

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2期(总第198期)

2023年4月25日出版

主 管

上海科学院

主 办

上海市实验动物学会

上海实验动物研究中心

编 辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主 编

王 健

执行主编

吴宝金

出 版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

张俊彦

印 刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发 行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发行人

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

人类疾病动物模型

hKDR^{+/+}人源化及*Rag1*^{-/-}基因缺陷新型双靶点遗传修饰荷瘤小鼠模型的建立

刘魁苏, 吴 勇, 曹 愿, 赵皓阳, 翟世杰, 孙晓炜, 李琳丽, 范昌发 103

环磷酸腺苷诱导生精障碍小鼠模型不同恢复期的比较研究

马靖威, 李 根, 杨 杨, 臧彩霞, 鲍秀琦, 张 丹 112

碘酸钠诱发视网膜色素变性大鼠模型的生理指标和组织病理学分析

谭 莹, 廖文平, 高启龙, 李 勇, 史新辉, 王京昆 124

食蟹猴缺血再灌注模型的建立及依达拉奉干预作用

潘梦鲜, 黄晓姣, 黄中理, 申 果, 张鹏飞, 曾 勇, 李文峰, 周华波, 韦祝梅 136

精神分裂症动物模型的研究概述

胡 玲, 胡志斌, 胡筠卿, 丁玉强 145

动物衰老模型的研究进展

尹丹阳, 胡 怡, 史仍飞 156

肾脏间质纤维化动物模型的研究进展

赖 灿, 李乐乐, 胡塔拉, 孟 彦 163

应激性心肌病动物模型的研究进展

吴昊晟, 苏 航, 朱 超, 王文慧, 吴生兵, 崔 帅, 周美启 173

甲型流感病毒对人与实验动物神经系统影响的研究进展

丁相荣, 霍姝洵, 代解杰 180

胰高血糖素样肽1类似物对阿尔兹海默症的神经保护作用及机制研究进展

梅承翰, 陈蓓蓓 186

国外实验动物科技进展

日本实验动物发展现状分析

苟 欢, 安新颖, 童俞嘉, 王 琰, 杨 爽 194

实验动物质量控制

北京地区实验小鼠诺如病毒流行情况

刘芳妮, 吕军革, 柯跃华, 王长军, 郭金鹏 205

比较医学研究与报告规范

《动物研究: 体内实验报告》即 ARRIVE 2.0 指南的解释和阐述 (一)

王 剑, 卢 今, 马政文, 陈国元, 卢 晓, 白 玉, 刘晓宇, 卢选成, 高 静, 李 垚, 庞万勇 213

实验动物与比较医学科创团队推介

空军军医大学实验动物中心 225

首都医科大学实验动物部 227

读者-作者-编者

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会名 前插8

《实验动物与比较医学》第3届(2020—2022年)优秀论文获奖名单 英文目次页后插页

《实验动物与比较医学》第3届(2022年)优秀审稿人获奖名单 135

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表 172

《实验动物与比较医学》2023年征订启事 185

《实验动物与比较医学》有关作者投稿必备信息和材料的说明 193

《实验动物与比较医学》出版伦理声明 204

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明 212

《实验动物与比较医学》2023年专题征稿启事 后插1

广告 封二, 前插1~7, 后插2~6, 封三, 封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b*大16*126*zh*P*¥30.00*2000*13* 2023-04

(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 代解杰

本期审稿专家 陈仁金 崔东红 邸亚男 范 薇 傅婷婷 富群华 高 耀 季樱红
李 峰 李 舸 李善刚 卢 健 庞晓斌 王靖宇 王莎莎 魏 强
吴 剑 谢淑武 徐汪节 杨 陈 张 磊 张 钰 赵四海 陈鸿军
陈民利 代解杰 丁玉强 李 垚 王朝霞 王 健 吴宝金 肖君华
徐 平 姚 明 张 泉 张 周

本期责任编辑 张俊彦 丁宇菁

本期责任编辑 王伟民

本期特邀编校 富群华 陶启辰 刘晓宇 孙 琛

本期实习编校 崔占鼎 郭嘉欣 洪 怡 任益凡 张 萍 赵宇朋 周 培 周 烁
郭家欣 陆佳雯 王 艳 王艳君 吴昊晟

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981

Volume 43, Issue 2

April 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, DAI Jiejie

CONTENTS IN BRIEF

Animal Models of Human Diseases

- Establishment of *hKDR*^{+/+} Humanized and *Rag1*^{-/-} Gene Knockout Double Genetically
Modified Mouse Model
*LIU Susu, WU Yong, CAO Yuan, ZHAO Haoyang, ZHAI Shijie, SUN Xiaowei, LI Linli,
FAN Changfa*..... 104
- Comparative Study on Different Recovery Periods of the Spermatogenic Dysfunction
Mouse Model Induced by Cyclophosphamide
MA Jingwei, LI Gen, YANG Yang, ZANG Caixia, BAO Xiuqi, ZHANG Dan 112
- Physiological Indexes and Histopathology Analysis of Sodium Iodate-Induced Retinitis
Pigmentosa in Rats
TAN Ying, LIAO Wenping, GAO Qilong, LI Yong, SHI Xinhui, WANG Jingkun 125
- Establishment of Ischemia-Reperfusion Model in *Cynomolgus* Macaques and Effects of
Edaravone Intervention
*PAN Mengxian, HUANG Xiaojiao, HUANG Zhongli, SHEN Guo, ZHANG Pengfei,
ZENG Yong, LI Wenfeng, ZHOU Huabo, WEI Zhumei*..... 136
- Overview of Studies in Animal Models of Schizophrenia
HU Ling, HU Zhibin, HU Yunqing, DING Yuqiang 145
- Advances in Animal Aging Models
YIN Danyang, HU Yi, SHI Rengfei 156
- Recent Advances of Animal Models of Renal Interstitial Fibrosis
LAI Can, LI Lele, HU Tala, MENG Yan 163
- Research Progress of Animal Models of Stress Cardiomyopathy
*WU Haosheng, SU Hang, ZHU Chao, WANG Wenhui, WU Shengbing, CUI Shuai,
ZHOU Meiqi* 173
- Research Progress on Influenza A Virus and Nervous System Disease of Human and
Experimental Animals
DING Xiangrong, HUO Shurui, DAI Jiejie..... 180
- Research Progress on Neuroprotective Effects and Mechanism of Glucagon-like
Peptide 1 Analogues in Alzheimer's Disease
MEI Chenghan, CHEN Beibei..... 186

Progress in Experimental Animals Abroad

- Analysis on the Development Status of Laboratory Animals in Japan
GOU Huan, AN Xinying, TONG Yujia, WANG Yan, YANG Shuang 194

Quality Control of Laboratory Animals

- Prevalence of Mouse Norovirus in Experimental Mice in Beijing
LIU Fangni, LU Junping, KE Yuehua, WANG Changjun, GUO Jinpeng..... 205

Guidelines for Comparative Medical Research and Reporting

- Explanation and Elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—Reporting Animal
Research and In Vivo Experiments (I)
*WANG Jian, LU Jin, MA Zhengwen, CHEN Guoyuan, LU Xiao, BAI Yu, LIU Xiaoyu,
LU Xuancheng, GAO Jing, LI Yao, Pang Wanyong* 213

《实验动物与比较医学》第3届(2020—2022年)优秀论文获奖名单

射血分数保留的心力衰竭动物模型的病理特征研究进展 董国菊,刘剑刚,官杰 (中国中医科学院西苑医院心血管病科,中国中医科学院心血管病研究所;青岛市海慈医疗集团;天津中医药大学)	2020(1)	
斑马鱼糖尿病模型的构建及应用进展 江霞,钱豪杰,魏迅,郑羽旋,周正宇 (苏州大学实验动物中心;苏州市科学技术局)	2020(6)	
不同低氧胁迫方式构建SD大鼠高原肺水肿模型的比较研究 林雪,雷有芳,蒲小燕 (青海大学医学院基础医学部)	2020(5)	
裸鼯鼠皮肤成纤维细胞外泌体的分离及鉴定 冯延,武文卿,张静远,李煜,李墨辰,袁征,崔淑芳 (海军军医大学基础医学院实验动物学教研室;军事科学院军事医学研究院实验动物中心)	2020(6)	
国内外大鼠和小鼠微生物、寄生虫检测标准的比较 陶凌云,周洁,胡建华,高诚 (上海实验动物研究中心)	2020(2)	
慢性低氧性肺动脉高压大鼠动脉血气分析指标的变化及其意义 张舒婷,姚青青,李宜珊,施熠炜 (山西医科大学生物化学与分子生物学教研室;山西医科大学第一医院呼吸与危重症医学科)	2021(1)	
苦参素对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠Th1/Th2细胞平衡及相关通路的影响 姚婷,高原,曾芳馨 (成都医学院第二附属医院·核工业四一六医院内分泌科;达州市中西医结合医院内分泌风湿免疫科)	2021(3)	
卵巢早衰动物模型构建方法及比较研究进展 李虹璇,李思慧,冯嘉欣,唐凯,卢蕊,韩丝银 (广西中医药大学基础医学院;广西中医药大学骨伤学院)	2021(6)	
二甲双胍对阿尔茨海默症模型大鼠认知功能障碍及PI3K/Akt通路的影响 王百乔,林小茹,韩敏,刘煜,唐超玲 (海南医学院第一附属医院药理学;海南医学院第一附属医院基础实验室)	2021(4)	
肉芽肿小叶性乳腺炎大鼠模型建立初探 左禧萌,史晓光,刘洁丽,杨臻瑞,高翔,赖瑞,赵泽,汪唐顺 (北京中医药大学东直门医院普通外科)	2021(4)	
槲皮素对辐照小鼠肝脏脂质代谢紊乱模型的保护效应 李自发,张浩,任萌,徐凯勇,胡明会,周苗苗,王可洲 (山东中医药大学实验动物中心;山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院/山东省实验动物中心)	2021(4)	
人源肿瘤异种移植动物模型在癌症精准医学研究中的应用 宋伟杰,周岩,牛瑞芳 (天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所公共实验室,国家肿瘤临床研究中心;天津大学药物科学与技术学院,天津市现代药物传递及功能高效化重点实验室)	2021(3)	
常用实验动物全身性麻醉药物的使用 卢晓,于灵芝,周聪颖,李如颖,陈文君,江善祥 (迪哲医药有限公司;南京农业大学动物医学院;上海实验动物研究中心;上海纽约大学文理学院)	2022(1)	
CNAS实验动物机构认可与AAALAC认证的比较分析 吴孝槐,肖巧喆,庞万勇,白玉,李垚,卢选成,冯涛 (中国合格评定国家认可中心;中国认证认可协会;赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台;北京诺和诺德医药科技有限公司;上海交通大学医学院;中国疾病预防控制中心)	2022(3)	
大鼠肠系膜淋巴液持续引流新方法的初步建立 张笑瑞,曹静,吴倩倩,康康,陈国元,吴宝金 (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;上海中医药大学科技实验中心实验动物中心)	2022(4)	
小鼠模型在消化道黏膜免疫及感染性疾病研究中的应用进展 于士颜 (上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院;上海交通大学医学院附属第九人民医院肿瘤科)	2022(1)	
不同方法建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型的比较研究 卢心鹏,刘蓉,黄文博,赵瑾,李洪涛 (广州医科大学附属第一医院,呼吸疾病国家重点实验室,广州呼吸健康研究院)	2022(3)	
适用于微创消融治疗研究的小鼠胰腺癌原位模型建立方法及比较 毛璐璐,张娜娜,刘昊,史爱华,朱子语,吕毅 (西安交通大学第一附属医院Med-X研究院再生与重建医学研究所;西安交通大学第一附属医院精准外科与再生医学国家地方联合工程研究中心;西安交通大学第一附属医院陕西省再生医学与外科工程研究中心;西安交通大学医学部;西安交通大学第一附属医院肝胆外科)	2022(2)	
三硝基苯磺酸诱导急性肠纤维化大鼠模型的改良方法 王怡如,蒋笑影,董若曦,潘一滨,韩向晖,曹永清 (上海中医药大学附属龙华医院肛肠科;上海中医药大学附属龙华医院中医外科研究所)	2022(4)	
不同时程APP/PS1模型小鼠嗅球病理和突触形态变化及美金刚干预作用 刘佳妮,刘剑刚,韦云,罗增刚,李浩,王怡,李琨 (中国中医科学院西苑医院,中国中医科学院老年病研究所;中国中医科学院研究生院;天津中医药大学;北京市中医管理局;北京开放大学)	2022(3)	



范昌发, 博士, 研究员, 博士生导师, 中国食品药品检定研究院模式动物研究室主任, 组建了该院的遗传修饰动物模型制作平台, 构建了全球首个人源化新冠小鼠模型 hACE2-KI, 自主建立了致癌模型 KI.C57-ras V2.0 等代表性小鼠模型, 并广泛用于我国新冠疫苗研发及新药临床前致癌性评价。发表论文 100 余篇, 包括 *Science* (2 篇)、*Nature*、*Cell Host & Microbe*、*STTT* (3 篇)、*NSR*、*EMI* (3 篇)、*Cancer Science*、*Cell Research*、*Virus* (2 篇)、*Vaccine* (4 篇) 等杂志; 获得 Cell Press 杂志社评选的“2020 年度中国区最受欢迎论文”; 申请专利 13 项, 授权 10 项; 承担或组织申请国家自然科学基金、国家重大新药创制专项、国家传染病重大专项、国家病原学专项课题等 17 项; 荣获中国药学会科学技术奖二等奖 1 项, 北京市科学技术进步奖一等奖 1 项、二等奖 1 项。自主研制遗传修饰大、小鼠模型 50 余种。

研究工作被英国 *The Economist*、美国 Cell Press、中国科学网、北京科技报等媒体专题报道。被科技部评选为“全国科技系统抗击新冠肺炎疫情先进个人”。

刘甦苏, 毕业于中国农业大学, 动物医学专业硕士, 副主任技师, 现工作于中国食品药品检定研究院, 一直从事与药品检定和安全评价相关的遗传修饰模式动物技术工作, 涉及医药学术领域中的肿瘤类动物模型、传染病动物模型、人源化动物模型三大类研究范围。工作期间主持、参与国家级及院级课题共 6 项, 发表期刊论文共 29 篇, 其中第一作者 7 篇 (SCI 论文 1 篇, 核心期刊论文 6 篇); 合编专著 1 部; 专利申请/授权共 10 项, 其中专利授权 4 项, 新申请专利 6 项; 起草并发布中国实验动物学会团体标准 2 项。获北京实验动物行业协会科学技术二等奖、2020 年北京实验动物行业协会先进个人称号。



$hKDR^{+/+}$ 人源化及 $Rag1^{-/-}$ 基因缺陷新型双靶点遗传修饰荷瘤小鼠模型的建立

刘甦苏, 吴 勇, 曹 愿, 赵皓阳, 翟世杰, 孙晓炜, 李琳丽, 范昌发

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 国家啮齿类实验动物资源库, 北京 102629)

[摘要] 目的 通过增强血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 人源化小鼠 ($hKDR^{+/+}$) 接纳不同来源的小鼠肿瘤细胞系的潜力, 建立能支持多种肿瘤细胞系成瘤的、可评价针对 VEGFR 靶点药物的新型荷瘤小鼠模型。**方法** 首先建立基于 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型评价针对 VEGFR 靶点抗体体内活性的方法, 同时采用 CRISPR/Cas9 技术构建重组激活基因 1 (recombination activating gene 1, $Rag1$) 敲除的 C57BL/6N 小鼠 (命名为 $Rag1^{-/-}$ 小鼠)。然后将 $Rag1^{-/-}$ 小鼠与 $hKDR^{+/+}$ 小鼠交配, 筛选获得双基因纯合、双靶点基因修饰的 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠。最后在 $hKDR^{+/+}$ 、 $Rag1^{-/-}$ 、 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和 C57BL/6N 小鼠上测试不同小鼠品系来源肿瘤细胞系的体内肿瘤生长差异。**结果** 针对 VEGFR 靶点设计的抗体在 $hKDR^{+/+}$ 小鼠体内表现出明显的抗肿瘤活性, 与 PBS 组相比, 肿瘤体积明显减小 ($P<0.01$), 肿瘤质量明显减轻 ($P<0.05$)。 $Rag1^{-/-}$ 小鼠、 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠的外周血 B 细胞和 T 细胞数量均明显减少 ($P<0.05$, $P<0.001$)。 C57BL/6 小鼠来源的 MC38 细胞接种 7 d 后, 在 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 、 $Rag1^{-/-}$ 、C57BL/6N 和 $hKDR^{+/+}$ 四组小鼠体内均可见肿瘤生长。 BALB/c 小鼠来源的 CT26 细胞接种 10 d 后, 仅在 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠体内见到肿瘤生长, 在 C57BL/6N 及 $hKDR^{+/+}$ 小鼠中均未见肿瘤生长; 接种后 3 周, $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠的成瘤体积明显大于 $Rag1^{-/-}$ 小鼠 ($P<0.01$)。**结论** 获得了 $Rag1$ 基因敲除小鼠, 并进一步筛选获得新型 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 双靶点基因修饰小鼠模型; $Rag1$ 基因缺失时, 不同品系小鼠来源的肿瘤细胞系更易成瘤。这提示可以通过降低 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠的免疫反应能力, 增强或扩大该模型小鼠接纳肿瘤细胞系的范围, 构建多种可用于评价 VEGFR 靶点药物的荷瘤小鼠模型。

[关键词] $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠; $Rag1^{-/-}$ 基因敲除小鼠; VEGFR 靶点; 抗体; 肿瘤

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0103-09



[基金项目] 国家科技重大专项课题“创新生物技术药评价及标准化关键技术研究”(2018ZX09101-001)

[第一作者] 刘甦苏(1981—), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事模式动物研究。E-mail: liususu@nifdc.org.cn

[通信作者] 范昌发(1970—), 男, 研究员, 主要从事模式动物研究。E-mail: fancf@nifdc.org.cn。ORCID: 0000-0001-5556-2025

Establishment of *hKDR*^{+/+} Humanized and *Rag1*^{-/-} Gene Knockout Double Genetically Modified Mouse Model

LIU Susu, WU Yong, CAO Yuan, ZHAO Haoyang, ZHAI Shijie, SUN Xiaowei, LI Linli, FAN Changfa

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control; National Rodent Laboratory Animal Resources Center, Beijing 102629, China)

Correspondence to: FAN Changfa (ORCID: 0000-0001-5556-2025), E-mail: fancf@nifdc.org.cn

[ABSTRACT] Objective Through improving the potential of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-humanized mouse model (*hKDR*^{+/+}) with C57BL/6N background to allow the growth of different mouse tumor cell lines, to establish novel tumor-bearing mouse models which can support *in vivo* tumorigenesis of different mouse tumor cell lines and be used to evaluate drugs targeting VEGFR. **Methods** Firstly, a method to evaluate the *in vivo* activity of antibody targeting VEGFR based on the *hKDR*^{+/+} humanized mouse model was established. Recombinant activating gene 1 (*Rag1*) knockout mice (*Rag1*^{-/-}) were established using CRISPR/Cas9 technology. Then these *Rag1*^{-/-} mice were crossed with *hKDR*^{+/+} mice to get a double gene modified homozygous *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} mouse model by screening. Finally, tumor cell lines derived from different mouse strains were tested on the double gene-modified mouse model to compare the differences in tumor growth. **Results** Antibodies designed for VEGFR showed significant anti-tumor activity in *hKDR*^{+/+} mice, which significantly reduced tumor volume and weight compared with the PBS group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The number of B cells and T cells in the peripheral blood of *Rag1*^{-/-} mice and *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} mice decreased ($P < 0.05$, $P < 0.001$). Tumors were observed in *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-}, *Rag1*^{-/-}, wild-type, and *hKDR*^{+/+} mice after 7 d of inoculation of MC38 cells derived from C57BL/6 mice. Tumors were only observed in groups of *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} and *Rag1*^{-/-} mice, but not in the wild-type and *hKDR*^{+/+} mice after 10 d of inoculation with CT26 cells derived from BALB/c mice. After 3 weeks of inoculation, the tumor volume of *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} mice was significantly larger than that of *Rag1*^{-/-} mice ($P < 0.01$). **Conclusion** *Rag1* knockout mice were obtained and a novel *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} double genes modified mouse model was further screened. The tumor cell lines from different mouse strain origins were more prone to growth in mice with *Rag1* gene deficiency. The results suggest that the reduced immune response of *hKDR*^{+/+} humanized mice will improve the capacity of supporting the growth of mouse tumor lines in the model. As a result, more tumor-bearing mouse models may be constructed for the evaluation of drugs targeting VEGFR in this way.

[Key words] *hKDR*^{+/+} humanized mice; *Rag1*^{-/-} knockout mice; VEGFR target; Antibodies; Tumor

肿瘤血管生成与肿瘤生长、侵入和转移关系密切,因此抗血管生成是治疗肿瘤的重要策略之一。其中,以血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体家族(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR, 即KDR)为靶点的抗肿瘤治疗越来越受到研究人员的重视。目前,作用于VEGF/VEGFR通路的抗肿瘤药物主要有两类:一类是单克隆抗体,另一类是小分子VEGFR酪氨酸激酶抑制剂。这两类药物均已在我国临床中应用。针对VEGFR靶点的抗体药物如雷莫芦单抗(ramucirumab, 商品名: Cyramza)作为一种全人源、靶向VEGFR的IgG1型单克隆抗体,是目前唯一上市的VEGFR靶点抗体药物。小鼠VEGFR(mKDR)与人VEGFR(hKDR)存

在不同的关键氨基酸,导致二者功能差异较大。研究人员针对基因研发的抗体不能与基因结合,而且在评价相关抗体时缺少合适的小鼠模型。因此,建立人源化^{+/+}小鼠模型有助于该靶点抗体药物的研发及其体内效力和安全性的评价^[1-3]。

常见的免疫缺陷小鼠有NOD scidy^[4]、NOD Ragy^[5]、NSG MHC I -null^[6]、*Rag1*、*Rag2*等,这些小鼠不能产生功能性T、B淋巴细胞或自然杀伤(natural killer, NK)细胞^[7-8],因而可以作为移植瘤模型的载体^[4,9],很好地支持非鼠源性肿瘤细胞成瘤,建立荷瘤小鼠模型。*Rag1*基因编码重组激活(recombinase activating gene, Rag)复合物的催化成分,其突变或缺失会使其编码的重组酶活性完全或部分丧失,使T、B淋巴细胞

的早期发育被阻断,导致原发性免疫缺陷病^[8]。故 *Rag1* 基因敲除小鼠常被用于疾病小鼠模型,以损害T细胞和B细胞的发育来减弱免疫排斥。

本实验室前期已建立 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠模型,证实其能有效地评价人 VEGFR 抗体的体内效力及安全性。该小鼠模型全称为 C57BL/6-KDR^{em1 (hKDR)}/NIFDC,简称 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠。该模型采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将 *hKDR* 基因的蛋白质编码区的部分外显子 4~7, 插入到 *mkdr* 基因的外显子 4 处构建获得^[10]。该模型免疫系统正常,能很好地支持同背景来源的鼠源性肿瘤细胞的生长成瘤,但存在不同背景来源的鼠源肿瘤细胞系和人源肿瘤细胞相互排斥的问题,不易建成多类型的成瘤鼠模型。为解决这个问题,本研究首先测试了 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠评价针对 VEGFR 靶点抗体体内活性的能力,同时采用 CRISPR/Cas 9 技术敲除 C57BL/6N 小鼠的 *Rag1* 基因,获得 T、B 淋巴细胞降低的免疫缺陷 *Rag1*^{-/-} 小鼠模型;随后将 *Rag1*^{-/-} 小鼠与 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠杂交,筛选获得双靶点遗传修饰小鼠,该小鼠模型全称为 C57BL/6-Rag1^{em1}/KDR^{em1 (hKDR)}/NIFDC,简称 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠。本研究的目的是在 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠模型的基础上,同时降低其对不同品系小鼠来源细胞的排斥,提高不同背景肿瘤细胞的接种成功率,为开展多种抗肿瘤抗体治疗研究提供合适的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6N 和 ICR 小鼠来自中国食品药品检定研究院实验动物研究所 [SCXK (京) 2022-0002], 繁育环境为屏障设施。动物接种及观察实验在屏障设施环境 [SYXK (京) 2022-0014] 中进行,饲喂灭菌小鼠颗粒饲料,饮用灭菌自来水。在清洁级环境下进行动物取材。本实验所有研究均按照中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理委员会批准的动物方案进行,审查编号为中检动(福)第 2021 (B) 002 号。

1.2 结肠癌细胞株

鼠源结肠癌细胞 MC38 和 CT26 由北京神州细胞生物技术有限公司赠送。其中,MC38 细胞来自 C57BL/6 小鼠结肠腺癌细胞系,购自上海慧颖生物科技有限公司(货号 M023),CT26 细胞来自 BALB/c 小鼠结肠腺癌细胞系,购自美国标准培养物保藏中心(American

Type Culture Collection, ATCC) (编号 CRL-2638),均传代 6~8 代。

1.3 主要仪器及试剂

480 II 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司; Nano Drop 超微量分光光度计购自美国 Thermo 公司; Cas9 转录试剂盒 (AM1344), Poly (A) 加尾试剂盒 (AM1350), MEGAshortscript T7 sgRNA 转录试剂盒 (AM1354), MEGAclear 转录清除回收试剂盒 (AM1908) 均购自美国 Life Technologies 公司,质粒提取试剂盒 (#12362) 和 RNeasy Mini 纯化试剂盒 (#74104) 购自中国 Qiagen 公司。细胞培养用培养基 (11960044)、胎牛血清 (10100147)、青链霉素混合液 (15140122)、0.25% 的胰蛋白酶 (25200072) 均购自美国 Gibco 公司; 细胞流式细胞术所用试剂均购自美国 BioLegend 公司。抗体药物 Ramucirumab 购自美国 Eli Lilly 公司, VEGFR2-HK19 由北京义翘神州科技股份有限公司赠送。本研究中所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。舒泰 50 购自法国 Virbac 公司 [批准文号: (2020) 外兽药证字 06 号], 盐酸赛拉唑购自长沙拜特生物科技有限责任公司 (批准文号: 兽药字 180121777)

1.4 用 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠评价抗体的体内抗肿瘤活性

hKDR^{+/+} 人源化小鼠模型的构建步骤详见文献^[10]。选用 3 周龄雄性 *hKDR*^{+/+} 小鼠,将鼠结肠癌 MC38 细胞 (5×10^6 细胞/只) 皮下接种到小鼠背侧。每天监测小鼠的一般健康状况,每周测量 2 次体质量,并使用游标卡尺测量肿瘤长径 (*a*) 和短径 (*b*), 计算肿瘤体积 $V = (a \times b^2) / 2$ 。当肿瘤体积达到 100~200 mm³ 时,将荷瘤小鼠随机分为不同组 (每组 4 只), 每周两次给予 Ramucirumab、VEGFR2-HK19 或同等体积的 PBS 溶剂, 每只小鼠给药剂量为 20 mg/kg, 共治疗 3 周。给药后, 每 5 d 测量 1 次肿瘤体积, 每周测量 1 次小鼠体质量。实验结束时, 采用 CO₂ 吸入法对实验动物实施安乐死后解剖小鼠, 收集肿瘤组织, 称重。

1.5 构建 *Rag1*^{-/-} 免疫缺陷小鼠模型

通过 NCBI 查询 *Rag1* 鼠源基因, *Rag1* 基因位于 2 号染色体, 全长 11 kb (Gene ID: 19373), 利用 crispr.mit.edu 网站在 *Rag1* 基因的第二外显子内设计一对互补的敲除引物, 并构建 sgRNA 表达载体。随后使用质粒提取试剂盒提取构建好的 sgRNA 表达载体, 并使用引

物 Rag1-pT7-sgRNA-F、Rag1-pT7-sgRNA-R (序列见表1), 以sgRNA质粒为模板进行PCR扩增。在37℃条件下用MEGAscript T7转录试剂盒进行体外转录, 并使用MEGAclean转录清除回收试剂盒进行纯化。超数排卵C57BL/6N小鼠、显微注射并胚胎移植到ICR小鼠后, 筛选获得Rag1杂合敲除小鼠模型。随后进一步通过交配筛选Rag1纯合敲除小鼠模型, 并留种建系。为进一步验证基因敲除的正确性, 随机取Rag1纯合基因敲除小鼠与野生型小鼠, 针对Rag1基因的编码序列设计引物, 上游引物为Rag1-F, 下游引物为Rag1-R (序列见表1), 扩增目的片段为351 bp, 通过基因扩增测序后进行序列验证和比对, 随后进一步采用外周血淋巴细胞流式细胞术进行表达验证。

表1 模型建立所需引物信息

Table 1 Primers for model development

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')
Rag1-T7 sgRNA-F	TAGGTGAAACGATTCCCACAGATG
Rag1-T7 sgRNA-R	AAACCATCTGTGGGAATCGTTTCA
Rag1-F	GGGGAAACCTTACCTAGAACAG
Rag1-R	AGAATTCCGTCGGGTGGAT
KDR-F	TTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAG
KDR-R	CCAGCACTGTCTAAATTCAACGGC
KDR-WF	GTATGTGTTTCTCTGCCCTCCTCG

1.6 构建 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源化免疫缺陷双靶点小鼠模型

构建的 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠和纯合 $Rag1^{-/-}$ 基因敲除小鼠, 分别饲养于屏障设施, 选取6~8周龄的小鼠交配。剪鼠尾提取DNA, 用PCR鉴定其基因型, 选出双基因阳性的小鼠定为F1代并同胞兄妹交配。依次类推, 经过5代交配后得到双基因纯合的遗传修饰小鼠。

选取出生3~7 d的 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 纯合人源化免疫缺陷小鼠6只, 采用PCR方法鉴定基因型。剪取尾部0.5 cm左右组织, 提取基因组DNA, PCR扩增筛选, 引物见表1, 分别命名为Rag1-F、Rag1-R、KDR-F、KDR-R和KDR-WF。

1.7 外周血淋巴细胞流式细胞术检测

使用舒泰和赛拉嗪麻醉各实验分组的3只小鼠后, 眼内眦采血, 血样加入等体积的0.9% NaCl稀释; 平铺至淋巴细胞分离液面上, 离心取分离液层, 去除红细胞后, PBS洗涤2次。将小鼠外周血淋巴细胞重悬于染

色缓冲液中, 分别加入抗CD3 (PE标记) 和抗CD19 (APC标记) 的荧光抗体进行标记, 冰上避光孵育20 min, 染色缓冲液洗涤2次后, 按流式细胞常规方法检测T细胞 (CD3标志) 和B细胞 (CD19标志) 含量并分析细胞比例。采用CellQuest软件分析样品, 每个样品收集 1×10^4 个细胞检测淋巴细胞数量, 结果以淋巴细胞百分含量散点图表示。

1.8 培养肿瘤接种细胞

鼠源结肠癌CT26和MC38细胞用含10% FBS和1% PS的DMEM培养基, 在37℃、5% CO₂的培养箱中培养, 待细胞铺满80%左右, 使用胰蛋白酶消化细胞, 离心收获并传代培养, 至一定数量后收集, 将收集到的细胞用锥虫蓝进行染色并计数。

1.9 建立双靶点遗传修饰的荷瘤小鼠模型

选用 $hKDR^{+/+}$ 、 $Rag1^{-/-}$ 、 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和C57BL/6N共4种不同小鼠, 每组各5只, 用于建立荷瘤小鼠模型。收集对数生长期的CT26和MC38细胞, 使用无血清的DMEM培养液重悬细胞, 并将细胞浓度调整为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 后, 各取100 μL 分别接种于小鼠左右肢根部皮下。接种当日记为第0日, 每日观察接种部位肿瘤生长情况, 并称量小鼠体重; 待观察到肿瘤生长, 每周2次用游标卡尺测量肿瘤长径 (a) 和短径 (b), 按照肿瘤体积 $V = (a \times b^2) / 2$ 计算肿瘤体积。当小鼠体重质量下降超过25%~30%或肿瘤体积超过3 000 mm³, 提示小鼠生存质量受到严重影响, 这时即停止测量, 并采用CO₂吸入法对实验动物实施安乐死。测定时间是4周。

1.10 数据统计分析

用GraphPad Prism 8.0软件对结果数据进行统计分析并制图方差齐性分析后, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据分析采用两因素方差分析, 组内两两比较采用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

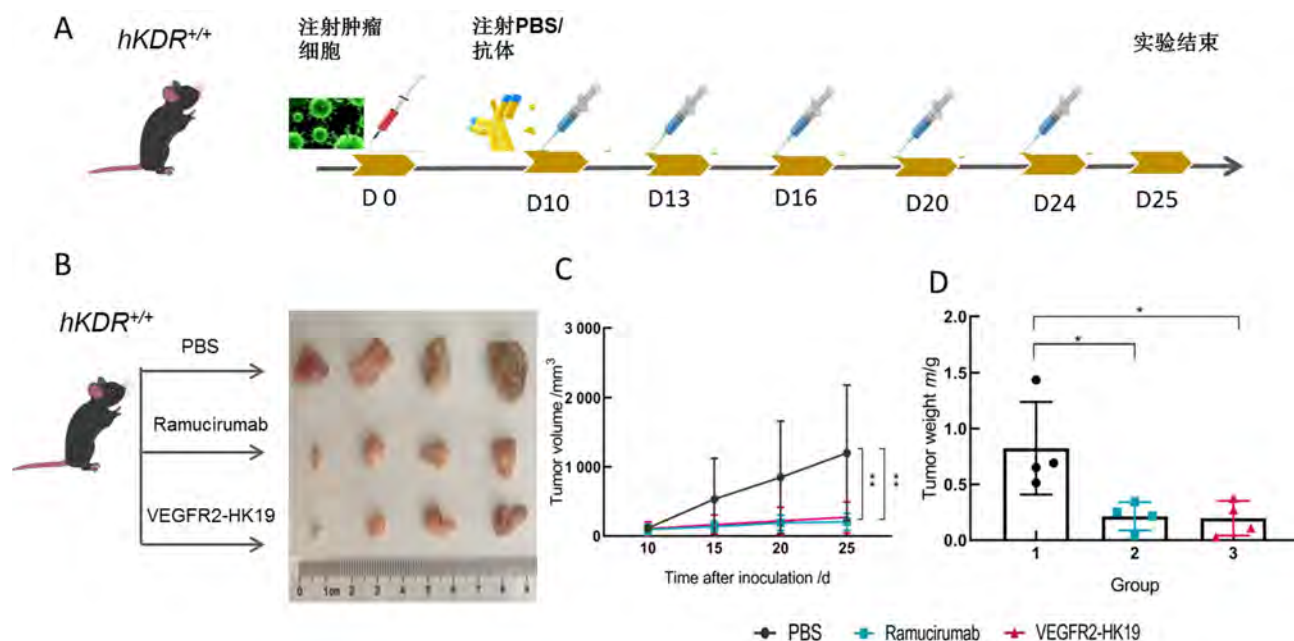
2 结果

2.1 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型能很好地评价 VEGFR2靶点抗体的抗肿瘤活性

为了验证 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型, 评价针对VEGFR靶点设计的抗体药物的抗肿瘤活性, 本研究首先通过皮下注射MC38细胞建立了 $hKDR^{+/+}$ 荷瘤模型。如图1A所示, 携带MC38衍生肿瘤的 $hKDR^{+/+}$ 小鼠接受Ramucirumab和VEGFR2-HK19这两种针对VEGFR靶

点的单克隆抗体治疗。其中,单抗 Ramucirumab 抗体已经 FDA 批准上市。实验全程,测量肿瘤体积。结果表明,与 PBS 对照组相比,经 Ramucirumab 和 VEGFR2-HK19 治疗后 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的肿瘤外观见图 1B; 统计分析显示治疗组肿瘤体积 (图 1C) 明显减小

($P<0.01$), 肿瘤质量 (图 1D) 明显减轻 ($P<0.05$)。相比之下, PBS 组不会导致 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的肿瘤形状、肿瘤体积或质量改变。这些结果表明,抗体能有效抑制 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的肿瘤生长, $hKDR^{+/+}$ 小鼠能很好地评价针对 VEGFR 靶点抗体的体内抗肿瘤活性。



注: A 为用人源化抗体或 PBS 治疗 MC38 荷瘤 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的实验方案示意图 (D0、D10、D13、D16、D20、D24 和 D25 分别表示注射肿瘤细胞当天及之后的第 10、13、16、20、24、25 天); B 为在治疗结束时, 对每只小鼠的肿瘤进行解剖, 并确定肿瘤大小; C 为 Ramucirumab 和 VEGFR-HK19 抗体能显著降低肿瘤体积 (每组 4 只小鼠, $^{**}P<0.01$); D 为治疗结束时, 各组肿瘤质量的比较 (每组 4 只小鼠, $^{*}P<0.05$)。

Note: A shows the experimental flow diagram of treating MC38 tumor bearing $hKDR^{+/+}$ mice with humanized antibody or PBS (D0, D10, D13, D16, D20, D24 and D25 show the day of injection and the 10th, 13th, 16th, 20th, 24th and 25th day after the injection of tumor cells, respectively); B shows the tumors were dissected from each mouse in different groups at the end of the treatment period; C shows Ramucirumab and VEGFR-HK19 can significantly reduce tumor volume ($n=4$, $^{**}P<0.01$); D shows the tumor weight in different groups at the end of the treatment ($n=4$, $^{*}P<0.05$).

图1 针对 VEGFR2 靶点的抗体能抑制 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的肿瘤生长

Figure 1 Antibody targeting VEGFR2 targets can inhibit tumor growth in $hKDR^{+/+}$ mouse

2.2 成功构建 $Rag1^{-/-}$ 免疫缺陷小鼠模型

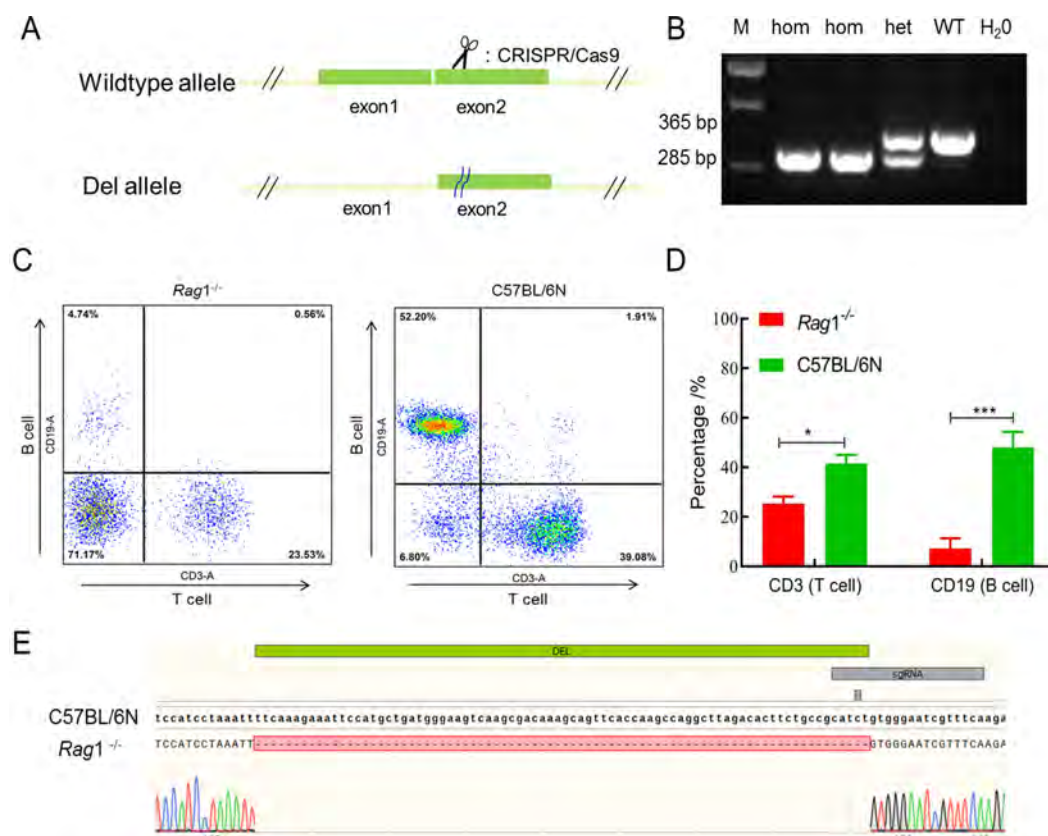
根据模型构建示意图 (图 2A), 设计并合成 sgRNA 后, 将活性最高的 sgRNA 插入到带 T7 启动子质粒载体 pT7-sgRNA 上并进行体外转录, 随后将 sgRNA 及 Cas9 mRNA 注射受精卵并移植至 ICR 假孕鼠。共注射并移植受精卵 196 枚, 出生小鼠 18 只, 筛选获得首建鼠 1 只。经过与野生型 C57BL/6N 杂交扩大繁殖后自交, 获得 3 只 $Rag1^{-/-}$ 基因敲除小鼠; PCR 鉴定基因型结果见图 2B, 只扩增出 285 bp 目的条带为纯合小鼠, 扩增出 365 bp 及 285 bp 目的条带为杂合小鼠。

针对 $Rag1$ 基因双向 DNA 测序比对, 结果证明

$Rag1$ 基因在 382 到 462 位点缺失 80 bp (图 2E), 片段缺失位点在 sgRNA 设计位点的前端。进一步扩繁后, 取 $Rag1^{-/-}$ 基因敲除小鼠的眼眶血, 流式细胞术检测外周血中 T 细胞和 B 细胞含量。结果显示, $Rag1^{-/-}$ 小鼠的 T 细胞 (CD3 标志) 和 B 细胞 (CD19 标志) 含量较 C57BL/6N 小鼠的明显降低 ($P<0.05$, $P<0.001$, 图 2C~D), 说明 $Rag1^{-/-}$ 免疫缺陷小鼠模型建立成功。

2.3 成功交配获得 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源化免疫缺陷小鼠

在验证 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠能很好地评价针对



注：A为模型的构建设计图示；B为 *Rag1* 基因敲除 (*Rag1*^{-/-}) 小鼠的基因型鉴定图 (hom, 基因纯合小鼠; het, 基因杂合小鼠; WT, 野生型小鼠); C为 *Rag1*^{-/-} 基因小鼠和 C57BL/6N 野生型小鼠外周血 T、B 淋巴细胞百分含量散点图; D为 2 组小鼠 T、B 淋巴细胞百分含量分析柱状图 (每组 3 只小鼠, **P*<0.05, ****P*<0.001); E 为 *Rag1* 基因目的片段测序及序列对比, 其中 DEL 表示敲除的片段。

Note: A shows model construction design; B shows genotype identification map of *Rag1*^{-/-} mice (hom shows homozygous mice; het shows heterozygous mice; WT shows wild-type mice). C shows scatter diagrams of the percentage of T and B lymphocytes in peripheral blood of *Rag1*^{-/-} mice and C57BL/6N wild-type mice. D shows the bar chart of percentage analysis of T and B lymphocytes in the two groups of mice (*n*=3, **P*<0.05, ****P*<0.001). E shows the sequence comparison of target fragments of the *Rag1* gene. DEL shows the knockout segment.

图2 *Rag1*^{-/-} 基因敲除小鼠的构建及验证

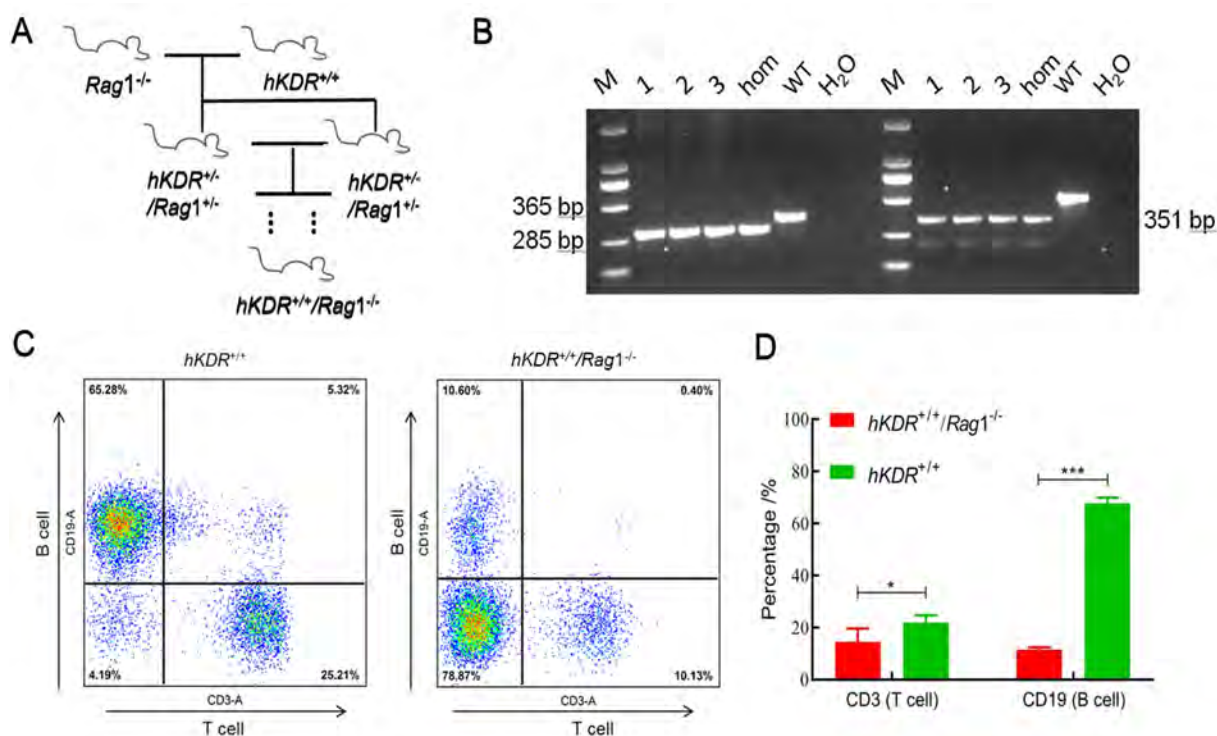
Figure 2 Design strategy and validation of *Rag1*^{-/-} gene knockout mice

VEGFR 抗体的体内抗肿瘤活性基础上, 进一步将雄性 *Rag1*^{-/-} 小鼠与雌性 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠交配, 筛选获得 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 双靶点遗传修饰小鼠, 交配及筛选流程见图 3A。针对插入基因 *hKDR*⁺ 及敲除基因 *Rag1* 设计引物, 进行双靶点小鼠模型的基因型鉴定, *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠目的条带大小为 351 bp, *Rag1*^{-/-} 小鼠目的条带大小为 285 bp, 小鼠正确扩增这 2 种条带则判定为 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠。图 3B 中样本 1、2、3 即为双基因纯合小鼠。

通过流式细胞术检测 *hKDR*^{+/+} 小鼠和 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠外周血中 B 细胞 (CD3 标志) 和 T 细胞 (CD19 标志) 含量, 可见 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 双靶点小鼠中的 T、B 细胞含量较 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠明显降低, 差异有统计学意义 (*P*<0.05, *P*<0.001, 图 3C~D)。

2.4 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 人源双靶点基因修饰小鼠利于 CT26 肿瘤细胞生长

观察 CT26 和 MC38 鼠源肿瘤细胞分别接种于 *hKDR*^{+/+}、*Rag1*^{-/-}、*hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 和 C57BL/6N 这 4 种小鼠左右后肢根部皮下的肿瘤生长情况, 结果显示, 右后肢接种 C57BL/6N 小鼠来源的 MC38 细胞后, 4 种小鼠均在 7 d 左右开始有肿瘤生长, 整个实验周期各种小鼠的成瘤体积差异无统计学意义 (图 4A)。左后肢接种 BALB/c 小鼠来源的 CT26 细胞 10 d 后, 仅 *Rag1*^{-/-} 和 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠观察到肿瘤生长, 而 C57BL/6N 和 *hKDR*^{+/+} 小鼠未见肿瘤生长; 接种后 3 周, *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠的成瘤体积大于 *Rag1*^{-/-} 小鼠, 二者差异有统计学意义 (*P*<0.01), 具体数据如图 4B~D 所示。从成瘤实验结果可知, 同一只小鼠同时接种 MC38 和



注: A为*hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-}人源双靶点基因修饰小鼠繁育流程; B为*hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-}人源双靶点基因小鼠基因型鉴定(1、2、3为双基因纯合小鼠, hom指基因纯合小鼠, WT指野生型小鼠); C为*hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-}人源双靶点基因修饰小鼠的外周血T、B淋巴细胞百分含量散点图; D为2组小鼠T、B淋巴细胞百分含量分析柱状图(每组3只小鼠, **P*<0.05, ****P*<0.001)。

Note: A shows breeding process of *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} humanized double target gene-modified mice; B shows genotype identification of *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} humanized double target gene mice (1, 2, 3 show homozygous mice with two genes, hom shows homozygous mice, WT shows wild-type mice); C shows scatter diagrams of percentage of T and B lymphocytes in the peripheral blood of *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} humanized double target gene-modified mice; D shows the bar chart of percentage analysis of T and B lymphocytes in the two groups of mice (*n* = 3, **P*<0.05, ****P*<0.001).

图3 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-}双靶点基因修饰小鼠的获得及验证

Figure 3 Design strategy and validation of *hKDR*^{+/+} humanized and *Rag1*^{-/-} deficient double genetically modified mouse model

CT26细胞后成瘤情况不一致,提示不同来源背景的肿瘤细胞系只能在免疫缺陷的*hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-}小鼠和*Rag1*^{-/-}小鼠中有肿瘤生长。

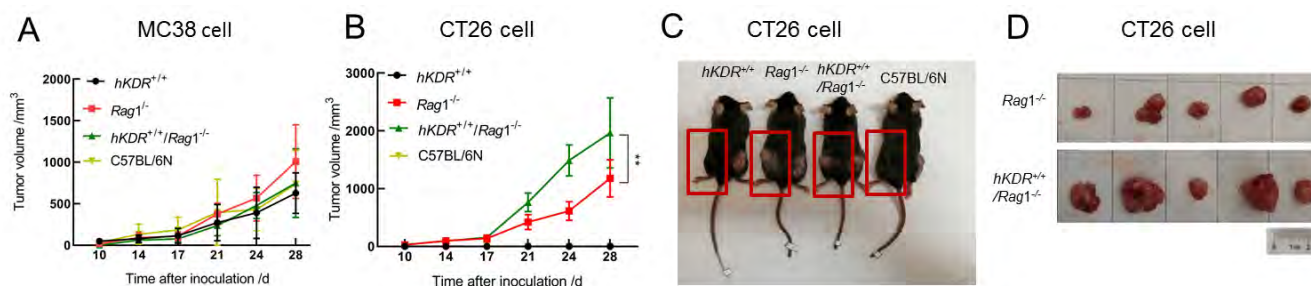
3 讨论

肿瘤的发生、发展与转移受到多种因素的影响,肿瘤微环境中新生血管的形成是多因素相互作用的结果,新生血管在肿瘤的发展转移过程中起到重要作用^[11]。近年来,以*hKDR*基因及其受体为靶点的抗肿瘤治疗受到越来越多的关注,相关人源化小鼠模型在药效评价及其作用机制研究等方面可发挥基础性作用。

本研究团队前期通过CRISPR/Cas9技术已获得了人VEGFR插入的*hKDR*^{+/+}人源化小鼠模型^[10]。本研究中,首先皮下接种C57BL/6来源的MC38细胞并使用靶点VEGFR的抗体药物进行治疗,结果显示抗体药物能

抑制肿瘤生长,证明该模型能很好地评价VEGFR抗体的体内抗肿瘤活性。但前期实验接种BALB/c遗传背景的CT26鼠源细胞后不见肿瘤生长,分析原因可能是小鼠免疫系统对异源肿瘤细胞产生了排斥作用。

因为表型均一、遗传稳定、背景数据充分的优势,模式动物的制作多用C57BL/6品系^[12]。而在开展抗肿瘤研究时往往需要接种不同背景的肿瘤细胞,以获得不同肿瘤类型的荷瘤小鼠模型,用于药效学评价。不同背景的成瘤鼠模型对免疫抑制剂的免疫应答存在差异^[13]。为此,在获得*hKDR*^{+/+}人源化小鼠的基础上,本研究通过敲除C57BL/6N小鼠的*Rag1*基因的第二个外显子处前端80 bp片段,导致其编码的重组酶活性部分丧失,使T、B淋巴细胞的早期发育被阻断,导致免疫缺陷,获得*Rag1*^{-/-}小鼠。较已报道的模型而言,本模型采用CRISPR/Cas9技术构建,周期较短,费用较



注：A 为 MC38 鼠源肿瘤细胞移植后的 4 种小鼠肿瘤体积变化比较；B 为 CT26 鼠源肿瘤细胞移植后的 4 种小鼠生长情况；C 为实验末期接种 CT26 细胞（左，红框所示）和 MC38 细胞（右）的成瘤小鼠外观；D 为实验末期接种 CT26 细胞 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠的肿瘤取材。每组 5 只小鼠，** $P < 0.01$ 。

Note: A shows comparison of tumor volume changes in the four types of mice after transplantation of MC38 tumor cells; B shows comparison of tumor volume changes in the four types of mice after transplantation of CT26 tumor cells; C shows the appearances of tumor forming mice inoculated with CT26 cells (left, showed in the red boxes) and MC38 cells (right) at the end of the treatment period; D shows tumor samples of $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ and $Rag1^{-/-}$ mice inoculated with CT26 cells at the end of the experiment. $n=5$, ** $P < 0.01$.

图 4 MC38 和 CT26 肿瘤细胞在 $Rag1^{-/-}$ 基因缺失背景的小鼠模型中正常生长

Figure 4 Tumor growth of MC38 and CT26 cells in mice with $Rag1^{-/-}$ gene deficiency

低。接着将 $hKDR^{+/+}$ 小鼠和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠经杂交筛选，获得 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源化免疫缺陷小鼠模型，以期进一步降低宿主小鼠的免疫排斥能力，提高不同背景肿瘤细胞的接种成功率，为相关抗体药物的研发提供更多类型的荷瘤动物模型。

MC38 和 CT26 是常用的小鼠结肠癌细胞株，都属于高转移性小鼠结肠癌细胞，但背景来源不同。其中 CT26 细胞是被 N-亚硝基-N-甲基脲烷诱导得到的未分化的 BALB/c 遗传背景的小鼠结肠癌细胞，MC38 细胞是来自 C57BL/6 小鼠的结肠腺癌细胞系^[14-15]。本实验中，同一只小鼠接种 MC38 和 CT26 细胞后肿瘤生长情况存在差异，MC38 细胞在 $hKDR^{+/+}$ 、 $Rag1^{-/-}$ 、 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和 C57BL/6N 这 4 种小鼠中均成瘤，但 CT26 细胞仅在 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠中正常生长。这些结果表明，降低 T、B 细胞含量能有效增强 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型接受不同背景来源细胞成瘤的潜力。这一结果为下一步的人源肿瘤细胞系或者人源肿瘤组织的移植提供了工作思路^[16-17]。

已有的比较研究已经初步阐明，针对 VEGFR 靶点的抗体是通过诱导细胞凋亡，抑制血管生成，从而表现出抗肿瘤活性，而非依靠宿主免疫反应杀灭肿瘤细胞^[18-20]。这提示本研究建立的 $hKDR^{+/+}$ 人源化及 $Rag1^{-/-}$ 基因敲除的双靶点基因修饰小鼠模型，通过降低自身免疫系统的功能，增强了肿瘤细胞移植的成功率。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理委员会批准[编号：中检动(福)第 2021(B)002 号]。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 the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of National Institutes for Food and Drug Control (Approval Letter No. #2021-B-002). 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]

刘魁苏和范昌发负责研究方案设计、手稿撰写及修订；吴勇和曹愿负责抗体实验；赵皓阳、翟世杰、孙晓炜和李琳丽负责动物实验和数据收集。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者声明无利益冲突、无署名纠纷。

[参考文献 References]

- [1] OLSSON A K, DIMBERG A, KREUGER J, et al. VEGF receptor signalling—in control of vascular function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5):359-371. DOI:10.1038/nrm1911.
- [2] CHUNG A S, LEE J, FERRARA N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(7):505-514. DOI:10.1038/nrc2868.
- [3] EBOS J M L, KERBEL R S. Antiangiogenic therapy: impact on

- invasion, disease progression, and metastasis[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(4):210-221. DOI:10.1038/nrclinonc.2011.21.
- [4] YAO L C, ARYEE K E, CHENG M S, et al. Creation of PDX-bearing humanized mice to study immuno-oncology[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1953:241-252. DOI:10.1007/978-1-4939-9145-7_15.
- [5] ITO R, KATANO I, KAWAI K J, et al. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice [J]. *Transplantation*, 2009, 87(11): 1654-1658. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181a5cb07.
- [6] BREHM M A, KENNEY L L, WILES M V, et al. Lack of acute xenogeneic graft- versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression[J]. *FASEB J*, 2019, 33(3): 3137-3151. DOI: 10.1096/fj.201800636R.
- [7] FUGMANN S D, LEE A I, SHOCKETT P E, et al. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 495-527. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.495.
- [8] MOMBAERTS P, IACOMINI J, JOHNSON R S, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes[J]. *Cell*, 1992, 68(5):869-877. DOI:10.1016/0092-8674(92)90030-g.
- [9] BENTZIEN F, STRUMAN I, MARTINI J F, et al. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1 (-/-) mice[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19):7356-7362.
- [10] CAO Y, SUN C Y, HUO G T, et al. Novel hKDR mouse model depicts the antiangiogenesis and apoptosis-promoting effects of neutralizing antibodies targeting vascular endothelial growth factor receptor 2[J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(1):115-128. DOI:10.1111/cas.15594.
- [11] KARAMAN S, LEPPÄNEN V M, ALITALO K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease[J]. *Development*, 2018, 145(14):dev151019. DOI:10.1242/dev.151019.
- [12] CHU V T, WEBER T, GRAF R, et al. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes[J]. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 4. DOI: 10.1186/s12896-016-0234-4.
- [13] 白杰, 高志涛, 石龙, 等. 探讨PD-1抑制剂在不同小鼠肿瘤模型中的应答差异[J]. *解放军医学院学报*, 2019, 40(4):357-363. DOI:10.3969/j.issn.2095-5227.2019.04.013.
- BAI J, GAO Z T, SHI L, et al. Differential PD-1 inhibitor efficacy among different mouse tumor models[J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2019, 40(4):357-363. DOI:10.3969/j.issn.2095-5227.2019.04.013.
- [14] TANIURA T, IIDA Y, KOTANI H, et al. Immunogenic chemotherapy in two mouse colon cancer models[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(10):3527-3539. DOI:10.1111/cas.14624.
- [15] 林怡婷, 林雨虹, 阮梅, 等. MC38-luc 稳转细胞株的构建及在小鼠结肠癌肝转移模型中的应用[J]. *福建医科大学学报*, 2018, 52(5):305-310.
- LIN Y T, LIN Y H, RUAN M, et al. Construction and validation of luciferase expressing MC38 cell in murine hepatic metastasis model of colon cancer[J]. *J Fujian Med Univ*, 2018, 52(5):305-310.
- [16] HERBST R S, ARKENAU H T, SANTANA-DAVILA R, et al. Ramucirumab plus pembrolizumab in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer, gastro-oesophageal cancer, or urothelial carcinomas (JVPDF): a multicohort, non-randomised, open-label, phase 1a/b trial [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(8): 1109-1123. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30458-9.
- [17] CHATTERJEE S, HEUKAMP L C, SIOBAL M, et al. Tumor VEGF: VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(4):1732-1740. DOI:10.1172/JCI65385.
- [18] GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKIS M I, SIVRIDIS E, et al. Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer[J]. *Eur J Clin Invest*, 2007, 37(11):878-886. DOI:10.1111/j.1365-2362.2007.01866.x.
- [19] LU R M, CHIU C Y, LIU I J, et al. Novel human Ab against vascular endothelial growth factor receptor 2 shows therapeutic potential for leukemia and prostate cancer[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(12):3773-3787. DOI:10.1111/cas.14208.
- [20] FRANKLIN M C, NAVARRO E C, WANG Y J, et al. The structural basis for the function of two anti-VEGF receptor 2 antibodies[J]. *Structure*, 2011, 19(8): 1097-1107. DOI: 10.1016/j.str.2011.01.019.

(收稿日期:2022-10-09 修回日期:2022-11-27)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,赵宇朋)

[引用本文]

刘甦苏, 吴勇, 曹愿, 等. *hKDR*^{+/+}人源化及 *Rag1*^{-/-}基因缺陷新型双靶点遗传修饰荷瘤小鼠模型的建立[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(2): 103-111. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.154.

LIU S S, WU Y, CAO Y, et al. Establishment of *hKDR*^{+/+} humanized and *Rag1*^{-/-} gene knockout double genetically modified mouse model[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2):103-111. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.154.



张 丹, 中国协和医科大学药理学博士, 曾在美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 从事博士后研究工作 4 年, 现为中国医学科学院北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室、新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室研究员, 博士生导师。主要研究方向包括: (1) 精神、神经系统疾病的机制研究及相关治疗药物的研发; (2) 炎症免疫相关疾病的机制研究及治疗药物研发; (3) 活性天然产物的生物靶标鉴定与作用机制研究; (4) 肠道微生物在多种疾病进程中的机制及药物研发。发表 SCI 论文 17 篇, 累计影响因子 136 分, 发表期刊包括 *Acta Pharmaceutica Sinica B*、*Redox Biol*、*Neurobiology of Aging*、*J Med Chem*、*Brain Behav Immun* 等; 参编专著 3 部; 获批专利 11 项; 获得 2013 年度“教育部新世纪优秀人才”、2012 年北京市组织部评选的“北京市优秀人才”等称号。

环磷酰胺诱导生精障碍小鼠模型不同恢复期的比较研究

马婧威, 李 根, 杨 杨, 臧彩霞, 鲍秀琦, 张 丹

(中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

[摘要] **目的** 比较并评价环磷酰胺造模后不同恢复期小鼠生精障碍的改善程度。**方法** 将 48 只 4~5 周龄体质量为 18~20 g 的 ICR 雄性小鼠随机分为 3 个对照组和 3 个模型组, 每组 8 只。3 个模型组的每只小鼠于实验第 1~7 天连续腹腔注射环磷酰胺 60 mg/kg, 处理结束后分别继续饲养 7 d、14 d 和 21 d。每个模型组均设相应的对照组, 3 个对照组小鼠腹腔注射对应体积的生理盐水。各组小鼠在相应时间点通过眼眶静脉采血后处死, 取睾丸、附睾和精囊, 称重后计算其生殖器官指数。HE 染色后比较睾丸和附睾组织病理学变化, 精子质量分析测定精子相关指标。ELISA 法及相关试剂盒检测血清生殖激素含量、睾丸氧化应激水平和睾丸标志性酶活性变化。**结果** 与对照组相比, 环磷酰胺处理结束后 7 d、14 d 和 21 d 的模型组小鼠睾丸指数均明显下降 ($P<0.01$), 7 d、14 d 的附睾指数和 7 d、21 d 的精囊指数明显下降 ($P<0.05$); 且随着时间延长, 模型组睾丸和附睾组织病理学损伤逐渐减轻。环磷酰胺处理结束后 7 d、14 d 的模型组精子数量明显减少 ($P<0.01$), 血清睾酮水平降低 ($P<0.05$), 睾丸中丙二醛含量明显增多 ($P<0.01$), 还原型谷胱甘肽含量和超氧化物歧化酶含量明显降低 ($P<0.05$), 睾丸标志性酶乳酸脱氢酶活力明显下降 ($P<0.05$), γ -谷氨酰转肽酶活力明显上升 ($P<0.05$); 其中 7 d 的模型组小鼠精子活力明显下降 ($P<0.001$), 精子畸形率明显上升 ($P<0.05$), 血清促卵泡素和促黄体生成素明显增加 ($P<0.01$)。21 d 的模型组小鼠精子相关指标、血清生殖激素水平、睾丸氧化应激水平和睾丸标志性酶活性变化均不明显 (均 $P>0.05$)。**结论** 环磷酰胺 60 mg/kg 连续腹腔注射 7 d, 注射结束后 7 d 所致小鼠生殖毒性较为明显, 能够构建较理想的小鼠生精障碍模型; 而随着恢复期的延长, 至环磷酰胺处理结束后 21 d 小鼠生精障碍各项指标逐渐恢复, 接近正常水平。

[关键词] 环磷酰胺; 生精障碍; 恢复期; ICR 小鼠

[中图分类号] R332; R698 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0112-12



Comparative Study on Different Recovery Periods of the Spermatogenic Dysfunction Mouse Model Induced by Cyclophosphamide

MA Jingwei, LI Gen, YANG Yang, ZANG Caixia, BAO Xiuqi, ZHANG Dan

(State Key Laboratory of Natural Products and Functions, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

[基金项目] 国家重点研发计划项目 (2018YFA0901900); 中国医学科学院医学科学创新基金项目 (2021-I2M-1-028)

[第一作者] 马婧威 (1998—), 女, 博士研究生, 研究方向: 新药活性评价及作用机制研究、神经药理学。E-mail: majingwei@imm.ac.cn

[通信作者] 张 丹 (1978—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 新药研发与神经退行性疾病发病机制研究。E-mail: danzhang@imm.ac.cn。

ORCID: 0000-0001-9792-4549

Correspondence to: ZHANG Dan (ORCID: 0000-0001-9792-4549), E-mail: danzhang@imm.ac.cn

[ABSTRACT] Objective To compare and evaluate the improvement degree of spermatogenic dysfunction mice at different recovery periods after cyclophosphamide modeling. **Methods** Forty-eight male ICR mice aged 4-5 weeks with the body weight of approximately 18-20 g were randomly divided into three control groups and three model groups, with 8 mice in each group. Each mouse of three model groups was intraperitoneally injected with 60 mg/kg cyclophosphamide continuously from the 1st to 7th day of the experiment, while each mouse of three control groups was intraperitoneally injected with the corresponding volume of normal saline. Then these mice were continued to be fed for another 7, 14 and 21 days after cyclophosphamide injection, respectively. A corresponding control group was set for each model group. The mice in each group were sacrificed after blood collection through orbital veins at corresponding time points. Testis, epididymis and seminal vesicle were taken and weighed, and their reproductive organ indexes were calculated. Histopathological changes of testis and epididymis were compared after HE staining. Sperm quality analysis was used to determine sperm-related indexes. Serum reproductive hormone content, testicular oxidative stress level and testicular signature enzyme activity were detected by ELISA and related kits. **Results** Compared with the control group, on the 7th, 14th and 21st day after cyclophosphamide treatment, the testicular index of mice in the model group decreased significantly ($P < 0.01$). The epididymis index decreased significantly on the 7th and 14th day, and the seminal vesicle index decreased obviously on the 7th and 21st day ($P < 0.05$). And the histopathological damage of testis and epididymis of the model group gradually alleviated over time. On the 7th and 14th day after cyclophosphamide treatment, the sperm count of the model group declined remarkably ($P < 0.01$), the serum testosterone (T) level reduced ($P < 0.05$), the malonaldehyde (MDA) content of testis increased significantly ($P < 0.01$), the content of reduced glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) decreased obviously ($P < 0.05$), the lactic dehydrogenase (LDH) activity of testis reduced obviously ($P < 0.05$), the gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT) activity increased significantly ($P < 0.05$), the latter two of which are important testicular signature enzymes. Therein on the 7th day after cyclophosphamide treatment, the sperm motility decreased significantly ($P < 0.001$), the rate of sperm malformation increased obviously ($P < 0.05$), the serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) increased notably ($P < 0.01$). Nevertheless on the 21st day after cyclophosphamide treatment, the sperm-related indexes, the content of serum reproductive hormone, the level of testicular oxidative stress and the activity of testicular signature enzyme did not change significantly ($P > 0.05$). **Conclusion** The reproductive toxicity in mice was more apparent on the 7th day after intraperitoneal injection with 60 mg/kg cyclophosphamide for seven days, at which time the more desirable spermatogenic dysfunction model of mice could be established. However, with the prolongation of the recovery period, the indexes of spermatogenic dysfunction in mice gradually recovered and approached the normal level on the 21st day after cyclophosphamide treatment.

[Key words] Cyclophosphamide; Spermatogenic dysfunction; Recovery stage; ICR Mice

近年来, 不孕不育症成为威胁人类健康的疾病之一。据世界卫生组织统计, 全球约有 20% 的育龄夫妇受到不孕不育的困扰^[1]。目前我国育龄夫妇的不孕不育率已攀升至 12% ~ 18%, 其中男性因素造成不育的占比约 49.5%, 并呈上升趋势。男性不育发生中, 70% ~ 90% 是精子问题造成的, 精子质量受到诸如环境污染、精神压力和缺乏锻炼等多种因素的影响。男性少弱精子症、精子质量下降是造成不孕不育的主要原因之一, 精子生成障碍、精子成熟和输出异常、精子活力下降是其重要表现^[2-3]。显然, 生精

障碍是导致男性不育的关键因素之一。

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP) 是一种临床常见的抗肿瘤药物, 通过对 DNA 的烷化作用而干扰细胞内多种生物学功能。近年来临床研究表明 CP 具有显著的生殖毒性^[4]。研究提示, CP 对睾丸有明显的损伤作用, 能够引起无精子症或少精子症, 造成不育。因此, 用 CP 构建生精障碍动物模型是研究生精障碍机制和筛选治疗药物的常用方法, 具有起效快、周期短、较稳定等优点^[1]。然而国内外关于 CP 的造模方式不尽相同, 目前对于不同剂量、不同处理时间造模效果的对比

比研究较少。并且CP引起的生殖毒性在处理结束后随时间延长均有不同程度的恢复,但关于CP恢复周期和恢复程度等研究尚留空白。因此,本研究在实验室前期研究的基础上,用60 mg/kg CP进行小鼠腹腔注射,观察并评价CP造模后不同恢复期小鼠生殖功能的变化,明确CP对小鼠生精障碍影响的时间变化规律,以期阐明CP致生精障碍模型的特征,进而建立更加稳定的小鼠生精障碍模型,为药物筛选提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性ICR小鼠48只,4~5周龄,体质量为18~20 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2019-0009],质量合格证编号:110011211104582923。动物饲养于中国医学科学院药物研究所实验动物中心[SYXK(京)2019-0023],屏障设施环境,温度为(23±1)℃,相对湿度为(60±10)%,光照每12 h明暗交替,保持正常昼夜节律。用小鼠IVC饲养笼饲养动物,每笼5只,实验过程中动物自由进食进水,饲料为钴60辐照实验鼠维持饲料,饮水为无菌水。本研究经中国医学科学院北京协和医学院药物研究所动物福利伦理委员会审核批准(00004267),符合3R原则。实验中所有操作均遵循北京市实验动物福利伦理审查指南。

1.2 主要试剂

CP水合物购自上海麦克林生化科技有限公司(批号:C11527270);生理盐水即氯化钠注射液(0.9%)购自山东华鲁制药有限公司(批号:SD20110306);BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司(货号:20201ES86);小鼠睾酮(testosterone, T)、促卵泡素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)酶联免疫检测试剂盒(干粉法,批号为20210517),丙二醛(malonaldehyde, MDA)测定试剂盒(硫代巴比妥酸法,批号为20210512),还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(微板法,批号为20210512),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(黄嘌呤氧化酶法,批号为20210513),乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)试剂盒(微板法,批号为20210514),γ-谷氨酰基转移酶(gamma-glutamyl-transferase, γ-GT)测试盒(GPNA底物法,批号为20210514)均购自南京建成生物工程研究所;麻醉用

异氟烷购自深圳瑞沃德生命科技有限公司。

1.3 主要仪器

Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司);AL204电子分析天平、XS105小质量电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);Allegra X-30R低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司);3-18K低温高速离心机(德国Sigma公司);MULTISCAN FC酶标仪(美国ThermoFisher公司);JJ-12J脱水机、JB-P5包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);Nikon Eclipse E100正置荧光显微镜(日本尼康公司);TC20全自动细胞计数仪含细胞计数板(美国Bio-Rad公司,批号:145-0011);JFX-B精子质量分析仪(石家庄市华众医疗用品有限公司);AP0200超低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司);微量移液器(德国Eppendorf公司);GZX-9030 MBE电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);气体麻醉仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及造模

48只ICR小鼠适应性饲养3 d后,按照体质量均衡原则随机分为3个对照组和3个模型组,每组各8只。参考文献[5]的造模方法并结合本实验室前期研究基础,3个模型组均于实验第1~7天连续腹腔注射CP 60 mg/kg,构建小鼠生精障碍模型,给药结束后分别继续饲养7 d、14 d和21 d(即实验第14、21和28天);每个模型组均设相应对照组,注射对应体积的生理盐水。各组小鼠在相应时间点取睾丸、附睾、精囊和血清。CP溶于0.9%氯化钠注射液,配制为6 mg/mL的溶液,给药剂量为0.1 mL/10 g。实验过程中每天记录小鼠活动及被毛情况。

1.4.2 生殖器官指数检测

在相应时间点,用异氟烷麻醉小鼠(诱导浓度2.5%,维持浓度1.5%),从眼眶静脉丛取血后,脱颈椎处死小鼠,迅速摘取各组小鼠的睾丸、附睾、精囊等组织,清除周围脂肪及结缔组织,滤纸吸干残余血液,称其质量,并计算脏器指数。睾丸指数=双侧睾丸质量(g)/体质量(g)×100%。附睾指数=双侧附睾质量(g)/体质量(g)×100%。精囊指数=精囊质量(g)/体质量(g)×100%。

1.4.3 HE染色

将取出的睾丸、附睾置于质量分数4%的多聚甲醛

溶液中固定 24 h, 洗去固定液, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋并切片, 厚度约为 4 μm , 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干。石蜡切片脱蜡后, 进行苏木精-伊红染色, 中性树脂封固, 置正置显微镜下观察并拍照。

1.4.4 精子相关指标检测

取小鼠左侧附睾, 加 500 μL PBS, 用眼科剪将其剪碎, 移液枪轻轻吹打, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 20 min, 使精子成分充分游出。用 70 μm 滤膜过滤得澄清液体, 过滤时加 500 μL PBS 以冲洗滤膜。取滤液 500 μL , 加入等体积的 5% NaHCO_3 固定液 (可降低精液的黏稠度), 混匀后吸取 10 μL , 注入细胞计数板的小室内, 插入细胞计数仪, 计算精子数。另取 20 μL 上述混合液, 滴于载玻片上, 盖上盖玻片, 置于精子质量分析仪上, 检测精子活力和精子畸形率。

1.4.5 血清生殖激素水平检测

各组小鼠在相应时间点取材前禁食 12 h, 麻醉后眼眶采集全血 500 μL , 室温静置 2 h 后, 在 3 500 r/min 下离心 15 min。收集血清, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用酶联免疫法检测小鼠血清 T、FSH 和 LH 的含量。具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.4.6 睾丸组织氧化应激水平检测

取睾丸组织, 准确称其质量, 按质量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入生理盐水, 制成 10% 组织匀浆。2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 检测小鼠睾丸组织匀浆中 MDA (硫代巴比妥酸法)、GSH (微板法) 和 SOD (黄嘌呤氧化酶法) 的含量, 按试剂盒说明书进行操作。

1.4.7 睾丸组织中标志性酶活性检测

按照 1.4.6 节方法制备小鼠睾丸 10% 组织匀浆, 根据试剂盒说明书检测小鼠睾丸组织中 LDH (微板法) 和 γ -GT (GPNA 底物法) 的活力。

1.5 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0.1 统计软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间数据的差异比较采用单因素方差分析, 然后用 Turkey 检验进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生精障碍小鼠一般状态

造模前, 小鼠状态良好, 行动敏捷, 被毛有光泽。连续 7 d 腹腔注射 CP 60 mg/kg 诱导小鼠生精障碍后, 与正常对照组相比, 模型组小鼠的精神状态不佳, 出

现活动减少、畏寒、被毛无光泽等现象。给药第 5 天, 模型组小鼠出现脱毛现象。实验过程中各组小鼠均无死亡现象。而且在给药造模后的 7 d、14 d 和 21 d 肉眼观察比较对照组和模型组小鼠体内器官状态时, 均未见明显差异 (图 1), 提示小鼠腹腔注射 CP 的造模方式未造成明显的脏器损伤。

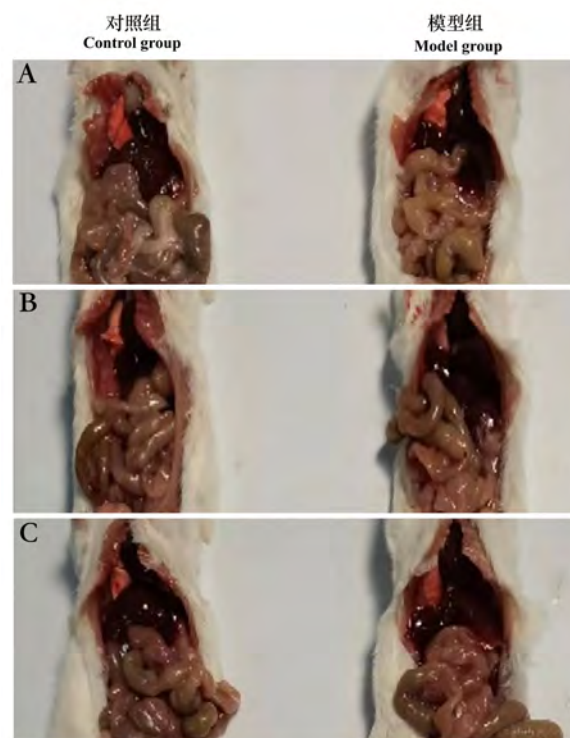


图1 环磷酰胺给药诱导生精障碍模型后 7 d(A)、14 d(B) 和 21 d(C) 的小鼠体内器官状态

Figure 1 *In-vivo* organ state of spermatogenic dysfunction mice on the 7th (A), 14th (B) and 21st (C) day after cyclophosphamide administration

2.2 生精障碍小鼠睾丸、附睾和精囊组织外观及病理学变化

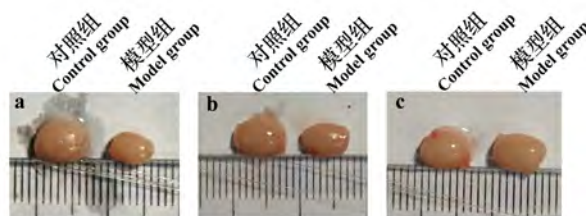
正常对照组小鼠的睾丸和附睾饱满, 富有弹性, 纹理清晰, 略透红润且有光泽; 精囊充盈, 左右两叶状长形结构对称性良好, 呈乳白色。模型组小鼠的睾丸和附睾明显萎缩, 色泽苍白且无光泽, 纹理不清; 精囊体积缩小, 对称性不佳, 趋于透明状。继续饲养 21 d 后, 模型组小鼠的睾丸和附睾略有改观, 稍见红润, 精囊略显饱满 (图 2A)。

睾丸切片的 HE 染色结果 (图 2B) 显示: 对照组小鼠睾丸组织中曲细精管内各级生精细胞完整, 按精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞顺序由

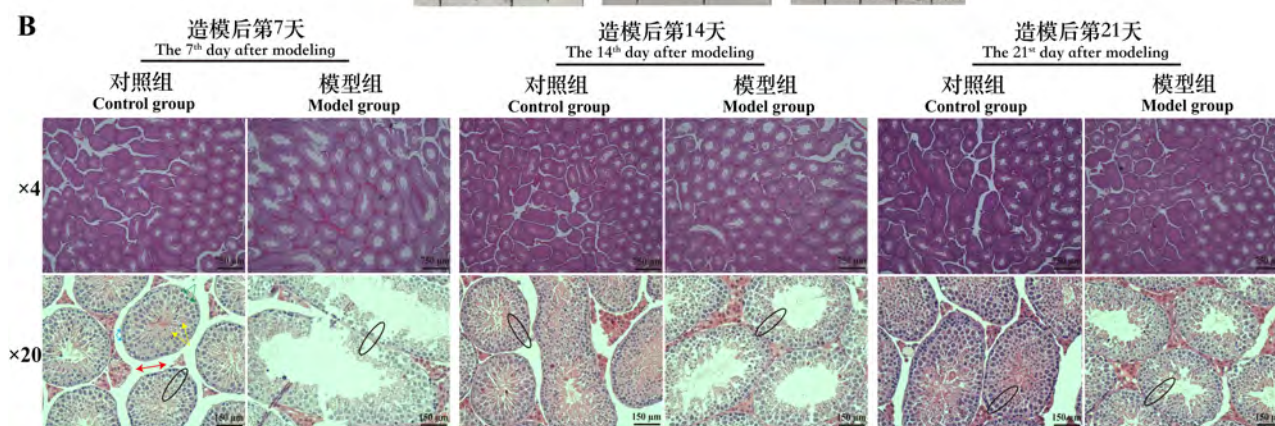
生精上皮到管腔依次整齐排列, 细胞成熟度较高^[6], 生精细胞层数约为5~6层。与对照组相比, 模型组小鼠睾丸出现明显的病理变化, 异常结构生精小管显著增多, 各级生精细胞出现脱落, 管腔内精细胞数目减少, 可见空泡形成, 间质细胞增多。继续饲养7 d的模型组小鼠异常结构的生精小管部分仅支持一层细胞附着在管腔基底膜上, 生精上皮严重受损, 完整性丧失,

管腔内几无成熟精子, 空泡化程度较高, 生精细胞层数仅约1~2层; 继续饲养14 d的模型组小鼠异常结构的生精小管完整性有所恢复, 可见约3~4层生精细胞附着在管状基底膜上, 管腔内可见少数成熟精子; 继续饲养21 d的模型组小鼠生精上皮进一步恢复, 完整性提高, 生精细胞层数明显增多, 约为4~5层, 管腔内成熟精子数目显著增加, 空泡化程度进一步降低。

A



B



注: 红色箭头指示间质细胞; 蓝色箭头指示精原细胞; 绿色箭头指示精母细胞; 黄色箭头指示精细胞; 线圈表示生精细胞层数。

Note: The red arrow indicates interstitial cells; the blue arrow indicates spermatogonium; the green arrow indicates spermatocyte; the yellow arrow indicates spermatid; the coil represents the number of spermatogenic cell layer.

