

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44卷 第5期 (总第207期)

2024年10月25日出版

主管

上海科学院

主办

上海市实验动物学会
上海实验动物研究中心

编辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主编

王健

执行主编

吴宝金

出版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

张俊彦

印刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发行

邮发代号: 4-789

零售

《实验动物与比较医学》编辑部

201203, 上海市金科路3577号

电话: 021-50793657

联系人: 王伟民

定价

每期30.00元, 全年180.00元

中国标准连续出版物号

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

版权声明

本刊为开放获取期刊, 遵从CC BY-NC-ND 4.0协议。2024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

实验动物资源开发与利用

中国实验动物资源鉴定与评价工作进展分析

杜小燕, 刘云波..... 469

小型猪后肢去负荷模拟失重模型的建立与组织损伤研究

涂颖欣, 纪依澜, 王菲, 杨东明, 王冬冬, 孙芷馨, 戴悦欣,

王言吉, 阙广捍, 吴斌, 赵德明, 杨利峰..... 475

不同周龄段雄性长爪沙鼠肾小体的形态变化

李梦, 陈柏安, 卢静..... 487

实验动物福利与伦理

基因编辑猪-猴异种组织器官移植围手术期动物护理

朱婵, 张栋梁, 赵德莉, 石雪琴, 千磊, 张玄, 金艳,

段伟, 戚若晨, 刘超华, 杨薛康, 韩军涛, 潘登科..... 495

不同发育时期小鼠代谢笼实验的最佳适应期探讨

谭贺, 杨晓辉, 张大秀, 王贵成..... 502

人类疾病动物模型

人肝肿瘤细胞的裸小鼠原位癌建模条件优化及评价

孟雨, 梁冬丽, 郑琳琳, 周园园, 王朝霞..... 511

改良型十二指肠旷置术对2型糖尿病大鼠糖代谢的影响

杨劲, 俞诗雅, 林楠, 方永超, 赵虎, 邱锦维, 林鸿铭,

陈惠燕, 王瑜, 吴伟航..... 523

经血干细胞移植联合运动训练促进大鼠脊髓损伤康复的转录组学分析

戚龙菊, 陈世园, 廖泽华, 石袁虎, 孙郁雨, 王庆华..... 531

PNR检测在糖尿病肾脏疾病模型大鼠诊断及药效评价中的应用

张乃群, 袁飘飘, 曹琳茸, 应娜, 杨涛涛..... 543

生殖毒理学研究动物模型的建立方法及应用评价

黄冬妍, 吴建辉..... 550

实验动物管理

基于行政许可的四川省实验动物管理现状与对策分析

陈兵, 邹弈星, 王敬东..... 560

比较医学研究与报告规范

动物实验证据整合方法研究的进展与挑战

郑卿勇, 李腾飞, 许建国, 周泳佳, 马智超, 王娜, 李莫兰, 杨雯景, 吴佩润, 王海东, 田金徽 ... 567

动物实验与比较医学研究论文出版规范清单(2024年版)

《实验动物与比较医学》编辑委员会 577

科普讲坛

NOD小鼠培育接力赛

孙强 583

读者-作者-编者

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会 前插8

本刊被数据库收录情况 英文目次第2页

《实验动物与比较医学》2025年征订启事 486

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明 510

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表 522

《实验动物与比较医学》出版伦理声明 530

书讯:《医学实验动物学》(第2版)教材出版 586

广告 封二,前插1~7,后插1~6,封三,封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*118*zh*P* ¥30.00*2000*14*2024-10

(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 李 垚

本期审稿专家 陈傍柱 陈方明 陈民利 陈 真 陈振文 丁玉强 范 薇 富群华

高 静 葛良鹏 韩凌霞 李文德 李 垚 刘晓宇 罗小泉 潘登科

庞万勇 施爱民 孙德明 王朝霞 王 健 王 宇 吴宝金 谢淑武

徐 平 徐汪节 闫明霞 杨利峰 杨晓辉 姚 明 应华忠 于 艳

袁晓龙 张厚森 张 周 赵彦光 赵 勇 周正宇 朱彦兵 邹 洪

本期责任编辑 张俊彦 丁宇菁

本期责任排版 王伟民

本期特邀编校 富群华 陶启辰 刘晓宇 吴凌波

本期实习编校 翟玉凤 干明红 洪 怡 姜怡欣 吴昊晟 张 萍 周 培 周 烁

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981 Volume 44, Issue 5

October 25, 2024

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© 2024 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, LI Yao

CONTENTS IN BRIEF

Development and Utilization of Laboratory Animal Resources

Analysis of the Progress in Identification and Evaluation of Laboratory Animal
Resources in China

DU Xiaoyan, LIU Yunbo 469

Evaluation of Simulated Weightlessness Model of Hindlimb Unloading
Miniature Pigs and Their Tissue Damage

*TU Yingxin, JI Yilan, WANG Fei, YANG Dongming, WANG Dongdong,
SUN Zhixin, DAI Yuexin, WANG Yanji, KAN Guanghan, WU Bin,
ZHAO Deming, YANG Lifeng* 475

Morphological Changes of Renal Corpuscles in Male Mongolian Gerbils
at Different Ages

LI Meng, CHEN Bai'an, LU Jing 487

Laboratory Animal Welfare and Ethics

Perioperative Animal Care for Xenotransplantation from Genetically Edited
Pigs to Monkeys

*ZHU Chan, ZHANG Dongliang, ZHAO Deli, SHI Xueqin, QIAN Lei,
ZHANG Xuan, JIN Yan, DUAN Wei, QI Ruocheng, LIU Chaohua,
YANG Xuekang, HAN Juntao, PAN Dengke* 495

Optimal Adaptation Period for Metabolic Cage Experiments in Mice at
Different Developmental Stages

TAN He, YANG Xiaohui, ZHANG Daxiu, WANG Guicheng 502

Animal Models of Human Diseases

Optimization and Evaluation of Conditions for Orthotopic Nude Mouse
Models of Human Liver Tumor Cells

*MENG Yu, LIANG Dongli, ZHENG Linlin, ZHOU Yuanyuan,
WANG Zhaoxia* 511

Effect of Modified Duodenal Exclusion Surgery on Glucose Metabolism in
Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

*YANG Jin, YU Shiya, LIN Nan, FANG Yongchao, ZHAO Hu, QIU Jinwei,
LIN Hongming, CHEN Huiyan, WANG Yu, WU Weihang* 523

Transcriptomic Analysis of Menstrual Blood-Derived Stem Cells
Transplantation Combined with Exercise Training in Promoting Spinal

Cord Injury Recovery in Rats

*QI Longju, CHEN Shiyuan, LIAO Zehua, SHI Yuanhu, SUN Yuyu,
WANG Qinghua* 531

Application of PNR Detection in the Diagnosis and Drug-efficacy Evaluation
of Diabetic Kidney Disease in Rats

ZHANG Naiqun, YUAN Piaopiao, CAO Linrong, YING Na, YANG Taotao
..... 543

Establishment Methods and Application Evaluation of Animal Models in Reproductive Toxicology Research <i>HUANG Dongyan, WU Jianhui</i>	550
Laboratory Animal Management	
Analysis on Current Status and Countermeasures for Laboratory Animal Management in Sichuan Province Based on Administrative Licensing <i>CHEN Bing, ZOU Yixing, WANG Jingdong</i>	560
Guidelines for Comparative Medical Research and Reporting	
Advances and Challenges in the Research of Integration Methods of Animal Experimental Evidence <i>ZHENG Qingyong, LI Tengfei, XU Jianguo, ZHOU Yongjia, MA Zhichao, WANG Na, LI Molan, YANG Wenjing, WU Peirun, WANG Haidong, TIAN Jinhui</i>	567
Guideline Checklist for Publishing Research Papers on Animal Experimentation and Comparative Medicine in China (2024 Edition) <i>Editorial Board of Laboratory Animal and Comparative Medicine</i>	577

本刊被数据库收录情况:

中国科技论文与引文数据库(CSTPCD,即中国科技核心期刊目录)

中国医药卫生“核心期刊”目录

中国核心期刊数据库

中国科技期刊数据库

中国生物医学文献数据库

中国期刊全文数据库

中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊

中国超星期刊域出版平台

中国期刊网、万方医学网、中国知网、维普网、长江文库、博看网、中邮阅读网、新华网,等

美国《化学文摘》(Chemical Abstracts)

美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrichsweb Global Serials Directory)

美国史蒂芬斯数据库(EBSCOhost)

国际农业与生物科学研究中心文摘(CAB Abstracts)

全球健康数据库(Global Health)

哥白尼期刊数据库(ICI World of Journals)

哥白尼精选期刊数据库(ICI Master List)

瑞典开放获取期刊目录(DOAJ)

WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)



刘云波，中国医学科学院医学实验动物研究所教授、研究员，兼任北京华卓康生物科技股份有限公司董事长、国家实验动物质量环境检测中心主任、中国实验动物学会常务理事、北京市实验动物行业协会副理事长、中国装备协会实验室装备分会常务理事、中国 GLP 联盟常务理事、中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会主任委员，同时在中国实验动物学会多个学术专委会任职。长期从事实验动物质量控制和新资源开发工作，是国家重点研发计划项目首席科学家，主持科研项目 26 项，其中 10 项科研成果获得省部级科技成果奖。参与编写著作和教材 11 部，主编国家标准 1 项、地方标准 11 项，参编国家标准 3 项。发表科研论文 110 余篇。



杜小燕，首都医科大学基础医学院教授、博士生导师，兼任中国实验动物学会第八届理事会理事、实验动物资源与鉴定工作委员会秘书长等社会职务。同时担任《中国比较医学杂志》《实验动物科学》《实验动物与比较医学》和 *Scientific Reports* 编委，以及《中国实验动物学报》通信编委。研究领域涉及实验动物遗传检测、实验动物资源和疾病模型培育及其遗传机制研究，主持和参加国家级课题 20 余项，以第一作者或通信作者身份在 *Molecular Cancer*、*JAMA* 等国内外学术期刊上发表论文 57 篇，单篇最高被引频次达 128 次。编著 10 部书籍，其中副主编 6 部。以第一发明人获得授权发明专利 2 项。荣获中国实验动物学会科技奖一、二、三等奖各 1 项，北京市实验动物行业协会奖基础类一等奖 3 项，2016 年中国实验动物学会优秀青年人才奖。

中国实验动物资源鉴定与评价工作进展分析

杜小燕¹，刘云波²

(1. 首都医科大学基础医学院, 北京 100069; 2. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

[摘要] 实验动物既是国家战略资源，也是国家科技发展的重要支撑条件。中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会成立于 2019 年 5 月，是中国目前唯一的专门从事实验动物资源鉴定与评价的专业学术团体机构。本文首先论述了实验动物资源鉴定与评价的意义，总结了 3 种新的实验动物资源开发途径，包括将实验用动物（经济动物、观赏动物、农用动物、野生动物等）驯化和标准化、通过自然突变和人工诱变获得实验动物新品种（系）、应用基因编辑技术创制新的实验动物资源；然后介绍了实验动物资源鉴定与评价的工作流程（包括初审即形式审查、函审即专家审核、会审或现场考察、审定即投票表决并公示、发放鉴定证书）和所需提交的材料（包括申请书、总结报告、鉴定或研究报告、附录和其他必要材料）；接着进一步论述了资源鉴定与评估的相关要求，包括种群、遗传学分类要求、生物学特性、遗传稳定、应用价值；最后，介绍了目前已经完成鉴定的实验动物资源新品种（系）情况，并分析了目前工作实践中存在的问题以及针对这些问题的解决措施，以期为后续相关研究提供参考。

[关键词] 实验动物；实验动物资源；鉴定与评价

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0469-06



Analysis of the Progress in Identification and Evaluation of Laboratory Animal Resources in China

DU Xiaoyan¹, LIU Yunbo²

(1. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China, 2. Institute of Laboratory

[基金项目] 国家重点研发计划项目课题“近交系爪沙鼠脑缺血再灌注损伤和两种 2 型糖尿病模型的创建及关键技术研究” (2021YFF0702402); 国家自然科学基金面上项目“自发性糖尿病爪沙鼠肥胖与非肥胖亚系的定向培育及其脂肪组织为靶点的分子机制” (32170540)

[第一作者] 杜小燕 (1971—)，女，博士，教授，研究方向：实验动物资源模型培育及分子遗传机制。E-mail: duduyan@ccmu.edu.cn. ORCID: 0000-0002-4030-7299

[通信作者] 刘云波 (1962—)，男，博士，研究员，主要从事实验动物管理、监测和研究工作。E-mail: yunboliu@126.com. ORCID: 0009-0007-9030-4911

Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Correspondence to: LIU Yunbo (ORCID: 0009-0007-9030-4911), E-mail: yunbolu@126.com

[ABSTRACT] Laboratory animals are not only a national strategic resource but also an important support for development of science and technology. The Committee of Identification and Evaluation for Laboratory Animal Resources, organized by Chinese Association for Laboratory Animal Sciences and established in May 2019, is currently the only specialized academic agency dedicated to the identification and evaluation of laboratory animal resources in China. This paper first discusses the significance of identifying and evaluating laboratory animal resources, summarizes three new approaches to developing these resources, including the domestication and standardization of laboratory animals (economic, ornamental, agricultural, and wild animals, etc.), the acquisition of new strains (species) through natural mutation and induced mutation, and the creation of new laboratory animal resources through gene editing technology. It then introduces the workflow for resource identification and evaluation, including preliminary review (format review), written review (expert review), joint review or on-site inspection, final review (voting and public announcement), and the issuance of certificates. The required materials to be submitted include application, summary report, research or identification reports, appendices and other necessary documents. The paper further discusses related requirements for resource identification and evaluation, including population, genetic classification, biological characteristics, genetic stability, and application value. Finally, the current status of newly identified laboratory animal strains (species) and issues in current work practices are analyzed, as well as solutions to these issues. This paper aims to provide a valuable reference for further research in this field.

[Key words] Laboratory animal; Laboratory animal resources; Identification and evaluation

实验动物是国家或地区科技创新发展的战略性资源之一，是实现科技进步、促进经济社会可持续发展、提高国家科技国际地位的基础性支撑条件。重视实验动物资源建设，推动实验动物资源多样化发展和标准化^[1]，尤其是开发可用于人类疾病动物模型构建的实验动物资源，是生物制品、医药研发、产业发展的必要支撑和有力保障。但长期以来，我国没有进行实验动物资源鉴定与评价的专业机构，导致很多科研机构和企业培育、创制的实验动物资源无法得到科学评价和行业认可。2019年5月，中国实验动物学会组织成立了中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会，其负责起草和制定实验动物资源鉴定与评价的程序、指南等相关文件，并积极开展工作。本文就近5年来中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会所取得的工作进展作简单总结，分析目前存在的问题并提出相应的解决对策。

1 实验动物新资源开发途径

1.1 实验用动物的驯化和标准化

在生产和科研等实践工作中，不仅需要传统意义上的“标准”实验动物，还可能用到野生动物、

经济动物、观赏动物、农用动物等，这些动物统称为实验用动物^[2]。实验用动物由于遗传背景、携带的微生物和寄生虫以及生物学特性不明确或不稳定，需要经过长期驯化、培育，实现标准化，才能成为实验动物资源。例如，野生长爪沙鼠经过驯化能够进行人工饲养繁育，科研人员通过基因组测序、多种遗传标记（包括生化位点^[3]、微卫星^[4]和单核苷酸多态性等）来分析遗传背景，制定并发布了营养、微生物和环境控制^[5-8]等地方标准和团体标准，并且成功培育出高发脑缺血和自发糖尿病的两个近交品系^[9-10]，使长爪沙鼠成为实验动物资源。

1.2 自然突变和人工诱变

实验动物在长期繁育过程中不可避免地发生自然突变。科学家在发现有价值的突变表型后通过定向选育，可获得新的实验动物品种（系）。例如，豫医无毛小鼠是在昆明小鼠群中发现突变个体，后经长期定向近亲培育获得的实验动物新资源^[11]。然而，这种自然突变可遇不可求，因此“诱变”这种经典遗传学研究方法应运而生。科学家们一般采用乙酰基亚硝基脲（N-ethyl-N-nitrosourea, ENU）使动物发生遗传突变，获得新的表型特征，再以表型驱动深入探究其背后隐

藏的遗传密码,从而获得实验动物新资源^[12]。截至2023年底,在PubMed数据库中,有700多篇文献是用ENU进行小鼠诱变研究的,最近的一篇文献是2022年日本科学家利用ENU诱导出小鼠小细胞低色素性贫血模型品系的报告^[13]。用“chemically induced mutation”检索Jackson实验室的小鼠基因组信息学数据库(Mouse Genome Informatics, MGI),共有8499个小鼠突变系^[14]。而在国内,吴宝金等^[15]也曾利用ENU诱变获得了神经行为学、毛发等异常的多种实验动物新资源品系和新模型。

1.3 基因编辑

自转基因、基因敲除等基因修饰技术问世以来,实验动物尤其是小鼠品系的数量已快速增长。2012年出现的成簇规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR相关蛋白核酸酶9(CRISPR-associated nuclease 9, Cas9)基因编辑技术推动生命科学研究进入了新纪元。该技术快速成为创制实验动物新资源的一种新方式,甚至有望成为疾病治疗的一种新手段。截至目前,在使用CRISPR/Cas9技术的2万多篇研究文献中,关于动物基因编辑的约占50%,科学家们通过该技术对多种动物实现了基因编辑^[16-17]。最新的研究报告显示,利用CRISPR/Cas9技术还可以培育出具有特异性器官缺陷的小鼠^[18]。这一技术革命使实验动物新品系激增,成为实验动物新资源开发的重要途径之一。

2 实验动物资源鉴定与评价的工作流程和所需材料

2.1 工作流程

实验动物资源鉴定与评价的工作流程包括初审、函审、会审、审定和证书发放。在初审阶段,申请单位提交材料后,由中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会秘书处进行形式审查,审查内容包括材料完整性以及每部分材料的形式和内容是否符合要求。例如,是否提交了4个部分的必需材料,申请书是否已加盖单位公章(共3处),申请单位、参加单位、培育单位等是否前后一致,主要培育人员名单是否完整,有无法人代表或单位主管领导签字等。对于总结报告、研究报告和附录,主要审查其内容的完整性。

形式审查通过后,发放受理通知书,进入函审阶段。经过20个工作日后,至少由2位函审专家给出审核意见,意见分为3种:合格,同意进行现场或会议评审;基本合格,修改后进行现场或会议评审;不合格,退回重修。对于前2种意见,申请人修改材料后进入现场考察或会议评审阶段。在现场考察或会议评审时,专家们进一步考察,或通过会议评审提出改进建议或修改意见。

现场考察或会议评审通过后,中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会组织全体委员对所有材料进行投票表决,获得超过半数同意票的即可通过鉴定与评价。之后,将全部材料提交给中国实验动物学会秘书处,经审核、公示后,即可发放鉴定证书。通过鉴定的品种(系)均会被收集进入国家动物模型资源共享信息平台(<https://namri.cnilas.org>)。

2.2 所需提交的材料

主要依据2个文件,即《中国实验动物学会实验动物新资源鉴定与评价条件和程序(试行)》和《中国实验动物学会实验动物新资源登记实施指南(试行)》(获取网址:http://www.calas.org.cn/article/view?cid=0_20_5589,末尾的“数据提交流程”-“实验动物资源”地址)。具体提交以下材料:(1)实验动物资源鉴定与评价申请书(单位盖章并附电子版);(2)实验动物资源培育(开发)总结报告;(3)实验动物资源鉴定或研究报告;(4)实验动物资源登记实施指南中的附录A~L;(5)中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会认为有必要提供的其他相关材料。

申请书内容包括动物品种(系)名称及简介(素材来源),育种的技术路线,模型动物的表型特征、性能指标、生理生化指标、应用情况等,模型的突出特点(创新性、先进性)和推广应用前景,主要培育人员名单(按照贡献大小排列,其顺序将在鉴定证书上体现,不可更改),以及单位盖章(大部分实验动物资源的培育为职务工作,必须由单位同意,这是申请书被受理的必要前提)。

总结报告是介绍培育研究工作的摘要,即简述培育背景、培育方法、培育结果和可能的应用前景。

研究(鉴定)报告是申请材料的重点,也是鉴定与评价的重要依据。其中须详述培育的背景、培育方法、培育结果(具体生物学数据)、资源培养或鉴定所涉及的技术方法、比较医学特点、应用证明和其他相

关材料。

附录共要求12项,包括系谱信息、生长性能、繁殖性能、一般生理和生化指标、主要脏器系数及组织学特征、特殊生物学特性指标、实验动物资源的应用、遗传质量控制、营养与饲料、饲养环境、饲养管理和实验操作技术方法。

3 实验动物资源鉴定与评估的相关要求

3.1 实验动物新资源应具有一定规模的种群

遗传质量控制要求是实验动物资源鉴定与评价的核心内容。新资源如果是小动物近交系,要求不少于20对种子动物,封闭群要求不少于50对种子动物;单倍型陆禽类实验动物新资源的种子动物要求不得少于6个家系且系谱清楚;其他新模型资源的种子动物要求不少于30对;大型实验动物则不少于15对种子动物。

3.2 实验动物新资源应符合近交系或封闭群等遗传学分类要求

所申请的实验动物新资源应该符合实验动物遗传质量分类的近交系、封闭群或杂交群(如不同品系的近交系通过杂交培育而成的具有特殊性状的新品系)要求。对于基因修饰动物,需要证明其背景动物品系的特征;对于新培育的动物,要建立适当的遗传检测方法,近交系需用至少2种方法(如基因组测序、微卫星DNA检测、单核苷酸多态性检测或皮肤移植等)证明遗传信息组成的一致性;对于封闭群,则需要通过遗传检测证明其具有多样性和遗传结构稳定性。

3.3 实验动物新资源应有明显或独特的生物学特性,且遗传稳定

作为实验动物新资源,其一定要有独特的生物学特性,并具有遗传稳定性。例如,大多数白色家兔的虹膜为红色,而浙江中医药大学筛选到虹膜为黑色的白色家兔,这种家兔表现出一种独特的生物学特性,并通过多代培育后,证明这种生物学特性能够稳定遗传,形成一个新品种(系)^[19]。

3.4 基因修饰实验动物新资源的表型特征应显著(需经3代证明其遗传稳定)

作为实验动物新资源,具有显著表型特征和遗传稳定是基本要求,尤其对于基因修饰动物资源,须至少繁殖3代以证明其遗传稳定性。现已通过中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会鉴定与评价的多个基因修饰动物品系均经过了多个代次的培

育。例如,中国农业科学院农业基因组研究所培育的中农巴马小型猪基因缺失品系已经繁育了超过6代,重庆市畜牧科学院培育的人抗体转基因小鼠CAMouse^{HC}也已超过9代,充分证明这2种实验动物新资源的特殊表型特征具有遗传稳定性。

3.5 实验动物新资源应具有明显的应用前景和价值

对于实验动物新资源申请,需要通过试用、生产应用、研究应用成果等多种方式来证明其专用或特殊的使用价值,或具有实用价值,并在将来的科学研究中有一定的应用前景。例如,上海实验动物研究中心培育的东方田鼠在血吸虫研究中具有明显的使用价值^[20];百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司培育的B-NDG[®]小鼠在免疫学研究和肿瘤研究中均具有重要价值。

4 目前已经鉴定的实验动物新资源概况

截至2024年7月,已经有12个实验动物新资源完成鉴定,具体见表1。新的实验动物品种(系)包括:由野生动物进行实验动物化培育而来的长爪沙鼠和东方田鼠;由家畜进行实验动物化培育而来的五指山小型猪近交系;由基因修饰技术产生的小型猪和小鼠新资源,如全人抗体转基因小鼠CAMouse^{HC}、ApoE、LDLR单基因或双基因缺失的中农巴马小型猪新品系、无 α Gal抗原基因编辑的巴马小型猪品系、I12rg基因敲除的B-NDG[®]免疫缺陷小鼠、人源化ACE2基因敲入(human ACE2 knock-in, hACE2-KI)的BALB/c小鼠等;也有由传统实验动物自发突变获得的新品系如白毛黑眼兔。

5 实验动物资源鉴定与评价存在的问题与对策

中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会开展工作已近5年,一直秉承以下的鉴定和评价标准:(1)新资源是采用合理的科学方法创建;(2)新资源表现出明显的可识别和(或)有用的表型和基因型,并与原有资源有所不同;(3)申请单位是否可提供应用证明,并对新资源有一定的保存和控制能力。基于这些标准,实验动物资源鉴定与评价工作取得了一定进展,但在实践过程中仍然存在一些问题,例如:(1)宣传力度不够。虽然每年由中国实验动物

表1 2019—2024年已通过实验动物新资源鉴定与评价工作委员会鉴定与评价的实验动物新品种(系)信息

Table 1 Information for new stocks or strains of laboratory animals approved by Committee of Laboratory Animal Resources Identification and Evaluation from 2019 to 2024

开发途径 Development method	实验动物新资源的品种(系)名称 Strain name of new laboratory animal resource	申请单位 Applying institution	获批时间 Approval time
野生动物实验动物化 Laboratory animal from wild animal	长爪沙鼠脑缺血近交系	首都医科大学	2021年5月
	长爪沙鼠糖尿病近交系	首都医科大学	2021年5月
	洞庭湖东方田鼠	上海实验动物研究中心	2021年5月
家畜实验动物化 Laboratory animal from domestic animal	中畜五指山小型猪近交系	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所	2022年9月
基因编辑或基因修饰 Gene editing or modification	人抗体转基因小鼠CAMouse ^{HG}	重庆市畜牧科学院	2021年5月
	中农巴马小型猪 <i>ApoE</i> 基因缺失品系	中国农业科学院农业基因组研究所	2022年11月
	中农巴马小型猪 <i>LDLR</i> 基因缺失品系	中国农业科学院农业基因组研究所	2022年11月
	中农巴马小型猪 <i>ApoE</i> 和 <i>LDLR</i> 双基因缺失品系	中国农业科学院农业基因组研究所	2022年11月
	无 α Gal 抗原基因编辑巴马小型猪 (BGMP) 品系	成都中科奥格生物科技有限公司	2023年9月
	B-NDG [®] 免疫缺陷小鼠	百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司	2024年2月
	人源化 <i>ACE2</i> 基因敲入 (hACE2-KI) 的 BALB/c 小鼠	中国人民解放军陆军军医大学	2024年7月
传统实验动物突变 Traditional laboratory animal mutation	白毛黑眼兔 (WHBE) 封闭群	浙江中医药大学	2023年9月

学会通过公众号或网站等进行宣传,但很多有实验动物资源鉴定与评价需求的科研院所和企事业单位仍然不了解这个机构及其作用,今后需加强这方面工作。(2) 评审专家人数不足。截至2024年5月,鉴定及评价工作主要是依靠中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会的23位委员完成的,随着申请鉴定与评价的实验动物品种(系)增多,秘书处可选择的函审和现场评审专家数量明显不足。因此,中国实验动物学会于2023年底启动了实验动物资源鉴定与评价评审专家库建设工作,得到了全国各地专家的积极响应,已于2024年6月召开了实验动物资源鉴定与评价评审专家库成立大会,完成了第一批评审专家的培训并发放证书。这一举措既解决了评审专家人数不足的问题,也提高了资源鉴定和评价的科学性、权威性和影响力。(3) 工作流程和细节需要进一步优化。包括函审专家是否可以兼做现场评审专家;审核专家如果意见不一致时如何处理;如何设立评审专家避嫌制度;是否将鉴定与评价工作视为服务性质工作而签署服务协议等。这些方面的流程还存在争议,需要进一步优化工作机制。

总之,实验动物资源鉴定和评价是一项具有探索性与前瞻性的工作,目前国内外可借鉴的经验较为缺乏,中国实验动物资源鉴定与评价工作将继续在探索中前进,希望能找到更多创新性的工作思路,有效推

动中国实验动物资源高质量发展。

[作者贡献 Author Contribution]

杜小燕起草论文、回复审稿意见;
刘云波对论文内容整体把握和修改。

[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]

- 贺争鸣. 基于能力提升的我国实验动物资源发展愿景[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(2): 85-90. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.042.
HE Z M. Development vision of laboratory animal resources in China based on ability improvement[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(2): 85-90. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.042.
- 孙德明,李根平,陈振文,等. 实验动物从业人员上岗培训教材[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011.
SUN D M, LI G P, CHEN Z W, et al. Induction training materials for laboratory animal practitioners[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011.
- 李迎,陈振文,马兰芝,等. 近交系长爪沙鼠生化标记遗传监测方法的建立及其应用[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(6):442-447. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2017.06.004.
LI Y, CHEN Z W, MA L Z, et al. Establishment and application of genetic monitoring methods for inbred gerbil by biochemical markers[J]. Lab Anim Comp Med, 2017, 37(6):442-447. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2017.06.004.
- DU X Y, CHEN Z W, LI W, et al. Development of novel microsatellite DNA markers by cross-amplification and

- analysis of genetic variation in gerbils[J]. *J Hered*, 2010, 101(6): 710-716. DOI: 10.1093/jhered/esq066.
- [5] 中国实验动物学会. 实验动物长爪沙鼠环境设施: T/CALAS 58—2018[S]. 北京: 科学出版社, 2018.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal-Mongolian gerbil requirements of environment and housing facilities: T/CALAS 58-2018[S]. Beijing: Science Press, 2018.
- [6] 中国实验动物学会. 实验动物长爪沙鼠遗传质量控制: T/CALAS 59—2018[S]. 北京: 科学出版社, 2018.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal-Mongolian gerbil genetic quality control: T/CALAS 59-2018[S]. Beijing: Science Press, 2018.
- [7] 中国实验动物学会. 实验动物长爪沙鼠微生物学等级及监测: T/CALAS 55—2018[S]. 北京: 科学出版社, 2018.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal-Mongolian gerbil microbiological standards and monitoring: T/CALAS 55-2018[S]. Beijing: Science Press, 2018.
- [8] 中国实验动物学会. 实验动物长爪沙鼠寄生虫学等级及监测: T/CALAS 56—2018[S]. 北京: 科学出版社, 2018.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal-Mongolian gerbil standards and monitoring for parasitology: T/CALAS 56-2018[S]. Beijing: Science Press, 2018.
- [9] WU Y, HU C J, LI Z H, et al. Development of a new cerebral ischemia reperfusion model of Mongolian gerbils and standardized evaluation system[J]. *Anim Mod Exp Med*, 2024, 7(1):48-55. DOI: 10.1002/ame2.12378.
- [10] LI X H, LU J, WANG Y, et al. Establishment and characterization of a newly established diabetic gerbil line[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159420. DOI: 10.1371/journal.pone.0159420.
- [11] 王纯耀, 章金涛, 祝庆蕃, 等. 豫医无毛小鼠近交系建立及其生物学特性[J]. *上海实验动物科学*, 1999, 19(1): 64-65.
WANG C Y, ZHANG J T, ZHU Q F, et al. Establishment of inbred lines of Yuyi hairless mice and their biological characteristics[J]. *Shanghai Lab Anim Sci*, 1999, 19(1): 64-65.
- [12] 吴宝金, 茅慧华, 李厚达. ENU诱变在功能基因组研究中的应用[J]. *癌变·畸变·突变*, 2004, 16(1):57-60. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616X.2004.01.018.
WU B J, MAO H H, LI H D. Application of ENU mutation in functional genome research[J]. *Carcinog Teratog Mutagen*, 2004, 16(1):57-60. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616X.2004.01.018.
- [13] MIYASAKA Y, OKUDA K, MIURA I, et al. A novel ENU-induced *Cpox* mutation causes microcytic hypochromic anemia in mice[J]. *Exp Anim*, 2022, 71(4):433-441. DOI: 10.1538/expanim.22-0032.
- [14] MGI. Mouse genome informatics[DB/OL]. [2024-04-07]. <https://www.informatics.jax.org>.
- [15] 吴宝金, 茅慧华, 邵义祥, 等. ENU诱变获得4种白斑小鼠及对突变基因的染色体定位[J]. *科学通报*, 2003, 48(22):2301-2307. DOI: 10.3321/j.issn:0023-074X.2003.22.002.
WU B J, MAO H H, SHAO Y X, et al. Four kinds of white spot mice obtained by ENU mutation and chromosome location of mutant genes[J]. *Chin Sci Bull*, 2003, 48(22):2301-2307. DOI: 10.3321/j.issn:0023-074X.2003.22.002.
- [16] YUAN Y G, LIU S Z, FARHAB M, et al. Genome editing: an insight into disease resistance, production efficiency, and biomedical applications in livestock[J]. *Funct Integr Genomics*, 2024, 24(3):81. DOI: 10.1007/s10142-024-01364-5.
- [17] MARIANO C G, DE OLIVEIRA V C, AMBRÓSIO C E. Gene editing in small and large animals for translational medicine: a review[J]. *Anim Reprod*, 2024, 21(1): e20230089. DOI: 10.1590/1984-3143-AR2023-0089.
- [18] LIM J J Y, MURATA Y, YURI S, et al. Generating an organ-deficient animal model using a multi-targeted CRISPR-Cas9 system[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):10636. DOI: 10.1038/s41598-024-61167-3.
- [19] 周卫民, 潘永明, 陈民利, 等. WHBE兔网织红细胞计数与分群测定[J]. *实验动物与比较医学*, 2009, 29(6):411-414. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2009.06.015.
ZHOU W M, PAN Y M, CHEN M L, et al. Measurement of reticulocytes and its subpopulation in WHBE rabbits[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2009, 29(6):411-414. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2009.06.015.
- [20] 谢建芸. 东方田鼠作为一种实验动物新资源的研究进展报告[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(5): 482-491. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.114.
XIE J Y. Research progress report on *Microtus fortis* as a new resource of laboratory animal[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(5): 482-491. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.114.

(收稿日期:2024-04-07 修回日期:2024-07-01)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,干明红)

[引用本文]

杜小燕, 刘云波. 中国实验动物资源鉴定与评价工作进展分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 469-474. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.050.

DU X Y, LIU Y B. Analysis of the progress in identification and evaluation of laboratory animal resources in China[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 469-474. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.050.



杨利峰, 博士, 中国农业大学动物医学院教授, 博士生导师。主要从事兽医病理学的教学与研究工作, 研究方向为传染性海绵状脑病的致病机制及诊断新技术研究。现任中国畜牧兽医学会兽医病理学分会第十届理事会秘书长、中国兽医协会兽医病理师分会第一届理事会副会长兼秘书长、中国药学会毒性病理学专业委员会委员、中国兽医协会标准化技术委员会委员、中国兽医协会实验动物兽医分会委员、中国兽医病理师、国家科技专家库专家、北京市科委专家等。担任《实验动物科学》《中国比较医学杂志》编委,《实验动物与比较医学》青年编委, *Aging Cell*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, *Neurobiology of Diseases* 和 *Journal of Alzheimer Diseases* 等期刊审稿人。作为项目主持人, 承担国家及省部级科研课题 30 余项; 获批国家发明专利 6 项 (均为第一完成人); 获得教育部成果鉴定 2 项 (第三完成人); 在国内外期刊上发表学术论文 150 余篇, 其中包含国际会议论文 5 篇, 以第一作者或通信作者在 SCI 国际期刊发表论文 50 篇; 主编及参编教材、著 (译) 作 17 部。

小型猪后肢去负荷模拟失重模型的建立与组织损伤研究

涂颖欣¹, 纪依澜¹, 王菲², 杨东明¹, 王冬冬¹, 孙芷馨¹, 戴悦欣¹, 王言吉², 阚广捍², 吴斌², 赵德明¹, 杨利峰¹

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 2. 中国航天员科研训练中心, 北京 100094)

[摘要] **目的** 利用小型猪多个系统组织结构和功能接近于人类的特性, 建立模拟失重动物模型, 观察其病理生理学变化, 为航空航天失重环境研究提供新方法。**方法** 选取 9 头普通级小型猪, 随机分为实验组 ($n=7$) 和对照组 ($n=2$)。实验组小型猪使用定制金属笼固定, 帆布吊带悬挂使其后肢离地去负荷, 身体与地面呈 -20° 角, 模拟失重 30 d (每天 24 h)。通过采集不同时间点各组小型猪的体重、血容量、血生化指标等数据, 对其基础体征的变化进行统计分析。实验结束后, 对小型猪实施安乐死并解剖取材, 对心血管、骨骼、骨骼肌等各系统组织脏器进行 HE、Masson 染色后的组织病理学观察, 并对各动脉血管厚度、骨骼肌肌纤维直径进行统计分析。同时, 采用蛋白质免疫印迹法检测骨骼肌肌肉萎缩蛋白包括肌环指蛋白 1 (muscle-specific RING finger protein 1, MuRf-1) 和肌萎缩素 1 (muscle atrophy F-box, MAFbx, 又称 Atrogin-1) 的表达量, 并采用免疫组织化学染色法检测脑内星形胶质细胞激活相关蛋白即胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的表达量, 以反映各系统的病理生理学功能变化。**结果** 后肢去负荷造模后, 实验组小型猪体重显著下降 ($P<0.001$), 血容量也显著下降 ($P<0.01$)。实验期间, 实验组小型猪的血红蛋白、红细胞比容和红细胞计数水平显著降低 ($P<0.05$), 随后逐渐恢复; 丙氨酸氨基转移酶和 γ -谷氨酰转移酶表达水平呈现先下降 ($P<0.05$) 后回升的趋势, 白蛋白水平显著下降 ($P<0.001$), 球蛋白水平显著上升 ($P<0.01$), 肌酐水平显著下降 ($P<0.05$)。实验组小型猪腓肠肌的平均肌纤维直径显著缩短 ($P<0.05$), 肌纤维直径分布左移, 小直径肌纤维增多; 同时腓肠肌、椎旁肌肉 Atrogin-1 的表达水平显著增加 ($P<0.05$)。这些变化与航天失重对人和动物的影响基本一致。此外, 实验组小型猪的脑皮质顶叶、额叶和海马区域部分神经元变性, 小脑区域浦肯野细胞数量轻度减少, 而海马区的 GFAP 阳性信号显著增强 ($P<0.05$)。**结论** -20° 角后肢去负荷 30 d 的小型猪可作为一种新的模拟失重动物模型, 用于航空航天领域相关研究。

[关键词] 模拟失重; 小型猪; 动物模型; 后肢去负荷

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0475-12



[基金项目] 国家重点研发计划“实验动物新品种、新品系开发与评价”(2022YFF0710501); 航天医学基础与应用国家重点实验室研究基金资助自主研究项目“模拟失重和压力变化复合因素对小型巴马猪咽鼓管功能变化规律研究”(SMFA22B05)

[第一作者] 涂颖欣(1999—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 兽医病理学。E-mail: novatu@163.com;

纪依澜(1997—), 女, 硕士, 研究方向: 兽医病理学。E-mail: jy1599@sina.com;

王菲(1988—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 航空航天实施医学。E-mail: 182211493@qq.com

[通信作者] 杨利峰(1980—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事基础兽医学研究。E-mail: yanglf@cau.edu.cn. ORCID: 0000-0001-5175-7589

Evaluation of Simulated Weightlessness Model of Hindlimb Unloading Miniature Pigs and Their Tissue Damage

TU Yingxin¹, JI Yilan¹, WANG Fei², YANG Dongming¹, WANG Dongdong¹, SUN Zhixin¹, DAI Yuexin¹, WANG Yanji², KAN Guanghan², WU Bin², ZHAO Deming¹, YANG Lifeng¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China)

Correspondence to: YANG Lifeng (ORCID: 0000-0001-5175-7589), E-mail: yanglf@cau.edu.cn

[ABSTRACT] Objective To establish a weightlessness simulation animal model using miniature pigs, leveraging the characteristic of multiple systems' tissue structures and functions similar to those of humans, and to observe pathophysiological changes, providing a new method for aerospace research. **Methods** Nine standard-grade miniature pigs were selected and randomly divided into an experimental group ($n=7$) and a control group ($n=2$). The experimental group was fixed using customized metal cages, with canvas slings suspending their hind limbs off the ground, and the body positioned at a -20° angle relative to the ground to simulate unloading for 30 days (24 hours a day). Data on body weight, blood volume, and blood biochemistry indicators were collected at different time points for statistical analysis of basic physiological changes. After the experiment, the miniature pigs were euthanized and tissue samples were collected for histopathological observation of the cardiovascular, skeletal and muscle systems HE and Masson staining. Statistical analysis was also conducted on the thickness of arterial vessels and the diameter of skeletal muscle fibers. Additionally, western blotting was employed to detect the expression levels of skeletal muscle atrophy-related proteins, including muscle-specific RING finger protein 1 (MuRf-1) and muscle atrophy F-box (MAFbx, as known as Atrogin-1), while immunohistochemistry was used to detect the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), an indicator of astrocyte activation in the brain, reflecting the pathophysiological functional changes across systems. **Results** After hindlimb unloading, the experimental group showed significant decreases in body weight ($P<0.001$) and blood volume ($P<0.01$). During the experiment, hemoglobin, hematocrit, and red blood cell count levels significantly decreased ($P<0.05$) but gradually recovered. The expression levels of alanine aminotransferase and γ -glutamyltransferase initially decreased ($P<0.05$) before rebounding, while albumin significantly decreased ($P<0.001$) and globulin significantly increased ($P<0.01$). Creatinine significantly decreased ($P<0.05$). The average diameter of gastrocnemius muscle fibers in the experimental group significantly shortened ($P<0.05$), with a leftward shift in the distribution of muscle fiber diameters and an increase in small-diameter muscle fibers. Simultaneously, Atrogin-1 expression in the gastrocnemius and paravertebral muscles significantly increased ($P<0.05$). These changes are generally consistent with the effects of weightlessness on humans and animals in space. Furthermore, degenerative changes were observed in some neurons of the cortical parietal lobe, frontal lobe, and hippocampal regions of the experimental group, with a slight reduction in the number of Purkinje cells in the cerebellar region, and a significant enhancement of GFAP-positive signals in the hippocampal area ($P<0.05$). **Conclusion** Miniature pigs subjected to a -20° angle hind limb unloading for 30 days maybe serve as a new animal model for simulating weightlessness, applicable to related aerospace research.

[Key words] Simulated weightlessness; Miniature pig; Animal model; Hindlimb unloading

随着航天技术的不断发展，宇航员的航天飞行任务时长逐渐增加。现有研究表明，航天失重条件下，人或动物的多个器官、系统会发生一系列适应性变化，这些变化主要发生于心血管、骨骼肌和骨骼中^[1-5]。

通过地面模拟失重动物实验，能够更详细地阐述其适应性变化：首先，在模拟失重条件下，机体血液头向转移并重新分布，从而导致机体心脏、血管的功能和结构发生一系列变化，例如心脏泵血功能、心脏节律、

心肌以及血管组织结构的变化^[6-9]；其次，模拟失重环境可导致机体承重骨及非承重骨的骨密度降低，破骨细胞的数量增加，这种改变程度与模型动物性别和模拟失重处理时长等因素相关^[10-13]；再者，经过模拟失重处理后的机体骨骼肌会发生失用性萎缩等变化，具体表现为抗重力肌萎缩、肌纤维横截面积减小等^[14-16]。此外，神经系统、免疫系统和消化系统等也会受到一定影响^[17-19]。

为了降低航天工作给宇航员机体带来的不良影响，有必要进一步研究这些不良影响及其作用机制。目前，在航空航天研究中，常用的模拟失重模型动物有大鼠、小鼠和豚鼠等啮齿类动物，以及兔、犬、猕猴和恒河猴等中型动物，常用的造模方式有尾部悬吊、后肢去负荷和头低位卧床等^[20]。而小型猪由于多个系统结构和功能接近于人类，是理想的医学研究实验动物，近年来被应用于心血管和神经退行性疾病等多个研究领域并受到广泛关注^[21]。前期研究表明， -6° 角四肢悬吊的头低位处理未能引起小型猪骨骼明显损伤或骨密度的显著降低，但骨骼抗动态载荷指标较对照组显著下降^[22]。已知使用小型猪建立模拟失重模型的悬吊角度和方式尚不明确，仍需进一步探索。

在前期研究的基础上，本研究拟加大悬吊角度，使用 -20° 角后肢去负荷的方法模拟失重环境，观察小型猪骨骼肌、骨骼和心血管系统等组织脏器的变化，通过检测小型猪是否出现骨质疏松和抗重力肌萎缩等病症，以评价造模是否成功；同时，对小型猪的神经系统、消化系统和泌尿系统等进行组织病理学观察，了解这种方法模拟失重对小型猪其他系统的影响，以期拓宽现有的实验动物地面模拟失重方法，为后续相应研究提供模型基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级8月龄左右的雄性巴马小型猪9头，体重 (19 ± 2.5) kg，购自北京实创世纪小型猪养殖基地[SCXK(京)2023-0015]。实验动物饲养及实验操作在中国人民解放军战略支援部队航天员科研训练中心的屏障动物实验设施[SYXK(军)2021-0003]中进行，动物实验方案通过中国航天员科研训练中心实验动物管理与使用委员会批准(批号ACC-IACUC-2022-027)，严格按照中国航天员科研训练中心实验动物中心的标准操作规程进行实验操作。

1.2 主要试剂和仪器

RIPA组织裂解液(R0020)、苯甲基磺酰氟

(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)(P0100)和油红O染色试剂盒(G1262)均购自北京索莱宝科技有限公司；IgG免疫组织化学试剂盒(GK800511)购自基因科技上海股份有限公司；胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(ab7260)购自英国Abcam公司；肌环指蛋白1(muscle-specific RING finger protein 1, MuRf-1)兔多克隆抗体(55456-1-AP)、肌萎缩素1(muscle atrophy F-box, MAFbx, 又称Atrogin-1)鼠单克隆抗体(KHC0329)、油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)兔多克隆抗体(10494-1-AP)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠多克隆抗体(SA00001-2)和HRP标记山羊抗兔多克隆抗体(SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司；阳离子防脱玻片(ZLI-9506)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

高速低温离心机(Micro21R)购自美国Thermo Fisher Scientific公司；高速台式离心机(5804)和掌上离心机(MiniSpi[®])购自德国Eppendorf公司；电泳仪(1645052)购自美国Bio-Rad公司；全自动染色机(ST5010)、切片机(RM2235)和全自动组织脱水机(TP1020)均购自德国Leica公司；生物组织自动包埋机(HD-310)和包埋机专用冷冻台(HD-310)均购自湖北慧达仪器有限公司。

1.3 实验分组及处理方式

9头体型和生理指标数据相近的8月龄左右的巴马小型猪被随机分为实验组($n=7$)和对照组($n=2$)。对参考以往文献中的造模方法^[14, 22-23]进行改进，实验组小型猪用定制金属笼固定，并用帆布吊带悬挂，使其后肢离地去负荷，身体与地面呈 -20° 角，如图1所示。对照组小型猪只使用金属笼饲养而不悬挂固定。后肢去负荷模拟失重实验持续进行30 d，每天24 h。分别于实验前(-3 d)、实验中的不同时间点(1、4、8、12、20、30 d)测量小型猪体重。此外，分别于实验中不同时间点(-1、8、15、23、30 d)采集小型猪颈静脉处静脉血，保存全血及血清，对血常规和血生化指标进行检测并记录。依据所测的血常规指标如血红蛋白(hemoglobin, HGB)和红细胞比容(hematocrit, HCT)相关数据，参考文献[24]中的公式计算小型猪的血浆容量变化量(change of plasma volume, ΔPV)。
$$\Delta PV = \frac{HGB_{Pre} \times (1 - HCT_{post})}{HGB_{post} \times (1 - HCT_{Pre})} - 1$$

1.4 组织病理学观察

实验结束后(第31天)，通过肌内注射舒泰50和速眠新各1 mL将小型猪麻醉，然后行颈静脉放血安乐



图1 后肢去负荷模拟失重实验中用定制金属笼固定实验组小型猪

Figure 1 Experimental group miniature pigs fixed in a customized metal cage for hindlimb unloading simulated weightlessness experiment

死，剖检取小型猪肌肉（包括腓肠肌、比目鱼肌、椎旁肌肉和前肢肌肉）、心脏和动脉血管（包括颈动脉、股动脉、主动脉和肺动脉）和脑（皮质顶叶、皮质额叶、海马和小脑区域）等主要脏器组织块各两份，一份置于质量分数为4%的甲醛溶液中固定，另一份冻存于 -80°C 。取固定1周后的各动物组织脏器，在相同部位取样，经常规修块、脱水、石蜡包埋和切片，然后进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色，并在光学显微镜下观察组织病理学变化。同时，对动脉血管组织石蜡切片进行Masson染色，观察其纤维分布情况。

1.5 免疫组织化学染色

使用阳离子防脱载玻片制作厚度为 $4\sim 5\ \mu\text{m}$ 的脑组织石蜡切片，经抗原修复、封闭后滴加稀释GFAP抗体，在 4°C 条件下孵育过夜；次日，用PBS溶液冲洗3次，滴加HRP标记的二抗，并在室温孵育30 min；用PBS溶液冲洗切片，滴加DAB显色液，用显微镜观察并控制显色时间，使用蒸馏水终止显色；苏木精染色，盐酸乙醇分化，自来水冲洗，常规脱水封固，在显微镜下观察GFAP免疫组化染色情况，以累积光密度(integrated optical density, IOD)表示星形胶质细胞的激活情况。

1.6 蛋白质免疫印迹分析

分别取冻存的对照组和实验组小型猪的前肢肌肉、椎旁肌肉、比目鱼肌和腓肠肌部分组织，放入匀浆器，滴加RIPA组织裂解液($200\ \mu\text{L}/20\ \text{mg}$)，于冰上匀浆后裂解30 min。将匀浆液倒入1.5 mL离心管内， $12\ 500\ \text{r}/$

min ， 4°C 离心5 min，离心后吸取上清液至新的1.5 mL离心管内分装。取一定量的上清液和loading buffer以4:1的比例混匀， 100°C 加热10 min将蛋白煮沸变性，通过常规SDS-PAGE和蛋白质印迹方法检测肌肉组织中MuRf-1和Atrogin-1的表达量。目的蛋白的相对表达量以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白GAPDH条带灰度值的比值表示。

1.7 统计学分析

实验数据使用Image J和GraphPad Prism 8.0软件进行分析，结果以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。重复测量数据使用重复测量方差分析，其他数据使用双侧非配对 t 检验分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模拟失重小型猪的基础体征变化

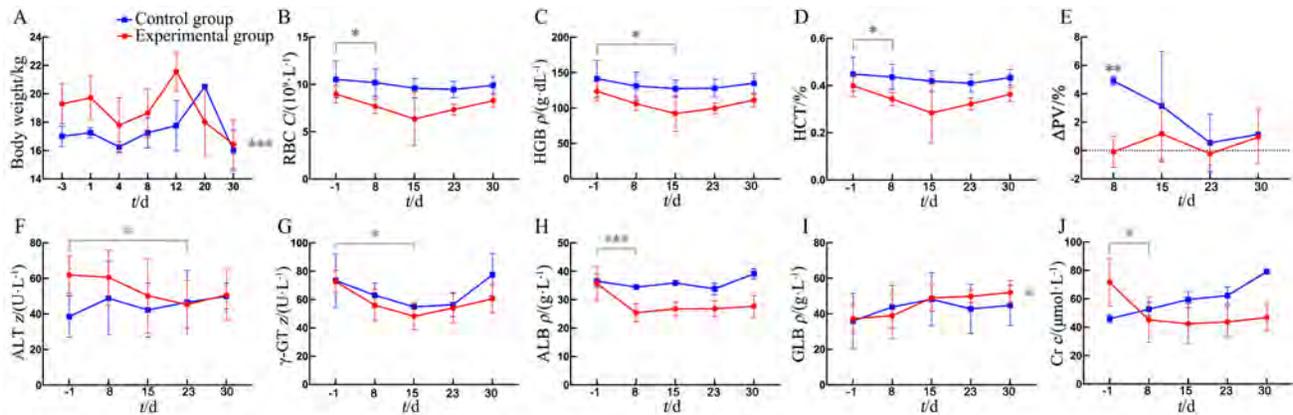
分别于后肢去负荷模拟失重实验前和实验中的不同时间点称量小型猪体重，结果如图2A所示。实验最后一天(第30天)，实验组和对照组小型猪体重与各自组内第1天的小型猪体重相比均有降低，其中实验组小型猪体重降低明显($P<0.001$)。

分别于实验中不同时间点对小型猪进行颈静脉采血，以检测血常规指标，部分结果如图2B~D所示。对照组和实验组小型猪在实验期间的红细胞计数(red blood cell, RBC)、HGB和HCT呈现不同的变化趋势：实验组的RBC、HGB和HCT水平在实验期间均呈先下降后上升的趋势，其中RBC水平在第8天显著下降($P<0.01$)，HGB水平在第8天和第15天显著下降($P<0.05$)，而第8天和第15天的HCT水平较实验前相比差异显著($P<0.05$)；对照组内各时间点的RBC、HGB和HCT水平无显著差异($P>0.05$)。根据 ΔPV 计算公式计算小型猪实验期间血容量的变化，结果显示在第8天时，与对照组相比，实验组小型猪的 ΔPV 显著下降($P<0.01$) (图2E)。

收集血清进行血生化分析，部分结果如图2F~J所示。实验组小型猪的丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平在第8~23天逐渐下降，第30天相较于第23天有部分回升，第23天的ALT水平显著低于实验前($P<0.05$)； γ -谷氨酰转移酶(γ -glutamyl transferase, γ -GT)水平先下降后上升，第23天的 γ -GT水平显著低于实验前($P<0.05$)；第8天的白蛋白(albumin, ALB)水平较实验前下降显著($P<0.001$)，随后呈微弱的上升趋势；血清球蛋白

(globulin, GLB) 水平呈逐渐上升趋势, 第15~30天的GLB水平显著高于实验前 ($P<0.01$); 实验第8天的

肌酐 (creatinine, Cr) 水平与实验前相比显著下降 ($P<0.05$), 后趋于平稳。



注: 实验组小型猪 ($n=7$) 使用定制金属笼固定, 并用帆布吊带悬挂, 使其后肢离地去负荷, 身体与地面呈 -20° 角。对照组小型猪 ($n=2$) 使用金属笼中饲养而不悬挂固定。A, 体重变化 (***) 实验期间实验组体重变化与对照组相比具有显著差异); B, 血液红细胞 (RBC) 计数变化; C, 血液血红蛋白 (HGB) 变化; D, 血液红细胞比容 (HCT) 变化; E, 血浆容量的变化 (ΔPV 为血浆容量变化量, ** 实验第8天的实验组 ΔPV 与对照组相比具有显著差异); F, 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 变化; G, 血清 γ -谷氨酰转氨酶 (γ -GT) 变化; H, 血清白蛋白 (ALB) 变化; I, 血清球蛋白 (GLB) 变化; J, 肌酐 (Cr) 变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

Note: Miniature pigs in the experimental group ($n=7$) were immobilized using customized metal cages and suspended from canvas slings so that their hind limbs were off the ground to unload and their bodies were at a -20° angle to the ground. Control group miniature pigs ($n=2$) were housed in metal cages without suspension immobilization. A, Changes in body weight during the experiment (***) the body weight change of the experimental group is significantly different from the control group); B, Changes in red blood cell count (RBC) during the experiment; C, Changes in hemoglobin (HGB) during the experiment; D, Changes in hematocrit (HCT) during the experiment; E, Changes in plasma volume change (ΔPV) during the experiment (** the ΔPV of experimental group is significantly higher than the control group at the 8th day); F, Changes in serum alanine aminotransferase (ALT) during the experiment; G, Changes in serum γ -glutamyl transferase (γ -GT) during the experiment; H, Changes in serum albumin (ALB) during the experiment; I, Changes in serum globulin (GLB) during the experiment; J, Changes in creatinine (Cr) during the experiment. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图2 后肢去负荷模拟失重实验期间实验组和对照组小型猪的部分基础体征指标变化

Figure 2 Changes in selected basic physical indicators of miniature pigs in the experimental and control groups during hindlimb unloading simulated weightlessness experiment

2.2 模拟失重小型猪的动脉血管组织病理学及厚度变化

后肢去负荷模拟失重实验结束后, HE 染色观察小型猪的颈动脉、股动脉、主动脉和肺动脉组织结构, 结果如图3A所示, 实验组和对照组的股动脉、主动脉和肺动脉均未见明显病变。Masson 染色结果如图3B所示, 与对照组相比, 实验组小型猪可见部分股动脉血管壁轻度增厚, 蓝染的纤维成分增多, 内膜增厚。使用图像分析软件对上述各血管内膜-中膜厚度进行统计分析, 结果如图3C所示, 上述各组血管内膜-中膜厚度未见明显差异 ($P>0.05$)。

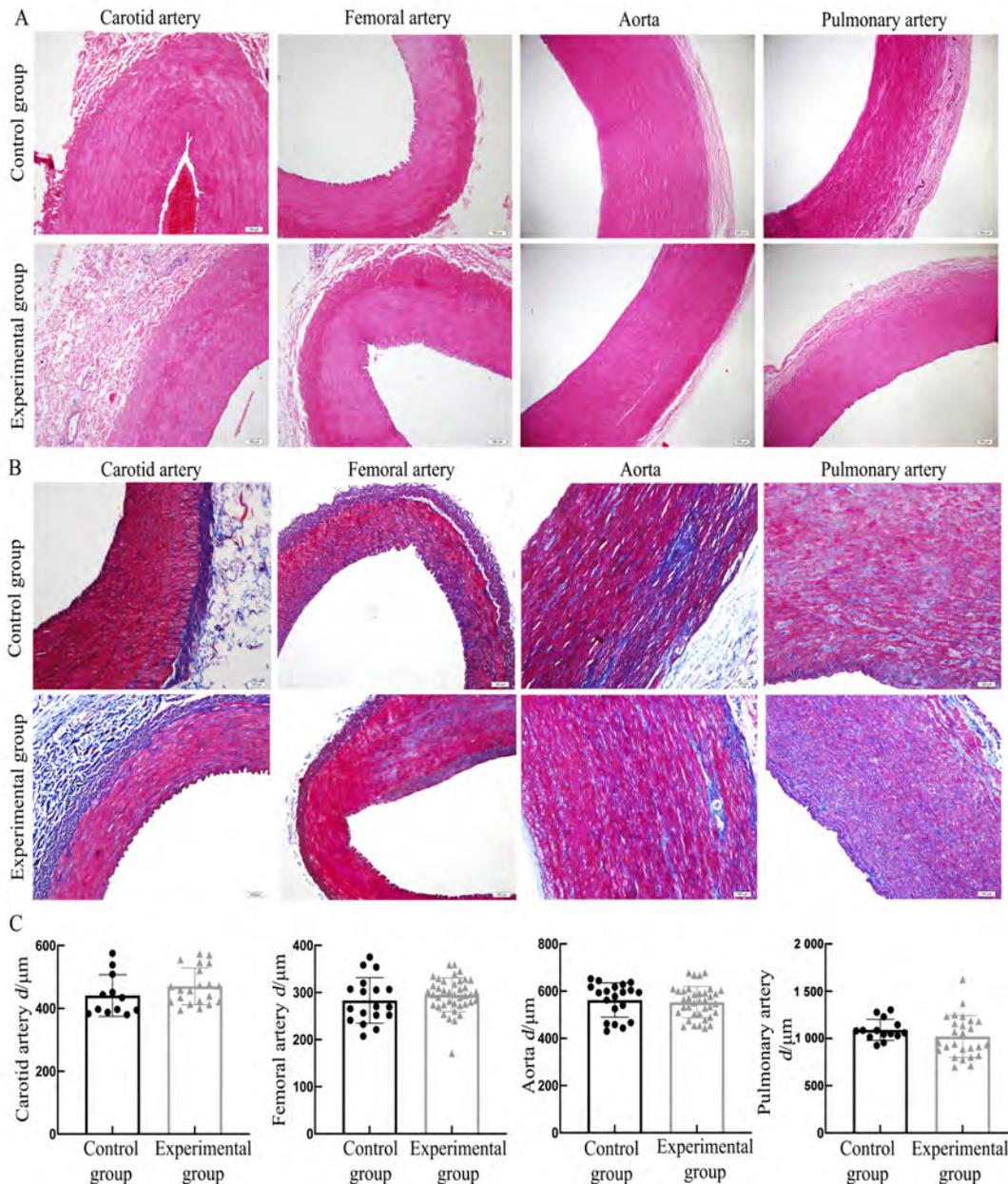
2.3 模拟失重小型猪的肌肉组织变化

2.3.1 小型猪骨骼肌肌纤维直径变化

后肢去负荷模拟失重实验结束后, HE 染色观察各

组小型猪的腓肠肌、比目鱼肌、椎旁肌肉和前肢肌肉的结构变化, 结果如图4A所示: 骨骼肌肌纤维呈长柱状, 肌内膜包裹单个肌纤维, 横纹明显, 实验组腓肠肌与对照组相比出现轻度萎缩。

使用 Image J 软件对各组小型猪骨骼肌肌纤维直径进行统计分析, 结果如图4B所示。与对照组相比, 实验组腓肠肌的平均肌纤维直径显著下降 ($P<0.05$); 比目鱼肌的平均肌纤维直径有所下降, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 前肢肌肉和椎旁肌肉的肌纤维直径与对照组相比未见明显差异 ($P>0.05$)。对各组骨骼肌肌纤维直径分布情况进行统计, 结果显示: 实验组腓肠肌肌纤维直径分布左移, 且组内直径较小的肌纤维增多; 与实验组相比, 对照组中目鱼肌、椎旁肌肉和前肢肌肉的不同直径肌纤维分布未见明显变化 (图4C)。



注：实验组小型猪($n=7$)使用定制金属笼固定，并用帆布吊带悬挂，使其后肢离地去负荷，身体与地面呈 -20° 角。对照组小型猪($n=2$)使用金属笼中饲养而不悬挂固定。A，各动脉血管的HE染色图（比例尺大小为 $100\ \mu\text{m}$ ）；B，各动脉血管的Masson染色图（比例尺大小为 $100\ \mu\text{m}$ ）；C，各动脉血管内-中膜厚度的统计分析结果。

Note: Miniature pigs in the experimental group ($n=7$) were immobilized using customized metal cages and suspended from canvas slings so that their hind limbs were off the ground to unload and their bodies were at a -20° angle to the ground. Control group miniature pigs ($n=2$) were housed in metal cages without suspension immobilization. A, HE staining of each artery (the scale size is $100\ \mu\text{m}$); B, Masson staining of each artery (the scale size is $100\ \mu\text{m}$); C, Statistical analysis of intima-media thickness in each artery.

