): 926-930. DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0926.
- [8] 侯成志, 李秋月, 魏戎, 等. 独活寄生汤治疗膝骨关节炎的研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(11):1843-1846. DOI: 10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2021.11.036.
- HOU C Z, LI Q Y, WEI X, et al. Study on Duhuo Jisheng Decoction in the treatment of knee osteoarthritis[J]. *J Basic Chin Med*, 2021, 27(11): 1843-1846. DOI: 10.19945/j. cnki. issn. 1006-3250.2021.11.036.
- [9] 王倩, 杨凯, 马强, 等. 中医药治疗膝骨关节炎研究进展[J]. *陕西中医药大学学报*, 2022, 45(3):130-134. DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.03.029.
- WANG Q, YANG K, MA Q, et al. Research progress on treatment of knee osteoarthritis with traditional Chinese medicine[J]. *J Shaanxi Univ Chin Med*, 2022, 45(3): 130-134. DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.03.029.
- [10] HUSSAIN S M, NEILLY D W, BALIGA S, et al. Knee osteoarthritis: a review of management options[J]. *Scott Med J*, 2016, 61(1):7-16. DOI: 10.1177/0036933015619588.
- [11] WANG Q, ZHUANG D, FENG W, et al. Fraxetin inhibits interleukin-1 β -induced apoptosis, inflammation, and matrix degradation in chondrocytes and protects rat cartilage *in vivo*[J]. *Saudi Pharm J*, 2020, 28(12):1499-1506. DOI: 10.1016/j.jsps.2020.09.016.
- [12] 金灵璐, 朱尉东, 仲卫红, 等. 升麻素昔治疗膝骨关节炎的作用机制研究[J]. *风湿病与关节炎*, 2021, 10(12):45-48.
- JIN L L, ZHU W D, ZHONG W H, et al. On the mechanism of cimicifugin in the treatment of knee osteoarthritis[J]. *Rheum Arthritis*, 2021, 10(12):45-48.
- [13] 高嘉美, 潘赐明, 郗域江, 等. 当归治疗骨关节炎作用机制的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2021, 10(11):77-80.
- GAO J M, PAN C M, XI Y J, et al. Research progress on the mechanism of *Angelica sinensis* in the treatment of osteoarthritis[J]. *Rheum Arthritis*, 2021, 10(11):77-80.
- [14] DESHMUKH V, O'GREEN A L, BOSSARD C, et al. Modulation of the Wnt pathway through inhibition of CLK2 and DYRK1A by lorecivint as a novel, potentially disease-modifying approach for knee osteoarthritis treatment[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(9): 1347-1360. DOI: 10.1016/j.joca.2019.05.006.
- [15] LI Z H, HUANG Z Y, ZHANG H, et al. P2X7 receptor induces pyroptotic inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis via NF- κ B/NLRP3 crosstalk[J]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2021, 2021:1-16. DOI: 10.1155/2021/8868361.
- [16] ZHENG L L, ZHANG Z J, SHENG P Y, et al. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 66: 101249. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101249.
- [17] MOBASHERI A, RAYMAN M P, GUALILLO O, et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(5):302-311. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.50.
- [18] 朱璐丹. 秦皮素对嗜水气单胞菌的抗感染机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020. DOI: 10.27314/d.cnki.gsscu.2020.000028.
- ZHU L D. Anti-infective mechanism of fraxetin against *aeromonas hydrophila*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. DOI: 10.27314/d.cnki.gsscu.2020.000028.
- [19] 曹桂云, 宁波, 秦金淼, 等. 基于标准汤剂的秦皮(白蜡树)配方颗粒质量标准分析[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*:1-11(2022-11-22)[2023-02-22]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20230148>.
- CAO G Y, NING B, QIN J M, et al. Quality standard analysis of fraxinus fraxinus dispensing granules based on standard decoction[J/OL]. *Chin J Exp Formul*:1-11(2022-11-22)[2023-02-22]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20230148>.
- [21] WU R, CHEN F, WANG N, et al. ACO1 in immunometabolism and disease[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(8): 822-833. DOI: 10.1038/s41423-020-0489-5.
- [22] GRIFFIN T M, SCANZELLO C R. Innate inflammation and synovial macrophages in osteoarthritis pathophysiology[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37 Suppl 120(5):57-63.
- [23] RU L B. Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2013, 15(5): 323. DOI: 10.1007/s11926-013-0323-5.
- [24] XIA Y, LIU N, XIE X X, et al. The macrophage-specific V-ATPase subunit ATP6V0D2 restricts inflammasome activation and bacterial infection by facilitating autophagosome-lysosome fusion[J]. *Autophagy*, 2019, 15(6): 960-975. DOI: 10.1080/15548627.2019.1569916.

(收稿日期: 2022-07-04 修回日期: 2022-10-02)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 任益凡)

[引用本文]

杨凌, 庄迪, 金立伦. 转录组测序筛选大鼠滑膜炎差异表达基因及秦皮素治疗靶点的体外验证[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(1):11-20. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.100.

YANG L, ZHUANG D, JIN L L. Screening of differentially expressed genes in rat synovitis by transcriptome sequencing and *in vitro* verification of therapeutic target of fraxetin[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(1):11-20. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.100.



崔立, 上海交通大学农业与生物学院动物科学系研究员、博士生导师、比较医学学科组PI。研究涉及肠道微生物与宿主互作、病毒宏基因组学等。近年主要关注疾病动物模型, 从事基于肠炎模型和类器官探究黏膜损伤修复机制, 并进行黏膜修复活性物质的评估等研究工作。同时担任上海交通大学实验动物伦理委员会委员, 中国畜牧兽医学会公共卫生分会第一、第二届理事, 《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》《亚洲兽医案例分析》等杂志编委, 英国皇家兽医学院访问学者。主持完成国家级及上海市科研项目10余项, 主编上海及国家职业培训系列教材《宠物健康护理员》, 发表学术论文40余篇, 获得授权专利8项。

杨平, 上海交通大学农业与生物学院动物医学在读硕士研究生, 中国执业兽医师。从事自身免疫疾病和神经系统疾病的临床前药物药效评价服务工作已13年, 作为项目负责人多次服务制药公司或学术研究机构, 完成国内外新药临床试验申请(investigational newdrug application, IND)的药效学实验数据申报10多项, 参与完成有关动物疾病模型及相关设备的研发项目近10项, 获得发明专利4项, 其中原始取得3项, 继受取得1项, 第一发明人1项。



贝伐珠单抗注射液对食蟹猴皮肤伤口愈合的影响

杨平¹, 崔立¹, 俞诚², 温智越¹

[1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201209; 2. 澎立生物医药技术(上海)股份有限公司, 上海 201203]

[摘要] **目的** 通过观察贝伐珠单抗注射液对食蟹猴背部皮肤伤口愈合速度及损伤皮肤组织中CD34表达的影响, 验证贝伐珠单抗注射液对食蟹猴伤口愈合的延迟作用, 为临床肿瘤手术患者使用贝伐珠单抗治疗时提供剂量和频次的用药参考。**方法** 6只雄性食蟹猴采用背部全层皮肤切除手术建立伤口愈合评估模型, 随机选取3只食蟹猴作为生理盐水组, 其余3只食蟹猴为贝伐珠单抗组。贝伐珠单抗组食蟹猴在手术后第0、4、8、11天静脉注射30 mg/kg 贝伐珠单抗注射液, 生理盐水组静脉注射等量生理盐水; 术后进行血常规检测, 并观察各组食蟹猴的伤口愈合情况, Image J软件分析伤口愈合率, 用评分法对伤口状态的严重程度进行评价。4周后对6只食蟹猴伤口愈合皮肤取材, 通过免疫组织化学法检查皮肤组织中CD34的表达水平。**结果** 成功构建食蟹猴伤口愈合评估模型。术后第3天的食蟹猴血液中白细胞、中性粒细胞数量明显升高 ($P<0.05$), 第7天后白细胞数量逐渐恢复正常, 而红细胞、血红蛋白、红细胞压积没有明显变化, 提示动物营养状态良好。与生理盐水组相比, 贝伐珠单抗组的伤口愈合率在术后7 d、28 d明显降低 ($P<0.01$, $P<0.001$), 愈合皮肤组织中CD34表达水平明显降低 ($P<0.01$)。**结论** 贝伐珠单抗注射液给药可能通过抑制食蟹猴伤口新生皮肤组织中的微血管生成, 延缓伤口愈合。临床中患者手术后使用贝伐珠单抗注射液时应该权衡利弊, 科学合理地选择干预时间点、剂量、频次。

[关键词] 贝伐珠单抗注射液; 伤口愈合; 伤口评分; CD34; 食蟹猴

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0021-09



Effects of Bevacizumab Injection on the Skin Wound Healing in Cynomolgus Monkeys

YANG Ping¹, CUI Li¹, YU Cheng², WEN Zhiyue¹

[1. Shanghai Jiao Tong University School Of Agriculture And Biology, Shanghai 201209, China; 2. PharmaLegacy Laboratories (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203, China]

Correspondence to: CUI Li (ORCID: 0000-0001-5202-9671), E-mail: lcui@sjtu.edu.cn

[基金项目] 上海市科委科技计划项目-实验动物专项“基于肠类器官3D培养和高内涵成像的药物毒性和安全性评价模型研究”(21140901400)

[第一作者] 杨平(1986—),男,硕士研究生,执业兽医师,研究方向:临床前药物药理药效评价。E-mail: pingyang@sjtu.edu.cn

[通信作者] 崔立(1971—),女,博士,研究员,研究方向:人兽共患病与比较医学。E-mail: lcui@sjtu.edu.cn. ORCID: 0000-0001-5202-9671

[ABSTRACT] Objective By observing the impact of Bevacizumab injection on the speed of wound healing and the expression of CD34 in cynomolgus monkeys, to verify its delayed wound healing mechanism, and to provide clinical reference for the dosage and frequency of Bevacizumab treatment for oncology surgery patients. **Methods** Six male cynomolgus monkeys underwent full-thickness skin resection on the back to establish a wound healing evaluation model. Three cynomolgus monkeys were randomly selected as the saline group, and the other three cynomolgus monkeys were allocated to the Bevacizumab treatment group. The monkeys of Bevacizumab group were administrated with Bevacizumab injection (30 mg/kg, i.v.) on day 0, day 4, day 8, and day 11, respectively. The monkeys of saline group were injected with the same volume of saline as the group receiving Bevacizumab. The blood routine test was conducted, and the wound healing of each group of cynomolgus monkeys was observed 28 days after operation. The wound healing rate was analyzed by software Image J, and the severity of the wound was assessed by scoring method. Wound healing skin samples of 6 cynomolgus monkeys were obtained after 4 weeks, and the expression level of CD34 in the wound skin tissues was detected using immunohistochemistry. **Results** A skin excision wound model has already been established in cynomolgus monkeys. The number of white blood cells and neutrophils in the blood of cynomolgus monkeys increased significantly on the 3rd day after operation ($P<0.05$), and the number of white blood cells gradually returned to normal on the 7th day, while the number of red blood cells, hemoglobin and hematocrit did not change significantly, suggesting that the animals were in good nutritional status. The Bevacizumab injection group wound healing rate was significantly slower than that of the saline group on day 7, and day 28 ($P<0.01$, $P<0.001$). Microvessel density in the wound skin of Bevacizumab group appeared to be significantly lower than that of the saline group ($P<0.01$). **Conclusion** The injection of Bevacizumab may delay the wound healing by inhibiting the angiogenesis in the new skin tissue of the cynomolgus monkey. In clinical practice, the timing of giving a tumor patient a bevacizumab injection after surgery should be based on the pros and cons, and the duration, dosage, and frequency of the intervention should be chosen in a rational way.

[Key words] Bevacizumab injection; Wound healing; Wound score; CD34; Cynomolgus monkey

贝伐珠单抗是一种抗人血管内皮生长因子全人源化单克隆抗体 (recombinant humanized anti vascular endothelial growth factor monoclonal antibody, rhuMab VEGF), 可与游离血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 结合, 抑制肿瘤组织新生血管生成, 从而发挥抑制肿瘤生长、迁移的作用。现阶段, 贝伐珠单抗已被广泛纳入多种恶性肿瘤诊疗指南的全球推荐标准方案, 如转移性结直肠癌、非小细胞肺癌、脑神经胶质瘤、肾癌、卵巢癌和宫颈癌等^[1-5]。rhuMab VEGF 在肿瘤治疗中发挥显著作用, 但其局限性仍不可忽视, 其中就包括伤口愈合延迟。VEGF 在伤口的愈合过程中具有促进炎症反应、促进切口部位新生血管生成等作用, 而接受贝伐珠单抗治疗的患者伤口愈合延迟, 出现手术并发症的概率明显增加^[6]。

研究表明, 创伤愈合是一个极为复杂的过程, 按

照其病理变化, 可分为止血期、炎症期、增生期及成熟期 (重塑期) 4 个阶段。在伤口愈合过程中, 炎症细胞如中性粒细胞及巨噬细胞分泌生长因子, 促进血管内皮细胞和成纤维细胞增殖; 纤维蛋白原被凝血酶催化转化为纤维蛋白, 纤维蛋白不仅具有刺激成纤维细胞增殖的能力, 而且能够诱导血管形成和组织修复^[7-8]。随后, 皮肤真皮成纤维细胞在伤口部位扩张, 产生 III 型胶原, 逐渐取代纤维蛋白基质。伤口愈合的下一个阶段包括内皮祖细胞分化、血管生成、构成肉芽组织填充覆盖伤口; 皮肤修复增殖后期的特点是角质形成细胞从创面边缘向肉芽组织迁移, 随后创面重新上皮化。皮肤重塑的成熟期从几周到甚至两年, III 型胶原逐渐被更强的 I 型胶原取代, I 型胶原通过积累和交联来加强伤口, 疤痕组织形成^[9-11]。

在伤口愈合过程中, 微血管发挥了重要作用, 它为细胞提供氧、营养, 带走代谢产物, 同时提供丰富

的生长因子。CD34在血管内皮细胞中广泛表达,能准确反映新生血管的活跃度,是目前血管内皮细胞最可靠的标志物^[12-13]。皮肤全层切除术是最常用于伤口愈合研究的造模方法^[14]。本研究首先用食蟹猴背部皮肤全层切除手术制作伤口愈合评估模型,然后通过大剂量多次重复注射贝伐珠单抗注射液给药,观察贝伐珠单抗对伤口愈合的延迟影响程度,旨在模拟临床中肿瘤患者术后使用贝伐珠单抗注射液治疗的伤口愈合情况,以期探索安全用药时机和剂量。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性食蟹猴6只,体质量为4~6 kg,年龄8岁左右,由肇庆创药生物科技有限公司提供[SCXK(粤)2017-0016],动物质量合格证号为44000600000060,饲养于澎立生物医药技术公司的实验动物设施[SYXK(沪)2019-0010]内。本研究中动物实验经澎立生物医药技术公司动物福利伦理委员会审查批准(PL21-V0078-1),动物实验操作符合3R原则。

1.2 实验仪器和试剂

数字病理全切片扫描仪(DMS-C-Pro);正置荧光偏光显微成像系统(Nikon 80i, DS-5MC-U2);全自动血液细胞分析仪(迈瑞, BC-6100Plus);大动物呼吸麻醉机(上海玉研科学仪器有限公司,型号AM1100)。贝伐珠单抗注射液(上海罗氏制药有限公司,批号H0278801);CD34抗体(Abbiotec,货号:250591);普朗特液体伤口敷料(国械注进20183641752);舒泰(法国维克有限公司,批号BN 8V4RA);阿托品(上海禾丰制药有限公司,批号0322701);头孢曲松钠(上海上药新亚药业有限公司,批号2104124);生理盐水(山东科伦药业有限公司,批号B22051204B)。

1.3 伤口愈合评估模型制作及分组给药

参考文献[15]采用背部全层皮肤切除手术制作伤口愈合评估模型。6只食蟹猴术前12 h禁食,手术前肌内注射1.5 mg/kg舒泰和0.03 mg/kg阿托品。动物麻醉后戴上猴面罩连接呼吸麻醉机,异氟烷体积分数调节至1%~3%以维持麻醉。背部脱毛备皮消毒后,沿脊柱两侧全层皮肤切除2个2 cm×2 cm区域的伤口。手术后创口覆盖无菌纱布,给实验猴穿上定制猴马甲以防止猴抓挠伤口。术后连续3 d注射头孢曲松钠(1 g头孢曲松钠用3.8 mL生理盐水稀释,单次注射约2 mL

即0.5 g, 2次/d)预防伤口感染。手术后,6只食蟹猴随机分为2组,每组3只。贝伐珠单抗组在手术后第0、4、8、11天静脉注射30 mg/kg(2 mL/kg)贝伐珠单抗注射液^[16-17],生理盐水组予以等剂量的生理盐水(即0.9% NaCl溶液),两组的注射时间一致。

1.4 血常规检查

皮肤全层切除手术后第0(即手术麻醉时)、3、7、14、28天,通过食蟹猴前肢或后肢静脉采集1 mL EDTA-2K抗凝全血,4℃保存,4 h内用全自动血液细胞分析仪进行血常规检测。

1.5 伤口愈合率和评分

食蟹猴经麻醉后,脱掉马甲,暴露伤口,并用生理盐水清洗。在伤口下方放置标尺,保持相对固定的焦距、光线,进行伤口部位的摄片和评分。摄片时间点分别为全层皮肤切除手术后即刻(即0 d)、手术后2 h(即0.08 d),以及术后第2、5、7、9、11、14、17、21、24、28天。刚手术后的伤口愈合率为0%,伤口全部愈合时愈合率为100%。使用Image J 1.52a软件追踪创面轮廓,测量创面切除后第0天的创面表面积(S_0),测量第 n 天伤口创面边界内面积(S_n),计算伤口愈合率,同时用Image J描记不同时间点的伤口轮廓轨迹,以伤口中心进行叠加绘制伤口叠加图。伤口愈合率= $(S_0 - S_n) / S_0 \times 100\%$ 。注意伤口部位勿用碘伏消毒,伤口皮肤颜色改变会干扰伤口评分。所有伤口按照皮肤颜色、伤口周围组织水肿情况、渗出液的类型及量进行评分,具体评级方式见表1(参照文献[18]整理)。

1.6 皮肤切片的CD34染色评价

皮肤全层切除手术后第28天伤口基本愈合时,用1%~3%异氟烷麻醉食蟹猴,用手术刀将伤口部位皮肤全层切下后,剔除皮下结缔组织或脂肪,用螺旋测微计测量愈合皮肤隆起最高位置的厚度。然后将皮肤组织用质量分数为4%的甲醛溶液固定48 h,选择皮肤组织最厚的部位修块后,石蜡包埋、切片,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗;在组织切片上滴加1~2滴(50~100 μ L)胃蛋白酶,37℃孵育30 min, PBS漂洗3次;滴加3%过氧化氢15 min, PBS冲洗3次;加入兔抗人CD34多克隆抗体(一抗工作液体积稀释比例为1:100),37℃孵育1 h, PBS冲洗;加入羊抗兔二抗孵育20 min, PBS冲洗;加入DAB显色剂显色,水洗;苏木精对比染色,水洗;盐酸乙醇分化,水洗;乙醇脱水,二甲苯透明;封固。用数字病理全切片扫描仪扫

表1 食蟹猴背部伤口评分表

Table 1 The back wound score in cynomolgus monkeys

项目 Item	得分 Score	描述 Description
伤口周围的皮肤颜色 (距离伤口 2 cm) Skin color around the wound (2 cm from the wound)	0	正常颜色或粉红色
	1	淡红色或有压之褪色的发红
	2	白色或灰白色
	3	深红色或压之不褪色的发红
	4	黑色或色素沉着过度
伤口周围组织水肿 Edema in wound surrounding tissue	0	无水肿或肿胀
	1	伤口周围非凹陷水肿范围<2 cm
	2	伤口周围非凹陷水肿范围≥2 cm
	3	伤口周围凹陷水肿范围<2 cm
	4	伤口周围凹陷水肿范围≥2 cm
渗出液类型 Type of exudate	0	无渗出液
	1	红色
	2	粉红色
	3	薄而透明, 水性
	4	黄色或绿色, 气味难闻
渗出量 Exudate amount	0	无渗出液
	1	伤口组织微湿, 但无法测量
	2	伤口组织湿润, 浸泡<25%的敷料
	3	伤口组织湿润, 浸泡敷料的 25% ~ 75%
	4	伤口组织湿润, 浸泡>75%的敷料

描切片, 400倍光学显微镜下每个样本随机选取5个视野, 用Image J软件分析计算CD34阳性表达(呈棕黄色或棕褐色颗粒)的微血管面积占选区面积的百分比, 以此作为微血管密度。

1.7 统计方法

采用SPSS 22.0统计学软件进行结果分析。检测结果数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两个独立样本间比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 贝伐珠单抗对血常规的影响

血常规测定结果显示, 所有动物手术后第3天, 白细胞、中性粒细胞数量明显升高($P < 0.05$); 第7天至第28天, 白细胞数量逐渐恢复正常, 中性粒细胞数量有部分上升趋势, 淋巴细胞数量呈现下降趋势, 但差异尚无统计学意义($P > 0.05$)。红细胞、血红蛋白、红细胞压积未有明显变化, 提示动物营养状态良好, 无贫血(表2)。

2.2 贝伐珠单抗对伤口愈合的影响

术后各时间点两组食蟹猴背部伤口照片见图1A。从伤口叠加图可见, 生理盐水组在术后第28天时伤口已接近完全愈合, 而贝伐珠单抗组的伤口创缘缺损大, 肉芽组织暴露(图1B)。

伤口评分和愈合率结果(图2)显示, 贝伐珠单抗处理延长了伤口愈合周期, 尤其在伤口愈合的早期(第3~7天)和末期(第21~28天)伤口损伤总评分较高(图2E); 并且贝伐珠单抗组的伤口愈合率显著低于生理盐水组, 尤其在手术后第28天时生理盐水组伤口愈合率为(99.12±2.00)%, 而贝伐珠单抗组愈合率为(78.63±4.00)%, 两组差异有显著的统计学意义($P < 0.001$)。

2.3 贝伐珠单抗对皮肤厚度和微血管密度的影响

与生理盐水组的愈合皮肤相比, 贝伐珠单抗组食蟹猴伤口愈合部位皮肤最厚处的厚度轻微变薄, 但差异尚无统计学意义($P > 0.05$)。免疫组织化学法检测结果显示, 贝伐珠单抗组食蟹猴伤口愈合部位的皮肤组织中CD34表达水平显著低于生理盐水组($P < 0.01$),

表2 食蟹猴血常规检测结果

Table 2 Blood routine examination results of cynomolgus monkeys

指标及组别 Index and group	手术后时间 Time after surgery/d				
	0	3	7	14	28
WBC/(10 ⁹ ·L ⁻¹)					
生理盐水组 Saline group	13.20±0.08	31.00±1.05 [△]	14.65±0.10	15.64±0.08	18.70±0.69
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	12.15±0.09	25.25±0.08 [△]	13.48±0.04	15.72±0.50	17.14±0.23
RBC/(10 ¹² ·L ⁻¹)					
生理盐水组 Saline group	5.80±0.21	6.01±0.48	6.22±0.13	5.88±0.35	5.99±0.34
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	6.10±0.16	5.84±0.43	5.97±0.15	5.72±0.11	5.84±0.18
NEU/%					
生理盐水组 Saline group	44.03±2.23	81.80±3.98 [△]	50.97±4.83	61.57±6.75	60.73±17.91
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	59.67±4.58	66.50±10.38	61.6±4.85	58.57±7.83	74.40±4.97
NEU/(10 ⁹ ·L ⁻¹)					
生理盐水组 Saline group	5.81±0.30	25.41±1.93 ^{△△}	7.46±0.66	9.61±1.01	11.53±3.54
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	7.26±0.59	16.80±2.62 [△]	8.31±0.66	9.25±1.39	12.74±0.83
LYM/%					
生理盐水组 Saline group	50.37±2.92	14.53±3.75	43.17±3.76	30.97±6.64	30.37±14.77
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	33.30±4.35	28.43±9.75 [△]	33.93±5.04	34.53±7.23	20.30±4.66
LYM/(10 ⁹ ·L ⁻¹)					
生理盐水组 Saline group	6.65±0.38	4.44±1.08	6.33±0.59	4.86±1.06	5.52±2.52
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	4.05±0.52	7.18±2.48	4.58±0.68	5.40±1.05	3.48±0.78
HGB ρ/(g·L ⁻¹)					
生理盐水组 Saline group	140.00±3.06	147.00±7.00	149.33±5.84	144.33±7.17	139.00±3.61
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	150.00±5.57	142.33±7.06	142.67±7.84	140.67±2.73	140.33±3.84
HCT/%					
生理盐水组 Saline group	45.93±1.13	47.27±2.20	47.93±2.15	45.73±2.22	44.97±1.90
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	48.70±1.65	45.40±2.39	45.93±2.05	45.87±1.22	45.30±1.56
EOS/%					
生理盐水组 Saline group	0.87±0.29	0.43±0.34	1.23±0.29	2.13±0.95	3.50±3.06
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	0.83±0.38	0.47±0.20	0.27±0.03	1.57±0.75	0.73±0.35
EOS/(10 ⁹ ·L ⁻¹)					
生理盐水组 Saline group	0.12±0.04	0.14±0.10	0.18±0.04	0.33±0.15	0.62±0.54
贝伐珠单抗组 Bevacizumab group	0.10±0.05	0.11±0.05	0.03±0.01	0.24±0.11	0.13±0.06

注: WBC, 白细胞; RBC, 红细胞; NEU, 中性粒细胞; LYM, 淋巴细胞; HGB, 血红蛋白; HCT, 红细胞压积; EOS, 嗜酸细胞。与手术第1天相比, [△]*P*<0.05, ^{△△}*P*<0.01; 同一时间点, 与生理盐水组相比, ^{*}*P*<0.05。

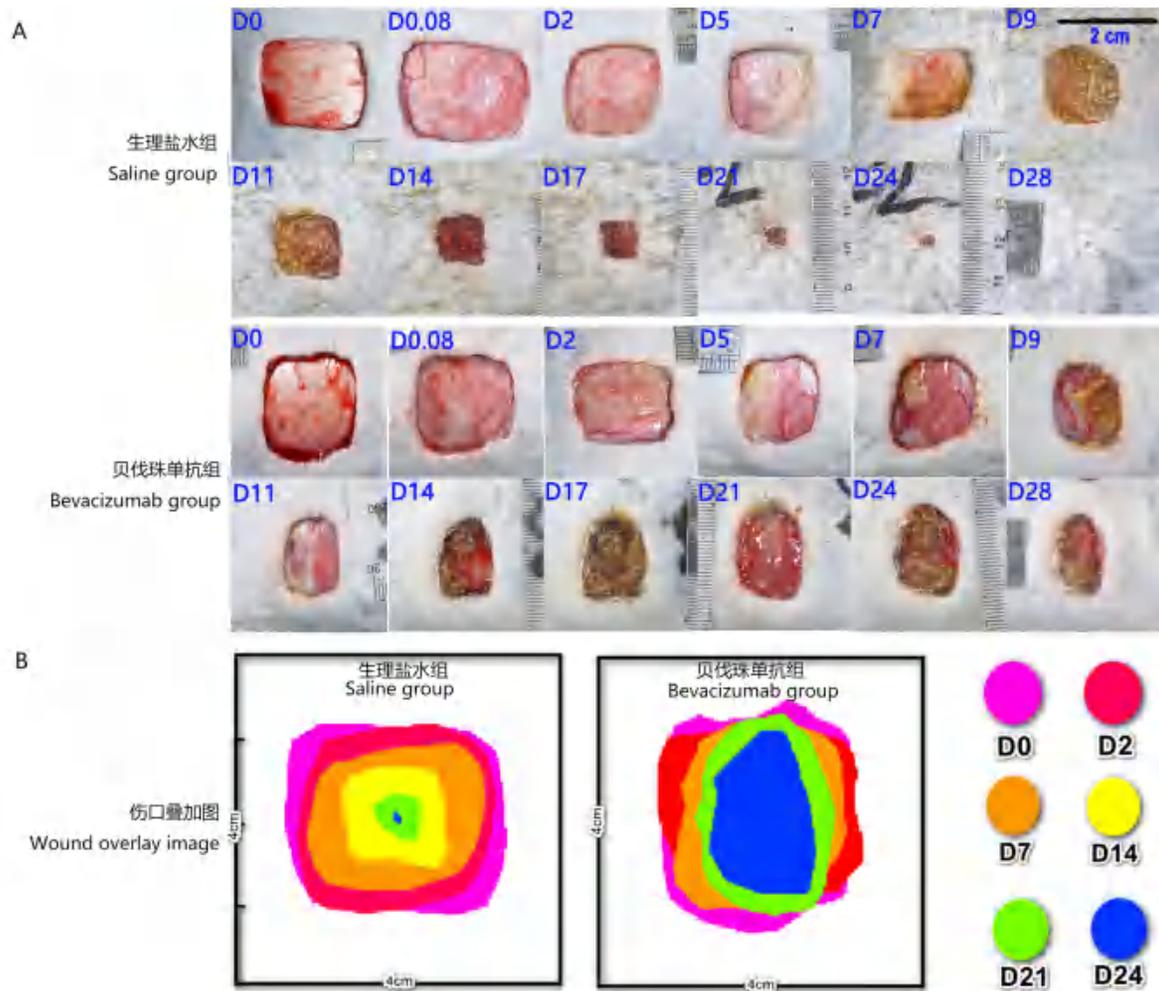
Note: WBC, White blood cell; RBC, Red blood cell; NEU, Neutrophile cell; LYM, Lymphocyte cell; HGB, Hemoglobin; HCT, Hematocrit; EOS, Eosinophil. Compared with the first day after surgery, [△]*P*<0.05, ^{△△}*P*<0.01; Compared with saline group at the same time point, ^{*}*P*<0.05.

图3), 说明贝伐珠单抗降低了伤口愈合组织中微血管密度。

3 讨论

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种血管内皮细胞关键生存因子和有丝分裂原, 主要由5种分泌蛋白组成: VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 和胎盘生长因子 (placental growth factor, PlGF)。VEGF家族成员通过与

膜结合的受体酪氨酸激酶实现细胞内的信号转导。由于VEGF-A在调节血管生成和疾病发生过程中起主导作用, 所以通常说的VEGF就是指VEGF-A。VEGF-A与VEGFR1和VEGFR2结合, 刺激内皮细胞的增殖与存活, 导致新血管的生成^[6,18]。贝伐珠单抗是一种重组抗VEGF单克隆抗体, 具有6个VEGF结合残基并可与VEGF结合, 防止VEGF与内皮细胞上的靶标VEGFR-1和VEGFR-2结合, 从而降低VEGF蛋白水平, 限制新生血管的形成^[19]。



注：A，生理盐水组与贝伐珠单抗组的代表性伤口，切除皮肤面积为 $4\text{ cm}\times 4\text{ cm}$ ；B，生理盐水组与贝伐珠单抗组的伤口愈合叠加图，各时间点的叠加图以伤口中心 $4\text{ cm}\times 4\text{ cm}$ 区域获得。D0、D0.08、D2、D5、D7、D9、D11、D14、D17、D21、D24、D28分别表示全层皮肤切除手术后即刻、第2小时，以及第2、5、7、9、11、14、17、21、24和28天。

Note: A, Representative wound pictures in saline group and Bevacizumab group, the resection area of skin was $4\text{ cm}\times 4\text{ cm}$; B, Wound healing overlap diagrams in saline group and Bevacizumab group, which the $4\text{ cm}\times 4\text{ cm}$ images of the wound center were obtained at each superimposed time point. D0, D0.08, D2, D5, D7, D9, D11, D14, D17, D21, D24, and D28 represent minute 2, hour 2, day 2, day 5, day 7, day 9, day 11, day 14, day 17, day 21, day 24 and day 28 after full-thickness skin resection, respectively.

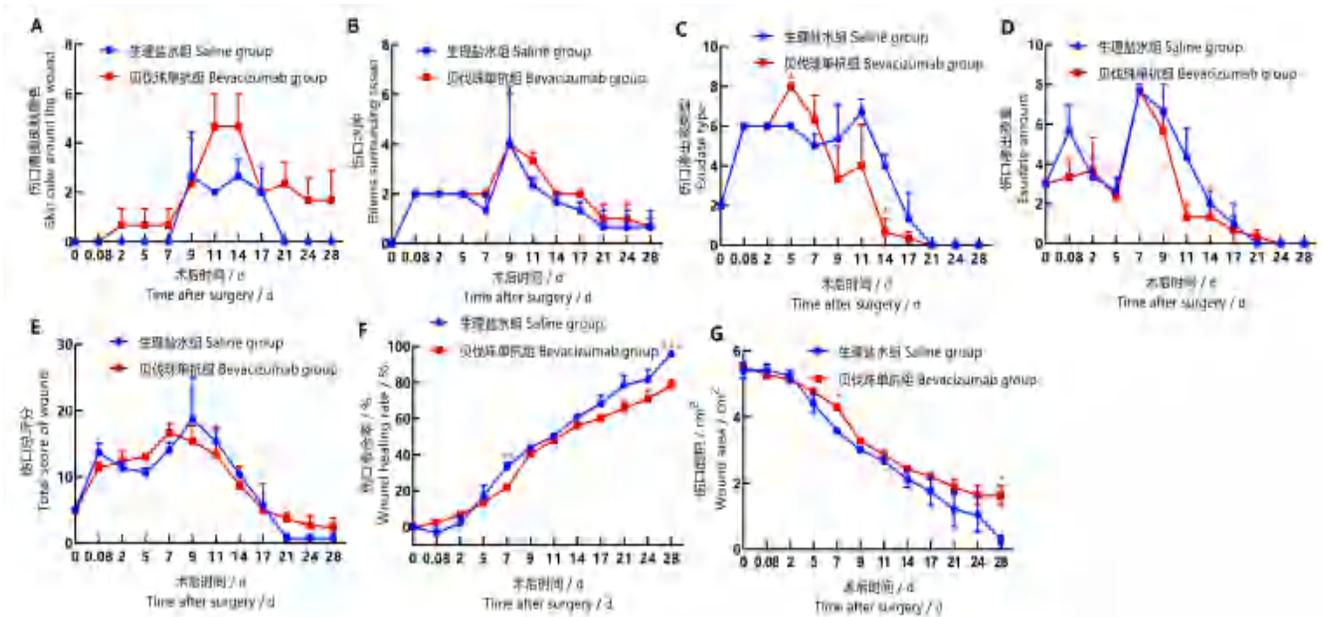
图1 食蟹猴背部伤口状态

Figure 1 The picture of back wound state in cynomolgus monkeys

食蟹猴在器官结构、生理功能、病理反应和生化代谢等方面与人类相似。对于全人源化抗体来说，由于存在与人相似的免疫交叉反应性，食蟹猴成为临床前药效研究的一种理想的建模用实验动物。以往临床前贝伐珠单抗类似药物的安全性评价常以非手术食蟹猴作为受试者，无法得知临床手术后患者选择贝伐珠单抗/化疗药物不同干预时间点、剂量、频次对伤口愈合的影响及其机制。本研究首先采用背部全层皮肤切除手术制作食蟹猴伤口愈合模型，术后2周内立刻给予4次高剂量贝伐珠单抗注射液，结果显示贝伐珠单抗延

长了伤口愈合周期，并且贝伐珠单抗处理组的伤口愈合率显著低于生理盐水组。同时，贝伐珠单抗组的3只食蟹猴中有2只出现了明显的伤口愈合并发症，主要表现为伤口裂开、伤口评分增高、伤口愈合延迟、出血，此伤口愈合不良率显著高于临床上相关贝伐珠单抗用药后愈合不良的比率^[20]。进一步的免疫组织化学法检测结果显示，贝伐珠单抗组食蟹猴伤口愈合部位的皮肤组织中CD34表达水平显著低于生理盐水组说明贝伐珠单抗降低了伤口愈合组织中微血管密度。

化疗药物，无论是单独使用还是与手术和放疗联

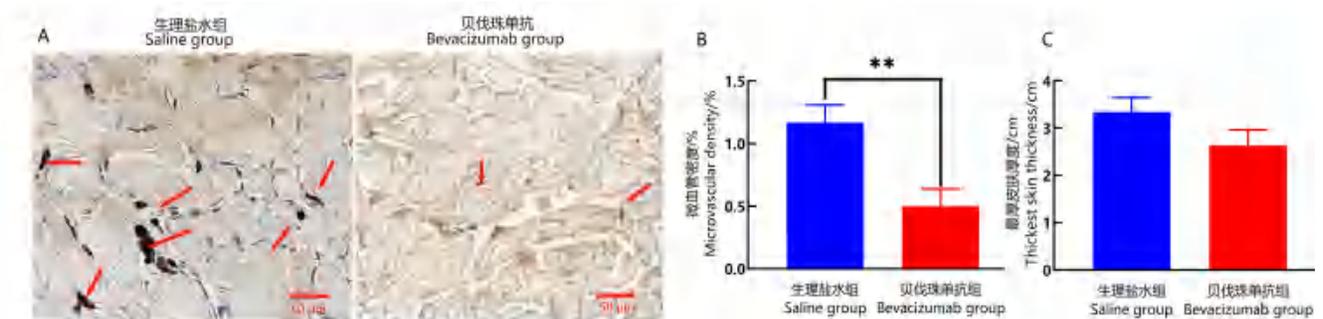


注: 同一个时间点贝伐珠单抗组与生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。每组 3 只食蟹猴 ($n = 3$)。

Note: T-test was used to compare Bevacizumab group with saline group at the same time point, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$.

图 2 食蟹猴背部伤口状态评分及愈合指标的统计图

Figure 2 Statistical chart of back wound score and wound healing index in back of cynomolgus monkeys



注: A 为生理盐水组和贝伐珠单抗组伤口愈合皮肤组织中 CD34 免疫组织化学染色 (DAB, $\times 400$), 图中箭头指示微血管内皮细胞内 CD34 被染色为棕黄色或者棕褐色颗粒, 标尺为 50 μm 。B 为两组伤口愈合皮肤组织中, CD34 阳性表达的微血管面积占选区面积的百分比 (即微血管密度) (** $P < 0.01$, $n = 3$)。C 为两组新生皮肤最厚部位的厚度。

Note: A, CD34 immunohistochemical staining in the wound skin tissues of saline group and Bevacizumab group, showing skin characteristics of each group under 400 \times microscope with a scale bar of 50 μm . The arrow in the figure indicates that the CD34 in the cytoplasm of microvascular endothelial cells is stained with tan or brown particles. B, Comparison of percentage of microvessel area of CD34 positive expression (showing microvessel density) in the wound healing skin tissues between the two groups (** $P < 0.01$, $n = 3$). C, The thickness of the thickest part of newborn skin in the two groups.

图 3 食蟹猴伤口愈合部位皮肤组织中 CD34 免疫组织化学染色和皮肤厚度分析

Figure 3 Immunohistochemical staining of CD34 and skin thickness analysis in the wound healing site of cynomolgus monkeys

合使用, 都会对愈合伤口的快速分裂组织产生不利影响, 导致纤维蛋白沉积和胶原合成减少, 延迟伤口闭合。肿瘤患者的总体营养状况通常会下降, 这是影响患者在手术和 (或) 治疗后愈合能力的一个重要方面 [21-25]。研究表明, 与单独给药相比, 贝伐珠单抗与

化疗药物联用可提高抗肿瘤疗效, 但肿瘤患者术后伤口部位的愈合不良是手术失败的一个重要原因 [26]。化疗药物和贝伐珠单抗在手术期使用恰恰会增加愈合不良的风险 [27]。本研究也提示, 临床上使用贝伐珠单抗应首先避免在手术期使用, 即使在肿瘤治疗的关键阶

段, 贝伐珠单抗也应该低剂量使用或等手术伤口愈合后使用, 以防止伤口愈合并发症的发生, 减轻患者痛苦。此次实验结果为未来开发靶点为 VEGF、TGF- β 等通路抑制剂的生物大分子抗癌新药时进行临床前安全性评价和等效性评价提供了一个新的角度。

另外, 贝伐珠单抗与 VEGF 结合后可抑制新生血管的生成, 目前已逐渐应用于各种眼部新生血管性和渗出性疾病以及增生性瘢痕的治疗^[29-30], 并取得了显著疗效。在本次实验中, 从伤口愈合部位皮肤的厚度可观察到贝伐珠单抗抑制皮肤增生的趋势, 但与生理盐水组相比没有显著性差异, 考虑其原因之一是使用食蟹猴的数量有限, 后续可通过增加动物数量做进一步的研究。

[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澎立生物医药技术(上海)股份有限公司实验动物使用与管理委员会批准(IACUC No. PL21-V0078-1)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例及澎立生物医药技术(上海)股份有限公司相关 SOP 进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of PharmaLegacy Laboratories (Approval Letter No. PL21-V0078-1). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), PharmaLegacy Laboratories SOPs and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

杨平: 方案策划、调查研究、方法设计、实验执行、初稿写作、项目管理;

崔立: 监督指导、数据策划、写作审编、提供资源;

俞诚: 提供食蟹猴、饲养管理、项目管理、实验数据收集;

温智越: 参与方法设计、实验数据收集、初稿写作。

[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] GUAN Z Z, XU J M, LUO R C, et al. Efficacy and safety of Bevacizumab plus chemotherapy in Chinese patients with metastatic colorectal cancer: a randomized phase III ARTIST trial[J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(10): 682-689. DOI: 10.5732/

cjc.011.10188.

- [2] NARITA Y. Bevacizumab for glioblastoma[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2015:1759. DOI:10.2147/tcrm.s58289.
- [3] MAK D Y, TJONG M C, LOUIE A V. Usage of radiotherapy with osimertinib plus Bevacizumab versus osimertinib for untreated patients with nonsquamous NSCLC Harboring EGFR mutations[J]. *J Thoracic Oncol*, 2023, 18(1): e3-e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.10.010>.
- [4] 寿建忠, 马建辉. 肾癌的靶向治疗现状与进展[J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(17):1539-1546.
- SHOU J Z, MA J H. Current status and advances in targeted therapy for renal cell carcinoma[J]. *Chin J New Drugs*, 2010, 19(17):1539-1546.
- [5] 唐欣颖, 匡泽民. «接受贝伐珠单抗治疗的卵巢癌和宫颈癌患者血压管理专家共识»: 2019 英国专家建议解读[J]. *中国合理用药探索*, 2020, 17(1):11-15.
- TANG X Y, KUANG Z M. Interpretation of 2019 UK expert recommendations on the management of hypertension in patients with ovarian and cervical cancer receiving Bevacizumab[J]. *Chin J Ration Drug Use*, 2020, 17(1):11-15.
- [6] ZHANG H, HUANG Z, ZOU X, et al. Bevacizumab and wound-healing complications: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82473-82481. DOI: 10.18632/oncotarget.12666.
- [7] PRZEKORA A. A concise review on tissue engineered artificial skin grafts for chronic wound treatment: can we reconstruct functional skin tissue in vitro?[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1622. DOI:10.3390/cells9071622.
- [8] LAURENS N, KOOLWIJK P, DE MAAT M P M. Fibrin structure and wound healing[J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(5):932-939. DOI:10.1111/j.1538-7836.2006.01861.x.
- [9] DE OLIVEIRA R C, WILSON S E. Fibrocytes, wound healing, and corneal fibrosis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(2): 28. DOI:10.1167/iovs.61.2.28.
- [10] URCIUOLO F, CASALE C, IMPARATO G, et al. Bioengineered skin substitutes: the role of extracellular matrix and vascularization in the healing of deep wounds[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(12): E2083. DOI:10.3390/jcm8122083.
- [11] VIG K, CHAUDHARI A, TRIPATHI S, et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): E789. DOI:10.3390/ijms18040789.
- [12] HUGHES M R, CANALS HERNAEZ D, CAIT J, et al. A sticky wicket: defining molecular functions for CD34 in hematopoietic cells[J]. *Exp Hematol*, 2020, 86: 1-14. DOI: 10.1016/j.exphem.2020.05.004.
- [13] KORNTNER S, LEHNER C, GEHWOLF R, et al. Limiting angiogenesis to modulate scar formation[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146:170-189. DOI:10.1016/j.addr.2018.02.010.
- [14] SAMI D G, HEIBA H H, ABDELLATIF A. Wound healing models: a systematic review of animal and non-animal models[J]. *Wound Med*, 2019, 24(1): 8-17. DOI: 10.1016/j.wndm.2018.12.001.
- [15] BYUN H S, LEE S J, LEE J I, et al. Effects of chitosan on wound healing in monkeys[J]. *J Vet Clin*, 2013, 30(4):241-246.

- [16] 中国药品评审中心. GPT1-1: 治疗用生物制品非临床安全性技术审评一般原则[S]. 2007.
China Drug Review Center, GPT1-1: Guidelines for the non-clinical safety evaluation of therapeutic biological products [S]. 2007.
- [17] 李劲锋, 于佳玥, 戴小宇, 等. 贝伐珠单抗类似药SMMU-13对食蟹猴的毒性[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2018, 36(1):76-80. DOI:10.3969/J.ISSN.1671-9964.2018.01.013.
LI J F, YU J Y, DAI X Y, et al. Toxicity study of SMMU-13, a biosimilar of Bevacizumab, in cynomolgus monkeys[J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Agric Sci, 2018, 36(1):76-80. DOI:10.3969/J.ISSN.1671-9964.2018.01.013.
- [18] JIA Y, ZHAO G, JIA J. Preliminary evaluation: The effects of Aloe ferox Miller and Aloe arborescens Miller on wound healing[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 120(2): 181-189. DOI: 10.1016/j.jep.2008.08.008.
- [19] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development [J]. Cell, 2019, 176(6): 1248-1264. DOI:10.1016/j.cell.2019.01.021.
- [20] GOLAS A R, BOYKO T, SCHWARTZ T H, et al. Prophylactic plastic surgery closure of neurosurgical scalp incisions reduces the incidence of wound complications in previously-operated patients treated with Bevacizumab (Avastin®) and radiation[J]. J Neurooncol, 2014, 119(2):327-331. DOI: 10.1007/s11060-014-1482-6.
- [21] RIOS J E S, ALMEIDA F M, LIMONGI R M, et al. The effect of Bevacizumab, 5-fluorouracil, and triamcinolone on the healing modulation of surgical wounds in rats[J]. Histol Histopathol, 2023: 18583. DOI:10.14670/HH-18-583.
- [22] ALMADANI Y H, VORSTENBOSCH J, DAVISON P G, et al. Wound healing: A comprehensive review[J]. Seminars in plastic surgery, 2021, 35(3):141-144. DOI:10.1055/s-0041-1731791.
- [23] 黄丽霞, 刘基华, 刘雪莹, 等. 贝伐珠单抗生物类似药与原研药疗效及不良反应的回顾性分析比较[J]. 中国处方药, 2022, 20(8):1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1671-945X.2022.08.002.
HUANG L X, LIU J H, LIU X Y, et al. Comparison of efficacy and adverse reactions between Bevacizumab biosimilar and the reference listed drug[J]. J China Prescr Drug, 2022, 20(8):1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1671-945X.2022.08.002.
- [24] RECK M, WEHLER T, ORLANDI F, et al. Safety and patient-reported outcomes of atezolizumab plus chemotherapy with or without Bevacizumab versus Bevacizumab plus chemotherapy in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(22):2530-2542. DOI:10.1200/jco.19.03158.
- [25] FINN R S, QIN S, IKEDA M, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2020, 382(20): 1894-1905. DOI: 10.1056/nejmoa1915745.
- [26] AHN J W, SHALABI D, CORREA-SELM L M, et al. Impaired wound healing secondary to Bevacizumab[J]. Int Wound J, 2019, 16(4):1009-1012. DOI:10.1111/iwj.13139.
- [27] 冯芬, 胡斌, 招丽蓉, 等. 血清VEGF水平与贝伐珠单抗联合化疗治疗转移性结直肠癌患者疗效的关系研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(31):6136-6139. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2017.31.032.
FENG F, HU B, ZHAO L R, et al. Metastasis colorectal cancer: effects of serum VEGF and bevacizumab combined with chemotherapy[J]. Prog Mod Biomed, 2017, 17(31): 6136-6139. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.31.032.
- [28] 张万虎, 何亚茹, 宋瑜, 等. 康柏西普与贝伐单抗玻璃体腔注射治疗新生血管性老年性黄斑变性疗效对比观察[J]. 当代医学, 2018, 24(8):12-15. DOI:10.3969/j.issn.1009-4393.2018.08.004.
ZHANG W H, HE Y R, SONG Y, et al. Efficacy of conbercept versus Bevacizumab in intramuscular injection for neovascular age-related macular degeneration[J]. Contemp Med, 2018, 24(8): 12-15. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2018.08.004.
- [29] SIMONDS J, MILLER F, MANDEL J, et al. The effect of Bevacizumab (Avastin) treatment on epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia[J]. Laryngoscope, 2009, 119(5): 988-992. DOI:10.1002/lary.20159.
- [30] KWAK D H, BAE T H, KIM W S, et al. Anti-vascular endothelial growth factor (Bevacizumab) therapy reduces hypertrophic scar formation in a rabbit ear wounding model[J]. Arch Plast Surg, 2016, 43(6):491-497. DOI:10.5999/aps.2016.43.6.491.
- (收稿日期:2022-08-17 修回日期:2022-10-30)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,赵宇朋)

[引用本文]

- 杨平, 崔立, 俞诚, 等. 贝伐珠单抗注射液对食蟹猴皮肤伤口愈合的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1): 21-29. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.128.
- YANG P, CUI L, YU C, et al. Effects of bevacizumab injection on the skin wound healing in cynomolgus monkeys[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 21-29. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.128.