图2 环磷酰胺给药诱导生精障碍模型后7、14和21 d的小鼠睾丸外观(A)和睾丸组织病理学(B)变化(HE染色)

Figure 2 The changes of testicular appearance(A) and testicular histopathology (B) of spermatogenic dysfunction mice on the 7th, 14th and 21st day after cyclophosphamide administration (HE staining)

附睾头部、体部和尾部的HE染色结果(图3)显示: 对照组小鼠附睾头、体、尾部管腔中均存在大量成熟精子, 管腔排列紧密且整齐。与对照组相比, 继续饲养7 d的模型组小鼠附睾头部的附睾小管间隙较大, 排列较为松散, 管腔内精子数目明显减少; 附睾体部和尾部精子数减少, 且缺少正常精子。继续饲养14 d的模型组小鼠附睾头部的附睾小管直径减小, 相邻小管间隙仍较大, 但管腔内可见少数精子; 附睾体部和尾部可见少量正常精子。继续饲养21 d的模型组小鼠附睾头部的附睾小管管腔直径增大, 相邻小管间隙缩小, 排列紧密性和完整性进一步恢复, 管腔内精子数显著增多; 附睾体、尾部精子密度显著提高, 且正常精子数量明显增加。

2.3 生精障碍小鼠生殖器官指数变化

连续7 d腹腔注射CP 60 mg/kg 诱导小鼠生精障碍模型, 此后继续饲养7 d的检测结果显示小鼠睾丸、附睾和精囊指数与对照组相比均显著下降 ($P<0.01$), 降低率分别为44.03%、11.72%和43.17% (图4A)。造模后继续饲养14 d的模型组小鼠睾丸和附睾指数明显低于对照组 ($P<0.01$), 下降了约40.38%和11.23%, 而精囊指数与对照组相比无明显差异 (图4B)。造模后继续饲养21 d的模型组小鼠睾丸和精囊指数均明显低于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 下降约25.99%和27.35%, 而附睾指数与对照组相比无明显差异 (图4C)。以上结果表明CP造模结束后第7天的小鼠睾丸、附睾和精囊指数降低较为明显, 随着恢复期的延长,

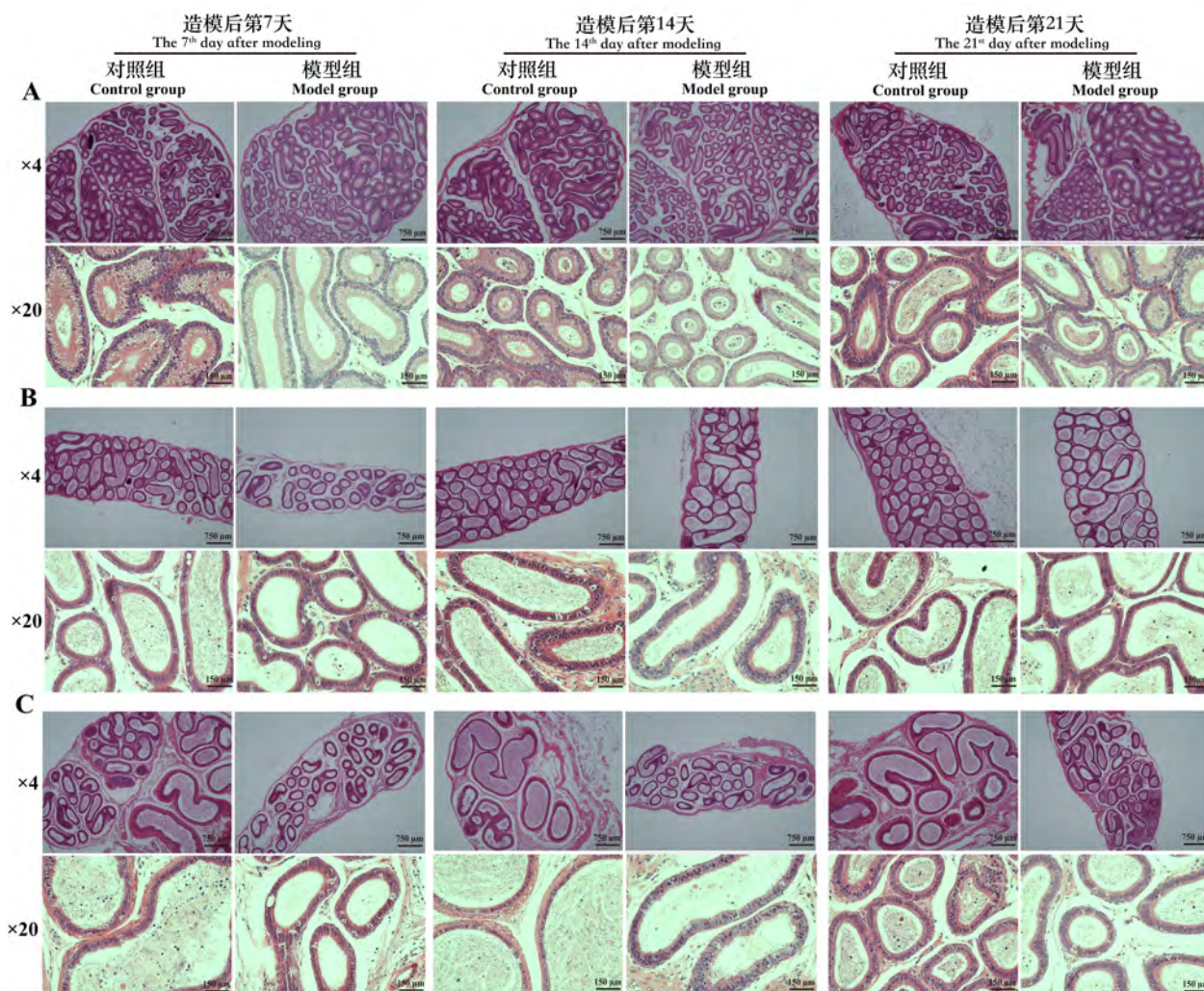


图3 环磷酰胺给药诱导生精障碍模型后7、14和21 d的小鼠附睾组织头部(A)、体部(B)和尾部(C)病理学变化(HE染色)
Figure 3 Pathological changes of epididymal head (A), body (B) and tail (C) of spermatogenic dysfunction mice on the 7th, 14th and 21st day after cyclophosphamide administration (HE staining)

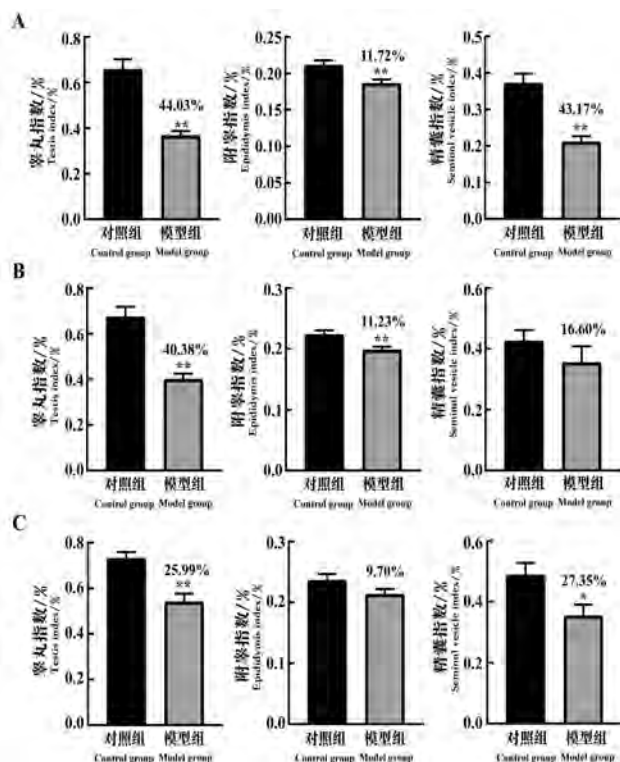
生殖器官指数逐渐趋于正常水平。

2.4 生精障碍小鼠精子数目、活力和畸形率变化

与对照组比较, CP诱导小鼠生精障碍模型后继续饲养7 d的模型组小鼠精子数和精子活力均显著下降 ($P<0.001$), 下降分别约为30.22%和35.83%; 精子畸形率显著升高 ($P<0.05$), 上升率约为18.26%。继续饲养14 d的模型组小鼠精子数仍显著低于对照组 ($P<0.01$), 下降率约为12.26%; 而精子活力和精子畸形率变化均不显著。继续饲养21 d的模型组小鼠以上3种指标与对照组相比均无明显差异 (图5)。上述结果表明, CP注射结束后第7天模型组小鼠精子相关指标变化最为显著; 随着恢复时间的延长, 精子数和精子活力逐渐上升, 精子畸形率下降, 至第21天模型组小鼠的3种精子相关指标已趋于正常水平。

2.5 生精障碍小鼠血清生殖激素水平变化

小鼠血清生殖激素含量测定结果显示, CP造模可导致小鼠内分泌紊乱, 表现为造模后继续饲养7 d和14 d的模型组小鼠血清中睾酮含量明显低于对照组 ($P<0.05$), 分别下降约为53.28%和46.85%; 造模后继续饲养7 d的模型组小鼠血清中FSH和LH含量明显高于对照组 ($P<0.01$), 分别上升约9.42%和25.99%, 造模后继续饲养14 d两组间上述两种激素含量变化均不明显; 而造模后继续饲养21 d时血清睾酮、FSH和LH含量与对照组相比已无明显差异 (图6)。上述结果表明, CP注射结束后第7天小鼠血清睾酮、FSH和LH含量变化较为显著; 随着时间的延长, 至第21天, 模型组小鼠血清生殖激素水平已恢复至对照组水平。



注：每组小鼠 $n=8$ 。与对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。模型组上方数据为与对照组比较的下降百分比。

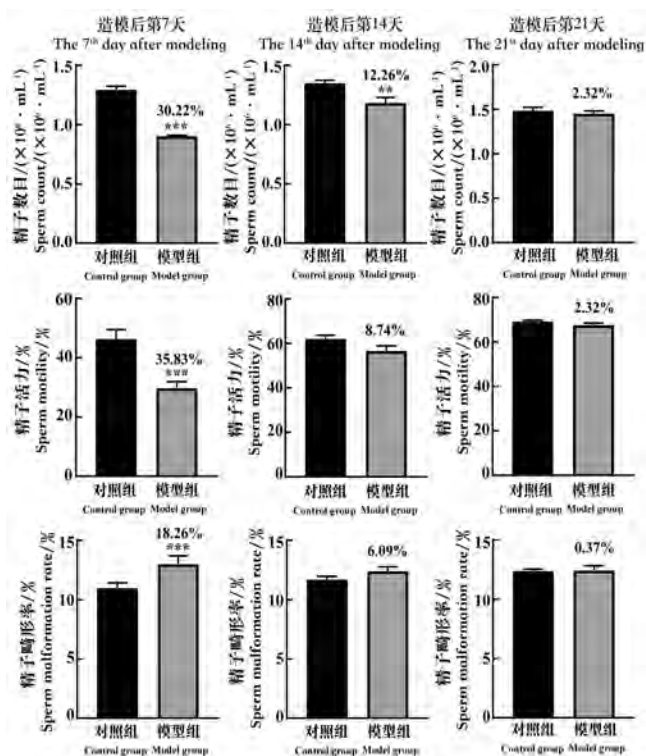
Note: In each group, $n=8$. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. The data above the model group is the percentage decline compared with the control group.

图4 环磷酰胺给药诱导生精障碍模型后7 d(A)、14 d(B)和21 d(C)的小鼠生殖器官指数变化

Figure 4 The changes of reproductive organ index of spermatogenic dysfunction mice on the 7th (A), 14th (B) and 21st (C) day after cyclophosphamide administration

2.6 生精障碍小鼠睾丸组织内氧化应激水平变化

CP造模后继续饲养7 d和14 d的模型组小鼠睾丸组织中MDA水平明显高于对照组 ($P<0.01$), 上升约69.54%和52.41%; GSH含量显著低于对照组 ($P<0.01$), 分别降低约91.47%和79.24%; SOD含量同样明显低于对照组 ($P<0.01$, $P<0.05$), 分别下降约26.26%和5.39%。至造模后继续饲养21 d, 模型组和对照组之间MDA、GSH和SOD含量变化均无明显差异(图7)。上述结果显示, CP注射结束后第7天小鼠睾丸MDA增量最大, 而GSH和SOD含量下降幅度较大, 说明抗氧化能力低下; 随时间推移, 生精障碍小鼠体内MDA含量下降, GSH和SOD含量上升, 氧化应激水平逐渐下降, 至第21天模型的各指标已逐渐趋于正常水平。



注：每组小鼠 $n=8$ 。与对照组相比，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。模型组上方数据为与对照组比较的下降百分比。

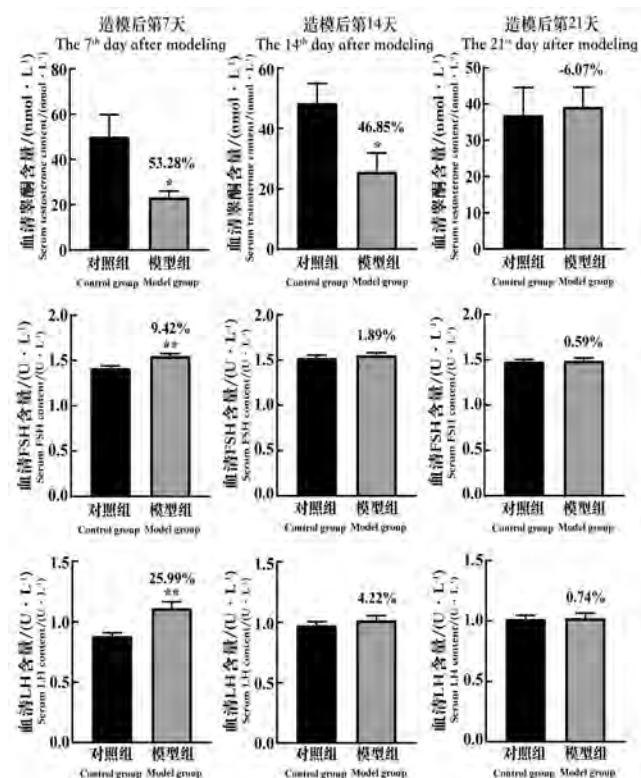
Note: In each group, $n=8$. Compared with the control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. The data above the model group is the percentage decline compared with the control group.

图5 环磷酰胺给药诱导生精障碍模型后7、14和21 d的小鼠精子数目、精子活力和精子畸形率的变化

Figure 5 The changes of the sperm count, the sperm motility and the rate of sperm malformation of spermatogenic dysfunction mice on the 7th, 14th and 21st day after cyclophosphamide administration

2.7 生精障碍小鼠睾丸组织中标志性酶的活性变化

CP造模后继续饲养7 d和14 d的模型组小鼠睾丸内LDH活力明显低于对照组 ($P<0.01$, $P<0.05$), 分别下降约16.83%和5.59%; 模型组小鼠睾丸内 γ -GT活力明显高于对照组 ($P<0.01$, $P<0.05$), 上升率分别约为49.11%和12.04%; 至造模后继续饲养21 d时两组间LDH和 γ -GT活力变化均不明显 ($P>0.05$) (图8)。结果提示, CP注射结束后第7天, 小鼠睾丸LDH活力下降幅度较大, 而 γ -GT活力增幅最高, 睾丸标志酶活性严重受损; 随时间推移生精障碍小鼠睾丸内LDH活力上升, γ -GT活力下降, 第21天时恢复至接近正常水平。



注: FSH, 促卵泡素; LH, 促黄体生成素。每组小鼠 $n=8$ 。与对照组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。模型组上方数据为与对照组比较的下降百分比。

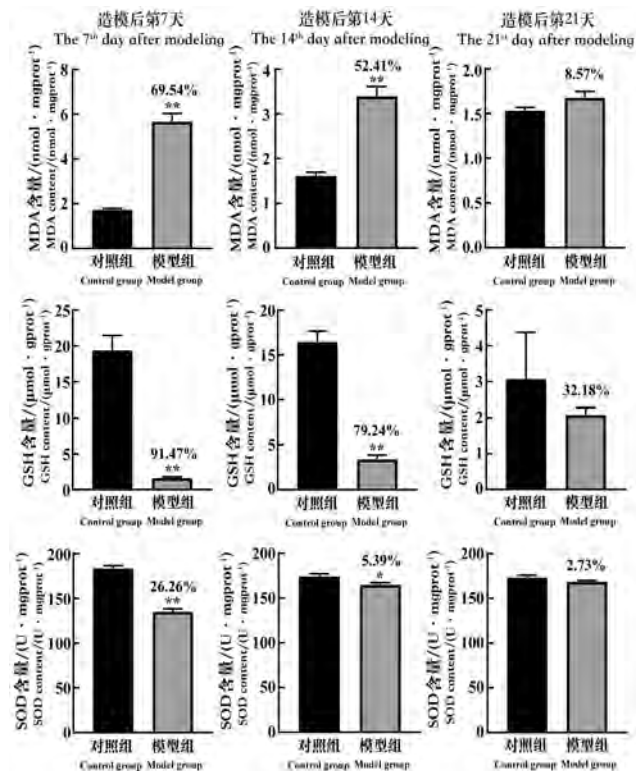
Note: FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone. In each group, $n=8$. Compared with the control group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$. The data above the model group is the percentage decline compared with the control group.

图6 环磷酰胺给药诱导生精障碍模型后7、14和21 d的小鼠血清睾酮、促卵泡素和促黄体生成素含量的变化
Figure 6 The changes of the serum testosterone content, FSH content and LH content of spermatogenic dysfunction mice on the 7th, 14th and 21st day after cyclophosphamide administration

3 讨论

随着经济社会的发展, 男性生殖障碍已成为社会热点问题之一。超过40%的不育男性患有少弱精子症, 此发病率仍在上升, 但目前暂无有效治疗方法^[6]。此外, 育龄男性罹患白血病、霍奇金淋巴瘤和睾丸生殖细胞瘤等时, 放化疗后其生育能力受损, 在此之前冷冻精液是目前保持男性未来生育力的唯一方法^[7]。

CP属噁磷类烷基化剂, 其代谢物可与各种生物大分子(DNA、RNA和蛋白质)共价交联, 诱导细胞凋亡, 是一种常用的抗肿瘤和免疫抑制药, 目前已广泛用于肿瘤和自身免疫病治疗及器官移植的免疫抑制剂

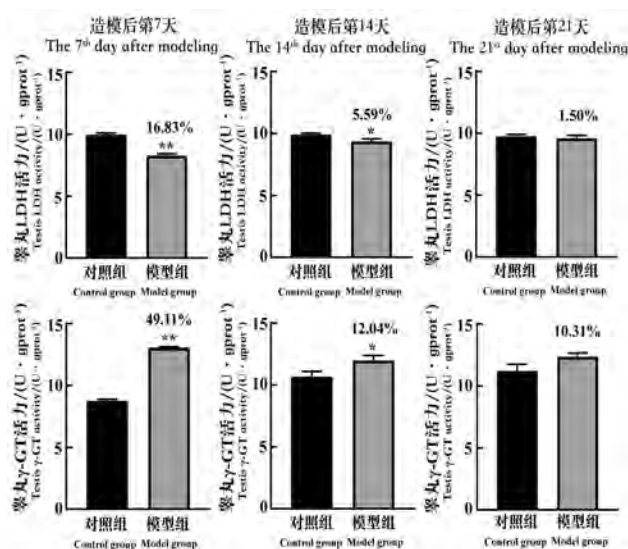


注: MDA, 丙二醛; GSH, 还原型谷胱甘肽; SOD, 超氧化物歧化酶; mgprot (gprot), 每毫克(克)蛋白。每组小鼠 $n=8$ 。与对照组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。模型组上方数据为与对照组比较的下降百分比。

Note: MDA, malonaldehyde; GSH, glutathione; SOD, superoxide dismutase; mgprot/gprot, per 1 mg (g) protein. In each group, $n=8$. Compared with the control group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$. The data above the model group is the percentage decline compared with the control group.

图7 环磷酰胺给药诱导生精障碍模型后7、14和21 d的小鼠睾丸组织MDA、GSH和SOD含量的变化
Figure 7 The changes of the MDA, GSH and SOD content in testicular tissue of spermatogenic dysfunction mice on the 7th, 14th and 21st day after cyclophosphamide administration

等^[8-9]。动物研究表明, CP对快速分裂细胞具有较强的细胞毒性, 这使得高度增殖的睾丸成为CP破坏的目标^[9], 可引起生殖器官生物化学和组织病理学改变。CP也可直接致生精损伤^[10], 精子畸形率增高和活力下降, 破坏生精微环境, 致各级精母细胞凋亡和分化阻滞^[1,11]。由于患者睾丸成熟程度不同, 故存在较大个体差异^[12]。此外, 目前已确定了化疗药物间相对性腺毒性的客观测量法——CP当量剂量(cyclophosphamide equivalent dose, CED), 此计算可用来估计某种治疗方案的累积性腺毒性^[13]。



注: LDH, 乳酸脱氢酶; γ -GT, γ -谷氨酰基转移酶; mgprot (gprot), 每毫克(克)蛋白。每组小鼠 $n=8$ 。与对照组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。模型组上方数据为与对照组比较的下降百分比。

Note: LDH, lactic dehydrogenase; γ -GT, gamma-glutamyl-transferase; mgprot (gprot), per 1 mg(g) protein. In each group, $n=8$. Compared with the control group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$. The data above the model group is the percentage decline compared with the control group.

图8 环磷酰胺给药诱导生精障碍模型后7、14和21 d的小鼠睾丸组织LDH和 γ -GT活力的变化

Figure 8 The changes of the LDH and γ -GT activity in testicular tissue of spermatogenic dysfunction mice on the 7th, 14th and 21st day after cyclophosphamide administration

CP可引起少弱精子症, 故常用于建立生精障碍动物模型, 且该模型较稳定。国内外学者在该模型上开展了多种药物活性评价, 但造模方式不尽相同。例如: 王梦梦等^[1]和Sun等^[14]分别采用60 mg/kg和80 mg/kg的CP剂量, 连续5 d腹腔注射昆明小鼠, 建立生精障碍小鼠模型; 刘建国等^[15]采用50 mg/kg的CP剂量, 连续7 d注射BALB/c小鼠以建立模型; 范红艳等^[16]和Yan等^[17]则分别采用50 mg/kg和60 mg/kg的CP剂量, 连续7 d和5 d注射ICR小鼠, 建立生精障碍小鼠模型。CP剂量和造模时间的不同与小鼠品种品系有关且模型效果不一, 而目前对于不同剂量CP处理不同时间的造模效果的比较研究较少。此外, 由CP引起的生殖毒性在给药处理结束后, 随时间延长均出现不同程度的恢复, 这对建立稳定的小鼠生精障碍模型提出了挑战。为此, 本文在参考了文献[5]的造模方法并结合实验室前期研究结果的基础上, 采用60 mg/kg剂量

的CP、连续7 d腹腔注射ICR小鼠的方案, 探讨CP停药后不同时间对小鼠生精障碍的影响, 这对于该领域后续机制研究和药效学研究具有重要意义。

精子发生是周期性的, 精原干细胞通过增殖、分化、减数分裂和精子发生产生成熟精子^[18]。睾丸是生精、分泌雄激素和维持副性特征的重要器官^[19], 是血睾屏障的重要组成部分^[20], 包含赖氏细胞、支持细胞和各级生精细胞, 共同维持性器官发育及精子发生^[21-24]。龚晓娟等^[25]发现, 多巴胺D1受体基因可影响睾丸组织结构, 进而影响生殖。附睾在精子发生中发挥关键作用, 是精子发育、成熟的“摇篮”, 具吸收分泌和浓缩功能^[19], 也是精子运输和贮存的重要器官, 附睾头部和尾部为精子成熟提供了微环境, 而尾部为功能性精子提供了贮存场所^[20]。精囊主要具有营养和稀释精子的功能。通过HE染色结果发现, CP可破坏睾丸生精小管上皮和附睾小管基底膜排列的完整性和紧密性, 造成各级生精细胞脱落, 生精细胞层数减少, 生精小管管腔空泡化, 附睾小管排列松散, 附睾体部和尾部成熟精子数目减少, 这在CP注射结束后第7天较为明显; 随着时间延长, 第14天生精小管和附睾小管管腔内可见少数精子, 而至第21天, 成熟精子数目进一步增多, 生精上皮逐渐恢复至趋于正常水平。另外, 精子数目、精子活力和精子畸形率是衡量机体生殖功能的重要指标, 精子数目反映睾丸生精功能的好坏, 精子活力和精子畸形率最能体现精子的质量。精子活力取决于有鞭毛运动精子的百分率, 其前向运动是质量评估的关键。精子的形态学检查是评判精母细胞质量和生育力的敏感指标, 正常形态精子百分率指征精子受精能力的高低。

此外, 精子发生受内分泌和旁/内分泌系统控制。性激素是由性腺和肾上腺皮质网状带等组织合成的甾体激素, 具有促进性器官成熟、第二性征发育及维持性功能等作用。生殖功能的正常运转离不开体内性激素的调节^[20]。睾丸主要分泌以睾酮为主的雄激素, 而睾酮的分泌受到下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG)的精细调节, 当下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)作用于垂体后, 垂体释放FSH和LH, 它们对睾酮的分泌与释放具有关键的调控作用。LH、FSH和T是控制生精的内分泌因素^[26]。FSH促使精原细胞增殖分化和精子成熟; LH可刺激睾丸间质细胞分泌睾酮, T水平可间接反映睾丸间质细胞功能状

态^[20]，因此血清生殖激素水平是评价睾丸生精作用的重要指标。本研究发现，CP致睾酮水平降低时，会激活体内负反馈系统，FSH和LH代偿性增高，进一步刺激睾酮的分泌与释放，CP注射结束后第7天模型组小鼠血清睾酮水平明显低于对照组，FSH和LH含量明显高于对照组，随着时间推移，睾酮水平逐步升高，两组间睾酮含量差异进一步缩小，FSH和LH水平也趋于恢复正常。

睾丸组织的氧化应激被认为是男性不育的主要元凶^[27]。正常状态下，体内氧化系统和抗氧化系统处于动态平衡状态。病理状态时，体内会产生大量自由基，平衡被打破，机体便产生氧化应激反应^[20]。MDA是脂质与氧自由基反应形成的氧化应激产物之一，其含量反映了脂质过氧化程度；GSH是一种低分子清除剂，也是体内重要的非酶性抗氧化物，是衡量机体抗氧化能力的重要因素，具有强大的还原功能^[20]，能清除自由基、解毒和维持细胞正常生长发育等，GSH含量的稳定对生精功能的维持至关重要；SOD是生物体内清除超氧阴离子自由基的重要抗氧化酶，可保护机体免受氧自由基的损害。本研究从氧化应激代谢产物、非酶抗氧化物和抗氧化酶三方面进行综合评价发现，CP注射结束后第7天和第14天模型组小鼠睾丸MDA含量明显高于对照组，GSH和SOD含量明显低于对照组，且第7天这3个指标的变化幅度最大，而至第21天两组间差异已无统计学意义。

睾丸组织中LDH主要分布于生精小管内成熟或正在成熟的生精细胞线粒体膜内，在质子转移中发挥关键作用^[28]。LDH可催化糖酵解和糖异生过程中乳酸和丙酮酸之间的氧化还原反应，参与生精上皮成熟及精子能量代谢，是精子能量的主要酶系之一，也是睾丸支持细胞、间质细胞及生精细胞等成熟的标志酶之一。LDH活力改变会使睾酮分泌减少，精细胞生长因子缺乏，进而导致精子发生障碍及发育异常^[19]。 γ -GT是睾丸支持细胞（Sertoli细胞）发育的标志物，其活性与睾丸支持细胞的成熟与增殖有关^[28]，具有为发育中精子提供营养和保护，以及调节生精细胞周期等作用^[19]，以上二者均为重要的睾丸标志酶。通过酶活性检测发现，CP注射结束后第7天和第14天模型组小鼠睾丸中LDH活力明显低于对照组， γ -GT活力明显高于对照组，至第21天两组间无明显差异。这说明CP致小鼠生精障碍，睾丸组织受损，LDH活力下降，可通

过代偿性增加 γ -GT的活性，缓解CP对睾丸（包括精子）的生殖毒性作用。

综上，本研究发现连续7 d腹腔注射CP可诱导小鼠生精障碍，CP注射结束后第7天模型组小鼠生殖器官指数均显著下降，睾丸和附睾组织病理学变化最为明显，精子数目、精子活力和精子畸形率变化最为显著，血清T含量明显低于对照组，血清FSH和LH含量显著高于对照组，睾丸组织MDA、GSH和SOD含量相较于对照组变化幅度最大，睾丸标志性酶LDH和 γ -GT活力也出现相应改变，但随着时间推移，第21天时两组间各项指标无显著性差异。因此，从生殖器官指数、睾丸和附睾组织病理学、精子相关指标、血清生殖激素水平、睾丸组织内氧化应激水平和睾丸标志性酶活力等6个方面进行模型评价，比较CP注射结束后第7、14和21天的评估结果，可得出结论：连续7 d腹腔注射60 mg/kg的CP，用药结束后第7天可建立较为理想的小鼠生精障碍模型；而随着时间延长，至第21天生精障碍各项指标逐渐恢复到趋于正常水平。小鼠生精上皮再生速度快^[29]，短期内CP连续注射所致生精障碍会随时间推移的机体代偿而得以修复，睾丸表达的Rab13 GTPase与生精上皮周期密切相关^[30]。本文从生殖系统表观、微观、氧化还原、酶学水平和血清内分泌水平等探索出一种较为理想的CP诱导小鼠生精障碍的造模方式和检测时间，阐明了给药处理结束后生精各项指标恢复周期和恢复程度的变化规律，为此后进行改善生精功能相关药物活性评价和生精障碍相关机制研究奠定了良好基础。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过中国医学科学院北京协和医学院药物研究所实验动物福利伦理委员会审核批准(编号:00004267)。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 the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College (Approval Letter No.00004267), 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]

马婧威负责收集资料、实验设计、实验操作、数据处理及论文撰写；

李根和杨杨参与实验操作和数据处理；

臧彩霞和鲍秀琦负责研究方案与论文的审核及修改；

张丹提供研究经费，参与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] 王梦梦, 克迎迎, 李亚格, 等. 杜仲补天素胶囊改善环磷酰胺诱导的小鼠生精障碍研究[J]. 中草药, 2019, 50(11): 2625-2631. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.018.
WANG M M, KE Y Y, LI Y G, et al. Effect of Duzhong Butiansu Capsule on improving spermatogenesis obstacle in mice induced by cyclophosphamide[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(11): 2625-2631. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.018.
- [2] 阚玉璇, 曾梦楠, 张贝贝, 等. 杜仲补天素胶囊对己烯雌酚诱导雄性小鼠生精障碍的实验研究[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2445-2451. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.037.
KAN Y X, ZENG M N, ZHANG B B, et al. Experimental study of *Eucommia ulmoides* Butiansu capsule on spermatogenic disorder induced by diethylstilbestrol in male mice[J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(9): 2445-2451. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.037.
- [3] 李环, 曲振廷, 钱鸿昊, 等. 人参皂苷 Rg1 联合人参皂苷 Rg3 对雄性生殖功能损伤模型小鼠生殖功能的改善作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(4): 707-713. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20200407.
LI H, QU Z T, QIAN H H, et al. Improvement effect of ginsenoside Rg1 combined with ginsenoside Rg3 on reproductive function in male model mice with reproductive function injury[J]. J Jilin Univ Med Ed, 2020, 46(4): 707-713. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20200407.
- [4] 陈指龙, 张晓春, 薛立群, 等. 环磷酰胺致小鼠生精障碍作用研究[J]. 动物医学进展, 2017, 38(5): 34-38. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2017.05.008.
CHEN Z L, ZHANG X C, XUE L Q, et al. Effect of cyclophosphamide on mouse spermatogenic obstacles[J]. Prog Vet Med, 2017, 38(5): 34-38. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2017.05.008.
- [5] 舒淇琳, 王梅, 曹国琼, 等. 杜仲补天素丸对环磷酰胺诱导的生精障碍保护作用[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(9): 2119-2121.
SHU Q L, WANG M, CAO G Q, et al. Protective effect of Duzhongbutiansuwan on spermatogenesis induced by cyclophosphamide[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(9): 2119-2121.
- [6] FAN Q G, ZHAO Z Y, MENG Q, et al. Improvement of astragaloside on spermatogenesis in oligoasthenozoospermia mouse induced by cyclophosphamide[J]. Reprod Sci, 2022, 29(6): 1738-1748. DOI: 10.1007/s40302-021-00808-8.
- [7] DOHLE G R. Male infertility in cancer patients: review of the literature[J]. Int J Urol, 2010, 17(4): 327-331. DOI: 10.1111/j.1442-2042.2010.02484.x.
- [8] ELANGO VAN, W. CHIOU T J, TZENG W F, et al. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice[J]. Toxicology, 2006, 222(1-2): 60-70. DOI: 10.1016/j.tox.2006.01.027.
- [9] SELVAKUMAR E, PRAHALATHAN C, SUDHARSAN P T, et al. Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity[J]. Clin Chim Acta, 2006, 367(1-2): 114-119. DOI: 10.1016/j.cca.2005.11.034.
- [10] FUKUTANI K, ISHIDA H, SHINOHARA M, et al. Suppression of spermatogenesis in patients with Behçet's disease treated with cyclophosphamide and colchicine[J]. Fertil Steril, 1981, 36(1): 76-80. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)45622-0.
- [11] SAPKOTA Y, WILSON C L, ZAIDI A K, et al. A novel locus predicts spermatogenic recovery among childhood cancer survivors exposed to alkylating agents[J]. Cancer Res, 2020, 80(17): 3755-3764. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0093.
- [12] SIMON, HOWELL, MRCP, et al. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy[J]. Endocrinol Metab Clin N Am, 1998, 27(4): 927-943. DOI: 10.1016/S0889-8529(05)70048-7.
- [13] EN L T, BROUGHAM M F H, WALLACE W H B, et al. Impacts of platinum-based chemotherapy on subsequent testicular function and fertility in boys with cancer[J]. Hum Reprod Update, 2020, 26(6): 874-885. DOI: 10.1093/humupd/dmaa041.
- [14] SUN Y M, GAO F, XU D, et al. Wenshen Shengjing Decoction improves early embryo development by maintaining low H3K27me3 levels in sperm and pronuclear embryos of spermatogenesis impaired mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8035997. DOI: 10.1155/2021/8035997.
- [15] 刘建国, 赵红乐, 李姣姣, 等. 补肾活血方对环磷酰胺所致小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响[J]. 中华男科学杂志, 2020, 26(9): 826-831. DOI: 10.13263/j.cnki.nja.2020.09.012.
LIU J G, ZHAO H L, LI J J, et al. Bushen Huoxue Recipe reduces cyclophosphamide-induced apoptosis of spermatogenic cells in mice[J]. Natl J Androl, 2020, 26(9): 826-831. DOI: 10.13263/j.cnki.nja.2020.09.012.
- [16] 范红艳, 江素鑫, 李乐乐, 等. CTX 对雄性小鼠生殖功能的影响及杨梅素的干预研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 43-46. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2019.05.010.
FAN H Y, JIANG S X, LI L L, et al. Influence of cyclophosphamide on reproductive function of male mice and intervention of myricetin[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(5): 43-46. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2019.05.010.
- [17] YAN G, TIAN F, LIU P, et al. Sheng Jing Decoction can promote spermatogenesis and increase sperm motility of the oligozoospermia mouse model[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 3686494. DOI: 10.1155/2021/3686494.
- [18] 李勋, 陈建设, 门波, 等. 益肾通络方调控 PI3K/Akt 通路对环磷酰胺诱导无精/少精症大鼠模型的保护作用研究[J]. 天津医药, 2020, 48(12): 1159-1164. DOI: 10.11958/20201749.
LI X, CHEN J S, MEN B, et al. The protective effect of Yishen

- Tongluo Fang regulating PI3K/Akt pathway on the azoospermia/oligozoospermia model rats induced by cyclophosphamide[J]. Tianjin Med J, 2020, 48(12): 1159-1164. DOI: 10.11958/20201749.
- [19] 伍欢, 李其闯, 贾欣, 等. 环磷酰胺对小鼠精子质量及相关酶的影响[J]. 科教文汇(上旬刊), 2018(9):181-183. DOI: 10.16871/j.cnki.kjwha.2018.09.076.
- WU H, LI Q C, JIA X, et al. Effect of cyclophosphamide on sperm quality and related enzymes in mice[J]. Sci Educ Article Collects, 2018(9): 181-183. DOI: 10.16871/j.cnki.kjwha.2018.09.076.
- [20] 王慧慧, 张莉, 徐瑞豪, 等. 杜仲补天素胶囊对白消安诱导的生精障碍小鼠的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2):169-178. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.02.008.
- WANG H H, ZHANG L, XU R H, et al. Effect of Duzhong Butiansu capsule on busulfan-induced spermatogenic impairment in mice[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(2):169-178. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.02.008.
- [21] 曹兵, 孙亚萍, 司彦坡, 等. 杜仲补天素胶囊对双酚A诱导小鼠生精障碍的保护作用研究[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(3):343-351. DOI: 10.3969/j.issn.1003-3734.2020.03.018.
- CAO B, SUN Y P, SI Y P, et al. Protective effect of Duzhong Butiansu capsules on bisphenol A-induced spermatogenic disorder in mice[J]. Chin J New Drugs, 2020, 29(3): 343-351. DOI: 10.3969/j.issn.1003-3734.2020.03.018.
- [22] 蒋福兴. 血睾屏障体内动态变化细胞生物学机制的研究[D]. 北京: 首都师范大学, 2008.
- JIANG F X. A study on the cellular biological mechanisms of dynamic changes in the blood testis barrier *in vivo*[D]. Beijing: Capital Normal University, 2008.
- [23] QIAN L, YU S J. Protective effect of polysaccharides from Lycium barbarum on spermatogenesis of mice with impaired reproduction system induced by cyclophosphamide[J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 76(5):383-385. DOI: 10.1111/aji.12558.
- [24] NOOH M M, RIZK S M, SAIED N M, et al. Carnosine remedial effect on fertility of male rats receiving cyclophosphamide, hydroxydaunomycin, oncovin and prednisone (CHOP) [J]. Andrologia, 2021, 53(11): e14233. DOI: 10.1111/and.14233.
- [25] 龚晓娟, 马盼, 孙敏, 等. DRD1基因敲除影响雄鼠生育的分子机理研究[J]. 实验动物科学, 2021, 38(2):53-56. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.02.009.
- GONG X J, MA P, SUN M, et al. Study on molecular mechanism of male mice reproduction in DRD1 knockout[J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(2):53-56. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.02.009.
- [26] SOLOMON R, ABUMADIGHAM A, KAPELUSHNIK J, et al. Involvement of cytokines and hormones in the development of spermatogenesis in vitro from spermatogonial cells of cyclophosphamide-treated immature mice[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4):1672. DOI: 10.3390/ijms22041672.
- [27] CAO Y C, WANG X S, LI S Q, et al. The effects of L-carnitine against cyclophosphamide-induced injuries in mouse testis [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017, 120(2): 152-158. DOI: 10.1111/bcpt.12679.
- [28] 乐小炎, 原林, 林少杰, 等. 乌贼墨多糖的制备及对睾丸化疗性损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17):342-344, 348. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2013.17.003.
- LE X Y, YUAN L, LIN S J, et al. Preparation of squid ink polysaccharides and its protection against chemotherapeutic injury on testis[J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(17):342-344, 348. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2013.17.003.
- [29] 范红艳, 王艳春, 顾饶胜, 等. 生精障碍动物模型的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(2):120-123. DOI: 10.3969/j.issn.1673-2995.2013.02.017.
- FAN H Y, WANG Y C, GU R S, et al. Research of the animal model of spermatogenic abnormalities[J]. J Jilin Med Coll, 2013, 34(2):120-123. DOI: 10.3969/j.issn.1673-2995.2013.02.017.
- [30] 宿文辉, 张天彪, 张丽雁, 等. Rab13 GTPase在大鼠睾丸中的表达及其与生精上皮周期的关系[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(5):402-405, 358. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2010.05.09.
- SU W H, ZHANG T B, ZHANG L Y, et al. Expression of Rab13 GTPase in rat testis and its relation with seminiferous epithelium cycle[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(5): 402-405, 358. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2010.05.09.
- (收稿日期: 2022-11-30 修回日期: 2023-02-11)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周烁)

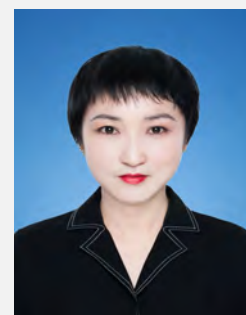
[引用本文]

- 马婧威, 李根, 杨杨, 等. 环磷酰胺诱导生精障碍小鼠模型不同恢复期的比较研究[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 112-123. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.167.
- MA J W, LI G YANG Y, et al. Comparative study on different recovery periods of the spermatogenic dysfunction mouse model induced by cyclophosphamide[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 112-123. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.167.



王京昆, 云南白药集团股份有限公司中央研究院院长助理, 云南白药集团股份有限公司药品事业部首席医学官, 云南省药物研究所药物安全性评价中心主任, 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室主任。同时是云南省云岭产业技术领军人才、云南省有突出贡献中青年技术专家、云南省技术创新人才、云南中医药大学和大理大学硕士生导师, 以及国家科技部科技专家库专家、国家科技奖励专家库专家、国家药品监督管理局和国家农业农村部 GLP 机构检查专家。兼任中国毒理学会药物毒理与安全性评价专业委员会常务委员, 中国毒理学会中药与天然药物毒理专业委员会常务委员, 中国实验动物学会实验动物与毒理学专业委员会常务委员、中国药学会中药临床评价专业委员会委员。主要从事中药新药研究、药物安全性评价研究、药物临床医学研究等工作。获得10项国家及省级科技奖励, 其中国家科技进步一等奖1项(排名第4), 云南省科技进步特等奖1项(排名第5)。

谭莹, 云南省药物研究所药物安全性评价中心副主任, 一般毒理研究室负责人, 一般毒理学、安全药理学、神经毒力研究专题负责人, 生理信号分析检测负责人, 中国毒理学会安全药理专业委员会委员, 昆明市药学会专家库专家, 作为核心成员负责和参与完成国家级、省部级研究课题20余项。深耕药物临床前安全性评价研究工作的十余年间, 按我国《药物非临床研究质量管理规范》、美国联邦法规(21CFR Part 58)和中/美新药申报审评和相关技术指导原则要求完成40余个不同类型受试物的临床前安全性评价研究50余项, 在中药、天然药物和外用制剂的临床前安全性评价研究中积累了丰富的丰富经验。以第一作者和通信作者在国家级专业核心期刊发表论文20余篇。



碘酸钠诱发视网膜色素变性大鼠模型的生理指标和组织病理学分析

谭莹^{1,2}, 廖文平^{1,2}, 高启龙³, 李勇^{1,2}, 史新辉^{1,2}, 王京昆^{1,2}

(1. 云南省药物研究所, 昆明 650011; 2. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650011; 3. 昆明市中医医院, 昆明 650031)

[摘要] **目的** 全面评价碘酸钠腹腔注射对SD大鼠生理指标和视网膜组织病理学特征的影响。**方法** 选取64只SD大鼠随机分为阴性对照组和模型组, 每组32只, 雌雄各半。模型组以10 mL/kg剂量腹腔注射碘酸钠(6 mg/mL)1次, 阴性对照组以10 mL/kg剂量腹腔注射生理盐水注射液1次。每天观察大鼠一般体征, 注射当天(0天)和注射后第2、6、9、13、16、20、23、27、29、36、43、50、57天称量所有存活大鼠体重; 注射后第3、7、21、28、41、62天随机选取大鼠(第28天为12只/组, 其余为4只/组, 均为雌雄各半)进行血清生化指标检测, 系统解剖摘取脏器称重, 然后对主要脏器和组织进行HE染色, 以及眼HE和TUNEL染色; 注射后第28、62天进行血常规指标检测。**结果** 注射碘酸钠后, 模型组88%的大鼠出现一过性稀便, 观察期间大鼠体质量增长稍缓且以雄鼠较明显。注射后第28天模型组雌鼠红细胞容积(red blood cell volume, RDW)和雄鼠尿素氮(urea nitrogen, BUN)、网织红细胞计数(reticulocyte count, Retic#)及百分比(reticulocyte percentage, Retic%)均升高, 与阴性对照组比较的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。雌雄鼠白细胞(white blood cells, WBC)、红细胞(red blood cells, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)、红细胞比容(hematocrit, HCT)均有降低趋势, 但组间差异均没有统计学意义(均 $P > 0.05$)。模型组雄鼠胸腺重量、系数除注射后第7天大于阴性对照组外, 其余时间点均小于阴性对照组, 但组间差异均没有统计学意义(均 $P > 0.05$)。组织病理学检查可见模型组大鼠视网膜由波浪状改变逐步发展为

[基金项目] 云南省重大科技专项“灯盏花口服类制剂新适应症和毒性作用系统研究”(2017ZF002-08)

[第一作者] 谭莹(1979—), 女, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 药物安全性评价研究。E-mail: ty1203@163.com。ORCID: 0009-0007-3084-9020

[通信作者] 王京昆(1969—), 男, 学士, 正高级工程师, 研究方向: 新药研发和药物安全性评价研究。E-mail: wjkyimm@163.com。ORCID: 0009-0006-9724-6286

异常心电图样改变, 各层排列紊乱, 外核层局灶性变薄, 视网膜外核层细胞凋亡; 病变发生率、病变评分和凋亡细胞数量均明显高于或多于同时期的阴性对照组, 第28天的组间差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。结论 碘酸钠腹腔注射除可使大鼠视网膜变性外, 对血清生化、血常规部分指标也有一定程度的影响, 还出现大鼠体质量增长略缓慢和一过性粪便性状改变的现象。因此, 在使用该模型开展药物安全性评价时, 应关注造模试剂对动物的影响。

[关键词] 碘酸钠; 生理指标; 视网膜组织病理; 视网膜色素变性模型; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0124-12



Physiological Indexes and Histopathology Analysis of Sodium Iodate-Induced Retinitis Pigmentosa in Rats

TAN Ying^{1,2}, LIAO Wenping^{1,2}, GAO Qilong³, LI Yong^{1,2}, SHI Xinhui^{1,2}, WANG Jingkun^{1,2}

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650011, China; 2. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug, Kunming 650011, China; 3. Kunming Traditional Chinese Medicine Hospital, Kunming 650031, China)

Correspondence to: WANG Jingkun (ORCID: 0009-0006-9724-6286), E-mail: wjkyimm@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the effects of intraperitoneal injection of sodium iodate on the physiological indexes and retinal histopathological characteristics of SD rats comprehensively. **Methods** A total of 64 rats were randomly divided into negative control group and model group, half male and half female. The model group was intraperitoneally injected with 6 mg/mL sodium iodate once at the dose of 10 mL/kg and the negative control group was injected with 10 mL/kg 0.9% NaCl once. The body weight of all surviving rats was detected on the day of injection (0 day) and the 2nd, 6th, 9th, 13th, 16th, 20th, 23rd, 27th, 29th, 36th, 43rd, 50th and 57th days after injection. On the 3rd, 7th, 21st, 28th, 41st and 62nd days after injection, the rats were randomly selected (12 rats in each group on the 28th day, and 4 rats in each group at other time points, those in each group were half male and half female) for serum biochemical indexes detection. The organs were dissected and weighed, and then the main organs and tissues were stained with HE, and the eyes were stained with HE and TUNEL. Blood routine indexes were detected on the 28th and 62nd day after injection. **Results** After injection of sodium iodate, 88% of the rats in the model group had transient loose stools. During the observation period, the body weight of the rats increased slightly and was more obvious in male rats. On the 28th day after injection, compared with the negative control group, the red blood cell volume (RDW) of female rats and blood urea nitrogen (BUN), reticulocyte count (Retic#) and reticulocyte percentage (Retic%) of male rats in the model group increased significantly (all $P < 0.05$). The white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT) of male and female rats showed decreasing trends, but there were no significant differences between the two groups (all $P > 0.05$). The thymus weight and coefficient of male rats in the model group were smaller than those in the negative control group except for the 7th day after injection, but there were no significant differences between the two groups (all $P > 0.05$). Histopathological examination showed that the retina of the model group gradually developed from wavy changes to abnormal electrocardiogram (ECG)-like changes, with disordered arrangement of each layer, focal thinning of the outer nuclear layer, and apoptosis of the outer nuclear layer of the retina. The incidence of lesions, lesion score and the number of apoptotic cells in the model group were significantly higher than or more than those in the negative control group at the same time, and the difference between the groups on the 28th day was statistically significant (all $P < 0.01$). **Conclusion** In addition to retinal degeneration in rats, intraperitoneal injection of sodium iodate also had a certain degree of influence on serum biochemical and blood routine indexes, and also showed a slight slow growth of body weight and transient changes in fecal traits. Therefore, when using this model to evaluate drug safety, the effects of modeling reagents on animals should be paid to attention.

[Key words] Sodium iodate; Physiological indexes; Retinal histopathology; Retinitis pigmentosa model; Rats

近年来将模型动物用于药物临床前安全性评价已成趋势。根据待评价药物的特点和临床适应症等选择合适的模型一直是备受关注的技术难题。根据药物临床前安全性评价研究的目的和相关技术指导原则的要求^[1-2], 安全性评价所涉及的内容非常宽泛。碘酸钠诱发的视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 动物模型因具有制备简单、病变稳定等特点, 被广泛用于 RP 药物/细胞治疗、机制探索和再生医学领域^[3]。经查阅国内外文献, 未见碘酸钠对除视网膜外其他组织器官功能、形态等影响的相关报告, 局限了该经典模型在毒理学领域的使用。本研究通过观察和检测注射碘酸钠后 9 周内多个时间点 SD 大鼠的一般体征、体质量, 血清生化和血常规指标, 脏器重量和系数, 主要脏器、器官和眼的外观形态及组织病理学检查, 全面评价碘酸钠对 SD 大鼠的整体影响, 以期补充和完善对该模型的认识, 为其用于药物安全性评价研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 购入时 5~6 周龄, 雌鼠体质量为 (127.57±9.79) g, 雄鼠体质量为 (144.26±10.03) g, 均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2016-0006], 动物质量合格证号为 1100112011024706 (雌) 和 1100112011024707 (雄)。动物饲养于云南省药物研究所药物安全性评价中心屏障环境设施 [SYXK (滇) K2017-0004], 温度 23.5~24.6 °C, 相对湿度 46%~64%, 昼夜各半循环照明。实验期间动物自由摄食、饮水, 动物饲料、垫料、饮用水和环境技术指标均符合国家规范。本研究所有动物实验操作及饲养环境条件等均通过云南省药物研究所实验动物福利伦理委员会审查批准 [编号: 动(伦) IACUC-2020-011-01], 所有实验流程均严格遵照云南省药物研究所药物安全性评价中心相关标准操作规程进行。

1.2 主要试剂与仪器

碘酸钠购自美国 SIGMA-ALDRICH 公司 (批号 MKCG6491); 氯化钠注射液购自浙江国镜药业有限公司 (批号 A19091901B); 白细胞鞘液 (Perox Sheath), 白细胞分类试剂 (Perox 1、2、3), 红细胞、血小板、血红蛋白、网织红细胞等血常规指标检测试剂均购自德国 Simenes Healthcare Diagnostics 公司; 丙氨酸氨基

转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、总胆红素、 γ -谷氨酰转移酶、总胆固醇、三酰甘油、肌酸激酶、乳酸脱氢酶、肌酐、尿素氮检测试剂盒均购自美国 Beckman Coulter 公司, 肌酸激酶同工酶测定试剂盒购自意大利 Sentinel CH. SpA 公司。ADVIA 2120 血液分析仪为德国 Siemens Healthcare Diagnostics 公司产品; Unicel DxC600 全自动生化分析仪为美国 Beckman Coulter 公司产品; ASP200/ASP300S 脱水机、RM2255 切片机、HI1210 摊片机、ST5020 染色机、CV5030 盖片机、EG1160 包埋机和 DM6000B 显微镜均为德国 Leica 公司产品; CX21FSI 显微镜为日本奥林巴斯株式会社产品。

1.3 动物分组及用药

经检疫合格后, 选择状况良好的 SD 大鼠 64 只, 用随机分组法分为阴性对照组和模型组, 每组 32 只, 雌雄各半。阴性对照组雌雄大鼠体质量分别为 (158.94±8.04) g、(197.58±8.29) g, 模型组雌雄大鼠体质量分别为 (159.17±7.60) g、(197.62±7.74) g。完成适应性饲养后, 大鼠约 6.5~7.5 周龄, 模型组以 10 mL/kg 的剂量, 腹腔注射质量浓度为 6 mg/mL 的碘酸钠溶液 1 次; 阴性对照组以相同容积和频次, 腹腔注射生理盐水注射液。

1.4 一般体征观察、体质量称量

腹腔注射用药后 9 周内, 每天观察各组大鼠的外观、活动及精神状态等。注射当天和注射后第 1~28 天每周称重 2 次 (即注射后第 2、6、9、13、16、20、23、27 天各 1 次), 之后每周称重 1 次 (即注射后第 29、36、43、50、57 天各 1 次)。

1.5 血清生化、血常规指标检测

注射后第 3、7、21、28、41 和 62 天, 随机选取各组大鼠, 经异氟烷麻醉后, 腹主动脉采血, 检测血清生化指标; 第 28、62 天检测血常规指标 1 次。除第 28 天每组选取 12 只 (雌雄各半) 外, 其余时间点均为每组 4 只 (雌雄各半)。血清生化指标包括天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、 γ -谷氨酰转移酶 (γ -glutamyltransferase, GGT)、总胆固醇 (total cholesterol, CHOL)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、肌酸激酶 (creatinine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶 (creatinine kinase isoenzyme, CKMB)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酐 (creatinine, CREA)、尿素氮 (urea nitrogen, BUN)。血常规指标

包括白细胞 (white blood cell, WBC)、红细胞 (red blood cell, RBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB)、红细胞容积 (red blood cell volume, RDW)、红细胞比容 (hematocrit, HCT)、平均红细胞容积 (mean corpuscular volume, MCV)、血小板 (platelet, PLT)、网织红细胞计数 (reticulocyte count, Retic#) 及百分比 (reticulocyte percentage, Retic%)。

1.6 系统解剖及脏器称重

注射后第3、7、21、28、41和62天, 各组大鼠 (除第28天每组选取12只外, 其余时间点均为每组4只, 各时间点均为雌雄各半) 经异氟烷麻醉后腹主动脉采血, 然后进行系统解剖, 摘取眼球 (含哈氏腺)、胸腺、心、肝、脾、肾, 称重。计算脏器系数 [脏器比% = 脏器湿重/g/体质量g × 1 000]。

1.7 组织病理学检查

眼球用质量分数为4%的多聚甲醛溶液和改良 Davidson's 固定液固定后进行 HE 和 TUNEL 染色。胸腺、心、肝、脾、肾用体积分数为4%的中性缓冲甲醛溶液固定后进行 HE 染色。用江丰 KF-PRO-005 数字病理切片扫描仪截取和采集图片。根据眼 HE 染色的半定量分级镜检结果量化评分: (1) 视网膜没有呈波浪状改变计0分, 轻微改变计1分, 轻度改变计2分, 中度改变计3分, 重度改变计4分; (2) 视网膜是否呈异常心电图样改变, 各层排列是否紊乱, 外核层是否局灶性变薄, 均按 (1) 的对应病变等级分数乘以2来计分。总分为 (1) + (2) 的总和。采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统计算视网膜外核层 TUNEL 染色阳性细胞总数。HE 染色评分和 TUNEL 染色阳性细胞数均以各组平均值作为最终结果。

1.8 统计学分析

除组织病理学检查外, 其余雌、雄大鼠检测数据分开处理。样本数=6时, 使用 IBM SPSS 24 进行统计分析, 计量数据组间比较用独立样本 *t* 检验, 组间病发生率比较用 χ^2 检验, 组间病变程度比较用秩和检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, 双侧检测。样本数=2时, 仅用均值进行描述。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

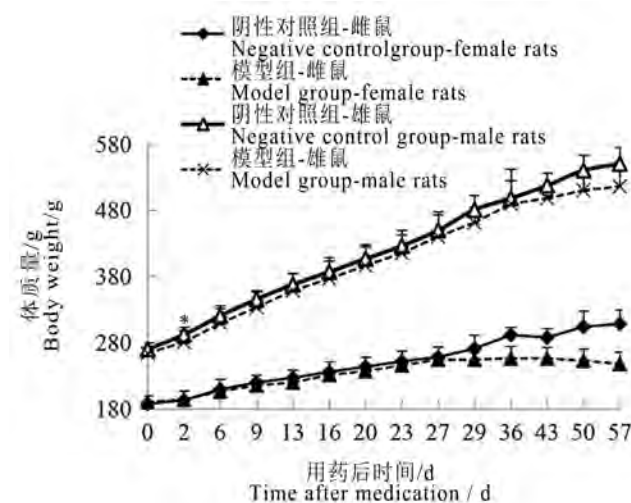
2 结果

2.1 用药后各组大鼠的一般体征和体质量变化

阴性对照组所有32只大鼠 (雌雄各16只) 均未见异常。模型组中有28只动物 (雌鼠12只, 雄鼠16只) 注射碘酸钠后16 min至1 h 34 min 陆续出现稀便 (发生

率为88%), 其中24只动物 (雌鼠11只, 雄鼠13只) 注射后4 h 8 min至4 h 23 min 稀便症状消失, 剩余4只 (雌鼠1只, 雄鼠3只) 注射次日恢复正常。

腹腔注射碘酸钠当天 (0天) 和注射后第2、6、9、13、16、20、23、27、29、36、43、50、57天, 阴性对照组和模型组大鼠的体质量均随着时间推移持续增长, 其中模型组雌雄鼠体质量略轻于阴性对照组, 但仅雄鼠注射后第2天与阴性对照组之间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$, 图1)。



注: 模型组一次性腹腔注射质量浓度为6 mg/mL 碘酸钠溶液10 mL/kg; 阴性对照组以相同容积和频次腹腔注射生理盐水注射液。各时间点两组大鼠数量分别为单性别16、16、14、12、12、12、12、10、10、4、4、2、2、2只; 与阴性对照组间比较, $*P<0.05$ 。

Note: The model group was intraperitoneally injected with 6 mg/mL sodium iodate solution once at the dose of 10 mL/kg; the negative control group was intraperitoneally injected with normal saline at the same volume and frequency. The number of rats in the two groups at each time point was 16, 16, 14, 12, 12, 12, 12, 10, 10, 4, 4, 2, 2, 2 respectively for single sex. Compared with the negative control group, $*P<0.05$.

图1 碘酸钠注射后雌雄鼠体质量变化曲线图

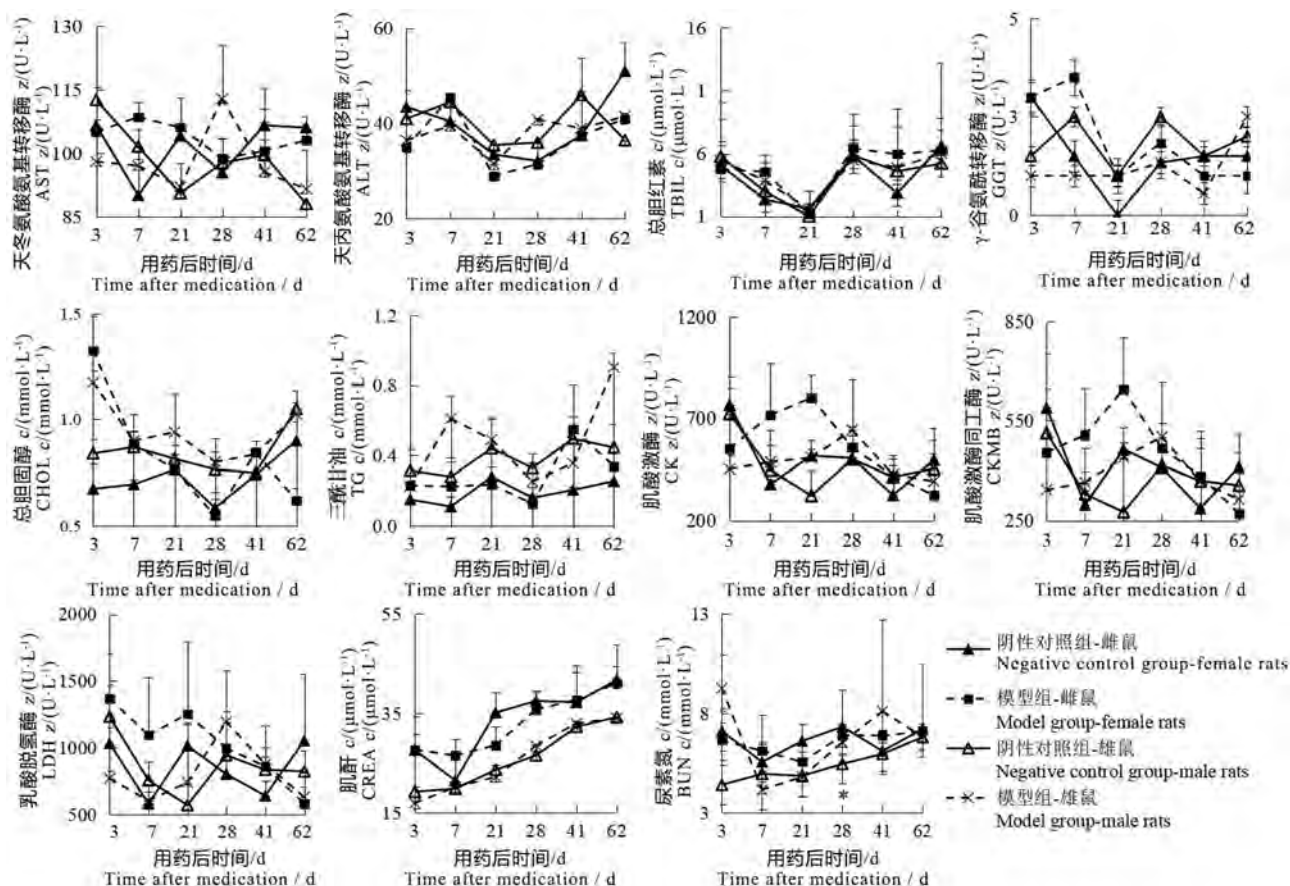
Figure 1 Body weight curve of male and female rats after sodium iodate injection

2.2 用药后各组大鼠的血清生化和血常规指标变化

腹腔注射碘酸钠后第3、7、21、28、41和62天, 模型组雌雄鼠的肝胆功能指标 AST、ALT、TBIL、GGT, 脂质代谢指标 CHOL、TG, 心功能指标 CK、CKMB、LDH, 以及肾功能指标 BUN、CREA, 均随着时间推移出现不同程度的波动, 但仅第28天雄鼠的 BUN 与阴性对照组之间比较差异有统计学意义 ($P<$

0.05, 图2)。腹腔注射碘酸钠后第28天, 模型组雌鼠的RDW以及雄鼠的Retic#和Retic%均高于阴性对照组, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与阴性

对照组相比, 第28天雌雄鼠的WBC、RBC、HGB、HCT, 以及第62天雄鼠的WBC、HCT均呈降低趋势, 但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图3)。



注: 模型组一次性腹腔注射质量浓度为6 mg/mL碘酸钠溶液10 mL/kg; 阴性对照组以相同容积和频次腹腔注射生理盐水注射液。各时间点两组大鼠数量分别为单性别2、2、2、6、2、2只; 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: The model group was intraperitoneally injected with 6 mg/mL sodium iodate solution once at the dose of 10 mL/kg; the negative control group was intraperitoneally injected with normal saline at the same volume and frequency. The number of rats in the two groups at each time point was 2, 2, 2, 6, 2, 2 respectively for single sex. Compared with the negative control group, * $P < 0.05$.

图2 碘酸钠注射后雌雄鼠血清生化指标变化

Figure 2 Changes of serum biochemical indexes of male and female rats after sodium iodate injection

2.3 用药后各组大鼠的脏器质量及系数

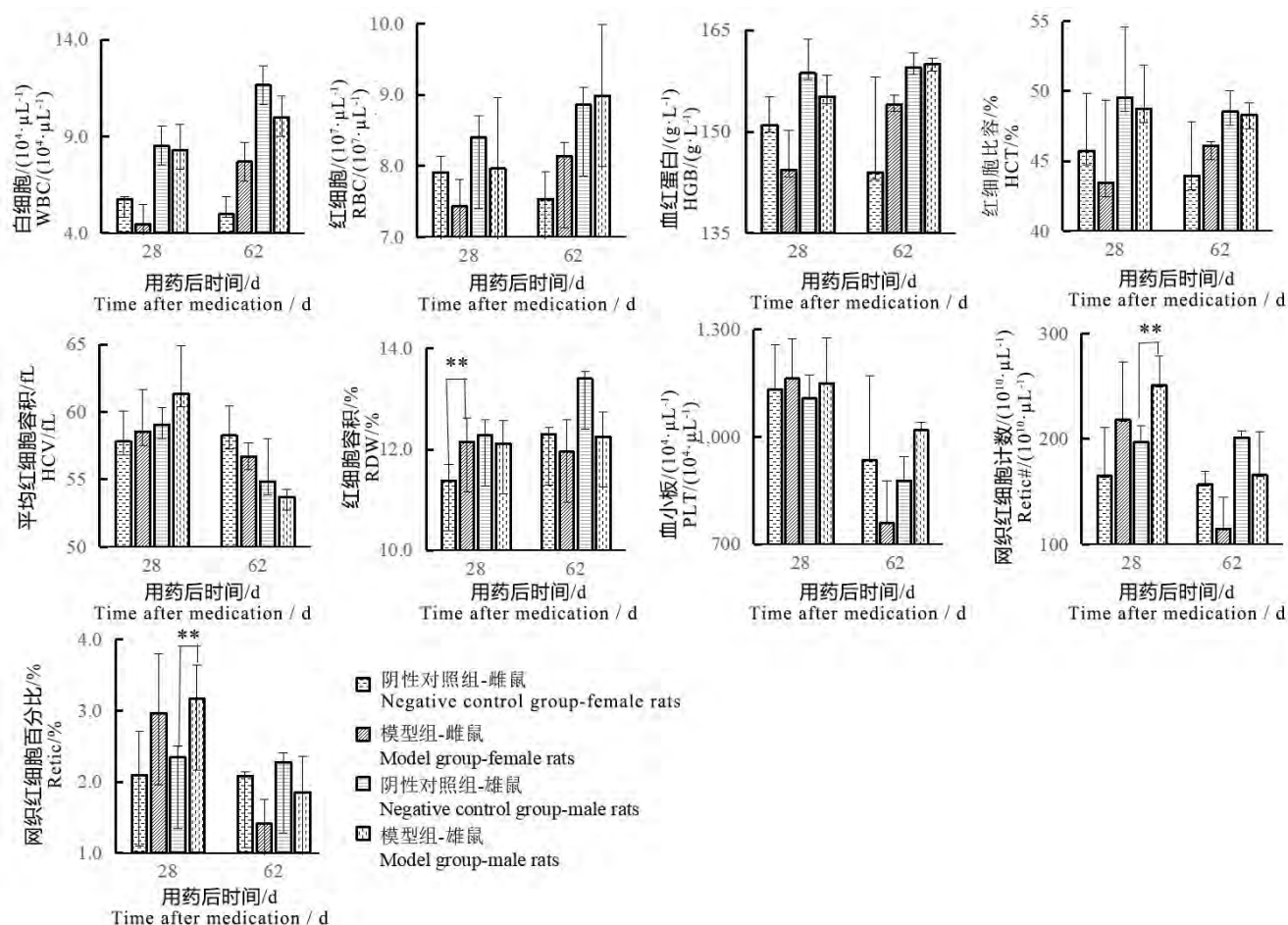
腹腔注射碘酸钠后第3、7、21、28、41和62天, 模型组雌雄大鼠心、肝、脾、肾质量和系数均为无规律小幅度波动, 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。注射后第3、21、28、41和62天, 模型组雄鼠的胸腺质量和系数均小于阴性对照组, 注射后第7天模型组雄鼠的胸腺质量和系数大于阴性对照组, 但组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 图4)。

2.4 用药后各组大鼠的各脏器组织病理学变化

经肉眼观察和HE染色后的组织病理学检查发现,

各组大鼠的胸腺、心、肝、脾、肾等脏器及其组织均未见异常。

眼HE染色结果显示, 阴性对照组大鼠的视网膜色素上皮层、视杆视锥层、外核层、内核层、神经节细胞层等形态结构完整且边界清晰, 各层细胞排列整齐且密度均匀。模型组大鼠在腹腔注射碘酸钠后第3天视网膜呈波浪样改变, 局部脱落、色素上皮损伤; 随时间延长, 以上病变程度加重, 第7天视网膜各层结构紊乱, 分界不清, 心电图呈异常改变, 色素上皮层正常结构消失; 第21天开始, 视细胞内外节可见明显



注：模型组一次性腹腔注射质量浓度为6 mg/mL 碘酸钠溶液10 mL/kg；阴性对照组以相同容积和频次腹腔注射生理盐水注射液。各时间点两组大鼠数量分别为单性别2、2、2、6、2、2只；与阴性对照组间比较，** $P < 0.01$ 。

Note: The model group was intraperitoneally injected with 6 mg/mL sodium iodate solution once at the dose of 10 mL/kg; the negative control group was intraperitoneally injected with normal saline at the same volume and frequency. The number of rats in the two groups at each time point was 2, 2, 2, 6, 2, 2 respectively for single sex. Compared with the negative control group, ** $P < 0.01$.

图3 碘酸钠注射后雌雄鼠血常规指标变化

Figure 3 Changes of blood routine indexes of male and female rats after sodium iodate injection

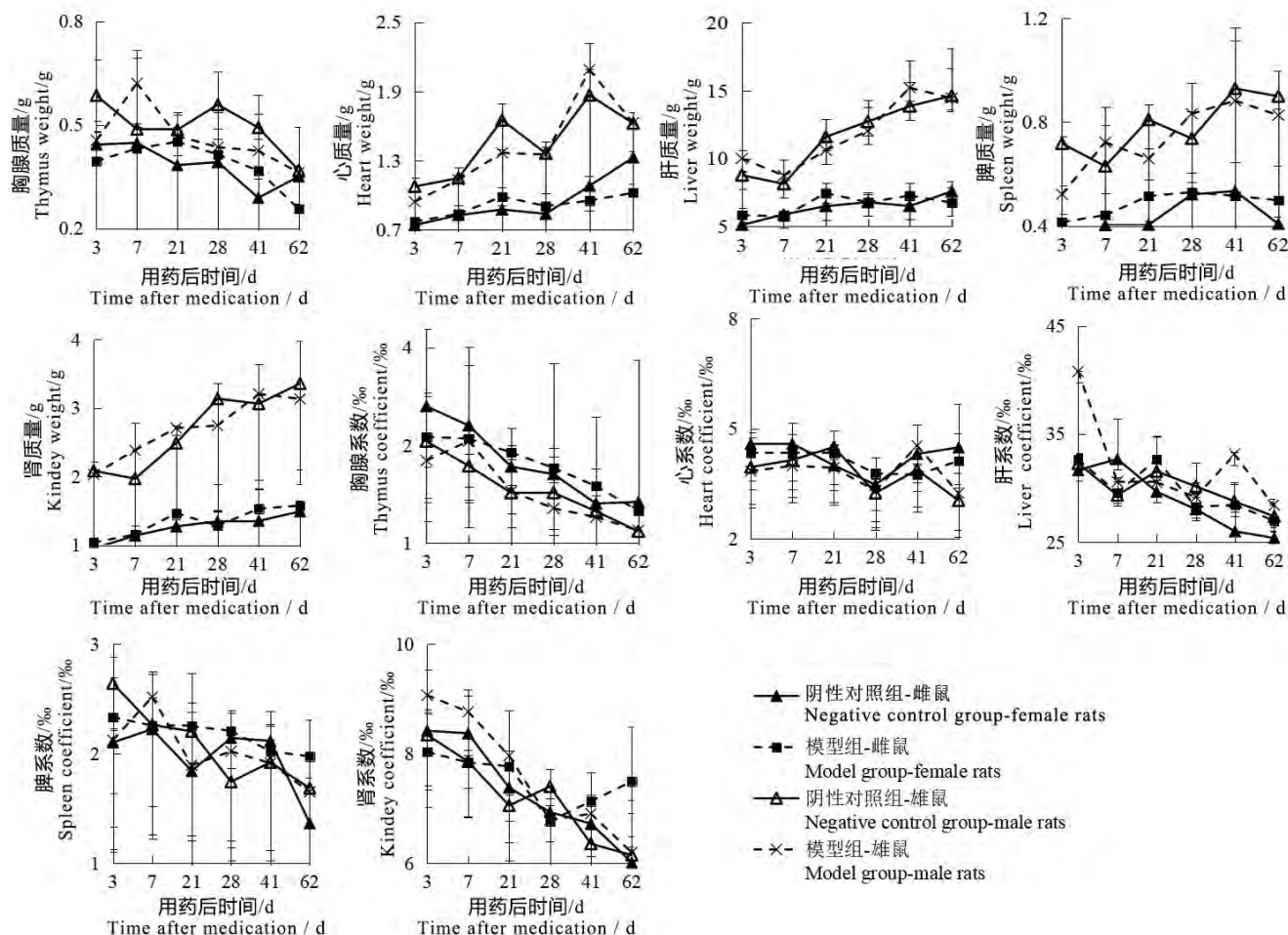
损伤，视杆视锥层细胞肿胀，局灶坏死缺失，外核层局灶性变薄、萎缩，节细胞层细胞数量减少，病变持续至第61天仍未恢复。视网膜病变的发生率在碘酸钠注射后第21、28天达到峰值，至第42天略有下降，其中第28天与阴性对照组相比有统计学意义（ $P < 0.01$ ，图5）。同样，视网膜病变评分在碘酸钠注射后第28天达到最高，与阴性对照组相比有统计学意义（ $P < 0.01$ ，图5），之后评分逐渐降低。

眼TUNEL染色结果显示，阴性对照组腹腔注射生理盐水后第28天时个别大鼠的视网膜偶见凋亡细胞。模型组腹腔注射碘酸钠后第3天时视网膜外核层开始出现凋亡细胞，第7天达到峰值，至第62天仍可见凋

亡细胞（图6）。图像分析结果与镜下观察一致，阴性对照组凋亡细胞数量远少于同时期模型组，其中注射后第28天的组间差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）。

3 讨论

碘酸钠是一种无机氧化剂，对视网膜色素上皮（retinal pigment epithelium, RPE）有较强的选择性^[3]，可在体内外诱导多种属动物（如小鼠^[4]、大鼠^[5-10]、兔^[11]、犬^[12]）和人^[13]视网膜色素变性，其机制主要为引发视网膜细胞氧化应激反应^[14]，阻碍视网膜色素上皮糖代谢的酶反应，造成RPE变性^[15]，直接损伤神经视网膜^[16]。研究普遍认为，碘酸钠对除眼以外的



注：模型组一次性腹腔注射质量浓度为6 mg/mL 碘酸钠溶液10 mL/kg；阴性对照组以相同容积和频次腹腔注射生理盐水注射液。各时间点两组大鼠数量分别为单性别2、2、2、6、2、2只。

Note: The model group was intraperitoneally injected with 6 mg/mL sodium iodate solution once at the dose of 10 mL/kg; the negative control group was intraperitoneally injected with normal saline at the same volume and frequency. The number of rats in the two groups at each time point was 2, 2, 2, 6, 2, 2 respectively for single sex.