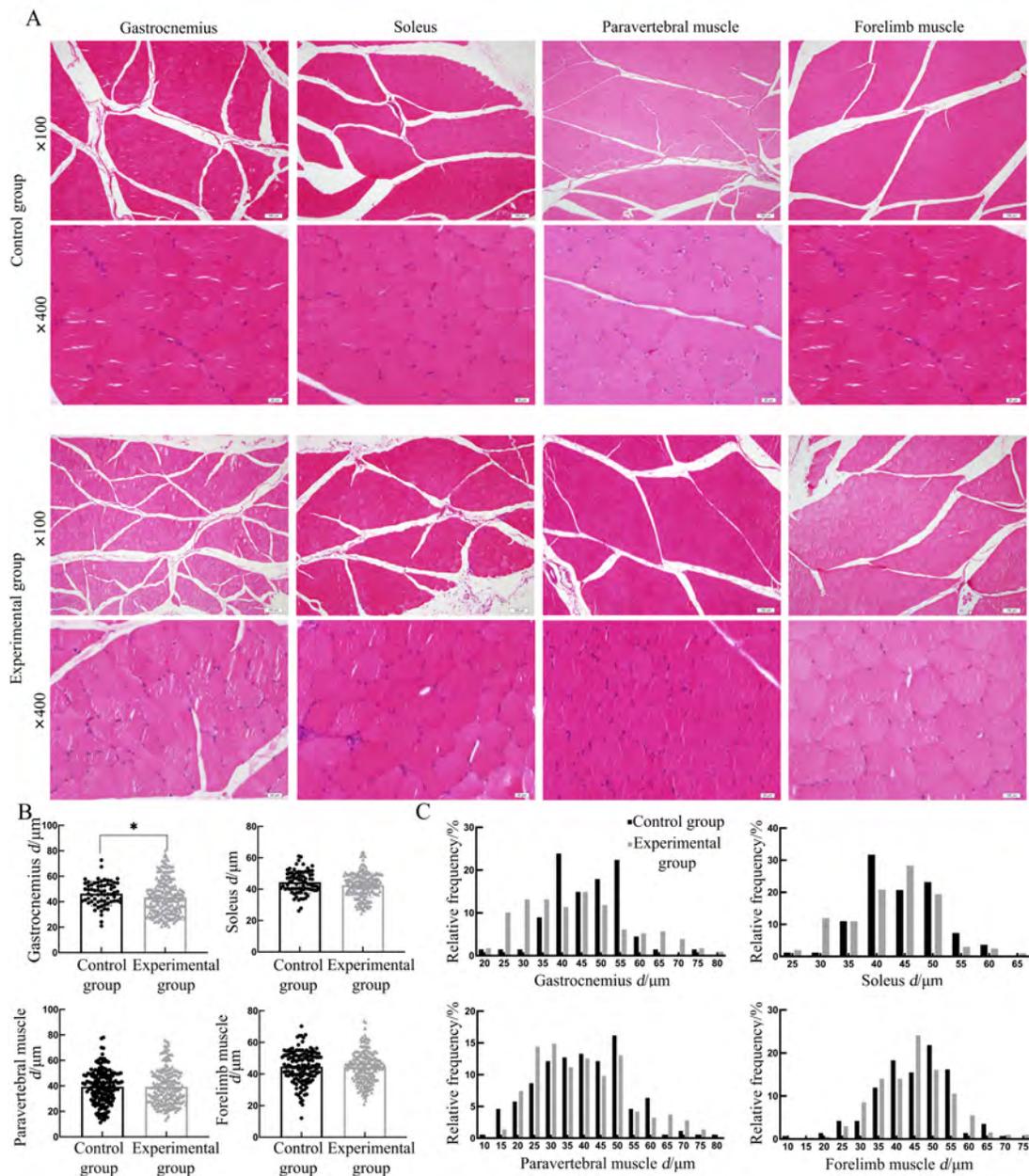
图3 后肢去负荷模拟失重实验结束后小型猪动脉血管组织病理学及厚度变化

Figure 3 Histopathology and thickness changes of arterial blood vessels in miniature pigs after the hindlimb unloading simulated weightlessness experiment

2.3.2 小型猪肌肉萎缩蛋白表达量变化

蛋白质免疫印迹法检测实验组和对照组小型猪肌肉组织中 MuRf-1 和 Atrogin-1 蛋白表达量，统计分析结果显示：与对照组相比，实验组的腓肠肌中 Atrogin-1

表达水平显著升高 ($P<0.05$)，比目鱼肌中 Atrogin-1 表达水平升高，但差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与对照组相比，实验组的比目鱼肌和腓肠肌中 MuRf-1 蛋白表达水平升高，但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照



注：实验组小型猪 ($n=7$) 使用定制金属笼固定，并用帆布吊带悬挂，使其后肢离地去负荷，身体与地面呈 -20° 角。对照组小型猪 ($n=2$) 使用金属笼中饲养而不悬挂固定。A、B、C，分别是各骨骼肌组织（腓肠肌、比目鱼肌、椎旁肌肉和前肢肌肉）的 HE 染色图（低倍镜及高倍镜视野下比例尺大小分别为 $100\ \mu\text{m}$ 和 $20\ \mu\text{m}$ ）、肌纤维直径统计图和肌纤维直径分布图。* $P<0.05$ 。

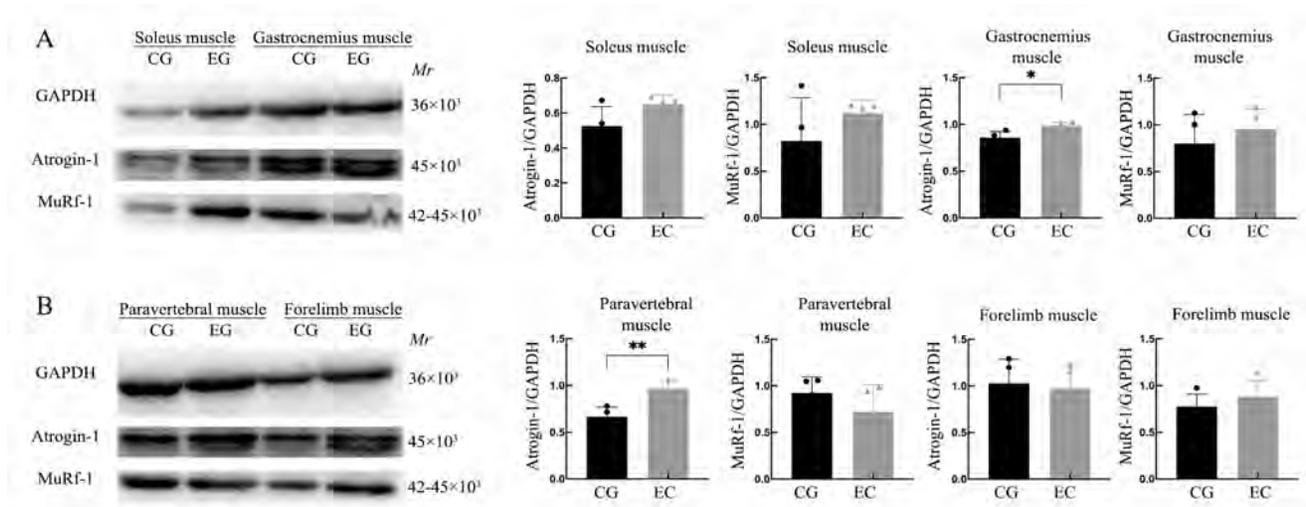
Note: Miniature pigs in the experimental group ($n=7$) were immobilized using customized metal cages and suspended from canvas slings so that their hind limbs were off the ground to unload and their bodies were at a -20° angle to the ground. Control group miniature pigs ($n=2$) were housed in metal cages without suspension immobilization. Figures A, B, and C represent the HE staining images (the scale size is $100\ \mu\text{m}$ or $20\ \mu\text{m}$ by low and high magnification), the statistical chart of muscle fiber diameters, and the distribution chart of muscle fiber diameters for various skeletal muscle tissues (gastrocnemius muscle, soleus muscle, paravertebral muscle, and forelimb muscle), respectively. * $P<0.05$.

图4 后肢去负荷模拟失重实验结束后小型猪骨骼肌结构和肌纤维直径变化

Figure 4 Changes in skeletal muscle structure and muscle fiber diameter of miniature pigs after the hindlimb unloading simulated weightlessness experiment

组相比，实验组前肢肌肉中 MuRf-1 和 Atrogin-1 蛋白表达量均无显著差异 ($P>0.05$)；椎旁肌肉中 Atrogin-1

表达量显著升高 ($P<0.05$)，而 MuRf-1 表达量未见显著变化 ($P>0.05$) (图5)。



注：实验组小型猪($n=7$)使用定制金属笼固定，并用帆布吊带悬挂，使其后肢离地去负荷，身体与地面呈 -20° 角。对照组小型猪($n=2$)使用金属笼中饲养而不悬挂固定。A，蛋白质印迹法检测比目鱼肌和腓肠肌中MuRF-1和Atrogin-1的表达量；B，蛋白质印迹法检测椎旁肌肉和前肢肌肉中MuRF-1和Atrogin-1的表达量。 $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

Note: Miniature pigs in the experimental group ($n=7$) were immobilized using customized metal cages and suspended from canvas slings so that their hind limbs were off the ground to unload and their bodies were at a -20° angle to the ground. Control group miniature pigs ($n=2$) were housed in metal cages without suspension immobilization. A, Expression levels of MuRF-1 and Atrogin-1 in soleus muscle and gastrocnemius muscle detected using western blotting; B, Expression levels of MuRF-1 and Atrogin-1 in paravertebral muscle and forelimb muscle detected using western blotting. $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

图5 后肢去负荷模拟失重实验结束后小型猪的肌肉萎缩相关蛋白表达量变化

Figure 5 Changes in expression levels of muscle atrophy proteins MuRF-1 and Atrogin-1 in miniature pigs after the hindlimb unloading simulated weightlessness experiment

2.4 模拟失重小型猪的脑组织变化

2.4.1 小型猪脑组织病理学变化

后肢去负荷模拟失重实验结束后，对小型猪各个脑区进行HE染色，结果如图6A所示。对照组中皮质额叶和皮质顶叶外锥体细胞层内的中、小型锥体神经元胞体呈锥形，细胞核清晰，大而圆；小脑区的浦肯野细胞丰富，细胞核清晰，胞体较大，可见树突向外延伸；海马区的锥体细胞层神经元胞体呈锥形，细胞核清晰，大而圆，排列整齐，颗粒细胞层神经元胞体较小，细胞核较清晰，排列整齐。实验组中皮质额叶内可见少量神经元变性，细胞核固缩，细胞质染色加深，嗜酸性增强，胞体缩小，皮质顶叶内可见部分神经元变性；小脑区浦肯野细胞轻度减少，部分细胞的细胞质染色加深，细胞核固缩，胞体缩小；海马区部分神经元染色加深，胞体缩小。

2.4.2 小型猪脑组织中星形胶质细胞激活情况

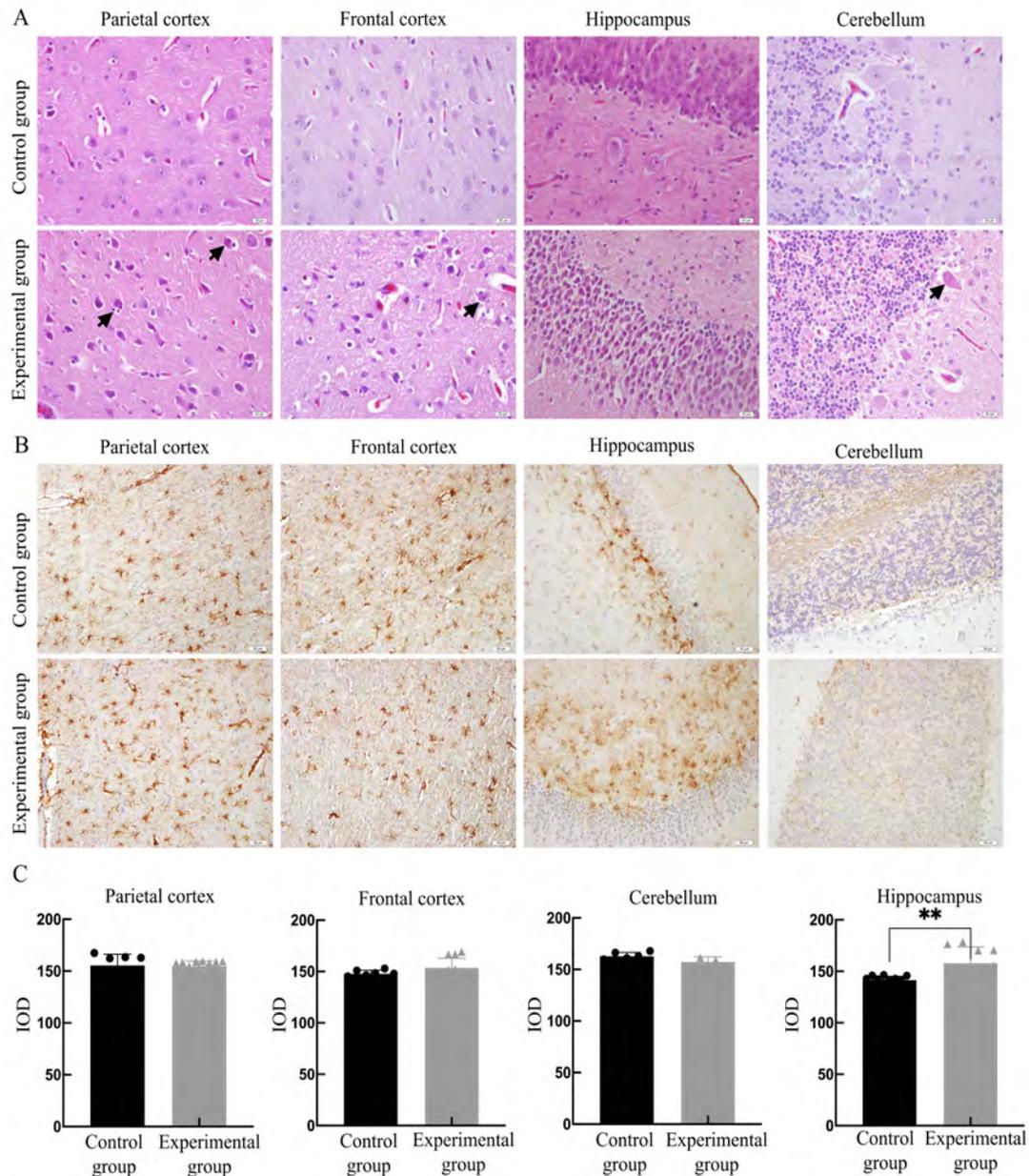
对小型猪各脑区组织进行针对GFAP的免疫组织化学染色，结果显示：GFAP阳性细胞为星形胶质细胞，着色为棕黄色，细胞具较多突起，呈星形；与对照组相比，实验组小型猪的皮质顶叶、额叶和小脑中

GFAP阳性信号无明显差异，而海马区阳性信号显著增强(图6B)。

随机选取多个视野，进一步用图像分析软件Image J对小型猪不同脑区的GFAP阳性信号进行定量分析，结果显示：与对照组相比，实验组小型猪的皮质顶叶、额叶和小脑中GFAP阳性信号强度无明显差异($P>0.05$)，而海马区的GFAP阳性信号强度显著升高($P<0.05$)(图6C)。

3 讨论

随着航天技术的不断发展，宇航员执行航天飞行任务的时长不断增加。载人航天涵盖了力学、天文学和航天医学等研究领域。已有多项研究表明，航天飞行时因人体暴露于失重、辐射等环境，其正常生理功能会受到一定影响^[1-5]。由于小型猪在生理构造和生活习性方面与人类较为相似，近年来被广泛应用于心血管和神经系统等方面的研究，但目前应用小型猪进行地面模拟失重模型研究的报告很少。本研究使用 -20° 角后肢去负荷的方法将实验组小型猪固定30 d，使其处于头低位、后肢离地状态，观察实验期间实验



注：实验组小型猪($n=7$)使用定制金属笼固定，并用帆布吊带悬挂，使其后肢离地去负荷，身体与地面呈 -20° 角。对照组小型猪($n=2$)使用金属笼中饲养而不悬挂固定。A，各脑区的HE染色（比例尺大小为 $20\ \mu\text{m}$ ），箭头示变性的神经元；B，各脑区神经胶质原纤维酸性蛋白（GFAP）免疫组织化学染色结果（比例尺大小为 $50\ \mu\text{m}$ ）；C，各脑区GFAP表达定量分析（IOD，累积光密度）。** $P<0.01$ 。

Note: Miniature pigs in the experimental group ($n=7$) were immobilized using customized metal cages and suspended from canvas slings so that their hind limbs were off the ground to unload and their bodies were at a -20° angle to the ground. Control group miniature pigs ($n=2$) were housed in metal cages without suspension immobilization. A, HE staining of each brain region (the scale size is $20\ \mu\text{m}$), the arrow indicates the degenerating neuron; B, Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry staining of each brain region (the scale size is $50\ \mu\text{m}$); C, Quantitative analysis of GFAP expression in each brain region (IOD, integrated optical density). ** $P<0.01$.

图6 后肢去负荷模拟失重实验结束后小型猪各脑区的组织病理学及相关蛋白表达变化

Figure 6 Changes in histopathology and related protein expression in each brain region of miniature pigs after the hindlimb unloading simulated weightlessness experiment

组和对照组小型猪的基础体征和各组织脏器的变化，评价该方式模拟失重的效果，为后续研究奠定模型基础。

本研究结果表明，在基础体征方面，后肢去负荷的方法会引起小型猪体重显著下降，实验中期小型猪的HGB、HCT和RBC水平显著下降，随后逐渐恢复。

以上现象与已有研究失重环境下机体的HGB、RBC和血容量变化相符,表明本研究方法能够模拟出失重条件下机体血容量丢失的趋势^[6-9]。此外,实验期间实验组小型猪的ALT和 γ -GT表达水平呈现先下降后上升的趋势,ALB显著下降,GLB显著上升,Cr显著下降。其中ALB和Cr的表达水平显著下降,提示实验组小型猪的肝肾功能可能受损,该变化与实验处理的相关性及其具体机制仍待进一步研究。本研究中HGB、HCT、RBC、ALT和 γ -GT等指标均呈先下降后上升的变化趋势。这可能是由于在实验处理前期,小型猪对机体环境变化较为敏感,而实验后期小型猪对模拟失重环境产生一定的适应性,因此能够逐渐恢复正常。

本研究中,虽然组织病理学观察结果表明实验组部分小型猪的股动脉和主动脉管壁轻度增厚,但统计分析结果显示对照组和实验组之间动脉血管内-中膜厚度无明显差异。此外,本研究对实验组和对照组小型猪的左心室、右心室、左心房和右心室心肌组织进行组织病理学评估后亦未发现明显异常,表明本研究采用的模拟失重处理可能并未引起小型猪动脉发生明显的组织病理学改变。

在骨骼肌方面,实验组小型猪腓肠肌的平均肌纤维直径显著缩短,肌纤维直径分布左移,小直径肌纤维增多,同时腓肠肌中肌肉萎缩蛋白Atrogin-1表达显著增加。除后肢抗重力肌外,实验组小型猪椎旁肌肉的平均肌纤维直径未见明显变化,Atrogin-1表达显著增加。上述结果表明实验组小型猪的腓肠肌和椎旁肌肉发生萎缩,与已有研究中失重或模拟失重处理导致的骨骼肌失用性萎缩表现一致^[14-16]。

本研究还通过HE染色发现,实验组小型猪的脑皮质顶叶、额叶和海马区域部分神经元变性,小脑区域浦肯野细胞数量轻度减少。免疫组织化学染色结果表明,实验组海马区星形胶质细胞激活相关蛋白GFAP的阳性信号显著增强,其他脑区GFAP在实验组和对照组之间未见显著差异。这些结果提示本研究采用的模拟失重处理并未对其他脑区结构造成明显损伤,而海马区域神经元对环境变化引起的组织损伤较为敏感,星形胶质细胞激活增强,这与其他研究中观察到的海马神经元退行性变化^[25]相一致。

本研究采用 -20° 角后肢去负荷的方法,初步探索并建立了一种新型的小型猪模拟失重模型。造模处理30 d后,其生理改变与航天失重研究和以犬、猴等为模型动物的地面模拟失重研究表现基本一致。需要说明,由于国内尚未开发出成熟的小型猪模拟失重模型,

且参考资料较少,因此在模拟失重动物模型中,小型猪是否优于其他模型动物、 -20° 角后肢去负荷处理30 d是否为最佳造模方式,这些均需要进一步探究对比。此外,本研究尽管取得了血容量和骨骼肌等方面的初步结果,但具体的分子机制仍待深入分析。未来本课题组将以本研究所建立的小型猪模拟失重模型为基础,继续探讨模拟失重对脑生理功能的影响,并评价模拟失重条件下骨髓输液装置的有效性。

综上所述,本研究使用的后肢去负荷造模方法引起小型猪血容量和骨骼肌系统等发生变化,与航天失重对机体的影响基本一致。即通过 -20° 角后肢去负荷处理的小型猪可作为一种新的模拟失重动物模型,用于航空航天领域相关研究。此外,经后肢去负荷造模方法处理后,小型猪除血管、肌肉和脑组织外,肝脏和肾脏等的生理学功能也可能受到影响。因此,探索以上不良影响的产生机制,从而开发抵抗不良影响的医疗及预防方法,以期为宇航员执行航空航天任务保驾护航,推动我国航空航天事业的蓬勃发展,势在必行。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验方案均已通过中国航天员科研训练中心实验动物管理与使用委员会批准(批号:ACC-IACUC-2022-027),所有实验操作均按照中国航天员科研训练中心实验动物中心标准操作规程进行,遵照中国实验动物相关法律法规条例要求。

All animal experimental protocols involved in this study have been approved by the Experimental Animal Management and Use Committee of the China Astronaut Research and Training Center (Approval No. ACC-IACUC-2022-027), and all experimental operations have been carried out in accordance with the Standard Operating Procedures of the Experimental Animal Center of the China Astronaut Research and Training Center, and in compliance with the requirements of the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

涂颖欣负责初稿写作及修改;
纪依澜负责实验设计、实验数据的检测及分析;
王菲负责动物实验设计及完成;
杨东明、王冬冬、孙芷馨和戴悦欣负责动物实验完成;
王言吉、阚广悍负责提供实验动物、设施及场地;
吴斌、赵德明负责实验监督与指导;
杨利峰负责项目管理及论文修订。

[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] ZÉRATH E, GRYPAS M, HOLY X, et al. Spaceflight affects bone formation in rhesus monkeys: a histological and cell culture study[J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93(3):1047-1056. DOI: 10.1152/jappphysiol.00610.2001.
- [2] VICO L, CHAPPARD D, ALEXANDRE C, et al. Effects of weightlessness on bone mass and osteoclast number in pregnant rats after a five-day spaceflight (COSMOS 1514)[J]. *Bone*, 1987, 8(2):95-103. DOI: 10.1016/8756-3282(87)90077-9.
- [3] MIU B, MARTIN T P, ROY R R, et al. Metabolic and morphologic properties of single muscle fibers in the rat after spaceflight, *Cosmos 1887*[J]. *FASEB J*, 1990, 4(1):64-72. DOI: 10.1096/fasebj.4.1.2136839.
- [4] GOLDSTEIN M A, EDWARDS R J, SCHROETER J P. Cardiac morphology after conditions of microgravity during COSMOS 2044[J]. *J Appl Physiol*, 1992, 73(2 Suppl): 94S-100S. DOI: 10.1152/jappphysiol.1992.73.2.S94.
- [5] TISCHLER M E, HENRIKSEN E J, MUNOZ K A, et al. Spaceflight on STS-48 and earth-based unweighting produce similar effects on skeletal muscle of young rats[J]. *J Appl Physiol*, 1993, 74(5): 2161-2165. DOI: 10.1152/jappphysiol. 1993. 74. 5.2161.
- [6] 刘焕, 茹凝玉, 吕强, 等. 中期及长期模拟失重大鼠颈总动脉钙化的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(1):1-6. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.01.01.
- LIU H, RU N Y, LV Q, et al. Mid-term and long-term simulated microgravity causes calcification of common carotid artery in rats[J]. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2021, 46(1):1-6. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.01.01.
- [7] 陈励, 张斌, 杨璐, 等. 模拟失重大鼠动脉血压、心率昼夜节律的影响及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2016, 41(4):289-294. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2016.04.06.
- CHEN L, ZHANG B, YANG L, et al. Effects of simulated microgravity on circadian rhythm of caudal arterial pressure and heart rate in rats and their underlying mechanism[J]. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2016, 41(4): 289-294. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2016.04.06.
- [8] 高放, 程九华, 薛军辉, 等. 模拟失重大鼠弹力型大动脉血管区域特异性重塑及其重力性对抗措施[J]. *生理学报*, 2012, 64(1):14-26. DOI: 10.13294/j.aps.2012.01.002.
- GAO F, CHENG J H, XUE J H, et al. *In-vivo* and *ex-vivo* studies on region-specific remodeling of large elastic arteries due to simulated weightlessness and its prevention by gravity-based countermeasure[J]. *Acta Physiol Sin*, 2012, 64(1):14-26. DOI: 10.13294/j.aps.2012.01.002.
- [9] 孙喜庆, 王冰, 孙会品, 等. 间断性头高位对模拟失重兔动脉内皮素表达和组织形态的影响[J]. *航天医学与医学工程*, 2006, 19(4): 265-268. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2006.04.007.
- SUN X Q, WANG B, SUN H P, et al. Effects of intermittent head-up tilt on the endothelin expression and morphological changes of artery during simulated weightlessness in rabbits [J]. *Space Med Med Eng*, 2006, 19(4):265-268. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2006.04.007.
- [10] 王晓平, 陆明, 马培, 等. 模拟失重大鼠恒河猴腰椎运动单元生物力学的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(26):3843-3848. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.26.007.
- WANG X P, LU M, MA P, et al. Effects of simulated weightlessness on biomechanics of motion unit of rhesus monkey lumbar vertebra[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2016, 20 (26):3843-3848. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.26.007.
- [11] 曹新生, 付崇建, 杨连甲. 3周模拟失重大鼠后肢骨生长代谢的影响[J]. *中华航空航天医学杂志*, 2000, 11(4):221-224. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-6239.2000.04.007.
- CAO X S, FU C J, YANG L J. Effects of 3 week simulated weightlessness on the growth and metabolism of hindlimb bones in rats[J]. *Chin J Aerosp Med*, 2000, 11(4):221-224. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-6239.2000.04.007.
- [12] 付崇建, 郁冰冰, 杨连甲, 等. 尾悬吊大鼠骨和骨髓中骨钙素的变化[J]. *航天医学与医学工程*, 2003, 16(4):260-263. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2003.04.007.
- FU C J, YU B B, YANG L J, et al. Changes of osteocalcin in bone and bone marrow in tail suspended rats[J]. *Space Med Med Eng*, 2003, 16(4):260-263. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837. 2003.04.007.
- [13] 赵赞廷, 马宇, 张恒伟, 等. 模拟微重力效应下小鼠骨流失的性别差异[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2022, 15(2):182-188. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2591.2022.02.009.
- ZHAO Z Y, MA Y, ZHANG H W, et al. Gender differences in bone loss under microgravity effect in mice[J]. *Chin J Osteoporos Bone Miner Res*, 2022, 15(2):182-188. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2591.2022.02.009.
- [14] 刘书林, 姚永杰, 刘秋红, 等. 犬头低位后肢去负荷模拟失重模型的建立与验证[J]. *载人航天*, 2021, 27(5):596-602. DOI: 10.16329/j.cnki.zrht.2021.05.009.
- LIU S L, YAO Y J, LIU Q H, et al. Establishment and validation of simulated weightlessness model of dog with head down hindlimb unloading[J]. *Manned Spacefl*, 2021, 27(5): 596-602. DOI: 10.16329/j.cnki.zrht.2021.05.009.
- [15] 孙亚志, 黄丽昀, 张谦, 等. 尾吊大鼠骨骼肌线粒体钙、镁含量和体视学的变化[J]. *航天医学与医学工程*, 1998, 11(4): 298-300. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.1998.04.016.
- SUN Y Z, HUANG L Y, ZHANG Q, et al. Changes of calcium and magnesium contents and stereology in skeletal muscle mitochondria of tail-suspended rats[J]. *Space Med Med Eng*, 1998, 11(4): 298-300. DOI: 10.16289/j.cnki. 1002-0837.1998. 04.016.
- [16] 吴苏娣, 樊小力, 唐斌, 等. 模拟失重大鼠比目鱼肌肌梭超微结构的影响[J]. *航天医学与医学工程*, 2002, 15(1):32-35. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2002.01.007.
- WU S D, FAN X L, TANG B, et al. Effects of simulated weightlessness on ultrastructure of soleus muscle spindle in rats[J]. *Space Med Med Eng*, 2002, 15(1):32-35. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2002.01.007.
- [17] 陈英, 杨春敏, 毛高平, 等. 模拟失重大鼠小肠黏膜紧密连接蛋白表达的影响[J]. *航天医学与医学工程*, 2011, 24(5):327-331. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2011.05.005.
- CHEN Y, YANG C M, MAO G P, et al. Impact of simulated weightlessness on expression of tight junction proteins of small intestine mucous membrane in rats[J]. *Space Med Med Eng*, 2011, 24(5): 327-331. DOI: 10.16289/j.cnki. 1002-0837.2011. 05.005.
- [18] 武强强, 张学英, 王德华, 等. 模拟失重大鼠啮齿动物情绪和认知的

- 影响及缓解措施研究进展[J]. 航天医学与医学工程, 2021, 34(2): 183-188. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2021.02.013.
- WU Q Q, ZHANG X Y, WANG D H, et al. Research progress in effects of simulated weightlessness on emotion and cognition of rodents and mitigating measures[J]. Space Med Med Eng, 2021, 34(2):183-188. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2021.02.013.
- [19] BAQAI F P, GRIDLEY D S, SLATER J M, et al. Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression[J]. J Appl Physiol, 2009, 106(6): 1935-1942. DOI: 10.1152/jappphysiol.91361.2008.
- [20] 纪依澜, 赵德明, 王菲, 等. 模拟失重实验动物模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1):106-111. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.013.
- JI Y L, ZHAO D M, WANG F, et al. Establishment and evaluation of experimental animal models simulating weightlessness[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2023, 31(1):106-111. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.013.
- [21] 吴华莉, 涂尾龙, 曹建国, 等. 小型猪在人类疾病模型方面的研究进展[J]. 养猪, 2021(4):63-67. DOI: 10.13257/j.cnki.21-1104/s.2021.04.019.
- WU H L, TU W L, CAO J G, et al. Research progress of miniature pig in human disease models[J]. Swine Prod, 2021 (4):63-67. DOI: 10.13257/j.cnki.21-1104/s.2021.04.019.
- [22] 谈诚, 李志利, 汪德生, 等. 四肢悬吊法对小型猪骨骼抗动态载荷功能的影响[C]//中国力学学会, 中国生物医学工程学会生物力学专业委员会. 第八届全国生物力学学术会议论文集. 上海: 医用生物力学, 2006: 160-161.
- TAN C, LI Z L, WANG D S, et al. Effect of hindlimb suspension on the dynamic load-bearing capacity of miniature pig skeleton[C]//Chinese Society of Theoretical and Applied Mechanics, Biomechanics Professional Committee of Chinese Society of Biomedical Engineering. Proceedings of the 8th National Conference on Biomechanics. Shanghai: Journal of Medical Biomechanics, 2006: 160-161.
- [23] 杨超, 徐子涵, 李铠, 等. 头低位卧床对恒河猴骨代谢、糖脂代谢的抑制效应及其相关性分析[J]. 空间科学学报, 2020, 40(4):540-546. DOI: 10.11728/cjss2020.04.540.
- YANG C, XU Z H, LI K, et al. Inhibitory effects of head-down bed rest on bone, glycolipid metabolism of *Rhesus* and their correlation analysis[J]. Chin J Space Sci, 2020, 40(4):540-546. DOI: 10.11728/cjss2020.04.540.
- [24] MATOMÄKI P, KAINULAINEN H, KYRÖLÄINEN H. Corrected whole blood biomarkers - the equation of Dill and Costill revisited[J]. Physiol Rep, 2018, 6(12): e13749. DOI: 10.14814/phy2.13749.
- [25] 李家卉, 李方方, 张敏, 等. 海马神经元退行性变参与模拟失重所致大鼠认知损伤[J]. 航天医学与医学工程, 2021, 34(2):122-127. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2021.02.005.
- LI J H, LI F F, ZHANG M, et al. Hippocampal neuronal degeneration involved in cognitive impairment induced by simulated weightlessness in rats[J]. Space Med Med Eng, 2021, 34(2):122-127. DOI: 10.16289/j.cnki.1002-0837.2021.02.005.

(收稿日期: 2024-03-05 修回日期: 2024-07-02)

(本文编辑: 张俊彦, 翟玉凤, 丁宇菁, 周培)

【引用本文】

- 涂颖欣, 纪依澜, 王菲, 等. 小型猪后肢去负荷模拟失重模型的建立与组织损伤研究[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 475-486. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.038.
- TU Y X, JI Y L, WANG F, et al. Evaluation of simulated weightlessness model of hindlimb unloading miniature pigs and their tissue damage[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(5): 475-486. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.038.

《实验动物与比较医学》2025年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管,上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办,是我国实验动物科学及比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊),并被瑞典DOAJ、美国Chemical Abstracts和Ulrichsweb、英国CAB Abstracts和Global Health、波兰ICI World of Journals和ICI Master List、WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)和美国EBSCO数据库,以及中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录,并入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录,以及中国科协组织的2022—2024年度“科技期刊双语传播工程”。

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



卢静, 首都医科大学基础医学院教授、博士研究生导师, 从教30余年来始终在本科和研究生教学一线, 履行着教书育人的光荣使命。同时担任中国实验动物学会常务理事、北京实验动物学会常务理事等职, 为北京市乃至我国的实验动物科学发展做了大量工作。作为中国实验动物学会高校专业教育和学科建设工作委员会主任委员, 积极组织筹备实验动物学教学研讨会, 提高了我国实验动物学专业人才培养的质量和数量, 提高了全国各高校和科研院所“实验动物学”公共课教学水平, 在推动我国实验动物学学科发展和进步中发挥了重要作用。此外, 担任首都医科大学实验动物部主任和基础医学院实验动物学系主任10年, 在服务管理、人才培养、科学研究、传承创新等方面都取得了显著成绩, 带领研究团队开展实验动物新资源和人类疾病动物模型相关研究, 承担科技部、国家自然科学基金委等资助的多项课题, 近年来在 *Nature Communications*、*Aging Cell* 等知名期刊发表多篇研究论文, 主编或参编《医学实验动物学》《实验动物寄生虫学》等多部实验动物专业教材。

不同周龄段雄性长爪沙鼠肾小体的形态变化

李梦¹, 陈柏安^{1,2,3}, 卢静^{1,2,3}

(1. 首都医科大学实验动物部, 北京100069; 2. 首都医科大学基础医学院, 北京100069; 3. 首都医科大学神经再生修复研究北京市重点实验室, 北京100069)

[摘要] 目的 通过观察比较不同周龄段的雄性长爪沙鼠的肾脏在最大纵切面上肾小体的变化, 初步探索不同周龄段雄性长爪沙鼠肾小体可能存在的变化规律, 为选择雄性长爪沙鼠用于肾病相关致病机制及药物筛选等研究提供基础数据支持。**方法** 分别取12周龄、48周龄、72周龄3个周龄段的雄性长爪沙鼠肾脏, 从最大冠状面纵切后制成肾脏组织切片; 苏木精-伊红染色后, 全景扫描成电子组织切片, 利用CaseViewer拍摄最大纵切面上肾小体图片, 并测量肾小体及其所包含的肾小球、肾小囊面积; 使用IBM SPSS Statistics 27进行统计分析, 使用GraphPad Prism 8制作图表。**结果** 与12周龄相比, 48周龄时肾小体 ($P=0.029$)、肾小球 ($P=0.001$) 的面积均显著增大, 肾小囊面积没有明显变化 ($P=0.478$), 肾小球在其肾小体中的面积占比有增大趋势, 但差异无统计学意义 ($P=0.163$); 与48周龄相比, 72周龄时肾小体、肾小球和肾小囊面积均显著增大 ($P<0.001$), 但肾小球在其肾小体中的面积占比显著减小 ($P<0.001$)。**结论** 12~72周龄的雄性长爪沙鼠肾小体持续增大, 在这个增大过程中可能存在一定规律, 即肾小球与肾小体的增大趋势相对一致; 而肾小囊与肾小体相比, 其增大趋势存在一定滞后性, 推测肾小体增大主要是由肾小球增大引起, 进而导致肾小囊被动增大造成的; 肾小体增大可能是通过多次“肾小球增大-引发肾小囊增大”完成。

[关键词] 雄性长爪沙鼠; 肾小体; 肾小球; 肾小囊

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0487-08



Morphological Changes of Renal Corpuscles in Male Mongolian Gerbils at Different Ages

LI Meng¹, CHEN Bai'an^{1,2,3}, LU Jing^{1,2,3}

(1. Department of Experimental Animals, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. Beijing Municipal Key Laboratory for Neural Regeneration and Repairing, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

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

[ABSTRACT] Objective By observing and comparing the changes in renal corpuscles at the largest longitudinal section in male Mongolian gerbils of different ages, this study preliminarily explored potential

[基金项目] 国家重点研发计划重点专项子课题“新型实验动物资源库服务科技创新能力提升的关键技术与示范”(2021YFF0702805)

[第一作者] 李梦(1981—),男,硕士,主管技师,研究方向:长爪沙鼠病理。E-mail: lm_bshlm@126.com

[通信作者] 卢静(1969—),女,博士,教授,主要从事学习记忆功能障碍疾病动物模型和实验动物资源研究。E-mail: lujing@ccmu.edu.cn

patterns of renal corpuscle changes, providing foundational data for the selection of male Mongolian gerbils for research on the pathogenic mechanisms and drug screening of nephropathy. **Methods** Kidney samples were collected from male Mongolian gerbils aged 12, 48, and 72 weeks. After making longitudinal cuts along the largest coronal plane in the middle, kidney tissue sections were prepared. Following HE staining, panoramic electronic tissue sections were scanned, and images of renal corpuscles at the largest longitudinal plane were captured using CaseViewer. The areas of renal corpuscles and their glomeruli and renal vesicles were measured. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 27, and figures were created using GraphPad Prism 8. **Results** Compared with the 12-week group, both the area of renal corpuscle ($P=0.029$) and glomerulus ($P=0.001$) significantly increased in the 48-week group, while there was no significant change in the area of renal vesicle ($P=0.478$). The proportion of glomerular area within the renal corpuscle showed an increasing trend but the difference was not statistically significant ($P=0.163$). Compared to the 48-week group, the areas of renal corpuscle, glomerulus, and renal vesicle were all significantly larger in the 72-week group ($P<0.001$), but the proportion of glomerular area within renal corpuscle decreased significantly ($P<0.001$). **Conclusion** The renal corpuscles in male Mongolian gerbils continued to increase from 12 to 72 weeks of age. There might be a certain pattern in this process of enlargement, where the trends of glomerular and renal corpuscle enlargement were relatively consistent. However, the enlargement of renal vesicles appeared to lag behind that of the renal corpuscle. It was speculated that the enlargement of renal corpuscles was mainly caused by the passive enlargement of renal vesicles due to glomerular enlargement. The enlargement of renal corpuscles might be achieved through multiple cycles of "glomerular enlargement - triggering renal vesicle enlargement".

[Key words] Male Mongolian gerbil; Renal corpuscles; Glomerulus; Renal vesicle

长爪沙鼠 (Mongolian gerbil) 自被开发为实验动物以来, 因具有特殊的生理结构和功能特点, 在速发型高脂血症^[1]、动脉粥样硬化^[2]、脑缺血^[3]、非酒精性脂肪肝肝硬化^[4]、自发性糖尿病^[5-6]、癫痫^[7]、感音神经性耳聋^[8]、寄生虫感染^[9]、抑郁症^[10]等疾病机制及治疗研究方面被广泛应用。随着研究的深入, 长爪沙鼠在生物医药领域的研究价值和前景不断扩大, 引起了越来越多研究人员的关注。

然而作为一种“新兴”的实验动物, 长爪沙鼠的脏器功能、基础指标研究尚不够全面和深入, 这给实际的研究工作带来了一些困难。就肾脏而言, 目前已有关于长爪沙鼠生长过程中肾脏质量、脏器指数^[11-12]、肾单位密度、肾小球大小变化和肾小管数量^[13]等的研究, 但对其肾脏生理、病理特性的深入研究还略显不足。比如, 糖尿病肾病是一种由糖尿病引发的微血管并发症, 其主要病变部位为肾小球血管, 之后可能逐渐累及肾小管; 但相关研究显示, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶3 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase, ND3) 是与糖尿病发病高度相关的线粒体呼吸链复合物 I 的重要组成部分, 仅在患有糖尿病肾病的长爪沙鼠的肾小管上皮细胞中高表达^[8]。这一发现提示长爪沙鼠肾脏具有的特殊生理特性亟须明确。

正是由于肾脏结构和功能特点不明, 长爪沙鼠作为模型动物用于肾脏相关研究的文献报告并不多, 即使被选用, 也未能显示出其有别于传统大鼠和小鼠的特点和价值。因此, 本研究通过仔细观察、记录和分析不同周龄雄性长爪沙鼠肾小体的生长变化情况, 为选用雄性长爪沙鼠进行肾脏相关研究提供基础数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性长爪沙鼠 (SPF) 级购自首都医科大学实验动物部 [SCXK (京) 2022-0013], 饲养于本单位中控制温湿度的 SPF 屏障环境 [SYXK (京) 2022-0049]。实验按长爪沙鼠周龄分为 12 周龄、48 周龄和 72 周龄 3 个组别, 每组 6 只。本实验经首都医科大学实验动物伦理委员会批准 (审批号: AEEI-2021-292)。

1.2 肾脏组织结构观察

雄性长爪沙鼠取血后, 通过颈椎脱臼法安乐死, 快速摘取肾脏, 吸干表面水分后, 使用电子天平 (德国 Acculab 公司, 型号 ALB-124) 称其湿重。然后取最大面从中间纵切肾脏, 放入 4% 多聚甲醛溶液中固定。

固定后的肾脏组织经脱水、包埋后切片 (厚度 4 μm)。

待用, 将石蜡切片置于60 °C烘箱中烘片2~3 h; 脱蜡、水化后, 苏木精染色3~8 min, 流水冲洗; 1%盐酸乙醇溶液分化30 s (观察分化效果), 用流水冲洗; 1%氨水溶液返蓝30 s, 流水冲洗; 镜检见着色后进行伊红染液染色1~3 min; 最后, 将染色后的切片脱水、封固, 晾干后使用3D HISTECH全景扫描仪(匈牙利3D HISTECH公司, 型号Pannoramic MIDI)扫描成电子图片。

1.3 图像分析及数据统计

使用CaseViewer软件采集图像, 应用GraphPad Prism 8软件进行图像统计分析。首先, 在40倍焦距下, 从每只雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面中随机选取30个肾小体, 并测量肾小体、肾小球、肾小囊的面积, 计算肾小球占比; 然后, 从每组中随机选取1只雄性长爪沙鼠, 在40倍焦距下测量该沙鼠肾脏最大纵切面中所有肾小体、肾小球、肾小囊的面积, 并计算肾小球占比。

1.4 统计学分析

应用IBM SPSS Statistics 27软件进行实验结果分析。肾小体、肾小球、肾小囊的面积, 以及肾小球占比数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 采用单因素方差分析进行多组间比较, 组内两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

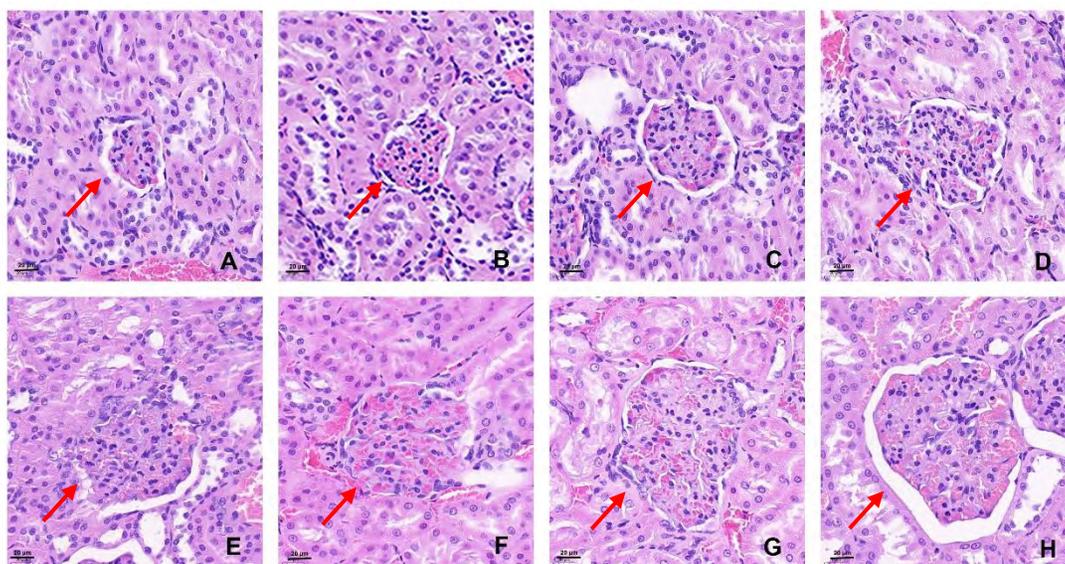
2 结果

2.1 随周龄增长, 雄性长爪沙鼠的肾小体和肾小球持续增大, 而肾小囊增大明显滞后

本实验通过阅片发现, 在雄性长爪沙鼠肾脏最大纵切面上呈现出的肾小体面积大小不一。图1列举出了横截面积为2 000~16 000 μm^2 不等的肾小体, 这种现象在雄性长爪沙鼠3个周龄段中是一致的。为了探究随着雄性长爪沙鼠的周龄增长, 肾小体面积整体是否会出现差异变化, 本实验测算了3个周龄段雄性长爪沙鼠肾脏最大纵切面上肾小体面积的平均值和标准差, 并通过统计学方法加以验证。首先, 在3个周龄段中, 对每只雄性长爪沙鼠随机选取30个视野进行比较; 得出一定结论后, 再随机抽取每个周龄1只雄性长爪沙鼠, 比较其肾脏最大纵切面上的所有肾小体, 从而尽可能消除随机选取30个视野对结论产生的影响; 最终将两种结论进行比较。

2.1.1 对每只雄性长爪沙鼠随机选取30个视野进行比较

在12~72周龄的周龄段中, 雄性长爪沙鼠的肾小体持续增大: 与12周龄相比, 48周龄雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面上肾小体面积显著增大($P=0.029$); 与48周相比, 72周龄雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面



注: 40×10倍焦距下不同横截面积(A~H图分别为2 476.0、3 211.0、5 089.6、6 502.2、8 534.3、10 320.7、13 010.6、15 427.0 μm^2)的肾小体图片(红色箭头所指), 比例尺大小为20 μm 。

Note: Images of renal corpuscles with different cross-sectional areas (the area of A-H images are 2 476.0, 3 211.0, 5 089.6, 6 502.2, 8 534.3, 10 320.7, 13 010.6, 15 427.0, μm^2 , respectively) at a magnification of 40 × 10 times (indicated by red arrows), with a scale bar size of 20 μm .

图1 雄性长爪沙鼠不同面积肾小体的苏木精-伊红染色结果

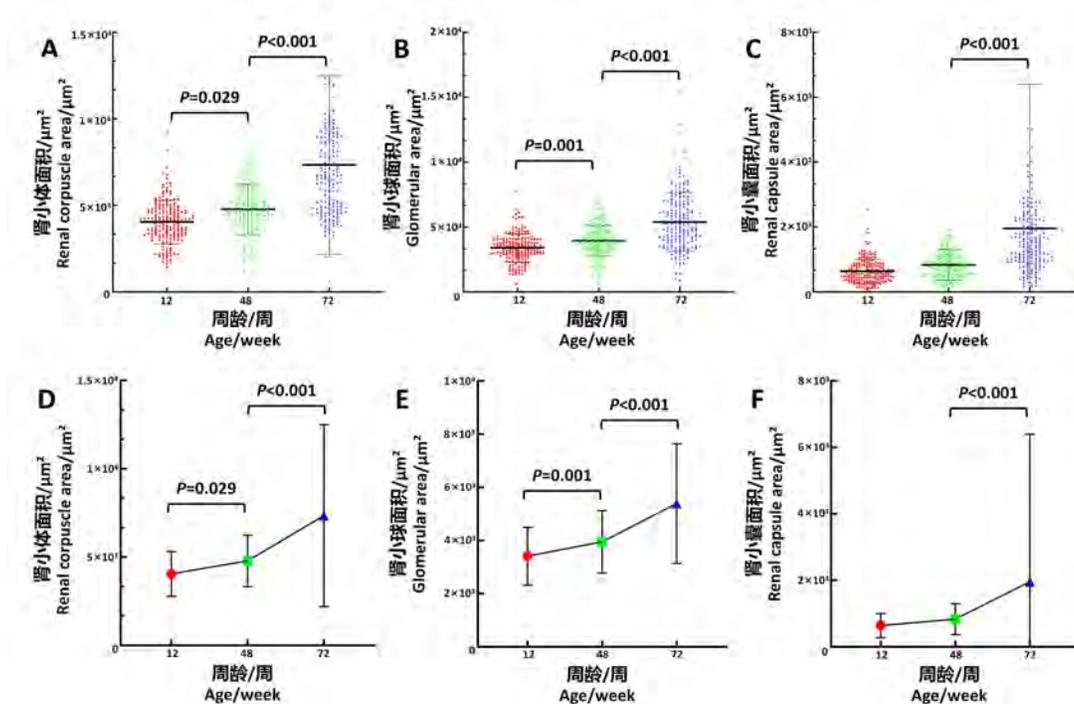
Figure 1 Hematoxylin and eosin staining results of renal corpuscles of different sizes in male Mongolian gerbils

上肾小体面积也显著增大 ($P<0.001$) (图2A和D)。

在12~72周龄的周龄段中, 雄性长爪沙鼠的肾小球也持续增大: 与12周龄相比, 48周龄雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面上肾小球面积显著增大 ($P=0.001$); 与48周龄相比, 72周龄雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面上肾小球面积也显著增大 ($P<0.001$) (图2B和E)。

不同的是, 在12~72周龄的年龄段中, 肾小囊增大的趋势并不完全与同时期肾小体和肾小球面积增大

的趋势保持一致。即有些肾小球明显增大的同时, 肾小囊也明显增大; 而有些肾小球明显增大的同时, 肾小囊却未见明显增大。这种不一致的趋势在12周龄和48周龄尤为明显: 与12周龄相比, 48周龄雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面上肾小囊未见明显增大 ($P=0.478$); 与48周龄相比, 72周龄雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面上肾小囊显著增大 ($P<0.001$) (图2C和F)。



注: 每只雄性长爪沙鼠随机选取30个视野, 测量30套肾小体、肾小球和肾小囊的面积 ($n=6$); A~C是3个周龄段肾小体、肾小球、肾小囊面积散点图; D~F是3个周龄段肾小体、肾小球、肾小囊面积趋势图。

Note: 30 fields of view were randomly selected from each male Mongolian gerbil, and the areas of 30 sets of renal corpuscles, glomeruli, and renal vesicles were measured ($n=6$); A-C are scatter plots of renal corpuscle, glomerulus, and renal vesicle area at three age groups; D-F are trend charts of renal corpuscle, glomerulus, and renal vesicle area at three age groups.

图2 不同周龄雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面上肾小体、肾小球、肾小囊大小比较

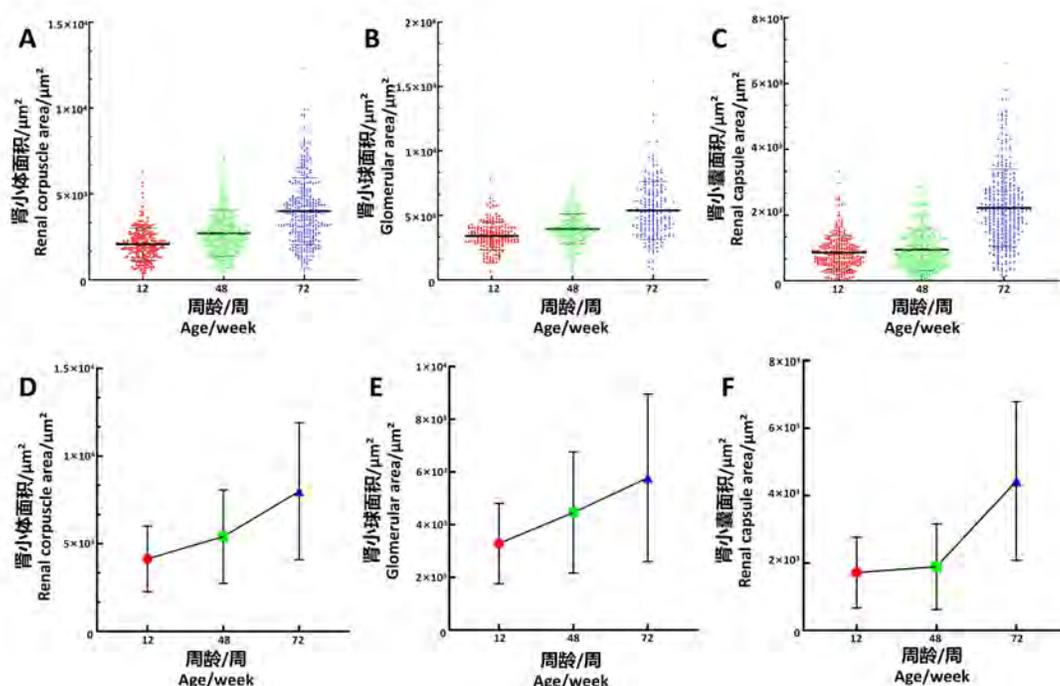
Figure 2 Comparison of sizes of renal corpuscles, glomeruli, and renal vesicles on the largest longitudinal section of the kidneys in male Mongolian gerbils of different ages

2.1.2 对每个周龄段的雄性长爪沙鼠随机抽取1只进行比较

在整个肾小体持续增大过程中, 肾小体面积 (图3A和D) 与肾小球面积 (图3B和E) 的增大趋势是相对一致的。这与上面的比较结论一致。而该过程中, 肾小囊的增大出现了滞后性: 48周龄与12周龄相比, 肾小囊的增大趋势不明显, 直到48~72周龄, 肾小囊才快速增长 (图2C和F)。

2.2 随周龄增长, 雄性长爪沙鼠的肾小球在其肾小体中占比明显降低

本实验发现, 在雄性长爪沙鼠肾脏的肾小体横截面积随周龄增加而增大的过程中, 肾小球并不全是与该肾小体同步增大的。为了更准确地描述这一现象, 应用肾小球面积在肾小体面积中的占比来反映这一关系。图4列举了50%~100%区间内不同面积占比的肾小球-肾小体, 这种情况在雄性长爪沙鼠的3个周龄段



注：不同周龄组随机选取1只雄性长爪沙鼠，测量其肾脏最大纵切面上所有肾小体、肾小球和肾小囊的面积，12周测量了236套肾小体、肾小球、肾小囊，48周测量了302套，72周测量了298套。A~C是肾小体、肾小球、肾小囊面积散点图；D~F是肾小体、肾小球、肾小囊面积趋势图。

Note: Randomly select one male Mongolian gerbil at each week of age and measure the area of all renal corpuscles, glomeruli, and renal vesicles on the largest longitudinal section of its kidney; 236, 302 and 298 sets of renal corpuscles, glomeruli, and renal vesicles were measured at 12 weeks, 48 weeks, and 72 weeks respectively; A-C are scatter plots of renal corpuscle, glomerulus, and renal vesicle area; D-F are trend charts of renal corpuscle, glomerulus, and renal vesicle area.