消瘀散新组方修复膝骨关节炎模型兔的软骨损伤及MMP-13表达

崔若琳¹, 王庆², 杨玲³, 冯文昌⁴, 刘智伟¹, 滕蔚然¹, 马碧涛¹, 王乐杨¹, 秦丽萍¹, 金立伦¹

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院中医科, 上海 200092; 2. 复旦大学附属华山医院中医科, 上海 200040; 3. 同济大学附属上海市第四人民医院老年科, 上海 200081; 4. 湖北省中西医结合医院科教部, 武汉 430015)

[摘要] **目的** 研究消瘀散新组方对膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 兔关节软骨的作用及机制。**方法** 将42只6月龄普通级新西兰白兔随机分为正常组、模型组、消瘀散组、消瘀散新组方组, 每组10只 (另2只用于模型验证)。除正常组外, 其他各组兔均按照改良Hulth法对右侧膝关节进行KOA造模。造模5周后, 对消瘀散组、消瘀散新组方组动物分别给予相应的贴膏进行膝关节治疗, 每天1次, 每次持续10 h。连续给药治疗2周后, 取4组兔膝关节软骨, 行大体观察并采用Outerbridge分级法评价各组软骨损伤情况, 采用HE染色法在光学显微镜下观察各组兔膝关节软骨、钙化层和软骨下骨病理改变, 并采用Mankin's法评价软骨退变程度, 采用免疫组织化学法在光学显微镜下观察各组兔膝关节软骨组织中基质金属蛋白酶13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 的表达情况。**结果** 关节软骨大体观察后Outerbridge评级比较发现, 消瘀散组较模型组的高分级动物数减少 ($P < 0.05$), 消瘀散新组方组比消瘀散组的高分级动物数也减少 ($P < 0.05$)。HE染色发现4组兔膝关节软骨的Mankin's评分由高到低依次为模型组 (10.82 ± 1.76)、消瘀散组 (6.19 ± 1.23)、消瘀散新组方组 (2.64 ± 1.18) 和对照组 (0.28 ± 0.17), 各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫组织化学检测发现各组兔膝关节软骨组织中MMP-13表达阳性率由高到低依次为模型组 (67.90 ± 13.94)%、消瘀散组 (37.10 ± 19.16)%、消瘀散新组方组 (13.60 ± 3.10)% 和对照组 (3.20 ± 2.39)%, 各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 消瘀散新组方可修复KOA兔关节软骨损伤, 降低软骨组织中MMP-13的表达水平, 这可能是其治疗骨关节炎的作用机制之一。

[关键词] 消瘀散新组方; 膝骨关节炎; 关节软骨; 基质金属蛋白酶-13

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0030-09



Repair Effects of Xiaoyusan New Formula on Cartilage Injury and MMP-13 Expression in Knee Osteoarthritis Model Rabbits

CUI Ruolin¹, WANG Qing², YANG Ling³, FENG Wenchang⁴, LIU Zhiwei¹, TENG Weiran¹, MA Bitao¹, WANG Leyang¹, QIN Liping¹, JIN Lilun¹

(1. Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine Traditional Chinese Medicine Department, Shanghai 200092, China; 2. Huashan Hospital Affiliated to Fudan University Traditional Chinese Medicine Department, Shanghai 200040, China; 3. Department of Geriatrics, Fourth People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200081, China; 4. Hubei Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Department of Education and Science, Wuhan 430015, China)

Correspondence to: JIN Lilun (ORCID: 0000-0001-9840-836X), E-mail: jinlilun@xinhumed.com.cn

[ABSTRACT] **Objective** To study the effect of Xiaoyusan new formula on the articular cartilage of knee osteoarthritis (KOA) rabbits and its mechanism. **Methods** A total of 42 New Zealand white rabbits aged 6 months were randomly divided into normal group, model group, ointment of Xiaoyusan group, and ointment of Xiaoyusan new formula group, with 10 rabbits in each group (the other 2 rabbits were used for

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目“消瘀散新组方治疗KOA的临床规范化研究”(19401932000); 上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划项目“北部区域中医骨关节病专病联盟建设”[ZY(2021-2023)-03-02-25]

[第一作者] 崔若琳(1992—),女,硕士,主治医师,研究方向:膝骨关节炎的发病机制与中药干预。E-mail: cuiRuolin@xinhumed.com.cn

[通信作者] 金立伦(1967—),男,硕士,主任医师,研究方向:膝骨关节炎的发病机制与中药干预。E-mail: jinlilun@xinhumed.com.cn。ORCID: 0000-0001-9840-836X

model validation). Except for the normal group, the right knee joints of all rabbits in the other groups were prepared as KOA models according to the modified Hulth method. After 5 weeks of molding, the rabbits in ointment of Xiaoyusan group, ointment of Xiaoyusan New Formula group were given corresponding ointments for knee arthritis treatment, once a day, each time for 10 hours. After 2-week continuous administration and treatment, the knee joint cartilage of the four groups of rabbits was taken and the cartilage damage of each group was evaluated by Outerbridge grading method. The pathological changes of the cartilage, calcified layer and subchondral bone of the knee joint of rabbits in each group were observed by HE staining method under the light microscope, and the degree of cartilage degeneration was evaluated by Mankin's method. The expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in the cartilage of rabbit knee joint in each group was detected by immunohistochemistry. **Results** After the general observation of articular cartilage, the Outerbridge grading showed that the number of high-grade animals in ointment of Xiaoyusan group was reduced compared with the model group ($P<0.05$), and the number of high-grade animals in ointment of Xiaoyusan new formula group was also reduced ($P<0.05$) compared with ointment of Xiaoyusan group. HE staining showed that Mankin's scores of articular cartilage in the four groups ranked from high to low: model group (10.82 ± 1.76), ointment of Xiaoyusan group (6.19 ± 1.23), ointment of Xiaoyusan new formula group (2.64 ± 1.18) and normal group (0.28 ± 0.17). The difference among four groups was statistically significant ($P<0.05$). Immunohistochemical detection showed that the positive rates of MMP-13 expression in rabbit articular cartilage tissues in each group were (67.90 ± 13.94)% of model group, (37.10 ± 19.16)% of ointment of Xiaoyusan group, (13.60 ± 3.10)% of ointment of Xiaoyusan new formula group and (3.20 ± 2.39)% of normal group, ranking from high to low, and the difference among four groups was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Xiaoyusan new formula can repair articular cartilage degeneration in KOA rabbits and decrease the expression of MMP-13 in cartilage, which may be one of the mechanisms of the treatment.

[Key words] Xiaoyusan new formula; Knee osteoarthritis; Articular cartilage; Matrix metalloproteinase-13

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种慢性退变性疾病, 以软骨的退行性病变、软骨下骨硬化、滑膜炎等导致的膝关节功能丧失为主要特征, 发病机制复杂。目前对 KOA 的阶梯治疗方案分为四类: 基础治疗、药物治疗、修复治疗和重建治疗。但是上述保守治疗方法 (包括基础治疗及药物治疗) 并不能抑制逐日加剧的关节软骨退行性改变, 长期服用药物还会引起胃肠反应、消化管溃疡及出血等不良反应。从中医理论角度出发, KOA 的病因主要是风寒湿等外感邪气, 同时该病的发生也有内在因素, 包括年老体虚、肝肾亏损、筋骨失养等机体肝肾气血不足。《内经》中提到“男子七八, 肝气衰, 筋不能动; 八八, 天癸竭, 精少, 肾脏衰, 形体皆极”, 表明随着人体年龄的增长, 肝肾功能及气血津液逐渐衰少, 肢体各方面活动能力下降, 外加生活不规律、不注重饮食等情况, 导致虚弱的中老年人体质更加容易感受风寒湿邪, 从而导致痹症。因此, 本病也称为老年性骨关节炎, 发病人群主要集中在中老年群体。临床研究中也发现 KOA 患者的年龄普遍较大。基于此临床认识及“本虚标实”

的病机^[1], “缓则治其本”, 针对 KOA 的治疗当以补益肝肾、温阳通络、活血化瘀为治则。

新华医院中医骨伤科是魏氏伤科的传承分基地, 消瘀散贴膏方及其精简方是魏氏伤科的经验方。前期研究表明: 临床上, 消瘀散在治疗踝关节软组织损伤和 KOA 时均有较好的治疗效果^[2-6]; 动物实验提示消瘀散能够降低大鼠 KOA 模型软骨中血管内皮生长因子的表达^[7-8], 从而起到治疗 KOA 的作用。后经过临床实践与大量文献查阅, 发现在补益肝肾中药中, 附子、杜仲、淫羊藿的使用居多, 在前期研究基础上向消瘀散精简方中加入三味补肝肾活血药附子、杜仲、淫羊藿, 组成消瘀散新组方。消瘀散原方中以活血化瘀药为主要成分, 新加的三味药以补益肝肾、温阳通络为主要作用, 方药、治则与病机相呼应。但消瘀散新组方对 KOA 治疗的作用机制尚不清楚。为了便于药物机制研究及质量控制, 本研究拟从观察消瘀散新组方对兔 KOA 关节软骨的影响入手, 验证消瘀散新组方对 KOA 的治疗效果。另外, 关节软骨的退变是 KOA 发生的重要机制之一, 而且基质金属蛋白酶 (matrix

metalloproteinases, MMPs) 是导致软骨基质降解的一个重要因子, 尤其 MMP-13 是关节软骨退变的标志物之一^[9]。本研究将 MMP-13 作为切入点, 探索消瘀散新组方治疗 KOA 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6月龄普通级新西兰白兔42只, 雌雄各半, 体重(2.3±0.5) kg, 购自瑞特培斯生物科技启东有限公司 [SCXK (苏) 2019-0003], 质量合格证编号为202103933。实验兔饲养于上海交通大学医学院附属新华医院动物实验中心 [SYXK (沪) 2018-0038], 标准实验室条件下喂养, 饮普通饮用水。本研究获得上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会审查批准 (XHEC-F-2022-061)。

1.2 中药方膏的配制

消瘀散方: 蒲公英250 g, 乳香100 g, 没药100 g, 川大黄100 g, 地鳖虫100 g, 蒲黄100 g, 五灵脂330 g, 苏木屑52 g, 三七100 g, 刘寄奴150 g, 西泽兰150 g, 紫丹参165 g, 川当归150 g, 老鹤草165 g, 紫荆皮165 g。消瘀散新组方: 川大黄100 g, 紫荆皮165 g, 乳香100 g, 三七100 g, 当归150 g, 附子100 g, 杜仲100 g, 淫羊藿100 g。两方均由上海虹桥饮片厂统一配成药粉, 以1 kg: 800 mL的比例加入生理盐水后搅拌均匀, 使药物和0.9% NaCl溶液(即生理盐水)相互渗透。20 min后, 以1: 3.5的质量比, 将中药放入麦芽糖中充分搅拌10 min至黏稠状, 即为可使用的药膏。将药膏装入密封罐, 置于4℃冰箱冷藏备用, 每张贴膏50 g。

1.3 主要试剂

苏木素-伊红染液(货号G1004)、EDTA (pH 8.0) 抗原修复液(货号RC016)、PBS缓冲液(RC035)等均购自上海茹创生物科技有限公司; 牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)(货号A8020)购自北京索莱宝科技有限公司; 兔抗人MMP-13一抗(工作液体积稀释比例为1: 2 000)购自英国Abcam公司的兔抗人多克隆抗体, 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔/鼠通用二抗和免疫组织化学试剂盒DAB显色剂购自丹麦DAKO公司。青霉素(批号H37020079)购自山东鲁抗医药股份有限公司, 速眠新II注射液购自吉林省敦化市圣达动物药品有限公司。

1.4 主要仪器

微量移液器(德国Eppendorf公司); -80℃和-20℃冰箱(美国Thermo公司); 4℃冰箱(日本Sanyo公司); 倒置显微镜(日本Olympus公司); 超速离心机(美国LI-COR Biosciences); 电子天平(上海分析仪器厂); 外科手术器械(张家港市大都医疗器械有限公司); KA-1000台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 恒温水浴箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.5 动物造模与分组干预

将42只成年新西兰白兔按照随机数字表法, 随机分为正常组(A组)、模型组(B组)、消瘀散组(C组, 作为阳性对照)和消瘀散新组方组(D组), 每组10只, 2只用作模型验证。除正常组外, 其余所有动物均按照改良Hulth法^[10]进行单侧KOA造模: 通过缘静脉注射3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉动物后, 取兔右侧膝关节内侧入路, 切断内侧副韧带, 摘除内侧半月板, 切断前交叉韧带; 术后连续3 d青霉素 2×10^5 U/kg肌肉注射, 1周后开始每天强迫兔活动0.5 h, 连续7周。正常组给予相同的切皮, 但不伤及膝关节, 术后常规肌肉注射青霉素预防感染, 每天 2×10^5 U/kg, 连续3 d。造模结束后, 消瘀散组、消瘀散新组方组动物在第一次给药干预前行患侧膝关节剃毛处理, 每天以消瘀散、消瘀散新组方膏药敷贴; 2 kg左右的新西兰白兔药量约为5 g/d, 每天10 h, 连续2周。模型组和正常组动物每天上午给予与中药组相同的绷带绑扎, 不敷贴任何膏药, 连续2周。

1.6 关节软骨组织的大体观察

用药治疗2周后干预结束, 腹腔内过量注射戊巴比妥钠处死动物后取材。分离兔膝关节软骨组织, 暴露关节面, 观察关节形态、关节液及关节软骨损伤情况。采用Outerbridge分级^[11]对软骨损伤进行评价: 0级, 正常; I级, 软骨软化或肿胀; II级, 软骨表面部分缺损, 但未到达软骨下骨; III级, 缺损或裂隙到达软骨下骨, 但未暴露软骨下骨; IV级, 软骨下骨暴露。III级与IV级为高分级。

1.7 HE染色分析关节软骨组织病理学变化

取新鲜软骨浸入体积分数为10%的中性甲醛溶液中, 标示相应代码和标签。24 h后放进脱水机, 依次用梯度乙醇溶液进行脱水。将浸好蜡的软骨组织于包埋机内进行包埋, 然后将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片, 片厚3 μm。切片放入苏木精染液中染色细胞核5~10 min, 依次用自来水、1%盐酸乙醇、1%氨

水冲洗。切片再放入伊红染液中染色细胞质5~10 min。最后将切片依次放入不同浓度的乙醇和二甲苯溶液中脱水透明，中性树胶封固。在光学显微镜下观察软骨、钙化层和软骨下骨病理改变，并采用Mankin's法^[12]对软骨结构、软骨细胞数、染色程度以及潮线完整性进行评分，以评价软骨退变程度。软骨结构光整如常，计0分；出现不规则裂隙，计1分；裂隙深达移行层，计2分；裂隙深达辐射层，计3分；裂隙深达钙化层，计4分；软骨层脱落，计5分。软骨细胞数量如常，计0分；数量弥漫性增多，计1分；出现大量簇集样细胞团，计2分；数量明显减少，计3分。基质染色正常，计0分；染色轻度减退，计1分；染色中度减退，计2分；染色重度减退，计3分；染色完全消失，计4分。潮线完整，计0分；多重潮线，计1分；软骨下血管入侵潮线，计2分。4项内容计分总和即为Mankin's评分。

1.8 免疫组织化学法分析关节软骨组织中MMP-13表达

软骨组织切片置于EDTA抗原修复缓冲液(pH 8.0)中，微波炉内进行抗原修复，然后置于PBS(pH 7.4)中晃动洗涤。切片放入3%过氧化氢溶液，室温避光孵育25 min，阻断内源性过氧化物酶后，置于PBS(pH 7.4)中晃动洗涤。切片用组织化学笔在组织周围画圈，在圈内滴加3%BSA封闭。轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加按一定比例配好的一抗工作液，于湿盒内4℃孵育过夜。玻片置于PBS(pH 7.4)中晃动洗涤，在圈内滴加与一抗相应种属的二抗，室温孵育20 min。玻片置于PBS(pH 7.4)中晃动洗涤，在圈内滴加DAB显色液显色。Harris苏木精对比染色细胞核3 min左右，

自来水、1%盐酸乙醇、自来水、氨水冲洗。将切片依次放入不同浓度的乙醇溶液中脱水透明，中性树胶封固。由2个观察者独立在每张切片上选取6个200倍镜下视野，MMP-13的阳性表达呈棕色颗粒，阳性率用染色阳性细胞数占细胞总数的百分比来计算，取两者的均数为最后得分。

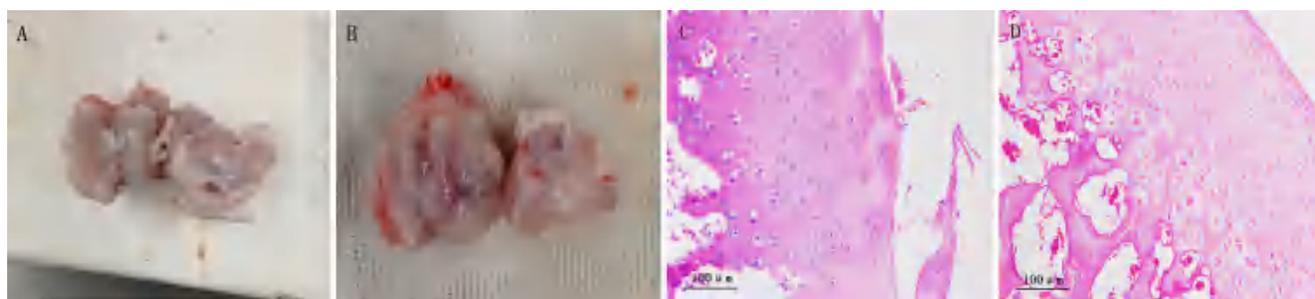
1.9 数据统计分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析，计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。4组兔关节软骨大体观察分级的组间比较采用Kruskal-Wallis *H*检验，Mankin's评分及MMP-13阳性细胞率的组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔KOA造模效果

KOA造模手术后所有动物的精神状态及饮食情况均正常，伤口愈合、无感染，但是术侧关节出现不同程度的肿胀，1周后肿胀明显，并出现活动功能障碍。处死后分离获得模型兔的两侧膝关节，肉眼观察健侧与患侧膝关节形态和软骨损伤差异，发现健侧膝关节软骨表面光滑，色泽正常，无缺损区域；患侧关节软骨表面粗糙不平，色泽晦暗，并出现缺损区域(图1A~B)。经HE染色后光学显微镜下观察发现，模型组兔患侧膝关节软骨结构完整性被破坏，软骨表层粗糙、缺损伴软骨层变薄，潮线不明了，细胞大小不一、形态不规整、排列紊乱，有明显的细胞堆积；正常组及模型组健侧膝关节软骨表层平整且光滑，细胞排列整齐，分布均匀，软骨结构完整清晰(图1C~D)。



注：A为正常组兔的一对膝关节，B为模型组兔的一对膝关节（左为健侧，右为患侧）；C~D为模型组兔的一对膝关节软骨组织的HE染色病理图（C为患侧，D为健侧；比例尺大小为100 μm）。

Note: A, a pair of knee joints from a rabbit in normal group; B, a pair of knee joints from a rabbit in model group (the left one is healthy side, right one is affected side); C-D, the HE staining pathological images of a pair of knee cartilage tissues from a rabbit in the model group (C is the affected side, D is the healthy side; the scale bar is 100 μm).

图1 造模后兔膝关节软骨大体观察及HE染色结果

Figure 1 The results of gross observation and HE staining of rabbit knee cartilage after modeling

2.2 消瘀散新组方治疗KOA的效果

2.2.1 降低膝关节软骨损伤

消瘀散和消瘀散新组方用药后,采用Outerbridge分级法评价各组关节软骨的损伤情况,结果如表1所示。与正常组相比,模型组的Outerbridge分级较差,

差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,消瘀散组和消瘀散新组方组的Outerbridge分级均有改善,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与消瘀散组相比,消瘀散新组方组的Outerbridge分级改善更明显,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 不同组膝关节软骨的Outerbridge分级和Mankin's评分比较

Table 1 Comparison of cartilage Outerbridge grade and Mankin's score among different groups

分组 Group	动物数量 <i>n</i>	Outerbridge分级 Outerbridge grade						Mankin评分 Mankin's score $\bar{x} \pm s$
		0	I	II	III	IV	最高级(III-IV)	
正常组 Normal group	10	9	1	0	0	0	0	0.30±0.68
模型组 Model group	10	0	0	2	5	3	8*	10.20±3.12*
消瘀散组 Xiaoyusan group	10	0	3	2	5	0	5#	6.10±2.64*#
消瘀散新组方组 Xiaoyusan new formula group	10	0	7	2	1	0	1**	3.20±1.69**

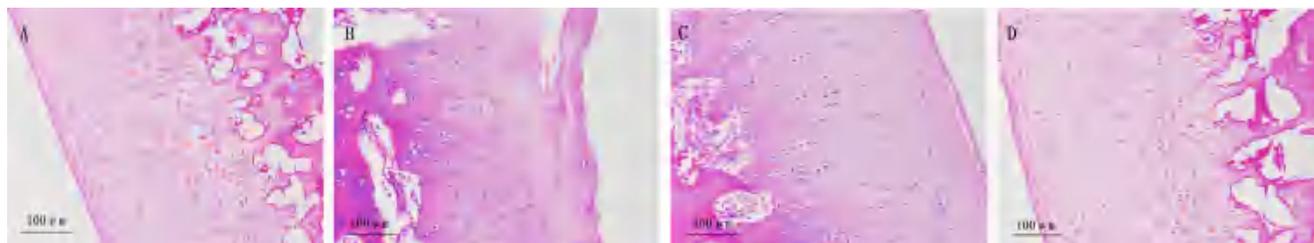
注:与正常组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$;与消瘀散组相比,** $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with model group, # $P < 0.05$; compared with ointment of Xiaoyusan group, ** $P < 0.05$.

2.2.2 抑制膝关节软骨组织病理学退变

消瘀散和消瘀散新组方用药后,HE染色观察各组兔膝关节软骨组织病理学变化,结果如图2所示。正常组软骨表面光滑,软骨细胞呈梭形柱状,细胞结构有序,潮线清晰;模型组软骨表面粗糙,软骨细胞聚

集,表层细胞簇集,深部软骨细胞的细胞核萎缩,潮线不完整;相对于模型组,消瘀散组的软骨细胞表面光滑程度明显改善,细胞结构相对有序;与消瘀散组比较,消瘀散新组方组的软骨表面更加光滑,细胞结构排列有序,潮线稍模糊。



注:A为正常组,B为膝关节炎手术模型组,C为手术造模后给予消瘀散治疗组,D为手术造模后给予消瘀散新组方治疗组。图中比例尺大小为100 μm。

Note: A, normal group; B, the model group of knee arthritis by surgery; C, ointment of Xiaoyusan group; D, ointment of Xiaoyusan new formula group. The scale bar is 100 μm.

图2 各组兔膝关节软骨的HE染色图

Figure 2 HE staining of rabbits articular cartilage among different groups

采用Mankin's评分法判断软骨组织退变程度,结果如表1所示。与正常组相比,模型组的Mankin's评分较高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相

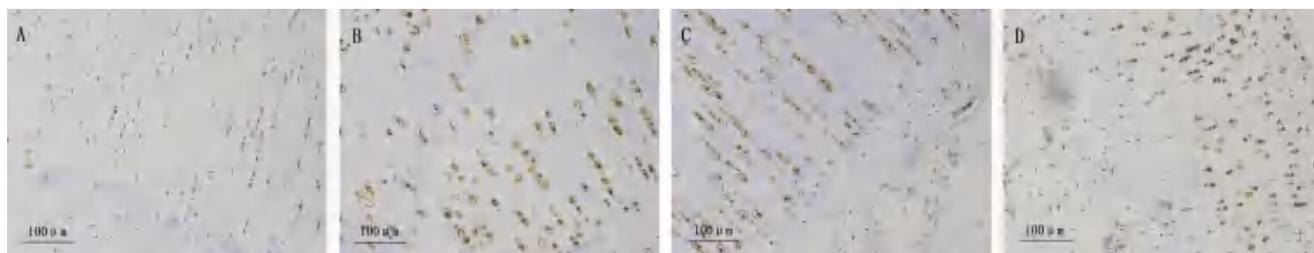
比,消瘀散组和消瘀散新组方组的Mankin's评分均下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与消瘀散组相比,消瘀散新组方组的Mankin's评分下降更明显,差

异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2.3 抑制软骨组织中MMP-13表达

消瘀散和消瘀散新组方用药后采用免疫组织化学法检测膝软骨组织中MMP-13的表达情况,结果如图3所示。与正常组 [(3.20±2.39)%] 相比,模型组的MMP-13阳性表达率 [(67.90±13.94)%] 明显升高,

差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比,消瘀散组 [(37.10±19.16)%] 和消瘀散新组方组 [(13.60±3.10)%] 的MMP-13阳性表达率均降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与消瘀散组相比,消瘀散新组方组的MMP-13阳性表达率降低更明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: A为正常组, B为膝关节炎手术模型组, C为手术造模后给予消瘀散治疗组, D为手术造模后给予消瘀散新组方治疗组。免疫组织化学法(DAB染色), 图中比例尺大小为100 μm。

Note: A, normal group; B, the model group of knee arthritis by surgery; C, ointment of Xiaoyusan group; D, ointment of Xiaoyusan new formula group. Detected by immunohistochemistry with DAB staining, the scale bar is 100 μm.

图3 各组兔膝关节软骨组织中MMP-13表达情况

Figure 3 Comparison of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) expression of rabbits articular cartilage among different groups

3 讨论

骨关节炎属于中医痹症范畴。《类证治裁·痹症》认为诸痹“良由营卫先虚, 腠理不密, 风湿寒乘虚内袭。正气为邪所阻, 不能宣行, 因而留滞, 气血凝涩, 久而成痹”。现代中医也认为, 素体虚弱、正气不足是痹症发病的内在因素, 而感受外邪是发病的外在条件^[13]。因此, 骨关节炎为本虚标实之症, 即肾阳亏虚、肝血亏虚并有血瘀。基于以上病机认识, 临床上针对骨关节炎的治疗当以补益肝肾、温阳通络、活血化瘀为治则。故本病的治疗需扶正祛邪并用, 采用活血化瘀、补肝肾之法以期标本兼顾。改良后的消瘀散新组方中, 君药大黄清热解毒, 活血化瘀; 附子补火助阳, 散寒止痛; 杜仲、淫羊藿补益肝肾, 骨有所养, 协助附子温阳散寒止痛, 共为臣药; 紫荆皮凉血泻火, 活血祛瘀; 三七、乳香活血化瘀, 通经止痛; 当归补血活血, 使血有所生, 筋有所养, 为佐使药。全方具有补益肝肾、温阳散寒、活血通络的功效。

增加的三味药中, 现代药理研究表明: 附子为乌头子根加工而成, 含有多种乌头碱类化合物, 具有较强的抗炎镇痛作用; 其镇痛作用可能与介导中枢阿片受体有关, 还可减少及清除氧自由基^[14]。制附子还可减轻风湿性关节炎的炎性反应, 减轻软骨破坏^[15]。朱

瑞丽等^[16]研究发现, 附子中3种单酯型生物碱如苯甲酰乌头原碱、苯甲酰中乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱对脂多糖刺激的巨噬细胞均有抗炎作用。杜仲的药用部位为树皮, 主要成分为多糖及黄酮类化合物等。杜仲多糖具有较好的免疫调节作用。刘青翠等^[17]发现, 杜仲叶提取物能有效提高血清超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性, 从而改善机体的抗氧化能力。Ha等^[18]用杜仲皮提取物处理小鼠骨髓细胞和骨髓基质细胞系ST-2, 发现其能促进骨形成, 抑制破骨细胞活性和骨质溶解。鲁海等^[19]发现, 杜仲能调节MMPs和组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)的表达, 对大鼠骨关节起到保护作用。王昭^[20]发现, 在大鼠骨关节炎模型中, 杜仲能调节NF-κB及IL-1表达, 从而起到保护作用。淫羊藿药材来源为植物的干燥叶, 有超过260余种单体化合物, 以淫羊藿苷的含量为最高, 具有改善骨代谢、抗炎等作用。淫羊藿苷可通过NF-κB信号途径来抑制滑膜炎性反应, 降低TNF-α、IL-1β等的含量, 还可通过Wnt-β连环蛋白、PI3K/Akt/NO等途径来参与骨保护^[21]。相关研究还发现, 淫羊藿苷能保护骨关节软骨下骨, 抑制破骨细胞的生长并促进其凋亡^[22]。吴迎春等^[23]发现, 淫羊藿总黄酮联合硫酸氨基葡萄糖对骨关节炎有明显的抑制作用。冯坤等^[24]发现, 淫

羊藿提取物对体外软骨组织生长具有促进作用。鲍远等^[25]发现,淫羊藿总苷具有促进大鼠关节软骨细胞增殖的作用。葛茂林等^[26]发现,淫羊藿苷能减轻兔骨关节软骨基质的降解,改善骨小梁结构,从而达到保护关节的作用。

KOA 是男女共患疾病。为客观全面地对该疾病进行研究,本研究中根据美国国家卫生研究院(National Institutes of Health, NIH) 2014年10月提出的实验动物性别平衡要求,选取同等数量的雄性兔和雌性兔。本研究中药物治疗组设计时,参考了《中药新药研究指南》(第六版)中实验动物给药剂量的建议(大动物可仅设1个剂量组)。由于本次实验药品为局部外用制剂,暂未检索到针对局部外用药的动物实验换算标准,故考虑用药安全性,实验剂量参考“人和动物间按体表面积折算方法”^[27]来计算。本研究仅初步探索消瘀散新组方对软骨组织中MMP-13表达的影响,在后续的研究中可进一步增加剂量组、透皮吸收试验、皮肤毒理试验、致敏试验等,以更全面地评估该药物的临床可推广性。

膝关节软骨主要是由软骨细胞(chondrocyte)、胶原蛋白(Collagen)、蛋白聚糖(proteoglycan, PG)和嵌入少量软骨细胞的其他蛋白质水合细胞外基质(extracellular cartilage matrix, ECM)组成的无血管组织。其中,ECM的主要成分为II型胶原蛋白(Collagen II)和聚蛋白多糖(aggrecan, ACAN)。有文献表明,ECM中Collagen II和ACAN合成与降解失衡是造成关节软骨破坏的重要原因之一^[28]。ECM中Collagen降解主要通过MMPs进行。MMPs是一组酶活性依赖Zn⁺的蛋白水解酶家族,其中MMP-3、MMP-13对Collagen II及其他ECM成分的水解起到关键作用^[29]。近年来,MMPs的代谢调控机制受到越来越多的关注。MMPs主要由软骨细胞产生,是降解软骨基质最重要、最有效的酶。虽然MMP-13降解Collagen II的活性很高,但几乎不在正常组织中表达;而在骨关节炎的软骨中,MMP-13会高表达,特异性地降解胶原分子中三维螺旋结构,胶原蛋白网保护的软骨细胞凋亡增加,导致Collagen II的降解加速破坏^[30]。研究发现其他诸多MMPs亚型降解Collagen II也需要通过MMP-13才能起作用^[31-34],贯穿KOA的全过程。

为了便于质量控制及对药物治疗机制进行深入研究,本研究采用动物实验探讨消瘀散新组方的治疗效果和作用机制。在KOA的发生、发展过程中,软骨退

变是一个重要的表现,因此软骨HE染色与大体观察是判断膝关节软骨损伤程度的重要方法。KOA动物造模后HE染色结果表明,膝关节软骨表面由光滑变粗糙,软骨细胞结构变得无序,潮线变得不完整,再结合关节软骨的外观评价,可以认为其符合相关文献中KOA模型的表现。经过2周的外敷药干预后,消瘀散及消瘀散新组方明显改善了膝关节软骨的HE染色表现,表明中药外敷对KOA具有显著的疗效。通过比较消瘀散组与消瘀散新组方组治疗后的膝关节软骨组织发现,消瘀散新组方治疗KOA的软骨改善程度明显优于消瘀散,据此可以推测新组方比消瘀散具有更好的疗效。另外,将关节软骨中MMP-13表达水平作为药物治疗的一个评价指标,MMP-13水平高低可直接反映软骨的病变程度。本研究中,MMP-13的免疫组织化学检测结果显示,造模后的膝关节软骨组织中MMP-13异常高表达,经过两组贴膏治疗后,MMP-13水平下降,且消瘀散新组方能明显改善KOA的病理状态,改善程度优于消瘀散。

综上所述,消瘀散新组方能显著改善KOA模型动物的膝关节软骨病理表现,且效果优于消瘀散。该结果可为进一步临床观察提供借鉴。此外,消瘀散新组方显著降低了软骨组织中MMP-13的表达水平,这可能是其治疗KOA的作用机制之一。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

该研究涉及的所有实验动物均已通过上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会的伦理审查批准(No. XHEC-F-2022-061),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 Ethics Committee of Xinhua Hospital affiliated to Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine (Approval Letter No. XHEC-F-2022-061). All experiment procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

崔若琳:负责方案策划、动物实验、数据处理、软件处理、初稿写作及修改;

王庆、冯文昌、杨玲:负责方法设计、提供资源和动物实验;

刘智伟、王乐杨:负责文献支持;

滕蔚然、马碧涛、秦丽萍:负责提供资源和方法设计;

金立伦:负责有效验证、项目管理、监督指导并提供资源。

[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] 袁芳, 侯秀娟, 刘小平, 等. 补益肝肾活血通络法治疗膝骨关节炎的理论探讨[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(3):891-893.
YUAN F, HOU X J, LIU X P, et al. Theoretical discussion on treating knee osteoarthritis with therapy of nourishing liver and kidney and promoting blood circulation for removing obstruction in collaterals[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(3):891-893.
- [2] 金立伦, 滕蔚然, 罗健兴, 等. 消瘀散精简方贴膏治疗急性软组织损伤的临床随机对照研究[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(4):51-54. DOI:10.16305/j.1007-1334.2013.04.018.
JIN L L, TENG W R, LUO J X, et al. Simplified "Xiaoyu San" Plaster in the treatment of acute soft tissue injury: a randomized controlled trial[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2013, 47(4):51-54. DOI:10.16305/j.1007-1334.2013.04.018.
- [3] 金立伦. 消瘀散治疗急性软组织损伤的临床疗效[J]. 药学服务与研究, 2006, 6(2):106-108. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2838.2006.02.006.
JIN L L. Efficacy of Xiaoyusan in the treatment of patients with acute soft tissue injuries[J]. Pharm Care Res, 2006, 6(2):106-108. DOI:10.3969/j.issn.1671-2838.2006.02.006.
- [4] 滕蔚然, 金立伦, 王乐杨, 等. 消瘀散贴膏治疗膝骨关节炎的临床疗效研究[J]. 食品与药品, 2013, 15(3):164-167. DOI:10.3969/j.issn.1672-979X.2013.03.005.
TENG W R, JIN L L, WANG L Y, et al. Clinical efficacy of Xiaoyusan plaster in treatment of knee osteoarthritis[J]. Food Drug, 2013, 15(3):164-167. DOI:10.3969/j.issn.1672-979X.2013.03.005.
- [5] 王庆, 冯文昌, 庄迪, 等. 消瘀散贴膏联合针灸治疗膝骨关节炎的疗效及对炎症因子的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(10):155-159. DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2020.10.048.
WANG Q, F W C, ZHUANG D, et al. Effect of Xiaoyusan paste combined with acupotomy on knee osteoarthritis and its effect on inflammatory factors[J]. J Liaoning Trad Chin Med, 2020, 47(10):155-159. DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2020.10.048.
- [6] 冯文昌, 王庆, 马碧涛, 等. 针灸联合消瘀散外敷治疗膝骨关节炎的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(8):54-57. DOI:10.16305/j.1007-1334.2018.08.016.
FENG W C, WANG Q, MA B T, et al. Clinical observation on acupotomy combined with external application of Xiaoyu Powder in treating knee osteoarthritis[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2018, 52(8):54-57. DOI:10.16305/j.1007-1334.2018.08.016.
- [7] MA B T, JIN L L, LIU X L, et al. An investigation over the impact of conventional Chinese bone setting to cartilage and the VEGF expression in cartilage cells in rats with knee osteoarthritis disease[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(5):5552-5558.
- [8] HAYAMI T, FUNAKI H, YAOEDA K, et al. Expression of the cartilage derived anti-angiogenic factor chondromodulin-1 decreases in the early stage of experimental osteoarthritis[J]. J Rheumatol, 2003, 30(10):2207-2217.
- [9] 范素青, 冯继华. 膝骨关节炎患者 hs-CRP 和 MMP-13 的相关性研究[J]. 中国高等医学教育, 2020, 280(4):130-132. DOI:10.3969/j.issn.1002-1701.2020.04.068.
FAN S Q, FENG J H. Correlation between hs-CRP and MMP-13 in patients with knee osteoarthritis [J]. Chin High Med Educ, 2020, 280(4):130-132. DOI:10.3969/j.issn.1002-1701.2020.04.068.
- [10] HULTH A, LINDBERG L, TELHAG H. Experimental osteoarthritis in rabbits. preliminary report[J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(5):522-530. DOI:10.3109/17453677008991540.
- [11] OUTERBRIDGE R E, DUNLOP J A. The problem of chondromalacia patellae[J]. Clin Orthop Relat Res, 1975(110):177-196. DOI:10.1097/00003086-197507000-00024.
- [12] MANKIN H J, DORFMAN H, LIPPIELLO L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips[J]. J Bone Jt Surg, 1971, 53(3):523-537. DOI:10.2106/00004623-197153030-00009.
- [13] 刘映岐, 肖依诚, 陶程露, 等. 中医对膝骨性关节炎的认识综述[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(61):251-253. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2016.61.167.
LIU Y Q, XIAO Y C, TAO C L, et al. A review of understanding of knee osteoarthritis in traditional Chinese medicine[J]. World Latest Medical Information Abstracts, 2016, 16(61):251-253. DOI:10.3969/j.issn.1671-3141.2016.61.167.
- [14] 袁雯. 附子的药理研究[J]. 中医临床研究, 2018, 10(4):145-147. DOI:10.3969/j.issn.1674-7860.2018.04.073.
YUAN W. A research on the pharmacological action of Fuzi [J]. Clin J Chin Med, 2018, 10(4):145-147. DOI:10.3969/j.issn.1674-7860.2018.04.073.
- [15] 刘建磊. 制附子干预大鼠佐剂性关节炎作用研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2012.
LIU J L. Effect of preparation of Aconite on adjuvant arthritis in rats[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2012.
- [16] 朱瑞丽, 易浪, 董燕, 等. 附子中 3 种乌头原碱对巨噬细胞的抗炎作用[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(5):908-913. DOI:10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2015.05.028.
ZHU R L, YI L, DONG Y, et al. Anti-inflammatory effect of three kinds of aconine from *Radix aconiti* lateralis preparata on macrophages[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2015, 32(5):908-913. DOI:10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2015.05.028.
- [17] 刘青翠, 彭翔, 张俊平, 等. 杜仲叶提取物对产蛋后期蛋鸡生产性能、蛋品质、蛋黄胆固醇含量及血清抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(1):284-292. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2018.01.034.
LIU Q C, PENG X, ZHANG J P, et al. Effects of Eucommia leaves extract on performance, egg quality, yolk cholesterol content and serum antioxidant indexes of laying hens during late period of laying[J]. Chin J Anim Nutr, 2018, 30(1):284-292. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2018.01.034.
- [18] HA H, HO J, SHIN S, et al. Effects of Eucommiae cortex on osteoblast-like cell proliferation and osteoclast inhibition[J]. Arch Pharm Res, 2003, 26:929-936. DOI:10.1007/BF02980202.

- [19] 鲁海, 谢国平, 刘文刚, 等. 杜仲干预大鼠膝骨性关节炎关节软骨破坏的机理研究[J]. 内蒙古中医药, 2015, 34(11):144-145. DOI:10.16040/j.cnki.cn15-1101.2015.11.137.
LU H, XIE G P, LIU W G, et al. Study on the mechanism of intervention of *Eucommia ulmoides* oliv. on articular cartilage destruction in rats with knee osteoarthritis[J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2015, 34(11):144-145. DOI:10.16040/j.cnki.cn15-1101.2015.11.137.
- [20] 王昭. 杜仲对大鼠早期膝OA模型NF- κ B与IL-1 β 表达相关性的研究[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2016.
WANG Z. Effect of *Eucommia ulmoides* on the expression of NF- κ B and IL-1 β in early knee OA model of rat[D]. Xiayang: Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [21] 路宇仁, 陈映冰, 崔元璐, 等. 淫羊藿苷药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17):209-220. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20181734.
LU Y R, CHEN Y B, CUI Y L, et al. Progress of pharmacological research on icariin[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(17):209-220. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20181734.
- [22] 李睿, 杨信信, 张小辉, 等. 淫羊藿苷治疗骨性关节炎的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(8):1088-1092. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2018.08.020.
LI R, YANG X X, ZHANG X H, et al. Research progress of Icariin in the treatment of osteoarthritis[J]. Chin J Osteoporos, 2018, 24(8): 1088-1092. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-7108.2018.08.020.
- [23] 吴迎春, 吕刚, 依力潘凯赛尔, 等. 淫羊藿总黄酮联合硫酸氨基葡萄糖对膝骨关节炎疗效临床研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(9):1195-1198. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2017.09.017.
WU Y C, LV G, YILIPAN K, et al. The clinical research of the efficacy of epimedium total flavone combined with glucosamine sulfate on knee osteoarthritis[J]. Chin J Osteoporos, 2017, 23(9): 1195-1198. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-7108.2017.09.017.
- [24] 冯坤, 谢文, 陈宝龙, 等. 淫羊藿提取物对体外软骨器官生长的促进作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(15):2823-2827. DOI:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.15.004.
FENG K, XIE W, CHEN B L, et al. Promoting effect of Epimedium on cartilage growth in vitro[J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2009, 13(15): 2823-2827. DOI: 10.3969/j. issn. 1673-8225.2009.15.004.
- [25] 鲍远, 黄俊明, 靖兴志, 等. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24):3501-3507. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.24.001.
BAO Y, HUANG J M, JING X Z, et al. Icariin promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2016, 20(24):3501-3507. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.24.001.
- [26] 葛茂林, 李志强, 舒清明, 等. 淫羊藿苷对早期兔膝关节骨性关节炎的影响[J]. 武警医学院学报, 2011, 20(12):954-957, 1025.
GE M L, LI Z Q, SHU Q M, et al. Effect of Icariin on the osteoarthritic knee of rabbits in the early stage[J]. Acta Acad Med CPAF, 2011, 20(12):954-957, 1025.
- [27] 李建荣, 黄芳华. 中药新药长期毒性实验设计及常见问题分析[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(9):769-772. DOI:10.3321/j.issn: 1003-3734.2004.09.001.
LI J R, HUANG F H. Experimental design of long-term toxicity of new Chinese medicines and analysis of common problems [J]. Chin New Drugs J, 2004, 13(9):769-772. DOI:10.3321/j.issn: 1003-3734.2004.09.001.
- [28] Ji J B, Li X F, Liu L, et al. Effect of low intensity pulsed ultrasound on expression of TIMP-2 in serum and expression of mmp-13 in articular cartilage of rabbits with knee osteoarthritis[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(12):1043-1048. DOI:10.1016/j.apjtm.2015.11.003.
- [29] WANG M, SAMPSON E R, JIN H, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(1): R5. DOI:10.1186/ar4133.
- [30] 成吉华, 赵丹, 郭杨, 等. 低强度脉冲超声治疗骨关节炎的应用进展[J]. 临床超声医学杂志, 2014, 16(7):475-477.
CHENG J H, ZHAO D, GUO Y, et al. A review of low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of osteoarthritis[J]. J Clin Ultrasound Med, 2014, 16(7):475-477.
- [31] 安恒远. 低强度脉冲超声波对体外培养兔软骨细胞MMP-13与II型胶原的影响[D]. 南京: 南京医科大学, 2011.
AN H Y. The effects of low intensity pulsed ultrasound on MMP-13 and COL- II of rabbit chondrocytes in vivo[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2011.
- [32] 颜益红. 超声波和运动疗法对兔膝关节炎软骨细胞凋亡, BCL-2和MMP-13的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
YAN Y H. The effects of ultrasound and exercise therapy on BCL-2 and MMP-13 in chondrocytes[D]. Changsha: Central South University, 2012.
- [33] 陈宁. 机械压力和维拉帕米对骨关节炎软骨细胞表达MCP-1和MMP-1、-3、-13的影响[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
CHENG N. The effects of mechanical stress and verapamil on MCP-1 and MMP-1, -3, -13expression[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2013.
- [34] 邱艺斌. 超声导入复方三七消痛软膏对兔膝骨性关节炎软骨细胞MMP-13表达的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2015.
QIU Y B. Effect of ultrasound-induced Compound Sanqi Analgesic ointment on expression of MMP-13 in rabbit chondrocytes with knee osteoarthritis [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2015.

(收稿日期: 2022-07-04 修回日期: 2022-09-30)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 洪怡)

[引用本文]

- 崔若琳, 王庆, 杨玲, 等. 消瘀散新组方修复膝骨关节炎模型兔的软骨损伤及MMP-13表达[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):30-38. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.099.
- CUI R L, WANG Q, YANG L, et al. Repair effects of Xiaoyusan new formula on cartilage injury and MMP-13 expression in knee osteoarthritis model rabbits[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 30-38. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.099.