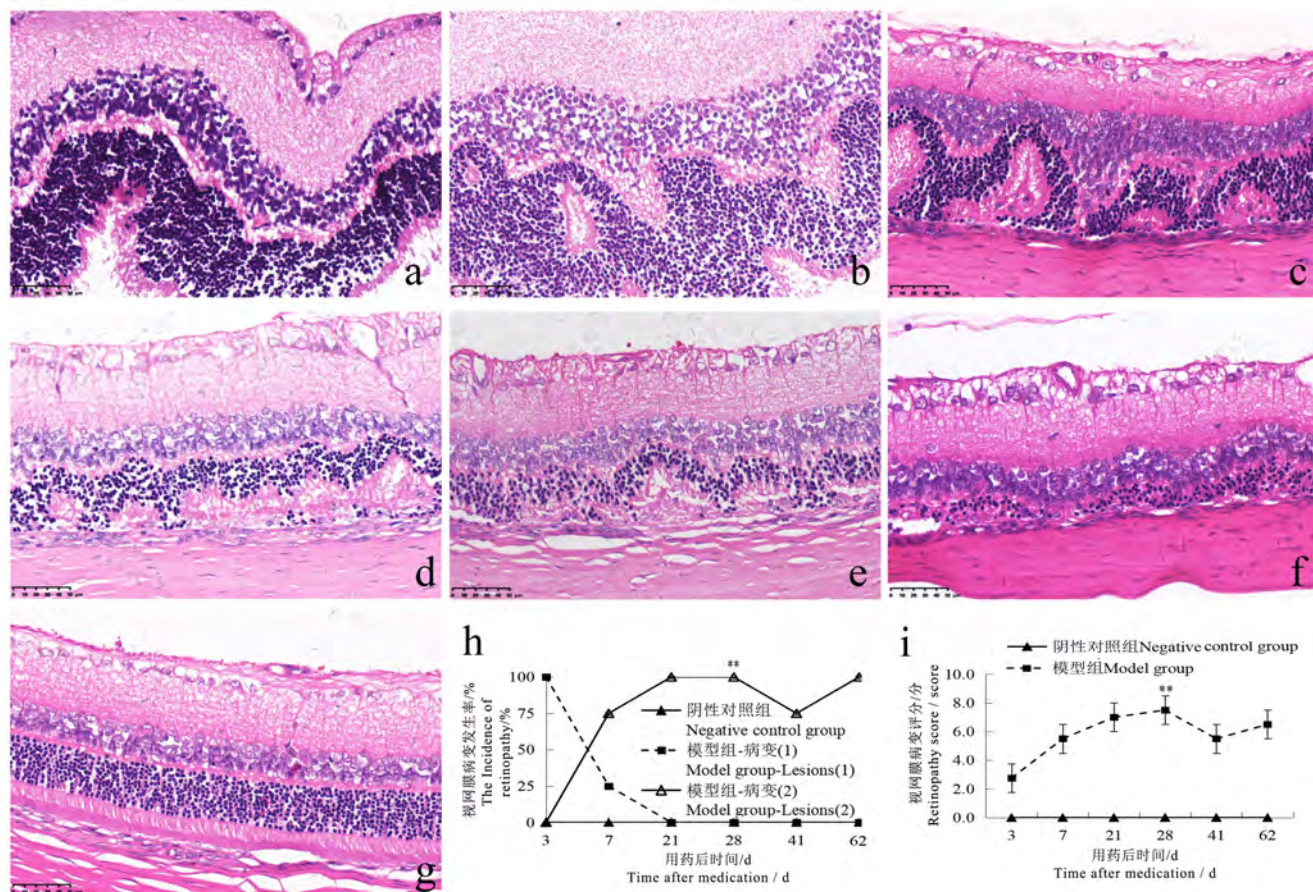
图4 碘酸钠注射后雌雄鼠各脏器质量及系数变化图

Figure 4 Changes of organ weight and coefficient of male and female rats after sodium iodate injection

全身其他组织和器官没有明显毒性作用^[17]。但碘酸盐毒理研究发现，大鼠或家兔经口或腹腔给予生理剂量的碘酸盐后，肝、肾、心、大脑、肌肉、小肠、胃、睾丸、颌下腺、皮肤、毛发和甲状腺组织中均有分布；小鼠经口摄入碘酸盐的半数致死量（median lethal dose, LD₅₀）范围为500~1 100 mg/kg，经胃肠外途径给药的LD₅₀范围为100~120 mg/kg；家兔碘酸盐最低致死剂量为75 mg/kg^[18]。以上结果说明碘酸盐具有全身暴露风险和一定的毒性。此外，碘酸钠的氧化作用可能诱发机体的氧化应激反应，而氧化应激生成的过氧化物和自由基会导致全身毒性作用，与多种疾病的发生发展密切相关，涉及的脏器和系统非常广泛，包

括但不限于脑^[19]、肝^[20]、肾^[21]、肺^[22]、骨^[23]、口腔^[24]，心血管系统^[25-26]、神经系统^[27]、生殖系统^[28]、脂质和糖代谢^[29]等。因此，研究碘酸钠是否会对动物全身组织器官和系统产生影响是有价值和意义的。基于此，本研究根据相关文献^[30-31]和预实验结果，在保证动物RPE出现典型病变的基础上，全面评价单次腹腔注射60 mg/kg碘酸钠对SD大鼠可能产生的影响。

在本实验条件下，腹腔注射碘酸钠对大鼠一般体征、体质量和生理指标均可产生一定影响且有性别差异。（1）注射当天88%的大鼠出现稀便，以雄鼠数量居多，且恢复时间较雌鼠略长；观察期间雄鼠体质量



注：模型组一次性腹腔注射质量浓度为6 mg/mL碘酸钠溶液10 mL/kg；阴性对照组以相同容积和频次腹腔注射生理盐水注射液。各时间点两组大鼠数量分别为单性别2、2、2、6、2、2只。a示模型组注射后第3天视网膜呈波浪样改变；b示模型组注射后第7天视网膜呈异常心电图样改变，各层排列紊乱；图c~f分别示模型组注射后第21、28、41、62天视网膜呈异常心电图样改变，各层排列紊乱、外核层局灶变薄；g示阴性对照组视网膜正常；h-i为两组大鼠的视网膜病变发生率及HE评分比较（病变1为视网膜呈波浪样改变，病变2为视网膜呈心电图样改变）与阴性对照组比较，** $P<0.01$ 。图中比例尺大小均为50 μm 。

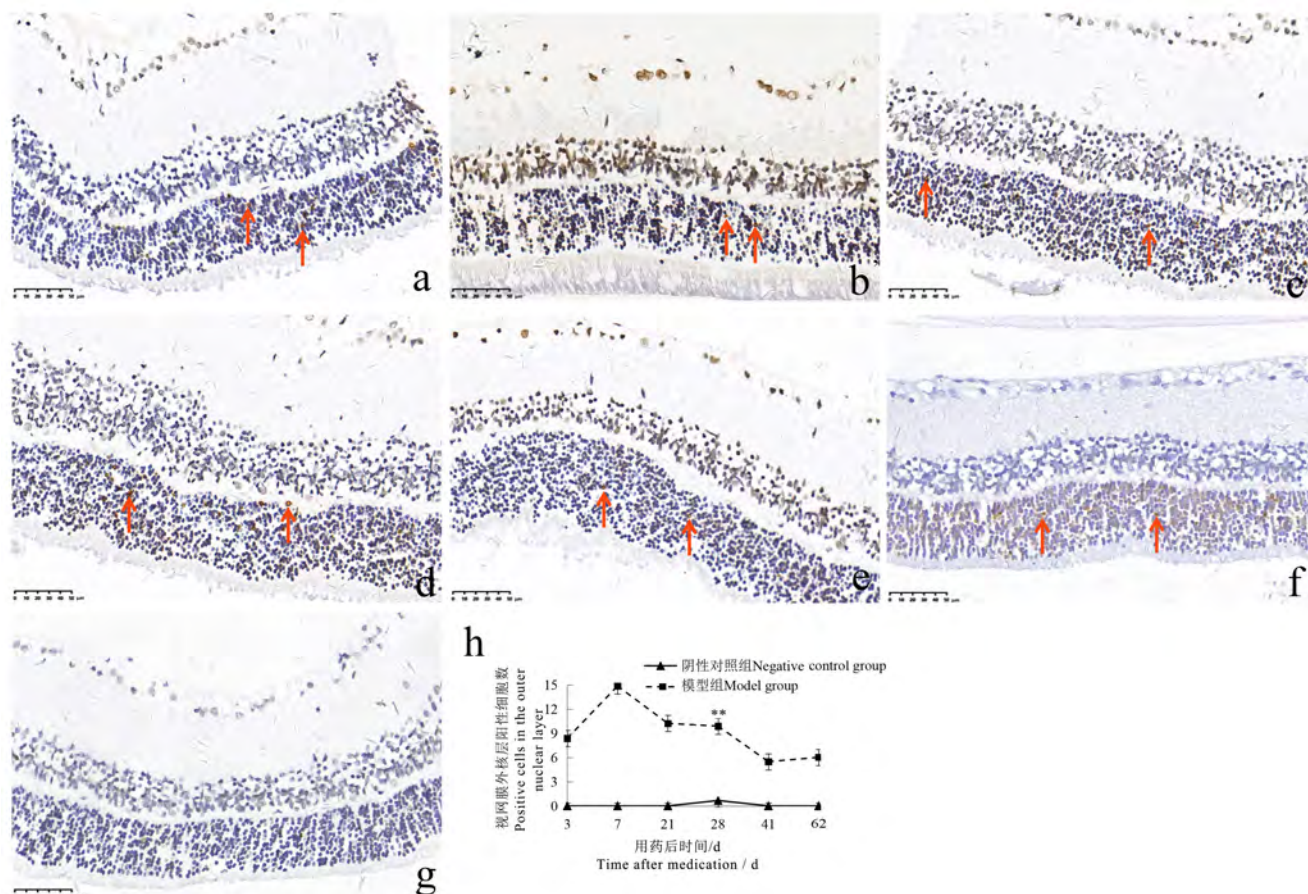
Note: The model group was intraperitoneally injected with 6 mg/mL sodium iodate solution once at the dose of 10 mL/kg; the negative control group was intraperitoneally injected with normal saline at the same volume and frequency. The number of rats in the two groups at each time point was 2, 2, 2, 6, 2, 2 respectively for single sex. a shows the retina of the model group appeared wave-like changes on the 3rd day after injection; b shows the retina of the model group appeared abnormal electrocardiogram (ECG)-like changes on the 7th day after injection, and the arrangement of each layer was disordered; c-f show the retina of the model group appeared abnormal ECG-like changes on the 21st, 28th, 41st and 62nd days after injection, with disordered arrangement of each layer and focal thinning of the outer nuclear layer. g shows normal retina in negative control group; h-i show the comparison of the incidence of retinopathy and HE score between the two groups (Lesion 1 shows wave-like changes in the retina, lesion 2 shows ECG-like changes in the retina). ** $P<0.01$, vs the negative control group. The scale size in the figure are 50 μm .

图5 碘酸钠注射后不同时间点的大鼠眼视网膜病变情况(HE染色, $\times 400$)

Figure 5 Retinopathy in rats at different time points after sodium iodate injection (HE staining, $\times 400$)

增长缓慢较雌鼠明显。在以大鼠作为实验系统和碘酸钠致RP的同类研究中^[3-12]均未见碘酸钠使动物粪便性状一过性改变或产生胃肠系统功能紊乱相关症状的报告，但在本研究中腹腔注射生理盐水注射液的阴性对照组大鼠未见类似症状，基本排除了注射方式导致动物出现稀便的可能性；另外，据文献报告碘酸盐腹

腔注射后在肠内有分布^[18]，因此推测该症状的出现与碘酸钠相关。(2) 雌雄鼠除心脏功能指标(CK、CK-MB)均于注射后第7天开始升高外，雌鼠的其他指标波动均早于雄鼠(雌鼠TBIL、GGT、AST、ALT和BUN、CREA注射后第7天开始升高，雄鼠上述指标的升高时间分别为第21天和第28天；雌鼠和雄鼠



注：模型组一次性腹腔注射质量浓度为6 mg/mL碘酸钠溶液10 mL/kg；阴性对照组以相同容积和频次腹腔注射生理盐水注射液。各时间点两组大鼠数量分别为单性别2、2、2、6、2、2只。a~f分别示模型组注射后第3、7、21、28、41、62天视网膜外层细胞TUNEL染色阳性（箭头所示为TUNEL染色阳性细胞）；g示阴性对照组视网膜TUNEL染色阴性；h为两组大鼠的视网膜外层细胞TUNEL染色阳性细胞数比较，与阴性对照组比较，** $P < 0.01$ 。图中比例尺大小均为50 μm 。

Note: The model group was intraperitoneally injected with 6 mg/mL sodium iodate solution once at the dose of 10 mL/kg; the negative control group was intraperitoneally injected with normal saline at the same volume and frequency. The number of rats in the two groups at each time point was 2, 2, 2, 6, 2, 2 respectively for single sex. a-f show that TUNEL staining was positive in the outer nuclear layer of the retina on the 3rd, 7th, 21st, 28th, 41st and 62nd days after injection in the model group (the arrows show TUNEL staining positive cells); g shows that the TUNEL staining of the retina in the negative control group was negative; h shows the comparison of the number of TUNEL staining positive cells in the outer nuclear layer of the two groups of rats. ** $P < 0.01$, vs the negative control group. The scale size in the figure are 50 μm .

图6 碘酸钠注射后不同时间点的大鼠视网膜TUNEL染色情况($\times 400$)

Figure 6 TUNEL staining of rat retina at different time points after sodium iodate injection ($\times 400$)

CHOL、TG 分别于注射后第3天和第7天开始波动)，但上述指标波动的持续时间未见性别差异（注射后第41天均恢复至与阴性对照组基本一致）。(3) 注射后第21天模型组雌鼠的肝、脾、肾、胸腺的质量及系数，以及雌鼠的心脏质量及系数的平均值和个体数据，均大于阴性对照组，这与模型动物脏器功能相关血清生化指标出现不同程度波动的情况相吻合；但碘酸钠对各脏器的影响仅体现在脏器功能层面，未涉及组织形态的改变。此外，注射后雌雄鼠出现波动的血常规指

标基本一致，但雌鼠的波动在注射后第28天较明显，雄鼠持续至第62天仍未完全恢复。以上结果提示，60 mg/kg碘酸钠腹腔注射可能有一定程度的全身毒性，但因部分时间点的样本数相对较少，上述指标的波动与碘酸钠的相关性还有待进一步证实。

本研究用HE、TUNEL染色对大鼠注射后不同时间点的视网膜病变进行了动态追踪，可见大鼠RPE及神经层细胞出现了明显的病理损伤，所见病变类型与文献报告^[7-10]基本一致，均表现为视网膜细胞排列紊

乱、呈波浪样改变,病变部位以后极部为主,同时视网膜外核层局灶萎缩、变薄,细胞数量减少,细胞凋亡,病变程度及范围随注射后时间的延长而加重。本研究结果与相关文献报道的差异主要包括以下几点:(1)与尾静脉注射相同剂量碘酸钠的报告^[10]相比,本研究视网膜病变更严重,注射后第7天视网膜扭曲加重,呈异常心电图样改变,外核层局灶缺失,但尾静脉注射后仅见视网膜波浪样改变和外核层细胞减少。导致病变程度差异的原因可能是,与直接进入血液循环的静脉注射相比,腹腔注射后药物经腹腔肠系膜静脉吸收进入全身循环,吸收和代谢速率较慢,与靶器官结合的时间较长。(2)本研究注射后第3、7天模型组部分动物视网膜上皮至Bruch膜脱落,类似报告^[11]仅在非啮齿类动物兔中可见,未见小鼠视网膜出现该情况。(3)Kiuchi等^[31]发现碘酸钠以100 mg/kg诱发小鼠RP模型第3天感光细胞凋亡达高峰,注射后第7天凋亡停止;但本研究大鼠的细胞凋亡高峰在注射后第28天,注射后第62天仍未停止,该差异可能与动物种属不同、机体代谢能力有差异相关。(4)在碘酸钠诱导RP模型中,部分研究仅使用雄性动物^[7-9],本研究中动物视网膜病变未见明显的性别差异,但在对生理指标的影响方面,雌性动物可能对碘酸钠更加敏感。

综上,碘酸钠引起大鼠视网膜病变与人类RP疾病的片状RPE缺损极为相似,且建模方法简单易行、病变稳定,碘酸钠静脉或腹腔注射对视网膜均有较好的选择性,但可能对动物其他组织器官功能也产生一定程度的影响。因此,在使用该动物模型作为药物安全性评价工具时,应充分考虑造模试剂的全身毒性暴露,并且需要评价药物与造模试剂可能的相互作用等。本研究提示,需通过增大样本量,建立丰富、可靠的背景数据等方法,正确分辨动物异常体征和各指标波动与待评价药物的相关性。

[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云南省药物研究所实验动物福利伦理委员会(IACUC)审查批准[编号:动(伦)IACUC-2020-011-01]。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 the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of Yunnan Institute of Pharmaceutical Research (Approval Letter No. IACUC-2020-011-01), 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]

谭莹负责实验方案设计、组织实施、数据统计及研究报告撰写;

廖文平负责组织病理学检查相关工作;

高启龙负责资料收集、文献综述、辅助结果分析和论文修改;

李勇负责血清生化、血常规指标的检测等相关工作;

史新辉负责论文图片整理和制作相关工作;

王京昆负责研究方案、报告和计划的审核及批准。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 国家食品药品监督管理总局.《药物非临床研究质量管理规范》(国家食品药品监督管理总局令第34号)[EB/OL]. (2017-08-02) [2023-01-13]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/bmgzh/20170802160401550.html>.
- [2] ICH. M3(R2) Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals[EB/OL]. (2009-06-11) [2023-01-13]. <https://www.cfdi.org.cn/resource/news/8522.html>.
- [3] 范美花. 碘酸钠诱发的视网膜色素变性动物模型研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(9):860-864. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.09.018.
FAN M H. Progress in developing a sodium iodate-induced retinitis pigmentosa animal model[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(9):860-864. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.09.018.
- [4] 茅佩瑶, 茅希颖, 陈雪, 等. 碘酸钠诱导小鼠视网膜色素上皮变性模型的研究[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(9):1636-1641, 1662. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.007.
MAO P Y, MAO X Y, CHEN X, et al. Study on a mouse model of retinitis pigmentosa induced by sodium iodate[J]. Prog Mod Biomed, 2020, 20(9):1636-1641, 1662. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.007.
- [5] LIU Y, LI Y, WANG C G, et al. Morphologic and histopathologic change of sodium iodate-induced retinal degeneration in adult rats[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(2):443-454.
- [6] 李鑫, 洪萌, 侯铁奇. 骨髓间充质干细胞对视网膜色素变性大鼠视网膜的修复作用[J]. 新乡医学院学报, 2021, 38(6):511-515. DOI: 10.7683/xyxyxb.2021.06.003.
LI X, HONG M, HOU T Q. Repair effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the retina of rats with retinitis pigmentosa[J]. J Xinxiang Med Univ, 2021, 38(6):511-515. DOI: 10.7683/xyxyxb.2021.06.003.
- [7] 蔡曾晓瑞, 胡相卡, 桂留铭, 等. 三七总皂苷对碘酸钠所致视网膜损伤的保护作用及机制研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2023, 41(1):113-119. DOI:10.13880/j.cnki.65-1174/n.2023.22.005.

- CAI Z X R, HU X K, GUI L M, et al. Study on protective effect and mechanism of panax notoginseng saponins on retina injury induced by sodium iodate[J]. Journal of Shihezi University(Natural Science), 2023, 41(1): 113-119. DOI: 10.13880/j.cnki.65-1174/n.2023.22.005.
- [8] 杜柏荣, 许衍峰, 韦志强. 维生素C通过调节巨噬细胞功能缓解大鼠黄斑变性的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(17): 130-134. DOI: 10.7619/jcmp.20220296.
DU B R, XU Y F, WEI Z Q. Vitamin C alleviates macular degeneration in rats by regulating function of macrophages [J]. J Clin Med Pract, 2022, 26(17): 130-134. DOI: 10.7619/jcmp.20220296.
- [9] 许凯. 黄芪甲苷纳米乳眼用凝胶对实验性大鼠干性年龄相关性黄斑变性的作用研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.
XU K. Study on the effect of astragaloside IV nanoemulsion gel on experimental dry age-related macular degeneration rat model[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2018.
- [10] 朱颖婷, 邓新国, 高杨, 等. 碘酸钠诱导大鼠视网膜损伤的病理改变和SOD、CAT的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(9): 1851-1854. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2010.09.038.
ZHU Y T, DENG X G, GAO Y, et al. Pathological changes and activity of SOD and CAT in the damaged retina induced by sodium iodate in rats[J]. Chin J Pathophysiol, 2010, 26(9): 1851-1854. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2010.09.038.
- [11] 王立春, 刘建宗, 郭莹. 碘酸钠诱导兔视网膜色素上皮变性模型的研究[J]. 眼科新进展, 2015, 35(11): 1032-1035. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0282.
WANG L C, LIU J Z, GUO Y. Experimental study on rabbit retinal pigment epithelial degeneration induced by sodium iodate[J]. Recent Adv Ophthalmol, 2015, 35(11): 1032-1035. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0282.
- [12] AHN S M, AHN J, CHA S, et al. Morphologic and electrophysiologic findings of retinal degeneration after intravitreal sodium iodate injection following vitrectomy in canines[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 3588. DOI: 10.1038/s41598-020-60579-1.
- [13] 陈若冰, 吴素琴, 姜玥, 等. 薯蓣皂苷元抑制碘酸钠诱发ARPE-19细胞氧化应激反应[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(11): 2783-2786. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2022.11.053.
CHEN R B, WU S Q, JIANG Y, et al. Diosgenin inhibits oxidative stress induced by sodium iodate in ARPE-19 cells[J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(11): 2783-2786. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2022.11.053.
- [14] GRIGNOLO A, ORZALESI N, CALABRIA G A. Studies on the fine structure and the rhodopsin cycle of the rabbit retina in experimental degeneration induced by sodium iodate[J]. Exp Eye Res, 1966, 5(1): 86-97. DOI: 10.1016/S0014-4835(66)80024-6.
- [15] WANG J M, IACOVELLI J, SPENCER C, et al. Direct effect of sodium iodate on neurosensory retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(3): 1941-1953. DOI: 10.1167/iops.13-13075.
- [16] CHOWERS G, COHEN M, MARKS-OHANA D, et al. Course of sodium iodate-induced retinal degeneration in albino and pigmented mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(4): 2239-2249. DOI: 10.1167/iops.16-21255.
- [17] 黄文金, 陈志辉. 碘酸盐的毒理学研究进展[J]. 海峡预防医学杂志, 2002, 8(1): 79-80. DOI: 10.3969/j.issn.1007-2705.2002.01.053.
HUANG W J, CHEN Z H. Research progress in toxicology of iodate[J]. Strait J Prev Med, 2002, 8(1): 79-80. DOI: 10.3969/j.issn.1007-2705.2002.01.053.
- [18] 黄越, 陈乃耀, 赵雪聪, 等. 氧化应激参与放射性脑损伤的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(2): 221-224. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2019.02.019.
HUANG Y, CHEN N Y, ZHAO X C, et al. Advances in research on oxidative stress involved in radiation-induced brain injury [J]. Chin J Neuroanat, 2019, 35(2): 221-224. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2019.02.019.
- [19] 廖月, 何毅怀, 罗亚文. 氧化应激在急性肝损伤中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(10): 2402-2407. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.10.039.
LIAO Y, HE Y H, LUO Y W. Role of oxidative stress in acute liver injury[J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(10): 2402-2407. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.10.039.
- [20] 胡英华, 贾炳超, 尚鑫, 等. 基于氧化应激通路的朱砂肾毒性机理研究及针灸对氧化应激的缓解作用[J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(5): 513-517. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2022.05.012.
HU Y H, JIA B C, SHANG X, et al. Study on the mechanism of cinnabar nephrotoxicity based on the oxidative stress pathway and the alleviating effect of acupuncture on oxidative stress[J]. J Chang Univ Chin Med, 2022, 38(5): 513-517. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2022.05.012.
- [21] 刘和亮, 赵金垣. 氧化应激和肺损伤[J]. 中国职业医学, 2002, 29(5): 49-51. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6486.2002.05.024.
LIU H L, ZHAO J Y. Oxidative stress and lung injury[J]. China Occup Med, 2002, 29(5): 49-51. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6486.2002.05.024.
- [22] 李敏启, 杜娟, 杨盼盼, 等. 氧化应激调控骨质疏松症的研究进展[J]. 山东大学学报(医学版), 2021, 59(6): 16-24. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2021.0295.
LI M Q, DU J, YANG P P, et al. Research progress of oxidative stress regulating osteoporosis[J]. J Shandong Univ Health Sci, 2021, 59(6): 16-24. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2021.0295.
- [23] 宁佳, 胡欣, 程兴群. 变异链球菌氧化应激调控机制的研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2023, 31(4): 295-300. DOI: 10.12016/j.issn.2096-1456.2023.04.012.
NING J, HU X, CHENG X Q. Research progress on oxidative stress regulatory mechanisms in Streptococcus mutans[J]. J Prev Treat Stomatol Dis, 2023, 31(4): 295-300. DOI: 10.12016/j.issn.2096-1456.2023.04.012.
- [24] WU N, ZHENG F, LI N, et al. RND3 attenuates oxidative stress and vascular remodeling in spontaneously hypertensive rat via inhibiting ROCK1 signaling[J]. Redox Biol, 2021, 48: 102204. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102204.
- [25] 李楠, 王保和, 张晨, 等. 淫羊藿苷对心血管疾病作用机制研究进展[J]. 天津中医药, 2023, 40(1): 126-130. DOI: 10.11656/j.issn.1672-1519.2023.01.22.
LI N, WANG B H, ZHANG C, et al. Research progress on the

mechanism of icariin on cardiovascular diseases[J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2023, 40(1):126-130. DOI: 10.11656/j.issn.1672-1519.2023.01.22.

[26] 王香香, 孙建军, 刁明芳. 氧化应激在感音神经性耳聋中的作用机制[J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2023, 21(1):56-60. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4933.2023.01.014.

WANG X X, SUN J J, DIAO M F. Mechanisms of oxidative stress in sensorineural deafness[J]. Chin Sci J Hear Speech Rehabil, 2023, 21(1):56-60. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4933.2023.01.014.

[27] 江楠, 马瑞红, 赵晓丽, 等. 氧化应激与生殖相关疾病研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2021, 40(5):402-406. DOI:10.12280/gjszjk.20210042.

JIANG N, MA R H, ZHAO X L, et al. Research progress on oxidative stress and reproductive related diseases[J]. J Int Reproductive Health/family Plan, 2021, 40(5):402-406. DOI: 10.12280/gjszjk.20210042.

[28] 赵金枫, 颜士玉, 王瑞, 等. 氧化应激在三氯乙烯所致毒性效应中的作用[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(12):1423-1429. DOI: 10.11836/JEOM22259.

ZHAO J F, YAN S Y, WANG R, et al. Role of oxidative stress in trichloroethylene-induced toxicity[J]. J Environ Occup Med, 2022, 39(12):1423-1429. DOI: 10.11836/JEOM22259.

[29] CARIDO M, ZHU Y, POSTEL K, et al. Characterization of a mouse model with complete RPE loss and its use for RPE cell transplantation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(8):5431-5444. DOI: 10.1167/iovs.14-14325.

[30] KIM H L, NAM S M, CHANG B J, et al. Ultrastructural changes and expression of PCNA and RPE65 in sodium iodate-induced acute retinal pigment epithelium degeneration model[J]. Neurochem Res, 2018, 43(5):1010-1019. DOI: 10.1007/s11064-018-2508-9.

[31] KIUCHI K, YOSHIZAWA K, SHIKATA N, et al. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice[J]. Curr Eye Res, 2002, 25(6): 373-379. DOI: 10.1076/ceyr.25.6.373.14227.

(收稿日期:2022-09-22 修回日期:2023-02-17)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,周培)

[引用本文]
谭莹, 廖文平, 高启龙, 等. 碘酸钠诱发视网膜色素变性大鼠模型的生理指标和组织病理学分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 124-135. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.149.

TAN Y, LIAO W P, GAO Q L, et al. Physiological indexes and histopathology analysis of sodium iodate-induced retinitis pigmentosa in rats[J]. Lab Anim Comp Med 2023, 43(2): 124-135. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.149.

《实验动物与比较医学》第3届(2022年)优秀审稿人获奖名单

杜小燕	首都医科大学基础医学院
李 华	上海益诺思生物技术股份有限公司
魏 强	中国医学科学院医学实验动物研究所
郑和平	解放军联勤保障部队第900医院
陈鸿军	中国农业科学院上海兽医研究所
崔东红	上海市精神卫生中心/上海市重性精神病重点实验室
邸亚男	北京大学第三医院
黄 冰	中山大学中山眼科中心眼科学实验动物中心
季樱红	复旦大学附属眼耳鼻喉科医院
赖国旗	重庆医科大学
黎 立	解放军第八医学中心结核病研究所
刘忠华	华南农业大学
王爽洁	复旦大学生殖与发育研究院上海市计划生育科学研究所
吴 剑	复旦大学附属中山医院上海市心血管病研究所
刘向云	上海体育学院
王 婧	苏州大学实验动物中心
吴建辉	上海市生物医药技术研究院
谢淑武	上海实验动物研究中心
朱彦兵	首都医科大学附属北京友谊医院

食蟹猴缺血再灌注模型的建立及依达拉奉干预作用

潘梦鲜^{1,2}, 黄晓蛟^{1,2}, 黄中理^{1,2}, 申 果^{1,2}, 张鹏飞^{1,2}, 曾 勇^{1,2}, 李文峰³, 周华波⁴, 韦祝梅^{1,2}

(1. 广西桂科院华仁济瀛生物科技有限公司, 南宁 530000; 2. 广西科学院医学与健康研究院, 南宁 530000; 3. 广西盛思蓝生物医药技术有限公司, 南宁 530000; 4. 南宁市华波宠物医院, 南宁 530000)

[摘要] **目的** 建立食蟹猴大脑中动脉缺血再灌注模型, 并分析依达拉奉干预的疗效。**方法** 将15只成年雄性食蟹猴随机分为3组, 分别为假手术组 (Sham, $n=3$)、缺血再灌注模型组 (Model, $n=6$) 和依达拉奉治疗组 (Edaravone, $n=6$)。采用左侧大脑动脉 M1 段夹闭 1 h 再灌注的方法建立成年食蟹猴大脑中动脉缺血再灌注模型, 再灌注 2 h 后 Edaravone 组动物静脉注射 0.5 mg/kg 依达拉奉进行干预治疗, Sham 组和 Model 组动物静脉注射等体积的生理盐水, 第 2 天至第 7 天, 每天 2 次。对食蟹猴进行行为学录像、临床表现观察以及神经功能缺损评分, 并对其脑水肿体积及脑缺血体积进行统计分析。**结果** 与 Sham 组相比, Model 组食蟹猴均出现明显的缺血性脑卒中疾病典型症状, Model 组在术后神经功能缺损评分显著升高 ($P<0.01$), 脑组织水肿体积显著增大 ($P<0.01$), 脑组织梗死体积显著增大 ($P<0.01$)。与 Model 组相比, Edaravone 治疗后神经功能评分降低 ($P<0.05$), 脑组织水肿体积显著减小 ($P<0.05$), 脑组织梗死体积显著减小 ($P<0.05$)。**结论** 成功建立了食蟹猴大脑中动脉缺血再灌注模型, 证实依达拉奉可以缓解食蟹猴大脑中动脉缺血再灌注引起的损伤。

[关键词] 食蟹猴; 缺血性脑卒中; 缺血再灌注; 依达拉奉

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0136-09



Establishment of Ischemia-Reperfusion Model in Cynomolgus Macaques and Effects of Edaravone Intervention

PAN Mengxian^{1,2}, HUANG Xiaojiao^{1,2}, HUANG Zhongli^{1,2}, SHEN Guo^{1,2}, ZHANG Pengfei^{1,2}, ZENG Yong^{1,2}, LI Wenfeng³, ZHOU Huabo⁴, WEI Zhumei^{1,2}

(1. Guangxi Gui Academy of Science Huaren Jiyang Biotechnology Co., LTD., Nanning 530000, China; 2. Institute of Medicine and Health, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530000, China; 3. Guangxi Thinon Biomedical Technology Co., LTD., Nanning 530000, China; 4. Nanning Huabo Pet Hospital, Nanning 530000, China)

Correspondence to: WEI Zhumei (ORCID: 0000-0002-1846-7501), E-mail: weizhumei@hrmtgroup.com

[ABSTRACT] **Objective** To establish an ischemia-reperfusion model in cynomolgus macaques and to analyse the effects of edaravone intervention. **Methods** A total of fifteen adult male cynomolgus macaques were randomly divided into three groups: sham operation (Sham group, $n=3$), ischemia-reperfusion model (Model group, $n=6$) and edaravone treatment (Edaravone group, $n=6$). Ischemic-reperfusion model of cynomolgus macaques was established by clamping the M1 branch of the left cerebral artery for 1 h. After 2 h of reperfusion, the animals in Edaravone group were injected with 0.5 mg/kg edaravone intravenously for intervention treatment, while the animals in Sham and Model groups were injected with an equal volume of normal saline intravenously, twice a day, from the 2nd to 7th day. The behavioral video recordings, clinical observations and neurological deficit scores of cynomolgus macaques were obtained, and brain edema volume and cerebral ischemia volume were statistically analyzed. **Results** Compared with the Sham group, the animals in Model group showed typical symptoms of ischemic stroke, with a significant increase in the neurological deficit score, the volumes of edema and infarct of brain tissue (all $P<0.01$). Compared with Model group, the neurological deficit score, the volumes of edema and infarct of brain tissue were significantly reduced in Edaravone group (all $P<0.05$). **Conclusion** An animal model of ischemia-reperfusion in cynomolgus macaques was successfully established,

[第一作者] 潘梦鲜(1991—),女,硕士,从事动物疾病模型研究。E-mail: meng@hrmtgroup.com。ORCID:0000-0002-2363-532X

[通信作者] 韦祝梅(1978—),女,硕士,兽医师,主要从事非人灵长类动物疾病模型研究。E-mail: weizhumei@hrmtgroup.com。ORCID: 0000-0002-1846-7501

and edaravone was confirmed to alleviate the damage caused by ischemia-reperfusion.

[Key words] Cynomolgus macaques; Ischemic stroke; Ischemia-reperfusion; Edaravone

脑卒中又称中风,具有致残率高、复发率高和病死率高等特点,极大地危害人类健康^[1]。脑卒中是脑血管破裂或堵塞导致脑组织损伤的疾病,分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中,其中脑缺血约占85%,脑出血约占15%^[2]。脑缺血的治疗方法是通过对溶栓恢复大脑的血液供应,然而快速再灌注会导致大脑区域进一步损伤,这种情况被称为缺血再灌注损伤^[3]。缺血性脑卒中患者主要是单侧大脑中动脉闭塞引起运动障碍、感觉功能及语言功能障碍,从而出现上下肢偏瘫、面瘫、言语不清的现象,这些症状的轻重程度与病灶区的位置及大小相关^[4]。

动物模型是研究疾病机制和评价药物作用的重要方法,在生物医学研究中发挥着核心作用。临床前动物模型对开发新的治疗方法以及阐明脑卒中期间和脑卒中后脑损伤及其修复的分子机制具有重要作用^[5-6]。啮齿类动物脑缺血再灌注的造模方法主要有开颅法、线栓法和栓塞法。啮齿类动物费用较少且易于饲养,建模方便,容易护理,病理检测已相当成熟,发病机制的研究也较为深入。现实中很多神经保护药物在啮齿类实验动物疾病模型中具有很好的保护作用,但在临床试验中却没有得到预期的保护作用。这可能是因为啮齿类动物的脑组织形态结构、生理功能及代谢与人类存在较大差异,临床转化率通常低于10%。非人灵长类动物具有与人类相似的大脑解剖结构、脑回结构及相似的神经运动功能,可以更好地反映缺血性脑卒中的临床症状和病理情况,是探索人类治疗方法的理想模型^[7-8]。卒中治疗专业学术圆桌会议(Stroke Treatment Academic Industry Roundtable, STAIR)推荐使用非人灵长类实验动物作为临床前研究动物。研究表明,啮齿类动物的缺血性脑卒中与人存在显著差异,这些差异包括脑卒中的病理特征、急性缺血性损伤后炎症和分子途径的变化;而非人灵长类动物的缺血性脑卒中模型与人类更相似^[9],因此成熟的非人灵长类动物模型对于新药研究及人类脑卒中病理机制研究十分重要。

为了更好地模拟脑卒中患者,大多数非人灵长类脑卒中模型是通过阻断大脑中动脉(middle cerebral artery occlusion, MCAO)构建的,该方法可以实现良好的重现性和术后存活率。目前,MCAO造模方法主要包括水平段(M1)闭塞和脑岛段(M2)闭塞,其中M1段闭塞的病灶区体积更大,神经功能缺失评分更

高,更能体现脑卒中后的症状^[10]。有研究发现,大脑中动脉M1段内的缺血区域具有侧支流动,卒中初始核较小,皮层和皮层下结构均有大量的半暗带^[11],有利于缺血性脑卒中发病机制的研究及新治疗方法的探索。

依达拉奉是一种抗氧化保护剂,可以通过清除羟自由基、过氧自由基和超氧自由基,缓解脑水肿,抑制迟发性神经元死亡,从而改善脑缺血引起的脑卒中^[12]。依达拉奉注射液于2001年在日本首次被批准用于治疗急性缺血性脑卒中患者,现在中国已广泛使用,是目前治疗脑卒中患者的常用药物^[13]。依达拉奉注射液在非人灵长类动物缺血再灌注模型的治疗效果尚少有报告。本研究通过夹闭食蟹猴大脑中动脉M1段建立脑动脉缺血再灌注模型,并通过静脉注射依达拉奉进行干预治疗,然后用神经功能缺损评分评价临床神经缺损程度,根据磁共振成像检查以及脑组织2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色检测缺血模型动物的水肿体积及脑梗死体积,评估脑缺血病灶区大小,探究依达拉奉注射液对食蟹猴缺血再灌注模型的治疗效果,以及其可否作为临床前非人灵长类动物缺血再灌注模型新药研究的阳性对照药,并为脑缺血再灌注损伤机制及以食蟹猴作为脑缺血再灌注模型动物用于药物治疗的深入研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级雄性食蟹猴15只,8~12岁,体质量6.0~9.0 kg,来源于广西雄森灵长类实验动物养殖开发有限公司[SCXK(桂)2016-0003],动物质量合格证号为0002880。所有食蟹猴均由兽医进行健康检查,确保体格健康、摄食正常、运动功能正常。动物食用全价猴-维持颗粒饲料,自由饮水;普通环境适应性饲养及操作训练14 d,温度为(22±4)℃,相对湿度为40%~70%,12 h/12 h昼夜交替。动物实验在广西盛思蓝生物医药技术有限公司实验设施[SYXK(桂)2020-0008]中进行,并通过广西盛思蓝生物医药技术有限公司实验动物福利与伦理委员会审查(IACUC编号:006-SSL12020)。

1.2 主要仪器及试剂

磁共振扫描仪为荷兰 Philips 公司产品(型号

Ingenia 3.0 T); 大动物麻醉机为北京众实迪科技发展有限公司产品 (ZS-MW); 监护仪为深圳迈瑞器械有限公司产品 (PM-9000)。依达拉奉注射液购自南京先声东元制药有限公司; TTC 染色试剂购自美国 Sigma 公司; 曲马多注射液购自石药集团欧意药业有限公司; 酚磺乙胺注射液购自国药集团容生制药有限公司; 氨苄西林钠股购自山东鲁抗医药股份有限公司; 异氟烷购自江苏恒丰强生技术有限公司; 术眠灵 II 注射液购自南京农业大学小动物疾病研究室; 戊巴比妥钠购自国药集团化学试剂有限公司; 硫酸阿托品购自黑龙江省北安市飞龙动物药厂; 乳酸钠林格注射液购自安徽双鹤药业有限公司。

1.3 实验动物分组及给药方法

15 只食蟹猴随机分为假手术组 (Sham, $n=3$)、模型对照组 (Model, $n=6$) 和依达拉奉治疗组 (Edaravone, $n=6$)。Edaravone 组动物静脉滴注 0.5 mg/kg 依达拉奉, 给药质量浓度为 0.25 mg/mL, 10 min 滴注完毕; Sham 组和 Model 组动物静脉注射等体积的生理盐水 (即 0.9% NaCl 溶液)。缺血再灌注损伤后 2 h 第一次给药, 第 2~7 天, 每天 2 次, 共 6 d。

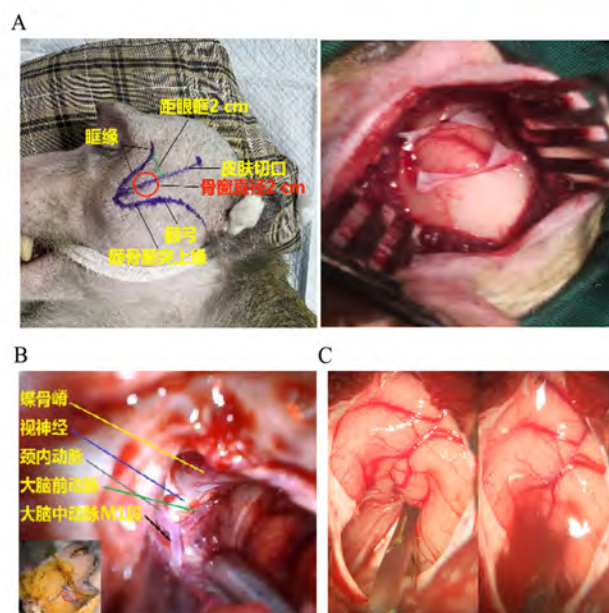
1.4 术前准备

动物实验前禁食不禁水 8~12 h, 麻醉前 15 min 给予硫酸阿托品注射液 (0.05 mg/kg), 肌肉注射 0.02 mL/kg 术眠灵 II 注射液进行诱导麻醉, 术野备皮, 开放静脉通道; 实施术前兽医基础用药, 即经肌肉注射氨苄西林钠 1 g/只、曲马多注射液 2.5 mg/kg、酚磺乙胺注射液 5 g/只, 气管插管后转移至手术台, 连接麻醉机使用异氟烷 (1%~2%) 气体维持麻醉, 心电监护, 静脉滴注乳酸钠林格注射液。体位摆放: 右侧卧位, 使颞骨体部位位于术野最高点, 术者视线能垂直地沿蝶骨嵴到达前床突和鞍旁。用碘伏消毒术野 2 次, 铺好无菌手术创巾。

1.5 动物模型制作方法

采用手术方法, 建立食蟹猴左侧大脑中动脉 M1 段缺血再灌注损伤模型。自左侧眶缘后外侧 1 cm、颞骨颞突上缘处, 至左侧上颞线、眶缘后 2 cm 处, 切开头皮、皮下组织, 分离颞肌、筋膜、骨膜, 显露颅骨; 环绕蝶骨嵴外侧部切开颅骨 2 cm×2 cm, 以外侧裂为中心, “十”字形剪开硬脑膜, 显露额下回、颞上回和外侧裂, 用湿的脑棉片覆盖保护脑实质, 打开硬脑膜 (图 1A); 解剖脑池, 用脑压板轻柔牵开额叶和颞叶, 在显微镜下显露颈内动脉分叉部、大脑中动脉 M1 段 (MCA M1)、大脑前动脉水平段 (A1), 充分解剖暴露

MCA M1 起始端 (图 1B); 显微镜下再次确认后, 用无损伤血管钳夹闭 MCA M1 起始端, 确保完全夹闭血管, 计算开始时间, 可见 M1 段血管远心端较瘪且血液颜色变深 (图 1C)。用生理盐水浸润术野以避免脑组织干燥, 夹闭 1 h 后松开血管钳恢复血流, 缝合硬脑膜, 缝合肌肉和皮肤。Sham 组除不夹闭大脑中动脉 M1 段外, 其余操作同模型组一样。所有组动物进行术后特级护理, 包括消炎、止血、止痛、吸痰、保温、生命体征监护等。



注: A, 手术入路; B, 辨别大脑中动脉 M1 段 (MCA M1); C, MCA M1 夹闭后可见血管颜色变深。

Note: A, Surgical approach; B, Identify the middle cerebral artery M1 (MCA M1); C, After MCA M1 was clamped, blood vessels became darker.

图1 食蟹猴左侧大脑中动脉 M1 段缺血再灌注损伤手术示意图
Figure 1 Surgical diagram of left M1-segment middle cerebral artery ischemia reperfusion injury in cynomolgus monkey

1.6 术后护理

术后 3 d 给予食蟹猴止痛药 (曲马多注射液, 2.5 mg/kg), 每天 2 次; 术后 5 d 给予消炎药 (氨苄西林钠, 1 g/只), 每天 2 次; 术后 2 d 给予止血药 (酚磺乙胺注射液, 5 g/只), 每天 1 次。观察发现动物流涎时, 使用电动吸引器清理口腔分泌物。每天将动物牵上猴椅, 用生理盐水清创, 然后碘伏消毒。若动物无法自主进食, 则需灌胃给予流食即牛奶+蛋白粉+米糊, 40~50 mL/只/次, 2 次/d; 同时, 静脉输入能量即肌酐+辅酶 A+Vb+ATP+Vc+KCl 2 mL+5% 葡萄糖溶液, 每天 1 次。

输液结束后,使用50%硫酸镁对进针处行热敷治疗15 min,保护动物四肢静脉。若动物出现偏瘫无法运动,需每天给动物翻身并按摩以增加血液循环,避免生疮。

1.7 神经功能评分

所有动物的神经功能活动视频采集分别于术前0天,术后第1天、第3天、第5天、第7天进行,根据录像中动物的行为学表现进行神经功能缺损评价(neurological deficit score, NDS)。依据Zhu等^[14]的评价方法,采取两人双盲评价。评价方法中含有四大类,包括意识、骨骼肌协调性、感觉系统功能和运动系统功能,满分为100,各类别满分分别为28、18、22、32,分数越高,说明神经功能损害越严重,详见表1。

1.8 磁共振成像检测

磁共振成像检查在广西医科大学琅东附属医院放射科进行。所有动物分别于术前0天、术后第3天、第7天进行磁共振检查,共3次。肌内注射0.04 mL/kg术眠灵麻醉动物后,扫描序列有T1WI、T2WI、T2W FLAIR、DWI,扫描结束后观察动物的苏醒情况,以及动物的精神行为状况。用Weasis软件进行图像分析,分别用T2W FLAIR和DWI序列分析水肿体积,每层水肿体积为该层水肿面积和层厚的乘积,各层的水肿体积之和为总的水肿体积。

1.9 TTC染色

在手术后的第8天,静脉注射戊巴比妥钠(100 mg/kg)深度麻醉后实施安乐死;取下大脑,−20℃速冻20 min后,冠状方向切片,每片脑组织的厚度为4 mm;用2%的TTC,37℃避光反应30 min,PBS清洗;加入质量分数为4%的多聚甲醛固定液,置于4℃冰箱中过夜,PBS清洗2次;用扫描仪扫描组织片,用Image J软件进行图像分析,测量梗死面积,每层梗死体积为该层梗死面积和层厚的乘积,各层的梗死体积之和为总的梗死体积。

1.10 统计分析

使用SPSS 20.0软件进行数据分析,使用GraphPad Prism 5.0软件作图。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物的临床观察及神经功能缺损评分

临床观察结果显示:Model组术后第3天死亡1只动物,该组动物死亡率为16.7%;Sham组和Edaravone组无动物死亡,死亡率为0。Sham组动物术后第1至第

2天精神状态较术前略差,可自主进食,术后第3至第7天逐渐恢复;Model组动物术后第1至第4天出现右侧上肢偏瘫无力、运动不协调、防御减退、轻微嗜睡,食欲下降、无法自主进食、嘴角微偏左侧歪斜等现象,术后第5至第7天动物可逐渐自主进食、坐立,且精神状态逐渐恢复;Edaravone组动物术后第1天至第3天出现右侧肢体偏瘫无力、运动不协调、嘴歪斜、嗜睡、精神状态差、防御减退、食欲下降、无法自主进食等情况,术后第4天至第7天逐渐可自主进食、坐立,精神状态较好。

神经功能缺损评分显示:Sham组术后分值最高峰出现在第1天,之后呈下降趋势,术后第7天时神经功能基本恢复;与Sham组比较,Model组术后第1、3、5、7天时评分差异显著($P < 0.01$),Edaravone组术后第1、3、5天时评分差异有统计学意义($P < 0.05$);与Model组比较,Edaravone组术后第3天时评分具有显著性差异($P < 0.01$),术后第5天和第7天时差异有统计学意义($P < 0.05$)(图2)。以上结果说明食蟹猴缺血再灌注后神经功能受到损伤,而依达拉奉可以缓解神经功能损伤。

2.2 各组动物的脑缺血及水肿体积变化

磁共振成像扫描时间约30 min,扫描结束后5~10 min动物苏醒(有知觉,可以动,但无意识),60~80 min动物可以自行坐立,运动不协调,有意识但情绪低落。磁共振成像的血管源性水肿体积(T2W FLAIR)数据分析显示,所有动物在手术前脑组织完好,无异常信号,无水肿;术后Sham组动物存在轻微水肿,Model组和Edaravone组动物水肿体积随时间推移呈下降趋势。T2W FLAIR序列分析(图3A和C)显示:与Sham组比较,Model组和Edaravone组在术后第3天和第7天时水肿体积明显增大(Model组 $P < 0.01$,Edaravone组 $P < 0.05$);与Model组比较,Edaravone组水肿体积明显减小(术后第3天时 $P < 0.05$,术后第7天时 $P < 0.01$)。DWI序列的分析结果与T2W FLAIR序列相似(图3B和D)。以上结果提示食蟹猴缺血再灌注后脑水肿体积显著增大,而依达拉奉可以缓解脑水肿。

2.3 各组动物的脑组织缺血梗死体积

脑组织发生缺血梗死后TTC染色可显示白色,而正常的脑组织则是红色。各组食蟹猴脑组织进行TTC染色的结果(图4)显示,与Sham组比较,Model组梗死体积显著增大($P < 0.01$),Edaravone组梗死体积增大($P < 0.05$);与Model组比较,Edaravone组梗死体积

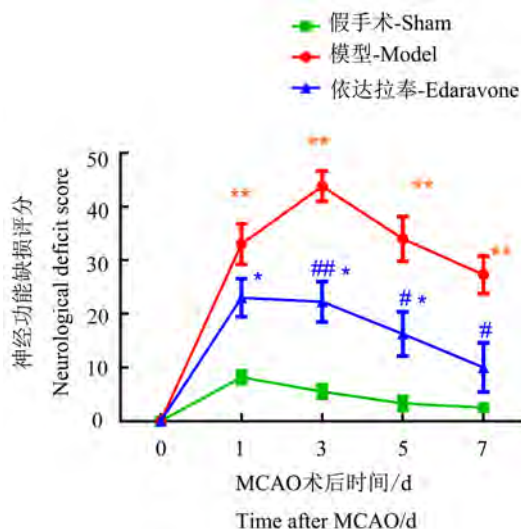
表1 食蟹猴卒中后神经功能缺损评分表

Table 1 Neurological deficit scoring for cynomolgus macaques after stroke

类别 Category	神经功能 Neurological function	分数 Score
意识 Consciousness	正常警觉性,有强的攻击性和逃离倾向	0
	有意识,但情绪稍低落,尚有较强的攻击性	2
	有意识,且有较弱的攻击性	4
	有意识,且有轻微反抗和明显逃离倾向	6
	有意识,但情绪低落,且不反抗	8
	昏昏欲睡,声音刺激能唤醒	10
	昏昏欲睡,声音刺激能睁眼	16
	昏迷,持续声音刺激能唤醒	20
	轻度昏迷,仅有反射运动	24
	深度昏迷,没有运动	28
骨骼肌肉协调 Skeletal muscle coordination	正常,行走正常	0
	总体运动协调性有轻微异常(共济失调发生为一过性间歇性)	2
	最小程度的共济失调,步态有轻微异常	4
	共济失调,但能攀登铁笼	6
	受到威逼刺激能够行走,攀爬困难	8
	本能的站立,行走几步就倒下	10
	坐着(不能站立),受到威逼刺激只能旋转身体	12
	坐着或趴着(不能站立或长时间保持坐姿),对威逼刺激有反应	14
	只能侧躺或仰面躺,对威逼刺激有反应	16
	没有活动,对威逼刺激几乎没有反应	18
感觉系统 Sensory system		L/R
面部反应 Facial sensation	面部对威逼刺激有明显的协调反应(攻击、威胁、躲避、示好等)	0/0
	面部对威逼刺激的协调反应性较降低(攻击、威胁表情明显减少)	1/1
	面部对威逼刺激的协调反应性明显降低(示好表情明显减少)	2/2
	感觉缺失,接触刺激面部时任何部位都没有反应	3/3
耳颤反射 Pinna reflex	耳朵颤动力正常	0/0
	动耳朵能力轻微降低,对声音刺激有动耳反应	1/1
	动耳朵能力明显降低,对声音刺激没有动耳反应	2/2
	感觉缺失,接触刺激时不表现出耳朵颤动	3/3
疼痛反射(下肢) Pain reflex (lower limb)	脚趾对接触刺激有完全、快速的收缩反应	0/0
	脚趾对接触刺激有较快速的收缩反应	1/1
	脚趾对接触刺激有较慢的收缩反应	2/2
	脚趾对接触刺激有弱的、慢的、不完全的、不协调的收缩反应	3/3
	脚趾对接触刺激有极弱的、慢的收缩反应	4/4
	感觉缺失,脚趾对接触刺激没有收缩反应	5/5
运动系统 Motor system		L/R
手 Hand	正常	0/0
	轻微运动障碍(速度稍慢、力量稍弱、准性稍差)	1/1
	力量/技巧减弱(运动障碍相对明显)	2/2
	较重度的运动障碍(速度很慢、力量很弱、准性很差)或不动	3/3
	麻痹/无运动能力	4/4
腿 Leg	正常	0/0
	轻微运动障碍(速度稍慢、力量稍弱、准性稍差)	1/1
	膝盖弯曲站立(运动障碍相对明显)	2/2
	较重度的运动障碍(速度很慢、力量很弱、准性很差)	3/3
	能动,但不能站立	4/4
	能动,不能站立,但几乎不动	5/5
	麻痹/无运动能力	6/6
手指 Finger	正常	0/0
	轻度痉挛和无力(表现为手指抓握时有翘指)	1/1
	中度痉挛和无力(表现为手指抓握时有持续翘指)	2/2
	明显痉挛和无力	3/3
脚趾 Toe	正常	0/0
	轻度痉挛和无力(表现为脚趾抓握时有翘趾)	1/1
	中度痉挛和无力(表现为脚趾抓握时有持续翘趾)	2/2
	明显痉挛和无力	3/3

注:L/R指该类别的评分以左侧与右侧分别评分,结果是左右侧评分的总和。

Note: L/R shows the scores on the left side and the right side respectively, and the results are the sum of the left and right side scores.



注: 15只食蟹猴随机分为假手术组 ($n=3$)、阻断大脑中动脉模型对照组 ($n=6$) 和依达拉奉治疗组 ($n=6$)。与假手术组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与模型组比较, $*P<0.05$, $##P<0.01$ 。

Note: 15 cynomolgus monkeys were randomly divided into Sham group ($n=3$), middle cerebral artery occlusion (MCAO) Model group ($n=6$) and Edaravone treatment group ($n=6$). $*P<0.05$, $**P<0.01$, compared with Sham group; $*P<0.05$, $##P<0.01$, compared with Model group.

图2 各组食蟹猴的神经功能缺损评分比较

Figure 2 Comparison of neurological deficits scores among the three groups of cynomolgus macaques

减少 ($P<0.05$)。以上结果说明食蟹猴缺血再灌注后脑组织梗死体积显著增大, 而依达拉奉可以缓解脑组织梗死。

3 讨论

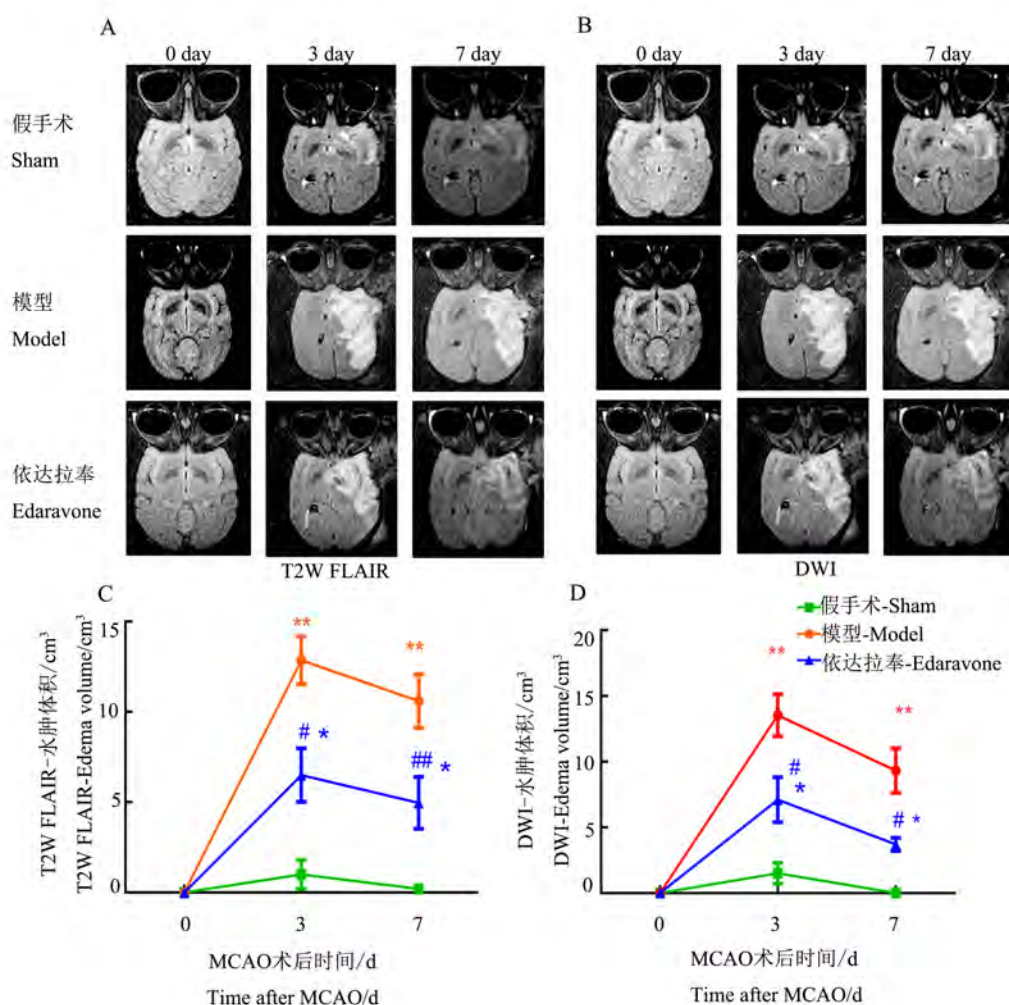
缺血性脑卒中引起人们死亡的主要原因之一, 也是成人残疾的主要原因。临床上大多数患者在发生脑卒中后 48 h 内会进行溶栓治疗, 存在一定程度的疏通后再灌注, 所以缺血再灌注模型可以更好地模拟临床病情发生。再灌注血运重建是目前针对缺血性脑卒中患者的一种标准临床治疗方法。尽管血流再灌注对缺血组织的挽救至关重要, 但再灌注也会加剧神经元损伤^[15]。啮齿类动物模型被广泛应用于脑缺血引起的运动功能影响及发病机制的研究, 然而由于该模型存在局限性, 不能较好地模拟人类脑卒中, 因此临床转化意义不大。例如研究表明, 啮齿类动物脑卒中模型与人类脑卒中存在大脑复杂程度及缺血性病理的差异, 导致啮齿类动物脑卒中中神经保护剂对人类治疗效果不

显著^[16]。非人灵长类动物在遗传学、神经解剖学、生理学和免疫学方面都比啮齿类动物更接近人类, 其缺血性脑卒中模型更符合人脑缺血后的生理症状和变化^[17]。因此, 非人灵长类动物被认为是复制人类缺血性脑卒中各个方面的理想临床前模型。

大脑中动脉的解剖结构从前到后分为水平段 (M1)、脑岛段 (M2)、岛盖段 (M3)、终末段 (M4), 同时供血范围逐渐缩小, 因此夹闭部位越靠近大脑前动脉, 缺血体积就越大^[18]。有研究者认为, MCAO 模型夹闭 M1 段比夹闭 M2 段得到的脑卒中症状更重, 病灶区体积更大^[10]。灵长类动物 MCAO 模型 M1 段夹闭缺血 90~120 min 可以出现明显的脑卒中症状^[10, 19-20]。本研究前期发现, 采用 M1 段夹闭 90 min 后动物死亡率高, 而 M1 段夹闭缺血 60 min 后食蟹猴模型的死亡率低, 术后出现运动不协调、上下肢偏瘫、面瘫等 MCAO 模型的典型症状, 且神经功能缺损评分显著升高。本研究共有 15 只食蟹猴参与实验, Sham 组 3 只, Model 组和 Edaravone 组各 6 只, 既减少动物的数量, 又满足比较药效的统计学要求。整个实验过程中仅 Model 组死亡 1 只动物, 死亡率仅 6.7%, 得益于本研究细致的术后护理, 体现了动物伦理和福利。例如: 术后 3 d 内肌肉注射止痛药 2 次/d, 减少动物术后疼痛; 术后 5 d 内肌肉注射消炎药 2 次/d, 每天给动物进行清创处理 2 次, 减少动物术后感染; 不能自主进食的动物每天灌胃流食 2 次, 同时静脉输入营养液 1 次, 满足动物对能量的需求。

在小鼠 MCAO 模型中, 缺血再灌注 1 d 时缺血体积最大, 在灌注第 3 天、第 7 天时缺血体积略减少, 但无显著差异^[21]。猕猴 MCAO 模型缺血再灌注第 30 天时, 较第 3 天的脑梗死体积减少^[22]。使用右翼开颅术对猕猴进行 MCAO, 与 MCAO 术后 24 h 相比, MCAO 术后 28 d 的脑梗死病灶体积明显减小^[23]。本研究中磁共振成像数据分析显示, 食蟹猴在缺血再灌注第 3 天时的病灶区水肿体积较第 7 天时大。以上文献及本研究结果显示, 在不同的动物模型中, 随着缺血再灌注时间的推移, 脑梗死体积会逐渐减小。本研究中 TTC 染色测量的脑梗死体积与磁共振成像的脑水肿体积具有一致性, 这一结果与之前研究报告相似^[24], 说明本研究成功构建了脑缺血再灌注食蟹猴模型。

依达拉奉注射液是当今治疗脑卒中患者的有效药物之一。目前对于依达拉奉注射液治疗脑卒中的作用



注: A和B为阻断大脑中动脉术前(0天)以及术后第3天、第7天的大脑磁共振成像扫描图(A为T2W FLAIR序列分析, B为DWI序列分析); C和D分别为T2W FLAIR、DWI序列分析获得的脑水肿体积统计分析结果。15只食蟹猴随机分为假手术组($n=3$)、阻断大脑中动脉模型对照组($n=6$)和依达拉奉治疗组($n=6$)。与假手术组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与模型对照组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

Note: A and B show MRI scans of brain before middle cerebral artery occlusion (MCAO) (day 0), after MCAO day 3 and day 7 (A was T2W FLAIR sequence, B was DWI sequence); C and D were statistical analysis of brain edema volume by T2W FLAIR and DWI sequence. 15 cynomolgus monkeys were randomly divided into Sham group ($n=3$), MCAO Model group ($n=6$) and Edaravone treatment group ($n=6$). $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, compared with sham group; $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, compared with model group.

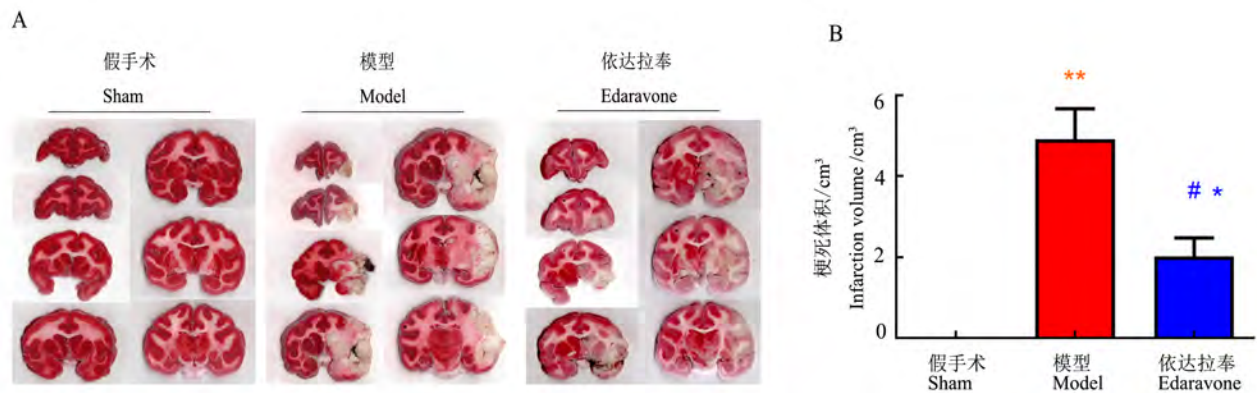
图3 各组食蟹猴的磁共振成像T2W FLAIR序列和DWI序列结果

Figure 3 Analysis of T2W FLAIR and DWI in each group of cynomolgus macaques

机制研究主要集中在啮齿类动物上^[25-28], 而非人灵长类的机制研究尚未有报告。本研究结果显示, 在神经功能缺损评估中, 与Model组动物比较, Edaravone组动物的神经功能得到了很好的恢复; 在磁共振成像评估中, Edaravone组动物的脑水肿体积减少, 在缺血再灌注后第3天和第7天时差异明显; 在TTC染色评估中, Edaravone组动物的脑梗死体积较Model组明显减少。以上结果显示依达拉奉注射液在食蟹猴MCAO模

型中具有神经保护作用, 同时提示食蟹猴MCAO模型可以作为依达拉奉药物作用机制研究的理想模型, 而且依达拉奉注射液可作为食蟹猴缺血再灌注模型新药研究的阳性对照药。

综上所述, 本研究成功构建了食蟹猴脑缺血再灌注模型, 证实了依达拉奉注射液在食蟹猴MCAO模型中具有神经保护作用, 可作为作用机制相似的新药用非人灵长类实验动物进行药效研究的阳性对



注: A为2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 染色 (每组一只动物的7张脑组织切片); B为各组脑组织梗死体积的统计结果。15只食蟹猴随机分为假手术组 ($n=3$)、阻断大脑中动脉模型对照组 ($n=6$) 和依达拉奉治疗组 ($n=6$)。与假手术组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与模型对照组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

Note: A shows 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining (seven pictures of brain tissue from one animal in each group); B shows statistical analysis of infarct volume in brain tissue. 15 cynomolgus monkeys were randomly divided into Sham group ($n=3$), middle cerebral artery occlusion (MCAO) Model group ($n=6$) and Edaravone treatment group ($n=6$). $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, compared with sham group, $^{\#}P<0.05$, compared with Model group.

图4 各组食蟹猴脑组织缺血梗死体积比较

Figure 4 Comparison of brain ischemic infarcts volume tissue of cynomolgus macaques among the three groups

照药物。本研究为脑缺血再灌注的机制研究提供了新的动物模型, 也为依达拉奉作用机制的深入研究提供了基础数据。

[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广西盛思蓝生物医药技术有限公司实验动物福利与伦理委员会批准 (IACUC 编号: 006-SSLI2020)。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 Guangxi Thinxon Biomedical Co., Ltd. (Approval Letter No. 006-SSLI2020), 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).

[作者贡献 Author Contribution]

潘梦鲜负责文章的材料收集和整理, 并结合实践进行文章撰写及后期修改;

黄晓姣和黄中理负责实验动物的造模、护理及检测;

申果负责文章摘要的翻译;

张鹏飞、曾勇负责全文的数据准确性确认, 并提出修改建议;

李文峰提供实验设施, 并给予经费支持;

周华波提供手术技术支持;

韦祝梅对全文内容提供指导。

[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] ROGER V L, GO A S, LLOYD-JONES D M, et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2011, 123(4): e18-e209. DOI: 10.1161/CIR.0b013e3182009701.
- [2] BENJAMIN E J, VIRANI S S, CALLAWAY C W, et al. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2018, 137(12): e67-e492. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558.
- [3] VONGSFAK J, PRATCHAYASAKUL W, APAIJAI N, et al. The alterations in mitochondrial dynamics following cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(9):1384. DOI: 10.3390/antiox10091384.
- [4] HOPE T M H, SEGHER M L, LEFF A P, et al. Predicting outcome and recovery after stroke with lesions extracted from MRI images[J]. *Neuroimage Clin*, 2013, 2: 424-433. DOI: 10.1016/j.nicl.2013.03.005.
- [5] WEN Z, XU X, XU L, et al. Optimization of behavioural tests for the prediction of outcomes in mouse models of focal middle cerebral artery occlusion[J]. *Brain Res*, 2017, 1665:88-94. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.04.001.
- [6] BROWN A, WOODS S, SKINNER R, et al. Neurological assessment scores in rabbit embolic stroke models[J]. *Open Neurol J*, 2013, 7:38-43. DOI: 10.2174/1874205X01307010038.
- [7] COOK D J, TYMIANSKI M. Nonhuman primate models of stroke for translational neuroprotection research[J]. *Neurotherapeutics*, 2012, 9(2): 371-379. DOI: 10.1007/s13311-

- 012-0115-z.
- [8] HUTCHISON RM, EVERLING S. Monkey in the middle: why non-human primates are needed to bridge the gap in resting-state investigations[J]. *Front Neuroanat*, 2012, 6: 29. DOI: 10.3389/fnana.2012.00029.
- [9] KWIECIEŃ T D, SY C, DING Y C. Rodent models of ischemic stroke lack translational relevance... are baboon models the answer? [J]. *Neurol Res*, 2014, 36(5): 417-422. DOI: 10.1179/1743132814Y.0000000358.
- [10] ZHAO B, SHANG G W, CHEN J, et al. A more consistent intraluminal rhesus monkey model of ischemic stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(23): 2087-2094. DOI: 10.4103/1673-5374.147936.
- [11] ROITBERG B, KHAN N, TUCCAR E, et al. Chronic ischemic stroke model in cynomolgus monkeys: behavioral, neuroimaging and anatomical study[J]. *Neurol Res*, 2003, 25(1): 68-78. DOI: 10.1179/016164103101200950.
- [12] LIU W P, WANG L L, LIU C W, et al. Edaravone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by downregulating ferroptosis via the Nrf2/FPN pathway in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45(9): 1269-1275. DOI: 10.1248/bpb.b22-00186.
- [13] XU J, WANG A X, MENG X, et al. Edaravone dextran versus edaravone alone for the treatment of acute ischemic stroke: a phase III, randomized, double-blind, comparative trial[J]. *Stroke*, 2021, 52(3): 772-780. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.031197.
- [14] ZHU H, LI Q, FENG M, et al. A new cerebral hemorrhage model in cynomolgus macaques created by injection of autologous anticoagulated blood into the brain[J]. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(7): 955-960. DOI: 10.1016/j.jocn.2010.11.038.
- [15] WU M M, GU X P, MA Z L. Mitochondrial quality control in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(10): 5253-5271. DOI: 10.1007/s12035-021-02494-8.
- [16] O'COLLINS V E, MACLEOD M R, DONNAN G A, et al. 1, 026 experimental treatments in acute stroke[J]. *Ann Neurol*, 2006, 59(3): 467-477. DOI: 10.1002/ana.20741.
- [17] LIN X, WANG H, CHEN J Y, et al. Nonhuman primate models of ischemic stroke and neurological evaluation after stroke [J]. *J Neurosci Methods*, 2022, 376: 109611. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2022.109611.
- [18] CIMFLOVA P, ÖZLÜK E, KORKMAZER B, et al. Long-term safety and efficacy of distal aneurysm treatment with flow diversion in the M2 segment of the middle cerebral artery and beyond[J]. *J Neurointerv Surg*, 2021, 13(7): 631-636. DOI: 10.1136/neurintsurg-2020-016790.
- [19] SASAKI M, HONMOU O, RADTKE C, et al. Development of a middle cerebral artery occlusion model in the nonhuman primate and a safety study of i. v. infusion of human mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26577. DOI: 10.1371/journal.pone.0026577.
- [20] RAMIREZ-GARCIA G, HARRISON K A, FERNANDEZ-RUIZ J, et al. Stroke longitudinal volumetric measures correlate with the behavioral score in non-human primates[J]. *Neuroscience*, 2019, 397: 41-55. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.026.
- [21] LIU F D, SCHAFER D P, MCCULLOUGH L D. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion[J]. *J Neurosci Methods*, 2009, 179(1): 1-8. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.12.028.
- [22] MATSUURA S, EGI Y, YUKI S, et al. MP-124, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor, ameliorates ischemic brain damage in a non-human primate model[J]. *Brain Res*, 2011, 1410: 122-131. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.05.069.
- [23] MELONI B P, CHEN Y N, HARRISON K A, et al. Poly-arginine peptide-18 (R18) reduces brain injury and improves functional outcomes in a nonhuman primate stroke model[J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(2): 627-634. DOI: 10.1007/s13311-019-00809-1.
- [24] LIU Y T, D'ARCEUIL H E, WESTMORELAND S, et al. Serial diffusion tensor MRI after transient and permanent cerebral ischemia in nonhuman Primates[J]. *Stroke*, 2007, 38(1): 138-145. DOI: 10.1161/01.STR.0000252127.07428.9c.
- [25] MA H F, ZHENG F, SU L J, et al. Metabolomic profiling of brain protective effect of edaravone on cerebral ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 814942. DOI: 10.3389/fphar.2022.814942.
- [26] WANG X X, WANG F, MAO G H, et al. NADPH is superior to NADH or edaravone in ameliorating metabolic disturbance and brain injury in ischemic stroke[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(3): 529-540. DOI: 10.1038/s41401-021-00705-5.
- [27] YU H, WU Z D, WANG X Z, et al. Protective effects of combined treatment with mild hypothermia and edaravone against cerebral ischemia/reperfusion injury via oxidative stress and Nrf2 pathway regulation[J]. *Int J Oncol*, 2020, 57(2): 500-508. DOI: 10.3892/ijo.2020.5077.
- [28] ZHAO L Q, PARIKH A, XIONG Y X, et al. Neuroprotection of oral edaravone on middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(4): 995-1006. DOI: 10.1007/s12640-022-00520-8.
- (收稿日期: 2022-10-28 修回日期: 2023-02-10)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 任益凡)

[引用本文]

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

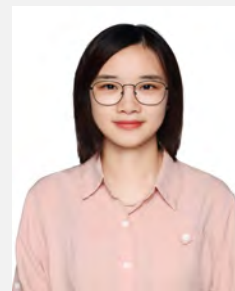
PAN M X, HUANG X J, HUANG Z L, et al. Establishment of ischemia-reperfusion model in cynomolgus macaques and effects of edaravone intervention[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2): 136-144. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.165.



丁玉强, 教授, 博士生导师, 复旦大学实验动物科学部主任, 复旦大学脑科学研究院PI。上海实验动物学会副理事长, 中国神经科学学会神经毒素分会主任委员, 《实验动物与比较医学》副主编, 《解剖学报》、《中国细胞化学与组织化学杂志》、*Scientific Report*、*Frontiers in Neuroanatomy*、*Journal of Chemical Neuroanatomy* 及 *Development Growth & Differentiation* 等多种学术期刊的编委或编辑。主要从事神经系统发育的细胞分子机制和神经精神疾病的致病机制研究。主持和参加国家自然科学基金重点项目、重大专项, 科技部新药创制重大科技专项、干细胞专项, 国家重点基础研究发展计划(973)等课题。入选中科院“百人计划”、上海市浦江人才计划、上海市优秀学科带头人计划和国家新世纪“百千万人才工程”, 系国家杰出青年科学基金获得者、上海市科技“领军

人物”。曾获教育部全国百篇优秀博士论文, 军队科技进步二等奖2项, 国家科技进步一等奖1项, 并入选爱思维尔出版集团发布的2014—2020年中国神经科学领域高引用学者榜。

胡玲, 博士, 复旦大学实验动物科学部青年副研究员。主要从事以小鼠疾病模型为工具的神经系统疾病发生机制方面的研究。担任 *Frontiers in Molecular Neuroscience* 期刊的客座主编。参与国家自然科学基金委员会、科技部、上海市科委的多个科研项目, 以(并列)第一作者在 *Cell Reports*、*Schizophrenia Bulletin*、*Molecular Brain* 等学术期刊上发表科研论文6篇。2023年获得上海市科委启明星计划扬帆专项资助。



精神分裂症动物模型的研究概述

胡玲¹, 胡志斌^{1,2}, 胡筠卿^{1,2}, 丁玉强^{1,2}

(1. 复旦大学实验动物科学部, 上海 200032; 2. 复旦大学脑科学研究院, 上海 200032)

[摘要] 精神分裂症(schizophrenia)是一类极具破坏性的复杂精神疾病, 伴有各种阳性和阴性症状以及认知障碍, 给社会带来沉重负担。在神经发育过程中遗传因素和环境因素之间具有复杂的相互作用, 使得精神分裂症病因的阐明和治疗的发展面临很大挑战。因此, 制备合适的动物模型可帮助人们理解各种致病因素引起精神分裂症的神经生物学基础, 为寻找新的治疗方法提供线索和理论依据。本文介绍了几种主要的精神分裂症动物模型的造模方式, 包括神经发育模型、药物诱导模型和遗传模型; 同时对精神分裂症动物的行为学评估、组织学分析以及可能的分子机制进行了概括, 以期精神分裂症动物模型的应用和改进提供参考。

[关键词] 精神分裂症; 动物模型; 行为学分析; 多巴胺; γ -氨基丁酸

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0145-11



Overview of Studies in Animal Models of Schizophrenia

HU Ling¹, HU Zhibin^{1,2}, HU Yunqing^{1,2}, DING Yuqiang^{1,2}

(1. Department of Laboratory Animal Science, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Institutes of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: DING Yuqiang (ORCID: 0000-0003-1202-4635), E-mail: dingyuqiang@vip.163.com

[ABSTRACT] Schizophrenia (SCZ) is a highly destructive and complex psychiatric disorder illness, accompanied by a variety of positive and negative symptoms along with cognitive impairment, which brings a heavy social burden. Elucidation of the pathogenesis and therapeutic development is challenging

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目“Ulk4基因在精神分裂症发病作用和机制-小鼠模型研究”(32271072)

[第一作者] 胡玲(1989—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 疾病动物模型与神经系统疾病发生机制。E-mail: 06huling@163.com;

胡志斌(1997—), 男, 博士研究生, 研究方向: 疾病动物模型与神经系统疾病发生机制。E-mail: zbhu20@fudan.edu.cn

[通信作者] 丁玉强(1966—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 疾病动物模型与神经系统疾病发生机制。E-mail: dingyuqiang@vip.163.com。

ORCID: 0000-0003-1202-4635

because the complex interplay between genetic risk factors and environmental factors in essential neurodevelopmental processes. Therefore, preparing appropriate animal models can help people better understanding the neurobiological basis of SCZ and provide theoretical basis for finding new treatments. In order to provide reference for the application and improvement of SCZ animal models, this commentary reviewed several main modeling methods for animal models of SCZ, including neurodevelopmental models, drug-induced animal models, and genetic models, and the behavioral evaluation, histological analysis and possible molecular mechanisms of SCZ animal models were also outlined.