图3 不同周龄组随机抽取1只雄性长爪沙鼠的肾脏最大纵切面上肾小体、肾小球、肾小囊大小比较

Figure 3 Comparison of the size of renal corpuscles, glomeruli, and renal vesicles on the largest longitudinal section in a male Mongolian gerbil randomly selected from different age groups

中均有出现。因此，为了探究随着雄性长爪沙鼠周龄增加，肾小球-肾小体面积占比在整体上有无变化趋势，本实验测算了3个周龄段中，雄性长爪沙鼠肾脏最大纵切面上肾小球-肾小体面积占比的平均值和标准差，并通过统计学方法加以验证。首先，在3个周龄段中，对每只雄性长爪沙鼠随机选取30个视野进行比较；之后在每个周龄段随机抽取1只雄性长爪沙鼠，对其肾脏最大纵切面上所有肾小球-肾小体面积占比进行比较，以此尽可能消除随机选取30个视野对结论产生的影响；最终将二者的结论进行比较。

2.2.1 对每只雄性长爪沙鼠随机选取30个视野进行比较

48周龄与12周龄相比，肾小球占比有降低趋势，但无统计学意义 ($P=0.163$)；而72周龄与48周龄相比，肾小球占比显著降低 ($P<0.001$) (图5A、B)。

2.2.2 对每个周龄段的雄性长爪沙鼠随机抽取1只进行比较

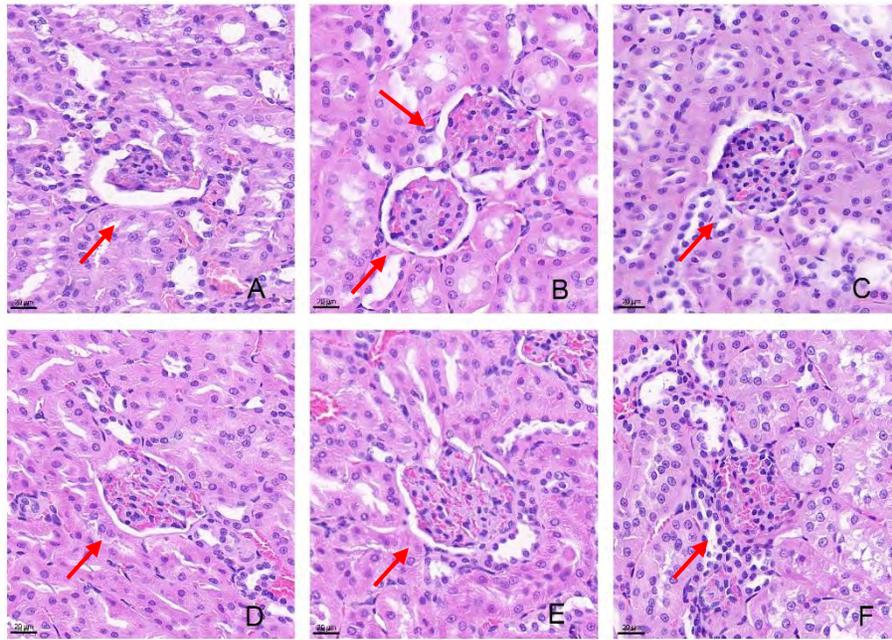
在12~72周龄的生长过程中，肾小球占比呈现先

上升再下降的趋势，即72周龄与48周龄对比时具有下降趋势，但48周龄与12周龄对比时更大样本量的比较具有上升趋势 (图5C、D)。这与前一种比较方法所得结果稍有区别。

3 讨论

肾小体作为肾单位的组成部分之一，是由肾小球和肾小囊组成。研究显示，随着周龄的增加，人体肾脏中的肾小球逐渐硬化并增大，而雄性长爪沙鼠同其他鼠类一样，也有类似于人的肾小球随周龄增大而硬化的特点^[13-15]。以往研究更多关注于肾小球增大过程中本身的病理机制及对肾相关功能的影响，而对于肾小体和肾小囊的变化趋势关注较少。肾小球、肾小囊、肾小体三者之间是始终协调一致、同步增大，还是有不同的变化趋势，探讨清楚这个问题有可能为相关研究提供新的思路。

本研究显示，在12~72周龄时，雄性长爪沙鼠肾小球与肾小体的增大趋势与之前报告的研究结果一

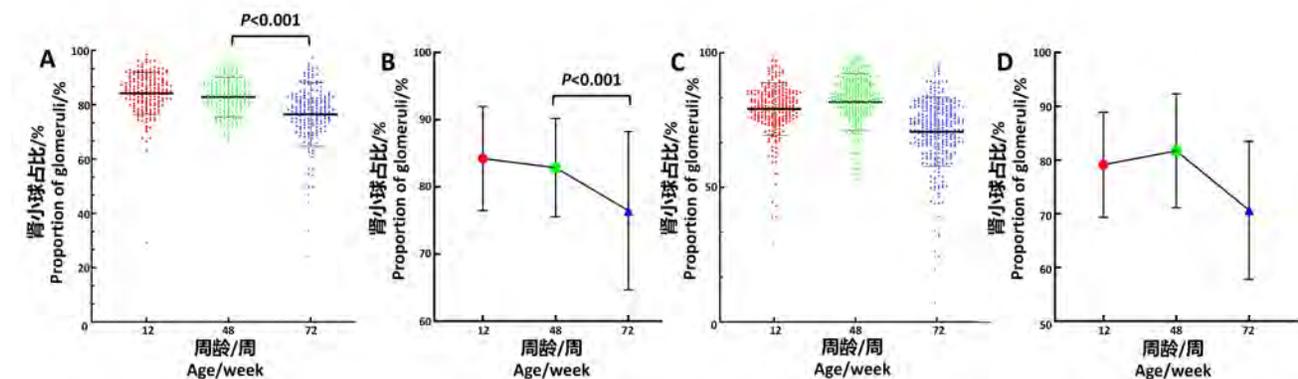


注：40×10倍焦距下不同肾小球占比[A：54.1%；B：66.9%（左下）/69.9%（右上）；C：73.7%；D：80.9%；E：83.0%；F：97.0%]的肾小体图片（红色箭头所指），比例尺大小为20 μm。

Note: Images of renal corpuscles with different proportions of glomeruli at magnification of 40 × 10 times (indicated by red arrows). A: 54.1%; B: 66.9% (bottom left)/69.9% (top right); C: 73.7%; D: 80.9%; E: 83.0%; F: 97.0%, with a scale bar size of 20 μm.

图4 雄性长爪沙鼠不同大小肾小球占比的苏木精-伊红染色结果

Figure 4 Hematoxylin and eosin staining results of the different proportion of glomerular in male Mongolian gerbils



注：A，C为肾小球占比散点图；B，D为肾小球占比趋势图。A~B，每只雄性长爪沙鼠随机选取30个视野，测量30套肾小体、肾小球和肾小囊的面积（n=6）；C~D，每个周龄随机取1只雄性长爪沙鼠，测量肾脏最大纵切面上所有肾小体、肾小球、肾小囊的面积，12周龄测量了236套肾小体、肾小球、肾小囊，48周龄测量了302套，72周龄测量了298套，计算肾小球占肾小体的面积之比。

Note: A and C are scatter plots of glomerular proportions; B and D are the trend charts of glomerular proportion. A-B 30 fields of view were randomly selected from each male Mongolian gerbil, and the areas of 30 sets of renal corpuscles, glomeruli, and renal vesicles were measured (n=6); C-D, One male Mongolian gerbil was randomly selected at each week of age, and the area of all renal corpuscles, glomeruli, and renal vesicle of on the largest longitudinal section of the kidneys was measured. 236, 302 and 298 sets of renal corpuscles, glomeruli, and renal vesicles were measured at 12 weeks, 48 weeks, and 72 weeks respectively. The ratio of glomeruli to renal corpuscle area was calculated.

图5 不同周龄雄性长爪沙鼠肾脏最大纵切面上肾小球占比大小比较

Figure 5 Comparison of the proportion of glomerular area on the largest longitudinal section of the kidneys in male Mongolian gerbils of different ages

致^[16]。比较48周龄与12周龄、72周龄与12周龄的数据可见,肾小体与肾小球显著增大。相比之下,肾小囊增大似乎呈现出滞后性,与12周龄相比,肾小囊在48周龄时略有增大,但没有统计学意义;而到了72周龄时,与48周龄相比显著增大,其增大趋势甚至超过了同期肾小球的增大趋势(图3)。这可能与肾小体有效滤过压的提高有关。有效滤过压=肾小球毛细血管压-(血浆胶体渗透压+囊内压),肾小球增大无疑可以提高肾小球毛细血管压,但是肾小球与肾小囊之间存在“空洞”的囊性结构,导致肾小囊对肾小球增大的回应比较迟钝,其内层被挤压扩张后,逐渐压缩肾小囊的体积,导致囊内压升高。随着囊内压增大,这种来自肾小球增大的压力才滞后性地从肾小囊脏层逐渐波及至壁层,从而导致肾小囊爆发式增大,以快速降低囊内压,提高肾小球毛细血管压和有效滤过压,最终利于原尿产生,满足机体需要。由此推测,肾小体增大并不是一步到位的,随着周龄增长,肾小体是通过多次“肾小球增大—引发肾小囊增大”的过程逐步完成的。

本研究发现,雄性长爪沙鼠肾小球虽然随着周龄逐渐增大(图2~3),但是肾小球在肾小体中的面积占比并不是保持不变的:在起初阶段不会出现显著下降(甚至存在升高的可能),而之后出现极显著性下降(图5)。这一现象表明,肾小体的增大并不是由肾小球和肾小囊同比例增大完成的,肾小球增大需要肾小囊更高的比例增大来配合,以此维持肾小体的有效滤过压,保证原尿生成的稳定性,以满足机体需要。由此推测,肾小球增大时若肾小囊在一定时间内无法伴随其显著增大,将导致囊内压升高并长期作用于肾小球毛细血管球,这可能是肾小球增大后进一步硬化的原因之一。

一般认为,雄性大鼠的体成熟时间为90日龄^[16],1个月相当于人类的3年^[17]。由于雄性长爪沙鼠的相关研究尚不明确,因此本实验参照大鼠,选择了12周龄、48周龄和72周龄这3个时间节点进行观察。这些时间节点大致相当于长爪沙鼠的青春期、青年期和中年期,以此初步研究雄性长爪沙鼠随着周龄增长,其肾小体、肾小球和肾小囊各自的变化趋势。雌性长爪沙鼠是否有类似的变化趋势,以及这些趋势是否会受雌性特殊生理功能的影响,将会在之后的实验中加以探究。

综上所述,随着周龄增长,雄性长爪沙鼠的肾小体会逐渐增大。在肾小体增大过程中,肾小球基本保

持着与肾小体同步增大的趋势;而肾小囊的增大会出现一定的滞后性,随后进入快速增大期。这种差异性可能与肾小体有效滤过压的变化与调节有关,肾小球在其肾小体中的面积占比可能是一个有意义的切入点,本研究有望为相关肾功能衰减以及肾小球硬化和坏死等研究提供一些基础数据支持。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验均已通过首都医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号:AEEI-2021-292)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Capital Medical University (Approval Number: AEEI-2021-292). All experimental processes were conducted in accordance with the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

李梦实施研究、数据采集、统计分析和解释、起草文章;陈柏安和卢静对文章的知识性内容作批评性审阅,并提供指导。

[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] 钟民涛,黄敏,卢静,等.长爪沙鼠速发型高脂血症模型的初步建立[J].中国实验动物学报,2006,14(3):217-221. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2006.03.014.
ZHONG M T, HUANG M, LU J, et al. Establishment of a rapid hyperlipidemic gerbil model[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2006, 14(3):217-221. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2006.03.014.
- [2] 钟民涛,王迎,卢静,等.长爪沙鼠的高脂血症与动脉粥样硬化相关性分析[J].中国比较医学杂志,2006,16(6):321-324. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2006.06.001.
ZHONG M T, WANG Y, LU J, et al. Analysis of correlation between hyperlipidemia and atherogenesis in the gerbil[J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(6): 321-324. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2006.06.001.
- [3] 李长龙,杜小燕,王冬平,等.长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育及其发病机制研究进展[J].中国实验动物学报,2018,26(4):512-517. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.017.
LI C L, DU X Y, WANG D P, et al. Advances in research of the establishment of an inbred Mongolian gerbil model of cerebral ischemia and its mechanism of pathogenesis[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4):512-517. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.017.
- [4] 李巍,陈晓娟,张旭亮,等.长爪沙鼠非酒精性脂肪肝肝硬化模型的建立[J].中国老年学杂志,2019,39(13):3233-3238. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2019.13.048.
LI W, CHEN X J, ZHANG X L, et al. Establishment of a

- Mongolian gerbil model of nonalcoholic fatty liver disease cirrhosis[J]. *Chin J Gerontol*, 2019, 39(13):3233-3238. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2019.13.048.
- [5] 杜小燕, 李长龙, 王冬平, 等. 长爪沙鼠自发性糖尿病模型近交系培育及其生物学特性的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4):507-511. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.016.
- DU X Y, LI C L, WANG D P, et al. Research progress in the establishment of a spontaneous diabetic inbred gerbil and its biological characteristics[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(4):507-511. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.016.
- [6] 李振宗, 赵晖, 曹琦, 等. ND3、NF- κ B 在遗传性糖尿病长爪沙鼠肝脏、肾脏中的表达定位[J]. *实验动物科学*, 2018, 35(6):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2018.06.001.
- LI Z Z, ZHAO H, CAO Q, et al. Localization of ND3 and NF- κ B on livers and kidneys from hereditary diabetic Mongolian gerbils[J]. *Lab Anim Sci*, 2018, 35(6):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2018.06.001.
- [7] 李胜利, 乔欣, 王钜. 海人酸致沙鼠癫痫模型初探[J]. *实验动物科学与管理*, 2006, 23(4):16-17. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2006.04.006.
- LI S L, QIAO X, WANG J. The primary study on the establishment of a model of epilepsy induced by kainic acid in gerbils[J]. *Lab Anim Sci Manag*, 2006, 23(4):16-17. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2006.04.006.
- [8] 宋丹丹, 桂飞, 汪海燕, 等. 长爪沙鼠不同感音神经性耳聋模型的建立及比较[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2024, 42(1):70-75. DOI: 10.13880/j.cnki.65-1174/n.2023.22.043.
- SONG D D, GUI F, WANG H Y, et al. Establishment and comparison of sensorineural deafness models in Mongolian gerbils[J]. *J Shihezi Univ Nat Sci*, 2024, 42(1):70-75. DOI: 10.13880/j.cnki.65-1174/n.2023.22.043.
- [9] 叶瑞, 王莉君, 李先春, 等. 长爪沙鼠及其寄生虫感染模型组学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2023, 44(8):97-101. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2023.08.014.
- YE R, WANG L J, LI X C, et al. Progress on omics of Mongolian gerbil and its parasite infection models[J]. *Prog Vet Med*, 2023, 44(8):97-101. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2023.08.014.
- [10] 伍颖, 王诗媛, 胡彩姣, 等. Cystatin C 敲除诱导的长爪沙鼠抑郁模型[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(5):907-916. DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0115.
- WU Y, WANG S Y, HU C J, et al. Knockout of cystatin C induced depression model in gerbils[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2022, 49(5):907-916. DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0115.
- [11] 马兰芝, 李迎, 尚世臣, 等. CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠脏器系数的比较[J]. *实验动物科学*, 2019, 36(4):60-62, 67. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.014.
- MA L Z, LI Y, SHANG S C, et al. Comparison of the viscera coefficient of CMU/1 and CMU/2 inbred strains of gerbil[J]. *Lab Anim Sci*, 2019, 36(4):60-62, 67. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.014.
- [12] 王钜, 卢静, 陈振文, 等. 清洁级长爪沙鼠主要器官重量的测定[J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(4):221-223. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2004.04.007.
- WANG J, LU J, CHEN Z W, et al. Mensuration of main visceral weight in clean Mongolian gerbils[J]. *Chin J Lab Anim Sci*, 2004, 14(4):221-223. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2004.04.007.
- [13] 卢领群, 郭红刚, 石巧娟, 等. 不同月龄长爪沙鼠的肾脏组织学特征[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(1):61-66. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.130.
- LU L Q, GUO H G, SHI Q J, et al. Histological characteristics of the kidney in Mongolian gerbils of different ages[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(1):61-66. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.130.
- [14] PANNARALE G, CARBONE R, DEL MASTRO G, et al. The aging kidney: structural changes[J]. *J Nephrol*, 2010, 23(Suppl 15):S37-S40.
- [15] GOYAL V K, CHATTERJEE P C. Changes with age in mouse kidney[J]. *Exp Gerontol*, 1980, 15(3):151-160. DOI: 10.1016/0531-5565(80)90059-5.
- [16] 秦川, 谭毅. 医学实验动物学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 75.
- QIN C, TAN Y. Medical laboratory animal science [M]. 3rd. Beijing: People's Medical Publishing House, 2020: 75.
- [17] SENGUPTA P. The laboratory rat: relating its age with human's[J]. *Int J Prev Med*, 2013, 4(6):624-630.
- (收稿日期:2024-01-16 修回日期:2024-06-03)
(本文编辑:张俊彦,翟玉凤,丁宇菁,吴昊晟)

[引用本文]

李梦, 陈柏安, 卢静. 不同周龄段雄性长爪沙鼠肾小体的形态变化[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 487-494. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.011.

LI M, CHEN B A, LU J. Morphological changes of renal corpuscles in male Mongolian gerbils at different ages[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 487-494. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.011.



韩军涛, 男, 医学博士, 主任医师、教授。现任中华医学会烧伤外科分会委员, 中国医师协会烧伤外科分会常务委员, 陕西省医学会烧伤与创面修复委员会主任委员, 中国医药教育协会烧伤专业委员会副主任委员, 《中华烧伤杂志》和《中华损伤与修复杂志》等学术期刊编委。先后主持国家自然科学基金面上项目3项, 国家重点研发项目子课题1项, 参与国家自然科学基金课题5项, 主持军队及陕西省医药卫生科研基金课题4项。获国家科技进步二等奖1项, 中华医学科技奖一等奖1项, 陕西省科技进步一、二、三等奖各1项, 军队科技进步三等奖1项。2007年起入选国家自然科学基金评审专家库及教育部科技奖励和科技成果鉴定专家库。发表论文120余篇, 其中SCI论文40余篇, 主编及参编专著10余部。



潘登科, 博士, 二级研究员, 原为电子科技大学医学院生物医学工程博士生导师, 现任成都中科奥格生物科技有限公司首席科学家, 中华医学会器官移植学分会异种移植学组副组长, 四川省实验动物学会副理事长, 四川省实验动物学会医用猪专委会主任委员。2005年培育中国首例体细胞克隆猪, 2010年培育中国首例克服超急性排斥的基因敲除猪, 多年致力于基因工程供体猪培育及其异种移植临床应用, 培育10余种基因编辑供体猪。2018年创立中科奥格生物, 建立基因编辑供体猪繁育、验证、生物安全净化体系。2022年在国内率先开展基因编辑猪肝脏、肾脏、皮肤到人体的临床研究和临床治疗, 取得多项国内外首创成果, 发表论文100多篇, 获国家科技进步二等奖2项。

基因编辑猪-猴异种组织器官移植围手术期动物护理

朱 婵¹, 张栋梁¹, 赵德莉¹, 石雪琴¹, 千 磊², 张 玄³, 金 艳⁴, 段 伟⁵, 戚若晨⁶, 刘超华⁷, 杨薛康¹, 韩军涛¹, 潘登科⁸

(1. 空军军医大学第一附属医院全军烧伤中心/烧伤与皮肤外科, 西安 710032; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 空军军医大学第一附属医院肝胆外科, 西安 710032; 4. 空军军医大学第一附属医院心脏外科, 西安 710032; 5. 空军军医大学第一附属医院骨科, 西安 710032; 6. 空军军医大学第一附属医院泌尿外科, 西安 710032; 7. 空军军医大学第一附属医院整形外科, 西安 710032; 8. 成都中科奥格生物科技有限公司, 成都 610095)

[摘要] 目的 探讨基因编辑猪-猴异种组织器官移植围手术期的动物护理, 为提高猪-猴异种组织器官移植实验的成功率提供帮助。方法 2022年10月—2023年10月, 对行基因编辑猪-猴异种组织器官移植的7只受体恒河猴进行围手术期护理和伤口保护。根据体型及手术区域, 为受体猴定制伤口防护服以保护伤口, 同时做好围手术期精细化护理。其中, 术前护理包括术前准备、术前用药等; 术中护理包括生理指标监护和麻醉手术护理等; 术后护理包括伤口保护、观察监测、营养护理等。结果 7只恒河猴的异种组织器官移植手术均获得成功。通过伤口防护服的保护和精细化护理, 所有恒河猴手术伤口均一期愈合, 术后恢复良好。结论 做好猪-猴异种组织器官移植围手术期的护理和伤口保护, 不仅能促进伤口愈合, 还能减轻手术给动物带来的疼痛和伤害, 这对猪-猴异种组织器官移植的实验研究进展和提升动物福利均具有重要意义。

[关键词] 基因编辑猪; 异种器官移植; 恒河猴; 护理; 伤口保护装置; 实验动物福利

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0495-07



Perioperative Animal Care for Xenotransplantation from Genetically Edited Pigs to Monkeys

[基金项目] 陕西省重点研发计划“TIGIT-Fc 重组蛋白诱导异种移植免疫耐受的机制及应用”(2021SF-107); 空军军医大学第一附属医院2024年度医务人员培养助推立项资助计划“多基因编辑猪皮用于深度烧伤创面的安全性和有效性研究”(XJZT24LZ06)

[第一作者] 朱 婵 (1985—), 女, 本科, 主管技师, 研究方向: 烧伤康复。E-mail: xuanxuan85@163.com

[通信作者] 韩军涛 (1968—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 各种烧伤的综合救治。E-mail: hanjt@fmmu.edu.cn; 潘登科 (1972—), 博士, 研究员, 研究方向: 异种器官移植。E-mail: pandengke2002@163.com

ZHU Chan¹, ZHANG Dongliang¹, ZHAO Deli¹, SHI Xueqin¹, QIAN Lei², ZHANG Xuan³, JIN Yan⁴, DUAN Wei⁵, QI Ruocheng⁶, LIU Chaohua⁷, YANG Xuekang¹, HAN Juntao¹, PAN Dengke⁸

(1. Department of Burns and Cutaneous Surgery, Burn Center of PLA, the First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Laboratory Animal Centre, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 4. Department of Cardiac Surgery, the First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 5. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 6. Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 7. Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 8. Chengdu Clonorgan Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 610095, China)

Correspondence to: HAN Juntao, E-mail: hanjt@fmmu.edu.cn;

PAN Dengke, E-mail: pandengke2002@163.com

[ABSTRACT] Objective To discuss the perioperative care and wound protection of xenotransplantation from genetically edited pigs to monkeys, with the goal of improving the success rate of such experimental procedures. **Methods** From October 2022 to October 2023, perioperative care and wound protection were performed on 7 recipient rhesus monkeys undergoing xenotransplantation of genetically edited pig tissues and organs. Customized wound protective garments were designed based on monkeys' size and surgical area to protect the wounds, alongside meticulous perioperative care. This included preoperative preparation and medication, intraoperative monitoring of physiological indicators and anesthesia management, and postoperative care comprising wound protection, observation and monitoring, and nutritional support. **Results** All seven monkeys successfully underwent xenotransplantation. With the aid of protective garments and detailed care, all surgical wounds healed by first intention, and postoperative recovery was satisfactory. **Conclusion** Proper care and wound protection during xenotransplantation from genetically edited pigs to monkeys not only promote wound healing, but also alleviate pain and harm to animals. This has significant implications for advancing experimental research in pig-monkey xenotransplantation and enhancing animal welfare.

[Key words] Genetically edited pig; Xenotransplantation; Rhesus monkey; Care; Wound protection device; Laboratory animal welfare

器官移植是目前治疗器官衰竭、严重组织毁损患者的有效方法之一^[1]。然而，供体短缺是阻碍同种异体器官移植的最大难题^[2]。异种器官移植由于不受供体短缺因素影响，被认为是解决人类器官短缺最为有效的方法之一^[3]。尽管如此，由于免疫排斥、感染及组织适配等问题，异种器官移植还需要长期的实验探索^[4]。空军军医大学第一附属医院即西京医院自2013年启动基因编辑猪-猴多组织多器官移植项目以来，不断探索研究异种器官移植的适用范围及难题的对策，为异种移植技术服务临床提供了科学依据和技术支撑^[5]。然而，受体动物的生理及机体功能会在手术后发生明显的改变，加上疼痛、交流障碍、不能配合等因素，需要得到良好的术后护理，才能提高移植器官成活率，从而快速恢复健康。其中，如何保护伤口不被抓挠并促进伤口愈合是围手术期护理的一个重要组成部分。本文根据空军军医大学第一附属医院在2022—2023年对基因编辑猪-猴异种组织器官移植围

手术期护理和伤口保护的实践探索，介绍实验动物的围手术期护理和伤口保护经验，以供同行参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2022—2023年，本院开展多学科合作，分别将3只基因编辑猪的多个器官和组织（肝脏、肾脏、心脏、腹壁、角膜、骨、皮肤等）移植给7只受体恒河猴，该实验在空军军医大学实验动物中心[SYXK（陕）2019-001]进行。实验动物的使用和处理所涉及各个环节均依据国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条例》执行，遵从《实验动物福利伦理审查指南》^[6]及实验动物相关福利要求，并且通过原第四军医大学医学伦理委员会和空军军医大学第一附属医院医学伦理委员会审查批准（批件号分别为IACUC2022001和KY2023183-X-1）。

本实验所采用的3只基因编辑猪（耳号167、

3076、3175) 分别为7月龄、12月龄以及8月龄的雄性基因编辑巴马小型猪, 由四川中科奥格生物科技有限公司 [SCXK (川) 2020-0033] 提供, 体重为7~8 kg, 基因型分别为 GTKO/B4GalNT2KO/CMAHKO/CD55/CD46/TBM、GTKO/ β GalKO/CD55 和 GTKO/CD55/CD46/TBM。

本实验所有恒河猴均为雄性, 体重10~20 kg, 年龄8~15岁, 由四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所 [2004 驯繁 (21-01) 号、SCXK (川) 2018-02] 提供, 由陕西龙腾猕猴养殖公司负责转运。实验用猴提前4周运输至空军军医大学实验动物中心进行适应性饲养, 并由四川省医学科学院派遣人员负责管理驯化。

1.2 围手术期护理

1.2.1 术前准备

移植手术于2022年10月至2023年10月分批次完成。恒河猴在适应期间采取不同的给药方式, 如肌肉注射、皮下注射、静脉注射和口服等, 进行正向训练, 并提前穿上伤口防护服, 在饲养笼中自由活动, 观察并记录其适应能力。手术前1 d完成恒河猴的常规体检和生化指标检查, 全面了解其各项机能^[7]。恒河猴全身麻醉前禁食禁水12 h, 术前30 min肌肉注射20 mg/kg 头孢唑林钠 [购自石药集团中诺药业 (石家庄) 有限公司] 以预防感染。

1.2.2 术中护理

动物麻醉由专科麻醉医生进行。先使用舒泰-50 (购自法国 Virbac 公司, 含唑拉西泮 125 mg、替来他明 125 mg) 0.7~1.0 mL (4~5 mg/kg, 肌肉注射) 对恒河猴进行基础麻醉后, 转移至手术室。入手术室后即刻固定恒河猴四肢, 气管插管后, 连接呼吸机并转为机控模式 (容量控制在100 mL, 18次/min, I:E=1:2, O₂流量为1 L/min)。同时, 监测恒河猴无创血压、心电图、脉搏氧饱和度和鼻咽温度。使用20 G 静脉穿刺针穿刺上肢合适部位的静脉, 连接输液管路。在超声引导下, 进行有创动脉穿刺和深静脉穿刺, 成功后缝合固定并监测连续血压和中心静脉压。使用推毛剪剃光手术区域的毛发, 肥皂水刷洗、擦干后, 用2% 碘伏消毒, 以便进行肝、肾、心脏移植。术中将恒温毯置于恒河猴周围以保持体温, 温度设定为40 °C。

手术开始后每小时追加舒泰-50 3 mg/mL (0.3 mg/kg, 静脉推注), 同时给予维库溴铵 (购自宜昌人福药业有限责任公司) 2 mL/h (每小时0.02 mg/kg), 静脉

泵注维持, 确保猴无体动。恒河猴基础心率约110次/min, 血压约115/90 mmHg。如果心率超过130次/min, 则判断最大可能是麻醉偏浅, 予以加深麻醉, 并可间断吸入七氟醚 (购自日本丸石制药株式会社) (0.8%~1%) 术中维持麻醉。

麻醉后泵注万衡 (购自德国 Fresenius 集团) 30 min, 泵速100 mL/h (每小时10 mL/kg, 共输注50 mL, 根据生命体征进行调整), 随后使用乳酸林格氏液 (购自江苏恒丰强生物技术有限公司) 维持 (泵速80 mL/h), 视术中出入量调整输液速度。静脉通路建立后采用乳酸林格氏液按照4-2-1的麻醉补液原则进行补液, 如有心率过快、血压偏低的现象, 泵速可提高至每小时10 mL/kg, 即100 mL/h^[8]。

根据出血情况决定是否需要输血, 首选自体血回输, 出血125 mL以上可回输; 如需输异体血, 则由输血科协助配型, 所需异体血由四川省医学科学院提供。

1.2.3 术后护理

手术后悉心观察和护理恒河猴。术后延迟拔管, 将其转移至复苏床, 采用加热毯维持体温, 并给予足够的垫料, 佩戴脖套, 防止其在麻醉未清醒期受伤。通过静脉通路泵入镇静药物右美托咪定 (购自四川国瑞药业有限责任公司) 200 μ g (稀释到50 mL, 1 mL/h) 和芬太尼 (购自江苏恩华药业股份有限公司) 0.5 mg (稀释到25 mL, 0.2 mL/h), 持续进行呼吸支持, 并密切观察恒河猴的体温、呼吸、心率、氧饱和度和手术部位情况等。术后第2天, 恒河猴完全清醒后放回猴笼。在恒河猴放回猴笼后的24 h内, 每隔2 h观察其状态, 监测恒河猴体温、心率、血压、饮食、大小便及手术部位情况, 并记录。24 h后改为每日监测, 记录恒河猴的体温、心率、血压和体重等生命体征, 以及活动情况、饮食状况、大小便情况、精神状态和手术部位情况。

在麻醉苏醒后的4~6 h内, 由于吞咽肌功能还未能完全恢复, 因此不宜喂食喂水^[9]。一般根据恢复状况, 于麻醉苏醒后12 h饲喂。可选用少量柔软易消化的食物 (如香蕉、圆白菜等) 进行饲喂, 以后逐渐增加馒头、水果、坚果等喂养, 适时为猴笼饮水装置添加饮用纯净水, 必要时可输液来补充营养。术后5 d内, 每日1次肌肉注射20 mg/kg 头孢唑林钠以预防感染; 每日对放置猴笼的房间进行紫外线消毒。消毒时, 用黑色罩布遮盖猴笼, 防止紫外线对实验猴造成伤害^[10]。术后隔日, 辅助医生进行手术伤口换药 (异种

皮肤移植的包扎伤口除外)。

1.3 手术伤口的保护

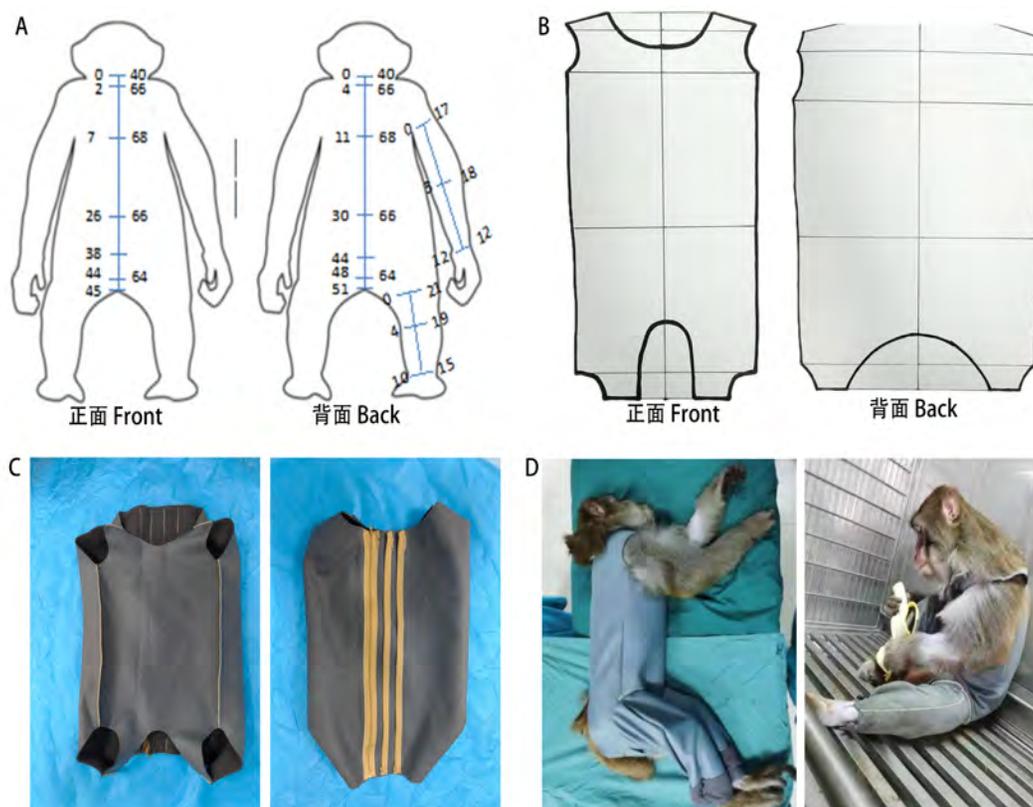
为避免恒河猴抓挠伤口造成伤口感染或开裂, 本实验中自制了一种伤口防护服, 可在不影响恒河猴活动进食的情况下保护伤口, 防止抓挠, 并能方便工作人员换药, 观察伤口愈合情况。

1.3.1 伤口防护服的制作

术前在麻醉状态下测量恒河猴的身体数据, 参考人体抗瘢痕压力衣的测量方法^[11]。背侧数据以第一颈椎为基准点, 腹侧数据以胸骨上缘为基准点, 沿中线向下测量, 并记录需要测量围径的标志点(图1A)。需要注意的是, 为不影响猴呼吸及大小便, 腹部纵向数值应较背部短。另外测量颈围、肩宽及四肢根部围径, 根据所测量的数据绘制图纸。将围径数值按3:2

的比例分配给背侧和腹侧, 分配好的围径均匀绘制于中线两侧, 于颈部边缘绘制肩部宽度的数据, 用光滑的曲线把所绘围径连接起来; 四肢部分根据四肢根部围径画出相应的凹陷形状。四肢根部围径数值按3:1的比例分配给腹侧和背侧, 即腹侧凹陷曲度更大。最后在腹侧的颈部和会阴部画出向内的圆弧, 圆弧大小以不影响实验猴呼吸和大小便为准。躯干部的手术伤口需制作马甲形防护服(图1B), 如伤口在四肢, 可加做袖子或者裤子。

根据图纸进行裁剪, 将裁剪好的布料对应缝合。为防止恒河猴锋利的爪子抓破伤口处的防护服, 可选择防抓挠的科技布(主要材料为聚氨酯)作为原材料, 并使用深灰色布料, 能够在一定程度上缓解恒河猴紧张不安的情绪。裁剪时背侧布料的其中一块在中线侧



注: A为身体测量数据(左为正面, 右为背面, 数据单位为cm); B为伤口防护服的设计图; C为成品(这是不包括四肢的基础款; 左为正面, 右为背面, 有多条拉链, 用于调整松紧度); D为行异种膝关节移植术后恒河猴穿戴伤口防护服(这是包含裤子的款式; 左为术后即刻, 右为术后一周)。

Note: A, Body measurements of a monkey (the left shows the front of the monkey, the right shows the back of it, unit: cm.) B, Design drawing of the wound-protective clothing. C, Finished suit (this is a basic sample without limb coverage; the left shows the front of the garment, the right with zippers shows the back of it). D, Rhesus monkeys wearing wound-protective clothing after xenograft knee joint transplantation (sample with pants; the left shows the monkey just after surgery, the right shows the monkey a week after surgery).

图1 异种组织器官移植围手术期的恒河猴伤口防护服制作过程

Figure 1 Manufacturing process of wound-protective garments for rhesus monkeys during perioperative period of xenotransplantation

预留 10 cm, 沿中线剪开, 便于缝装拉链。在背侧中线拉链旁边设置多条拉链, 每条拉链之间有 3 cm 的间隔, 可根据纱布包裹厚度选择不同位置的拉链链合, 以便调整衣服松紧 (图 1C)。

1.3.2 伤口防护服的穿戴

术前 3 d 缝制好伤口防护服, 给实验猴适应性穿着, 并观察伤口防护服对恒河猴日常生活及情绪的影响。手术后即刻为实验猴穿着防护服, 如有不合身, 则在术后苏醒过程中进行调整。术后如发现器官移植伤口区域的敷料松动或者防护服松动, 则立即更换 (图 1D)。

表 1 异种组织器官移植手术的受体恒河猴资料

Table 1 Information of recipient rhesus monkeys undergoing xenotransplantation surgery

编号 Number	性别 Sex	年龄/year Age/year	体重/kg Weight/kg	移植组织或器官 Transplanted tissue or organ	手术时长/h Operating time/h	并发症 Complication	存活时间/d Survival time/d	伤口愈合 Wound healing
1	雄	8	11.0	肝脏	7.5	无	14	I 期愈合
2	雄	9	11.2	心脏	4.0	无	20	I 期愈合
3	雄	10	10.0	肾脏	4.5	无	27	I 期愈合
4	雄	10	11.4	膝关节	4.0	无	>365	I 期愈合
5	雄	11	10.6	角膜和皮肤	6.5	无	>365	I 期愈合
6	雄	12	12.0	颅骨和神经	6.0	无	>365	I 期愈合
7	雄	15	17.5	全层腹壁组织	8.0	无	13	I 期愈合

注: 手术时长不包括取供体的时间。

Note: Surgical time does not include donor harvesting.

2.2 伤口防护服有利于异种移植受体恒河猴的伤口愈合

7 只恒河猴术后均穿戴伤口防护服来保护伤口免受抓挠。术前恒河猴穿上伤口防护服开始适应, 第 1 小时内因好奇会拉扯、抓挠防护服, 1 h 后基本适应。恒河猴穿着防护服时, 活动、进食基本不受影响, 也没有出现情绪暴躁等情况。通过伤口防护服的保护, 未发现恒河猴抓挠影响伤口愈合的情况, 所有手术伤口均于术后 7~14 d 达 I 期愈合 (图 2~3)。愈合后不再穿戴防护服。

3 讨论

猴是最常见的非人灵长类实验动物, 其在生理机能、形态结构和生化代谢等许多方面都与人类高度相似^[12]。因此, 应用猴进行科学实验研究对理解人类自身至关重要。基因编辑猪-猴异种组织器官移植实验的手术难度大、代价高, 需要多部门、多单位配合。手术前后每个环节都需要认真应对, 其中伤口保护是围

2 结果

2.1 异种移植术围术期恒河猴均成活

7 只恒河猴的异种组织器官移植手术均获得成功, 包括 1 例肝脏移植、1 例肾脏移植、1 例心脏移植、1 例神经移植、1 例膝关节移植、1 例腹壁组织移植和 1 例皮肤联合角膜移植。手术过程顺利, 无严重麻醉及围手术期并发症发生。移植术后, 所有恒河猴均顺利苏醒, 移植器官或组织均成活。术后随访中, 有 4 只恒河猴死于移植后相关并发症; 有 3 只存活已超过一年, 所移植器官仍有正常功能, 无相关并发症, 提示不因器官移植而影响生存 (具体资料见表 1)。



注: 左为术后即刻; 右为术后 10 d 拆线时。

Note: Left, immediately after surgery; Right, 10 days after surgery at the time of removing stitches.

图 2 行异种肾移植术后的恒河猴伤口愈合情况 (腹部伤口)
Figure 2 Wound healing of rhesus monkeys after xenogeneic kidney transplantation (abdominal wound)



注：从左到右依次为术后即刻、术后5 d、术后10 d、术后15 d和术后19 d。

Note: From left to right, they are immediately after surgery, 5 days after surgery, 10 days after surgery, 15 days after surgery and 19 days after surgery.

图3 行异种皮片移植术后的恒河猴皮片成活情况

Figure 3 Survival of skin grafts in rhesus monkeys after xenogeneic skin graft transplantation

手术期护理中非常重要的一个方面，如果护理不当，可能导致伤口撕裂、感染，从而影响到整个移植术结果。

实验猴从术前4周开始进行环境适应性训练，可消除其因突然到达陌生环境而引起的应激性反应，既可保障动物福祉，也可在一定程度上减轻术后并发症^[13]。术前伤口防护服的适应性穿着，可使实验动物适应防护服的束缚，不对防护服感到陌生，还可以根据具体情况实时调整防护服的大小。术前禁食禁水和术前用药非常关键，可有效减少手术相关的并发症，提高手术成功率。

组织器官移植手术创伤大，术后反应重，可能出现的并发症较多^[14]，因此术后护理非常关键。实验动物的术后恢复情况除了与术中操作、术后排斥反应，感染、移植器官适配等有关外，也与术后的护理有关，有时护理不良甚至可能导致实验失败，甚至动物死亡^[15]。伤口保护是术后护理的一个重要方面，尤其是异种皮片移植的实验，避免术后抓挠是实验成功的关键。以往大多采用限制动物活动的方式以达到保护实验动物伤口的目的，如在猴的肘关节和腕关节上佩戴支具，限制其触及伤口，但这样不仅会影响实验动物的活动和进食，还可能影响其情绪^[16]。本实验中制作的伤口防护服最大程度上保证了实验动物术后的正常活动和进食，也有效防止了其术后抓挠伤口。此外，由于恒河猴被毛浓密纤长，术区敷料固定困难，伤口防护服还可帮助固定伤口敷料，防止敷料脱落。

综上，在基因编辑猪-猴多组织多器官移植围手术期，精细的围手术期护理和合适的伤口保护对于手术和实验的成功非常重要。术前准备为手术的成功实施创造了最好的条件，且降低了手术并发症的发生风险。伤口防护服的开发应用，不仅可以在不影响实验动物

活动和进食的基础上有效保护伤口，同时还可以减少实验人员的工作量。精细的术后护理能够有效降低动物手术死亡率，提高实验动物生活质量，避免不必要的重复手术和实验，同时减轻对动物造成的疼痛和伤害，尽最大可能地使用较少量动物获取实验所需数据。

【医学伦理声明 Medical Ethics Statement】

本研究涉及的动物实验均已通过原第四军医大学医学伦理委员会和空军军医大学第一附属医院医学伦理委员会批准（项目批准号分别为IACUC2022001和KY2023183-X-1）。各实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Medical Ethics Committee of the Fourth Military Medical University of the PLA (Approval No: IACUC2022001) and the Medical Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of the Air Force Medical University (Approval ID: KY2023183-X-1). All experimental procedures were performed in accordance with Chinese laws and regulations related to experimental animals.

【作者贡献 Author Contribution】

朱婵负责论文撰写和修改，收集实验数据，以及伤口防护服制作；
张栋梁参与论文撰写和修改，收集数据；
赵德利、石雪琴和干磊负责围手术期动物管理；
张玄、金艳、段伟、戚若晨和刘超华参与动物手术，收集实验数据；
杨薛康和韩军涛负责实验协调，参与动物手术，审核论文；
潘登科负责多基因编辑猪的设计及制备。

【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] PATEL M S, LOURAS N, VAGEFI P A. Liver xenotransplantation[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2017, 22(6): 535-

540. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000459.
- [2] STEPHAN A. Organ shortage: can we decrease the demand? [J]. *Exp Clin Transplant*, 2017, 15(Suppl 1):6-9. DOI: 10.6002/ect.mesot2016.L27.
- [3] WALTZ E. When pig organs will fly[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(12):1133-1138. DOI: 10.1038/nbt.4027.
- [4] ZHOU Q, LI T, WANG K W, et al. Current status of xenotransplantation research and the strategies for preventing xenograft rejection[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 928173. DOI: 10.3389/fimmu.2022.928173.
- [5] 张玄, 王琳, 张洪涛, 等. 多基因编辑猪-猴心脏、肝脏、肾脏移植临床前研究初步报道[J]. *器官移植*, 2021, 12(1):51-56. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2021.01.008.
- ZHANG X, WANG L, ZHANG H T, et al. Preliminary report of preclinical trial of multi-genome engineering pig-to-macaque heart, liver and kidney transplantation[J]. *Organ Transplant*, 2021, 12(1):51-56. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2021.01.008.
- [6] 孙德明, 李蔚鸥, 王天奇, 等. 实验动物福利伦理审查的标准化与我国新国标解读[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(10):133-137. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.023.
- SUN D M, LI W O, WANG T Q, et al. Standardization of ethical review for laboratory animal welfare and interpretation of the new national standards in China[J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(10):133-137. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.023.
- [7] 张冰, 姬鹏飞, 彭岚刚, 等. 基因编辑“猪-恒河猴”异位心脏异种移植的围术期治疗及管理经验[J]. *中国体外循环杂志*, 2023, 21(4): 232-236. DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2023.04.11.
- ZHANG B, JI P F, PENG L G, et al. Preclinical treatment procedure and experience of gene-edited pig-*Rhesus* heterotopic heart xenotransplantation[J]. *Chin J Extracorp Circ*, 2023, 21(4):232-236. DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2023.04.11.
- [8] 白鸽, 李霄, 张虹, 等. 五指山小型猪-藏酋猴异种肝移植的术前检测[J]. *实用器官移植电子杂志*, 2018, 6(5):355-358. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2018.05.004.
- BAI G, LI X, ZHANG H, et al. Pre-operative detection of Wuzhishan miniature pig-Tibetan monkey xenotransplantation[J]. *Pract J Organ Transplant Electron Version*, 2018, 6(5):355-358. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2018.05.004.
- [9] 徐西彬, 朱青, 张恩. 电极植入猕猴脑皮层手术的护理实践及探讨[J]. *实验动物与比较医学*, 2022, 42(2):166-170. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.078.
- XU X B, ZHU Q, ZHANG E. Nursing practice and discussion of electrode implantation into cerebral cortex of *Rhesus* monkey[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2022, 42(2):166-170. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.078.
- [10] 王宏. 实验猕猴在生物医学研究中的福利管理[J]. *生命科学*, 2020, 32(7):711-716. DOI: 10.13376/j.cbbs/2020089.
- WANG H. Welfare management of experimental Rhesus monkey in biomedical research[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2020, 32(7):711-716. DOI: 10.13376/j.cbbs/2020089.
- [11] 胡大海, 易南, 朱雄翔. 实用烧伤康复治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- HU D H, YI N, ZHU X X. *Practical burn rehabilitation therapy* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016.
- [12] LU T Y, YANG B C, WANG R L, et al. Xenotransplantation: current status in preclinical research[J]. *Front Immunol*, 2020, 10:3060. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03060.
- [13] DENNER J. Virus safety of xenotransplantation[J]. *Viruses*, 2022, 14(9):1926. DOI: 10.3390/v14091926.
- [14] ZHANG X, WANG Q C, ZHAO J J, et al. The resurgent landscape of xenotransplantation of pig organs in nonhuman Primates[J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(5): 697-708. DOI: 10.1007/s11427-019-1806-2.
- [15] 中国肝移植注册中心, 国家肝脏移植质控中心, 国家人体捐献器官获取质控中心, 等. 中国移植器官保护专家共识(2022中文版)[J]. *中华外科杂志*, 2022, 60(5):409-423. DOI: 10.3760/cma.j.cn112139-20220223-00078.
- China Liver Transplant Registry, National Center for healthcare quality management in liver transplant, National Quality Control Center for Human Donated Organ Procurement, et al. The Chinese expert consensus on organ protection of transplantation(2022 edition) [J]. *Chin J Surg*, 2022, 60(5): 409-423. DOI: 10.3760/cma.j.cn112139-20220223-00078.
- [16] KAMBERI S, MEIER R P H. Xenotransplantation literature update March 2021-March 2023[J]. *Xenotransplantation*, 2023, 30(3): e12805. DOI: 10.1111/xen.12805.
- (收稿日期: 2024-03-12 修回日期: 2024-08-06)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 张萍)

[引用本文]

- 朱婵, 张栋梁, 赵德莉, 等. 基因编辑猪-猴异种组织器官移植围手术期动物护理[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 495-501. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.043.
- ZHU C, ZHANG D L, ZHAO D L, et al. Perioperative animal care for xenotransplantation from genetically edited pigs to monkeys[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 495-501. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.043.

不同发育时期小鼠代谢笼实验的最佳适应期探讨

谭 贺, 杨晓辉, 张大秀, 王贵成

(复旦大学发育生物学研究所, 上海 200433)

[摘要] **目的** 探究小鼠代谢笼实验中不同发育时期小鼠的最佳适应时间, 以期为利用小鼠开展代谢研究提供参考。**方法** 使用3个发育阶段(离乳期M1、青春期M2和成年期M3)的雄性C57BL/6J小鼠共80只进行为期7 d的代谢笼实验, 每5 min记录小鼠摄食、饮水、能量消耗、呼吸商、体重和活动水平等数据。通过时间序列分解和综合聚类分析对数据进行处理, 采用重复测量方差分析法并结合t检验进行统计学差异比较, 以推断最佳适应时间。**结果** 不同发育阶段的小鼠代谢活动存在明显差异 ($P<0.01$)。与M2和M3小鼠相比, M1小鼠的运动水平较低 ($P<0.01$), 并且昼夜节律不明显。M1小鼠具有更高的氧气消耗量、二氧化碳呼出量和能量消耗水平, 以及较低的呼吸商 (均 $P<0.001$), 表明其主要以脂肪作为能量来源。对摄食、饮水和能量消耗等因素进行分析后发现, 各发育阶段的小鼠在第1个光周期(0~12 h)与第2个光周期之间(24~36 h)存在明显差异 (均 $P<0.05$), 而24 h后每日摄食量、饮水量不再有明显差异 (均 $P>0.05$)。综合多指标进行聚类分析后发现, 小鼠在进入代谢笼的前24 h综合指标与后续6 d的综合指标不成簇, 出现离群, 表现出明显差异。**结论** 小鼠代谢笼实验可以用于检测小鼠连续的生理学指标变化, 结果提示小鼠进入代谢笼24 h就可以适应新的代谢笼环境, 这为小鼠代谢实验设计提供了理论依据。

[关键词] 代谢笼; 适应期; 摄食; 饮水; 聚类分析; 小鼠

[中图分类号] Q4-33; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0502-09



Optimal Adaptation Period for Metabolic Cage Experiments in Mice at Different Developmental Stages

TAN He, YANG Xiaohui, ZHANG Daxiu, WANG Guicheng

(Institute of Developmental Biology and Molecular Medicine, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Correspondence to: WANG Guicheng (ORCID: 0000-0002-3979-419X), E-mail: wangguicheng@fudan.edu.cn

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the optimal adaptation period for mice at different developmental stages during metabolic cage experiments, aiming to provide a reference for conducting metabolic research using mice. **Methods** A total of 80 male C57BL/6J mice at three developmental stages (weaning period M1, adolescent M2, and adulthood M3) were subjected to a 7-day metabolic cage experiment. Data on food intake, water intake, energy expenditure, respiratory quotient, body weight, and activity levels were recorded every five minutes. The collected data were processed using time series decomposition and comprehensive cluster analysis. Statistical differences were compared using repeated measures ANOVA combined with t-test to determine the optimal adaptation period. **Results** Significant differences in metabolism were observed among mice in different developmental stages ($P<0.01$). Compared with adolescent (M2) and adult (M3) mice, weaned mice (M1) exhibited lower activity level ($P<0.01$) and less distinct circadian rhythm. M1 mice had higher oxygen consumption, carbon dioxide production, and energy expenditure, as well as a lower respiratory quotient (all $P<0.001$), indicating that they mainly relied on fat as an energy source. Analysis of food intake, water intake, and energy expenditure revealed significant differences between the first light cycle (0-12 h) and the second light cycle (24-36 h) across all developmental stages (all $P<0.05$). However, there was no significant difference in daily food intake or water intake after 24 hours (both $P>0.05$). Comprehensive cluster analysis of multiple indicators showed that the overall indicators of mice during the first 24 hours in the metabolic cages did not cluster with those of the subsequent 6 days, demonstrating significant differences. **Conclusion** Metabolic cage

[第一作者] 谭 贺(1980—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 实验动物表型分析。E-mail: tanhe@fudan.edu.cn

[通信作者] 王贵成(1985—), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 实验动物平台建设。E-mail: wangguicheng@fudan.edu.cn。ORCID: 0000-0002-3979-419X

experiment can be used to detect continuous physiological changes in mice. The results suggest that mice can adapt to new metabolic cages environment within 24 hours, providing a theoretical basis for the design of metabolic experiments using mice.