牛磺酸对苯扎氯铵损伤大鼠眼角膜内皮细胞无保护作用

葛 健¹, 孙静芬¹, 吴永杰²

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院眼科, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海市高血压研究所, 上海市高血压重点实验室, 上海 200025)

[摘要] **目的** 观察2%牛磺酸对苯扎氯铵损伤大鼠眼角膜内皮细胞的保护作用。**方法** 取3只SPF级SD大鼠(共6只眼), 每只眼制备6块角膜内皮层和后弹力层组织片, 随机分为3组。用组织块培养法培养大鼠眼角膜内皮细胞1 d后, 对照组仅加入2%牛磺酸溶液, 实验组在加入2%牛磺酸溶液后再注入质量分数分别为0.01%和0.03%的苯扎氯铵溶液。继续培养1、2、4、5、6、8 d后倒置显微镜下观察各组大鼠眼角膜内皮细胞的生长情况, 并用Wright染色后光学显微镜下观察内皮细胞形态。**结果** 用0.01%苯扎氯铵和2%牛磺酸处理1 d的实验组大鼠眼角膜组织块边缘出现多角形的内皮细胞, 胞体透明; 2 d后多角形细胞增多, 但没有出现细胞间的融合生长现象; 3 d后多角形细胞减少, 内皮细胞未见核分裂象; 4 d后可见内皮细胞核着色加深, 多角形细胞少见; 5 d后内皮细胞数量减少, 出现细胞体固缩死亡现象。用0.03%苯扎氯铵和2%牛磺酸处理1 d的实验组未观察到内皮细胞生长, 胞体稀少散在。仅用2%牛磺酸处理的对照组1 d后组织块边缘出现多角形内皮细胞和少数类内皮多边形细胞; 3 d后组织块边缘多角形细胞增多, 而且有逐渐融合生长的现象; 5 d后内皮细胞个数增多, 而且细胞外形多呈六角形; 8 d后内皮细胞形成大片状, 胞体呈六角形或类圆形, 出现细胞核分裂象。左右眼角膜内皮细胞生长均匀, 在0.01%和0.03%苯扎氯铵处理的实验组以及对照组内左右眼内皮细胞形态均无明显差别。**结论** 2%牛磺酸对被不同浓度的苯扎氯铵液损伤的大鼠眼角膜内皮细胞无保护作用。

[关键词] 牛磺酸; 苯扎氯铵; 眼角膜内皮细胞; 组织培养; SD大鼠

[中图分类号] R-332; R779.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0039-05



Taurine Has no Protective Effect on Rat Corneal Endothelial Cells Injured by Benzalkonium Chloride

GE Jian¹, SUN Jingfen¹, WU Yongjie²

(1. Department of Ophthalmology, RuiJin Hospital, Shanghai Jiao Tong University Medical School, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Institute of Hypertension, RuiJin Hospital, Shanghai Jiao Tong University Medical School, Shanghai 200025, China)

Correspondence to: WU Yongjie, E-mail: wyj10506@rjh.com.cn

[ABSTRACT] **Objective** To observe the protective effect of 2% taurine on corneal endothelial cells injured by benzalkonium chloride in rats. **Methods** Six piece of corneal endodermis and elastic layer tissue slices were prepared from 6 eyes of 3 SPF SD rats and randomly divided into three groups. The corneal endothelial cells of rats were cultured by tissue block culture for 1 day, then the control group cells were added with 2% taurine solution, while the experimental group cells were added with 2% taurine solution and 0.01% or 0.03% benzalkonium chloride solution. After 1, 2, 4, 5, 6 and 8 days of continuous culture, the growth of corneal endothelial cells in each group was observed under an inverted microscope, and the morphology of endothelial cells was observed under an optical microscope after Wright staining. **Results** Treated with 0.01% benzalkonium chloride and 2% taurine for 1 day, polygonal endothelial cells appeared on the edge of corneal tissue mass, and the cells were transparent. After 2 days, the number of

[第一作者] 葛 健(1964—),男,副主任医师,研究方向:眼表疾病的临床和机制研究。E-mail: gj10420@rjh.com.cn;

孙静芬(1967—),女,博士,副主任医师,研究方向:青光眼的临床和视神经保护机制研究。E-mail: sjf10520@rjh.com.cn

[通信作者] 吴永杰(1967—),男,副研究员,研究方向:动物实验和实验动物研究。E-mail: wyj10506@rjh.com.cn

polygonal cells increased, and there was no fusion growth between cells. After 3 days, the number of polygonal cells decreased and no mitotic signs were observed in endothelial cells. After 4 days, the endothelial nuclei were deeply stained and polygonal cells were rare. After 5 days, the number of endothelial cells decreased, and cell body shrinkage and death occurred. In the experimental group treated with 0.03% benzalammonium chloride and 2% taurine for 1 day, no endothelial cell growth was observed and the cells were sparsely-scattered. In control group, polygonal endothelial cells and a few endothelium-like polygon cells appeared at the edge of tissue blocks after 1 day. After 3 days, the number of polygonal cells at the edge of tissue blocks increased, and there was a phenomenon of gradual fusion growth. After 5 days, the number of endothelial cells increased, and the cells were mostly hexagonal. After 8 days, the endothelial cells formed large sheets, the cell bodies were hexagonal or round, and the nuclei were divided. The growth of corneal endothelial cells in the left and right eyes was uniform, and there was no significant difference in the morphology of the left and right eye endothelial cells in the 0.01% and 0.03% benzalammonium chloride treatment groups and the control group. **Conclusion** 2% taurine had no protective effect on corneal endothelial cells injured by benzalammonium chloride.

[Key words] Taurine; Benzalkonium chloride; Corneal endothelial cells; Tissue culture; SD rats

对于眼结膜和角膜疾病及部分内眼疾病，目前最主要的用药治疗方式是眼药水滴用。很大部分眼药水都添加防腐剂，其中苯扎氯铵是被广泛使用的防腐剂之一。苯扎氯铵是一种具有阳离子表面活性的广谱杀菌剂，能改变菌体细胞膜的通透性，使菌体细胞质内的物质外渗，阻碍菌体细胞代谢，从而起到灭菌作用。因为在低浓度时有较好的安全性和有效性，苯扎氯铵一直以低浓度形式被用作滴眼液的防腐剂，至今已有近70年历史^[1]。

近年来，临床上广泛使用含有苯扎氯铵的眼科药物，其对角膜和结膜的潜在损害也逐渐引起人们的重视。临床上时常可以观察到眼科药物造成的细点状的角膜上皮炎，或者因长期用药造成的角膜组织糜烂和眼内外眦皮肤溃烂，以及使用眼药水造成的眼结膜长期充血和眼干涩、刺痛等临床表现。研究发现，低浓度的苯扎氯铵对角膜细胞、角膜神经有损伤，对眼表组织有毒性反应^[2]；在结膜囊内滴用含苯扎氯铵的眼药水后，药物和苯扎氯铵都能以渗透压梯度和主动运输方式进入眼球内，从而对球内组织产生作用，其中苯扎氯铵可能会损伤眼组织。因此，如何减少和抑制眼药水中防腐剂对眼组织的损害就显得尤为重要。

牛磺酸又称 α -氨基乙磺酸，最早从牛黄中分离得到^[3]。牛磺酸广泛存在于动物的心肌、骨骼肌、神经组织和眼组织中，尤以大脑和心肌中的浓度最高。牛磺酸能抑制神经递质的传导，维持神经细胞膜的稳定性^[4-5]，也能帮助钠、钾、钙在细胞内外运动，并且在眼、血管和胆囊中具有解毒和抗氧化作用^[6-8]。本研究拟通过使用质量分数为2%的牛磺酸，观察其对苯

扎氯铵损害的大鼠眼角膜内皮细胞生长有无保护作用。

由于临床上常使用的眼药水一般含质量分数为0.003%~0.03%的苯扎氯铵，因此本研究设计用0.01%和0.03%的苯扎氯铵溶液损伤大鼠眼角膜，同时加入含2%牛磺酸溶液的大鼠眼角膜内皮细胞培养液，以此观察角膜内皮细胞的生长情况，从而判断牛磺酸是否对日常使用浓度的苯扎氯铵损伤的眼角膜内皮细胞有保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠3只，10周龄，1雌2雄，体质量250~280 g，购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXY(浙)2019-0001]。大鼠饲养于上海交通大学医学院附属瑞金医院的实验动物设施[SYXK(沪)2011-0113]内。本研究中动物实验方案经上海交通大学医学院附属瑞金医院动物实验伦理委员会审核批准[R.J.(Z)2019011]，动物实验操作遵循3R原则。

1.2 主要试剂

EDTA/F12混合培养液(体积比为1:1)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和胎牛血清购自美国Gibco公司；牛磺酸结晶购自永安药业股份有限公司(批号:20200512)，使用时按照质量比为2:100溶于蒸馏水，配制成2%的牛磺酸溶液；苯扎氯铵购自运佳黄浦制药有限公司(批号:200801)，使用时按照质量比为0.01:100和0.03:100溶于蒸馏水，配制成0.01%和0.03%的苯扎氯铵溶液。

1.3 眼角膜组织制备

用3%苯巴比妥溶液，按1 mL/kg剂量，经尾静脉

注射麻醉大鼠；无菌条件下摘除大鼠眼球，用灭菌生理盐水冲洗3次，在超净工作台内用眼科剪刀在放大镜下取大鼠眼角膜，放入含100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的D-PBS溶液中，漂洗3次后备用。

1.4 角膜内皮细胞培养液制备

用体积比为1:1的EDTA/F12混合液培养大鼠眼角膜组织，内含10 mmol/L HEPES、200 mL/L胎牛血清、100 mL/L链霉素、100 \times 10³ U/L青霉素和2.5 mg/L两性霉素B，调整pH值为7.2~7.4。

1.5 眼角膜内皮细胞培养和药物处理

在超净工作台内，用显微镜镊子在显微镜下撕下大鼠眼角膜的内皮层和后弹力层，每只眼制备6块组织片。将撕取的每一块组织片的内皮细胞层面朝上，平放于12孔培养板的一孔内，每行以3孔排列。3只大鼠的左右眼组织均分开放在两块培养板上，使每行组织都是取自同一只大鼠的眼角膜，而每一列组织均分属3只不同大鼠的同侧眼角膜。先将每块角膜组织置于37℃培养箱中干燥15 min，然后加入已制备的角膜内皮细胞培养液，继续放置在37℃、5% CO₂培养箱内培养；1 d后，在更换培养液时，左右每只眼的角膜内皮细胞按列分别一次性加入2%牛磺酸溶液（第1列，作为对照组）、2%牛磺酸溶液和0.01%苯扎氯铵溶液（第2列，作为实验组1）、2%牛磺酸溶液和0.03%苯扎氯铵溶液（第3列，作为实验组2），更换培养液后调整pH值为7.4。此后，培养液每天换1次，共培养8 d。

1.6 细胞观察和拍照

角膜组织培养12 h后，每天用倒置显微镜观察角膜内皮细胞的生长情况。在加药培养后的第1、2、4、5、6、8天，分别吸取部分角膜内皮细胞，用40 g/L多聚甲醛溶液固定，然后行Wright染色，在光学显微镜（40倍）下观察细胞形态，并摄片记录。

2 结果

2%牛磺酸溶液+0.01%苯扎氯铵液处理的实验组1中，第1天组织块边缘均出现多角形的内皮细胞，胞体透明；第2天可见多角形细胞继续增多，但未出现细胞间融合现象；第3天出现多角细胞减少，内皮细胞未见核分裂象；第4天可见内皮细胞核着色加深，多角形细胞少见；第5天内皮细胞数量减少，并出现细胞体固缩死亡现象（图1A~C）。

2%牛磺酸溶液+0.03%苯扎氯铵液处理的实验组2中，第1天及以后均未观察到有内皮细胞生长，细胞体稀少散在（图1D）。

只含2%牛磺酸而未加苯扎氯铵的对照组中，第1天组织块边缘均出现多角形内皮细胞和少数类内皮多边形细胞；第2、3天可见组织块边缘的多角形细胞增多，而且有逐渐融合的现象；第4天内皮细胞增多，胞体规则且多为六角形，内皮细胞成片状；第5天内皮细胞更加融合成片，开始出现核分裂现象；第8天内皮细胞形成大片状，胞体呈六角形或类圆形，细胞核分裂象多见（图1E~G）。

无论实验组还是对照组，左右眼之间角膜内皮细胞生长速度和细胞形态均相似，无明显差异。

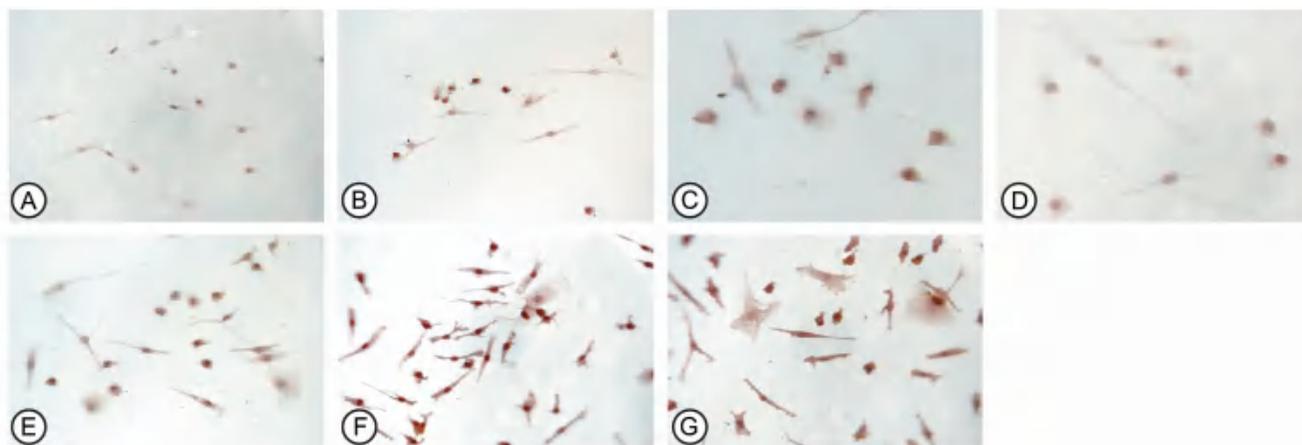
3 讨论

牛磺酸是一种含硫氨基酸，在眼科临床上被用于准分子激光角膜切削术（photorefractive keratectomy, PRK）和准分子激光角膜原位磨镶术手术（laser-in situ keratomileusis, LASIK）后的保护药液，能抑制角膜组织中脂质过氧化水平，利于角膜伤口的愈合^[9]。另外，牛磺酸能在体外诱导脐血间质干细胞向感光细胞和表达视紫红质的细胞分化^[10]。牛磺酸在眼部能抑制牛晶状体上皮细胞的凋亡^[11]；临床上常用4%~5%的牛磺酸治疗慢性结膜炎和白内障^[12]。安全剂量的牛磺酸可注入玻璃体腔，增加眼的视敏度^[13]。故而，一定浓度的牛磺酸对眼组织有益而无毒害。

苯扎氯铵对眼角膜组织具有毒性损伤，仅在0.005%时即可迅速破坏兔眼角膜上皮细胞的屏障功能^[14]，0.1%时甚至可以破坏眼角膜内皮屏障^[15]。苯扎氯铵对眼组织的毒性损害与其浓度（质量分数）成正比，也和苯扎氯铵作用眼组织的时间成正比。

本实验中使用苯扎氯铵的一个质量分数为0.01%，是临床上使用0.02%拉坦前列素类药物所含苯扎氯铵浓度的一半。拉坦前列素在治疗青光眼时可致部分病人的角膜上皮细胞出现点状脱落，造成角膜上皮损伤而停止使用。另外，0.1%玻璃酸钠滴眼液（国内生产）含苯扎氯铵的质量分数是0.03%。因此，本研究中实验组选用两个浓度的苯扎氯铵是合适的。

在0.01%苯扎氯铵+2%牛磺酸的实验组中，前2 d可见组织块边缘出现多角形的内皮细胞，胞体透明，说明内皮细胞开始有生长现象；第3天，这个实验组出现多角内皮细胞减少，此时内皮细胞已开始停止生长；第4天，内皮细胞核着色加深，多角形细胞少见，内皮细胞数量减少；第5天，出现内皮细胞胞体固缩死亡现象。由此可见0.01%苯扎氯铵对所培养的大鼠内皮细胞的生长有抑制作用，同时2%牛磺酸溶液对受



注: A~C, 用2%牛磺酸+0.01%苯扎氯铵处理的实验组1大鼠眼角膜内皮细胞: A显示培养第2天, 多角形细胞增多, 但没有细胞间的融合现象; B显示培养第4天, 可见多角形细胞少, 细胞固缩, 内皮细胞稀少; C显示培养第5天, 内皮细胞数减少, 出现细胞体固缩死亡现象。D, 用2%牛磺酸+0.03%苯扎氯铵处理的实验组2大鼠眼角膜内皮细胞, 培养第1天, 内皮细胞无生长。E~G, 用2%牛磺酸(未加入苯扎氯铵)处理的对照组大鼠眼角膜内皮细胞: E显示培养第2天, 出现多量的多角形细胞, 而且有细胞聚集生长现象; F显示培养第4天, 可见多量的多角形细胞, 内皮细胞增多, 胞体规则且多呈六角形, 内皮细胞成片状; G显示培养第5天, 可见细胞核染色质浓染, 具核分裂象。

Note: A-C, corneal endothelial cells of experimental group 1 treated with 2% taurine + 0.01% benzalkonium chloride: A showed on the second day of culture, the number of polygonal cells increased, while there was no fusion growth between cells; B showed on the 4th day of culture, polygonal cells pycnosis, the number of polygonal cells and corneal endothelial cells were rare; C showed after on the 5th day of culture, the number of endothelial cells decreased, and cell body shrinkage and death occurred; D, corneal endothelial cells of experimental group 2 treated with 2% taurine + 0.03% benzalkonium chloride, after cultured 1 day, no endothelial cell growth was observed. E-G, corneal endothelial cells of control group treated with 2% taurine: E showed that on the second day of culture, a large number of polygonal cells appeared, and there was cell aggregation and growth; F showed that on the 4th day of culture, a large number of polygonal cells and endothelial cells were observed, the cell body was regular and mostly hexagonal, and the endothelial cells were lamellar; G showed that on the 5th day of culture, the nuclear chromatin was heavily stained and the mitotic phase was observed.

图1 大鼠眼角膜内皮细胞培养生长情况和细胞形态(Wright染色, ×40)

Figure 1 Growth and morphology of rat corneal endothelial cells (Wright staining, ×40)

损的内皮细胞无保护作用。

在未加苯扎氯铵、仅加2%牛磺酸的对照组中, 第1天组织块边缘出现多角形内皮细胞和少数类内皮多边形细胞; 第2、3天组织块边缘多角形内皮细胞增多, 而且有逐渐融合的现象; 第4天内皮细胞增多, 而且内皮细胞外形多呈六角形; 到第8天内皮细胞形成大片状, 胞体呈六角形或类圆形, 出现细胞核分裂象。对照组中大鼠眼角膜内皮细胞能够正常生长, 这和之前报告认为2%牛磺酸对大鼠内皮细胞的生长有益是相符^[16]。本实验结果证明2%牛磺酸对大鼠的眼角膜内皮细胞生长有促进作用。

实验过程中, 对各组大鼠在所选择实验观察和记录时间点都做了记录, 从而能够横向对比。例如, 在未加苯扎氯铵的对照组中, 第4天的组织块边缘多角形内皮细胞增多, 而且逐渐融合成片生长; 而在加有0.01%苯扎氯铵的实验组中, 第4天的眼角膜内皮细胞核着色加深, 多角形细胞少见, 内皮细胞数量减少。这说明没有受到苯扎氯铵损害的眼角膜内皮细胞在含

有2%牛磺酸的环境中生长良好, 而在加有0.01%苯扎氯铵后眼角膜内皮细胞出现生长停止的现象, 提示2%牛磺酸本身对眼角膜细胞有益无害, 但对遭受0.01%苯扎氯铵损害的眼角膜内皮细胞并没能提供足够的保护。

本实验中, 另外设置有0.03%苯扎氯铵+2%牛磺酸的实验组, 在第1天未能观察到内皮细胞生长, 提示较高浓度的苯扎氯铵对眼组织的损害作用更强, 而且2%牛磺酸不能帮助受损细胞充分“解毒”, 因此这些细胞失去了正常生长能力而死亡。需要说明, 目前临床上眼药水含苯扎氯铵的质量分数为0.003%~0.03%, 今后的研究中可进一步设置更低的苯扎氯铵浓度, 以得出更加严谨的结论, 为临床应用提供理论基础。

综上, 苯扎氯铵作为眼科药物的防腐剂以低浓度形式在眼科临床上被广泛使用, 其对眼球组织可造成一定的损伤, 这种组织损伤具有使用时间和剂量的叠加效应, 并且难以用2%牛磺酸防治。因此, 在临床上应告知患者合理规范地使用眼科药物, 尽量减少苯扎氯铵对眼的伤害。

[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附属瑞金医院伦理委员会审核批准[No. R.J.(Z)2019011]。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of RuiJin Hospital, Shanghai Jiao Tong University Medical school (Approval Letter No. R. J. (Z) 2019011). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

葛健、孙静芬和吴永杰共同讨论确立议题,确定实验方法和对实验结果的分析,共同讨论研究文章的修改工作;吴永杰主要负责动物实验;葛健完成文章写作和修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 陈祖基. 眼科临床药理学[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2011. CHEN Z J. Clinical pharmacology of ophthalmology [M]. 2 ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2011.
- [2] CHENG L, CHEN L, WEI X B, et al. NOD2 promotes dopaminergic degeneration regulated by NADPH oxidase 2 in 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 1-15. DOI: 10.1186/s12974-018-1289-z.
- [3] 朱国昌. 牛磺酸药理研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2014(33):70-71. DOI:10.3969/j.issn.1671-3141.2014.33.045. ZHU G C. Progress in pharmacological research of taurine [J]. *World Latest Medicine Information*, 2014(33)70-71. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2014.33.045.
- [4] NIU X L, ZHENG S M, LIU H T, et al. Protective effects of taurine against inflammation, apoptosis, and oxidative stress in brain injury[J]. *Mol Med Report*, 2018: 4516-4522. DOI: 10.3892/mmr.2018.9465.
- [5] JAKARIA M, AZAM S, HAQUE M E, et al. Taurine and its analogs in neurological disorders: focus on therapeutic potential and molecular mechanisms[J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101223. DOI:10.1016/j.redox.2019.101223.
- [6] SEIDEL U, HUEBBE P, RIMBACH G. Taurine: a regulator of cellular redox homeostasis and skeletal muscle function[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(16): e1800569. DOI: 10.1002/mnfr.201800569.
- [7] BALIOU S, ADAMAKI M, IOANNOU P, et al. Protective role of taurine against oxidative stress (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(2):605. DOI:10.3892/mmr.2021.12242.
- [8] BKAILY G, JAZZAR A, NORMAND A, et al. Taurine and cardiac disease: state of the art and perspectives[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2020, 98(2):67-73. DOI:10.1139/cjpp-2019-0313.
- [9] WANG K, SHI Y Q, LIU W, et al. Taurine improves neuron injuries and cognitive impairment in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial activation[J]. *NeuroToxicology*, 2021, 83: 129-136. DOI: 10.1016/j. neuro. 2021.01.002.
- [10] 金玮, 杨安怀, 邢怡桥, 等. 牛磺酸体外诱导脐血干细胞分化为感光细胞生物学鉴定[J]. 眼科研究, 2008, 26(5):338-342. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2008.05.005. JIN W, YANG A H, XING Y Q, et al. Differentiation of cord blood derived mesenchymal stem cells induced by taurine into photoreceptors in vitro[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2008, 26(5):338-342. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2008.05.005.
- [11] 田甜, 张冰洋, 王楷栋, 等. 牛磺酸对百草枯诱导的帕金森病样小鼠神经元及小胶质细胞的保护作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2020(11):801-808. TIAN T, ZHANG B Y, WANG K D, et al. Protective effects of taurine on neurons and microglia in Parkinson's disease-like mouse model induced by paraquat[J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2020(11):801-808.
- [12] SIEFKEN W, CARSTENSEN S, SPRINGMANN G, et al. Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration[J]. *J Investig Dermatol*, 2003, 121(2): 354-361. DOI: 10.1046/j. 1523-1747. 2003.12366.x.
- [13] YOERUEK E, JÄGLE H, LÜKE M, et al. Safety profile of a taurine containing irrigation solution (AcriProTect) in pars Plana vitrectomy[J]. *Retina*, 2007, 27(9):1286-1291. DOI:10.1097/iae.0b013e3180592b73.
- [14] CHEN W, HU J, ZHANG Z, et al. Localization and expression of zonula occludins-1 in the rabbit corneal epithelium following exposure to benzalkonium chloride[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40893. DOI:10.1371/journal.pone.0040893.
- [15] CHEN W, LI Z, HU J, et al. Corneal alternations induced by topical application of benzalkonium chloride in rabbit[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26103. DOI: 10.1371/journal. pone. 0026103.
- [16] 胡琦, 宝玉峰, 周文艳, 等. 牛磺酸对体外培养的兔角膜基质细胞增殖的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2005, 39(4):327-330. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1905.2005.04.009. HU Q, YANG B F, ZHOU W Y, et al. Effect of taurine on the proliferation of cultured rabbit corneal keratocytes[J]. *J Harbin Med Univ*, 2005, 39(4):327-330. DOI:10.3969/j.issn.1000-1905.2005.04.009.

(收稿日期:2022-03-24 修回日期:2022-10-22)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,赵宇朋)

[引用本文]

葛健, 孙静芬, 吴永杰. 牛磺酸对苯扎氯铵损伤大鼠眼角膜内皮细胞无保护作用[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):39-43. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.034.

GE J, SUN J F, WU Y J. Taurine has no protective effect on rat corneal endothelial cells injured by benzalkonium chloride[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(1): 39-43. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817. 2022.034.



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、保存和资源共事工作, 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; 获得国家专利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。

SHJH^{hr}小鼠部分生物学特性及衰老表型的测定与分析

唐慧青¹, 常书福², 于志锋³, 张雷³, 谈小倩¹, 瞿伟¹, 李亮¹, 钱珍¹, 顾坚忠¹, 徐平¹

(1. 上海吉辉实验动物饲养有限公司, 上海 201611; 2. 复旦大学附属中山医院, 上海 200032; 3. 上海市骨科内植物重点实验室, 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011)

[摘要] **目的** 测定与分析SHJH^{hr}小鼠的部分生物学特性及衰老表型, 为该小鼠模型用于衰老机制研究、抗衰老药物研发等提供基础数据。**方法** 以对应同周龄段的ICR小鼠为对照, 测定SHJH^{hr}小鼠3~16周龄体质量生长数据、1~4胎繁育能力以及生命周期; 测定6周龄SHJH^{hr}小鼠的血常规(30项)和血清生化指标(25项); 采集8周龄SHJH^{hr}小鼠静脉血进行流式细胞分析, 测定免疫细胞含量; 利用显微CT测量4、8、26周龄SHJH^{hr}小鼠松质骨衰老骨结构与骨密度; 组织学观察8周龄小鼠骨和关节组织病理学变化。**结果** 与ICR小鼠相比, SHJH^{hr}小鼠16周龄时雌雄体质量均明显偏低($P < 0.05$), 母鼠繁育性能低下($P < 0.01$)或不具备正常的繁育性能。SHJH^{hr}小鼠的生存时间最短57周龄, 最长为71周龄, 较正常ICR小鼠短, 表现出明显的快速衰老现象; 同时, 部分血液生理生化指标、骨与软骨组织病理变化均显示SHJH^{hr}小鼠生理机能加速衰老与异常。**结论** SHJH^{hr}小鼠符合快速衰老的部分特性, 并伴有因衰老而导致的某些生理病理变化。

[关键词] 自发性快速衰老; 生物学特性; 衰老表型; SHJH^{hr}小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0044-09



Investigation on Biological Characteristics and Aging Phenotype of SHJH^{hr} Mice

TANG Huiqing¹, CHANG Shufu², YU Zhifeng³, ZHANG Lei³, TAN Xiaoqian¹, QU Wei¹, LI Liang¹, QIAN Zhen¹, GU Jianzhong¹, XU Ping¹

(1. Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co., Ltd., Shanghai 201611, China; 2. Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implant, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Correspondence to: XU Ping (ORCID: 0000-0001-6744-8908), E-mail: pingxu@jh-labanimal.com

[ABSTRACT] **Objective** To measure and analyze biological characteristics and aging phenotype of SHJH^{hr} mice and provide basic data for the application of the mouse model in aging mechanisms research and antiaging drug development. **Methods** With ICR mice of the same age as control group, the body mass

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

[第一作者] 唐慧青(1978—), 女, 兽医学士, 执业兽医师, 研究方向: 实验动物模型和实验动物疾病。E-mail: tanghuiqing@jh-labanimal.com

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

growth data of SHJH^{hr} mice at the age of 3 to 16 weeks, the reproduction ability of 1 to 4 fetuses and the life cycle of SHJH^{hr} mice were measured. Blood routine (30 items) and serum biochemical indexes (25 items) of 6-week-old SHJH^{hr} mice were measured. The venous blood of 8-week-old SHJH^{hr} mice was collected for flow cytometry analysis to determine the content of immune cells. The aging bone structure of the cancellous bone and bone mineral density of SHJH^{hr} mice aged 4, 8 and 26 weeks were measured by micro-CT. Histopathological changes of bone and joint of 8-week-old mice were observed. **Results** Compared with ICR mice, the female and male body mass of SHJH^{hr} mice were significantly lower at the age of 16 weeks ($P < 0.05$), and the reproductive performance of female mice was low ($P < 0.01$) or did not have normal reproductive capacity. The shortest survival time of SHJH^{hr} mice was 57 weeks and the longest was 71 weeks, which was shorter than those of normal ICR mice, showing obvious rapid aging phenomenon. At the same time, some physiological and biochemical indexes of blood and pathological changes of bone and cartilage tissues also showed the accelerated aging and abnormality of animal physiological functions. **Conclusion** SHJH^{hr} mice have some biological characteristics of rapid aging as well as some physiological and pathological changes caused by aging.

[Key words] Spontaneous rapid aging; Bio-characteristics; Aging phenotype; SHJH^{hr} mice

衰老是所有生命发生、发展的必然过程，是机体从构成物质、组织结构到生理功能的渐进性丧失和退化过程，可以被定义为与年龄相关的生理功能下降^[1]。衰老不同于所有人类疾病，是目前已知的最复杂的表型，也是全身性生物功能障碍的唯一例子。衰老的表型在所有器官和组织中都有表现，它影响有机体的整体生理功能，增加机体对所有主要慢性病的易感性^[2]。因此，开发能够较好模拟人类衰老的动物模型，以此研究衰老机制、研发抗衰老药物、延缓衰老，一直以来都是人类社会发展中备受关注的热点。

本课题组于2017年10月在远交群ICR小鼠的生产群中偶然发现，哺乳中的小鼠有2只雄性仔鼠存在脱毛现象，通过突变子代与亲代回交后，其后代再进行自交，成功建立了无毛小鼠繁育群体，并定名为SHJH^{hr}。在随后的群体表型观察中发现，SHJH^{hr}小鼠除脱毛-无毛的表型外，相对于ICR小鼠更加活跃，消耗饲料和翻动垫料频率更高，同时粪便及尿液产生较多，3月龄时出现典型的焦虑反应^[3]。本研究对本课题组自主培育的远交群SHJH^{hr}小鼠进行了部分生物学特性数据测定和衰老表型的观察与分析，为该突变小鼠用于衰老相关研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级远交群SHJH^{hr}小鼠和ICR小鼠，均来自上海吉辉实验动物饲养有限公司[SCXK(沪)2017-0012]，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 射线辐照(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。本研究中所有动物检测方案均经上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理委员会批准(批号：SH9H-2021-A881-SB)，所有实验操作都符合实验动物福利伦理相关要求。

1.2 体质量生长测定

随机取3周龄(21±1日龄)SHJH^{hr}离乳小鼠雌雄各30只，以同周龄ICR小鼠作对照，每隔一周称重一次，持续至16周龄。统计后计算出每个时间点的平均体质量，绘制生长曲线。

1.3 繁育能力测定

随机取8~10周龄SHJH^{hr}小鼠纯合子(*hr/hr*)雌雄各20只、杂合子(*+hr*)雌雄各10只。按照*hr/hr*雄×*+hr*雌、*+hr*雄×*hr/hr*雌和*hr/hr*雄×*hr/hr*雌进行交配，每组10对，按1雄1雌长期同居；对照组ICR小鼠10对，按1雄1雌长期同居。窝产仔数多于10只的只留10只进行哺乳，不足10只的按实际产仔数哺乳。统计1~4胎的产仔数、胎间隔和离乳成活率，并与ICR小鼠比较。

1.4 寿命统计

随机取6月龄SHJH^{hr}小鼠共计60只(雌雄各半)，每笼3只，一直饲养至死亡，统计生存时间。同时，观察小鼠外观，记录衰老表型。

1.5 血液生理生化指标测定

随机取6周龄小鼠20只(雌雄各半)，禁食16 h后

采血,全自动血液分析仪(SYSMEX XT-2000i)测定白细胞(white blood cell, WBC)、中性粒细胞(neutrophilegranulocyte, NE)、淋巴细胞(lymphocyte, LY)等血常规30项指标;全自动生化分析仪(HITACHI 7180)测定谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)、谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT)等血清生化学25项指标,并与同龄ICR小鼠作对比。

1.6 免疫细胞分析

随机取8周龄SHJH^{hr}小鼠雌雄各2只,眶后静脉丛采血,使用EDTA管抗凝4℃保存,并于1h内进行实验测定。用FACSAria III流式细胞分选仪分析SHJH^{hr}小鼠血液中的CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞,以及B220、BK1.1细胞、CD11b⁺等淋巴细胞亚群的含量,分析其免疫功能。

1.7 骨与关节退变检测

随机取4、8和26周龄SHJH^{hr}小鼠及对照组ICR小鼠各6只,用舒泰50按50 mg/kg剂量麻醉后颈椎脱臼法处死。采集小鼠胫骨组织样本,分离后放入动物用Micro-CT系统(μ CT 80, Scanco Medical AG, Switzerland)进行扫描,分辨率为10 μ m,获取胫骨平

台下1mm处微观结构形态,计算其骨密度(bone mineral density, BMD, g/cm³)和体积分数(BV/TV, %)。

1.8 骨与关节的病理学分析

随机取8周龄SHJH^{hr}小鼠及ICR小鼠各6只,用舒泰50按50 mg/kg剂量麻醉后颈椎脱臼法处死。取膝关节,多聚甲醛溶液固定后进行脱钙处理,然后行石蜡包埋切片,利用全自动染色机(Leica SV5030, German)进行HE染色,分析骨与关节的病理学变化。

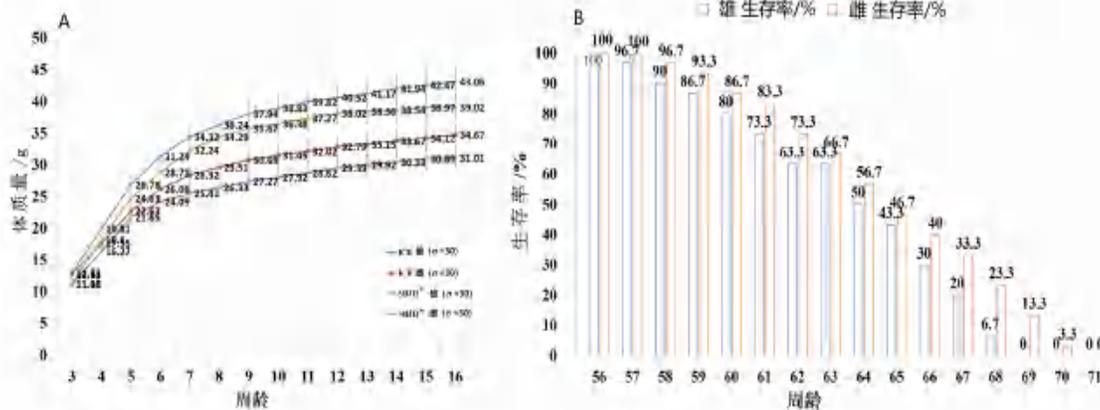
1.9 统计分析

运用EXCEL统计学软件,结果数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用t检验进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SHJH^{hr}小鼠的体质量生长情况

SHJH^{hr}小鼠3周龄时的平均离乳体质量与ICR小鼠无显著性差异,在5~6周龄时开始与ICR小鼠出现一定的差异(图1A)。16周龄时的SHJH^{hr}小鼠体质量与ICR小鼠相比,雄鼠轻10.35%,雌鼠轻11.80%,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表1)。



注: δ 为雄, η 为雌。

Note: δ male, η female.

图1 SHJH^{hr}小鼠的体质量生长曲线(A)和生存率(B)

Figure 1 Body mass growth curves (A) and survival rates (B) of SHJH^{hr} mice

2.2 SHJH^{hr}小鼠的繁育性状

记录3种交配组合SHJH^{hr}小鼠1~4胎的繁育性能(表2),并与对照组ICR小鼠比较发现,采用 hr/hr 雄 \times hr/hr 雌交配的繁殖模式,其产仔数、胎间隔、离乳成活率等均与ICR小鼠基本相同。而采用 $+hr$ 雄 \times hr/hr 雌和 hr/hr 雄 \times hr/hr 雌的繁殖模式,除第一胎外,其他

胎次的平均产仔数、胎间隔、离乳成活率均显著低于对照组ICR小鼠($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 SHJH^{hr}小鼠的寿命

统计60只SHJH^{hr}小鼠(雌雄各半)的寿命(图1B),最长存活71周(498 d),最短57周(402 d);雌鼠平均寿命为65.2周[(456.4 \pm 18.3) d],雄鼠为63.3

表1 SHJH^{hr}小鼠生长过程中的体质量变化与ICR小鼠的比较Table 1 Comparison of body mass changes between SHJH^{hr} mice and ICR mice during growth

项目 Item	SHJH ^{hr} 雄鼠 Male SHJH ^{hr}	ICR雄鼠 Male ICR	SHJH ^{hr} 雌鼠 Female SHJH ^{hr}	ICR雌鼠 Female ICR
3周龄平均离乳体质量/g Average body mass of 3 weeks old/g	11.18±1.81	12.83±1.67	11.08±1.12	12.61±1.05
6周龄平均体质量/g Average body mass of 6 weeks old /g	28.71±2.43*	31.24±2.37	24.09±1.15*	26.08±1.23
16周龄平均体质量/g Average body mass of 16 weeks old/g	39.02±2.85*	43.06±3.31	31.01±2.97*	34.67±3.08

注:与同年龄阶段ICR小鼠比较,* $P < 0.05$; $n=30$ 。

Note: Compared with ICR mice at the same stage, * $P < 0.05$; $n = 30$.

表2 SHJH^{hr}小鼠1~4胎的繁育性能Table 2 Reproductive performance of 1 to 4 fetuses of SHJH^{hr} mice

项目 Item	交配组合 Mating type	第1胎 1st born	第2胎 2nd born	第3胎 3rd born	第4胎 4th born
窝产仔数/只 Litter size, n	对照组(ICR)	15.7±2.4	17.2±1.7	16.8±2.1	15.9±1.9
	<i>hr/hr</i> ♂ × +/ <i>hr</i> ♀	16.6±1.9	16.3±2.6	15.8±1.8	16.5±2.2
	+/ <i>hr</i> ♂ × <i>hr/hr</i> ♀	14.1±2.1	10.9±1.9*	8.8±2.9*	6.1±2.7**
	<i>hr/hr</i> ♂ × <i>hr/hr</i> ♀	13.6±2.4	11.5±2.3*	8.2±3.1*	7.1±2.8**
胎间隔 Fetal interval/d	对照组(ICR)	23.4±3.2	28.3±2.7	29.7±2.7	32.2±4.2
	<i>hr/hr</i> ♂ × +/ <i>hr</i> ♀	22.9±2.8	30.2±3.1	28.5±4.2	30.9±3.8
	+/ <i>hr</i> ♂ × <i>hr/hr</i> ♀	24.5±3.6	42.6±5.7*	61.1±7.2**	82.8±35.2**
离乳成活率 Survival rate of weaning/%	<i>hr/hr</i> ♂ × <i>hr/hr</i> ♀	23.8±3.3	44.2±6.1*	68.2±12.3**	87.4±29.9**
	对照组(ICR)	93.4 (9.34/10)	96.3 (9.63/10)	96.7 (9.67/10)	94.9 (9.49/10)
	<i>hr/hr</i> ♂ × +/ <i>hr</i> ♀	94.2 (9.42/10)	95.6 (9.56/10)	94.8 (9.48/10)	95.1 (9.51/10)
	+/ <i>hr</i> ♂ × <i>hr/hr</i> ♀	52.9 (5.29/10)**	41.2 (4.12/10)**	32.1 (3.21/10)**	11.4 (1.14/10)**
	<i>hr/hr</i> ♂ × <i>hr/hr</i> ♀	51.4 (5.14/10)**	42.7 (4.27/10)**	28.2 (2.82/10)**	8.7 (0.87/10)**

注:与ICR小鼠比较,* $P < 0.05$; $n=10$ 。♂为雄,♀为雌。

Note: Compared with ICR mice, * $P < 0.05$; $n = 10$. ♂ male, ♀ female.

周 [(443.1±20.5) d], 雌性SHJH^{hr}小鼠的生存时间稍长于雄性, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 SHJH^{hr}小鼠的血液生理和生化

比较6周龄SHJH^{hr}小鼠与ICR小鼠的血液学生理指标(表3)发现, 网织红细胞(reticulocyte, RET)总数及RET百分比显著低于ICR小鼠 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其他血液学指标的差异无统计学意义。

SHJH^{hr}小鼠的血清生化指标测定结果(表4)显示, SHJH^{hr}小鼠的尿素氮(Urea)、三酰甘油(triglyceride, TG)和游离脂肪酸(nonesterified fatty acid, NEFA), 以及雌性的总胆红素(total bilirubin, TBIL), 与对照组ICR小鼠相比均有显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 其他指标的差异无统计学意义。

2.5 SHJH^{hr}小鼠的免疫细胞

流式细胞分析结果(图2)显示, SHJH^{hr}小鼠的T

细胞(CD3⁺CD4⁺)占比11.4%, 辅助性T细胞(CD3⁺CD8⁺)占比4.9%, B细胞(B220)占比8.2%, 自然杀伤细胞(NK1.1)占比16.5%。T、B和NK细胞发育正常, 数量与占比均与正常ICR小鼠基本相同。

2.6 SHJH^{hr}小鼠的骨骼退变衰老

SHJH^{hr}小鼠腰椎显微CT结果(图3A、B)表明: 在4周龄时, 雌性和雄性小鼠的BV/TV和BMD都没有明显改变; 到8周龄时, 不论是雌性还是雄性小鼠, BV/TV和BMD均出现明显下降, 其中雄性小鼠下降更为明显, 约下降50%; 6月龄时雄性小鼠的BV/TV和BMD与对照组ICR小鼠相比, 下降约60%。

组织学观察发现, 8周龄SHJH^{hr}小鼠的骨与关节均开始出现不同程度的变化(图4), 骨生长板内软骨细胞矿化, 骨生长板变薄, 关节囊局部滑膜增厚等。而同龄ICR小鼠的骨和关节均未出现异常病理改变。

表3 SHJH^{hr}小鼠(6周龄)的血液学生理指标Table 3 Hematological indexes of SHJH^{hr} mice (6 weeks old)

项目 Item	SHJH ^{hr} 雄鼠 Male SHJH ^{hr}	ICR 雄鼠 Male ICR	SHJH ^{hr} 雌鼠 Female SHJH ^{hr}	ICR 雌鼠 Female ICR
WBC/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	4.88±1.85	5.80±0.81	5.98±2.64	4.69±1.00
RBC/(10 ¹² ·L ⁻¹)	8.44±0.62	7.78±0.43	8.67±0.61	7.60±0.16
HGB ρ/(g·L ⁻¹)	139.2±6.84	125.5±10.34	147.0±8.29	122.25±1.71
HCT/%	47.64±0.85	41.43±3.20	49.06±1.62	40.33±0.83
MCV/fL	56.68±3.68	53.23±1.37	56.90±4.91	53.08±0.92
MCH m/pg	16.54±0.50	16.12±0.63	16.98±0.51	16.10±0.49
MCHC ρ/(g·L ⁻¹)	292.10±12.77	303.10±4.55	299.90±20.78	303.25±9.54
PLT/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	1 644.30±131.48	1 526.50±199.58	1 449.60±144.21	1 360.75±81.71
RDW-SD/fL	31.59±2.34	31.67±2.29	32.38±2.03	38.70±2.80
RDW-CV/%	16.86±1.32	17.90±1.72	17.71±1.67	21.51±1.03
PDW/fL	7.18±0.26	7.18±0.32	7.24±0.35	7.20±0.37
MPV/fL	6.91±0.17	7.00±0.24	6.95±0.17	7.11±0.18
P-LCR/%	5.30±0.87	5.80±1.42	5.85±0.87	6.82±0.68
PCT/%	1.14±0.11	1.07±0.11	1.01±0.10	0.97±0.06
NEUT/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	1.39±0.46	0.97±0.14	2.26±0.87	1.09±0.22
LYMPH/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	3.38±1.43	4.72±0.71	5.40±2.79	3.50±0.85
MONO/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	0.03±0.02	0.03±0.01	0.03±0.03	0.01±0.01
EO/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	0.08±0.04	0.08±0.04	0.28±0.29	0.08±0.03
BASO/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
NEUT/%	29.01±4.43	16.65±1.64	29.68±8.27	23.75±4.65
LYMPH/%	68.66±4.81	81.25±2.19	66.56±7.93	74.18±4.42
MONO/%	0.52±0.30	0.58±0.17	0.41±0.37	0.33±0.10
EO/%	1.81±0.78	1.42±0.66	3.28±2.08	1.63±0.53
BASO/%	0.00±0.00	0.10±0.10	0.07±0.04	0.13±0.15
RET/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	584.44±157.99	977.67±140.83 [*]	662.89±190.72	1 562.98±174.91 [*]
RET/%	7.05±2.28	12.57±1.73 [*]	7.78±2.62	20.59±2.59 ^{**}
LFR/%	52.63±3.37	51.48±3.75	50.66±2.35	44.86±2.94
MFR/%	16.46±1.19	15.03±2.05	15.20±1.40	14.68±0.32
HFR/%	30.91±3.37	33.50±5.41	34.14±2.78	40.45±3.11
IRF/%	47.37±3.37	48.53±3.75	49.34±2.35	55.13±2.94

注:与对应的ICR小鼠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; $n = 10$ 。WBC, 白细胞;RBC, 红细胞;HGB, 血红蛋白;HCT, 红细胞压积;MCV, 红细胞平均压积;MCH, 平均血红蛋白量;MCHC, 平均血红蛋白浓度;PLT, 血小板;RDW-SD, 红细胞分布宽度标准差;RDW-CV, 红细胞分布宽度变异系数;PDW, 血小板体积分布宽度;MPV, 平均血小板体积;P-LCR, 大型血小板比率;PCT, 血小板压积;NEUT, 中性粒细胞;LYMPH, 淋巴细胞;MONO, 单核细胞;EO, 嗜酸性细胞;BASO, 嗜碱性细胞;RET, 网织红细胞;LFR 低分化网织红细胞;MFR, 中分化网织红细胞;HFR, 高分化网织红细胞;IRF, 未成熟网织红细胞。

Note: Compared with ICR mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 10$. WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT, platelet count; RDW-SD, red cell volume distribution width-standard deviation; RDW-CV, red cell volume distribution width-variation coefficient; PDW, platelet volume distribution width; MPV, mean platelet volume; P-LCR, platelet-large cell rate; PCT, plateletcrit; NEUT, neutrophilicgranulocyte; LYMPH, lymphocyte; MONO, monocytes; EO, eosinophil; BASO, basophilic cell; RET, reticulocyte; LFR, low differentiation reticulocyte; MFR, middle differentiation reticulocyte; HFR, high differentiation reticulocyte; IRF, immature reticulocyte.

2.7 各年龄段的SHJH^{hr}小鼠外观

SHJH^{hr}小鼠成年以后, 皮肤老化速度极快(图5), 表现为脱毛、皮肤僵化褶皱明显, 表皮色泽与可视黏

膜苍白等。9~11个月龄时皮肤上出现丘疹, 甚至肉瘤, 11月龄后开始陆续死亡, 群体内最长寿命约71周龄, 远低于同等饲养条件下正常ICR小鼠的寿命。

表4 SHJH^{hr}小鼠(6周龄)的血清生化指标Table 4 Serum biochemical indexes of SHJH^{hr} mice (6 weeks old)

项目 Item	SHJH ^{hr} ♂	ICR ♂	SHJH ^{hr} ♀	ICR ♀
GPT z/(U·L ⁻¹)	42.63±7.25	34.53±7.97	40.70±9.36	35.30±4.27
GOT z/(U·L ⁻¹)	135.74±51.87	110.95±32.88	154.69±34.67	109.73±25.97
TP ρ/(g·L ⁻¹)	52.82±1.70	47.48±3.21	52.49±3.35	42.64±1.74
ALB ρ/(g·L ⁻¹)	30.30±1.00	28.20±1.85	31.60±2.30	26.21±0.82
GLOB ρ/(g·L ⁻¹)	22.53±0.97	19.29±1.38	20.89±1.93	16.44±0.95
A/G	1.34±0.05	1.46±0.02	1.52±0.15	1.59±0.05
TBIL c/(μmol·L ⁻¹)	0.98±0.33	1.07±0.40	0.47±0.18*	1.05±0.24
ALP z/(U·L ⁻¹)	188.18±36.13	199.25±50.96	217.22±48.40	191.63±23.97
GLU c/(mmol·L ⁻¹)	6.62±0.64	6.98±1.35	5.49±0.74	6.45±0.52
Urea c/(mmol·L ⁻¹)	9.38±1.57*	6.36±0.52	9.27±1.16*	6.24±0.61
Crea c/(μmol·L ⁻¹)	11.39±0.96	11.25±1.89	13.77±1.40	13.12±0.90
UA c/(μmol·L ⁻¹)	129.08±21.23	91.65±4.14	112.01±18.22	91.30±5.86
Ca c/(mmol·L ⁻¹)	2.42±0.07	2.59±0.08	2.38±0.05	2.55±0.07
P c/(mmol·L ⁻¹)	2.84±0.35	3.76±0.25	3.43±0.22	3.78±0.22
CHOL c/(mmol·L ⁻¹)	3.55±0.37	3.15±0.48	1.96±0.33	1.98±0.23
TG c/(mmol·L ⁻¹)	2.22±0.70*	1.34±0.34	1.59±0.37*	0.85±0.31
HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	2.11±0.19	2.48±0.40	1.35±0.24	1.54±0.19
LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	0.23±0.03	0.40±0.04	0.18±0.03	0.27±0.05
CK z/(U·L ⁻¹)	2 780.68±1 965.23	1 838.40±859.10	2 530.90±897.23	1 906.9±846.35
LDH z/(U·L ⁻¹)	1 063.48±155.12	811.95±208.50	930.97±132.80	610.02±177.99
K c/(mmol·L ⁻¹)	6.56±0.38	6.50±0.42	5.97±0.35	5.87±0.23
Na c/(mmol·L ⁻¹)	168.35±2.34	162.78±3.02	167.10±1.97	159.53±1.41
Cl c/(mmol·L ⁻¹)	116.08±3.16	109.47±1.14	118.26±1.72	109.52±0.87
CHE z/(U·L ⁻¹)	7 596.10±1 065.80	6 658.75±172.88	9 730.10±1 555.38	5 431.25±1 050.21
NEFA c/(mmol·L ⁻¹)	1.42±0.24*	0.94±0.15	1.11±0.16**	0.60±0.17

注:与对应性别的ICR小鼠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; $n = 10$ 。GPT,谷丙转氨酶(即ALT);GOT,谷草转氨酶(即AST);TP,总蛋白;ALB,白蛋白;GLOB,球蛋白;A/G,白蛋白球蛋白比;TBIL,总胆红素;ALP,碱性磷酸酶;GLU,葡萄糖;Urea,尿素氮;Crea,肌酐;UA,尿酸;Ca,钙;P,磷;CHOL,总胆固醇;TG,三酰甘油;HDL-C,高密度脂蛋白;LDL-C,低密度脂蛋白;CK,肌酸激酶;LDH,乳酸脱氢酶;K,钾;Na,钠;Cl,氯;CHE,血清胆碱酯酶;NEFA,游离脂肪酸。

Note: Compared with ICR mice of the same sex, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 10$. GPT, glutamic-pyruvic transaminase (also named as ALT); GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase (also named as ALT); TP, total protein; ALB, albumin; GLOB, globulin. A/G, albumin/ globulin; TBIL, total bilirubin; ALP, alkaline phosphatase; GLU, glucose; Urea, urea nitrogen; Crea, creatinine; UA, uric acid; Ca, calcium; P, phosphorus; CHOL, cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high-density lipoprotein; LDL-C, low-density lipoprotein; CK, creatine kinase; LDH, lactate dehydrogenase; K, potassium; Na, sodium; Cl, chloride; CHE, serum cholinesterase; NEFA, free fatty acid.