[Key words] Schizophrenia; Animal models; Behavior analysis; Dopamine; γ -aminobutyric acid

随着社会和经济发展水平的提高, 精神疾病受到越来越多的关注和重视。其中精神分裂症作为一种常见的精神类疾病, 严重损害患者的精神活动和社会功能, 其终身患病率约为1%, 带来沉重的社会负担。精神分裂症是一种涉及多种症状的疾病, 包括认知、行为和情感等, 其症状在不同患者身上差异很大, 甚至在同一患者的不同病程阶段也存在显著差异^[1]。总体而言, 精神分裂症可以分为三大症状群, 即阳性症状、阴性症状和认知症状。阳性症状反映正常功能的过度或者扭曲(如幻听、幻视、妄想等), 阴性症状描述的是与动机、兴趣、言语或情感表达有关的正常行为的减少或丧失(如快感缺失、社交减少等), 认知症状可表现为学习记忆能力的异常^[2]。临床上, 精神分裂症患者的症状异质性很大, 常缓慢起病, 病程迁延, 容易复发, 呈现精神残疾和脑功能衰退的趋势。

目前, 精神分裂症的具体发病机制仍不明确, 一般认为它是由中枢神经系统结构和功能异常导致, 是遗传和环境因素交互作用的结果。通过对精神分裂症进行家系研究和同卵双生子研究发现, 遗传因素在精神分裂症中占据了重要地位。近年来随着基因测序成本的下降和分子遗传学的快速进步, 全基因组关联研究(genome wide association study)和罕见基因变异分析发现了上百个能增加精神分裂症患病风险的基因, 但很多风险基因的功能是未知的^[3]。合适的动物模型可帮助人们研究这些致病因素如何影响大脑的结构和功能, 理解精神分裂症的病因和神经生物学基础, 为未来开发新的治疗方法提供思路。

一般而言, 合适的动物模型需要满足表面效度(face validity)、结构效度(construct validity)和预测效度(predictive validity)三个方面^[4]。其中, 表面效度主要指与疾病的症状有同源性, 可模拟出疾病的一些典型症状, 包括精神分裂症中的阳性、阴性症状及认知异常。结构效度指可重复疾病的神经生物学基础和

病因, 如多巴胺功能的亢进和减退、谷氨酸递质的异常、基因改变导致的神经化学及结构的异常。预测效度指表现或缺失相应的药物反应, 或能够被已知的抗精神病药物如氟哌啶醇、氯氮平或奥氮平所治疗, 以及可用来评估治疗精神分裂症的新型化合物的效能。本文重点介绍了精神分裂症的动物模型, 包括神经发育模型、药物诱导模型以及遗传模型; 另外, 本文概述了评估精神分裂症动物模型的行为学范式、组织学检测以及可能的分子机制, 并对现有模型的不足进行了总结, 以期精神分裂症动物模型的选择和改进提供参考。

1 精神分裂症动物模型

1.1 神经发育模型

尽管精神分裂症的典型症状出现在青春期或成年早期, 但大量的研究表明其与出生前的事件如产妇的应激、营养不良、感染、免疫激活, 或分娩时的产科并发症(如缺氧)等密切相关, 这与精神分裂症的神经发育假说是一致的^[5]。因此, 构建神经发育动物模型主要是在敏感的围产期给药或产后早期进行环境操纵, 使中枢神经系统的发育产生不可逆的变化。第一个用于研究精神分裂症的神经发育模型是通过在大鼠出生后第7天局部注射兴奋性毒素鹅膏蕈氨酸引起腹侧海马损伤, 或利用河豚毒素暂时失活神经元的活性来构建^[6]。除此以外, 不同时期神经发生的异常^[7]、离乳后啮齿类动物的社会孤立^[8]和围产期或产妇的免疫激活^[9]等, 都被认为是复刻精神分裂症核心症状的神经发育模型的造模方式, 其行为学改变通常出现在青春期之后。

在构建神经发育模型时, 使用较广泛的方式有: 出生前注射甲基氧化偶氮甲醇(methylazoxymethanol, MAM)、离乳后社会隔离、“孕期感染模型”及二次打击假说。MAM是一种可使DNA甲基化的抗有丝分裂的

试剂, 特异性地作用于成神经细胞的增殖, 而不影响胶质细胞^[10]。在妊娠期不同阶段注射 MAM 会引起不同的神经发育异常, 其中在大鼠妊娠第 17 天给药是常见的构建精神分裂症动物模型的方法。其后代的脑部结构变化包括内侧前额叶体积减少、侧脑室和第三脑室体积增加、边缘和皮层区域的中间神经元标志物减少、腹侧被盖区多巴胺神经元活性增加等。行为学表型包括对多巴胺通路激动剂安非他明的运动反应增加、社交活动减少、感觉运动门控缺陷、记忆障碍和焦虑增加等^[10]。

离乳后社会隔离是基于啮齿类动物在群体中会显示出明确的社会结构和等级制度, 剥夺这一特征会对它们的神经发育产生重要的影响。因此, 从离乳开始对幼鼠进行社会隔离可导致一系列成年后的行为缺陷^[11-12], 包括自发运动水平增加、对新奇事物的反应增强、感觉运动门控障碍、认知障碍以及焦虑和攻击性增加等, 而这些症状与精神分裂症的核心症状是十分相似的。已知的抗精神病药物如氟哌啶醇、奥氮平、利培酮等均可逆转社会隔离导致的自发运动增加^[13]。鉴于此, 离乳后社会隔离诱导的精神分裂症模型具有较高的预测有效性, 可以测试药物逆转精神分裂症阳性症状的效能。同时该模型也有较好的结构效度, 模型动物出现前额叶体积减少、树突棘密度降低、海马中小清蛋白 (parvalbumin, PV) 阳性的中间神经元降低等情况, 这些都是在精神分裂症患者中也能观察到的组织学异常^[14]。

另一种模型构建策略是在妊娠的啮齿类动物中使用聚肌苷聚胞苷酸 [Poly (I : C)] 诱导母体免疫激活 (maternal immune activation)。越来越多的证据表明, 母体免疫激活会在啮齿类动物和灵长类动物后代的大脑中诱导长时间的免疫改变, 这可能是表观遗传改变的基础, 而表观遗传改变反过来介导动物行为和大脑结构变化, 这些改变与精神分裂症的病理改变是类似的^[15]。行为学改变包括感觉运动门控异常、社交行为异常、焦虑样和抑郁样行为增加等阴性症状, 同时出现对多巴胺通路激动剂安非他明的运动反应增加等阳性症状^[16]。大脑结构变化包括树突棘的密度下降, 树突的复杂性下降, 以及抑制性神经元的数量减少等^[17]。磁共振成像研究发现, 母体免疫激活的子代脑室扩大, 脑区体积减少^[18]。

二次打击假说是指在大脑发育早期和青春期均给予动物一定程度的刺激, 从而使动物出现精神分裂症

样表型的一种思路。胚胎的神经发育是由母体的生理变化所决定, 若母体经历免疫激活等过程, 则会引起子代一系列的行为和大脑结构的变化。青春期时, 心理压力和社会孤立的经历则会引起各种精神疾病的病理生理学改变, 包括抑郁、焦虑以及精神分裂症等^[15,19]。二次打击即是结合这两个时期的刺激来构建精神分裂症动物模型。

总之, 神经发育模型可在疾病前驱期研究疾病发展的过程, 并有利于开发阻止疾病进展的治疗方法。这些经过充分验证的神经发育模型不仅复制了精神分裂症的许多行为和神经解剖学表型, 而且显示在青春前期前后进行干预可以缓解模型动物的行为变化, 这些干预措施包括认知训练、抗精神病药物、抗氧化药物和苯二氮卓类药物等, 符合动物模型中的预测效度^[20]。

1.2 药物诱导模型

药物诱导的精神分裂症动物模型应用非常广泛, 模型构建的原理是基于病因学中投射到边缘区域的多巴胺能通路的过度活跃^[21-22], 以及谷氨酸受体中 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体的功能减退^[23]。因此, 在动物模型中常使用的药物是多巴胺通路激动剂 (如安非他明、阿普吗啡) 和非竞争性 NMDA 受体拮抗剂 [如苯环己哌啶 (phencyclidine, PCP)、氯胺酮、地佐环平 (dizocilpine, MK-801)]。其中, 安非他明诱发的精神疾病症状包括运动过度、空间工作记忆障碍、感觉运动门控缺陷和潜在抑制缺陷^[24-25]。然而, 反复服用安非他明并不会引起社会交往缺陷 (相当于精神分裂症的阴性症状)^[26], 但可诱导大脑形态和生理发生改变, 如 NMDA 受体表达异常、树突形态改变、伏隔核和纹状体中多巴胺的释放增加等^[27]。

近年来, NMDA 受体的功能减退在精神分裂症中的研究引起了广泛关注。因此, 非竞争性 NMDA 受体拮抗剂 (氯胺酮、PCP、MK-801) 被广泛用于建立有效的精神分裂症动物模型^[28-29]。不同剂量的 PCP 注射会导致动物产生与人类精神分裂症相似的各种行为缺陷, 如记忆和学习障碍、社交能力受损、自发运动水平和感觉运动门控异常等^[30-31]。值得注意的是, PCP 在行为改变中的作用可能还取决于使用的剂量和给药途径等。PCP 在分子水平上的影响包括前额叶皮层多巴胺、谷氨酸、5-羟色胺以及去甲肾上腺素释放增加, γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 的释放降

低,影响了额叶皮层兴奋/抑制回路的平衡^[32-33],下调脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及其受体TrkB的水平^[34]。电生理学研究显示,在注射PCP的动物中,内侧前额叶皮层和海马的长时程增强(long-term potentiation, LTP)作用受损,而LTP是突触可塑性、学习和记忆的基础^[34-35]。

氯胺酮是另一种NMDA受体拮抗剂。这种化合物是PCP的衍生物,被广泛用作麻醉剂^[36]。当健康的志愿者注射氯胺酮后,可产生精神分裂症的阴性和阳性症状^[37]。在动物模型上的研究也表明,氯胺酮会损害空间工作记忆,可引起焦虑样行为、社会行为改变、自发运动水平升高和感觉运动门控障碍等^[38]。氯胺酮引起的分子水平改变包括多个脑区BDNF蛋白的表达水平降低^[39]、炎性细胞因子的失衡^[40],以及海马区域PV阳性神经元的数量下降^[41]等。

MK-801也是一种NMDA受体拮抗剂,其对NMDA受体的抑制效力高于氯胺酮和PCP^[28]。在啮齿类动物中,MK-801引起的行为效应包括自发运动水平升高、感觉运动门控缺陷、社交能力下降以及条件性恐惧记忆的异常等^[42]。在注射MK-801的动物中,纹状体、前额叶及伏隔核的多巴胺释放增加,抑制性GABA系统功能障碍^[43],海马和前额叶皮层长期兴奋/抑制失衡^[44],从而产生精神分裂症样的行为学改变。同时,MK-801给药还会降低神经营养因子BDNF水平,影响学习记忆过程^[45]。

总之,药物诱导的精神分裂症模型具有很好的表面效度和结构效度,有助于精神分裂症的病因学分析,也有利于发现潜在的药物治疗靶点。

1.3 遗传小鼠模型

遗传因素在精神分裂症病因学中一直是研究的焦点和热点,也是很多精神分裂症小鼠模型的基础。许多候选基因与增加精神分裂症发病风险有关,其中大多数与神经元可塑性、谷氨酸能或多巴胺能神经递质以及突触发生相关^[46]。发表于2014年的全基因组关联研究包括37 000名患者和113 000名对照者,确定了108个与精神分裂症相关的基因位点^[47]。2022年,另一篇报告涵盖了76 755名患者和243 649名对照者,进一步明确了287个基因位点可能和精神分裂症有关联^[48]。而确定候选基因是构建复杂精神分裂症动物模型的第一步,精神分裂症的病因病理学很可能涉及不止一个基因,包含了复杂的基因-环境相互作用和基因-基因相互作用。下面将讨论几种基于基因突变的比

较成熟的精神分裂症模型。

精神分裂症缺损1基因(disrupted-in-schizophrenia 1, DISC1)主要编码突触蛋白DISC1,其在发育早期表达。通过遗传分析发现,DISC1基因在人类中被认为是与精神分裂症高度相关的遗传因素^[49]。DISC1蛋白被证明可以调节神经元细胞的形态发生、成熟、迁移和突触整合等^[50]。DISC1功能诱导和(或)部分功能丧失的小鼠表现出识别记忆、社交和焦虑行为的缺陷以及感觉运动门控异常等^[51],而这些是精神分裂症的典型行为症状。这些小鼠模型的脑形态和分子水平的改变也与精神分裂症患者的研究结果一致,包括脑室增大、皮质厚度降低和脑容量减少^[52]、皮层中 γ -氨基丁酸能神经元密度降低^[53]、NMDA受体亚基和突触后致密蛋白95的表达减少等^[54]。

22q11.2缺失综合征是由22q11.2染色体缺失引起的一种遗传综合征。大量遗传证据表明,22q11.2缺失与人类的精神分裂症有关^[55],且已构建相关的精神分裂症动物模型。据估计,22q11.2缺失约占精神分裂症病例的1%。小鼠模型重现了22q11.2缺失携带者中观察到的主要神经解剖学改变,包括皮层和皮层下灰质体积的改变、脑室增大、树突棘密度和树突复杂性减少,以及多巴胺和 γ -氨基丁酸系统的紊乱等精神分裂症特征^[56]。22q11.2缺失小鼠表现出感觉运动门控异常、恐惧条件反射异常、空间记忆受损等行为学异常^[57]。该模型最大的优势在于22q11.2区域的缺失是精神分裂症发展的最强遗传预测因子^[58],利于开发和评估新的治疗方法的效能。

细胞黏附分子神经调节蛋白1(neuregulin-1, NRG1)及其受体ErbB4的基因突变也会增加患精神分裂症的风险^[59]。尸检研究显示,精神分裂症患者大脑中NRG1-ErbB4信号的mRNA和蛋白表达水平均发生改变^[60]。同时,NRG1和ErbB4遗传变异与侧脑室白质完整性以及侧脑室体积增加有关。NRG1基因敲除纯合子小鼠胚胎致死,但存活的杂合子可以部分补偿NRG1-ErbB4信号,但仍表现出活动和探索行为的增加、自发交替测试中工作记忆的异常、感觉运动门控异常等^[61]。而NRG1功能不足的小鼠表现出脑内NMDA受体蛋白水平降低、海马锥体神经元上的树突棘密度减少等病理改变^[62]。

Dysbindin是一种参与调节胞吐、囊泡生成和兴奋性突触传递中受体转运过程的突触蛋白^[63]。研究表明,人类中的Dysbindin基因异常损害人类的认知能

力,增加了患精神分裂症的风险^[64]。有研究表明,精神分裂症患者的海马和前额叶中Dysbindin蛋白水平显著降低^[65]。Dysbindin突变小鼠表现出精神分裂症样的行为异常,包括多动、学习和记忆缺陷,以及冲动和强迫行为增加^[66]。此外,突变小鼠破坏了多巴胺受体D2信号通路,导致多巴胺释放增加和细胞表面D2受体过表达,与精神分裂症的阳性症状密切相关^[67]。

本实验室也一直关注精神分裂症的发病机制,并构建了小鼠模型来研究精神分裂症易感基因锌指蛋白804A基因(zinc finger protein 804A, *ZNF804A*)及丝氨酸/色氨酸激酶家族unc-51样激酶4基因(*unc-51-like kinase 4*, *Ulk4*)的功能。全基因组相关分析发现,*ZNF804A*单核苷酸多态性与精神分裂症高度相关^[68]。而*ZNF804A*(也称*ZFP804A*)敲除小鼠表现出条件性恐惧记忆、空间学习记忆以及工作记忆受损等行为学改变,并在一定年龄的雌性敲除小鼠中引发精神分裂症样行为表现,且这种受损可被抗精神分裂症药物氯氮平纠正^[69]。而另一个易感基因*Ulk4*的敲除小鼠表现出药物诱导的过度活跃、感觉运动门控缺陷以及认知功能障碍等精神分裂症样的行为学表现^[70]。进一步研究发现,*Ulk4*可能通过与蛋白磷酸酶(protein phosphatase, PP)2A及PP1 α 相互作用,影响Akt/糖原合酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK3)信号通路,并引起相应的行为学表现^[71]。

在研究精神分裂症时,确定这些风险基因和位点的具体生物学功能是其中一个挑战,而遗传鼠模型的建立为理解精神分裂症的病理改变和发病机制提供了很好的实验对象。

2 精神分裂症模型小鼠的行为学分析

大部分精神分裂症相关的动物模型主要以小鼠为主。因此,笔者着重介绍小鼠模型中的行为学异常表现。精神分裂症小鼠模型主要表现出阳性症状,如自主运动增加、感觉运动门控受损等。而在有些小鼠模型中,也伴随着焦虑和抑郁水平上升的阴性症状,或学习记忆下降等认知障碍。值得注意的是,目前使用的抗精神病药物主要对阳性和阴性症状有效,而对认知症状缺乏显著疗效。因此,在小鼠模型上模拟出这些行为学异常有利于评价新的治疗方法的效能。下文对精神分裂症小鼠模型中常用的行为范式进行简要介绍。

2.1 旷场实验

旷场实验的具体操作是将小鼠放入封闭的旷场中,然后记录实验期间的运动距离和速度^[72]。旷场实验是检测精神分裂症小鼠模型阳性症状的常用方式,具体表现为在旷场中本底水平自发运动增加或对拟精神病药物(psychotomimetic drugs)的敏感性增加。这些药物包括MK-801、氯胺酮、PCP、苯丙胺等,其可诱导出模型小鼠产生过度活跃的表现。因此,旷场实验可以检测这些拟精神病药物的敏感性与精神分裂症的阳性症状之间的直接相关性。

2.2 前脉冲抑制实验

前脉冲抑制实验是检测感觉运动门控功能的经典方法,原理是在突然而强烈的外界刺激下,生物体会自发产生惊跳反射,但在给予强刺激之前,先给予一个弱刺激,会降低生物体出现惊跳反射的频率。精神分裂症被认为是感觉运动门控受损,从而出现意识混乱的表现^[73]。因此,前脉冲的下降通常被解释为精神分裂症样的阳性症状。前脉冲抑制实验的主要优势在于物种之间具有高度的保守性,可在小鼠和人类之间转译^[74]。

2.3 强迫游泳、悬尾和糖水偏好实验

强迫游泳和悬尾实验主要用于评价小鼠精神分裂症的阴性症状——抑郁样行为^[75]。将小鼠放进水中或者用胶带将小鼠的尾巴悬挂起来,动物的主要反应是挣扎,但之后会有一段时间静止不动,因此,将小鼠不动的时间作为分析抑郁样行为的指标。

蔗糖偏好测试旨在评估动物的快感缺失^[76],后者同样是精神分裂症的阴性症状。当小鼠可以在蔗糖溶液和饮用水之间自由选择时,它们会更偏爱蔗糖溶液^[76]。然而,当表现出压力和抑郁的迹象时,这种偏好会降低。实验过程中,给予小鼠饮用水和蔗糖溶液,定期评估水和蔗糖溶液的摄入量,并根据蔗糖摄入量占总摄入量的比例确定其对蔗糖的偏好。

2.4 高架十字实验

在啮齿类动物中,研究人员通常也将焦虑行为作为精神分裂症的阴性症状。而高架十字测试被认为是衡量啮齿类动物焦虑程度的黄金标准。该测试基于啮齿类动物对开阔和高地的天然厌恶,以及它们在新环境中与生俱来的自发探索行为^[77]。实验装置由相互垂直交叉的开臂、闭臂以及中心区域组成,小鼠待在开放臂中的时间占比反映了小鼠的焦虑水平。

2.5 三箱社交实验

社会交往减少、参与社会交往的愿望降低、社会

认知功能缺陷也是精神分裂症的阴性症状之一^[78]。三箱社交实验是测量动物模型的社会功能常用的方法。装置包括三个相通的箱体组成,两端有铁丝杯,可放一只陌生的小鼠和一个没有生命的物体,或放一只熟悉的和一只陌生的小鼠,让实验鼠在箱子里自由探索。社会互动包括实验鼠与陌生小鼠和物体,或在熟悉小鼠和陌生小鼠之间互动的次数和持续时间。

2.6 多种迷宫实验

几乎98%的精神分裂症患者都有认知障碍,通常出现工作记忆受损的情况,这也是精神分裂症的主要症状之一^[79]。其中工作记忆是一种关键的记忆功能,指在特定的事件中快速形成记忆的能力,主要依赖于前额叶功能的完整性。迷宫实验包括T-迷宫、Y-迷宫和Morris水迷宫等,主要检测精神分裂症模型小鼠的工作记忆和空间记忆能力。

2.7 新物体识别实验

新物体识别实验是利用小鼠先天对新物体有探索倾向的原理而建立的学习记忆测试方法。该方法具有让小鼠在自由活动状态下进行学习记忆测试的特点,能更近似地模拟人类的学习记忆行为^[80]。这种行为活动需要小鼠短暂地接触两种物体。其中一件物体首先呈现给小鼠,在休息几分钟到几天不等的时间后,再呈现另一物体。一般动物对新事物的探索多于对熟悉事物的探索。该实验可以检测小鼠的短期记忆。

3 精神分裂症模型动物的组织学表型及其可能的分子机制

3.1 皮层变薄和侧脑室体积增大

利用结构磁共振成像发现,精神分裂症患者与健康受试者相比,前者表现出广泛的皮质薄化(主要在额叶和颞叶区域)以及脑室变大的表型^[87-88],而这一形态学改变也在众多精神分裂症动物模型中被发现。而前额叶皮层的发育以及的大脑其他区域的连接对认知功能至关重要。认知障碍是与精神分裂症相关的核心症状之一,甚至在疾病发作之前就已显现。目前抗精神病的药物对认知障碍的干预有限。因此,理解认知障碍的潜在机制将对发现改善认知功能的新疗法具有重要意义。

3.2 树突的复杂性和树突棘密度下降

树突棘(dendritic spine)是位于神经元树突分支(dendritic branch)上具有特定形态和生化功能的微小突起结构,是突触的重要组成部分,它的形态异常会

造成神经递质或受体正常功能受损。神经突形态学的改变和树突棘密度降低是精神分裂症患者重要的病理特征^[81],有研究表明,树突棘的异常与工作记忆受损、感觉运动处理过程异常以及社交能力受损都有很大关联,而这些症状也往往出现在精神分裂症患者身上或动物模型中^[82]。

3.3 多巴胺信号通路异常

目前,多巴胺假说是精神分裂症发病机制的研究热点,该假说认为皮层的多巴胺系统活性增强与精神分裂症中的阳性症状密切相关^[83]。对多个精神分裂症患者的尸检发现,他们的脑内多巴胺D2受体明显增高。同时,多巴胺介导的神经传递是目前治疗精神类疾病尤其是精神分裂症的主要药物靶点,如氯氮平、氟哌啶醇等药物均通过阻断多巴胺的D2受体来降低多巴胺的水平^[84]。而正常人滥用促多巴胺释放药物,如安非他命使纹状体内多巴胺的释放增加,可产生类似精神分裂症的症状。以上这些研究为多巴胺假说提供了理论依据。越来越多的证据表明,多巴胺是通过调节GSK3及相关信号通路分子如Akt的活性来对行为产生作用^[85]。Akt是多巴胺受体信号通路下游重要的关键中间环节,在精神分裂症的发病机制中发挥着非常重要的作用^[86]。

3.4 γ -氨基丁酸系统异常

除多巴胺通路外, γ -氨基丁酸系统也与精神分裂症的发病密切相关。 γ -氨基丁酸是大脑中分布最为广泛的抑制性神经递质,可影响神经元的活性。在皮层,兴奋性的锥体神经元与抑制性的中间神经元形成局部的环路,且与投射到皮层的多巴胺神经元也有突触接触。越来越多的证据表明,皮层神经元兴奋性与抑制性的不平衡导致精神分裂症患者及动物模型中认知功能的障碍^[89]。精神分裂症患者的尸检研究发现,背外侧前额叶皮质 γ -氨基丁酸合成酶GAD67 mRNA表达下调以及 γ -氨基丁酸受体水平也存在异常^[90],提示前额叶可能存在 γ -氨基丁酸系统功能的缺陷。而这种缺陷可能导致精神分裂症的阴性症状和认知缺陷。

笔者总结了目前常见的精神分裂症动物模型的建模方法及其行为学表型和组织学表型,见表1。

4 结论与展望

目前有关精神分裂症动物模型的研究主要围绕神经发育、药物诱导和遗传这三方面进行造模,这些动物模型较好地模拟了部分人类精神分裂症患者相关的

表1 精神分裂症相关的小鼠模型
Table1 The animal models of schizophrenia

模型类型 Type of model	操作方式 Operation	行为学表型 Behavioral phenotype	组织学表型 Histological phenotype	参考文献 Reference
神经发育学模型 Neurodevelopmental model	出生前注射甲基氧化偶氮甲醇	对多巴胺通路激动剂安非他明的运动反应增加, 社交活动减少, 感觉运动门控缺陷, 记忆障碍, 焦虑增加	内侧前额叶体积减少, 侧脑室和第三脑室体积增加, 边缘和皮层区域的中间神经元标志物减少, 腹侧被盖区多巴胺神经元活性增加	[10]
	出生后社会隔离	自发运动增加, 对新奇事物的反应增强, 感觉运动门控障碍, 认知障碍, 焦虑和攻击性增加	前额叶体积减少, 树突棘密度降低, 海马中PV阳性的中间神经元降低	[11-13]
	母体免疫激活	感觉运动门控异常、社交行为异常、焦虑样和抑郁样行为增加等阴性症状, 同时出现对多巴胺通路激动剂安非他明的运动反应增加等阳性症状	树突棘的密度下降, 树突的复杂性下降, 抑制性神经元的数量也减少。磁共振成像研究发现母体免疫激活的后代脑室扩大和脑区体积减少	[15-16,18]
	胚胎期和青春期进行刺激	根据胚胎期和青春期的刺激确定	根据胚胎期和青春期的刺激确定	[15,19]
药物诱导模型 Drug-induced model	多巴胺通路激动剂安非他命	运动过度, 空间工作记忆障碍, 感觉运动门控缺陷, 潜在抑制缺陷	NMDA受体表达异常, 树突形态改变, 伏隔核和纹状体中多巴胺的释放增加	[24-26]
	氯胺酮	损害空间工作记忆, 引起焦虑样行为、社会行为改变, 运动过度, 感觉运动门控障碍	多个脑区BDNF蛋白的表达水平降低, 炎性细胞因子失衡, 海马区域PV阳性神经元的数量下降	[37-41]
	苯环己哌啶	记忆和学习障碍, 社交能力受损, 活动升高, 感觉运动门控异常	前额叶皮层多巴胺、谷氨酸、5羟色胺以及去甲肾上腺素释放增加, γ -氨基丁酸释放降低, BDNF/TrkB的水平下调	[30-34]
	MK-801	运动过度, 感觉运动门控缺陷, 社交能力下降, 条件性恐惧记忆异常	运动过度, 感觉运动门控缺陷, 社交能力下降, 条件性恐惧记忆的异常	[42-45]
遗传模型 Genetic model	DISC1	识别记忆、社交和焦虑行为缺陷, 感觉运动门控异常等	脑室增大, 皮质厚度和脑容量减少, 皮层中 γ -氨基丁酸能神经元密度降低, NMDA受体亚基和PSD-95的表达减少	[50-54]
	22q11.2缺失综合征	感觉运动门控异常, 恐惧条件反射异常, 空间记忆受损等	皮层和皮层下灰质体积改变, 脑室增大, 树突棘密度和树突复杂性减少, 多巴胺和 γ -氨基丁酸系统紊乱	[56-58]
	NRG1	活动和探索行为增加, 在自发交替测试中工作记忆异常, 感觉运动门控异常	脑中功能性的NMDA受体水平降低, 海马锥体神经元上的树突棘密度减少	[61-62]
	Dysbindin	多动, 学习和记忆缺陷, 冲动和强迫行为增加	多巴胺释放增加, 细胞表面D2受体过表达	[66-67]
	Ulk4	感觉运动门控异常, 工作和空间记忆异常	Akt-Gsk3 β 信号通路异常, Gsk3 β 活性增加	[71]

注: PV即小白蛋白; NMDA即N-甲基-D-天冬氨酸受体; BDNF即脑源性神经营养因子; TrkB即酪氨酸激酶受体B; DISC1即精神分裂症致病基因; PSD-95即突触后致密蛋白-95; NRG1即神经调节蛋白; Akt即蛋白激酶B; Gsk3 β 即糖原合成酶激酶-3 β ; Ulk4即unc-51样激酶4。
Note: PV, parvalbumin; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; TrkB, tyrosine Kinase receptor B; DISC1, disrupted-in-Schizophrenia-1; PSD-95, postsynaptic density-95; NRG1, neuregulin-1; Akt, protein kinase B; Gsk3 β , glycogen Synthase Kinase 3 Beta; Ulk4, unc-51-like kinase 4.

病因、大脑病理改变以及行为异常, 加深了人们对精神分裂症病理学机制的认识。此外, 这些模型可以用于识别药物治疗的途径, 并为新型抗精神病药物的筛选和验证提供了证据。

然而, 现有的精神分裂症动物模型存在一定的局限性。药物诱导模型大多只针对多巴胺系统或谷氨酸

系统,最终造成的病理因素比较单一,难以模拟临床患者病因的复杂性;此外,给药时间和给药剂量的不同会造成动物行为学结果的差异。为此,建立针对多种递质系统的给药体系以及完善给药标准才能增强实验的可重复性,以使模型更好地模拟临床病症。遗传模型目前大多仅针对单个基因在精神分裂症病理过程中的作用,有时难以表现出精神分裂症样的表型,而鉴于基因与环境相互作用的复杂性,单个基因的敲减并不能代表疾病的真实复杂性。为此,建立多个相关基因共同敲减的动物模型或增加环境因素对动物进行刺激,才能使得模型发挥更加稳定的作用。与之相比,神经发育模型能够观察到与患者类似的解剖学改变(例如神经元素乱、脑室增大等),而且能够产生年龄依赖性的表型,然而在大多数研究中也忽视了环境因素的作用,因此将外界刺激考虑其中能够增加该模型研究的准确性。总而言之,三种模型均有其独特的优点,但往往未重视环境这一因素的作用。因此,未来的研究应该对动物模型增加适当的环境因素刺激,以便增强研究结果的说服力。

相信随着动物模型的不断完善,精神分裂症发病机制的研究也能越加深入,开发出更快速和更少不良反应的治疗方法将成为可能。

[作者贡献 Author Contribution]

胡玲撰写和修改文稿;

胡志斌和胡筠卿负责文献收集和文稿修改;

丁玉强修改及核定文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] MCCUTCHEON R A, REIS MARQUES T, HOWES O D. Schizophrenia-an overview[J]. JAMA Psychiatry, 2020, 77(2): 201-210. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2019.3360.
- [2] CORRELL C U, SCHOOLER N R. Negative symptoms in schizophrenia: a review and clinical guide for recognition, assessment, and treatment[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2020, 16:519-534. DOI: 10.2147/NDT.S225643.
- [3] CONSORTIUM I S, PURCELL S M, WRAY N R, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder[J]. Nature, 2009, 460(7256): 748-752. DOI: 10.1038/nature08185.
- [4] YEE B K, SINGER P. A conceptual and practical guide to the behavioural evaluation of animal models of the symptomatology and therapy of schizophrenia[J]. Cell Tissue Res, 2013, 354(1):221-246. DOI: 10.1007/s00441-013-1611-0.
- [5] GREEN J G, MCLAUGHLIN K A, BERGLUND P A, et al. Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication I: associations with first onset of DSM-IV disorders[J]. Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(2):113-123. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.186.
- [6] LIPSKA B K, WEINBERGER D R. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test[J]. Neuropsychopharmacology, 2000, 23(3):223-239. DOI:10.1016/S0893-133X(00)00137-8.
- [7] HU L, ZHANG L. Adult neural stem cells and schizophrenia[J]. World J Stem Cells, 2022, 14(3):219-230. DOI: 10.4252/wjsc.v14.i3.219.
- [8] LAPIZ M S, FULFORD A, MUCHIMAPURA S, et al. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission [J]. Neurosci Behav Physiol, 2003, 33(1):13-29. DOI: 10.1023/A: 1021171129766.
- [9] SHEU J R, HSIEH C Y, JAYAKUMAR T, et al. A critical period for the development of schizophrenia-like pathology by aberrant postnatal neurogenesis[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 635. DOI: 10.3389/fnins.2019.00635.
- [10] LODGE D J, GRACE A A. Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia[J]. Behav Brain Res, 2009, 204(2):306-312. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.01.031.
- [11] WALKER D M, CUNNINGHAM A M, GREGORY J K, et al. Long-term behavioral effects of post-weaning social isolation in males and females[J]. Front Behav Neurosci, 2019, 13:66. DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00066.
- [12] SKELLY M J, CHAPPELL A E, CARTER E, et al. Adolescent social isolation increases anxiety-like behavior and ethanol intake and impairs fear extinction in adulthood: possible role of disrupted noradrenergic signaling[J]. Neuropharmacology, 2015, 97:149-159. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.025.
- [13] FABRICIUS K, HELBOE L, FINK-JENSEN A, et al. Pharmacological characterization of social isolation-induced hyperactivity[J]. Psychopharmacology, 2011, 215(2): 257-266. DOI: 10.1007/s00213-010-2128-9.
- [14] SCHUBERT M I, PORKESS M V, DASHDORJ N, et al. Effects of social isolation rearing on the limbic brain: a combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats[J]. Neuroscience, 2009, 159(1): 21-30. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.019.
- [15] BERGDOLT L, DUNAEVSKY A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders[J]. Prog Neurobiol, 2019, 175: 1-19. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2018.12.002.
- [16] HADAR R, DONG L, DEL-VALLE-ANTON L, et al. Deep brain stimulation during early adolescence prevents microglial alterations in a model of maternal immune activation[J]. Brain Behav Immun, 2017, 63: 71-80. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.12.003.
- [17] COIRO P, PADMASHRI R, SURESH A, et al. Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders[J]. Brain Behav Immun, 2019, 84: 1-12. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.04.003.

- 2015, 50:249-258. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.07.022.
- [18] SHORT S J, LUBACH G R, KARASIN A I, et al. Maternal influenza infection during pregnancy impacts postnatal brain development in the Rhesus monkey[J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 67(10):965-973. DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.11.026.
- [19] DESBONNET L, KONKOTH A, LAIGHNEACH A, et al. Dual hit mouse model to examine the long-term effects of maternal immune activation and post-weaning social isolation on schizophrenia endophenotypes[J]. *Behav Brain Res*, 2022, 430:113930. DOI: 10.1016/j.bbr.2022.113930.
- [20] WILSON C, TERRY A V Jr. Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: role in novel drug discovery and development[J]. *Clin Schizophr Relat Psychoses*, 2010, 4(2): 124-137. DOI: 10.3371/CSRP.4.2.4.
- [21] MCCUTCHEON R A, ABI-DARGHAM A, HOWES O D. Schizophrenia, dopamine and the Striatum: from biology to symptoms[J]. *Trends Neurosci*, 2019, 42(3): 205-220. DOI: 10.1016/j.tins.2018.12.004.
- [22] BIAŁOŃ M, WĄSIK A. Advantages and limitations of animal schizophrenia models[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11):5968. DOI: 10.3390/ijms23115968.
- [23] NAKAZAWA K, JEEVAKUMAR V, NAKAO K. Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia[J]. *NPJ Schizophr*, 2017, 3: 7. DOI: 10.1038/s41537-016-0003-3.
- [24] CERETTA A P C, SCHAFFER L F, DE FREITAS C M, et al. Gabapentin prevents behavioral changes on the amphetamine-induced animal model of schizophrenia[J]. *Schizophr Res*, 2016, 175(1-3): 230-231. DOI: 10.1016/j.schres.2016.04.044.
- [25] ARROYO-GARCÍA L E, TENDILLA-BELTRÁN H, VÁZQUEZ-ROQUE R A, et al. Amphetamine sensitization alters hippocampal neuronal morphology and memory and learning behaviors[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(9): 4784-4794. DOI: 10.1038/s41380-020-0809-2.
- [26] SAMS-DODD F. A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and *D*-amphetamine[J]. *Neuropsychopharmacology*, 1998, 18(4):293-304. DOI: 10.1016/S0893-133X(97)00161-9.
- [27] ROBINSON T E, KOLB B. Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(21):8491-8497. DOI:10.1523/JNEUROSCI.17-21-08491.1997.
- [28] WALLACH J, KANG H, COLESTOCK T, et al. Pharmacological investigations of the dissociative 'legal highs' diphenidine, methoxphenidine and analogues[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157021. DOI: 10.1371/journal.pone.0157021.
- [29] GRAYSON B, BARNES S A, MARKOU A, et al. Postnatal phencyclidine (PCP) as a neurodevelopmental animal model of schizophrenia pathophysiology and symptomatology: a review[J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2016, 29: 403-428. DOI: 10.1007/7854_2015_403.
- [30] TSIVION-VISBORD H, PERETS N, SOFER T, et al. Correction: Mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles improve behavioral and biochemical deficits in a phencyclidine model of schizophrenia[J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1):327. DOI: 10.1038/s41398-020-01016-9.
- [31] GIGG J, MCEWAN F, SMAUSZ R, et al. Synaptic biomarker reduction and impaired cognition in the sub-chronic PCP mouse model for schizophrenia[J]. *J Psychopharmacol*, 2020, 34(1):115-124. DOI: 10.1177/0269881119874446.
- [32] NEUGEBAUER N M, MIYAUCHI M, SATO T, et al. Hippocampal GABA_A antagonism reverses the novel object recognition deficit in sub-chronic phencyclidine-treated rats [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 342: 11-18. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.12.033.
- [33] MOGHADDAM B, ADAMS B W. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1349-1352. DOI: 10.1126/science.281.5381.1349.
- [34] TANQUEIRO S R, MOURO F M, FERREIRA C B, et al. Sustained NMDA receptor hypofunction impairs brain-derived neurotrophic factor signalling in the PFC, but not in the hippocampus, and disturbs PFC-dependent cognition in mice[J]. *J Psychopharmacol*, 2021, 35(6):730-743. DOI: 10.1177/02698811211008560.
- [35] MOGHADAM A A, VOSE L R, MIRY O, et al. Pairing of neonatal phencyclidine exposure and acute adolescent stress in male rats as a novel developmental model of schizophrenia[J]. *Behav Brain Res*, 2021, 409: 113308. DOI: 10.1016/j.bbr.2021.113308.
- [36] OSHODI T O, BEN-AZU B, ISHOLA I O, et al. Molecular mechanisms involved in the prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia-like behavior by rutin: the role of glutamic acid decarboxylase isoform-67, cholinergic, Nox-2-oxidative stress pathways in mice[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(3):2335-2350. DOI: 10.1007/s11033-021-06264-6.
- [37] BECK K, HINDLEY G, BORGAN F, et al. Association of ketamine with psychiatric symptoms and implications for its therapeutic use and for understanding schizophrenia: a systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA Netw Open*, 2020, 3(5): e204693. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.4693.
- [38] AZIMI SANAVI M, GHAZVINI H, ZARGARI M, et al. Effects of clozapine and risperidone antipsychotic drugs on the expression of CACNA1C and behavioral changes in rat 'Ketamine model of schizophrenia[J]. *Neurosci Lett*, 2022, 770: 136354. DOI: 10.1016/j.neulet.2021.136354.
- [39] XU Y, DENG C, ZHENG Y, et al. Applying vinpocetine to reverse synaptic ultrastructure by regulating BDNF-related PSD-95 in alleviating schizophrenia-like deficits in rat[J]. *Compr Psychiatry*, 2019, 94:152122. DOI: 10.1016/j.comppsy.2019.152122.
- [40] LI Y N, SHEN R P, WEN G H, et al. Effects of ketamine on levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the Hippocampus of mice following acute or chronic administration[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8:139. DOI: 10.3389/

- fphar.2017.00139.
- [41] FUJIKAWA R, YAMADA J, JINNO S. Subclass imbalance of parvalbumin-expressing GABAergic neurons in the hippocampus of a mouse ketamine model for schizophrenia, with reference to perineuronal nets[J]. *Schizophr Res*, 2021, 229:80-93. DOI: 10.1016/j.schres.2020.11.016.
 - [42] KRAEUTER A K, MASHAVAVE T, SUVARNA A, et al. Effects of beta-hydroxybutyrate administration on MK-801-induced schizophrenia-like behaviour in mice[J]. *Psychopharmacology*, 2020, 237(5): 1397-1405. DOI: 10.1007/s00213-020-05467-2.
 - [43] FAN H R, DU W F, ZHU T, et al. Quercetin reduces cortical GABAergic transmission and alleviates MK-801-induced hyperactivity[J]. *EBioMedicine*, 2018, 34:201-213. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.07.031.
 - [44] FLORES-BARRERA E, THOMASES D R, TSENG K Y. MK-801 exposure during adolescence elicits enduring disruption of prefrontal E-I balance and its control of fear extinction behavior[J]. *J Neurosci*, 2020, 40(25):4881-4887. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0581-20.2020.
 - [45] CHEN G D, LIN X D, LI G Y, et al. Risperidone reverses the spatial object recognition impairment and hippocampal BDNF-TrkB signalling system alterations induced by acute MK-801 treatment[J]. *Biomed Rep*, 2017, 6(3): 285-290. DOI: 10.3892/br.2017.850.
 - [46] FARRELL M S, WERGE T, SKLAR P, et al. Evaluating historical candidate genes for schizophrenia[J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(5):555-562. DOI: 10.1038/mp.2015.16.
 - [47] SCHIZOPHRENIA WORKING GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci[J]. *Nature*, 2014, 511(7510):421-427. DOI: 10.1038/nature13595.
 - [48] TRUBETSKOY V, PARDIÑAS A F, QI T, et al. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia [J]. *Nature*, 2022, 604(7906):502-508. DOI: 10.1038/s41586-022-04434-5.
 - [49] LIU C M, LIU Y L, HWU H G, et al. Genetic associations and expression of extra-short isoforms of disrupted-in-schizophrenia 1 in a neurocognitive subgroup of schizophrenia[J]. *J Hum Genet*, 2019, 64(7): 653-663. DOI: 10.1038/s10038-019-0597-1.
 - [50] BRADSHAW N, PORTEOUS D J. DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(3): 1230-1241. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.12.027.
 - [51] PLETNIKOV M V, AYHAN Y, XU Y, et al. Enlargement of the lateral ventricles in mutant DISC1 transgenic mice[J]. *Mol Psychiatry*, 2008, 13(2):115. DOI: 10.1038/sj.mp.4002144.
 - [52] ELLISON-WRIGHT I, GLAHN D C, LAIRD A R, et al. The anatomy of first-episode and chronic schizophrenia: an anatomical likelihood estimation meta-analysis[J]. *Am J Psychiatry*, 2008, 165(8): 1015-1023. DOI: 10.1176/appi.ajp.2008.07101562.
 - [53] UMEDA K, IRITANI S, FUJISHIRO H, et al. Immuno-histochemical evaluation of the GABAergic neuronal system in the prefrontal cortex of a DISC1 knockout mouse model of schizophrenia[J]. *Synapse*, 2016, 70(12):508-518. DOI: 10.1002/syn.21924.
 - [54] CUI L, SUN W, YU M, et al. Disrupted-in-schizophrenia1 (DISC1) L100P mutation alters synaptic transmission and plasticity in the hippocampus and causes recognition memory deficits[J]. *Mol Brain*, 2016, 9(1):89. DOI: 10.1186/s13041-016-0270-y.
 - [55] VAN L, BOOT E, BASSETT A S. Update on the 22q11.2 deletion syndrome and its relevance to schizophrenia[J]. *Curr Opin Psychiatry*, 2017, 30(3): 191-196. DOI: 10.1097/YCO.0000000000000324.
 - [56] SUN Z Y, WILLIAMS D J, XU B, et al. Altered function and maturation of primary cortical neurons from a 22q11.2 deletion mouse model of schizophrenia[J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1):85. DOI: 10.1038/s41398-018-0132-8.
 - [57] KARAYIORGOU M, SIMON T J, GOGOS J A. 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(6):402-416. DOI: 10.1038/nrn2841.
 - [58] ZINKSTOK J R, BOOT E, BASSETT A S, et al. Neurobiological perspective of 22q11.2 deletion syndrome[J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(11): 951-960. DOI: 10.1016/S2215-0366(19)30076-8.
 - [59] MOSTAID M S, LLOYD D, LIBERG B, et al. Neuregulin-1 and schizophrenia in the genome-wide association study era[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, 68: 387-409. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.001.
 - [60] JOSHI D, FULLERTON J M, WEICKERT C S. Elevated ErbB4 mRNA is related to interneuron deficit in prefrontal cortex in schizophrenia[J]. *J Psychiatr Res*, 2014, 53: 125-132. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2014.02.014.
 - [61] KARL T, DUFFY L, SCIMONE A, et al. Altered motor activity, exploration and anxiety in heterozygous neuregulin 1 mutant mice: implications for understanding schizophrenia[J]. *Genes Brain Behav*, 2007, 6(7): 677-687. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2006.00298.x.
 - [62] BANERJEE A, MACDONALD M L, BORGMANN-WINTER K E, et al. Neuregulin 1-erbB4 pathway in schizophrenia: from genes to an interactome[J]. *Brain Res Bull*, 2010, 83(3-4):132-139. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2010.04.011.
 - [63] WANG H T, XU J P, LAZAROVICI P, et al. Dysbindin-1 involvement in the etiology of schizophrenia[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2044. DOI: 10.3390/ijms18102044.
 - [64] WOLF C, JACKSON M C, KISSLING C, et al. Dysbindin-1 genotype effects on emotional working memory[J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(2):145-155. DOI: 10.1038/mp.2009.129.
 - [65] WEICKERT C S, ROTHMOND D A, HYDE T M, et al. Reduced DTNBP1 (dysbindin-1) mRNA in the hippocampal formation of schizophrenia patients[J]. *Schizophr Res*, 2008, 98(1-3): 105-110. DOI: 10.1016/j.schres.2007.05.041.
 - [66] KARLSGODT K H, ROBLETO K, TRANTHAM-DAVIDSON H, et al. Reduced dysbindin expression mediates N-methyl-D-

- aspartate receptor hypofunction and impaired working memory performance[J]. *Biol Psychiatry*, 2011, 69(1): 28-34. DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.09.012.
- [67] JI Y Y, YANG F, PAPAEO F, et al. Role of dysbindin in dopamine receptor trafficking and cortical GABA function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(46): 19593-19598. DOI: 10.1073/pnas.0904289106.
- [68] WANG Q Z, JI W D, HE K J, et al. Genetic analysis of common variants in the ZNF804A gene with schizophrenia and major depressive disorder[J]. *Psychiatr Genet*, 2018, 28(1): 1-7. DOI: 10.1097/YPG.0000000000000185.
- [69] HUANG Y, HUANG J, ZHOU Q X, et al. ZFP804A mutant mice display sex-dependent schizophrenia-like behaviors[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(6): 2514-2532. DOI: 10.1038/s41380-020-00972-4.
- [70] LANG B, ZHANG L, JIANG G Y, et al. Control of cortex development by ULK4, a rare risk gene for mental disorders including schizophrenia[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31126. DOI: 10.1038/srep31126.
- [71] HU L, ZHOU B Y, YANG C P, et al. Deletion of schizophrenia susceptibility gene *Ulk4* leads to abnormal cognitive behaviors via Akt-GSK-3 signaling pathway in mice[J]. *Schizophr Bull*, 2022, 48(4): 804-813. DOI: 10.1093/schbul/sbac040.
- [72] AMANN L C, GANDAL M J, HALENE T B, et al. Mouse behavioral endophenotypes for schizophrenia[J]. *Brain Res Bull*, 2010, 83(3-4): 147-161. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2010.04.008.
- [73] SWERDLOW N R, WEBER M, QU Y, et al. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research[J]. *Psychopharmacology*, 2008, 199(3):331-388. DOI: 10.1007/s00213-008-1072-4.
- [74] GEYER M A, MCILWAIN K L, PAYLOR R. Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review[J]. *Mol Psychiatry*, 2002, 7(10):1039-1053. DOI: 10.1038/sj.mp.4001159.
- [75] STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice[J]. *Psychopharmacology*, 1985, 85(3): 367-370. DOI: 10.1007/BF00428203.
- [76] LIU M Y, YIN C Y, ZHU L J, et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice[J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(7):1686-1698. DOI: 10.1038/s41596-018-0011-z.
- [77] KOMADA M, TAKAO K, MIYAKAWA T. Elevated plus maze for mice[J]. *J Vis Exp*, 2008(22):1088. DOI: 10.3791/1088.
- [78] O'TUATHAIGH C M, DESBONNET L, WADDINGTON J L. Genetically modified mice related to schizophrenia and other psychoses: seeking phenotypic insights into the pathobiology and treatment of negative symptoms[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24(5): 800-821. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2013.08.009.
- [79] KEEFE R S E, EESLEY C E, POE M P. Defining a cognitive function decrement in schizophrenia[J]. *Biol Psychiatry*, 2005, 57(6):688-691. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.01.003.
- [80] CLARK R E, MARTIN S J. Interrogating rodents regarding their object and spatial memory[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2005, 15(5):593-598. DOI: 10.1016/j.conb.2005.08.014.
- [81] JAARO-PELED H. Gene models of schizophrenia: DISC1 mouse models[J]. *Prog Brain Res*, 2009, 179: 75-86. DOI: 10.1016/S0079-6123(09)17909-8.
- [82] BRENNAMAN L H, KOCHLAMAZASHVILI G, STOENICA L, et al. Transgenic mice overexpressing the extracellular domain of NCAM are impaired in working memory and cortical plasticity[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 43(2):372-378. DOI: 10.1016/j.nbd.2011.04.008.
- [83] JAUHAR S, JOHNSTONE M, MCKENNA P J. Schizophrenia[J]. *Lancet*, 2022, 399(10323):473-486. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01730-X.
- [84] JOHNSTONE E C, CROW T J, FRITH C D, et al. Mechanism of the antipsychotic effect in the treatment of acute schizophrenia[J]. *Lancet*, 1978, 1(8069):848-851. DOI: 10.1016/S0140-6736(78)90193-9.
- [85] EMAMIAN E S, HALL D, BIRNBAUM M J, et al. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(2):131-137. DOI: 10.1038/ng1296.
- [86] ARGUELLO P A, GOGOS J A. A signaling pathway AKTing up in schizophrenia[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6):2018-2021. DOI: 10.1172/JCI35931.
- [87] TAKAYANAGI Y, SASABAYASHI D, TAKAHASHI T, et al. Reduced cortical thickness in schizophrenia and schizotypal disorder[J]. *Schizophr Bull*, 2020, 46(2):387-394. DOI: 10.1093/schbul/sbz051.
- [88] HELLER C, WEISS T, DEL RE E C, et al. Smaller subcortical volumes and enlarged lateral ventricles are associated with higher global functioning in young adults with 22q11.2 deletion syndrome with prodromal symptoms of schizophrenia[J]. *Psychiatry Res*, 2021, 301: 113979. DOI: 10.1016/j.psychres.2021.113979.
- [89] BENES F M, LIM B, MATZILEVICH D, et al. Regulation of the GABA cell phenotype in hippocampus of schizophrenics and bipolars[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10164-10169. DOI: 10.1073/pnas.0703806104.
- [90] FATEMI S H, FOLSOM T D, THURAS P D. GABA $_A$ and GABA $_B$ receptor dysregulation in superior frontal cortex of subjects with schizophrenia and bipolar disorder[J]. *Synapse*, 2017, 71(7):e21973. DOI: 10.1002/syn.21973.

(收稿日期:2022-11-10 修回日期:2023-02-13)

(本文编辑:张俊彦,富群华,洪怡,丁宇菁)

引用本文

胡玲, 胡志斌, 胡筠卿, 等. 精神分裂症动物模型的研究概述[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 145-155. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.174.

HU L, HU Z B, HU Y Q, et al. Overview of studies in animal models of schizophrenia[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2): 145-155. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.174.

动物衰老模型的研究进展

尹丹阳, 胡 怡, 史仍飞

(上海体育学院运动健康学院, 上海 200438)

[摘要] 随着全球老龄化日益严重, 衰老相关问题成了健康领域的一个研究热点。近年来, 动物衰老模型得到广泛开发与应用, 在衰老机制研究中具有重要意义。其中, 线虫和果蝇等寿命较短的动物在衰老研究中具有天然优势; 各类大鼠、小鼠衰老模型被用于多种衰老研究; 同时, 非洲青鳉鱼等新型动物衰老模型也相继得以开发应用。本文回顾了目前在衰老研究中使用的主要动物模型, 并对各模型的建立方法、模型成功与否的评价指标、优缺点进行分析, 以期对相关研究提供参考。

[关键词] 衰老; 动物模型; 评价

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0156-07



Advances in Animal Aging Models

YIN Danyang, HU Yi, SHI Rengfei

(School of Exercise and Health, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Correspondence to: SHI Rengfei (ORCID: 0000-0002-8310-6526), E-mail: rfshi@sus.edu.cn

[ABSTRACT] With the increasing severity of global aging, aging-related issues have become the hotspot in the field of health. In recent years, animal aging models have been widely developed and applied, which is of great significance in the study of aging mechanism. Animals with short life span, such as *Caenorhabditis Elegans* and *Drosophila Melanogaster*, have natural advantages in the study of aging. Various rat and mouse aging models have been used in aging studies. In recent years, new animal aging models have been developed, such as the African turquoise killifish. The authors reviewed main animal models used in the study of aging, and analyzed the establishment methods, evaluation indexes, advantages and disadvantages of each model in order to provide reference for related research.

[Key words] Aging; Animal model; Evaluation

人口老龄化已成为一个日益严重的全球性问题。联合国预计, 到2050年, 亚洲将有近四分之一的人口超过60岁^[1]。衰老与心血管疾病等多种慢性病显著相关^[2]。随着年龄增长, 人体开始出现身体虚弱、认知功能下降, 同时患多种疾病的风险增加, 包括癌症、糖尿病、心血管疾病、肌肉骨骼和神经退行性疾病。与年龄有关的疾病往往严重影响生活质量, 并对个人、家庭和社会造成不良后果^[3-4]。

衰老相关研究, 包括衰老的分子机制、应对策略

等, 已成为当前一大研究热点。由于动物自然衰老通常需要较长时间, 越来越多的研究人员通过D-半乳糖、基因敲除等方法来建立细胞和动物衰老模型。尽管细胞模型能够用于机制研究, 但无法从整体层面探讨衰老的机制。因此, 动物衰老模型具有独特的研究价值。在动物实验研究中, 从线虫、果蝇等无脊椎动物, 到大鼠、小鼠等脊椎动物, 都已开发出衰老模型, 并广泛应用于衰老相关研究。不同模型各有优缺点, 都有不同程度的应用^[5]。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目“低雌激素条件下肌源性17 β -estradiol介导的运动预防肌少症的机制研究”(32171136); 上海自然科学基金资助项目“运动对骨骼肌Aromatase/17 β -estradiol通路的影响及功能研究”(19ZR1452900); 国家重点研发项目子课题“肌少症被动运动干预研究及验证”(2020YFC2005604)

[第一作者] 尹丹阳(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 运动生物化学与运动营养。E-mail: greenyin@vip.qq.com

[通信作者] 史仍飞(1976—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 运动生物化学与运动营养。E-mail: rfshi@sus.edu.cn. ORCID: 0000-0002-8310-6526

本研究通过计算机检索PubMed、中国知网等数据库,以动物衰老模型(animal model of ageing)、小鼠衰老模型(mouse model of ageing)、大鼠衰老模型(rat model of ageing)、*D*-半乳糖衰老模型(*D*-gal induced ageing model)等为关键词,检索期限从2012年1月1日起至2021年12月31日。排除非动物衰老模型的研究(如细胞衰老模型),以及具体某种疾病的衰老模型(如帕金森动物模型),纳入多种动物衰老模型,并对其建立方法、衰老指标、优缺点进行汇总(表1),以期衰老相关研究提供参考。

1 无脊椎动物衰老模型

1.1 线虫

自1974年以来,隐杆线虫(*Caenorhabditis Elegans*)一直被用作实验模型动物^[6]。隐杆线虫在实验室条件下存活不超过1个月,可以观察其完整生命周期。线虫的许多衰老表型与人类相似,包括身体活动变化、食物摄入减少、DNA损伤积累、脂褐质积累和生殖细胞组织减少等^[7]。

1.2 果蝇

果蝇(*Drosophila Melanogaster*)生命周期只有3个月,在衰老阶段会出现新陈代谢、组织功能、生殖能力、身体活动和行为等方面的变化。在衰老研究中,果蝇具有建模快、可模拟多细胞环境和多组织相互作用、易于产生大量种群等优势^[8]。同时,果蝇具有一些高等脊椎动物的结构,如大脑和心脏^[9]。另外,果蝇的肌肉占身体质量的比例很大,并且结构上与哺乳动物的肌肉有许多相似之处^[8]。因此,开发果蝇衰老模型可以用于进一步研究衰老对肌肉、大脑、心脏的影响^[10-11]。然而,果蝇因为缺乏干细胞而没有再生能力,因此其虽然可以进行骨骼肌衰老研究,但具有一定的局限性。

综上,无脊椎动物由于寿命短,具有建模快、方便培养观察的优势,部分衰老研究可以通过无脊椎动物模型,复制某些人类衰老的特征,快速探索衰老机制。然而,无脊椎动物缺乏特定的器官和系统(如血液、骨骼和适应性免疫系统),而这些器官和系统是衰老和与年龄相关疾病的重要组成部分。因此,无脊椎动物衰老模型具有较大的局限性,例如无法将它们用作研究骨骼系统衰老的模型^[12]。无脊椎动物衰老模型的研究结果,可能需要通过建立结构和生理机制与人类更相似的脊椎动物模型来进一步验证。

2 脊椎动物衰老模型

2.1 斑马鱼

斑马鱼(*Danio Rerio*)已被广泛应用于衰老研究模型^[13-14]。与小鼠相比,斑马鱼的实验成本较低,胚胎数量多,可以进行大规模的遗传和药理学干预^[15]。

斑马鱼一般寿命为36~42个月,在实验室条件下可以观察其自然衰老状态。衰老模型下的斑马鱼可出现衰老的关键特征,包括年龄依赖性线粒体功能障碍、端粒退化和蛋白质氧化^[13]。端粒酶缺陷型转基因斑马鱼的中位寿命只有9个月,能够表现出加速衰老的表型,因此可能进一步缩短实验研究时间^[16]。

然而,斑马鱼缺少哺乳动物所具有的特定器官,如肺或骨髓,在研究上有一定局限性。

2.2 绿松石鲮鱼

绿松石鲮鱼(*Nothobranchius*)是目前可以圈养繁殖的寿命最短的脊椎动物^[17],在适宜的实验室条件下其寿命为4~6个月。绿松石鲮鱼显示出许多与人类共有的分子、细胞和生理老化表型^[17-18]。与衰老的哺乳动物类似,随着年龄的增长,它们会逐渐失去毛发和皮肤色素^[19],并出现脊柱弯曲异常、自发活动减少等年龄依赖性特征^[17]。此外,端粒的长度也与人类相似^[20]。这些特征都使绿松石鲮鱼在衰老研究中具有天然优势。

斯坦福大学的研究人员基于绿松石鲮鱼基因组,利用基因编辑技术培育了非洲青鲮鱼(African turquoise killifish),其寿命缩短为9~26周,能够进一步缩短衰老研究周期^[21-22]。

然而,同斑马鱼一样,绿松石鲮鱼也缺少一些哺乳动物的特定器官,如骨髓,无法用于该类器官的相应研究。

2.3 小鼠

小鼠体内包含99%的人类基因,基因同源性高达78.5%^[23]。同时,与其他动物相比,小鼠基因组转化技术非常成熟。而且小鼠相对便宜,是实验动物模型的理想来源^[24]。由于自然衰老小鼠耗时较长,目前已开发出*D*-半乳糖衰老模型小鼠、快速老化模型小鼠、基因工程小鼠等,一定程度上缩短了衰老模型的建模时间。

2.3.1 自然衰老模型

不同种系小鼠的预期寿命有一定差异,通常为2~4年。衰老研究中常用的C57BL/6J雌性小鼠的中位寿

表1 常见衰老动物模型的建立方法、评价指标及优缺点

Table 1 Establishment methods, evaluation indexes, advantages and disadvantages of common aging animal models

动物 Animal	模型 Model	一般寿命 Lifespan	模型建立方法 Establishment method	衰老评价指标 Evaluation index	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
线虫 <i>Caenorhabditis Elegans</i>	自然衰老模型	1个月 ^[7]	实验环境下可观察其完整生命周期;可进行基因干预	咽部/头部组织减少,体壁肌肉组织减少,肌团密度减少;身体运动逐渐减少,最大速度下降,趋化反应减少;代谢率下降;生殖细胞少,生产后代数量减少;脂褐质积累,DNA损伤积累,羧基含量增加,卵黄蛋白积累,蛋白酪氨酸激酶活性下降,溶酶体水解酶增加	建模快;许多衰老表型与人类相似	缺乏特定器官和系统
果蝇 <i>Drosophila Melanogaster</i>	自然衰老模型	3个月 ^[8]	实验环境下可观察其完整生命周期;可进行基因干预	体质量和胸腔体积减少;活动减少,攀爬和飞行减少,拍打翅膀频率减少;代谢率下降;生殖能力下降;DNA损伤积累,线粒体功能障碍,脂褐素和过氧化物积累	建模快;有接近高等脊椎动物的特征	缺乏特定器官和系统;缺乏干细胞而没有再生能力
斑马鱼 <i>Danio Rerio</i>	自然衰老模型	36~42月 ^[13]	实验环境下可观察其完整生命周期	脊柱弯曲,肌肉退化;游泳能力下降;生殖能力下降;视网膜色素上皮中Drusen样病变;SA-β-gal染色增加,脂褐素积累,肌肉中氧化蛋白增加,端粒缩短,线粒体膜成分变化,无症状细胞内胞嘧啶甲基化减少	建模快;实验成本较低,胚胎产生数量多	作为鱼类,缺少特定器官和系统
非洲青鳉鱼 African turquoise killifish	基因组编辑衰老模型	9~26周 ^[21]	通过CRISPR/Cas9基因组编辑,生成基因编辑胚胎,并培育至成年	脊柱弯曲,颜色消退,体型变小;生育能力下降;运动/活动减少;认知障碍;脂褐素积累,细胞凋亡增加,端粒缩短,线粒体损伤,神经变性,鳍再生减少	基因改造快速高效,建模快;作为脊椎动物与人类更为相似	作为鱼类,缺少特定器官和系统
小鼠 Mouse	自然衰老模型	2~4年 ^[25]	自然生长至衰老阶段	被毛无光泽,脱毛,脊柱弯曲;行动迟缓,活动量减少;SA-β-gal染色增加;衰老相关基因的表达增加	呈现自然衰老特征	建模时间长
	D-半乳糖诱导衰老模型	注射1月后提早衰老 ^[31]	定期定量注射D-半乳糖	骨骼肌的肌质/体质比、横截面积和纤维直径显著降低;SA-β-gal染色增加;衰老相关基因的表达增加	建模时间相对较短,重复性好,存活率较高	免疫生化指标与自然衰老小鼠存在差异
	快速老化模型	1年左右 ^[41]	日本京都大学研究人员培育的SAMP快速老化小鼠	被毛无光泽,脱毛,皮肤溃疡,脊柱弯曲;行动迟缓,活动量减少;学习记忆力障碍;增龄性骨质疏松;衰老相关生化指标变化	缩短衰老周期;衰老症状与自然衰老小鼠一致	维系成本较高
	基因衰老模型	不同敲除模型有差异	p21和p53基因敲除;P16基因敲除	被毛无光泽,皮肤弹性下降,消瘦;学习记忆力下降;行动力下降,运动协调能力下降;衰老相关生化指标变化	特异性敲除基因,可研究单个基因对衰老的影响	与自然衰老有差异;成本高
大鼠 Rat	D-半乳糖诱导衰老模型	2.5~3年	定期定量注射D-半乳糖	被毛光泽和皮肤弹性下降,形体消瘦;运动协调性、抗疲劳特性和耐力下降;学习和记忆能力下降;生化指标和神经化学指标出现衰老性变化	实验大鼠在行为学和形态学上与人类自然衰老相似	建模时间较长

注: SA-β-gal, β-半乳糖苷酶; CRISPR/Cas9, 规律成簇间隔短回文重复及其相关核酸酶; SAMP, 快速老化小鼠。
Note: SA-β-gal, senescence-associated β-galactosidase; CRISPR/Cas9, clustered regularly interspaced short palindromic repeats and its associated nuclease; SAMP, senescence accelerated mouse/prone.

命为914 d, 雄性901 d^[25]。与衰老相关的生物标志物至少要在18个月龄后才被检测到^[23], 因此, 大多数自然衰老的小鼠模型都在18个月龄或以上。也有其他年龄的自然衰老小鼠模型, 如27月龄^[26]、88~96周龄^[27]、22月龄^[28-29]、24月龄^[30]。与用于研究衰老的其他模型动物相比, 自然衰老小鼠的建模时间长、实验成本也高。

2.3.2 D-半乳糖诱导衰老模型小鼠

D-半乳糖是一种6碳醛糖, 天然存在于人体和多种食物中^[51]。D-半乳糖在高含量的情况下可通过半乳糖氧化酶的催化转化为醛糖和过氧化氢, 从而产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[52]。ROS的增加可能导致氧化应激、炎症反应、线粒体功能障碍和凋亡, 从而诱导产生衰老症状^[53]。

D-半乳糖致衰老的动物模型是由我国学者龚国清等^[31]于1991年根据代谢紊乱衰老模型构建而成。研究者给3月龄小鼠每天眼球后注射D-半乳糖0.12 mg/g, 连续一个月, 结果发现与同龄鼠相比, D-半乳糖诱导小鼠出现各种衰老表型变化, 这些变化与21月龄鼠接近, 表明该方法可以构建动物衰老模型。之后, 更多的衰老研究使用了该模型。注射D-半乳糖的小鼠表现出认知功能障碍和神经退行性变^[32-33], 免疫反应减弱^[34], 氧化应激加剧^[31], 而且衰老相关基因的表达增加, 标志衰老的 β -半乳糖苷酶阳性染色增加^[35]。

D-半乳糖诱导的衰老模型建模时间相对较短、重复性好, 并且在整个实验期间的存活率较高^[36]。然而, 也有研究者提出, 虽然D-半乳糖诱导衰老模型小鼠的某些指标接近自然衰老小鼠, 但免疫生化指标与自然衰老小鼠存在差异^[37-38]。

2.3.3 快速老化模型小鼠

快速老化小鼠 (senescence accelerated mouse, SAM) 是日本京都大学研究人员培育的一种近交系衰老模型小鼠, 分为正常老化的R系统 (SAMR) 和快速老化的P系统 (SAMP)^[39-40]。SAMP系统在4~6月龄后迅速出现老化特征, 如行动迟缓、脱毛、脊柱弯曲等。SAMR系统则表现为正常衰老, 常作为SAMP的对照。与SAMR相比, SAMP的衰老过程更快, 寿命更短^[41]。SAMP在衰老过程中与年龄相关的病理表型与老年人类相似, 例如SAMP1、P2、P7、P9、P10、P11中的老年淀粉样变性, SAMP6中的老年骨质疏松症, SAMP8和P10中的学习和记忆缺陷等^[42]。SAMP8可用于骨骼肌、神经系统相关的衰老研究; SAMP3可用作

增龄性关节炎研究模型; SAMP6可用于老年骨质研究; SAMP1和SAMP9可用作视觉器官老化模型; SAMP10可作为老年痴呆症模型^[43-44]。

肌少症是一种与年龄相关的全身骨骼肌疾病, 其特征是肌肉质量减少和肌肉功能降低^[55]。与SAMP6和SAMR1相比, SAMP8小鼠骨骼肌更早出现衰老的典型特征^[44]。许多研究已经使用SAMP8小鼠来验证运动干预对肌少症的影响。Takigawa等^[54]使用SAMP8小鼠模型研究长期运动对肌少症的预防效果, 发现25周的跑步机运动后, SAMP8小鼠衰老相关的肌肉功能衰退有所恢复, 表明长期运动锻炼可能有助于预防肌少症。

2.3.4 基因工程小鼠

随着基因技术日渐成熟, 可以通过转基因、基因剔除、基因打靶等技术, 构建需要的实验小鼠模型。在衰老研究中, 大多数研究都使用了基因敲除小鼠^[45]。

p21和p53基因缺失的小鼠模型已用于细胞衰老研究^[46-47]。敲除p53基因可改善衰老表型, 并延长Zmpste24^{-/-}小鼠 (一种早衰小鼠) 的寿命^[47]。敲除p16可产生另一种衰老模型。有研究人员通过药物诱导去除了p16 (Ink4a) 阳性衰老细胞, 设计了一种新型转基因INK-ATTAC小鼠, 研究表明去除衰老细胞能够延长小鼠的寿命和健康期^[48]。

此外, 还有利用其他基因进行衰老研究的小鼠模型, 如白细胞介素10 (interleukin-10, IL-10) 基因缺陷小鼠 (IL10^{tm/m}) 模型。使用92周大的雄性IL-10缺陷 (IL10^{tm/m}) 小鼠, 可以进行老龄身体虚弱研究^[49]。

一般来说, 基因工程可以更快地建立小鼠模型, 但缺点是基因工程小鼠通常不具有自然衰老下观察到的典型特征。而且, 在小鼠中, 一次只能敲除一两个基因, 因此很难理解基因的相互作用^[50]。

2.4 大鼠

大鼠的自然寿命在2.5~3年, 建立自然衰老模型的耗时较长。目前在大鼠衰老研究中, D-半乳糖诱导衰老模型已被广泛使用。大鼠定期定量注射D-半乳糖可产生自然衰老的症状。通常皮下注射D-半乳糖 (每天125~300 mg/kg) 需要持续6~10周, 腹腔注射D-半乳糖 (每天100~300 mg/kg) 需要持续4~7周, 才能够建立稳定的衰老模型^[5]。

D-半乳糖诱导衰老模型的大鼠与人类自然衰老不仅在形态、行为特征上具有高相似度, 而且在分子生

物学水平上也有一致性。*D*-半乳糖诱导衰老大鼠的生化 and 生理变化包括氧化应激、线粒体功能障碍和心脏细胞凋亡。不同研究在*D*-半乳糖使用剂量、持续时间、用药方式、模型评价指标等方面都具有较大差异^[5]。

D-半乳糖诱导衰老大鼠也常被用作运动抗衰老模型,以探索运动对衰老的影响。在这些研究中,首先持续为大鼠腹腔注射*D*-半乳糖,以建立衰老模型(注射时间在4~6周,注射剂量为150~300 mg/kg/d);在此基础上,增加运动干预,主要包括跑步机、游泳等有氧运动^[56-59]。如Ginus等^[56]让*D*-半乳糖诱导衰老大鼠每周在跑步机上跑步4次,持续4周,结果发现*D*-半乳糖可导致大鼠破骨细胞数量增加,而跑步机运动能将其逆转至正常水平。此外,*D*-半乳糖诱导衰老大鼠在长期游泳训练(6~8周)后,也被证明在多方面产生抗衰老作用,包括增强心肌抗衰老功能^[57]、减轻骨骼肌萎缩^[58]、减轻大脑衰老等^[59]。

3 小结及展望

综上,目前已有多种动物模型可以用于衰老研究。线虫、果蝇这类无脊椎动物由于寿命短、结构简单,在研究衰老的分子机制上有一定优势。而大鼠、小鼠由于其基因与人类高度相似,生理结构比线虫和果蝇更为复杂,在衰老研究中可应用的领域更为广泛。*D*-半乳糖诱导衰老模型、基因敲除衰老模型的开发,也为大鼠、小鼠应用于衰老研究缩短了建模时间。最近,国内徐平研究团队在远交群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,随后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(定名为SHJH^{hr});后续研究发现,该突变小鼠在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,而且在生长、发育、繁殖及部分血液学指标上都显示出老化表型,尤其在骨骼和生存期方面出现明显的衰老特征,提示该小鼠有望用于衰老相关研究^[60]。此外,新型脊椎动物模型如绿松石鲟鱼的开发,也进一步缩短了脊椎动物用于衰老研究的周期。各种动物衰老模型有不同的优缺点,在不同研究领域各有应用。建议根据研究目的和研究设计,选择更符合实验需求的动物衰老模型。例如,运动抗衰老研究可以选择骨骼肌系统更接近人体的小鼠、大鼠衰老模型。

在探索衰老的病理和生理机制上,开发及构建衰

老动物模型具有独特的前景。目前,判断动物衰老模型是否建立成功,有一些较为通用的检测指标,如SA- β -gal阳性染色。但由于诱导衰老的因素及相关机制不同,判断衰老模型的各种标志物具有一定局限性。因此,目前用于动物衰老模型检测的最佳生物标志物组合,尚未达成共识,这也使得某些动物衰老模型的可信度和实用性存疑。尽管不同动物在衰老阶段的形态、外观特征有差异,但未来可以在衰老的其他指标上制定一定的标准,例如检测衰老相关蛋白、衰老相关基因水平的变化,以形成动物衰老模型的建模标准。

另一方面,虽然目前已开发出多种应用于衰老研究的动物模型,但由于衰老影响的范围较广,包括神经系统退化、肌肉骨骼退化、生殖能力减退等多方面,某一种动物模型并不能应用于所有方面的衰老研究。而具体到某一领域的衰老研究,可用的动物衰老模型也较为局限。例如研究运动对衰老的影响,需要聚焦于肌肉骨骼系统,无法采用鱼类动物模型,而主要采用大鼠、小鼠衰老模型,但其衰老周期较长。因此,未来研究中可以针对衰老影响的具体领域,开发适用于该领域的动物衰老模型。

[作者贡献 Author Contribution]

尹丹阳查找及筛选相关文献,撰写初稿并修改;
胡怡参与文稿修订,给予修改意见;
史仍飞审核与确定文章主体框架,审核、修改文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] HARPER S, KLIEN E. Forty years of global action on ageing: what has been achieved? [J]. J Popul Ageing, 2022, 15(1):1-5. DOI:10.1007/s12062-022-09362-w.
 - [2] IZQUIERDO M, MERCHANT R A, MORLEY J E, et al. International exercise recommendations in older adults (ICFSR): expert consensus guidelines[J]. J Nutr Health Aging, 2021, 25(7):824-853. DOI:10.1007/s12603-021-1665-8.
 - [3] BILSKI J, PIERZCHALSKI P, SZCZEPANIK M, et al. Multifactorial mechanism of sarcopenia and sarcopenic obesity. Role of physical exercise, microbiota and myokines [J]. Cells, 2022, 11(1):160. DOI:10.3390/cells11010160.
 - [4] KRITSILIS M, RIZOU S V, KOUTSOUDAKI P N, et al. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 2937. DOI:10.3390/ijms19102937.
 - [5] 赵凡凡, 周玉枝, 高丽, 等. *D*-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展 [J]. 药学报, 2017, 52(3):347-354. DOI:10.16438/j.0513-4870.2016-0696.
- ZHAO F F, ZHOU Y Z, GAO L, et al. Advances in the study of

- the rat model of aging induced by *D*-galactose[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 52(3):347-354.
- [6] BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 1974, 77(1):71-94. DOI:10.1093/genetics/77.1.71.
 - [7] COLLINS J J, HUANG C, HUGHES S, et al. The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*[J]. *WormBook*, 2008: 1-21. DOI: 10.1895/wormbook.1.137.1.
 - [8] PIPER M D W, PARTRIDGE L. *Drosophila* as a model for ageing[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(9 Pt A):2707-2717. DOI:10.1016/j.bbadis.2017.09.016.
 - [9] CHINTAPALLI V R, WANG J, DOW J A T. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(6): 715-720. DOI: 10.1038/ng2049.
 - [10] DEMONTIS F, PERRIMON N. FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging[J]. *Cell*, 2010, 143(5): 813-825. DOI: 10.1016/j.cell.2010.10.007.
 - [11] OCORR K, PERRIN L, LIM H Y, et al. Genetic control of heart function and aging in *Drosophila*[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(5):177-182. DOI:10.1016/j.tcm.2007.04.001.
 - [12] TISSENBAUM H A. Using *C. elegans* for aging research[J]. *Invertebr Reprod Dev*, 2015, 59(Sup1): 59-63. DOI: 10.1080/07924259.2014.940470.
 - [13] KISHI S, UCHIYAMA J, BAUGHMAN A M, et al. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence[J]. *Exp Gerontol*, 2003, 38(7):777-786. DOI:10.1016/s0531-5565(03)00108-6.
 - [14] GILBERT M J H, ZERULLA T C, TIERNEY K B. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age[J]. *Exp Gerontol*, 2014, 50:106-113. DOI:10.1016/j.exger.2013.11.013.
 - [15] KIKUCHI K. Dedifferentiation, transdifferentiation, and proliferation: mechanisms underlying cardiac muscle regeneration in zebrafish[J]. *Curr Pathobiol Rep*, 2015, 3(1):81-88. DOI:10.1007/s40139-015-0063-5.
 - [16] ANCHELIN M, ALCARAZ-PÉREZ F, MARTÍNEZ C M, et al. Premature aging in telomerase-deficient zebrafish[J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6(5):1101-1112. DOI:10.1242/dmm.011635.
 - [17] GENADE T, BENEDETTI M, TERZIBASI E, et al. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research[J]. *Aging Cell*, 2005, 4(5):223-233. DOI:10.1111/j.1474-9726.2005.00165.x.
 - [18] VALENZANO D R, TERZIBASI E, GENADE T, et al. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(3): 296-300. DOI:10.1016/j.cub.2005.12.038.
 - [19] GEYFMAN M, ANDERSEN B. Clock genes, hair growth and aging (Albany NY)[J]. *Aging*, 2010, 2(3):122-128. DOI:10.18632/aging.100130.
 - [20] HARTMANN N, REICHWALD K, LECHER A, et al. Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*[J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(5):290-296. DOI:10.1016/j.mad.2009.01.003.
 - [21] HAREL I, BENAYOUN B A, MACHADO B, et al. A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate[J]. *Cell*, 2015, 160(5):1013-1026. DOI:10.1016/j.cell.2015.01.038.
 - [22] HU C K, BRUNET A. The African turquoise killifish: a research organism to study vertebrate aging and diapause[J]. *Aging Cell*, 2018, 17(3): e12757. DOI:10.1111/ace1.12757.
 - [23] DUTTA S, SENGUPTA P. Men and mice: relating their ages[J]. *Life Sci*, 2016, 152:244-248. DOI:10.1016/j.lfs.2015.10.025.
 - [24] MITCHELL S J, SCHEIBYE-KNUDSEN M, LONGO D L, et al. Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases[J]. *Annu Rev Animal Biosci*, 2015, 3:283-303. DOI:10.1146/annurev-animal-022114-110829.
 - [25] YUAN R, PETERS L L, PAIGEN B. Mice as a mammalian model for research on the genetics of aging[J]. *ILAR J*, 2011, 52(1):4-15. DOI:10.1093/ilar.52.1.4.
 - [26] GUO Y T, NIU K J, OKAZAKI T, et al. Coffee treatment prevents the progression of sarcopenia in aged mice *in vivo* and *in vitro*[J]. *Exp Gerontol*, 2014, 50: 1-8. DOI: 10.1016/j.exger.2013.11.005.
 - [27] LEDUC-GAUDET J P, PICARD M, ST-JEAN PELLETIER F, et al. Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(20):17923-17937. DOI:10.18632/oncotarget.4235.
 - [28] CAMPOREZ J P G, PETERSEN M C, ABUDUKADIER A, et al. Anti-myostatin antibody increases muscle mass and strength and improves insulin sensitivity in old mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(8): 2212-2217. DOI: 10.1073/pnas.1525795113.
 - [29] KOVACHEVA E L, SINHA HIKIM A P, SHEN R Q, et al. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH₂-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(2):628-638. DOI:10.1210/en.2009-1177.
 - [30] SELDEEN K L, LASKY G, LEIKER M M, et al. High intensity interval training improves physical performance and frailty in aged mice[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2018, 73(4):429-437. DOI:10.1093/gerona/glx120.
 - [31] 龚国清, 徐赓本. 小鼠衰老模型研究[J]. *中国药科大学学报*, 1991, 22(2):101-103.
 - [32] GONG G Q, XU F B. Study of aging model in mice[J]. *J China Pharm Univ*, 1991, 22(2):101-103.
 - [33] SHEN Y X, XU S Y, WEI W, et al. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with *D*-galactose[J]. *J Pineal Res*, 2002, 32(3):173-178. DOI:10.1034/j.1600-079x.2002.10850.x.
 - [34] XU X H, ZHAO T Q. Effects of puerarin on *D*-galactose-induced memory deficits in mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(7):587-590.
 - [35] SHANG Y Z, GONG M Y, ZHOU X X, et al. Improving effects of SSF on memory deficits and pathological changes of neural and immunological systems in senescent mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12):1078-1083.
 - [36] SHWE T, PRATCHAYASAKUL W, CHATTIPAKORN N, et al. Role of *D*-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions[J]. *Exp Gerontol*, 2018, 101: 13-36. DOI:10.1016/j.exger.2017.10.029.

- [36] CEBE T, ATUKEREN P, YANAR K, et al. Oxidation scrutiny in persuaded aging and chronological aging at systemic redox homeostasis level[J]. *Exp Gerontol*, 2014, 57: 132-140. DOI: 10.1016/j.exger.2014.05.017.
- [37] 秦红兵, 杨朝晖, 范忆江, 等. *D*-半乳糖诱导衰老小鼠模型的建立与评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(7):1275-1278. QIN H B, YANG Z Y, FAN Y J, et al. Establishment and evaluation of aging models induced by *D*-galactose in mice [J]. *Clin J Rehabil Tissue Eng Res*, 2009, 13(7):1275-1278.
- [38] AZMAN K F, ZAKARIA R. *D*-Galactose-induced accelerated aging model: an overview[J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6):763-782. DOI:10.1007/s10522-019-09837-y.
- [39] TAKEDA T, HOSOKAWA M, TAKESHITA S, et al. A new murine model of accelerated senescence[J]. *Mech Ageing Dev*, 1981, 17(2):183-194. DOI:10.1016/0047-6374(81)90084-1.
- [40] TAKEDA T, HOSOKAWA M, HIGUCHI K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence[J]. *Exp Gerontol*, 1997, 32(1-2): 105-109. DOI: 10.1016/s0531-5565(96)00036-8.
- [41] CHIBA Y, SHIMADA A, KUMAGAI N, et al. The senescence-accelerated mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(4):679-687. DOI:10.1007/s11064-008-9812-8.
- [42] TAKEDA T, MATSUSHITA T, KUROSUMI M, et al. Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM) [J]. *Exp Gerontol*, 1997, 32(1-2):117-127. DOI:10.1016/S0531-5565 (96)00068-X.
- [43] TAKEDA T. Senescence-accelerated mouse (SAM): with special reference to age-associated pathologies and their modulation[J]. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 1996, 51(2): 569-578. DOI:10.1265/jjh.51.569.
- [44] DERAIVE W, EIJNDE B O, RAMAEKERS M, et al. Soleus muscles of SAMP8 mice provide an accelerated model of skeletal muscle senescence[J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(7):562-572. DOI:10.1016/j.exger.2005.05.005.
- [45] HERRANZ N, GIL J. Mechanisms and functions of cellular senescence[J]. *J Clin Investig*, 2018, 128(4): 1238-1246. DOI: 10.1172/jci95148.
- [46] BENSON E K, ZHAO B, SASSOON D A, et al. Effects of p21 deletion in mouse models of premature aging[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(13):2002-2004. DOI:10.4161/cc.8.13.8997.
- [47] VARELA I, CADIÑANOS J, PENDÁS A M, et al. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation[J]. *Nature*, 2005, 437(7058):564-568. DOI:10.1038/nature04019.
- [48] BAKER D J, WIJSHAKE T, TCHKONIA T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders[J]. *Nature*, 2011, 479(7372): 232-236. DOI: 10.1038/nature10600.
- [49] AKKI A, YANG H L, GUPTA A, et al. Skeletal muscle ATP kinetics are impaired in frail mice[J]. *AGE*, 2014, 36(1):21-30. DOI:10.1007/s11357-013-9540-0.
- [50] XIE W Q, HE M, YU D J, et al. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12(3):538-554. DOI:10.1002/jcsm.12709.
- [51] ACOSTA P B, GROSS K C. Hidden sources of galactose in the environment[J]. *Eur J Pediatr*, 1995, 154(7 Suppl 2): S87-S92. DOI:10.1007/BF02143811.
- [52] WU D M, LU J, ZHENG Y L, et al. Purple sweet potato color repairs *D*-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2008, 90(1): 19-27. DOI: 10.1016/j.nlm.2008.01.010.
- [53] ULLAH F, ALI T, ULLAH N, et al. Caffeine prevents *D*-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain[J]. *Neurochem Int*, 2015, 90: 114-124. DOI: 10.1016/j.neuint.2015.07.001.
- [54] TAKIGAWA K, MATSUDA R, UCHITOMI R, et al. Effects of long-term physical exercise on skeletal muscles in senescence-accelerated mice (SAMP8)[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(3): 518-524. DOI: 10.1080/09168451.2018.1547625.
- [55] XIE W Q, HE M, YU D J, et al. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12(3):538-554. DOI:10.1002/jcsm.12709.
- [56] PARTADIREDDA G, KARIMA N, UTAMI K P, et al. The effects of light and moderate intensity exercise on the femoral bone and cerebellum of *D*-galactose-exposed rats[J]. *Rejuvenation Res*, 2019, 22(1):20-30. DOI:10.1089/rej.2018.2050.
- [57] CHEN W K, TSAI Y L, SHIBU M A, et al. Exercise training augments Sirt1-signaling and attenuates cardiac inflammation in *D*-galactose induced-aging rats[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(12):4166-4174. DOI:10.18632/aging.101714.
- [58] FAN J J, YANG X Q, LI J, et al. Spermidine coupled with exercise rescues skeletal muscle atrophy from *D*-gal-induced aging rats through enhanced autophagy and reduced apoptosis via AMPK-FOXO3a signal pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11):17475-17490. DOI:10.18632/oncotarget.15728.
- [59] KOU X J, LI J, LIU X R, et al. Swimming attenuates *D*-galactose-induced brain aging via suppressing miR-34a-mediated autophagy impairment and abnormal mitochondrial dynamics[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2017, 122(6): 1462-1469. DOI:10.1152/jappphysiol.00018.2017.
- [60] 唐慧青, 常书福, 于志锋, 等. SHJH^{hr}小鼠部分生物学特性及衰老表型的测定与分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(1): 44-52. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.069.
- TANG H Q, CHANG S F, YU Z F, et al. Investigation on biological characteristics and aging phenotype of SHJH^{hr} mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(1): 44-52. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.069.