[Key words] Metabolic cage; Adaptation period; Food intake; Water intake; Cluster analysis; Mice

近年来,代谢性疾病(如高脂血症、高血压病、糖尿病、肥胖、高尿酸血症等)的发病率和死亡率逐年攀升,对人体健康和生命安全造成严重影响,已成为公共卫生领域关注的一个焦点^[1]。此类疾病的发病率随年龄增长而上升^[2],但其潜在的病理生理机制目前尚未完全阐明,相关概念和标准也尚不明确。因此,了解代谢性疾病的发病机制和早期诊断标准具有重要意义。

为探究代谢性疾病的发生风险和致病机制,研究人员常使用小鼠或大鼠代谢异常模型进行实验^[3-5],其中监测动物代谢与行为指标是评价模型构建成功与否的关键。代谢笼是一种可连续测量和记录实验动物代谢与行为指标的分析系统,广泛应用于研究^[6-8]。代谢笼包含活动、食物、水、氧气和二氧化碳等检测模块,以及数据记录和存储等模块,用以对实验动物进行连续监测^[9]。为确保数据准确,通常在一个笼内只放置一只实验动物。鉴于代谢和行为指标具有周期性特点,代谢笼实验通常持续24 h以上。但是研究发现,单调的独居环境、较小的活动空间和密集分布的金属材料可引发实验小鼠或大鼠出现应激和不适反应^[10-15]。代谢笼中的独居环境会降低大鼠的药物代谢能力^[16]。长时间在代谢笼中饲养的小鼠易出现氧化应激水平、皮质酮水平和肌酐排泄量显著增加的现象。因此,多项实验指南建议缩短小鼠在代谢笼中的时间^[17]。

然而,为了获得稳定可靠的后续实验数据,常需要动物适应新环境和位置。因此,代谢笼实验中的适应期设置至关重要。适应期过短可能导致实验数据受环境因素影响;过长则增加时间和经济成本,同时可能影响小鼠的生理和心理状态。另外,适应期受多种因素影响,如实验环境、操作和小鼠特征等,并无固定准则。基于以上考虑,本研究使用不同发育时期的C57BL/6J小鼠进行代谢笼实验前的适应期监测,通过周期性检测确定稳定指标的时间点,以期为同领域研究者提供实验适应期的设计依据,并为其他实验平台提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养条件

根据 Dutta 等^[18] 对小鼠年龄的分期标准,选择3

个发育阶段的SPF级C57BL/6J小鼠共80只:离乳期(M1,出生后21~28 d,24只)、青春期(M2,出生后29~42 d,24只)、成年期(M3,出生后43~70 d,32只)进行实验研究。实验小鼠来源于美国杰克逊实验室(JAX序列号:1045045),小鼠引进后一直饲养在复旦大学发育生物学研究所的实验动物屏障设施[SYXK(沪)2020-0032]。鉴于雄性小鼠对独居环境具有更强的适应能力^[19],故本实验选取雄性小鼠作为研究对象。实验动物屏障设施内环境温度为22~24℃,相对湿度为40%~70%,昼夜光照节律12 h(8:00~20:00)。在代谢分析期间使用与小鼠饲养室相同的酸化水、饲料与垫料,以减少小鼠需要适应的环境因素。所有小鼠饲养及实验操作均遵循《复旦大学发育生物学研究所动物管理与使用指南》(2020)的要求,实验方案通过复旦大学发育生物学研究所动物管理委员会批准(No. IDM2021093)。

1.2 实验仪器及其参数设置

高分辨率多通路小鼠呼吸运动测量系统购自美国Sable Systems International公司(型号Promethion core),实验中使用生活笼、环境监测模块、代谢监测模块、质量监测模块和位置监测模块,1次实验中平行进行8笼检测。实验中小鼠的体重、摄食与饮水情况监测使用通用型MM-1质量测量模块进行,MM-1提供0.002 g分辨率的测量结果;笼盒中的代谢相关空气指标由美国Sable Systems International公司的Promethion代谢筛查用GA3m2气体分析仪测量,获得二氧化碳、氧气等的含量变化数据;小鼠行为学指标数据由美国Sable Systems International公司的Promethion BXYZ Beambreak活动监测仪记录,获得小鼠的移动距离和步行距离。

每次实验开始前1 d将实验所需笼具、饲料盒以及气体通道进行高温高压灭菌,水瓶经过紫外消毒室消毒后组装,笼具底部铺一层垫料。在进行气体与模块校准后建立检测文件,水瓶与饲料盒在MM-1测量模块下悬挂过夜,次日检查以防止水瓶泄漏。检测正式开始于次日早上8时,实验小鼠于8:00左右从饲养室取出,8:10放入笼具。

1.3 小鼠运动及代谢数据的采集

80只小鼠进行了为期7 d的代谢笼实验,实验周期

内每5 min进行一次实验数据采集,经软件处理后生成csv文件。能量消耗(energy expenditure, EE)与呼吸商(respiratory quotient, RQ)是代谢笼实验中被广泛关注的2个指标,研究中常采用这2个指标的稳定时间作为最短适应时间。能量消耗水平通过检测氧气消耗量(VO_2)和二氧化碳呼出量(VCO_2),然后根据Weir公式 $[EE(kcal/d) = (3.9 \times VO_2 + 1.1 \times VCO_2) \times 1.44]$ 计算得到。呼吸商代表动物在不同运动强度或生理状态下机体消耗脂肪或碳水化合物的比例,其通过生成二氧化碳和消耗氧气的比率($RQ = VCO_2 / VO_2$)计算得到。 X 、 Y 、 Z 轴移动频率和步行距离可反映小鼠探索新事物的天性,这2个指标的稳定时间象征着探索期结束时间。总运动距离反映小鼠在代谢笼环境中的整体运动强度。食物摄入、饮水与体重是反映小鼠适应期效果的3个指标,当这3个指标稳定时,认为小鼠已经适应新环境^[20]。

在本研究中,选择能量消耗、呼吸商、体重、食物摄取、饮水和活动水平等作为小鼠对环境适应程度的指标。以24 h为周期,对数据进行时间序列分解和综合聚类分析,以判断小鼠的适应时间。

1.4 统计学方法

使用SPSS 26.0软件进行各指标数据的统计分析,然后采用Python 3.12.2软件进行数据可视化处理和统筹分析。结果数据以平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm se$)表示,采用重复测量方差分析3个发育阶段统计数据的差异显著性,并采用双侧 t 检验进行组内前后两天指标的比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的运动水平与年龄相关

小鼠进入新环境后通常会经历几个不同的适应阶段:第一阶段是畏惧期,此阶段小鼠刚进入新环境,通常会在角落蜷缩身体,判断环境是否有威胁存在;第二阶段是探索期,此阶段小鼠多数会沿边界运动并探索周围环境;第三阶段为适应期,此阶段小鼠基本可以适应当前环境,不再恐惧并且恢复正常的进食、饮水和打理毛发等行为。

在实验过程中,剔除部分小鼠状态恶化或中途死亡、代谢笼盒传感器故障和水瓶泄漏等数据后,共有48只小鼠(M1即离乳期8只, M2即青春期16只, M3即成年期24只)的活动和代谢数据纳入统计。对于纳入统计的小鼠,统计其在代谢笼中对 X 、 Y 、 Z 轴红外

射线矩阵的打断次数(反映移动频率)。结果显示, M1小鼠在 X 、 Z 轴上移动频次显著低于M2小鼠($P < 0.01$, $P < 0.001$)和M3小鼠($P < 0.01$, $P < 0.001$) (图1A~C)。统计各个发育时期的小鼠在代谢笼中每5 min的运动距离,结果显示, M1小鼠在每5 min内的运动距离显著短于M2小鼠($P < 0.01$)和M3小鼠($P < 0.05$),并且呈现出较差的昼夜节律(图1D~F)。以上结果提示,小鼠的运动水平与其发育阶段密切相关。

2.2 小鼠的代谢能力与年龄相关

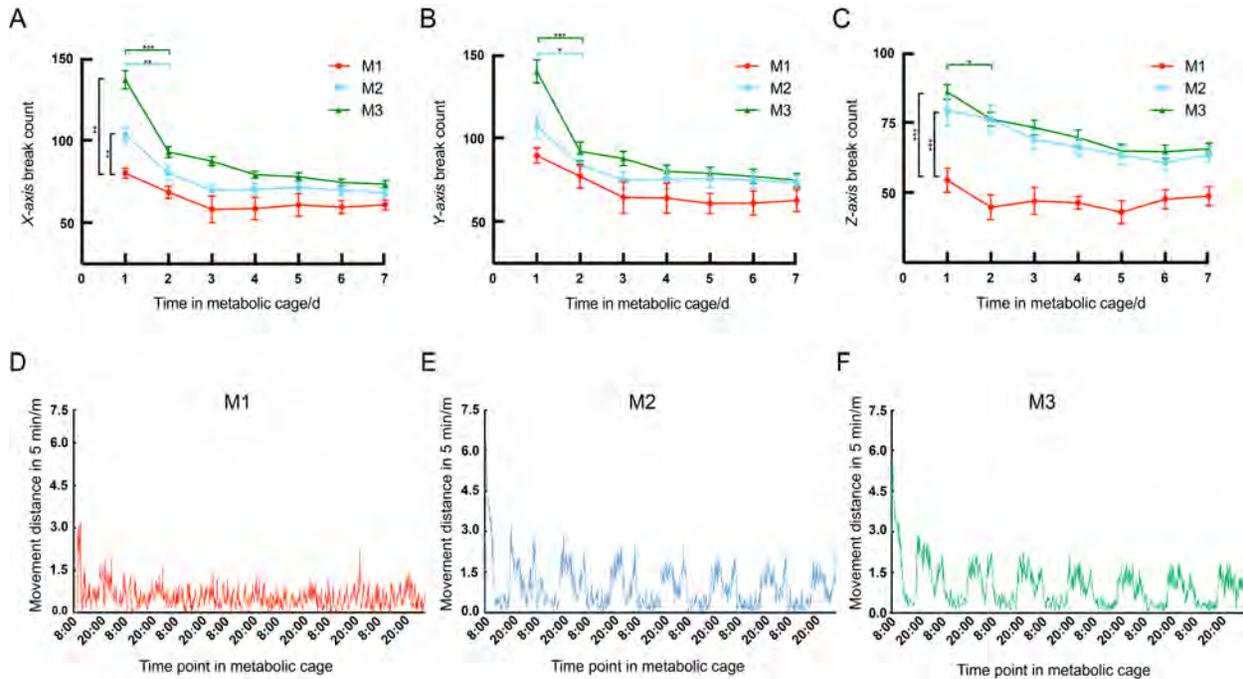
随着年龄增长,小鼠在代谢笼中的氧气消耗量(4.586 ± 0.247 7、 4.020 ± 0.277 、 3.602 ± 0.168 6)和二氧化碳呼出量(3.489 ± 0.199 2、 3.109 ± 0.164 0、 2.984 ± 0.205 8)逐渐降低,离乳期(M1)小鼠的氧气消耗量和二氧化碳呼出量显著高于青春期(M2)和成年期(M3)小鼠(均 $P < 0.001$,图2A~B)。通过Weir公式计算得到的能量消耗水平也同样逐渐降低(0.527 ± 0.005 1、 0.460 ± 0.002 9、 0.420 ± 0.001 9), M1小鼠显著高于M2和M3小鼠(均 $P < 0.001$,图2C)。不同发育阶段小鼠的呼吸商存在差异, M3小鼠明显高于M2和M3小鼠(均 $P < 0.001$,图2D)。尽管成年期小鼠的呼吸商仍然较低,表明脂肪是主要的能量来源,但随着年龄增长,能量来源从以脂肪高占比向以碳水化合物高占比转化。以上结果提示,小鼠的代谢能力随着年龄发生变化。

2.3 小鼠适应能力随时间变化

对小鼠各项适应能力数据进行整理分析,第1天(0~24 h时间段)和第2天(24~48 h时间段)的饮食数据比后发现,小鼠的摄食量和饮水量没有显著差异($P > 0.05$);同样,第2天(24~48 h时间段)和第3天(48~72 h时间段)的摄食量和饮水量也没有显著差异($P > 0.05$)。结果表明,在24 h时间内,小鼠已经可以正常进食和饮水,并在后续实验周期内趋于稳定(表1)。

3个发育时期的小鼠在 X 、 Y 、 Z 轴上的运动水平随时间变化(图1A~C)。进一步对小鼠在 X 、 Y 、 Z 轴上运动打断射线的频次总和进行比对分析后发现, M2和M3小鼠在第1天的运动水平显著高于第2天及后续实验周期(均 $P < 0.001$,表1)。结果说明代谢笼实验第1天时小鼠处于探索代谢笼环境的适应阶段;小鼠在第2天及后续实验周期内各个方向上的运动水平稳定,说明此阶段小鼠已对代谢笼环境有了很好的适应能力。

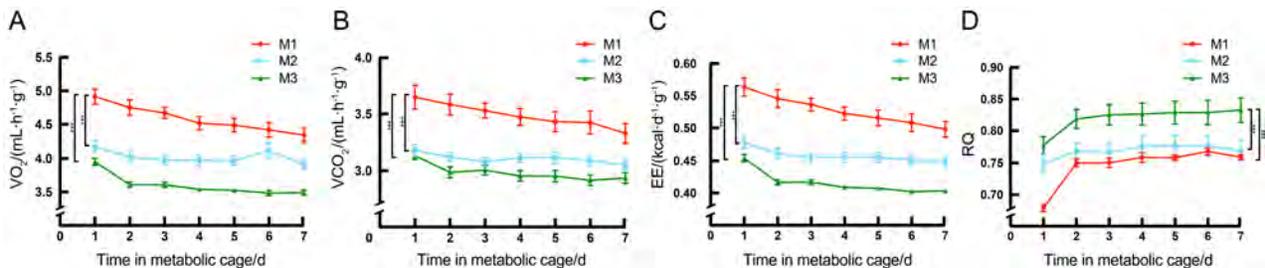
为了精确探究小鼠对新环境的适应时间,对前2 d



注：A~C，小鼠在X轴、Y轴和Z轴上打断红外射线的频次，离乳期（M1， $n=8$ ）小鼠在X和Z轴上运动频次显著低于青春期（M2， $n=16$ ）和成年期（M3， $n=24$ ）小鼠（ $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ ， $^{***}P<0.001$ ）；D~F，M1、M2和M3小鼠每5 min在所有方向上的运动距离总和。
 Note: A-C, Frequency of infrared beam interruptions on X, Y, Z axes, the movement frequencies of weaned mice (M1, $n=8$) on X and Z axes was significantly lower than that of adolescent (M2, $n=16$) and adult (M3, $n=24$) mice ($^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ ， $^{***}P<0.001$); D-F, Total movement distance of M1, M2, M3 mice in all directions every 5 minutes in metabolism cage.

图1 不同发育阶段的C57BL/6小鼠在代谢笼内的活动水平比较

Figure 1 Comparison of activity levels of C57BL/6 mice at different developmental stages in metabolism cages



注：A，氧气消耗量的变化；B，二氧化碳呼出量的变化；C，能量消耗（EE）水平的变化；D，小鼠代谢笼中呼吸商（RQ）变化。离乳期（M1， $n=8$ ）小鼠的 O_2 消耗水平、 CO_2 呼出水平和能量消耗水平显著高于青春期（M2， $n=16$ ）小鼠和成年期（M3， $n=24$ ）小鼠（ $^{***}P<0.001$ ），而M3小鼠的RQ显著高于M1和M2小鼠（ $^{***}P<0.001$ ）。以上数据均以体重（g）为基准进行校正，结果以 $mean\pm SEM$ 表示，统计学显著性差异通过重复测量数据方差分析给出。

Note: A, Changes in oxygen consumption; B, Changes in carbon dioxide exhalation; C, Changes in energy expenditure (EE) levels; D, Changes in metabolism cage respiratory quotient (RQ) in mice. O_2 consumption, CO_2 exhalation, and EE of weaned mice (M1, $n=8$) were significantly higher than those of adolescent (M2, $n=16$) and adult (M3, $n=24$) mice ($^{***}P<0.001$). RQ of M3 mice was significantly higher than that of M1 and M2 mice ($^{***}P<0.001$). Data were calibrated on body mass (g), and results were expressed as $mean\pm SEM$, statistically significant differences were shown by repeated measures ANOVA.

图2 不同发育阶段的C57BL/6小鼠在代谢笼中的代谢活动变化

Figure 2 Metabolic activity changes of mice in metabolism cages across 3 age groups

的情况进行了详细研究，特别是比较了第1个光周期（0~12 h）和第2个光周期（24~36 h）内小鼠的摄食量和饮水量变化。结果显示，M1小鼠在第1个光周期

与第2个光周期之间的摄食量和饮水量都存在显著差异（ $P<0.05$ ， $P<0.001$ ），M2小鼠的摄食量和饮水量差异不明显，M3小鼠仅摄食量有显著差异（ $P<0.001$ ，

表1 小鼠进入代谢笼内前3 d的各指标适应效果评价

Table 1 Evaluation of adaptation effects on various indicators in metabolic cages during the first three days

		($\bar{x} \pm se$)		
适应时间	指标	离乳期(M1)	青春期(M2)	成年期(M3)
Adaptation time	Indicators	Weaned (M1)	Adolescent (M2)	Adult (M3)
第1天 0-24 h	摄食量/g	4.43±1.12	4.27±1.02	5.02±1.51
	饮水量/mL	3.38±0.62	2.98±0.59	3.50±1.01
	XYZ轴移动频次/次	222.21±23.20	289.41±40.00	368.90±39.49
第2天 24-48 h	摄食量/g	4.69±0.80	4.25±0.99	4.50±1.21
	饮水量/mL	3.57±0.73	3.15±0.75	3.44±0.77
	XYZ轴移动频次/次	186.22±32.15	240.27±32.29***	264.98±36.63***
第3天 48-72 h	摄食量/g	4.78±1.00	3.82±0.67	4.78±1.14
	饮水量/mL	4.78±1.00	3.05±0.66	3.43±0.82
	XYZ轴移动频次/次	168.21±54.76	213.24±24.71***	250.81±25.62***

注: XYZ轴移动频次为小鼠在X、Y、Z轴上运动打断射线的频次总和。以第1天作为对照组, *** $P < 0.001$ 。

Note: XYZ movement frequency is the total number of interruptions of infrared beams on the X, Y, and Z axes. Compared to the first day, *** $P < 0.001$.

表2)。结果说明, 不同年龄小鼠适应摄食和饮水的时间略有不同, 但24 h内都会趋于稳定。

表2 小鼠进入代谢笼内第1个与第2个光周期的各指标适应效果评价

Table 2 Evaluation of adaptation effects on various indicators in metabolic cages during the first and second light periods

		($\bar{x} \pm se$)		
适应时间	指标	离乳期(M1)	青春期(M2)	成年期(M3)
Adaptation time	Indicators	Weaned (M1)	Adolescent (M2)	Adult (M3)
第1个光周期 0-12 h	摄食量/g	1.52±0.44	1.16±0.47	1.58±0.72
	饮水量/mL	0.44±0.29	0.37±0.25	0.49±0.34
第2个光周期 24-36 h	摄食量/g	2.03±0.45*	1.05±0.47	0.95±0.42***
	饮水量/mL	1.29±0.43***	0.54±0.35	0.67±0.31

注: M1为离乳期小鼠; M2为青春期小鼠; M3为成年期小鼠。以第1个光周期作为对照组, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

Note: M1, weaned mice; M2, adolescent mice; M3, adult mice. Compared to the first light cycle, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

在3个不同发育阶段的小鼠中, M1、M2小鼠的氧气消耗量、二氧化碳呼出量和能量消耗水平在第1天和第2天之间无显著差异(均 $P > 0.05$), 但M3小鼠的氧气消耗量、二氧化碳呼出量和能量消耗水平在第1天和第2天之间存在显著差异(均 $P < 0.05$, 图2)。基于上述多项指标的综合考量可知, 3个发育阶段的小鼠在进入新环境的24 h内已经成功适应。

2.4 代谢笼环境中小鼠适应时间的可视化处理

为了更加直观地分析3个发育阶段小鼠的代谢指

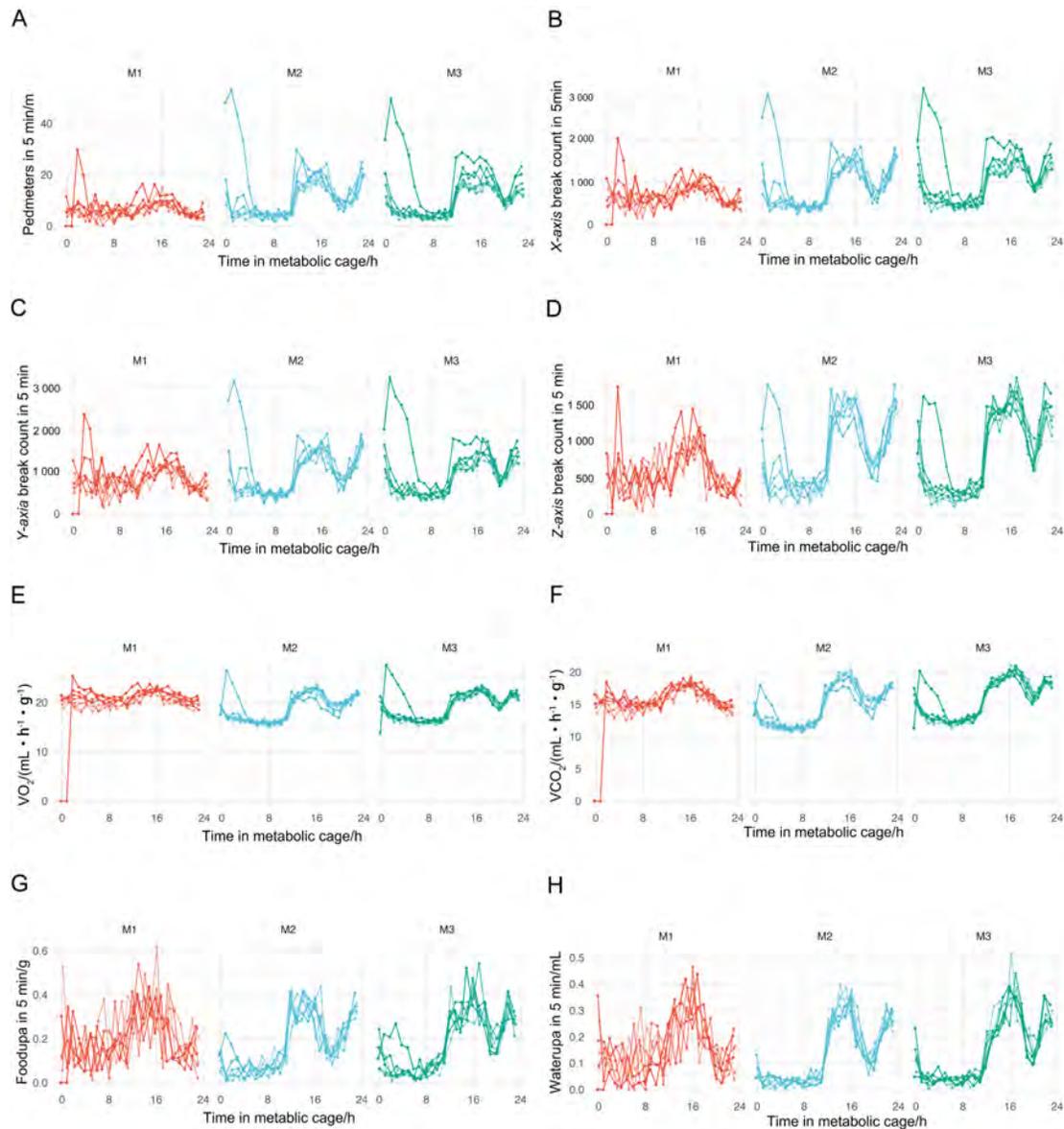
标变化, 运用Python软件对收集到的小鼠代谢笼数据进行分析。选取每5 min内所有定向运动距离总和、在XYZ轴上的移动频次、氧气消耗量、二氧化碳呼出量、摄食量和饮水量等指标进行可视化处理。结果显示, 每5 min内所有定向运动总和以及X、Y、Z轴上的移动频次这4个运动指标在第1天都显著高于后续周期。同样地, 第1天的氧气消耗量、二氧化碳呼出量和摄食量指标数据出现了偏高的离散曲线, 后续阶段的数据趋于稳定且与小鼠在光周期与暗周期的活动和生理状态相吻合, 呈现在光周期内活动水平和氧气消耗水平低, 暗周期内活动水平和氧气消耗水平高的特点(图3)。

2.5 代谢笼环境中小鼠适应时间的聚类分析

运用Python软件的K-means算法对氧气消耗量、二氧化碳呼出量、呼出水含量、能量消耗、呼吸商、每5 min内所有定向运动总和、总运动距离、摄食量和饮水量指标进行聚类分析。分析结果显示, M1小鼠的第1天数据(M1_1)与后续6 d的数据(M1_2~M1_7)相分离, 不能形成聚类; M2和M3小鼠同样呈现了第1天与后续6 d数据离散的结果, 不能形成聚类(图4)。综上所述, 各个发育时期的C57BL/6小鼠在进入代谢笼环境后, 仅需24 h便能适应环境, 随后可开始收集代谢数据。

3 讨论

本研究使用的Promethion系统采用流式呼吸测量法检测代谢率, 使用各种传感器技术监测食物和水的



注：A，小鼠在代谢笼中每5 min内所有方向上的运动总和；B，小鼠每5 min在X轴上的运动频次；C，小鼠每5 min在Y轴上的运动频次；D，小鼠每5 min在Z轴上的运动频次；E，小鼠在代谢笼中消耗氧气的变化；F，小鼠在代谢笼中呼出二氧化碳的变化；G，小鼠在代谢笼中每5 min内摄取食物的质量；H，小鼠在代谢笼中每5 min内饮水量。M1为离乳期小鼠；M2为青春期小鼠；M3为成年期小鼠。

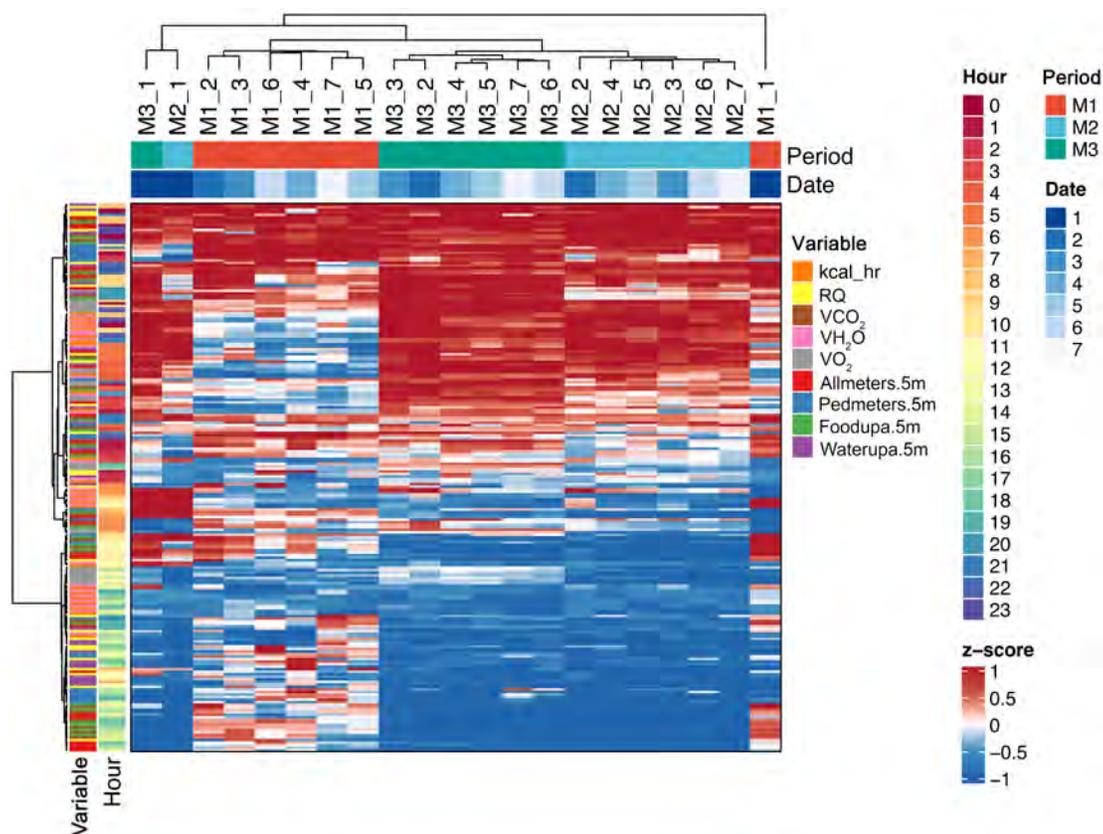
Note: A, The total movements of the mice in all directions during 5 minutes in metabolic cages; B, The frequency of movement along the X axis; C, The frequency of movement along the Y axis; D, The frequency of movement along the Z axis; E, Changes in oxygen consumption in metabolic cages; F, Changes in carbon dioxide exhaled in metabolic cages; G, The amount of food intake every 5 minutes by mice in metabolic cages; H, The amount of water intake by mice every 5 minutes in metabolic cages. M1, weaned mice; M2, adolescent mice; M3, adult mice.

图3 不同发育阶段的小鼠进入代谢笼后的适应指标数据可视化分析

Figure 3 Visualization analysis of adaptation indicators for mice in metabolic cages at different developmental stages

摄入量、动物体重和运动位置（X、Y、Z红外探测阵列），同时配备环境监测、跑轮、通道等模块应用于特殊的实验设计。为了保持实验的普适性，本研究仅使用了生活笼、环境监测、代谢监测、体重监测和位置监测模块。成功设置后，该系统在指定时间范围内每

5 min进行一次代谢、体重和位置数据的测量，同时监测环境变量，如光照、温度、湿度和声音等。然而，由于实验平台的差异，包括饲养室与实验室、代谢笼与饲养笼之间的差异，如环境噪声、温度、光照等，会导致小鼠产生探索和适应的行为。这些行为可能会



注：离乳期小鼠进入代谢笼的第1天（M1_1）、青春期小鼠进入代谢笼的第1天（M2_1）和成年期小鼠进入代谢笼的第1天（M3_1）数据均出现离群，不与同组内数据成簇。Kcal_hr，小鼠每小时能量消耗/mL；VCO₂，小鼠二氧化碳呼出量；VO₂，小鼠氧气消耗量/mL；VH₂O，小鼠饮水量 mL；Allmeters.5m，小鼠每5 min总运动距离/m；Pedmeters.5m，小鼠每5 min内定向运动总距离/m；Foodupa.5m，小鼠每5 min摄食量/g；Waterupa.5m，小鼠每5 min饮水量/mL。

Note: The data from day 1 in metabolic cages for weaned mice (M1_1), adolescent mice (M2_1), and adult mice (M3_1) were outliers and did not cluster with the data from the same group. Kcal_hr, EE per hour/mL; VCO₂, mice carbon dioxide exhalation; VO₂, oxygen consumption/mL; VH₂O, water intake/mL; Allmeters.5m, total movement distance in 5 min/m; Pedmeters.5m, total directional movement distance along X, Y, Z axes in 5 min/m; Foodupa.5m, food intake in 5 min/g; Waterupa.5m, water intake in 5 min/mL.

图4 不同发育阶段的小鼠进入代谢笼后各适应指标数据的多因素聚类分析

Figure 4 Multifactor clustering analysis of adaptation indicators for mice at different developmental stages in metabolic cages

影响小鼠的日常行为模式和昼夜节律，从而使得特定时段的数据无法完全代表正常状态下的小鼠行为和代谢表型。

先前的研究普遍认为，正常小鼠在代谢笼实验中的适应时间应该大于48 h，从48 h开始，数据基本能达到稳定状态^[20-21]。然而，由于研究的具体内容不同，实验者通常使用不同年龄和品系的小鼠进行代谢笼实验。因此，年龄和品系应是影响小鼠最佳适应时间的两个主要因素。

本次研究采用摄食、饮水、体重和活动水平作为衡量小鼠适应代谢笼环境的指标。通过连续7 d的数据采集分析发现，不同发育阶段的小鼠代谢水平存在显

著差异。离乳期（M1）小鼠在X、Z轴上打断红外射线的频次和每5 min运动距离均显著低于青春期（M2）和成年期（M3）小鼠。这表明M1小鼠的运动频率较低，运动距离较短。此外，M1小鼠在食物摄入、饮水和运动方面的节律性较差，在光周期和暗周期阶段没有明显区别。因此，在进行代谢检测，特别是易受生物节律影响的生理数据时，应谨慎考虑使用M1或日龄更小的鼠。

M2和M3小鼠在进入代谢笼的第1天呈现活动频率高、运动量大，并伴随氧气消耗量、二氧化碳呼出量和能量消耗提高的现象；然而，与第2天和后续阶段相比，第1天的摄食量、饮水量、体重和能量消耗

水平均显著降低,这可能是由于适应新环境所致。不过,第2天相较于第3天以及随后的时间,这些数据之间没有显著差异。说明在经过1 d适应后,小鼠已经在新的代谢笼环境中取得良好的适应效果。

早期研究中,对代谢笼适应期的设置问题往往存在不同的观点。Kalliokoski等^[17]利用BALB/c小鼠进行了为期3周的代谢笼实验,结果显示代谢笼实验组小鼠的代谢物皮质酮和肌酐水平显著升高,机体处于较高的氧化应激水平,因此认为小鼠无法适应代谢笼环境。Eriksson等^[22]研究表明,对于年幼大鼠,代谢笼环境不会造成明显的应激反应。另有研究表明,小鼠的饲养、攀爬、梳理毛发、进食行为和皮质酮水平在饲养位置改变后立即发生显著变化,但大多数行为会相对较快地稳定下来,皮质酮水平会在1 d内恢复到正常水平^[23]。

已知新的饲养环境会影响小鼠生理和心理状态,而长时间的代谢笼环境被认为对于小鼠是一种中度或重度压迫^[24]。另一方面,为了得到稳定可靠的数据,应该让动物适应新的笼子和位置的变化^[23]。因此,在小鼠代谢检测实验中,适应期的设计是必要且关键的。根据小鼠的年龄和品系设计代谢笼实验的适应期,是提高实验效率和数据可用性的有效手段。本研究结果显示,对C57BL/6小鼠进行代谢活动检测时,设置24 h的适应期是比较合适的选择。鉴于代谢检测系统的多样性和动物平台的差异,本研究结果还有待于进一步验证,不能否定其他的代谢检测系统或平台存在不同于本平台的研究结果。本研究可为使用Promethion系统的代谢笼实验提供数据支持,同时也可为其他平台的代谢笼实验设计提供参考。

[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复旦大学发育生物学研究所动物管理与使用委员会审核批准(No. IDM2021093)。所有动物实验过程均遵循中国实验动物相关法律法规条例如《实验动物管理条例》和《复旦大学发育生物学研究所实验动物管理和使用指南》(2020版)等要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Animal Care and Use Committee of the Institute of Developmental Biology and Molecular Medicine, Fudan University (Approval letter No. IDM2021093). All experiments were carried out in accordance with the requirement of Chinese laws and regulations on laboratory animals, such as *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and Regulations for the Administration of Laboratory Animals* (2020 Revision).

[作者贡献 Author Contribution]

谭贺负责调查研究、方法设计、数据采集和初稿写作;
杨晓辉负责数据分析和技术支持;
张大秀负责动物准备和有效验证;
王贵成负责方案设计、项目管理、提供资源以及写作审稿。

[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] GRUNDY S M. Metabolic syndrome update[J]. Trends Cardiovasc Med, 2016, 26(4): 364-373. DOI: 10.1016/j.tcm.2015.10.004.
- [2] GUPTA A, GUPTA V. Metabolic syndrome: what are the risks for humans?[J]. Biosci Trends, 2010, 4(5):204-212.
- [3] GRIFFIN J L. Understanding mouse models of disease through metabolomics[J]. Curr Opin Chem Biol, 2006, 10(4): 309-315. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.06.027.
- [4] KULKARNI N M, JAJI M S, SHETTY P, et al. A novel animal model of metabolic syndrome with non-alcoholic fatty liver disease and skin inflammation[J]. Pharm Biol, 2015, 53(8):1110-1117. DOI: 10.3109/13880209.2014.960944.
- [5] LUO Y H, LU H C, PENG D Q, et al. Liver-humanized mice: a translational strategy to study metabolic disorders[J]. J Cell Physiol, 2022, 237(1):489-506. DOI: 10.1002/jcp.30610.
- [6] EVANS C C, LEPARD K J, KWAK J W, et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92193. DOI: 10.1371/journal.pone.0092193.
- [7] RIDAURA V K, FAITH J J, REY F E, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J]. Science, 2013, 341(6150):1241214. DOI: 10.1126/science.1241214.
- [8] TETRI L H, BASARANOGLU M, BRUNT E M, et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 295(5): G987-G995. DOI: 10.1152/ajpgi.90272.2008.
- [9] LIU Z W, HUANG M L, WU X, et al. PER1 phosphorylation specifies feeding rhythm in mice[J]. Cell Rep, 2014, 7(5):1509-1520. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.04.032.
- [10] ZHU S W, YEE B K, NYFFELER M, et al. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice[J]. Behav Brain Res, 2006, 169(1): 10-20. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.11.024.
- [11] ISHIDA H, MITSUI K, NUKAYA H, et al. Study of active substances involved in skin dysfunction induced by crowding stress. I. effect of crowding and isolation on some physiological variables, skin function and skin blood perfusion in hairless mice[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(2):170-181. DOI: 10.1248/bpb.26.170.
- [12] STEYERMARK A C, MUELLER P J. Cage size affects feeding and energetics of captive rodents[J]. Physiol Biochem Zool, 2002, 75(2):209-213. DOI: 10.1086/338689.
- [13] BARTOLOMUCCI A, PALANZA P, SACERDOTE P, et al.

- Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2003, 28(4):540-558. DOI: 10.1016/s0306-4530(02)00039-2.
- [14] MANSER C E, ELLIOT H, MORRIS T H, et al. The use of a novel operant test to determine the strength of preference for flooring in laboratory rats[J]. *Lab Anim*, 1996, 30(1):1-6. DOI: 10.1258/002367796780744974.
- [15] MANSER C E, MORRIS T H, BROOM D M. An investigation into the effects of solid or grid cage flooring on the welfare of laboratory rats[J]. *Lab Anim*, 1995, 29(4):353-363. DOI: 10.1258/002367795780740023.
- [16] BRUNNER L J, DIPIRO J T, FELDMAN S. Metabolic cage isolation reduces antipyrine clearance in rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1994, 46(7):581-584. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1994.tb03861.x.
- [17] KALLIOKOSKI O, JACOBSEN K R, DARUSMAN H S, et al. Mice do not habituate to metabolism cage housing: a three week study of male BALB/c mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58460. DOI: 10.1371/journal.pone.0058460.
- [18] 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.
- [19] PALANZA P. Animal models of anxiety and depression: how are females different?[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, 25(3): 219-233. DOI: 10.1016/s0149-7634(01)00010-0.
- [20] STECHMAN M J, AHMAD B N, LOH N Y, et al. Establishing normal plasma and 24-hour urinary biochemistry ranges in C3H, BALB/c and C57BL/6J mice following acclimatization in metabolic cages[J]. *Lab Anim*, 2010, 44(3): 218-225. DOI: 10.1258/la.2010.009128.
- [21] 尹媛, 陆璐, 王蕴, 等. 小鼠生活笼实验引入适应期的必要性研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(4):358-362. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.154.
- YIN Y, LU L, WANG Y, et al. Necessity of an acclimatization period in a home cage experiment of mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2021, 41(4):358-362. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.154.
- [22] ERIKSSON E, ROYO F, LYBERG K, et al. Effect of metabolic cage housing on immunoglobulin A and corticosterone excretion in faeces and urine of young male rats[J]. *Exp Physiol*, 2004, 89(4): 427-433. DOI: 10.1113/expphysiol. 2004.027656.
- [23] TULI J S, SMITH J A, MORTON D B. Stress measurements in mice after transportation[J]. *Lab Anim*, 1995, 29(2): 132-138. DOI: 10.1258/002367795780740249.
- [24] European Parliament. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes[S/OL]. (2010-10-20) [2024-02-20]. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
- (收稿日期: 2024-02-29 修回日期: 2024-06-05)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 干明红)

【引用本文】

谭贺, 杨晓辉, 张大秀, 等. 不同发育时期小鼠代谢笼实验的最佳适应期探讨[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 502-510. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.034.

TAN H, YANG X H, ZHANG D X, et al. Optimal adaptation period for metabolic cage experiments in mice at different developmental stages[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 502-510. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.034.

《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)且不出明显的肿瘤溃疡。如投稿文章中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性材料。

《实验动物与比较医学》编辑部

人肝肿瘤细胞的裸小鼠原位癌建模条件优化及评价

孟雨^{1,2}, 梁冬丽², 郑琳琳², 周园园², 王朝霞²

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 上海交通大学实验动物中心, 上海 200240)

[摘要] 目的 优化通过注射人肝肿瘤细胞株构建原位癌裸小鼠模型的条件, 并探索适宜的给药治疗时间。

方法 选用稳定表达萤光素酶报告基因 (LUC) 的人肝细胞癌 Hep3B 与肝母细胞瘤 HepG2 细胞株, 使用小动物活体成像系统分析萤光素酶发光强度与肝肿瘤细胞数量之间的线性相关性, 验证人源肝肿瘤细胞的发光效率。在 5 周龄雌性 BALB/c 裸小鼠的肝叶原位接种不同浓度 (8×10^6 、 2.4×10^7 、 7.2×10^7 个/mL)、不同重悬介质 (PBS、Matrigel) 的人肝肿瘤细胞悬液 HepG2-LUC 和 Hep3B-LUC (共 12 组, 每组 7 只), 分别构建人肝肿瘤裸小鼠原位癌模型。每 7 d 为 1 个周期记录各组小鼠体重, 用小动物活体成像系统定期监测原位肿瘤的生长过程, 观察肿瘤生长趋势。接种肿瘤细胞后第 35 天剖取小鼠肝脏, 制备病理切片, 进行苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色观察组织病理学变化。**结果** 两种人肝肿瘤细胞株的发光强度均与细胞数量呈正相关 ($R^2=0.9831$, $R^2=0.9705$), 适用于原位癌模型的构建。HepG2-LUC 高浓度组, HepG2-LUC+Matrigel 低、中、高浓度组, Hep3B-LUC 中、高浓度组与 Hep3B-LUC+Matrigel 低、中、高浓度组均成功造模。HepG2-LUC+Matrigel 高浓度组较低浓度与中浓度组小鼠的体重显著下降 ($P<0.05$), Hep3B-LUC+Matrigel 高浓度组较低浓度与中浓度组小鼠的体重也显著下降 ($P<0.05$)。成功造模组小鼠的荧光发光强度随时间呈指数型增长 ($R^2>0.9500$), 且在移植后 14 d 发光强度至少可达到 1.0×10^7 p/ (s·cm²·sr)。HepG2-LUC 低、中浓度组和 Hep3B-LUC 低浓度组小鼠肝脏未见明显的病理学变化, 其余组肝脏肿瘤和肝细胞病变明显。**结论** 对于 HepG2-LUC 细胞株, 推荐肝叶原位注射 2.4×10^7 个/mL (50 μ L) 且与 Matrigel 重悬的混合细胞液体造模, 并于造模后第 7 天给药或采取预后措施; 而对于 Hep3B-LUC 细胞株, 推荐肝叶原位注射 7.2×10^7 个/mL (50 μ L) (不与 Matrigel 重悬混合) 造模, 并于造模后的第 14 天给药或采取预后措施。

[关键词] 肝癌; 原位移植; HepG2-LUC; Hep3B-LUC; BALB/c 裸小鼠

[中图分类号] R73-3; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0511-12



Optimization and Evaluation of Conditions for Orthotopic Nude Mouse Models of Human Liver Tumor Cells

MENG Yu^{1,2}, LIANG Dongli², ZHENG Linlin², ZHOU Yuanyuan², WANG Zhaoxia²

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Laboratory Animal Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Correspondence to: WANG Zhaoxia, E-mail: zhaoxiaw@sjtu.edu.cn

[ABSTRACT] Objective The study aims to optimize the conditions for constructing orthotopic nude mouse models of liver cancer by injecting human liver tumor cell lines and to explore appropriate timings for drug administration. **Methods** Human hepatocellular carcinoma Hep3B and hepatoblastoma HepG2 cell lines, which stably expressing the luciferase reporter gene (LUC), were selected. The linear correlation between the luciferase luminescence intensity and the number of liver tumor cells was analyzed using a Small Animal *In Vivo* Imaging system to verify the luminescent efficiency of the human liver tumor cells. Different concentrations (8×10^6 , 2.4×10^7 , 7.2×10^7 cells/mL) and resuspension media (PBS, Matrigel) of human liver tumor cell suspensions HepG2-LUC and Hep3B-LUC were orthotopically inoculated into the liver lobes of 5-week-old female BALB/c nude mice (12 groups, 7 mice each) to construct human liver tumor nude mouse orthotopic cancer models. Every 7 days, the weights of mice were recorded, and the growth of orthotopic tumors was monitored using the Small Animal *In Vivo* Imaging system. On day 35 post-cell

[第一作者] 孟雨 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物。E-mail: mengyu0809@sjtu.edu.cn;

梁冬丽 (1988—), 女, 博士, 实验师, 研究方向: 实验动物模型、雄性生殖。E-mail: July_liang@sjtu.edu.cn

[通信作者] 王朝霞 (1969—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 医学实验动物学。E-mail: zhaoxiaw@sjtu.edu.cn

inoculation, mouse livers were dissected, and pathological slices were prepared for HE staining to observe histopathological changes in liver tissues. **Results** The luminescence intensity of human liver tumor cell lines was positively correlated with the number of cells ($R^2=0.983$ 1, $R^2=0.970$ 5), indicating their suitability for orthotopic model construction. Successful modeling was achieved in the high-concentration groups of HepG2-LUC, the low-, medium-, and high-concentration groups of HepG2-LUC+Matrigel, the medium- and high-concentration groups of Hep3B-LUC, and the low-, medium-, and high-concentration groups of Hep3B-LUC+Matrigel. For both HepG2-LUC+Matrigel and Hep3B-LUC+Matrigel groups, mice in the high-concentration groups exhibited significantly reduced body weight compared to the low- and medium-concentration groups (both with $P<0.05$). The luminescence intensity of successfully modeled mice increased exponentially over time ($R^2>0.950$ 0), and reached a minimum of 1.0×10^7 p/(s·cm²·sr) by day 14 post-transplantation. Mice in the low- and medium-concentration groups of HepG2-LUC and the low-concentration group of Hep3B-LUC showed no significant pathological changes, while the other groups exhibited evident liver tumors and hepatocyte lesions. **Conclusion** For the HepG2-LUC cell line, the recommended injection volume is 50 μ L with a cell density of 2.4×10^7 cells/mL, resuspended with Matrigel, followed by drug administration or prognostic measures on day 7 post-modeling. For the Hep3B-LUC cell line, the recommended injection volume is 50 μ L with a cell density of 7.2×10^7 cells/mL, not resuspended with Matrigel, with administration or prognostic measures on day 14 post-modeling.

[Key words] Liver cancer; Orthotopic transplantation; HepG2-LUC; Hep3B-LUC; BALB/c nude mice

恶性肝肿瘤是指发生在肝脏的恶性病变，主要包括肝癌和极为罕见的肝肉瘤。肝癌主要分为肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 和胆管细胞癌 (cholangiocellular carcinoma, CCA)。在成人病例中，HCC 占比可达 90%，CCA 约占 10%。在儿童病例中，恶性肝肿瘤主要是胚胎来源的肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB)，占 60%~70%，其次是 HCC，占 25%~30%^[1-2]。目前，临床上针对 HCC 的治疗手段仍以传统的手术切除为主^[3-4]，但其治疗效果差，术后转移及复发率较高^[5]。其他的一些保守治疗手段，如消融治疗、经导管动脉化疗栓塞术、免疫治疗和靶向治疗^[6]，也难以治愈肝癌。不同于 HCC 的治疗方法繁多，针对 HB 的治疗手段目前仅局限于肝切除和化疗^[7]。近年来 HB 的发病率持续上升，但相关治疗药物的研发仍没有显著进展。因此，亟须建立一种高效、操作简便、能满足临床研究需求的原位肝癌动物模型，以进一步加速抗肿瘤药物的研发。

原位肝癌动物模型的种类多样，大致分为自发性肝肿瘤模型、诱发性肝肿瘤模型、移植性肝肿瘤模型、基因修饰模型等。其中，移植性肝肿瘤模型在药物研发中应用最为广泛。根据移植体来源不同，移植性肝肿瘤模型又分为同种移植和异种移植。前者的受体动物一般拥有完整的免疫系统，是评估免疫调节疗法的有力工具；后者则需要使用免疫缺陷动物，能高度模拟人类肿瘤的特点^[8]。异种移植又分为异位移植

(如皮下、腹腔)与原位移植。原位移植肿瘤模型能准确地反映肿瘤环境，特别是血管化和基质的影响^[9]，但它比异位移植的操作更复杂，且存在不易观测的缺点。萤光素酶作为一种体内报告基因，其标记特异性强、组织穿透率高，可以有效弥补原位癌模型难以观测的短板，利用活体成像技术可以直接观察、定量监测肿瘤在体内的生长、转移及对药物的反应等情况^[10-11]。

本研究分别选用萤光素酶报告基因 (luciferase reporter gene, LUC) 标记的人肝母细胞瘤 HepG2、人肝癌细胞株 Hep3B 构建人肝肿瘤裸小鼠原位癌模型，辅以生物发光活体成像，实现肿瘤生长情况的动态监测，并对造模条件进行优化与评价，为临床筛选新药及评估不同治疗手段提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及其饲养环境

5 周龄雌性 BALB/c 裸小鼠 84 只，体重 15~17 g，购自上海灵畅生物科技有限公司 [SCXK (沪) 2023-0003，实验动物质量合格证编号为 2023000302957、20230003003317、20230003003378]，随机分为 12 组 (7 只/组)。动物饲养于上海交通大学实验动物中心屏障设施 [SYXK (沪) 2023-0042]，24 h 提供无菌水和固体棒状饲料，室温 (24±2) °C，相对湿度 40%~70%，定期检测环境卫生。动物在 12 h 光照和 12 h 黑

暗的交替环境下饲养, 正常摄食和饮水。动物先经适应性饲养7 d后开展动物实验, 并按照实验动物使用的3R原则给予人道关怀。本实验经上海交通大学实验动物伦理与使用委员会批准(批号A2023099), 严格遵守国家有关动物实验伦理和使用准则。

1.2 细胞、试剂和仪器

荧光素酶报告基因标记的HepG2-LUC和Hep3B-LUC细胞株分别购自南京科佰生物科技有限公司和厦门逸漠生物科技有限公司。HepG2-LUC细胞培养使用MEM基础培养液, 并添加10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1 mmol/L丙酮酸钠和2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素; Hep3B-LUC细胞培养使用Hep3B-LUC专用培养液。两种细胞均置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养。

Hep3B-LUC专用培养液购自厦门逸漠生物科技有限公司; 基质胶(Matrigel, 保存于-20 $^{\circ}\text{C}$)购自美国Corning公司; D-荧光素钾购自上海乐辰生物科技有限公司; MEM培养液、PBS、胎牛血清、嘌呤霉素、丙酮酸钠和非必需氨基酸均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 异氟烷购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司; 质量分数4%多聚甲醛溶液、苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司。

小动物三维光学活体成像系统(IVIS Spectrum)为美国PerkinElmer公司产品; 小动物专用麻醉机(R500)为深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司产品; 组织脱水机(Excelsior AS)和染料染色机(Gemini AS-ClearVue)为美国Eprida公司产品。

1.3 细胞生物发光效率测试

将处于对数生长期的HepG2-LUC和Hep3B-LUC细胞分别按每孔中细胞数量梯度(2 $\times 10^3$ 、4 $\times 10^3$ 、8 $\times 10^3$ 、1.6 $\times 10^4$ 、3.2 $\times 10^4$ 、4.8 $\times 10^4$ 、6.4 $\times 10^4$ 个)接种于黑色96孔细胞板中, 每个梯度设置3个复孔。培养8 h后加入100 μL D-荧光素钾底物(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 静待2 min后使用小动物活体成像仪测定荧光素酶报告基因在细胞内的表达发光情况。以平均生物发光强度反映荧光素酶表达水平, 单位为光子数/(秒 \cdot 平方厘米 \cdot 球面度), 即 $\text{p}/(\text{s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{sr})$ 。使用Graphpad prism 10软件对数据进行线性回归和单因素方差分析。

1.4 细胞原位注射裸小鼠肝肿瘤模型的构建

1.4.1 细胞原位注射肝肿瘤模型

消化、收集处于对数生长期的肝肿瘤细胞HepG2-LUC和Hep3B-LUC, 用PBS稀释成8.0 $\times 10^6$ 个/mL

(低)、2.4 $\times 10^7$ 个/mL(中)、7.2 $\times 10^7$ 个/mL(高)共3个浓度的细胞悬液, 置于0~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰盒中低温保存。取42只BALB/c裸小鼠, 随机分为6组, 分别命名为HepG2-LUC低、中、高浓度组, 以及Hep3B-LUC低、中、高浓度组, 每组各7只。

使用异氟烷进行呼吸麻醉, 用碘伏进行腹部皮肤消毒, 于胸骨下部0.5 cm处开小口, 无菌棉签轻轻挤压出小鼠左肝叶, 用1 mL注射器分别注入50 μL 的3个浓度的2种细胞悬液。细胞接种完成后旋转出针, 棉签按压后立即使用电凝笔止血, 轻轻提拉皮肤将肝叶退回腹腔后缝合, 碘伏擦拭创口。待裸小鼠苏醒后, 皮下注射美洛昔康(0.02 mL/10 g)以镇痛, 一天一次, 连续3 d。

1.4.2 细胞+基质胶原位注射肝肿瘤模型

消化、收集处于对数生长期的HepG2-LUC和Hep3B-LUC细胞, 先用PBS稀释成1.6 $\times 10^7$ 、4.8 $\times 10^7$ 、1.4 $\times 10^8$ 共3个浓度的细胞悬液, 再与Matrigel基质胶(4 mg/mL)以1:1的比例混合成终浓度分别为8.0 $\times 10^6$ 个/mL(低)、2.4 $\times 10^7$ 个/mL(中)、7.2 $\times 10^7$ 个/mL(高)的细胞悬液, 所有操作均于0~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰盒中进行。后续建模步骤同1.4.1节, 每种细胞每个浓度(分别命名为HepG2-LUC+Matrigel低、中、高浓度组, Hep3B-LUC+Matrigel低、中、高浓度组)各7只裸小鼠。

1.5 肝脏病理检查

将肝肿瘤细胞原位接种完成后的裸小鼠置于常规屏障环境下饲养, 每天观测并记录小鼠存活情况。以每7 d为1个周期记录各组小鼠体重(检测时间点记为D0、D7、D14、D21、D28、D35), 并用小动物活体成像系统定期监测原位肿瘤的生物发光情况(检测时间点记为D7、D14、D21、D28、D35), 观察肿瘤生长趋势。接种肝肿瘤细胞后的第35天, 进行末次体重记录及活体生物发光成像后, 以二氧化碳过量吸入结合颈椎脱臼法安乐死所有裸小鼠。剖开腹腔, 摘取肝脏, 观察肝脏表面的肿瘤形态, 并拍照记录。将肝脏样本立即放入质量分数为4%的多聚甲醛溶液中固定24~48 h, 然后进行脱水、石蜡包埋与切片, 常规HE染色进行病理组织学观察。

1.6 统计学方法

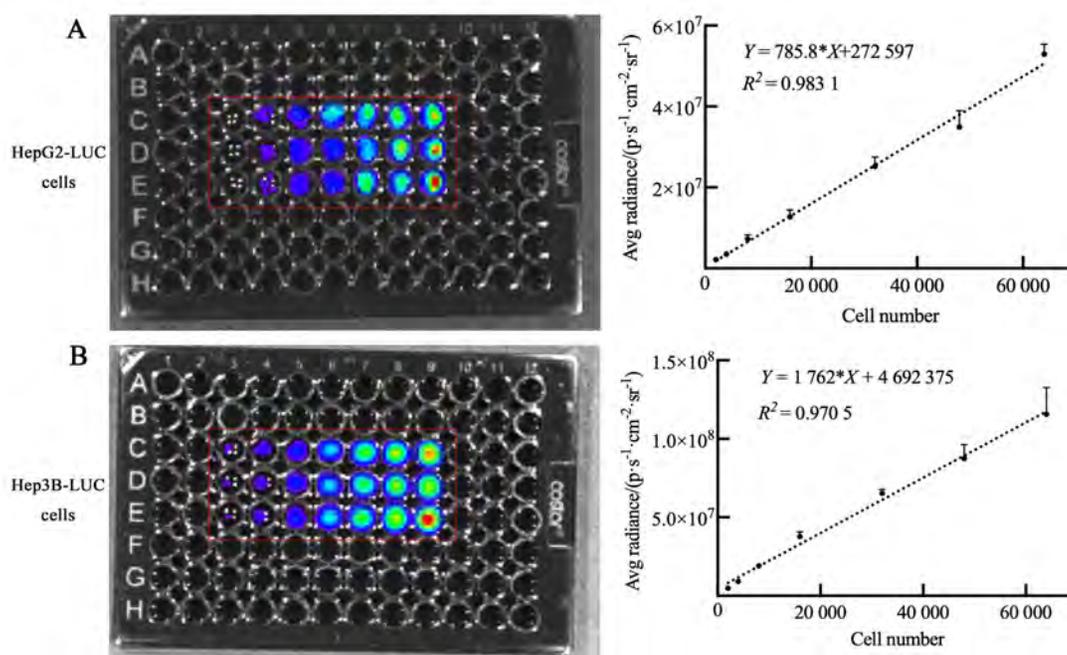
使用Graphpad prism 10软件进行统计分析与绘图, 各实验结果数值均用平均值 \pm 标准差表示。多组间差异采用两因素方差分析, 并用Tukey法进行事后多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人肿瘤细胞的生物发光强度与其数目成正比

将7个细胞数量梯度的HepG2-LUC细胞和Hep3B-LUC细胞分别与过量的D-荧光素钾底物混合孵育后,测定生物发光强度。以细胞数(X)为横坐标,平均生

物发光强度(Y)为纵坐标,绘制相关曲线(图1)。结果显示,相关曲线的斜率分别可达785.8和1 762.0,相关系数 R^2 分别为0.983 1($P<0.000 1$)、0.970 5($P<0.000 1$),差异均有统计学意义。结果表明,该细胞株的荧光素酶报告基因表达活性良好,可用于原位癌模型的构建。



注: A和B分别为荧光素酶报告基因(LUC)标记的人肝母细胞瘤HepG2细胞(HepG2-LUC)、人肝癌细胞Hep3B(Hep3B-LUC)细胞与D-荧光素钾底物混合孵育后的生物发光效率,一元线性回归及单因素方差分析显示各细胞数目与平均生物发光强度呈线性正相关关系。96孔板中,从左至右每孔含细胞数量依次为 2×10^3 、 4×10^3 、 8×10^3 、 1.6×10^4 、 3.2×10^4 、 4.8×10^4 和 6.4×10^4 个($n=3$)。

Note: A, Bioluminescence efficiency of human hepatoblastoma HepG2 cells labeled with luciferase reporter gene (LUC) after incubating with D-luciferin potassium; B, Bioluminescence efficiency of human hepatocellular carcinoma Hep3B cells labeled with LUC after incubating with D-luciferin potassium. Simple linear regression and one-way ANOVA test showed that the number of each cell was positively correlated with the average bioluminescence intensity. In the 96-well plate, the number of cells in each well from left to right was 2×10^3 , 4×10^3 , 8×10^3 , 1.6×10^4 , 3.2×10^4 , 4.8×10^4 , and 6.4×10^4 , $n=3$.

图1 人肝肿瘤细胞株的细胞生物发光效率

Figure 1 Cell bioluminescence efficiency of human liver tumor cell lines

2.2 Matrigel的使用导致接种细胞高浓度组的小鼠体重显著降低

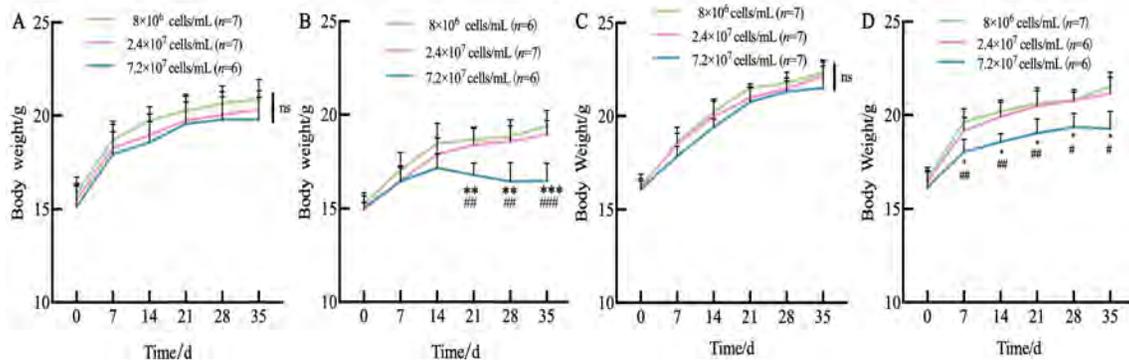
在造模过程中, HepG2-LUC高浓度(7.2×10^7 个/mL)组, HepG2-LUC+Matrigel高、低浓度(8.0×10^6 个/mL)组, Hep3B-LUC+Matrigel高、中浓度(2.4×10^7 个/mL)组的裸小鼠各死亡1只,存活率为85.7%;其余各组裸小鼠无死亡,均存活至第35天,存活率为100%。

手术造模后的35 d内HepG2-LUC高、中、低浓度组裸小鼠的体重变化如图2A所示:裸小鼠体重随时间

不断增长,且3组间无显著差异($P>0.05$)。HepG2-LUC+Matrigel中、低浓度组裸小鼠体重随时间不断增长,二者无显著性差异($P>0.05$);而高浓度组在第21、28和35天时体重显著下降,相较于低浓度组分别下降了1.89 g($P=0.002 0$)、2.42 g($P=0.002 4$)和2.93 g($P=0.000 5$),相较于中浓度组分别下降了1.63 g($P=0.005 1$)、2.16 g($P=0.001 3$)和2.47 g($P=0.000 9$) (图2B)。Hep3B-LUC高、中、低浓度组裸小鼠的体重变化如图2C所示:裸小鼠体重随时间不断增长,且3组间无显著差异($P>0.05$)。Hep3B-LUC+Matrigel

中、低浓度组的体重随时间不断增长,二者无显著性差异 ($P>0.05$); 而高浓度组体重增长缓慢,造模后7、14、21、28和35 d的裸小鼠体重相较于低浓度组分别下降了1.58 g ($P=0.0022$)、1.62 g ($P=0.0050$)、1.60 g

($P=0.0094$)、1.44 g ($P=0.0224$) 和2.27 g ($P=0.0258$), 相较于中浓度组分别下降了1.13 g ($P=0.0197$)、1.34 g ($P=0.0183$)、1.45 g ($P=0.0275$)、1.44 g ($P=0.0288$) 和1.88 g ($P=0.0479$) (图2D)。



注: A~D依次为HepG2-LUC [萤光素酶报告基因(LUC)标记的用PBS稀释成不同细胞浓度的人肝母细胞瘤HepG2细胞]、HepG2-LUC+Matrigel [LUC标记的与Matrigel基质胶(4 mg/mL)混合成不同细胞浓度的人肝母细胞瘤HepG2细胞]、Hep3B-LUC [LUC标记的用PBS稀释成不同细胞浓度的人肝癌Hep3B细胞]、Hep3B-LUC+Matrigel [LUC标记的与Matrigel基质胶(4 mg/mL)混合成不同细胞浓度的人肝癌Hep3B细胞]原位注射裸小鼠的体重随时间增长趋势。与低浓度(8×10^6 个细胞/mL)组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P=0.0001$; 与中浓度(2.4×10^7 个细胞/mL)组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P=0.0001$; 3组之间比较, $^{ns}P>0.05$ 。

Note: A-D represent body weight over time in nude mouse orthotopic tumor models of HepG2-LUC [human hepatoblastoma HepG2 cells labeled with luciferase reporter gene (LUC) and diluted with PBS into different cell concentrations], HepG2-LUC+Matrigel (human hepatoblastoma HepG2 cells labeled with LUC and diluted with 4 mg/mL Matrigel into different cell concentrations), Hep3B-LUC (human hepatocellular carcinoma Hep3B cells labeled with LUC and diluted with PBS into different cell concentrations), and Hep3B-LUC+Matrigel (human hepatocellular carcinoma Hep3B cells labeled with LUC and diluted with 4 mg/mL Matrigel into different cell concentrations) successively. Compared with the low-concentration (8×10^6 cells/mL) group of the same time, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P=0.0001$; Compared with the medium-concentration (2.4×10^7 cells/mL) group of the same time, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P=0.0001$; Compared among the three groups of the same time, $^{ns}P>0.05$.