3 讨论

研究衰老过程中各种生理病理机制离不开衰老模型。以往使用的药物诱导、辐射诱导或基因调控等方法,都会对生命细胞产生损伤,进而造成快速衰老现象。这种衰老现象在自然衰老中一般很少出现,而且不可避免地与自然衰老存在一定的差异^[4]。自然衰老动物模型被认为是最符合人类生理性衰老特点的模型^[5],但动物自然衰老进展缓慢,饲养周期过长,费用昂贵,且老年性动物很难获得。此外,正常衰老动物的健康状况普遍较差,动物出现表型的差异大,重复性差^[6],很难应用于衰老机制研究和抗衰老药物

评价^[7]。

SHJH^{hr}小鼠是从ICR生产群中发现的一个突变小鼠,经前期观察发现,该小鼠无毛,且皮肤衰老极快,9~11个月龄时皮肤上出现丘疹,并有肉瘤和其他肿瘤发生。同时,SHJH^{hr}小鼠在成年时的体质量、繁育性状、生存时间等方面均明显低于背景鼠,符合早衰老小鼠模型的宽松标准^[8]。因此,对该小鼠进行部分生物学特性和衰老表型的测定与分析,可以为今后使用该小鼠模型进行衰老研究提供基础数据。

本研究发现,SHJH^{hr}小鼠随日龄增长,体质量与对照小鼠差异逐渐明显,16周龄时差异显著($P < 0.05$)。此外,前期观察发现SHJH^{hr}小鼠相比ICR小鼠更加活

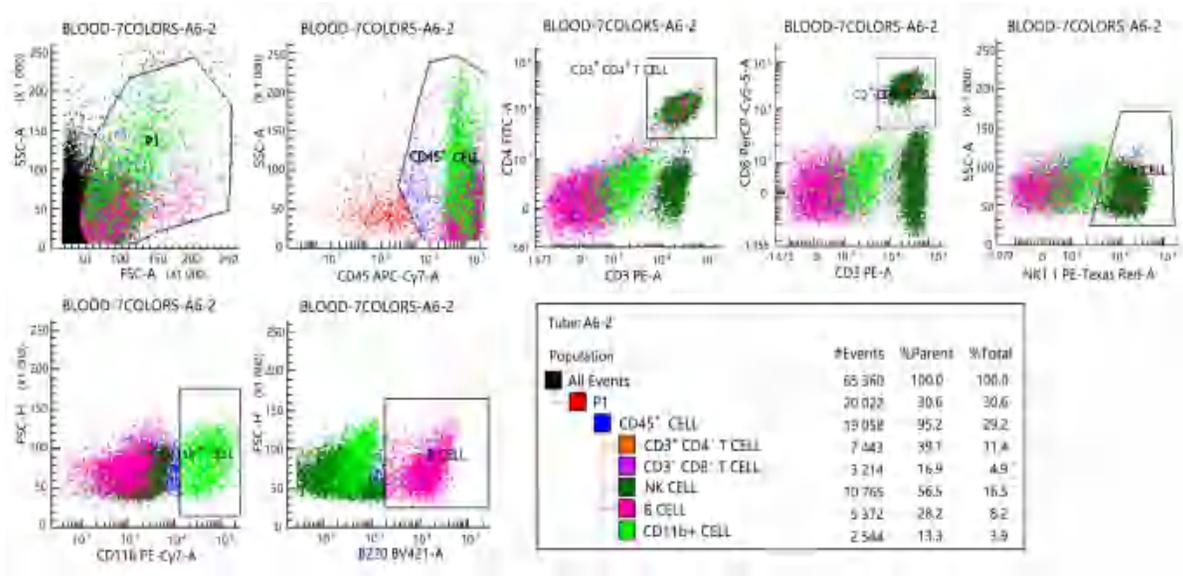
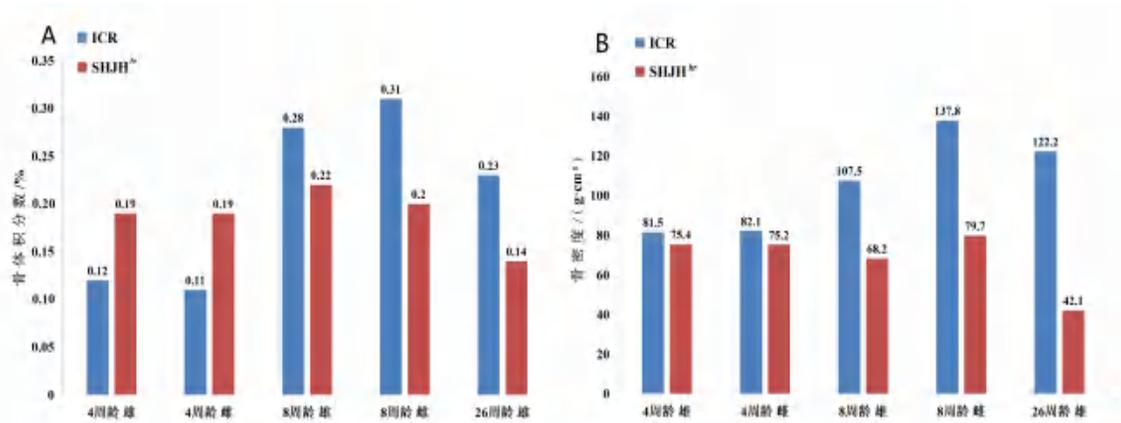


图2 SHJH^{hr}小鼠(8周龄)的淋巴细胞亚群分析
Figure 2 Analysis of lymphocyte subsets in SHJH^{hr} mice (8 weeks old)



注: A为不同年龄小鼠的骨体积分数 (BV/TV); B为不同年龄小鼠的骨密度 (BMD)。
Note: A, the bone volume fraction (BV/TV) of SHJH^{hr} mice at different ages; B, the bone mineral density (BMD) of SHJH^{hr} mice at different ages.

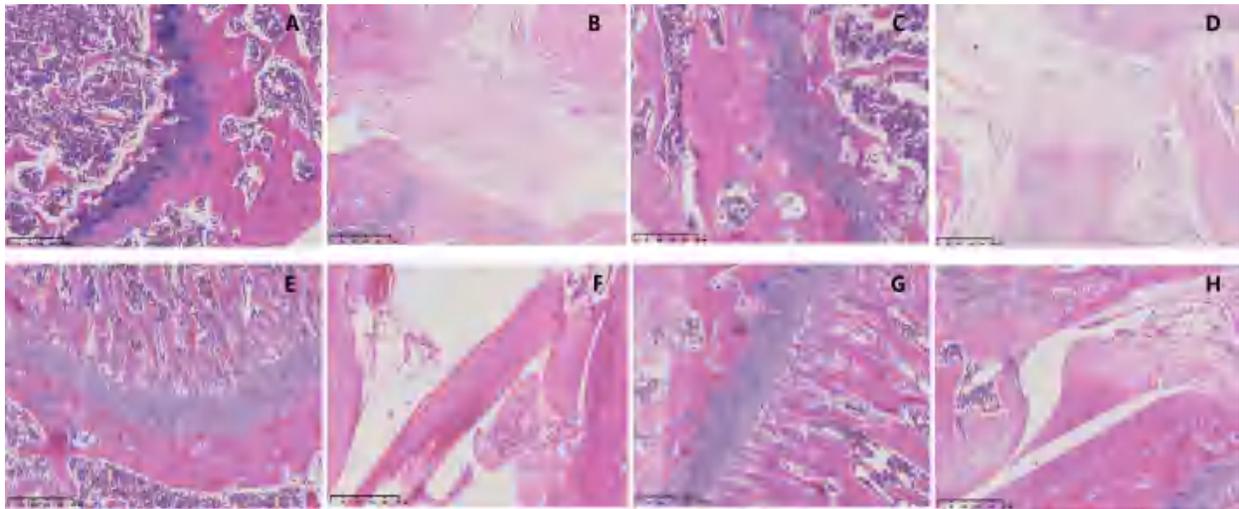
图3 不同年龄SHJH^{hr}小鼠的骨骼变化
Figure 3 Changes of bone in SHJH^{hr} mice of different ages

跃, 翻动垫料频率增加^[3], 提示SHJH^{hr}小鼠神经兴奋性较普通ICR小鼠更高, 可能存在甲状腺功能紊乱等引起的体质量减轻趋势^[9]。这与Li等^[3]报告的SHJH^{hr}小鼠9月龄时促甲状腺激素 (thyrotropin, TSH) 和甲状腺激素水平显著升高的结果相符合。

纯合子雌性SHJH^{hr}小鼠的生殖功能表现为明显早衰, 该小鼠体成熟后虽然能够繁殖且大部分能哺育第1、2胎仔鼠, 但哺育率及离乳成活率明显降低 ($P < 0.05$), 第3胎后 (6月龄不到) 不孕率增加, 哺乳性能急剧下降; 这与李洪涛等^[10]的研究结果类似。该小鼠的临床表现为生育间隔增加, 以及受孕率、产仔数和离乳成活率明显降低。

生存期初步统计显示, 雌性SHJH^{hr}小鼠的平均寿命为65.2周 [(456.4±18.3) d], 雄鼠为63.3周 [(443.1±20.5) d]; 这与施新猷等^[11]报告的730~1 095 d、Teena等报告^[12]的642~1 230 d以及Flurkey等^[13]报告的平均28个月的生存期相比, SHJH^{hr}小鼠生存期缩短近一半; 但杜春燕等^[14]报告在开放环境饲养的无毛小鼠平均寿命为(261.6±41.2) d, 则SHJH^{hr}小鼠的寿命要长出许多。这种差异可能是由于品系和饲养环境的不同引起, 尤其是与开放环境引起的外源性疾病如病原体导致死亡率增加等有关。

本研究比较6周龄SHJH^{hr}小鼠与ICR小鼠的血液生理、生化指标发现, 多数无显著性差异。相对于同年



注: A为雄性8周龄SHJH^{hr}小鼠骨生长板变薄(≤20%),骨生长板内软骨细胞矿化(21%~40%);B为雄性8周龄SHJH^{hr}小鼠关节囊局部滑膜增厚(≤20%);C为雌性8周龄SHJH^{hr}小鼠骨生长板内软骨细胞矿化(>40%);D为雌性8周龄SHJH^{hr}小鼠关节囊局部滑膜增厚(≤20%)。E和F为8周龄雄性ICR小鼠的骨与关节未见异常病理改变;G和H为8周龄雌性ICR小鼠的骨与关节未见异常病理改变。图中比例尺大小为250 μm。
 Note: A, the thinness of bone growth plate (≤20%) and the mineralization of chondrocytes in bone growth plate (21%-40%) in 8-week-old male SHJH^{hr} mice; B, local synovial thickening of joint capsule (≤20%) in 8-week-old male SHJH^{hr} mice; C, the mineralization of chondrocytes in bone growth plate (>40%) in 8-week-old female SHJH^{hr} mice; D, local synovial thickening of joint capsule (≤20%) in 8-week-old female SHJH^{hr} mice. E-F showed no abnormal pathological changes of bones and joints in 8-week-old male ICR mice; G-H showed no abnormal pathological changes of bones and joints in 8-week-old female ICR mice. The scale size is 250 μm.

图4 8周龄SHJH^{hr}小鼠(A~D)和ICR小鼠(E~H)的骨与关节病理变化(HE染色)

Figure 4 Pathological changes of bone and joint in 8-week-old SHJH^{hr} mice (A-D) and ICR mice (E-H) (HE staining)



注: A~D分别为20、280、360和400日龄小鼠。
 Note: A-D are 20, 280, 360 and 400 days old mice, respectively.

图5 不同日龄SHJH^{hr}小鼠的外观照片

Figure 5 Photos of SHJH^{hr} mice at different ages

龄段繁育正常的ICR小鼠,SHJH^{hr}小鼠的皮肤僵化褶皱明显,表皮色泽与可视黏膜苍白,这可能与RET总数及其百分比显著低于ICR小鼠相关。

本研究中流式细胞分析结果显示,8周龄SHJH^{hr}小鼠的T、B和NK细胞发育正常,免疫功能也正常。

Flurkey等^[15]、Lerner等^[16]和Miller等^[17]认为,哺乳动物在老化过程中发生的初始记忆(或激活)T淋巴细胞比率的变化,是免疫老化最常用的生物标志物之一。这种与年龄相关的T细胞亚群的转变,从T细胞进入循环免疫系统开始,成熟后继续,最终导致T细胞衰老和胸腺退化。因此,在未来研究中将测试该小鼠8周龄后的胸腺质量比及其淋巴细胞亚群的变化,以确定该小鼠免疫老化的年龄段。

本研究中骨骼衰老测定结果显示,SHJH^{hr}小鼠在8周龄(近2月龄)即出现明显的骨骼衰老表型,比文献^[18]描述的SAM小鼠更早,BV/TV和BMD的下降率更高。而正常小鼠(ICR小鼠)在56周龄(近13月龄)后才会出现。根据组织学观察结果,SHJH^{hr}小鼠可能存在钙磷吸收与代谢异常。

综上,本研究的数据测定和分析结果表明,SHJH^{hr}小鼠在生长、发育、繁殖及部分血液学指标上都显示出老化表型,并且在骨骼和生存期方面出现明显的衰老特征。Li等^[3]利用SHJH^{hr}小鼠进行甲状腺功能不全研究时发现,该小鼠表现出高代谢率、高心率和低血压,4月龄时甲状腺功能显示出较低的TSH水平,9月龄时TSH和甲状腺激素水平显著升高,提示SHJH^{hr}小鼠在心血管、代谢等方面均表现出早衰老特征。后续本课题组将继续对该小鼠的心血管、神经、

内分泌三方面进行系统性的衰老表型分析, 以期为该小鼠的推广应用提供更多基础数据。

[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交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理委员会的审查批准 (No. SH9H-2021-A881-SB)。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 the Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. SH9H-2021-A881-SB). All experiments were carried out in accordance with China's laws and regulations on experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

唐慧青: 收集资料并负责数据分析及论文撰写;

常书福: 收集资料并负责心血管衰老相关表型分析;

于志峰: 收集资料并负责骨与关节衰老相关表型的实验与分析;

张 雷: 收集资料并负责骨与关节衰老相关表型的实验设计与分析;

谈小倩: 负责血液生理生化实验;

瞿 伟: 负责动物繁育能力测定;

李 亮: 负责动物体质量生长测定;

钱 珍: 负责动物生存率测定;

顾坚忠: 负责免疫细胞分析;

徐 平: 负责课题实验设计以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] AUSTAD S N. Diverse aging rates in metazoans: targets for functional genomics[J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(1):43-49. DOI:10.1016/j.mad.2004.09.022.
- [2] MARTIN G M. Genetic modulation of senescent phenotypes in *Homo sapiens*[J]. *Cell*, 2005, 120(4):523-532. DOI:10.1016/j.cell.2005.01.031.
- [3] LI Y C, GAO J F, GUAN Y L, et al. Novel rhino-like SHJH^{hr} mice with thyroid dysfunction[J]. *Zoological Research*, 2021, 42(6):734-738. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.211
- [4] LEE Y T, LIN H Y, CHAN Y W F, et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1):12. DOI:10.1186/s12944-016-0402-5.
- [5] TAKEDA T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(4):639-659. DOI:10.1007/s11064-009-9922-y.
- [6] YUAN R, TSAIH S W, PETKOVA S B, et al. Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF₁ levels[J]. *Aging Cell*, 2009, 8(3):277-287. DOI:10.1111/j.1474-9726.2009.00478.x.
- [7] MORITA D, HIGUCHI Y, MAKIDA K, et al. Effects of ultraviolet irradiation with a LED device on bone metabolism associated with vitamin D deficiency in senescence-accelerated mouse

P6[J]. *Heliyon*, 2020, 6(2): e03499. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e03499.

- [8] HASTY P, VIJG J. Accelerating aging by mouse reverse genetics: a rational approach to understanding longevity[J]. *Aging Cell*, 2004, 3(2):55-65. DOI: 10.1111/j.1474-9728.2004.00082.x.
- [9] TAYLOR P N, ALBRECHT D, SCHOLZ A, et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(5):301-316. DOI: 10.1038/nrendo.2018.18.
- [10] 李洪涛, 杜春燕, 王纯耀, 等. 豫医无毛小鼠生殖及乳腺功能观察 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2003, 38(2):198-199. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2003.02.020.
- LI H T, DU C Y, WANG C Y, et al. Study on procreation and mammary gland of Yuyi hairless mice[J]. *J Henan Med Univ (Med Sci)*, 2003, 38(2):198-199. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2003.02.020.
- [11] 施新猷, 王四旺, 顾为望, 等. 比较医学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2003.
- SHI X, WANG S, GU W, et al. *Comparative medicine*[M]. Xi'an: Shaanxi Science And Technology Press, 2003.
- [12] GOODRICK C L. Body weight increment and length of life: the effect of genetic constitution and dietary protein[J]. *J Gerontol*, 1978, 33(2):184-190. DOI:10.1093/geronj/33.2.184.
- [13] FLURKEY K, MCURRER J, HARRISON D. Mouse models in aging research[M]//The mouse in biomedical research. Amsterdam: Elsevier, 2007: 637-672. DOI: 10.1016/b978-012369454-6/50074-1.
- [14] 杜春燕, 李洪涛, 章金涛, 等. 豫医无毛小鼠寿命观察[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2003, 38(2):196-198. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2003.02.019.
- DU C Y, LI H T, ZHANG J T, et al. Investigation on life span of Yuyi hairless mice[J]. *J Henan Med Univ (Med Sci)*, 2003, 38(2):196-198. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2003.02.019.
- [15] FLURKEY K, STADECKER M, MILLER R A. Memory T lymphocyte hyporesponsiveness to non-cognate stimuli: a key factor in age-related immunodeficiency[J]. *Eur J Immunol*, 1992, 22(4):931-935. DOI:10.1002/eji.1830220408.
- [16] LERNER A, YAMADA T, MILLER R A. Pgp-1hi T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to concanavalin A[J]. *Eur J Immunol*, 1989, 19(6):977-982. DOI: 10.1002/eji.1830190604.
- [17] MILLER R A. Immune system [M]. //MASORO E J. Handbook of physiology, New York: Oxford University Press, 1995: 555-590.
- [18] KIM Y H, PARK M, CHO K A, et al. Tonsil-derived mesenchymal stem cells promote bone mineralization and reduce marrow and visceral adiposity in a mouse model of senile osteoporosis[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(15):1161-1171. DOI:10.1089/scd.2016.0063.

(收稿日期:2022-05-23 修回日期:2022-09-21)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,周烁)

[引用本文]

唐慧青, 常书福, 于志峰, 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.

SPF级雄性SD大鼠回肠与结肠菌群结构比较分析

许琴¹, 倪艳^{1,2}, 是文辉¹, 李建璞¹, 刘江伟¹, 赵红琼², 徐新明³

(1. 新疆军区总医院, 新疆特殊环境医学重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052; 3. 新疆畜牧科学院生物技术研究所, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的** 使用高通量测序技术分析 SPF 级雄性 SD 大鼠回肠与结肠菌群结构与丰度。**方法** 收集 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠的回肠及结肠腔内容物, 提取内容物中细菌总 DNA 并进行 PCR 扩增。使用 Illumina NovaSeq 测序平台对样本中细菌 16S rRNA 的 V3-V4 区进行测序。然后基于有效数据在门、属水平上分析肠道菌群的物种结构和丰度, 采用 QIIME 软件 (扩增子) 分析工具分析回肠和结肠菌群的多样性及差异, 同时应用 Tax4Fun 程序预测回肠及结肠菌群的优势基因富集通路。**结果** 在门水平上, 雄性 SD 大鼠回肠内微生物优势菌群主要是厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria), 占比超过 98%; 结肠内微生物优势菌群主要是厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 占比超过 95%。在属水平上, 回肠以乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和另枝菌属 (*Alistipes*) 为主要优势菌群, 结肠以乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 及罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*) 为优势菌群。在菌群多样性方面, 结肠菌群的 α 多样性包括丰富度指数 (Chao1 指数) 及多样性指数 (香农指数 Shannon index) 都显著高于回肠 ($P < 0.01$), 其菌群物种的组成结构差异性比回肠小; 回肠菌群结构差异性显著的主要是厚壁菌门 (Firmicutes)、罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*) 和消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae), 而结肠菌群结构差异性显著的是拟杆菌门 (Bacteroidetes)、拟杆菌纲 (Bacteroidia) 和拟杆菌目 (Bacteroidales)。在菌群功能方面, 回肠菌群优势基因显著富集于类脂物代谢、多酮代谢、膜运输、生物降解等通路, 而结肠菌群优势基因显著富集于甘聚糖生物合成代谢、能量代谢、辅助因子和维生素及其他产物的生物合成等通路。**结论** SPF 级雄性 SD 大鼠回肠与结肠菌群在结构与丰度上存在显著差异, 结肠菌群的丰富度及多样性高于回肠。

[关键词] 肠道菌群; 菌群丰度; 回肠; 结肠; SD 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0053-08



Analysis on Ileum and Colon Microflora of SPF Male SD Rats based on High-throughput Sequencing

XU Qin¹, NI Yan^{1,2}, SHI Wenhui¹, LI Jianying¹, LIU Jiangwei¹, ZHAO Hongqiong², XU Xinming³

(1. General Hospital of Xinjiang Military Districts, Key Laboratory of Special Environmental Medicines of Xinjiang, Urumqi 830000, China; 2. Veterinary Medicine College of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 3. Biotechnology Research Institute of Xinjiang Animal Husbandry Sciences Academy, Urumqi 830000, China)

Correspondence to: XU Xinming (ORCID: 000-0002-7247-2774), E-mail: xuxinmingcool@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the microflora structure and abundance of ileum and colon of SPF male SD rats by high-throughput sequencing technique. **Methods** The ileal and colonic lumen contents of 30 SPF male SD rats were collected, the total bacterial DNA in the contents was extracted and amplified by PCR. The V3-V4 region of bacterial 16S rRNA in the samples was sequenced using Illumina NovaSeq sequencing platform. Then the species structure and abundance of the intestinal flora were analyzed at the phylum and genus level based on validated data. The diversity and differences between ileal and colonic flora were analyzed using the QIIME software (amplicon) analysis tool. The Tax4Fun program was applied to predict the dominant gene enrichment pathways of ileal and colonic flora. **Results** At the phylum level,

[基金项目] 全军实验动物专项科研课题“高原缺氧寒冷应激环境功能性肠病动物模型制作及干预”(SYDW[2018]10)

[第一作者] 许琴 (1974—), 女, 博士, 研究方向: 人类疾病动物模型制作及特殊环境医学病理生理学。E-mail: xuqin740831@163.com;

倪艳 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 基础兽医学。E-mail: 2460548072@qq.com

[通信作者] 徐新明 (1973—), 男, 副研究员, 研究方向: 动物遗传育种, 动物科学生物技术研究。E-mail: xuxinmingcool@163.com。ORCID: 000-0002-7247-2774

the dominant microflora in the ileum of male SD rats were Firmicutes and Actinobacteria, accounting for more than 98%. The dominant colonic microbial community were mainly Firmicutes and Bacteroidetes, accounting for more than 95%. At the genus level, *Lactobacillus* and *Alistipes* were the predominant bacteria in the ileum. The colon was dominated by *Lactobacillus* and *Romboutsia*. In terms of flora diversity, the alpha diversity of colonic flora including richness index (Chao1 index) and diversity index (Shannon index) were significantly higher than those of ileum ($P < 0.01$), and the structural variability of the composition of its flora species was smaller than that of ileum; the ileal flora with significant structural variability were mainly of the phylum Firmicutes, *Romboutsia*, Peptostreptococcaceae, while the colonic flora had significant structural differences in Bacteroidales. In terms of flora function, the ileal flora dominant genes were significantly enriched in lipid-like metabolism, polyketide metabolism, membrane transport, biodegradation and other pathways, while the colonic flora dominant genes were significantly enriched in glycan biosynthesis metabolism, energy metabolism, biosynthesis of cofactor and vitamins and other products, and other pathways. **Conclusion** There are significant differences in structure and abundance between the ileal and colonic flora of SPF male SD rats, and the abundance and diversity of colonic flora are higher than those of ileal flora.

[Key words] Intestinal microflora; Bacteria abundance; Ileum; Colon; SD rats

早在两千多年前，西方现代医学之父希波克拉底就提出“所有疾病都始于肠道”这一医学观点。我国自古就有“粪毒入血，百病蜂起”的中医论证。肠道微生物数量可达 10^{14} 个，占体内微生物数量的 $2/3$ ，所拥有的基因数约为人类基因数的100倍，被称为人的第二基因组^[1]。健康人体内菌群种类大约有3 500多种^[2-3]。不仅如此，肠道还是最大的免疫器官，肠组织中存在大量的淋巴细胞及免疫因子，机体70%的免疫细胞分布在肠道，且肠道微生物能促进肠道免疫发育，促进肠黏膜细胞分泌免疫球蛋白A (immunoglobulin A, IgA)^[4]。Bazin等^[5]研究发现，无菌小鼠的肠道在无菌状态下，脾脏内B细胞的分化水平低且亲和力弱，成熟的生发中心比普通小鼠的少且小。William等^[6]发现，无菌条件下饲养的小鼠的肠道定植菌不能使IgA水平恢复，且抗原递呈细胞数目很少。Wilmore等^[7]认为，“肠是外科应激的中心器官”。还有研究者认为，胃肠道是多器官功能障碍综合征的“发动机”，肠道菌群与代谢和各器官的功能有着直接或间接的关系^[8]。Klingensmish等^[9]甚至认为，肠道菌群是“器官中的器官”。

众所周知，肠道菌群失稳态是炎症肝病及各种功能性胃肠病的直接诱因^[10]。肠道菌群不仅与多种慢性病如高血压、糖尿病、肥胖、抑郁、帕金森病、阿尔茨海默病以及肿瘤的发病息息相关^[11-16]，还与许多自身免疫性疾病有关^[17]。因此，本研究对正常大鼠回肠和结肠的微生物组成进行检测分析，以期对胃肠病相关大鼠模型的构建和肠道菌群的研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠30只，体质量180~220 g，6~8周龄，购自新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2018-0001]，采用⁶⁰Co辐射灭菌实验饲料(江苏省协同生物工程有限责任公司生产)及灭菌玉米芯垫料(北京科澳协力饲料有限公司生产)饲养于中国人民解放军新疆军区总医院实验动物屏障设施[SYXK(军)2017-0050]中。大鼠购入后于屏障系统IVC设施内饲养，环境温度20~24℃，相对湿度40%~70%，12 h/12 h昼夜光照。适应性饲养5 d后开始实验。动物实验经新疆军区总医院实验动物福利伦理审查委员会批准(批号DWLL20190729)。

1.2 回肠及结肠内容物的收集

以0.2 mL/100 g体质量的剂量腹腔注射3%戊巴比妥钠，深度麻醉大鼠后，以腹中线开腹暴露大鼠消化道；在距离大鼠回盲端15 cm处，取5 cm回肠，分别向上、向下汇集内容物于2 cm回肠空间，剪去多余回肠组织；将汇集的回肠内容物及部分肠黏膜组织置于1.8 mL Corning冻存管内，对应大鼠编号标记为ZH1~ZH30，直接置于液氮内冻存。同样，在盲肠的结肠端，取5 cm结肠，同回肠内容物的汇集方法，将结肠内容物及部分肠黏膜组织收集于1.8 mL Corning冻存管内，标记为ZJ1~ZJ30，直接液氮冻存。

1.3 DNA提取及PCR扩增

取液氮冻存回肠及结肠内容物，复温后使用粪便

菌群提取试剂盒, 采用 CTAB/SDS 法提取样本 DNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度后, 用无菌水将 DNA 稀释至 1 ng/ μ L, 作为扩增模板, 上样行 PCR (Bio-rad 100 梯度 PCR 仪)。16S rRNA V3-V4 区的 PCR 扩增引物为 341F(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和 806R(5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')。DNA 聚合酶缓冲液预混液为 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (美国 New England Biolabs 公司)。PCR 反应体系为 30 μ L, 包含细菌 DNA 模板 (1 ng/ μ L) 10 μ L、正反向引物各 1.5 μ L、2 \times 反应缓冲液 15 μ L、超纯水 2 μ L。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 30 个循环包括 (98 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s); 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 维持。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, -8 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 PCR 产物的纯化

来自 30 只 SD 大鼠回肠或结肠菌群样本的 PCR 产物等浓度混合, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 使用 GeneJET 胶回收试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司产品) 回收 400 ~ 450 bp 的目标条带, 纯化产物。

1.5 文库构建和上机测序

使用美国 Illumina 公司的 TruSeq DNA PCR Preparation Kit 构建文库, 文库经 Qubit 定量并检测合格后, 使用 NovaSeq 6000 高通量测序平台测序。测序由天津诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.6 数据处理

针对测序结果, 首先过滤去除干扰信息, 得到有效数据。过滤方法: (1) 过滤掉 reads 中的接头序列和 barcode 序列; (2) 用 Flash 软件将有 overlap 的 reads 对进行拼接^[18]; (3) 使用 QIIME 软件过滤掉含 N 较多或含低质量碱基较多的序列^[19]; (4) 过滤掉拼接序列中的嵌合体序列。然后基于有效数据进行操作分类单元 (operation taxonomic units, OTU) 聚类, 在门、属水平上进行物种丰度分析。并采用 QIIME 软件 (扩增子) 分析工具对回肠和结肠菌群进行 Alpha 和 Beta 多样性分析, 同时应用 LEfSe (LDA Effect Size) 分析软件得到线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 评分。最后, 应用 Tax4Fun 程序预测回肠及结肠菌群的优势基因富集通路, 以预测菌群功能。

2 结果

2.1 大鼠回肠、结肠微生物分布情况

2.1.1 基于 OTU 的韦恩图分析

经上机测序及数据处理, 60 个样品共得到 26 403

条有效数据。以 97% 的一致性进行 OTU 聚类后, 共得到 799 个 OTU, 其中回肠独有 375 个 OTU, 结肠独有 347 个 OTU。根据聚类得到的 OTUs 结果, 绘制韦恩图, 详见图 1A。

2.1.2 大鼠回肠、结肠菌群在门水平上的相对丰度

在门水平上的比较发现, 回肠内微生物以厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 为主要优势菌群, 占比超过 98%, 其中 Firmicutes 占比最高。结肠微生物以厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 为主要优势菌群, 占比超过 95%, 其中 Firmicutes 占比最高; 同时还包含软壁菌门 (Tenericutes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia), 但含量较少。回肠和结肠的相同点是 Firmicutes 占比都居各自菌群中最高, 不同点是结肠的菌群丰度显著高于回肠。根据结果绘制成柱形图, 见图 1B。

2.1.3 大鼠回肠、结肠菌群在属水平上的相对丰度

在属水平上比较发现, 回肠以乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和另枝菌属 (*Alistipes*) 为主要优势菌群, 还包含罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*) 和不明瘤胃球菌属 (*Unidentified Ruminococcus*) 等。结肠以乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 及罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*) 为优势菌群, 其次还包含不明梭状芽孢菌属 (*Unidentified Clostridiales*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 等。根据得到的数据绘制成扇形图, 见图 1C。

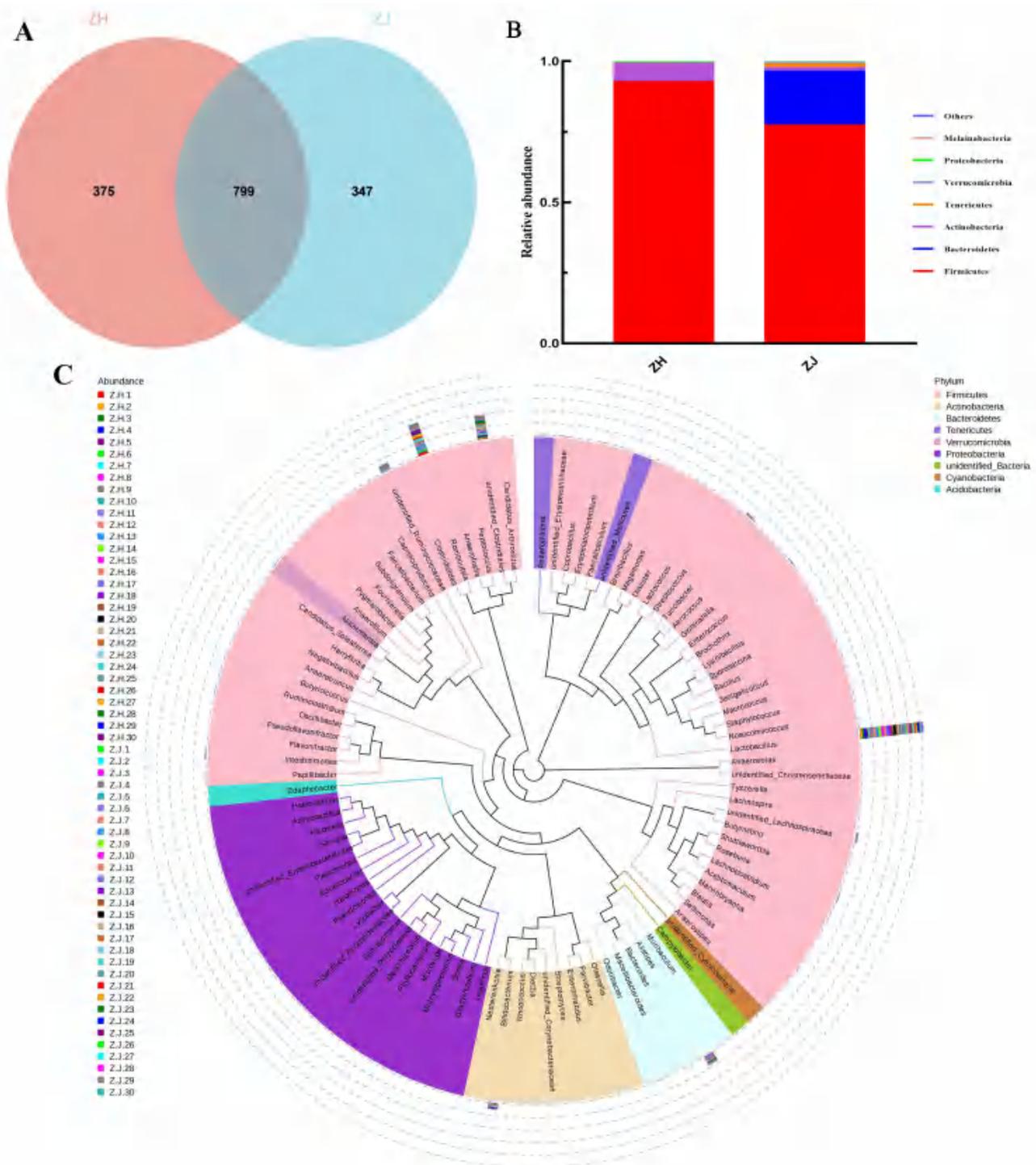
2.2 回肠与结肠菌群多样性

2.2.1 α 多样性指数

对 Illumina NovaSeq 测序得到的 26 403 条有效数据, 在 97% 一致性阈值下测得 α 多样性分析指数。回肠、结肠测得覆盖度 (coverage) 均高于 0.99, 表明样品中未被检测的序列概率较低。其中结肠 Chao1 指数 (Chao1 index)、香农指数 (Shannon index) 高于回肠, 前者说明结肠菌群丰富度高于回肠, 后者说明结肠菌群多样性高于回肠。详见表 1。

2.2.2 β 多样性

通过主坐标分析 (principal co-ordinates analysis) 来研究回肠与结肠菌群的多样性^[20], 结果如图 2A 所示。回肠样本与结肠样本相对集中分布于相应的象限内, 回肠样本分布相对比较均匀, 而结肠样本分布相对集中, 说明结肠样本中菌群物种的组成结构差异性小。



注：A，韦恩图，图中粉色圆圈代表结肠（ZJ）独有 OTU 个数，蓝色圆圈代表回肠（ZH）独有 OTU 个数，重叠部分代表回肠、结肠共有的 OTUs 个数；B，门水平的物种相对丰度柱形图；C，属水平物种系统发生关系图。

Note:A, Venn graph, in which, the pink circle represents the number of operation taxonomic units (OTU) unique to colon (ZJ), the blue circle represents the number of OTUs unique to ileum (ZH), and the overlap part represents the number of OTUs shared by ileum and colon; B, Histogram of relative species abundance at phylum level; C, Phylogenetic graph of genus level species.

图1 大鼠回肠、结肠菌群基于OTUs的门、属水平分类

Figure 1 Classification of phylum and genus of ileum and colon microflora in rats based on operation taxonomic units

2.2.3 多样性差异

LDA 评分体现了回肠、结肠菌群丰度显著差异的

主要菌群，回肠组主要表现在厚壁菌门（Firmicutes）、罗姆布茨菌属（*Romboutsia*）和消化链球菌科

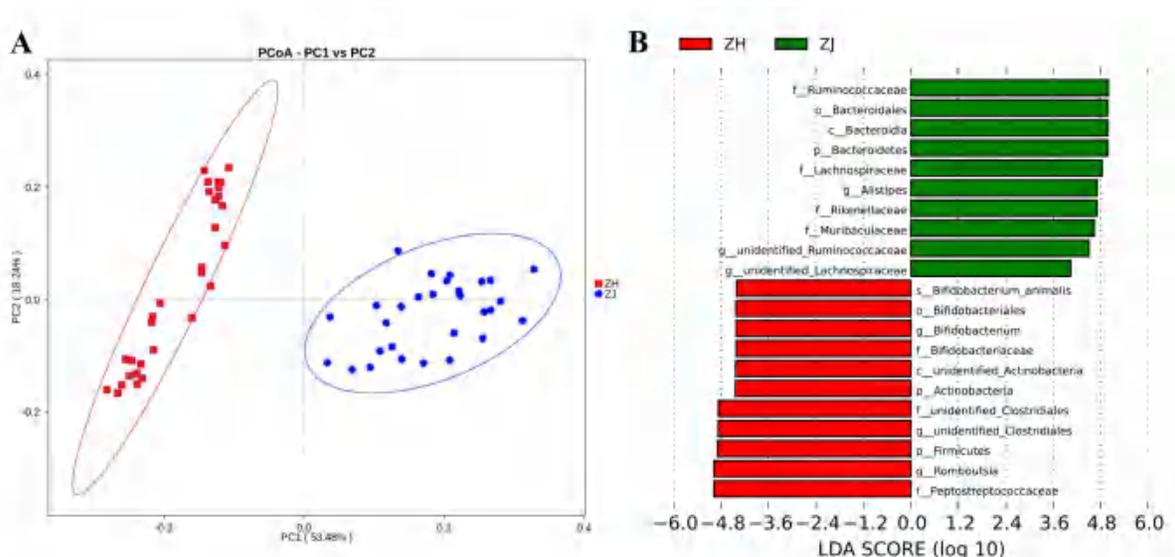
(Peptostreptococaceae) 群落结构差异性显著; 结肠组主要表现在拟杆菌门 (Bacteroidetes)、拟杆菌纲

(Bacteroidia) 和拟杆菌目 (Bacteroidales) 群落结构差异性显著。详见图2B。

表1 大鼠回肠与结肠菌群的 α 多样性指数统计

Table1 Alpha diversity indices statistics of microflora in ileum and colon of rats

样品名称	观察数	OTU数	香农指数	辛普森指数	Chao1指数	测序深度
Sample name	Observed number	OTU number	Shannon index	Simpson index	Chao1 index	Goods_Coverage
回肠 (ZH)	7 969	1 174	2.49	0.950	337.61	0.998
结肠 (ZJ)	18 434	1 146	5.90	0.661	671.08	0.998



注: A, 基于Weighted Unifrac距离的主坐标分析 (PCoA), 横坐标表示一个主成分 (PC1), 纵坐标表示另一个主成分 (PC2), 百分比表示主成分对样本差异的贡献值。B, 线性判别分析 (LDA) 值分布图。ZJ, 结肠; ZH, 回肠。

Note: A, the principal co-ordinates analysis (PCoA) based on the weighted unifrac distance. The abscissa represents one principal component (PC1), the ordinate represents another principal component (PC2), and the percentage represents the contribution value of principal component to sample difference. B, the linear discriminant analysis (LDA) value distribution. ZJ, colon; ZH, ileum.

图2 大鼠回肠、结肠菌群多样性分析

Figure 2 Diversity analysis of microflora in ileum and colon of rats

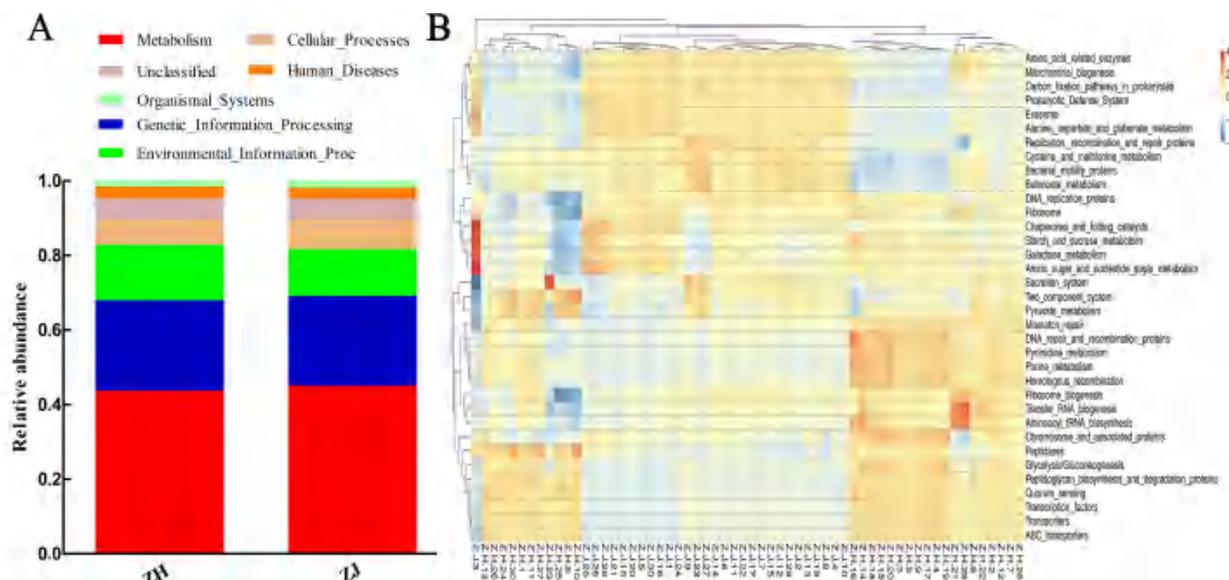
2.3 回肠、结肠菌群功能预测

根据回肠、结肠菌群的16S Silva数据库注释结果, 生成功能相对丰度柱状堆积图 (图3A)。由图可见回肠、结肠富集通路主要表现在新陈代谢、遗传信息加工、环境信息处理及细胞转化。

根据回肠、结肠菌群在数据库中的功能注释及丰度信息绘制热图, 并从功能差异层面进行聚类分析 (图3B)。结果显示: 在回肠样本中, 优势基因在类脂代谢、多酮代谢、膜运输、生物降解等通路显著富集, 还在传染病通路上显示出一定的丰度; 在结肠样本中, 优势基因在甘聚糖生物合成代谢、能量代谢、辅助因子和维生素及其他产物的生物合成等通路显著富集。

3 讨论

随着高通量测序技术的发展, 肠道菌群相关研究已成为国内外医学研究的热点。生物学家 Seth Bordenstein 曾提出, 改变肠道微生物组以治疗疾病确实具有巨大的潜力, 但科学家必须先明确健康肠道微生物的菌群结构^[21]。检测肠道微生物的方法有: 细菌培养、PCR技术、分子探针技术及基因芯片技术、宏基因组测序技术^[22]。本研究利用宏基因组二代测序技术, 对SPF级雄性SD大鼠的回肠及结肠菌群进行了检测。实验采用无菌手术方法获得大鼠的回肠和结肠内容物, 不仅检测了肠腔菌群, 并对黏膜定植菌群进行了分析, 使检测结果更全面。



注：A，Tax4Fun功能注释相对丰度柱形图；B，基于Tax4Fun的功能注释聚类热图。

Note:A, Tax4Fun relative abundance histogram of function annotation; B, clustering heat map of function annotation based on Tax4Fun.