(收稿日期:2022-06-29 修回日期:2022-09-22)

(本文编辑:张俊彦,丁宇菁,富群华,姜欣怡)

引用本文

尹丹阳, 胡怡, 史仍飞. 动物衰老模型的研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(2): 156-162. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.094.

YIN D Y, HU Y, SHI R F. Advances in animal aging models[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2): 156-162. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.094.

肾脏间质纤维化动物模型的研究进展

赖 灿¹, 李乐乐¹, 胡塔拉¹, 孟 彦²

(1. 内蒙古医科大学研究生院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学附属医院肾内科, 呼和浩特 010050)

[摘要] 肾脏间质纤维化是许多肾脏疾病不断进展的共同路径。不管是各种慢性肾脏病, 或是各种因素所引起的无法完全恢复的急性肾损伤, 其进展过程多数是在经过肾脏间质纤维化后进入终末期肾功能衰竭。肾脏间质纤维化的动物模型是探索肾脏间质纤维化发生机制和新诊断治疗方法的主要研究工具。不同的动物模型各有特色, 研究者可依据个人经验及实验目的建立不同的模型, 并以此为基础开展科学研究, 为肾脏疾病的防治提供更多新方法、新思路。本文着重综合阐述目前常见的几种肾脏间质纤维化动物模型, 包括单侧输尿管梗阻、缺血-再灌注损伤、肾大部切除、微栓塞诱导形成的手术模型, 环孢素A、阿霉素、马兜铃酸、氯化汞、庆大霉素、马兜铃酸、顺铂、腺嘌呤诱导形成的化学模型, 转基因杂交、肾损伤因子-1诱导形成的转基因修饰模型, 双侧缺血-再灌注损伤联合庆大霉素、单侧肾切除联合血管紧张素II、单侧缺血-再灌注损伤联合pLVX-shTNC质粒诱导形成的复合模型, 以供相关研究人员了解和借鉴。

[关键词] 肾脏间质纤维化; 动物模型; 慢性肾脏病; 急性肾损伤

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0163-10



Recent Advances of Animal Models of Renal Interstitial Fibrosis

LAI Can¹, LI Lele¹, HU Tala¹, MENG Yan²

(1. Graduate School of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Division of Nephrology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

Correspondence to: MENG Yan (ORCID: 0000-0002-9236-5546), E-mail: mbao124@qq.com

[ABSTRACT] Renal interstitial fibrosis is a common pathway in the progression of many renal diseases. Whether it is chronic kidney disease or acute kidney injury that cannot be fully recovered, the progression process mostly enters end-stage renal failure after renal interstitial fibrosis. The animal model of renal interstitial fibrosis is an important research tool for exploring the pathogenesis of renal interstitial fibrosis and new diagnostic and treatment methods. Different animal models have their own characteristics. Researchers can establish different models based on their own experience and experimental purposes, and carry out scientific research on this basis to provide more new methods for the prevention and treatment of kidney diseases. The authors focused on several common animal models of renal interstitial fibrosis to provide the reference for related researchers, including surgical models induced by unilateral ureteral obstruction, ischemia-reperfusion injury, 5/6 nephrectomy, and microembolization; chemical models induced by cyclosporine A, adriamycin, aristolochic acid, mercuric chloride (HgCl₂), gentamicin, cisplatin, and adenine; transgenic hybridization and kidney injury molecule 1 (KIM-1) induced transgenic modification model; composite model induced by bilateral ischemia-reperfusion injury (BIRI) combined with gentamicin, unilateral nephrectomy combined with angiotensin II (Ang II), and unilateral ischemia-reperfusion injury (UIRI) combined with pLVX-shTNC plasmid.

[Key words] Renal interstitial fibrosis; Animal model; Chronic kidney disease; Acute kidney injury

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目“组蛋白去乙酰化酶Sirt6通过Wnt/ β -Catenin信号通路对慢性肾脏病肾性骨病的控制作用及机制研究”(81960143); 内蒙古自治区自然科学基金项目“RNA m6A甲基化在慢性肾脏病肾小管间质纤维化中的作用及机制研究”(2022MS08063); 内蒙古医科大学“致远”人才计划-“治学”人才项目(ZY0130015)

[第一作者] 赖 灿(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 胃肠疾病、慢性肾脏病。E-mail: 1353837956@qq.com

[通信作者] 孟 彦(1983—), 男, 博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 慢性肾脏病、血液透析。E-mail: mbao124@qq.com。ORCID: 0000-0002-9236-5546

肾脏间质纤维化 (renal interstitial fibrosis) 是各种慢性肾脏病 (chronic kidney disease) 进展, 或急性肾损伤 (acute kidney injury) 后在肾脏损伤未能完全恢复时转化为慢性肾脏病并进一步发展的病理过程之一。人们普遍认为, 肾脏间质纤维化是慢性肾脏病进行性进展的关键因素之一, 并逐渐改变肾脏基础生理结构^[1-2]。细胞外基质在肾间质中过度聚集、肾小管的萎缩, 以及各种炎性细胞浸润、肾小管上皮细胞和肾脏间质成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化, 都是肾脏损伤的典型病变特征, 并且肾脏纤维化过程不可逆转^[1,3-5], 最终患者不可逆地走向肾功能衰竭, 正常工作生活被严重干扰, 社会经济负担也因此增加。慢性肾脏病是导致非传染性疾病发病和死亡的重要因素^[6], 据全球疾病负担 (global burden of disease, GBD) 数据统计, 2017 年全球慢性肾脏病患者率达 9.1%。肾脏间质纤维化产生机制复杂, 一直以来各种动物实验研究对于揭示肾脏间质纤维化的病理特征和分子机制都起到至关重要的作用。因此, 选择构建较理想的肾脏间质纤维化动物模型, 对研究肾脏间质纤维化的发生机制、诊断、防治以及延缓其进一步发展等都有着非常重大的意义。目前, 肾脏间质纤维化主要动物模型包括手术诱导模型、药物诱导模型、转基因修饰模型、复合模型。每个模型各有其特点, 以适用不同的实验要求, 下文就其特点逐一展开描述分析。

1 手术诱导的肾脏间质纤维化模型

手术类诱导的动物模型是通过手术方式减少或阻断肾脏组织参与正常的代谢过程, 使肾脏组织被动失代偿, 从而构建肾脏间质纤维化动物模型。其主要有三种经典模型, 即单侧输尿管梗阻模型、缺血-再灌注模型和肾大部切除模型, 以及它们的一些改进型。除此之外, 还有肾微栓塞加部分肾切除的手术模型。

1.1 单侧输尿管梗阻模型

单侧输尿管梗阻模型广泛应用于梗阻性肾脏疾病的研究, 是目前研究肾脏间质纤维化的经典模型之一。造模方法: 大鼠腹腔注射麻醉, 在左肾门附近切开腹腔, 分离并结扎左输尿管, 然后闭合腹腔。结扎术后 2 周, 检测发现其血肌酐 (blood creatinine, Scr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平较对照组明显升高^[7]。结扎肾因尿流受阻、压力升高引起缺血缺氧, 导致肾小管间质损伤。单侧输尿管梗阻模型的主要特点是肾小管扩张、间质增生、近端肾小管大量损

伤、肾脏积水、白细胞浸润、肾小管上皮细胞死亡以及成纤维细胞增生^[8], 从而导致肾脏瘢痕形成, 间质纤维化。单侧输尿管梗阻模型建立的优势是: 操作较为简单, 技术成熟; 周期短, 肾结扎术后一周可发生肾脏间质纤维化; 存活率高, 可操作空间大。

除经典的单侧输尿管梗阻模型外, 可逆性单侧输尿管梗阻 (reversible unilateral ureteral obstruction, RUUO) 模型^[9-13]以及改进型 RUUO 模型^[9,12]也有研究者在探索应用。如 Song 等^[9,12]用小鼠先建立单侧输尿管梗阻模型, 术后 3~7 d 通过再植方式构建 RUUO 模型。建立单侧输尿管梗阻模型时, 从下腹中线开腹, 暴露左输尿管, 并在膀胱上方不远处结扎左输尿管两次, 两次结扎间隔一段距离, 然后离断, 关腹; 术后 3 d 或 7 d 再次从原切口进入腹腔, 找到之前左输尿管用 7/0 黑线结扎的粗大梗阻端, 用带侧孔的 20 mL 注射器针头从膀胱前壁穿透到后壁, 同时将之前连接在左输尿管中的线固定在针头侧孔中, 然后注射器针头以相反的方向从膀胱中取出; 输尿管的末端使用微血管钳固定在膀胱前壁, 再用 10/0 黑线将输尿管末端间断缝合到膀胱后壁, 缝合后在其结扎线下方 5 mm 处的输尿管壁切开一个小口, 使尿液从中流出。用输尿管再植加置管方式构建改进型 RUUO 模型: 缝合输尿管到膀胱后壁, 并开口见尿液流出, 与上述 RUUO 相同; 随后在胰岛素针的引导下, 将直径为 6~9 mm 的 PTFE 管推入输尿管腔, 其中管口暴露 1~2 mm, 在输尿管和聚四氟乙烯管的末端作为一个整体放回膀胱, 然后缝合膀胱前壁, 用盐水冲洗腹腔后关腹。RUUO 模型即在建立单侧输尿管梗阻模型一段时间后解除梗阻, 恢复尿路通畅再进行相关研究。

RUUO 模型主要用于研究尿路梗阻缓解后肾脏结构和功能的恢复情况, 更接近临床尿路梗阻疾病的特点^[9]; 该模型构建也不复杂, 可重复, 可靠性高。梗阻后再通的间隔时间需要研究人员根据自己的经验及研究内容进行摸索调整。但近期有研究认为, RUUO 后肾功能的快速恢复不能反映肾组织的实际恢复情况, 梗阻后诱导形成的慢性肾脏病在恢复时具有组织持续损伤、纤维化和肾单位丢失的特征, 但不能反映在肾功能的测量标准中^[11]。

1.2 缺血-再灌注模型

各种因素所致的急性肾损伤是一种可迁延发展为慢性肾脏病却易被忽略的慢性肾脏病病因。缺血性急性肾损伤 (ischemic acute kidney injury, IAKI) 是急性

肾损伤的主要分型,其可致肾脏毛细血管永久性损伤,并向慢性肾衰竭方向进展^[14],也是导致肾脏缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)的主要原因之一。

IRI模型包括双侧缺血-再灌注损伤(bilateral ischemia-reperfusion injury, BIRI)模型、单侧缺血-再灌注损伤(unilateral ischemia-reperfusion injury, UIRI)模型、单侧IRI加对侧肾切除术(unilateral IRI with contralateral nephrectomy, uIRIx)模型。建立UIRI和BIRI模型时,不同实验目的和不同造模动物的具体造模时间差异较大,但其基本路径相同。造模方法:使用血管夹,夹闭小鼠或大鼠的单侧或双侧肾蒂至少10 min,随后松开血管夹以诱导缺血-再灌注损伤,术后1~6周可成模。Yang等^[15]通过UIRI手术(夹闭左侧肾蒂30 min)2 d后再切除8~10周雄性BALB/c小鼠对侧肾脏,术后2~3 d建立uIRIx模型,用以模拟急性肾损伤。其研究表明,肾损伤后近端肾小管G₂/M细胞周期的停滞导致促纤维化因子的异常扩增,也是急性肾损伤与慢性进行性纤维化肾病之间的机制联系。短时间夹闭肾蒂可模拟急性肾损伤,以及急性肾损伤后向慢性肾脏病的演化探究。长时间夹闭肾蒂可直接形成肾脏纤维化,如左侧肾蒂夹闭50 min后松开恢复血供,术后10周肉眼可见SD大鼠肾脏体积增大,肾脏表面不再光滑,粗糙呈颗粒样、凹凸不平,肾脏组织明显纤维化^[16]。

目前有学者认为,急性肾损伤后肾脏功能不能完全恢复,也称适应性不良修复,可导致肾脏长期功能缺陷并逐渐演化成慢性肾脏病^[17-19]。研究表明,UIRI可用作研究急性肾损伤发展为慢性肾脏病过程的合适动物模型,纤维化相关基因(如ColII、TGF β 、CCN2、CCN3)的表达量随着缺血持续时间和实验中动物核心体温的增加而增多^[20]。无论哪种模型,严格控制肾缺血的时间至关重要。研究者可依据研究对象及目的进行调整,模拟出相似病情的肾脏纤维化演化路径及其结果并对之进行研究。但IRI模型操作复杂^[20-21],可重复性差,尤其是BIRI模型控制难度大。uIRIx模型对缺血程度有较高的耐受性,常用于长期模型的建立。

1.3 肾大部切除模型

肾大部切除(5/6 nephrectomy, 5/6Nx)模型造模方法:小鼠或大鼠麻醉后,切去左肾外缘及其上下两极共约2/3组织,约1周后再切除右肾,术后残留约1/6肾组织。由于术后残肾血流量骤降,肾间质代偿性增

殖,系膜细胞和系膜基质增生,从而引起肾小球硬化,以及相应的肾小管灶状萎缩减少,最后形成肾脏间质纤维化^[22],其Scr、BUN和尿蛋白水平均显著升高。该模型的建立技术已经比较成熟,成功率较高,故目前5/6 Nx模拟人类肾功能损失后的肾衰竭动物模型已广泛应用于慢性肾脏病研究。

此外,改良的5/6 Nx模型^[23-24]也有应用,具体造模方法:手术结扎左肾上下极,1周后切除右肾。相较于传统的5/6 Nx模型,该方法具有更省时、出血少、存活率更高、重复性好的特点^[24]。近期有研究者探究出存活率更高的基于结扎的5/6肾切除手术(5/6 nephrectomy based on ligation, l-PNx)新模型,具体的造模方法:手术切除小鼠右肾1周后直接结扎左肾上下极,导致结扎的左肾上下极坏死^[25]。l-PNx模型术后4周及12周的总体病理表现比传统的5/6Nx模型更严重,大鼠肾脏 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、胶原蛋白I和胶原蛋白III表达水平更高,在研究慢性肾脏病的肾纤维化方面更有优势^[25]。

1.4 其他手术模型

除上述较为经典的3种模型外, Kimura等^[26]在1999年建立了微栓塞导致的进行性慢性肾衰竭大鼠模型,其造模方法:戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉12周龄大鼠后取下右肾,随后通过左肾动脉尾部注射丙烯酸微球(直径20~30 μ m),注射时夹闭主动脉尾部、肠系膜前动脉和腹腔动脉,以确保微球流入左肾动脉;这些丙烯酸微球阻塞了血管极附近的肾小球前小动脉和肾小球内毛细血管,导致血压升高,术后2~12周可诱导尿白蛋白排泄量、Scr和血总胆固醇浓度增加,血清白蛋白则降低,后期可见肾小管基底膜增厚、管腔扩张和肾脏间质纤维化等病理改变^[26]。近期Bersani等^[27]修改了Kimura等^[26]的模型,其造模方法:110~120日龄大鼠经腹膜内注射硫喷妥钠(45 mg/kg)麻醉后进行腹腔镜手术,夹闭腹腔、肠系膜、对侧肾脏和主动脉远端区域,以保证血流仅在左肾动脉中流动,在左肾动脉口前的区域滴注含有聚甲基丙烯酸甲酯微球(直径20~27 μ m)的生理盐水(0.8 mg/0.2 mL),随后切除右肾;术后30、60、90 d进行验证,分析不同肾病进展阶段血管、肾小球、肾小管和间质的表现。在此基础上,可发展用于评价药物的长期效果及其不良反应。肾微栓塞引起的早期血管损伤可能是实验模

型中慢性肾脏病进展的重要触发阶段, 且该模型有很好的重复性^[27]。

2 药物诱导的肾脏间质纤维化模型

在生活与医疗环境中接触和使用环孢素A、阿霉素、庆大霉素、马兜铃酸、顺铂、腺嘌呤、汞及其化合物, 以及血管紧张素II (angiotensin II, Ang II)、叶酸、镇痛药、酪氨酸等一系列化学物质均可使肾脏间质产生不同程度的纤维化。因此, 药物诱导的肾脏间质纤维化模型主要有环孢素A模型、阿霉素模型、马兜铃酸模型、氯化汞模型、庆大霉素模型、顺铂模型、腺嘌呤诱导高尿酸肾病模型等。下文具体描述各模型特征。

2.1 环孢素A模型

环孢素A (cyclosporine A) 模型是由Rosen等^[28]用皮下注射环孢素A的方式所构建的一种慢性肾脏毒性动物模型。造模方法: 大鼠或小鼠腹腔注射环孢素A ($15 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 持续约2~4周^[29-30]。用药后可通过检测大鼠肾病理改变及其BUN、Scr等水平变化来检验造模情况。

环孢素A是由十一个氨基酸组成的环状多肽, 其作为一种强效免疫抑制剂, 目前在临床上多使用于肝脏、心脏、肺、肾等器官移植术后, 在一定程度上可提高患者的生存率。肾脏毒性是环孢素A最主要的不良反应, 长期使用环孢素A后可表现为肾脏机能的进行性降低, 以及肾小管和肾血管等组织的不可逆损伤^[29-31]。环孢素A引起肾脏间质纤维化的主要过程是肾小血管收缩, 肾小管基底膜萎缩, 上皮细胞损伤变性、坏死等, 肾间质炎症, 肾慢性缺血, 成纤维细胞迁移并释放出大量的细胞外基质, 从而促使纤维化的发生发展^[29-35]。

但该模型制作费用昂贵, 且环孢素A具有肝毒性, 在一定程度上影响了该模型的可靠性, 限制了其应用, 故环孢素A模型更适用于肝肾纤维化复合损伤模型。

2.2 阿霉素模型

阿霉素 (adriamycin) 造模方法: 大鼠尾静脉注射阿霉素 ($2 \sim 12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 约2~7周。有部分研究者在该模型上对药物作用进行评估^[36-37], 但由于阿霉素的毒性高, 若注射时有溢出或渗透出血管外, 易导致周边组织损伤坏死、溃烂、炎症等, 影响数据的判断。而且目前对于阿霉素模型缺乏较为统一的评判标准, 各研究者使用的造模方法及其评价指标不太一致。

阿霉素是一种抗癌谱广泛的含醌的蒽环类化学治

疗药物。它经由肾脏代谢后被还原成半醌型自由基, 并在各类脂质介质影响下引发肾小球损伤, 逐渐发展成肾病综合征, 并逐步恶化, 导致肾小管萎缩、肾间质炎症, 最终形成肾纤维化。研究表明, 阿霉素模型在用于模拟人类罹患微小病变性肾病综合征和局灶节段性肾小球硬化型肾病综合征后所发展的肾脏纤维化模型具有比较高的可靠性^[36-39]。

目前有研究者在阿霉素模型的基础上, 结合代谢组学、生物信息学、网络药理学等, 探索肾脏疾病的可能作用机制及其潜在生物学靶点^[36,40-41]。其研究结果表明, 左旋肉碱、溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LysoPC) (20:3)、鞘磷脂 (sphingomyelin, SM) (d18:1/16:0) 等22种代谢物与肾损伤相关^[41]; 修复性脂质介质合成中间体 (14S-hydroxy-docosahexaenoic acid, 14S-HDHA)、二吡啶甲酸 (dipicolinic acid, DPA)、二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 等7种代谢物与早期肾损伤有关, 而色氨酸、亚油酰肉碱、LysoPC (18:3) 等12种代谢物则反映了晚期肾病^[36]。

2.3 马兜铃酸模型

马兜铃酸 (aristolochic acid) 造模方法: 小鼠腹腔注射马兜铃酸 ($2.5 \sim 3 \text{ mg/kg}$), 每周1~2次, 持续4~10周^[42-43]。小鼠腹腔注射马兜铃酸后, 体重显著减少, 出现肾萎缩、肾功能下降和肾小管间质纤维化, 并且诱导肾纤维化相关基因的表达水平升高, 加快细胞衰老、线粒体功能障碍及其肾脏中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的积累, 降低肾脏抗衰老基因Klotho的表达^[42]。

马兜铃酸是一种硝基菲羧酸, 2017年被世界卫生组织列入致癌清单中。这类有机化合物天然存在于马兜铃科植物中, 其中有些植物曾被作为中药材参与中药的炮制。不合理或长期服用此类药材可导致肾脏进行性损伤、肾间质炎症、肾间质纤维化等, 即马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy, AAN)。因此, 用马兜铃酸建立的肾病模型用以研究以上病变更符合临床病理特点。

马兜铃酸构建的各种肾脏毒性模型, 多用以诱导慢性肾脏间质纤维化, 也可诱导急性肾损伤疾病、肾间质炎症等。如Wang等^[44]通过连续给C57BL/6小鼠腹腔注射马兜铃酸I钠盐 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 5 d诱导建立以急性肾小管损伤为主要特征的AAN模型。但用马兜铃酸建立的肾脏间质纤维化模型普遍需要8周, 造模周期较长, 费用较为昂贵。

2.4 氯化汞模型

氯化汞 (HgCl_2) 造模方法: 大鼠口服 HgCl_2 ($8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 持续9周^[45]。汞及其化合物的主要靶器官之一是肾脏, 除了生活中接触外, 人类等高层食物链中也容易聚集, 摄入后累积造成肾脏损伤。

长期接触或使用 HgCl_2 会产生肾皮质毒性作用, 主要表现为肾小球硬化、急性肾小管坏死和肾间质炎性细胞浸润, 最终导致肾间质纤维化^[46]。但由于 HgCl_2 的高毒性, 剂量把握不当易致大鼠死亡, 故造模前进行不同浓度梯度的预实验极为重要。短时间使用高剂量的 HgCl_2 造模可以引起急性肾损伤^[47], 后期可进展为肾脏间质纤维化。

2.5 庆大霉素模型

庆大霉素 (gentamicin) 造模方法: 小鼠或大鼠皮下注射庆大霉素 ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 约7~9 d^[48-49]。造模后检测发现大鼠尿量显著增加至对照值的2倍, 尿渗透压降低至一半, 尿液浓缩功能明显受损, 其Scr为6 mg/L, 较对照组的2 mg/L明显升高^[48]。

庆大霉素是一种氨基糖苷类抗生素, 其不良反应主要表现为肾脏毒性, 故目前在临床上很少使用, 早期多表现为急性肾损伤, 尤其在短期大剂量使用庆大霉素时, 后期可逐渐进展为肾脏间质纤维化及肾功能障碍等。目前研究认为, 大部分急性肾损伤患者临床治愈或病情缓解后会出现肾间质胶原蛋白积累的隐匿过程, 部分迁延为慢性肾脏病并最终进展至慢性肾功能衰竭。故现在庆大霉素多用于建立以急性肾损伤为基础的动物模型, 并在其基础上进行肾脏间质纤维化及慢性肾脏病的研究。如Huang等^[48]给C57BL/6J小鼠腹腔注射庆大霉素 ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 7 d建立急性肾损伤模型, 发现急性肾损伤涉及集合管的程序性坏死, 并介导肾功能障碍、炎症和纤维化。Albino等^[49]给雄性Wistar大鼠皮下注射庆大霉素 ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 9 d建立急性肾损伤模型, 庆大霉素建模后分别在第1、30和180 d对大鼠进行研究, 观察急性肾损伤后向肾纤维化和慢性肾脏病演化过程。

2.6 顺铂模型

顺铂造模方法: 小鼠腹腔注射顺铂 (18 mg/kg), 共一次, 3 d后检测发现其Scr、BUN较对照组明显升高^[50]。顺铂作为一种广谱强效抗癌药物, 广泛应用于各种肿瘤的联合化疗中。该药物溶于水后, 水分子取代其氯离子, 从而激活其细胞内生物活化, 随后与DNA结合, 引起交叉联结, 破坏DNA的功能, 并抑制细胞有丝分裂, 是一种细胞非特异性药物。但顺铂的

抗癌作用缺乏特异性, 肾毒性是限制顺铂临床应用的关键因素之一。顺铂诱导急性肾损伤产生的标志是近端肾小管细胞的死亡和炎症。癌症患者经过顺铂治疗后有20%~40%出现急性肾损伤^[51]。顺铂在肾脏中主要通过线粒体氧化应激、炎症、直接损伤等多种途径促进近端肾小管细胞的损伤、死亡以及凋亡^[52], 其中膜转运蛋白 (CTR1、CTR2、ATP7A、ATP7B和OCT2等) 在介导细胞摄取顺铂的过程中发挥重要作用^[53], 这种作用因肾脏的排泄功能而被放大。顺铂的肾毒性具有累积性和剂量依赖性^[54]。高剂量或多次累积较大剂量的用药方式均会产生不可逆的肾功能损伤, 严重时甚至出现急性肾小管坏死、尿毒症、肾衰竭^[50-51,55]。顺铂的毒性较强, 且缺乏特异性; 因此, 该种造模方式难度较大, 较难把控剂量, 致死率高。

2.7 腺嘌呤诱导高尿酸肾病模型

造模方法: 大鼠灌胃腺嘌呤 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 共4周, 随后检测发现其Scr、BUN水平明显较对照组升高; 并且肉眼可见肾脏颜色暗黄, 表面有明显结晶颗粒状, HE染色见肾小管无序排列^[56]。腺嘌呤是4种核酸碱基之一, 广泛存在于体内, 其分解代谢终产物是水溶性较差的尿酸。尿酸可影响内皮功能, 减少一氧化氮的生成, 是诱发高血压的重要介质^[57]。高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 诱导的近端肾小管上皮细胞中乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) /三磷酸腺苷结合转运蛋白G超家族成员2 (adenosine triphosphate combined transport protein G superfamily member 2, ABCG2) 表达降低, 这可能促进肾小管上皮细胞和肾间质中的尿酸单钠晶体沉积, 导致严重的肾脏损伤^[58]。高血压可能是导致亚临床肾损伤的初始触发因素, 后续诱发HUA, 形成高血压、尿酸升高和肾脏损害的恶性循环^[59]。研究认为慢性肾脏病可提高HUA发生的风险, 而HUA又可加速慢性肾脏病的进展^[60]。但Sellmayr等^[61]研究显示, 无症状的HUA不会影响慢性肾脏病的进展, 除非尿酸在肾脏中结晶, 导致慢性尿酸晶体性肾病, 后期可形成尿酸晶体性肉芽肿。该晶体会触发M1样巨噬细胞相关的间质炎症和纤维化, 加速慢性肾脏病进展。因此, 在一定程度上尿酸晶体肉芽肿的形成可作为肾脏间质纤维化模型成功的标志, 对应的腺嘌呤摄入剂量与时间是模型制备成功的关键。

2.8 其他化学诱导模型

除了上述这些化学物质诱导模型外, 还有血管紧张素II模型。血管紧张素II作为肾素-血管紧张素-醛

固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RASS) 的关键因子之一, 多用以建立高血压肾病相关模型。另外, 还有用叶酸、镇痛药、酪氨酸等诱导的肾脏间质纤维化动物模型。

3 转基因修饰的肾脏间质纤维化模型

肾脏间质纤维化往往伴随着一些因子不同程度的异常表达, 故研究时可以直接介入相关基因表达通路而验证、模拟类似环境, 探索其机制及相关治疗方法。这也是当今表观遗传研究的关键方法。

3.1 转基因杂交模型

Lim 等^[62]利用白喉毒素受体 (diphtheria toxin receptor, DTR) 在近端肾小管上表达的特点 [白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 可介导细胞消融, 从而诱导近端肾小管细胞特异性损伤], 建立 DTR⁺转基因小鼠; 同时利用改良毒素 LMB2 介导人 CD25 对肾小球足细胞选择性损伤的特性 [其中 CD25 由肾病蛋白启动子 25 (nephrin promoter 25, Nep25) 驱动], 建立 Nep25⁺转基因小鼠; 将两种转基因小鼠杂交后可获得双转基因小鼠 (Nep25⁺/DTR⁺) 和仅具有 Nep25 转基因的小鼠 (Nep25⁺/DTR⁻) 模型。随后 Nep25⁺/DTR⁺小鼠和 Nep25⁺/DTR⁻小鼠均在第 10、17 周龄先后注射 DT、LMB2, 结果发现 Nep25⁺/DTR⁺小鼠模型具有明显连续的肾小管和肾小球损伤的特点, 提示这是一种可用于探究肾小管损伤后肾小球损伤敏感性的新方法。进一步的实验分析表明, 即使是轻微的肾小管损伤也会增加随后肾小球损伤的敏感性, 肾小管间质损伤和轻微的纤维化在新一轮纤维化启动以及恶化进展中起着关键作用^[62]。

3.2 肾损伤因子-1 (kidney injury molecule 1, KIM-1) 模型

KIM-1 造模方法: 转基因诱导肾小管上皮细胞内特异性表达 KIM-1 的转基因 KIM-1^{REClg}小鼠, 共 4 周。结果显示 KIM-1 可增加促炎性细胞因子 (MCP-1、TGF- β 和 IL-6 等)、纤连蛋白等的表达, 其中 MCP-1 是 KIM-1 促进肾脏间质纤维化的重要介质。肾脏损伤后不完全愈合, 慢性 KIM-1 表达将进一步促进肾小管间质炎症发生、毛细血管丢失和缺氧, 进一步诱导 KIM-1 产生, 形成缺氧和炎症的恶性循环, 最终导致肾小管间质纤维化^[63-64]。

KIM-1 是一种由肾缺血上调的 I 型跨膜糖蛋白, 其持续表达是急性肾损伤转化为慢性肾脏病的标志物,

与肾脏间质纤维化的严重程度密切相关。它在健康受试者的尿液中几乎检测不到, 但在急性肾小管坏死 (acute tubular necrosis, ATN) 患者中显著增加^[65]。肾脏损伤后, 从急性肾损伤到慢性肾脏病的进展过程中 KIM-1、MCP-1 等都起着重要作用, 这些因子可作为防治及延缓该进程的重要靶点。

4 肾脏间质纤维化复合模型

单纯化学药物或单一手术等方法有时难以建立研究者想要的理想模型, 无法模拟较为复杂的疾病环境。一些研究者进而探索多因素作用下的复合动物模型。

4.1 BIRI 术联合庆大霉素模型

造模方法: 用大鼠先建立 BIRI 模型 (夹闭双侧肾蒂 60 min), 术后 2 周, 皮下注射庆大霉素 (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 5 d, 最终构建肾缺血和肾毒性双重损伤的慢性肾脏病复合模型。造模后检测 Scr 水平, 每 2 周收集一次血液和尿液样本计算肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR), 成模 1 周后即可见 Scr 明显升高, GFR 显著降低。成模 20 周后免疫细胞化学检测结果显示肾小球硬化和扩张、萎缩性小管^[66]。该模型适合各种因素导致肾缺血后, 经肾代偿、失代偿所致的慢性肾脏病研究。该建模方法的观测周期长, 但造模难度也大, 死亡率高。

4.2 单侧肾切除联合 Ang II 模型

造模方法: 结扎切除小鼠左肾, 术后 1 周再行右肾微渗透泵 (内置 Ang II 溶液) 植入手术, 持续泵入 4 周; 检测发现其 Scr、BUN 升高, 24 h 尿蛋白定量明显升高; 组织染色可见近曲小管上皮细胞浑浊肿胀, 大量的间质细胞浸润, 胶原纤维明显增多; 结果提示肾脏损伤以及肾脏纤维化^[67]。该模型在高血压与肾损伤的双重作用下, 通过单侧肾切除联合 AngII 加快成模, 可作为高血压肾损伤后肾脏间质纤维化模型。研究者可在此基础上探索改进方法, 如调整药物剂量与种类、作用时间等, 以模拟相似的疾病发展路径。

4.3 UIRI 术联合 pLVX-shTNC 质粒模型

造模方法: 小鼠 UIRI (夹闭左侧肾蒂 26~30 min) 术后 4 d 向其尾静脉注射 pLVX-shTNC, 术后第 10 天可成模^[68-69]。检测发现其 Scr、BUN 水平明显升高, 肾纤维化相关蛋白 (如 α -SMA、 α -平滑肌肌动蛋白、波形蛋白、纤连蛋白) 表达明显增多, 免疫组织化学检测可见明显胶原沉积。研究发现, 腱糖蛋白 C (tenascin-C, TNC) 在正常人的肾脏中检测不到,

但它可在各种慢性肾脏病患者的肾组织活检中检测到,证明TNC是致肾纤维化的关键致病因素。TNC可促进急性肾损伤上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT),通过整合素 α v β 6/FAK/ERK-1/2信号级联激活EMT,从而损害肾小管的完整性^[68]。这是急性肾损伤进展到慢性肾脏病的模型,靶向这种信号级联反应可能是肾纤维化干预治疗的新策略。

5 结语

肾脏疾病是人类常见疾病,其中大部分与肾脏间质纤维化密切相关,构建一个较为理想的肾脏间质纤维化动物模型对于探讨肾脏疾病的发生、发展机制极为重要。近年来随着技术的进步与应用,研究者对肾脏间质纤维化动物模型的构建方法越来越成熟,除了构建经典的手术、化学模型外,还偏向于结合研究对象的特征设计构造出有一定特异性的新模型。目前,各种复合模型、基因表达修饰模型等新型模型越来越多,每种模型各有其特点以及一定的适用范围。

2009年,单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术首次问世,近年获得了爆炸式的发展。与传统的二代测序技术如RNA-seq等仅能检测一群细胞转录组的平均水平不同,scRNA-seq技术可在细胞水平上对基因组、转录组及表观基因组水平进行测序分析。scRNA-seq技术更能发现细胞在不同时间(生长周期)、空间(细胞位置)环境下的基因表达特性,对细胞生理与病理的机制探究更深刻。以上模型建立后,检测验证相关基因表达水平相较于scRNA-seq缺乏相关模型演变进展的层次分析,若能结合该技术检测动物模型在不同病变阶段的表达特异性,将更能发现其内在病变机制,扩大其研究成果的深度。

肾脏疾病的复杂的病情及病理生理机制促使研究者不断改进已有的各种动物模型,研究探索新模型,以建立更为稳定可控、与疾病环境更相似的模型。这将促进对肾脏间质纤维化治疗药物的疗效评价、发生发展机制的探索以及新药研发。

[作者贡献 Author Contribution]

赖灿负责方案策划、初稿写作;

李乐乐负责提供资源;

胡塔拉负责项目管理;

孟彦负责论文把关和修订。

[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] LIU X Y, ZHANG X B, ZHAO Y F, et al. Research progress of Chinese herbal medicine intervention in renal interstitial fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 900491. DOI: 10.3389/fphar.2022.900491.
- [2] SZETO H H. Pharmacologic approaches to improve mitochondrial function in AKI and CKD[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(10):2856-2865. DOI: 10.1681/ASN.2017030247.
- [3] ZEISBERG M, KALLURI R. Physiology of the renal interstitium[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10(10):1831-1840. DOI: 10.2215/CJN.00640114.
- [4] MUÑOZ-FÉLIX J M, MARTÍNEZ-SALGADO C. Dissecting the involvement of ras GTPases in kidney fibrosis[J]. *Genes*, 2021, 12(6):800. DOI: 10.3390/genes12060800.
- [5] MARTÍNEZ-SALGADO C, SÁNCHEZ-JUANES F, LÓPEZ-HERNÁNDEZ F J, et al. Endothelial activin receptor-like kinase 1 (ALK1) regulates myofibroblast emergence and peritubular capillary stability in the early stages of kidney fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 843732. DOI: 10.3389/fphar.2022.843732.
- [6] GBD CHRONIC KIDNEY DISEASE COLLABORATION. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2020, 395(10225):709-733. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30045-3.
- [7] ZHOU J Q, JIANG H. Livin is involved in TGF- β 1-induced renal tubular epithelial-mesenchymal transition through lncRNA-ATB[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(18): 463. DOI: 10.21037/atm.2019.08.29.
- [8] MARTÍNEZ-KLIMOVA E, APARICIO-TREJO O E, TAPIA E, et al. Unilateral ureteral obstruction as a model to investigate fibrosis-attenuating treatments[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4): 141. DOI: 10.3390/biom9040141.
- [9] SONG J, LIU J, LUO J, et al. A modified relief of unilateral ureteral obstruction model[J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 497-506. DOI: 10.1080/0886022X.2019.1624263.
- [10] KUMAR R, SONI H, AFOLABI J M, et al. Induction of reactive oxygen species by mechanical stretch drives endothelin production in neonatal pig renal epithelial cells[J]. *Redox Biol*, 2022, 55:102394. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102394.
- [11] KLINKHAMMER B M, BUCHTLER S, DJUDJAJ S, et al. Current kidney function parameters overestimate kidney tissue repair in reversible experimental kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2022, 102(2): 307-320. DOI: 10.1016/j.kint.2022.02.039.
- [12] SONG J, XIA Y Y, YAN X, et al. Losartan accelerates the repair process of renal fibrosis in UUO mouse after the surgical recanalization by upregulating the expression of Tregs[J]. *Int Urol Nephrol*, 2019, 51(11):2073-2081. DOI: 10.1007/s11255-019-02253-8.
- [13] NARVÁEZ BARROS A, GUITERAS R, SOLA A, et al. Reversal unilateral ureteral obstruction: a mice experimental model[J]. *Nephron*, 2019, 142(2):125-134. DOI: 10.1159/000497119.
- [14] BASILE D P, DONOHOE D L, ROETHE K, et al. Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,

- 2003, 284(2): F338-F348. DOI: 10.1152/ajprenal.00169.2002.
- [15] YANG L, BESSCHETNOVA T Y, BROOKS C R, et al. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury [J]. *Nat Med*, 2010, 16(5): 535-543, 143. DOI: 10.1038/nm.2144.
- [16] 陈国晓, 刘修恒, 张祥生, 等. 臭氧氧化后处理对肾脏缺血再灌注损伤的作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(9): 19-24. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.09.004.
- CHEN G X, LIU X H, ZHANG X S, et al. Ozone oxidative post-conditioning protects rat kidney from ischemia reperfusion injury[J]. *China J Mod Med*, 2017, 27(9): 19-24. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.09.004.
- [17] SATO Y, YANAGITA M. Immune cells and inflammation in AKI to CKD progression[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(6): F1501-F1512. DOI: 10.1152/ajprenal.00195.2018.
- [18] LIU B C, TANG T T, LV L L, et al. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(3): 568-579. DOI: 10.1016/j.kint.2017.09.033.
- [19] ZHENG Z H, LI C L, SHAO G Z, et al. Hippo-YAP/MCP-1 mediated tubular maladaptive repair promote inflammation in renal failed recovery after ischemic AKI[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(8): 754. DOI: 10.1038/s41419-021-04041-8.
- [20] LE CLEF N, VERHULST A, D'HAESE P C, et al. Unilateral renal ischemia-reperfusion as a robust model for acute to chronic kidney injury in mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152153. DOI: 10.1371/journal.pone.0152153.
- [21] HESKETH E E, CZOPEK A, CLAY M, et al. Renal ischaemia reperfusion injury: a mouse model of injury and regeneration [J]. *J Vis Exp*, 2014(88): e51816. DOI: 10.3791/51816.
- [22] 许辉, 刘惺, 宁旺斌, 等. HIF-1 α 在5/6肾切除大鼠慢性肾纤维化模型中的表达[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2009, 34(4): 308-312.
- XU H, LIU X, NING W B, et al. Expression of HIF-1 α in 5/6-nephrectomized rat models of chronic kidney fibrosis[J]. *J Central South Univ Med Sci*, 2009, 34(4): 308-312.
- [23] KIM K, ANDERSON E M, THOME T, et al. Skeletal myopathy in CKD: a comparison of adenine-induced nephropathy and 5/6 nephrectomy models in mice[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2021, 321(1): F106-F119. DOI: 10.1152/ajprenal.00117.2021.
- [24] WANG X L, CHAUDHRY M A, NIE Y, et al. A mouse 5/6th nephrectomy model that induces experimental uremic cardiomyopathy[J]. *J Vis Exp*, 2017(129): 55825. DOI: 10.3791/55825.
- [25] TAN R Z, ZHONG X, LI J C, et al. An optimized 5/6 nephrectomy mouse model based on unilateral kidney ligation and its application in renal fibrosis research[J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 555-566. DOI: 10.1080/0886022X.2019.1627220.
- [26] KIMURA M, SUZUKI T, HISHIDA A. A rat model of progressive chronic renal failure produced by microembolism[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(4): 1371-1380. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65239-X.
- [27] BERSANI-AMADO L E, DA ROCHA B A, SCHNEIDER L C L, et al. Nephropathy induced by renal microembolism: a characterization of biochemical and histopathological changes in rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(6): 2311-2323.
- [28] ROSEN S, GREENFELD Z, BREZIS M. Chronic cyclosporine-induced nephropathy in the rat. A medullary ray and inner stripe injury[J]. *Transplantation*, 1990, 49(2): 445-452. DOI: 10.1097/00007890-199002000-00041.
- [29] LIM S W, DOH K C, JIN L, et al. Ginseng treatment attenuates autophagic cell death in chronic cyclosporine nephropathy [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2014, 19(8): 490-499. DOI: 10.1111/nep.12273.
- [30] CAIRES A, FERNANDES G S, LEME A M, et al. Endothelin-1 receptor antagonists protect the kidney against the nephrotoxicity induced by cyclosporine-a in normotensive and hypertensive rats[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 51(2): e6373. DOI: 10.1590/1414-431X20176373.
- [31] AMADOR C A, BERTOCCHIO J P, ANDRE-GREGOIRE G, et al. Deletion of mineralocorticoid receptors in smooth muscle cells blunts renal vascular resistance following acute cyclosporine administration[J]. *Kidney Int*, 2016, 89(2): 354-362. DOI: 10.1038/ki.2015.312.
- [32] HOUÉE-LÉVIN C, BOBROWSKI K, HORAKOVA L, et al. Exploring oxidative modifications of tyrosine: an update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences[J]. *Free Radic Res*, 2015, 49(4): 347-373. DOI: 10.3109/10715762.2015.1007968.
- [33] WEI Z H, XUE Y R, XUE Y C, et al. Ferulic acid attenuates non-alcoholic steatohepatitis by reducing oxidative stress and inflammation through inhibition of the ROCK/NF- κ B signaling pathways[J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 147(1): 72-80. DOI: 10.1016/j.jphs.2021.05.006.
- [34] MONTAGNINO G, BANFI G, CAMPISE M R, et al. Impact of chronic allograft nephropathy and subsequent modifications of immunosuppressive therapy on late graft outcomes in renal transplantation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(10): 2622-2629. DOI: 10.1093/ndt/gfh453.
- [35] 李渭敏, 仲吉英, 陈奕豪, 等. 蛋白激酶B介导的APPL1在肾缺血再灌注损伤致肾脏慢性纤维化的机制研究[J]. *临床肾脏病杂志*, 2019, 19(10): 772-777. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2390.2019.10.012.
- LI W M, ZHONG J Y, CHEN Y H, et al. The mechanism of Akt-mediated APPL1 in chronic renal fibrosis induced by acute renal ischemia-reperfusion injury[J]. *J Clin Nephrol*, 2019, 19(10): 772-777. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2390.2019.10.012.
- [36] LI A P, YANG L, ZHANG L C, et al. Evaluation of injury degree of adriamycin-induced nephropathy in rats based on serum metabolomics combined with proline marker[J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(7): 2575-2584. DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00785.
- [37] PIPPIN J W, BRINKKOETTER P T, CORMACK-ABOUD F C, et al. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(2): F213-F229. DOI: 10.1152/ajprenal.90421.2008.
- [38] BOHNERT B N, ESSIGKE D, JANESSA A, et al. Experimental nephrotic syndrome leads to proteolytic activation of the epithelial Na⁺ channel in the mouse kidney[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2021, 321(4): F480-F493. DOI: 10.1152/ajprenal.00199.2021.
- [39] HULKKO J, PATRAKKA J, LAL M, et al. Neph1 is reduced in primary focal segmental glomerulosclerosis, minimal change nephrotic syndrome, and corresponding experimental animal models of adriamycin-induced nephropathy and puromycin aminonucleoside nephrosis[J]. *Nephron Extra*, 2014, 4(3): 146-154. DOI: 10.1159/000365091.
- [40] WANG Y L, FAN S N, YANG M, et al. Evaluation of the mechanism of Danggui-Shaoyao-San in regulating the metabolome of nephrotic syndrome based on urinary

- metabonomics and bioinformatics approaches[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261: 113020. DOI: 10.1016/j.jep. 2020. 113020.
- [41] LI A P, YANG L, CUI T, et al. Uncovering the mechanism of Astragali Radix against nephrotic syndrome by intergrating lipidomics and network pharmacology[J]. *Phytomedicine*, 2020, 77:153274. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153274.
- [42] URATE S, WAKUI H, AZUSHIMA K, et al. Aristolochic acid induces renal fibrosis and senescence in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22):12432. DOI: 10.3390/ijms222212432.
- [43] TAGUCHI S, AZUSHIMA K, YAMAJI T, et al. Effects of tumor necrosis factor- α inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23587. DOI: 10.1038/s41598-021-02864-1.
- [44] WANG S F, FAN J J, MEI X B, et al. Interleukin-22 attenuated renal tubular injury in aristolochic acid nephropathy via suppressing activation of NLRP3 inflammasome[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2277. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02277.
- [45] WANG Q L, YUAN J L, TAO Y Y, et al. Fuzheng Huayu recipe and vitamin E reverse renal interstitial fibrosis through counteracting TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 631-640. DOI: 10.1016/j.jep.2009.12.011.
- [46] ABDEL HALEEM N Y, EL-AASAR H M, ZAKI S M, et al. Concomitant protective and therapeutic role of verapamil in chronic mercury induced nephrotoxicity in the adult rat: histological, morphometric and ultrastructural study[J]. *Arch Med Sci*, 2015, 11(1):199-209. DOI: 10.5114/aoms.2013.37342.
- [47] ROJAS-FRANCO P, FRANCO-COLÍN M, TORRES-MANZO A P, et al. Endoplasmic reticulum stress participates in the pathophysiology of mercury-caused acute kidney injury[J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1):1001-1010. DOI: 10.1080/0886022X.2019.1686019.
- [48] HUANG H H, JIN W W, HUANG M, et al. Gentamicin-induced acute kidney injury in an animal model involves programmed necrosis of the collecting duct[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(9):2097-2115. DOI: 10.1681/ASN.2019020204.
- [49] ALBINO A H, ZAMBOM F F F, FORESTO-NETO O, et al. Renal inflammation and innate immune activation underlie the transition from gentamicin-induced acute kidney injury to renal fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2021, 12:606392. DOI: 10.3389/fphys.2021.606392.
- [50] YE L, PANG W X, HUANG Y H, et al. Lansoprazole promotes cisplatin-induced acute kidney injury via enhancing tubular necroptosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2703-2713. DOI: 10.1111/jcmm.16302.
- [51] HAMROUN A, LENAIN R, BIGNA J J, et al. Prevention of cisplatin-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis[J]. *Drugs*, 2019, 79(14): 1567-1582. DOI: 10.1007/s40265-019-01182-1.
- [52] GHOSH S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug[J]. *Bioorg Chem*, 2019, 88: 102925. DOI: 10.1016/j.bioorg. 2019. 102925.
- [53] CIARIMBOLI G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(1):547-550.
- [54] OH G S, KIM H J, SHEN A H, et al. Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies[J]. *Electrolyte Blood Press*, 2014, 12(2): 55. DOI: 10.5049/EBP.2014.12.2.55.
- [55] DEWAELES E, CARVALHO K, FELLAH S, et al. Istradefylline protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin antitumor effects[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(22): e152924. DOI: 10.1172/JCI152924.
- [56] 陈建新, 刘刚, 杨麟, 等. 5种方法制备高尿酸血症大鼠模型的实验研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(11):2456-2461. DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.11.027.
- CHEN J X, LIU G, YANG L, et al. Experimental study on preparation of hyperuricemia rat model by five methods[J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2021, 38(11):2456-2461. DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.11.027.
- [57] JOHNSON R J, KANG D H, FEIG D, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease?[J]. *Hypertension*, 2003, 41(6):1183-1190. DOI: 10.1161/01.HYP.0000069700.62727.C5.
- [58] HASEGAWA J, MAEJIMA I, IWAMOTO R, et al. Selective autophagy: lysophagy[J]. *Methods*, 2015, 75: 128-132. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.12.014.
- [59] KIELSTEIN J T, PONTREMOLI R, BURNIER M. Management of hyperuricemia in patients with chronic kidney disease: a focus on renal protection[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2020, 22(12): 102. DOI: 10.1007/s11906-020-01116-3.
- [60] JAFFE D H, KLEIN A B, BENIS A, et al. Incident gout and chronic Kidney Disease: healthcare utilization and survival[J]. *BMC Rheumatol*, 2019, 3(1): 1-11. DOI: 10.1186/s41927-019-0060-0.
- [61] SELLMAYR M, HERNANDEZ PETZSCHE M R, MA Q Y, et al. Only hyperuricemia with crystalluria, but not asymptomatic hyperuricemia, drives progression of chronic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(12): 2773-2792. DOI: 10.1681/ASN.2020040523.
- [62] LIM B J, YANG J W, ZOU J, et al. Tubulointerstitial fibrosis can sensitize the kidney to subsequent glomerular injury[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(6): 1395-1403. DOI: 10.1016/j.kint. 2017. 04.010.
- [63] HUMPHREYS B D, XU F F, SABBISSETTI V, et al. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 4023-4035. DOI: 10.1172/JCI45361.
- [64] XU L Y, SHARKEY D, CANTLEY L G. Tubular GM-CSF promotes late MCP-1/CCR2-mediated fibrosis and inflammation after ischemia/reperfusion injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(10):1825-1840. DOI: 10.1681/ASN.2019010068.
- [65] PIETRUKANIEC M, MIGACZ M, ŻAK-GOŁĄB A, et al. Could KIM-1 and NGAL levels predict acute kidney injury after paracentesis?—preliminary study[J]. *Ren Fail*, 2020, 42(1):853-859. DOI: 10.1080/0886022X.2020.1801468.
- [66] ZHANG C, GEORGE S K, WU R P, et al. Reno-protection of urine-derived stem cells in a chronic kidney disease rat model induced by renal ischemia and nephrotoxicity[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(3):435-446. DOI: 10.7150/ijbs.37550.
- [67] 陈建, 曾莉, 陈刚, 等. 单侧肾切除及微渗透泵灌注血管紧张素 II 诱导小鼠肾纤维化与高血压模型的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(2):26-29, 37. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.02.008.
- CHEN J, ZENG L, CHEN G, et al. Establishment of a mouse

model of renal fibrosis and hypertension induced by unilateral nephrectomy and infusion of angiotensin II using a micro-osmotic pump[J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(2): 26-29, 37. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.02.008.

[68] ZHU H L, LIAO J L, ZHOU X K, et al. Tenascin-C promotes acute kidney injury to chronic kidney disease progression by impairing tubular integrity via α v β 6 integrin signaling[J]. Kidney Int, 2020, 97(5): 1017-1031. DOI: 10.1016/j.kint.2020.01.026.

[69] SKRYPNYK N I, HARRIS R C, DE CAESTECKER M P. Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice[J]. J Vis Exp, 2013(78): 50495. DOI: 10.3791/50495.

(收稿日期:2022-11-09 修回日期:2023-02-18)
(本文编辑:张俊彦,富群华,张萍,丁宇菁)

[引用本文]
赖灿,李乐乐,胡塔拉,等.肾脏间质纤维化动物模型的研究进展[J].实验动物与比较医学,2023,43(2):163-172. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.171.
LAI C, LI L L, HU T L, et al. Recent advances of animal models of renal interstitial fibrosis[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 163-172. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.171.

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表

英文缩略词	英文全称	中文全称(备注)
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
FDA	Food and Drug Administration	食品药品监督管理局(美国)
SPF	specific pathogen-free	无特定病原体
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
CT	computerized tomography	计算机体层摄影
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
CCK8	cell counting kit 8	细胞计数试剂盒-8
MTT	thiazolyl blue	噻唑蓝(细胞增殖活性检测试剂)
BCA	bicinchoninic acid	二辛可宁酸(蛋白浓度测定试剂)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
SP	streptavidin-peroxidase	链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶
HE	hematoxylin and eosin	苏木精-伊红
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
ddH ₂ O	distillation-distillation H ₂ O	双蒸水
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
PBST	phosphate-buffered saline with Tween-20	含Tween-20的磷酸盐缓冲液
TBST	Tris-buffered saline with Tween-20	含Tween-20的Tris盐酸缓冲液
DEPC	diethylenecarbonate	焦碳酸二乙酯
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
FITC	fluorescein insothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PE	phycoerythrin	藻红蛋白
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
RIPA	radio immunoprecipitation assay	放射免疫沉淀法
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
PI	propidium iodide	碘化丙啶
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B淋巴细胞瘤-2基因
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(内参)
Ras	rat sarcoma gene	大鼠肉瘤基因
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
cDNA	complementary DNA	互补(反向转录)DNA
siRNA	small interfering RNA	小干扰RNA
miRNA	microRNA	微RNA

应激性心肌病动物模型的研究进展

吴昊晟¹, 苏航¹, 朱超¹, 王文慧¹, 吴生兵^{2,3}, 崔帅^{2,4}, 周美启^{4,5}

(1. 安徽中医药大学研究生院, 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学针灸经络研究所, 合肥 230038; 3. 安徽中医药大学针灸学院, 合肥 230012; 4. 新安医学教育部重点实验室, 合肥 230012; 5. 安徽省中医药科学院亳州中医药研究所, 亳州 236800)

[摘要] 应激性心肌病 (stress cardiomyopathy, SC) 是一种由强烈精神刺激或躯体应激所致的急性心肌病。目前, 在SC的急性或慢性阶段, 能够有效降低死亡率、改善预后或预防复发的干预措施极少。因此, 通过建立一种可靠、有效的SC动物模型来研究SC的发病机制及其防治方法, 尤为重要。本文梳理了国内外现有SC模型的制备方法和评价指标, 并展开综述, 即论述了儿茶酚胺类激素注射法、束缚法、束缚联合电击法、束缚联合脱水法、迷走神经电刺激等造模方法的操作细节, 以及利用旷场实验、心超、心电图、ELISA等方法对相关指标进行评价, 以期研究SC时的模型选择和建立提供有益参考。

[关键词] 应激性心肌病; 动物模型; 造模方法; 评价指标

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0173-07



Research Progress of Animal Models of Stress Cardiomyopathy

WU Haosheng¹, SU Hang¹, ZHU Chao¹, WANG Wenhui¹, WU Shengbing^{2,3}, CUI Shuai^{2,4}, ZHOU Meiqi^{4,5}

(1. Graduate School of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Institute of Acupuncture and Meridians, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 3. School of Acupuncture and Moxibustion, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 4. Xin'an Key Laboratory of Medical Science, Ministry of Education, Hefei 230012, China; 5. Bozhou Institute of Traditional Chinese Medicine, Anhui Academy of Traditional Chinese Medicine, Bozhou 236800, China)

Correspondence to: ZHOU Meiqi (ORCID: 0000-0002-8798-7121), E-mail: meiqizhou@163.com

[ABSTRACT] Stress cardiomyopathy (SC) is an acute cardiomyopathy caused by intense mental stimulation or physical stress. Currently, few interventions are effective in reducing mortality, improving prognosis, or preventing recurrence in acute or chronic stages of SC. Therefore, it is particularly important to establish a reliable and effective SC animal model to study the pathogenesis and prevention of SC. In this paper, the preparation methods and evaluation indexes of SC models at home and abroad were reviewed, including the operation details of catecholamine hormone injection method, binding method, binding combined with electroshock method, binding combined with dehydration method, vagus nerve electrical stimulation and other modeling methods, as well as evaluation indexes such as open field test, cardiac ultrasound, electrocardiogram and ELISA, striving to provide useful reference for model selection and establishment of SC research.

[Key words] Stress cardiomyopathy; Animal model; Modeling method; Evaluation index

应激性心肌病 (stress cardiomyopathy, SC) 也被称为Takotsubo综合征, 是一种由强烈精神刺激或躯体应激所致的急性心肌病。近年来, 随着新型冠状病毒

肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 疫情引起人们恐惧情绪的蔓延, 在长期应激刺激下, 人体内儿茶酚胺类激素的表达量增高, SC发病率在疫情期间

[基金项目] 国家重点研发计划“基于心/肺经的经络关键问题创新研究”(2018YFC1704600); 安徽省中医药领军人才建设项目(ZYYLJRC201911)

[第一作者] 吴昊晟(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 经络脏腑相关研究。E-mail: 811985763@qq.com

[通信作者] 周美启(1963—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 经络脏腑相关研究。E-mail: meiqizhou@163.com。ORCID: 0000-0002-8798-7121

显著增加^[1-2]。SC症状类似于心肌缺血，包括胸痛、呼吸困难、心电图异常（ST段抬高）、心肌酶学指标的改变和左心室运动功能障碍^[3]。越来越多的证据表明，SC的临床预后比心肌缺血患者的预后更差^[4-5]。然而，目前极少有干预措施能够在SC的急性或慢性阶段有效降低死亡率、改善预后或预防复发^[6]。SC已成为严重的公共卫生问题，急需研究它的发病机制及诊疗措施。因此，建立与人类SC症状相似的动物模型尤为重要，是研究SC病理机制和药物治疗的重要一步。以下就目前国内国外现有的SC动物模型的制备方法和评价指标展开论述。

1 SC模型的制备方法

通常认为，SC的发病机制与应激后强烈的交感神经激活和循环儿茶酚胺水平升高密切相关^[7]。因此，通过各种方法产生一定的刺激，模拟交感神经激活和儿茶酚胺激增，是目前建立SC动物模型最常用的方法。应激反应分为生理应激和心理应激两种。生理应激过程涉及神经—免疫—内分泌网络，持久的生理应激会导致生理功能紊乱，甚至引发病理性改变。心理应激则是指机体在持续刺激源作用下出现的非特异性反应，既有积极的，也有消极的心理反应。通常使用化学因素模拟生理应激的状况，使用物理因素模拟心理应激状态，以此建立SC模型，具体制备方法如下。

1.1 化学因素造模方法

最常用的化学因素造模方式是儿茶酚胺类激素注射法，即通过给动物注射异儿茶酚胺类激素以引起SC病变，这是国内外制备SC模型最常用的方法。相关研究表明，强烈的情绪或身体压力可过度激活交感神经系统（sympathetic nervous system, SNS），导致儿茶酚胺的过度释放，触发SC，故而常通过注射儿茶酚胺类激素模拟这种病理状态。注射药物包括异丙肾上腺素（isoproterenol, ISO）和去甲肾上腺素（norepinephrine, NE），注射方法有腹腔注射、皮下注射和埋置缓释泵。

ISO是临床上常用的药物，能引起心肌收缩力增加，心率加快，导致冠状动脉灌注不足，左心室扩张^[8]。所以，常使用外源性ISO模拟应激状态时儿茶酚胺类激素的释放。大鼠是最常用的实验动物之一，其中SD大鼠常被用于SC造模（表1）。张志红等^[9]使用雄性SD大鼠，以50 mg/kg为剂量腹腔注射ISO制备SC大鼠模型；心超显示该模型大鼠的左心室射血分数（left ventricular ejection fraction, LVEF）、左心室缩短分数（left ventricle shortens fraction, LVFS）明显降低，

心室壁运动出现障碍，左心室出现气球样改变；心肌酶谱检测显示模型大鼠血液中心肌酶含量明显升高。Ali等^[10]和Qi等^[11]也使用相同方法建立了SC模型，结果显示不仅23.3%的大鼠出现了心尖运动不能（左心室心尖部），并且在ISO给药后收缩压和舒张压呈现先升高后下降的非线性变化趋势，另外有心率增加的现象。杜志君等^[12]也认为使用该方法可以获得典型的SC模型。Godsman等^[13]使用不同性别的大鼠和不同剂量的ISO造模，然后选用雌性SD大鼠单次腹腔注射100 mg/kg ISO进行代谢方面的研究，结果显示左心室中葡萄糖代谢率（glucose metabolic rate, MRglu）增加，最终糖酵解代谢物脂肪酸的利用率和酰基肉碱代谢物下降，克雷布斯循环中间体和腺苷三磷酸（adenosine triphosphate, ATP）减少。尹元立等^[14]使用SD大鼠每天于不同部位多点皮下注射ISO，持续3周，也达到了SC造模的目的，结果显示LVFS及LVEF明显降低，而左心室收缩末期内径（left ventricular end contractile diameter, LVESD）增加，心电图ST段明显抬高，血清中缺血修饰白蛋白（ischemia modified albumin, IMA）表达水平明显增高。

SD大鼠腹腔注射NE也是一种常用的SC造模方法，同样也能引起心肌收缩力增强，心率加快，心排量增高。但杜志君等^[12]通过实验发现，NE可用于非典型SC模型的制备，该模型没有ISO造成的SC模型的症状典型；NE在注射剂量为2~4 mg/kg时造模成功率较高，且死亡率较低，特别是以4 mg/kg最优，成功率达75%，死亡率仅有16.67%。蔡伟文等^[15]则使用单次腹腔注射4 mg/kg NE，成功模拟出了SC模型，成功率为66.67%，发现左心室心尖段、心中段、心基底段短轴缩短率（fractional shortening, FS）明显减少。

除大鼠以外，小鼠也是常用的实验动物种类，造模使用的品系则较多，有C57BL/6J、129/Sv小鼠等（表1）。Liao等^[16]单次腹腔注射200 mg/kg的ISO，小鼠出现急性左心室功能障碍，LVEF<35%，心肌肌钙蛋白（cardiac troponin, cTn）T水平升高，心肌出现纤维化和细胞死亡。Shao等^[17]单次腹腔注射400 mg/kg大剂量的ISO，2 h后小鼠心肌出现节段性运动障碍，并且心肌脂质转运蛋白和载脂蛋白表达下调。向仕钊等^[18]使用C57BL/6J雄性小鼠，以50 mg/kg的ISO腹腔注射3周造模。注射后即刻小鼠毛发直立，自主活动明显减少。注射3周后心脏功能降低，心脏大体和心室内径增加，心房钠尿肽（atrial natriuretic peptide,

表1 化学因素建立大鼠、小鼠应激性心肌病模型的方法

Table 1 Methods of constructing rat and mouse model of stress cardiomyopathy by chemical factors

动物	品种或品系	性别	年龄或体质量	药物	剂量	给药方案	参考文献
Animal	Stock or strain	Sex	Age/weight	Drug	Dose	Dosage regimen	Reference
大鼠 Rat	SD	雄	250 ~ 300 g	ISO	50 mg/kg	单次腹腔注射	[9]
	SD	雌	2 ~ 4月龄, 241±55 g	ISO	100 mg/kg	单次腹腔注射	[13]
	SD	雄	220 ~ 250 g, 8周龄	ISO	100 mg/kg	不同部位多点皮下注射, 持续3周	[14]
	SD	雌	300 ~ 350 g	NE	2 ~ 4 mg/kg	单次腹腔注射	[12]
	SD	雌	300 ~ 350 g	NE	4 mg/kg	单次腹腔注射	[15]
小鼠 Mice	C57BL/6J	雄/雌	8 ~ 16周龄	ISO	200 mg/kg	单次腹腔注射	[16]
	C57BL/6J	/	16周	ISO	400 mg/kg	单次腹腔注射	[17]
	C57BL/6J	雄性	7周龄, 20 ~ 25 g	ISO	50 mg/kg	腹腔注射3周	[18]
	129/Sv	/	8周	ISO	25 mg/kg	连续皮下注射5 d	[19]
	C57BL/6J	雄/雌	8周	ISO	30 mg/kg	皮下埋置微渗透泵, 连续21 d释放ISO	[20]

注: ISO, 异丙肾上腺素; NE, 去甲肾上腺素。
Note: ISO, isoproterenol; NE, norepinephrine.

ANP)、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP)、 β 肌球蛋白重链 (β -myosin heavy chain, β -MHC) 明显上调。Khurana 等^[19] 使用 129/Sv 小鼠, 每日 1 次皮下注射 ISO, 连续 5 d 后发现左心室中天狼猩红 (picosirius Red) 染色的胶原蛋白含量显著增加。Walsh-Wilkinson 等^[20] 给小鼠皮下埋置缓释泵, 连续 21 d 释放 ISO 后, 心超显示 LVFS 减少, LVESD 增加。

腹腔注射 ISO 是建立 SC 模型最常用的方法。该方法操作简单, 模拟 SC 较容易。国内外应用该方法建立大鼠 SC 模型的方法较为一致, 普遍使用 SD 大鼠单次腹腔注射大剂量 ISO (50 ~ 100 mg/kg) 即能模拟 SC 的病理状态。但对于小鼠而言, 该方法研究尚待进一步明确, 小鼠品系 C57BL/6、129/Sv 均有使用, 注射剂量和注射频率也各不相同, 既有小剂量 (25 ~ 50 mg/kg) 多次 (3 ~ 21 次) 注射, 也有大剂量 (200 ~ 400 mg/kg) 单次注射, 对于后来研究者选用小鼠造模有一定困难。但总体而言, 以单次大剂量注射可产生急性应激变化, 主要是功能障碍; 多次小剂量可造成慢性应激, 心肌结构也有较为明显的病理改变。

1.2 物理因素造模方法

物理因素造模的方式较为多样, 通常使用束缚法、束缚结合电击法、束缚结合脱水法建立动物心理应激模型 (表 2)。

1.2.1 束缚法

束缚法是将动物固定于束缚装置中, 产生束缚刺激的作用, 造成心理和生理的双重压力, 能够较好地模拟人类生活中应激和身心疾病的发生过程^[21-22]。该方法具有造模简单、操作方便、成本低廉的特点, 但

要注意在束缚过程中应严格遵守实验动物伦理原则, 善待动物并尽量减少动物的痛苦和伤害。齐跃等^[23] 将雄性 SD 大鼠仰卧固定于解剖板上, 束缚躯干及四肢 2 h 即可模拟出 SC 的病理状态, 心电图显示心率增加、ST 段抬高、按心率校正的 QT 间期延长, 通过检测血浆发现 NE 和 cTnI 浓度明显升高, 超声心动图显示收缩期左心室心尖近气球样变。

1.2.2 束缚加电击法

足底电刺激是一种可使动物产生恐惧的复杂应激源, 具有生理和心理双重影响。通过足底电刺激诱发情感障碍模型已广泛应用于人类精神疾病的研究^[24]。李凤等^[25] 将雄性 SD 大鼠置于固定器内固定 30 min, 然后将其移至电笼内每隔 2 min 给予 10 s 足底电刺激 (2 mA), 整体电刺激持续时长不超过 30 min, 每日 2 次, 共 15 d。ELISA 检测显示血清皮质醇 (cortisol) 含量明显升高, BNP mRNA 表达量明显升高; 心肌 HE 染色显示炎性细胞浸润, 局灶心肌纤维增生, 细胞质内 BNP 呈阳性着色。阿兰达^[26] 和石建等^[27] 也应用相同参数电击造模, 观察大鼠受刺激后心脏的变化, 结果与上述研究几乎一致: 前者的研究结果显示左心室收缩带坏死、炎性细胞浸润、心肌间质水肿和局灶性纤维化; 后者的结果显示, 心功能异常, 左心室收缩压明显降低, 左心室舒张压、心脏指数和心肌组织羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量明显升高。

1.2.3 束缚结合脱水法

孙艳荣等^[28] 在临床中发现 SC 患者往往存在脱水状况, 并且经补液治疗后心功能得以改善。所以, 通过给予大鼠每日饮水仅 50 mL、不限日粮的脱水处理,

并将大鼠束缚于固定器内每日6~8 h,共处理3周,可以制备SC模型。结果显示心尖部室壁运动减弱,呈气球样变,心率增加,ST段明显偏移,血浆中肾上腺素(epinephrine, E)及去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)含量明显升高,炎性细胞浸润,心尖部出现水肿、坏死,但其典型的SC造模成功率仅为26.67%。

表2 物理因素建立大鼠应激性心脏病模型的方法
Table 2 Methods of constructing stress cardiomyopathy model in rats by physical factors

动物	品种	性别	月龄或体质量	造模方案	参考文献
Animal	Stock	Sex	Age/weight	Modeling process	Reference
大鼠 Rat	SD	雄性	3~4月龄,300~350 g	束缚2 h	[23]
大鼠 Rat	SD	雄性	300~350 g	固定30 min,每间隔2 min给予10 s足底电刺激2 mA,每日2次,持续15 d	[25]
大鼠 Rat	SD	雄性	280~300 g	限制饮水50 mL/d,每日束缚6~8 h,连续3周	[28]

综上,束缚法可以较好地模拟出心理和生理双重应激下所致的SC模型,造成动物情绪应激,普遍表现为心率加快,心律失常,心尖气球样变。而后面几种复合型方法,包括束缚联合电击法和束缚联合脱水法,均未与单纯束缚法进行对照研究,因此尚不清楚电击和脱水能否在束缚后更好地模拟SC病理状态,还需更进一步地研究其能否更好地模拟复杂的SC发病状态。

1.3 其他造模方法

另外,还有极少数以家兔作为实验动物的造模方式^[29]。通过选用2月龄、体质量2~2.2 kg的雌性新西兰白兔,麻醉后固定,颈部皮肤备皮,从颈部正中切开约3 cm的切口,分离迷走神经,将其暴露,使用电压刺激仪给予迷走神经1.5 V的电刺激,每刺激2 min后间歇5 min,持续1 h。经该方法造模的家兔呈现心率加快,左心室壁厚度变薄,心肌组织出现结构紊乱、心肌断裂等病理改变。但该方法对手术技术的要求较高,且存在电刺激迷走神经时容易造成迷走神经损伤,以及组织长时间暴露易造成坏死等问题。

2 SC动物模型的评价指标

对于SC动物模型,常用的评价方法包括旷场实验、超声心动图、心电图、血清ELISA检测。这些方法既可用于评价SC模型的建立,也可用于SC动物治疗效果的评价。旷场实验是通过观测动物在一定时间内的运动情况判断其应激情况的实验,但易受外界干扰,对实验环境安静、无异味、无干扰等要求较高。心超和心电图的实验操作简单、成本低,在实验过程中能较好反映心功能的变化情况,是评测SC模型的重要手段。ELISA检测方法简单,且可以客观地量化评价SC的应激和心肌损伤水平。

2.1 旷场实验

旷场实验是将动物放入旷场箱的中心,记录并分析在一定时间段内(如5 min)动物的总路程、运动轨迹、跨格次数、中央停留时间、中央格数等指标,以反映动物的自主活动情况^[30-31]。在评价SC模型时,通常以检测总路程和动物避开中心区域的次数或时间来反映动物的应激反应水平^[32]。对于应激的评价是区别SC模型与心肌缺血、心肌肥厚等模型的关键点。SC动物常表现为自主活动减少,蜷缩在角落,或在周围格徘徊(图1A、B)。

2.2 超声心动图

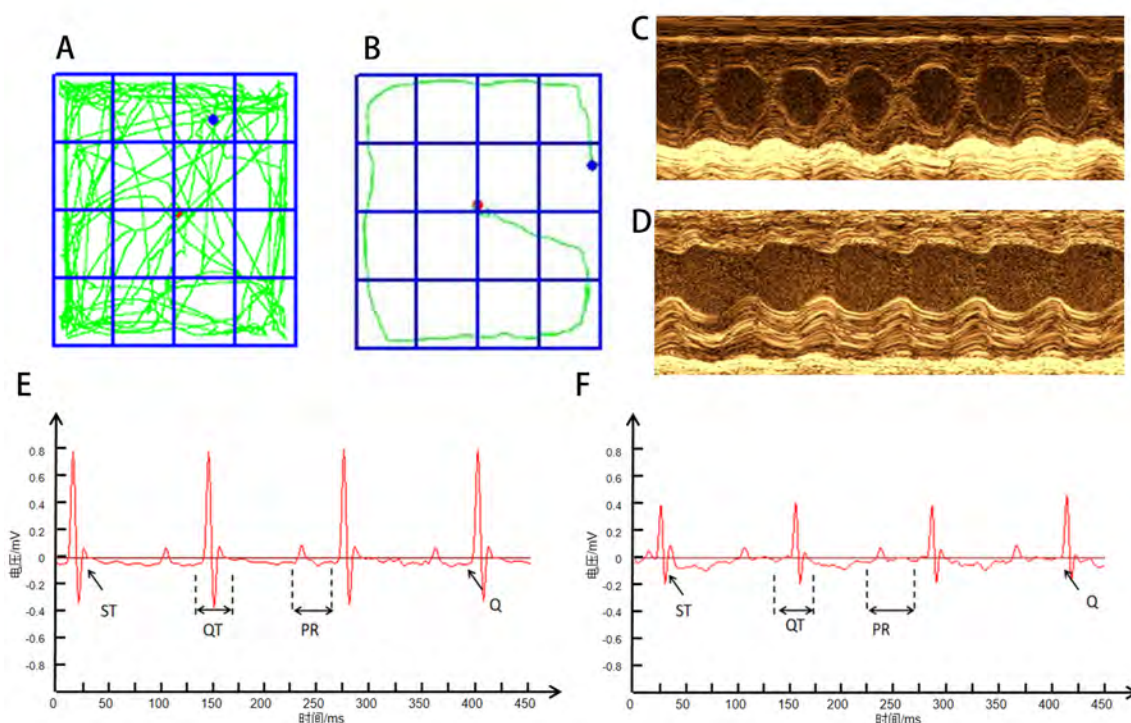
心超可准确反映左心室情况,是评价SC动物模型最直接、可靠的方法,有助于发现左心室节段性室壁运动异常,包括运动减弱和运动不能^[33]。这种节段性的室壁运动异常,多是短暂、可逆的,通常心电图并不敏感,而心超在SC模型评价上有着重要价值。SC动物常表现为左心室呈现气球样变,心尖部运动功能障碍,LVEF和LVFS减少,LVESD增大^[34-35](图1C、D)。

2.3 心电图

在SC模型评价中,心电图常作为心超的辅助手段使用。SC动物模型较典型的心电图常表现为可逆性的ST段抬高和(或)T波倒置,以及QT间期和PR间期延长^[36-37],并伴有病理性Q波出现^[38-39](图1E、F)。当模型不典型时,通常表现为ST段上斜型压低。

2.4 ELISA检测

在SC模型评价中,ELISA检测最常见的指标主要是反映应激情况的指标,如皮质醇,以及反映心肌损伤的指标,包括心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT)、cTnI、ANP、BNP。皮质醇作为经典的压力生物标志物,也是SC发病的影响因素^[40-41]。在SC发病



注：A为正常组旷场实验轨迹图；B为SC模型组旷场实验轨迹图；C为正常组心超图；D为SC模型组心超图；E为正常组心电图；F为SC模型组心电图。

Note: A is the trajectory diagram of open field experiment in normal group; B is the open field experiment trajectory of SC model group; C is the cardiogram of the normal group; D is the cardiogram of SC model group; E is the electrocardiogram of normal group; F is the electrocardiogram of SC model group.

图1 应激性心肌病动物模型的评价指标代表性图像

Figure 1 Representative images of evaluation index in an animal model of stress cardiomyopathy

时，BNP与cTnT的比率（BNP/cTnT）显著增高，区别于急性心肌缺血，并具有较高特异性^[42]。SC动物模型常表现为皮质醇、cTnT、cTnI、ANP和BNP升高。

3 结语

本文总结了目前SC动物模型的常见制备方法和评价指标。SC动物模型的构建方法较多且各有优劣。能够有效模拟SC病理情况，操作简单、成本低廉且评价体系完备的动物模型，可以为今后揭示SC发病机制、探索SC的治疗和预防策略提供有效工具。

SC动物模型建立成功与否，应该以在应激状态下是否产生与临床病理特征一致的表现作为判断标准。由于应激是引起SC的重要因素，因此在SC模型的制备中，可通过直接束缚、电击、脱水、迷走神经电刺激造成动物应激，或者通过注射儿茶酚胺类激素模拟应激时的状态。虽然这些方法在应激的同时均造成了不同程度的心肌病变，可以在一定程度上模拟SC的病理

状态，然而引起人类SC的原因复杂，目前的SC模型仍存在一定局限性，需要进一步研发和摸索。

总的来说，SC动物模型研究发展至今，取得了不少成果，但仍然存在很多问题有待解决。首先，建立模型的标准和评价指标尚未完全明确，主要集中在以小鼠建立SC模型时，化学因素造模的给药剂量和方法不确定是阻碍SC研究发展的关键原因之一；另外小鼠缺少物理因素的造模方法，也有待进一步探索。其次，SC在临床诊疗中有着性别差异，女性更容易应激，但目前的动物模型尚未对性别进行区分，是否雌性动物比雄性动物更易建立模型尚待探索。最后，目前的造模动物以啮齿类动物为主，缺乏猪、犬等大型动物模型，仅有少量研究显示实验猪在注射药物 Celocurin chloride后能够产生SC的反应^[43]，但很少有用该方法造模方法的研究报告，大型动物模型是否能够更加高度地模拟SC的病理状态，这也有待于进行更系统性的研究。

[作者贡献 Author Contribution]

吴昊晟提出文章思路, 撰写、修订文章;
苏航、朱超、王文慧和吴生兵对文章思路有重要建议, 对文章
框架及内容作批评性审阅;
崔帅、周美启对文章的知识性内容作批评性审阅, 并给予指导
性支持。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] SHAH R M, SHAH M, SHAH S, et al. Takotsubo syndrome and COVID-19: associations and implications[J]. *Curr Probl Cardiol*, 2021, 46(3): 100763. DOI: 10.1016/j. cpcardiol. 2020. 100763.
- [2] BARBIERI L, GALLI F, CONCONI B, et al. Takotsubo syndrome in COVID-19 era: is psychological distress the key? [J]. *J Psychosom Res*, 2021, 140: 110297. DOI: 10.1016/j. jpsychores. 2020.110297.
- [3] CASTILLO RIVERA A M, RUIZ-BAILÉN M, RUCABADO AGUILAR L. Takotsubo cardiomyopathy - a clinical review[J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(6): RA135-RA147. DOI:10.12659/msm. 881800.
- [4] OKURA H. Update of takotsubo syndrome in the era of COVID-19[J]. *J Cardiol*, 2021, 77(4): 361-369. DOI:10.1016/j. jjcc. 2020.10.004.
- [5] CHHABRA L. Prognostication in takotsubo syndrome[J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2022, 23(3):110. DOI:10.31083/j.rcm2303110.
- [6] TEMPLIN C, GHADRI J R, DIEKMANN J, et al. Clinical features and outcomes of takotsubo (stress) cardiomyopathy [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(10): 929-938. DOI: 10.1056/ NEJMoa1406761.
- [7] LYON A R, CITRO R, SCHNEIDER B, et al. Pathophysiology of takotsubo syndrome[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77(7):902-921. DOI:10.1016/j. jacc.2020.10.060.
- [8] LI C M, HUANG D, TANG J, et al. CIC-3 chloride channel is involved in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy[J]. *Gene*, 2018, 642:335-342. DOI:10.1016/j. gene.2017.11.045.
- [9] 张志红. 硫化氢对 Takotsubo 心肌病的保护作用及其机制探讨 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
ZHANG Z H. Protective effect of H₂S on takotsubo cardiomyopathy and its mechanism[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2017.
- [10] ALI A, REDFORS B, ALKHOURY J, et al. Sacubitril/valsartan decreases mortality in the rat model of the isoprenaline-induced takotsubo-like syndrome[J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8 (5):4130-4138. DOI:10.1002/ehf2.13530.
- [11] QI C L, SHAO Y Z, LIU X S, et al. The cardioprotective effects of icariin on the isoprenaline-induced takotsubo-like rat model: involvement of reactive oxygen species and the TLR4/ NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105733. DOI:10.1016/j. intimp.2019.105733.
- [12] 杜志君, 蔡伟文, 张文静, 等. 典型与非典型应激性心肌病大鼠模型的制备方法[J]. *广东医学*, 2016, 37(7):953-957. DOI:10.13820/j. cnki.gdyx.2016.07.001.
DU Z J, CAI W W, ZHANG W J, et al. Research on the rat model establishment methods of typical and atypical stress cardiomyopathy[J]. *Guangdong Med J*, 2016, 37(7): 953-957. DOI:10.13820/j. cnki.gdyx.2016.07.001.
- [13] GODSMAN N, KOHLHAAS M, NICKEL A, et al. Metabolic alterations in a rat model of takotsubo syndrome[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 118(8): 1932-1946. DOI: 10.1093/cvr/ cvab081.
- [14] 尹元立, 高永红. 血清缺血修饰白蛋白与大鼠应激性心肌病相关性分析[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2018, 10(5):621-624. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2018.05.30.
YIN Y L, GAO Y H. Correlation between serum ischemia modified albumin and rat Takotsubo cardiomyopathy[J]. *Chin J Evid Based Cardiovasc Med*, 2018, 10(5): 621-624. DOI: 10. 3969/j.issn.1674-4055.2018.05.30.
- [15] 蔡伟文, 杜志君, 查道刚. 大鼠应激性心肌病模型及其复发模型的制备[J]. *岭南心血管病杂志*, 2016, 22(3):315-319. DOI:10.3969/ j.issn.1007-9688.2016.02.18.
CAI W W, DU Z J, ZHA D G. Preparation for rat model of stress-induced cardiomyopathy and its recurrence model[J]. *South China J Cardiovasc Dis*, 2016, 22(3): 315-319. DOI: 10. 3969/j.issn.1007-9688.2016.02.18.
- [16] LIAO X D, CHANG E, TANG X M, et al. Cardiac macrophages regulate isoproterenol-induced takotsubo-like cardiomyopathy[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(3): e156236. DOI: 10.1172/jci. insight.156236.
- [17] SHAO Y Z, REDFORS B, STÅHLMAN M, et al. A mouse model reveals an important role for catecholamine-induced lipotoxicity in the pathogenesis of stress-induced cardiomyopathy[J]. *Eur J Heart Fail*, 2013, 15(1): 9-22. DOI: 10.1093/eurjhf/hfs161.
- [18] 向仕钊, 卞洲艳, 周恒, 等. 比索洛尔联合还原型谷胱甘肽改善应激性心肌病心肌重构[J]. *中国心血管杂志*, 2015, 20(5):358-365. DOI:10.3969/j.issn.1007-5410.2015.05.011.
XIANG S Z, BIAN Z Y, ZHOU H, et al. Combined utilization of bisoprolol and glutathione attenuates ventricular remodeling of takotsubo cardiomyopathy in mice[J]. *Chin J Cardiovasc Med*, 2015, 20(5): 358-365. DOI: 10.3969/j. issn. 1007-5410.2015. 05.011.
- [19] KHURANA I, MAXWELL S, ROYCE S, et al. SAHA attenuates Takotsubo-like myocardial injury by targeting an epigenetic Ac/Dc axis[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6:159. DOI: 10.1038/s41392-021-00546-y.
- [20] WALSH-WILKINSON E, ARSENAULT M, COUET J. Segmental analysis by speckle-tracking echocardiography of the left ventricle response to isoproterenol in male and female mice [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11085. DOI:10.7717/peerj.11085.
- [21] 万坤铭, 孙帅, 俞超芹. 应激致功能性下丘脑性闭经动物模型研究进展[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2022, 62(1):99-104. DOI:10. 13764/j.cnki.ncdm.2022.01.020.
WAN K M, SUN S, YU C Q. Advances in animal models of stress-induced functional hypothalamic amenorrhea[J]. *J Nanchang Univ Med Sci*, 2022, 62(1): 99-104. DOI: 10.13764/j. cnki.ncdm.2022.01.020.
- [22] 高源, 郭翠娟, 刘仁平, 等. 束缚应激对小鼠卵巢氧化损伤的实验研究[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2022, 62(2): 26-30. DOI: 10. 13764/j.cnki.ncdm.2022.02.005.
GAO Y, GUO C J, LIU R P, et al. A study on ovarian oxidative damage caused by restraint stress in mice[J]. *J Nanchang Univ Med Sci*, 2022, 62(2): 26-30. DOI: 10.13764/j. cnki. ncdm. 2022.02.005.
- [23] 齐跃, 房加雄, 董彦, 等. 束缚诱导大鼠应激性心肌病的有效性评价[J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2016, 25(10):791-794. DOI:10. 16548/j.2095-3720.2016.10.004.