图2 不同接种细胞浓度、不同介质的肝肿瘤模型裸小鼠的体重变化

Figure 2 Body weight changes of nude mouse liver tumor models with different cell concentrations and suspension media

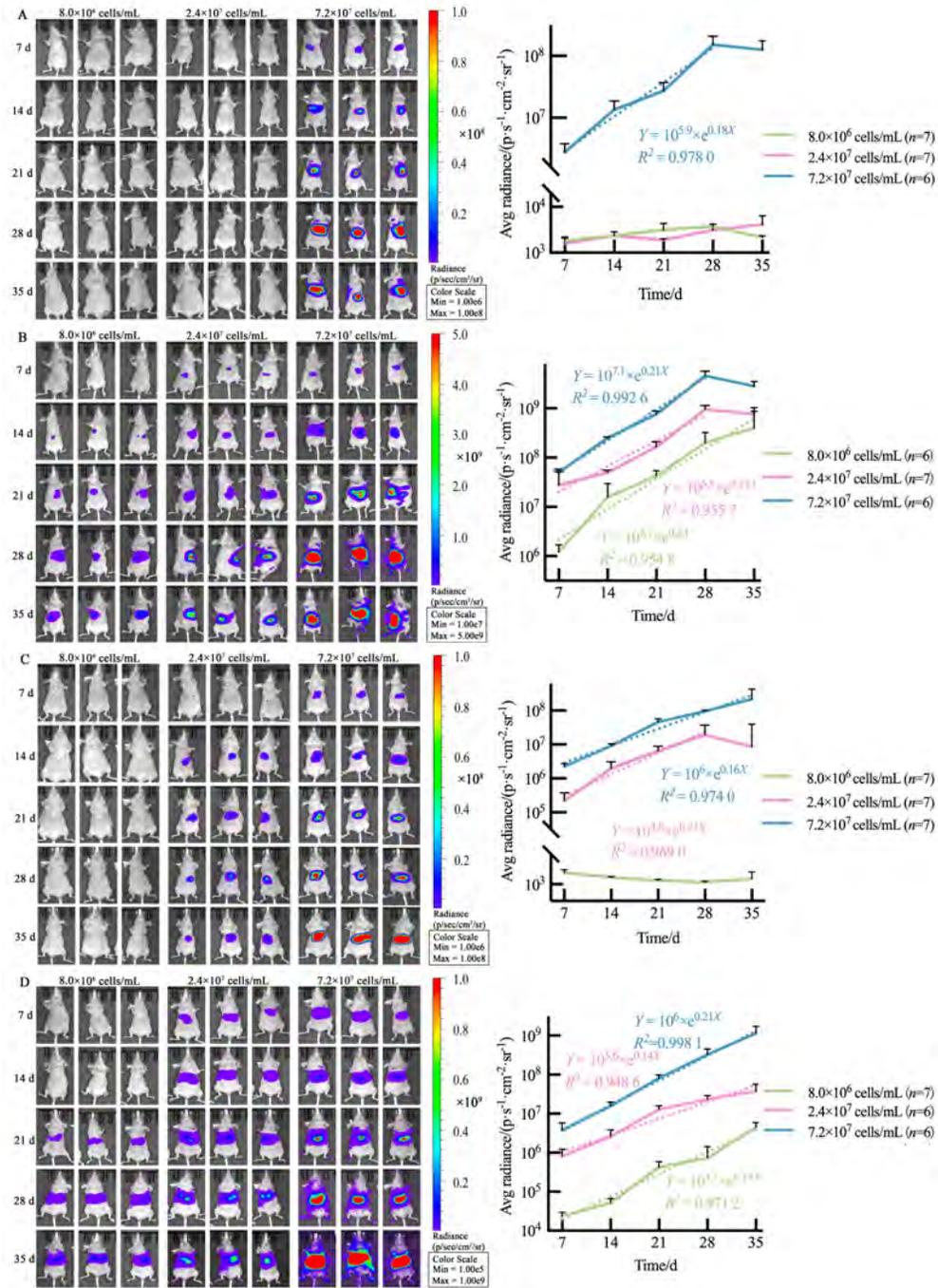
2.3 Matrigel的使用显著提高肝肿瘤原位模型的成功率

对于HepG2-LUC细胞,直接原位注射造模、不用Matrigel时,低浓度组与中浓度组在造模后7~35 d期间肿瘤荧光表达极弱,平均发光强度在 $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^3$ p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$),随时间增长并无明显变化,表明肝脏处并未形成原位肿瘤;HepG2-LUC高浓度组(7.2×10^7 个/mL)在第7天时发光强度达到了 3×10^6 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$),并随时间的增长,发光面积及强度逐渐增加,最高于第28天达到了 1.6×10^8 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$),进一步计算显示其前28 d的平均发光强度随时间呈指数型增长 ($Y=10^{5.9} \times e^{0.18X}$, $R^2=0.9780$, $P=0.0111$,图3A)。

使用Matrigel作为细胞重悬介质的原位注射造模后第7天,HepG2-LUC+Matrigel低浓度组裸小鼠的肿瘤平均发光强度为 1.3×10^6 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$),然后随时间呈

指数型增长 ($Y=10^{5.7} \times e^{0.2X}$, $R^2=0.9548$, $P=0.0041$),至第35天平均发光强度达到 5.1×10^8 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$)。HepG2-LUC+Matrigel中浓度组第7天的发光强度为 3.4×10^7 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$),然后随时间呈指数型增长 ($Y=10^{6.8} \times e^{0.17X}$, $R^2=0.9557$, $P=0.0037$),至第28天发光强度达 9.6×10^8 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$)。HepG2-LUC+Matrigel高浓度组第7天的发光强度为 3.4×10^7 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$),并随时间呈指数型增长 ($Y=10^{7.1} \times e^{0.21X}$, $R^2=0.9926$, $P=0.0224$),至第28天发光强度达 2.9×10^9 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$) (图3B)。

对于Hep3B-LUC细胞株,直接原位注射造模、不用Matrigel时,低浓度组与HepG2-LUC低浓度组相似,在造模7~35 d裸小鼠体内肿瘤平均发光强度持续处于 2.0×10^3 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$)左右,无明显变化,表明肝脏处并未形成原位肿瘤。中浓度组第7天发光强度为 2.4×10^5 p/ ($s \cdot cm^2 \cdot sr$),最高于第28天达 2.2×10^7 p/



注：A~D依次为 HepG2-LUC [萤光素酶报告基因 (LUC) 标记的用PBS稀释成不同细胞浓度的人肝母细胞瘤 HepG2 细胞]、HepG2-LUC+Matrigel (LUC 标记的与 Matrigel 基质胶 (4 mg/mL) 混合成不同细胞浓度的人肝母细胞瘤 HepG2 细胞)、Hep3B-LUC (LUC 标记的用PBS稀释成不同细胞浓度的人肝癌 Hep3B 细胞)、Hep3B-LUC+Matrigel (LUC 标记的与 Matrigel 基质胶 (4 mg/mL) 混合成不同细胞浓度的人肝癌 Hep3B 细胞) 原位注射裸小鼠的每周成像结果，提示造模后各组小鼠体内发光强度随时间的变化趋势 (虚线提示呈指数型增长)。

Note: A-D represent the weekly bioluminescence monitoring results of nude mouse orthotopic tumor models of HepG2-LUC [human hepatoblastoma HepG2 cells labeled with luciferase reporter gene (LUC) and diluted with PBS into different cell concentrations], HepG2-LUC+Matrigel (human hepatoblastoma HepG2 cells labeled with LUC and diluted with 4 mg/mL Matrigel into different cell concentrations), Hep3B-LUC (human hepatocellular carcinoma Hep3B cells labeled with LUC and diluted with PBS into different cell concentrations), and Hep3B-LUC+Matrigel (human hepatocellular carcinoma Hep3B cells labeled with LUC and diluted with 4 mg/mL Matrigel into different cell concentrations) successively, which show the change trends of the luminescence intensity over time after in-situ modeling (dotted lines indicate exponential growth).

图3 不同接种细胞浓度、不同介质的肝肿瘤模型裸小鼠体内生物发光强度

Figure 3 Bioluminescence monitoring of nude mouse liver tumor models with different cell concentrations and suspension media

($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$), 增长期间指数模型为 $Y=10^{4.8} \times e^{0.21X}$ ($R^2=0.9690$, $P=0.0156$)。高浓度组的发光强度也由第7天的 2.3×10^6 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$) 持续发展到第35天的 2.5×10^8 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$), 随时间呈指数增长 ($Y=10^6 \times e^{0.16X}$, $R^2=0.9740$, $P=0.0018$, 图3C)。

使用 Matrigel 辅助造模时, Hep3B-LUC+Matrigel 高、中、低浓度组裸小鼠的肿瘤发光面积及强度均随时间的增长逐渐增加。低浓度组的发光强度随时间呈指数型增长 ($Y=10^{3.7} \times e^{0.19X}$, $R^2=0.9712$, $P=0.0021$), 从第7天的 2.4×10^4 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$) 持续发展到第28天的 4.7×10^6 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$)。中浓度组第7天的发光强度为 8.6×10^5 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$), 随时间增长, 第35天最高可达 4.0×10^7 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$), 增长期间指数模型为 $Y=10^{5.6} \times e^{0.14X}$ ($R^2=0.9486$, $P=0.0050$)。高浓度组的发光强度也由第7天的 4.0×10^6 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$) 持续发展到第35天的 1.2×10^9 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$), 随时间呈指数增长 ($Y=10^6 \times e^{0.21X}$, $R^2=0.9981$, $P<0.0001$) (图3D)。

另外, 4种原位癌模型的发光位置均局限于腹部, 未发现远端转移。部分模型(如 HepG2-LUC 高浓度组, HepG2-LUC+Matrigel 高、中浓度组, Hep3B-LUC 中浓度组)于第35天出现平均发光强度降低的现象, 推测由于肿瘤实质过密, 光透过率降低。总的来说, 构建成功的肝肿瘤裸小鼠模型中, 生物发光强度均以指数型增长, 但由于细胞系、细胞溶液介质、细胞浓度的区别, 初始发光强度有所不同。

2.4 各组裸小鼠病理学特征与活体成像结果一致

各组裸小鼠均于造模后第35天时安乐死, 解剖后均未发现腹水或腹壁瘤、远端肿瘤及在其他脏器的播散性种植等现象。取小鼠肝脏, 肉眼观察(图4A)发现: HepG2-LUC 低、中浓度组和 Hep3B-LUC 低浓度组的肝脏色泽绛红, 均未见实质性肿瘤, 表明造模未成功, 与活体成像检测结果一致; HepG2-LUC 高浓度组形成的原位肝肿瘤组织多为表面黑色类圆形凸起, 质地硬; Hep3B-LUC 中、高浓度组形成的原位肝肿瘤组织多呈灰白色, 微凸, 质地较硬, 其中高浓度组可见少许黑色病变; HepG2-LUC+Matrigel 低、中、高浓度组的肝脏均可见黑色凸起的肿瘤组织, 质地硬; Hep3B-LUC+Matrigel 低、中、高浓度组的肝脏均可见明显灰白色肿瘤组织, 质地硬, 其中中浓度组可见少许黑色病变, 高浓度组可见大量黑色病变。

进一步将肝脏组织制备成病理切片, 进行 HE 染色, 结果如图4B。未成瘤组裸小鼠的肝索排列整齐,

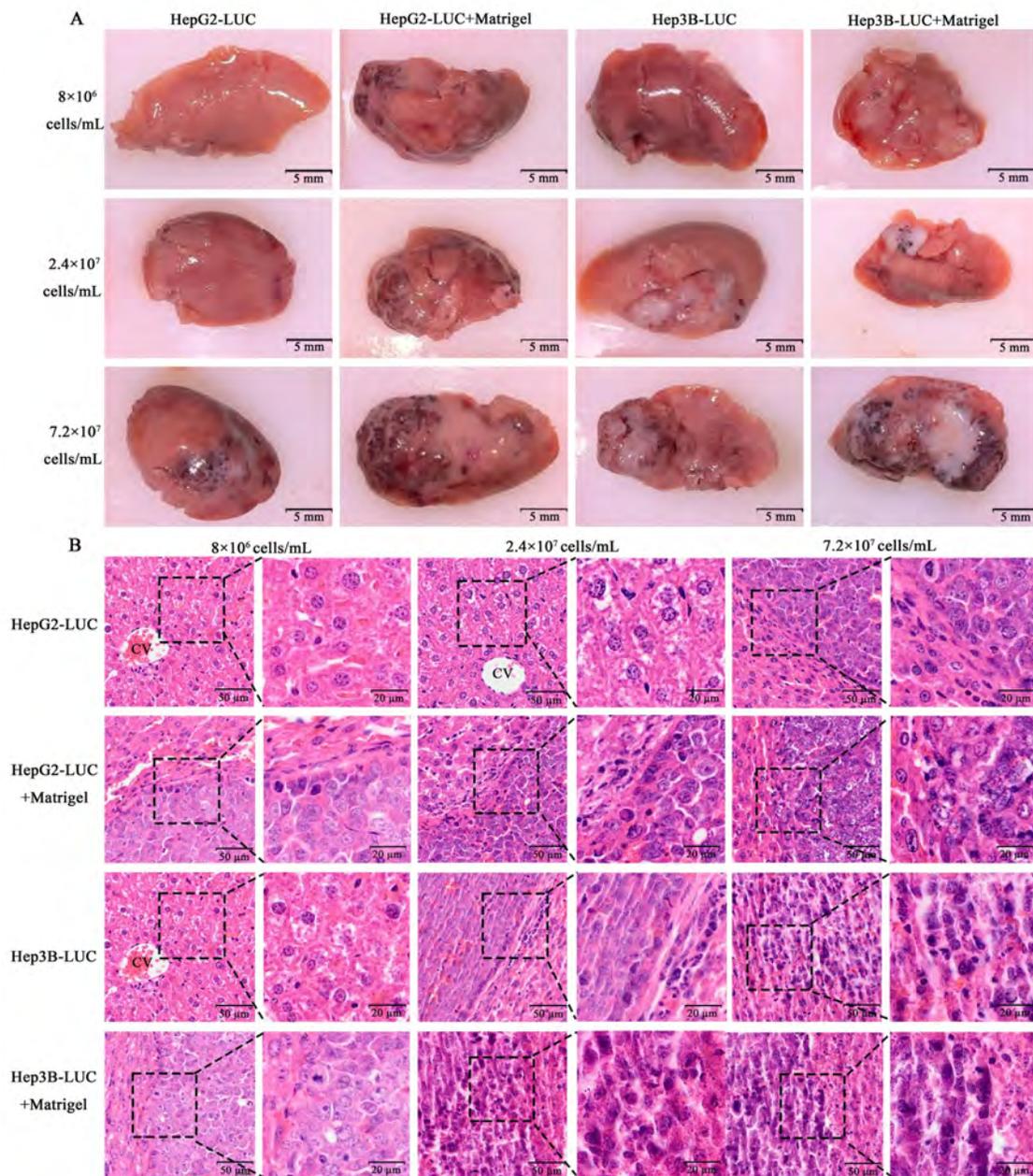
细胞核与细胞质比例适宜; 成瘤组的肝小叶组织结构消失, 癌细胞成巢状排列, 细胞核大且浓染, 核质比增高, 癌组织与正常肝组织界限清晰, 周围肝细胞存在压迫萎缩。

3 讨论

本研究将不同背景的表达萤光素酶报告基因的人源细胞株以不同浓度、不同重悬介质直接注射至裸小鼠肝脏中建立了人肝肿瘤细胞株的裸小鼠原位癌模型, 每组小鼠存活率最低可达 85.7%, 在生长过程中仅有 HepG2-LUC+Matrigel 与 Hep3B-LUC+Matrigel 高浓度组小鼠出现体重下降。通过小动物活体成像系统监测肿瘤发展状况以及 HE 染色进行肝脏病理分析, 发现不同的人肝肿瘤细胞株构建的裸小鼠原位癌模型差异较大, 这些差异与细胞株的分型、浓度及重悬介质等均相关, 其中 HepG2-LUC 高浓度组、HepG2-LUC+Matrigel 低/中高浓度组、Hep3B-LUC 中/高浓度组和 Hep3B-LUC+Matrigel 低/中/高浓度组均造模成功, 且肿瘤生长情况与时间呈指数型关系。

动物模型可以分为异位模型与原位模型。相比于异位模型, 原位模型能够更准确地模拟肿瘤微环境(特别是血管化和基质的影响), 因此成为动物肝肿瘤的主要造模方式^[9,12]。目前最常用的方法是皮下荷瘤后组织移植法^[13-15], 即将体外培养的细胞皮下注射于腋窝处建立肿瘤后剪碎移植于肝脏, 这种操作方法简单, 但肿瘤生长速度较慢导致耗费时间过长, 并且所需动物数目较多^[16]。另一种方法是本文采用的原位细胞注射法, 即直接将肝肿瘤细胞注射到实验动物的肝脏内, 能够减少使用动物数量, 提高造模效率, 加快药物研究进程, 但操作不当易造成组织损伤、动物死亡。使用棉签按压、电凝笔止血、减少术中对肝脏的压迫等方法可减少术中出血、减少漏液与组织损伤、降低肿瘤转移率^[17]。研究表明, 通过合理改进相关手术细节, 基本可避免出现肝肿瘤转移。

在原位细胞注射建立的肝肿瘤模型中, 每只小鼠接种的细胞数量是影响肿瘤发展速度的重要因素, 但不同细胞所需的接种数量也有所不同。Wu等^[11]选用的 Huh7-LUC 细胞接种数量为 1.0×10^6 个/只, 第20天平均发光强度达到 1.0×10^8 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$)。但 Zhang等^[18]选用的 Hepa1-6-LUC 细胞接种数量仅为 4×10^5 个/只, 第20天平均发光强度同样可达到 1.0×10^8 p/ ($s \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr}$)。此外, 选择合适的肝肿瘤细胞浓度与注射体积也是利



注：HepG2-LUC，用PBS稀释成不同细胞浓度的荧光素酶报告基因（LUC）标记的人肝母细胞瘤HepG2细胞接种裸小鼠左肝叶后35 d；HepG2-LUC+Matrigel，与Matrigel基质胶（4 mg/mL）以1：1的比例混合成不同细胞浓度的LUC标记的人肝母细胞瘤HepG2细胞接种裸小鼠左肝叶后35 d；Hep3B-LUC，用PBS稀释成不同细胞浓度的LUC标记的人肝癌细胞Hep3B接种裸小鼠左肝叶后35 d；Hep3B-LUC+Matrigel，与Matrigel基质胶（4 mg/mL）以1：1的比例混合成不同细胞浓度的LUC标记的人肝癌细胞Hep3B接种裸小鼠左肝叶后35 d。A图中比例尺大小为5 mm，B图中各细胞浓度组内左右两图的比例尺大小分别为50 μm 和20 μm 。

Note: HepG2-LUC, left liver lobe of nude mice 35 days after in-situ modeling with human hepatoblastoma HepG2 cells labeled with luciferase reporter gene (LUC) and diluted with PBS into different cell concentrations. HepG2-LUC+Matrigel, left liver lobe of nude mice 35 days after in-situ modeling with human hepatoblastoma HepG2 cells labeled with LUC and diluted with 4 mg/mL Matrigel into different cell concentrations. Hep3B-LUC, left liver lobe of nude mice 35 days after in-situ modeling with human hepatocellular carcinoma Hep3B cells labeled with LUC and diluted with PBS into different cell concentrations. Hep3B-LUC+Matrigel, left liver lobe of nude mice 35 days after in-situ modeling with human hepatocellular carcinoma Hep3B cells labeled with LUC and diluted with 4 mg/mL Matrigel into different cell concentrations. The scale size is 5 mm in figure A, and the scale sizes of the left and right graphs in each cell concentration group are 50 μm and 20 μm respectively in figure B.

图4 不同接种细胞浓度、不同介质的肝肿瘤模型裸小鼠的肝脏组织典型图片 (A) 和HE染色图 (B)

Figure 4 Gross images (A) and HE staining (B) of liver tissue in nude mouse liver tumor models with different cell concentrations and suspension media

用原位细胞注射法构建原位移植性肿瘤动物模型时较难把握的一个问题,细胞浓度过高易形成栓塞,注射体积过大对操作者技术要求高。现有肝肿瘤原位细胞注射模型中所选择的注射体积与细胞浓度各不相同。如同样利用鼠源H22细胞建模,罗晓琴等^[17]的研究中使用细胞浓度高达 10^8 个/mL,而注射体积仅为 $5\ \mu\text{L}$,细胞总量为 5×10^5 个/只;李泽山等^[19]则使用细胞浓度为 1.0×10^6 个/mL,注射体积为 $20\ \mu\text{L}$,细胞总量为 2×10^4 个/只;潘蕊等^[20]同样使用细胞浓度为 1.0×10^6 个/mL,但注射体积高达 $100\ \mu\text{L}$,细胞总量为 1.0×10^5 个/只。对于HepG2细胞原位注射模型也同样存在不足,如赵然等^[21]将 $150\ \mu\text{L}$ 、 1.0×10^7 个/mL的HepG2细胞直接注射到肝脏中,仅采用棉签按压止血,腹壁粘连率高达90%,推测是由于注射体积过大导致细胞溢漏至创口或腹腔;尹君等^[22]将HepG2细胞浓度调整至 8.5×10^7 个/mL,注射体积为 $60\ \mu\text{L}$,细胞总量为 5.1×10^6 个/只,虽未发现腹壁粘连,但是小鼠均在第20天左右死亡,推测是由于注射细胞总量过大导致病情发展迅速。

为了解决以上问题,参考现有的文献报告结果,本研究选取了较低(4.0×10^5 个/只)、中等(1.2×10^6 个/只)和较高(3.6×10^6 个/只)共3个细胞接种量梯度,比较不同接种量对肿瘤发展速度和模型构建效果的影响,以期构建稳定高效的肝肿瘤裸小鼠模型,为其他相关细胞系构建类似模型提供实验参考。本研究选取的两种人源细胞有以下特性:HepG2源自人肝母细胞瘤,具有低转移、在裸小鼠中成瘤率较差的特点,AFP阳性,HBsAg阴性,无乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因组^[23-24]。但该细胞系所含有的生物转化代谢酶与人正常肝实质细胞同源,在药物作用相关研究中代谢酶保持稳定,是肝细胞代谢或遗传毒性方面研究的理想细胞系^[25-26];Hep3B源自人肝细胞癌,在裸小鼠中能致瘤,但基本不转移^[23]。与HepG2不同的是,这株细胞整合了完整的HBV基因组,可用于HBV感染后发展致癌的相关研究。本研究结果表明,对于HepG2与Hep3B细胞系,原位注射细胞总量至少需要达到 1.0×10^6 个,才能保证成瘤率。

Matrigel基质胶是一种富含细胞外基质蛋白和各种生长因子的可溶组织基底膜基质。目前,Matrigel已被证实能够提高人肿瘤细胞在裸小鼠上的生长速度,有助于减少异质性和细胞渗漏,提高造模成功率,同时减少细胞使用数目^[27]。另外,Matrigel基质胶已被应

用在多种癌症的异种模型中^[28-31],但在肝肿瘤中Matrigel主要应用于类器官的培养^[32-34]。本研究通过对比实验探索了Matrigel基质胶在异种肝肿瘤原位模型中的功能,发现HepG2-LUC+Matrigel与Hep3B-LUC+Matrigel不同浓度组均能观察到肝脏肿瘤生长,且成像结果显示发光强度均与时间呈正相关,而未使用Matrigel的HepG2中、低浓度组和Hep3B低浓度组则未能成功造模。由此可见,Matrigel的使用可以在肝肿瘤细胞较少时支撑并促进肿瘤生长。此外,Matrigel在高于 $10\ ^\circ\text{C}$ 的环境下会迅速凝固,将细胞与Matrigel混合后注射入小鼠肝脏内,细胞随凝固的Matrigel固定在肝脏内,有效地防止了因细胞外溢造成的腹腔播散。总体来看,使用Matrigel可极大提高构建肝肿瘤原位模型的成功率。

成像技术的进步对于生物学、药学和医学的发展具有推动作用,小动物活体成像的主要优势是能够监测深层肿瘤、发现转移灶等^[35-36],因此被广泛应用于组织药代动力学、药效学研究^[37]。本研究的成像结果表明两种细胞系建立的原位肿瘤模型均未出现肿瘤转移,该结果与HepG2细胞特性相符。但对于Hep3B细胞,黎凤鸣等^[15]构建的Hep3B皮下移植瘤模型显示肿瘤转移,而本研究未发现肿瘤转移。鉴于也有报告称Hep3B细胞系的迁移能力低^[38-39],所以对于Hep3B细胞系可能还需做进一步的特性研究。

综上所述,本文探究了Matrigel基质胶对于构建原位肝肿瘤模型的影响,优化了2种人肝肿瘤细胞的裸小鼠原位移植模型条件,利用小动物活体成像技术监测肿瘤发展情况,推荐的造模条件如下:不易成瘤的HepG2-LUC细胞单独注射造模时所需细胞量较大,辅以Matrigel能够减少细胞用量且加快肿瘤发展速度,但当细胞浓度高时模型动物的体重下降过快,说明进入肿瘤末期过早,故推荐每只小鼠注射 1.2×10^6 个细胞(如体积 $50\ \mu\text{L}$ 、浓度 2.4×10^7 个/mL),并使用基质胶辅助造模,于造模后第7天给药或采取预后措施。Hep3B-LUC、Hep3B-LUC+Matrigel 2组使用高浓度细胞建模后原位肝肿瘤的初期表现很相似(第7天生物发光强度接近),但后者(即辅以Matrigel混悬后)与低、中浓度组相比,第7天开始体重显著下降,且肿瘤发展速度较快(第35天生物发光强度达到 1.2×10^9 p/(s·cm²·sr),动物状态过差会影响后续实验;Hep3B-LUC+Matrigel中浓度组($Y=10^{5.6}\times e^{0.14X}$)与Hep3B-LUC高浓度组($Y=10^6\times e^{0.16X}$)的肿瘤发展曲线相似,疾病

进展速度适宜; 相比之下, Hep3B-LUC+Matrigel 低浓度组的肿瘤发展速度较慢, 同时考虑到经济因素与操作便捷性, 故推荐每只小鼠注射 3.6×10^6 个细胞 (如体积 $50 \mu\text{L}$ 、浓度 7.2×10^7 个/mL), 不使用基质胶辅助造模, 可于造模第 14 天给药或采取预后措施。该模型构建方法的优化可为相关研究者提供参考, 极大提高实验重复性, 促进肝肿瘤相关药物研究与临床治疗。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学实验动物伦理与使用委员会审批通过 (批号为 A2023099)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Shanghai Jiao Tong University (Approval Number: A2023099). All experimental procedures were performed in accordance with the relevant laws and regulations regarding experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

孟雨负责实验操作、论文撰写、统计分析、论文修改;
梁冬丽负责课题方案设计、实验监督与指导、论文修改;
郑琳琳、周园园参与了部分细胞实验与动物实验, 支撑仪器测试;
王朝霞负责调查研究、整体构思、资金支持、文章讨论。

[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] SELVAGGI F, CATALANO T, COTELLESE R, et al. Targeting Wnt/ β -catenin pathways in primary liver tumours: from microenvironment signaling to therapeutic agents[J]. *Cancers*, 2022, 14(8):1912. DOI: 10.3390/cancers14081912.
- [2] ZHENG H C, XUE H, YUN W J. An overview of mouse models of hepatocellular carcinoma[J]. *Infect Agent Cancer*, 2023, 18(1):49. DOI: 10.1186/s13027-023-00524-9.
- [3] MARRERO J A, KULIK L M, SIRLIN C B, et al. Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the American association for the study of liver diseases[J]. *Hepatology*, 2018, 68(2): 723-750. DOI: 10.1002/hep.29913.
- [4] EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(1): 182-236. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.
- [5] MOLINA-SÁNCHEZ P, LUJAMBIO A. Experimental models for preclinical research in hepatocellular carcinoma[M]// *Molecular and Translational Medicine*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 333-358. DOI: 10.1007/978-3-030-21540-8_16.
- [6] KALYAN A, NIMEIRI H, KULIK L. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: current and promising[J]. *Clin Liver Dis*, 2015, 19(2):421-432. DOI: 10.1016/j.cld.2015.01.009.
- [7] CZAUDERNA P, ZBRZEZNIAK G, NAROZANSKI W, et al. Preliminary experience with arterial chemoembolization for hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma in children[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2006, 46(7): 825-828. DOI: 10.1002/pbc.20422.
- [8] BROWN Z J, HEINRICH B, GRETEN T F. Mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and highlights for immunotherapy research[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(9):536-554. DOI: 10.1038/s41575-018-0033-6.
- [9] 雷会霞, 苗明三. 基于数据挖掘的肝癌动物模型应用分析[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(3):186-190. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.20210615.006.
LEI H X, MIAO M S. Application analysis of liver cancer animal model based on data mining[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2022, 38(3): 186-190. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.20210615.006.
- [10] 陈志刚, 纪志刚, 石冰冰, 等. 荧光素酶在膀胱肿瘤动物模型中的应用[J]. *北京医学*, 2015, 37(11):1101-1103. DOI: 10.15932/j.0253-9713.2015.11.027.
CHEN Z G, JI Z G, SHI B B, et al. Application of luciferase in animal model of bladder tumor[J]. *Beijing Med J*, 2015, 37(11): 1101-1103. DOI: 10.15932/j.0253-9713.2015.11.027.
- [11] WU T, HEUILLARD E, LINDNER V, et al. Multimodal imaging of a humanized orthotopic model of hepatocellular carcinoma in immunodeficient mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35230. DOI: 10.1038/srep35230.
- [12] GU C Y, LEE T K W. Preclinical mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and update[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 412(2):113042. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113042.
- [13] ZHOU Z F, PENG F, LI J Y, et al. Intratumoral IL-12 gene therapy inhibits tumor growth in A HCC-hu-PBL-NOD/SCID murine model[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:7773-7784. DOI: 10.2147/OTT.S222097.
- [14] HUANG Q X, HE S S, ZHAN D A. Osimertinib is a dual inhibitor of hepatocellular carcinoma and angiogenesis in an EGFR-independent manner, and synergizes with venetoclax [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(12):10727-10735. DOI: 10.1007/s00432-023-04926-5.
- [15] 黎凤明, 王静妮, 王春苗, 等. 人肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞的异质性与生物学行为关系的初探[J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(3):398-405. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.03.009.
LI F M, WANG J N, WANG C M, et al. Preliminary research on the relationship between heterogeneity and biological behavior of human hepatocellular carcinoma HepG2 and Hep3B cells[J]. *J Guangxi Med Univ*, 2023, 40(3):398-405. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.03.009.
- [16] 敬文宪, 张伶俐. 肿瘤研究中的实验动物福利问题探讨[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(9):1234-1240. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.09.015.
JING W X, ZHANG L L. Discussing the welfare of laboratory animals in tumor research[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2023, 31(9):1234-1240. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.09.015.

- [17] 罗晓琴, 丁冠茗, 郑旭, 等. 小鼠肝癌原位移植性肿瘤动物模型的改良[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6):16-22. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.06.003.
LUO X Q, DING G M, ZHENG X, et al. Improved mouse model of orthotopic transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6):16-22. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.06.003.
- [18] ZHANG Y T, ZHONG A X, MIN J, et al. Biomimetic responsive nanoconverters with immune checkpoint blockade plus antiangiogenesis for advanced hepatocellular carcinoma treatment[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2024, 16(6): 6894-6907. DOI: 10.1021/acsami.3c18140.
- [19] 李泽山, 刘超, 申东方, 等. 虎杖提取物对小鼠肝癌原位移植瘤及 miRNA-204-5p/Jarid2/PTEN 信号通路的影响[J]. 智慧健康, 2022, 8(10):179-182, 192. DOI: 10.19335/j.cnki.2096-1219.2022.10.054.
LI Z S, LIU C, SHEN D F, et al. Effects of *Polygonum cuspidatum* extract on orthotopic transplanted liver cancer and miRNA-204-5p/Jarid2/PTEN signaling pathway in mice[J]. Smart Healthc, 2022, 8(10):179-182, 192. DOI: 10.19335/j.cnki.2096-1219.2022.10.054.
- [20] 潘蕊, 喻锐, 张海亮, 等. 不同方法建立小鼠肝癌原位移植瘤模型差异性的探讨[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3):329-336. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.006.
PAN R, YU K, ZHANG H L, et al. Different transplantation models of hepatocellular carcinoma in mice[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2024, 32(3):329-336. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.006.
- [21] 赵然, 刘羽, 高丽丽, 等. HepG2 细胞皮下接种与肝原位接种成瘤的比较研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(3):205-207, 211. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1905.2010.03.002.
ZHAO R, LIU Y, GAO L L, et al. Comparative study of subcutaneous injection and liver injection of HepG2 cells to develop tumor model[J]. J Harbin Med Univ, 2010, 44(3):205-207, 211. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1905.2010.03.002.
- [22] 尹君, 李景丁莎, 左丛林, 等. 人源性肝癌细胞小鼠原位移植瘤模型的建立及特点的比较研究[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 68-74. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.012.
YIN J, LIJING D S, ZUO C L, et al. Establishment of mouse orthotopic transplantation tumor models of human hepatoma and comparison of their characteristics[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(12):68-74. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.012.
- [23] 农宜熙, 黄俊玲, 黄赞松, 等. 人肝癌细胞株的特性及其实验应用[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(2):159-165. DOI: 10.11569/wcjd.v25.i2.159.
NONG Y X, HUANG J L, HUANG Z S, et al. Characteristics and experimental applications of human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. World Chin J Dig, 2017, 25(2):159-165. DOI: 10.11569/wcjd.v25.i2.159.
- [24] ARZUMANIAN V A, KISELEVA O I, POVERENNAYA E V. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23):13135. DOI: 10.3390/ijms222313135.
- [25] ŠTAMPAR M, TOMC J, FILIPIČ M, et al. Development of *in vitro* 3D cell model from hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line and its application for genotoxicity testing[J]. Arch Toxicol, 2019, 93(11): 3321-3333. DOI: 10.1007/s00204-019-02576-6.
- [26] KNOWLTON S, TASOGLU S. A bioprinted liver-on-a-chip for drug screening applications[J]. Trends Biotechnol, 2016, 34(9): 681-682. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.05.014.
- [27] BENTON G, ARNAOUTOVA I, GEORGE J, et al. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 79-80:3-18. DOI: 10.1016/j.addr.2014.06.005.
- [28] MULLEN P. The use of Matrigel to facilitate the establishment of human cancer cell lines as xenografts[J]. Methods Mol Med, 2004, 88: 287-292. DOI: 10.1385/1-59259-406-9:287.
- [29] MORENO J A, SANCHEZ A, HOFFMAN R M, et al. Fluorescent orthotopic mouse model of pancreatic cancer[J]. J Vis Exp, 2016(115):54337. DOI: 10.3791/54337.
- [30] QUINTANA E, SHACKLETON M, SABEL M S, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells[J]. Nature, 2008, 456(7222):593-598. DOI: 10.1038/nature07567.
- [31] BEYREUTHER E, BRÜCHNER K, KRAUSE M, et al. An optimized small animal tumour model for experimentation with low energy protons[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177428. DOI: 10.1371/journal.pone.0177428.
- [32] BROUTIER L, MASTROGIOVANNI G, VERSTEGEN M M, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening[J]. Nat Med, 2017, 23(12):1424-1435. DOI: 10.1038/nm.4438.
- [33] NUCIFORO S, FOFANA I, MATTER M S, et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies[J]. Cell Rep, 2018, 24(5): 1363-1376. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.001.
- [34] LI L, KNUTSDOTTIR H, HUI K, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity[J]. JCI Insight, 2019, 4(2): e121490. DOI: 10.1172/jci.insight.121490.
- [35] 郑南南, 黄钢. 小动物活体光学三维成像系统及其对乳腺癌的定量分析[J]. 激光生物学报, 2022, 31(3):215-223. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2022.03.004.
ZHENG N N, HUANG G. Small animal living three-dimensional optical imaging system and its quantitative analysis of breast cancer[J]. Acta Laser Biol Sin, 2022, 31(3): 215-223. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2022.03.004.
- [36] LI G, CHI C W, SHAO X F, et al. Application of molecular imaging technology in evaluating the inhibiting effect of apigenin *in vivo* on subcutaneous hepatocellular carcinoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 487(1): 122-7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.029.
- [37] 夏猛, 孙玉浩, 王萌, 等. 原发性肝癌常见动物模型的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(8):1938-1942. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.08.042.
XIA M, SUN Y H, WANG M, et al. Research advances in commonly used animal models of primary hepatocellular

- carcinoma[J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(8):1938-1942. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.08.042.
- [38] BHATTACHARYA S D, MI Z Y, KIM V M, et al. Osteopontin regulates epithelial mesenchymal transition-associated growth of hepatocellular cancer in a mouse xenograft model [J]. Ann Surg, 2012, 255(2):319-325. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31823e3a1c.
- [39] XU Q R, LIU X, LIU Z K, et al. MicroRNA-1296 inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma by targeting SRPK1-mediated PI3K/AKT pathway[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 103. DOI: 10.1186/s12943-017-0675-y.

(收稿日期:2024-03-25 修回日期:2024-06-03)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,周烁)

[引用本文]

- 孟雨, 梁冬丽, 郑琳琳, 等. 人源肝肿瘤细胞的裸小鼠原位癌建模条件优化及评价[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 511-522. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.048.
- MENG Y, LIANG D L, ZHENG L L, et al. Optimization and evaluation of conditions for orthotopic nude mouse models of human liver tumor cells[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(5): 511-522. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.048.

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

《实验动物与比较医学》编辑部

改良型十二指肠旷置术对2型糖尿病大鼠糖代谢的影响

杨 劲¹, 俞诗雅², 林 楠^{1,2}, 方永超¹, 赵 虎¹, 邱锦维², 林鸿铭², 陈惠燕², 王 瑜¹, 吴伟航^{1,2}

(1. 联勤保障部队第九〇〇医院普通外科, 福州 350000; 2. 福建医科大学福总临床医学院普通外科, 福州 350000)

[摘要] **目的** 探讨防反流的改良型十二指肠旷置术对2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 大鼠糖代谢的影响, 明确十二指肠在维持葡萄糖稳态中的作用。**方法** 取40只5周龄的雄性SD大鼠, 通过高脂饲料喂养联合低剂量链脲霉素诱导T2DM。将36只达到T2DM模型标准的大鼠随机分为3组: 单纯十二指肠旷置术组 (DE组)、防反流的改良型十二指肠旷置术组 (MDE组) 及假手术组 (SO组), 每组12只。术后第4周行胃肠道造影, 并分别于术前及术后1、2、4、8周检测各组大鼠的体重、空腹血糖浓度、血清胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 浓度; 术后8周处死大鼠, 取每组大鼠胆胰袢1 cm 肠段, 行病理切片的苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色后在光学显微镜下观察肠黏膜绒毛长度。**结果** 胃肠造影显示DE组中造影剂明显向十二指肠腔反流, 而MDE组未见反流现象。术后1周, 3组大鼠的体重较术前均短暂性显著下降 ($P<0.05$), 之后各组大鼠体重均随时间增长, 组间体重无显著差异 ($P>0.05$)。与SO组比较, MDE组和DE组术后各个时间点的空腹血糖浓度明显下降 ($P<0.05$), GLP-1浓度显著升高 ($P<0.05$); MDE组术后各个时间点的空腹血糖浓度均比DE组低 ($P<0.05$), 但MDE组和DE组之间术后各个时间点的血清GLP-1浓度无显著差异 ($P>0.05$)。在肠黏膜形态学上, MDE组大鼠的胆胰袢黏膜绒毛长度均明显短于DE组和SO组 ($P<0.05$)。**结论** 防反流的改良型十二指肠旷置术可以有效改善T2DM大鼠的糖代谢, 避免食糜向旷置的十二指肠反流, 从而加强其降糖作用。

[关键词] 十二指肠旷置术; 2型糖尿病; 血糖; 胃肠道造影; 肠绒毛; 大鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0523-08



Effect of Modified Duodenal Exclusion Surgery on Glucose Metabolism in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

YANG Jin¹, YU Shiya², LIN Nan^{1,2}, FANG Yongchao¹, ZHAO Hu¹, QIU Jinwei², LIN Hongming², CHEN Huiyan², WANG Yu¹, WU Weihang^{1,2}

(1. Department of General Surgery, 900th Hospital of Joint Logistics Support Force, PLA, Fuzhou 350000, China; 2. Fuzong Clinical Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350000, China)

Correspondence to: WU Weihang (ORCID: 0000-0002-7335-6388), E-mail: 454646066@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the impact of anti-reflux modified duodenal exclusion surgery on glucose metabolism in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM), and to elucidate the role of the duodenum in maintaining glucose homeostasis. **Methods** Forty male Sprague-Dawley rats aged 5 weeks were fed a high-fat diet and induced with T2DM using low-dose streptozotocin. Thirty-six rats that met the T2DM model criteria were randomly divided into three groups: the simple duodenal exclusion surgery group (DE group), the anti-reflux modified duodenal exclusion group (MDE group), and the sham operation group (SO group), with 12 rats in each group. Gastroenterography was performed 4 weeks after surgery, and the body weight, fasting blood glucose levels, and serum glucagon-like peptide-1 (GLP-1) concentrations were measured before surgery and at 1, 2, 4, and 8 weeks post-surgery. Eight weeks post-surgery, the rats were euthanized, and a 1 cm segment of the biliopancreatic loop was collected from each group for pathological

[第一作者] 杨 劲 (1993—), 男, 硕士, 住院医师, 研究方向: 胃肠疾病、代谢与减重外科治疗。E-mail: 766753548@qq.com. ORCID: 0000-0002-8454-283X

[通信作者] 吴伟航 (1990—), 男, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 胃肠道肿瘤分子机制、早期诊断和营养学治疗。E-mail: 454646066@qq.com. ORCID: 0000-0002-7335-6388

sectioning and HE staining to observe the intestinal mucosal villus length under an optical microscope. **Results** Gastroenterography showed that there was significant reflux of the contrast agent into the duodenal lumen in the DE group, while no reflux was observed in the MDE group. At one week post-surgery, the body weights of rats in all three groups significantly decreased compared to before surgery ($P < 0.05$), and then the body weights of all groups increased over time, with no significant differences between the groups ($P > 0.05$). Compared with the SO group, the fasting blood glucose levels in the MDE and DE groups significantly decreased at all time points post-surgery ($P < 0.05$), while GLP-1 concentrations significantly increased ($P < 0.05$). The fasting blood glucose levels in the MDE group were lower than those in the DE group at all time points post-surgery ($P < 0.05$), but there were no significant differences in serum GLP-1 concentrations between the MDE and DE groups ($P > 0.05$). Regarding intestinal mucosal morphology, the villus lengths of the biliopancreatic loops in the MDE group were significantly shorter than those in the DE and SO groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Anti-reflux modified duodenal exclusion surgery effectively improves glucose metabolism in T2DM rats by preventing the reflux of chyme into the diverted duodenum, thereby enhancing its hypoglycemic effect.

[Key words] Duodenal exclusion surgery; Type 2 diabetes mellitus; Blood glucose; Gastroenterography; Intestinal villi; Rats

近 30 年来，全球范围内 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的患者数逐年上升，严重危害人类健康。在中国，成年人糖尿病的患病率达到 10.9%^[1-2]，其中 T2DM 约占 90%。外科减重手术在减轻体重的同时，可以有效治疗 T2DM，且效果优于药物治疗^[3]。有研究报告，胆胰分流 (biliopancreatic diversion, BPD) 和 Roux-en-Y 胃转流术的降糖效果均较好，分别为 95% 和 75%^[4-7]。这两种术式的降糖效果有差异，分析其原因可能是旷置小肠的长度不同导致。BPD 手术旷置小肠较长，几乎不存在食糜反流至十二指肠，因此降糖效果更佳。笔者推测，隔绝食糜与十二指肠的接触在降糖中可能起到一定作用，但单纯小肠旷置仍不可避免食糜反流。故本研究拟通过比较在十二指肠与空肠之间放置硅胶管以防止食糜反流的改良型十二指肠旷置术 (modified duodenal exclusion, MDE) 与单纯十二指肠旷置术 (duodenal exclusion, DE) 对 T2DM 大鼠空腹血糖的改善情况，进一步探讨其降糖的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只，5~6 周龄，平均体重为 150 g，购自福州世宸生物科技有限公司 [SCXK (闽) 2016-0002]。所有实验大鼠饲养于中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院比较医学科实验动物中心的屏障环境设施 [SYXK (闽) 2018-0006] 中，每笼饲养 4 只，大鼠可自由摄食高脂饲料及饮水。屏障系统中室

温 20~26 °C，相对湿度 40%~70%，换气 ≥15 次/h，采用全新风系统，光照明暗各 12 h。动物实验方案通过联勤保障部队第九〇〇医院实验动物福利伦理委员会审查批准 (2020-79)。

高脂饲料 (含 10% 猪油、2.5% 胆固醇、20% 蔗糖、67.5% 基础饲料) 购自上海懋康生物科技有限公司 (MS1607)；500 mg 链脲霉素 (streptozocin, STZ) 购自美国 Sigma Aldrich 公司 (V900890)；安素肠内营养粉购自福建康德乐大药房 (H20080270)；拜安捷 2 代 (BayerBreeze2) 血糖仪购自德国 Bayer 公司 (YZB/USA 5910-2011)；管径 4 mm 的硅胶管购自美国 Thermo Fisher 公司 (TSR0200100p)；二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV) 抑制剂 (HY-169110) 及血清胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 检测用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (E-AB-F0994D) 均购自美国 AD 公司。

1.2 大鼠 T2DM 模型建立

40 只 SD 大鼠均自由摄食高脂饲料、净水，高脂饲料喂养 4 周后，大鼠禁食 12 h，以 30 mg/kg 剂量的 STZ 行一次性腹腔注射。STZ 注射后继续高脂饲料喂养，72 h 及 1 周后测大鼠的随机血糖。若两次测量的随机血糖浓度均 ≥16.7 mmol/L，则认为达到 T2DM 模型标准。结果发现，在 40 只 SD 鼠中，有 36 只达到了 T2DM 标准。

1.3 手术分组及手术操作

将 36 只 T2DM 模型大鼠随机分成 3 组，每组 12 只，分别行十二指肠旷置术 (DE 组)、置管+十二指肠旷置

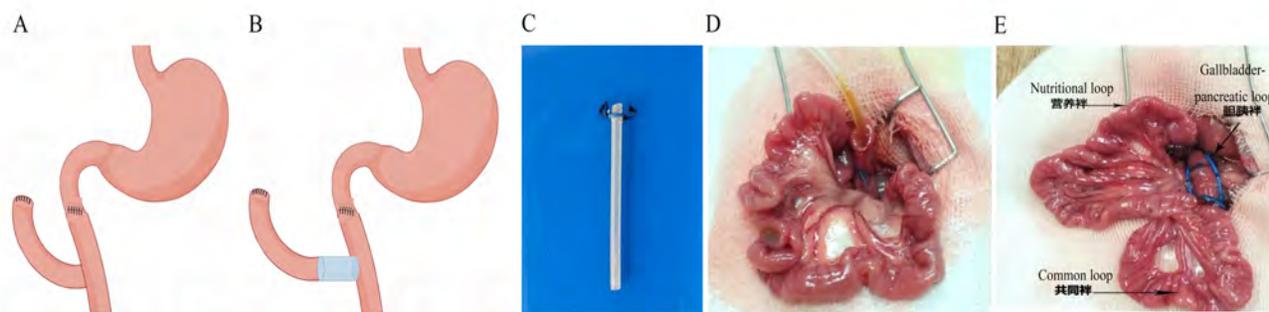
术 (MDE 组) 及假手术 (SO 组)。各组大鼠于术前禁食 18 h, 自由饮水, 以 4 mL/kg 剂量的氯胺酮腹腔注射麻醉。麻醉成功后, 消毒、铺巾, 于腹部正中线、剑突下 4 cm 切口。

DE 组 (图 1A): 用手术剪逐层切开皮肤、肌肉及腹膜, 进入腹腔, 自幽门下 5 mm 处横断十二指肠, 用 2-0 号丝线行荷包缝合以包埋十二指肠残端; 距屈氏韧带 2 cm 处横断空肠, 将远端空肠与胃幽门残端行端端吻合, 在距离吻合口 15 cm 处的空肠系膜对侧肠壁上切开一条长约 1 cm 的切口, 并与空肠近端进行端侧吻合。

MDE 组 (图 1B): 在与 DE 组相同的位置横断肠管, 缝合包埋十二指肠残端, 远端空肠与胃幽门残端

行端端吻合; 在距离吻合口 15 cm 处的空肠系膜对侧肠壁上切开一条长约 1 cm 的切口, 将一只长约 4 cm、管径约 2 mm 的硅胶管 (图 1C) 的一端两侧缝合并固定于近端空肠肠壁上 (图 1D), 另一端伸入空肠远端, 再用 5-0 医用涤纶编织线行肠管端侧吻合。为了便于造影中识别胆胰袢, 术中在胆胰袢两侧以及胆胰袢与共同袢吻合口处固定医用显影条标记 (图 1E)。

SO 组: 在幽门下方和空肠相同位置切断肠管, 并在原处行端端吻合, 保持相同的创伤与暴露时间, 然后彻底止血, 用温生理盐水冲洗腹腔, 逐层关闭腹腔。在动物复苏期间, 为了维持大鼠体温, 采用红外线加热设备, 以确保在麻醉苏醒过程中大鼠的核心体温保持稳定。



注: A, DE 组手术示意图; B, MDE 组手术示意图; C, 采用直径约 2 mm、长约 4 cm 硅胶管制成的十二指肠肠腔套管, 头端标示显影条, 便于造影中识别; D, 将硅胶套管一端缝合固定于肠壁, 可见胰液从硅胶管通畅流出; E, 单纯十二指肠旷置后吻合结束, 于胆胰袢及胆胰袢和共同袢的吻合口处标记显影条, 便于术后造影中识别胆胰袢。

Note: A, Schematic diagram of the surgical procedure for the DE group. B, Schematic diagram of the surgical procedure for the MDE group. C, Duodenal intestinal lumen tubes made of silicone tubing of about 2 mm in diameter and 4 cm in length, with the head end labeled with a contrast strip for easy identification in imaging. D, One end of the silicone tube was sutured to the intestinal wall, allowing biliopancreatic fluid to flow smoothly from the silicone tube. E, End of the anastomosis after simple duodenal exclusion surgery, with contrast strips marking the biliopancreatic loop and the anastomosis of biliopancreatic loop and common loop to facilitate the identification in postoperative imaging.

图 1 单纯十二指肠旷置术 (DE) 组和防反流十二指肠旷置术 (MDE) 组大鼠的手术示意图

Figure 1 Surgical illustrations of rats in the duodenum exclusion (DE) group and the modified duodenum exclusion (MDE) group with anti-reflux

1.4 胃肠道造影观察

术后 4 周, 对大鼠行胃肠道的泛影葡胺造影, 以观察 DE 术后胃肠道的解剖结构及其运动特点。先给大鼠灌胃 1 mL/100 g 剂量的泛影葡胺造影剂, 30 min 后, 再给大鼠腹腔注射 4 mL/kg 剂量的氯胺酮, 待大鼠麻醉后, 四肢固定于木板上, 进行 X 线透视观察。

1.5 术后指标检测

术后禁水 6 h, 禁食 3 h, 予以 5% 葡萄糖生理盐水 20 mL/d 皮下注射补液, 第 4 天起改流质饮食 (10% 安

素溶液), 第 7 天恢复正常普通饲料饮食。分别测定各组大鼠在术前 (0 周) 以及术后 1 周、2 周、4 周、8 周禁食 12 h 后的体重。术后第 2 周起, 每日监测大鼠进食量, 人为控制添加饮食至 13.5~15.0 g。用拜安捷 2 代血糖仪, 通过尾静脉, 检测各组大鼠的空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG) 浓度。于眼内眦静脉, 用毛细玻璃管采血 2 mL, 立即滴入 1% DPP-IV 抑制剂 (一种 T2DM 治疗药物, 可以提高内源性 GLP-1 浓度), 3 500 r/min 离心 5 min 后取血清, 用 ELISA 试剂盒检测

血清中GLP-1的浓度。

1.6 肠道组织病理观察

术后8周，通过腹腔注射氯胺酮（按剂量100 mg/kg体重）的方法安乐死各组大鼠，在安静环境中监测大鼠直至确认其死亡，确保过程符合伦理要求。DE组和MDE组采集胆胰袢肠段：取十二指肠残端至屈氏韧带之间的十二指肠肠管，从中间截取长约1 cm的肠段，经等渗生理盐水冲洗后，浸泡于质量分数为4%的甲醛溶液中，制作病理切片。采用常规苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色法对肠黏膜组织进行染色：切片经梯度乙醇溶液水化后，用苏木精染液进行核染色，随后用1%盐酸乙醇溶液分化；流水冲洗后，用伊红染液进行细胞质染色；脱水、透明后，用中性树胶封固。采用盲法，在光学显微镜下观察肠黏膜的组织形态学特征，用Motic Images Advanced 3.2图像分

析系统测量每个切片中4条肠绒毛的长度，取其平均值进行统计分析。

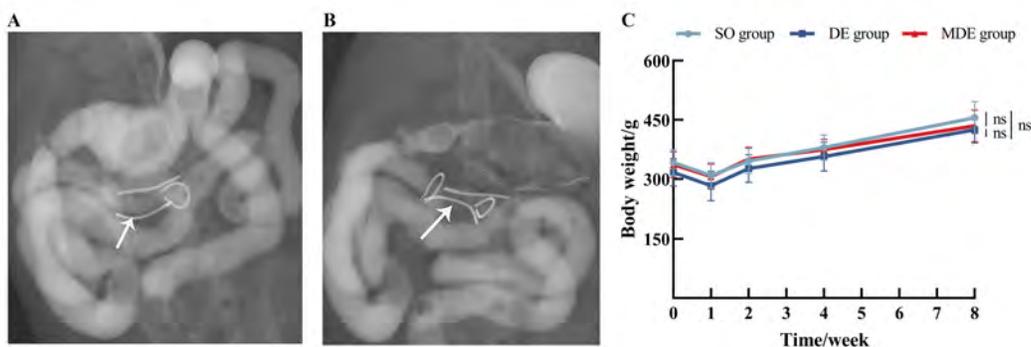
1.7 统计分析

采用SPSS 20.0和Graphpad Prism 8.0软件进行统计学分析以及数据可视化，计量资料以均数±标准差(Mean±SD)表示；多组间比较以(体重/血糖/GLP-1×时间)作为影响因素，进行双因素方差分析，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 术后大鼠胃肠道反流情况

胃肠造影观察发现，单纯行十二指肠旷置术的DE组大鼠胆胰袢存在明显的造影剂反流现象(图2A)，而同时放置了硅胶管的MDE组未见造影剂反流(图2B)。



注：A，单纯十二指肠旷置（DE）组术后的胃肠造影图（图中箭头所示为胆胰袢，可见造影剂反流至胆胰袢中）；B，单纯十二指肠旷置+套管置入（MDE）组术后的胃肠造影图（箭头所示为套管置入的胆胰袢，未见造影剂反流至胆胰袢征象）；C，三组大鼠术后的体重变化（SO，假手术；ns，差异无统计学意义；SO、DE和MDE组大鼠分别为12、11和10只）。

Note: A, Postoperative gastroenterography of simple duodenal exclusion (DE group, $n=11$) (the arrow indicates the biliopancreatic loop, with visible contrast reflux into the loop). B, Postoperative gastroenterography of simple duodenal exclusion + tube placement (MDE group, $n=10$) (the arrow indicates the biliopancreatic loop with inserted tube, with no contrast reflux observed). C, Postoperative body weight changes in three groups of rats (SO, Sham operation, $n=12$; ns, No statistical difference).

图2 DE组及MDE组大鼠术后胃肠造影和体重变化

Figure 2 Postoperative gastroenterography and body weight changes in DE and MDE rat groups

2.2 术后大鼠死亡及并发症情况

实验中，MDE组的2只大鼠分别因肠梗阻和吻合口瘘于术后1周内死亡，DE组的1只大鼠因术后8 h出血死亡，SO组大鼠无死亡。因此，SO、DE和MDE组纳入统计分析的大鼠分别有12、11和10只。实验结束（术后8周）后，安乐死MDE组存活大鼠，解剖观察置管在位情况，发现其中2只大鼠体内放置于十二指肠的硅胶管脱落。

2.3 术后大鼠体重变化

在术前，单纯十二指肠旷置术组（DE组）、防反流十二指肠旷置术组（MDE组）及假手术组（SO组）大鼠的体重差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。与术前相比，3组大鼠术后1周的体重均显著降低（ $P<0.05$ ），组间差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。1周以后随时间大鼠体重逐渐增加，且在各个时间点的组间体重差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）(图2C)。

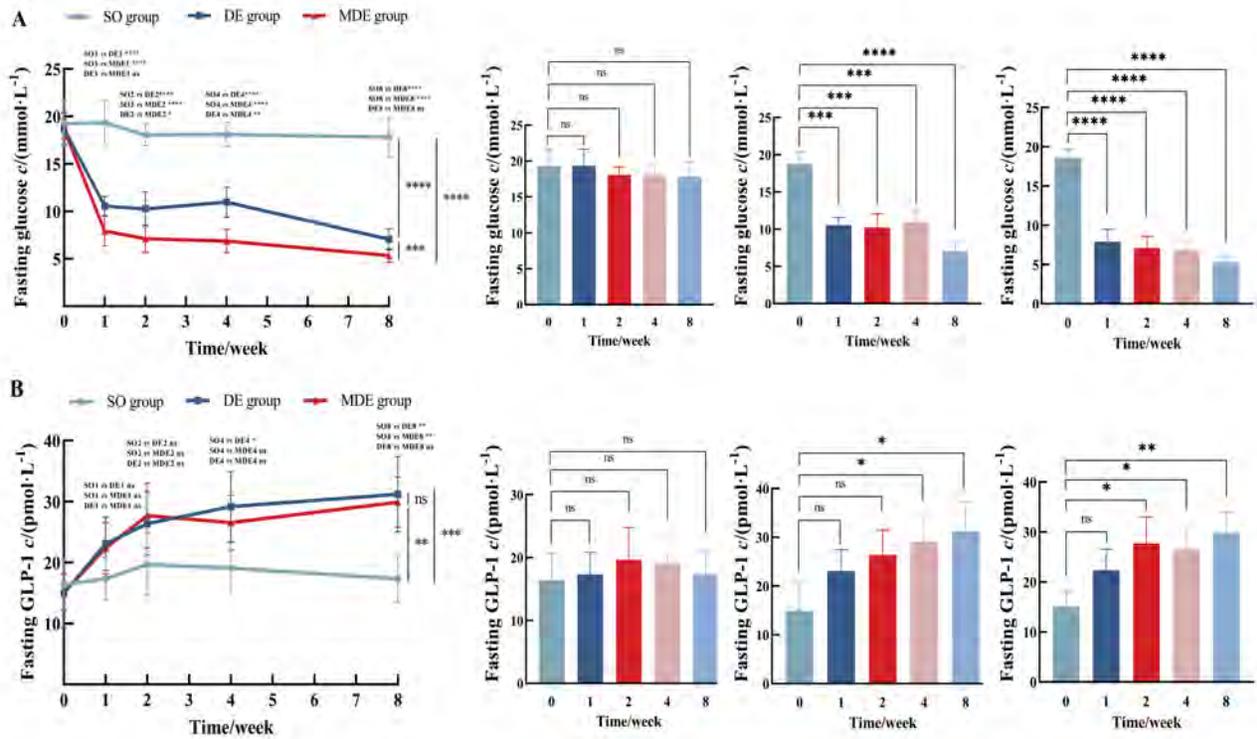
2.4 术后大鼠空腹血糖浓度变化

与术前比较, DE组和MDE组大鼠术后空腹血糖浓度均显著下降 ($P<0.05$), 而SO组术前与术后空腹血糖无明显变化 ($P>0.05$)。DE组和MDE组术后在各个时间点的空腹血糖浓度较SO组均显著降低 ($P<0.05$), 且MDE组术后空腹血糖浓度较DE组更低, 差

异有统计学意义 ($P<0.05$, 图3A)。

2.5 术后大鼠血清GLP-1浓度变化

术后4~8周, DE组和MDE组大鼠的血清GLP-1浓度较术前显著升高 ($P<0.05$), 但两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$); SO组大鼠术前、术后的血清GLP-1浓度相比无显著变化 ($P>0.05$, 图3B)。



注: A, 3组大鼠术前、术后不同时间点的空腹血糖变化折线图和柱形图; B, 3组大鼠术前、术后不同时间点GLP-1的变化折线图和柱形图。SO组, 假手术组, $n=12$; DE组, 单纯十二指肠旷置组, $n=11$; MDE组, 单纯十二指肠旷置+置管/防反流组, $n=10$ 。ns, 差异无统计学意义。*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$, ****表示 $P<0.0001$ 。

Note: A, Line graphs and bar charts showing the changes in fasting glucose levels of the three groups of rats at different time points before and after surgery. B, Line graphs and bar charts of changes in GLP-1 levels at different time points pre- and post-operatively in the three groups of rats. SO group, Sham operation group, $n=12$; DE group, Simple duodenal exclusion group, $n=11$; MDE group, Simple duodenal exclusion with tube placement/anti-reflux group, $n=10$. ns, No statistical difference. * indicates $P<0.05$, ** indicates $P<0.01$, *** indicates $P<0.001$, **** indicates $P<0.0001$.