图3 大鼠回肠、结肠菌群功能预测图

Figure 3 Functional prediction charts of microflora in ileum and colon of rats

机体肠道不同部位的定植菌群不同，数量也不同。正常生理状态下，大肠更靠近消化道末端，比小肠适宜微生物生长，细菌数量更多且种类更丰富，可达300多种^[23-25]。本实验再次证实这一经典理论，通过分析回肠、结肠的菌群多样性，结肠内菌群多样性及丰度显著高于回肠。聚类分析显示，回肠、结肠菌群在门水平主要分属9个门，分别是厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、软壁菌门（Tenericutes）、放线菌门（Actinobacteria）、疣微菌门（Verrucomicrobia）、酸杆菌门（Acidobacteria）、蓝藻菌门（Cyanobacteria）、变形菌门（Protrubacteria）及黑色素杆菌门（Melainabacteria）。其中，回肠主要分布在厚壁菌门（Firmicutes）和放线菌门（Actinobacteria）；而结肠的门水平分布较广，包括厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、软壁菌门（Tenericutes）、放线菌门（Actinobacteria）和疣微菌门（Verrucomicrobia）。在属水平上，回肠菌群以乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）和另枝菌属（*Alistipes*）为主要优势菌群，还包含罗姆布茨菌属（*Romboutsia*）和不明瘤胃球菌属（*Unidentified Ruminococcus*）等；结肠以乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）及罗姆布茨菌属（*Romboutsia*）为优势菌群，其次还包含不明梭状芽孢菌属（*Unidentified Clostridiales*）、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）等。其中，回肠与结肠中乳酸杆菌

属占比较高，显示乳酸杆菌在肠段中分布较广，乳酸杆菌的作用也尤为突出。

肠道菌群还受物种、年龄、饮食、地域、药物等因素的影响^[26-27]。黄树武等^[28]研究发现大鼠与小鼠肠道菌群存在差异，而且发现Wistar大鼠体内未检测到放线菌门。然而本研究发现SD大鼠肠道内存在放线菌门，说明肠道菌群的差异性与品种品系存在相关性。简平等^[29]发现，金丝猴随着年龄增长，其肠道优势菌群显著减少，金丝猴肠道各菌群的数量在不同年龄段有较大差异。近期国外有相关研究表明，地中海饮食习惯可降低患非传染病的风险，推测不同的肠道菌群结构和代谢方式可能是潜在的作用机制^[30]。王保守等^[31]研究不同海拔地区牦牛的肠道菌群结构差异时发现，高海拔地区牦牛瘤胃球菌丰度显著低于低海拔地区牦牛。

已有研究表明处于高原低氧环境更易患胃肠功能障碍性疾病。高原低氧环境所致的胃肠功能障碍是最先发生的，可能诱发其他各种不良适应性反应。肠道微生物群被认为是保护肠道免受病原体侵害和维持肠道黏膜屏障完整性的关键部分。但目前肠道微生物对高原低氧环境下胃肠功能障碍性疾病的致病机制尚未阐释清楚。本研究组致力于高原高寒环境条件下功能性肠病动物模型的制作及干预，研究对象为特殊年龄段特殊人群，且均为男性。为了避免雌激素的干扰，

同时更接近实际应用对象,本研究将SPF级雄性大鼠作为实验对象,对其回肠及结肠菌群结构进行了比较,为深入分析高原功能性肠病动物模型提供了研究依据。

本研究通过Tax4Fun功能预测发现,大鼠回肠、结肠菌群富集通路主要表现在新陈代谢、遗传信息加工、环境信息处理及细胞转化等方面。大鼠回肠菌群优势基因在类脂物代谢、多酮代谢、膜运输、生物降解等通路显著富集,在传染病通路也显示出一定的丰度。大鼠结肠菌群优势基因在甘聚糖生物合成代谢、能量代谢、辅助因子和维生素及其他产物的生物合成等通路显著富集。因此,笔者推测炎症性肠病患者肠道菌群的研究重点除结肠菌群外,还应包括回肠菌群。而对于肠道菌群与慢性代谢性疾病以及与下丘脑-肠-微生物轴信号通路相互作用等方面的研究,侧重点应放在结肠菌群。

综上所述,本实验通过对大鼠回肠菌群和结肠菌群的检测分析,发现结肠和回肠在菌群的多样性及丰富度上存在显著差异。结肠菌群的多样性指数和丰度指数都显著高于回肠菌群,这可能和两者不同的生理结构、不同的生理生化环境以及肠道微生物的不同定殖性能相关。本研究为肠道菌群与相关疾病作用机制的研究提供了参考依据。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究中所有动物实验均经新疆军区总医院实验动物福利与伦理审查委员会批准(批号DWLL20190729)。所有实验过程均遵循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 the Experimental Animal Welfare and Ethics Review Committee of Xinjiang Military Command General Hospital (Approval Letter No. DWLL20190729), and all experimental protocols were carried out in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

许琴:提供资金支持,采集样本,撰写初步文章,对文章进行加工修改;

倪艳:分析数据,撰写初步文章,对文章进行加工修改;

徐新明:提供资金支持,采集样本;

刘江伟:提供资金支持,分析数据;

赵红琼:对文章进行加工修改;

是文辉:采集样本,分析数据;

李建瑛:采集样本,分析数据。

[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] PALAU-RODRIGUEZ M, TULIPANI S, ISABEL QUEIPO-ORTUÑO M, et al. Metabolomic insights into the intricate gut microbial-host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6:1151. DOI:10.3389/fmicb.2015.01151.
- [2] GILL T, ASQUITH M, ROSENBAUM J T, et al. The intestinal microbiome in spondyloarthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2015, 27(4):319-325. DOI:10.1097/BOR.0000000000000187.
- [3] SCHAEVERBEKE T, TRUCHETET M E, RICHEZ C. Gut metagenome and spondyloarthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(4):349-352. DOI:10.1016/j.jbspin.2013.02.005.
- [4] 赵杰,朱维铭,李宁. 益生菌、益生元、合生元与炎症性肠病[J]. *肠外与肠内营养*, 2014, 21(4):251-253, 256. DOI:10.16151/j.1007-810x.2014.04.014.
ZHAO J, ZHU W M, LI N. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and inflammatory bowel disease[J]. *Parenter Enteral Nutr*, 2014, 21(4):251-253, 256. DOI:10.16151/j.1007-810x.2014.04.014.
- [5] CRABBÉ P A, BAZIN H, EYSSEN H, et al. The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ-free intestinal tract[J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1968, 34(4): 362-375. DOI: 10.1159/000230130.
- [6] WILLIAMS A M, PROBERT C S J, STEPANKOVA R, et al. Effects of microflora on the neonatal development of gut mucosal T cells and myeloid cells in the mouse[J]. *Immunology*, 2006, 119(4): 470-478. DOI: 10.1111/j. 1365-2567.2006.02458.x.
- [7] WILMORE D W, ROBINSON M K. Short bowel syndrome[J]. *World J Surg*, 2000, 24(12): 1486-1492. DOI: 10.1007/s002680010266.
- [8] KABIR S I, KABIR S A, RICHARDS R, et al. Pathophysiology, clinical presentation and management of diversion colitis: a review of current literature[J]. *Int J Surg*, 2014, 12(10):1088-1092. DOI:10.1016/j.ijsu.2014.08.350.
- [9] KLINGENSMITH N J, COOPERSMITH C M. The gut as the motor of multiple organ dysfunction in critical illness[J]. *Crit Care Clin*, 2016, 32(2):203-212. DOI:10.1016/j.ccc.2015.11.004.
- [10] 黎介寿. 肠内营养与肠屏障功能[J]. *肠外与肠内营养*, 2016, 23(5):257-259. DOI:10.16151/j.1007-810x.2016.05.001.
LI J S. Enteral nutrition and intestinal barrier function[J]. *Parenter Enteral Nutr*, 2016, 23(5):257-259. DOI:10.16151/j.1007-810x.2016.05.001.
- [11] 孙亚鲁,尹勇,王晓梅. 肠道菌群与脑卒中的关系[J]. *医学综述*, 2019, 25(9): 1782-1786. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-2084.2019.09.022.
SUN Y L, YIN Y, WANG X M. Relationship between intestinal flora and stroke[J]. *Med Recapitul*, 2019, 25(9):1782-1786. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.09.022.
- [12] 李波,侍荣华,李宗杰. 肠道菌群-肠-脑轴与心身疾病的相互关系[J]. *生理科学进展*, 2018, 49(3):221-226. DOI:10.3969/j.issn.0559-7765.2018.03.013.
LI B, SHI R H, LI Z J. The correlations between microbiota-gut-brain axis and psychosomatic disorders[J]. *Prog Physiol Sci*, 2018, 49(3):221-226. DOI:10.3969/j.issn.0559-7765.2018.03.013.
- [13] 黄小群,廖小平. 肠道菌群与抑郁的相关性研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2019, 22(1):112-116. DOI:10.12083/SYSJ.2019.

- 01.023.
HUANG X Q, LIAO X P. Research progress on the relationship between intestinal flora and depression[J]. *Chin J Pract Nerv Dis*, 2019, 22(1):112-116. DOI:10.12083/SYSJ.2019.01.023.
- [14] 王林洁, 袁建玲, 鲍波. 肠道菌群对帕金森病影响的研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(8):1501-1505. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2019.08.009.
WANG L J, YUAN J L, BAO B. Research progress in influence of gut Microbiota on Parkinson's disease[J]. *Med Recapitul*, 2019, 25(8): 1501-1505. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-2084.2019.08.009.
- [15] 孙功鹏, 高月兰, 魏家燕, 等. 氧化三甲胺与常见慢性疾病相关研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(11):1377-1381. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.023.
SUN G P, GAO Y L, WEI J Y, et al. Research progress on trimethylamine oxide and common chronic diseases[J]. *Int J Lab Med*, 2019, 40(11):1377-1381. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.023.
- [16] 王晓钰, 蒋升瑶, 蔺智兵, 等. 基于糖尿病-肿瘤小鼠模型研究糖尿病对结肠癌/乳腺癌进展及肠道菌群的影响[J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(6):469-479. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.06.007.
WANG X Y, JIANG S Y, LIN Z B, et al. Effects of diabetes on colorectal cancer/breast cancer progression and intestinal flora based on a diabetes-tumor mouse model[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2021, 41(6):469-479. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.06.007.
- [17] 陈梅佳, 沈楠, 杜青. 肠道菌群在风湿免疫性疾病中作用的研究进展[J]. *中华全科医师杂志*, 2019, 18(3):279-282. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-7368.2019.03.018.
CHEN M J, SHEN N, DU Q. Research progress of intestinal flora in rheumatic immune diseases[J]. *Chin J Gen Pract*, 2019, 18(3): 279-282. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1671-7368.2019.03.018.
- [18] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr507.
- [19] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nat Methods*, 2010, 7(5):335-336. DOI:10.1038/nmeth.f.303.
- [20] MINCHIN P R. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination[J]. *Vegetatio*, 1987, 69(1): 89-107. DOI:10.1007/BF00038690.
- [21] BROOKS A W, PRIYA S, BLEKHMANN R, et al. Gut microbiota diversity across ethnicities in the United States[J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(12): e2006842. DOI:10.1371/journal.pbio.2006842.
- [22] 刘玉婷, 郝微微, 温红珠, 等. 肠道菌群的检测方法及研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(20):3142-3148. DOI:10.11569/wcjd.v24.i20.3142.
LIU Y T, HAO W W, WEN H Z, et al. Intestinal flora: detection methods and research advances[J]. *World Chin J Dig*, 2016, 24(20):3142-3148. DOI:10.11569/wcjd.v24.i20.3142.
- [23] 李旖旎. 粪菌移植联合小儿化食丸对高热量饮食模型大鼠肠道菌群-SCFAs-GPR43-IL1-8通路的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
LI Y N. Effects of bacteria transplantation combined with Xiaorhuashi Pill on "intestinal flora- SCFAs-GPR43-IL18" pathway in high-calorie diet model rats[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.
- [24] COSTELLO E K, LAUBER C L, HAMADY M, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time[J]. *Science*, 2009, 326(5960):1694-1697. DOI:10.1126/science.1177486.
- [25] 李宁. 肠道菌群紊乱与粪菌移植[J]. *肠外与肠内营养*, 2014, 21(4): 193-197. DOI:10.16151/j.1007-810x.2014.04.015.
LI N. Intestinal flora disorder and fecal bacteria transplantation[J]. *Parenter Enteral Nutr*, 2014, 21(4):193-197. DOI:10.16151/j.1007-810x.2014.04.015.
- [26] 朱华, 肖冲, 尚海泉, 等. 基于高通量测序的不同年龄恒河猴肠道菌群结构差异分析[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1):72-78. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.012.
ZHU H, XIAO C, SHANG H Q, et al. Analysis of gut microbiomes of Rhesus macaques of different ages by high-throughput sequencing[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(1): 72-78. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.012.
- [27] 翟子豪, 宋颀, 王俊茵, 等. 峨眉山与黄山藏酋猴肠道菌群组成的比较[J]. *四川动物*, 2019, 38(1):1-10. DOI:10.11984/j.issn.1000-7083.20180183.
ZHAI Z H, SONG Y, WANG J Y, et al. Comparison of gut microbiome in *Macaca thibetana* between mount Emei and mount Huangshan[J]. *Sichuan J Zool*, 2019, 38(1):1-10. DOI:10.11984/j.issn.1000-7083.20180183.
- [28] 黄树武, 闵凡贵, 王静, 等. 常见SPF级小鼠和大鼠肠道菌群多样性研究[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(2):229-235. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.016.
HUANG S W, MIN F G, WANG J, et al. Diversity of intestinal flora in commonly used SPF mice and rats[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(2):229-235. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.016.
- [29] 简平, 王强, 王剑, 等. 不同年龄段川金丝猴肠道菌群结构差异分析[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(4):1302-1309. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2015.04.037.
JIAN P, WANG Q, WANG J, et al. Difference analysis of gut microbiome of *Rhinopithecus roxellana* in different ages[J]. *Chin J Anim Nutr*, 2015, 27(4):1302-1309. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2015.04.037.
- [30] KIMBLE R, GOUINGUENET P, ASHOR A, et al. Effects of a mediterranean diet on the gut microbiota and microbial metabolites: A systematic review of randomized controlled trials and observational studies[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022:1-22. DOI: 10.1080/10408398.2022.2057416.
- [31] 王保宁, 陈昱作, 贡嘎, 等. 不同海拔区域内牦牛肠道菌群结构组成多样性研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2021, 58(5):152-158. DOI:10.19907/j.0490-6756.2021.056003.
WANG B N, CHEN Y Z, GONG G, et al. Study on diversity of structural composition of yaks intestinal flora in different altitudes[J]. *J Sichuan Univ Nat Sci Ed*, 2021, 58(5): 152-158. DOI:10.19907/j.0490-6756.2021.056003.

(收稿日期:2022-07-07 修回日期:2022-09-16)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,余儒洋)

【引用本文】

许琴,倪艳,是文辉,等. SPF级雄性SD大鼠回肠与结肠菌群结构比较分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(1):53-60. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.103.

XU Q, NI Y, SHI W H, et al. Analysis on ileum and colon microflora of SPF male SD rats based on high-throughput sequencing[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(1):53-60. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.103.

不同月龄长爪沙鼠的肾脏组织学特征

卢领群, 郭红刚, 石巧娟, 戴方伟, 褚晓峰

(杭州医学院实验动物中心, 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 310000)

[摘要] **目的** 探究不同月龄长爪沙鼠肾脏的组织学特征。**方法** 选取2、6、12月龄长爪沙鼠各10只, 雌雄各半。动物安乐死后取肾脏, 制作石蜡切片, HE、MASSON和PAS染色后, 数字扫描观察不同月龄长爪沙鼠的肾脏组织各部分结构差异, 通过图像分析软件测量肾脏组织相关数据。**结果** 长爪沙鼠的肾皮质和外髓质肾小管断面中近曲小管数量较远曲小管多; 随着月龄增加, 肾小球密度减少, 肾小球直径增加, 肾小管基膜增厚, 肾小管间纤维成分增多。**结论** 长爪沙鼠肾脏的组织结构随着月龄增长出现差异性变化, 这种变化可能与肾小球硬化、实质性细胞减少有关, 具体机制有待进一步研究。

[关键词] 长爪沙鼠; 肾脏; 组织学变化

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0061-06



Histological Characteristics of the Kidney in Mongolian Gerbils of Different Ages

LU Lingqun, GUO Honggang, SHI Qiaojuan, DAI Fangwei, CHU Xiaofeng

(Experimental Animal Center of Hangzhou Medical College, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Safety Research, Hangzhou 310000, China)

Correspondence to: CHU Xiaofeng, E-mail: sydw@zjinfo.gov.cn

[ABSTRACT] **Objective** To explore the histological characteristics of the kidney in Mongolian gerbils of different ages. **Methods** Ten Mongolian gerbils of 2, 6, and 12 months old (half male and half female) were selected. After euthanasia, the kidneys were taken and paraffin sections were made. After HE, MASSON and PAS staining, the structural differences of different parts of the kidney tissue in gerbils of different ages were observed by digital scanning, and the relevant data of the kidney tissue were measured by image analysis software. **Results** The number of proximal convoluted tubules was more than that of distal convoluted tubules in the renal cortex and outer medulla of gerbils. With age, the glomerular density decreased, the glomerular diameter increased, the basement membrane of renal tubules thickened, and the fibrous components between renal tubules increased. **Conclusion** The histological structure of Mongolian gerbil's kidney varies with age, which may be related to glomerulosclerosis and parenchymal cell reduction. The specific mechanism needs further study.

[Key words] Mongolian gerbil; Kidney; Histological change

长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus*) 又称为蒙古沙鼠 (Mongolian gerbil), 属于哺乳纲啮齿目鼠科沙鼠亚科沙鼠属, 在我国主要分布于内蒙古以及邻省区的沙化草原地。长爪沙鼠作为实验动物, 因其脑底动脉、前列腺、眼、耳等独特的解剖结构, 以及对丝虫、幽门螺杆菌和汉坦病毒的易感性等原因, 已被广泛地应

用于脑神经、寄生虫病、微生物、生殖、内分泌、营养、代谢、药理、肿瘤等诸多领域的研究, 被称为“多功能”实验动物^[1]。

长爪沙鼠长期栖息于干旱、半干旱地区, 具有尿液浓缩的特点, 能够有效利用食物中和体内代谢的水分, 因此对饮用水量的要求很低, 可以把饮水量控制

[基金项目] 浙江省科技计划项目“长爪沙鼠组织形态学数据库的建立与大鼠、小鼠比较组织学研究”(2018C37124); 浙江省基础公益研究计划项目“链脲佐菌素诱发长爪沙鼠多囊肝动物模型建立与发病机制研究”(LGD22C040024)

[第一作者] 卢领群(1976—), 男, 本科, 高级实验师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: lulingqun@sohu.com

[通信作者] 褚晓峰(1968—), 男, 本科, 副研究员, 研究方向: 实验动物应用研究。E-mail: sydw@zjinfo.gov.cn

在每 100 g 体质量 2 mL 左右, 且对体质量无影响。由于其泌尿系统的特殊性, 长爪沙鼠成为了研究肾脏功能性疾病的良好动物模型^[2-3]。

肾脏是动物最重要的排泄器官, 其正常结构对于维持机体内环境稳态具有重要作用^[4]。到目前为止, 有关肾脏结构的研究主要集中于人^[5]、小鼠^[6]、牦牛^[7-8]、大熊猫^[9]和兔^[10]等, 而肾脏的增龄性变化研究仅限于小鼠^[11]和人^[12], 尚未见到有关长爪沙鼠随月龄增加的肾脏组织学变化的系统性研究报告。因此, 本实验运用组织学染色和图像分析的方法对长爪沙鼠肾组织各部分结构进行观察及测量分析, 描述不同月龄段长爪沙鼠肾结构组织学变化特征, 为进一步研究长爪沙鼠的肾脏发育和生理学功能提供可靠的形态学数据资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验选取 2、6、12 月龄长爪沙鼠, 每个月龄段各 10 只, 雌雄各半。长爪沙鼠来自杭州医学院实验动物中心 [SCXK (浙) 2019-0002], 实验在杭州医学院实验动物中心屏障设施 [SYXK (浙) 2019-0011] 内完成。实验方案经杭州医学院实验动物中心实验动物福利伦理委员会审查批准 (编号为 ZJCLA-IACUC-20110002), 实验操作遵循国家有关实验动物的相关法规条例要求。动物饲养设施光照周期为 7:00-19:00 光照, 19:00-7:00 黑暗。长爪沙鼠饲喂辐照饲料, 饮用超滤水, 笼器具, 垫料等均经 121 °C 高压灭菌, 饲养环境温度 20~25 °C, 湿度 40%~60%。

1.2 肾脏组织结构观察

动物经过量 CO₂ 麻醉后安乐死, 进行大体解剖观察。摘取两侧肾脏, 去除肾周脂肪和结缔组织, 将肾脏置于质量分数为 4% 的中性甲醛溶液中固定 48 h 后取出, 将肾脏切开, 观察解剖学差异。

肾脏组织经梯度乙醇溶液脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后, 制作石蜡切片, 分别进行 HE、MASSON 和 PAS 染色 (相关染色剂均购自杭州浩克生物技术有限公司)。HE 染色后观察肾小管和肾小球, MASSON 染色后观察细胞间质中纤维增生情况, PAS 染色后观察肾小球和肾小管基底膜糖原。着色后的切片用宁波江丰生物信息技术有限公司生产的 KF-PRO-020 数字切片扫描仪进行扫描, 观察肾脏各部分组织结构。然后用自带看图软件 K Viewer 测量切片中肾脏皮质厚度

(cortical thickness, CT)、外髓质厚度 (outer medullar thickness, OMT)、内髓质厚度 (in medullar thickness, IMT)、皮质面积 (cortical area, CA)、外髓质面积 (outer medullar area, OMA) 和内髓质面积 (inner medullar area, IMA), 并计数整个切面内肾小球个数。

切片在 20 倍物镜下随机选择肾脏皮质 (cortical) 和外髓质 (near medulla) 处 10 个视野, 计数近曲小管 (proximal convoluted tubules, PCT) 与远曲小管 (distal convoluted tubules, DCT) 的数量, 观察切片 MASSON 染色和 PAS 染色后动物肾脏内纤维结缔组织和肾小管基膜的改变。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 19.0 统计学软件进行结果分析。本研究中各数据在性别上没有统计学差异, 因此合并统计。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同月龄的长爪沙鼠之间比较采用方差分析, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏解剖学特点

大体解剖观察可见, 长爪沙鼠的肾脏为单乳头肾, 表面光滑, 不分叶, 具有较长的突出于肾盂的肾乳头。HE 染色后显示, 皮质与髓质界限清楚, 髓放线条纹清晰, 髓质外区 (外髓) 与髓质内区 (内髓) 界限分明 (图 1)。

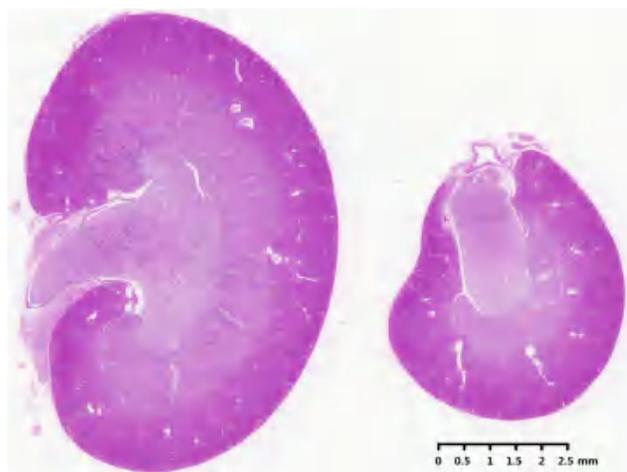


图 1 长爪沙鼠肾组织切面的 HE 染色图 (左侧为纵断面, 右侧为横断面, 均放大 6 倍)

Figure 1 HE staining diagram of kidney tissue section of Mongolian gerbils (longitudinal section on the left and transverse section on the right, magnification $\times 6$)

2.2 肾脏组织形态学相关数据

长爪沙鼠肾脏组织中髓质宽厚。不考虑月龄因素，长爪沙鼠肾脏髓质厚度与皮质厚度的比值约为3.61，外髓质厚度与皮质厚度的比值接近1。分月龄段统计发现，不同月龄的长爪沙鼠肾脏髓质/皮质厚度比 ($F=2.190$, $P=0.128$) 和外髓质/皮质厚度 ($F=0.614$, $P=0.548$) 的差异均无统计学意义 (表1)。同样，不同月龄长爪沙鼠肾脏的外髓质面积与皮质面积之比 ($F=0.111$, $P=0.895$)、外髓质面积与肾脏面积之比 ($F=0.534$, $P=0.641$)、内髓质面积与皮质面积之比 ($F=0.618$, $P=0.546$)、内髓质面积与肾脏面积之比 ($F=$

0.172 , $P=0.843$)、髓质面积与皮质面积之比 ($F=0.360$, $P=0.700$) 差异均无统计学意义 (表1)。

2.3 肾小体及肾小管相关数据

2月龄、6月龄和12月龄长爪沙鼠的肾单位密度逐渐降低，3个月龄段间差异均有统计学意义 ($P<0.01$, 表1)，推测这与长爪沙鼠随着月龄增加，其肾小球硬化及数量减少有关。

2月龄、6月龄、12月龄长爪沙鼠的皮质肾小球直径和髓质肾小球直径均逐渐增加，不同月龄段间差异均有统计学意义 ($P<0.01$, 表1)，提示随着月龄增加，长爪沙鼠的肾小球逐渐增大。

表1 不同月龄长爪沙鼠肾脏组织形态学及肾小体、肾小管相关测量数据

Table 1 Related measurement data of kidney histomorphology and renal corpuscles and tubules in Mongolian gerbils of different ages

测量指标 Measurement index	2月龄 2 months old	6月龄 6 months old	12月龄 12 months old	合计 Total
髓质厚度/皮质厚度 Thickness of medulla/cortex	3.99±1.34	3.82±0.68	3.36±0.97	3.61±1.20
外髓质厚度/皮质厚度 Thickness of outermedulla/cortex	0.91±0.24	0.95±0.16	0.84±0.33	0.90±0.25
内髓质面积/皮质面积 Area of internal medulla/cortex	0.30±0.10	0.26±0.09	0.35±0.37	0.31±0.24
内髓质面积/肾脏面积 Area of internal medulla/kidney	0.17±0.04	0.16±0.04	0.17±0.11	0.17±0.07
髓质面积/皮质面积 Area of medulla/cortex	0.68±0.28	0.64±0.25	0.78±0.43	0.70±0.33
外髓质面积/皮质面积 Area of outer medulla/cortex	0.38±0.19	0.38±0.17	0.42±0.16	0.39±0.17
外髓质面积/肾脏面积 Area of outer medulla/kidney	0.22±0.08	0.22±0.07	0.24±0.07	0.23±0.07
肾单位密度 Nephron density	8.82±1.80	6.65±2.86*	4.73±1.13*	6.61±2.61
皮质肾小球数量 Number of cortical glomeruli	34.40±8.80	29.80±5.07	31.7±6.15	31.66±6.72
外髓质肾小球数量 Number of extramedullary glomeruli	42.10±8.79	37.37±9.60	44.03±8.54	41.05±9.38
皮质肾小球长度 Length of cortical glomerulus	57.70±5.96	67.06±8.74*	82.38±18.35*	69.04±15.84
外髓质肾小球长度 Length of extramedullary glomerulus	86.81±8.94	91.45±13.74*	110.58±14.18*	96.39±16.16
皮质部近曲小管数/远曲小管数 PCT/DCT in cortex	2.31±0.94	2.25±1.02	3.58±1.63	2.70±1.35
近髓部近曲小管数/远曲小管数 PCT/DCT in proximal medulla	3.12±2.19	4.24±2.78	2.23±0.79	3.15±2.16

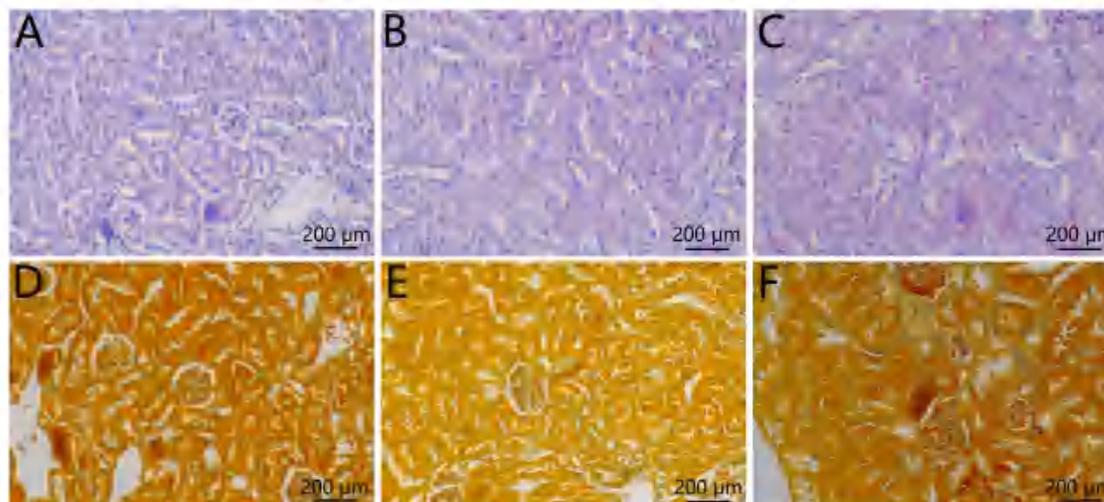
注: * $P<0.05$,与2月龄长爪沙鼠比较; # $P<0.05$,与6月龄长爪沙鼠比较。

Note: PCT/DCT, Ratio of proximal and distal convoluted tubules. Compared with the 2 months old group, * $P<0.05$; Compared with the 6 months old group, # $P<0.05$.

2月龄、6月龄和12月龄长爪沙鼠的肾皮质近曲小管数/远曲小管数比值和髓质近曲小管数/远曲小管数比值均大于1(表1),提示长爪沙鼠的肾组织中,不论是皮质部位还是髓质部位,近曲小管数量均比远曲小管数量多。

2.4 不同月龄长爪沙鼠的肾间质纤维化

本研究采用MASSOM染色和PAS染色法检测了长爪沙鼠肾间质的组织学特性,结果提示,随着月龄增加,肾间质的纤维化程度逐渐增加,主要表现为肾小管四周基膜增厚、纤维增生(图2)。



注: A-C分别为2、6、12月龄长爪沙鼠肾组织的PAS染色代表图; D-F分别为2、6、12月龄长爪沙鼠肾组织的MASSON染色代表图。比例尺大小均为200 μm。

Note: A-C are kidney of 2, 6 and 12 months old Mongolian gerbils, respectively (PAS staining, the scale size is 200 μm); D-F are kidney of 2, 6 and 12 months old Mongolian gerbils, respectively (MASON staining, the scale size is 200 μm).

图2 不同月龄段长爪沙鼠肾脏组织学观察

Figure 2 Histology of the kidney in Mongolian gerbils of different ages

3 讨论

袁江玲等^[13]比较了SD大鼠和子午沙鼠肾脏(子午沙鼠个体比长爪沙鼠大)的形态学结构;赵文杰等^[14]对长爪沙鼠泌尿系统的解剖形态结构、肾小体、肾小管、输尿管、膀胱进行了描述,但未对不同月龄的长爪沙鼠肾脏进行测量比较。本实验首次对不同月龄长爪沙鼠肾小球数量、肾小球直径、肾近曲小管、远曲小管数量和肾间质进行比较。

以往研究发现,生活在干旱缺水环境如沙漠地区的动物甚至具有相对长的乳突和较大的髓质厚度,如双峰驼的髓质/皮质厚度比值为4:1,大袋鼠和非洲野驴为5:1,沙漠山羊和绵羊为3:1^[15-16];而生活于气候潮湿、水源充足地带的动物如家猪和驼鹿的髓质/皮质厚度比值是1:5,非洲大羚羊是1:1,这些动物的髓质比较狭窄^[16]。本研究结果显示,长爪沙鼠的肾髓质宽厚,髓质/皮质厚度比值为3.61:1,2月龄时达3.99左右,6月龄时为3.82左右,12月时为3.36左右;

其中,外髓/皮质厚度比值接近1。袁江玲等^[13]报告,子午沙鼠的外髓质/皮质厚度比值为 0.79 ± 0.17 ,SD大鼠的外髓质/皮质厚度比值为 0.75 ± 0.19 ,提示长爪沙鼠、子午沙鼠和SD大鼠三者在外髓质和皮质厚度的比值上相仿。

哺乳动物肾脏内髓参与尿液浓缩过程,是尿素循环累积的场所,更大面积的内髓质表示更强的尿素累积能力。因此,通过测定内髓面积与肾脏面积、髓质面积与皮质面积的比值,可以评估肾脏对水环境的适应能力^[3,17]。本研究发现,不同月龄长爪沙鼠的肾外髓质面积与皮质面积之比、外髓质面积与肾脏面积之比没有明显差异,并且与袁江玲等^[13]报告子午沙鼠和SD大鼠的外髓质面积/肾脏面积比值相仿,提示外髓质面积/肾脏面积比值在3种动物间没有明显的种间差异。而且3个月龄段长爪沙鼠的肾脏内髓质面积/皮质面积、内髓质面积/肾脏面积、髓质面积/肾脏面积之比也无明显差异,提示3个月龄段长爪沙鼠的尿液浓缩能力相仿。对比而言,长爪沙鼠的这3个指标分别

为 0.31 ± 0.24 、 0.17 ± 0.07 、 0.70 ± 0.33 ，子午沙鼠分别为 0.35 ± 0.05 、 0.20 ± 0.02 、 0.76 ± 0.12 ，SD大鼠分别为 0.18 ± 0.04 、 0.12 ± 0.01 、 0.54 ± 0.18 ，提示长爪沙鼠和子午沙鼠的尿液浓缩能力相仿，但与SD大鼠相差较大。长爪沙鼠的肾内髓质面积在肾脏面积中占比大于SD大鼠，提示尿液浓缩能力大于SD大鼠。

有研究发现，生活于干旱地区的小型哺乳动物的肾脏形态学相关指标均较高^[18]；生活于干旱地区的动物一般应具备更长的近曲小管，而生活于水源充足地区的动物近曲小管较短^[19-20]。本研究数据表明，长爪沙鼠的近曲小管截面数比远曲小管多，提示长爪沙鼠有更长的近曲小管。近曲小管具有重吸收水分的功能。因此，长爪沙鼠的尿液浓缩能力可能与其较长的近曲小管有较大相关性。本研究数据提示，长爪沙鼠的肾外髓部比皮质部的近曲小管数/远曲小管数比值大，说明外髓部的近曲小管数量更多。与SD大鼠相比，长爪沙鼠的肾外髓部近曲小管数/远曲小管数比值大，提示长爪沙鼠在外髓部有比大鼠更多的近曲小管。

另外，本研究数据还表明，2月龄、6月龄和12月龄长爪沙鼠随着月龄增加，肾单位密度逐渐降低，这与Pannarale等^[21]和Denic等^[22]对人肾脏的增龄研究结果相似；其原因可能是随着月龄增长，肾小球逐渐发生硬化，从而导致肾小球数量减少。同时，随着月龄增加，长爪沙鼠的肾小球逐渐增大，皮质肾小球和髓质肾小球均增大，不同月龄段间均有明显差异，这与Goyal等^[11]对鼠肾的研究结果一致；其原因可能是随着月龄增长，实质性细胞减少，从而导致肾小球内其余细胞出现代偿性肥大。相比而言，长爪沙鼠的肾单位密度(6.61 ± 2.61)大于子午沙鼠(5.14 ± 0.32)，子午沙鼠又大于SD大鼠(2.96 ± 0.29)。

本研究进一步用MASSON染色和PAS染色确定肾纤维化程度和病变程度，发现随着月龄增加，长爪沙鼠肾间质的纤维化程度增加，肾小管基膜增厚，胶原纤维主要分布在肾小管外周、肾小囊壁层。综上，本研究结果有望为长爪沙鼠作为泌尿系统疾病研究用实验动物提供基础数据支持。

[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经杭州医学院实验动物中心实验动物福利伦理委员会审查批准(批号:ZJCLA-IACUC-20110002)。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 experimental animal protocols in this study were

reviewed and approved by Animal Care and Use Committee in Hangzhou Medical College (Approval Letter No. ZJCLA-IACUC-20110002), and all experimental protocols were carried out in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

卢领群: 提供研究经费, 负责动物饲养;

郭红刚、石巧娟和戴方伟: 收集资料、实验设计、数据统计及论文撰写;

褚晓峰: 负责研究方案与论文的审核及修改。

[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] 丁贤明, 钱宝珍. 长爪沙鼠在生物医学中的应用及其生理生化研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(5):313-318. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2006.05.017.
DING X M, QIAN B Z. Advances in study of physiology and biochemistry of Mongolian gerbils and its application in biomedical[J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(5):313-318. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2006.05.017.
- [2] PORT C D, BAXTER D W, RICHTER W R. The Mongolian gerbil as a model for lead toxicity. I. Studies of acute poisoning[J]. Am J Pathol, 1974, 76(1):79-94.
- [3] BOHMAN S O, JENSEN P K A. The interstitial cells in the renal medulla of rat, rabbit, and gerbil in different states of diuresis[J]. Cell Tissue Res, 1978, 189(1): 1-18. DOI: 10.1007/BF00223117.
- [4] GULLO A M L, CHIEREGO M L. Homeostasis-basics, definitions, clinical evidence[M]//GULLO A. Anaesthesia, pain, intensive care and emergency medicine -A. P. I. C. E. Milano: Springer,2022:539-575.
- [5] MCBRIDE J M. Embryology, anatomy, and histology of the kidney [M]//HANSEL D, KANE C, PANER G, et al. The kidney. New York: Springer, 2016:1-18.
- [6] LIEBELT A G. Unique features of anatomy, histology, and ultrastructure kidney, mouse[M]//JONES TC, HARD G G, MOHR U. Urinary system, Monographs on pathology of laboratory animals. Berlin Heidelberg: Springer, 1998:37-57.
- [7] 赵善廷, 王士平, 秦传芳, 等. 牦牛肾脏的定量组织学和组织化学研究[J]. 中国牦牛, 1990(3):49-51, 67.
ZHAO S T, WANG S P, QIN C F, et al. Quantitative histology and histochemistry of yak kidney[J]. China Yak, 1990(3): 49-51, 67.
- [8] 莫重存, 俞红贤. 青海牦牛肾脏的形态学观测[J]. 甘肃畜牧兽医, 2004, 34(5):12-13. DOI:10.15979/j.cnki.cn62-1064/s.2004.05.005.
MO Z C, YU H X. Morphological observation on kidney of Qinghai yak[J]. Gansu Animal Vet Sci, 2004, 34(5):12-13. DOI:

- 10.15979/j.cnki.cn62-1064/s.2004.05.005.
- [9] 米志平, 杨智, 李平. 小熊猫肾脏和输尿管的组织学研究[J]. 四川动物, 2003, 22(4):241-243.
MI Z P, YANG Z, LI P. Histological research on kidney and ureter of red pandas[J]. Sichuan J Zool, 2003, 22(4):241-243.
- [10] KOZMA C, MACKLIN W, CUMMINS L, et al. Anatomy, physiology, and biochemistry of the rabbit[M]//WEISBROTH S H, FLATT R E, KRAUS A L. The biology of the laboratory rabbit. New York: Academic Press, 1974:49-72.
- [11] GOYAL V K, CHATTERJEE P C. Changes with age in mouse kidney[J]. Exp Gerontol, 1980, 15(3):151-160. DOI:10.1016/0531-5565(80)90059-5.
- [12] GOYAL V K. Changes with age in the human kidney[J]. Exp Gerontol, 1982, 17(5): 321-331. DOI: 10.1016/0531-5565(82) 90032-8.
- [13] 袁江玲, 徐晓辉, 史深, 等. 子午沙鼠与SD大鼠肾脏形态学特征的比较[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6):765-769. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.012.
YUAN J L, XU X H, SHI S, et al. Morphological comparison of kidneys between Meriones meridianus and SD rats[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2019, 27(6):765-769. DOI:10.3969/j.issn. 1005-4847.2019.06.012.
- [14] 赵文杰, 宋志琦, 程广宇, 等. 长爪沙鼠正常泌尿器官的组织学观察[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12):24-26, 95. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2014.012.005.
ZHAO W J, SONG Z Q, CHENG G Y, et al. Histological observation on the urinary organs in normal Meriones Unguiculataus[J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(12): 24-26, 95. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2014.012.005.
- [15] YAAKOBI D, SHKOLNIK A. Structure and concentrating capacity in kidneys of three species of hedgehogs[J]. Am J Physiol, 1974, 226(4): 948-952. DOI: 10.1152/ajplegacy. 1974.226.4.948.
- [16] MBASSA G K. Mammalian renal modifications in dry environments[J]. Vet Res Commun, 1988, 12(1): 1-18. DOI: 10.1007/BF00396399.
- [17] WINKELMANN J R, GETZ L L. Water balance in the Mongolian gerbil[J]. J Mammal, 1962, 43(2): 150-154. DOI: 10.2307/1377085.
- [18] SCHMIDT-NIELSEN B, O'DELL R. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney[J]. Am J Physiol, 1961, 200: 1119-1124. DOI: 10.1152/ajplegacy. 1961. 200.6.1119.
- [19] AL-KAHTANI M A, ZULETA C, CAVIEDES-VIDAL E, et al. Kidney mass and relative medullary thickness of rodents in relation to habitat, body size, and phylogeny[J]. Physiol Biochem Zool, 2004, 77(3):346-365. DOI:10.1086/420941.
- [20] VALTIN H. Structural and functional heterogeneity of mammalian nephrons[J]. Am J Physiol Ren Physiol, 1977, 233 (6): F491-F501. DOI:10.1152/ajprenal.1977.233.6.f491.
- [21] PANNARALE G, CARBONE R, DEL MASTRO G, et al. The aging kidney: structural changes[J]. J Nephrol, 2010, 23(Suppl 15): S37-S40.
- [22] DENIC A, GLASSOCK R J, RULE A D. Structural and functional changes with the aging kidney[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2016, 23(1):19-28. DOI:10.1053/j.ackd.2015.08.004.

(收稿日期:2022-08-19 修回日期:2022-09-23)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,周培)

引用本文

卢领群, 郭红刚, 石巧娟, 等. 不同月龄长爪沙鼠的肾脏组织学特征[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):61-66. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.130.

LU L Q, GUO H G, SHI Q J, et al. Histological characteristics of the kidney in Mongolian gerbils of different ages[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1):61-66. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.130.

《实验动物与比较医学》被列入遵循ICMJE国际规范的期刊名单

2023年1月,《实验动物与比较医学》被国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE)列入“遵循ICMJE推荐规范的期刊名单”,详见链接<https://www.icmje.org/journals-following-the-icmje-recommendations>。这标志着本刊的学术出版国际化、规范化进入实质性发展阶段。

ICMJE每年更新一次《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》(*Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals*, 简称ICMJE规范)。自2020年起,《实验动物与比较医学》编辑部参与了2019年版、2021年版和2022年版ICMJE规范的汉化工作。最新版的ICMJE规范中文译本请见链接<https://www.icmje.org/recommendations/translations/chinese2022.pdf>。

本刊审稿及编辑团队将努力遵循这一国际规范,以促进本刊发表论文的规范化提升和国际化认可,助力于我国实验动物与比较医学研究的高质量发展。

(《实验动物与比较医学》编辑部)

实验用猫的驯化及繁殖方法初步研究

何永平, 谢美贤, 庞智慧, 李庆秀, 何华红, 张讷敏, 李 薇

(广州市药品检验所, 广州 510160)

[摘要] **目的** 开展家猫实验动物化的驯化饲养及繁殖, 探索实验猫的饲养管理方法和繁殖技术。**方法** 从广州市郊农村引进中华田园猫3窝计7只, 建立繁育种子群, 按实验动物饲养管理方法进行笼养驯化饲养和封闭繁殖、传代, 统计种群繁殖情况、种猫年怀孕次数、产仔季节、仔猫出生和离乳体质量、离乳成活率等数据。**结果** 幼年种猫能适应笼养饲养管理方式。在传代繁殖、扩大种群中, 一年怀孕1胎、2胎、3胎的母猫只数占比分别为63.2%、26.3%和10.5%, 1~4季度产仔胎数比例分别为20.7%、20.7%、27.6%和31.0%。19只母猫共计怀孕、产仔29胎次, 产仔101只, 每胎平均产仔(3.5±1.33)只。幼猫离乳成活67只, 平均离乳成活率为60.86%。雌、雄猫的出生体质量分别为(89.31±13.69)g和(93.47±15.12)g, 离乳体质量分别为(361.62±82.77)g和(376.0±91.71)g。**结论** 家养中华田园猫能适应实验动物化饲养、繁殖方式, 繁殖力较强, 一年四季能正常怀孕、产仔; 幼猫生长到5~6月龄时能够满足药品降压物质检查对猫的体质量要求, 可被用作来源清楚的药品检验用实验猫。

[关键词] 中华田园猫; 实验动物驯化; 繁殖性能; 产仔数; 离乳成活率

[中图分类号] Q95-33;R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0067-06



A Preliminary Study on the Domestication and Breeding Methods of Experimental Cats

HE Yongping, XIE Meixian, PANG Zhihui, LI Qingxiu, HE Huahong, ZHANG Namin, LI Wei

(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

Correspondence to: LI Wei, E-mail: gz-liwei@tom.com

[ABSTRACT] **Objective** Focused on the laboratory animal domestication and breeding of domestic cats, to explore the feeding management methods and breeding techniques of experimental cats. **Methods** Seven Chinese garden cats from three litters were introduced from the rural suburbs of Guangzhou, and a breeding seed colony was established. The cats were domesticated in captivity, bred, closed breeding and transmission according to the feeding and management methods of laboratory animal. The population reproduction, the number of pregnancies per year, the litter season, the birth and weaning quality of the cats, and the survival rate of weaning were statistically collected. **Results** The young breeding cats were able to adapt to the cage feeding management. In the transmission breeding and the expanded breeding colony, the number of female cats pregnant with one, two or three litters a year accounted for 63.2%, 26.3% and 10.5%, respectively. The proportions of litters born from the 1st to the 4th quarters were 20.7%, 20.7%, 27.6%, and 31.0%. A total of 29 pregnancies and 101 kittens were got from 19 female cats, with an average of (3.5±1.33) kittens per litter. The birth weights of female and male cats were (89.31±13.69) g and (93.47±15.12) g, respectively. Sixty-seven kittens survived from weaning. The average survival rate was 60.86%, and the weaning weights of female and male cats were (361.62±82.77) g and (376.0±91.71) g, respectively. **Conclusion** Domestic Chinese garden cats can adapt to laboratory animal feeding and breeding rules, and have strong fertility. They can normally pregnant and breeding throughout the year. The kittens grow to 5-6 months of age can meet the weight requirements for the examination of pharmaceutical hypotensive substances, and can be used as experimental cats for pharmaceutical examination with clear origin.