- QI Y, FANG J X, DONG Y, et al. Evaluation of the immobilization effectiveness on inducing stress cardiomyopathy in rats[J]. J Logist Univ PAP Med Sci, 2016, 25(10):791-794. DOI:10.16548/j.2095-3720.2016.10.004.
- [24] 李永丰, 吴宇蔚, 乔海法. 足底电击应激诱发精神疾病模型的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2020, 36(4):464-468. DOI:10.16557/j.cnki.1000-7547.2020.04.018.
- LI Y F, WU Y W, QIAO H F. Research progress of the mental illness model induced by plantar shock stress[J]. Chin J Neuroanat, 2020, 36(4): 464-468. DOI: 10.16557/j.cnki. 1000-7547.2020.04.018.
- [25] 李凤, 李玉军, 王凯, 等. 大鼠应激性心脏病模型心肌组织BNP的表达变化[J]. 中国法医学杂志, 2015, 30(5):459-462, 467. DOI:10.13618/j.issn.1001-5728.2015.05.003.
- LI F, LI Y J, WANG K, et al. Expression of BNP in a rat model of stress cardiomyopathy[J]. Chin J Forensic Med, 2015, 30(5): 459-462, 467. DOI:10.13618/j.issn.1001-5728.2015.05.003.
- [26] 阿兰达. 大鼠应激性心脏病神经肽Y和PGC-1 α 表达的实验研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.
- ANANDA S. An Experimental study on the expression of Neuropeptide Y and PGC-1 α in a rat model of Stress Cardiomyopathy[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2010.
- [27] 石建, 曾安宁, 熊德高. 灯盏花素改善应激性心脏病大鼠心功能异常的机制[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(15):3646-3648. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2016.15.016.
- SHI J, ZENG A N, XIONG D G. Mechanism of breviscapine in improving cardiac dysfunction in rats with stress cardiomyopathy[J]. Chin J Gerontol, 2016, 36(15): 3646-3648. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2016.15.016.
- [28] 孙艳荣, 富华颖. 制动联合脱水建立应激性心脏病大鼠模型[J]. 泰山医学院学报, 2017, 38(5):497-499. DOI:10.3969/j.issn.1004-7115.2017.05.006.
- SUN Y R, FU H Y. Establishment of rat model of stress induced cardiomyopathy by combination of braking and dehydration[J]. J Taishan Med Coll, 2017, 38(5):497-499. DOI: 10.3969/j.issn.1004-7115.2017.05.006.
- [29] 郭瑞威, 杨丽霞, 奚银艳, 等. 电刺激迷走神经建立应激性心脏病家兔模型[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(3):186-189. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2016.03.005.
- GUO R W, YANG L X, XI Y Y, et al. Establishment of stress induced cardiomyopathy model by stimulation of vagus nerve with electricity signal in rabbit[J]. Lab Anim Comp Med, 2016, 36(3):186-189. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2016.03.005.
- [30] GOULD T D, DAO D T, KOVACSICS C E. The open field test [M]//Pietropaolo P. Mood and anxiety related phenotypes in mice. Totowa: Humana Press, 2009:1-20. DOI: 10.1007/978-1-60761-303-9_1.
- [31] THIPPESWAMY B S, MISHRA B, VEERAPUR V P, et al. Anxiolytic activity of *Nymphaea alba* Linn. in mice as experimental models of anxiety[J]. Indian J Pharmacol, 2011, 43(1):50-55. DOI:10.4103/0253-7613.75670.
- [32] LIPKIND D, SAKOV A, KAFKAFI N, et al. New replicable anxiety-related measures of wall vs center behavior of mice in the open field[J]. J Appl Physiol (1985), 2004, 97(1):347-359. DOI:10.1152/jappphysiol.00148.2004.
- [33] YAKUPOGLU H Y, SAEED S, SENIOR R, et al. Reversible exercise-induced left ventricular dysfunction in symptomatic patients with previous Takotsubo syndrome: insights from stress echocardiography[J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2020;jeaa237. DOI:10.1093/ehjci/jeaa237.
- [34] LEE M. Time course of functional recovery in takotsubo (stress) cardiomyopathy: a serial speckle tracking echocardiography and electrocardiography study[J]. J Cardiovasc Imaging, 2020, 28(1):50-60. DOI:10.4250/jcvi.2019.0083.
- [35] SEMELKA R C, TOMEI E, WAGNER S, et al. Interstudy reproducibility of dimensional and functional measurements between cine magnetic resonance studies in the morphologically abnormal left ventricle[J]. Am Heart J, 1990, 119(6):1367-1373. DOI:10.1016/S0002-8703(05)80187-5.
- [36] MITSUMA W, KODAMA M, ITO M, et al. Serial electrocardiographic findings in women with takotsubo cardiomyopathy[J]. Am J Cardiol, 2007, 100(1): 106-109. DOI: 10.1016/j.amjcard.2007.02.062.
- [37] ABRAHAM J, MUDD J O, KAPUR N, et al. Stress cardiomyopathy after intravenous administration of catecholamines and beta-receptor agonists[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 53(15):1320-1325. DOI:10.1016/j.jacc.2009.02.020.
- [38] GIANNI M, DENTALI F, GRANDI A M, et al. Apical ballooning syndrome or takotsubo cardiomyopathy: a systematic review [J]. Eur Heart J, 2006, 27(13):1523-1529. DOI:10.1093/eurheartj/ehl032.
- [39] CHHABRA L, BUTT N, AHMAD S A, et al. Electrocardiographic changes in takotsubo cardiomyopathy[J]. J Electrocardiol, 2021, 65: 28-33. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2020.12.006.
- [40] DJURIĆ I, OBRADOVIĆ S, GLIGIĆ B. Dynamics of electrocardiographic changes, brain-natriuretic peptide and cortisol levels in a patient with stress (takotsubo) cardiomyopathy: a case report[J]. Vojnosanit Pregl, 2013, 70(5):511-515. DOI:10.2298/vsp1305511d.
- [41] MADHAVAN M, BORLAUG B A, LERMAN A, et al. Stress hormone and circulating biomarker profile of apical ballooning syndrome (Takotsubo cardiomyopathy): insights into the clinical significance of B-type natriuretic peptide and troponin levels[J]. Heart, 2009, 95(17):1436-1441. DOI:10.1136/hrt.2009.170399.
- [42] AHMED K A, MADHAVAN M, PRASAD A. Brain natriuretic peptide in apical ballooning syndrome (Takotsubo/stress cardiomyopathy): comparison with acute myocardial infarction[J]. Coron Artery Dis, 2012, 23(4): 259-264. DOI: 10.1097/MCA.0b013e3283526a57.
- [43] JOHANSSON G, JONSSON L, LANNEK N, et al. Severe stress-cardiopathy in pigs[J]. Am Heart J, 1974, 87(4):451-457. DOI: 10.1016/0002-8703(74)90170-7.
- (收稿日期:2022-07-06 修回日期:2022-09-21)
(本文编辑:张俊彦,丁宇菁,富群华,郭嘉欣)
- 【引用本文】**
吴昊晟, 苏航, 朱超, 等. 应激性心脏病动物模型的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 173-179. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.102.
- WU H S, SU H, ZHU C, et al. Research progress of animal models of stress cardiomyopathy[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 173-179. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.102.

甲型流感病毒对人与实验动物神经系统影响的研究进展

丁相荣¹, 霍殊纳², 代解杰¹

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118; 2. 昆明医科大学, 昆明 650500)

[摘要] 流感作为一种高度传染性疾病, 主要影响呼吸系统, 常导致肺部并发症, 但它也会导致多种罕见却严重的神经系统并发症, 包括格林-巴利综合征、横贯性脊髓炎、脑膜脑炎等。近年来, 多个国家和地区相继报告了甲型流感病毒引起的神经系统并发症病例, 逐渐引起国际关注。然而该并发症的发病机制尚不清楚, 相关病例及动物实验科学研究较少, 无特定疗法。本文围绕人与实验动物感染甲型流感病毒后神经系统并发症的研究进展进行归纳总结, 以期对甲型流感病毒引起的神经系统性疾病有一个全面的认识和理解。

[关键词] 甲型流感病毒; 神经系统并发症; 动物实验

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0180-06



Research Progress on Influenza A Virus and Nervous System Disease of Human and Experimental Animals

DING Xiangrong¹, HUO Shurui², DAI Jiejie¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 2. Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Correspondence to: DAI Jiejie (ORCID: 0000-0002-4242-9089), E-mail: dj@imbcams.com.cn

[ABSTRACT] Influenza is a highly contagious disease that mainly affects the respiratory system and often leads to lung complications. Also it can cause a variety of very rare and serious neurological complications, including Guillain-Barre syndrome, transverse myelitis, meningoencephalitis and others. In recent years, neurological complications caused by influenza A virus have been reported in many countries and regions, and gradually attracted international attention. However, the pathogenesis of this complication remains unclear, and there are few related cases and animal experimental studies, and no specific treatment. Therefore, the authors summarized the study of neurological complications caused by influenza A virus in human and laboratory animals, in order to have a comprehensive understanding of the neurological diseases caused by influenza A virus.

[Key words] Influenza A virus; Neurological complications; Animal experiment

神经系统由中枢神经系统和周围神经系统两部分组成。中枢神经系统是人体中最重要的部分, 通常被称作身体的控制中心^[1]。血-脑屏障、血-脑脊液屏障以及脑脊液-脑屏障能阻止嗜神经性病毒通过脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)或血源性扩散等途径渗透入脑脊液或脑组织, 进而保护中枢神经系统^[2]。尽管如

此, 一些病毒仍能进入中枢神经系统并引起疾病。在美国, 每年由病毒引起的中枢神经系统感染病例的数量远超过由酵母菌、霉菌、细菌以及原生动物引起的感染病例的总和^[3]。甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)作为人兽共患病原体, 具有变异率高、传染性强、危害性大以及可引起全球大流行等特点, 一直以

[基金项目] 云南省科技人才和平台计划项目“中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼯标准化与应用研究省创新团队”(2017HC019)

[第一作者] 丁相荣(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型及机制研究。E-mail: dxr00912@163.com

[通信作者] 代解杰(1961—), 男, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型建立与比较医学。E-mail: dj@imbcams.com.cn。ORCID: 0000-0002-4242-9089

来都是关注的重点对象^[4]。虽然其主要感染目标是肺部,但也可导致急性或慢性神经系统并发症,包括热性惊厥、雷氏综合征、脑膜炎/脑炎、横贯性脊髓炎、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)等^[5],故增加了神经退行性疾病的长期风险^[6]。根据其直接感染中枢神经系统的能力,可将流感病毒分为嗜神经性流感病毒与非嗜神经性流感病毒。在人类中传播的大都为非嗜神经性流感病毒,包括H1N1病毒(1918年西班牙流感和2009年猪流感)、H2N2病毒(1957—1958年亚洲流感)和H3N2病毒(1968年香港流感)。本文在阐述人与实验动物感染甲型流感病毒后引起的神经系统并发症类型的基础上,进一步对目前研究甲型流感病毒相关性并发症所使用的实验动物种类、相关并发症的发病特点及分子机制进行归纳总结,以期对甲型流感病毒相关性中枢神经系统并发症的研究和治疗提供相关资料。

1 热性惊厥

热性惊厥是流感病毒感染最常见的神经系统并发症。有研究报告,在因流感住院的人群中,热性惊厥的发病率占神经系统并发症的80.6%;而热性惊厥在甲型流感病毒感染者中的发病率为8.4%,显著高于乙型流感病毒感染者中4.6%的发病率,并常见于6月龄至5岁儿童,伴有发热但没有中枢神经系统感染^[7-8]。Sawires等^[9]发现与四月份相比,在甲型流感高峰期(秋冬季)热性惊厥的发病率增加了48%,而在乙型流感高峰期(秋冬季)热性惊厥发病率只增加了31%,进一步证实甲型流感较乙型流感更易引起热性惊厥。与未被感染者相比,甲型流感病毒感染者更容易发生局部癫痫^[10]。然而,大多数热性惊厥患儿预后良好,很少发生长期神经发育并发症和后遗症^[11];只有当癫痫与更严重的神经系统并发症(如脑炎或脑病)相关时,才会影响预后^[12]。

2 流感相关性脑病

流感相关性脑病是流感病毒感染后第二常见的神经系统并发症,一般与突然出现的高热、严重抽搐、快速进展的昏迷以及2或3日内死亡有关,死亡率约为30%。流感相关性脑病在日本高发,偶发于欧洲和北美,患者多为幼儿,高峰年龄为1~3岁^[13]。流感相关性脑病的临床表现范围广,致病机制尚不明确。细胞因子风暴被认为是导致流感相关性脑病的重要原因

之一^[14]。这是一种不受控制的全身炎症反应^[15]。在一些病例中,流感病毒可能通过周围神经感染中枢神经系统,或通过受损的血脑屏障诱导中枢神经系统发生细胞因子风暴^[16]。细胞因子对免疫系统中的病毒清除和细胞间交流极其重要,但过多的细胞因子可能会导致严重的免疫病理损伤^[17]。与此相一致的是,Daiva等^[18]发现与未感染流感病毒或无神经系统疾病的患者相比,流感相关性脑病患者的血清白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-10和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 水平显著升高。体外细胞实验结果显示,禽流感病毒H7N9和大流行性H1N1都可以感染分化的人类神经元细胞和星形胶质细胞,其中H7N9能诱导细胞中IL-8、IL-6、趋化因子(C-C motif)配体2、TNF- α 和 β 干扰素(interferon- β , IFN- β)等促炎细胞因子的表达,而且星形胶质细胞相比神经元细胞更敏感,但H1N1感染对细胞因子的表达没有明显影响。血-脑屏障在控制病毒入侵中枢神经系统方面具有重要作用,而星形胶质细胞过度表达IL-8会增加血-脑屏障对病毒感染的通透性。此外,感染H7N9的星形胶质细胞在感染后期仍能诱导细胞因子的表达,这可能是促炎级联反应中自分泌/旁分泌反馈与其他感染细胞串扰的结果^[19]。

在动物实验中也观察到类似结果。Gefei等^[20]通过分离感染禽流感H5N1病毒和人H1N1病毒的小鼠星形胶质细胞和小胶质细胞,建立了小鼠体外模型,并经研究发现,流感病毒受体SA α 2,3Gal和SA α 2,6Gal在小鼠星形胶质细胞和小胶质细胞中均匀分布。这首次证明H5N1和H1N1流感病毒都能感染小鼠星形胶质细胞和小胶质细胞,并能在体外诱导细胞病变、细胞凋亡并产生促炎细胞因子,有助于流感病毒导致神经损伤机制的研究。类似结果在雪貂模型中也得到证实。Kirsty等^[21]通过接种H5N1病毒和H1N1病毒,建立了流感病毒感染的雪貂模型;观察发现,接种H1N1的雪貂大脑中IL-6和IL-8表达显著上调,嗅球中TNF- α 、IL-6和IL-8的表达也显著上调;而接种H5N1的雪貂中,仅在少量脑干小神经元和小胶质细胞中检测到TNF- α 表达,在少数小神经元或小胶质细胞以及细胞类型不明的脑膜细胞中检测到IL-6的表达,IL-8在少数脑干内皮细胞以及嗅球、小脑和脑膜细胞中表达。这些数据表明,在H5N1和H1N1病毒感染期间,中枢神经系统中的促炎细胞因子反应增强。Wang等^[22]通过鼻内滴注甲型流感WSN/33(H1N1)病毒,建立了流感小鼠模型,研究发现感染H1N1的小鼠肺和脑中

IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达, 以及病毒复制活性和血管通透性等, 在感染期的第 1~6 天均显著升高。

上述基于患者人群、细胞模型和动物模型的研究结果均表明, 细胞因子在流感病毒相关性中枢神经系统并发症的发展中起到重要作用^[14]。其中, 促炎细胞因子在免疫反应和中枢神经系统正常功能中起着至关重要的作用, 与神经炎症有关, 可能导致神经精神疾病, 如认知障碍和神经行为改变。而在流感病毒感染期间, TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等促炎细胞因子表达上调^[23], 其中 IL-1 β 不仅是细胞因子风暴的组成部分, 还促进 T 细胞和中性粒细胞向感染部位转运, 诱导内皮细胞和上皮细胞产生 IL-6、TNF- α 等第二波细胞因子。因此, 当感染 H3N2、H1N1 以及 H7N9 病毒时, 过量的 IL-1 β 可使疾病恶化, 导致严重后果^[17]。不仅如此, 促炎细胞因子还可能通过增加血-脑屏障的通透性, 引起神经元、神经胶质细胞的凋亡以及血管内皮损伤, 导致急性脑水肿以及坏死^[18]。然而, 目前常用于研究甲型流感相关神经系统的疾病的小鼠和雪貂模型都有其局限性, 而树鼩对流感病毒敏感, 其 N-乙酰神经氨酸 (α , 2-3 和 α , 2-6 唾液酸) 受体分布与人类相似, 并已有研究表明树鼩在流感研究中具有适用性^[24-25]。此外, 有研究发现树鼩的一些免疫系统信号通路及重要神经系统与灵长类动物具有高度同源性, 而且除了 N-糖基化数量和半胱氨酸位置的微小差异外, 树鼩 IFN- β 和 IFN- α 的预测结构与人类相近^[26]。因此, 树鼩可能为甲型流感病毒神经疾病免疫性致病机制及细胞因子抑制剂类药物的研究提供更理想的动物模型。

除细胞因子风暴外, 其他因素也可能导致流感相关性脑病。(1) 遗传背景: 日本的一项研究发现, 在流感相关性脑病患者的血清和脑脊液中几种细胞因子浓度以及血清转氨酶和乳酸脱氢酶水平升高, 并伴有全身血管损伤以及多器官衰竭, 表明血管或血管内膜损伤以及高血红蛋白血症可能在流感相关性脑病的发病机制中发挥重要作用。而日本常发生以血管损伤或全身炎症反应为特征的川崎病, 这可能是由于其具有促进高红细胞血症发展或全身炎症反应的遗传背景, 这也解释了为什么在日本流感相关性脑病的发病率高于其他国家^[27]。(2) 代谢紊乱: 姚敏等^[28]通过接种 A 型流感病毒株 (Aichi/2/68) 构建了新生鼠、幼年鼠以及成年鼠的流感小鼠模型, 并发现病毒感染后, 小鼠脑组织中的总脂、游离肉毒碱明显升高, 短链肉毒碱明显减少, 长链肉毒碱略微增加, 提示流感病毒感

染会影响脑组织中脂肪在线粒体中的氧化与代谢。(3) 病毒入侵中枢神经系统: 在雪貂和小鼠流感模型中已观察到流感病毒通过三叉神经、迷走神经、嗅觉神经、面神经、舌咽神经以及前庭蜗神经而扩散到中枢神经系统的证据^[29-30], 这与 Park 等^[31]的研究结果相一致。Park 等^[31]的小鼠模型研究结果表明, 流感病毒通过周围神经入侵中枢神经系统, 导致流感相关性脑病如脑炎的发病。Emmie 等^[32]利用雪貂作为研究 1918 年 H1N1 西班牙大流感的动物模型, 发现周围和中枢神经系统均存在活性病毒的复制。但流感病毒是否入侵脑实质仍是一个争议性话题。在许多病例报告中, 患者的脑脊液中无法检测到流感病毒抗原; 然而也有研究报告, 在极少数患者的脑脊液或脑组织中可检测到流感病毒。Dou 等^[33]在一名因甲型流感 H3N2 病毒感染而表现为急性脑炎的老年人的脑脊液中检测到 H3N2 病毒 RNA。Mak 等^[34]在一名因感染禽流感病毒 H5N1 而导致脑炎并发梗阻性脑积水的 2 岁儿童的脑脊液中也检测到病毒 RNA。无论是季节性还是大流行性非嗜神经性甲型流感病毒通常都无法入侵神经系统, 但其仍与神经系统疾病有关; 而嗜神经性甲型流感病毒通常是高致病性禽流感病毒, 具有进入中枢神经系统并复制的能力^[35]。

3 神经退行性疾病

帕金森病是一种神经衰弱疾病, 其可以影响 1%~2% 的 55 岁以上人口。根据流行病学研究以及临床描述, 病毒是导致帕金森病的诱因之一。而与帕金森病相关的最常见病毒是流感病毒。已知 1918 年 H1N1 病毒引起的西班牙流感、1957—1958 年 H2N2 病毒引起的亚洲流感、1968 年 H3N2 病毒引起的香港流感和 2009 年 H1N1 病毒引起的猪流感等的爆发均与具有帕金森病特征的脑炎有关^[36]。动物实验为流感引起的帕金森疾病研究提供了有力证据。例如, 感染 H5N1 的小鼠表现出包括运动迟缓、 α 突触核蛋白磷酸化和聚集水平升高、黑质紧致 (SNpc) 多巴胺能神经元表型丧失以及小胶质细胞活化在内的帕金森病病理损伤^[37]。有研究发现, 甲型流感病毒 H1N1 感染不仅扰乱了人类多巴胺能神经元的蛋白质稳态, 还显著增加了小鼠体内 α -突触核蛋白水平, 这可能是因为 H1N1 通过阻断蛋白质降解途径而破坏蛋白质平衡, 进而导致 α -突触核蛋白在人类多巴胺能神经元和小鼠大脑中聚集, 说明细胞蛋白平衡可能在某种程度上补偿了错误折叠的 α 突触核蛋白^[38]。此外, Hosseini 等^[39]的小鼠实验结

果也显示, 甲型流感病毒感染能增强小鼠海马体内神经胶质细胞的激活状态及其密度, 引起神经炎症, 导致海马神经元形态和认知缺陷的改变, 以及持久的病毒特异性神经元连接改变。该研究还发现, 感染非嗜神经性 H3N2 的阿尔兹海默病模型小鼠 (APP/PS1) 表现出更明显的认知障碍和淀粉样蛋白 β 斑块负荷, 表明非嗜神经性 H3N2 感染作为外周免疫刺激, 可能通过小胶质细胞过度激活加重阿尔兹海默病症状^[6]。流感病毒感染可以通过激活大脑中的星形胶质细胞和小胶质细胞引发炎症级联反应, 从而增加发生神经精神性疾病和神经退行性疾病的可能性^[39]。

4 格林-巴利综合征

格林-巴利综合征是一种“经典”神经免疫性疾病, 是典型的感染后周围神经系统综合征^[40]。在西方国家, 60%~70% 的格林-巴利综合征病例的病因不明, 这种不明原因的病例数量在冬季达到高峰, 而患者在发病前通常感染呼吸系统疾病或流感^[40]。Valerie 等^[41] 报告, 由不明原因导致的格林-巴利综合征每月发病率与报告的流感样疾病呈正相关, 但频率较低 (1996—2004 年的 405 例格林-巴利综合征患者中仅有 3.5% 与流感有关); 大多数病例集中在流感高发季节, 尤其是甲型流感病毒 H3N2 (1996—1997 年和 1999—2000 年流行), 涉及甲型流感病毒感染的格林-巴利综合征病例与研究其他病例不同, 甲型流感引起格林-巴利综合征病例从感染到发作的时间较长 (中位数为 15 d), 并且无抗神经节苷脂抗体的应答。

5 总结与展望

过去一个世纪以来, 研究人员对流感相关神经性并发症的了解越来越多。随着 2009 年甲型 H1N1 流感的出现和流行, 有关流感神经系统并发症的报告不断增加, 研究人员对其并发症的兴趣剧增^[7]。目前, 甲型流感病毒的高致病株已被用作流感病毒感染导致人神经系统疾病动物模型的建立及机制研究的有效材料。但甲型流感病毒引起的中枢神经系统并发症的机制和后果尚不清楚, 尤其是其能否入侵中枢神经系统仍是一个争议性话题。尽管有病例报告以及动物实验证明流感病毒能够入侵中枢神经系统, 然而在大多数病例的脑脊液中仍未检测到病毒 RNA, 这种差异仍需临床报告以及动物实验验证。

目前, 细胞因子风暴是最广为接受的一个流感相关中枢神经系统并发症的机制假说, 但其具体作用和

机制仍未阐明。而且流感病毒感染重症并发症带来的高死亡率和严重后遗症迫切需要解决。因此, 寻找和建立合适的流感神经系统并发症的动物模型, 阐明甲型流感病毒与中枢神经系统细胞之间的相互作用, 揭示其发病机制, 对于预防和治疗这种严重的神经系统并发症至关重要, 是推进相关研究进展的关键。目前最常见的用于研究流感相关神经并发症的模型动物是小鼠和雪貂。小鼠是用于流感病毒感染神经病理学评估的首选实验动物, 其大脑解剖和神经评估方法优于雪貂。值得注意的是, 流感病毒受体在人脑和小鼠脑中的表达模式并不完全一样: 在小鼠脑中, 禽流感病毒受体 (AIV-R) 在小脑浦肯野神经细胞中表达, 而人流感病毒受体 (HuIV-R) 在小脑白质和部分脑中表达; 在人脑中, 包括小脑、脑干、海马体以及大脑皮层等区域的许多神经元和神经胶质细胞同时表达 AIV-R 和 HuIV-R^[42]。而树鼯作为灵长类动物的近亲, 在生理学、免疫学、分类学以及基因组学等方面与人类的相似性高于常用的小鼠、大鼠等啮齿类实验动物。此外, 树鼯与灵长类动物在一些免疫信号通路、重要神经系统、免疫细胞、细胞因子结构和功能方面具有高度相似性^[26]。这些特点为树鼯成为神经系统疾病动物模型提供了坚实基础。目前树鼯已用于阿尔兹海默病、帕金森病等多种神经系统疾病的研究, 但尚未见利用树鼯动物模型研究流感病毒相关神经系统疾病的报告。基于本实验室前期研究发现感染 H1N1 A/PR8/34 病毒的树鼯脑部能够发生病理性改变 (尚未发表), 笔者推断树鼯可能是研究流感神经系统并发症的理想模型, 但其可行性还有待进一步研究证实。

[作者贡献 Author Contribution]

丁相荣参与讨论确定主体框架, 收集资料, 撰写初稿并修改;
霍姝洵参与讨论, 收集资料;
代解杰指导论文设计, 文章修饰及把关。

[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] ALAJANGI H K, KAUR M, SHARMA A, et al. Blood-brain barrier: emerging trends on transport models and new-age strategies for therapeutics intervention against neurological disorders[J]. *Mol Brain*, 2022, 15(1):49. DOI: 10.1186/s13041-022-00937-4.
- [2] AMPIE L, MCGAVERN D B. Immunological defense of CNS barriers against infections[J]. *Immunity*, 2022, 55(5): 781-799. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.04.012.
- [3] ROMERO J R, NEWLAND J G. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents[J]. *Semin*

- Pediatr Infect Dis, 2003, 14(2): 72-82. DOI: 10.1053/spid.2003.127223.
- [4] 兰旭, 邓春青. 甲型流感病毒血凝素研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(6): 563-570. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.055.
LAN X, DENG C Q. Research progress in influenza A virus hemagglutinin[J]. Chin J Zoonoses, 2021, 37(6): 563-570. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.055.
 - [5] CHEN Q L, LI P Q, LI S Y, et al. Brain complications with influenza infection in children[J]. J Behav Brain Sci, 2020, 10(3): 129-152. DOI: 10.4236/jbbs.2020.103008.
 - [6] HOSSEINI S, MICHAELSEN-PREUSSE K, SCHUGHART K, et al. Long-term consequence of non-neurotropic H3N2 influenza A virus infection for the progression of alzheimer's disease symptoms[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 643650. DOI: 10.3389/fncel.2021.643650.
 - [7] HAN J Y, HAN S B. Seizures related to influenza in pediatric patients: a comparison with seizures associated with other respiratory viral infections[J]. J Clin Med, 2021, 10(14): 3088. DOI: 10.3390/jcm10143088.
 - [8] LEUNG YU M K, LEUNG C P P, WONG W H S, et al. Clinical spectrum and burden of influenza-associated neurological complications in hospitalised paediatric patients[J]. Front Pediatr, 2021, 9: 752816. DOI: 10.3389/fped.2021.752816.
 - [9] SAWIRES R, KULDORFF M, FAHEY M, et al. Snotwatch: an ecological analysis of the relationship between febrile seizures and respiratory virus activity[J]. BMC Pediatr, 2022, 22(1): 359. DOI: 10.1186/s12887-022-03222-4.
 - [10] KWONG K L, LAM S Y, QUE T L, et al. Influenza A and febrile seizures in childhood[J]. Pediatr Neurol, 2006, 35(6): 395-399. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2006.07.005.
 - [11] HAN J Y, HAN S B. Febrile seizures and respiratory viruses determined by multiplex polymerase chain reaction test and clinical diagnosis[J]. Children (Basel), 2020, 7(11): 234. DOI: 10.3390/children7110234.
 - [12] EKSTRAND J J. Neurologic complications of influenza[J]. Semin Pediatr Neurol, 2012, 19(3): 96-100. DOI: 10.1016/j.spen.2012.02.004.
 - [13] SUGAYA N. Influenza-associated encephalopathy in Japan [J]. Semin Pediatr Infect Dis, 2002, 13(2): 79-84. DOI: 10.1053/spid.2002.122993.
 - [14] 雷雨璇, 舒跃龙, 房师松. 流感相关中枢神经系统并发症研究进展 [J]. 病毒学报, 2022, 38(1): 196-204. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004088.
LEI Y X, SHU Y L, FANG S S. Research progress on influenza-related complications of the central nervous system[J]. Chin J Virol, 2022, 38(1): 196-204. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004088.
 - [15] KHORRAMDELAZAD H, KAZEMI M H, NAJAFI A, et al. Immunopathological similarities between COVID-19 and influenza: investigating the consequences of Co-infection[J]. Microb Pathog, 2021, 152: 104554. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104554.
 - [16] MASTROLIA M V, RUBINO C, RESTI M, et al. Characteristics and outcome of influenza-associated encephalopathy/encephalitis among children in a tertiary pediatric hospital in Italy, 2017-2019[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 1012. DOI: 10.1186/s12879-019-4636-5.
 - [17] GU Y N, ZUO X, ZHANG S Y, et al. The mechanism behind influenza virus cytokine storm[J]. Viruses, 2021, 13(7): 1362. DOI: 10.3390/v13071362.
 - [18] RADZIŠAUSKIENĖ D, VITKAUSKAITĖ M, ŽVINYTĖ K, et al. Neurological complications of pandemic A(H1N1)2009pdm, postpandemic A(H1N1)v, and seasonal influenza A[J]. Brain Behav, 2021, 11(1): e01916. DOI: 10.1002/brb3.1916.
 - [19] NG Y P, YIP T F, PEIRIS J S M, et al. Avian influenza A H7N9 virus infects human astrocytes and neuronal cells and induces inflammatory immune responses[J]. J Neurovirol, 2018, 24(6): 752-760. DOI: 10.1007/s13365-018-0659-8.
 - [20] WANG G F, ZHANG J, LI W Z, et al. Apoptosis and proinflammatory cytokine responses of primary mouse microglia and astrocytes induced by human H1N1 and avian H5N1 influenza viruses[J]. Cell Mol Immunol, 2008, 5(2): 113-120. DOI: 10.1038/cmi.2008.14.
 - [21] SHORT K R, VEERIS R, LEIJTEN L M, et al. Proinflammatory cytokine responses in extra-respiratory tissues during severe influenza[J]. J Infect Dis, 2017, 216(7): 829-833. DOI: 10.1093/infdis/jix281.
 - [22] WANG S Y, LE T Q, KURIHARA N, et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza[J]. J Infect Dis, 2010, 202(7): 991-1001. DOI: 10.1086/656044.
 - [23] BOHMWALD K, ANDRADE C A, KALERGIS A M. Contribution of pro-inflammatory molecules induced by respiratory virus infections to neurological disorders[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021, 14(4): 340. DOI: 10.3390/ph14040340.
 - [24] LI R F, YUAN B, XIA X S, et al. Tree shrew as a new animal model to study the pathogenesis of avian influenza (H9N2) virus infection[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 166. DOI: 10.1038/s41426-018-0167-1.
 - [25] KAYESH M E H, SANADA T, KOHARA M, et al. Tree shrew as an emerging small animal model for human viral infection: a recent overview[J]. Viruses, 2021, 13(8): 1641. DOI: 10.3390/v13081641.
 - [26] 周风梅, 李润峰, 袁兵, 等. 树鼩应用于病毒感性疾病动物模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(6): 115-120. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.021.
ZHOU F M, LI R F, YUAN B, et al. Research advances of application of tree shrew as an animal model of viral infectious diseases[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(6): 115-120. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.021.
 - [27] MORISHIMA T, TOGASHI T, YOKOTA S, et al. Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan[J]. Clin Infect Dis, 2002, 35(5): 512-517. DOI: 10.1086/341407.
 - [28] 姚敏, 汪晓莺, 董志珍, 等. 甲型流感病毒感染对鼠脑组织线粒体脂代谢功能的影响[J]. 南通大学学报(医学版), 2012, 32(1): 18-21. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7887.2012.01.006.
YAO M, WANG X Y, DONG Z Z, et al. Effect of influenza A virus infection on function of fat metabolism in mouse brain mitochondria[J]. J Nantong Univ Med Sci, 2012, 32(1): 18-21. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7887.2012.01.006.
 - [29] YAMADA M, BINGHAM J, PAYNE J, et al. Multiple routes of invasion of wild-type Clade 1 highly pathogenic avian

- influenza H5N1 virus into the central nervous system (CNS) after intranasal exposure in ferrets[J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 124(4):505-516. DOI: 10.1007/s00401-012-1010-8.
- [30] JANG H, BOLTZ D, STURM-RAMIREZ K, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33): 14063-14068. DOI: 10.1073/pnas.0900096106.
- [31] PARK C H, ISHINAKA M, TAKADA A, et al. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice[J]. *Arch Virol*, 2002, 147(7):1425-1436. DOI: 10.1007/s00705-001-0750-x.
- [32] DE WIT E, SIEGERS J Y, CRONIN J M, et al. 1918 H1N1 influenza virus replicates and induces proinflammatory cytokine responses in extrapulmonary tissues of ferrets[J]. *J Infect Dis*, 2018, 217(8): 1237-1246. DOI: 10.1093/infdis/jiy003.
- [33] DOU Y C, LI Y Q. Influenza A H3N2-associated meningoencephalitis in an older adult with viral RNA in cerebrospinal fluid: case report[J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 874078. DOI: 10.3389/fneur.2022.874078.
- [34] MAK G C K, KWAN M Y W, MOK C K P, et al. Influenza A (H5N1) virus infection in a child with encephalitis complicated by obstructive hydrocephalus[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(1):136-139. DOI: 10.1093/cid/cix707.
- [35] FROGGATT H M, HEATON N S. Nonrespiratory sites of influenza-associated disease: mechanisms and experimental systems for continued study[J]. *FEBS J*, 2022, 289(14): 4038-4060. DOI: 10.1111/febs.16363.
- [36] SMEYNE R J, NOYCE A J, BYRNE M, et al. Infection and risk of parkinson's disease[J]. *J Parkinsons Dis*, 2021, 11(1):31-43. DOI: 10.3233/JPD-202279.
- [37] JANG H, BOLTZ D, MCCLAREN J, et al. Inflammatory effects of highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in the CNS of mice[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(5): 1545-1559. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5123-11.2012.
- [38] MARREIROS R, MÜLLER-SCHIFFMANN A, TROSSBACH S V, et al. Disruption of cellular proteostasis by H1N1 influenza A virus causes α -synuclein aggregation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(12):6741-6751. DOI: 10.1073/pnas.1906466117.
- [39] HOSSEINI S, WILK E, MICHAELSEN-PREUSSE K, et al. Long-term neuroinflammation induced by influenza A virus infection and the impact on hippocampal neuron morphology and function[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(12): 3060-3080. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1740-17.2018.
- [40] BLACKBURN K M, WANG C. Post-infectious neurological disorders[J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2020, 13: 175628642095290. DOI: 10.1177/1756286420952901.
- [41] SIVADON-TARDY V, ORLIKOWSKI D, PORCHER R, et al. Guillain-Barré syndrome and influenza virus infection[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(1):48-56. DOI: 10.1086/594124.
- [42] KIM M, YU J E, LEE J H, et al. Comparative analyses of influenza virus receptor distribution in the human and mouse brains[J]. *J Chem Neuroanat*, 2013, 52: 49-57. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2013.05.002.
- (收稿日期:2022-09-02 修回日期:2022-12-17)
(本文编辑:张俊彦,富群华,洪怡,丁宇菁)

【引用本文】

丁相荣, 霍妹洵, 代解杰. 甲型流感病毒对人与实验动物神经系统影响的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 180-185. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.142.

DING X R, HUO S R, DAI J J. Research progress on influenza A virus and nervous system disease of human and experimental animals[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2): 180-185. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.142.

《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

胰高血糖素样肽 1 类似物对阿尔兹海默症的神经保护作用及机制研究进展

梅承翰, 陈蓓蓓

(贵州省分析测试研究院, 贵阳 550000)

[摘要] 胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是一种由肠道分泌的促胰岛素激素, 能有效增强胰岛素的释放, 同时还具有多种药理活性。GLP-1 类似物已广泛用于治疗 II 型糖尿病。而阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 与 II 型糖尿病之间存在胰岛素抵抗等共同的病理特征, 并且流行病学调查研究显示 II 型糖尿病会显著增加 AD 发病风险, 二者紧密相关。目前, GLP-1 类似物在 AD 临床前动物研究和人体临床试验中均显示出一定的治疗效果。本文首先介绍了 GLP-1 和 AD 的主要特征, 然后分析了临床前动物模型研究中 GLP-1 治疗 AD 的几种作用机制。GLP-1 易于透过血脑屏障, 通过结合并激活脑中广泛分布的 GLP-1 受体 (glucagon-like peptide 1 receptor, GLP-1R) 影响多个病理生理过程, 如葡萄糖代谢、神经炎症、线粒体功能和细胞增殖等。而胰岛素抵抗和炎症是 AD 与 II 型糖尿病的关键共同通路。GLP-1 可能是通过改善线粒体功能和糖酵解、降低氧化应激水平、抗炎、抗凋亡、诱导神经发生和抑制胶质细胞增生等, 发挥神经保护作用。本文希望为进一步研究 GLP-1 类似物对 AD 的治疗作用提供参考, 并为 AD 患者提供新的治疗策略。

[关键词] 胰高血糖素样肽 1; 阿尔兹海默症; β -淀粉样蛋白; 神经保护作用

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0186-08



Research Progress on Neuroprotective Effects and Mechanisms of Glucagon-like Peptide 1 Analogues in Alzheimer's Disease

MEI Chenghan, CHEN Beibei

(Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550000, China)

Correspondence to: CHEN Beibei (ORCID: 0009-0001-1609-2259), E-mail: chenbeibei@gzata.cn

[ABSTRACT] Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is a kind of incretin produced in the intestinal with multiple pharmacological effects, which can stimulate insulin secretion effectively. Various GLP-1 analogues have been widely used in the treatment of type 2 diabetes mellitus. Alzheimer's disease (AD) is closely related to type 2 diabetes mellitus, with some common pathological features, such as insulin resistance, and epidemiological studies also showed that patients with type 2 diabetes mellitus have an increased risk of developing AD. GLP-1 analogues have shown beneficial effects in both preclinical animal research and clinical trials of AD. Therefore, the authors summarized the main characteristics of GLP-1 and AD, and analyzed the mechanisms of GLP-1 in preclinical AD studies of animal models. GLP-1 readily crosses the blood-brain barrier and exerts its neuroprotective effects by binding to and activating the widely distributed GLP-1 receptors (GLP-1Rs) in the brain, affecting multiple physiological and pathological processes including glucose metabolism, neuroinflammation, mitochondrial function, and cell proliferation. Insulin resistance and inflammation are key common pathways in AD and type 2 diabetes. GLP-1 may exert its neuroprotective effects by improving mitochondrial function and glycolysis, reducing oxidative stress

[基金项目] 贵州科学院省级科研专项资金项目“食用菌多糖提取物的增强免疫力功能评价研究”(黔科院科专合字[2020]02号); 贵州科学院创新人才团队能力提升工程建设项目“贵州特色优势资源功效性评价及产品研发团队”

[第一作者] 梅承翰 (1991—), 男, 博士研究生, 工程师, 从事血脑屏障破坏在神经退行性和血管性疾病中的生理作用及分子调控机制研究。E-mail: ccklmch@sina.cn

[通信作者] 陈蓓蓓 (1979—), 女, 博士, 副研究员, 从事材料科学、健康毒理学相关工作。E-mail: chenbeibei@gzata.cn。ORCID: 0009-0001-1609-2259

levels, exerting anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, inducing neurogenesis, and inhibiting glial cell proliferation. This paper maybe provide the reference for further study of GLP-1 analogues in AD, hoping to open new therapy venues for AD patients.

[Key words] Glucagon-like peptide 1; Alzheimer's disease; Amyloid β -protein; Neuroprotective effect

胰高血糖素样肽1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是一种由回肠L细胞分泌的肠促胰岛素激素,能有效促进胰岛素释放和抑制胰高血糖素释放,并影响营养物质摄入,还可增加饱腹感。GLP-1同时具有多种药理活性,对大脑、胰脏、肾脏、肌肉、肝脏、胃肠道、心脏和骨等都有广泛影响。GLP-1可结合并激活GLP-1受体 (glucagon-like peptide 1 receptor, GLP-1R),从而发挥调控作用。多种GLP-1R激动剂已用于治疗II型糖尿病。长期以来,胰岛素抵抗一直被认为是II型糖尿病的核心特征;但近年在阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 患者大脑中也发现胰岛素抵抗,甚至在未并发II型糖尿病的AD患者脑中也有发现^[1]。另有研究显示,葡萄糖代谢功能失调是AD的

重要疾病进程之一^[2]。上述文献提示AD可能与大脑内胰岛素抵抗有关,而II型糖尿病是AD发展的重要风险因素。多个临床前动物模型研究结果显示GLP-1类似物如利拉鲁肽、艾塞那肽及其他GLP-1R激动剂等对AD的认知功能下降有一定的改善作用^[3-9](表1),但其作用机制错综复杂,目前尚不清楚。本文就GLP-1类似物用于AD治疗的临床前动物实验研究进展进行简要综述。

1 GLP-1概述

GLP-1是回肠L细胞分泌的由30个氨基酸组成的肠促胰岛素激素,在中枢神经系统中具有神经营养和神经保护作用^[10]。当食物进入十二指肠时GLP-1被分

表1 GLP-1类似物在AD动物模型研究中的应用

Table 1 Applications of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogues in Alzheimer's disease (AD) animal model

药物 Drug	动物 Animal	给药前月龄或 体质量 Age or body mass before dosing	给药方式及剂量 Dosage and Administration	给药周期 Dosing intervals	行为学实验 Behavioural experiments	结论 Conclusions
利拉鲁肽 Liraglutide ^[3]	APP/PS1小鼠(δ)	14月龄	ip, 25 nmol/kg体质量	qd, 连续2月	新物体识别、水迷宫	逆转记忆损害
利拉鲁肽 Liraglutide ^[4]	5xFAD小鼠(δ)	4月龄	ih, 25 nmol/kg体质量	qd, 连续2月	水迷宫	改善认知
GLP-1/GIP/Gcg三激动剂 ^[5]	3xTg-AD小鼠(δ/η)	7月龄	ip, 10 nmol/kg体质量	qd, 连续30 d	旷场、Y迷宫、水迷宫	改善长期空间记忆和工作记忆
DA5-CH ^[6]	APP/PS1小鼠(δ/η)	9月龄	ip, 10 nmol/kg体质量	qd, 连续28 d	旷场、Y迷宫、水迷宫	改善工作记忆和长期空间记忆
利拉鲁肽 Liraglutide ^[7]	Swiss小鼠(脑室内注射A β 寡聚物, δ)	3月龄	ip, 25 nmol/kg体质量	qd, 连续7 d	新物体识别、对象位置记忆模型	可逆转A β 寡聚物引起的记忆障碍
艾塞那肽 Exendin-4 ^[8]	SD大鼠(海马内微量注射A β 1-42, δ)	220~260 g	海马内微量注射, 0.2 nmol (1 μ L)	单次	水迷宫	显著拮抗A β 片段引起的空间学习和记忆能力损害
DA4-JC ^[9]	3xTg-AD小鼠(δ/η)	8月龄	ip, 10 nmol/kg体质量	qd, 连续46 d	旷场、新物体识别、Y迷宫、水迷宫	改善认知

注: GLP-1指胰高血糖素样肽1; GIP指葡萄糖依赖性促胰岛素多肽; Gcg指胰高血糖素; DA5-CH和DA4-JC均为GLP-1/GIP双重激动剂; AD指阿尔兹海默症; ip指腹腔内注射; qd指每天一次; ih指皮下注射。

Note: GLP-1, glucagon-like peptide 1; GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide; Gcg, glucagon; DA5-CH and DA4-JC are GLP-1/GIP dual agonists; AD, Alzheimer's disease; ip, intraperitoneal injection; qd, quaque die; ih, subcutaneous injection.

泌入血^[11]。GLP-1 可被二肽基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase 4, DDP4) 所酶解^[12]。DDP4 快速酶解 GLP-1 后, 内源性 GLP-1 半衰期缩短 (约 1~2 min)^[13]。GLP-1 通过 GLP-1R 发挥作用, GLP-1R 在胰脏、肾脏、心脏、肺、脂肪、平滑肌以及中枢神经系统的一些细胞中均有表达^[13]。

GLP-1R 激活后, 激活腺苷酸环化酶并产生环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP), 进而激活与 cAMP 相关的第二信使通路, 如蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和环腺苷酸结合蛋白 (exchange proteins directly activated by cAMP, Epac) 通路^[14]。在神经系统中, GLP-1R 激活后可导致细胞内 cAMP 和 PKA 水平增加, 钙通道开放, 致使更多的神经递质被释放。此外 GLP-1R 激活后, 可激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路, 进而参与细胞生长、分化和修复等过程^[15]。

研究人员运用不同策略开发出了长效或短效的 GLP-1R 激动剂, 如短效的艾塞那肽、利西拉肽, 以及长效的利拉鲁肽、阿必鲁肽、索马鲁肽和度拉糖肽等^[13], 用于糖尿病和肥胖症的治疗。

GLP-1 具有多种药理学作用^[16]。在代谢方面, GLP-1 可调控胰岛素分泌, 降低胃排空, 抑制食物摄取, 增加尿和钠排泄, 调控啮齿类动物的 β 细胞增殖。GLP-1 在心血管和神经保护方面亦有作用, 可抑制炎症和凋亡, 还能影响学习、记忆和奖赏等行为^[17]。GLP-1 易于穿过血脑屏障, 可影响中枢神经系统的多个生理和病理过程, 如神经炎症、线粒体功能和细胞增殖等^[18]。海马和新皮质锥体神经元的树突和胞体中也含有 GLP-1R, 这些受体在神经元活动和树突传递中有重要作用^[10]。GLP-1R 在大脑内广泛分布, 调控葡萄糖代谢, 影响神经和认知功能^[14]。

2 AD 概述

AD 是一种进行性神经退行性疾病, 以短期和长期记忆丢失、决策能力下降、健忘和情绪变化等为特征^[19]。AD 病理切片具有淀粉样蛋白斑块、神经原纤维缠结、神经炎症等特点。AD 病因以 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 级联反应假说为主, 然而其经过近三十年的发展和完善, 到目前为止, 除 A β 清除药物 donanemab^[20] 和 lecanemab 显示出一定疗效外,

其他药物在临床上均未获成功^[21]。AD 药物开发频遭失败, 人们不得不重新审视 AD 的发病机制。有研究报告, AD 患者大脑中还存在其他组织病理学、分子和生化异常, 如细胞丢失、神经突营养不良、细胞促死亡基因和信号通路激活增加、能量代谢障碍、线粒体功能障碍、慢性氧化应激和 DNA 损伤^[22]。

传统认为 A β 是一种异常产生的蛋白, 由 β -分泌酶和 γ -分泌酶对 β -淀粉样前体蛋白进行顺序切割而来^[23]。A β 能诱导膜脂质过氧化、损害离子激活的 ATP 酶、葡萄糖和谷氨酸转运体的功能, 进而损伤和杀死神经元^[24]。虽然 A β 沉积可能是 AD 的关键起始病理因素, 但其他下游事件如神经炎症和微管相关蛋白 tau 堆积, 可能是神经退化的主要驱动因素^[21]。最近在认知正常的 A β 阳性个体中进行的横断面和纵向 tau-PET 成像研究显示, tau 病变在内嗅皮质外广泛分布并持续积累, 这表明 tau 的传播可能不像之前认为的那样在空间上受到限制。随着年龄增长, tau 病理改变在内嗅皮层和内侧颞叶积累, 即使在没有认知衰退的情况下也是如此, 这被称为原发性年龄相关性 tau 病^[25]。因此, 一些研究者提出 tau 假说, 即 AD 的认知衰退和神经退行性变主要是由 tau 病理的发生和扩散所驱动^[21]。

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 是一种载脂蛋白, 其主要功能是作为脂蛋白颗粒中的脂质结合蛋白, 参与脂质向靶部位的转运和递送。ApoE 可能在很大程度上通过影响 A β 病理来调节 AD 发病风险。ApoE 对 tau 病理和 tau 相关的神经变性也有调节作用^[26]。ApoE4 基因是 AD 最强的遗传风险因素。ApoE4 可能通过调节免疫和小胶质细胞反应提高 AD 的发病风险。ApoE4 携带者对静脉注射脂多糖有更强的全身炎症反应, 如体温升高更强烈, 全血中肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α 分泌水平更高^[27]。

近年来研究人员发现, AD 患者脑中存在胰岛素抵抗, 而胰岛素抵抗长期以来被认为是 II 型糖尿病的核心病理特征。胰岛素抵抗即靶组织不能对胰岛素产生正常反应。II 型糖尿病患者因胰岛素信号通路受损, 致使脑组织出现 A β 斑块沉积、线粒体功能障碍和炎症应激^[28]。流行病学研究显示, II 型糖尿病使 AD 的患病风险增加 2 倍^[29]。AD 与 II 型糖尿病关联复杂, 可能存在共同致病机制, 如炎症和氧化应激增加、血脂异常、线粒体和突触功能受损、胰岛素抵抗, 而胰岛素抵抗和炎症是二者的关键共同通路^[28]。

越来越多的证据表明, AD 与胰岛素抵抗有关。高胰岛素血症、高血糖和高瘦素血症是胰岛素抵抗的重要危险因素^[16]。外周高胰岛素血症可导致 AD 患者脑内胰岛素含量降低, 而 AD 患者脑中胰岛素受体不仅数量减少、定位错误, 且亲和力低^[30]。高血糖可通过如葡萄糖神经毒性、血管损伤和晚期糖基化终末产物聚集等多种机制影响大脑^[30]。胰岛素能与 A β 相互作用, 直接影响 AD 病理^[31]。胰岛素还能通过影响脂代谢和蛋白酶 (如胰岛素降解酶), 防护 A β 突触毒性, 并调节 A β 清除^[31]。AD 患者外周的胰岛素抵抗与额叶和颞叶区 A β 沉积正相关, 外周胰岛素抵抗可能先于 A β 沉积发生^[30]。一项 AD 神经病理学研究显示, 胰岛素抵抗与缠结标志物共定位^[31]。在认知正常的成年人中, 外周胰岛素抵抗增加与较差的认知分数和脑脊液中较高浓度的 p-tau 和总 tau 相关^[32]。相反, tau 也可以影响胰岛素信号转导。临床前研究显示, tau 基因敲除小鼠的大脑胰岛素敏感性降低, 突触可塑性缺陷, 短期记忆受损^[33]。Tau 和胰岛素之间的相互作用可能会导致恶性循环, 致使神经退化和认知障碍。胰岛素对突触形成和维持有很好的调节作用, 对长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 和抑制也有相应影响^[31]。大脑胰岛素抵抗会损害突触的完整性, 而 A β 和 tau 也可以干扰突触上胰岛素的作用^[34]。

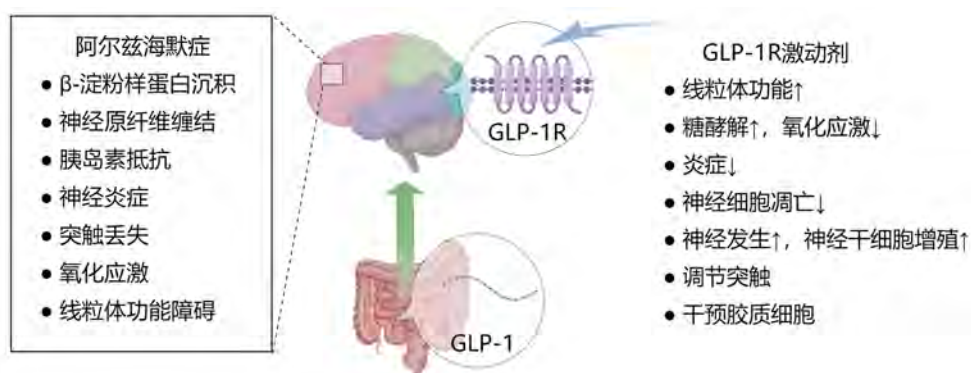
胰岛素抵抗与氧化应激有关。预防疾病特异性蛋白 (如 A β 和 tau 蛋白) 聚集可能是对早期氧化损伤的一种补偿反应。在早期, 氧化应激刺激 c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 激活。缺损的胰岛素信号通路与蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 和

叉头转录因子 (forkhead transcription factors, FOXO) 有关^[16]。

用于治疗糖尿病的药物也可能影响 AD 病理过程, 如 A β 斑块沉积和神经原纤维缠结。胰岛素或长效胰岛素类似物可改善记忆、认知和大脑中的葡萄糖吸收。¹⁸F-DG-PET 成像显示, 胰岛素或长效胰岛素类似物可减少中枢神经系统中的 AD 生物标志物水平^[30]。大脑外切体生化分析显示, 在接受 20 U 胰岛素治疗的患者中, 胰岛素抵抗的生物标志物 (如 pS312-IRS-1 和 Py-IRS-1) 水平得到改善, 且与 AD 评定量表即认知分量表变化显著正相关^[35], 提示克服大脑中的胰岛素抵抗可以减缓 AD 疾病进展。

3 GLP-1 治疗 AD 的作用机制

GLP-1R 激动剂在 AD 临床前动物体内药效研究中均显示出一定的治疗作用。GLP-1 类似物可改善 APP/PS1 小鼠的胰岛素抵抗^[36]。GLP-1 类似物是大脑中的一种生长因子, 能引起突触形成和神经发生, 并可保护大脑免受氧化损伤。AD 转基因小鼠用 GLP-1 类似物治疗后, AD 关键病理标志物如 A β 低聚物和 A β 斑块水平降低, 小胶质细胞激活减少, 并且记忆行为改善^[37]。本实验室前期研究表明索马鲁肽在水迷宫和回避实验中有效改善了 APP/PS1 小鼠的学习认知, 病理结果也显示 AD 转基因小鼠大脑中反应性小胶质细胞减少 (结果尚未发表)。如图 1 所示, GLP-1R 激动剂的神经保护作用机制错综复杂, 即可以改善线粒体功能以及糖酵解和氧化应激水平, 并具有抗炎、抗凋亡功能, 也可以影响神经干细胞和神经前体细胞, 调节突触以及干预胶质细胞等。



注: GLP-1 指胰高血糖素样肽 1; AD 指阿尔兹海默症; 本图由 Figdraw 绘制。

Note: GLP-1, glucagon-like peptide 1; AD, Alzheimer's disease; this figure is drawn by Figdraw soft.

图 1 GLP-1 在 AD 中的神经保护作用示意图

Figure 1 Schematic representation of neuroprotective effects of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in Alzheimer's disease (AD)

3.1 改善线粒体功能

线粒体作为关键细胞器控制着细胞的能量代谢、抗氧化、细胞存活和死亡等。星形胶质细胞和神经元细胞线粒体异常与中枢神经系统疾病紧密相关。GLP-1 能通过改善线粒体功能, 发挥神经保护作用。Xie 等^[38] 研究表明, GLP-1 通过激活 5x FAD 小鼠 cAMP/PKA 通路, 增加动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, DRP1) 在 s637 位点的磷酸化, 还能减轻 A β 诱导的星形胶质细胞中线粒体破裂。GLP-1 能改善星形胶质细胞中 A β 诱导的能量障碍、线粒体活性氧过度产生、线粒体膜电位塌陷以及细胞毒性。Cai 等^[9] 研究表明, GLP-1/促胰岛素释放肽 (glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP) 双受体激动剂 DA4-JC 可使 APP/PS1/tau 小鼠神经元细胞线粒体数目和体积正常化。进一步的动物实验结果证明, GLP-1 类似物通过下调 BAX/BAD 凋亡通路 (SD 大鼠), 或通过 Bcl-2 (SD 大鼠、小鼠神经元细胞) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助因子 1 α (peroxisome proliferators activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α) 促线粒体通路 (PC12 细胞、ICR 小鼠), 保护线粒体活性, 增强线粒体基因发生^[39]。GLP-1 类似物不仅可以减轻线粒体结构损伤, 还能恢复神经元细胞中线粒体数目和体积, 并保护线粒体活性免受损伤。

3.2 改善糖酵解和氧化应激

有氧糖酵解的主要功能之一在于支持细胞内的合成代谢反应, 而 AD 早期阶段的有氧糖酵解常发生变化。氧化应激导致的线粒体功能障碍也是 AD 发病的重要因素。GLP-1 在改善糖酵解和降低氧化应激水平方面也多有报告。GLP-1 在 GLP-1R 过表达细胞系 SH-GLP-1R⁺ 和人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中可通过抑制烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶, 降低晚期糖基化终产物诱导的活性氧^[40]。GLP-1 能降低 Ts65Dn 唐氏综合征模型小鼠海马中线粒体氧化应激水平, 并改善树突棘形态, 表现为成熟的树突棘增加、未成熟的棘减少^[41]。GLP-1 还能减轻 5x FAD 小鼠星形胶质细胞中 A β 诱导的糖酵解下降, 降低氧化磷酸化水平和活性氧的产生^[4]。总之, GLP-1 可通过抑制晚期糖基化终产物受体和氧化应激, 保护神经元细胞对抗晚期糖基化终产物诱导的细胞凋亡, 并通过增强大脑有氧糖酵解、降低氧化磷酸化和氧化应激水平来改善认知。

3.3 抗炎作用

炎症也是 AD 的一个主要特征。AD 患者的白细胞

介素 (interleukin, IL) -1、IL-6 和 TNF- α 等促炎细胞因子水平常升高^[42]。基于 SD 大鼠的实验结果显示, 炎症时小胶质细胞激活, 并释放促炎细胞因子, 引发免疫响应, 导致免疫细胞激活和 A β 沉积^[43]。进一步的细胞水平及动物体内实验结果显示, GLP-1 在脑等器官激活后, 可能影响 PI3K/Akt 信号通路 (PC12 细胞、SH-SY5Y 细胞、db/db 小鼠), 调节 NF- κ B (小鼠星形胶质细胞、小鼠小胶质细胞), 控制小胶质细胞激活, 促进抗炎细胞因子产生, 减少 TNF- α 产生 (大鼠星形胶质细胞、SD 大鼠、APP/PS1 小鼠), 激活信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of Transcription 3, STAT3) (RAW 264.7 细胞)^[44]。慢性炎症能激活星形胶质细胞和小胶质细胞, 而 GLP-1 激动剂可显著降低促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β (大鼠星形胶质细胞、SD 大鼠、APP/PS1 小鼠), 降低大脑慢性炎症和 A β 斑块沉积 (APP/PS1 小鼠), 保留形成的记忆。利拉鲁肽还能抑制 APP/PS1 小鼠 TNF- α 、IL-1、IL-10 等促炎细胞因子^[45]。

3.4 抗凋亡

GLP-1 对神经元的促存活效应还归因于降低内质网应激和增强神经细胞自噬。利拉鲁肽能促进 Akt 和 STAT3 激活 (PC12 细胞、SH-SY5Y 细胞、db/db 小鼠), 降低神经细胞凋亡, 利拉鲁肽也有可能是通过激活星形胶质细胞和小胶质细胞中 GLP-1R 而降低神经细胞凋亡^[44]。GLP-1 可能通过过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferators-activated receptor- γ , PPAR- γ) 降低羧甲基赖氨酸诱导的 PC12 细胞凋亡, 部分依赖于 PPAR- γ 调控的 GLP-1R^[46]。

3.5 影响神经干细胞和神经前体细胞

神经发生是从神经元祖细胞或神经干细胞产生新神经元。研究表明, 成人神经发生与记忆功能和 LTP 的促进有关^[47]。在 AD 患者脑中, 通常观察到神经发生减少和疾病病理加重。GLP-1R 激动剂能增强 ob/ob 小鼠、db/db 小鼠和高脂饮食小鼠 (Swiss TO) 神经祖细胞增殖^[48], 并增加 C57BL/6 小鼠海马齿状回神经发生^[49]。早期研究显示, AD 模型小鼠 APP/PS1 脑中神经干细胞增殖受损, 而 GLP-1 类似物可促进 SD 大鼠大脑中神经干细胞增殖^[50]。GLP-1R 激动剂通过 MAPK 通路激活 C57BL/6 小鼠海马神经发生^[50]。

3.6 调节突触

利拉鲁肽能防止 APP/PS1 AD 模型小鼠胰岛素受体和突触丢失, 并逆转 AD 相关的 A β 寡聚体诱导的记忆

障碍。利拉鲁肽的神经保护机制涉及 PKA 信号通路激活。非人灵长类动物猕猴侧脑室注射 A β 寡聚体后,与记忆相关的胰岛素受体和突触明显丢失,而给予利拉鲁肽后,特定脑区中与 AD 相关的胰岛素受体、突触和 tau 病变减少^[7]。利拉鲁肽也能增强 APP/PS1 AD 模型小鼠突触的可塑性、密度、结构、突触数量,增加突触小泡蛋白和突触后密度蛋白 95 (postsynaptic density-95, PSD-95) 水平,同时增强 LTP 和脉冲传播^[51]。突触对于神经元之间的信息交流至关重要,AD 患者脑内存在大量突触丢失,而 GLP-1R 激动剂可有效预防突触丢失。此外,SD 大鼠脑组织学研究也证明 GLP-1R 在树突上有表达,表明 GLP-1R 可直接影响突触的可塑性。

3.7 干预胶质细胞

Park 等^[52]报告了一种基于基因工程的 GLP-1R 激动剂 NLY01,能选择性阻断 A β 诱导的小胶质细胞激活,抑制反应性星形胶质细胞形成,保护 5xFAD 和 3xTg-AD 小鼠的神经元。GLP-1 还通过 cAMP/PKA 途径,增强 5xFAD 小鼠 A β 处理后的星形胶质细胞对神经元的支持能力^[4]。利拉鲁肽能减少 APP/PS1 AD 模型小鼠皮质和海马中的小胶质细胞增生和星形胶质细胞增生^[51]。GLP-1R 激动剂能阻断小胶质细胞介导的反应性星形胶质细胞转化,并保留神经元的活力,此外还可提升小胶质细胞对神经元细胞的支持能力,从而改善 AD 小鼠的空间学习和记忆。

4 展望

临床前动物实验研究显示, GLP-1 类似物在改善 AD 病理特征和认知上具有有益作用;然而在人体临床研究中,其仅显示出一定的积极效果。英国帝国理工学院开展的利拉鲁肽治疗 AD 的疗效评价试验可能会为 GLP-1 类似物在中枢神经系统中的实际作用提供更多有用信息,并为 AD 患者开拓新的治疗方案。以 A β 级联反应假说开发的药物绝大多数止步于临床试验,因而修正、补充和完善 AD 病因假说对于后续抗 AD 药物研究很有必要。此外,采用以家族性 AD 为特征的 AD 动物模型测试抗 AD 药物,可能是导致绝大多数抗 AD 药物折戟于临床试验的原因之一。而且目前针对 AD 的 GLP-1 类似物应用研究多集中于家族性 AD 动物模型。因此,有必要建立更加接近人类 AD 的动物模型,并加以测试。

【作者贡献 Author Contribution】

梅承翰检索文献,撰写和修改文稿;
陈蓓蓓修改文稿。

【利益声明 Declaration of Interest】

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献 References】

- [1] ARNOLD S E, ARVANITAKIS Z, MACAULEY-RAMBACH S L, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(3):168-181. DOI:10.1038/nrneurol.2017.185.
- [2] BUTTERFIELD D A, HALLIWELL B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(3): 148-160. DOI: 10.1038/s41583-019-0132-6.
- [3] MCCLEAN P L, HÖLSCHER C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76(Pt A): 57-67. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.005.
- [4] ZHENG J P, XIE Y Z, REN L J, et al. GLP-1 improves the supportive ability of astrocytes to neurons by promoting aerobic glycolysis in Alzheimer's disease[J]. *Mol Metab*, 2021, 47:101180. DOI:10.1016/j.molmet.2021.101180.
- [5] LI T, JIAO J J, HÖLSCHER C, et al. A novel GLP-1/GIP/Gcg triagonist reduces cognitive deficits and pathology in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Hippocampus*, 2018, 28(5):358-372. DOI:10.1002/hipo.22837.
- [6] CAO Y, HÖLSCHER C, HU M M, et al. DA5-CH, a novel GLP-1/GIP dual agonist, effectively ameliorates the cognitive impairments and pathology in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 827: 215-226. DOI:10.1016/j.ejphar.2018.03.024.
- [7] BATISTA A F, FORNY-GERMANO L, CLARKE J R, et al. The diabetes drug liraglutide reverses cognitive impairment in mice and attenuates insulin receptor and synaptic pathology in a non-human primate model of Alzheimer's disease[J]. *J Pathol*, 2018, 245(1):85-100. DOI:10.1002/path.5056.
- [8] WANG X H, WANG L, JIANG R R, et al. Exendin-4 antagonizes A β 1-42-induced attenuation of spatial learning and memory ability[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(5): 2885-2892. DOI: 10.3892/etm.2016.3742.
- [9] CAI H Y, YANG D, QIAO J, et al. A GLP-1/GIP dual receptor agonist DA4-JC effectively attenuates cognitive impairment and pathology in the APP/PS1/tau model of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 83(2):799-818. DOI:10.3233/JAD-210256.
- [10] HÖLSCHER C. Potential role of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in neuroprotection[J]. *CNS Drugs*, 2012, 26(10):871-882. DOI: 10.2165/11635890-000000000-00000.
- [11] GRIECO M, GIORGI A, GENTILE M C, et al. Glucagon-like peptide-1: a focus on neurodegenerative diseases[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13:1112. DOI:10.3389/fnins.2019.01112.

- [12] HOLST J J. The physiology of glucagon-like peptide 1[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(4): 1409-1439. DOI: 10.1152/physrev.00034.2006.
- [13] ANDERSEN A, LUND A, KNOP F K, et al. Glucagon-like peptide 1 in health and disease[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(7):390-403. DOI:10.1038/s41574-018-0016-2.
- [14] DOYLE M E, EGAN J M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas[J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 113(3): 546-593. DOI:10.1016/j.pharmthera.2006.11.007.
- [15] CALSOLARO V, EDISON P. Novel GLP-1 (glucagon-like peptide-1) analogues and insulin in the treatment for Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases [J]. *CNS Drugs*, 2015, 29(12): 1023-1039. DOI: 10.1007/s40263-015-0301-8.
- [16] YILDIRIM SIMSIR I, SOYALTIN U E, CETINKALP S. Glucagon like peptide-1 (GLP-1) likes Alzheimer's disease[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(3): 469-475. DOI: 10.1016/j. dsx. 2018. 03.002.
- [17] MÜLLER T D, et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)[J]. *Mol Metab*, 2019, 30:72-130. DOI:10.1016/j.molmet.2019.09.010.
- [18] ATHAUDA D, FOLTYNIE T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action[J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(5):802-818. DOI:10.1016/j.drudis.2016.01.013.
- [19] BULGART H R, NECZYPOR E W, WOLD L E, et al. Microbial involvement in Alzheimer disease development and progression[J]. *Mol Neurodegener*, 2020, 15(1):42. DOI:10.1186/s13024-020-00378-4.
- [20] MINTUN M A, LO A C, DUGGAN EVANS C, et al. Donanemab in early Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(18): 1691-1704. DOI:10.1056/NEJMoa2100708.
- [21] LONG J M, HOLTZMAN D M. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies[J]. *Cell*, 2019, 179(2): 312-339. DOI:10.1016/j.cell.2019.09.001.
- [22] CASADESUS G, PUIG E R, WEBBER K M, et al. Targeting gonadotropins: an alternative option for Alzheimer disease treatment[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 2006(3):39508. DOI: 10.1155/JBB/2006/39508.
- [23] HAASS C, KAETHER C, THINAKARAN G, et al. Trafficking and proteolytic processing of APP[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(5): a006270. DOI:10.1101/cshperspect.a006270.
- [24] PERRY T A, GREIG N H. A new Alzheimer's disease interventive strategy: GLP-1[J]. *Curr Drug Targets*, 2004, 5(6): 565-571. DOI:10.2174/1389450043345245.
- [25] CRARY J F, TROJANOWSKI J Q, SCHNEIDER J A, et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging[J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 128 (6):755-766. DOI:10.1007/s00401-014-1349-0.
- [26] SHI Y, HOLTZMAN D M. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(12): 759-772. DOI: 10.1038/s41577-018-0051-1.
- [27] GALE S C, GAO L, MIKACENIC C, et al. APO ϵ 4 is associated with enhanced in vivo innate immune responses in human subjects[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 134(1): 127-34. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.01.032.
- [28] MITTAL K, KATARE D P. Shared links between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: a review[J]. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*, 2016, 10(2): S144-S149. DOI:10.1016/j.dsx.2016.01.021.
- [29] BARBAGALLO M, DOMINGUEZ L J. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease[J]. *World J Diabetes*, 2014, 5(6):889-893. DOI: 10.4239/wjd.v5.i6.889.
- [30] KELLAR D, CRAFT S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(9): 758-766. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30231-3.
- [31] ARNOLD S E, ARVANITAKIS Z, MACAULEY-RAMBACH S L, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(3):168-181. DOI:10.1038/nrneurol.2017.185.
- [32] LAWS S M, GASKIN S, WOODFIELD A, et al. Insulin resistance is associated with reductions in specific cognitive domains and increases in CSF tau in cognitively normal adults[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9766. DOI: 10.1038/s41598-017-09577-4.
- [33] BIUNDO F, DEL PRETE D, ZHANG H, et al. A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3184. DOI:10.1038/s41598-018-21596-3.
- [34] FORNER S, BAGLIETTO-VARGAS D, MARTINI A C, et al. Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony[J]. *Trends Neurosci*, 2017, 40(6): 347-357. DOI: 10.1016/j.tins.2017.04.002.
- [35] MUSTAPIC M, TRAN J, CRAFT S, et al. Extracellular vesicle biomarkers track cognitive changes following intranasal insulin in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 69(2): 489-498. DOI:10.3233/JAD-180578.
- [36] TALBOT K. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and its potential treatment with GLP-1 analogs[J]. *Neurodegener Dis Manag*, 2014, 4(1): 31-40. DOI:10.2217/nmt.13.73.
- [37] MCCLEAN P L, PARTHSARATHY V, FAIVRE E, et al. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2011, 31 (17):6587-6594. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0529-11.2011.
- [38] XIE Y Z, ZHENG J P, LI S Q, et al. GLP-1 improves the neuronal supportive ability of astrocytes in Alzheimer's disease by regulating mitochondrial dysfunction via the cAMP/PKA pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 188: 114578. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114578.
- [39] HÖLSCHER C. Insulin signaling impairment in the brain as a risk factor in Alzheimer's disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11:88. DOI:10.3389/fnagi.2019.00088.
- [40] CHEN S, YIN L, XU Z, et al. Inhibiting receptor for advanced glycation end product (AGE) and oxidative stress involved in the protective effect mediated by glucagon-like peptide-1 receptor on AGE induced neuronal apoptosis[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 612:193-198. DOI:10.1016/j.neulet.2015.12.007.

- [41] DAY S M, YANG W Z, WANG X, et al. Glucagon-like peptide-1 cleavage product improves cognitive function in a mouse model of down syndrome[J]. eNeuro, 2019, 6(2): ENEURO.0031-ENEURO.0019.2019. DOI:10.1523/ENEURO.0031-19.2019.
- [42] OZBEN T, OZBEN S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease[J]. Clin Biochem, 2019, 72:87-89. DOI:10.1016/j.clinbiochem. 2019. 04.001.
- [43] LIU X Y, ZHANG N, ZHANG S X, et al. Potential new therapeutic target for Alzheimer's disease: Glucagon-like peptide-1[J]. Eur J Neurosci, 2021, 54(10): 7749-7769. DOI: 10.1111/ejn.15502.
- [44] ROWLANDS J, HENG J L, NEWSHOLME P, et al. Pleiotropic effects of GLP-1 and analogs on cell signaling, metabolism, and function[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9:672. DOI: 10.3389/fendo.2018.00672.
- [45] MASKERY M, GOULDING E M, GENGLER S, et al. The dual GLP-1/GIP receptor agonist DA4-JC shows superior protective properties compared to the GLP-1 analogue liraglutide in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease[J]. Am J Alzheimers Dis Other Dement, 2020, 35: 1533317520953041. DOI:10.1177/1533317520953041.
- [46] ZHANG H Q, SONG B, ZHU W W, et al. Glucagon-like peptide-1 attenuated carboxymethyl lysine induced neuronal apoptosis via peroxisome proliferation activated receptor- γ [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(14):19013-19027. DOI:10.18632/aging.203351.
- [47] HAMILTON A, HOLSCHER C. The effect of ageing on neurogenesis and oxidative stress in the APP(swe)/PS1 (deltaE9) mouse model of Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 2012, 1449:83-93. DOI:10.1016/j.brainres.2012.02.015.
- [48] HAMILTON A, PATTERSON S, PORTER D, et al. Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain[J]. J Neurosci Res, 2011, 89(4):481-489. DOI:10.1002/jnr.22565.
- [49] HUNTER K, HÖLSCHER C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis[J]. BMC Neurosci, 2012, 13: 33. DOI: 10.1186/1471-2202-13-33.
- [50] BAE C S, SONG J. The role of glucagon-like peptide 1 (GLP1) in type 3 diabetes: GLP-1 controls insulin resistance, neuroinflammation and neurogenesis in the brain[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11): 2493. DOI:10.3390/ijms18112493.
- [51] VARGAS-SORIA M, CARRANZA-NAVAL M J, DEL MARCO A, et al. Role of liraglutide in Alzheimer's disease pathology[J]. Alzheimers Res Ther, 2021, 13(1): 112. DOI: 10.1186/s13195-021-00853-0.
- [52] PARK J S, KAM T I, LEE S, et al. Blocking microglial activation of reactive astrocytes is neuroprotective in models of Alzheimer's disease[J]. Acta Neuropathol Commun, 2021, 9(1): 78. DOI:10.1186/s40478-021-01180-z.

(收稿日期:2022-08-30 修回日期:2022-12-09)

(本文编辑:张俊彦,富群华,周烁,丁宇菁)

[引用本文]

梅承翰, 陈蓓蓓. 胰高血糖素样肽1类似物对阿尔兹海默症的神经保护作用及机制研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 186-193. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.136.

MEI C H, CHEN B B. Research progress on neuroprotective effects and mechanism of glucagon-like peptide 1 analogues in Alzheimer's disease[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 186-193. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.136.