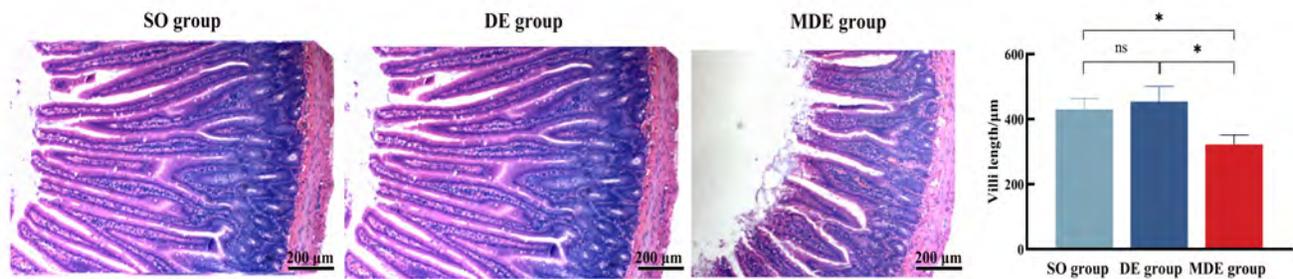
图3 3组大鼠术前、术后不同时间点的空腹血糖和GLP-1浓度变化

Figure 3 Changes in fasting glucose and GLP-1 levels in the three groups of rats at different time points before and after surgery

2.6 术后大鼠的肠黏膜形态学变化

HE染色后显微镜下观察发现, MDE组大鼠的胆胰袢肠黏膜绒毛长度均明显小于DE组和SO组 ($P<0.05$), 而后两组肠的肠绒毛长度无明显差异 ($P>0.05$, 图6)。此外, MDE组的肠黏膜还表现出以下病理组织形态特征: 绒毛变短且排列不规则, 隐窝深度增加,

黏膜层变薄, 细胞核增大且染色质浓缩, 以及细胞间质中炎症细胞浸润增多。相比之下, DE组和SO组的肠黏膜绒毛排列较为整齐, 隐窝深度正常, 黏膜层厚度保持一致, 细胞核大小和染色质分布正常, 炎症细胞浸润较少。这些形态学变化表明, MDE处理可能对肠黏膜的结构和功能产生影响。



注: SO, 假手术组, $n=12$; DE, 单纯十二指肠旷置组, $n=11$; MDE, 单纯十二指肠旷置+置管/防反流组, $n=10$ 。ns, 差异无统计学意义。^{*}表示 $P<0.05$ 。

Note: SO, Sham operation group, $n=12$; DE, Simple duodenal exclusion group, $n=11$; MDE, Simple duodenal exclusion with tube placement/anti-reflux group, $n=10$. ns, No statistical difference. ^{*}indicates $P<0.05$.

图4 3组大鼠术后8周后的胆胰袢肠黏膜绒毛形态图(HE染色, $\times 100$)

Figure 4 Morphology of intestinal mucosal villi of biliopancreatic collaterals in three groups of rats after 8 weeks (HE staining, $\times 100$)

3 讨论

外科代谢手术能够有效缓解T2DM, 其疗效在国际上已得到广泛认可^[8], 但关于其降糖机制, 至今尚未完全阐明。在诸多学说中, “前肠学说”受到当今大多数学者的认同。“前肠学说”认为: 通过旷置十二指肠和一部分近端空肠, 使该段旷置肠管被排除于食糜之外, 减少近端小肠抗胰岛素激素的分泌, 从而达到改善糖代谢的作用^[9]。本课题组前期研究发现, Roux-en-Y胃转流术的降糖效果优于毕Ⅱ式胃大部切除术, 后者是在胃大部切除后将残留胃和上端空肠吻合, 同时将十二指肠残端自行缝合的一种术式; 胃肠造影结果提示, 这可能与毕Ⅱ式更容易发生食糜反流至十二指肠有关^[10]。笔者推测, 外科代谢手术后存在食糜向近端旷置的小肠(胆胰袢)反流, 根据“前肠学说”理论, 一旦食糜向胆胰袢反流, 将会使外科手术的降糖效果大打折扣。有研究报告, T2DM患者通过内镜放置一种带覆膜的十二指肠-空肠支架, 支架上薄膜可隔绝食物与近端小肠接触, 从而达到旷置近端小肠的目的, 结果显示, 在支架植入1周后, 空腹血糖和餐后血糖即明显下降, 并且持续改善至术后24周^[11-12]; 另有研究在自发性糖尿病Goto-Kakizaki (GK)大鼠中放置相似的腔内覆膜, 同样能达到降低血糖、改善糖耐量的效果^[13]。这些研究结果与笔者先前的推测相符合, 且更进一步证实隔绝食糜对近端小肠的刺激在改善T2DM的糖代谢中起到至关重要的作用。然而, 国内尚未见有关十二指肠旷置术后食糜反流影响糖代谢的研究。

本研究在单纯十二指肠旷置术的基础上, 于旷置的十二指肠与共同袢之间放置一段软硅胶管, 目的是防止食物向旷置的十二指肠肠腔内反流, 隔绝食糜对十二指肠的刺激, 以研究单纯十二指肠旷置术的降糖效果。术后4周胃肠造影证实, 单纯十二指肠旷置的DE组存在造影剂向十二指肠反流的现象, 而放置硅胶管的MDE组未见造影剂向十二指肠反流。肠黏膜形态学观察发现, MDE组的胆胰袢黏膜绒毛长度明显短于DE组和SO组, 这可能是由于MDE组的胆胰袢长期缺乏食物刺激, 从而引起肠绒毛失用性萎缩的结局。胃肠造影与病理结果一致证明, 该放置硅胶管的单纯十二指肠旷置模型可有效防止食糜向胆胰袢反流。

本研究进一步发现, 在术后1~8周, MDE组的空腹血糖浓度低于各个时间节点DE组大鼠的空腹血糖浓度, 并且差异有统计学意义($P<0.05$), 这提示避免食糜向十二指肠反流可进一步增强代谢手术的降糖效果, 这与“前肠学说”不谋而合。本实验中3组大鼠在术后1周内, 因手术创伤体重均暂时性明显下降, 之后随时间缓慢上升, 各组之间体重差异无统计学意义($P<0.05$); 将体重变化与空腹血糖浓度联系起来分析, 可发现该术式的降糖效果不依赖于术后体重下降, 这与前人研究结果^[14-15]相一致。

GLP-1主要是由末端小肠中L细胞分泌并参与改善糖代谢的一种激素, 当未消化的食物过早排至末端小肠, 可促进GLP-1的分泌, 血清中GLP-1浓度升高可促进胰岛素分泌, 提高胰岛素敏感性, 从而改善糖代谢^[16], 甚至发挥神经保护作用^[17]。MDE组与DE组通过旷置十二指肠使未消化食糜更早排至远端小肠,

因此血清 GLP-1 浓度明显高于 SO 组, 但 MDE 组与 DE 组血清 GLP-1 浓度无明显差异, 说明食糜向十二指肠的反流不是通过影响 GLP-1 的分泌调节糖代谢, 其降糖效果的提升可能与避免食糜激活十二指肠黏膜上受体, 或者通过肠道神经-内分泌调节引起不利于糖代谢的因素有关。

综上所述, 本研究表明, 防反流旷置十二指肠可以有效改善 T2DM 大鼠的糖代谢, 避免食糜向旷置的十二指肠反流, 从而增强其降糖效果, 更进一步支持了“前肠学说”理论。关于食糜反流对降糖效果的影响有待进一步验证, 本课题组将在后续的实验中进行进一步研究其机制。

[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人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院伦理委员会审查批准 [2020-79]。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。All animal experiments involved in this study have been approved by the Ethics Committee of the 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army [approval number 2020-79]. All experimental procedures were conducted in accordance with the relevant laws, regulations, and statutory requirements for the use of laboratory animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

杨劲, 俞诗雅, 负责论文撰写、投稿及修稿;
俞诗雅, 林鸿铭, 陈惠燕, 负责论文中结果图的制作数据分析与统计;
林楠, 方永超, 邱锦维负责实验实施与相关指标检测;
吴伟航, 王瑜, 赵虎, 负责实验方案构思与论文中结果图的修改、修稿。

[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] WANG L M, GAO P, ZHANG M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013[J]. JAMA, 2017, 317(24):2515-2523. DOI: 10.1001/jama.2017.7596.
- [2] MINGRONE G, PANUNZI S, GAETANO A D, et al. Metabolic surgery versus conventional medical therapy in patients with type 2 diabetes: 10-year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial[J]. Lancet, 2021, 397(10271):293-304. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32649-0.
- [3] YOSHINO M, KAYSER B D, YOSHINO J, et al. Effects of diet versus gastric bypass on metabolic function in diabetes[J]. N Engl J Med, 2020, 383(8): 721-732. DOI: 10.1056/NEJMoa2003697.
- [4] MINGRONE G, PANUNZI S, GAETANO A D, et al. Bariatric

- surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2012, 366(17): 1577-1585. DOI: 10.1056/NEJMoa1200111.
- [5] 高相楠, 高宏凯, 张利岩, 等. 腹腔镜胃转流术对体质指数 28 ~ 35 kg/m² 伴代谢综合征的 2 型糖尿病患者的疗效研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(8): 906-910. DOI: 10.3969/J. iSSn.1007-9572.2015.08.012.
- GAO X N, GAO H K, ZHANG L Y, et al. Efficacy of laparoscopic gastric bypass operation on type 2 diabetic mellitus patients with body mass index 28-35 kg/m² accompanied by metabolic syndrome[J]. Chin Gen Pract, 2015, 18(8): 906-910. DOI: 10.3969/J. iSSn.1007-9572.2015.08.012.
- [6] 张振, 宫轲. 外科治疗糖尿病的主要手术方式及其机制[J]. 首都医科大学学报, 2015, 36(2):318-323. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.2015.02.029.
- ZHANG Z, GONG K. Main surgery procedures and mechanisms for treating type 2 diabetes[J]. J Cap Med Univ, 2015, 36(2):318-323. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.2015.02.029.
- [7] 吴春兴, 王小芳, 谢斐. 参麦注射液治疗稳定性心绞痛合并 2 型糖尿病患者的临床疗效观察[J]. 医学临床研究, 2019, 36(1):148-149, 154. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7171.2019.01.050.
- WU C X, WANG X F, XIE F. Clinical observation of Shenmai injection in the treatment of patients with stable angina pectoris complicated with type 2 diabetes mellitus[J]. J Clin Res, 2019, 36(1):148-149, 154. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7171.2019.01.050.
- [8] ANGRISANI L, SANTONICOLA A, IOVINO P, et al. Bariatric surgery and endoluminal procedures: IFSO worldwide survey 2014[J]. Obes Surg, 2017, 27(9):2279-2289. DOI: 10.1007/s11695-017-2666-x.
- [9] THALER J P, CUMMINGS D E. Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery[J]. Endocrinology, 2009, 150(6): 2518-2525. DOI: 10.1210/en.2009-0367.
- [10] 王瑜, 张再重, 王烈, 等. 不同肠段小肠旷置术对非肥胖型 2 型糖尿病大鼠的治疗作用[J]. 中华外科杂志, 2009, 47(22):1736-1740. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2009.22.016.
- WANG Y, ZHANG Z C, WANG L, et al. Effect of diabetes control after small intestine exclusion surgery in Goto-Kakizaki rat with non-obese type 2 diabetes mellitus[J]. Chin J Surg, 2009, 47(22):1736-1740. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2009.22.016.
- [11] DE JONGE C, RENSEN S S, VERDAM F J, et al. Endoscopic duodenal-jejunal bypass liner rapidly improves type 2 diabetes[J]. Obes Surg, 2013, 23(9): 1354-1360. DOI: 10.1007/s11695-013-0921-3.
- [12] 陈济华, 陈鑫. 十二指肠空肠套管治疗肥胖和 2 型糖尿病的研究进展[J]. 中华消化内镜杂志, 2021, 38(6):496-500. DOI: 10.3760/cma.j.cn321463-20200716-00325.
- CHEN J H, CHEN X. The researching progress of duodenal-jejunal bypass sleeve in treating obesity and type 2 diabetes [J]. Chin J Dig Endosc, 2021, 38(6):496-500. DOI: 10.3760/cma.j.cn321463-20200716-00325.
- [13] 陈鑫, 刘彬, 喻敏, 等. 十二指肠腔内套管置入术改善非肥胖型 2 型糖尿病大鼠糖代谢的作用[J]. 中华内分泌外科杂志, 2013, 7(6): 447-450, 477. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6090.2013.06.002.

- CHEN X, LIU B, YU M, et al. Duodenal endoluminal sleeve improves glucose metabolism of non-obese type 2 diabetic rats[J]. Chin J Endocr Surg, 2013, 7(6):447-450, 477. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6090.2013.06.002.
- [14] 黄盛, 焦亚彬, 王瑜, 等. 胃转流术治疗非肥胖型2型糖尿病大鼠的长期疗效观察[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(5):1313-1317. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.05.011.
- HUANG S, JIAO Y B, WANG Y, et al. Long-term efficacy of gastric bypass on non-obese type 2 diabetes mellitus in Goto-Kakizaki rat[J]. Chin J Clin Electron Ed, 2011, 5(5):1313-1317. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.05.011.
- [15] SUN D, LIU S Z, ZHANG G Y, et al. Type 2 diabetes control in a nonobese rat model using sleeve gastrectomy with duodenal-jejunal bypass (SGDJJB)[J]. Obes Surg, 2012, 22(12):1865-1873. DOI: 10.1007/s11695-012-0744-7.
- [16] 李贝贝. GLP1药物治疗2型糖尿病与早期胰岛素治疗2型糖尿病的临床效果及对血糖影响的比较[J]. 中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生, 2022(7):52-55.
- LI B B. Comparison of clinical effects and blood sugar effects between GLP1 drugs and early insulin in the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Chinese Science and Technology Journal Database (Full-text Edition) Medical and Health, 2022 (7):52-55.
- [17] 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 mechanisms of glucagon-like peptide 1 analogues in Alzheimer's disease[J]. Lab Anim Comp Medicine, 2023, 43 (2): 186-193. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.136.
- (收稿日期: 2024-04-17 修回日期: 2024-07-16)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 干明红)
- [引用本文]**
杨劲, 俞诗雅, 林楠, 等. 改良型十二指肠旷置术对2型糖尿病大鼠糖代谢的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 523-530. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.056.
- YANG J, YU S Y, LIN N, et al. Effect of modified duodenal exclusion surgery on glucose metabolism in rats with type 2 diabetes mellitus[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(5): 523-530. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.056.

《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观点和数据等应准确引用, 如使用图片和表格则需要提供相关的版权及许可证明。

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

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

4. 作者投稿前须确认署名及顺序, 所有作者均须对该文的科研诚信负责。投稿时应登记所有署名作者的基本信息, 并在文末附作者贡献说明及利益冲突声明。职务作品投稿还应经得作者所在单位审批同意。

5. 涉及人体及实验动物的研究性论文需在研究开展前通过医学伦理或动物实验伦理审查, 投稿时需提交审查批件的电子扫描件。正文中应注明伦理审批机构名称及批号, 并在文末附中英文的医学伦理声明。

6. 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。

7. 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。

8. 本刊审稿专家和编辑均须公正、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。

9. 所有来稿若涉及学术不端行为, 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

经血干细胞移植联合运动训练促进大鼠脊髓损伤康复的转录组学分析

戚龙菊¹, 陈世园^{1,3}, 廖泽华^{1,3}, 石袁虎^{1,3}, 孙郁雨¹, 王庆华²

(1. 南通大学附属南通第三医院, 南通市第三人民医院, 南通 226000; 2. 南通大学实验动物中心, 南通 226001; 3. 南通大学医学院, 南通 226001)

[摘要] **目的** 通过转录组测序分析探讨经血干细胞 (menstrual blood-derived stem cells, MenSCs) 移植联合运动训练治疗脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 大鼠的潜在干预靶点和分子机制。**方法** 选用SPF级2月龄雌性SD大鼠, 采用第十胸椎 (T10) 处半切方式构建SCI模型后, 分为SCI后MenSCs移植联合运动训练组 [简称细胞与跑步机训练 (cell and treadmill training, CTMT) 组] 和SCI组 (作为对照), 每组12只大鼠。其中, CTMT组大鼠在建模后1周于损伤局部显微注射MenSCs 1×10^5 个, 随后进行为期2周的减重有氧运动训练。选取损伤处的脊髓组织进行转录组测序分析, 获得SCI组和CTMT组大鼠的脊髓组织中mRNA表达数据, 进行基因表达差异分析、GO功能富集分析、KEGG通路富集分析和蛋白质互作网络分析。同时, 采用BBB评分评估两组大鼠的运动功能康复情况, 苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色评估两组大鼠损伤局部的组织病理学改善程度, 采用实时荧光定量PCR法和蛋白质印迹法对差异基因表达进行验证。**结果** 转录组测序分析差异基因的表达数据显示, 与SCI组相比, CTMT组有247个上调基因及174个下调基因, 其中 *Bdnf*、*Hmox1*、*Sd4*、*Mmp3* 和 *Cd163* 等基因显著上调 [$|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 0.66$, $P < 0.05$]。KEGG通路富集分析与GO功能富集分析提示, 这些差异基因主要参与了生长发育、代谢反应及免疫炎症过程, 例如轴突生长、电子传递链等。其中, *Bdnf* 基因富集在PI3K-Akt信号通路。BBB评分显示, MenSCs移植联合运动训练显著提高SCI大鼠的运动能力。HE染色提示治疗组大鼠的损伤局部病理变化程度显著减轻。实时荧光定量PCR法和蛋白质印迹法证明, CTMT组脊髓组织中脑源性神经生长因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA和蛋白表达水平均显著高于SCI组 ($P < 0.001$)。**结论** MenSCs移植联合运动训练治疗可能通过上调BDNF表达促进SCI大鼠运动功能的恢复, 这为SCI的临床康复治疗提供了一个新思路。

[关键词] 脊髓损伤; 转录组测序; 经血干细胞; 运动训练; 脑源性神经生长因子; 大鼠

[中图分类号] R744; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0531-12



Transcriptomic Analysis of Menstrual Blood-Derived Stem Cells Transplantation Combined with Exercise Training in Promoting Spinal Cord Injury Recovery in Rats

QI Longju¹, CHEN Shiyuan^{1,3}, LIAO Zehua^{1,3}, SHI Yuanhu^{1,3}, SUN Yuyu¹, WANG Qinghua²

(1. Affiliated Nantong Third Hospital of Nantong University, Nantong Third People's Hospital, Nantong 226000, China; 2. Laboratory Animal Center of Nantong University, Nantong 226001, China; 3. Medical School of Nantong University, Nantong 226001, China)

Correspondence to: WANG Qinghua (ORCID: 0000-0003-3661-6408), E-mail: wangqh@ntu.edu.cn

[ABSTRACT] **Objective** To explore the potential therapeutic targets and molecular mechanisms of menstrual blood-derived stem cells (MenSCs) transplantation combined with exercise training in

[基金项目] 南通市科技计划项目“GelMA水凝胶负载MenSCs-Exo调控miR-421/MAGED1/PI3K-Akt分子轴改善脊髓损伤后功能恢复的机制研究”(JC2023040)、“MenSCs外泌体调控miR-421/MAGED1/PPAR γ 轴改善脊髓损伤后轴突再生机制及其临床诊疗技术攻关”(MS20220212);南通市卫生健康委员会科研课题面上项目“有氧运动调控GDNF减轻脊髓损伤后疼痛的机制及临床应用研究”(MS2022062)

[第一作者] 戚龙菊 (1985—),女,硕士,副主任护师,研究方向为脊髓损伤后功能康复。E-mail: qilongjunt@163.com

[通信作者] 王庆华 (1978—),男,博士,讲师,研究方向为脊髓损伤后功能康复。E-mail: wangqh@ntu.edu.cn。ORCID: 0000-0003-3661-6408

promoting recovery in rats with spinal cord injury (SCI) through transcriptome sequencing analysis.

Methods Female SD rats aged two months were selected and a SCI model was established by a hemisection at the tenth thoracic vertebra (T10). The rats were then divided into two groups: the Cell and Treadmill Training (CTMT) group, which received MenSCs transplantation and treadmill training after SCI, and the SCI group (control), with 12 rats in each group. One week after modeling, the CTMT group received a microinjection of 1×10^5 MenSCs at the injury site, followed by two weeks of weight-supported aerobic exercise training. Spinal cord tissue from the injury site was selected for transcriptome sequencing, and mRNA expression data from both the SCI and CTMT groups were analyzed. Differential gene expression, GO (Gene Ontology) functional enrichment, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway enrichment, and protein-protein interaction (PPI) network analyses were performed. Motor function recovery was assessed using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) score, while histopathological changes at the injury site were evaluated through hematoxylin-eosin (HE) staining. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blotting were used to verify the expression of differentially expressed genes.

Results Transcriptome sequencing analysis showed 247 upregulated genes and 174 downregulated genes in the CTMT group compared to the SCI group. Notably, genes such as *Bdnf*, *Hmox1*, *Sd4*, *Mmp3*, and *Cd163* were significantly upregulated [$|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 0.66$, $P < 0.05$]. KEGG pathway enrichment analysis and GO functional enrichment analysis indicated that these differentially expressed genes were mainly involved in growth and development, metabolic reactions, and immune-inflammatory processes, such as axon growth and the electron transport chain. The *Bdnf* gene was notably enriched in the PI3K-Akt signaling pathway. The BBB score showed that MenSCs transplantation combined with exercise training significantly improved the motor function of SCI rats. HE staining revealed that pathological changes at the injury site were significantly reduced in the treatment group. Furthermore, real-time quantitative PCR and Western blotting confirmed that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein expression levels in the CTMT group were significantly higher than those in the SCI group ($P < 0.001$). **Conclusion** The combined exercise training with MenSCs effectively promotes the recovery of motor function in SCI rats by upregulating BDNF expression, providing a novel strategy for SCI treatment.

[Key words] Spinal cord injury; Transcriptome sequencing; Menstrual blood-derived stem cells; Exercise training; Brain-derived neurotrophic factor; Rats

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种严重致残的疾病, 伴随诸多并发症, 包括感觉和运动功能障碍、排尿失禁、自主功能失调等, 其受损功能恢复是康复领域内的一个世界级难题^[1]。目前, 临床上主要通过外科手术治疗缓解损伤脊髓内压力, 用皮质类固醇药物治疗减轻脊髓组织的肿胀程度, 通过康复训练降低疼痛、瘙痒和溃疡等并发症^[2]。然而, 由于中枢神经系统的自我修复能力有限^[3], 传统的治疗方法并不能重建损伤后脊髓的神经传导功能。

近年来, 多种干细胞已经被报告可应用于SCI的治疗, 并取得了一定效果^[4-6]。经血干细胞 (menstrual blood-derived stem cells, MenSCs) 于2007年被首次从女性月经期间脱落的子宫内膜中分离出来。它具有来源丰富、无创采集、安全性高等特性, 且拥有极强的多向分化能力^[7]和稳定的遗传性能^[8]; 同

时, 因其自体移植伦理风险低, 定向分化为神经元的能力较强^[9], 免疫调节和神经营养因子分泌能力也强^[10], 正逐步成为中枢神经系统疾病治疗的新材料。本课题组前期研究证实, MenSCs移植能降低大鼠SCI后的胶质瘢痕面积, 抑制神经元凋亡, 促进轴突再生和功能恢复^[11]。然而, 细胞移植后, 由于缺血、缺氧和水肿的微环境, 大部分细胞可能会死亡^[12]。因此, 如何保留移植的MenSCs并使其保持活力, 进而发挥相应功能, 需要进一步探索。

近年来, 运动康复锻炼在预防和治疗各种疾病方面变得越来越重要^[13-14]。诸多临床研究表明: 运动训练有利于SCI患者的运动诱发电位和体感诱发电位改善, 促进神经肌肉运动功能的恢复^[15-16]; 这种广泛接触特定任务的重复性训练有助于促进初级运动皮层的重组^[17]; 运动训练明显改善了不完全SCI患者的神经

功能恢复和神经可塑性^[18]；与对照组相比，运动训练明显增加了腰部运动神经元中一种脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）的表达^[19]。另有研究证实，运动训练叠加重复经颅磁刺激（repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS）可显著提升不完全性SCI大鼠后肢的运动功能，通过促进BDNF和突触素 I（synapsin I, SYN1）表达，改善中枢运动控制及运动神经元的可塑性^[20]。

SCI疾病的治疗和康复是一个复杂过程，治疗靶点的缺失限制了机制研究和临床诊疗的成效。开展高通量转录组分析，可从多角度探讨MenSCs联合运动锻炼治疗SCI的分子机制，帮助挖掘潜在的治疗靶点。本研究采用第十胸椎（T10）半切法构建大鼠SCI模型，通过转录组测序筛选出MenSCs移植联合运动训练治疗SCI大鼠模型组和对照组大鼠脊髓组织中差异表达基因和信号通路，并在大鼠体内验证该治疗效果和关键基因表达情况，以期挖掘针对SCI的临床康复治疗潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养环境

SPF级2月龄雌性SD大鼠（220~250 g）购自南通大学实验动物中心[SCXK（苏）2019-0001]，饲养于屏障设施[SYXK（苏）2020-0029]。大鼠自由采食高压灭菌水和⁶⁰Co辐照灭菌的鼠饲料（购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司），使用高压灭菌的玉米芯垫料（购自苏州双狮实验动物饲料科技有限公司），环境温度20~26℃，12 h/12 h明暗周期循环，相对湿度为40%~70%。此动物实验设计方案获得了南通大学实验动物中心实验动物伦理福利审查委员会的审核批准（批号S20201230-332），充分遵照动物的“5大自由”和“3R”原则，以保障实验动物和科研人员福利，维护动物实验伦理准则。

1.2 细胞制备及鉴定

MenSCs的获取、培养及鉴定根据本课题组既定实验方案进行，并获得南通市妇幼保健医院伦理委员会批准（No.2016-023）。简要步骤：征集健康成年育龄女性志愿者，在经期第2天，无菌操作条件下，将月经血采集杯置入阴道深处，采集月经血；在实验室中进行MenSCs的分离、培养、扩增及传代等过程；同时对MenSCs进行鉴定，主要通过流式细胞仪检测细胞表面标志物如CD146-APC、CD73-PerCP、CD105-PE和CD73-FITC以鉴定MenSCs的特性，并通过成脂诱导分

化、成骨诱导分化、成软骨诱导分化实验鉴定MenSCs的多向分化潜能^[11,21]。本实验中使用的细胞主要处于第6~7代。

1.3 大鼠模型制备

所购SD大鼠在性别确认和健康观察后适应性饲养1周，采用3%的异氟烷和氧气混合气体诱导麻醉大鼠，术中维持异氟烷体积分数为2%。大鼠经补液和护眼后行备皮操作，于第十胸椎处作2 cm切口，分离黏膜和肌肉，剔除椎板和两侧椎弓根，以暴露脊髓，用11号手术刀片于垂直中央血管处切断右侧一半脊髓组织。大鼠在缝合后置于37℃热台直至苏醒，经补液（皮下注射2 mL温热生理盐水）、镇痛（皮下注射缓释型buprenex, 0.05 mg/kg）和抗炎（肌肉注射青霉素, 200 000 U/d）处理后返回笼盒中。每日定时人工按摩大鼠的膀胱区辅助排尿。同时，剔除术后第一天损伤侧完全自主运动、自主排尿以及术后1周出现严重尿血、尿路感染、严重腹胀、过度虚弱等不符合SCI模型标准的大鼠。符合SCI模型标准的大鼠随机分为脊髓损伤组（SCI组）和SCI建模后MenSCs移植联合运动训练[简称细胞与跑步机训练（cell and treadmill training, CTMT）]组，每组12只。

一次手术后1周，再次麻醉大鼠，并暴露脊髓，于损伤正中处向头侧和尾侧各旁开2 mm，CTMT组采用微量进样器注射 1×10^5 个MenSCs（约5 μL）^[22]，SCI组注射5 μL PBS，术后护理过程同上。二次手术次日开始，采用ZH-PT大鼠实验跑台（购自安徽正华生物仪器设备有限公司），CTMT组大鼠开始减重运动训练。运动训练策略：每次训练前排空大鼠膀胱，然后用夹子（中间隔层纱布）夹住大鼠尾巴，使其下半身悬吊起来，前肢接触跑台；跑台速度设定为6 m/min，大鼠每次运动20 min，2次/d，5 d/周，总共2周；训练周期内，可根据大鼠的后肢运动能力恢复情况，逐渐降低悬吊高度，调整后肢承受体重的范围在20%~40%。每天2次的运动在早晚固定时间点进行，并保持动物笼盒位置固定，以减少混杂因素。

1.4 大鼠运动功能评估

采用评价SCI模型大鼠运动能力的BBB评分体系（Basso, Beattie, and Bresnahan locomotor rating scale），分别于造模前（即造模当天）及首次造模后1、3、5、7、10、14、21 d评估SCI组及CTMT组大鼠（每组随机抽取7只大鼠）右后肢的运动能力恢复情况。实验人员需事先进行统一培训，然后在双盲情况下依据BBB评分表对各组大鼠的运动能力进行评分。

1.5 大鼠组织取材

二次手术后2周,将大鼠置于安乐死箱内引入二氧化碳处死,通过捏压脚趾反射等方法确认其生命迹象彻底消失。在确定大鼠无呼吸、无心跳后,沿着大鼠背部造模处的创口,打开背部皮肤及肌肉,暴露脊柱。再沿已摘除椎板的创口处,拆除剩余椎板,暴露完整脊髓。从尾部剪断脊髓,剪断脊髓与周围神经的连接。取出脊髓,去掉脊髓外膜,洗涤干净,取损伤处(T10)上下共5 mm长度的脊髓组织。每组12只大鼠,随机取每组3只大鼠的脊髓组织样本,置于组织RNA保存液即RNA Keeper Tissue Stabilizer(R501,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司)中,冻存于 -80°C ,以便后续测序分析;再随机取每组3只大鼠的脊髓组织样本,保存于4%甲醛固定液中,用于后续冰冻切片和苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色;再随机取每组5只大鼠的脊髓组织样本,冻存于 -80°C ,用于后续的实时荧光定量PCR和蛋白质免疫印迹法检测;每组各剩余1只大鼠,取材后备用。

1.6 转录组测序及生物信息学分析

将各组大鼠手术损伤处脊髓组织(总长5 mm,每组3份样本,来源于3只大鼠)从保存液中取出,液氮冷冻后用TRIzol试剂(购自美国Invitrogen公司)提取RNA。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离长度为18~30 nt的RNA,随后用Illumina测序平台(来自广州基迪奥生物科技有限公司)进行测序分析,结果用统计分析软件R(4.1.0)中的edgeR(3.36.0)软件包(<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>)来鉴定两组间差异表达基因。进一步利用分析软件R中的limma包(3.50.3)、heatmap包(1.0.12)、ggplot2包(3.5.0)和clusterProfiler包(4.10.0)开展差异表达基因的生物信息学相关分析,按照“高通量的测序→数据的质控→参考基因组的比对→基因表达水平的分析→聚类分析→GO/KEGG富集分析→蛋白互作网络分析”的技术路线进行。

1.6.1 样品之间的相关性检验与主成分分析

实验与样品的选择是否可靠,可以通过分析样品之间的基因表达水平来实现。样品之间表达模式的相似程度通常用相关系数表示。而样品之间基因表达量的主成分分析,可以评估样本的重复性、处理因素间的整体差异、样本分组情况和实验设计的科学性。

1.6.2 基因差异表达分析

差异基因的分布情况用火山图直观呈现。将阈值

设定为 $\log_2(\text{FoldChange}) \geq 0.66$ 并且 $P < 0.05$,筛选两组中的差异基因。依据差异基因的 $\log_2(\text{FoldChange})$ 大小,呈现上调和下调最显著的各15个基因,将功能相同或相近的基因行分层聚类法(hierarchical clustering)分析,以热图形式呈现结果。

1.6.3 差异表达基因的功能分析

采用基因本体(Gene Ontology, GO; <http://www.geneontology.org>)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG; <http://www.kegg.jp>)这两个数据库,分别对差异表达基因(上调和下调的基因)进行分子功能、细胞组分、生物学过程与KEGG通路的富集分析,以气泡图形式呈现结果。

1.6.4 蛋白互作网络分析

依据 $\log_2(\text{FoldChange}) \geq 0.66$ 且 $P < 0.05$ 的筛选标准,共获得421个显著差异基因。从STRING蛋白质互作数据库(<http://string-db.org>)内提取出目标基因集的互作关系,构建网络,进行蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析。用Cytoscape软件呈现差异基因表达的蛋白互作网络示意图,然后用Cytoscape软件的cytoHubba插件来判定核心节点基因。

1.7 组织冰冻切片和HE染色

对多聚甲醛溶液灌注固定后各组大鼠的脊髓组织(每组3份样本,分别来源于3只大鼠)进行修剪,经10%、20%、30%蔗糖溶液脱水,平放于包埋盒(购自北京索莱宝生物科技有限公司)内。将装有组织的包埋盒进行最佳切割温度化合物(optimal cutting temperature compound)包埋。等待30 min后,安装样品托,组织修块后,使用冷冻低温切片机(德国Leica公司产品)进行连续性切片,对脊髓进行冠状面切片(厚10 μm)。切片置于 -20°C 冰箱保存,用于HE染色(试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司):苏木精染色5 min,双蒸水(ddH₂O)洗2次,1% HCl分化25 s, ddH₂O洗2次后伊红染色1.5 min。梯度脱水封固后使用Olympus DP71软件采集图像,用于后续的数据分析。

1.8 实时荧光定量PCR和蛋白质印迹法检测

取各组大鼠损伤处脊髓组织(每组5份样本,来源于5只大鼠),用TRIzol提取总RNA,用通用型逆转录试剂盒HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit R211-01(购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司)获得cDNA,用通用型高灵敏度染料法定量PCR检测

试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix Q711-02 (购自南京诺维赞生物科技股份有限公司) 以及 StepOne™ 实时荧光定量 PCR 系统 (购自美国 Applied Biosystems 公司) 进行目标基因的 PCR 检测。引物序列如下: *Bdnf* 基因的正向引物为 5'-TGATGCTCAGC-AGTCAA-3', 反向引物为 5'-CACTCGCTAATACT-GTCAC-3'; 内参基因 *GAPDH* 的正向引物为 5'-CCT-CCTGCACCACCAACTGCTT-3', 反向引物为 5'-GAG-GGGCCATCCACAGTCTTCT-3'。PCR 反应过程: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。*Bdnf* 基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算, 每份样本设置 3 个复孔。

取各组大鼠损伤处脊髓组织 (每组 5 份样本, 来源于 5 只大鼠), 组织研磨后加入 RIPA 裂解液, 匀浆, 离心后吸取上清液, 测定蛋白质浓度后沸水中变性。使用 BDNF 抗体 (以 GAPDH 抗体作内参, 均购自英国 Abcam 公司, 工作液稀释比例为 1:1 000) 检测 BDNF 蛋白表达。采用 ECL 法显影摄片, 试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司。最后利用 Image J 软件进行目的条带的灰度值分析。

1.9 数据处理及统计方法

用 SPSS 23.0 软件及 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据的统计和分析。首先对各实验结果数据进行 K-S 单样本检验, 确认数据是否符合正态分布; 正态数据用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 通过两独立样本 *t* 检验进行两组间比较; 偏态分布的计量资料用中位数 (四分位间距) [M (P25, P75)] 表示, 通过 Mann-Whitney U 秩和检验进行两组间比较。计数资料用频数和构成比进行描述, 通过非参数 χ^2 检验进行两组间比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠的脊髓组织转录组测序数据可靠

Illumina 测序后相关性检验结果显示, 各样本之间表达量分布均一性高, 中位数、四分位数范围和极值均较为接近, 表明测序数据质量较好 (图 1A)。在主成分分析结果 (图 1B) 中, 一个样本用一个点表示, 共 6 个样本; 横坐标是 PC1 (0.409), 为第一主成分; 纵坐标是 PC2 (0.317), 为第二主成分。主成分分析结果显示, 同一组内的样本聚集在一起, 表明本实验操作具有良好的可重复性; 而不同组间的样本则呈现较大的空间距离, 说明主要样本间的差异来自组间差异。

2.2 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因情况

与 SCI 组 (对照组) 相比, CTMT 组大鼠脊髓组织中有 174 个基因表达下调, 有 247 个基因表达上调 ($|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 0.66, P < 0.05$)。表 1 中列出了在差异表达基因中下调或上调最显著的 15 个 mRNA, 其中显著上调的基因主要有 *Rabepk*、*Pkig*、*Cthrc1* 和 *Bdnf* 等。依据样本的每千个碱基的转录每百万映射读取的片段 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, fpkm), 使用 R 包中 pheatmap 工具、ggplot 工具, 绘制差异基因火山图 (图 2A) 及聚类热图 (图 2B), 以此呈现 SCI 组和 CTMT 组大鼠脊髓组织中的 mRNA 表达差异情况。

2.3 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因相关通路

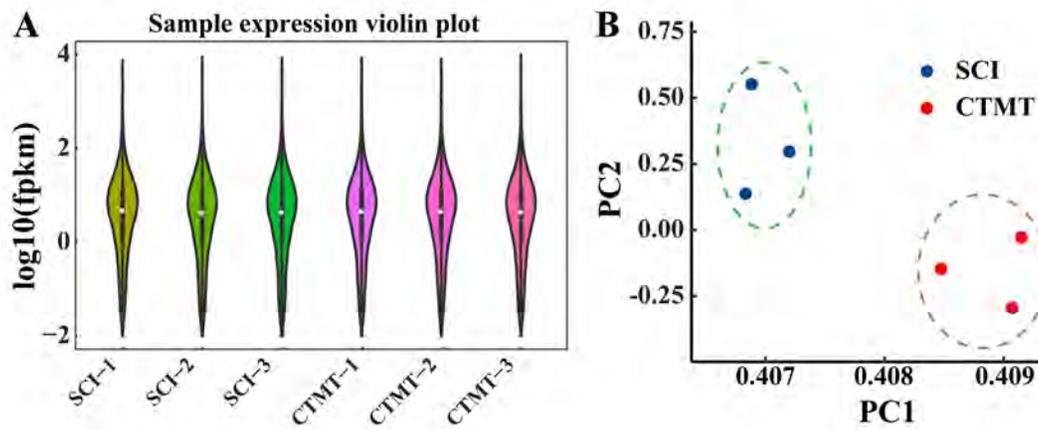
图 3A~C 是两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的 GO 功能富集分析气泡图。图 3D 是差异表达基因的 KEGG 通路富集气泡图。GO 富集分析中, 3 个本体 (ontology) 分别表示 “分子功能 (molecular function, MF)” “细胞组分 (cellular component, CC)” “生物学过程 (biological processes, BP)”。进一步的功能富集分析显示, 差异基因同分子功能的相同蛋白结合呈显著相关性, 与细胞组分的细胞质和细胞外间隙显著相关, 与生物学过程的免疫反应和神经发育显著相关。最后, KEGG 通路富集分析结果表明, 差异基因主要集中在代谢通路 (metabolic pathway)、癌症相关通路 (pathways in cancer) 和细胞内信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 等; 其中, *Bdnf* 基因可调控细胞内信号转导通路 (表 2)。

2.4 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的互作关系

针对 421 个差异表达基因, 从 STRING 数据库内提取出目的基因集的互作关系, 构建 PPI 网络图 (图 4)。相比于 SCI 组, CTMT 组大鼠脊髓组织中 *Bdnf*、*Hmox1*、*Sd4*、*Mmp3*、*Cd163*、*Cat* 和 *Traf3* 等基因表达显著上调, 且有较多的节点连接数量。其中, *Bdnf* 在差异基因互作结果中形成了较大的节点, 提示该基因在相关病理生理过程中发挥着重要的调控作用。

2.5 MenSCs 移植联合运动训练能够改善 SCI 大鼠的运动功能

采用 HE 染色法检测 SCI 大鼠脊髓损伤局部的组织病理学改变程度, 结果见图 5。SCI 组损伤局部脊髓组织较疏松, 形成大片空洞, 伴有大量炎症细胞浸润, 组织明显充血、水肿, 甚至有部分区域伴有微血管的



注: A为样本表达量分布情况(FPKM, 每千个碱基的转录每百万映射读取的片段), 可见SCI组(即单纯脊髓损伤手术组, 作为对照, $n=3$)和CTMT组(即SCI手术后经血干细胞移植联合运动训练组, $n=3$)各样本的中位数、四分位数范围和极值均较为接近, 表明测序结果在组内均一性较好, 测序数据质量可靠。B为主成分分析(PC1, 第一主成分; PC2, 第二主成分), 可见同组样品聚类在比较接近的空间内, 而样本间差异主要来源于组间差异。

Note: A showed the distribution of sample expression levels (FPKM, fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments); in the figure, the median, interquartile range and extreme values of the samples in SCI (spinal cord injury, as the control, $n=3$) group and the CTMT (the transplantation of menstrual blood-derived stem cells combined with treadmill training after SCI surgery, $n=3$) group were relatively close, which indicated that the sequencing results were more homogeneous within the group and the sequencing data quality was high. B showed the principal components analysis (PC1, principal component 1; PC2, principal component 2), and the samples from the same group were clustered together with close proximity, and the differences between samples mainly arose from intergroup differences.

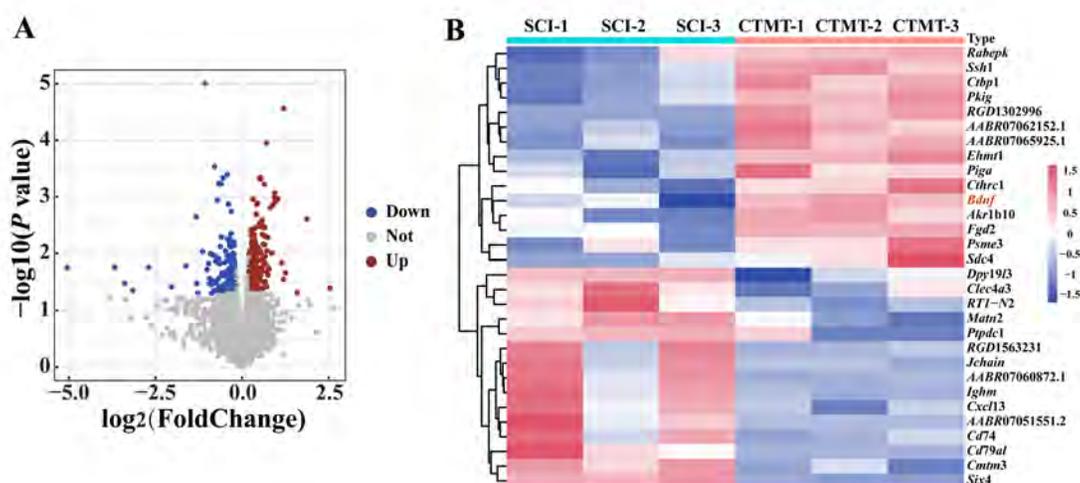
图1 两组大鼠的脊髓组织样本间基因表达量分布情况和主成分分析

Figure 1 Distribution of gene expression and principal component analysis of spinal cord tissue samples in the two groups of rats

表1 经血干细胞移植联合运动训练治疗脊髓损伤大鼠的脊髓组织中显著上调和下调基因

Table 1 Significantly up-regulated and down-regulated genes in spinal cord tissues of spinal cord injury rats after transplantation of menstrual blood-derived stem cells combined with exercise training

表达上调基因 Up-regulated gene	log2(差异倍数) log2 (FoldChange)	t值 t value	P值 P value	表达下调基因 Down-regulated gene	log2(差异倍数) log2 (FoldChange)	t值 t value	P值 P value
<i>Psmc3</i>	2.542 363 895	2.672 366 157	0.040 381 267	<i>Ptpdc1</i>	-0.941 169 616	-2.823 151 331	0.033 418 310
<i>Fgd2</i>	1.870 409 798	5.277 683 881	0.002 476 179	<i>RT1-N2</i>	-0.961 937 408	-3.508 946 559	0.014 746 432
<i>Sdc4</i>	1.591 559 898	2.530 079 050	0.048 412 378	<i>Cd79a1</i>	-1.007 349 648	-3.292 831 274	0.018 934 378
<i>Cthrc1</i>	1.259 963 833	3.177 793 692	0.021 693 595	<i>Six4</i>	-1.071 889 332	-15.482 205 520	0.000 009 930
<i>RGD1302996</i>	1.205 943 515	12.811 980 370	0.000 027 300	<i>Matn2</i>	-1.137 472 728	-3.927 529 073	0.009 277 287
<i>Rabepk</i>	1.201 118 420	2.962 815 910	0.028 125 989	<i>Clec4a3</i>	-1.273 541 156	-2.512 270 495	0.049 532 946
<i>Bdnf</i>	1.141 863 432	3.525 110 815	0.001 447 754	<i>AABR07051551.2</i>	-1.308 692 094	-2.825 531 707	0.033 319 465
<i>Pkig</i>	1.036 827 364	6.255 767 217	0.001 095 780	<i>Cmtm3</i>	-1.324 596 882	-5.371 453 966	0.002 279 345
<i>AABR07065925.1</i>	0.970 924 295	6.151 591 228	0.001 189 396	<i>Dpy19B</i>	-1.623 739 520	-3.419 084 313	0.016 347 174
<i>Ehmt1</i>	0.944 670 184	6.578 534 619	0.000 855 702	<i>Cd74</i>	-2.034 312 055	-2.712 776 259	0.038 372 308
<i>AABR07062152.1</i>	0.939 321 669	6.344 499 009	0.001 022 741	<i>Cxcl13</i>	-2.697 259 120	-3.378 916 162	0.017 124 825
<i>Ctbp1</i>	0.898 198 041	5.961 511 123	0.001 385 227	<i>RGD1563231</i>	-3.151 695 504	-2.603 665 774	0.044 063 014
<i>Akr1b10</i>	0.859 136 478	3.868 507 287	0.009 887 528	<i>Jchain</i>	-3.390 915 739	-2.827 200 269	0.033 250 368
<i>Ssh1</i>	0.818 982 469	5.813 203 431	0.001 564 263	<i>Ighm</i>	-3.673 986 054	-3.369 414 954	0.017 314 754
<i>Piga</i>	0.785 438 853	3.303 450 635	0.018 700 031	<i>AABR07060872.1</i>	-5.052 108 514	-3.355 872 330	0.017 589 546



注: A, 火山图中, 横坐标为基因表达变化倍数, 纵坐标表示差异基因表达量的统计显著性, 上调和下调的基因分别用红色和蓝色实心圆点表示, 灰色圆点表示表达无差异的基因。B, 聚类热图中, 横坐标为样品名称, 纵坐标为基因名称, 粉色表示高表达基因, 蓝色表示低表达基因。SCI为对照组(即单纯脊髓损伤手术组, 作为对照, $n=3$), CTMT为联合治疗组(即SCI手术后经血干细胞移植联合运动训练组, $n=3$)。Note: A, in volcano plot, horizontal axis indicated the fold change in the gene expression, the vertical axis indicated the statistical significance of differential gene expression profile, the red and blue dots indicated the upregulated and downregulated genes, respectively, and the gray dots indicated the non-DEGs; B, in clustered heatmap, the horizontal axis indicated the sample names, the vertical axis indicated gene names, the pink indicated highly expressed genes, and the blue indicated low expressed genes. SCI was the control group (spinal cord injury, as the control, $n=3$), and CTMT was the cell and treadmill training group (the transplantation of menstrual blood-derived stem cells combined with treadmill training after SCI surgery, $n=3$).

图2 两组大鼠的脊髓组织间差异表达基因火山图和聚类热图

Figure 2 Volcano plot and clustered heatmap of differentially expressed genes in spinal cord tissues between the two groups of rats

破裂出血变化, 纤维束排列层次不够清晰; CTMT组局部脊髓组织排列整齐且紧密, 但仍存在轻微空洞, 没有炎性细胞浸润和组织充血水肿, 纤维束的排列层次比较清晰(图5A)。对比结果表明, MenSCs移植联合运动训练干预后显著改善了SCI大鼠的脊髓损伤程度。进一步用Image J软件分析表明, 与SCI组相比, 联合治疗显著降低了脊髓损伤区域面积(图5B, $P < 0.001$)。

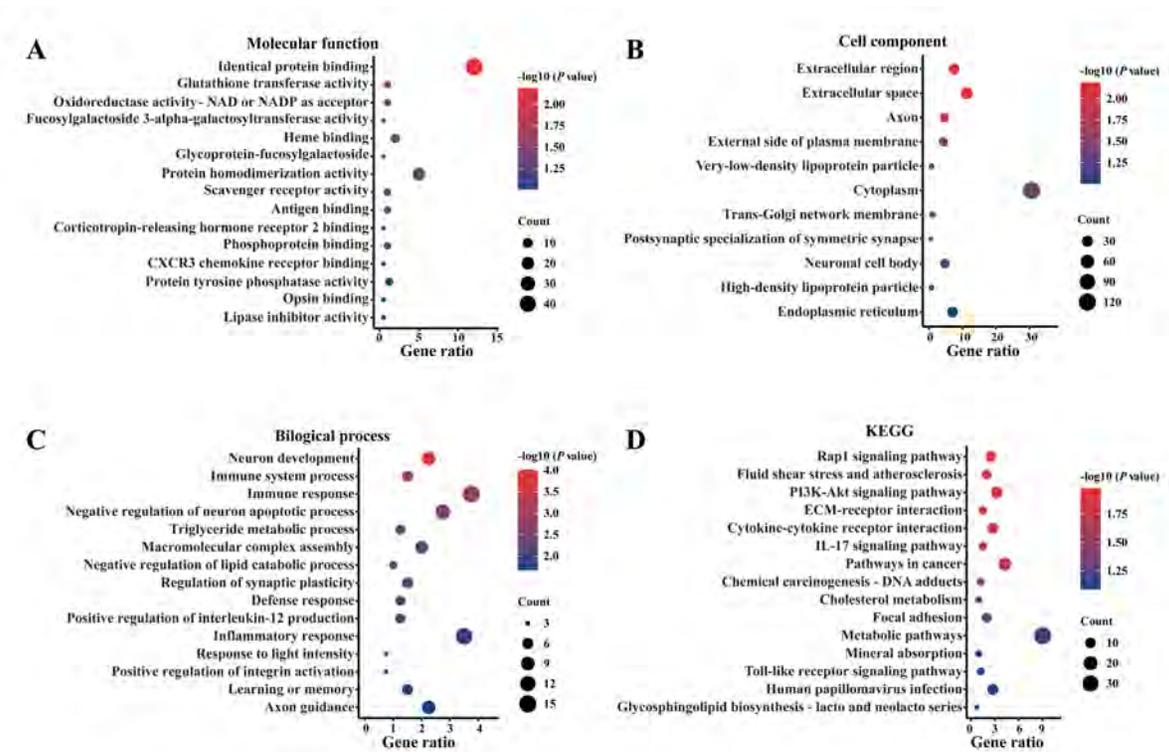
术后14 d开始, BBB评分表明, 联合治疗组大鼠的后肢运动功能显著高于SCI组大鼠(图5C, $P < 0.05$, $P < 0.001$)。实时荧光定量PCR法检测损伤局部脊髓组织中*Bdnf*基因表达情况, 结果表明联合治疗组的*Bdnf* mRNA表达量显著高于SCI组(图5D, $P < 0.001$)。蛋白质印迹法分析表明, 联合治疗组大鼠脊髓组织中BDNF蛋白含量显著高于SCI组(图5E, $P < 0.001$)。

综上所述, MenSCs移植联合运动训练治疗能有效改善SCI大鼠损伤局部脊髓组织的病变结构, 促进后肢运动功能恢复, 上调BDNF表达。

3 讨论

SCI后会触发包括急性期和慢性期在内的完整病理过程, 并且会导致一系列与疾病相关联的破坏性事件的发生, 如炎症反应、氧化应激、缺血、凋亡, 以及感觉、运动功能障碍等^[23]。近年来, 随着再生医学的发展, 干细胞已经成为SCI治疗的热点材料。移植的干细胞可以分泌多种营养因子, 进而促进血管再生、细胞分化、抵抗炎症和凋亡等。然而, 干细胞移植后的细胞易流失、定植率低、定向分化能力差, 而且其作用的分子机制尚不明确, 这些均对其未来的临床应用提出了新的挑战。

运动康复锻炼是目前在SCI恢复期被广泛应用的手段之一, 能够有效减缓损伤平面的扩展, 改善损伤局部微环境, 降低诸如疼痛、痉挛等并发症, 促进运动功能恢复。迄今为止, 尽管许多措施在治疗SCI方面显示出了良好的应用前景, 但是单一策略并不能完全恢复SCI患者的神经功能。组合疗法已被证明能更有效地促进神经回路重建和功能恢复。



注：A～C分别为GO富集分析中的3个本体，即分子功能（A）、细胞组分（B）与生物过程（C）；D为KEGG通路富集分析。富集系数列在X轴，富集条目列在Y轴，气泡大小表示富集在各条目上的基因数量，面积愈大表示富集基因数量愈多，而颜色呈现的是反映差异显著性的P值大小，红色愈深代表其差异性愈显著。

Note: A-C indicated the 3 analysis ontologies for Gene Ontology (GO) enrichment analysis, including molecular function (A), cellular components (B) and biological processes (C), respectively. D represented the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. The X-axis represented the fold enrichment, the Y-axis represented the enrichment items, and the bubble size indicated the number of genes enriched on each item. The larger the bubble, the greater the number of enriched genes. The color corresponded to P-value. The darker the red color, the more significant the difference.