[基金项目] 广州市市场监督管理局科技项目“药品检验‘活的试剂’-标准化实验猫培育关键技术研究”(2021kj35)

[第一作者] 何永平(1966—),男,高级兽医师,研究方向:实验动物质量研究。E-mail: idc36498026@126.com

[通信作者] 李 薇(1965—),女,主任药师,研究方向:药品检验质量技术。E-mail: gz-liwei@tom.com

[Key words] Chinese garden cats; Laboratory animal domestication; Reproductive performance; Litter size; Weaning survival rate

猫主要应用于生理学、药理学、毒理学、神经系统、心血管系统等方面的生物医学研究，是药品降压物质检查试验的首选实验用动物^[1-2]。但是至2021年，实验猫缺少国家质量标准和质量检测方法标准，全国只有河北省、黑龙江省、四川省等少数省、市、自治区发布了实验用猫地方标准；拥有实验用猫生产许可证的企业只有昆药集团股份有限公司、山西亚宝药业股份有限公司和河北制药股份有限公司3家^[3]，科研实验用猫和药品降压物质检查试验用猫普遍选来自农村的家猫^[3-5]。使用无质量标准、遗传背景不明确、来源不清楚的家养猫或流浪猫进行科研实验、药品检验可能存在安全风险。

实验猫的市场供需矛盾突出，急需开发利用我国丰富的家猫物种资源，开展家猫的实验动物驯化培育，对其携带的病原微生物和寄生虫进行控制，选育生物学特性显著、繁殖性能优良、能满足不同实验需求的实验猫品种、品系，育成繁殖性能优异的实验动物猫品种。培育母性好、产仔数多、离乳成活率高和生长发育良好的实验用猫，不仅可以增加实验猫的市场供应量，缓解供需矛盾，还能压缩实验猫繁殖种群规模，提高生产效率，降低生产成本和市场价格。因此，人工培育并推广应用对携带微生物和寄生虫进行控制、遗传背景明确或来源清楚的实验猫在生物医药科学研究、药品检验检定领域具有重要意义^[6]。本研究利用广州本地家猫资源开展家猫实验动物化的驯化饲养、繁殖，建立繁育种群并进行微生物和寄生虫量控制，培育质量符合相关标准的实验动物猫。

1 材料与方法

1.1 原种猫的来源

从广州市郊农村农户家中引进3窝共7只（其中雄性2只、雌性5只），1~2月龄，体质量350~500 g的健康、花色、短毛、幼年本地三花猫（即家养中华田园猫），建立原种猫人工培育群并进行繁育。原种猫后代（繁殖种猫）进行全同胞兄妹或半同胞兄妹近交繁殖、传代，以扩大种群。本研究方案通过广州市药品检验所实验动物福利伦理委员会审查批准（批号：LLSC2020009）。

1.2 饲养环境

本研究中动物饲养于广州市药品检验所的动物实验室〔实验动物使用许可证号：SYXK（粤）2018-0084〕内。饲养环境符合国标GB 14925—2010《实验动物 设施及环境》有关普通环境动物设施的环境技术指标要求，温度控制在20~26℃，日温差小于4℃，相对湿度40%~70%，换气次数≥8次/h，噪声≤60 dB（A），日照明时间12 h，照度大于200 lx。

1.3 饲养笼具

直立式不锈钢猫笼为苏州新区枫桥实验动物笼具厂产品，长0.600 m×宽0.712 m×高1.751 m，体积0.748 m³；分成上、中、下独立三层，每层长0.553 m×宽0.647 m×高0.441 m，体积0.158 m³；设有饲料盒和饮水盆，底部设置接粪盘。猫笼内放置猫砂盆，冬季笼内放置猫抓垫等防寒设施，供猫取暖。种猫单笼饲养；体质量2 kg以下的幼猫雌雄分开，每笼3只集体笼养；幼猫体质量达到2 kg后单笼饲养。

1.4 饲料

猫粮为悦享品牌的全期均衡系列饲料，主要成分：粗蛋白≥32%、粗脂肪≥15%、粗纤维≤5.0%、粗灰分≤10%、水分≤10%、牛磺酸≥0.15%、钙≥1.1%、总磷≥1.0%、水溶性氯化物（以α-计）≥0.3%。

1.5 仪器

PL601-S电子天平，最大称量610 g，实际分度值0.1 g，检定分度值1 g，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司产品；ASC-30电子计价秤，最大称量30 kg，分度值10 g，永康市楼店实用衡器厂产品；软尺。

1.6 原种猫的检疫

原种猫在进入动物设施前，首先进行外观检查，检查内容包括全身毛发是否光亮、皮肤有无破损，眼、口、鼻、耳朵是否正常，肛门口有无粪便粘连，生殖器是否正常，四肢有无残缺，精神状态是否良好，行为动作是否协调。外观检查无异常的种猫送到检疫观察室进行7 d检疫观察，每天记录种猫的外观、精神状态、行为、采食、饮水及排泄物状况。第4、7天用36~37℃的温水给猫洗澡，洗完后用纯棉毛巾擦身并吹干、梳理被毛，清除部分体表寄生虫。每天用1:29 蓝月亮®84消毒液对环境、笼具进行擦洗消毒。

1.7 建立动物档案

每只猫编制唯一身份号码, 采用脖子佩戴金属号码牌的方式进行动物标记, 建立身份档案。档案记录每只猫的身份信息, 繁殖种猫档案中记录雌、雄繁殖种猫合笼的时间、产仔时间、产仔数、幼猫出生体质量、离乳成活数、离乳体质量、母猫生产胎次等信息。

1.8 日常饲养管理

每天定时投喂饲料2次, 上下午各一次, 每次称量、记录加料量, 根据猫的采食情况及时调整投料量。猫饮用净化水, 每天换水2次。饲养室、饲养笼具每天进行清洁。每星期定时称量猫体质量1次。

1.9 人工繁殖

种群扩大、繁殖种猫采用全同胞兄妹或半全同胞兄妹近交繁殖、传代, 每代雌、雄繁殖种猫数量按2:1比例留种。种猫生长到7~8月龄、体质量大于2.5 kg时, 把雄猫放入繁殖雌猫的饲养笼内, 开始长期同居方式饲养、交配繁殖。待母猫怀孕后, 把雄猫移出, 放入另一只雌猫饲养笼中进行繁殖饲养管理。

母猫怀孕期一般60~65 d。临产前3~7 d将母猫转移至比较安静的环境中单笼饲养、待产, 加强日常饲养管理, 临产前笼内放置产垫, 为幼猫做足充分的保暖措施。母猫产仔后与幼猫同笼饲养、一起生活, 母猫自主哺乳幼猫。幼猫3周龄后开始吃食, 哺乳31~39 d后离乳。离乳后的幼猫按雌、雄分笼集体饲养, 体质量达到2 kg后再分笼、单独饲养管理。此时, 按照选种标准挑选新的种猫。

1.10 繁殖种猫的选择标准

留种标准: 幼猫的母亲母性好, 产仔数较多, 窝产仔数不少于3只; 一窝幼猫最多留1只雌猫和1只雄猫; 幼猫应体格健壮, 身体健康、无缺陷, 毛色相近, 精神状态良好, 动作协调, 性情温顺、与人亲近。

1.11 统计分析

运用SPSS 25.0统计学软件, 记录数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间单独样本比较采用 t 检验, 多组比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原种猫及繁殖种群的繁殖情况

原种猫及繁殖种群在驯化、传代繁殖、种群扩大中, 5只原种母猫及其繁育的后代(繁殖种猫), 19只母猫共计怀孕、产仔29胎次, 生产仔猫合计101只, 离乳成活67只(其中雄性30只、雌性37只), 平均每

胎产仔(3.5 ± 1.33)只, 平均离乳成活率60.86%。

2.2 母猫产仔季节分布

猫属于季节性多次发情动物, 在繁殖方面具有许多独特的规律。在自然气候条件下, 每年有春季和秋季两次交配期, 每年1~6月是猫最好的繁殖季节。但在标准化实验动物设施环境条件下进行家猫驯化饲养、繁殖后, 猫原有的季节性发情的生理学特征减弱, 母猫一年四季均能顺利怀孕、产仔。本研究中母猫产仔的季度分布情况如图1。

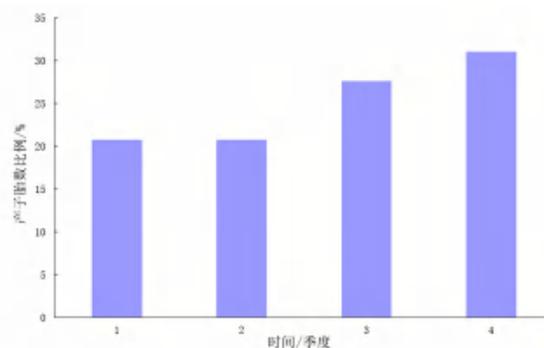


图1 母猫产仔季节分布图

Figure 1 Seasonal distribution of female cats giving birth

2.3 母猫年怀孕、产仔胎次

成年繁殖种猫按雌:雄比例为2:1留种。猫是刺激性排卵动物, 发情前期症状表现微弱, 持续时间较短, 大约持续1 d, 比较难观察判断^[7]。猫的生殖周期较长, 饲养成本高, 占用空间大, 为了不错失雌猫受孕机会, 配种时把雄猫放入雌猫饲养笼中, 进行实验动物常用的长期同居方式饲养管理。确认雌猫怀孕成功后, 把雄猫移出, 放入另一只繁殖母猫的饲养笼中, 继续进行交配繁殖。繁殖种群中1年产仔1胎、2胎、3胎的母猫数占比分别为63.2% (12/19)、26.3% (5/19)和10.5% (2/19)。

2.4 仔猫的出生体质量、离乳体质量

统计离乳存活仔猫的体质量数据, 雄性仔猫出生体质量为(93.47 ± 15.12) g, 雌性仔猫出生体质量为(89.31 ± 13.69) g。幼猫哺乳31~39 d后离乳, 离乳成活67只, 雄性幼猫离乳体质量为(376.0 ± 91.71) g, 雌性幼猫离乳体质量为(361.62 ± 82.77) g。

2.5 季节对产仔数、仔猫离乳成活率的影响

母猫在1、2、3、4季度的窝产仔数分别为(3.7 ± 0.94)只、(3.2 ± 1.34)只、(3.6 ± 1.41)只和(3.4 ± 1.42)只, 平均离乳成活率分别为61.12%、61.2%、60.41%、

60.92%。各季度间的胎产仔数、平均离乳成活率两两比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 不同胎次间产仔数、离乳率的差异

种群母猫第1、2胎的平均产仔数分别为 (3.50 ± 1.14) 只和 (3.40 ± 1.59) 只, 第1、2胎幼猫的平均离乳存活率分别为 (56.93 ± 37.53) % 和 (71.43 ± 45.18) %。第1胎与第2胎的产仔数、平均离乳存活率比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.7 幼猫的采食情况

幼猫出生2周后开始长出牙齿, 出生3周开始采食少量猫粮, 4~6周龄可以离乳、饲喂猫粮。每天定时饲喂2次悦享品牌的全期均衡系列猫粮, 每次饲喂应适量、不能过量。对于2月龄后的猫, 每天每只投喂60~70 g商品猫粮, 实际投喂量以第2天巡查观察猫采食状况时食盒中无剩余猫粮为原则, 尽量减少猫粮浪费。猫不同生长发育期的日采食量如图2。

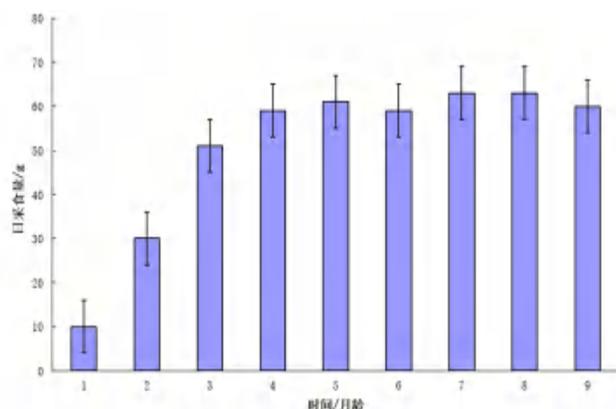


图2 幼猫的日常采食量

Figure 2 Daily feed intake of kittens

2.8 幼猫的生长发育

对幼猫从出生起到36周龄期间进行定期称重。猫出生体质量为100 g左右, 4周龄时体质量接近400 g; 雄猫20周龄、雌猫24周龄时体质量可达到2000 g以上, 能够满足《中国药典》对猫的体质量要求; 32周龄的雄猫体质量超过3000 g, 雌猫体质量大于2500 g, 接近成年猫的体质量。猫的生长曲线如图3。

2.9 人工繁殖实验用猫的主要生物学特征

三花(黄灰白三色)猫, 脸型方圆, 两耳直竖, 身体匀称修长, 四肢健壮有力, 性情温顺, 喜欢与人接触、玩耍。雄性成年体长 (45.3 ± 3.08) cm, 雌性 (43.1 ± 4.14) cm; 雄性尾长 (23.3 ± 2.58) cm, 雌性 (22.9 ± 2.79) cm; 雄性前肢长 (22.8 ± 1.17) cm, 雌性

(22.6 ± 0.79) cm; 雄性后肢长 (23.5 ± 0.84) cm, 雌性 (22.9 ± 1.21) cm。猫的体型特征如图4。

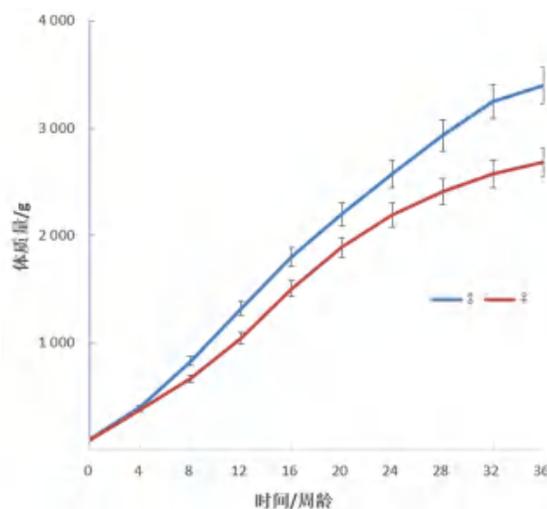


图3 幼猫的生长曲线

Figure 3 Growth curve of kittens



图4 人工繁殖实验用猫的体型特征图(左♂、右♀)

Figure 4 Graphs of body size characteristics of artificial breeding experimental cats (left ♂, right ♀)

3 讨论

培育标准化实验动物猫, 建立繁育种群和解决繁育技术是关键。本课题组从广州市郊农村农户家中引进7只本地幼年短毛家猫, 建立原种子猫群, 在实验动物普通环境条件下进行笼养驯化。前期研究对笼养驯化实验用猫的血生化指标进行了检测^[8]。在此基础上, 本研究探讨笼养驯化实验用猫的繁殖方式及性能。阶段性的研究结果显示, 笼养种群母猫每胎产仔 (3.5 ± 1.33) 只, 平均离乳成活率60.86%, 每胎产仔数比以往文献报告的自然环境中母猫一胎平均产仔4~5

只^[9]略低,平均离乳成活率与胡佐斌报告本地普通家猫笼养繁殖的仔猫成活率<50%(仔猫断奶成活数为0)^[10]存在较大差异。

猫属于季节性多次发情动物,首次发情时间受品种、季节、体况等因素的影响,短毛品种猫的初情期比较早熟,4月龄可出现首次发情^[7]。繁殖种猫不宜过早进行首次交配繁殖。本研究的种猫首次交配年龄为7~8月龄,体质量大于2.5 kg。实验结果表明,母猫的产仔经历和哺乳、护理幼猫的经验有助于提高幼猫的离乳成活率。

家猫是长日照繁殖动物,受季节性光照影响较大,光照强度和长度不足是家猫少发情的一个重要原因^[7]。在标准化动物实验环境设施条件下,饲养室温度控制在20~26℃,日光照时间维持12 h明12 h暗,饲养室内照度≥200 lx,因此季节变化对猫发情的影响减弱,家猫一年四季均可顺利怀孕、产仔。猫的这种生物学特性不仅可以有效提高动物产房和笼具的使用率,还能为科学实验提供不同生长发育阶段的实验用猫。

母猫产仔后与幼猫同笼饲养、一起生活,自主哺乳,幼猫哺乳期为31~39 d,哺乳时间最长不超过60 d,避免哺乳时间过长造成母猫身体机能消耗过度,同时避免影响种猫的后继生产。幼猫3周龄时开始进食,离乳后按雌、雄分笼集体饲养。猫体质量达到2 kg后需要更大的活动空间时,集体笼养猫需要分笼单独饲养。体质量达到2 kg前,雌、雄猫避免同笼饲养,防止未完全发育成熟的猫过早交配、怀孕产仔。

猫从出生起开始进行集体笼养驯化,饲喂悦享品牌猫粮,经过多代驯化饲养,能适应集体笼养的饲养管理方式。猫体型较大,需占用较大活动空间,生产、繁殖周期长,饲养成本高。为降低繁殖种群规模,雌、雄种猫按2:1比例留种。雌猫发情前期症状表现微弱,持续时间较短,大约持续1 d,比较难观察判断^[7]。为了避免雌猫错失受孕的机会,繁殖时将雄猫投入雌猫饲养笼内,进行实验动物常用的长期同居方式饲养管理,确认雌猫怀孕后将雄猫移出。

需要指出,本研究只是阶段性的初步研究结果,尚存在诸多不足,例如:原种猫和繁殖种猫的遗传背景和特性需要再深入研究,家猫的实验动物化更是需要长期的研究积累,才能获得稳定的遗传特性并确定其品种、品系;本研究平台是药品检验机构,目前在实验动物微生物、寄生虫等检疫方面尚有一定困难,需要在下一阶段加强对人工培育实验用猫的生物净化工作,并尝试建

立猫的人兽共患病和烈性传染病检测方法和猫群的微生物、寄生虫控制标准;另外,本研究所用猫笼是购买的实验动物笼具,现有规格偏小,不能完全满足猫喜爱活动的天性需求,接下来需要评估笼养条件对猫繁殖的影响,通过采取环境丰富的干预措施来有效提高实验猫的福利水平,缓解其应激反应^[11]。

综上,实验动物猫的培育迫切而艰巨,集中笼养条件对猫繁殖的影响研究报告较少^[12]。开发利用本地猫资源,建立实验用猫种群,开展笼养驯化饲养、近交繁殖、传代,解决繁殖关键技术具有重大意义。本课题研究表明,家猫能适应实验动物普通环境条件下的笼养饲养管理方式,实现一年四季顺利怀孕、产仔;近交繁殖,母猫的窝产仔数比自然环境(开放或半开放饲养条件)下的随机交配繁殖略低,幼猫的离乳成活率有待提高。随着研究的继续深入,有望解决近交衰退难题,对猫携带的病原微生物和寄生虫进行净化、控制,选育生物学特性显著的猫进行定向培育,最终育成能满足生物医药科学研究需求的实验动物猫品种、品系。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过广州市药品检验所实验动物福利伦理委员会审查批准(批号:LLSC2020009)。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 experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Laboratory Animal Welfare and Ethics Committee of Guangzhou Institute for Drug Control (Approval Letter No. LLSC2020009), and all experimental protocols were carried out in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

何永平:负责研究项目的方案设计、落实,以及论文的撰写、修改和定稿;
谢美贤、李庆秀:负责猫繁殖管理、数据记录和整理,以及生理生化指标检测;
庞智慧:负责繁殖数据核对、生理生化指标检测;
张讷敏:负责猫在药品检验应用中的检测实验;
何华红:负责研究项目实施协调,参与论文修改;
李 薇:负责研究项目的总体把关和论文关键性修改。

[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] 王宇,高丹,彭娜娜,等.实验用英国短毛猫的组织结构特征及背

- 景病变[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(3): 229-236. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.151.
WANG Y, GAO D, PENG N N, et al. Anatomical characteristics and background lesions in laboratory British-shorthair cats [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(3): 229-236. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.151.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Four parts [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2015.
- [3] 滑志民, 张似青, 陈菊红, 等. 实验用猫的历史、发展现状及发展前景[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019(1): 27-29. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2019.01.007.
HUA Z M, ZHANG S Q, CHEN J H, et al. History, development status and development prospect of experimental cats[J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2019(1): 27-29. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2019.01.007.
- [4] 刘明慧, 袁宝, 陈健, 等. 猫实验动物标准化的研究进展及探讨[J]. 吉林畜牧兽医, 2015, 36(2):29-30, 32.
LIU M H, YUAN B, CHEN J, et al. Research progress and discussion on standardization of cat laboratory animals[J]. Jilin Anim Husb Vet Med, 2015, 36(2):29-30, 32.
- [5] 方远书, 何忠平, 裴颖儿. 实验用猫研究现状和发展趋势探讨[J]. 山东畜牧兽医, 2017, 38(10):62.
FANG Y S, HE Z P, QIU Y E. Research status and development trend of laboratory cats[J]. Shandong J Anim Sci Vet Med, 2017, 38(10):62.
- [6] 黑龙江省质量技术监督局. DB23/T 2057.2—2017: 实验动物猫微生物学等级及监测[S]. 2017.
Heilongjiang Quality and Technical Supervision Bureau. DB23/T 2057.2—2017: Laboratory animals cat microbiological grade and monitoring[S]. 2017.
- [7] 刘永旺, 芮荣. 猫的繁育管理[J]. 动物医学进展, 2004, 25(1):126-128. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2004.01.043.
LIU Y W, RUI R. Management of cat breeding[J]. Prog Vet Med, 2004, 25(1):126-128. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2004.01.043.
- [8] 庞智慧, 谢美贤, 李庆秀, 等. 实验用猫的饲养管理探索初报[J]. 广东畜牧兽医科技, 2021, 46(5):24-27.
PANG Z H, XIE M X, LI Q X, et al. A preliminary report on the feeding and management of experimental cats[J]. Guangdong J Anim Vet Sci, 2021, 46(5):24-27.
- [9] 高得仪. 猫的繁殖和管理[J]. 北京实验动物科学, 1989, 6(3): 17-23.
GAO D Y. Breeding and management of cats[J]. Lab Anim Sci, 1989, 6(3):17-23.
- [10] 胡佐斌. 笼养对母猫繁殖性能的影响[J]. 四川畜牧兽医, 1997, 24(3):43-44.
HU Z B. Effect of caging on reproductive performance of female cats[J]. Sichuan Anim Veterin Sci, 1997, 24(3):43-44.
- [11] 陈鸿婷, 杨斐, 胡樱. 环境丰富对英国短毛猫应激相关指标的改善作用[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2): 152-158. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.130
CHEN H T, YANG F, HU Y. Improving effect of environmental enrichment on stress-related indicators of British-shorthair cats[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(2): 152-158. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.130.
- [12] 滑志民, 蔡旋, 张似青, 等. 实验用猫的繁育[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2020(1):38-39. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2020.01.016.
HUA Z M, CAI X, ZHANG S Q, et al. Breeding of experimental cats[J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2020(1):38-39. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2020.01.016.
- (收稿日期:2022-08-03 修回日期:2022-10-26)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁)

[引用本文]

- 何永平, 谢美贤, 庞智慧, 等. 实验用猫的驯化及繁殖方法初步研究[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):67-72. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.118.
HE Y P, XIE M X, PANG Z H, et al. A preliminary study on the domestication and breeding methods of experimental cats[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1):67-72. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.118.

《实验动物与比较医学》入选中国科协“科技期刊双语传播工程”

为贯彻习近平总书记关于办好一流学术期刊的重要指示, 牢牢把握建设世界科技强国战略目标, 围绕实现科技期刊高质量发展的现实需求, 中国科学技术协会组织实施了“科技期刊双语传播工程”(以下简称“双语工程”), 即在我国优势、重点或特色学科, 组织一批有较高学术水平和较强影响力、且具有一定国际化办刊基础的中文科技期刊, 对其刊载的优秀论文进行双语长摘要撰写和翻译, 从而更加有效地传播中国的科技学术成果, 促进中外学术交流与合作, 切实提升中国中文科技期刊的国际学术影响力和传播服务力。

《实验动物与比较医学》顺利通过遴选, 成功入选2022年“科技期刊双语传播工程”。该年度全国共有229本期刊, 3 046篇文献入选。本刊推选的优秀原创论文的中英文长摘要已于“科创中国”网站(<https://www.kczg.org.cn/>)进行宣传展示。2023年, 本刊将继续加强已发表论文的国内外精准推广工作, 促进我国优秀科研成果的国内外交流。

(《实验动物与比较医学》编辑部)

虚拟现实在实验动物行为分析中的应用进展

张超超, 田雪松

(上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203)

[摘要] 虚拟现实 (virtual reality, VR) 是一种通过计算机进行场景模拟的新兴技术, 近年来已经成为动物行为分析的可靠工具。动物行为对动物生存至关重要。动物行为分析为遗传学、生态学、神经科学、经济学以及机器人科学等领域的科技进步提供了有用信息。动物行为分析可分为刺激独立于动物对刺激的反应的开环研究, 以及刺激根据动物的实时运动进行调整的闭环研究。本文首先梳理了动物行为分析的起源、概念和应用领域, 回顾了传统技术条件下以视觉刺激为代表的动物行为开环研究的不足; 然后以视觉、嗅觉、触觉、听觉刺激为例, 分析了虚拟现实技术条件下的动物行为分析系统能够将精确的实验控制与复杂的实验动物行为相结合的可行性, 完成了真实物理世界的实验方法无法实现的闭环研究; 最后对虚拟现实发展为高级模拟及虚拟动物的前景进行了展望。

[关键词] 虚拟现实; 开环系统; 闭环系统; 动物行为; 虚拟动物

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0073-06



Application of Virtual Reality in the Behavior Analysis of Laboratory Animal

ZHANG Chaochao, TIAN Xuesong

(Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Correspondence to: TIAN Xuesong (ORCID: 0000-0001-6162-2856), E-mail: xuesong.tian@shutcm.edu.cn

[ABSTRACT] Virtual reality (VR) is an emerging technology for computer scene simulation that has become a reliable tool for animal behavior analysis in recent years. The behavior of an animal is crucial for its survival. Animal behavior analysis provides useful information for scientific progress in genetics, ecology, neuroscience, economics, and robotics. Animal behavior analysis can be divided into open-loop studies, in which the stimulus is independent of the animal's response to the stimulus, and closed-loop studies, in which the stimulus is adjusted according to the real-time movement of the animal. In this paper, we have discussed the origin, concept, and applications of animal behavior analysis, and reviewed the shortcomings of open-loop research on animal behavior represented by visual stimulation using traditional technology. Then taking visual, olfactory, tactile, and auditory stimulation as examples, we analyzed that the animal behavior analysis system using VR technology could combine precise experimental control with the complex behavior of laboratory animals, and complete the closed-loop research that could not be achieved using the experimental methods of the real physical world. The prospect of VR in developing superior simulations and virtual animals in the future was also discussed.

[Key words] Virtual reality; Open-loop control system; Closed-loop control system; Animal behavior; Virtual animals

动物行为是由过去经验、内部动机状态和外部环境线索相互作用形成的。对于生存至关重要的行为,

如喂养和社会互动, 还受到物种特定神经回路的遗传编码的影响。行为分析可为遗传学、生态学、神经科

[基金项目] 上海中医药大学课程建设项目“基于虚拟现实技术探讨医学实验动物学仿真教学平台建设”(编号: 2022SHUTCMKCJS103)

[第一作者] 张超超(1981—), 男, 硕士, 高级实验师, 主要从事实验动物研究。E-mail: stonezcc@163.com。ORCID: 0000-0001-6290-1240

[通信作者] 田雪松(1973—), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中医药防治脑、视网膜疾病研究。E-mail: xuesong.tian@shutcm.edu.cn。ORCID: 0000-0001-6162-2856

学、经济学到机器人科学等领域的科学进步提供有用信息^[1]。动物行为研究的起源可追溯到古希腊哲学家亚里士多德 (Aristotle)。1950 年代前后, Tinbergen、Lorenz 和 Von Frisch 等在自然和半自然条件下, 对动物的行为进行了长期的研究, 形成了动物行为分析和行为生态研究相结合的实验动物行为学, 他们特别强调室外 (野外、开放区域) 环境更适合观察真实的动物行为。然而, 在自然环境中进行动物行为学研究, 除容易受到外部因素的意外干扰外, 既耗时又昂贵。室内环境虽然提供了对实验条件的更多控制, 但是动物的一些自然行为在室内 (实验室、笼、盒) 环境中可能不会表现出来。一些模式动物已经成为室内动物行为实验的首选物种, 有证据表明它们在室内环境中也能很好地表现出自然行为, 例如斑马鱼、果蝇、大鼠、小鼠等^[2]。在医学上, 小型脊椎动物 (鱼或小鼠) 是首选实验动物, 因为它们能够表现出一些与包括人类在内的其他脊椎动物一致的基本行为特征, 在实验性药物试验期间, 可以通过密切监测它们的行为来研究疾病的进展, 并判断药物对它们行为的影响^[3]。

在自然条件下, 动物持续接受来自环境的感官刺激 (视觉、听觉、嗅觉、触觉等), 并且必须对其做出适当反应。室内实验经常使用模拟自然条件的人工感官刺激来激发实验动物的行为反应。根据刺激与实验动物之间有无“互动反馈”, 将动物行为实验分为“开环系统 (open-loop control system)”和“闭环系统 (closed-loop control system)”。当刺激独立于动物对刺激的反应, 即实验者根据动物在实验中的反应, 在实验结束后而不是在实验进行中调整刺激参数^[4], 这种方法被称为“开环系统”。“开环系统”亦称“无反馈系统”, 与之相对的是“闭环系统”, 即“反馈系统”。“开环系统”是指系统的输入影响输出, 但不受输出影响的系统。因其内部没有形成闭合的反馈环, 像是被断开的环, 故称为“开环系统”。而“闭环系统”研究动物行为的基本思想是根据动物的运动不断更新刺激, 刺激与实验动物之间实现“互动反馈”。在过去的很多年里, 科研人员一直努力试图解决这个问题, 直到虚拟现实 (virtual reality, VR) 及实时测量运动技术的出现为设计动物行为闭环实验提供了有力的技术支持。

VR 通常被定义为“人类可视化、操作及与计算机和极其复杂的数据交互的一种方式”, 具体地说, VR 可以被视为一种高级形式的人机界面, 它允许用户以自然的方式与计算机生成的环境“互动反馈”并“沉浸”在其中, 在用户眼中构建了一个三维的看似真实

的虚拟世界^[5]。近年来, VR 在科技领域中的应用呈现出爆发式增长, 与大多数技术进步一样, 被人们所接受, 已广泛用于机器设计、外科医生培训等, 并成功地作为生物实验室的一种实验工具, 用于改善使用动物模型的实验, 研究范围从实验动物行为研究发展到药物开发研究, 也许在将来的研究中 VR 会替代动物模型本身^[6-7]。

1 开环系统中的视觉刺激与动物行为

传统上视觉刺激实验在行为实验中具有重要作用, 其他感官刺激实验 (如听觉、嗅觉、触觉等) 由于技术条件的限制, 应用相对较少。视觉刺激实验是迄今为止规模最大、内容最多样化的工作, 常用的视觉刺激可以分为 4 种不同类型, 分别为静态刺激、抽象刺激、视频刺激以及 1990 年代末伴随 VR 发展产生的虚拟刺激^[2,8]。

静态刺激是行为实验中最早使用的一些刺激。刺激常常采用相关的动物, 它们被呈现为一个静态对象, 如动物的模型、图像等。例如, Tinbergen 等^[9]使用了成年海鸥的纸板模型来模拟海鸥雏鸟的乞讨行为, 雏鸟对模型的反应很自然, 就像向父母乞讨食物一样。Gyger 等^[10]利用捕食者模型研究了鸡的报警行为, 当鹰的模型在笼子上方移动时, 鸡发出警报声。科学家推测受试动物可能将静态模型视为真实动物, 并对其做出反应。此方法的主要优点是相同的刺激可用于不同的动物, 并且可以在不同实验之间修改其视觉特性, 可以控制刺激传递的时间和刺激的频率。但其主要局限是, 在刺激物和被测个体间没有互动反馈, 随着时间的推移, 个体会习惯于刺激, 并停止对刺激做出反应^[11]。

抽象刺激是设计一种简约但足以驱动动物行为决策过程 (如运动) 的刺激。常见的抽象刺激由原始几何形状 (如点和线) 设计的简单图案, 例如, 条纹或圆圈组成, 常用于研究视觉诱发运动。早期研究视动反应 (optomotor response) 和眼动反应 (optokinetic response) 的实验装置之一是由机械控制的刺激传递系统。它由一个放置动物的平台和一个环绕平台的圆筒组成, 圆筒内壁涂有条纹图案等抽象图案 (刺激物)。当电机驱动圆筒沿其中心轴旋转, 圆筒内平台上的动物通常表现出沿着旋转方向移动的倾向, 条纹图案的宽度、圆柱体的旋转速度和旋转方向也会对动物决策产生影响^[12]。此方法的主要优点是抽象刺激的实验相对容易设计, 其结果也可重复。主要缺点是生物体和

抽象图案之间没有互动反馈，受到机械限制，不适合进行大规模实验。

视频刺激通常是用摄像机来记录动物的活动，然后在实验过程中将录制的视频片段作为视觉刺激物，这种方法本质上是以逼真的照片为基础模拟真实的自然环境^[11]。这些实验在行为学文献中被称为视频回放实验。Jensse等^[13]利用视频回放设计了一个雌性蜥蜴的择偶实验，展示了雄性蜥蜴求偶时表现的影像，并报告说雌性蜥蜴确实对这种刺激做出了适当的反应。此方法推测动物不理解视频屏幕的概念，因此会以自然和本能的方式对所呈现的刺激做出反应。视频刺激具有一些明显的优势，可以描绘复杂的运动物体，可以按照设计顺次显示设定的行为。实验所需的相机和显示技术通常为商业化产品，这使得研究人员可以广泛使用这种方法。视频回放方法也有缺点：视频中的动物与真实动物没有充分互动，这可能会导致真实动物习惯化或非自然反应；另外，用于创建刺激的摄像头的采样率必须与动物的生理视觉特性相匹配，否则视频中的运动在动物看来可能会模糊、变色或扭曲。

虚拟刺激是对其他类型刺激的重大改进，是目前人工视觉刺激中级别最高的一类。该设置或多或少类似于视频播放方法，但刺激的内容是虚拟创建的，即使用计算机图形和动画技术生成刺激，用户可以配置精细的细节，这在原始视频刺激中通常是难以实现的，其最初动机是增加沉浸感并消除早期刺激方法的缺陷^[2]。例如，Ioannou等^[14]将小点投射到鱼缸内侧的半透明屏幕上，以模拟移动的虚拟猎物，捕食者——蓝鳃太阳鱼攻击这些投射物，就好像它们是真正的猎物一样。但是，虚拟刺激由于缺乏刺激物和受试动物之间的交互作用而受到限制。因此，不建议对相同的动物进行重复实验，因为它们会逐渐习惯刺激^[14]。

对于上述4种不同类型的视觉刺激，动物均做出了适当的反应，但是刺激与真实动物之间没有“互动反馈”，均属于开环实验。

2 闭环系统中的感官刺激与动物行为

虚拟刺激和实时跟踪方法的结合被认为是闭环（反馈）系统，即刺激根据动物的实时运动进行调整。因此，在虚拟刺激呈现期间对运动的密切跟踪及虚拟场景的实时更新至关重要^[15]。Hölscher等^[16]于2005年首次建立了啮齿动物的闭环视觉VR系统，其主要由2个关键部分，分别是全景显示器和球形跑步机，全景显示覆盖了啮齿动物的大部分视野，用以提供啮齿动

物视为互动环境的沉浸式视觉虚拟刺激；球形跑步机用于追踪测量啮齿动物的运动。迄今为止，该系统仍然是大多数啮齿动物VR设备的基础，基本步骤如下：将动物（头部固定或自由运动）放在球形跑步机上（通常是聚苯乙烯球，球放在一个铝碗里，铝碗的直径略大于球的直径，压缩空气从碗下方或碗内的多个气孔引导到碗中，气流支撑着球，使其漂浮在气垫上，并以几乎没有摩擦的稳定位置远离碗的内表面），动物面向360°环形投影系统；动物运动，使球（跑步机）运动旋转，并由位于跑步机附近的运动传感器（通常为1或2只光学计算机鼠标）测量，信号被输入计算机，计算机生成并更新虚拟场景^[17]。需要注意的是，头部固定或自由运动动物是目前啮齿类动物VR系统中两种主要配置，各有优缺点，即第一种模式更适用于脑成像研究，而第二种模式更适用于研究社交互动^[18-19]。

此外，VR可以通过以下策略，避免传统视频刺激时动物眼中模糊、变色或扭曲的运动：（1）选用曲面LCD屏幕；（2）改变照明条件或使用滤色器将显示屏上的颜色与动物的颜色感知相匹配；（3）控制刺激物的大小、显示器的亮度、周围环境以及参与图像形成的视网膜区域的亮度，降低动物的闪烁融合阈值；（4）使用透视校正。通过上述改进方法，尽量使虚拟刺激与动物的生理视觉特性相匹配。

在野外，许多哺乳动物，例如小鼠，主要依赖环境中的视觉线索来导航^[6]。这种视觉信息是一种逐渐积累的证据，动物可以从中学习，从而在其领域内为自己提供优势。Pinto等^[20]在Hölscher等建立的闭环视觉VR系统基础上搭建了虚拟T型迷宫，以此探究大脑如何逐渐积累视觉感官证据，这在传统行为研究中很难实现。基本步骤如下：头部固定的大鼠站在球形跑步机上，大鼠前方的屏幕上呈现出迷宫，大鼠运动使得球形跑步机运动旋转，前方屏幕出现不同的虚拟场景，此时大鼠仿佛置身于迷宫中奔跑，球的运动控制了大鼠在虚拟T型迷宫中的位置；当大鼠沿着迷宫中间向前奔跑时，它们看到迷宫两侧出现了外观简洁、高对比度的高塔（宽2 cm，高6 cm）；每当大鼠距离塔10 cm时，塔就会出现，200 ms后消失，并且这些高塔根据泊松统计（Poisson statistics）随机分布在每个试验中；选择塔出现最多一侧的T型迷宫臂时给予糖水奖赏，不正确的选择则导致播放错误提示音，除常规的3 s间隔外，还有9 s的视频暂停惩罚。研究迷宫中大鼠、小鼠的行为并不是神经科学领域的一项新实验，

但在VR环境中视觉刺激可以很容易地调节且形成“互动反馈”，确实有助于增进人们对空间学习和决策的理解及机制研究。

眼睛是人类“心灵之窗”，但胡须为啮齿类动物的内心活动提供了更好的途径。啮齿类动物是触觉灵敏动物，通过移动胡须来定位和识别附近的物体，并引导它们沿着墙壁和狭窄的隧道移动，它们用胡须探索环境的敏感性与人类指尖相似^[21]。Sofroniew等^[22]为头部固定的小鼠开发了一种闭环触觉VR系统，该系统由一个空气支撑的球形跑步机和两个活动墙壁组成，小鼠与墙壁之间的横向距离通过球形跑步机的运动进行闭环控制，用以模拟小鼠通过胡须与蜿蜒走廊墙壁的接触，如何沿着走廊导航。基本步骤如下：头部固定的小鼠站在球形跑步机的顶部，测量它们的运动并将运动转换为小鼠距离墙壁的位置关系；当小鼠在走廊中央时，它们的胡须只会碰到墙壁；如果小鼠向右跑，右边的虚拟墙壁就会离小鼠更近；当小鼠离开墙壁时，墙壁则移开。在此设置中，两面墙壁始终保持30 mm的固定距离，模拟固定宽度的走廊。为了模拟虚拟走廊的曲率，可相应地移动虚拟墙壁，使小鼠成功地操控球形跑步机在走廊中转弯。利用这种闭环触觉VR系统可研究桶状皮质通过触须-物体接触引导类似于墙壁跟踪行为中的重要作用。

所有运动的生物体都能对其周围空间分布的化学物质做出反应，比如配偶吸引、对特定气味的厌恶。但是一直以来很难阐明这种行为背后的神经生物学机制，主要原因在于传统动物行为实验过程中，从技术上几乎不可能在一定的时间、空间内及时有效地控制化学物质的浓度。为了克服这些技术困难，Radvansky等^[18]开发了一种闭环嗅觉VR系统，用于评估VR环境中小鼠嗅觉驱动的行为。该系统在确定精确时间和分布的在线预测算法及快速流量控制器的帮助下，通过气流系统分别泵入化学物质戊酸甲酯（泡泡糖味）、 α -萜烯（松脂味）、氧化戊酸甲酯（酸味），其气味通过小鼠的鼻子。通过该系统可以创建一个虚拟房间，提供精确的气味分布，用以探索虚拟环境。基本步骤如下：将小鼠（头部固定）放在空气支撑的球形跑步机上，面向5联面板显示器，连接气味装置的白色鼻罩在不接触小鼠鼻子的情况下尽可能深地包绕小鼠的鼻子，将光学计算机鼠标安装在球形跑步机前部的赤道处，作为运动传感器以记录小鼠俯仰和偏航速度，计算机读取光学鼠标信号，并更新虚拟场景。这一方法的建立为研究嗅觉驱动行为、多感觉整合的神经生

物学机制提供了可能。

听觉线索在动物导航中起着重要作用，尤其是当视觉系统无法检测到物体或捕食者时。尽管空间调制的声音在电影和视频游戏的环绕声系统中无处不在，并且声学空间线索在自然界中也无处不在，但听觉VR一直以来尚未被用于研究啮齿类动物的行为或神经回路。直到最近，Gao等开发了一种价格合理的闭环听觉VR系统，用于评估VR环境中小鼠听觉驱动的行为。该系统具有听觉标志，可以轻松配置各种声音刺激、虚拟轨迹参数、听觉标志位置和特征，以及奖励参数（例如舔舐依赖性、位置、奖励量、重复率等），在此系统中小鼠可以将新的声音刺激理解为不同的虚拟现实环境^[23]。基本步骤如下：头部固定的小鼠站在球形跑步机的顶部，将跑步机上的运动映射到环形虚拟环境，虚拟轨道的总长度为1.5 m。三个听觉标志（3 kHz、6 kHz、12 kHz纯音）位于等距离位置（即每个标志区距离50 cm，其中含25 cm的声音区和25 cm的静音区），随着动物接近和离开每个声音区（总共25 cm），声音响度先增大后减小。在声音区域之间，有3个25 cm的静音区域，其中每一个区域内有1个奖励区域。当小鼠在有3个听觉标志的虚拟环境中奔跑，在进入奖励区域之前，它们会进行预舔舐和适度的减速。并且小鼠对听觉标志的变化有着高度的意识，当熟悉的虚拟环境切换到一个新的环境时，舔舐行为发生了巨大的变化，然后当熟悉的虚拟环境被重新引入时，舔舐行为迅速恢复正常。尤其需要注意的是，此行为不同于标准的经典条件反射，因为小鼠通过运动主动控制他们听到的声音刺激而不是被动地接受刺激，也就是说“动物在虚拟空间中的运动控制着刺激的呈现”，从而实现声音刺激与实验动物行为之间的“互动反馈”。此外，Cushman等^[24]提出了视觉和听觉相结合的方法，以测试大鼠空间学习对多传感器信息的依赖性。

综上，VR系统将精确的实验控制与实验动物的复杂行为结合起来，完成了真实物理世界的实验方法不能完成的闭环实验，因此VR系统是分析实验动物行为的一个有效且强大的工具。然而，也有研究认为：（1）VR系统内的导航可能存在所谓静态虚拟现实系统中的虚假运动感，一些神经元的激活可能受到真实和虚拟现实刺激的不同调节^[25]；（2）由于图像处理、数据存储、图形绘制等每个计算步骤都会在系统中引入一个时间延迟，导致动物运动和显示器上刺激变化之间存在延迟，因此必须降低延迟，以便进行实时交互式实

验^[26]。虽然有一定局限性，但是VR系统依然提供了一种目前最先进的“闭环”工具来研究动物模型中的感知决策，从而增强人们对动物行为的理解。目前，在实验动物中进行的大多数闭环VR研究都只采用了视觉刺激，如果能够补充触觉、嗅觉或听觉线索的刺激将使动物的自然反馈回路越来越多，并可能生成更具说服力的高级模拟和更高的虚拟任务。因此，有研究人员设想，是否有可能建立一个能够精确复制真实动物的VR模型，乃至生成虚拟动物来替代传统动物模型^[4,6]？

3 高级模拟及虚拟动物

使用动物模型测试新药是几乎所有药物走向临床的关键组成部分。随着社会的不断发展进步，各国在动物福利立法上逐渐协调一致，提倡和推行动物实验的“3R原则”，即：替代（Replacement）、减少（Reduction）和优化（Refinement）。因此，有必要进行准确且比传统模型表现更好的临床前试验模型，以减少、完善并最终取代动物模型的使用。计算机模拟人体模型可能是一种更便宜、更快、争议更小的解决方案。目前已经开发出能够在药物试验中优于动物模型的计算机模拟，以预测药物诱发心律失常的临床风险^[27]。此外，已有研究通过建立定量结构活性关系计算机模型（quantitative structure-activity relationship）来预测、阐明化学物质的毒副作用及作用机制^[28]。

Brown等^[29]根据前期对海蛞蝓（sea-slug）大脑和行为的实验数据构建了一种能够模拟海蛞蝓饥饿水平和学习能力之间关系的虚拟海蛞蝓（cyberslug），该虚拟海蛞蝓接收感官输入，根据需求和记忆评估资源价值，然后输出运动功能，引导虚拟海蛞蝓避开或接近猎物。该模型不但为将来更复杂的人工智能的发展提供基础，而且可能为未来的动物行为研究带来变革式发展。

4 结语

综上所述，本文回顾了行为学研究的两种主要方法：“开环系统”中的视觉刺激与“闭环系统”中的感官刺激。与早期的开环研究相比，VR技术在提供互动的多模态的感官刺激方面具有独特的优势，目前已经成为研究动物感觉、认知和感觉运动控制的可靠工具。更为重要的是，研究人员可以利用从研究这些行为中获得的知识，设计智能传感器和多智能体人工智能乃至虚拟动物，为更复杂的人工智能的发展提供基础。

【作者贡献 Author Contribution】

张超超: 负责论文检索、整理与撰写;

田雪松: 提出方案, 负责文章思路、架构撰写及对全文内容进行修改指导。

【利益声明 Declaration of Interest】

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献 References】

- [1] ANN K. The what, how, and why of naturalistic behavior[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2022, 74: 102549. DOI: 10.1016/j.conb.2022.102549.
- [2] NAIK H, BASTIEN R, NAVAB N, et al. Animals in virtual environments[J]. *IEEE Trans Vis Comput Graph*, 2020, 26(5): 2073-2083. DOI:10.1109/TVCG.2020.2973063.
- [3] DENAYER T, STÖHR T, VAN ROY M. Animal models in translational medicine: validation and prediction[J]. *New Horizons Transl Med*, 2014, 2(1): 5-11. DOI: 10.1016/j.nhtm.2014.08.001.
- [4] DOMBECK D A, REISER M B. Real neuroscience in virtual worlds[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22(1):3-10. DOI:10.1016/j.conb.2011.10.015.
- [5] RIVA G, MALIGHETTI C, SERINO S. Virtual reality in the treatment of eating disorders[J]. *Clin Psychol Psychother*, 2021, 28(3):477-488. DOI:10.1002/cpp.2622.
- [6] SAWYER A, GLEESON A. Animal models and virtual reality[J]. *BioTechniques*, 2018, 65(2):55-60. DOI:10.2144/btn-2018-0104.
- [7] POPOV V V, KUDRYAVTSEVA E V, KUMAR KATIYAR N, et al. Industry 4.0 and digitalisation in healthcare[J]. *Materials (Basel)*, 2022, 15(6):2140. DOI:10.3390/ma15062140.
- [8] TARR M J, WARREN W H. Virtual reality in behavioral neuroscience and beyond[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(11):1089-1092. DOI:10.1038/nn948.
- [9] TINBERGEN N, PERDECK A C. On the stimulus situation releasing the begging response in the newly hatched herring gull chick (*Larus argentatus argentatus* pont.)[J]. *Behaviour*, 1951, 3(1):1-39. DOI:10.1163/156853951x00197.
- [10] GYGER M, KARAKASHIAN S J, MARLER P. Avian alarm calling: is there an audience effect? [J]. *Animal Behav*, 1986, 34(5):1570-1572. DOI:10.1016/S0003-3472(86)80229-9.
- [11] D'EATH R B. Can video images imitate real stimuli in animal behaviour experiments? [J]. *Biol Rev*, 2007, 73(3):267-292. DOI: 10.1111/j.1469-185x.1998.tb00031.x.
- [12] ABDELJALIL J, HAMID M, ABDEL-MOUTTALIB O, et al. The optomotor response: a robust first-line visual screening method for mice[J]. *Vis Res*, 2005, 45(11): 1439-1446. DOI: 10.1016/j.visres.2004.12.015.
- [13] JENSSEN T A. Female response to filmed displays of *Anolis nebulosus* (*Sauria*, Iguanidae)[J]. *Animal Behav*, 1970, 18:640-647. DOI:10.1016/0003-3472(70)90007-2.
- [14] IOANNOU C C, GUTTAL V, COUZIN I D. Predatory fish select for coordinated collective motion in virtual prey[J]. *Science*, 2012, 337(6099):1212-1215. DOI:10.1126/science.1218919.
- [15] THURLEY K, AYAZ A. Virtual reality systems for rodents[J]. *Curr Zool*, 2016, 63(1):109-119. DOI:10.1093/cz/zow070.
- [16] HÖLSCHER C, SCHNEE A, DAHMEN H, et al. Rats are able to navigate in virtual environments[J]. *J Exp Biol*, 2005, 208(Pt 3): 561-569. DOI:10.1242/jeb.01371.

- [17] THURLEY K, HENKE J, HERMANN J, et al. Mongolian gerbils learn to navigate in complex virtual spaces[J]. Behav Brain Res, 2014, 266:161-168. DOI:10.1016/j.bbr.2014.03.007.
- [18] RADVANSKY B A, DOMBECK D A. An olfactory virtual reality system for mice[J]. Nat Commun, 2018, 9: 839. DOI:10.1038/s41467-018-03262-4.
- [19] URSULA K, KAY T, KATJA F, et al. Spatial cognition in a virtual reality home-cage extension for freely moving rodents[J]. J Neurophysiol, 2017, 117(4): 1736-1748. DOI: 10.1152/jn.00630.2016.
- [20] PINTO L, KOAY S A, ENGELHARD B, et al. An accumulation-of-evidence task using visual pulses for mice navigating in virtual reality[J]. Front Behav Neurosci, 2018, 12: 36. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00036.
- [21] SOFRONIEW N J, SVOBODA K. Whisking[J]. Curr Biol, 2015, 25(4): R137-R140. DOI:10.1016/j.cub.2015.01.008.
- [22] SOFRONIEW N J, VLASOV Y A, HIRES S A, et al. Neural coding in barrel cortex during whisker-guided locomotion[J]. eLife, 2015, 4: e12559. DOI:10.7554/eLife.12559.
- [23] GAO S B, WEBB J, MRIDHA Z, et al. Novel virtual reality system for auditory tasks in head-fixed mice[J]. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2020: 2925-2928. DOI:10.1109/EMBC44109.2020.9176536.
- [24] CUSHMAN J D, AHARONI D B, WILLERS B, et al. Multisensory control of multimodal behavior: do the legs know what the tongue is doing? [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80465. DOI:10.1371/journal.pone.0080465.
- [25] LOPATINA O L, MORGUN A V, GORINA Y V, et al. Current approaches to modeling the virtual reality in rodents for the assessment of brain plasticity and behavior[J]. J Neurosci Methods, 2020, 335: 108616. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2020.108616.
- [26] FELDSTEIN I T, ELLIS S R. A simple video-based technique for measuring latency in virtual reality or teleoperation[J]. IEEE Trans Vis Comput Graph, 2021, 27(9):3611-3625. DOI:10.1109/TVCG.2020.2980527.
- [27] PASSINI E, BRITTON O J, LU H R, et al. Human In silico drug trials demonstrate higher accuracy than animal models in predicting clinical pro-arrhythmic cardiotoxicity[J]. Front Physiol, 2017, 8:668. DOI:10.3389/fphys.2017.00668.
- [28] GUPTA R, SRIVASTAVA D, SAHU M, et al. Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery[J]. Mol Divers, 2021, 25(3):1315-1360. DOI: 10.1007/s11030-021-10217-3.
- [29] BROWN J W, CAETANO-ANOLLÉS D, CATANHO M, et al. Implementing goal-directed foraging decisions of a simpler nervous system in simulation[J]. eNeuro, 2018, 5(1): ENEURO.0400-17.2018. DOI:10.1523/ENEURO.0400-17.2018

(收稿日期:2022-06-08 修回日期:2022-07-16)

(本文编辑:张俊彦,富群华,周培)

【引用本文】

张超超,田雪松.虚拟现实在实验动物行为分析中的应用进展[J].实验动物与比较医学,2023,43(1):73-78. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.078.