《实验动物与比较医学》有关作者投稿必备信息和材料的说明

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

1. 所有署名作者的信息, 包括最高学历、职称、研究方向、E-mail、电话, 以及开放研究者与贡献者身份识别码 (open researcher and contributor ID, ORCID) 等。

2. 第一作者单位盖章的论文审查表或介绍信扫描件, 需承诺本文符合科研诚信要求。

3. 涉及动物实验的研究性文章还需提供实验动物的生产许可证和质量合格证、实验场所的实验动物使用许可证、该研究的实验动物福利伦理审查表的扫描件。文中注明以上三证一表的准确编号, 并在文末列出本文涉及的医学伦理声明。

4. 填写作者贡献及利益冲突声明表, 并在文末列出所有署名作者的贡献情况及利益声明。

5. 研究如有基金资助, 请提供与本文内容相符的基金立项证明, 并在首页注明基金名称、受资助项目名称及编号。

以上2~5材料均请打包后, 作为附件上传至本刊投审稿系统。若材料或信息不齐、造假, 编辑部将直接退稿。

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

《实验动物与比较医学》编辑部



安新颖, 博士, 研究员, 硕士生导师, 中国医学科学院医学信息研究所医学科技评价与战略情报研究中心主任, 医学科技评价研究室主任, 中华医学会医学信息学分会委员。研究方向为医学信息分析与科技评价: 在医学情报分析方面, 自主研发千万数量级的评价数据库和分析系统, 开展多源异构数据整合分析; 在医学科技评价方面, 率领团队积极探索医学科技评价的新方向、新思路、新模式, 打造面向医学领域的科技评价标杆, 持续9年发布覆盖全国1660余家医院的《中国医院科技量值》和110余所高校的《中国医学院校科技量值》报告, 受到社会各界的广泛关注, 为国家医学科技创新布局提供重要支撑。近年来主持国家科技支撑计划、国家重点研发计划子课题、国家自然科学基金项目等国家级课题3项及教育部人文社科课题1项。在 *Scientometrics*、*Journal of Information Science*、《情报学报》、《图书情报工作》等期刊发表论文100余篇。作为副主编, 编写“十四五”规划教材《信息分析方法及医学应用》, 参编专著多部。申请国家发明专利1项, 软件著作权4项。受邀在重要学术会议上做大会报告20余次。

日本实验动物发展现状分析

苟欢, 安新颖, 童俞嘉, 王琰, 杨爽

(北京协和医学院/中国医学科学院医学信息研究所, 北京 100020)

[摘要] 实验动物为人类医学研究和生命健康做出了重要贡献。过去数十年, 日本实验动物科学发展较为迅速, 为世界实验动物领域的发展提供了重要支撑。因此, 了解日本实验动物的管理模式、资源存储情况, 分析日本实验动物发展的优势, 提出强化我国实验动物高质量发展的建议, 具有重要意义。本文通过文献调研, 首先分析了日本实验动物管理体系, 包括法规政策、科研经费管理、实验动物管理、人才培养, 以及标准与规范体系等; 然后梳理了日本实验动物研究现状, 包括实验动物资源、主要研究机构和生产企业等; 在此基础上总结发现, 目前日本实验动物研究领域呈现出政策体系完备、管理方式灵活、资源储备丰富和产业规模化发展的特点; 最后针对国内现存问题, 提出中国实验动物科技领域发展建议: (1) 借鉴日本实验动物法制化管理方式, 加强与完善我国实验动物立法和管理模式; (2) 加大科研经费投入, 发挥研究机构、学会、行业的作用, 推进实验动物资源增量建设和产业化发展。

[关键词] 日本; 实验动物; 资源; 管理体系; 法规

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0194-11



Analysis on the Development Status of Laboratory Animals in Japan

GOU Huan, AN Xinying, TONG Yujia, WANG Yan, YANG Shuang

(Institute of Medical Information, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100020, China)

Correspondence to: AN Xinying (ORCID: 0000-0002-9870-7009), E-mail: an.xinying@imicams.ac.cn

[ABSTRACT] Experimental animals have made important contributions to human medical research and life and health. It is known that the development of laboratory animal science in Japan has been relatively rapid in the past few decades, providing important support for the development of the world's experimental animal field. Therefore, it is of great significance to understand the management mode and resource storage situation of Japanese experimental animals, analyze the advantages of Japanese experimental animal development, and propose suggestions to strengthen the high-quality development of experimental animals in China. Through literature research, the authors first analyzed the management system of experimental animals in Japan, including regulations and policies, research funding management,

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目“生物医学文献信息保障与集成服务平台”(2021-I2M-1-033)

[第一作者] 苟欢(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 医学信息分析与评价。E-mail: 18813124025@163.com。ORCID: 0000-0002-5604-0883

[通信作者] 安新颖(1978—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 医学信息分析、科技评价、知识发现。E-mail: an.xinying@imicams.ac.cn。ORCID: 0000-0002-9870-7009

experimental animal management, talent cultivation, and standard and normative systems. Then, the current status of experimental animal research in Japan was summarized, including experimental animal resources, major research institutions, and production enterprises. On this basis, it was found that the field of experimental animal research in Japan currently exhibits characteristics such as a complete policy system, flexible management methods, rich resource reserves, and large-scale industrial development. Finally, by comparing the existing problems in China, suggestions for the development of experimental animal technology in China are proposed: (1) drawing on the legal management method of experimental animals in Japan, strengthening and improving the legislation and management model of experimental animals in China; (2) increasing investment in scientific research funds, playing the role of research institutions, societies and industries, and promoting the incremental construction and industrial development of experimental animal resources.

[Key words] Japan; Laboratory animals; Resources; Management system; Statute

实验动物主要用于生命科学和生物技术研究、食品和药品等质量检验和安全性评价^[1]。动物实验是追求人类健康和福利的医学科学研究的重要工具,通过动物实验对了解生命现象、应用医学和医疗保健起到了重要作用。使用的动物种类从线虫、果蝇、鱼到哺乳动物(如大鼠、小鼠、犬、猫和猴等)。就脊椎动物而言,大鼠和小鼠的使用量占比90%以上,犬、猫和猴的使用量占比约1%^[2]。鉴于实验动物在科学研究中的重要性,世界各国非常重视实验动物工作的发展,其中日本实验动物科学研究起步较早,其发展阶段大致分为1944年开始的近代化运动萌芽期、1950—1970年代自主发展阶段,以及70年代后逐步和国际实验动物组织开展合作并扩大了研究发展领域的阶段^[3]。日本在实验动物科学发展中形成了具有本国特色的管理和研究体系。我国实验动物科学工作起步相较国外稍晚,总体对比国际有一定差距,但历经40年的发展历程,在实验动物规范化和法制化管理上已取得长足进步。本文旨在通过分析日本实验动物发展现状,对比我国目前在实验动物领域的发展不足,借鉴日本实验动物管理和研究体系的优势,提出我国实验动物科技领域发展的建议。

1 日本实验动物管理体系

1.1 法规政策

日本实验动物立法在亚洲起步较早。20世纪70年代日本总理府就制定和颁布了实验动物保护相关法律,依法监督、管理动物实验;相关科研机构按照律法严格进行动物实验;实验动物委员会为研究机构提供学术建议和技术指导^[4]。日本实验动物学发展时间较长,有较为丰富的国际合作经验,实验动物研究与应用相对成熟;在充分借鉴美英等发达国家立法经验的

基础上,目前日本实验动物相关法律建立了官、产、学、研相结合的产业模式^[5-7]。日本目前有关实验动物管理的法规有30多种^[8],如表1所示:1973年日本颁布的《动物保护与管理法》是日本实验动物管理的基本法;1980年由总理府颁布了关于实验动物的最高法规《实验动物饲养及保管准则》;1987年文部省发布《关于大学内动物实验的通知》等。

同时日本也非常重视动物伦理,虽然早期是在欧美国家的外部压力下被动形成,但逐渐发展为有本土化的实验动物饲养和使用相关伦理。2014年秋田大学公布了其动物实验宣言,阐述了实验动物利用原则,与3R原则有异曲同工之处^[9]。

1.2 科研经费管理

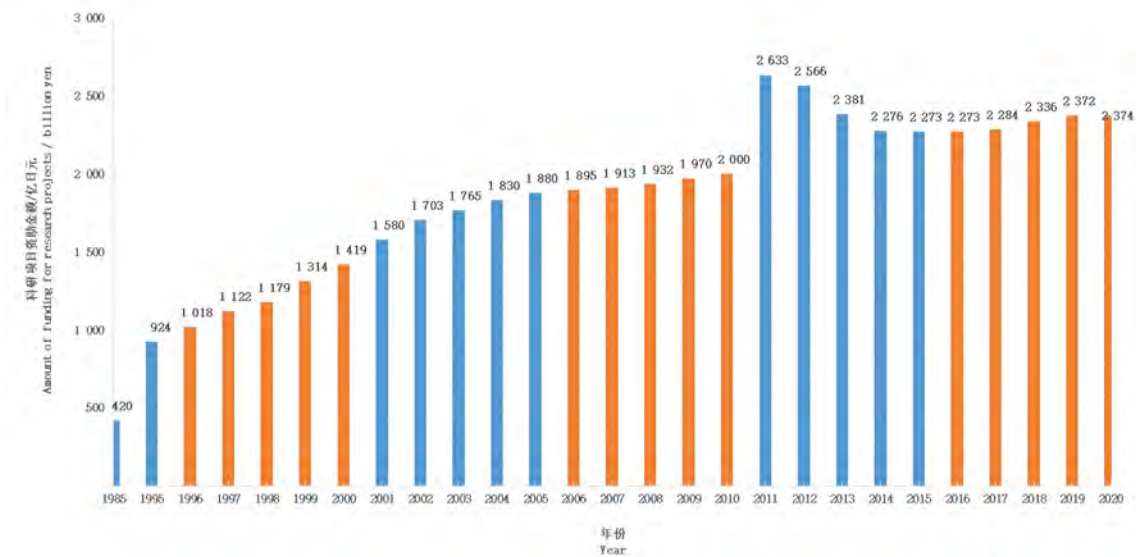
日本科研费(Grants-in-Aid for Scientific Research)的前身是1918年创立的“科学奖励金”,到目前已有一百多年的发展历史,而作为科研费管理主体与绩效第三方评价机构是日本学术振兴会,其前身设立于1932年,发展至今已形成较为完善的评价机制和体系。KAKENHI是日本规模最大、应用最广的竞争性资金制度,其所涉经费约占政府全部竞争性资金总量的50%以上^[10]。1995年日本颁布了《科学技术基本法》,该法被视为日本全面推进“科学技术创造立国”重大国策的根本大法,依据该法日本政府制定了科技领域的纲领性文件《科学技术基本计划》。该计划每5年为一期,目前已制定并实施了5期。如图1所示,1985—2020年,日本科研费预算资金为49 632亿日元;其中共资助774个与实验动物相关的科研项目,合计66.83亿日元,占比0.13%^[11]。

日本在实验动物科学领域的发展离不开国家科研经费的支持,为了加强日本实验动物领域研究的持续扩展,提高实验动物管理服务能力,日本在国家层面

表1 日本实验动物相关法规

Table 1 Relevant laws and regulations on laboratory animals in Japan

颁布年份 Issued Years	法规 Statutes
1971年	《关于确保建筑物卫生环境的法律实施规则》
1973年、1983年	《动物保护与管理法》
1979年	《关于防止动物实验人兽共患病的通知》
1976年	《观赏动物饲养和保护基准》
1980年	《实验动物饲养及保管准则》
1987年	《关于大学内实验动物的有关通知》
1989年	《外来生物法》
1998年	《传染病预防和传染病患者医疗法》
2005年、2010年	《关于动物的进口申报制度》
2006年、2013年、2020年	《全面促进动物福利和管理措施的基本准则》
2006年	《动物实验正确实施的指导方针》
2006年、2015年	《厚生劳动省管辖的实施机构实施动物实验等的基本方针》
2006年	《农林水产省管辖的实施机构实施动物实验等的基本方针》
2018年	《关于通过限制使用转基因生物等确保生物多样性的法律条款》



注：相关数据来源于文献 [11]。
Note: The relevant data are from the reference [11].

图1 近40年日本科研资助中实验动物相关项目经费情况

Figure 1 The status of experimental animal-related projects in Japanese scientific research funding in the past 40 years

投入大量科研经费，促进日本实验动物资源共享，持续推动实验动物研究国际化^[12]。

1.3 实验动物管理

日本实验动物管理工作主要由政府主导，行业自律实现监督与调控。日本环境省主要负责实验动物保护、饲养和实验动物福利等方面，如图2所示。文部科学省、厚生劳动省和农业水产省等主要负责实验动物相关法律政策的颁布，具体进行动物实验的科研机构如日本实验动物学会协助政府，参与实验动物行业管理。日本要求每个研究机构成立实验动物管理与使

用委员会（Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC），IACUC负责审查由主要研究者提出的动物实验计划，并确定该计划是否符合本单位要求和国家发布的法规要求，经审核后可以实施^[4]。研究机构内部需要制定实验动物饲养和动物实验的管理细则，对实验人员严格要求，负责的研究机构会接受监督和定期检查。

1.4 人才培养模式

为实现以行业自律为主的实验动物管理模式，日本研究机构对实验动物研究人员的培养要求较高，重

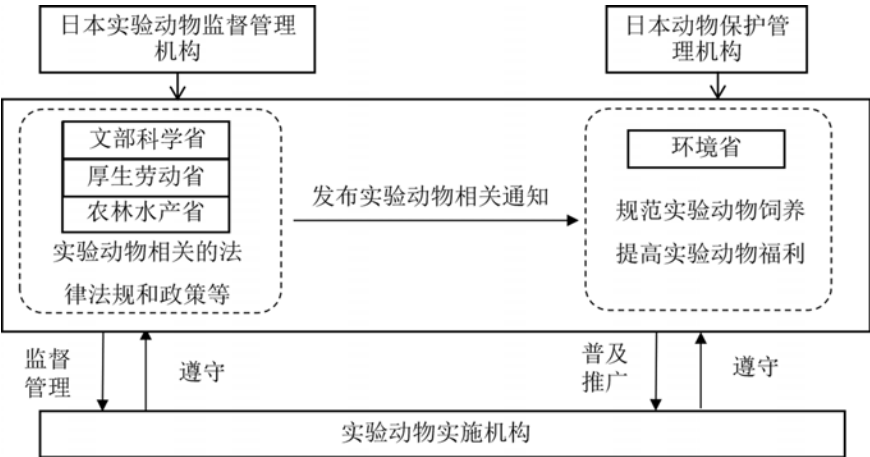


图2 日本实验动物管理体系

Figure 2 Japanese laboratory animal management system

视从业人员的职业素养。各实验动物机构或学会制定培训课程，要求对相关人员进行岗前教育和系统培训，培养从业人员的敬业意识和业务素质，同时定期对技术人员进行考核，开展资格认定，日本实验动物从业人员分为技术人员、研究人员和动物技术专家，其中技术人员又分为初级、中级和高级^[13]。日本实验动物的人才培养模式有助于提高从业人员的专业水平和工作效率。

1.5 标准与规范体系构架

在实验动物质量管理和评价方面，日本实验动物中央研究所是日本实验动物质量检测的权威机构，也是国际实验动物科学理事会（International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS）指定的实验动物遗传、微生物检测中心和ICLAS的参比实验室^[8]。

日本政府在实验动物管理制度中发挥了主要作用，

实验动物的相关学会和团体也提供了重要的辅助作用。自1980年颁布《实验动物饲养及保管准则》后，日本要求每个大学和研究机构都需要制定动物实验指南，如表2所示。

2 日本实验动物研究现状

2.1 实验动物资源建设

2.1.1 实验动物资源项目

为响应科技基本计划，日本文部科学省实施了国家生物资源项目（National BioResource Project, NBRP）^[14]。该项目于2002年开始，目的是系统地收集、保存和提供基础的模式生物资源。该项目每5年进行一次审查，目前已经是第5期。NBRP包含4个方面。（1）核心基础开发计划：通过建立核心设施对生物资源进行收集、保存和共享。（2）基因组信息维护

表2 日本实验动物相关标准规范

Table 2 Relevant standards and specifications on laboratory animals in Japan

年份 Years	指南 Guidelines	发布机构 Agencies
1980	《实验动物的饲养和储存标准》	总理办公室
1983、1996	《实验动物设施建筑和设备指南》	日本实验动物科学协会
1982	《关于实施医药品安全性试验的标准》	日本厚生省
1987	《动物实验指南》	日本实验动物学会
1995	《动物处死方法指南》	日本环境省
2006	《在研究机构实施动物实验等的基本指南》	教育、文化、体育、科学和技术部
2006	《日本药理学会动物实验相关指南》	日本药理学会
2012	《ICLAS/CIOMS 国际指南 2012 年修订版》	日本实验动物学会
2013	《实验动物的饲养和保存标准以及减轻疼痛的标准》	日本环境部
2015	《生理学领域动物实验相关基本指南》	日本生理学会
2015	《神经科学动物实验指南》	神经科学学会
2015	《日本毒理学会动物实验指南》	日本毒理学会

计划：通过丰富和扩展品系特征信息、遗传信息（如cDNA的基因组序列）和基因组资源（包括收集的生物资源的基因组库）来提高生物资源的质量并增加其价值。（3）基础技术维护计划：目的是提高生物资源质量控制和保存技术，具体包括生物资源的收集、增殖和质量控制、保存、提供等都需要改进生物资源的质量控制和保存技术。该计划中新技术开发主要在动物的冷冻保存技术方面，效果显著。（4）信息中心维护计划：建设和升级包含位置信息、遗传信息和生物特征的生物资源数据库。BioResourceWorld（BRW）是针

对NBRP的集成数据库检索系统，包含34个独立的资源数据库，每个数据库各有特点，BRW提供了包括野生物种、近交系、突变体、基因工程系、DNA克隆等在内的多条生物资源记录。

NBRP涉及20多个物种，其中与实验动物相关的有11个，包含约9 000个小鼠品种品系、900个大鼠品种品系、30个鸡品系、20个鹌鹑品系、4个亚种6 000只非洲爪蟾、6 000个斑马鱼品系、超6 00个青鳉品系及约45 000个果蝇品系等，如表3所示。

表3 日本国家生物资源项目中实验动物资源
Table 3 Experimental animal resources in National BioResource Project of Japan

动物品种 Species	承担机构 Institutions	数量 Quantity
小鼠 Mice	理化学研究所 (RIKEN BRC)	约9 000个品种品系
大鼠 Rats	京都大学	约900个品种品系
日本猴 Japanese macaques	国家生理科学研究所 (NIPS) 与京都大学灵长类动物研究所 (KUPRI)	/
鸡和鹌鹑 Chicken / Quail	名古屋大学鸟类生物科学研究中心 (ABRC)	鸡共约30个品系, 鹌鹑约20个品系
爪蟾/蝾螈 Clawed frogs / Newts	广岛大学两栖动物研究中心 (ARC)	/
斑马鱼 Zebrafish	理化学研究所脑科学中心 (RIKEN CBS)、国家遗传学研究所 (NIG)、国立自然科学研究院	约6 000个品系
青鳉 Medaka	国立基础生物学研究所和宇都宫大学	超过6 000个品系
海鞘 Ciona intestinalis	京都大学和筑波大学下田海洋研究中心	约130个品系
果蝇 Drosophila	果蝇遗传资源联盟 (DGRC)	约45 000个品系
蚕 Silkworms	九州大学农业研究生院	用于基因组信息分析的标准品系约50个, 野生蚕品系大约500个
线虫 C.elegans	东京女子医科大学医学部	约11 100个基因缺失品系, 50多个Cre重组酶转基因品系, 70多个平衡品系

2.1.2 实验动物资源承担机构

小鼠资源是NBRP的一部分，也是日本理化学研究所（Rikagaku KENkyusho/Institute of Physical and Chemical Research, RIKEN）的生物资源研究中心（BioResource Research Center, BRC）的主要资源之一。RIKEN BRC^[15]成立于2001年1月，是一个全球性的非营利性生物资源中心，为世界各地的私营企业和学术组织提供生物材料、技术服务和教育计划。其中，实验动物部门的总体目标是收集有价值的小鼠品系，将高质量、特征良好的近交、突变和基因工程小鼠共

享给研究人员。
NBRP-日本大鼠（NBRP-Rat）资源库^[16]的负责机构是日本京都大学，是世界上最大的大鼠资源库之一，目前已有785种大鼠品种品系，为生物医学研究的各个领域做出了贡献。
“日本猴”^[17]是NBRP核心设施升级计划之一。自2003年起，为了向日本研究机构和大学的神经科学领域研究人员进行有效饲养日本猴的可持续供应，日本国家生理科学研究所（National Institute of Physiological Sciences, NIPS）与京都大学灵长类动物研究所

(Kyoto University Primate Research Institute, KUPRI) 合作开展建立了这个有价值的实验动物研究模型。

鸡和鹌鹑是生命科学中重要的模式生物, 弥合了哺乳动物与其他脊椎动物之间的进化差距, 目前日本约有9 600种现存鸟类的主要实验模型。名古屋大学的鸟类生物科学研究中心 (Avian Biological Science Research Center, ABRC)^[18] 是NBRP鸟类资源的核心机构, 开发了稳定的品系来维护、保存和分配鸡和鹌鹑等鸟类资源, 构建了鸟类资源数据库, 并在严格的遗传控制下将其开发为全球高标准的实验动物资源。

日本广岛大学的两栖动物研究中心 (Amphibian Research Center, ARC)^[19] 主要负责和组织NBRP中的爪蟾/蝾螈项目, 主要任务是收集、保存和共享非生物资源 (如DNA等), 建立了爪蟾/蝾螈数据库网站, 提供胚、蝌蚪、成年蟾/蝾螈以及DNA和RNA用于研究。

RIKEN的脑科学中心 (Brain Science Center, CBS)、国立遗传学研究所 (National Institute of Genetics, NIG)、国立自然科学研究院主要负责和承担斑马鱼项目^[20], 建立了活动所需的鱼类设施, 建立突变的鱼品系, 收集并保存后脑和脊髓中运动、感觉和侧线神经元分化和轴突延伸有缺陷的突变品系。

日本国立基础生物学研究所和宇都宫大学是NBRP资源-青鳉^[21]的负责机构, 收集、保存并提供青鳉的标准品系、近交品系、突变体、野生种和相关物种资源, 还提供基因组序列和BAC/EST基因组资源。

海鞘除了代表无脊椎动物脊索动物的独特进化地位外, 还提供了一个简单的实验系统, 用于研究发育、繁殖、内分泌和生理学的分子机制, 是世界范围内生命科学交流不可缺少的模式生物。日本京都大学和筑波大学下田海洋研究中心合作开展NBRP资源项目-海鞘^[22], 用于野生和转基因品系的收集。

果蝇遗传资源联盟 (Drosophila Genetic Resources Consortium, DGRC)^[23] 主要负责为用户提供NBRP收集和保存的果蝇品系。在其建立的资源网站中, 可以浏览和搜索所有可用的果蝇品系, 可以在基因组浏览器上查看果蝇的染色体图谱。

NBRP-蚕^[24] 主要由日本九州大学农业研究生院负责, 提供家蚕、野生蚕、蚕培养细胞和基因组资源, 它的两个分工合作机构是高知大学理学院生命科学系和新树大学纺织学院。

线虫是适合生命科学研究的模式生物。NBRP线虫资源项目^[25] 的主要负责机构是东京女子医科大学医学部, 目的是收集研究人员可用的线虫品系资源。

2.2 实验动物研究机构

2.2.1 日本实验动物中央研究所

该研究所成立于1952年5月15日^[26], 目标是开发高质量、同质性和可重复的人源化实验动物, 并利用实验动物研究和阐明人类疾病发病机制, 为医疗发展和人类健康作出贡献。它进行的相关研究主要分布在4个研究部门。(1) 实验动物基础研究部: 其下设免疫研究室开发的严重免疫缺陷“NOG”(NODShi.Cg-Prkdcscid Il2 rgtmlSug, /Jic) 小鼠适用于重建人类造血和免疫系统, 通过基因改造开发“更先进的人源化小鼠”, 在人类造血和免疫功能方面优于亲本“NOG”小鼠, 可用于药物发现 and 安全性研究。(2) 实验动物应用研究部: 包含3个研究室, 其中人类疾病模型研究室致力于开发新型人源化模型动物, 并应用于临床前的药物研究; 人类器官/组织模型研究室致力于开发肝脏人源化小鼠; 肿瘤生物研究室目前已建立了500多个人类肿瘤细胞系, 为制药公司提供异种移植。 (3) 猕猴医学生物研究室: 包含4个研究实验室, 其中应用发育生物研究室, 利用普通猕猴为患者开发新药及可靠的输送系统; 疾病模型动物研究室致力于开发疾病模型并推进兽医护理研究; 分子发育学研究室致力于使用非人灵长类动物的基因改造, 创建疾病模型; 生殖工程研究室致力于卵母细胞研究, 以及生殖细胞如精子和胚胎等的收集。(4) 活体动物影像中心: 聚焦基础技术的开发, 使用核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)、Micro-CT和活体荧光成像进行体内成像的研究。

2.2.2 熊本大学生命资源发展与分析研究所

该研究所^[27] 成立于2003年4月, 下属4个二级中心, 即动物资源和发展中心 (Center for Animal Resources and Development, CARD)、基因技术中心 (Gene Technology Center, GTC)、3个放射性同位素中心 (Radio Isotope Center, RIC) 和仪器分析中心 (Instrumental Analysis Center, IAC), 含9个研究领域 (包括实验动物领域、资源开发领域、疾病模型领域、基因组功能领域、放射性同位素实验领域、分子血管控制领域、疾病表观基因组领域、生殖功能学领域和生殖工程联合研究领域), 主要服务内容包括: (1) 实验动物的生产、开发、保存、供应和表型分析等; (2) 开展与动物研究、基因测试、同位素测试和仪器分析测试相关的研究, 提供信息服务和技术指导等。

其中, 动物资源和发展中心建立了CARD R-BASE小鼠数据库^[28], 该库是基因工程小鼠的国际资源库和

分发中心, 包含6个小鼠品种2 400多个品系。该中心还建立了可交换基因捕获克隆数据库 (Exchangeable Gene Trap Clones, EGTC) [29]。

截至2022年10月, 国际小鼠品系资源库 (International Mouse Strain Resource, IMSR) 统计的小鼠品系达82 269种 [30], 其中熊本大学的动物资源和发展中心是日本小鼠品系的主要提供机构之一。随着21世纪基因编辑技术的开发与利用, 基因工程动物资源也得到长足发展, 其中基因工程小鼠和大鼠资源最为丰富 [31]。美英等发达国家主要保存在美国Jackson实验室、英国桑格研究所, 日本则保存在熊本大学等机构。

2.2.3 日本国立遗传研究所

该研究所于1949年成立 [32], 负责遗传学的基础研究、指导和推广, 在实验动物方面致力于小鼠研究, 并建立了相关实验室和资源库。(1) 小鼠基因组学资源实验室, 研究出一种野生型小鼠品系, 这一系列野生型品系及其相关品系称为三岛群, 对小鼠的遗传性状研究做出了巨大贡献。(2) JMSR (Japan Mouse/Rat Strain Resources Database) 数据库是日本库存可用的小鼠/大鼠品系可搜索在线数据库。(3) MMDBJ (Mouse Microsatellite Data Base of Japan) 是日本小鼠微卫星数据库, 提供不同小鼠品系之间简单序列长度多态性 (Simple Sequence Length Polymorphisms, SSLPs) 的信息, 重点来自日本野生小鼠品系, 即与标准实验室品系遗传距离较远的小家鼠。(4) NeuroGT数据库, 也称为神经源性标记小鼠线的脑图谱, 提供由大脑中单个线标记的神经元图像数据目录。

2.2.4 日本东京大学医学科学研究所实验动物中心

该中心 [33] 成立于1965年, 是日本国内历史最悠久的实验动物设施, 聚焦于基因组医学、再生医学和疾病模型动物的研究。该中心包含6个实验室: (1) 干细胞病理学部, 致力于揭示多细胞生物体中的表观遗传调控; (2) 先天免疫实验室, 致力于严重免疫缺陷SCID小鼠和大鼠资源的提供; (3) 生殖系统生物学实验室, 致力于运用传统的基因操作技术以及基于CRISPR/Cas9的基因组编辑技术研究哺乳动物生殖系统的潜在机制; (4) 基因工程小鼠研究实验室, 致力于转基因小鼠和大鼠的研究和开发; (5) 基因组工程学部, 致力于研究基因组工程技术和新的基因组编辑工具的开发; (6) 先进动物模型开发实验室, 主要提

供转基因啮齿类动物的支持服务。

2.3 实验动物生产企业

2.3.1 日本 SLC (Sankyo Labo Service Corporation) 公司

该公司 [34] 于1949年应日本卫生部 (现厚生劳动省) 的要求成立, 并开始进行实验动物的生产和供应。SLC在稳定的环境下, 按照标准操作程序生产和销售实验动物 (小鼠、大鼠、豚鼠、兔等)、疾病模型动物 (糖尿病、高血压、肥胖模型动物等) 和转基因动物。SLC公司拥有的实验动物资源有小鼠 (包括远交、近交、免疫缺陷、同类系、杂交、疾病模型和转基因小鼠)、大鼠 (包括远交、近交、疾病模型和转基因大鼠)、豚鼠、兔、仓鼠、沙鼠、食蟹猴、雪貂、比格犬和小型猪等。

SLC公司提供的技术服务包括: 遗传修饰动物的制作、受托饲养、SPF化、冷冻胚胎制作和手术病理模型创建等。SLC公司提供实验动物的使用范围包括: (1) 医疗器械生物安全测试、化合物毒性研究; (2) 利用严重联合免疫缺陷 (severe combined immune-deficiency, SCID) 小鼠的致癌性研究进行再生医学细胞和组织的安全性测试; (3) 使用小鼠、大鼠、兔、雪貂和猴等开展药理学研究; (4) 供应不同需求的模型动物; (5) 使用基因编辑技术生产基因工程小鼠和大鼠; (6) 通过手术提供病理模型动物, 包括器官摘除、痛觉过敏、插管动物等。

2.3.2 日本 CLEA (Central Institute for Experimental Animals) 公司

该公司 [35] 成立于1965年, 是第一家批量生产SPF小鼠和大鼠的日本公司, 并一直供应给许多生物科学相关公司和研究机构, 并且是实验动物、实验动物饲料和设备的完整系统供应商。

CLEA公司拥有的实验动物资源丰富, 其中疾病模型包括免疫缺陷模型、小鼠糖尿病模型等; 转基因动物包括rasH2小鼠、Hras128/Jcl小鼠、Kras301/Jcl小鼠、klotho/Jcl小鼠、 α -Klotho KO/Jcl小鼠、OVA-IgE/Jcl小鼠等; 还有一些其他疾病远交品系、近交品系以及杂交品系等实验动物资源。

CLEA公司提供的技术服务包括胚胎和精子冷冻保存、冷冻胚胎制作和交付、动物模型制作、研究材料供应等。另外, CLEA公司还提供手术治疗、携带肿瘤、含药饮食等实验动物, 以及使用实验动物创建单克隆抗体, 供应实验动物血清、血浆和器官等服务。

3 日本实验动物科学发展的特点总结

3.1 实验动物政策体系较为完备,第三方评价审查机制欠缺

法律法规在政策体系中起到导向性和强制性的作用。首先,日本在实验动物领域颁布的法律从根本上确立了实验动物学科在国家科技发展和进步中的重要地位。其次,在国家颁布的实验动物基本法的倡导下,结合实验动物本身的饲养、培育特点以及应用方向,日本实验动物学会和权威科研机构会制定具有针对性的、适应本单位实验动物管理和发展的、与法律紧密衔接的规章制度和标准规范等。最后,日本无论在立法还是规范性文件中都非常重视动物福利和伦理,凸显对实验动物作为自然生命的尊重。

日本在科研经费方面建立了科研经费绩效第三方评价机制,但主要以科研经费审查评价为主,依据的政策文件是文部科学省发布的《独立行政法人日本学术振兴会实施科学研究费助成事业审查的基本考量》^[10]。在实验动物研究管理项目中,没有独立的针对实验动物项目第三方的评价政策,实验动物相关的第三方评价机制和法规政策有待重视和完善。

3.2 实验动物管理方式灵活,自主管理约束力较弱

日本实验动物管理方式呈现由政府主导、行业自律进行监督与调控的特点。日本政府颁布国家大法,在法律的约束下,下级实验动物实施机构需要建立动物实验管理委员会,制定动物实验指导方针或管理章程。大学或者科研机构的研究人员要进行动物实验,需要制定实验动物计划书,具有完善的动物实验设施,并向其上级负责的机构提出申请,在相关管理制度的规范下完成动物实验。除了完备的规章制度,日本在实验动物领域的科研项目中投入大量资金,在经费上大力支持实验动物的研究和发展,显示了对实验动物学科发展的重视。

虽然日本已建立了较为完备的实验动物管理体系,但对动物实验设施和从业人员资格认证的程序还不完善^[4],其行业和民间团体的管理方式自由度较高,尤其各大学机构在实验动物管理方式中强调和重视的内容各有不同,导致不同机构委员会的管理约束力较弱。

3.3 实验动物资源储备较为丰富,可持续发展能力不断加强

实验动物除了支撑基础医学研究,也是临床医学

创新发展的密切纽带。目前基因工程技术的快速发展,人源化实验动物模型作为重要的试验工具能推动医学新疗法、新药研发的发展进程。因此,实验动物资源是国家科技创新的重要战略资源,例如:人源化小鼠模型价值高,因为它能模拟人体临床试验^[36];斑马鱼基因组与人类基因组同源性达到87%,也成为临床前研究的药物筛选和评价的重要材料^[37]。日本十分重视实验动物资源的建设和研究,早在2017年日本已经有100多种实验动物资源,8 000多个实验动物品系,包含基因工程动物、遗传多样性动物、突变系等^[38]。

日本政府稳定投入科研经费,启动实验动物资源建设项目,与大学和研究机构合作,利用长时期积累的实验动物和动物模型的饲养、保存等技术经验,建立了物种丰富、资源量大的数据库,例如NBRP建立了11个独立的实验动物资源库,由十几家大学或机构协同承担,形成资源创建-利用发展-保存共享-再利用的良性的全链条发展模式。

3.4 实验动物产业发展逐渐规模化,服务范围不断扩大

在实验动物产业发展中,小鼠模型几乎占动物模型市场规模的一半,而基因编辑动物模型又占据多数市场空间。日本在实验动物科学领域发展的几十年中,已经取得了一定的成果,产业发展已经形成良好的规模。日本SLC公司和CLEA公司最具代表性。它们在日本政府的扶持下成立,主要生产和供应小鼠和大鼠资源,包括近交系、远交系、杂交系、免疫缺陷、转基因、疾病模型等不同类型的鼠类资源,还提供遗传动物制作、胚胎和精子冷冻保存、受托饲养、SPF化、手术病理模型创建等多项技术服务。实验动物公司通过实验动物养殖、饲养等流程,转基因和基因敲除等实验方法,充分掌握动物实验的操作和质量管理技术,支撑并推动包含实验动物培育、产品研发与生产供应以及高新技术服务在内的产业发展,已经具有相当规模的发展,且服务范围正不断扩大。

4 对我国实验动物科技领域发展的启示和建议

4.1 加强与完善我国实验动物立法和管理模式

我国实验动物管理模式与日本类似,由政府部门主导,协同实验动物研究机构共同管理。但目前,我国主要还是以实验动物研究机构根据各自管理范围内的工作形成一些管理文件为主。自1988年以来,我国

先后制定了《实验动物管理条例》和《实验动物质量管理办法》等规范性文件,对我国实验动物管理工作起到了约束和规范性的作用。我国也颁布了一些和实验动物管理相关的法律,例如《野生动物保护法》、《中华人民共和国动物防疫法》等提及了实验动物保护,但是关于实验动物研究与管理的内容不完整,保护范围相对狭窄^[8]。此外,我国目前的法律条例对实验动物福利和安全方面不够重视^[39],在实验动物管理立法方面仍面临着挑战。

为促进我国实验动物管理体系的形成,可以借鉴日本在实验动物福利法制化的管理方式,以政府管理为主,国家统筹规划,同时注重机构自主管理性和行业自律性,加强国家和地区各级实验动物主管部门间的统筹协调和管理经验互鉴。基于动物福利和人文关怀的角度,遵循国际3R原则,重点关注教学用实验动物福利管理,推动本国实验动物福利发展,形成适用于本国实验动物管理的伦理体系。在实验动物科研项目中引入第三方评价审查机制,提高实验动物法律、指南和标准的执行力,不流于形式。在实验动物研究许可管理方面,我国于2018年在中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)的管理下开启了动物机构认可评审工作,创建了国内实验动物机构认可评价体系^[40]。为推进我国实验动物认可评价制度的建立,今后还需加强和各实验动物研究机构互联互通,监督落实并执行认可制度、相关标准和指南等配套文件。

4.2 推进实验动物资源增量建设和产业化发展

经过近40年的积淀和发展,根据国家“创新驱动”、“健康中国”及“国家科技创新发展规划”的要求,我国实验动物资源工作取得了长足发展,尤其是利用基因编辑技术在动物模型研发方面在国际上有较大的影响力,基本建成了国家实验动物种子中心^[1]。

为推进我国实验动物资源增量建设,可以借鉴日本NBRP,制定稳定长期的发展计划,采用竞争性科研经费配置方式,加大科研经费的投入。在实验动物资源平台建设方面,国家已于2020年3月开通“国家动物模型资源共享信息平台”数据库^[41],推动了我国实验动物领域信息资源共享。为加强和攻克实验动物资源保藏、共享等技术,应明确未来的重点发展领域,例如:实验动物基础研究、实验动物医学研究、实验动物微生物研究和比较医学研究等。未来还应该重点关注:人类疾病动物模型的研制和创新,加强实验动

物相关设备和试剂的开发,以及围绕精准医疗、器官移植和新药研发等领域,吸引国内外知名高校、研究机构联合建设实验动物的开放式创新平台。

在实验动物产业发展方面,发挥研究机构、学会、行业的作用^[42]。例如:探索和研究本国自主培育的新技术和新方法;遵循实验动物饲养的标准和条例,加强技术革新能力;严格掌握和执行实验动物生产过程质量控制标准,提升实验动物质控能力,及时响应实验动物产业链各级需求变化。此外,还应抓住科技发展创新战略的机遇,重视实验动物从业人员的资质认证和上岗前培训,开展国际交流与培训,着力引进和培养实验动物行业高层次人才,加快实验技术服务产业的国际化进程。充分利用国内实验动物领域从业人才,挖掘实验动物产业价值,推动实验动物产业化发展,实现产学研相结合的发展模式。

[作者贡献 Author Contribution]

苟欢负责文献调研、资料收集和论文撰写;
安新颖负责论文主体框架、调研方案和论文审核;
童俞嘉、王琰和杨爽负责数据收集和文稿修改。

[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] 赵心刚, 卢凡, 程苹, 等. 我国实验动物资源建设的问题与展望[J]. 中国科学院院刊, 2019, 34(12):1371-1378. DOI: 10.16418/j.issn.1000-3045.2019.12.006.
ZHAO X G, LU F, CHENG P, et al. Problems and prospects of laboratory animal resources in China[J]. Bull Chin Acad Sci, 2019, 34(12): 1371-1378. DOI: 10.16418/j. issn. 1000-3045.2019. 12.006.
- [2] Japanese Physiological Society. About animal experiments [EB / OL]. [2022-03-08]. <http://physiology.jp/guidance/4804/>.
- [3] 王杨杨, 刘江宁. 日本实验动物管理进程[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 126-132. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.12.020.
WANG Y Y, LIU J N. Management process of laboratory animals in Japan[J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 126-132. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.12.020.
- [4] 巩和凌子, 孔琪, 刘江宁. 国内外实验动物法制化管理现状比较[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 71-75. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.09.013.
GONG H L Z, KONG Q, LIU J N. Comparison of legal systems in China and abroad for improved management of laboratory animals[J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 71-75. DOI: 10.3969/j. issn.1671-7856.2020.09.013.
- [5] 陶凌云, 周洁, 倪丽菊, 等. 典型发达国家实验动物人道终点的选择[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(6): 451-454. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2016.06.010.
TAO L Y, ZHOU J, NI L J, et al. Choice of humane endpoint of

- laboratory animals in typical developed countries[J]. Lab Animal Comp Med, 2016, 36(6): 451-454. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2016.06.010.
- [6] 杨果杰, 杨磊, 浦野彻. 日本实验动物法制化管理状况[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(2):24-27. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2005.02.009.
- YANG G J, YANG L, PU Y C. Legal management of experimental animals in Japan[J]. Lab Animal Sci Adm, 2005, 22(2):24-27. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2005.02.009.
- [7] 陶雨风, 刘忠华, 毕玉春, 等. 国内外实验动物管理体制及法规条例的比较[J]. 实验动物科学, 2011, 28(4):46-51. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.04.013.
- TAO Y F, LIU Z H, BI Y C, et al. Comparison of domestic and foreign experimental animal management systems, laws and regulations[J]. Lab Animal Sci, 2011, 28(4):46-51. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.04.013.
- [8] 巩薇, 卢胜明, 陈洪岩, 等. 国内外不同体制下实验动物管理政策体系和标准体系的分析与启示[J]. 实验动物科学, 2021, 38(1):43-48. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.01.008.
- GONG W, LU S M, CHEN H Y, et al. Analysis and enlightenment of policy system and standard system of laboratory animal management under different systems at home and abroad[J]. Lab Animal Sci, 2021, 38(1):43-48. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2021.01.008.
- [9] 周菲菲, 赵熠玮. 东亚生命观视角下的日本动物伦理研究[J]. 科学与社会, 2021, 11(2):94-109. DOI: 10.19524/j.cnki.10-1009/g3.2021.02.094.
- ZHOU F F, ZHAO Y W. Research on Japanese animal ethics from the perspective of east Asian life view[J]. Sci Soc, 2021, 11(2):94-109. DOI: 10.19524/j.cnki.10-1009/g3.2021.02.094.
- [10] 李润华. 日本科研费(KAKENHI)绩效第三方评价机制研究[J]. 高教探索, 2021(8): 89-97. DOI: 10.3969/j.issn.1673-9760.2021.08.014.
- LI R H. Research on the third-party evaluation mechanism of Japan's research expenditure (KAKENHI) [J]. High Educ Explor, 2021(8): 89-97. DOI: 10.3969/j.issn.1673-9760.2021.08.014.
- [11] JSPS. About us[EB/OL]. [2022-02-20]. <https://www.jsps.go.jp/>.
- [12] 中国科学技术协会, 中国航空学会. 航空科学技术学科发展报告: 2014-2015[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2016.
- China Association for Science and Technology, China Aviation Society. Report on the development of aviation science and technology discipline: 2014-2015 [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2016.
- [13] 邸冉, 刘佩琳, 杨海龙, 等. 实验动物从业人员培养体系调查分析[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4):116-119. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.016.
- DI R, LIU P L, YANG H L, et al. Investigation and analysis of the training system for experimental animal practitioners [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32 (4): 116-119. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.016.
- [14] NBRP. About NBRP[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://nbrp.jp/en/resource-search-en/>.
- [15] RIKEN BRC. Experimental animal division[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://mus.brc.riken.jp/ja/>.
- [16] The National Bio Resource Project for the Rat in Japan. About NBRP rat[EB/OL]. [2022-10-20]. http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/Default_jp.aspx.
- [17] National BioResource Project "Japanese Macaques. About NBRP "Nihonzaru (Japanese monkeys)"[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://nihonzaru.jp/index.html>.
- [18] NBRP-Chicken/Quail. Nbrp chickens and quail resources[EB/OL]. [2022-10-20]. <http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~nbrp/index.html>.
- [19] NBRP_Xenopus. National BioResource Project: Clawed frogs/Newts[EB/OL]. [2022-10-20]. https://xenopus.nbrp.jp/NBRP_Xenopus/NBRP_Clawed_frogs_Newts_Top.html.
- [20] National BioResource Project Zebrafish. National Bio Resource Project: Zebrafish aim of the project[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://shigen.nig.ac.jp/zebra/>.
- [21] NBRP Medaka. home[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://shigen.nig.ac.jp/medaka/top/top.jsp>.
- [22] NBRP-C. intestinalis. About Ciona intestinalis[EB/OL]. [2022-10-20]. https://marinebio.nbrp.jp/marinebio/about_ciona.jsp.
- [23] Drosophila Genetic Resource Consortium. About DGRC[EB/OL]. [2022-10-20]. https://fruitfly.jp/flystock/index_e.html.
- [24] NBRP-Silkworm. National BioResource Project (NBRP), Silkworm[EB/OL]. [2022-10-20]. https://silkworm.nbrp.jp/index_en.html.
- [25] NBRP-C. elegans. HOME[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://shigen.nig.ac.jp/c.elegans/>.
- [26] CIEA. About CIEA[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://www.ciea.or.jp/about/>.
- [27] Institute of Resource Development and Analysis Kumamoto University. About IRDA[EB/OL]. [2022-10-20]. <http://irda.kuma-u.jp/about/index.html>.
- [28] CARD R-BASE. About R-BASE (Resource Database)[EB/OL]. [2022-10-20]. <http://cardb.cc.kumamoto-u.ac.jp/transgenic/index.jsp>.
- [29] EGTC. About EGTC[EB/OL]. [2022-10-20]. <http://egtc.jp/action/main/about>.
- [30] IMSR. Contributing repositories [EB/OL]. [2022-02-20]. <http://www.findmice.org/repository>.
- [31] 张连峰, 崔韶. 国内外实验动物模型概览[J]. 科技导报, 2017, 35(24):27-31. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.24.002.
- ZHANG L F, CUI S. Overview of experimental animal models at home and abroad[J]. Sci Technol Rev, 2017, 35(24): 27-31. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.24.002.
- [32] NIG. About NIG[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://www.nig.ac.jp/nig/>.
- [33] Laboratory Animal Research Center. About us[EB/OL]. [2022-10-20]. <https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/en/lab/animalresearch/section02.html>.
- [34] SLC. About us[EB/OL]. [2022-02-20]. <http://www.jslc.co.jp/animals/mouse.php>.
- [35] CLEA. About CLEA[EB/OL]. [2022-02-20]. <https://www.clea-japan.com/en/>.
- [36] 中国实验动物信息网. 人源化动物模型[EB/OL]. [2018-04-20].

- http://www.lascn.net/Item/27558.aspx.
- [37] 贺争鸣. 我国资源动物的实验动物化潜力与展望[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(3): 1-7. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2010.03.001.
- HE Z M. Potentials and prospects: laboratory animal derived from resource animals in China[J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(3):1-7. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2010.03.001.
- [38] 秦川. 中国实验动物学科发展的关键问题与对策的思考[J]. 科学通报, 2017, 62(30):3413-3419. DOI: 10.1360/N972017-00370.
- QIN C. Problem and countermeasure for development of laboratory animal science in China[J]. Chin Sci Bull, 2017, 62(30):3413-3419. DOI: 10.1360/N972017-00370.
- [39] 莫菲. 比较法视野中的实验动物伦理与安全法治模式: 兼谈实验动物法与中国特色动物保护法体系建设的关系[J]. 法学评论, 2021, 39(6):148-158. DOI: 10.13415/j.cnki.fxpl.2021.06.013.
- MO F. Rule of law model of experimental animal ethics and safety in perspective of comparative law[J]. Law Rev, 2021, 39(6):148-158. DOI: 10.13415/j.cnki.fxpl.2021.06.013.
- [40] 刘晓宇, 赵海龙, 卢选成, 等. 关于建设我国实验动物福利保障体系的思考[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(4): 326-330. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.04.014.
- LIU X Y, ZHAO H L, LU X C, et al. Thoughts on the construction of China's laboratory animal welfare guarantee system[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(4): 326-330. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.04.014.
- [41] 国家动物模型资源共享信息平台. 关于建立"国家动物模型资源共享信息平台"数据库的通知[EB/OL]. (2020-04-29) [2022-11-28]. https://www.namri.cn/module/submit/submit_detail.jsp?id=12.
- National Infrastructure of Animal Model Resources. Notice on establishing the database of 'National Animal Model Resource Sharing Information Platform'[EB/OL]. (2020-04-29) [2022-11-28]. https://www. namri. cn/module/submit/submit_detail.jsp?id=12.
- [42] 郭大伟, 朱冠, 金东庆. 我国实验动物产业化发展的困境和对策探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2):145-148. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.02.013.
- GUO D W, ZHU G, JIN D Q. Discussion on the dilemma and countermeasures of industrialization development of laboratory animals in China[J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(2):145-148. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2018.02.013.
- (收稿日期: 2022-09-01 修回日期: 2022-12-03)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 崔占鼎)
- [引用本文]**
苟欢, 安新颖, 童俞嘉, 等. 日本实验动物发展现状分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 194-204. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.141.
- GOU H, AN X Y, TONG Y J, et al. Analysis on the development status of laboratory animals in Japan[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 194-204. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.141.

《实验动物与比较医学》出版伦理声明

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

1. 所有来稿必须是作者的原创作品, 如文中使用先前发表的资料 (如图、表格), 需要提供相关的版权及许可证明。

2. 本刊坚决抵制第三方代写或代投、抄袭 (即剽窃)、造假 (包括伪造及篡改) 等学术不端行为。一经发现, 编辑部立即撤稿, 该文所有作者均会被列入黑名单。

3. 本刊不接受重复发表文章 (包括不同语种), 也不允许作者一稿多投 (包括同时或错时)。稿件一旦受理, 编辑部将即时处理。若作者有加急需求, 可第一时间联系编辑部寻求帮助。

4. 作者投稿前须确认署名及顺序, 所有作者均须对该文的科研诚信负责。投稿时应登记所有署名作者的基本信息, 并在文末附作者贡献说明及利益冲突声明。

5. 若来稿有过投稿他刊的经历, 本刊鼓励作者第一时间如实说明, 并提供以往的审稿意见及修改情况 (包括补充论据或解释说明)。这样的诚信行为有利于该稿在本刊的审稿速度和录用概率。

6. 本刊实行严格的三审制度, 所有来稿均需通过编辑部初审、同行评议专家外审和主编定稿会终审共 3 个审稿环节, 才决定录用与否。

7. 本刊审稿专家和编辑均需公正、尽责对待所有来稿, 对学术不端行为不姑息、不偏袒, 努力维护期刊学术声誉, 并在文章未发表前不随意公开研究内容, 以保障作者的首发权。

8. 所有来稿中若涉及学术不端行为 (《CY/T 174—2019: 学术出版规范期刊学术不端行为界定》), 均须由作者本人负责。本刊对已发现的学术不端作者, 保留通报其所在单位及同领域期刊社的权利。

《实验动物与比较医学》编辑部

北京地区实验小鼠诺如病毒流行情况

刘芳妮^{1,2}, 吕军苹^{2,3}, 柯跃华², 王长军^{1,2}, 郭金鹏²

(1. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 110122; 2. 解放军疾病预防控制中心应急处置大队科室, 北京 100071; 3. 中央民族大学药学院, 北京 100081)

[摘要] **目的** 调查北京地区19家生物公司自然条件下养殖的实验小鼠感染小鼠诺如病毒 (mouse norovirus, MNV) 的情况。**方法** 从19家公司生产的小鼠中随机抽取, 每品种品系、每批次14只小鼠合为一笼, 共计1 396笼19 544只小鼠。对每笼取粪便样本, 采用TaqMan探针荧光定量PCR法, 用MNV-1引物检测各品系小鼠感染MNV的情况, 根据循环阈 (cycle threshold, Ct) 值判断小鼠是否被感染; 采用卡方检验对5种小鼠粪便样本阳性率进行统计学差异性分析; 将5种小鼠阳性样本的Ct值进行统计描述; 采用非参数检验法对5种小鼠Ct值进行差异性分析。**结果** 共检测粪便样本1 396份, BALB/c、C57BL/6、ICR、KM、BALB/c-nude小鼠的粪便MNV检出阳性率分别为17.65%、39.33%、10.57%、18.32%和27.4%。C57BL/6小鼠的粪便MNV检出阳性率大于BALB/c、ICR、KM小鼠 ($P < 0.05$), 且BALB/c-nude小鼠的粪便MNV检出阳性率大于ICR、BALB/c小鼠 ($P < 0.05$); BALB/c-nude小鼠和C57BL/6小鼠的病毒载量总体上大于KM小鼠 ($P < 0.001$, $P < 0.05$)。**结论** MNV-1引物可应用于小鼠MNV感染情况的检测; 北京市5种实验小鼠MNV阳性率在10%~40%, 其中C57BL/6小鼠和BALB/c-nude小鼠的MNV阳性检出率较高。

[关键词] 小鼠诺如病毒; TaqMan探针; 荧光定量PCR; 自然感染

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0205-08



Prevalence of Mouse Norovirus in Experimental Mice in Beijing

LIU Fangni^{1,2}, LU Junping^{2,3}, KE Yuehua², WANG Changjun^{1,2}, GUO Jinpeng²

(1. School of Public Health, China Medical University, Liaoning 110122, China; 2. Emergency response brigade department, PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China; 3. college of pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Correspondence to: GUO Jinpeng (ORCID: 0000-0001-5966-4109), E-mail: pengpla@126.com

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the infection of mouse norovirus (MNV) in experimental mice raised under natural conditions from 19 biological companies in Beijing. **Methods** The mice used in this study were randomly selected from mice produced by 19 companies, and 14 mice of each strain and batch were combined into one cage, totaling 1 396 cages of 19 544 mice. The fecal samples from BALB/c, C57BL/6, ICR, KM, and BALB/c-nude mice were collected. TaqMan probe fluorescence quantitative PCR method was used to detect MNV infection of mice with MNV-1 primer, and whether the mice were infected with MNV was determined according to cycle threshold (Ct value). The chi-square test was used to analyze the difference of positive rate among the fecal samples from the five types of mice. The Ct values of the positive samples were statistically described; the non-parametric test was used to analyze the differences in Ct values among the five types of mice. **Results** A total of 1 396 fecal samples were collected. The positive rates of fecal MNV detection in BALB/c, C57BL/6, ICR, KM, and BALB/c-nude mice were 17.65%, 39.33%, 10.57%, 18.32% and 27.4%, respectively. According to the chi-square test results, the positive rate of fecal in C57BL/6 mice was higher than that in BALB/c, ICR, and KM mice (all $P < 0.05$), and the positive rate of BALB/c-nude mice was higher than that in ICR and BALB/c mice ($P < 0.001$, $P < 0.05$). The viral load of BALB/c-nude or C57BL/6 mice was generally greater than that of KM mice ($P < 0.05$). **Conclusion** MNV-1

[基金项目] 军队后勤生物安全研究专项“生物样本多途径核酸及血清学调查技术研究”(2019T03901)

[第一作者] 刘芳妮 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 诺如病毒感染机制研究。E-mail: fangniliu@163.com

[通信作者] 郭金鹏 (1977—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 军事预防医学。E-mail: pengpla@126.com。ORCID: 0000-0001-5966-4109

primers can be applied to the detection of MNV infection in mice. The positive rate of MNV in five types of experimental mice in Beijing ranges from 10% to 40%, among which C57BL/6 mice and BALB/c-nude mice have higher positive rates of MNV than the others.

[Key words] Mouse norovirus; TaqMan probe; Fluorescence quantitative PCR; Natural infection

诺如病毒 (noroviruses, NOV) 是杯状病毒科的单股正链 RNA 病毒。杯状病毒科目前分为 5 个属: 疱疹病毒属、兔出血症病毒属、纽布病毒属、札幌病毒属和诺如病毒属。杯状病毒为 T = 3 的二十面体颗粒, 含有 180 个主要衣壳蛋白; 该病毒体积微小, 无包膜, 大多由 3 个开放阅读框 (open reading frames, ORF) 构成; ORF 大多包括 ORF-1、ORF-2 和 ORF-3, 可编码 8 种病毒蛋白^[1-2]。除 ORF-1、ORF-2 和 ORF-3 外, 小鼠诺如病毒 (murine noroviruses, MNV) 额外包含 ORF4。诺如病毒 G I 和 G II 是引起人类感染的主要病毒基因群, G I 和 G II 进一步分为 9 和 27 个基因型, 其中 G II.4 病毒是大多数诺如病毒感染爆发的原因^[3-4]。人诺如病毒 (human noroviruses, HuNoV) 流行范围广泛, 各年龄组均可被感染, 是地方性急性胃肠炎的主要病因, 在全世界胃肠炎病例中占比高达 20%^[5-6]。此外, 诺如病毒不断进化, 每 2~4 年产生新的毒株, 并在全球范围内引起流行^[7-8]。MNV 是唯一一种在细胞培养和小动物模型中可复制的诺如病毒, 可用于构建研究诺如病毒生物学和发病机制的小动物模型, 同时 MNV 也是研究 HuNoV 的理想病毒模型^[9]。

研究表明, 实验室鼠群体在正常屏障饲养环境下 MNV 感染率较高。经调查日本 67.3% 的普通级小鼠、39.1% 的 SPF 级小鼠和 62.5% 的美国普通级小鼠感染了 MNV, 且商用 SPF 级 C57BL/6 小鼠中也发现了 20% 的小鼠存在 MNV 抗体^[10]。关于北美地区 MNV 的流行情况, 有学者调查了 12 639 只小鼠, 结果表明当地的 MNV 感染率为 22.1%^[11]。研究发现, MNV 是小鼠群体中最为流行的病毒, 其总流行率 (32%) 比其他病毒高 10 倍以上^[12]。近年来, 有学者对我国各地实验 MNV 感染情况进行调查, 发现广东地区实验小鼠的阳性率为 37.38%^[13], 上海地区实验小鼠的阳性率为 29.78%^[14], 重庆地区实验小鼠高达 78%^[15] 等。此外, 对 36 家国内机构送检的 1 182 份实验小鼠的血清, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和免疫荧光法 (IFA) 联合进行 MNV 检测, 发现阳性率高达 42.2%^[16]。

本实验利用筛选得到的最佳引物 MNV-1, 采用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法, 对北京市 19 家生物公

司生产的 5 种常用实验小鼠的 MNV 携带率进行了调查。本研究对了解北京市实验小鼠感染 MNV 情况以提高实验小鼠健康水平, 以及我国未来制定实验动物相关政策以控制生物公司小鼠 MNV 携带率提供参考; 而且, 本实验建立了成熟的 TaqMan 探针检测方法, 可供相关实验动物部门和检测机构控制实验潜在性病毒感染提供技术参考和支持。现将调查结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 小鼠粪便收集

从北京 19 家生产实验小鼠的生物公司, 抽取每品系、每批次 14 只小鼠合为一笼, 对每笼小鼠垫料中的粪便进行随机收集, 然后送至解放军疾病预防控制中心进行检测。共检测 1 396 笼, 总共 19 544 只小鼠。5 个品种品系小鼠及其数量分别是: BALB/c 小鼠 425 笼, C57BL/6 小鼠 267 笼, ICR 小鼠 265 笼, KM 小鼠 202 笼、BALB/c-nude 237 笼。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括病毒 RNA 提取试剂盒、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒、SuperReal 荧光定量探针法试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; MNV 质粒标准品由北京擎科生物技术有限公司合成, 经过测序验证合格。仪器包括离心机 (德国 Eppendorf AG 公司, 型号 5424R)、A2 生物安全柜 (美国 Thermo 公司, 型号 1300 Series A2)、PCR 仪 (美国 Thermo 公司, 型号 9700)、实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号 CFX96™ Touch)。

1.3 样本采集、处理以及 RNA 提取

用 1.5 mL 离心管在每笼小鼠的垫料中收集粪便, 后根据收取的粪便量加入适量无 RNA 酶水, 放置于冰盒中运输, 尽可能对当天到达实验室的粪便样本进行 RNA 提取; 若条件所限, 也应将粪便储存在 -80 ℃, 于样本到达一周内进行 RNA 提取。对所采集的 1 396 份小鼠粪便样本均采用一致的样本处理方法, 处理过程: 采用 12 000 r/min 的速度将装有样本的离心管离心 5 min, 取 140 μL 样本上清液; 按照病毒 RNA 提取试

剂盒说明书,提取样本上清液中病毒总RNA;反转录后,保存于 -20°C 冰箱备用。

1.4 引物和探针合成

从GenBank获取MNV全基因组序列,根据MNV基因组中高度保守的区域,采用NCBI的Primer-Blast软件设计引物。共设计引物3对,根据引物的特异性、敏感性等选择了最佳引物MNV-1,上游引物P1序列为5'-TCTGTCTGCGCTGGGTC-3',下游引物P2序列为5'-GCTGCGCCATCACTCATCC-3',探针序列为ATGCTGAGACCCCGCAGGAACG。普通PCR引物MNV-P-F2,上游引物序列为5'-ATGGTRGTCC-CACGCCAC-3',下游引物序列为5'-TGCGCCATCA-CTCATCC-3'。以上引物及探针均由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.5 反转录反应和PCR标准曲线的建立

利用FastKing cDNA第一链合成试剂盒和SuperReal荧光定量探针法试剂盒对病毒总RNA进行反转录反应。反转录反应的cDNA链合成需要按照第一链合成试剂盒说明书进行操作。反应体系为 $2\mu\text{L}$ 10×King RT Buffer、 $1\mu\text{L}$ FastKing RT Enzyme Mix、 $2\mu\text{L}$ FQ-RT Primer Mix、 $5\mu\text{L}$ RNase-Free ddH₂O,最后加入提取的 $10\mu\text{L}$ 病毒RNA进行反转录。反应条件: 42°C 孵育15 min, 95°C 孵育3 min,冷却至 4°C 后放置于 -20°C 冰箱保存。

建立PCR标准曲线:连续进行7次10倍梯度稀释,得到8个稀释度的MNV质粒标准品,范围为 $2.712\times 10^2\sim 2.712\times 10^9$ 拷贝/ μL ,每个稀释度重复检测3次。反应体系包括:PreMix $12.5\mu\text{L}$,正向、反向引物($10\mu\text{mol/L}$)分别 $0.75\mu\text{L}$,荧光探针 $0.5\mu\text{L}$,DNA模板 $1\mu\text{L}$ 。PCR反应条件: 95°C 条件下预变性15 min,然后 95°C 变性3 s, 60°C 退火、延伸。采集40个循环的荧光,然后绘制质粒DNA在不同浓度下的循环阈(cycle threshold, Ct)值标准曲线。

1.6 TaqMan 荧光定量 PCR 法检测样本中的 MNV 病毒

以抽检的1396份小鼠粪便样本中反转录合成的cDNA为模板,参照1.5节中荧光定量PCR实验步骤进行荧光定量PCR实验操作,检测样本中的MNV含量。结果判读:阳性样本结果的Ct值有数值出现,且其扩增曲线的起峰超过基线;阴性样本结果的Ct值为NA,未出现起峰或者起峰未超过基线。

1.7 TaqMan 荧光定量 PCR 法进行 MNV 特异性检测

采用1.5节方法,对12个已知病毒的RNA进行荧光定量PCR检测。12种病毒均来自解放军疾病预防控制中心菌毒种库,需保存于 -80°C 冰箱,病毒分别为:ev71、MNV(NCBI编号HQ317203)、鼠肝炎病毒、冠状病毒229e、脊髓灰质炎病毒、MNV(NCBI编号:MF973199)、柯萨奇病毒、埃可病毒、腺病毒、甲流病毒、乙流病毒、甲肝病毒。采用无RNA酶水作为阴性对照。

1.8 PCR 产物测序及序列比较分析

将抽检样本中的经荧光定量PCR检测,结果为阳性的20个小鼠粪便病毒RNA样本,进行普通PCR实验。PCR反应体系: $2\times\text{T5 Super PCR Mix (Colony)}$ $12.5\mu\text{L}$,上下游引物各 $1\mu\text{L}$,DNA模板 $1.5\mu\text{L}$,无RNA酶水 $9\mu\text{L}$,总反应体积为 $25\mu\text{L}$ 。反应程序: 98°C 5 min; 98°C 10 s, 55°C 15 s, 72°C 30 s,35个循环; 72°C 7 min。然后将PCR产物送至北京擎科生物技术有限公司进行测序,通过NCBI网站的Blast软件进行同源性核苷酸分析。

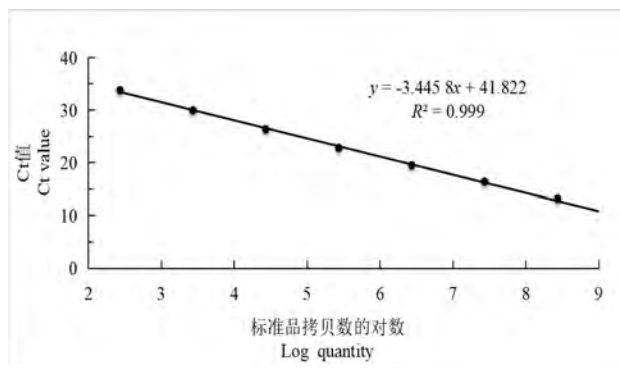
1.9 统计学方法

采用SPSS 26.0统计学软件对以上检测结果进行统计分析。采用非参数Kruskal-Wallis检验对5个品种品系小鼠的Ct值进行差异性分析,若各类小鼠的Ct值分布存在差异,则再用Kruskal-Wallis检验的多重比较对各类小鼠Ct值进行差异性分析。使用卡方检验分析5个品种品系小鼠的MNV阳性检出率之间是否有差异,若5个品种品系小鼠的阳性检出率整体上存在差异,则需用卡方分割法进行组间两两比较,同时用Bonferroni法校正P值,最后得出检验结果。以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MNV-1引物的PCR标准曲线

以MNV-1为引物,8个稀释度的MNV质粒标准品($2.712\times 10^2\sim 2.712\times 10^9$ 拷贝/ μL)为模板,进行荧光定量PCR实验;每个梯度进行3次重复。接着,以MNV质粒cDNA模板量的对数值(X)为标准曲线的横坐标,以荧光信号超过阈值时的Ct值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。计算得到标准曲线方程为: $Y=-3.4458X+41.822$ 。相关系数(r^2)为0.999,扩增效率 $E=95\%$,提示标准曲线的重复性良好(图1)。



注: Ct 是循环阈值。

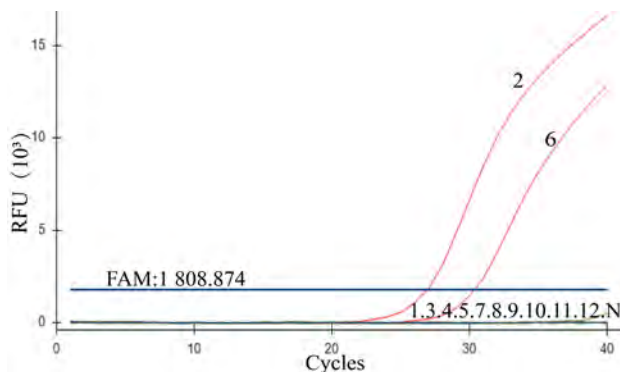
Note: Ct, cycle threshold.

图1 MNV-1引物的实时荧光PCR标准曲线图

Figure 1 The Standard curve of real-time PCR for MNV-1 primer

2.2 MNV特异性的PCR验证结果

以 MNV-1 为引物, 对 12 种已知病毒 ev71、MNV (HQ317203)、鼠肝炎病毒、冠状病毒 229e、脊髓灰质炎病毒、MNV (MF973199)、柯萨奇病毒、埃可病毒、腺病毒、甲流病毒、乙流病毒、甲肝病毒 (编号分别为 1~12) 的 RNA 进行荧光定量 PCR 检测, 结果显示第 2 和 6 号样本的 PCR 结果为阳性且有明显起峰, 其余结果均为阴性 (图 2)。



注: 2、6 号为小鼠诺如病毒; 其余病毒依次为 1 号 ev71、3 号鼠肝炎病毒、4 号冠状病毒 229e、5 号脊髓灰质炎病毒、7 号柯萨奇病毒、8 号埃可病毒、9 号腺病毒、10 号甲流病毒、11 号乙流病毒、12 号甲肝病毒; N 为阴性对照。基线值为 FAM: 1 808 874。

Note: No.2 and No.6 are murine noroviruses; The other viruses are as follows: No.1 is ev71, No.3 is murine hepatitis virus, No.4 is Coronavirus 229e, No.5 is poliovirus, No.7 is coxsackie virus, No.8 is echovirus, No.9 is influenza A virus, No.11 is influenza B virus, No.12 is hepatitis A virus. N: negative control. The baseline value was FAM:1 808 874.

图2 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 MNV 特异性的结果

Figure 2 Results of specificity test of the TaqMan real-time RT-PCR assay for murine noroviruses (MNV)

2.3 MNV 的 PCR 产物测序结果分析

采用荧光定量 PCR 法检测所有抽检小鼠粪便的病毒 RNA 样本后, 将 20 个阳性样本进行测序, 结果显示病毒基因测序结果相同。再利用 Clustalk W 软件, 将本研究测序结果与基因数据库 Genbank 所收集的几种诺如病毒成员的核苷酸序列数据进行比对, 显示与 MNV 核苷酸的同源性为 100%, 阳性符合率为 100%, 证实本研究检测序列为 MNV 核酸片段。

2.4 5 个品种品系小鼠粪便样本检测 MNV 阳性情况及其差异性

荧光定量 PCR 检测结果显示, BALB/c、C57BL/6、ICR、KM、BALB/c-nude 小鼠粪便的 MNV 阳性检出率分别为 17.65%、39.33%、10.57%、18.32% 和 27.4%, 5 个品种品系小鼠的总体阳性检出率为 22.21% (表 1)。卡方检验结果显示, 各个品种品系小鼠阳性检出率存在差异 ($\chi^2=76.704$, $P<0.05$), 再采用卡方分割法进行两两比较, 结果显示 C57BL/6 小鼠的 MNV 阳性检出率大于 BALB/c、ICR、KM 小鼠 ($P<0.05$), 且 BALB/c-nude 小鼠的 MNV 阳性检出率大于 BALB/c 和 ICR 小鼠 ($P<0.05$)。

2.5 5 个品种品系小鼠粪便 MNV 阳性样本的 Ct 值分布及其差异性

2.5.1 病毒载量 Ct 值的分布

5 个品种品系小鼠中, BALB/c-nude 小鼠样本的 Ct 值 [32~40] 分布范围较广, BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠 Ct 值主要在 [34~40] 低病毒载量区间, ICR 小鼠和 KM 小鼠的 Ct 值主要在 [36~40] (图 3)。所有小鼠的 Ct 值集中在 38~40 的阳性样本量占比最多, 几乎占总阳性量的 48%, 36~38 区间的阳性样本量占比达 38%, 少部分样本 Ct 值分布在 32~36 区间, 说明只有少部分小鼠粪便携带高浓度的 MNV 病毒。

2.5.2 5 个品种品系小鼠阳性样本 Ct 值间差异性分析

采用非参数 Kruskal-Wallis 检验对 5 种小鼠的 Ct 值进行差异性分析, 结果显示 $H(k)=18.660$ 、 $P=0.001$, 提示各类小鼠的 Ct 值分布之间存在差异; 再用 Kruskal-Wallis 检验的多重比较法对各类小鼠的 Ct 值进行两两比较, 根据 Bonferroni 校正后的 P 值得出结论, 结果显示 KM 小鼠与 BALB/c-nude 小鼠、C57BL/6 小鼠的 Ct 值之间差异均有统计学意义 ($P<0.001$ 、 $P=0.023<0.05$)。

将各类小鼠的统计分析结果绘制箱式图 (图 4),

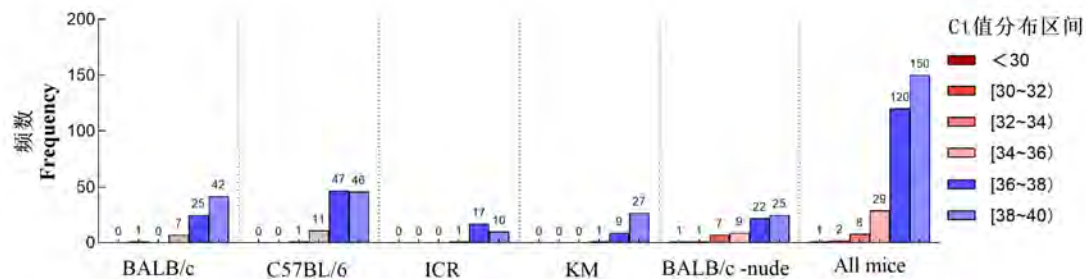
表1 北京市小鼠粪便样本的 MNV 病毒检出情况

Table 1 Detection of MNV in mouse fecal samples in Beijing

小鼠品种品系	样本数	阳性数量	阳性率
Stock or strain of mice	Samples	Positive samples	Positive rate/%
BALB/c	425	75	17.65 [△]
C57BL/6	267	105	39.33
ICR	265	28	10.57 ^{*△}
KM	202	37	18.32 [*]
BALB/c-nude	237	65	27.40 [*]
总样本数量	1 396	310	22.21
The total number of sample			

注：经卡方分割法检验，^{*}示与 C57BL/6 小鼠相比， $P < 0.05$ ；[△]示与 BALB/c-nude 小鼠相比， $P < 0.05$ 。

Note: According to the chi-square test, ^{*} represents compared with C57BL/6 mice, $P < 0.05$; [△] represents compared with BALB/c-nude mice, $P < 0.05$.



注：“[”表示包含端点值，“)”表示不包含端点值。

Note: “[” represents inclusion of endpoint value; “)” represents exclusion of endpoint value.

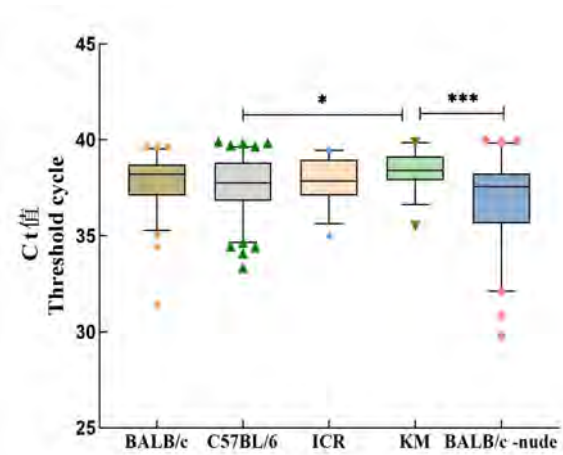
图3 小鼠 Ct 值频数分布直方图

Figure 3 Histogram of frequency distribution of Ct values of mice

结果显示：裸小鼠相对于其他4种小鼠其 Ct 值分布较为分散，5种小鼠中ICR小鼠的 Ct 值分布最为集中。根据非参数检验结果可知，KM 小鼠与 BALB/c-Nude 小鼠、C57BL/6 小鼠的 Ct 值中位数之间差异有统计学意义（校正后的 P 值分别为 $P < 0.001$ 、 $P = 0.023$ ），KM 小鼠 Ct 值的中位数大于其他两种小鼠，提示 BALB/c-Nude 小鼠和 C57BL/6 小鼠的病毒载量总体上大于 KM 小鼠。

3 讨论

2003 年首次发现 MNV [17]，此后通过对生物公司等机构的小鼠进行常规检测，发现 MNV 在世界范围内的生物医学研究机构中是最普遍的一种病原体 [12,18-20]。MNV 在许多小鼠中引起无症状感染，包括免疫能力强的小鼠和缺乏适应性免疫反应的小鼠 [17,21]。目前基因库中有超过 100 种不同的 MNV 序列 [22]。有研究表明，实验小鼠感染 MNV 可能会对借



注：经 Kruskal-Wallis 检验的多重比较以及 Bonferrni 校正， $***P < 0.001$ ， $*P < 0.05$

Note: After K-W test for multiple comparisons and Bonferrni correction, $***P < 0.001$, $*P < 0.05$.

图4 5个品种品系小鼠阳性样本 Ct 值箱式图

Figure 4 The Box plot of Ct values for positive samples of five stocks or strains of mice

助小鼠模型进行生物学或发病机制研究的结果造成不良影响^[23-24]。

研究发现,除 MNV-1 外,大多数 MNV 毒株感染小鼠后可长期、持续性地通过粪便排出体外^[25],所以收集小鼠粪便,然后进行检测能较好地反映小鼠的 MNV 感染情况。中国医学科学院魏强团队采用 VP1 酶联免疫吸附法(ELISA)对北京地区 2007—2013 年的 600 份小鼠血清样本检测,发现 MNV 感染率为 11.67%,其中 377 例为生物公司的小鼠样本,其感染率为 0.27%,而其余来自实验室的样本感染率为 30.94%^[20]。本研究发现,北京 19 家生物公司的小鼠 MNV 感染率为 10%~40%,与上述研究结果存在差异,推测可能原因:(1)与多年来生物公司未重视 MNV 的定期监测及清除,使得 MNV 逐渐在实验室播散有关;(2)因为小鼠血清中抗体的形成需要 3~5 周^[26],但被 MNV 感染的小鼠的粪便中病毒可在感染后第 2 天至 8 周内持续被检出^[27];(3)可能与本研究所采用的检测方法不同有关。本研究结果显示,北京生物公司 5 类实验小鼠 BALB/c、C57BL/6、ICR、KM、BALB/c-nude 的粪便 MNV 阳性检出率分别为 17.65%、39.33%、10.57%、18.32%、27.4%。但有研究发现,自然感染的 KM 小鼠粪便样本中 MNV 阳性率为 11% (4/35)^[28],另有研究调查了广东省 BALB/c 小鼠、C57BL/6 小鼠、KM 小鼠的 MNV 感染率分别为 70% (7/10)、100% (12/12)、64% (16/25)^[13]。以上几种小鼠的粪便检出阳性率与本研究相差较大,推测可能与样本量相差较大有关。

本研究中发现 C57BL/6 小鼠、BALB/c-nude 小鼠的粪便 MNV 检出阳性率较高,推测其原因可能是 C57BL/6 小鼠属于实验室最常用的近交系小鼠。有研究表明,C57BL/6 小鼠感染 MNV 后,表现为长期持续性感染,小鼠的肠道 MNV 含量处于较高水平^[29];该研究还发现, BALB/c-nude 小鼠的 T 细胞免疫缺陷可导致机体 B 细胞的活化减少,影响 MNV 特异性抗体的产生, T 细胞及 B 细胞在清除 MNV 的过程发挥重要作用,因此其 MNV 检出率阳性高。笔者推测,本研究中 ICR 小鼠粪便检出率最低的原因可能与该小鼠具有免疫活性以及健全的免疫系统有关。本研究中 KM 小鼠的阳性检出率为 18.32%,与广州某实验中心 KM 小鼠粪便 MNV 检出阳性率 23% (3/13)^[30] 相近。

本研究通过对各生物公司小鼠粪便样本的检测,探知了北京地区 5 种实验小鼠的 MNV 感染情况,对估

算全国小鼠的 MNV 感染状况可提供借鉴。本研究发现,实验小鼠 C57BL/6 和 BALB/c-nude 的 MNV 感染率较高。由于 MNV 在实验动物设施环境中顽固存在、难以消灭,因此建议养殖 C57BL/6 和 BALB/c-nude 小鼠时应设置哨兵动物,同时遵守严格的动物准入规则,采用血清抗体 ELISA 法检测结合粪便核酸检测,做到早发现并及时处理感染动物,杜绝病毒的引入和扩散。对于感染的小鼠也可通过胚胎移植到 MNV 阴性代孕小鼠体内,或出生后不久将幼崽交叉寄养给 MNV 阴性的养鼠^[31-33]。同时,采用二氧化氯溶液^[34]以及紫外线消毒法^[35-36]对房间进行消毒,可最大限度地降低环境中 MNV 滴度。总之,通过消除 MNV 感染引起的潜在混淆效应,可提高各实验室和研究机构中动物模型的一致性,提高小鼠实验结果的科学性和可靠性。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

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 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]

刘芳妮负责小鼠粪便诺如病毒检测实验部分,并进行结果分析、文章撰写及修改;
吕军苹负责协助做实验以及实验指导;
柯跃华提出实验构思,并联系生物公司提供小鼠粪便;
王长军指导关键性实验并对论文进行补充;
郭金鹏对实验阶段性进展工作进行细致指导,并对文章框架及思路提供重要建议,以及最终版的论文审核。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] THORNE L G, GOODFELLOW I G. Norovirus gene expression and replication[J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt 2): 278-291. DOI: 10.1099/vir.0.059634-0.
- [2] PRASAD B V, HARDY M E, JIANG X, et al. Structure of Norwalk virus[J]. *Arch Virol Suppl*, 1996, 12: 237-242. DOI: 10.1007/978-3-7091-6553-9_25
- [3] CANNON J L, BARCLAY L, COLLINS N R, et al. Genetic and epidemiologic trends of Norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel G II .4 recombinant viruses[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(7): 2208-2221. DOI: 10.1128/JCM.00455-17.