图3 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的GO富集分析和KEGG通路富集分析

Figure 3 GO enrichment and KEGG pathway enrichment analyses of differentially expressed genes in spinal cord tissues of the two groups of rats

本研究主要通过转录组测序分析探讨了MenSCs联合运动训练这一组合疗法治疗SCI大鼠的潜在干预靶点和分子机制。全基因组层面的综合分析能够为从分子生物学角度深入探讨SCI的病理进程提供新的视角^[24]。本研究采用转录组测序方法，首次探讨了SCI大鼠和运动训练联合MenSCs治疗大鼠后的脊髓组织中基因表达谱差异。通过转录组测序发现，联合治疗组中共有247个基因表达上调，174个基因表达下调。为了探索差异基因的潜在功能，采用GO和KEGG富集分析来预测两组间差异基因的生物功能，包括生物学过程、分子功能、细胞成分和信号通路等情况。本研究中GO富集分析结果显示：分子功能以代谢和免疫功能为主，如NAD或NADP活性、抗原结合、趋化因子受体结合，这与Wu等^[11]和Li等^[25]的研究结果相吻

合；同时显示，联合治疗调节了免疫过程，与唐丹等^[26]报告的跑台运动训练可调节HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路，抑制SCI后大鼠肺组织炎症反应并改善其肺损伤的研究结果相吻合。细胞成分中，胞外区域、神经轴突和神经元胞体占了主要地位。生物学过程显示神经调控及免疫调节为主，如神经元发育、凋亡、突触可塑性及轴突引导。KEGG富集分析结果则提示，差异基因多与神经系统、免疫系统活动有关。GO和KEGG分析结果均提示差异基因主要通过调控PI3K-Akt、Rap1和IL-17等信号通路，促进脊髓损伤后的修复。

本研究进一步通过PPI网络分析，在上调基因集中筛选出节点基因，包括*Bdnf*、*Hmox1*、*Sd4*、*Mmp3*、*Cd163*、*Cat*和*Traf3*等。其中，*Bdnf*基因形成最大的节

表2 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的KEGG信号通路富集分析结果

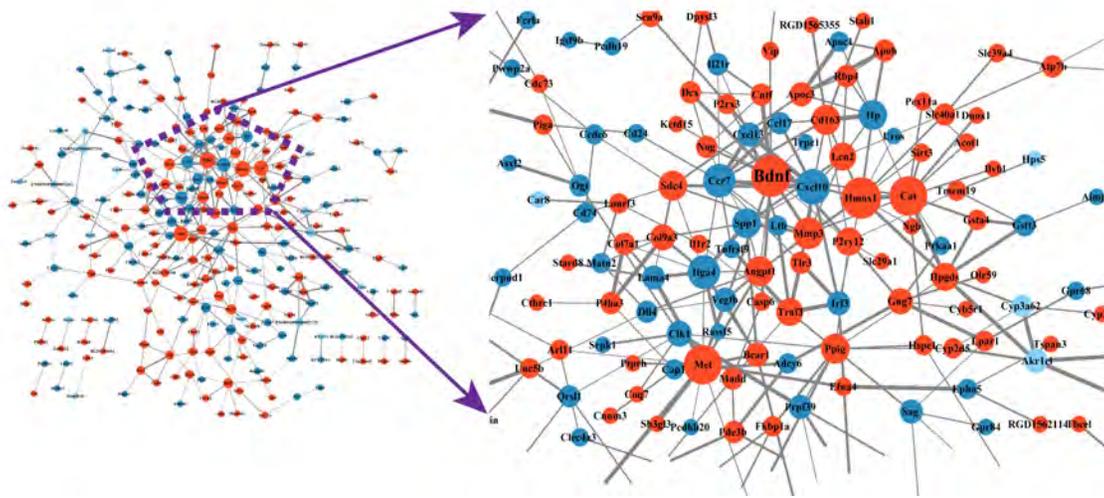
Table 2 Results of KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in spinal cord tissues of the two groups of rats

信号通路名 Term of signal pathway	计数 Count	富集系数 Gene ratio	P值 P value	基因名 Genes
Rap1 signaling pathway	10	2.506 265 664	0.010 546 665	<i>Angpt1, Rassf5, Vegfb, Lpar1, Rapgef6, Efna4, Met, Bcar1, Rap1gap, Adcy6</i>
Fluid shear stress and atherosclerosis	8	2.005 012 531	0.014 625 259	<i>Prkaa1, Mef2c, Sdc4, Gsta4, Il1r2, Gstt3, Hmox1</i>
PI3K-Akt signaling pathway	13	3.258 145 363	0.014 714 234	<i>Prkaa1, Itga4, Angpt1, Bdnf, Lama4, Lpar1, Vegfb, Ppp2r3b, Efna4, Gng7, Spp1, Col9a3, Met</i>
ECM-receptor interaction	6	1.503 759 398	0.016 252 600	<i>Sdc4, Itga4, Rgd1565355, Lama4, Spp1, Col9a3</i>
Cytokine-cytokine receptor interaction	11	2.756 892 231	0.016 582 561	<i>Cxcl10, Cntf, Il25, Tnfsf15, Tnfrsf9, Il1r2, Il21r, Ccr7, Ltb, Cxcl13, Ccl17</i>
IL-17 signaling pathway	6	1.503 759 398	0.020 227 194	<i>Cxcl10, Il25, Traf3, Mmp3, Lcn2, Ccl17</i>
Pathways in cancer	17	4.260 651 629	0.020 758 687	<i>Ctbp1, Lama4, Lpar1, Vegfb, Gstt3, Adcy6, Dll4, Gsta4, Peg12, Traf3, Gng7, Rassf5, Ccdc6, Hmox1, E2f3, Met</i>
Chemical carcinogenesis-DNA adducts	5	1.253 132 832	0.040 451 734	<i>Cyp3a9, Hpgds, Gsta4, Gstt3</i>
Cholesterol metabolism	4	1.002 506 266	0.053 168 933	<i>Rgd1565355, Apoh, Apoc1, Apoc3</i>
Focal adhesion	8	2.005 012 531	0.054 767 437	<i>Itga4, Lama4, Vegfb, Spp1, Col9a3, Pip5k1c, Met, Bcar1</i>
Metabolic pathway	36	9.022 556 391	0.068 256 357	<i>Mtmt2, Glcd, Mtmr14, Pde3b, Gstt3, Hexd, Ehmt1, Adcy6, Abo, Selenbp1, Cyp3a9, Hpgds, Neu4, Spp1, Hmox1, St3gal6, Ca8, Pip5k1c, Csgalnact1, Car1, Uros, Qrs1, Coq7, Sirt3, Nt5c3b, Akrlb10, Cyp2u1, Gsta4, Akrlc15, P4ha3, Piga, Cat, Acot1, Idnk</i>
Mineral absorption	4	1.002 506 266	0.072 932 376	<i>Atp7b, Slc40a1, Hmox1, Slc39a4</i>
Toll-like receptor signaling pathway	5	1.253 132 832	0.074 076 217	<i>Cxcl10, Irf3, Traf3, Spp1, Tlr3</i>
Human papillomavirus infection	11	2.756 892 231	0.079 092 324	<i>Irf3, Itga4, Traf3, Rt1-N2, Lama4, Spp1, Col9a3, Ppp2r3b, Rt1-T24-1, Tlr3, Lgl1</i>
Glycosphingolipid biosynthesis	3	0.751 879 699	0.081 761 102	<i>St3gal6, Abo</i>

点, 提示其在脊髓损伤修复过程中发挥重要作用。BDNF (即 *Bdnf* 基因表达的蛋白) 是一种典型的神经营养因子, 广泛参与神经元分化及发育, 可以通过激活特定的受体 (如 TrkB、TrkC 等), 促进损伤脊髓的修复 [27-29]。本课题组的前期研究结果表明, 运动训练能够促进 BDNF 和 TrkB 在损伤远端脊髓组织中的表达, 并且促进了 SCI 大鼠后肢运动功能的康复 [11]; 同时, 前期研究结果显示, MenSCs 治疗可以促进 BDNF 表达。另有研究证实, BDNF 能够在损伤局部发挥保护神经元、促进轴突再生, 以及调节中枢神经突触可塑性的作用 [30-31]。因此, 本课题组推测 MenSCs 治疗联合运动训练可通过调节 BDNF 表达, 促进 SCI 大鼠的康复。

干细胞及运动训练均已被证明能够有效改善 SCI

后损伤局部的免疫微环境, 抑制神经元凋亡, 促进轴突再生, 进而增强运动功能的恢复 [4-6, 11]。然而, MenSCs 移植和运动锻炼组合疗法在治疗 SCI 中的疗效及机制尚未见报道。本课题组以往工作发现, MenSCs 移植能促进 SCI 大鼠的轴突再生, 但 SCI 后的病理微环境导致移植后干细胞活力被抑制 [11]。有研究报告提示, 运动训练能够显著提高损伤局部神经干细胞的活化及向神经元的定向分化 [32]。另有临床研究显示, 运动训练联合脂肪来源的间充质干细胞移植能够显著促进血管生成, 改善严重 SCI 患者的运动功能 [33]。亦有研究表明, 运动训练可以提高移植干细胞的定植、存活及分化 [34]。因此, 笔者推测在 SCI 中, 运动锻炼亦可对 MenSCs 的存活发挥相似的作用。

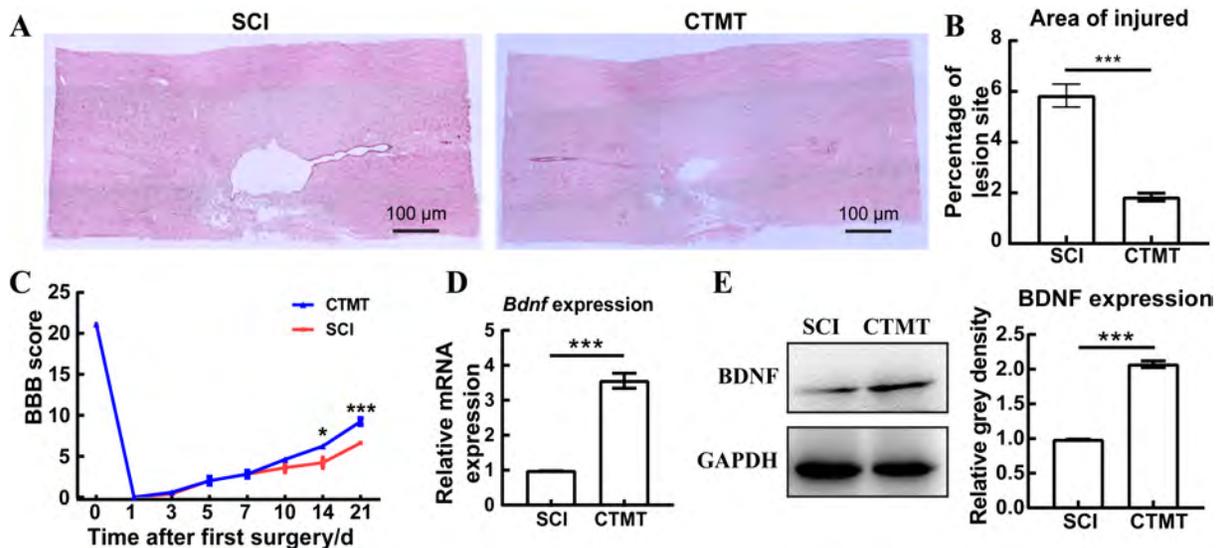


注：圆点及其大小分别代表节点（node）和度（degree），与此节点连接的基因数目越多，节点越大；点内填充红色代表该节点的基因表达量上调，蓝色代表该节点的基因表达量下调。

Note: The size of the dots represented the node and degree, the node with more connections had a larger size; the red color in the dots represented the up-regulation of gene expression in this node, and the blue color represented the down-regulation of gene expression.

图4 两组大鼠脊髓组织中差异表达基因的蛋白互作网络图

Figure 4 Protein-protein interaction network of differentially expressed genes in spinal cord tissues of the two groups of rats



注：A为苏木精-伊红染色观察SCI组（即单纯脊髓损伤手术组，作为对照， $n=3$ ）和CTMT组（即SCI手术后经血干细胞移植联合运动训练组， $n=3$ ）大鼠的脊髓损伤局部结构病理变化情况（放大40倍）。B，A图中损伤区域面积的统计结果（ $***P < 0.001$, $n=3$ ）。C，2组大鼠的BBB运动评分比较，分数越高说明运动功能恢复越好。D，实时荧光定量PCR检测两组大鼠损伤脊髓组织中*Bdnf*的转录水平差异（ $***P < 0.001$, $n=5$ ）。E，蛋白质印迹法检测两组大鼠损伤脊髓组织中BDNF蛋白水平差异（ $***P < 0.001$, $n=5$ ）。

Note: A showed the local structural pathological changes of the spinal cord injury in the SCI group (spinal cord injury, as the control, $n=3$) and the CTMT group (the transplantation of menstrual blood-derived stem cells combined with treadmill training after SCI surgery, $n=3$), observed by hematoxylin-eosin staining (magnified 40 times). B, statistical results of the lesion area in Figure A ($***P < 0.001$, $n=3$). C, BBB motor score, a higher score indicated a better recovery of motor function. D, Real-time fluorescence quantitative PCR was performed to detect the changes in the transcriptional level of *Bdnf* gene in the injured spinal cord in rats of SCI and CTMT groups ($***P < 0.001$, $n=5$). E, Western blotting analysis was performed to detect the changes in the protein level of BDNF in SCI and CTMT groups ($***P < 0.001$, $n=5$).

图5 经血干细胞移植联合运动训练治疗可促进脊髓损伤大鼠的运动功能恢复及BDNF表达

Figure 5 Menstrual blood-derived stem cells transplantation combined with treadmill training promotes motor function recovery and BDNF expression in spinal cord injury rats

本研究实验进一步证明, 运动训练联合 MenSCs 治疗的方式可以有效促进 BDNF 的表达或分泌。分析原因可能是运动锻炼促进了移植 MenSCs 的定植、存活及分化, 同时改善了 SCI 大鼠损伤局部的组织结构, 促进了其后肢运动功能的恢复。这与 Sun 等^[35] 研究的间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 和运动训练可通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路恢复 SCI 后运动功能的结果相吻合。本研究揭示了运动训练联合 MenSCs 移植在 SCI 大鼠康复过程中的作用, 并初步探讨了 BDNF 在此过程中发挥的重要作用。本研究结果提示 BDNF 有望成为治疗 SCI 患者的潜在靶点, 为以后干细胞联合运动康复锻炼在 SCI 患者中的应用提供了临床前实验基础和理论依据。

当然, 此研究亦存在不足, 比如, 在动物实验时应同时设立更严谨的实验对照, 如空白对照组和单因素处理组 (包括运动训练组和 MenSCs 移植治疗组)。本研究仅将 MenSCs 移植联合运动康复作为一个整体组合治疗方法, 与模型对照组进行比较, 针对性探讨这种复合疗法对 SCI 大鼠的作用。在后续研究中, 本课题组将纳入更多的处理因素, 并在不同维度上观察运动康复和 MenSCs 治疗对 SCI 动物脊髓损伤的修复作用。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

所有动物实验方案通过南通大学实验动物中心实验动物福利伦理审查委员会审查批准 (No. S20201230-332), 实验过程均遵循中国实验动物相关法律、法规和条例的要求进行。

All animal experiments involved in this study were approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Nantong University (No. S20201230-332). All experimental procedures were conducted in compliance with the requirements of Chinese laws and regulations related to laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

戚龙菊负责获得项目资助, 以及实验设计、数据处理、初稿写作和文稿修改;

陈世园负责测序数据的生物信息学分析;

廖泽华、石袁虎负责动物模型构建及分子生物学实验;

孙郁雨参与初稿写作;

王庆华负责获得项目资助, 课题设计和参与文稿修改。

[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] COURTINE G, SOFRONIEW M V. Spinal cord repair: advances in biology and technology[J]. Nat Med, 2019, 25(6): 898-908. DOI: 10.1038/s41591-019-0475-6.

- [2] O'SHEA T M, BURDA J E, SOFRONIEW M V. Cell biology of spinal cord injury and repair[J]. J Clin Invest, 2017, 127(9):3259-3270. DOI: 10.1172/JCI90608.
- [3] ZHOU X, WAHANE S, FRIEDL M S, et al. Microglia and macrophages promote corraling, wound compaction and recovery after spinal cord injury via Plexin-B2[J]. Nat Neurosci, 2020, 23(3): 337-350. DOI: 10.1038/s41593-020-0597-7.
- [4] ASSINCK P, DUNCAN G J, HILTON B J, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury[J]. Nat Neurosci, 2017, 20(5):637-647. DOI: 10.1038/nn.4541.
- [5] JONES I, NOVIKOVA L N, NOVIKOV L N, et al. Regenerative effects of human embryonic stem cell-derived neural crest cells for treatment of peripheral nerve injury[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(4): e2099-e2109. DOI: 10.1002/term.2642.
- [6] CAO S X, MA J, ZHANG J Y, et al. Reprogramming of one human induced pluripotent stem cell line from healthy donor [J]. Stem Cell Res, 2021, 57: 102613. DOI: 10.1016/j. scr. 2021.102613.
- [7] FENG P H, LI P P, TAN J C. Human menstrual blood-derived stromal cells promote recovery of premature ovarian insufficiency via regulating the ECM-dependent FAK/AKT signaling[J]. Stem Cell Rev Rep, 2019, 15(2): 241-255. DOI: 10.1007/s12015-018-9867-0.
- [8] LI Y, LI X N, ZHAO H X, et al. Efficient induction of pluripotent stem cells from menstrual blood[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22 (7):1147-1158. DOI: 10.1089/scd.2012.0428.
- [9] SHIRIAN S, EBRAHIMI-BAROUGH S, SABERI H, et al. Comparison of capability of human bone marrow mesenchymal stem cells and endometrial stem cells to differentiate into motor neurons on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffold[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(8): 5278-5287. DOI: 10.1007/s12035-015-9442-5.
- [10] ZEMEL'KO V I, KOZHUKHAROVA I V, KOVALEVA Z V, et al. [BDNF secretion in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, endometrium and adipose tissue]. [J]. Tsitologiya, 2014, 56(3): 204-211. DOI: 10.1134/S1990519X1404 0129.
- [11] WU Q F, WANG Q H, LI Z J, et al. Human menstrual blood-derived stem cells promote functional recovery in a rat spinal cord hemisection model[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 882. DOI: 10.1038/s41419-018-0847-8.
- [12] RONG Y L, LIU W, WANG J X, et al. Neural stem cell-derived small extracellular vesicles attenuate apoptosis and neuroinflammation after traumatic spinal cord injury by activating autophagy[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(5):340. DOI: 10.1038/s41419-019-1571-8.
- [13] SHARIF K, WATAD A, BRAGAZZI N L, et al. Physical activity and autoimmune diseases: get moving and manage the disease[J]. Autoimmun Rev, 2018, 17(1): 53-72. DOI: 10.1016/j. autrev.2017.11.010.
- [14] BOOTH F W, ROBERTS C K, LAYE M J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases[J]. Compr Physiol, 2012, 2(2): 1143-1211. DOI: 10.1002/cphy.c110025.

- [15] ZBOGAR D, ENG J J, MILLER W C, et al. Physical activity outside of structured therapy during inpatient spinal cord injury rehabilitation[J]. *J Neuroeng Rehabil*, 2016, 13(1): 99. DOI: 10.1186/s12984-016-0208-8.
- [16] BEHRMAN A L, ARDOLINO E M, HARKEMA S J. Activity-based therapy: from basic science to clinical application for recovery after spinal cord injury[J]. *J Neurol Phys Ther*, 2017, 41 Suppl 3(Suppl 3 IV STEP Spec Iss): S39-S45. DOI: 10.1097/NPT.000000000000184.
- [17] UNGERLEIDER L G, DOYON J, KARNI A. Imaging brain plasticity during motor skill learning[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2002, 78(3):553-564. DOI: 10.1006/nlme.2002.4091.
- [18] SUN T S, YE C Q, WU J, et al. Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(27): 2540-2547. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.27.005.
- [19] WANG H X, LIU N K, ZHANG Y P, et al. Treadmill training induced lumbar motoneuron dendritic plasticity and behavior recovery in adult rats after a thoracic contusive spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2015, 271: 368-378. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.07.004.
- [20] 殷睿安, 王双燕, 王培, 等. 重复经颅磁刺激叠加运动训练对脊髓损伤大鼠运动功能和神经元可塑性的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2021, 36(7):774-778, 792. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2021.07.002.
- YIN R A, WANG S Y, WANG P, et al. Effects of combined rTMS and exercise training on locomotor function and neuronal plasticity in rats with spinal cord injury[J]. *Chin J Rehabil Med*, 2021, 36(7): 774-778, 792. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2021.07.002.
- [21] HE W H, ZHANG X X, LI X Z, et al. A decellularized spinal cord extracellular matrix-gel/GelMA hydrogel three-dimensional composite scaffold promotes recovery from spinal cord injury via synergism with human menstrual blood-derived stem cells[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(30):5753-5764. DOI: 10.1039/d2tb00792d.
- [22] HWANG D H, SHIN H Y, KWON M J, et al. Survival of neural stem cell grafts in the lesioned spinal cord is enhanced by a combination of treadmill locomotor training via insulin-like growth factor-1 signaling[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(38): 12788-12800. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5359-13.2014.
- [23] DE MIRANDA L, LEVI R, DIVANOGLIOU A. Tapping into the unimpossible: Philosophical health in lives with spinal cord injury[J]. *J Eval Clin Pract*, 2023, 29(7):1203-1210. DOI: 10.1111/jep.13874.
- [24] WANG M H, CORDELL H J, VAN STEEN K. Statistical methods for genome-wide association studies[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 55: 53-60. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.04.008.
- [25] LI Y, CHEN Y, LI X, et al. RNA sequencing screening of differentially expressed genes after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(9): 1583-1593. DOI: 10.4103/1673-5374.255994.
- [26] 唐丹, 王先斌, 杨香莲, 等. 跑台运动训练对脊髓损伤后大鼠肺损伤及HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2023, 38(2):159-166. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2023.02.004.
- TANG D, WANG X B, YANG X L, et al. Effects of treadmill training on lung injury and HMGB1/TLR-4/NF- κ B signaling pathway after spinal cord injury in rats[J]. *Chin J Rehabil Med*, 2023, 38(2):159-166. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2023.02.004.
- [27] MITRE M, MARIGA A, CHAO M V. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(1):13-23. DOI: 10.1042/CS20160044.
- [28] WEISHAUP T, BLESCH A, FOUAD K. BDNF: the career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2012, 238(2):254-264. DOI: 10.1016/j.expneurol.2012.09.001.
- [29] KEEFE K M, SHEIKH I S, SMITH G M. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):548. DOI: 10.3390/ijms18030548.
- [30] WU Q F, CAO Y N, DONG C M, et al. Neuromuscular interaction is required for neurotrophins-mediated locomotor recovery following treadmill training in rat spinal cord injury[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2025. DOI: 10.7717/peerj.2025.
- [31] HERNANDEZ-TORRES V, GRANSEE H M, MANTILLA C B, et al. BDNF effects on functional recovery across motor behaviors after cervical spinal cord injury[J]. *J Neurophysiol*, 2017, 117(2):537-544. DOI: 10.1152/jn.00654.2016.
- [32] SAHELI M, KHORAMIPOUR K, VOSOUGH M, et al. Athletes' mesenchymal stem cells could be the best choice for cell therapy in *Omicron*-infected patients[J]. *Cells*, 2022, 11(12): 1926. DOI: 10.3390/cells11121926.
- [33] TAKAHASHI A, NAKAJIMA H, KUBOTA A, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cell transplantation for severe spinal cord injury: functional improvement supported by angiogenesis and neuroprotection[J]. *Cells*, 2023, 12(11):1470. DOI: 10.3390/cells12111470.
- [34] WU R, GUO Y P, ZHANG L Y, et al. Physical exercise promotes integration of grafted cells and functional recovery in an acute stroke rat model[J]. *Stem Cell Reports*, 2022, 17(2):276-288. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.12.006.
- [35] SUN X, HUANG L Y, PAN H X, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells and exercise restore motor function following spinal cord injury by activating PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(5): 1067-1075. DOI: 10.4103/1673-5374.355762.

(收稿日期: 2024-02-27 修回日期: 2024-08-06)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周培)

[引用本文]

戚龙菊, 陈世园, 廖泽华, 等. 经血干细胞移植联合运动训练促进大鼠脊髓损伤康复的转录组学分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 531-542. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.031.

QI L J, CHEN S Y, LIAO Z H, et al. Transcriptomic analysis of menstrual blood-derived stem cells transplantation combined with exercise training in promoting spinal cord injury recovery in rats[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 531-542. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.031.

PNR 检测在糖尿病肾脏疾病模型大鼠诊断及药效评价中的应用

张乃群¹, 袁飘漂¹, 曹琳茸¹, 应娜¹, 杨涛涛²

(1. 余姚市第四人民医院, 余姚 315470; 2. 宁波市医疗中心李惠利医院, 宁波 315000)

[摘要] **目的** 通过监测肾小球足细胞相关分子 podocin 和 nephrin 的 mRNA 比值 (podocin mRNA: nephrin mRNA ratio, PNR) 在大鼠糖尿病肾脏疾病 (diabetic kidney disease, DKD) 早期模型中的变化, 并将其与尿白蛋白-肌酐比值 (urinary albumin to creatinine ratio, U-ACR) 对比, 评价 PNR 作为 DKD 早期诊断指标的可行性; 并比较缬沙坦和福辛普利钠对 DKD 的早期干预作用。**方法** 采用尾静脉注射链脲霉素 (streptozotocin, STZ) (60 mg/kg) 建立 DKD 大鼠模型, 监测对比 PNR 与 U-ACR 的早期变化, 适时给予缬沙坦和福辛普利钠干预; 采用苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin staining, HE) 染色观察肾小球结构形态, 透射电子显微镜观察肾小球足细胞超微结构。**结果** 造模后 PNR 在第 9 天达临界值 (≥ 1), 较 U-ACR 在第 15 天达临界值 (≥ 30 mg/g) 更早; 造模后第 9 天给予缬沙坦和福辛普利钠干预, 发现其对 U-ACR 均有显著降低作用 ($P < 0.05$), 且缬沙坦低剂量优于高剂量 ($P > 0.05$), 而福辛普利钠高剂量优于低剂量 ($P > 0.05$); 低剂量的缬沙坦和福辛普利钠均对 PNR 有明显降低作用 ($P < 0.05$), 高剂量未见明显影响; 缬沙坦和福辛普利钠干预对肾小球结构及足细胞排布均具有一定的改善和维持作用。**结论** PNR 较 U-ACR 更早变化, 对大鼠 DKD 早期诊断具有一定的提示作用, 缬沙坦和福辛普利钠早期干预对大鼠 DKD 有一定的治疗作用。

[关键词] PNR; 尿白蛋白-肌酐比值; 糖尿病肾脏疾病; 蛋白尿预防; 大鼠

[中图分类号] R587.1; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0543-07



Application of PNR Detection in the Diagnosis and Drug-efficacy Evaluation of Diabetic Kidney Disease in Rats

ZHANG Naiqun¹, YUAN Piaopiao¹, CAO Linrong¹, YING Na¹, YANG Taotao²

(1. The No.4 People's Hospital of Yuyao, Yuyao 315470, China; 2. Ningbo Medical Center Lihuli Hospital, Ningbo 315000, China)

Correspondence to: YANG Taotao (ORCID: 0009-0000-7268-9685), E-mail: 843397827@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** This study aims to monitor the mRNA ratio of podocin to nephrin (PNR) in glomerular podocytes of early diabetic kidney disease (DKD) rat models. The feasibility of using PNR as an early diagnostic indicator for DKD was evaluated by comparing it with the urinary albumin-to-creatinine ratio (U-ACR). Additionally, the early intervention effects of valsartan and fosinopril sodium on DKD were compared. **Methods** The DKD rat model was established by caudal intravenous injection of streptozotocin (STZ) at a dosage of 60 mg/kg. The early changes in PNR and U-ACR were monitored and compared, followed by timely intervention with valsartan and fosinopril sodium. Hematoxylin and eosin staining (HE) was used to observe glomerular structure, while transmission electron microscopy examined the ultrastructure of glomerular podocytes. **Results** PNR reached the critical value (≥ 1) on day 9 after modeling, earlier than U-ACR, which reached the critical value (≥ 30 mg/g) on day 15. Intervention with valsartan and fosinopril sodium on day 9 after modeling significantly reduced U-ACR ($P < 0.05$), with low-dose valsartan showing better results than high-dose ($P > 0.05$), while high-dose fosinopril sodium

[基金项目] 余姚市卫生健康科技计划项目“基于 U-PNR 检测探究缬沙坦和卡托普利对 DKD 蛋白尿一级预防作用研究”(2022YYB13); 浙江省药学会医院药学专项科研资助项目“基于尿 PNR 检测的 DN 早期诊断及缬沙坦的干预作用研究”(2017ZY24)

[第一作者] 张乃群 (1979—), 女, 本科, 副主任药师, 主要从事医院药学和药理学研究。E-mail: 326943179@qq.com

[通信作者] 杨涛涛 (1989—), 男, 硕士, 主管中药师, 从事医院药学和药理学研究。E-mail: 843397827@qq.com。ORCID: 0009-0000-7268-9685

outperformed low-dose ($P>0.05$). Both low doses of valsartan and fosinopril sodium significantly reduced PNR ($P<0.05$), with no significant effect observed for high doses. The interventions with valsartan and fosinopril sodium improved and maintained glomerular structure and podocyte arrangement. **Conclusion** PNR changes earlier than U-ACR, indicating its potential as an early diagnostic marker for DKD in rats. Early intervention with valsartan and fosinopril sodium demonstrates a therapeutic effect on DKD in rats.

[Key words] PNR; Urinary albumin-to-creatinine ratio (U-ACR); Diabetic kidney disease; Proteinuria prevention; Rats

糖尿病肾脏疾病 (diabetic kidney disease, DKD) 既往称为糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN), 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 中最常见的慢性微血管并发症之一^[1]。肾小球脏层上皮细胞 (即足细胞) 中的裂隙隔膜蛋白 nephrin 和 podocin 是滤过屏障选择性滤过功能的关键组成部分, 当滤过屏障遭到破坏时产生蛋白尿, 而蛋白尿又是 DKD 的独立危险因素^[2]。因此, 尽早对 DKD 蛋白尿进行检测和干预尤为必要。

血管紧张素 II 受体拮抗剂 (angiotensin II receptor blocker, ARB) 和血管紧张素转换酶抑制剂 (angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI) 是临床上用于控制蛋白尿的常用药物, 但多是在蛋白尿已出现, 或相关指标如尿微量白蛋白-肌酐比值 (urinary albumin-to-creatinine ratio, U-ACR) 发生明显变化时开始干预^[3]。本研究通过监测肾小球足细胞蛋白 podocin 和 nephrin 基因表达, 并计算二者比值 (podocin mRNA: nephrin mRNA ratio, PNR), 对 DKD 进展进行评估以确定最佳用药窗口期; 同时, 及时在病变早期进行缬沙坦胶囊和福辛普利钠片的药物干预, 为 DKD 的早期评估和干预时间窗研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠120只, 6~8周龄, 体重180~200 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2022-0004]; 大鼠饲养在浙江中医药大学动物实验研究中心屏障设施 [SYXK (浙) 2021-0012], 环境温度为 (20±2) °C, 相对湿度为 50%~60%, 光照为 12 h/12 h 明暗交替, 噪声<50 db; 并在实验过程中按实验动物使用的3R原则给予人道主义关怀。本研究方案已通过浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查批准 (批准编号: 20221114-13; 终审编号: IACUC-202304-11)。

1.2 主要试剂

缬沙坦胶囊 (Valsartan) (80 mg/粒, 7粒/盒) 为

北京诺华制药有限公司产品; 福辛普利钠片 (Monopril) (10 mg/片, 14片/盒) 为中美上海施贵宝制药有限公司产品; 链脲霉素 (streptozotocin, STZ) 为德国 Calbiochem 公司产品 (批号 B56987); 盐酸塞拉唑溶液 (2 mL×10支/盒) 为敦化市圣达动物药业有限公司产品 (批号 20221030); 阿托品溶液 (2 mL/支, 10支/盒) 购自上海全宇生物科技 (驻马店) 动物药业有限公司 (批号 210803); 舒泰50 (50 mg/mL, 10 mL/瓶) 为法国 Virbac 公司生产 (批号 BN8EZG); 尿生化检测试剂盒、总RNA提取试剂 (RNAiso Plus)、逆转录试剂盒 (PrimeScript RT Reagent Kit)、荧光定量PCR试剂盒 (SYBR Premix EX Taq™ II) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 主要仪器

ACCU-CHEK Advantage 血糖仪 (德国 Roche 公司); 7020型全自动生化分析仪 (日本 Hitachi 公司); 激光多普勒微循环血流仪 (英国 Moor 公司); 80I 相差显微镜 (日本 Nikon 公司); iQ5 荧光定量PCR仪 (美国 BIO-RAD 公司); 实验动物安乐死系统 (北京广源达科技发展有限公司)。

1.4 模型制备和早期评估

适应性饲养3周后, 取体重300~340 g的雄性SD大鼠60只。除24只大鼠作为正常对照组 (正常饲养, 不作任何处理) 外, 其余36只大鼠禁食不禁水16 h (21:00~次日13:00), 经尾静脉一次性注射STZ (60 mg/kg) 建立糖尿病模型^[4]。造模后给予大鼠充足饮水和饲料, 3 d后禁食不禁水12 h (21:00~次日09:00) 检测空腹血糖, 取血糖值范围在15.0~25.0 mmol/L的糖尿病模型大鼠24只。

造模后3 d、5 d、7 d、9 d、11 d、13 d、15 d、17 d 各取3只糖尿病模型大鼠进行代谢试验, 正常对照组也在相同时间点各取3只进行代谢试验。收集24 h尿液, 用全自动生化分析仪监测尿肌酐 (urine creatinine, U-Crea) 和尿微量白蛋白 (urine micro-albumin, U-Alb), 计算二者比值即U-ACR。用舒泰

50 (45 mg/kg)、盐酸塞拉嗪溶液 (10 mg/kg) 和阿托品溶液 (0.04 mg/kg, 2 mL/kg, 需在注射舒泰50前5~10 min注射) 复合过量麻醉大鼠, 摘取其肾脏组织并清洗、分离组织后离心, 按照试剂盒说明书进行RNA提取、反转录并检测 podocin mRNA 和 nephrin mRNA, 计算PNR, 并进行组织病理学检查和超微病理学检查。

1.5 模型分组和给药干预

适应性饲养3周后, 取体重300~340 g的雄性SD大鼠50只, 按1.4节方法建立糖尿病模型后第9天, 随机分为5组: 模型对照组 (给予0.9%NaCl溶液即生理盐水, 10 mL/kg)、缬沙坦高剂量组 (50 mg/kg)、缬沙坦低剂量组 (25 mg/kg)、福辛普利钠高剂量组 (50 mg/kg) 和福辛普利钠低剂量组 (25 mg/kg), 每组10只。另设含10只大鼠的正常对照组 (给予生理盐水, 10 mL/kg)。缬沙坦、福辛普利钠分别研磨成粉后, 用灭菌水配制为混悬液, 当各组大鼠的PNR > 1且稳定后进行药物干预。给药前将药液摇匀, 经口灌胃, 每天1次, 连续4周。实验结束后, 对上述大鼠实施CO₂安乐死, 并取其肾脏组织做进一步分析。

1.6 药效评价

1.6.1 代谢试验

给药2周和4周后各进行一次24 h代谢试验, 时间从上午9:00开始至次日上午9:00结束。每笼1只大鼠, 收集24 h尿液, 用尿生化检测试剂盒测定尿总蛋白 (urine total protein)、尿素氮 (urine urea nitrogen)、U-Crea (单位g) 和U-Alb (单位mg) 含量, 并计算U-ACR值 (即U-Alb和U-Crea的比值)。

1.6.2 mRNA检测

肾脏组织按流程处理后, 用RNAiso Plus试剂进行组织中总RNA提取, 再用PrimeScript™ RT Reagent反转录成cDNA后, 使用SYBR Premix EX Taq™ II试剂盒检测 nephrin 与 podocin mRNA 水平。各引物序列如下: nephrin 的正向引物为5'-GACACCTGCATGATG-AAGTGGAG-3', 反向引物为5'-CAGGCCAGCGAA-GGTCATAG-3', 目的片段的大小为102 bp; Podocin 的正向引物为5'-AGAAGACATCCAGCCACACAAG-3', 反向引物为5'-CAGCCCCTCAACCCAAAA-3', 目的片段的大小为84 bp。根据实时荧光定量PCR测定的循环阈 (cycle threshold, Ct) 值按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 计算目的基因的相对表达量。

1.6.3 肾脏病理观察

给药实验结束后, 摘取大鼠右侧肾脏, 漂洗去血,

放入体积分数为10%的甲醛溶液中固定48 h, 石蜡包埋、切片, 进行常规病理苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色, 在光学显微镜下观察肾脏组织的细胞结构。进一步将肾皮质切至1 mm³大小, 置于2.5%戊二醛溶液中固定, 脱水包埋切片后, 用透射电子显微镜观察肾小球足细胞的超微结构。

1.7 统计分析

采用SPSS 19.0软件进行统计分析, 符合正态分布的计量数据采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后大鼠U-ACR和PNR值比较

与未处理的正常对照组大鼠相比, 注射STZ建立糖尿病模型后的前13 d, U-Alb无法被检测到或很低; 直至第15天时, U-ACR ≥ 30 mg/g, 提示出现蛋白尿, DKD模型构建成功。同时采用实时荧光定量PCR检测肾脏组织中 podocin mRNA 和 nephrin mRNA, 计算PNR值后发现, 造模后PNR逐步升高, 至第9天时 > 1, 后呈继续升高的趋势 (表1)。通过对比发现, PNR早于U-ACR达到临界值的变化。

2.2 药物干预对U-ACR和PNR的影响

按照模型制备的条件, 造模后第9天开始分组并进行药物干预。与正常对照组比较, 模型对照组大鼠的U-ACR在药物干预实验开始时有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 至给药第4周时差异显著 ($P < 0.01$), 其中缬沙坦和福辛普利钠高、低剂量均有降低作用 ($P < 0.01$), 且缬沙坦低剂量组的作用稍优于高剂量组, 福辛普利钠高剂量组稍优于低剂量组。与正常对照组比较, 模型对照组的PNR在实验开始时即升高超过临界值 (PNR < 1), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 至第4周时差异显著 ($P < 0.01$), 其中缬沙坦低剂量组和福辛普利钠低剂量组均显著降低 ($P < 0.01$) 且低于临界值 (表2)。

2.3 STZ造模及药物干预后的肾小球结构

经HE染色后光学显微镜下观察可见, 正常对照组大鼠肾脏肾小球形态正常、轮廓清晰、结构完整; 与正常对照组比较, 模型对照组肾小球肿胀, 基底膜增厚, 系膜区基质沉积, 结构破损不完整; 与模型对照组比较, 缬沙坦组和福辛普利钠干预后大鼠肾小球形态和结构均有改善, 高剂量组均优于低剂量组 (图1A~F)。

表1 STZ造模后大鼠U-ACR和PNR值的变化

Table 1 Changes of U-ACR and PNR values in rats after STZ modeling

造模后时间 Time after molding/d	U-ACR/(mg·g ⁻¹)		PNR	
	正常组	模型组	正常组	模型组
	Normal	Model	Normal	Model
3	12.69±3.69	ND	0.85±0.40	0.39±0.19
5	13.29±4.05	ND	0.88±0.31	0.64±0.45
7	13.02±3.7	ND	0.86±0.37	0.66±0.10
9	12.14±3.27	9.45±6.23	0.91±0.27	1.26±0.11
11	11.96±3.21	18.19±8.75	0.90±0.25	1.70±0.65
13	13.88±4.02	ND	0.89±0.30	1.63±0.63
15	12.73±3.98	72.59±19.51	0.87±0.38	1.25±0.17
17	13.01±2.98	77.68±11.16	0.91±0.42	2.54±0.20

 $(\bar{x} \pm s, n=3)$

注: U-ACR, 尿微量白蛋白与尿肌酐的比值; PNR, 足细胞相关分子 podocin 和 nephrin 的 mRNA 比值。ND, 因无检测值而无法计算。

Note: U-ACR, urinary albumin-to-creatinine ratio; PNR, podocin mRNA: nephrin mRNA ratio. ND, no detection value, therefore cannot be calculated.

表2 药物干预对糖尿病模型大鼠U-ACR和PNR的影响

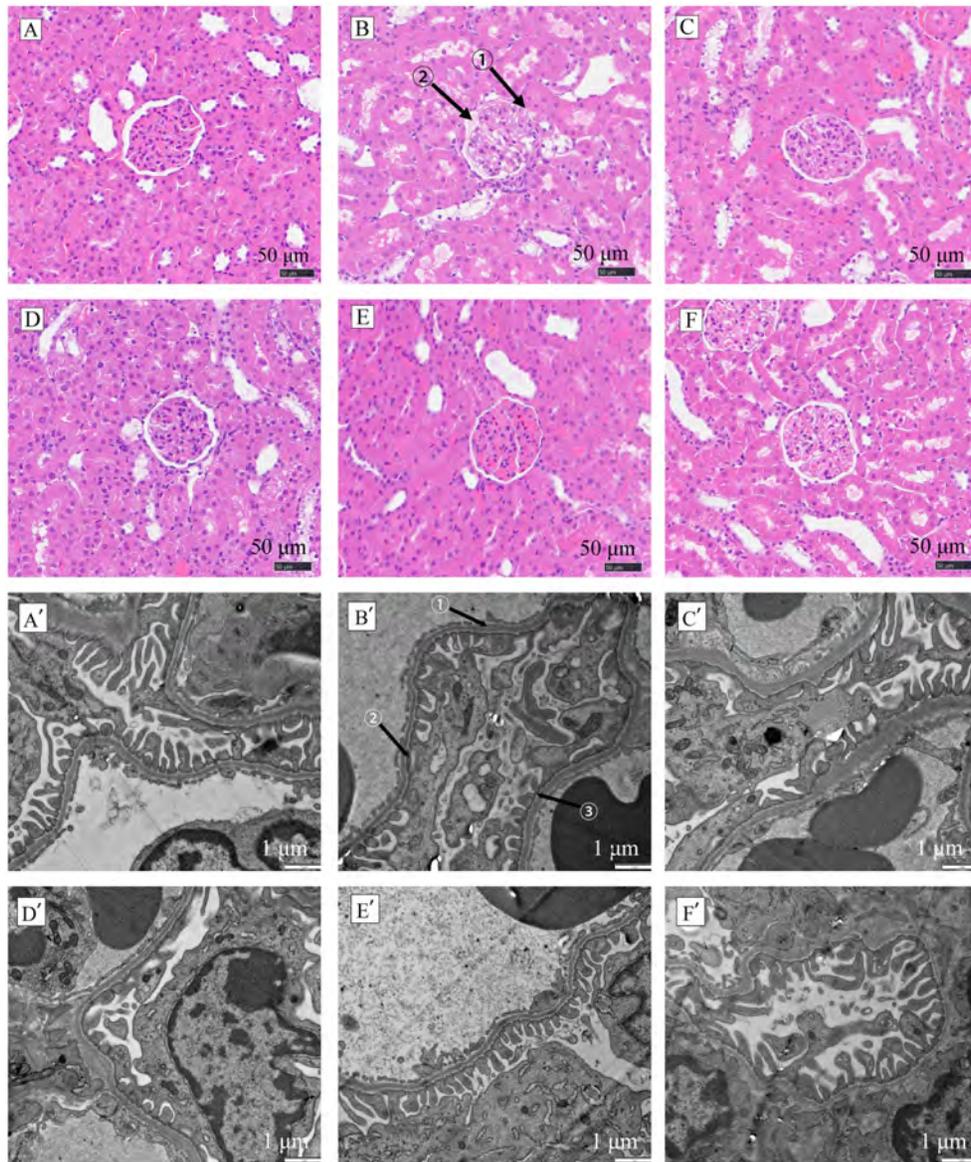
Table 2 Effects of drug intervention on U-ACR and PNR in diabetic model rats

组别 Group	U-ACR/(mg·g ⁻¹)		PNR	
	给药前	给药4周	给药前	给药4周
	0 week	4 weeks	0 week	4 weeks
正常对照 Normal control (0.9%NS)	11.69±3.15	11.45±3.25	0.92±0.21	0.89±0.17
模型对照 Model control (0.9%NS)	17.96±6.45	896.12±62.89**	1.24±0.11	1.64±0.08**
缬沙坦低剂量 Valsartan 25 mg/kg	18.08±7.03	408.99±78.03 ^{△△}	1.16±0.14	0.53±0.13 ^{△△}
缬沙坦高剂量 Valsartan 50 mg/kg	18.86±6.90	480.97±94.34 ^{△△}	1.14±0.24	1.28±0.44
福辛普利钠低剂量 Fosinopril 30 mg/kg	18.73±6.82	314.93±67.81 ^{△△}	1.26±0.22	0.92±0.28 ^{△△}
福辛普利钠高剂量 Fosinopril 60 mg/kg	17.86±5.92	236.61±43.55 ^{△△}	1.17±0.21	2.14±0.29

 $(\bar{x} \pm s, n=10)$ 注: U-ACR, 尿微量白蛋白与尿肌酐的比值; PNR, 足细胞相关分子 podocin 和 nephrin 的 mRNA 比值。与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。Note: U-ACR, urinary albumin-to-creatinine ratio; PNR, podocin mRNA: nephrin mRNA ratio. Compared with normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model control group, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$.

进一步用透射电子显微镜观察可见, 正常对照组大鼠的肾小球足细胞结构完整, 足突排列整齐清晰, “拉链状”布局显而易见, 基底膜平滑规整; 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠的肾小球足细胞足突广泛融合或消失, “拉链状”布局模糊不成型, 基底膜弥漫性不规则增厚, 上皮下电子致密物

沉积; 与模型对照组相比, 缬沙坦组和福辛普利钠组大鼠的肾小球形态和结构有不同程度改善, 且福辛普利钠组大鼠的肾小球和基膜的形态结构较缬沙坦组好; 其中, 缬沙坦低剂量组优于高剂量组, 而福辛普利钠高剂量组优于低剂量组 (图 1A' ~ F')。



注: A、A' 为正常对照组 (0.9% NaCl); B、B' 为模型对照组 (0.9% NaCl); C、C' 为缬沙坦低剂量组 (Valsartan 25 mg/kg); D、D' 为缬沙坦高剂量组 (Valsartan 50 mg/kg); E、E' 为福辛普利钠低剂量组 (Fosinopril 30 mg/kg); F、F' 为福辛普利钠高剂量组 (Fosinopril 60 mg/kg)。B图中, 箭头①为肾小球形态轮廓, 箭头②为系膜区基质沉积; B' 图中, 箭头①为足细胞基底膜弥漫性不规则增厚, 箭头②③为足细胞“拉链状”结构布局破损、模糊不成型。

Note: A and A' represent the normal control group (0.9% NaCl), B and B' represent the model control group (0.9% NaCl), C and C' represent the low-dose Valsartan group (Valsartan 25 mg/kg), and D and D' represent the high-dose Valsartan group (Valsartan 50 mg/kg). E and E' represent the low-dose foscipril sodium group (Fosinopril 30 mg/kg), and F and F' represent the high-dose foscipril sodium group (Fosinopril 60 mg/kg). In fig. B, the arrow ① indicates the glomerular contour, the arrow ② indicates the mesangial matrix deposition. In fig. B', the arrow ① indicates the diffuse irregular thickening of the podocyte membrane, while the arrows ② and ③ indicate damage and fuzziness of the “zipper” layout of podocytes.

图1 各组大鼠肾脏组织的HE染色 (A~F, $\times 400$) 和透射电子显微镜观察 (A'~F', $\times 5000$)

Figure 1 HE staining (A-F, $\times 400$) and transmission electron microscopy (A'-F', $\times 5000$) of renal tissues in each group of rats

3 讨论

DKD是以微血管病变为主的肾小球疾病, 发病机制目前尚不明确, 可能与长期高血糖引起的代谢紊乱、遗传因素、肾小球血流动力改变、细胞因子产生增加、

氧化应激、炎症反应、激肽系统及自噬等有关^[5]。蛋白尿作为标志性症状贯穿整个DKD病程, 早期微量蛋白尿发展为显性蛋白尿, 再进展至大量蛋白尿, 最后出现终末期肾衰竭。DKD病理改变主要是肾小球系膜细胞增殖、系膜细胞外基质增加、肾小球基底膜增

厚和结节性或弥漫性肾小球硬化,可伴间质性肾炎或肾小动脉硬化^[6]。蛋白尿的出现是肾小球滤过系统异常导致的,临床常用的降压药物(ARB、ACEI类等)对其具有改善作用,且有研究认为这些降压药物可能对滤过系统结构和组成(即肾小球足细胞)具有一定保护作用^[2]。肾小球滤过屏障由足细胞、肾小球基底膜和内皮细胞组成,足细胞与相邻足突之间的裂孔膜构成了蛋白滤过的最后一道屏障,一旦足细胞损伤脱落将缺乏再生能力。因此,研究足细胞结构及其蛋白或能在DKD病程中更早预测蛋白尿。

Nephrin蛋白特异性表达于足细胞,其通过同种二聚体形成可以自我组装的拉链样结构,形成裂孔膜的分子基础^[7]。Podocin蛋白是继nephrin之后发现的一种同样特异性表达于足细胞的关键蛋白,一方面通过与nephrin连接形成裂孔膜的骨架,另一方面其富含的胆固醇和神经鞘脂可以增强nephrin诱导的信号传导^[8]。研究发现,足细胞损伤以及nephrin、podocin蛋白在肾小球的表达下降,均与蛋白尿的发生及发展密切相关:足细胞损伤程度越大,nephrin和podocin蛋白表达下调越多,足细胞之间裂孔膜的结构破坏越严重,从而导致蛋白尿产生^[9]。

对DKD进行早期检测和干预的重要性不言而喻,既往研究多是在传统指标出现变化后才开始干预^[8]。本研究结合文献报告,在前期研究中采用大剂量STZ(60 mg/kg)尾静脉注射制备DKD大鼠模型^[10],该模型能短时间内反映疾病急性进展,为相关指标变化和机制研究提供基础条件^[11-12]。本研究发现,U-Alb在DKD疾病早期含量很低且不稳定,导致U-ACR无法检测和计算;PNR可以正常通过检测肾脏足细胞蛋白nephrin和podocin的mRNA相对表达量计算得出。对比U-ACR与PNR的变化发现,PNR较U-ACR变化稳定且更早达到临界值。

本实验与其他研究报告^[13-14]相似,ACEI和ARB类药物均对U-ACR有显著降低作用,说明尽早干预有必要。根据PNR的变化给予缬沙坦和福辛普利钠干预,两类药物在大鼠模型中均对蛋白尿有控制作用,同时对PNR也有影响,这说明缬沙坦与福辛普利钠对DKD大鼠的肾小球足细胞蛋白nephrin和podocin表达具有干预作用,podocin和nephrin基因表达比值PNR变化是这种干预作用的综合体现和实验证实^[15-16]。组织病理学检查和超微病理学检查发现,这些药物对肾小球结构形态及肾足细胞的分布排列也有明显的改善作用,提示其独立于降血压以外的肾脏保护作用很可

能是通过改变肾小球足细胞蛋白及结构来实现的。但缬沙坦和福辛普利钠两种药物对PNR呈现出剂量和效果不一致的作用,低剂量时均作用显著,高剂量时差异不明显,因此高、低剂量表现的差异值得进一步深入探究。

本实验研究虽有一些新的探索 and 发现,如大剂量尾静脉注射STZ制备急性DKD大鼠模型能反映相关指标的短期急性变化,但鉴于模型复制具有一定的失败率,且研究和观察周期较短,在药效观察方面尚有一定局限性和不足。此外,在DKD疾病早期检测PNR值并设定其临界值的结论尚未达成共识,但本实验发现可为相关研究提供新的思路,为DKD早期诊断、防治及药物开发提供新的生物学指标。

综上,本研究在前期研究基础上制备了大鼠糖尿病模型,以此模拟DKD疾病的发生和急性进展;对比发现PNR相较于传统指标U-ACR在造模后更早达到指标临界值,并且通过药物干预试验验证了缬沙坦和福辛普利钠两类药物对蛋白尿的防治作用;本研究中PNR的检测及分析结果提示,ACEI和ARB类药物的肾脏保护效应或许是通过肾小球足细胞podocin和nephrin蛋白实现的。PNR或许是DKD早期监测的一个潜在指标,可以为DKD的早期诊断、预防治疗及药物开发研究提供新的线索。

[医学伦理声明 Statement of medical ethics]

本研究涉及的动物实验方案已通过浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查批准(批准编号:20221114-13;终审编号:IACUC-202304-11)。各实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Animal Ethics and Welfare Committee of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine (Approval No. 20221114-13; Final review No. IACUC-202304-11). All experimental procedures were performed in accordance with the laws and regulations related to experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

张乃群负责实验的组织实施,论文的撰写与修改;
袁飘飘参与论文撰写与修改;
曹琳茸和应娜参与实验数据的统计与分析;
杨涛涛负责动物实验(含分子生物学检测与病理及电子显微镜等)和论文修改。

[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] LUO J L, PIAO C L, JIN D, et al. Mechanism of rhubarb for diabetic kidney disease through the AMPK/NF- κ B signaling pathway based on network pharmacology[J]. *ChemistrySelect*, 2022, 7(4): e202103534. DOI: 10.1002/slct.202103534.
- [2] 杨涛涛, 陈民利. 足细胞蛋白 Nephrin、Podocin 与肾小球疾病[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(11):72-77. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.011.016.
YANG T T, CHEN M L. Podocyte protein nephrin, podocin and glomerulopathy[J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23(11):72-77. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.011.016.
- [3] 陈月梅, 张春莹, 龙婷婷, 等. 随机尿蛋白、尿蛋白/肌酐比值及尿微量白蛋白/肌酐比值在早期糖尿病肾病中应用价值[J]. *临床军医杂志*, 2023, 51(4):362-365, 369. DOI:10.16680/j.1671-3826.2023.04.07.
CHEN Y M, ZHANG C Y, LONG T T, et al. Application value of random urine protein, urinary albumin/urinary creatinine ratio and urine microalbumine creatinine ratio in early diabetic nephropathy[J]. *Clin J Med Off*, 2023, 51(4):362-365, 369. DOI: 10.16680/j.1671-3826.2023.04.07.
- [4] 叶桐江, 郑博文, 赵琳, 等. 链脲佐菌素诱导1型糖尿病大鼠模型的最佳禁食时间与最优剂量[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2019, 45(2):52-55. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2812.2019.02.009.
YE T J, ZHENG B W, ZHAO L, et al. Optimal fasting time and dose of streptozotocin-induced diabetic rat model[J]. *J Lanzhou Univ Med Sci*, 2019, 45(2):52-55. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2812.2019.02.009.
- [5] 吴兆芳, 于艳丽, 韩红梅, 等. 2型糖尿病患者胰岛素抗体水平与尿白蛋白/肌酐比值的相关性研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2022, 8(6):431-435. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2022.06.007.
WU Z F, YU Y L, HAN H M, et al. Correlation between insulin antibody and urinary albumin/creatinine ratio in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Chin J Diabetes*, 2022, 8(6):431-435. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2022.06.007.
- [6] 朱丽坤, 曹爽, 蒋仕林, 等. 黄芪注射液对 db/db 小鼠肾脏 IL-1 β 、MCP-1 和 TNF- α 的 mRNA 表达的影响[J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(1):60-64. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.01.010.
ZHU L K, CAO S, JIANG S L, et al. Effect of *Astragalus* injection on mRNA expression of IL-1 β , MCP-1 and TNF- α in kidney of db/db mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(1):60-64. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.01.010.
- [7] KOSTOVSKA I, TRAJKOVSKA K T, TOPUZOVSKA S, et al. Nephriuria and podocytopathies[J]. *Adv Clin Chem*, 2022, 108:1-36. DOI: 10.1016/bs.acc.2021.08.001.
- [8] 关冰, 田雪, 李伟男, 等. 健脾益肾活血方对膜性肾病大鼠肾组织 Nephrin 和 Podocin 表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 8(6):731-736.
GUAN B, TIAN X, LI W N, et al. Effect of Jianpi Yishen Huoxue Decoction on the expression of Nephrin and Podocin in renal tissue of rats with membranous nephropathy[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2022, 8(6):731-736.
- [9] 吝娜, 曹磊, 王保兴. 舒洛地特对膜性肾病大鼠肾组织中 podocin、nephin 表达的影响[J]. *临床内科杂志*, 2022, 39(7):481-485. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2022.07.013.
LIN N, CAO L, WANG B X. Effects of sulodexide on the expression of podocin and nephrin in renal tissues of membranous nephropathy rats[J]. *J Clin Intern Med*, 2022, 39(7):481-485. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2022.07.013.
- [10] SWAMINATHAN S M, RAO I R, SHENOY S V, et al. Novel biomarkers for prognosticating diabetic kidney disease progression[J]. *Int Urol Nephrol*, 2023, 55(4):913-928. DOI: 10.1007/s11255-022-03354-7.
- [11] 罗文婷, 唐诗韵, 肖湘, 等. 糖尿病肾病动物模型的研究进展[J]. *成都医学院学报*, 2023, 18(5):650-657. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2257.2023.05.023.
LUO W T, TANG S Y, XIAO X, et al. Research progress of animal models of diabetic nephropathy[J]. *J Chengdu Med Coll*, 2023, 18(5):650-657. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2257.2023.05.023.
- [12] 王雪, 呼永河. 糖尿病小鼠模型的常见种类及其构建要素分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(4):415-421. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.031.
WANG X, HU Y H. Analysis of common types and construction elements of diabetic mouse models[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(4):415-421. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.031.
- [13] 程乾, 沈永芹, 谷雨, 等. 银杏叶提取物、卡托普利、缬沙坦单独用药及联合用药对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞的保护作用[J]. *徐州医学院学报*, 2010(6):351-354. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2065.2010.06.001.
CHENG Q, SHEN Y Q, GU Y, et al. Cytoprotection of the monotherapy and combination treatment of *Ginkgo biloba* extract, captopril, valsartan on rat glomerular mesangial cells cultured in high glucose[J]. *Acta Acad Med Xuzhou*, 2010(6):351-354. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2065.2010.06.001.
- [14] FUJIWARA T, YANO Y, HOSHIDE S, et al. 缬沙坦/氨氯地平联合治疗时夜间中心血压变化与尿白蛋白/肌酐的相关性[J]. *中华高血压杂志*, 2019, 5(7):698. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2019.07.028.
FUJIWARA T, YANO Y, HOSHIDE S, et al. Association between change in central nocturnal blood pressure and urine albumin-creatinine ratio by a valsartan/amlodipine combination: a CPET study[J]. *Chin J Hypertens*, 2019, 5(7):698. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2019.07.028.
- [15] ANTAL-KONYA V, SCHAY G, KETSZERI M, et al. The regulation of the nephrin-nephin distance by podocin mediates the interallelic interactions of the NPHS2 R229Q variant[J]. *Pediatr Nephrol*, 2023, 38(7):2262-2263.
- [16] 陈霞波, 龚文波, 陈民利, 等. 温肾健脾方对糖尿病肾病大鼠肾小球足细胞 nephrin 和 podocin 表达的影响[J]. *中华危重症医学杂志(电子版)*, 2017, 10(4):224-229. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2017.04.003.
CHEN X B, GONG W B, CHEN M L, et al. Effect of warming kidney and spleen recipe on the expressions of nephrin and podocin in glomerular podocyte of diabetic nephropathy rats[J]. *Chin J Crit Care Med Electron Ed*, 2017, 10(4):224-229. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2017.04.003.

(收稿日期:2024-03-13 修回日期:2024-08-04)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,张萍)

[引用本文]

- 张乃群, 袁飘漂, 曹琳茸, 等. PNR 检测在糖尿病肾脏疾病模型大鼠诊断及药效评价中的应用[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 543-549. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.044.
- ZHANG N Q, YUAN P P, CAO L R, et al. Application of PNR detection in the diagnosis and drug-efficacy evaluation of diabetic kidney disease in rats[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 543-549. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.044.

生殖毒理学研究动物模型的建立方法及应用评价

黄冬妍^{1,2}, 吴建辉^{1,2}

(1. 上海市生物医药技术研究院, 国家卫生健康委生育调节药械重点实验室, 上海生殖健康药具工程技术研究中心, 上海 200237; 2. 上海市生物医药技术研究院药理毒理学研究室, 上海 200032)

[摘要] 生殖毒理学是指应用毒理学方法研究外来物质干扰卵子或精子生成的机制及其有害作用对后代影响的学科, 研究内容包括受试物对亲代生殖功能的损伤作用和对子代胚胎的毒性评价。人们每天会接触到各种药品、化学品和环境污染物质, 这些物质是否具有生殖毒性, 关乎子孙后代的健康, 这就需要通过生殖毒理学研究来进行评价。由于生殖毒性评价的特殊性和重要性, 国内外相关机构出台了相应的指导原则、国家标准或行业标准, 均涉及动物实验。在生殖系统疾病研究中, 目前开发出了很多研究重要生殖器官的动物模型, 如睾丸和卵巢研究用动物模型。每种模型均涉及动物的选择、方法的建立和评价指标的量化, 且各有其优势和局限性, 研究人员使用时要根据试验需求和模型特点来综合考量。本文针对生殖毒理学研究中常用的生殖与发育毒性评价动物模型, 包括生育力与早期胚胎发育毒性评价大鼠模型、胚胎-胎仔发育毒性评价大鼠模型、胚胎-胎仔发育毒性评价兔模型、胚胎-胎仔发育毒性评价小型猪模型、围产期毒性评价大鼠模型、胚胎发育毒性评价斑马鱼模型, 化学药物和放射疗法诱导、自身免疫性和卵巢切除等方式引起的卵巢毒性评价动物模型, 以及化学药物和环境因素引起的睾丸毒性评价动物模型, 对这些模型的建立方法、应用范围和特点进行总结, 以期对相关领域的研究应用提供参考。

[关键词] 生殖毒理学; 发育毒性; 围产期毒性; 睾丸毒性; 卵巢毒性; 动物模型

[中图分类号] R994; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0550-10



Establishment Methods and Application Evaluation of Animal Models in Reproductive Toxicology Research

HUANG Dongyan^{1,2}, WU Jianhui^{1,2}

(1. Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, NHC Key Lab of Reproduction Regulation, Shanghai Engineering Research Center of Reproductive Health Drugs and Devices, Shanghai 200237, China; 2. Department of Pharmacology and Toxicology, Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: WU Jianhui (ORCID: 0000-0001-7031-4425), E-mail: wujh_731@163.com

[ABSTRACT] Reproductive toxicology is a discipline that uses toxicological methods to study the mechanisms by which foreign substances interfere with the generation of eggs or sperm and their detrimental effects on offspring. Research includes evaluating the damaging effects of test substances on reproductive function of parents and the toxicity evaluation of offspring embryos. People are exposed to a wide range of drugs, chemicals and environmental pollutants on a daily basis, and determining whether these substances have reproductive toxicity is crucial for the health of future generations. Reproductive toxicology research is therefore critical. Given the specificity and importance of reproductive toxicity evaluation, corresponding institutions both domestically and internationally have issued guidelines, national standards, or industry standards, all of which involve animal experiments. In the study of reproductive system diseases, numerous animal models have been developed to investigate key reproductive organs, such as testicles and ovaries. Each model involves the selection of animals, the establishment of methods, and the quantification of evaluation indicators, and all have advantages and limitations. The choice of model should be based on experimental needs and the characteristics of the model. This paper summarizes commonly used animal models for reproductive and development toxicity

[第一作者] 黄冬妍(1989—),女,硕士,助理研究员,研究方向:生殖药理毒理学研究。E-mail: hdy043@163.com

[通信作者] 吴建辉(1976—),男,博士,研究员,研究方向:生殖药理毒理学研究。E-mail: wujh_731@163.com。ORCID: 0000-0001-7031-4425

evaluation in reproductive toxicology research, including rat models for fertility and early embryonic development toxicity, rat models for embryo-fetal development toxicity, rabbit models for embryo-fetal development toxicity evaluation, minipig models for embryo-fetal development toxicity, rat models for perinatal toxicity, zebrafish models for embryonic development toxicity, and models for evaluating ovarian toxicity induced by chemical drugs, radiotherapy, autoimmunity, and ovariectomy, as well as models for evaluating testicular toxicity caused by chemical drugs and environmental factors. The methods for establishing these models, their application scope, and characteristics are reviewed in order to provide references for relevant research applications.