ZHANG C C, TIAN X S. Application of virtual reality in behavior analysis of laboratory animal[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 73-78. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.078.

科普小知识:《关于加强科技伦理治理的意见》中“3R”原则解析

2022年3月20日,中共中央办公厅、国务院办公厅印发了《关于加强科技伦理治理的意见》(简称《意见》),要求各地区各部门结合实际认真贯彻落实。《意见》在“科技伦理原则”部分明确提出要尊重生命权利,使用实验动物应符合“减少、替代、优化”等要求。

“替代(Replacement)、减少(Reduction)、优化(Refinement)”最早是在动物学家罗塞尔和微生物学家伯奇合著的《仁慈实验技术原理》(1959年)一书中提出,被称为“3R”原则。目前,“3R”原则已被国际科学界广泛认可,并且世界各国都在积极贯彻“3R”原则。

“代替”指使用低等级动物替代高级动物,或不使用动物而采用其他方法达到与动物实验相同的目的。替代方法包括:绝对替代,即用无生命系统如计算机程序来代替动物实验;相对替代,指用系统发育水平较低的动物取代脊椎动物等。

“减少”指为获得特定数量及准确的信息,尽量减少实验动物的使用数量。减少方法包括:使用恰当的实验设计和统计学方法计算出能满足科学要求所需最小动物使用量;尽量使动物一体多用,如将处死动物送外科手术实验,病理解剖的同时提供组织或器官;使用符合实验要求的高质量动物。“减少”依赖于对实验设计、统计方法的恰当应用以及对动物饲养和实验区域环境相关变量的有效控制。

“优化”指对必须使用的实验动物,应尽量减低非人道方法的使用频率或危害程度。“优化”的方法包括:选择对动物伤害少的实验方案;研发和采用对动物侵入性低的手术、样品或指标采集方法,如植入遥测芯片收集生理数据的方法;改善实验设施条件和优化操作技术,尽量减轻对动物的伤害。

“3R”原则在我国并不是首次被提出,早在2006年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》第六条就要求:善待实验动物包括倡导“减少、替代、优化”的“3R”原则,科学、合理、人道地使用实验动物。随后,国家标准《实验动物机构质量和能力的通用要求》(GB/T 27416—2014)和《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)都对开展动物实验中遵守“3R”原则提出了明确规定。

“3R”原则一方面保证了实验动物免受不必要的痛苦,另一方面保障了科学研究结果的准确性和可靠性。因此,广大科研人员要积极按照“3R”原则指导设计和开展动物实验研究。

(本刊特邀云学术编辑刘晓宇博士供稿)

基于江苏省实验动物行政许可现状的安全管理对策

漆重阳, 陈林, 艾曼, 徐航, 张厚森

(江苏省生产力促进中心, 南京 210042)

[摘要] 随着生命科学的快速发展, 实验动物在生物医药等众多领域中扮演着重要角色。近年来, 国家“放管服”改革不断深入, 实验动物行政管理部门愈加重视事中事后监管工作, 其中实验动物安全管理更是监管过程中的重点和难点。本文通过对近三年江苏省实验动物许可证情况、设施面积、生产和使用量、从业人员等信息进行分析, 结合近年来依法行政管理实际, 剖析实验动物生产和使用过程中管理制度、从业人员、设施运行、动物质量控制、意外伤害和人兽共患病、动物运输和废弃物处理等方面可能存在的安全风险隐患, 并介绍当前实验动物安全管理制度建设、日常管理服务以及事中事后监管清单等内容, 提出相关安全管理对策和建议, 希望能为进一步提升实验动物安全管理水平提供支撑。

[关键词] 江苏省; 实验动物; 风险隐患; 安全管理; 对策

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0079-07



Safety Management Countermeasures Based on the Status of Laboratory Animal Administrative Licensing in Jiangsu Province

QI Chongyang, CHEN Lin, AI Man, XU Hang, ZHANG Housen

(Productivity Centre of Jiangsu Province, Nanjing 210042, China)

Correspondence to: Zhang Housen (ORCID: 0000-0001-5824-1497), E-mail: jsuzhs@163.com

[ABSTRACT] With the rapid development of life science, laboratory animals play an important role in many fields, such as biomedicine. In recent years, the national reforms “to delegate power, streamline administration and optimize government services” continues deepen, the laboratory animals administrative departments have paid more attention to interim and post-event supervision, in which the safety management of laboratory animals is the key and challenging point in the supervision process. In this paper, the information regarding licenses for laboratory animals in Jiangsu, facility areas, animal production and usage, employees, and other information the past three years were introduced. Combined with legal administrative management in recent years, the potential safety risks in the production and use of laboratory animals were analyzed, such as risks in management systems, employees, facility operation, animal quality control, accidental injury and zoonosis, animal transportation, and waste disposal. Additionally, the current construction, daily management services, and the list of interim and post-event supervision of the laboratory animal safety management system were introduced. Based on this discussion, we proposed relevant safety management countermeasures and suggestions and provided support for further improvements to laboratory animal safety management.

[Key words] Jiangsu Province; Laboratory animals; Risk and hidden danger; Safety management; Countermeasures

随着我国生命科学不断进步、生物医药产业快速发展, 实验动物作为科技基础支撑条件之一, 得到各

级政府和科研人员的重视, 它们也被誉为“活的精密仪器”^[1]。当前, 随着新冠肺炎疫情防控常态化, 以

[基金项目] 江苏省实验动物协会科研课题“实验动物机构管理标准体系建立”(DWXH202107); 江苏省生产力促进中心青年人才基金“江苏省实验动物行业现状调查和发展途径研究”(Z2020002)

[第一作者] 漆重阳(1993—), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 实验动物管理。E-mail: jsqicy@163.com

[通信作者] 张厚森(1978—), 男, 硕士, 正高级工程师, 研究方向: 实验动物管理。E-mail: jsuzhs@163.com。ORCID: 0000-0001-5824-1497

及“生物安全法”的正式实施,实验动物安全管理也成为民众日常关注的焦点话题。近年来江苏省较好地执行了国家实验动物行政许可管理制度,依据2008年颁布的《江苏省实验动物管理办法》(省政府令第45号)相关规定,江苏省科学技术厅负责对实验动物生产和使用许可证的发放和管理^[2-3]。随着国家“放管服”改革的不断深入,江苏省始终坚持实验动物法制化、标准化、规范化、便民化管理^[4]。本文通过信息统计、调查研究等方式,分析江苏省实验动物行政许可现状,探究江苏省实验动物管理过程中可能存在的安全风险隐患,提出相应的安全管理对策,为江苏省实验动物科技工作长期安全稳定发展提供参考。

1 2019—2021年江苏省实验动物科技发展现状

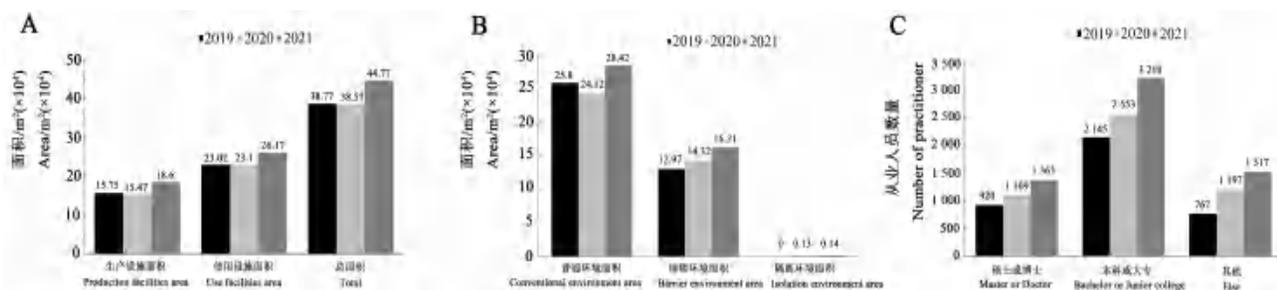
近年来,江苏省实验动物行业规模不断扩大,实验动物许可证数量、设施面积、生产和使用量、专职从业人员均位居全国前列^[5],较好地支撑了江苏省生物医药产业发展。

截至2021年底,江苏省有效期内实验动物许可证

353份(包含自贸试验区各片区许可证23份),其中实验动物生产许可证54份,使用许可证299份。实验动物工作单位193家,其中生产单位46家,使用单位170家,23家既是生产单位又是使用单位。相较于2020年,2021年江苏省实验动物许可证及许可单位数量均有增加^[5]。全省13个设区市均有实验动物工作单位,其中苏州、南京片区数量最多,分别是52家和50家,分别占26.9%和25.9%;由于2021年自贸试验区苏州片区许可证发放数量多于南京片区,苏州地区工作单位数量首次超过南京。

1.1 实验动物设施面积

近3年,江苏省实验动物设施规模总体呈上升趋势。2021年实验动物设施总面积达447 700 m²,由于新冠疫苗与药物研发对实验动物的需求增加,设施总面积同比上年增长16.1%,增速高于常年平均水平。按设施类型分:生产设施186 000 m²,使用设施261 700 m²,同比上年分别增长20.2%和13.3%(如图1A所示)。按设施环境分:普通环境设施284 200 m²,屏障环境设施162 100 m²,隔离环境设施1 400 m²,同比上年分别增长17.8%、13.2%和7.7%(如图1B所示)。



注: A图显示江苏省实验动物生产和使用设施面积; B图显示江苏省实验动物不同环境设施面积; C图显示江苏省实验动物不同学历从业人员数量。

Note: A, the area of laboratory animal production and use facilities in Jiangsu Province in 2019–2021; B, the area of laboratory animal facilities with different environments in Jiangsu Province in 2019–2021; C, the number of laboratory animal practitioners with different education levels in Jiangsu Province in 2019–2021.

图1 2019—2021年江苏省实验动物设施和从业人员情况

Figure 1 Laboratory animal facilities and practitioners in Jiangsu Province in 2019–2021

1.2 实验动物生产和使用数量

近3年,江苏省实验动物生产量总体呈增长趋势,2021年实验动物总生产量达415.8万只,同比上年增长23.5%。生产的实验动物种类主要有小鼠、大鼠、豚鼠、兔、鸡、犬、猪(小型猪)、猴、雪貂等,主要在省内销售,部分销售至省外和国外。目前新冠

疫苗与药物研发的任务紧迫,但受制于猴需求量激增、种群保护、价格飙升等原因,其总量逐渐减少;而犬、猪(小型猪)因符合试验条件且价格相对便宜,生产量同比上年大幅增长,分别为59.1%和57.1%,分别占实验动物生产总量的0.36%和0.29%^[5],如表1所示。

近3年,江苏省实验动物使用量总体同样呈增长趋势,2021年实验动物使用总量达320.36万只,同比上年增长39.3%。使用的实验动物品种主要有小鼠、大鼠、豚鼠、兔、鸡、犬、猪(小型猪)、猴、雪貂、仓鼠、猫等,主要从本省生产单位购买;部分动物如

仓鼠和猫等,因江苏省目前没有生产单位,主要从外省购买。其中小鼠、大鼠、豚鼠、猴的使用量同比上年增长相对较多,分别为21.1%、101.8%、51.1%和53.7%。鸡、猪(小型猪)、雪貂、仓鼠、猫等使用量同比变化不大^[5](表1)。

表1 2019—2021年江苏省实验动物生产和使用情况

Table 1 Production and use of laboratory animals in Jiangsu Province in 2019–2021

物种 Species	实验动物生产量/万只 Production of laboratory animals/ten thousand			实验动物使用量/万只 Use of laboratory animals/ten thousand		
	2019	2020	2021	2019	2020	2021
	小鼠 Mouse	250.41	289.56	343.83	111.47	158.63
大鼠 Rat	22.77	14.64	26.49	33.16	37.61	75.89
豚鼠 Guinea pig	12.72	15.10	25.91	11.06	15.27	23.07
兔 Rabbit	14.60	14.48	15.79	9.16	9.37	11.33
犬 Dog	1.04	0.93	1.48	1.09	1.49	1.92
鸡 Chicken	1.24	0.95	0.77	5.37	5.25	4.42
猪 Swine	0.86	0.77	1.21	0.33	0.95	0.56
猴 Monkey	0.31	0.27	0.24	1.05	1.23	1.89
雪貂 Ferret	0.15	0.10	0.08	0.01	0.01	0.01
仓鼠 Hamster	-	-	-	0.18	0.19	0.22
猫 Cat	-	-	-	0.03	0.03	0.03
总数 Total	304.10	336.80	415.80	172.91	230.03	320.36

1.3 实验动物从业人员

近3年,江苏省实验动物专职从业人员数量持续上升,2021年总量达6 090人,同比上年增长25.3%;其中技术人员3 634人,占总人数的59.7%;研究生以上学历1 363人,占总人数的22.4%,同比上年增长22.9%;大专本科学历3 210人,占总人数的52.7%,同比上年增长25.7%。随着实验动物设施质量不断提升,高学历专业技术人员数量较2020年保持快速增长(如图1C所示)。

近年来,江苏省实验动物设施趋向规模化、集群化发展^[5]。CRO机构、模式动物、仪器设备、笼器具、净化工程、专用垫饲料、实验动物玩具、耗材试剂等重点实验动物产业集聚于苏州、南京、泰州、无锡、南通等地。为进一步服务实验动物行业,苏州、无锡相继成立了实验动物协会,不断优化提升实验动物地方产业整体实力。由于受到新冠肺炎疫情的影响,以及地方政府产业发展政策各不相同,江苏省实验动物设施规模的地区差异化愈加明显,实验动物羊、树鼩、SPF级猪等的生产、使用标准化建设亟待完善^[5]。面对实验动物科学研究的不断深入和产业规模逐年扩

大,实验动物安全管理工作也将是行政许可管理过程中的重点内容。

2 实验动物安全风险隐患分析

江苏省实验动物工作单位涉及类型较多,有高校、医院、专业科研院所、企业及个体组织;涉及地域分布广,全省13个设区市均有分布;涉及行业较多,有教学科研、生产研发、检验检测、畜牧养殖等。因此,各地的实验动物安全管理水平参差不齐。近年来,通过多次实地走访、座谈研讨等方式,发现江苏省实验动物在管理过程中可能存在的安全风险隐患主要有以下几个方面。

2.1 管理组织制度方面

为深化落实国家“放管服”改革相关政策,江苏省逐步将实验动物“证照分离”改革范围扩大至全省,全面精简许可证申请材料,强化事中事后监管。但在核实过程中会发现,个别单位存在安全管理体系不健全,管理委员会和伦理委员会未能按要求履行职责,存在常年未实质性开展项目审查、督查工作,伦理审查前置性和内容完整性没有完全落实,存在事后补录

等行为；管理制度和操作规程部分脱离实际，缺乏可操作性，未能及时修订，制度规程的宣传、培训、执行不够全面等情况，这些问题将较大程度地影响相关研究工作科学有序开展。

2.2 从业人员管理方面

江苏省实验动物专职从业人员专科及以上学历所占比例超过75%，但从事一线实验动物饲养管理的从业人员学历普遍较低，多为跨行业就业，且流动性大，整体水平较低。其中很多从业人员对实验动物法律法规不熟悉，安全防护意识不足，应急处置培训和演练还有待加强。部分未取得许可证的高职院校、医疗机构等，对学生或员工的实验动物知识培训欠缺，教学实验中使用的动物来源不清或质量不能保证，这将直接影响从业人员的健康安全。

2.3 设施运行管理方面

合同研究组织（contract research organization, CRO）、检测机构以及具备良好实验室操作规范（good laboratory practice, GLP）等资质的单位，实验动物设施管理整体水平较高，但仍会有其他设施规模较小的单位存在较多问题。如未定期开展设施环境安全检查和隐患排查，运行记录台账不完整、不及时、不规范，存在造假和延时补录等情况。单位重点场所的安全警示标识缺失，废弃物暂存间等地未设置人员进出管理制度；应急物资配备管理不完善，部分物资已过期且未定时更换。普通环境设施存在防野鼠防蚊蝇措施不到位，缺少与外界的物理隔断；屏障环境设施空调通风过滤系统未定期检修，运行效果难以持续满足国家标准要求等。

2.4 动物质量控制方面

江苏省主要通过通过对实验动物引种、人员准入、饲养繁育、环境控制、质量抽检等环节进行监管，有效保障动物质量达到合格标准。但也发现个别单位存在相关问题，如：未定期对设施环境和动物质量进行监测，相关自检能力不足或落实不到位；对实验动物饲养过程中笼器具、垫料饲料、饮用水设备等卫生状况不够重视；由于种子中心供种价格相对较高等因素，部分犬、猪等大动物的引种来源存在问题；部分饲养人员专业能力培训不到位，导致SPF级大鼠小鼠的微生物控制存在一定难度；在无证或不合格的设施环境中违规饲养实验动物，存在较大的生物安全风险隐患^[6]。

2.5 意外伤害和人兽共患病方面

在实验动物生物安全管理过程中，意外伤害和人

兽共患病一直是风险隐患排查治理的重点。常见的意外伤害主要包括被动物咬伤、抓伤，被注射器等实验器具刺伤、划伤，药物接触引发皮肤、黏膜伤害等^[7]。在科学研究和教学过程中，部分从业人员存在违规使用未经合格检疫、来源不清的实验动物，如果人员防护不到位，出现意外伤害或其他不当操作，就会存在人员感染人兽共患病的风险。常见人兽共患病主要包括流行性出血热、弓形虫病、淋巴细胞脉络丛脑膜炎、布鲁菌病、狂犬病、猴B病毒感染等^[8-9]。

2.6 动物运输和废弃物处理方面

江苏省实验动物生产单位达40多家，生产管理水平参差不齐，部分规模相对较小的生产单位，存在动物运输车辆和包装设备较落后，不同种类动物混合运输或交叉运输，动物运输车辆灭菌消毒不充分，运输和接收环节动物福利和污染控制不足等情况。此外，随着江苏省实验动物工作单位和实验动物生产使用数量逐渐增加，面对每年高达几百万只的实验动物尸体及其他废弃物，大部分辖区有资质的废弃物处置单位只有一家，保障能力不够，供需矛盾突出，这也导致部分实验动物工作单位存在实验动物尸体及废弃物处理不及时、不规范等情况。

3 实验动物行政许可安全管理举措

近年来，根据“管行业必须管安全、管业务必须管安全、管生产经营必须管安全”的原则，江苏省通过建立完善的实验动物安全管理制度机制，开展实验动物安全日常管理服务，构建实验动物事中事后监管清单等工作，强化全省实验动物安全管理力度，不断提升实验动物安全管理的能力和水平。

3.1 完善实验动物安全管理制度建设

安全管理制度建设是实验动物安全稳定发展的重要保障。近年来，江苏省通过多次实地调研和组织专家论证，对《江苏省突发实验动物生物安全事件应急预案》进行了修订和完善，对应急事项中的职责、分级等内容做了进一步的明确，能够更好地适应江苏省实验动物生物安全应急管理的实际需要。此外，依据实验动物安全管理相关规定，结合管理过程中发现的具体问题，研究编制的《实验动物安全指导手册》，涵盖了实验动物安全生产管理要点和相关要求，为全省实验动物工作单位安全管理提供指导。为了能及时准确地获知实验动物工作单位紧急情况，通过建立24 h热线电话报送机制，进一步加强和完善省级层面的安全管理制度和信息快速传递机制建设。

3.2 强化实验动物日常管理服务措施

不断细化落实管理举措也是保障实验动物安全管理重点。根据《江苏省突发实验动物生物安全事件应急预案》，江苏省常态化组织和指导各辖区开展实验动物生物安全应急演练和培训活动，充分展示突发实验动物生物安全事件的监测预警、应急处置等关键环节，旨在进一步提升实验动物工作单位安全管理和应急处理能力。江苏省实验动物管理委员会办公室多次联合无锡市实验动物协会举办“生物安全二级动物实验室建设与管理学术研讨会”等。同时，通过适时发布加强安全管理的通知，明确安全管理重点和责任主体，更好地助力各实验动物工作单位提高安全生产意识，树牢安全底线思维，压实安全生产责任，全力保障生命和财产安全，确保各项措施落地见效。另外，深入开展实验动物安全排查和隐患整治，不留盲区死角，做到标本兼治。在宣传培训和调研监管方面，江苏省重点开展4.24“世界实验动物日”期间的安全科普宣传，常态化组织从业人员生物安全技能标准化培训；联合省教育和省卫生健康部门对无证使用实验动物的院校和医院等进行调研监管，联合省林业部门开展实验动物猴“双随机、一公开”监管等，进一步强化实验动物安全管理服务。在许可审批考核、质量抽检、许可证年检和绩效考评等日常许可监管方面，逐步实现实验动物安全重要节点排查工作常态化，不断强化实验动物安全管理措施。

3.3 构建实验动物事中事后监管清单

2019年，江苏省科学技术厅印发加强实验动物行政许可事中事后监管工作的实施办法^[10]，不断推进实验动物管理向服务型、开放型、精细化转变，加快构建权责明晰、透明高效的事中事后监管机制，重点针对实验动物许可证管理及基本信息变更情况、基本制度建立落实情况、管理队伍及从业人员情况、设施使用及环境质量控制情况、动物质量控制及福利保障情况，以及其他违规开展实验动物生产、使用等情况，构建实验动物事中事后监管清单，妥善处置多项虚假网络宣传、无证使用动物举报等事项，努力为全省生命科学研究和生物医药产业发展提供高质量的实验动物支撑。

4 实验动物安全管理思考与建议

实验动物安全工作是实验动物许可审批和事中事后日常监管的重中之重，在实验动物管理的多个环节都有所要求和体现。实验动物安全除常规的消防、设

备运行等安全外，还存在影响因素较多、不易觉察的生物安全问题，这些易突发、不可预测且技术要求较高的安全风险隐患，会对江苏省实验动物安全管理造成一定的困难。结合管理实际，就主管部门及实验动物工作单位进一步加强实验动物安全管理，现提出相关思考与建议。

4.1 完善实验动物安全的全周期全过程管理

在国家及省级实验动物法律、法规和制度修订中，实验动物全流程溯源管理将是安全管理规范的重点之一。在许可证申请和年检工作中，主管部门需进一步完善政务管理与服务系统实验动物管理部分模块建设，优化实验动物生产、销售、运输、饲养、实验、废弃物处置等信息化管理，实施全流程、全周期监管。实验动物生产单位需建立人员安全准入机制，相关院校进一步规范实验动物教学培训工作，严格执行实验动物质量管理要求；对实验动物环境和设施进行严格的消毒、灭菌，定期组织开展实验动物质量检测。实验动物使用单位需严格遵守实验动物使用管理制度，建立严格的防护措施，配备人员防护装备，确保实验人员安全；严把实验动物来源关，所使用的实验动物必须来源于取得实验动物生产许可证的单位；实验动物运输、废弃物处置应符合安全管理要求，严禁将使用后的实验物流入消费市场。

4.2 强化实验动物设施风险隐患排查和治理

传统安全管理往往基于事故发生后，被动地进行补救，存在管理方式松散、滞后问题。实验动物工作单位需从上到下全员提高实验动物安全管理认知和重视程度，针对设施安全责任落实、消防安全管理、仪器设备安全管理、化学品安全管理、动物实验及特殊动物实验（放射性、感染性、化学毒性及其他）安全管理、动物尸体及其他废弃物无害化处理、生物安全应急预案制定与相应的工作人员和物资配备、实验动物福利伦理保障、工作人员安全防护等情况，定期进行风险隐患排查和治理，保障设施安全、稳定运行。在此基础上，主管部门利用年检等事中事后管理，对实验动物工作单位落实情况进行检查。

4.3 强化实验动物生物安全管理

随着实验动物用于病原性研究愈加频繁，生物安全问题逐渐凸显，有些生物安全事件也会很严重^[11]。实验动物工作单位需按照国家及江苏省相关生物安全管理规定，建立健全实验动物安全管理制度，采取有效措施，预防和控制实验动物感染，防止可能危及公共卫生安全、生态安全及人体健康的实验动物流失及

病原体泄漏。特殊动物实验应在符合安全标准的实验设施和设备内进行,并按照生物安全等级和其他有关规定进行分类管理。科技部门可加强与农业农村、卫生健康等相关部门的联系,进一步开展动物生物安全二级实验室(ABSL-2)备案管理研讨,协助和指导实验动物工作单位做好生物安全管理工作。鼓励实验动物工作单位根据实验动物生产使用种类,制定相应动物疾病和人兽共患病防护和管理制度,细化和完善实验动物生物安全管理措施,并确保能落实到位。

4.4 提高安全应急和保障能力

科学的应急管理举措可有效保障实验动物从业人员生命和财产安全,维护实验动物工作单位正常生产、使用秩序,确保实验动物工作单位持续安全稳定。实验动物工作单位、各级管理部门需建立健全应急工作预案,强化应急响应和处置工作措施,配置相应的保障条件,每年至少组织一次可操作性强、实战性高的应急演练。如单位发现实验动物染疫或者疑似染疫的,立即报告当地科技部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构等,并启动应急预案,采取隔离等控制措施防止疫情扩散。接到动物疫情报告的相关单位,应及时采取必要的控制处理措施,并按照国家及江苏省规定的程序上报。各有关部门、实验动物工作单位经常性组织开展实验动物质量、生物安全、应急处置等相关的技能培训和宣传普及活动,加强警示教育,强化安全意识。

4.5 建立安全管理监督体系

政府部门主导的安全管理监督是实验动物安全稳定的有力保障。省级科技部门需持续将实验动物安全监管作为年度“双随机、一公开”监管工作的重要内容。结合年度“双随机、一公开”监管和实验动物质量抽检情况,制定实验动物工作单位日常运行管理考核指标体系,可联合教育、生态环境、农业农村、卫生健康、海关、药监、林业等部门对实验动物工作单位开展现场调研,根据调研结果建立全省实验动物工作单位分级管理体系,逐步实现安全管控内部分级,并重点筛查安全管理问题突出的实验动物工作单位,做好事中事后监管工作。各辖区部门可根据本行政区域内实验动物工作实际,抓好实验动物安全属地管理工作,针对性地制定实验动物安全管理具体举措。

4.6 建设安全管理信息平台

科学全面的政务系统建设是实验动物行政许可高效稳定的基础。江苏省可在政务管理与服务系统的实验动物管理部分设立安全管理模块,实验动物工作单

位可及时在线上进行填报,更新单位安全人员信息以及单位安全管理制度、人员物资、应急演练等保障情况。督促实验动物工作单位做好压实实验动物安全工作主体责任、完善落实管理制度及操作规程、保障实验动物福利伦理、开展科普宣传及安全培训、定期开展各项安全自查自纠、建立健全实验动物安全应急处置管理、主动接受监督等工作,并线上签署实验动物安全生产承诺书,将每季度自查自纠结果及时上传系统,协助推进“互联网+监管”平台建设。

5 结语

实验动物科学技术是生命科学发展和健康中国建设的基础支撑条件。近年来,江苏省实验动物工作在行业发展、疫情防控、管理创新、人才培养等方面发挥着重要的支撑作用。随着国家“放管服”改革的持续推进,以及设施规模逐年增长,江苏省实验动物安全管理工作依旧是任重道远。本文通过对实验动物安全风险隐患进行初步分析,提出相关思考和对策,旨在为政府行政管理决策以及实验动物相关单位开展安全管理提供参考。相信在政府政策正确引导和广大从业单位与人员不断努力下,实验动物行业必将持续、安全、稳定发展。

[作者贡献 Author Contribution]

漆重阳: 检索文献,撰写论文;
陈林、艾曼、徐航: 整理数据,修改论文;
张厚森: 审核研究方案及论文。

[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] 李冠民, 邹大挺. 我国实验动物工作进展[J]. 实验动物科学与管理, 2001, 18(1):45-49. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2001.01.015. LI G M, ZOU D T. Progress in laboratory animal work in China [J]. Lab Anim Sci Adm, 2001, 18(1): 45-49. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2001.01.015.
- [2] 中华人民共和国科学技术部. 实验动物许可证管理办法(试行): 国科发财字〔2001〕545号[A]. 2001. Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Measures for the administration of laboratory animal licenses (for trial implementation): Guo Ke Fa Cai Zi〔2001〕No. 545[A]. 2001.
- [3] 江苏省人民政府. 江苏省实验动物管理办法: 省政府令第45号[A]. 2008. Jiangsu Provincial People's Government. The laboratory animal management measures of Jiangsu Province: provincial government order No. 45[A]. 2008.
- [4] 杨艳红, 陈林, 张厚森, 等. 江苏省实验动物行政管理现状及对策

- [J]. 中国科技资源导刊, 2020, 52(3):37-40.
YANG Y H, CHEN L, ZHANG H S, et al. Current situation and countermeasures of laboratory animal administration in Jiangsu Province[J]. China Sci Technol Resour Rev, 2020, 52(3):37-40.
- [5] 陈林, 艾曼, 徐航, 等. 江苏省实验动物行政许可现状[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(4):284-289.
CHEN L, AI M, XU H, et al. Current status of administrative licensing for laboratory animals in Jiangsu Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(4):284-289.
- [6] 彭华松, 徐汪节, 刘闯, 等. 国内高校实验动物安全管理的调查研究与思考[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(3):598-602. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2019.03.37.
PENG H S, XU W J, LIU C, et al. Investigation and consideration of safety management for laboratory animals in Chinese universities[J]. Chin J Vet Sci, 2019, 39(3):598-602. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2019.03.37.
- [7] 刘丽艳, 韩艳梅, 李文超, 等. 实验动物潜在生物安全威胁及降低风险的建议[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(2):264-266, 278. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.064.
LIU L Y, HAN Y M, LI W C, et al. Potential biosafety threats of laboratory animals and suggestions for risk reduction[J]. Exp Technol Manag, 2020, 37(2):264-266, 278. DOI:10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.064.
- [8] 胡小林. 实验动物生物安全风险及管理对策[J]. 畜牧兽医学报 (电子版), 2019(6): 26-27. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3637.2019.06.015.
HU X L. Animal biological safety risks and management countermeasures[J]. Graziery Vet Sci Electron Version, 2019(6):26-27. DOI:10.3969/j.issn.2096-3637.2019.06.015.
- [9] 谢忠忱, 江秩, 黄开胜, 等. 高校实验动物生物安全管理模式研究[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(2):1-5. DOI:10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.001.
XIE Z C, JIANG Y, HUANG K S, et al. Research on laboratory animal biosafety management model in colleges and universities[J]. Exp Technol Manag, 2020, 37(2):1-5. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.001.
- [10] 江苏省科学技术厅. 加强实验动物行政许可事中事后监管工作的实施办法(修订版): 苏科技规〔2019〕330号[A/OL]. (2019-12-11) [2022-0601]. http://std.jiangsu.gov.cn/art/2019/12/11/art_82571_10218106.html.
Jiangsu Provincial Department of Science and Technology. Implementation measures for strengthening operational and post-operational oversight of administrative license laboratory animals (revised version): Su Ke Ji Gui〔2019〕No. 330[Z]. (2019-12-11) [2022-0601]. http://std.jiangsu.gov.cn/art/2019/12/11/art_82571_10218106.html.
- [11] 魏强. 动物实验中的生物安全问题[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6):75-78. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.019.
WEI Q. Biosafety issues in animal experiments in China[J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(6):75-78. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.019.

(收稿日期: 2022-06-09 修回日期: 2022-09-27)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 周培)

【引用本文】

- 漆重阳, 陈林, 艾曼, 等. 基于江苏省实验动物行政许可现状的安全管理对策[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):79-85. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.083.
QI C Y, CHEN L, AI M, et al. Safety management countermeasures based on the status of laboratory animal administrative licensing in Jiangsu Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1):79-85. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.083.

《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)

动物实验研究报告的国际指南 ARRIVE 2.0 介绍 及期刊实施计划

张俊彦¹, 刘晓宇², 李 垚³, 陈国元⁴, 卢 晓⁵, 白 玉⁶, 卢选成², 庞万勇⁷, 吴宝金⁴

(1. 上海实验动物研究中心《实验动物与比较医学》编辑部, 上海 201203; 2. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206; 3. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025; 4. 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; 5. 迪哲医药股份有限公司, 上海 201203; 6. 北京诺和诺德医药科技有限公司, 北京 102206; 7. 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] 动物实验在生物医药科学研究过程中发挥着重要作用, 是基础医学向临床医学转化的必要途径。动物实验研究及报告的规范性决定了研究结果的可靠性和可重复性, 也是其研究成果能够向临床试验转化应用的关键。针对如何更加规范地设计、实施动物实验, 撰写动物实验报告, 以及发表相关学术论文, 《实验动物与比较医学》期刊从2023年起推出“比较医学研究及报告规范”专栏, 重点推介并解读实验动物与比较医学相关的国际通用规范, 如ARRIVE 2.0等。本文对动物实验研究报告的国际指南ARRIVE 2.0的制定和使用、基本内容和优先级别, 以及国际生物医学期刊实施ARRIVE 2.0指南的计划方案进行了重点介绍, 并说明《实验动物与比较医学》期刊遵循ARRIVE 2.0指南的目前情况及未来计划。动物实验医学研究及报告遵循ARRIVE 2.0指南等国际规范是助推我国实验动物科学与生物医药学高质量发展的重要动力之一, 也是落实3R原则和提高实验动物福利强有力的一种手段, 广大科研工作者和期刊工作者均应该高度重视并积极践行。

[关键词] 动物实验; 研究设计; 论文发表; ARRIVE 2.0指南; 生物医学期刊

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** E **[文章编号]** 1674-5817(2023)01-0086-09



Introduction to the International Guide for Animal Research Reporting ARRIVE 2.0, and Its Implementation Plan in the Journal

ZHANG Junyan¹, LIU Xiaoyu², LI Yao³, CHEN Guoyuan⁴, LU Xiao⁵, BAI Yu⁶, LU Xuancheng², PANG Wanyong⁷, WU Baojin⁴

(1. Editorial Office of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 2. Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 3. Department of Laboratory Animal Science, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 4. Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China; 5. Dizal Pharmaceuticals Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 6. Novo Nordisk Research Centre China, Beijing 102206, China; 7. Translational In Vivo Model Research Platform, Sanofi G&D, Beijing 100022, China)

Correspondence to: LI Yao (ORCID: 0000-0002-6263-4549), E-mail: yao.li@shsmu.edu.cn;

WU Baojin (ORCID: 0000-0002-9768-8862), E-mail: baojin.wu@sibcb.ac.cn

[ABSTRACT] Animal experiments play an important role in the process of biomedical research, and is a necessary way to transform basic medicine into clinical medicine. The standardization of animal experimental studies and reports determines the reliability and reproducibility of research results, and is also the key to transforming the results of animal experiments into clinical trials. In view of how to design

[第一作者] 张俊彦(1979—),女,硕士,副编审,研究方向:医学期刊出版。E-mail: callar_zhang@163.com;

刘晓宇(1979—),女,博士,副研究员,研究方向:实验动物伦理。E-mail: liuxy@niohp.chinacdc.cn

[通信作者] 李 垚(1979—),男,博士,副研究员,研究方向:发育生物学及实验动物学。E-mail: yao.li@shsmu.edu.cn. ORCID: 0000-0002-6263-4549;

吴宝金(1969—),男,博士,研究员,研究方向:小鼠遗传学和人类疾病动物模型。E-mail: baojin.wu@sibcb.ac.cn. ORCID: 0000-0002-9768-8862

and implement animal experiments, write animal experiment reports, and publish relevant academic papers in a more standardized way, LACM (*Laboratory Animal and Comparative Medicine*) has launched a new column of comparative medical research and reporting standards from 2023, focusing on the introduction and interpretation of international general norms related to laboratory animal and comparative medicine, such as ARRIVE 2.0 guidelines (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments). This article focuses on the development and application, basic content and priority of ARRIVE 2.0, as well as the scheme of implementing ARRIVE 2.0 guidelines in international biomedical journals, and explains the current situation and future plans of LACM following ARRIVE 2.0 guidelines. The research and report of animal experimental medicine following the ARRIVE 2.0 guidelines and other international norms is one of the important driving forces to promote the high-quality development of experimental animal science and biomedicine in China, and also a powerful means to implement the 3R principle and improve the welfare of laboratory animals. Through this article, we hope the majority of scientific researchers and editors will attach great importance and actively implement these international standards.

[Key words] Animal experiment; Research design; Publication of research papers; ARRIVE 2.0 guidelines; Biomedical journal

近半个世纪以来, 实验动物在生物医药科学研究中发挥着越来越重要的作用, 被公认为是难以替代的“活的试剂”^[1]、“活的精密仪器”^[2]。尤其是以实验动物为基础, 对人类各种疾病进行类比研究的现代比较医学, 发展到后基因组时代的今天, 实验动物模型人源化或类人化的需求越来越高^[3], 从实验动物的选择和模型的建立, 到实验方案的设计和实施, 都需要更加符合规范性和可重复性的要求, 因为这决定着动物实验研究成果是否能进一步向真正有益于人类的临床试验研究转化。同时, 动物实验研究报告的完整性、准确性和透明性也直接影响着读者对该研究结果及其质量的客观判断, 最终决定着动物实验研究成果的可信度和转化率。为此, 国际学术界针对动物体内研究及报告制定了多份推荐规范性文件, 以提高动物实验医学研究的质量和价值。

近年来, 有关动物体内实验研究及报告的规范性, 包括实验动物福利伦理、动物体内实验结果转化等, 越来越受到业界关注; 由于规范化偏离而引起的国际期刊撤稿情况层出不穷^[4-5]。国内有学者调研分析发现, 目前一些期刊已发表的部分动物实验研究在其设计、实施和论文撰写等方面均存在不同程度的缺陷, 尤其是描述不充分、不完整、不透明的问题比较突出, 使读者无法客观、准确地评估其真实性和学术价值^[6-8]; 而且国内研究人员和期刊工作者对动物实验相关国际规范的知晓率均较低, 实际应用率更低^[9-11]。因此, 系统性地普及、推广相关国际规范, 研究制定中国化的动物体内研究及报告指南, 可提高我国动物

实验研究及论文发表水平, 促进我国实验动物科研成果及论文被科学共同体充分评估、认可和利用。

综上, 本刊从2023年起新开辟一个特别专栏, 邀请业界知名专家编译或解读实验动物与比较医学相关的国际通用规范, 旨在帮助国内从事实验动物研究以及更广泛地利用实验动物(或实验用动物)进行生物医药科学研究的工作者, 提高动物体内研究方案设计、操作实施及论文写作的规范性和质量, 扎实推进我国实验动物与比较医学的高质量发展。本专栏的首期计划是针对国际实验动物领域内著名的ARRIVE 2.0指南进行中文编译和解读, 将于今年分期刊发。现将ARRIVE 2.0指南的基本情况, 以及国际期刊和本刊实施该指南的具体计划介绍如下。

1 ARRIVE 2.0指南的制定和使用

ARRIVE 全称为 *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*, 即《动物研究: 体内实验的报告》, 是由英国国家研究用动物替代、优化和减少中心(National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, NC3Rs)(网址为 <https://www.nc3rs.org.uk/>) 提供基金支持并组织多学科专家拟订的一份旨在指导动物实验研究和实验设计、提高动物实验报告规范性的国际指南^[12]。

ARRIVE 指南相继发表过两个版本, 其中ARRIVE 2.0是在2010年版本的基础上进一步优化后制定的最新版, 2019年发布于生命科学预印本平台BioRxiv(因此又被称为ARRIVE 2019), 2020年正式

发表于 *PLoS Biology* 期刊^[13-15]。ARRIVE 2.0 指南拟订者共 28 位，分别来自英国、美国、加拿大、澳大利亚、德国、瑞士的 25 个相关单位，他们的身份既有大学、研究机构和生物医药公司的研究人员，也有基金资助方、学术期刊编辑（包括主编），以及方法学家、统计学家和实验动物福利专家等。因此，该指南的制定过程审慎地考虑和采纳了实验动物和生物医药科学界尽可能广泛的意见和建议，也包含了来自其他外部利益相关方的意见和建议，是广泛国际协作的结果，具有很强的科学性和实用性。

ARRIVE 2.0 指南自发布即被科学界公认为是最值得借鉴和遵循的国际规范之一，适用于任何与活体动物相关的研究，包括从哺乳动物到鱼以及无脊椎动物的生命科学全链条。该指南主要是为了解决动物实验研究结果的可重复性问题，这也是科学家、基金资助方和政策制定者极为关注的一个重要问题。以往的动物实验研究结果在发表时常缺乏重要信息，不利于人们对研究方法和结果的充分评估。只有透明和准确的报告才是研究可重复性的基石。所以，遵循该指南可以提高动物实验研究的透明度，使得动物体内研究报告可以被更有效地评估，从而为未来的进一步研究、政策制定和临床实践提供可靠的指导信息。

ARRIVE 2.0 指南可以指导整个动物实验研究过程，包括：(1) 在动物实验研究的计划阶段，对活体动物实验的科学设计、减少偏倚、样本量估算以及统计分析等方面提供建议，以帮助研究人员设计严谨和可靠的实验方案；(2) 在动物实验研究的实施阶段，指导研究人员将研究方法有关的重要信息完整、准确地记录下来，这些信息将在后期报告撰写时发挥重要作用；(3) 作者撰稿阶段，可以作为备忘自查清单，确保报告包含了所有的相关信息并规范表述；(4) 期刊审稿阶段，可以作为期刊编辑及同行评审专家的审稿清单，确保所有重要信息都被关注到，以客观评价该研究的学术价值。

在 NC3Rs 提供的 ARRIVE 指南网站 (www.ARRIVEguidelines.org) 上可以找到使用 ARRIVE 2.0 的相关资源，包括：(1) 对指南中每个条目进行的解释与说明，包括该条目设立的理由和证据，对动物实验研究的广泛性建议，以及已发表文献中良好报告的清晰示例；(2) 可供填写的两种 ARRIVE 2.0 清单，一种是 ARRIVE 2.0 关键 10 条，另一种是完整的 ARRIVE 2.0 清单，能够使研究人员清楚每个条目的相关信息在稿

件中的具体位置，也便于期刊可以根据实际需求采纳适合的清单；(3) ARRIVE 支持方信息，包括学术期刊、基金资助方、科研机构和其他组织如何能够使用和推广本指南的相关信息。需要说明，ARRIVE 指南的版权完全开放，目前已有多种语言版本，便于国际上更多人能够使用并推广该指南。

2 ARRIVE 2.0 指南的内容和优先级别

ARRIVE 2.0 指南的简要内容即是一份指导动物实验研究报告写作的规范性清单，包括 10 项关键条目（共 22 个亚条目）和 11 项推荐条目（共 16 个亚条目）；详细内容则包括具有更多背景信息的解释与说明性文件，以及详细的实例解读，以确保该指南可以在实践中被充分理解和应用。ARRIVE 2.0 的英文简版^[15]和完整解读版^[16]均于 2020 年发表在 *PLoS Biology* 期刊。本刊即将推出的是在 ARRIVE 2.0 英文完整解读版基础上进行编译的汉化版，其中某些实例会稍作调整，以更加适用于中国的动物实验科研实践。

为了确保最关键的问题最先被关注到，ARRIVE 2.0 指南按优先级（重要性）将清单条目划分为两部分，即关键 10 条（表 1）和推荐 11 条（表 2），但每一部分中各个亚条目之间没有等级之分。其中，关键 10 条是每篇动物体内实验报告都需要包含的基本的最小信息集合，如果没有这些信息，读者和同行评审专家将无法全面评估该研究结果的可靠性；而推荐 11 条是对关键 10 条的进一步补充，增加了动物体内研究中一些重要的背景性内容。ARRIVE 2.0 指南强调，在动物实验研究报告中最好能充分报告两部分的完整内容。

3 国际期刊对 ARRIVE 2.0 指南的实施方案

目前，ARRIVE 2.0 指南已经被国际医学期刊广泛采纳，例如：国际医学期刊编辑委员会（International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE）和提高生物医学研究质量和透明度（Enhancing the Quality and Transparency of Health Research, EQUATOR）协作网均认可和推荐 ARRIVE 指南；Springer Nature 和 Wiley 等国际知名学术出版集团旗下期刊均在使用 ARRIVE 2.0 指南；而且 MEDLINE 数据库在遴选收录期刊时也明确要求“期刊的伦理政策应清晰陈述、可见，并与最佳实践一致”，期刊和作者均应遵照 ARRIVE 2.0 指南以提高论文质量^[11,14]。

国际期刊为支持研究人员利用 ARRIVE 2.0 指南完

表1 国际指南ARRIVE2.0的关键10条

Table 1 10 key points of international guide ARRIVE 2.0

编号 No.	项目 Item	具体内容 Content
1	研究设计	对于每个实验, 给出简要的研究设计细节。包括: a) 比较的组别, 含对照组。如果没有对照组, 应阐明理由; b) 实验单元(如: 以单只动物、一窝动物或一笼动物为单元)
2	样本量	a) 详细说明分配给每个实验组的确切实验单元数量, 以及每次实验的实验单元总数。整个实验使用的动物总数也需要说明; b) 解释样本量是如何决定的。如已计算样本量, 需提供任何预先计算的细节
3	纳入和排除标准	a) 描述实验期间用于纳入和排除动物(或实验单元), 以及分析过程中纳入和排除数据点的任何标准。详细说明这些标准不是预先设立的。如果没有设立相关标准, 则给予明确声明; b) 对于每个实验组, 报告分析中排除的动物、实验单元或数据点, 并说明原因。如果没有排除的情况, 也请说明; c) 对于每次分析, 报告每个实验组中被纳入分析的动物、实验单元或数据点(<i>n</i>)的准确数量
4	随机化	a) 说明是否采用随机化方法将实验单元分配给对照组和处理组。如已随机化分配, 需提供产生随机化序列的方法; b) 描述用于将潜在混杂因素最小化的策略, 如处理和测量的顺序, 或者动物/笼具的位置等。如果没有控制混杂因素, 则给予明确声明
5	盲法	描述谁会在实验的不同阶段(动物分配、实验实施、结果评估、数据分析)知晓分组情况
6	结果测量	a) 清晰地定义所有评估的结果测量指标(如细胞死亡、分子标志物或行为改变); b) 对于测试假说的研究, 明确主要的结果测量指标, 即用于确定样本量的结果测量
7	统计方法	a) 提供用于每次分析的统计方法的细节, 包括使用的软件; b) 描述用于评估数据是否能满足统计假设的任何方法, 以及当统计假设无法满足时所做的方法变更
8	实验动物	a) 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(如果相关的话); b) 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
9	实验步骤	对于每个实验组(包括对照组), 描述可让其他研究人员重复的足够的实验细节。包括: a) 内容(做了什么)、方法(怎么做的)、材料(用了什么); b) 时间和频次; c) 地点(包括任何适应期的细节); d) 原因(提供进行这些程序的理由)
10	结果	对于实施的每个实验, 包括独立重复, 应报告: a) 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); b) 如果适用, 应报告效应量及其可信区间

注: 来源于www.arriveguidelines.org网站中ARRIVE 2.0指南中文简版, 由中国EQUATOR中心的卞兆祥教授和段玉婷博士、诺和诺德中国研发中心的白玉博士翻译, 庞万勇博士核定。

Note: The original table is from the simplified Chinese version of ARRIVE Guide 2.0 at www.arriveguidelines.org. It was translated by Professor Bian Zhaoxiang and Dr. Duan Yuting from the China EQUATOR Center and Dr. Bai Yu of Novo Nordisk Research Centre China. It was reviewed by Dr. Pang Wanyong.