- [4] VAN BEEK J, DE GRAAF M, AL-HELLO H, et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(5): 545-553. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30059-8.
- [5] AHMED S M, HALL A J, ROBINSON A E, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8):725-730. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.
- [6] PATEL M M, HALL A J, VINJÉ J, et al. Noroviruses: a comprehensive review[J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(1): 1-8. DOI: 10.1016/j.jcv.2008.10.009.
- [7] BLANTON L H, ADAMS S M, BEARD R S, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004[J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(3):413-421. DOI:10.1086/499315.
- [8] HALL A J, LOPMAN B A, PAYNE D C, et al. Norovirus disease in the United States[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8): 1198-1205. DOI: 10.3201/eid1908.130465.
- [9] WOBUS C E, THACKRAY L B, VIRGIN H W 4th. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis[J]. *J Virol*, 2006, 80(11): 5104-5112. DOI: 10.1128/JVI.02346-05.
- [10] OHSUGI T, MATSUURA K, KAWABE S, et al. Natural infection of murine norovirus in conventional and specific pathogen-free laboratory mice[J]. *Front Microbiol*, 2013, 4: 12. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00012.
- [11] HSU C C, WOBUS C E, STEFFEN E K, et al. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine Norovirus 1 infection in mice[J]. *Clin Diagn Lab*, 2005, 12(10): 1145-1151. DOI: 10.1128/CDLI.12.10.1145-1151.2005.
- [12] PRITCHETT-CORNING K R, COSENTINO J, CLIFFORD C B. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats[J]. *Lab Anim*, 2009, 43(2):165-173. DOI: 10.1258/la.2008.008009.
- [13] 袁文, 张钰, 刘忠华, 等. 广东省实验小鼠自然感染鼠诺如病毒的调查[J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(2): 78-82. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2010.02.019.
- YUAN W, ZHANG Y, LIU Z H, et al. Investigation of natural murine Norovirus in laboratory mice in Guangdong Province[J]. *Chin J Comp Med*, 2010, 20(2): 78-82. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2010.02.019.
- [14] 刘芹. 上海地区小鼠诺瓦克病毒的感染状况及病毒的分离和表达[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- LIU Q. Infection of Murine Norovirus and Expression of Isolated Viruses in Shanghai Area [D]. Shanghai: Fudan University, 2014.
- [15] 田娜, 何丽雯, 曾莉, 等. 重庆地区小鼠诺如病毒的感染及其对免疫功能影响的初步研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(12): 1635-1641. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002256.
- TIAN N, HE L W, ZENG L, et al. Preliminary study on the infection of mouse norovirus and its effect on immune function in Chongqing[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2019, 44(12): 1635-1641. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002256.
- [16] 王翠娥, 陈立超, 周倩, 等. 实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析[J]. *实验动物科学*, 2014, 31(2):20-24. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2014.02.005.
- WANG C E, CHEN L C, ZHOU Q, et al. Testing of multiple viral antibodies in laboratory rats and mice[J]. *Lab Animal Sci*, 2014, 31(2):20-24. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2014.02.005.
- [17] KARST S M, WOBUS C E, LAY M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus[J]. *Science*, 2003, 299(5612):1575-1578. DOI:10.1126/science.1077905.
- [18] HENDERSON K S. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice[J]. *Lab Anim (NY)*, 2008, 37(7):314-320. DOI: 10.1038/labani0708-314.
- [19] MÄHLER M, KÖHL W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in western Europe[J]. *Lab Anim (NY)*, 2009, 38(5): 161-165. DOI: 10.1038/labani0509-161.
- [20] XIANG Z G, TIAN S N, TONG W, et al. MNV primarily surveillance by a recombination VP1-derived ELISA in Beijing area in China[J]. *J Immunol Methods*, 2014, 408: 70-77. DOI: 10.1016/j.jim.2014.05.007.
- [21] MUMPHREY S M, CHANGOTRA H, MOORE T N, et al. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses[J]. *J Virol*, 2007, 81(7):3251-3263. DOI:10.1128/JVI.02096-06.
- [22] KARST S M, WOBUS C E. Viruses in rodent colonies: lessons learned from murine noroviruses[J]. *Annu Rev Virol*, 2015, 2(1): 525-548. DOI: 10.1146/annurev-virology-100114-055204.
- [23] LENCIONI K C, SEAMONS A, TREUTING P M, et al. Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease[J]. *Comp Med*, 2008, 58(6):522-533.
- [24] CADWELL K, PATEL K K, MALONEY N S, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene *Atg16L1* phenotypes in intestine[J]. *Cell*, 2010, 141(7): 1135-1145. DOI: 10.1016/j.cell.2010.05.009.
- [25] THACKRAY L B, WOBUS C E, CHACHU K A, et al. Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence[J]. *J Virol*, 2007, 81(19):10460-10473. DOI:10.1128/JVI.00783-07.
- [26] HSU C C, WOBUS C E, STEFFEN E K, et al. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(10): 1145-1151. DOI: 10.1128/CDLI.12.10.1145-1151.2005.
- [27] HSU C C, RILEY L K, WILLS H M, et al. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses [J]. *Comp Med*, 2006, 56(4): 247-251.
- [28] 向丹丹, 魏晓峰, 胡建华, 等. RT-PCR 检测实验小鼠自然和实验感染鼠诺如病毒[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2013, 31

- (3): 63-69. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-9964.2013.03.011.
- XIANG D D, WEI X F, HU J H, et al. Detection of murine Norovirus from naturally and experimentally infected laboratory mice by RT-PCR method[J]. J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci, 2013, 31(3): 63-69. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-9964.2013.03.011.
- [29] 李晓波, 付瑞, 王淑菁, 等. 小鼠诺如病毒感染实验小鼠的抗体变化规律分析[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(4):343-350. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.127.
- LI X B, FU R, WANG S J, et al. Analysis of antibody changes in laboratory mice infected with murine Norovirus[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(4):343-350. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.127.
- [30] 肖建鹏, 马莉珍, 刘嫻, 等. 实验小鼠感染鼠诺如病毒的检测[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(4):392-394, 403.
- XIAO J P, MA L Z, LIU S, et al. Detection of murine noroviruses from laboratory mice[J]. J Trop Med, 2011, 11(4): 392-394, 403.
- [31] COMPTON S R. Prevention of murine norovirus infection in neonatal mice by fostering[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008, 47(3):25-30.
- [32] BUXBAUM L U, DERITIS P C, CHU N S, et al. Eliminating murine norovirus by cross-fostering[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50(4):495-499.
- [33] KIM H, BANG J, BAEK S H, et al. Eliminating murine Norovirus, Helicobacter hepaticus, and intestinal protozoa by embryo transfer for an entire mouse barrier facility[J]. Exp Anim, 2022, 71(1):28-35. DOI: 10.1538/expanim.21-0026.
- [34] KASTENMAYER R J, PERDUE K A, ELKINS W R. Eradication of murine norovirus from a mouse barrier facility[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008, 47(1):26-30.
- [35] PARK G W, LINDEN K G, SOBSEY M D. Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation[J]. Lett Appl Microbiol, 2011, 52(2): 162-167. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2010.02982.x.
- [36] WIELICK C, LUDWIG-BEGALL L F, DAMS L, et al. The use of germicidal ultraviolet light, vaporised hydrogen peroxide and dry heat to decontaminate face masks and filtering respirators contaminated with an infectious norovirus[J]. Infect Prev Pract, 2021, 3(1): 100111. DOI: 10.1016/j.infpip.2020.100111.
- (收稿日期:2022-08-16 修回日期:2022-12-18)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,赵宇朋)

[引用本文]

刘芳妮, 吕军苹, 柯跃华, 等. 北京地区实验小鼠诺如病毒流行情况[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 205-212. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.126.

LIU F N, LU J P, KE Y H, et al. Prevalence of mouse norovirus in experimental mice in Beijing[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 205-212. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.126.

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

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

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

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

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

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



庞万勇, 博士, 中国实验动物学会认证的实验动物高级医师, 美国实验动物医学会认证的实验动物专科兽医师 (DACLAM), 以及中国兽医病理学家分会认证的兽医病理师。中国实验动物学会常务理事、实验动物医师工作委员会主任委员、实验动物福利伦理专业委员会秘书长, CNAS实验动物专业委员会委员, 中华医学会医师培训工程——中华医学人文培训工程专家委员会委员, 国际AAALAC认可委员会委员, 世界兽医协会 (WVA) 理事 (代表实验动物专科兽医师)。本科和硕士毕业于中国农业大学动物医学院, 博士毕业于爱尔兰国立都柏林大学兽医学院, 曾在丹麦哥本哈根大学从事实验动物医学博士后研究。现任赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台总监, 负责该公司在全球范围内动物实验外包和合作业务的动物福利合规事务, 并协调该公司在中国的临床申报项目中的临床前部分。

发表文章约36篇, 其中SCI文章约20篇。

王 剑, 兽医学博士, 中国执业兽医师。毕业于华南农业大学兽医学院临床内科学, 主攻动物营养代谢病与中毒病。先后于华南农业大学畜牧学、上海市农业科学院生物学博士后流动工作站从事动物采食调控、动物病毒学等研究工作。现任上海交通大学医学院实验动物科学部实验师, 主要从事小鼠的转基因模型构建、繁育和病原微生物检测等相关工作。同时兼任上海市畜牧兽医协会动物公共卫生分会理事、中国兽医协会动物诊疗分会会员。发表国内外学术论文9篇, 参编《现代宠物医生手册》临床专著1部。



《动物研究:体内实验报告》即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述(一)

王 剑¹, 卢 今¹, 马政文¹, 陈国元², 卢 晓³, 白 玉⁴, 刘晓宇⁵, 卢选成⁶, 高 静⁷, 李 垚¹, 庞万勇⁸

(1. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海200025; 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. 迪哲医药股份有限公司, 上海201203; 4. 北京诺和诺德医药科技有限公司, 北京102206; 5. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京100050; 6. 中国疾病预防控制中心实验动物中心, 北京102206; 7. 上海交通大学医学院临床研究中心, 上海200025; 8. 赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台, 北京100022)

[摘要] 提高生物医学研究结果的可重复性是一项重大挑战, 研究人员透明且准确地报告其研究过程有利于读者对该研究结果的可靠性进行评估, 进而重复该实验或在该成果的基础上进一步探索。ARRIVE 2.0指南是2019年英国国家3Rs中心 (NC3Rs) 组织发布的一份适用于任何与活体动物研究报告相关的指导性清单, 用以提高动物体内实验设计、实验实施和实验报告的规范性, 以及动物实验结果的可靠性、可重复性和临床转化率。ARRIVE 2.0指南的使用不仅可以丰富动物实验研究细节, 确保动物实验结果信息被充分评估和利用, 还可以使读者准确且清晰地了解作者所表述的内容, 促进基础研究评审过程的透明化和完整性。目前, ARRIVE 2.0指南已经被国际生物医学期刊广泛采纳。本文是在国际期刊遵循ARRIVE 2.0指南的最佳实践基础上, 对2020年发表于*PLoS Biology*期刊上的ARRIVE 2.0指南完整解读版 (原文请见<https://arriveguidelines.org>) 进行中文编译 (第一部分包括前言和“关键10条”里的“研究设计”“样本量”“纳入和排除标准”), 以期促进国内研究人员充分理解并使用ARRIVE 2.0指南, 提高实验动物研究及报告的规范性, 助推我国实验动物科技与比较医学研究的高质量发展。

[关键词] 动物实验; ARRIVE 2.0指南; ARRIVE关键10条; 研究设计; 样本量; 纳入和排除标准

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** C **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0213-12

Explanation and Elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0— Reporting Animal Research and In Vivo Experiments (I)



[第一作者] 王 剑 (1986—), 男, 兽医学博士, 实验师, 研究方向: 实验动物医学。E-mail: wangjian3976@shsmu.edu.cn

[通信作者] 庞万勇 (1974—), 男, 兽医学博士, 研究方向: 实验动物医学。E-mail: panglyong@outlook.com。ORCID: 0000-0002-0724-2016

WANG Jian¹, LU Jin¹, MA Zhengwen¹, CHEN Guoyuan², LU Xiao³, BAI Yu⁴, LIU Xiaoyu⁵, LU Xuancheng⁶, GAO Jing⁷, LI Yao¹, Pang Wanyong⁸

(1. Department of Laboratory Animal Science, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 2. Animal Core Facility, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China; 3. Dical Pharmaceuticals Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 4. Novo Nordisk Research Centre China, Beijing 102206, China; 5. National Institute for Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China; 6. Laboratory Animal Center, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 7. Clinical Research Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 8. Translational in Vivo Model Research Platform, Sanofi G&D, Beijing 100022, China)

Correspondence to: PANG Wanyong (ORCID: 0000-0002-0724-2016), E-mail: pang1yong@outlook.com

[ABSTRACT] Improving the reproducibility of biomedical research results is a major challenge. Researchers reporting their research process transparently and accurately can help readers evaluate the reliability of the research results and further explore the experiment by repeating it or building upon its findings. The ARRIVE 2.0 guidelines, released in 2019 by the UK National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs), provide a checklist applicable to any *in vivo* animal research report. These guidelines aim to improve the standardization of experimental design, implementation, and reporting, as well as the reliability, repeatability, and clinical translatability of animal experimental results. The use of ARRIVE 2.0 guidelines not only enriches the details of animal experimental research reports, ensuring that information on animal experimental results is fully evaluated and utilized, but also enables readers to understand the content expressed by the author accurately and clearly, promoting the transparency and integrity of the fundamental research review process. At present, the ARRIVE 2.0 guidelines have been widely adopted by international biomedical journals. This article is a Chinese translation based on the best practices of international journals following the ARRIVE 2.0 guidelines in international journals, specifically for the complete interpretation of the ARRIVE 2.0 guidelines published in the *PLoS Biology* journal in 2020 (original text can be found at <https://arriveguidelines.org>). The first part of the article includes the preface and the "Key 10" section, which covers "study design" "sample size" and "inclusion and exclusion criteria". Its aim is to promote the full understanding and use of the ARRIVE 2.0 guidelines by domestic researchers, enhance the standardization of experimental animal research and reporting, and promote the high-quality development of experimental animal technology and comparative medicine research in China.

[Key words] Animal experiment; ARRIVE 2.0 guidelines; ARRIVE essential 10; Study design; Sample size; Inclusion and exclusion criteria

透明准确的报告对于提高科学研究的可重复性至关重要；它使其他研究者能够仔细审查研究方法的严谨性，评估结果的可靠性，并能重复或借鉴其工作。然而，有证据表明，大多数出版物中缺少关键信息，涉及动物研究的报告还有极大的改进空间^[1-4]。为此，英国国家3Rs中心（National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, NC3Rs）在2010年发布了ARRIVE指南即《动物研究：体内实验报告》（*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*）。该指南罗列了文稿中应有信息的条目清

单，以确保出版物包含足够的信息，从而补充完善知识库^[5]。该指南目前已被1 000多种期刊推荐使用，并获得了世界各地的研究资助者、大学和学术团体的广泛认可。

然而，目前对ARRIVE指南影响报告质量的评估结果不一^[6-11]。有证据表明，从事体内研究的科学家尚没有充分意识到完整报告ARRIVE指南所涵盖信息的重要性，也没有意识到这些信息与其工作或研究领域的相关性^[12]。作为一个新的国际工作组——该指南的作者们对第一版的ARRIVE指南进行了修订和更新，

以使其更易被采用;修订后的 2.0 版 ARRIVE 指南^[13]及其完整解读版^[14](即本文的英文原稿)一起发布。作者们依据当前的最佳实践更新了诸多建议,并对信息进行了重构,将报告条目分为“关键 10 条”和“推荐 11 条”两个集合。ARRIVE 2.0 中的“关键 10 条”构成了研究报告的最低要求,“推荐 11 条”则为所述的研究提供了更多的背景内容。诚然,研究报告最好能同时包含这两部分条目的全部信息,但首先应关注关键问题,这有助于论文作者、期刊工作人员、编辑以及审稿人在实际工作中使用该指南,从而使指南得以切实地实施。一旦“关键 10 条”在所有稿件中得到一致报告,那么“推荐 11 条”就可以被逐步添加到期刊要求中,直到所有 21 项条目在所有论文中都被例行报告。NC3Rs 网站中描述了修订和将条目分组的完整方法^[13]。

此次指南修订的一个重要举措是撰写这篇解释和阐明性文章,从而为 ARRIVE 2.0 指南中的 21 项条目(包括关键 10 条和推荐 11 条)提供背景和理论基础。为此,ARRIVE 2.0 指南的作者们为每项条目及其子条目提供了附加指南,进一步阐释了在描述动物研究文稿时报告这些信息的重要性及其支持性证据,详细说明了应该报告哪些内容及细节。该指南适用于生物科学研究中涉及活体动物的所有研究领域,包括哺乳动物以及模式生物(例如果蝇或秀丽隐杆线虫)。无论是单一动物研究的文稿,还是体内观察联合其他类型实验研究的范围更广的文稿,每项条目都同等重要。当然,要报告的具体细节类型可能因物种和实验设置而不同,因此需要在每个条目的附加指引中进一步确认。

ARRIVE 2.0 指南的作者们认识到,研究的目的会影响研究方案的设计。例如:验证性研究的目的是评估特定的假说,会采用严谨的实验方法降低实偏倚风险,并在研究启动之前制定详细的统计分析计划。相比之下,探索性研究经常同时研究多个问题,而不需要像验证性研究那样严格遵守严谨的标准;这种灵活性可用以开发或测试新的方法、产生某些可在以后正式验证的理论和假说。这两种研究类型都为科学进步做出了宝贵的贡献。准确透明地报告研究目的,以及在实验设计、实施和分析中采用的严谨性水平,有助于读者判断如何使用该项研究、研究结果是否具有开创性,以及在采纳借鉴该成果前是否需要进一步验证,或者这些研究是否足够可靠而能被应用于其他研究场景。

为了详细说明“关键 10 条”所述报告信息的重要性,此完整解读版还涵盖了实验设计的概念和最佳实践方案。这主要有两个目的:首先,有助于论文作者理解这些信息与读者评估研究报告结果的可靠性之间的相关性,因而鼓励作者全面详尽地报告相关信息;第二,它支持在动物研究设计和实施过程中践行最佳实践,即研究人员在计划进行体内实验伊始就查阅此完整解读版,将有助于他们充分利用 ARRIVE 2.0 指南,不仅将这些建议应用到研究设计中,而且在实验实施过程中收集相应的信息,以便为了遵循指南规范地报告研究结果。

为了确保这些建议对目标受众尽可能清晰和实用,作者们在撰写该指南时便与从事体内研究^[13]的科研工作者一起,对 ARRIVE 2.0 指南及此完整解读版进行实用测试。每项条目都独立成章,有助于作者能够单独查阅特定条目内容;并且列出术语表以解释常见的统计学术语(表 1)。每个子条目也通过已发表文献中筛选出的优秀案例进行阐明释义,即给出最佳实践指南和建议,以提高研究人员从实验设计到论文发表的水平。解释说明部分和优秀案例均可从 ARRIVE 指南网站(<https://www.arriveguidelines.org>)获得。

1 ARRIVE 2.0 指南的“关键 10 条”

ARRIVE 2.0 关键 10 条是确保审稿人和读者能够评估研究结果可靠性的最低报告要求。这一部分中没有等级之分,10 个条目按逻辑顺序显示,包括:研究设计、样本量、纳入和排除标准、随机化、盲法、结果测量、统计方法、实验动物、实验步骤、结果^[15]。

1.1 条目 1: 研究设计

每一项研究所需要提供的实验设计信息如下。

1.1.1 子条目 1a: 比较的组别, 含对照组。如果没有对照组, 应阐明理由

详解: 对照组或比较组的设置往往取决于实验目的。阴性对照用于确定组间差异是否由干预引起(例如: 野生型和基因修饰动物, 安慰剂组和积极治疗组, 假手术组和手术干预组)。阳性对照是用于支持对阴性结果的解释或者确定预期的效果是否可以检测到。

有些情况下, 可以不必单独设置非干预组, 例如: 当以比较不同给药方法(腹腔给药与经口灌服)为实验目的时, 或在纵向研究中用作自身对照的动物。预实验有时也不需要设置对照组, 例如: 检验一个实验步骤或规程的可行性。

表1 ARRIVE 2.0指南所附统计学术语

Table 1 Statistical terminology attached to the ARRIVE 2.0 guidelines

术语名称 Terminology name	含义 Content
偏倚 Bias	对干预的真实效果的过高或过低估计。偏倚是由实验设计、实施或分析的不足引起,从而导致误差的引入
统计描述和统计推断 Descriptive and inferential statistics	统计描述用于总结数据,通常包括集中趋势(如平均值或中位数)的测量和离散程度(如标准差或范围)的测量。统计推断用于对从中抽取样本的总体进行概括。假设检验如方差分析(ANOVA)、Mann-Whitney 检验或 <i>t</i> 检验等属于统计推断的范畴
效应量 Effect size	组间差异或变量之间关系强度的定量测量
实验单元 Experimental unit	独立于所有其他单元而接受干预的生物实体,这样就可以将任何两个实验单元分配给不同的处理组。有时也被称为随机化单元。
外部效度 External validity	某一特定研究的结果能够应用或推广到其他研究、研究条件、动物品系/物种或人类的程度
假阴性 False negative	当备择假设(H_1)为真时,却得到无统计学意义的结果。在统计学中,它被称为第Ⅱ类错误
假阳性 False positive	当零假设(H_0)为真时,却得到具有统计学意义的结果。在统计学中,它被称为第Ⅰ类错误
自变量 Independent variable	研究人员控制的变量(如处理、条件、时间)或样本的属性(如性别)或技术特征(如批次、笼、样本收集)等可能会影响结果测量的变量。自变量可以是科研中所关注的变量,也可以是干扰变量。自变量也被称为预测变量
内部效度 Internal validity	某一特定研究的结果在多大程度上可以归因于实验干预的效果,而不是其他一些未知的因素(如该研究的设计、实施或分析的不足所引入的偏倚)
干扰变量 Nuisance variable	干扰变量是指在研究中出现的一类变量,不是研究的主要关注点,但可能对研究结果测量产生影响并增加变异性,因此需要在实验设计或分析中加以考虑。此外,如果它们与关注的自变量有关联,就成为混杂因素,因为这会引入偏倚。在实验设计(以防止它们成为混杂因素)和分析(解释变异性,有时是降低偏倚)中都应对干扰变量加以考虑。例如,可将干扰变量作为区组因素或协变量
零假设和备择假设 Null and alternative hypotheses	零假设(H_0)是指没有影响/效应,如各组之间的差异或变量之间的关联。备择假设(H_1)是假设存在某种效应
结果测量/结局变量 Outcome measure	在研究过程中记录的、用以评估处理或实验干预效果的任何变量。它也被称为因变量、响应变量
统计效力/检验效能 Power	对于预先定义的有生物学意义的效应量,如果效应真实存在(即零假设被正确拒绝),统计检验将检测出效应的概率
样本量 Sample size	每组的实验单元数量,也被称为 <i>n</i>

针对较为复杂的研究设计,推荐使用诸如时间轴、流程图等直观表述形式,前者比文字描述更容易理解。相比单纯的文字描述,图表更利于表述哪些处理和程序在哪个研究阶段应用于特定的动物或组别。图表还有助于表述复杂的设计特征,例如:多因素的交叉或嵌套(层次设计或多水平设计),区组设计(减少非必要的变异,详见条目4:随机化),或对某一个实验单元随时间进行反复检测的实验(重复测量设计);更多不同的实验设计类型,详见文献^[16-18]。“实验设计助手”(The Experimental Design Assistant, EDA)是支持研究人员设计体内实验的辅助平台(网站: <https://eda.nc3rs.org.uk/>),可以生成图表来表示任何类型的实验

设计^[19]。

每一个实验都应报告所有分组信息,包括实验组、对照组(阴性或阳性)等。选择性地排除一些实验组(例如,因为数据与论文的叙述不一致或有冲突)具有误导性,因此应避免^[20]。确保能够清晰地区分实验组、比较组和对照组(阳性或阴性)。如果同一对照组用于多个实验或未设置对照组,需在报告中清晰地阐述。

报告示例1:“DAV1是一项单因素、两阶段交叉实验。实验所用药物为阿莫西林,受试动物为16头仔猪。该实验分为两个阶段:第一阶段,阿莫西林和安慰剂以混饲的方式饲喂仔猪;第二阶段,仅将含有阿

莫西林的饲料饲喂仔猪。其中,阿莫西林的口服剂量为30 mg/kg (单一剂量)。在每一个实验阶段,分别采集仔猪采食后0.5、1、1.5、2、4、6、8、10和12 h的血浆以测定阿莫西林的浓度”^[21]。

报告示例2:“本研究方案的示意图由EDA设计完成。该示意图表明本研究是一个较为简单的对比研究,即两种药物处理两种不同的肿瘤细胞

系后,观察药物对肿瘤细胞转移、扩散的影响。采用区组随机化将斑马鱼胚胎随机等量分为3组。分组后,每枚胚胎注射两种肿瘤细胞中的一种,并对注射后的胚胎进行药物干预(包括空白对照组)。通过两因素方差分析,确定药物处理对每种肿瘤细胞系生长、存活和侵袭的效果”^[22]。见图1。

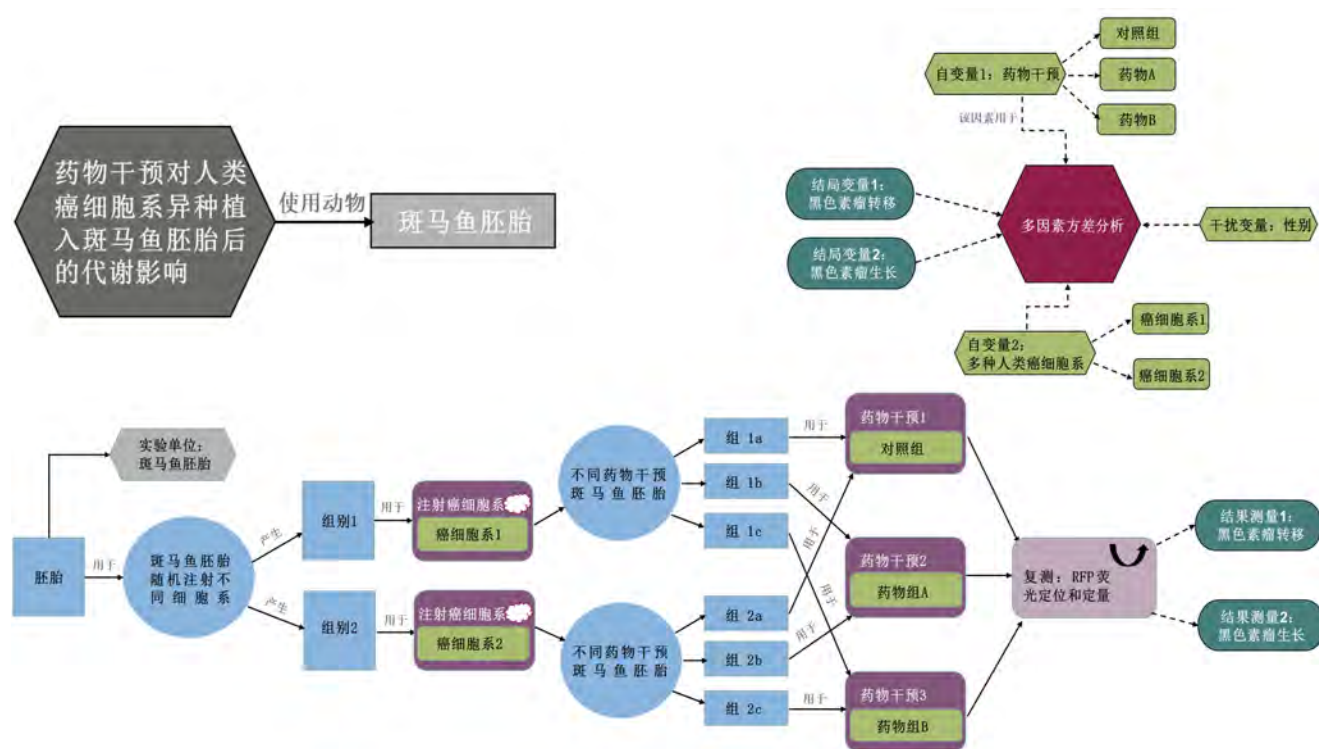


图1 文献[22]中“实验设计助手”设计的研究方案

Figure 1 The example of a study plan created by the Experimental Design Assistant (EDA) in study [22]

1.1.2 子条目 1b: 实验单元 (如: 以单只动物、一窝动物或一笼动物为单元)

详解: 在一项实验设计中, 其所涉及的生物性和技术性因素通常是分层次组织的, 比如动物体内的细胞、细胞里的线粒体, 或者房间里的笼盒、笼盒里的动物等。这样的层次会使确定样本量变得困难 (是动物、细胞, 还是线粒体的数量?)。样本量是每组的实验单元数。实验单元指的是独立于所有其他单元而接受干预的生物实体, 这样就可以将任何两个实验单元分配给不同的处理组。有时也被称作随机单元。此外, 实验单元不应相互影响所测量的结果。

通常而言, 实验单元是被独立分配到处 (例如, 注射药物) 组中的单个动物, 也可以是一笼或一窝 (例如, 对一整笼的实验动物饲喂某种食物或者对母体

进行处理后研究其幼仔), 也可以是动物身体的一部分 (例如, 将多种药物分别用于同一只动物身体的不同部位)。动物还可以做自身对照, 接受不同的处理, 其间由洗脱期分隔。此时, 实验单元是指处于不同实验处理时期的单个动物。单个实验也可能会有多个实验单元, 例如: 先对妊娠雌性动物进行实验处理, 然后对其离乳的幼仔分组饲喂不同的饲料^[23]。关于实验单元的更多指南, 详见文献^[17, 24-25]。

将实验单元与子样本或重复测量相混淆会人为地导致样本量膨胀。例如: 当实验单元是小鼠个体时, 则来自同一只小鼠身上的50个细胞的测量值代表样本量为1 (即 $n=1$)。这50个测量值是子样本, 提供测量误差的估计值, 因此应取平均值或在巢式分析中使用。在这种情况下报告 $n=50$ 就是一个典型的伪重复^[26],

这使得真实的变异性被低估,从而会导致假阳性和无效的分析结果^[26-27]。然而,如果将取自小鼠身上的每个细胞随机分配到不同处理组内,且单独进行评估,那么每个细胞就可以作为实验单元。

每个实验都应该明确指出其实验单元,以便对样本量和统计分析做出正确评估。

报告示例1:“本研究的样本为分别从饲喂含1倍胆碱和4倍胆碱日粮的妊娠15.5 d母鼠中采集的胎盘组织(每组每一胎鼠性别各有3只妊娠母鼠,共计12只妊娠小鼠)。为确保统计的独立性,每只妊娠小鼠只取一个胎盘(雄性或雌性胎鼠)用于实验。因此,胎盘即作为该实验的一个实验单元”^[28]。

报告示例2:“我们使用了高通量表型分析中收集的数据,该表型分析基于“流水线”或流程的形式进行表征,其中小鼠通过一系列以标准操作规程(SOP)为基础的标准化和验证性检测而被表征……这里的单只小鼠就是本研究中的实验单元”^[29]。

报告示例3:“将鱼根据体质量(0.7~1.2 g和1.3~1.7 g)分为两组,并随机放养在24个装有60 L水的饲养容器内(每一个实验单元的密度为15条)”^[30]。

报告示例4:“本研究中的 n 是指动物数量,每组包括6只动物,每只动物最多获取3张皮质纹状体切片,每个切片采集5次数据”^[31]。

1.2 条目2:样本量

1.2.1 子条目2a: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。同时说明整个实验使用的动物总数

详解:样本量大小与实验之初每个实验组包含的实验单元数量有关,通常用“ n ”表示(详见条目1-研究设计,以获取关于实验单元的定义和报告准则的更多指南)。这些信息对于评估统计模型的有效性和实验结果的可靠性至关重要。

研究开始时每组的样本量可能与分析中的 n 数量不同(详见条目3:纳入和排除标准)。此信息有助于读者了解实验的损耗,以及是否存在样本被排除的情况和这些情况出现在哪个组中。研究报告中对所用动物的总数进行说明,有助于识别实验中是否存在重复利用动物的情况。

报告每组准确的 n 值,以及每个实验的总样本量(包括任何独立的重复)。如果实验单元不是动物,动物的总数同样需要阐述,以帮助读者更好地理解实验

设计方案。例如:在一项研究饲喂的实验中,以动物饲养“笼”为实验单元,并且每笼饲养一对动物,则所用动物总数是实验单元总数的两倍。

报告示例1:“实验中对每组动物实施的处理和移植方案。根据每组所接受的一期和二期处理对其进行命名。注:S为生理盐水;L为左旋多巴;SS组在一期和二期均给予了生理盐水;SL组在一期给予了生理盐水,在二期给予了左旋多巴;LS组在一期给予了左旋多巴,二期给予了生理盐水;LL组在两个阶段均给予了左旋多巴。实验开始时每组为12只动物,但有些动物出现了与实验无关的肿瘤,因此被从实验中移除”^[32]。见图2。

	处理组	n =	一期	移植类型	二期
假手术组	SS	6	生理盐水	假手术	生理盐水
	SL	8	生理盐水	假手术	左旋多巴
	LS	8	左旋多巴	假手术	生理盐水
	LL	8	左旋多巴	假手术	左旋多巴
同种异体移植组	SS	10	生理盐水	14 d大鼠胚胎的腹侧中脑	生理盐水
	SL	11*	生理盐水		左旋多巴
	LS	12	左旋多巴		生理盐水
	LL	12	左旋多巴		左旋多巴
异种异体移植组	SS	10	生理盐水	12 d小鼠胚胎的腹侧中脑	生理盐水
	SL	10*	生理盐水		左旋多巴
	LS	11*	左旋多巴		生理盐水
	LL	12	左旋多巴		左旋多巴

注:*表示这些组最初有12只动物,但一些动物患上了与实验无关的肿瘤,因此被从研究中移除。

Note: *These groups initially consisted of 12 animals, but some animals developed tumors unrelated to the experiment and were therefore removed from the study.

图2 文献[32]中每组动物的处理和移植方案

Figure 2 The scheme of treatment and transplantation for each group of animals in study [32]

1.2.2 子条目2b:解释样本量是如何确定的。如已计算样本量,需提供先前计算的所有细节

详解:任何类型的实验报告都需要描述样本量大小的决定依据。对于确证性实验,由于采用统计推断来估计效应量大小,并确定推翻零假设的证据权重,因此需要证明样本量大小的合理性,以确保实验具有最佳样本量来检验研究问题^[33-34](详见条目13即推荐11条中的第3条:研究目标)。如果样本量过小(即检

验效力不足的研究), 则会产生不确定的结果, 而样本量过大 (即检验效力过强的研究) 则会因不必要的使用动物而引发伦理问题, 并可能产生虽具有统计学意义但与生物学无关的微不足道的结果^[35]。检验效力低有3种影响: 首先, 在实验中, 真实的效应很有可能被遗漏; 其次, 当检测到效应时, 往往会是真实效应量的高估^[24]; 最后, 当低检验效力与发表偏倚同时存在, 发表的文章中假阳性率就会增加^[36]。因此, 低效力的实验会使研究的内部效度变差, 同时在无定论的研究中有浪费动物的伦理风险^[37]。

研究设计方案会影响实验的统计效力, 效力的计算需要与所实施的研究设计方案相匹配。针对各种实验设计和统计分析, 都已有协助进行事先样本量计算的统计程序, 既有免费资源 (在线小程序以及 R 语言中的功能), 也有付费的商业软件^[38-40]。需要根据结局指标和自变量类型以及分组数量来选择合适的软件或算法。建议咨询统计学专家, 尤其是在设计复杂或不常见的实验设计类型时。

当实验用于测试干预措施对一个连续结果变量的平均值产生的影响时, 可以根据预先定义的与生物学相关的效应大小、依据先前数据预估的变异性、选定的显著水平、检验效能等因素之间的数学关系来计算样本量 (见下一段和 Bate 等^[17]、Festing 等^[41] 的实用性建议)。如果您事先进行了样本量计算, 请报告: (1) 统计分析方法 (例如: 采用双侧 t 检验, 差异显著性 P 值为 0.05); (2) 所关注的效应量, 并解释选择该效应量大小的理由; (3) 变异性的估计指标 (例如标准差) 以及是如何估算的; (4) 选择的检验效能。

效力计算时所用到的信息包括主要实验目的、预先确定的效应量、变异性估计、显著性阈值、效力、方向性。样本量的计算基于效应量大小、变异性、显著性水平、检验效能和样本量之间的数学关系。需要考虑以下问题:

(1) 主要的结局指标是什么? 应在实验的计划阶段就确定好主要结局指标是什么, 这是最重要的结果, 它将回答主要的实验问题。

(2) 具有生物学关联的效应量是什么? 效应量是指不同实验组之间主要结局指标的生物学相关性变化。可以参考类似的研究获得相关信息, 从而使研究人员去探索效应量达到何种大小时会具有科学意义, 并值得进一步开展工作。在临床前研究中, 还应考虑效应的临床相关性。

(3) 变异性如何估计? 变异性估计可以通过以下方面获得: 1) 根据与计划开展的实验条件完全相同的预实验所获得的数据来估计。例如: 以前在同一实验室所做的实验和类似条件下对具有相同特征的动物进行相同处理的实验。2) 从以前测试不同处理方法的实验中的对照组获得。3) 参照文献中报告的类似实验。

(4) 多大的假阳性风险是可以接受的? 显著性水平或阈值 (α) 是假阳性结果的发生概率。如果它被设定为 0.05, 那么对于单次统计检验来说, 获得假阳性的概率在 1/20。然而, 在多重检验中, 需要对显著性阈值或 P 值进行调整 (例如: 使用 Bonferroni 校正)。

(5) 多大的假阴性风险是可以接受的? 对于一个预先定义的具有生物学意义的效应值, 检验效能 (即 $1-\beta$) 是统计检验可以检测到一个真实存在的效应 (即真阳性结果) 的概率。通常 80% ~ 95% 的目标效力被认为是可接受的, 而这意味着还有 5% ~ 20% 的假阴性风险。

(6) 使用单侧检验还是双侧检验?

检验的方向性取决于特定分析中测试数据的分布。对于基于 t 或 z 分布的检验 (如 t 检验), 是否使用单侧或双侧检验来分析数据, 与备择假设是否具有方向性有关。一个具有方向性 (单侧) 备择假设的实验, 可以用单侧检验进行分析, 从而最大限度地提高检测该效应的灵敏度。在统计学领域, 对于何时使用单侧检验存在一定的争议^[42]。单侧检验的使用需要证明为什么只有在某个设定方向上的处理效应才有意义, 以及为什么将另一个方向上的大的效应当作非显著性差异对待^[43]。在使用单侧检验后, 研究者就无法再检验另一个方向上是否有遗漏效应的可能。仅仅为了获得统计学上的显著性差异而选择单侧检验是不合适的。具有无方向性备择假设的双侧检验更为常见, 它允许研究人员在不考虑方向性的情况下, 检验实验处理的效果。需要注意的是, 诸如方差分析 (ANOVA) 和卡方检验是基于只有一尾的不对称分布 (F 分布和卡方分布)。因此, 这些检验没有方向性选项, 即只能是单侧检验。

有几种类型的研究不适合事先进行样本量的计算。例如, 生产抗体或组织所需的动物数量取决于所需生产的数量以及单个动物的产出能力。对于以成功获得样本或状况 (例如, 获得转基因动物) 为结果的实验, 动物数量是由实验过程的成功率决定的。

在早期的可行性研究或预实验中, 动物的需求量

取决于研究目的。当初步研究的主要目标是流程或操作性质时（例如，为了改进程序和设备），所需的动物数量一般较少。在这种情况下，就不宜使用效力计算，样本量的大小可以根据操作能力和限制条件进行估计^[44]。仅靠预实验不太可能为未来实验的效力计算提供足够的变异性数据。系统综述和先前的研究是变异性信息的更合适来源^[45]。

如果没有使用效力计算来确定样本量，需要在报告中对此进行说明，并提供决定每组样本量的理由。无论是否使用了效力计算，在解释如何确定样本量时，都需要考虑到任何可能出现的动物或数据损失，例如，根据事先确定好的排除标准或预期损耗（详见条目3：纳入和排除标准）。

报告示例1：“样本量大小是根据参考治疗组即丁丙诺啡给药后的术后疼痛数字评分量表（NRS）得分（NRS AUC 平均值=2.70；非劣效性界值=0.54；标准偏差=0.66）……以及格拉斯哥综合疼痛量表（GCPs）……使用在线软件（实验设计助手：<https://eda.nc3rs.org.uk/eda/login/auth>）进行计算的。检验效能被设定为80%。每组至少需要20只犬”^[46]。

报告示例2：“本研究首次对生物玻璃原型进行了体内实验评估，故采用了一个较小的样本量。因此，研究的主要目的是收集基本实验数据，为今后更复杂的实验设计提供数据支持”^[47]。

1.3 条目3：纳入和排除标准

1.3.1 子条目3a：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所有标准。详细说明这些标准是否为预先设定。如未设定相关标准，应给予明确声明

详解：纳入和排除标准定义了实验开始后实验动物及数据被采用与否的筛选条件。因此，为了确保科学上的严谨性，应在开展实验和收集数据之前制定这些标准^[8, 33, 48-49]。纳入标准不应与动物特征相混淆（详见条目8：实验动物），但可能与之相关（例如：对某特定操作程序而言，体质量必须在特定范围内），或与其他研究指标有关（例如：任务表现必须超过既定的阈值）。在为不同目的选择数据进行重新分析的研究中，纳入和排除标准应描述如何选择数据。

技术或动物福利问题，是制定排除标准时所需要考虑的重要因素，例如：手术期间预期的并发症或其他可能会影响实验程序的情况（如运动损伤的发生有可能影响动物行为学检测结果）。实验样本或数据的排

除标准包括不符合相关质量控制标准，比如样品量不足、受到污染程度不可接受、组织质量欠佳等。同样，研究人员在分析过程中如何定义和处理异常数据也应在正式实验开始之前确定（详见子条目3b：可靠的数据清理指南）。

排除标准还可以反映出一项研究的伦理原则和其人道终点相一致（详见条目16即推荐11条的第6条：动物照护和监测）。例如：在癌症相关研究中，如果动物皮下肿瘤的大小超过规定体积，那么该动物可能在预设的时间点之前从研究中剔除并实施安乐死^[50]。如果动物数量的损失可以预计，在决定实验入组的动物数量时应该考虑这些因素（详见条目2：样本量）。尽管排除标准和人道终点通常包含在实验伦理审查申请中，但是同时在文稿中报告用于排除实验动物或相关数据的标准将有助于读者解读实验数据，并为其他想采用该模型的研究人员提供关键信息。

最佳的做法是在预注册的研究方案中包含所有事先设定的纳入和排除标准，以及异常值的判定标准（详见条目19及推荐11条中的第9条：研究方案注册）。至少应在实验记录本中记录纳入和排除标准并在稿件中报告，明确指出在收集任何数据之前就定义了相关标准。

报告示例1：“如果这些动物成功地接受了大脑动脉栓塞（MCAo），则被纳入研究。MCAo的定义是通过激光多普勒血流仪观察到动物大脑血流量下降60%或更多。如果线栓导致血管壁穿孔（根据动物安乐死时蛛网膜下腔有出血来判断），或线栓的硅胶头在撤线过程中脱落，或动物过早死亡导致无法采集行为和组织学数据，则从研究中排除”^[51]。

1.3.2 子条目3b：对于每个实验组，报告分析中排除的任何动物、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

详解：未予说明的动物、实验单元以及数据点可能导致原始数据无法支持研究结论^[52]。对排除和损耗进行报告为其他研究人员评估实验结果、重复实验或在其他物种上测试该干预措施提供了有价值的信息，也可以为人体试验提供重要的安全性信息（例如，与不良反应相关的排除）。

实验损耗有很多合理的原因，其中有些是可预期并可预先进行控制的（详见子条目3a：如何定义排除和纳入标准），但是有些数据的缺失是不可预期的，例如：因为动物接受了错误的处理、非预期的药物毒性、

与实验无关的感染或疾病、采样错误（例如：因检测失误导致虚假结果，及设备校准不当），或其他人为错误（例如，忘记打开记录设备）。

大多数的统计分析方法对异常值和缺失值极为敏感。在某些情况下，剔除异常数据可能是科学合理的，比如数据输入中的明显错误或读数超出合理范围的测量。然而，不恰当的数据清理可能使研究结果产生偏倚^[53]，提供数据剔除的理由可以有效地区分可靠的数据清理与数据操纵。数据缺失普遍存在于各个研究领域，如果缺失值不是随机的，则可能会影响研究的敏感性，还可能导致估计偏差、效力失真和信息丢失^[54]。分析方案应包括探索数据丢失原因的方法。针对缺失数据调整统计分析方法同样重要^[55-56]。

随着共享代码以实现分析重现等策略的增加，数据开放共享得以持续发展（详见条目20即推荐11条中的第10条：数据获取）。虽然这些做法相对公开透明，但仍然需要进一步公布数据清理的合理性，以及数据清理方法是否在收集数据之前定义。

应报告所有动物排除和数据点缺失，以及排除它们的理由。例如：以上信息可以用表格或流程图的形式加以概括，以描述每个组别的缺失情况。同时还须说明在排除数据或动物时研究者是否对分组情况不知情（详见条目5-盲法，以及Holman等^[57]的研究），并明确说明剔除异常值所使用的软件和统计模型（例如，GraphPad Prism的异常值检验）。

报告示例1：“对所有数据而言，动物饲养围栏（简称畜栏）是实验单元。该实验的目的是通过对不同畜栏中饲养的肉公牛饲喂含有不同比例盐酸莱克多巴胺（RAC）和锌氨基酸螯合物（ZnAA）添加剂的饲料，观察不同组别间肉公牛的热胴体重。在实验当中，有一个畜栏内的肉公牛（饲喂90 mg/kg ZnAA）出现了与实验本身无关的疾病而表现不佳，故将该畜栏所有数据从实验前（Pre-RAC）和实验期间的数据中全部剔除……”。“通过使用Cook's *D* 统计值确定异常值，若Cook's *D* 值 > 0.5，则将其删除。有一头肉公牛饲喂48 d的肝脏活检微量无机物（TM）结果异常，故相关数据被删除”^[58]。

报告示例2：“72只自发性高血压大鼠（SHR）被随机分配到实验当中，其中13只不符合我们的纳入和排除标准：7只的脑血流量下降未达到60%；1只术后死亡（尸检无法确定死因）；1只死于线栓介入过程中大出血；4只在线栓撤出时，涂在尼龙线远端的硅铜弹

性体脱落，使得再灌注的持久性不确定。因此，共有59只动物纳入本研究中梗死体积的分析。因为失误，有3只实验动物在神经行为学评分的最终评估之前被安乐死，其中1只来自常温/水组，两只来自低温/喉替啶组。这些失误发生时，人员对处理组分配不知情。所以，最后只有56只SHR大鼠被纳入神经行为学评分分析中”^[51]。

报告示例3：“流程图显示了实验方案以及研究中所使用、死亡和纳入的动物数量……在心血管磁共振成像（CMR）和超声心电图的基础数据确立后，如前所述，通过左前降支（LAD）冠状动脉结扎术（*n*=48）诱发了心肌梗死（MI）。作为手术操作的对照，假手术组小鼠接受了开胸术和心包切开口，但没有进行冠状动脉结扎（*n*=12）”^[59]。见图3。

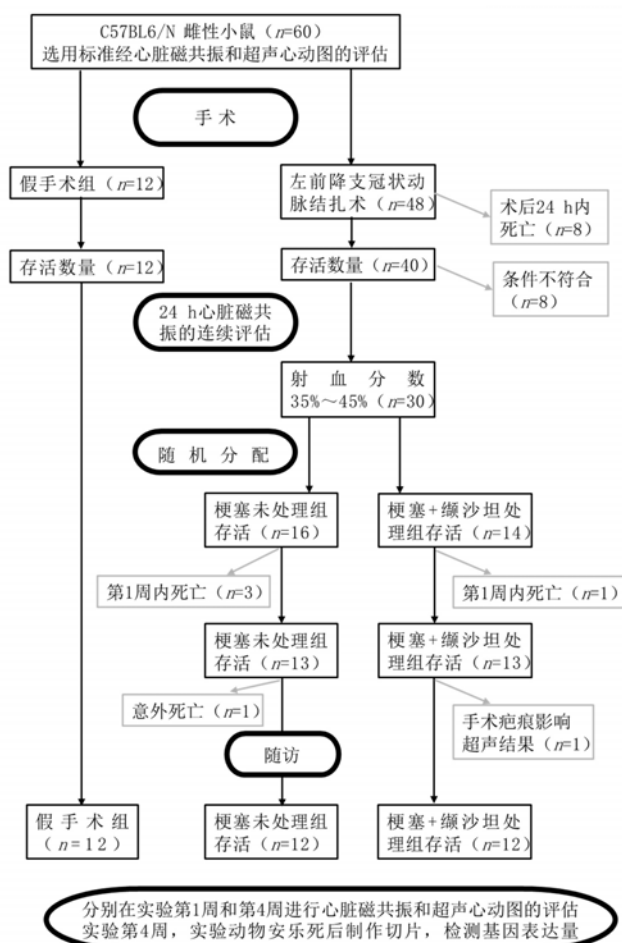


图3 文献 [59] 中实验方案及其所使用、死亡和纳入的动物数量

Figure 3 Flow chart showing the experimental protocol with the number of animals used, died and included in the study [59]

1.3.3 子条目 3c: 对于每次分析, 报告每个实验组中被纳入分析的动物、实验单元或数据点的确切数量(n)

详解: 每组中被分析的实验单元的确切数量(即 n 值)是读者解读分析报告时所需的重要信息, 因此应明确报告。实验中所有使用过的动物及其数据都应在报告中得到应有的体现。有时出于充分的理由, 可能需要将动物排除在研究之外(比如疾病或死亡), 或者把数据从分析中剔除(比如生物学上不合理的数值等)。有关动物缺失的报告, 有助于读者更好地理解实验设计过程并重复该方法, 有助于全程追踪研究中的动物数量, 尤其是当分析中的样本量与原始分组数量不匹配时。

对于每个研究结局, 应在文本或图表中清楚地标明数字并提供绝对数字(例如 10/20, 而不是 50%)。对于需要在不同时间点对实验动物进行检测的研究, 报告中需明确阐述哪些动物在何时接受检测^[33]。

报告示例 1: “F 组在 2010 年包含 29 只成年雄性和 58 只成年雌性恒河猴 ($n=87$), 在 2011 年则包括 32 只成年雄性和 66 只成年雌性恒河猴 ($n=98$)。雌性数量的增加是由于从青少年逐渐发育成熟至成年。雌性属于 3 个母系族群, 而雄性的等级没有大的变化。6 个中低等级的个体因死亡而未纳入分析, 2011 年初从该组移出的 5 个中等级别的雄性也未纳入分析”^[59]。

报告示例 2: “通过视频记录动物与饲养员之间互动时所表现出的动作及时长, 比如闻戴手套的手或管道、伸出爪子接触、攀爬或进入管道, 并统计互动时间占总时间的比例。然后对每笼中的 2 只小鼠取平均值, 因为它们同时进行测试, 彼此的行为并非独立。该实验发现: 相比那些用抓尾方式抓取的小鼠 ($6.4\%\pm 2.0\%$, 测试时间 60 s, $n=8$ 笼), 使用原来笼具里的管道辅助抓取 ($39.8\%\pm 5.2\%$, 60 s, $n=8$ 笼) 的小鼠与操作人员互动更多。而那些采用手捧方式抓取的实验组小鼠与人员的互动水平介于上述两种方法之间 ($27.6\%\pm 7.1\%$, $n=8$ 笼)”^[60]。

(待续)

[作者贡献 Author Contribution]

王剑负责 ARRIVE 2.0 指南完整版第一部分即摘要、前言和“关键 10 条”前 3 条内容的编译初稿和修改;

卢今、马政文参与 ARRIVE 2.0 指南完整版第一部分内容的编译初稿写作;

陈国元、卢晓、白玉、刘晓宇和卢选成负责对 ARRIVE 2.0 指南完整版第一部分编译内容提出关键性修改建议;

高静负责 ARRIVE 2.0 指南完整版中统计学概念及阐述的翻译审定;

李焱负责 ARRIVE 2.0 指南完整版中文编译工作的策划、组织, 以及第一部分内容的初稿审定和监督指导;

庞万勇负责 ARRIVE 2.0 指南完整版中文编译工作的指导, 以及全部内容的审定。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] KILKENNY C, PARSONS N, KADYSZEWSKI E, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7824. DOI: 10.1371/journal.pone.0007824.
- [2] FLÓREZ-VARGAS O, BRASS A, KARYSTIANIS G, et al. Bias in the reporting of sex and age in biomedical research on mouse models[J]. eLife, 2016, 5: e13615. DOI: 10.7554/eLife.13615.
- [3] WEISSGERBER T L, GARCIA-VALENCIA O, GAROVIC V D, et al. Why we need to report more than 'Data were Analyzed by t-tests or ANOVA'[J]. eLife, 2018, 7: e36163. DOI: 10.7554/eLife.36163.
- [4] MACLEOD M R, LAWSON MCLEAN A, KYRIAKOPOULOU A, et al. Correction: risk of bias in reports of *in vivo* research: a focus for improvement[J]. PLoS Biol, 2015, 13(11): e1002301. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002301.
- [5] 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.2021.02.010.
- [6] BAKER D, LIDSTER K, SOTTOMAYOR A, et al. Two years later: journals are not yet enforcing the ARRIVE guidelines on reporting standards for pre-clinical animal studies[J]. PLoS Biol, 2014, 12(1): e1001756. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001756.
- [7] GULIN J E N, ROCCO D M, GARCÍA-BOURNISSEN F. Quality of reporting and adherence to ARRIVE guidelines in animal studies for chagas disease preclinical drug research: a systematic review[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(11): e0004194. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004194.
- [8] AVEY M T, MOHER D, SULLIVAN K J, et al. The devil is in the details: incomplete reporting in preclinical animal research [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166733. DOI: 10.1371/journal.pone.0166733.
- [9] REICHLIN T S, VOGT L, WÜRBEL H. The researchers' view of scientific rigor-survey on the conduct and reporting of *in vivo* research[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0165999. DOI: 10.1371/journal.pone.0165999.
- [10] LEUNG V, ROUSSEAU-BLASS F, BEAUCHAMP G, et al. ARRIVE has not ARRIVED: support for the ARRIVE (Animal Research: reporting of *in vivo* Experiments) guidelines does not improve the reporting quality of papers in animal welfare, analgesia or anesthesia[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0197882. DOI: 10.1371/journal.pone.0197882.
- [11] HAIR K, MACLEOD M R, SENA E S, et al. A randomised

- controlled trial of an Intervention to Improve Compliance with the ARRIVE guidelines (IICARus)[J]. *Res Integr Peer Rev*, 2019, 4:12. DOI: 10.1186/s41073-019-0069-3.
- [12] MCGRATH J C, LILLEY E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(13):3189-3193. DOI: 10.1111/bph.12955.
- [13] PERCIE DU SERT N, HURST V, AHLUWALIA A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research[J]. *BMC Vet Res*, 2020, 16(1):242. DOI: 10.1186/s12917-020-02451-y.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] FESTING M F W, ALTMAN D G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals [J]. *ILAR J*, 2002, 43(4):244-258. DOI: 10.1093/ilar.43.4.244.
- [17] BATE S T, CLARK R A. The design and statistical analysis of animal experiments[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.
- [18] RUXTON G D, COLEGRAVE N. Experimental design for the life sciences[M]. Oxford: Oxford University Press, 2017.
- [19] PERCIE DU SERT N, BAMSEY I, BATE S T, et al. The experimental design assistant[J]. *PLoS Biol*, 2017, 15(9): e2003779. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003779.
- [20] The BMJ. Scientific misconduct [EB/OL]. [2020-1-10]. <https://www.bmj.com/about-bmj/resources/authors/forms-policies-and-checklists/scientific-misconduct>.
- [21] NGUYEN T T, BAZZOLI C, MENTRÉ F. Design evaluation and optimisation in crossover pharmacokinetic studies analysed by nonlinear mixed effects models[J]. *Stat Med*, 2012, 31(11-12): 1043-1058. DOI: 10.1002/sim.4390.
- [22] HILL D, CHEN L P, SNAAR-JAGALSKA E, et al. Embryonic zebrafish xenograft assay of human cancer metastasis[J]. *F1000Research*, 2018, 7:1682. DOI: 10.12688/f1000research.16659.2.
- [23] BURDGE G C, LILLYCROP K A, JACKSON A A, et al. The nature of the growth pattern and of the metabolic response to fasting in the rat are dependent upon the dietary protein and folic acid intakes of their pregnant dams and post-weaning fat consumption[J]. *Br J Nutr*, 2008, 99(3): 540-549. DOI: 10.1017/S0007114507815819.
- [24] LAZIC S E, CLARKE-WILLIAMS C J, MUNAFÒ M R. What exactly is 'N' in cell culture and animal experiments?[J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(4): e2005282. DOI: 10.1371/journal.pbio.2005282.
- [25] NC3Rs. Experimental unit 2015 [EB/OL]. [2019-3-21]. <https://eda.nc3rs.org.uk/experimental-designunit>.
- [26] LAZIC S E. The problem of pseudoreplication in neuroscientific studies: is it affecting your analysis?[J]. *BMC Neurosci*, 2010, 11:5. DOI: 10.1186/1471-2202-11-5.
- [27] HURLBERT S H. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments[J]. *Ecol Monogr*, 1984, 54(2):187-211. DOI: 10.2307/1942661.
- [28] KWAN S T C, KING J H, GRENIER J K, et al. Maternal choline supplementation during normal murine pregnancy alters the placental epigenome: results of an exploratory study[J]. *Nutrients*, 2018, 10(4):417. DOI: 10.3390/nu10040417.
- [29] KARP N A, MASON J, BEAUDET A L, et al. Prevalence of sexual dimorphism in mammalian phenotypic traits[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15475. DOI: 10.1038/ncomms15475.
- [30] RIBEIRO F, VASQUEZ L A, FERNANDES J B K, et al. Feeding level and frequency for freshwater angelfish[J]. *R Bras Zootec*, 2012, 41(6): 1550-1554. DOI: 10.1590/S1516-35982012-000600033.
- [31] GRASELLI G, ROSSI S, MUSELLA A, et al. Abnormal NMDA receptor function exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(2): 502-517. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02178.x.
- [32] LUDIVINE S, BREGER, . Influence of chronic L-DOPA treatment on immune response following allogeneic and xenogeneic graft in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 61:155-164. DOI: 10.1016/j.bbi. 2016. 11.014.
- [33] VAHIDY F, SCHÄBITZ W R, FISHER M, et al. Reporting standards for preclinical studies of stroke therapy[J]. *Stroke*, 2016, 47(10):2435-2438. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.013643.
- [34] MUHLHAUSLER B S, BLOOMFIELD F H, GILLMAN M W. Whole animal experiments should be more like human randomized controlled trials[J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(2): e1001481. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001481.
- [35] JENNIONS M D, MØLLER A P. A survey of the statistical power of research in behavioral ecology and animal behavior [J]. *Behav Ecol*, 2003, 14(3): 438-445. DOI: 10.1093/beheco/ 14.3.438.
- [36] BUTTON K S, IOANNIDIS J P A, MOKRYSZ C, et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(5): 365-376. DOI: 10.1038/nrn3475.
- [37] WÜRBEL H. More than 3Rs: the importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research[J]. *Lab Anim (NY)*, 2017, 46(4):164-166. DOI: 10.1038/labani.1220.
- [38] TEAM R. R: a language and environment for statistical computing[M]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017.
- [39] PENG C Y, LONG H Y, ABACI S. Power analysis software for educational researchers[J]. *J Exp Educ*, 2012, 80:113-136. DOI: 10.1080/00220973.2011.647115.
- [40] CHARAN J, KANTHARIA N D. How to calculate sample size in animal studies?[J]. *J Pharmacol Pharmacother*, 2013, 4(4):303-306. DOI: 10.4103/0976-500X.119726.

- [41] FESTING M F. On determining sample size in experiments involving laboratory animals[J]. Lab Anim, 2018, 52(4):341-350. DOI: 10.1177/0023677217738268.
- [42] FREEDMAN L S. An analysis of the controversy over classical one-sided tests[J]. Clin Trials, 2008, 5(6):635-640. DOI: 10.1177/1740774508098590.
- [43] RUXTON G D, NEUHÄUSER M. When should we use one-tailed hypothesis testing?[J]. Methods Ecol Evol, 2010, 1(2):114-117. DOI: 10.1111/j.2041-210X.2010.00014x.
- [44] REYNOLDS P S. When power calculations won't do: Fermi approximation of animal numbers[J]. Lab Anim (NY), 2019, 48(9):249-253. DOI: 10.1038/s41684-019-0370-2.
- [45] Bate ST. How to decide your sample size when the power calculation is not straightforward [EB/OL]. [2018-8-2]. <https://www.nc3rs.org.uk/news/howdecide-your-sample-size-when-power-calculation-not-straightforward>.
- [46] BUSTAMANTE R, DAZA M A, CANFRÁN S, et al. Comparison of the postoperative analgesic effects of cimicoxib, buprenorphine and their combination in healthy dogs undergoing ovariohysterectomy[J]. Vet Anaesth Analg, 2018, 45(4):545-556. DOI: 10.1016/j.vaa.2018.01.003.
- [47] SPIN J, OLIVEIRA G, SPIN-NETO R, et al. Histomorphometric evaluation of the association between bioglass and lyophilized bovine bone in the treatment of critical bone defects created on rat calvaria: a pilot study[J]. Rev Odontol UNESP, 2015, 44(1):37-43. DOI: 10.1590/1807-2577.1020.
- [48] RICE A S C, MORLAND R, HUANG W, et al. Transparency in the reporting of *in vivo* pre-clinical pain research: The relevance and implications of the ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) guidelines[J]. Scand J Pain, 2013, 4(2):58-62. DOI: 10.1016/j.sjpain.2013.02.002.
- [49] SALKIND N J. Encyclopedia of research design[M]. Thousand Oaks, Calif: SAGE Publications, 2010.
- [50] WORKMAN P, ABOAGYE E O, BALKWILL F, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research[J]. Br J Cancer, 2010, 102(11):1555-1577. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605642.
- [51] SENA E S, JEFFREYS A L, COX S F, et al. The benefit of hypothermia in experimental ischemic stroke is not affected by pethidine[J]. Int J Stroke, 2013, 8(3):180-185. DOI: 10.1111/j.1747-4949.2012.00834.x.
- [52] KAFKAFI N, AGASSI J, CHESLER E J, et al. Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2018, 87:218-232. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.01.003.
- [53] SCOTT S, KRANZ J E, COLE J, et al. Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS [J]. Amyotroph Lateral Scler, 2008, 9(1): 4-15. DOI: 10.1080/17482960701856300.
- [54] KANG H. The prevention and handling of the missing data[J]. Korean J Anesthesiol, 2013, 64(5): 402-406. DOI: 10.4097/kjae.2013.64.5.402.
- [55] DAVID ALLISON P. Missing data[M]. Thousand Oaks, Calif: Sage Publications, 2002.
- [56] JAKOBSEN J C, GLUUD C, WETTERSLEV J, et al. When and how should multiple imputation be used for handling missing data in randomised clinical trials - a practical guide with flowcharts[J]. BMC Med Res Methodol, 2017, 17(1):162. DOI: 10.1186/s12874-017-0442-1.
- [57] HOLMAN C, PIPER S K, GRITTNER U, et al. Where have all the rodents gone? the effects of attrition in experimental research on cancer and stroke[J]. PLoS Biol, 2016, 14(1): e1002331. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002331.
- [58] GENTHER-SCHROEDER O N, BRANINE M E, HANSEN S L. Effects of increasing supplemental dietary Zn concentration on growth performance and carcass characteristics in finishing steers fed ractopamine hydrochloride[J]. J Anim Sci, 2018, 96(5):1903-1913. DOI: 10.1093/jas/sky094.
- [59] CASTIGLIONI L, COLAZZO F, FONTANA L, et al. Evaluation of left ventricle function by regional fractional area change (RFAC) in a mouse model of myocardial infarction secondary to valsartan treatment[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135778. DOI:10.1371/journal.pone.0135778.
- [60] BRENT L J N, HEILBRONNER S R, HORVATH J E, et al. Genetic origins of social networks in rhesus macaques[J]. Sci Rep, 2013, 3:1042. DOI: 10.1038/srep01042.
- [61] GOUVEIA K, HURST J L. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44999. DOI: 10.1038/srep44999.

(收稿日期:2023-03-30 修回日期:2023-04-20)

(本文编辑:张俊彦,富群华)

[引用本文]

王剑, 卢今, 马政文, 等.《动物研究:体内实验报告》即 ARRIVE 2.0 指南的解释和阐述(一)[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 213-224. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.043.

WANG J, LU J, MA Z W, et al. Explanation and elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0—reporting animal research and *in vivo* experiments (I) [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 213-224. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.043.



空军军医大学实验动物中心

1 中心简介

空军军医大学实验动物中心是动物学博士学位授权点, 陕西省实验动物质量监督检测中心。实验动物中心建筑面积约5 000 m², 其中屏障设施面积约3 000 m²。中心现有20名专业技术人员和20余名服务保障人员, 其中高级职称4名、中级职称1名、初级职称4名。中心设有动物生产部、动物实验部、基因编辑动物制备与保种实验室、大动物模型创制与评估实验室、实验动物质量检测实验室、小动物分子影像实验室和动物实验技能培训实验室共7个平台, 主要承担实验动物教学、科研用实验动物保障, 动物模型研究以及实验动物从业人员培训等工作, 具备实验动物许可证管理和动物质量检测等职能。

2 平台建设成果

2.1 实验动物质量检测实验室

实验室通过了CMA认证, 具备开展实验动物相关国家标准中规定的全部实验动物病原体(细菌、病毒和寄生虫等)、遗传和环境设施等项目检测的能力, 可为实验动物生产和使用单位培养动物质量检测专业技术人员, 从而有效保障实验动物使用过程中的生物安全。

空军军医大学实验动物中心实验动物质量检测实验室



2.2 基因编辑动物制备与保种实验室

建立了规范化基因编辑技术平台, 可开展小鼠净化、精子/胚胎冻存、显微注射、卵巢移植、大鼠胚胎移植、基因工程小鼠制备等工作。同时, 利用CRISPR/Cas9技术制备了系列人源化基因编辑猪, 为建立规模化的猪源性器官移植样本库提供理想的供体。

空军军医大学实验动物中心基因编辑动物制备与保种实验室

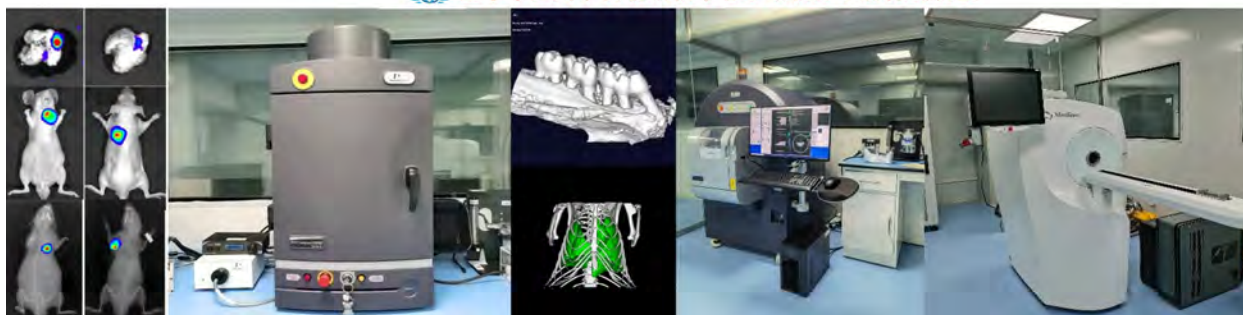


2.3 小动物分子影像实验室

实验室配备激光共聚焦显微镜、X-Ray小动物活体成像仪、小动物microCT显微成像系统和高分辨率小动物磁共振成像仪(3.0T和9.4T), 可实现对动物活体内部组

织相关的生理或病理过程动态实时成像, 评估动物模型在基因和蛋白质水平的变化, 动态捕捉疾病的发生和发展, 形成活体、无创、动态监测动物的科研平台。

空军军医大学实验动物中心小动物分子影像实验室



2.4 肿瘤异种移植模型资源库

建立了基于临床肿瘤标本的系列人源肿瘤组织来源移植瘤 (patient-derived xenograft, PDX) 和患者来源的类器官 (patient-derived organoid, PDO) 模型资源库, 涉及胰腺癌、胃癌、肝癌、结直肠癌和前列腺癌。进一步开展了基于上述模型的肿瘤个体化治疗研究, 形成了一系列标准化的药物筛选模型, 可以有效指导临床肿瘤患者用药。

2.5 大动物模型创制与评估实验室

中心建有约 400 m² 的大动物模型创制与评估实验室, 设置犬、猪和非人灵长类动物的饲养间, 以及专业的大动物外科手术室, 配备有 X 光机、B 超机、腹腔镜等用于动物模型检测评估的设备。目前已成功建立小型猪的脑胶质瘤模型用于辐射医学研究, 建立了小型猪烧伤模型用于皮肤移植研究, 还有用于航空医学研究的非人灵长类动物模型。

空军军医大学实验动物中心大动物模型创制与评估实验室



3 工作成果

在科研方面, 实验动物中心主要围绕人源化动物模型的制备及应用开展研究工作: 建立了 4 个品系的基因编辑小鼠模型; 制备了系列免疫人源化肿瘤移植模型, 创建了基于此类模型开展新型免疫治疗方案的评价体系; 利用构建的肿瘤 PDO 模型, 制定了免疫检查点抑制剂体外筛选评价策略; 构建了国内首例小型猪脑胶质瘤原位异种移植模型, 完成了系列影像学评估。

近五年承担国家自然科学基金项目 5 项, 省部级重点项目 20 余项; 发表影响因子 > 5 的 SCI 论文共 7 篇, 在中文核心期刊发表论文近 20 篇; 授权发明专利 2 项, 申报发明专利 3 项。

另外, 举办了三期专业技术培训班, 先后获得陕西省科技进步二等奖 1 项、陕西省教学成果一等奖 1 项, 荣立集体三等功 1 次, 获“科研先进单位”称号。

4 发展方向

近年来, 空军军医大学实验动物中心围绕疾病动物模型的制备和应用开展研究工作, 在人源化动物模型的创制、基因编辑动物的制备与保种研究方面形成了良好的技术优势。未来, 本中心将不断拓展和完善各个平台的资源建设和服务效能, 努力承担实验动物行业发展的责任, 更好地服务于我国生命科学和医学事业的发展。

图文: 张彩勤

审核: 师长宏

首都医科大学实验动物部

1 团队简介

实验动物部是首都医科大学的一个重要公共服务技术平台，主要开展实验动物寄养、动物实验技术服务、专业课程教学、科学研究等工作。部门现有员工62人，其中博士7人，硕士22人，具有高级职称10人。实验动物学是首都医科大学北京市重点建设学科，学科带头人作为博士研究生导师卢静教授，团队成员主要包括陈柏安教授、仵毅副教授、孙泉副教授、张静副教授、孟劲副教授等。本部实验动物学学科近年来获国家自然科学基金、科技部重大研究计划子课题、北京市科委重大项目、北京市教委科技项目等多项资助，重点针对大脑、肝脏等相关的我国重大、常见、多发疾病，围绕疾病的致病机制以及动物模型的建立、评价、比较、标准化等方面开展研究，同时围绕致死基因创建基因编辑新技术以开展相关研究。右上图为实验动物学学科团队部分成员及研究生合影。

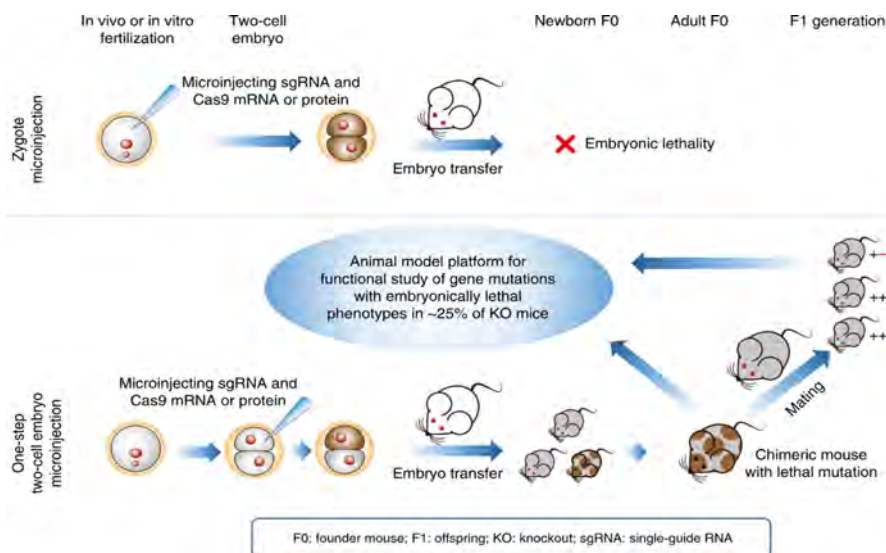


2 特色技术服务平台

2.1 实验动物基因编辑平台

平台秉持“顶天立地”技术服务与创新的双驱动发展模式，拥有分子克隆、胚胎培养与显微注射、胚胎冷冻与复苏等操作所需的仪器设备。本平台技术全面，主要开展基因敲除动物模型构建、胚胎干细胞制备嵌合鼠、胚胎净化、精子及胚胎冷冻复苏、老龄鼠生殖力挽救等技术服务。近年来创建了基于CRISPR/Cas9系统的二细胞胚胎一步显微注射技术，

既解决了现有基因编辑技术无法构建胚胎致死基因全身性敲除小鼠模型的难题，又弥补了常规条件性基因敲除小鼠模型现有的诸多缺陷，具有广泛的应用价值。右上图为基于CRISPR/Cas9系统的二细胞胚胎一步显微注射法构建致死基因敲除小鼠模型示意图（引自：WU Y, ZHANG J, PENG B, et al. Generating viable mice with heritable embryonically lethal mutations using the CRISPR/Cas9 system in two-cell embryos[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):2883）。



2.2 行为学技术平台

本平台为满足首都医科大学神经科学发展需求,配置了小动物行为跟踪系统、多种学习记忆测试的迷宫系统、社会交互系统、大鼠和小鼠转棒式疲劳仪、步态成像分析系统、大鼠旋转行为测试系统等动物行为学测试仪器设备及技术力量,可全面支撑科研人员开展学习记忆、焦虑抑郁、社交行为、运动功能、神经系统相关疾病动物模型的制备、评估等研究。下图为本平台常用的实验动物行为学测试仪器。



3 近年来代表性研究成果

(1) 基于CRISPR/Cas9系统创建了二细胞胚胎一步显微注射法构建致死基因敲除小鼠模型的新技术,为研究致死基因体内功能以及创建与致死基因相关的各类重大疾病动物模型提供了新的技术和思路,相关研究论文发表于*Nature Communications*等期刊。

(2) 筛选并鉴定了脑内缺乏A β 二聚体的猕猴及小鼠模型,分析了其脑内阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)样神经病变特征,为研究AD病因提供了新思路,相关研究论文发表于*Aging Cell*等期刊。

(3) 研制了观测AD主要神经病变脑内A β 沉积的单光子发射型断层扫描(single photon emission computed tomography, SPECT)显像剂([^{99m}Tc] 14b和15),为活体评价AD动物模型的神经病变提供了新的可用技术,相关研究论文发表于*Journal of Medicinal Chemistry*等期刊。

图文: 陈柏安

审核: 卢 静

《实验动物与比较医学》2023年专题征稿启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)创刊于1981年,是国内实验动物科技领域的第一本专业性学术刊物。本刊兼顾理论与实践、普及与提高,刊登实验动物和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息,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、实验动物设施与管理、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。

本刊历任主编包括我国实验动物科学专家邓肿先生、刘瑞三先生和高诚研究员,本刊现任主编为上海市生物医药技术研究院王健研究员,执行主编为中国科学院分子细胞科学卓越创新中心吴宝金研究员,名誉主编为中国科学院李劲松院士。目前,本刊为中文双月刊,国内外公开发行,系中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊)和中国医药卫生“核心期刊”,2022年入选中国科协“科技期刊双语传播工程”,并被美国Chemical Abstracts和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。

2023年,《实验动物与比较医学》继续坚守初心、守正创新,努力提高期刊的学术服务及引领能力,为我国实验动物与比较医学的科技发展、人才培养,搭建更高质量的学术交流平台。现根据本刊专业特色及国内外研究前沿进展,特向全国范围内的实验动物科技工作者及生物医药研发学者公开征稿。

一 选题方向(包括但不限于,题目可自拟)

- (1) 国内外实验动物与比较医学优秀团队介绍专题;
- (2) 有中国特色和自主知识产权的实验动物新资源开发及利用专题;
- (3) 动物实验研究方案设计(包括统计学分析方法)精粹专题;
- (4) 猪等中大型动物用于心血管、器官移植等比较医学专题;
- (5) 实验动物质量控制新技术及标准化专题;
- (6) 实验动物环境设施及科技支撑平台建设及运行管理专题;
- (7) 实验动物福利伦理及替代技术(3D生物打印、类器官等)研究专题;
- (8) 医用材料、医疗器械及药物研发相关的实验动物专题;
- (9) 人类疾病动物模型建立及新技术(基因编辑或其他遗传修饰等)应用专题;
- (10) 生命健康共同体及人兽共患病研究专题。

二 稿件要求

(1) 来稿必须为原创论文,撰写格式同本刊常规论著或综述的形式。可至本刊官网免费下载2022年相关文献以参考。

(2) 稿件准备须符合本刊《稿约》及国际医学期刊编辑委员会(ICMJE)制定的《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》要求(详见本刊官网“投稿指南”“投稿必看”)。

(3) 所有稿件均请至本刊官网在线投稿,并注明拟投专题或方向(可自拟)。

三 论文发表及评奖

(1) 针对专题来稿,本刊将特邀相关专家作执行编委,进行学术把关及点评。

(2) 优先评选优秀论文,并通过各大学术平台进行多渠道、多媒体推广与宣传。

(3) 欢迎承接国家重大专项及省部级基金资助课题的优秀团队同时多篇来稿,本刊将开通绿色通道,优先审稿和刊发。

投稿咨询QQ群号:750879769。编辑部联系电话:021-50793637。

期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部



让 / 科 / 研 / 更 / 高 / 效

实验动物综合管理系统

非人灵长类实验动物管理



基因工程动物编辑管理



电子实验记录



智能数字笼具

实验动物管理信息化整体解决方案供应商



厦门抱壹智能科技有限公司

www.baoyizn.com 400 1177 307

贝克曼库尔特 生命科学

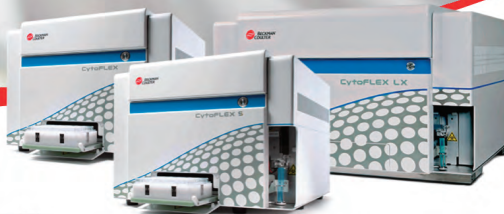
——加速探索未知答案



Biomek i7
自动化工作站



Avanti 高速离心机



CytoFLEX系列
流式细胞仪平台



Vi-CELL BLU
细胞计数/活力分析

贝克曼库尔特生命科学事业部一直致力于改善全世界人类的健康。在过去的一百年里，“贝克曼”、“库尔特”品牌的各种仪器已被世界各地医务人员和科研工作者所普遍认可和接受。贝克曼库尔特生命科学事业部为广大科研、商业实验室的生命科学研究工作者们提供优异的仪器系统、试剂和全球的技术服务与支持，不断促进生物学科研究的新技术发展。我们的技术支持和售后服务网络遍及全球，营销达130多个国家。公司主要产品包括流式细胞仪、离心机、实验室自动化系统、颗粒与细胞分析仪器等，其产品主要用于前沿的重要研究领域，包括基因组学、蛋白质组学、细胞组学以及生物制药等。

欲了解更多信息，敬请访问贝克曼库尔特生命科学官方网站www.mybeckman.cn及电商平台shop.mybeckman.cn。



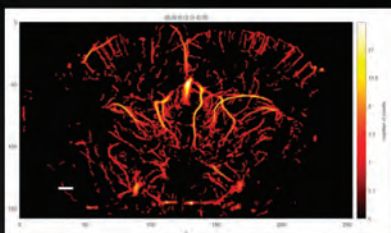
20 000帧/秒超高显像帧频
脑部微小血管多普勒成像
揭示生命活动实时脑区变化
精确显示病灶

「FUS」

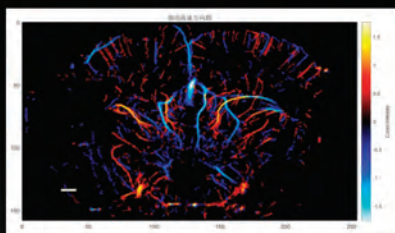


VINNO 超分辨脑成像系统

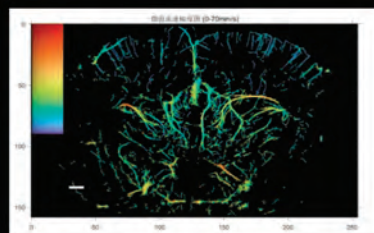
超分辨图像



微泡密度分布图



微泡流动方向图



微泡流动速度图



010-6954 9098

北京益仁恒业科技有限公司
Beijing Yeeran Technology Co.LTD

—— 为实验室提供整体解决方案 ——

专业的实验动物 饲养管理&实验空间共享

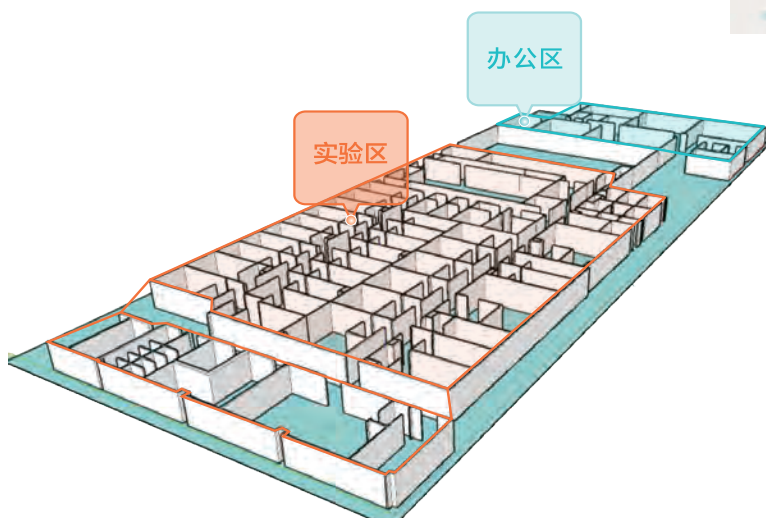
专业化的动物实验平台

- 稳定的独立实验空间
- 完善的设施设备配置
- 个性化实验技术支持



专业化的运营方式

- 数字化的饲养管理
- 提供全程可追溯数据记录
- 优良的实验和工作环境



3000 m²的实验动物设施
40个独立饲养及实验套间



上海元上生物医学科技有限公司

地址:上海市浦东新区周浦镇半夏路208号4号楼3楼

网址:<http://www.qishangbiomed.com> 电话:021-5811 1918



让科学家心无旁骛做科研

懂需求、懂流程、懂取证、节能并运行稳定的专业实验室建设商

实验动物环境与设施 | 生物安全实验室

GLP实验室、GMP车间 | 理化实验室



北京脑科学与类脑研究中心



和元生物屏障环境动物房



中科侨昌化学合成实验室



康龙化成宁波GMP车间



浙江大学医学中心实验动物平台

咨询热线: 021-55238821

公司网址: www.shyeten.com

公司地址: 上海市嘉定区高潮路215号C座208室

高新技术企业
上海市示范平台
上海市专精特新企业