善动物研究报告, 往往采取一系列分级的行动计划。该计划首先强调ARRIVE 2.0指南和透明的报告研究结果对作者、读者、期刊编辑和审稿人的重要性, 同时介绍与指南相配套的检查列表, 后者可以确保期刊履行作为监督科学研究质量和研究方法严谨性的最后一道关卡的使命。期刊应根据自身实际情况来制定ARRIVE 2.0指南的具体实施计划项目列表, 其目标是确保期刊发表的动物实验研究报告尽量遵守ARRIVE 2.0指南。

ARRIVE 2.0指南中的关键10条即“10项基本要求”属于最低要求, 是指任何稿件在描述动物研究时都必须包含的内容, 因为读者和审稿人只有依靠这些

内容才能评估研究结果的可靠性。而作为补充的推荐11条则是提供包括研究背景在内的其他细节内容。因此, ARRIVE 2.0指南的期刊行动计划一般可分为3个连续的级别^[17](表3), 从第一级到第三级对作者、审稿人和期刊编辑遵循该指南的期望逐级增加。目前, 国际上许多生物医学期刊已经达到第一级甚至第二级, 并且正在向更高级别推进。越来越多的国际期刊正在更积极地使用ARRIVE 2.0指南作为审稿和接收稿件的标准, 以此引领动物实验研究的规范化实施。

其中, 表3中提到的“ARRIVE 10项基本要求作者清单”, 是在ARRIVE 2.0指南关键10条的表2基础上附加一列, 请作者填写相应项目出现在文章中的哪

表2 国际指南ARRIVE 2.0的推荐11条

Table 2 11 recommendations of international guide ARRIVE 2.0

编号 No.	项目 Item	具体内容 Content
1	摘要	提供一个准确的有关研究目标, 动物物种、品系和性别, 关键方法, 主要结果以及研究结论的摘要
2	研究背景	a) 包括足够的科学背景, 有助于理解研究的缘由和背景性内容, 并解释实验方案; b) 解释实验中使用的动物种类和模型如何达到研究目标。如果适用, 请解释与人类生物学的相关性
3	研究目标	清楚地描述研究问题、研究目标以及研究的具体假说(如果适用)
4	伦理声明	提供批准本次使用动物进行实验研究的伦理审查委员会或相应机构的名称, 以及任何相关许可证或方案的编号(如适用)。如果没有寻求或未得到伦理批准, 则需说明原因
5	饲养场所和饲养	提供饲养场所和饲养条件的细节, 包括任何环境丰富改善措施
6	动物照护和监测	a) 描述在实验方案中为减轻动物疼痛、折磨和苦痛而采取的任何干预性措施或步骤; b) 报告任何预期或非预期的不良事件; c) 描述为研究建立的人道终点, 被监测的指征和监测的频率。如果研究未采用人道终点, 请予以说明
7	诠释/科学内涵	a) 结合研究目标和假设、目前的理论和其他相关的文献研究等, 解释结果; b) 评价研究的局限性, 包括潜在的偏倚来源、动物模型的局限性和结果的不精确性
8	可推广性/转化	评论这项研究的结果是否以及如何有可能适用于其他物种或实验条件, 包括任何与人类生物学的关联(适用时)
9	实验方案注册	提供一份声明, 说明是否在研究前准备了实验方案(包括研究问题、关键设计特点和分析计划), 该实验方案是否进行了注册, 以及在何处注册
10	数据获取	提供一份声明, 描述研究数据是否可获取, 以及从何处可以获得
11	利益冲突声明	a) 声明任何潜在的利益冲突, 包括经济上的和非经济上的。如果不存在利益冲突, 也应声明; b) 列出所有的资助来源(包括课题识别号), 以及资助方在研究设计、分析和报告中所起的作用

注: 来源于 www.arriveguidelines.org 网站中 ARRIVE 2.0 指南中文简版, 由中国 EQUATOR 中心的卞兆祥教授和段玉婷博士、诺和诺德中国研发中心的白玉博士翻译, 庞万勇博士核定。

Note: The original table is from the simplified Chinese version of ARRIVE Guide 2.0 at www.arriveguidelines.org. It was translated by Professor Bian Zhaoxiang and Dr. Duan Yuting from the China EQUATOR Center and Dr. Bai Yu of Novo Nordisk Research Centre China. It was reviewed by Dr. Pang Wanyong.

部分哪行, 或写明未报告的理由。因此, 该清单需要作者投稿时提交, 以便期刊审核。另外, 生物医学期刊还可以使用 ARRIVE 2.0 指南中关键 10 条的遵从性问卷^[18](表 4) 来评估任一报告活体动物实验的作者来稿是否符合 ARRIVE 2.0 指南的关键 10 条, 同行评审专家审稿时也可以使用。相应地, 该问卷也可供作者在投稿前甚至实验开展时自查是否符合欲投期刊的要求。

当然, 这份遵从性问卷的设计比较简洁, 基本采用二进制的方式, 便于作者填写, 但也存在一定的局限性。例如在某些情况下, 动物实验报告中可能包含多个实验且仅有一个实验满足 ARRIVE 指南的子项目要求, 根据该问卷会认为整个报告符合 ARRIVE 2.0 指南, 而实际上并非所有实验都满足该标准。因此, 期刊编辑和审稿人应根据稿件实际情况进行一定程度的主观判断, 或者设计适用于自己期刊的更加完整、合理的遵从性问卷。

4 《实验动物与比较医学》遵循 ARRIVE 2.0 指南的实施工计划

本刊是国内创刊最早的实验动物专业学术期刊, 40 多年来始终与我国实验动物科学及比较医学的发展紧密同步, 兼顾理论与实践、普及与提高, 致力于服务并推动我国实验动物医学科技领域的人才培养、科技创新、学科发展和行业繁荣。近年来, 随着国内外对实验动物福利伦理的关注度越来越高, 动物体内实验研究报告及期刊出版的规范化要求日渐紧迫, 已经成为我国科研伦理治理的关键一环。2021 年 12 月 17 日, 习近平总书记主持召开中央全面深化改革委员会第二十三次会议, 审议通过《关于加强科技伦理治理的指导意见》, 提出要强化科技伦理审查和监管, 要求开展科技活动应进行科技伦理风险评估或审查, 特别是开展涉及人、实验动物的科技活动, 应当通过科技伦理委员会审查批准。无论生物医学研究工作者还是

表3 ARRIVE 2.0指南的期刊行动计划

Table 3 Journal action plan of ARRIVE 2.0 guideline

分级 Classification	目标 Aim	具体内容 Content
第一级 Level 1	指出 ARRIVE 2.0 指南的重要性——本层级的关键行动侧重于通过以下方法让更多人了解 ARRIVE 2.0 指南	1) 发表公开声明支持 ARRIVE 2.0 指南,并写在“给作者的投稿说明”中(建议插入由 NC3Rs 发布的 ARRIVE 2.0 指南链接)。同时,对作者在撰写动物实验相关内容时参考和使用 ARRIVE 2.0 指南提出期望; 2) 鼓励期刊所有工作人员和编辑熟悉 ARRIVE 2.0 指南以及相关资料; 3) 在期刊投稿系统或稿件审稿流程允许的情况下,包含关于提交稿件是否遵守 ARRIVE 2.0 指南的内容; 4) 在给同行审稿人的说明中强调本期刊遵循 ARRIVE 2.0 指南
第二级 Level 2	支持并落实 ARRIVE 2.0 指南的 10 项基本要求——本层级的关键行动是期刊向作者发出期望其遵守 ARRIVE 2.0 指南的信号	1) 要求作者在提交研究中包含动物实验的稿件时,提交完整的“ARRIVE 10 项基本要求作者清单”; 2) 为期刊工作人员提供内部或外部培训,以强调透明和完整地发表研究结果的重要性和好处。培训应涵盖 ARRIVE 2.0 指南要求的信息、研究报告中包含这些信息的基本原理以及其与研究结果可靠性之间的关系; 3) 在编委或期刊工作人员的水平上评估每篇描述动物研究的稿件是否符合“ARRIVE 10 项基本要求”。理想情况下,评估应在同行评议后完成并作为文章发表的条件,作者应补充任何遗漏的信息。为协助期刊更好地实施这一步骤,NC3Rs 提供了一份“遵从性问卷”,以便更高效地对稿件的遵从性进行评估; 4) 告知同行审稿人其评估内容应包括稿件是否符合“ARRIVE 10 项基本要求”。这可以通过向同行审稿人提供“ARRIVE 10 项基本要求作者清单”或“遵从性问卷”实现
第三级 Level 3	支持完整的 ARRIVE 2.0 指南——本层级的关键行动是积极执行期刊所有稿件应完全遵守 ARRIVE 2.0 指南的要求	1) 要求作者在提交研究中包含动物实验的稿件时,提交完整的“ARRIVE 2.0 指南作者清单”(即包括 10 项基本要求和 11 项推荐项目清单,而不仅是 10 项基本要求); 2) 在编辑或期刊工作人员的水平上评估每篇描述动物研究的稿件是否符合完整的 ARRIVE 2.0 指南要求。理想情况下,评估应在同行评议后完成并作为文章发表的条件,作者应补充任何遗漏的信息

注:英文原版来源于 www.arriveguidelines.org 网站,由刘晓宇博士翻译。

Note: The original table is from the www.arriveguidelines.org. It was translated by Dr. Liu Xiaoyu.

相关期刊工作者,都应该高度重视动物福利伦理及科研规范,早日与国际接轨^[19]。因此,本刊有必要为推动中国实验动物医学研究的科学设计、严谨实施和规范报告,切实发挥学术期刊对相关规范的普及、教育和引领作用。本刊新开辟的“比较医学研究及报告规范”专栏即为此目标应运而生!

其实自 2020 年起,本刊就着手实验动物科研及报告规范化的国际对标工作,包括:(1)在“规范与指南”栏目完整介绍了当时最新的 2019 年版 ICMJE 推荐规范^[20],其中涉及动物实验报告要求及动物研究伦理参考指南,随后一有版本更新就及时向国内介绍其更新内容^[21-22],并被 ICMJE 列入“遵循 ICMJE 推荐规范的期刊名单”;(2)在本刊官网及印刷刊物上公开期刊出版伦理^[23]等相关政策,并对实验动物福利伦理的审稿要求进行重点说明,其中明确指出本刊严格遵守我国实验动物相关的法律、法规和标准,同时参考借鉴国际生物医学期刊关于动物实验研究报告的相关指南共识(如 ARRIVE 2.0、IGP 2012、IAVE 2010 等)

完善编辑出版工作^[24];(3)为加强期刊学术诚信体系建设,本刊率先提出了实验动物“三证一表”的要求^[25],即涉及实验动物和动物实验的来稿在投稿时须提供实验动物生产许可证和质量合格证、动物实验场所的实验动物使用许可证,以及作者单位实验动物福利伦理委员会或其他相关机构出具的实验动物福利伦理审查表,引导科研工作者从源头上重视动物实验研究和伦理审批的规范性;(4)2022 年起本刊开始国际化推广工作,除了加强英文长摘要、英文图表及注解、中文文献的英文显示度外,更是在研究报告本身的完整性、规范性和透明性方面进一步提高要求,例如增加作者贡献及利益冲突说明、伦理声明等,后者明确所涉动物实验研究通过了哪一机构的伦理审查(列出批号),并遵循哪些指南或法规。以上这些工作都是遵循国际通行规范(包括 ARRIVE 2.0 指南)的重要体现,然而对于切实提升我国实验动物科研及期刊质量而言还远远不够,需要进一步系统性地推进。

“比较医学研究及报告规范”专栏的设立目标就是

表4 ARRIVE 2.0指南关键10条的遵从性问卷

Table 4 Compliance questionnaire for the key 10 items of ARRIVE 2.0 guideline

项目 Item	问题 Question	回答 Answer
研究设计 Study design	是否明确地描述了所有实验组和对照组?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
	是否明确地描述了实验单元(如以单只动物、一窝动物或一笼动物为单元)?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
样本量 Sample size	是否详细说明了研究开始时分配给每个实验组的确切实验单元数?(如格式为n=?)	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
	是否解释了样本量是如何决定的?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
纳入和排除标准 Inclusion and exclusion criteria	是否描述了用于纳入和排除动物、实验单元或数据点的标准?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
	对于排除的动物、实验单元或数据点是否说明了原因?如果没有排除的情况,是否说明?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一次分析 <input type="checkbox"/> 否
随机化 Randomization	用什么方法将实验单元分配给对照组和处理组?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
盲法 Blinding	是否清晰地描述了研究人员在实验的任何阶段或数据分析时知晓或不知道分组情况?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
结果测量 Outcome measures	对呈现的所有实验结果,是否报告了所测参数的细节?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
	统计方法 Statistical methods	是否报告了每次分析的统计方法的细节?
实验动物 Experimental animals	是否描述了用于评估数据是否满足统计假设的所有方法?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一次分析 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不适用
	是否报告了所有使用的动物种类的详细资料?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
	是否报告了动物的性别信息?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
	是否报告了以下至少一项信息:动物年龄、体重或发育阶段?	<input type="checkbox"/> 对该物种不适用 <input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
实验步骤 Experimental procedures	是否详细描述了实验步骤开展的时间和频次?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
	是否详细描述了针对实验场所的适应期?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否
结果 Results	是否报告了每个组的描述性统计值,包括变异性(如均值和标准差,或中位数和范围)?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不适用于这类数据收集法
	是否报告了统计效应量和可信区间?	<input type="checkbox"/> 是,至少针对一个实验 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不适用于这类数据分析法

注:英文原版来源于www.arriveguidelines.org网站,由刘晓宇博士翻译。

Note: The original table is from the www.arriveguidelines.org. It was translated by Dr. Liu Xiaoyu.

针对动物实验医学研究及报告的规范化进行国际对标和推广。就首期关注的ARRIVE 2.0指南来说,本刊已经做到了期刊行动计划的第一级,今年起即通过对该指南的深入解读和积极推广,力求实现第二和第三级

目标——支持并落实ARRIVE 2.0指南。未来,本专栏还将推介和解读更多的国际规范及指导性文件(如IGP 2012、IAVE 2010、GSPC清单等),并在对比分析和充分调研的基础上制定中国版的相关标准和指南,

期望为促进我国实验动物科学与比较医学的高质量发展贡献力量,从而有益于我国生物医药领域的科技创新和相关科研成果及期刊出版的国际交流。

[作者贡献 Author Contribution]

张俊彦:负责文章构思及撰写;

刘晓宇:负责表3和表4的翻译汉化,以及本文的英文部分;

李焱、陈国元、卢晓、卢选成和庞万勇:负责ARRIVE 2.0指南相关资料的整理、编译和解读工作,并对本文提出关键性修改建议;

白玉:参与ARRIVE 2.0指南包括表1和表2的编译汉化工作;

吴宝金:参与定稿和期刊工作指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- 漆晚生. 比较医学与人类疾病动物模型[J]. 实验动物与比较医学, 2006, 26(1):59-64.
QI W S. Comparative medicine and animal models of human diseases[J]. Lab Anim Comp Med, 2006, 26(1):59-64.
- 贺争鸣, 尚昌连, 王禄增, 等. 关注和提高实验动物福利[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(6): 381-383. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2004.06.019.
HE Z M, SHANG C L, WANG L Z, et al. Pay attention to and improve the welfare of experimental animals[J]. Chin J Comp Med, 2004, 14(6): 381-383. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2004.06.019.
- 赵国屏. 从人类基因组计划到精准医学: 比较医学的发展趋势与挑战[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(1): 1-8. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.022.
ZHAO G P. Development trend and challenge of comparative medicine from human genome project to precision medicine [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(1): 1-8. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.022.
- 极其罕见!由于动物福利的原因,复旦大学,武汉大学等多单位发表的7篇文章接连被撤回[Z/OL]. iMedicines. (2022-11-09)[2023-01-10]. https://mp.weixin.qq.com/s/g4h10_us0HWiceNGN2opgg.
Extremely rare! Due to animal welfare, seven articles published by Fudan University, Wuhan University and other institutions were withdrawn one after another[Z/OL]. iMedicines. (2022-11-09) [2023-01-10]. https://mp.weixin.qq.com/s/g4h10_us0HWiceNGN2opgg.
- 违反实验伦理?Nature高引论文也照撤不误![Z/OL]. 解螺旋. (2018-07-26) [2023-01-10]. <https://mp.weixin.qq.com/s/G4rMNBA1srkUxsAGjZOGMQ>.
Violation of experimental ethics? Nature's highly cited papers are also correct! [Z/OL]. Decoil. (2018-07-26)[2023-01-10]. <https://mp.weixin.qq.com/s/G4rMNBA1srkUxsAGjZOGMQ>.
- 王瑞奇, 黄春华, 吴清忠, 等. 基于SYRACLE风险评价工具及实验研究报告规范评价电针干预脊髓损伤后神经源性膀胱动物实验报告质量[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 76-87. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.11.012.
WANG R Q, HUANG C H, WU Q Z, et al. Evaluation of the quality of animal experiment report electroacupuncture intervention for neurogenic bladder after spinal cord injury based on SYRACLE risk assessment tool and experimental research report specification[J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 76-87. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.11.012.
- 王雪, 熊俊, 袁婷, 等. 基于ARRIVE指南和GSPC清单评价灸法干预膝骨性关节炎动物实验报告质量[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6):3131-3137.
WANG X, XIONG J, YUAN T, et al. Evaluation of the quality of animal experiment report of moxibustion intervention for knee osteoarthritis based on ARRIVE guideline and GSPC list [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(6):3131-3137.
- 韩晨静, 刘华云, 熊婕, 等. 对国内针刺动物实验报告规范化问题的探讨[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6):2993-2997.
HAN C J, LIU H Y, XIONG J, et al. Discussion on the problems in the standardization of domestic acupuncture animal experiment report[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(6):2993-2997.
- 张婷, 廖绪亮, 李博, 等. 国内研究人员对动物实验设计与报告标准认知情况的调查[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(1): 17-23. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.01.05.
ZHANG T, LIAO X L, LI B, et al. A survey of Chinese researchers' knowledge of animal experimental design methods and reporting standards[J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2019, 11(1): 17-23. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.01.05.
- 白哲, 杨晶晶, 许家科, 等. ARRIVE指南和GSPC清单在国内期刊的引入: 对期刊"稿约"和编辑的调查研究[J]. 中国循证医学杂志, 2016, 16(9):1020-1025. DOI:10.7507/1672-2531.20160157.
BAI X, YANG J J, XU J K, et al. Endorsement of the ARRIVE guideline and GSPC checklist by Chinese journals: a survey of journal editors and review of journals' instructions for authors[J]. Chin J Evid Based Med, 2016, 16(9):1020-1025. DOI: 10.7507/1672-2531.20160157.
- 王亚辉. 医学期刊稿约中动物实验伦理标准的现状及完善建议[J]. 编辑学报, 2022, 34(1):48-52. DOI: 10.16811/j.cnki.1001-4314.2022.01.010.
WANG Y H. A constructive look at medical journals' author guidelines on animal ethics-based criteria in China[J]. Acta Ed, 2022, 34(1):48-52. DOI: 10.16811/j.cnki.1001-4314.2022.01.010.
- KILKENNY C, BROWNE W J, CUTHILL I C, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2012, 20(4):256-260. DOI: 10.1016/j.joca.2012.02.010.
- 张雅静, 刘建平. 动物实验«ARRIVE声明»报告国际规范及促进结果利用的建议与思考[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(12): 1507-1510.
ZHANG Y J, LIU J P. ARRIVE statement for animal experiments: suggestions and thinkings on how to internationally standardize and promote their utilization[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2018, 38(12):1507-1510.
- 尚志忠, 姜彦彪, 赵冰, 等. 动物实验报告规范: ARRIVE 2019简介[J]. 医学新知, 2020, 30(4):285-290.
SHANG Z Z, JIANG Y B, ZHAO B, et al. The reporting guideline of animal studies—ARRIVE 2019[J]. New Med, 2020, 30(4):285-290.
- DU SERT N P, HURST V, AHLUWALIA A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research[J]. PLoS Biol, 2020, 18(7): e3000410. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000410.
- DU SERT N P, AHLUWALIA A, ALAM S, et al. Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0[J]. PLoS Biol, 2020, 18(7): e3000411. DOI: 10.1371/

- journal.pbio.3000411.
- [17] ARRIVE Implementation Action Plan - Journals[A/OL]. [2023-01-10]. <https://arriveguidelines.org/resources/action-plan-journals>.
- [18] ARRIVE Compliance Questionnaire[A/OL]. [2023-01-10]. <https://arriveguidelines.org/sites/arrive/files/documents/ARRIVE%20Compliance%20Questionnaire.pdf>.
- [19] 鹿双双, 师晓萌, 刘晓宇, 等. 实验动物福利伦理审查与监管实践及探索[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(4): 339-343. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.04.011.
LU S S, SHI X M, LIU X Y, et al. Practice and exploration on laboratory animal welfare and ethical reviewing and monitoring[J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(4): 339-343. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.04.011.
- [20] 张俊彦, 于笑天, 汪源. 学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范(一)[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(5): 456-462. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.05.016.
ZHANG J Y, YU X T, WANG Y. Chinese translation part I of Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals[J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(5): 456-462. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.05.016.
- [21] 张俊彦, 于笑天, 汪源. 2021年版 ICMJE 推荐规范的更新内容[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 35.
ZHANG J Y, YU X T, WANG Y. Updated content of ICMJE recommendation specification in 2021 edition[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(1): 35.
- [22] 张俊彦, 于笑天, 汪源. 2022年版 ICMJE 推荐规范的更新内容[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 341.
ZHANG J Y, YU X T, WANG Y. Updated content of ICMJE recommendation specification in 2022 edition[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(1): 341.
- [23] «实验动物与比较医学»编辑部. «实验动物与比较医学»出版伦理声明[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(6):530.
Editorial Office of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*. An ethical statement published by *Laboratory Animal and Comparative Medicine*[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(6):530.
- [24] «实验动物与比较医学»编辑部. «实验动物与比较医学»有关实验动物福利伦理内容的说明[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(6):571.
Editorial Office of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*. Explanation of *Laboratory Animal and Comparative Medicine* on the welfare ethics of experimental animals[J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(6):571.
- [25] 张俊彦, 富群华. 中文科技期刊应对学术不端来稿的案例分析及单刊实践初探[J]. 中国科技期刊研究, 2022, 33(2): 159-166. DOI: 10.11946/cjstp.202106140483.
ZHANG J Y, FU Q H. Countermeasures against academic misconducts in Chinese scientific journals: a case study[J]. Chin J Sci Tech Period, 2022, 33(2): 159-166. DOI: 10.11946/cjstp.202106140483.

(收稿日期:2023-01-25 修回日期:2023-02-14)
(本文编辑:富群华)

[引用本文]

张俊彦, 刘晓宇, 李垚, 等. 动物实验研究报告的国际指南 ARRIVE 2.0 介绍及期刊实施计划[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):86-94. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.014.
ZHANG J Y, LIU X Y, LI Y, et al. Introduction to the international guide for animal research reporting ARRIVE 2.0, and its implementation plan in the journal[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1):86-94. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.014.

上海实验动物科普志愿者服务队

为促进社会公众准确了解并科学认知实验动物科学, 并不断普及科学知识、弘扬科学精神、传播科学思想、倡导科学方法、恪守科学道德, 同时大力发扬志愿者精神, 2017年6月, 基于上海实验动物研究中心的专业优势, 在该中心党总支的领导下, 成立了上海实验动物科普志愿者服务队(Shanghai Laboratory Animal Popularization Volunteer Service Team, SLAP)(“上海志愿者网”团体ID: 92332603)。这是目前上海唯一一支、也是国内少数专门针对实验动物科学的专业化科普志愿服务团队之一。



自成立以来, SLAP 积极履行社会责任, 主动参与新时代文明实践工作, 坚持“两面向三走进”(即, 面向全国、面向全市, 走进社区、走进校区、走进展区), 以“专业化”“可持续”为能力建设目标, 逐步丰富科普课程, 积累了诸多多元化、高质量的科普成果。其中, 《解密生命科学——走近伟大的实验动物科学》系列课件获2021年度上海市“科技创新行动计划”科普专项资助(编号: 21DZ2305600)。与此同时, 不断建立健全线上线下结合、模块化组合的科普活动组织模式, 形成了兼具专业性、趣味性、互动性的科普特色, 赢得了社会公众(尤其是青少年)的广泛好评, 助力提高公民科学素养, 营造了良好的科技创新生态。截至目前, SLAP 荣获了“上海市科技系统志愿服务先进集体”“上海市新时代文明实践优秀团队”等荣誉称号, 1名队员被评为“上海市优秀志愿者”, 得到了社会各界的高度认可。



截至目前, SLAP 荣获了“上海市科技系统志愿服务先进集体”“上海市新时代文明实践优秀团队”等荣誉称号, 1名队员被评为“上海市优秀志愿者”, 得到了社会各界的高度认可。

(本刊青年编委林金杏博士供稿)

中国科学院上海药物研究所实验动物中心



1 中心简介

中国科学院上海药物研究所实验动物中心最初成立于1956年；2003年搬迁至上海浦东张江祖冲之路园区，动物设施面积为3 000 m²；随后2010年新建浦东张江海科路园区，面积约7 500 m²；2018年海科路园区再增3 500 m²，同年新增金科路园区700 m²动物设施。目前，上海药物研究所共有3个园区4处实验动物设施，总面积为14 700 m²，取得了上海市科学技术委员会颁发的实验动物生产许可证 [SCXK (沪) 2020-0005，许可范围包括SPF级小鼠、大鼠和普通级猴]、实验动物使用许可证 [SYXK (沪) 2020-0042，许可范围包括SPF级小鼠、大鼠，清洁级小鼠、大鼠、仓鼠，普通级豚鼠、兔、犬、猴]，并获得了国家重点保护野生动物驯养繁殖许可证。



中国科学院上海药物研究所实验动物技术平台



祖冲之路动物设施

海科路三号动物设施

海科路四号动物设施

金科路动物设施

本所的实验动物使用与管理程序于2011年整体通过了国际实验动物评估和认可委员会 (AAALAC) 认证。可以开展药物安全性评价研究，是国内较早通过药品监督管理局认证的药品非临床研究质量管理规范 (GLP) 实验室，也是国内率先通过两个欧盟成员国认证的GLP实验室；并且通过了英国药品和健康产品管理局 (MHRA) 的官方审计，获得临床试验批准，也通过了美国食品药品监督管理局 (FDA) 的GLP遵从性审查。

实验动物中心是中国科学院上海药物研究所新药临床前实验研究的技术支撑平台，重点为所内药物安全性评价、药效学评价、药物代谢评价等研究提供动物实验条件保障和相关的技术服务，开展治疗恶性肿瘤、心脑血管疾病、神经精神性疾病、代谢性疾病、自身免疫性疾病等药物开发研究提供动物实验的条件保障和相关的技术服务。主要内容包括：以AAALAC指南要求为标准，进行实验动物的规范使用和管理、合理调配设施资源的利用、积极组织落实所内各研究组的动物实验计划、保障动物实验研究的有序开展；通过模型动物的生产繁育和种质保持以及动物胚胎冷冻移植技术，保障新药研究的质量；通过兽医护理、微生物检测等维护动物福利技术，保障动物实验结果的可靠性。

2 资源条件

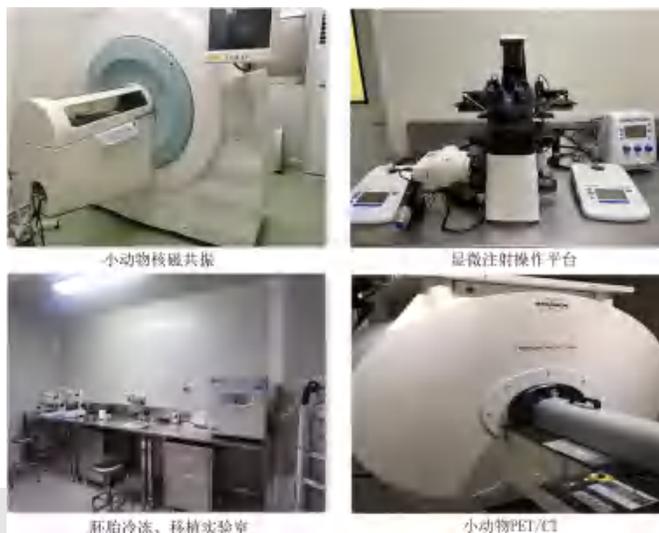
实验动物中心有饲养管理、疾病模型动物种质保持、兽医护理、微生物检测、条件保障共5个技术队伍，拥有实验动物微生物检测实验室、胚胎冷冻和移植实验室、转基因动物显微操作平台。

上海药物研究所拥有组织机构完善的实验动物管理委员会 (IACUC)、实验动物从业人员职业健康委员会、兽医小组、紧急状况处置小组等，具有相应的章程、政策、指导原则和标准操作规程 (SOP)。



实验动物平台现有在职员工 88 人，其中硕士 14 人，本科学历 32 人，专科学历 42 人；高级技术职称 11 人。现任负责人为张周，正高级工程师。

实验动物设施内配置有较为全面、系统、先进的实验动物饲养和实验设备，包括笼器具清洗机、纯水系统、高温高压灭菌器、垃圾倾倒地、隔离器、换笼工作台、生物安全柜、过氧化氢气雾消毒器等；配置了磁共振脂肪含量测量仪、胚胎冷冻移植系统、显微注射操作系统等，搭建了实验犬和实验猕猴的生物遥测实验室；另外还配置有小动物活体成像系统、PET/CT、磁共振等设备。



3 工作成果

(1) 在国家科技重大专项、上海市科学委员会、中国科学院生物技术局等资助下，动物中心开展支撑性研究，主要完成了创新药物开发研究中实验动物的技术支撑作用、清醒比格犬心血管指标及心电图遥测系统的建立、普通棉耳猕猴的规模化种群保持及遥测实验技术平台的建立，以及模型动物胚胎冷冻保存及移植后子代质量检测等工作，发表论文 20 余篇。

(2) 实验动物使用和管理程序较为完善，形成了一系列的上海药物研究所实验动物使用和管理政策、指导原则、标准操作规程 (SOP)。

(3) 技术服务范围不断拓展，可以提供服务的技术包括转基因动物基因型鉴定技术、动物胚胎冷冻与移植、生物净化技术、药代动力学生物样本采集技术、显微注射操作技术以及生物遥测技术等。

4 未来展望

上海药物研究所正在牛顿路园区建造面积约 5 700 m² 的实验动物设施，预计 2025 年投入使用；同时规划有牛顿路二期约 4 600 m² 的实验动物设施。动物中心将继续加强建设符合国际流程规范的动物饲养管理和实验设施，不断开发动物实验技术；继续加强规范化、软件化、系统化管理体系的建设，保证实验动物使用和管理更便捷、更合理；继续加强人才培养和建设，保障实验动物使用与管理程序符合国际规范要求；加强疾病模型动物种质保持及规模化生产繁育体系的建设，开展模型动物生物学特性研究，不断满足科研一线进行相关疾病药物的临床前评价研究的要求。



(图文：李娜；审核：张周)

ZARC 浙江中医药大学动物实验研究中心



1 中心简介

浙江中医药大学动物实验研究中心成立于1987年，2006年升格为处级建制；2017年6月，学校组建中医药科学院，该中心成建制纳入。浙江中医药大学动物实验研究中心是浙江省新药创制科技服务平台-药效学子平台、浙江省实验动物公共服务平台动物实验基地等省级公共服务平台，也是国家中医药管理局中医药实验动物学重点学科（培育）、浙江省高校动物学重点学科（A类）等省部级重点学科建设单位，同



时是国家中医药管理局三级科研实验室、浙江省中医药实验动物学重点实验室。该中心主要承担科研、教学和校内外动物实验技术服务工作，先后通过AAALAC完全认证、CNAS认可（检测）、CMA认证、邓白氏注册认证。现有标准化动物实验设施4 000 m²，拥有小动物行为学、动物影像学、血液生化检测、分子生物学检测等仪器设备总价值3 000余万元。现有教职工及其他工作人员共45人，其中在编专业技术人员21人，具有高级职称者10人；8人具有博士学位，17人具有硕士学位；有博士生导师1人、硕士生导师3人；1人入选浙江省卫生创新人才、浙江省“151”人才第二层次资助计划，1人入选浙江省“151”人才第三层次、浙江省高校优秀青年教师资助计划。

2 科学研究

围绕“实验动物新资源的开发与应用”“人类疾病动物模型与比较药理学研究”“动物实验技术规范与方法学研究”等研究方向，培育了WHBE兔、高脂血症易感（WSHe）大鼠等实验动物新资源；为比较不同病理因素诱导人类疾病动物模型的表型与病理机制，开展自发性、诱发性和基因修饰动物疾病模型的生物学特点及病理过程研究，并利用上述模型对肿瘤、代谢性疾病、心血管疾病等的防治药物进行药理作用研究；为动物实验技术、动物福利规范，以及动物生理生化检测与分析技术研究，建立了一批新的动物实验基础技术和基本诊断技术。近10年来，主持国家重大专项



课题和国家自然科学基金5项,浙江省自然科学基金等省部级项目39项;共发表论文208篇;科研成果分别获中国实验动物学会科学技术奖二、三等奖各1项,浙江省中医药科学技术奖三等奖2项。

3 社会服务

主要面向校内外提供全方位的服务,包括实验动物饲养、动物实验操作、诱导性动物模型定制与原代细胞模型建立、肿瘤细胞供应与模型建立、动物实验后的样品诊断与分析、基因修饰小鼠生物净化与精子冻存、药品质检与医疗器械生物学评价、实验动物质量与环境检测、实验动物与动物实验培训,并承担委托的动物实验技术服务项目和临床前药效学评价。近年来,年承担动物实验服务项目约1200项,横向研发项目约15项,累计合作单位达到600余家,服务范围辐射15个省市自治区。



4 教学工作

本中心承担本科生和研究生的“实验动物学”“动物实验方法与技术”“人类疾病动物模型”等课程的教学工作,授课对象覆盖学校内除人文管理学院以外所有学院的本科生和研究生,每年累计达到800余课时。“动物实验方法与技术”被列为浙江省一流本科课程。2006年起,中心挂靠中药学硕士点招收硕士研究生,2013年自主设置“实验动物与比较药理”硕士点,现已毕业硕士研究生37人、博士研究生1名,在培硕士研究生7人。主编“十二五”“十三五”“十四五”规划教材4部,其他教材3部,由科学出版社、中国中医药出版社等出版。

5 目标愿景

未来3年,浙江中医药大学将在富春校区新建1万平方米的动物实验设施,硬件条件将得以极大改善。本中心将不忘初心,秉承“科学、规范、求真、求实”的精神,建设温暖、和谐、奋进的文化,强化学科引领,提升创新驱动能力,团结协作,创新机制,把中心建设成为设施完善、设备先进,管理规范、技术专业,在科学研究、学术推广、人才培养和社会服务等方面具有自身特色和优势,在国内高校、科研院所的实验动物工作中有一定示范和引领作用的公共服务平台。

撰文:徐孝平
供图:周卫民
审核:王德军
陈民利

江苏省医药动物实验基地



1 基地简介

江苏省医药动物实验基地（下文简称基地）于2008年由江苏省政府批准立项并资助，在原南京医科大学实验动物中心和南京医科大学卫生分析检测中心基础上扩建，是江苏省实验动物科技资源共享服务平台。基地依托于南京医科大学医药实验动物中心，是学校直属的正处级机构，同时挂牌江苏省实验动物中心、江苏省医药农药兽药安全性评价与研究中心、江苏南医大检测中心。

基地建有SPF级大鼠和小鼠生产繁殖、SPF级动物实验研究、无菌小鼠实验研究、大动物拟临床研究、生物安全二级动物感染实验研究、基因修饰模式动物构建与研究、特色实验动物研究（树鼩和金黄仓鼠）、动物疾病表型分析、小动物分子影像分析、实验动物设施环境与质量检测、食品药品化妆品及农药毒理学安全性评价与功效评价等子平台，拥有实验动物生产许可证、实验动物使用许可证、实验室资质认定机构、农药登记毒理学试验单位、特殊食品验证评价技术机构、化学品毒性鉴定机构、化妆品注册和备案检验检测机构、实验动物设施环境与质量检测机构、微生物动物感染BLS-2备案证等服务资质。设有医药实验动物学教研室和医药模式动物重点实验室，承担南京医科大学相关专业研究生和本科生的医学实验动物学理论和实验课教学工作，开展实验动物相关的科学研究工作。

基地建有SPF级大鼠和小鼠生产繁殖、SPF级动物实验研究、无菌小鼠实验研究、大动物拟临床研究、生物安全二级动物感染实验研究、基因修饰模式动物构建与研究、特色实验动物研究（树鼩和金黄仓鼠）、动物疾病表型分析、小动物分子影像分析、实验动物设施环境与质量检测、食品药品化妆品及农药毒理学安全性评价与功效评价等子平台，拥有实验动物生产许可证、实验动物使用许可证、实验室资质认定机构、农药登记毒理学试验单位、特殊食品验证评价技术机构、化学品毒性鉴定机构、化妆品注册和备案检验检测机构、实验动物设施环境与质量检测机构、微生物动物感染BLS-2备案证等服务资质。设有医药实验动物学教研室和医药模式动物重点实验室，承担南京医科大学相关专业研究生和本科生的医学实验动物学理论和实验课教学工作，开展实验动物相关的科学研究工作。

2 人员与设施设备

基地现有专职教学与科研服务人员175人，其中具有硕士或博士学位30人，具有高级职称12人。设施建筑面积3万余平方米，仪器设备2500余台/套，建有16个独立的屏障设施环境系统。提供SPF级大鼠和小鼠供应、实验动物饲养与动物实验研究、基因修饰模式动物构建、疾病表型与分子影像、医疗器械评价拟临床研究、食品药品化妆品及农药毒理学安全性评价与功效评价等技术服务。

拥有独立的动物生产繁殖楼，可提供SPF级



SD大鼠、ICR小鼠、BALB/c小鼠、C57BL小鼠、裸小鼠等，年生产能力30万只。拥有用于动物实验的小动物屏障环境设施12个，配备了IVC、EVC、隔离器等设备，共有大鼠、小鼠饲养笼位3万余个，可开展SPF级和无菌级小动物实验研究、人传染病原微生物BSL-2等级的动物感染实验。普通级环境设施饲养的实验动物有兔、豚鼠、金黄仓鼠、树鼩、猪、犬、猴等，配备有标准手术室及麻醉机、呼吸机、心电监护仪等设备，开展拟临床研究项目及医疗器械评价实验。



拥有实验动物基因修饰设备与技术，可提供小鼠生物净化、基因修饰模式动物构建、保种动物复苏辅助生殖等。拥有生物辐照仪、小动物彩色超声、活体成像、X光、CT、磁共振仪等影像设备，以及动物全自动血球分析仪、生化分析仪、血凝仪、血氧仪、生物能量测定仪、各类行为学检测仪器、生理代谢学检测仪器、病理学检测仪器等，可提供系统的实验动物疾病表型分析和分子影像分析。拥有气相色谱分析仪、液相色谱分析仪、气-质联用仪、液-质联用仪、薄层色谱成像系统等，建有普通毒性室、遗传毒性室、生殖毒性室、吸入毒性室、功效评价室等，可提供各类食品药品化妆品及农药的理化分析，以及毒理学安全性评价与功效评价研究。

3 项目与成果

基地技术服务向省内外高校和科研院所、企业全面开放，已支撑了涉及实验动物研究的国家自然科学基金项目数千项，目前年服务项目达10 000项次，2022年度服务收入5 500余万元。近年来，基地科技人员申请获得国家自然科学基金项目、国家重大研发计划项目、省自然科学基金项目10余项，在*Nature Cell Biology*、*Science of the Total Environment*、*Cell Proliferation*、*Journal of Genetics and Genomics*等期刊发表SCI论文30余篇。还获得单笼多只型鼠类饲养盒、一种线虫挑取针、受试物致敏性检测方法及其试剂盒、计量器皿专用的标签保护装置等4项专利。

基地取得了江苏省首张动物感染BSL-2卫健委备案证书，在江苏省的实验动物设施中率先使用EVC笼具、无菌小鼠饲养环境简易层流罩、溶液空调、超低氮天然气锅炉等新技术设备，在行业内起到了良好示范作用。本平台规模大、管理好、效益高，吸引了数十家省内外高校实验动物机构参观学习，发挥了良好的科技交流和促进实验动物行业进步的作用。基地荣获江苏省科技厅“江苏省实验动物工作成效突出集体”荣誉称号。

基地是江苏省最大规模的集实验动物繁殖供应、动物饲养与实验研究、基因修饰模式动物构建、表型与影像分析、拟临床研究、农药和新化学物质试验、保健食品登记注册试验、化妆品注册备案试验、医药类产品安全性评价、实验动物设施环境与质量检测、教育培训、实验动物福利伦理科普等为一体的综合性高水平医药实验动物与动物实验基地，不仅有力地保障了依托单位的科学研究与医学教育的需要，而且积极辐射服务于江苏省内外相关高校科研院所与企业，致力于不断提升和充分发挥实验动物学科在医学人才培养、生命科学与医药研究、健康产品研发中的重要支撑作用。

图文：周建丽，秦珩，张珂
审核：施爱民

《实验动物与比较医学》稿约(2023年版)



《实验动物与比较医学》创刊于1981年,系国内第一本实验动物科技领域的专业学术性刊物。本刊兼顾普及与提高,刊登实验动物和比较医学领域的研究新成果、新进展和各种信息,内容主要涉及人类疾病动物模型构建、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,以及实验动物应用于生物医药各领域的基础与应用研究,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、前沿述评、科技动态、人物及书讯等。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。欢迎各方作者投稿。

1 稿件写作要求和注意事项

1.1 总体要求: 研究论著的内容必须构思有据、设计严密、材料标准(所用实验动物要注明品种、品系、等级、性别、年龄、体质量、来源、饲养环境,以及生产许可证、使用许可证和质量合格证编号)、方法可靠(动物实验需符合3R原则,并通过科研伦理审查)、数据精确且运用恰当的统计学方法分析处理,应在前人工作基础上有所发展,提供新知。文献综述或实践探索类文稿应由相关科研团队结合自身近年来的研究成果或实践经验完成,要求有较强的前瞻性和指导性。

1.2 论文结构: 论文内容一般按下列顺序分节排列:中文的标题、作者姓名及单位名称、结构式摘要和关键词,英文的文题、作者姓名及单位名称、摘要和关键词,引言,材料与方法,结果,讨论,参考文献。基金项目、第一作者和通信作者简介放在首页脚注位置,致谢、医学伦理声明、作者贡献及利益声明等信息放在讨论之后。正文中各级标题层次按1、1.1、1.1.1、...的形式排列。

1.3 文题及摘要: 论文标题力求简明、具体、确切,应能概括出文章要旨。中文题目字数一般以少于20个汉字为宜,尽量不使用非公知的缩略词。英文标题内容应尽可能与中文对应一致,且各个实词的首字母大写。中英文摘要应具有独立性和自明性,尽量完整、准确地呈现论文的主要内容,字数应在500字以上。研究类

论文的摘要撰写应采用IMRAD结构,即分目的、方法、结果和结论四部分。关键词应尽量选用美国国立医学图书馆 Medical Subject Headings (MeSH) 中的主题词,3~5个,中英文相对应。

1.4 正文要点: 正文中方法部分应介绍清楚,包括实验动物麻醉及安乐死方法,尤其是改进和创新的方法及操作步骤,以便他人可重复。研究中所用试剂应注明生产厂家和批次,仪器应注明制造商和型号。实验分组应详细说明,应设空白对照、阴性对照及阳性对照。正文中结果叙述应与之前的方法陈述相对应,并包含具体的统计学分析数据。有关实验结果的讨论性文字应放在讨论部分。

1.5 统计学要求: 应用恰当的统计学方法,统计学符号按GB/T 3358-2009《统计学词汇及符号》的有关规定书写。如:(1)正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布时用中位数 M (四分位数)表示;(2)计数资料的卡方检验应给出 χ^2 值;(3)两组比较的独立样本 t 检验应给出 t 值;(4)多组比较的 F 检验应给出 F 值,然后组内两两比较应用LSD- t 检验和SNK- q 检验等,给出相应的 t 值或 q 值;(5)相关性分析应给出相关系数 r 值;(6)差异是否有统计学意义应给出具体的 P 值范围。

1.6 图表要求: 图表分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图表应有中英文对照的标题、表头及注解说明。整个图表及其注解内容应具有自明性。照片图要求有足够的清晰度和对比度,论文中需单张陈列高清图。组织病理学照片还需注明放大倍数(或给出标尺)和染色方法。非原创图表必须提供授权使用证明。

1.7 单位、数字和符号: 计量单位按《中华人民共和国法定计量单位》要求书写,并以单位符号表示。数字执行GB/T 15835-2011标准中关于出版物上数字用法的规定,公历世纪、年代、年、月、日、时刻和计数、计量均采用阿拉伯数字表示。

1.8 名词术语: 科技名词应规范使用正确术语(参考“术语在线”,<https://www.termonline.cn>),药品名应用通用名(非商品名)。非常用缩略语需要在首次出现时按照“中文全称(英文全称,英文缩略词)”的格式介绍,后面直接用缩略语即可。

1.9 参考文献: 无论是综述、论著,还是经验交流类文

章都需引用足量的参考文献，且应尽量新而有代表性。综述文章的参考文献中最近3年的一般须占50%以上，论著类文章应占30%以上。参考文献引用格式应参照GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》要求，采用顺序编码制著录，即依照其在正文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号上标在相应文字之后。文后对应的参考文献应详细著录其著作者姓名、文题、出处、年卷期、页码及DOI等完整信息，中文文献还应给出英文翻译。常见的参考文献标识包括：图书M、期刊J、报纸N、学位论文D、会议报告C、标准S、专利P、档案（包括条例、法规及公文等）A、电子公告EB。

2 投稿要求及注意事项

2.1 投稿方式：请通过本刊官网（<http://www.slarc.org.cn/dwyx>）的在线投稿系统（官网首页左上角“作者投稿”）进行投稿，投稿前请仔细阅读官网首页的“期刊政策”和“投稿必看”中相关说明。投稿时按照系统要求步骤填写所有正确信息。

2.2 投稿材料：投稿时需上传必要的补充材料，清单如下：（1）WORD文稿；（2）单位介绍信（盖章）；（3）基金证明（如有）；（4）实验动物及动物实验有关的“三证一表”（如涉及），包括实验动物生产许可证、实验动物质量合格证、实验动物使用许可证、动物福利伦理审查表；（5）人体试验伦理审批证明文件（如涉及）；（6）作者贡献声明表；（7）利益冲突声明表；（8）版权转让协议；（9）其他辅助材料（如原始数据、视频及音频等）。以上材料均提供电子文件即可。

2.3 学术诚信：来稿须是作者独立取得的原创性成果，无抄袭、剽窃、涉密、一稿多投、署名争议等问题，且保证文稿中所有实验材料、方法和结果等陈述内容（包括数据）均真实可信。本刊杜绝第三方代投、代写和代修行为，也不接收ChatGPT等人工智能程序合成的稿件（包括图像）。如发现来稿涉及学术不端行为，将撤稿处理，并通报作者单位。

2.4 作者署名：作者署名及单位信息（包括顺序）需在投稿时确认，后期不再接受调整与增减。在线投稿时请填写所有署名作者的完整信息，并在文稿末尾说明所有署名作者的具体贡献及利益冲突情况。署名即是确认知情并能够对本文负责。

2.5 医学伦理：实验动物的使用需遵守《实验动物管理条例》、《实验动物福利伦理审查指南》（GB/T 35892—2018），以及IGP 2012等国际标准。动物实验需遵守

3R原则，经得所在单位实验动物福利伦理委员会（或相关机构）的审查批准，其中实验动物麻醉、安乐死及荷瘤尺寸等需符合动物福利伦理要求。人体临床试验需先注册（提供注册号），并经所在单位的医学伦理委员会审批通过，其中受试内容及其标本获取等需签署知情同意书。

2.6 评审政策：本刊执行严格的三审三校制度，并遵循国内外出版伦理相关规范，包括ARRIVE 2.0、COPE和ICMJE推荐规范等国际指南。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，才能决定录用与否。作者投稿后可在线查询审稿进度，若有疑问或加急需求可直接联系编辑部。退修稿件逾期3个月未回复时，视作自动撤稿。

2.7 编校修改：按照《著作权法》有关规定，本刊可对录用稿件做文字方面的编辑加工（修改或删除）。凡有涉及原意的修改，会请作者审核确认。送印前，还会请作者认真校对清样。逾期未回复者视为同意修改。

2.8 版权说明：本刊为开放获取期刊，使用CC BY-NC-ND 4.0协议。所有文章一经发表即可永久供读者免费阅读和下载。作者向本刊投稿，即视为愿意将著作财产权（包括但不限于复制权、发行权、翻译权、汇编权、改编权、信息网络传播权等）授予本刊，而且本刊有权将上述权利转授给第三方，不同意入编或上网者请在投稿时声明。所有稿件均须署名作者签署版权转让协议书。

2.9 相关费用：本刊所有来稿免收审稿费。稿件确认录用后，需支付包含彩版制作费在内的论文发表费。优秀稿件可酌情减免版面费。稿件刊出后，编辑部一次性支付稿酬（包含所有版权转让的报酬），并赠当期杂志2册。

2.10 数字推广：本刊为中国科技论文统计源期刊（即中国科技核心期刊），并被DOAJ、CA、Ulrichsweb、EBSCO等多个国际重要数据库收录。本刊官网提供网络首发即优先在线出版服务，作者如有需要可在投稿时说明。期刊出版后，作者可通过本刊官网、中国知网、万方、维普和超星等多家数字平台进行文献检索。本刊官网可免费下载所有过刊文献及相关资料。

2.11 联系地址：上海市金科路3577号，《实验动物与比较医学》编辑部（邮政编码：201203）。电话：021-50793657。E-mail: bjb50793657@163.com。投稿咨询QQ群：750879769。

《实验动物与比较医学》编辑部