[Key words] Reproductive toxicology; Development toxicity; Perinatal toxicity; Testicular toxicity; Ovarian toxicity; Animal models

毒理学是一种主要通过动物实验等方法, 研究外源性因素(包括化学、物理、生物因素)对生物系统的有害作用, 以预测其对人体的危害, 从而为确定安全限值并采取防治措施提供科学依据的学科。作为毒理学的一门分支学科, 生殖毒理学着重应用毒理学方法, 研究外来物质(如药物、农药、环境污染及工业化学物质)干扰卵子或精子生成的机制及所致有害作用对后代的影响^[1]。1960年代, 沙利度胺(商品名: 反应停)在上市前由于没有被充分评估其潜在的生殖毒性, 导致全球许多国家的孕妇使用后产下很多四肢短小、形同海豹的婴儿, 这就是震惊世界的“反应停事件”^[2]。经过此事件, 世界各国开始重视生殖毒理学研究, 并对药物的生殖毒性进行系统性评价。

在药物开发过程中, 通过哺乳动物生殖毒性试验可以评估受试物对动物生殖功能及其子代发育过程的影响, 预测药物可能产生对生殖器官和细胞、受孕、妊娠、分娩、哺乳等亲代生殖机能的不良影响, 以及对子代胚胎-胎儿发育、出生后发育的不良影响。生殖毒性研究在限定临床研究受试者范围、降低临床研究受试者和药品上市后使用人群的用药风险方面发挥着重要作用^[3]。近年来, 随着中国育龄夫妇不孕不育率的逐年提高, 对生殖毒性研究的需求变得越来越迫切。药物生殖毒性评价领域已经出台了相应的技术指导原则, 同时食品保健品的生殖毒性评价领域也颁布了相应的国家标准, 其评价方法成熟, 评价指标完善。此外, 有关食品、保健品、环境污染物的生殖毒性研究报告也越来越多^[4]。

动物模型作为研究人类疾病的一个重要工具, 在探索疾病的病理机制、开发治疗药物方面发挥着极其重要的作用。目前, 生殖毒性动物模型已广泛应用于药物、食品、保健品、环境污染物的评价^[5-6]。本文对生殖毒理学研究中常用的动物模型建立方法、应

用范围和优缺点进行综述, 以期从事药物生殖毒性评价和生殖系统疾病药物研发的专业人员提供有益参考。

1 生殖与发育毒性评价动物模型

生殖与发育毒性试验是评价药物对哺乳动物生殖系统的影响而进行的一组试验, 包含对一个完整生命周期(即从第一代受孕至下一代受孕)的观察, 可以检测即时和潜在的不良影响。根据“人用药品注册技术要求国际协调会”(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)关于人用药物生殖毒性研究技术指导原则^[7], 一般评估下列阶段:(A)从交配前至受孕(成年雄性和雌性的生殖功能、配子的发育和成熟、交配行为、受精);(B)从受孕至着床(成年雌性的生殖功能、着床前发育、着床);(C)从着床至硬腭闭合(成年雌性的生殖功能、胚胎发育、主要器官形成);(D)从硬腭闭合至妊娠结束(成年雌性的生殖功能、胎仔发育和生长、器官发育和生长);(E)从子代出生至离乳(分娩和哺乳、新生幼仔对宫外生活的适应性、离乳前发育和生长);(F)从子代离乳至性成熟(离乳后发育和生长、适应独立生活、青春期开始和达到完全性功能、对第二代的影响)。

在药物开发过程中, 通常采用经典的三段试验方案来评价大多数药物的生殖毒性: I段, 即生育力与早期胚胎发育试验阶段(A和B); II段, 即胚胎-胎仔发育试验阶段(C和D); III段, 即围产期发育试验阶段(C~F)。考虑到实用性、可获得性和背景历史数据, 生殖与发育毒性评价试验一般在啮齿类动物中进行, 通常选用的是大鼠、小鼠; 在特殊情况下, 如对生物制品进行评价时, 选用犬和非人灵长类动物。仅胚胎-胎仔发育毒性评价试验会采用第二种非啮齿类哺

乳动物(兔)进行评估。当传统动物不适合致畸性试验研究时,要根据具体情况,选择另一种可替代的动物进行试验。目前,小型猪作为生殖毒理研究的模式动物,应用不断增多,在胚胎-胎仔发育毒性评价试验中,可作为替代动物^[7]。2003年,美国国立卫生研究院将斑马鱼列为大鼠与小鼠之后的第三类模式动物,其也被广泛应用于药物的发育和胚胎毒性的研究^[8]。

1.1 生育力与早期胚胎发育毒性评价大鼠模型

大鼠由于遗传背景明确、操作方便,通常被推荐用于建立生育力与早期胚胎发育毒性评价动物模型。建模方法:成年大鼠于交配前至少2周开始给予受试物,雄性大鼠给药持续整个交配期;雌性大鼠给药持续至胚胎着床期[即妊娠第6天(gestation day 6, GD6),见阴栓和/或精子者为交配成功,并定义为妊娠第0天(GD0)],并于GD13~GD15处死雌性大鼠。试验期间,观察受试大鼠的外观(至少每天1次)、体重(至少每周2次)、摄食量(至少每周1次)、动情周期,并剖检所有亲代大鼠,保存大鼠的睾丸、附睾、卵巢、子宫,以及肉眼观察有异常的组织器官;对雄性大鼠进行精子计数和活力检查,对雌性大鼠统计黄体数、着床点数、活胎数和死胎数^[3,7]。

郑成成等^[9]选用SD大鼠进行了荆防颗粒浸膏的生育力与早期胚胎发育毒性试验,将雌、雄大鼠分别给药2周和4周后合笼交配,并在交配期间持续给药,交配成功的雌鼠继续给药至GD6。试验期间,每日观察动物的一般状态;雄鼠和未交配成功的雌鼠每周测定2次体重,妊娠雌鼠于GD0、GD3、GD6、GD9、GD12、GD15分别测定1次体重;雌、雄鼠交配前每周测定1次摄食量,妊娠雌鼠于GD0、GD6、GD12分别测定1次摄食量。给药结束后检查雄鼠的精子活动度、数量和形态,称量睾丸、附睾、前列腺和精囊的湿重,并计算脏器系数;妊娠雌鼠于GD15解剖检查妊娠情况和着床数(统计活胎、死胎、吸收胎数量),称量子宫连胎、子宫和卵巢的质量。另有研究者^[10]在评价柚皮苷对SD大鼠生育力与早期胚胎发育毒性的研究中,采用类似的建模方法和评价指标,只是在具体细节上稍有区别,如:妊娠雌鼠于GD0、GD2、GD4、GD6、GD8、GD10、GD12、GD14分别测定1次体重;于GD0、GD6、GD13分别测定1次摄食量。

1.2 胚胎-胎仔发育毒性评价动物模型

胚胎-胎仔发育毒性试验的目的是观察受试物对妊娠动物的胚胎及胎仔发育的不良影响,包括胎仔发育

和存活情况。通常用大鼠和家兔作为模型动物,在特殊情况下会选用小型猪。

1.2.1 胚胎-胎仔发育毒性评价大鼠模型

大鼠是胚胎-胎仔发育毒性试验最常用的啮齿类动物。建模方法:从GD6或GD7开始每天给予孕鼠受试物,持续至GD15~17,并于分娩前(GD20或21)处死,进行解剖后终点检查。试验期间,观察动物的外观(至少每天1次)、体重(至少每周2次)、摄食量(至少每周1次),并进行毒代动力学(toxicokinetics, TK)检测;剖宫后,保存肉眼观察的异常器官,进行黄体、活胎、死胎和吸收胎计数,计算着床数,测量胎仔体重和顶臀长,检查胎仔外观、软组织和骨骼,观察胎盘并称量^[3,7]。

Yue等^[11]选用SD大鼠进行了洛索洛芬(loxoprofen)的胚胎-胎仔发育毒性检测,GD6~15期间每天对孕鼠静脉注射洛索洛芬。试验期间,每天观察动物1~2次;于GD0、GD3、GD6、GD10、GD13、GD16和GD20分别测定1次孕鼠体重,于GD0、GD3、GD6、GD10、GD13、GD16和GD19分别测定1次摄食量;于GD20进行剖宫检查,称量子宫质量,统计黄体数、活胎数、死胎数和吸收胎数,观察胎仔性别和外观,测量顶臀长,检查胎仔内脏和骨骼。在伴随TK试验中,设毒代A组和B组,A组动物于GD6首次给药时进行采血,而B组动物于GD15采血,采血时间点为给药前以及给药后5 min、30 min、1 h、2 h、4 h、7 h和24 h。同生育力与早期胚胎发育毒性评价试验一样,不同的胚胎-胎仔发育毒性试验的具体方案也会略有不同。如Kuwata等^[12]设计DS-7309的大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验时,给药期为GD7~17,于GD0测定1次未妊娠雌性大鼠体重,于GD0、GD3、GD7、GD9、GD11、GD13、GD15、GD17和GD20分别测定1次孕鼠体重和摄食量;分别于GD7和GD17采血,采血点为给药前以及给药后30 min、2 h、7 h和24 h,用于TK试验。

1.2.2 胚胎-胎仔发育毒性评价兔模型

兔是胚胎-胎仔发育毒性试验最常用的非啮齿类动物。建模方法:从GD6或GD7开始每天给予孕兔受试物,持续至GD18~19,并于分娩前(GD28或GD29)处死孕兔,进行解剖后终点检查。试验期间,观察动物的外观(至少每天1次)、体重(至少每周2次)、摄食量(至少每周1次),并进行TK检测;剖宫后,保存肉眼观察到的异常器官,进行黄体、活胎、死胎和吸收胎计数,计算着床数,测量胎仔体重和顶臀长,

检查胎仔外观、软组织和骨骼, 观察胎盘并称重^[3,7]。

Kuwata等^[12]选用兔进行了DS-7309的胚胎-胎仔发育毒性试验, 于GD6~18给予DS-7309。试验期间, 每天观察动物1~2次; 于GD3、GD6、GD9、GD12、GD15、GD18、GD21、GD24和GD28分别测定1次体重, GD1~28每日测定摄食量; 于GD28进行剖宫检查, 统计活胎数和吸收胎数, 计算着床数, 称量子宫等。于GD6和GD18, 分别在给药前以及给药后30 min、2 h、7 h和24 h采血, 进行TK分析。

兔和大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验的建立方法和评价指标较为一致, 在进行胚胎-胎仔发育毒性伴随TK试验时, 一般设置卫星组, 参考受试物的药代动力学数据设计采血时间点, 多为GD6~8。Rao等^[13]在进行PTX-2的大鼠和兔胚胎-胎仔发育毒性试验时, 考虑到动物可能在妊娠和非妊娠状态下药代动力学不同, 除了分别在GD7、GD17/19(大鼠/兔)进行首次和末次采血外, 在GD13增加了一次中间采血, 采血点为给药前以及给药后5 min、1 h、4 h、8 h和24 h。大多数药物的胚胎-胎仔发育毒性试验是在大鼠和(或)家兔上进行, 这两个物种对发育毒性药物同样敏感, 但在相同的全身暴露水平下, 家兔对母体毒性药物略敏感。尽管如此, 在大鼠和家兔的发育毒性低不良反应水平上, 依然有68%的药物表现出2倍以上的差异^[14]。

1.2.3 胚胎-胎仔发育毒性评价小型猪模型

小型猪在生理学和解剖学等方面与人类有很多相似性, 对很多人类致畸物质表现出敏感性, 可作为胚胎-胎仔发育毒性评价的替代动物模型。建模方法: 于GD11~35期间给予孕猪(6~8月龄)受试物, 在GD28~35期间每天通过超声检查确定妊娠状态。试验期间, 每日观察动物临床体征, 并记录摄食量和体重的变化。于GD110~112进行剖宫产检查, 包括黄体、着床、死胎和活胎计数, 胎仔外观和内脏检查、性别确定等。为了缩短小型猪致畸试验的研究周期, 有研究者于GD60(妊娠中期)和GD110分别对哥廷根小型猪进行剖宫产检查, 发现中期剖宫产胎猪大小与终末处死家兔时胎兔的大小和体重相当; 通过生殖器官内部检查可确定胎猪性别, 骨骼和软骨双染法可检出骨骼改变, 结果表明小型猪中期剖宫产技术可行, 能缩减成本, 节省时间^[15-16]。

1.3 围产期发育毒性评价大鼠模型

围产期发育毒性试验的目的是检测母体动物从胚胎着床至离乳时给药对妊娠或哺乳期雌性动物与子代

发育的不良影响, 推荐使用大鼠作为动物模型。建模方法: 从胚胎着床(GD6或GD7)开始给药至子代(F1)出生后第20天(postnatal day 20, PND20), 即F1代离乳的时间点。孕鼠(F0)分娩后, 饲养其子代(F1)至离乳, 每窝至少保留雌、雄子代各1只; 子代(F1)至少10周龄时, 将同组内非同窝的雌、雄子代大鼠进行合笼交配, 检测其生殖能力。试验期间, 观察F0雌性大鼠的外观(至少每天1次)、测量体重(至少每周2次)和摄食量(至少每周1次, 直至哺乳中期); PND21进行剖检, 保存肉眼观察的异常器官, 计数子宫着床点; 观察F1子代大鼠离乳前后的存活、性别、体格发育情况, 测量体重, 检测性成熟程度和生育力, 以及感觉功能和反射行为^[3,7]。

Song等^[17]在研究新型冠状病毒疫苗ZF2001的围产期发育毒性时, 选用10~12周龄的SD大鼠, 分别于交配前7 d、GD6、GD20和PND20肌内注射ZF2001, 其间记录F0代雌性大鼠的一般状况、体重和摄食量, PND21进行剖宫产检查。在PND1~21期间, 每日观察F1代大鼠的临床体征、存活情况, 记录体重和生长发育指标; 并于PND4将F1代均窝至8只/窝, 雌雄各半; 于PND19进行自主神经活动测试, PND20进行改良的Irwin's行为评价; 在PND21处死每窝中的6只后进行大体检查; 于PND77将每窝中剩余的2只大鼠(一雌一雄)用于生育力检测, 记录雄鼠的交配天数, 计算交配率和交配后雌鼠受孕率, 并于GD15处死F1代雌性大鼠, 剖宫产检查, 记录黄体数、着床数、活胎数、死胎数和吸收胎数等。

1.4 胚胎发育毒性评价斑马鱼模型

斑马鱼作为一种水生脊椎动物, 具有每次产卵数量多、胚胎透明、发育时间短等特点。斑马鱼在受精后72 h内完成胚胎发育, 并在3个月内达到性成熟。斑马鱼与人类基因的同源性达70%, 具有87%的全基因组相似性, 且82%的人类疾病相关基因可以在斑马鱼中找到同源性。因此, 斑马鱼可以作为评价药物潜在发育毒性的模式动物^[18]。建模方法: 将雌、雄斑马鱼以一定比例隔离在产卵池中(使用玻璃隔板), 于次日清晨交尾产卵, 数分钟后(一般不超过30 min)收集胚胎。正常发育的胚胎在含待测受试物的培养皿中继续培养, 在不同时间节点观察性腺、产卵率、受精率、受精卵死亡率、孵化率和胚胎死亡率等指标^[18]。

Yu等^[20]在评价全氟辛酸对斑马鱼早期胚胎发育的毒性研究中, 将4月龄AB野生型斑马鱼置于产卵池中, 受精2 h后选用正常的胚胎进行试验, 在受精后

12 h、24 h和72 h分别用显微镜观察胚胎存活率,在受精后72 h测定胚胎孵化率、体长和畸形率,在受精后120 h测量斑马鱼幼体的运动情况。

综上,大鼠、兔、小型猪和斑马鱼是目前生殖与发育毒性评价试验汇总常用的模型动物,各自的优缺点^[7,21]汇总见表1。

表1 生殖与发育毒性试验常用模型动物的比较

Table 1 Comparisons of animal models for reproductive and developmental toxicity tests

模型动物 Modeling animals	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
大鼠 Rats	生物学资料全面;妊娠短,生育力强;自发畸形率低;价格低廉,易获得	对性激素敏感,不适用于多巴胺受体激动剂和非固醇类抗炎药物的研究;对外源性蛋白的应用受限;药理活性有限或无活性
兔 Rabbits	同大鼠;且生殖道与人类最相似	对某些抗生素和消化道紊乱有易感性,其临床症状难以解释
小型猪 Minipigs	性成熟时间较其他非啮齿类动物短;器官发生期短(妊娠第11~35天);与非人灵长类动物相比,多产,精子学资料与人类相似	胎盘缺乏转移大分子能力;妊娠长(114 d);受试物用量大,成本高;尚无用于研究的商业试剂盒
斑马鱼 Zebrafish	生殖周期短;每次产卵数量多;胚胎透明易观察,胎仔发育迅速;实验成本低	生殖系统基础资料相对缺乏;体外受精,与人类繁殖方式差异大

2 卵巢毒性评价动物模型

人类胎儿卵巢中生殖细胞的发育可形成有限的原始卵泡池,而卵泡池是女性成年后生育能力和生殖寿命的最终决定因素。在胎儿卵巢发育过程中,如果亲代暴露在毒性物质中,可能会引起子代生殖表型的变化,包括卵巢重量降低、原始卵泡数量减少、雌激素水平改变、生殖功能下降等,也可能增加成年后卵巢相关疾病的易感性^[22]。雌性子代的生殖表型变化(包括I、II、III段)已经在第一节中具体描述,本节主要讨论卵巢相关疾病模型。卵巢早衰又称为早发性卵巢功能不全,是指女性40岁之前出现原发性或继发性闭经,月经稀发或闭经至少4个月,随机2次检查(间隔>4周)的血清卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)≥25 IU/L,并伴有雌二醇(estradiol, E2)和抗米勒管激素(anti-müllerian hormone, AMH)水平降低的内分泌疾病。卵巢早衰的病因复杂且发病机制尚不明确,而理想可靠的动物模型是开展卵巢早衰病理机制和干预技术研究必不可少的物质基础。卵巢早衰模型常用动物为大鼠和小鼠,建立方法一般包括放化疗诱导、自身免疫、卵巢切除、特定基因敲除和超促排卵等^[23]。卵巢早衰患者在临床上表现为卵泡丢失、卵泡闭锁增多、包膜增厚、间质纤维化的组织病理学改变,以及低雌激素和高促性腺激素的内分泌表现^[24]。大鼠、小鼠的动情周期可以反映卵巢功能,是评价卵巢早衰大鼠、小鼠模型的重要指标。如果同时出现动情周期紊乱、低雌激素和高促卵泡激素水平、

卵巢组织中各级卵泡变少而闭锁卵泡增多、卵巢颗粒细胞凋亡率增高等现象,且以上各项指标与对照组比较具有显著性差异,即可判定为造模成功。

2.1 化学药物诱导的卵巢早衰模型

环磷酰胺、顺铂和雷公藤多苷等化学药物可以通过促进卵泡闭锁,加速卵泡耗竭,从而引发卵巢早衰。Shen等^[25]选用C57BL/6小鼠,每天腹腔注射50 mg/kg环磷酰胺,连续14 d,小鼠出现动情周期紊乱、血清FSH水平升高、E2和AMH水平显著降低、卵巢组织中各阶段生长卵泡数目减少、闭锁卵泡数增多等典型的卵巢早衰表型。董若曦等^[26]给予Wistar大鼠腹腔注射4 mg/kg的顺铂,间隔1周再次注射,结果大鼠出现动情周期紊乱、体重明显下降、AMH水平降低和卵巢组织中各级卵泡数量减少等卵巢早衰表型。另有文献报告,连续每天灌胃40 mg/kg和50 mg/kg雷公藤多甙14 d,均能引起Wistar大鼠(或SD大鼠)动情周期紊乱、血清E2水平显著降低、子宫内膜厚度和卵巢面积显著减少、闭锁卵泡数明显增多等卵巢早衰特征^[27]。目前,药物诱导卵巢早衰模型报道较多,多选择大鼠、小鼠或家兔,单次或者连续给药后均能建立较为理想的卵巢早衰模型(其建模方法汇总见表2),可用于相关药物的药理毒理学评价。

2.2 放射疗法诱导卵巢早衰模型

卵巢对射线十分敏感,其中原始卵泡受损最明显。电离辐射会导致细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高,诱发炎症反应,从而使卵巢内代谢和能量调节发生改变,引起颗粒细胞与卵母

表2 药物诱导卵巢早衰动物模型的建立方法比较

Table 2 Comparisons of modeling methods for drug-induced premature ovarian failure animals

诱导药物 Inducing drugs	所用动物 Animals	给药方式 Administration	给药剂量和周期 Dose and time	评价指标 Evaluation indicators
环磷酰胺 Cyclophosphamide	家兔	腹腔注射	50 mg/kg 连续 2 d	血清 FSH、E2 和 AMH 水平, 卵巢组织病理学表现
	2~3 月龄大鼠	腹腔注射	20 mg/kg, 连续 20 d	动情周期, 血清 FSH、E2 和 AMH
	6~8 周龄 C57BL/6 小鼠	腹腔注射	50 mg/kg, 连续 14 d; 100 mg/kg, 连续 10 d	水平, 卵巢组织病理学表现
顺铂 Cisplatin	Wistar 大鼠	腹腔注射	4 mg/kg, 第一次注射后间隔一周再注射	动情周期, 血清 FSH、E2 和 AMH
	SD 大鼠	腹腔注射	6 mg/kg, 第一次注射后间隔一周再注射	水平, 卵巢组织病理学表现
	C57BL/6 小鼠	腹腔注射	50 mg/kg, 连续 7 d	
雷公藤多苷片 Tripterygium glycosides tablet	Wistar 大鼠	灌胃	50 mg/kg, 连续 14 d	动情周期, 血清 FSH、E2 和 AMH
	7~8 周龄 SD 鼠		400 μ g/kg, 连续 60 d	水平, 卵巢组织病理学表现
	8 周龄 SD 大鼠		50 mg/kg, 连续 14 d	
	12 周龄 SD 大鼠		40 mg/kg, 连续 70 d	

注: FSH, 卵泡刺激素; E2, 雌二醇; AMH, 抗苗勒氏管激素。

Note: FSH, follicle-stimulating hormone; E2, estradiol; AMH, anti-Müllerian hormone.

细胞损伤、老化及质量下降, 卵巢储备功能降低, 诱导卵巢早衰的发生^[27]。通过暴露在不同剂量的 X 射线或 γ 射线可建立卵巢早衰模型, 操作简单, 耗时短, 效果显著。Tan 等^[28] 利用 X 射线照射仪, 以 4 Gy 的辐射剂量对 C57BL/6J 小鼠进行单次全身照射, 每周连续 6 d, 持续 2 周。照射期间, 小鼠出现动情周期紊乱, 表现为持续的动情后期和动情间期、短暂的动情期。解剖后发现卵巢重量、血清 AMH 水平和各级卵泡数的显著下降, 成功建立了小鼠卵巢早衰模型。孙萍等^[29] 用 0.5 Gy 和 0.7 Gy 钴⁶⁰ γ 射线照射大鼠后发现, 随着射线剂量的增加, 卵巢组织中闭锁卵泡数量逐渐增多, 成熟卵泡和次级卵泡数逐渐减少, 颗粒细胞层变薄。因此, 大剂量的钴⁶⁰ γ 射线可以用来建立卵巢早衰大鼠模型。

2.3 自身免疫性卵巢早衰模型

研究显示, 10%~30% 的卵巢早衰与自身免疫性疾病相关。因此, 通过切除新生动物胸腺或利用透明带 3 多肽 (zona pellucida glycoprotein 3, ZP-3) 作为抗原对雌性动物进行免疫, 可构建自身免疫性卵巢早衰模型。将新生动物的胸腺切除, 会导致自身免疫性 CD4⁺ T 细胞缺少, 引起急性免疫性卵巢炎。用 ZP-3 免疫后, 同样可以引起卵巢明显的炎症改变。大量卵泡受到淋巴细胞的浸润、破坏后, 无法继续生长为成熟卵泡, 从而出现卵巢萎缩。涂晓娟等^[30] 选用新生 3 d 的 BALB/c 小鼠, 无菌条件下打开胸腔, 取出两片白色胸腺后立即缝合, 小鼠会出现血清 FSH 和黄体生成素

(luteinizing hormone, LH) 水平显著升高、淋巴细胞浸润、纤维组织增生、生长卵泡数明显减少、闭锁卵泡数目明显增多等表型, 与人类自身免疫性卵巢早衰的典型症状高度一致。Li 等^[31] 利用完全弗氏佐剂, 以 ZP-3 多肽 (75 μ g/kg) 为免疫原, 通过腹腔注射的方式, 对 7~8 周龄的 BALB/c 雌鼠进行第一次免疫, 14 d 后再进行一次加强免疫, 并在 42 d 后处死小鼠, 发现小鼠出现典型的卵巢早衰表型, 包括动情周期紊乱、血清 FSH 水平上升、血清 AMH 和 E2 水平显著降低、各级卵泡数量明显减少、大量卵泡闭锁等。

2.4 卵巢切除型卵巢早衰模型

卵巢切除模型是研究雌激素缺乏和卵巢功能下降的经典模型, 可以模拟临床上卵巢手术损伤所致的卵巢早衰, 以及围绝经期妇女的临床症状和相关病理学改变。建模方法: 小鼠麻醉后, 完全暴露卵巢, 用手术缝合线结扎卵巢两侧血管, 切除双侧全部卵巢组织, 并以丝线将残端结扎, 逐层缝合关闭腹腔^[32]。周宇等^[33] 通过手术方式切除小鼠的双侧卵巢后, 观察到小鼠的雌激素水平直线下降, 动情周期停滞, 血清 FSH 水平显著升高, 其他的生理病理改变也符合卵巢早衰的临床表现。卵巢切除法建模对小鼠的一般生理情况影响较小, 是研究卵巢早衰较为理想的动物模型。

2.5 基因敲除型卵巢早衰模型

染色体异常和基因突变都可以引起卵巢早衰的发生。目前, 基因敲除的卵巢早衰模型已较为成熟, 该模型有助于人们了解某特定基因对卵巢早衰的作用。

该模型一般选用小鼠，敲除特定基因后，小鼠血清FSH和LH水平明显增高，卵巢体积减小，原始卵泡数减少，闭锁卵泡数增多，符合卵巢早衰特征。目前已报告的卵巢早衰相关基因包括：磷酸酯酶与张力蛋白同源物基因 (phosphatase and tensin homolog, *PTEN*)、生长分化因子9基因 (growth differentiation factor 9, *GDF9*)、脆性X智力低下1基因 (fragile X mental retardation 1, *FMR1*)、B淋巴细胞瘤-2基因 (B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*) 等。其中，叉头框转录因子2基因 (forkhead transcription factor gene 2, *FOXL2*) 是目前研究最多的卵巢早衰相关基因^[34]，在卵泡细胞发育和成熟过程中发挥重要作用。Emori等^[35]发现敲除雌性小鼠的*FOXL2*基因后，小鼠颗粒细胞停止生长，随后卵母细胞死亡，大量卵泡闭锁，生育能力降低。随着基因编辑技术的广泛应用，尤其是常间回文重复序列丛集 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其关联蛋白 (CRISPR-associated proteins, Cas) 技术，为新的基因突变型卵巢早衰动物模型的建立提供了良好的技术支持。

表3 常见的卵巢早衰动物模型比较

Table 3 Comparisons of common animal models of premature ovarian failure

建模方式 Modeling methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
化学药物诱导 Chemical drugs induction	造模方法简单易行,周期短,成本低,模型稳定,应用最广	卵巢功能有自然恢复的可能性,不适合进行长期的探索性研究
放射疗法诱导 Radiotherapy induction	成功率高,可重复性强,周期短,能模拟临床放疗损伤导致的卵巢早衰	不易操作,对实验者的健康会产生潜在危害;在干预过程中对其他器官也会产生损伤,影响实验结果
自身免疫 Autoimmunity	模拟程度好,适用于免疫学相关的卵巢早衰生物医学研究	造模方法复杂,成功率低,周期长
卵巢切除 Ovariectomy	模拟程度好,对动物其他组织的损伤小	永久性的卵巢功能丢失,无法应用于卵巢早衰临床研究
基因敲除 Gene knockout	能明确某一特定基因对卵巢早衰的作用	成本高,对实验技术要求高,存在外源性基因表达不稳定可能
超促排卵 Superovulation	有效模拟自然衰老卵巢特征,适合卵巢衰老绝经领域研究	应用相对较少,缺少背景资料

3 睾丸毒性评价动物模型

睾丸在精子发生和分泌激素过程中发挥着至关重要的作用。睾丸组织中生精小管和间质的形态与功能发育会形成高度协调的微环境，保证了睾丸的正常发育和精子生成^[38]。药物和环境类激素污染物等许多外源性物质，会引起睾丸组织损害，导致精子发生障碍，最终引起男性不育。因此，在进行雄性生殖系统毒性评价时，睾丸毒性评价显得尤其重要。同卵巢毒性一样，睾

2.6 超促排卵型卵巢早衰模型

对于啮齿类动物，给予超排卵剂量的孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 反复诱导超排卵，可导致卵泡闭锁增多，血清雄激素和E2水平均下降。建模方法^[36]：7~8周龄的C57BL/6雌性小鼠腹腔注射5U的PMSG，48h后腹腔注射5U的HCG，19h后腹腔注射25U的前列腺素F2 α (prostaglandin F2 α , PGF2 α)，完成一个促排卵周期；12h后进行下一个周期的注射，通过连续10次以上促排卵周期后，即可建立卵巢早衰小鼠模型。Nie等^[37]通过上述方法对C57BL/6小鼠进行5次、10次和15次的连续超排卵，结果发现超过10次超排卵后模型小鼠的卵巢指数降低、原始卵泡数减少、血清E2和AMH水平下降，而FSH水平上升、颗粒细胞凋亡显著增加，即出现卵巢早衰表型。

卵巢早衰动物模型的建立方法多样，各自的优缺点汇总见表3。科研人员可根据每种模型的特点和实验需求选择合适的建模方法。

丸介导的子代生殖表型的变化已经在第一节中详细描述，本节主要讨论受试物对睾丸的直接毒性作用。该类睾丸毒性动物模型的建立方法与药物重复给药毒性研究类似，即根据受试物特点，选择合适的动物和给药方式，给予一定周期的暴露，动物安乐死后，对相关指标进行检测。评价睾丸毒性的实验动物一般选择大鼠、小鼠。组织学检查被认为是评价睾丸损伤最敏感的指标。若睾丸萎缩，生精小管退化或坏死，同时精子质量和活力显著性下降，即可判定为造模成功^[1]。

刘丽莉等^[39]通过腹腔注射的方式给予昆明小鼠每天50 mg/kg的环磷酰胺,每周1次,连续4周,小鼠出现睾丸指数显著降低、睾丸曲细精管结构不完整、生精细胞脱落后呈现大面积的空泡、精子存活率降低而畸形率升高、血清睾酮水平降低等表型。Lin等^[40]以灌胃的方式每天给予SD大鼠40 mg/kg的雷公藤多苷,连续4周,可以降低精子活力,引起生精小管损伤,建立了具有生殖毒性的弱精子症大鼠模型。在雷公藤多苷建模后,大鼠表现出体重减轻和发育迟缓,与中医中由脾虚肾虚引起男性不育的症状一致。

除药物外,环境因素对睾丸的毒性作用也不容小觑,并且随着研究的深入,不断有新的环境污染物被发现可能导致睾丸损害。内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)是一种干扰体内天然激素合成、分泌、转运、结合、作用或消除的外源性物质,可损害生殖系统和内分泌系统^[4]。双酚A、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]、重金属、丙烯酰胺是常见的具有睾丸毒性的EDCs,可以用于建立睾丸毒性模型。Iram等^[41]以灌胃的方式给予小鼠每天500 mg/kg的DEHP,连续4周,生精细胞和支持细胞高度扭曲,生精小管萎缩,睾丸重量、生精小管管腔平均横截面积、生精细胞数和间质细胞数均减少。Zheng等^[42]在Wistar大鼠饲喂饮水中分别加入梯度浓度的醋酸铅,根据小鼠的饮食习惯,在每晚9时更换新的醋酸铅饮水,并在第2天上午9时再次更换,连续56 d。结果显示,随着醋酸铅剂量的增加,死精子数量和畸形精子数量增加,精子总数和活力下降,睾丸细胞凋亡数量增加,血清睾酮浓度下降,提示醋酸铅致大鼠睾丸毒性模型建立成功。

4 总结

随着2017年中国加入ICH,以及2020年生殖与发育毒性相关指导原则[ICH.S5(R3)]的更新,进行生殖与发育毒性试验时通常选择研究背景资料丰富、与人的种属接近、容易获取且方便操作的动物开展试验,常规实验动物为大鼠、小鼠和家兔。考虑到动物对受试物致畸敏感性的差异,在开展胚胎-胎仔发育毒性试验时,通常选择两种动物,一种是啮齿类动物如大鼠,一种是非啮齿类动物如家兔,以充分暴露受试物的生殖毒性^[7]。小鼠由于易惊、胎仔小、群体畸形现象明显,通常不作为首选动物;大鼠通过催乳素维持早期妊娠,不适合用于评价多巴胺类兴奋剂或降低催乳素水平药物的生殖毒性试验;家兔对消化道功能

紊乱药物和抗生素敏感,其临床表现难以解释。在这些特殊情况下,可以考虑使用替代动物,如小型猪。目前在药物毒理学试验中已有几十种不同品种品系的小型猪得到应用,但国内有关小型猪生殖毒性试验的研究资料还相对有限,在应用上还存在局限性。非人灵长类动物应视为非常规的实验种属,常用于评价仅在灵长类中具有药理学活性的生物制品对胚胎-胎仔发育和出生后早期发育的影响。近年来,使用非人灵长类动物进行生物制品发育毒性测试的比例有所下降(2020—2022年占生物制品许可申请的22%,而2002—2015年为62%),现在更多的生物制品在啮齿类动物中进行测试(2020—2021年占生物制品许可申请的37%)^[14]。在进行动物试验时,还要充分考虑动物福利,遵守“3R”原则。斑马鱼的应用减少了哺乳动物的使用量,而且斑马鱼获取方便,实验周期短,实验成本低,已在部分早期发育毒性研究中替代大鼠和兔。

卵巢早衰动物模型的建立方法多样,每种方法均有独特性和局限性。目前,肿瘤和自身免疫性疾病在临床上发病率高,且社会关注度高,国内外研究化疗药物和自身免疫性疾病导致的卵巢早衰模型最多,其中环磷酰胺、顺铂和ZP-3最具代表性,是公认的卵巢早衰发病机制和治疗研究的常用动物模型。睾丸是许多物质产生生殖毒性的靶器官,而且毒性作用的分子机制多样。在实验研究中,主要依据其发病原因的不同而采用不同的病理方法来进行模型制备,其中化疗药物和内分泌干扰物造模应用较为广泛。

需要强调,研究人类生殖毒性并没有单一的理想动物模型,应根据受试物的特点、与人体的相互作用以及实验动物的特点进行综合考量,选择最适合的动物模型,在一定条件下也可以采用多个动物模型进行评价。尽管动物模型因其局限性不能完全模拟人类疾病,但不断发展优化的动物模型为生殖系统疾病发生机制和治疗靶点的探索提供了更多可能。同时,生殖毒理学动物模型作为评价生殖系统疾病的重要工具,在相关药物开发、诊断方法筛选方面起着不可替代的作用,对于维护生殖健康,提升国家人口安全具有重要意义。

[作者贡献 Author Contribution]

黄冬妍负责查找文献、撰写初稿及修改;
吴建辉负责论文审核和写作指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献References]

- [1] 周植星, 陈美灵, 张晓东, 等. 男性生殖系统用药生殖毒性评价的监管要求和关注要点[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(21): 3183-3192. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.21.030.
ZHOU Z X, CHEN M L, ZHANG X D, et al. The regulatory requirements and points to consider for the developmental and reproductive toxicity assessment for male reproductive system medicines[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(21):3183-3192. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.21.030.
- [2] KIM J H, SCIALLI A R. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease[J]. Toxicol Sci, 2011, 122(1):1-6. DOI: 10.1093/toxsci/kfr088.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物生殖毒性研究技术指导原则[EB/OL]. (2006-12-19)[2024-02-01]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzldCODE=8eab7a099135eb60cebb678adfec6587>.
National Medical Products Administration Drug Evaluation Center. The Technical guidelines for research on reproductive toxicity of drugs[EB/OL]. (2006-12-19) [2024-02-01]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzldCODE=8eab7a099135eb60cebb678adfec6587>.
- [4] 周萍, 吴建辉. 常见内分泌干扰物对人类生殖功能损伤及其药物干预的研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2022, 42(9):956-961. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210307-00106.
ZHOU P, WU J H. Research progress on the damage of human reproductive function caused by common endocrine disruptors and its drug intervention[J]. Chin J Reprod Contracept, 2022, 42(9):956-961. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210307-00106.
- [5] WANG K Y, HUANG D Y, ZHOU P, et al. Bisphenol A exposure triggers the malignant transformation of prostatic hyperplasia in beagle dogs via cfa-miR-204/KRAS axis[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 235: 113430. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113430.
- [6] ZHOU P, WU S S, HUANG D Y, et al. Oral exposure to DEHP may stimulate prostatic hyperplasia associated with upregulation of COX-2 and L-PGDS expressions in male adult rats[J]. Reprod Toxicol, 2022, 112: 160-170. DOI: 10.1016/j.reprotox.2022.07.008.
- [7] Food and Drug Administration. S5(R3): Detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals[EB/OL]. (2020-02-18) [2024-02-01]. <https://www.fda.gov/media/148475/download>.
- [8] 刘昱甫. 拟胚体和斑马鱼模型评价五种食药两用物质发育毒性[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2023. DOI: 10.27180/d.cnki.gjxzc.2023.000568.
LIU Y F. Embryoid bodies and zebrafish model to evaluate developmental toxicity of five kinds of drug dual-use materials[D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2023. DOI: 10.27180/d.cnki.gjxzc.2023.000568.
- [9] 郑成成, 王恩力, 徐百卉, 等. 荆防颗粒浸膏对大鼠生育力与早期胚胎发育毒性研究[J]. 中国药物警戒, 2022, 19(5):505-509. DOI: 10.19803/j.1672-8629.2022.05.07.
ZHENG C C, WANG E L, XU B H, et al. Toxicity of the reproductive and early embryonic development of Jingfang granule extract in rats[J]. Chin J Pharmacovigil, 2022, 19(5): 505-509. DOI: 10.19803/j.1672-8629.2022.05.07.
- [10] WANG Y G, WU H, CHEN P, et al. Fertility and early embryonic development toxicity assessment of naringin in Sprague-Dawley rats[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2021, 123: 104938. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.104938.
- [11] YUE P, ZHAO X X, LU F, et al. Embryo-fetal developmental toxicity and toxicokinetics of loxoprofen tromethamine intravenously administered to pregnant rats[J]. Birth Defects Res, 2023, 115(2):240-250. DOI: 10.1002/bdr2.2116.
- [12] KUWATA C, MATSUOKA T, OHSHIMA Y, et al. Effects of glucokinase activator, DS-7309, on embryo-fetal developmental toxicity in rats and rabbits[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2022, 129:105119. DOI: 10.1016/j.yrtph.2022.105119.
- [13] RAO G K, SANTAGOSTINO S F, WONG L, et al. Repeat-dose and embryo-fetal developmental toxicity of zinpentraxin Alfa [J]. Reprod Toxicol, 2024, 123: 108526. DOI: 10.1016/j.reprotox.2023.108526.
- [14] BARROW P. Review of embryo-fetal developmental toxicity studies performed for pharmaceuticals approved by FDA in 2020 and 2021[J]. Reprod Toxicol, 2022, 112: 100-108. DOI: 10.1016/j.reprotox.2022.06.012.
- [15] LUNNEY J K, VAN GOOR A, WALKER K E, et al. Importance of the pig as a human biomedical model[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(621): eabd5758. DOI: 10.1126/scitranslmed.abd5758.
- [16] 廖生钱. 小型猪在生殖毒性实验中的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2020(9): 28-29. DOI: 10.3969/J. ISSN. 1671-6027.2020.09.015.
LIAO S Q. Research progress of miniature pigs in reproductive toxicity experiment[J]. Chin J Anim Husb Vet Med, 2020(9): 28-29. DOI: 10.3969/J. ISSN. 1671-6027.2020.09.015.
- [17] SONG Y S, SHAO J J, SHE G B, et al. Developmental and reproductive toxicity of a recombinant protein subunit COVID-19 vaccine (ZF2001) in rats[J]. NPJ Vaccines, 2023, 8(1): 74. DOI: 10.1038/s41541-023-00673-3.
- [18] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503. DOI: 10.1038/nature12111.
- [19] 马雪莹. 基于斑马鱼模型研究吡啶磺胺类的发育毒性与致毒机制[D]. 厦门: 华侨大学, 2022. DOI:10.27155/d.cnki.ghqiu.2022.000728.
MA X Y. Study on developmental toxicity and toxicity mechanism of indazolsulfamide based on zebrafish model[D]. Xiamen: Huaqiao University, 2022. DOI:10.27155/d.cnki.ghqiu.2022.000728.
- [20] YU J, CHENG W Q, JIA M, et al. Toxicity of perfluorooctanoic acid on zebrafish early embryonic development determined by single-cell RNA sequencing[J]. J Hazard Mater, 2022, 427: 127888. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127888.
- [21] 张元慧, 蒋建东, 孔维佳. 非啮齿类动物在生殖毒性试验中的应用进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11):111-115. DOI: 10.3969/j.jissn.1671-7856.2019.11.017.
ZHANG Y H, JIANG J D, KONG W J. Research progress with non-rodent species in reproductive toxicity studies[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11):111-115. DOI: 10.3969/j.jissn.1671-7856.2019.11.017.
- [22] 杨威, 杨明俊, 王玉柱, 等. 大气污染细颗粒物对女(雌)性生殖健康影响的研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2019(7):602-607. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2019.07.016.
YANG W, YANG M J, WANG Y Z, et al. Impact of atmospheric

- fine particles on female reproductive health[J]. Chin J Reprod Contracept, 2019(7): 602-607. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2019.07.016.
- [23] GHAREMANI-NASAB M, GHANBARI E, JAHANBANI Y, et al. Premature ovarian failure and tissue engineering[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5):4217-4226. DOI: 10.1002/jcp.29376.
- [24] 李虹璇, 李思慧, 冯嘉欣, 等. 卵巢早衰动物模型构建方法及比较研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(6):505-514. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.056.
- LI H X, LI S H, FENG J X, et al. Construction methods and comparative research progress of premature ovarian failure animal models[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(6):505-514. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.056.
- [25] SHEN J, CAO D, SUN J L. Ability of human umbilical cord mesenchymal stem cells to repair chemotherapy-induced premature ovarian failure[J]. World J Stem Cells, 2020, 12(4): 277-287. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i4.277.
- [26] 董若曦, 朱小丹, 樊伯珍, 等. 不同剂量顺铂腹腔注射建立大鼠化疗损伤性卵巢早衰模型[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 104-109. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.003.
- DONG R X, ZHU X D, FAN B Z, et al. Intraperitoneal injection in different dosages of cisplatin to establish a rat model of premature ovarian failure induced by chemotherapy[J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(2):104-109. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.003.
- [27] HUANG Y Q, HU C, YE H F, et al. Inflamm-aging: a new mechanism affecting premature ovarian insufficiency[J]. J Immunol Res, 2019, 2019:8069898. DOI: 10.1155/2019/8069898.
- [28] TAN R R, HE Y H, ZHANG S Y, et al. Effect of transcutaneous electrical acupoint stimulation on protecting against radiotherapy-induced ovarian damage in mice[J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1):65. DOI: 10.1186/s13048-019-0541-1.
- [29] 孙萍, 包秀芳. 不同剂量钴⁶⁰射线致大鼠卵巢早衰的实验研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(47):1. DOI: CNKI: SUN: WMIA.0.2017-47-038.
- SUN P, BAO X F. Experimental study on premature ovarian failure induced by different doses of cobalt⁶⁰ gamma rays in rats [J]. World Latest Medical Information, 2017, 17(47):1. DOI: CNKI: SUN: WMIA.0.2017-47-038.
- [30] 涂晓娟. 免疫性卵巢早衰中Treg调控B细胞功能的初步研究[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2020. DOI: 10.27001/d.cnki.gtjyu.2019.000218.
- TU X J. Autoimmune ovarian premature aging Treg regulation B cell function in the preliminary study[D]. Chongqing: The Chinese people's liberation army (PLA) army medical university, 2020. DOI: 10.27001/, nkidc. Gtjyu. 2019. 000218.
- [31] LI X R, XIE J X, WANG Q R, et al. MiR-21 and pellino-1 expression profiling in autoimmune premature ovarian insufficiency[J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 3582648. DOI: 10.1155/2020/3582648.
- [32] 潘先均, 张琪娟, 孙荣华, 等. 小鼠卵巢切除术中戊巴比妥钠麻醉使用及围手术期改良[J]. 医学信息, 2014, 27(1):45-46. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2014.01.058.
- PAN X J, ZHANG Q J, SUN R H, et al. The use of pentobarbital sodium and improvement of ovariectomy during the perioperative period[J]. J Med Inf, 2014, 27(1):45-46. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2014.01.058.
- [33] 周宇, 贾玉玲, 严大为, 等. 两种小鼠卵巢早衰模型的比较[J]. 上海医学, 2018, 41(8): 489-494. DOI: CNKI: SUN: SHYX. 0.2018-08-012.
- ZHOU Y, JIA Y L, YAN D W, et al. Comparison of two kinds of premature ovarian failure model in mice[J]. Shanghai Med J, 2018, 41(8):489-494. DOI: CNKI: SUN: SHYX. 0.2018-08-012.
- [34] VENTURELLA R, DE VIVO V, CARLEA A, et al. The genetics of non-syndromic primary ovarian insufficiency: a systematic review[J]. Int J Fertil Steril, 2019, 13(3):161-168. DOI: 10.22074/ijfs.2019.5599.
- [35] EMORI C, ITO H, FUJII W, et al. Oocytes suppress FOXL2 expression in cumulus cells in mice[J]. Biol Reprod, 2020, 103(1):85-93. DOI: 10.1093/biolre/iaaa054.
- [36] 靳琦, 尹平, 郑慧敏. 早发性卵巢功能不全动物模型研究概述[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1):305-308.
- JIN Q, YIN P, ZHENG H M. Summary of animal models of premature ovarian insufficiency[J]. Chin J Trad Chin Med Pharm, 2022, 37(1):305-308.
- [37] NIE X W, DAI Y J, ZHENG Y, et al. Establishment of a mouse model of premature ovarian failure using consecutive superovulation[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(5):2341-2358. DOI: 10.1159/000495895.
- [38] 张博航, 祁晓萱, 袁艳. 睾丸类器官在体外精子发生中的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(4):770-781. DOI: 10.12211/2096-8280.2023-095.
- ZHANG B H, QI X X, YUAN Y. Advancements in testicular organoids for *in vitro* spermatogenesis[J]. Synthetic Biol J, 2024, 5(4):770-781. DOI: 10.12211/2096-8280.2023-095.
- [39] 刘丽莉, 刘昌平, 孙桃桃, 等. 锁阳水提液对环磷酰胺所致小鼠睾丸损伤的影响[J]. 淮北师范大学学报(自然科学版), 2024, 45(1): 56-61. DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2024.01.010.
- LIU L L, LIU C P, SUN T T, et al. Effect of *Cynomorium songaricum* water extract on testicular injury induced by cyclophosphamide in mice[J]. J Huaibei Norm Univ Nat Sci, 2024, 45(1):56-61. DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2024.01.010.
- [40] LIN X Y, LI Q R, LI H Y, et al. Jujing Zhuyu decoction inhibits apoptosis in rats with asthenozoospermia by regulating the mitochondrial apoptosis pathway[J]. Andrologia, 2022, 54(11): e14632. DOI: 10.1111/and.14632.
- [41] IRAM F, BATOOL S, SHAMEEM S, et al. Effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract against di-(2-ethylhexyl) phthalate induced reproductive toxicity in male mice[J]. Andrologia, 2022, 54(8): e14480. DOI: 10.1111/and.14480.
- [42] ZHENG X Y, GUO C M, LV Z J, et al. From animal to cell model: pyroptosis targeted-fibrosis is a novel mechanism of lead-induced testicular toxicity[J]. Food Chem Toxicol, 2023, 178:113886. DOI: 10.1016/j.fct.2023.113886.
- (收稿日期: 2024-02-23 修回日期: 2024-07-28)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 姜怡欣)

[引用本文]

黄冬妍, 吴建辉. 生殖毒理学研究动物模型的建立方法及应用评价[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 550-559. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.028.

HUANG D Y, WU J H. Establishment methods and application evaluation of animal models in reproductive toxicology research [J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(5): 550-559. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.028.

基于行政许可的四川省实验动物管理现状与对策分析

陈兵^{1,2}, 邹弈星^{1,2}, 王敬东^{1,2}

(1. 四川省农村科技发展中心, 成都 610041; 2. 四川省实验动物管理委员会办公室, 成都 610041)

[摘要] 实验动物是支撑科技进步与创新不可或缺的战略资源。同时, 实验动物生物安全是国家公共卫生安全的重要组成部分, 而实验动物生产与使用许可是法定的行政许可事项。本文首先梳理了四川省实验动物生产与使用许可证及持证单位的数量、类型及行业分布, 实验动物设施面积和前10位单位情况, 实验动物生产种类、数量及部分单位的实验动物生产能力, 实验动物使用种类、数量及前10位的单位情况等管理和发展现状; 然后探讨认为四川省实验动物行业的发展优势是产业规模领先西部、区域影响力不断增强和综合效益不断显现, 同时存在的主要问题是实验动物生产能力不能较好地满足实验动物使用需求、实验动物技术创新水平有待提升、实验动物安全管理任重道远等; 最后提出相应的对策建议, 包括积极支持实验动物生产提质增效、建立稳定的实验动物科技创新支持机制、高度重视实验动物安全管理等。本文可为进一步提高四川省及其他省市的实验动物管理水平和行业发展动能提供参考。

[关键词] 实验动物; 行政许可; 四川省; 发展现状; 管理对策

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0560-07



Analysis on Current Status and Countermeasures for Laboratory Animal Management in Sichuan Province Based on Administrative Licensing

CHEN Bing^{1,2}, ZOU Yixing^{1,2}, WANG Jingdong^{1,2}

(1. Sichuan Rural Science and Technology Development Center, Chengdu 610041, China; 2. Office of Sichuan Laboratory Animal Management Committee, Chengdu 610041, China)

Correspondence to: WANG Jingdong (ORCID: 0009-0007-7517-491X), E-mail: ncxwjd@126.com

[ABSTRACT] Laboratory animals are indispensable strategic resources that support technological progress and innovation. At the same time, the biosafety of laboratory animals is an important component of national public health security. The production and use of laboratory animals require statutory administrative licensing. This article first summarizes the current status of management and development in Sichuan Province by reviewing the number, types, and industry distribution of license-holding facilities, the area of facilities and the status of top ten largest facilities by area, the types and quantities of laboratory animals produced, and the production capacity of certain facilities, as well as the types and quantities of laboratory animals used and the status of the top ten facilities by animal quantity. Then, it discusses the development advantages of the laboratory animal industry in Sichuan Province, including its leading industrial scale in the western region, increasing regional influence, and emerging comprehensive benefits. However, there are significant issues such as the inability of laboratory animal production to adequately meet the demand, the need to improve the level of technological innovation, and the challenges of ensuring animal safety management. Finally, corresponding countermeasures suggestions are proposed, including actively supporting the improvement of quality and efficiency of laboratory animal

[基金项目] 四川省科技计划项目-软科学项目“‘十四五’实验动物管理制度研究”(2022JDR0022)

[第一作者] 陈兵(1990—),男,硕士,助理研究员,研究方向:实验动物管理。E-mail: ncxwjd@126.com。ORCID: 0009-0009-8133-7361

[通信作者] 王敬东(1971—),男,硕士,研究员,研究方向:实验动物管理。E-mail: ncxwjd@126.com。ORCID: 0009-0007-7517-491X

production, establishing a stable support mechanism for technological innovation, and placing a strong emphasis on animals safety management. This article aims to provide a reference for further improving the management level and industry development momentum of laboratory animals in Sichuan Province and other provinces.

[Key words] Laboratory animals; Administrative licensing; Sichuan Province; Development status; Management countermeasures

实验动物作为生命科学研究中的“精密仪器”，被广泛应用于生命科学^[1]、食品药品^[2]、仪器设备^[3]、环境保护^[4]、航空航天^[5]、检验检测^[6]等多个领域，是不可或缺的战略性生物资源，也是生物技术创新突破的内源动力及其先进性的标志^[7]。自2018年以来，四川省努力探索实验动物管理工作新模式，相继出台了一系列用以规范实验动物监督管理、保障实验动物质量和生物安全的规章制度与标准规范，如《四川省实验动物管理办法》《关于进一步做好实验动物质量管理工作的通知》等，从而推动本省实验动物行业的高质量发展。本文系统地梳理了四川省实验动物行政许可和行业发展状况，进一步分析了四川省实验动物发展优势及存在的问题，以期为进一步精准出台实验动物创新与发展的支持政策和管理措施提供参考。

1 四川省实验动物许可和管理现状

1.1 实验动物许可证持证单位

1.1.1 持证单位及许可证数量

截至2023年12月底，四川省实验动物持证单位共116家；其中，仅持有生产许可证的单位有7家，仅持有使用许可证的单位有93家，持有双证的单位有16家。有效期内的实验动物许可证共151张；其中，实验动物生产许可证30张，实验动物使用许可证121张，分别占总数量的19.87%和80.13%。部分持证单位持有多个实验动物许可证。例如，成都生物制品研究所

有限责任公司持有实验动物生产许可证2张和实验动物使用许可证4张。

1.1.2 持证单位类型

四川省实验动物持证单位包括企业、高等院校、科研院所和其他单位。其中，企业数量最多，达84家，占单位总数的72.41%；大中专院校有14家，占单位总数的12.07%；科研院所9家，占单位总数的7.76%；其他单位有9家，占单位总数的7.76%（图1A）。

1.1.3 持证单位行业分布

四川省实验动物持证单位涉及行业包括生物医药、教育科研、医疗卫生、农林化工和其他行业。其中，生物医药类最多，有77家，占总数的66.38%；教育科研类有14家，占总数的12.07%；医疗卫生类有11家，占总数的9.48%；农林化工类6家，占总数的5.17%；其他有8家，占总数的6.9%（图1B）。

1.2 实验动物设施

1.2.1 设施总面积

截至2023年12月底，四川省实验动物设施总面积为29.67万m²。按设施用途划分，实验动物生产设施和使用设施面积分别为10.47万m²和19.2万m²，分别占总设施面积的35.29%和64.71%。按设施等级划分，实验动物设施普通环境、屏障环境和隔离环境面积分别为19.18、9.65和0.84万m²，分别占总设施面积的64.64%、32.52%和2.84%，主要为普通环境设施和屏

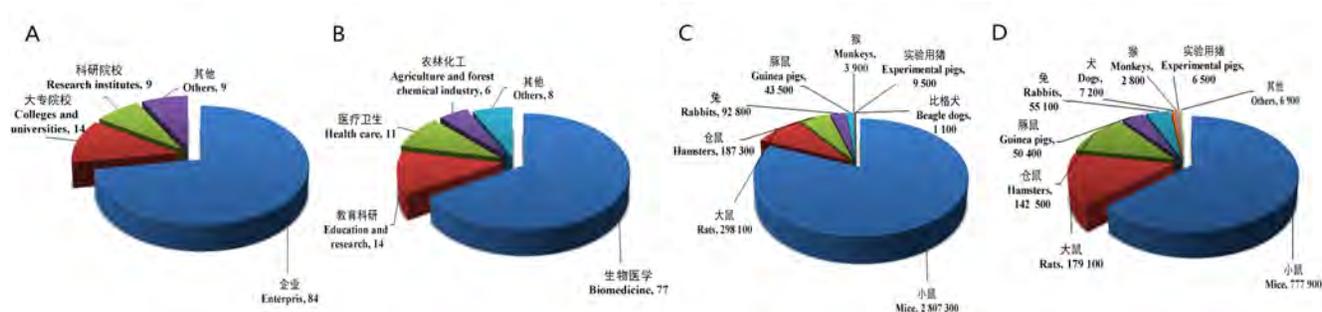


图1 2023年底四川省实验动物持证单位的类型(A)和行业分布(B)以及实验动物的生产量(C)和使用量(D)统计

Figure 1 Types (A) and industrial distribution (B) of license-holding laboratory animal facilities, as well as the production (C) and usage (D) statistics of laboratory animals in Sichuan Province as of the end of 2023

障环境设施。

四川省实验动物设施面积范围集中在 200 ~ 3 000 m²，有 111 个，占总数的 73.51%。而 10 000 m² 及以上的设施 9 个，占 5.96%；3 000 ~ 9 999 m² 之间的设施 13 个，占 8.61%；1 000 ~ 2 999 m² 之间的设施 41 个，占 27.15%；500 ~ 999 m² 之间的设施 23 个，占 15.23%；200 ~ 499 m² 之间的设施 44 个，占 29.14%；小于 200 m² 的设施 21 个，占 13.91%。

1.2.2 设施面积前 10 位的单位情况

从四川省持证单位拥有的设施面积来看，成都华西海圻医药科技有限公司的实验动物设施面积最大，

包含 2 处实验动物使用设施（2 张许可证），总面积达 40 144 m²，其中普通设施面积为 33 670 m²、屏障环境设施面积为 6 474 m²；其次是四川横竖生物科技股份有限公司，有实验动物生产设施和使用设施共 3 处（3 张许可证），总面积为 39 200 m²，全部为普通环境设施，用于饲养实验猴和开展猴相关实验；四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所的设施面积排在第 3 位，有实验动物生产设施和使用设施共 5 处（5 张许可证），总面积为 25 320 m²，其中普通环境设施面积为 23 400 m²，屏障环境设施面积为 1 920 m²。四川省实验动物设施面积位居前 10 位的单位见表 1。

表 1 2023 年四川省实验动物设施面积前 10 位的单位情况

Table 1 Top 10 laboratory animal facilities by facility area in Sichuan Province, 2023

排名 Rank	单位名称 Facility name	实验动物设施面积/m ² Laboratory animal facility area/m ²		
		普通环境 Conventional environment	屏障环境 Barrier environment	总面积 Total area
		1	成都华西海圻医药科技有限公司	33 670
2	四川横竖生物科技股份有限公司	39 200	0	39 200
3	四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所	23 400	1 920	25 320
4	四川格林豪斯生物科技有限公司	14 300	0	14 300
5	四川大学华西医院	1 250	12 138	13 388
6	雅安普莱美生物科技有限公司	13 067	0	13 067
7	成都药明康德新药开发有限公司	10 514	2 353	12 867
8	成都海枫生物科技有限公司	9 133	2 385	11 518
9	四川维通利华实验动物技术有限公司	0	11 056	11 056
10	成都达硕实验动物有限公司	8 400	1 000	9 400

1.3 实验动物生产

1.3.1 生产动物种类

四川省生产的实验动物有大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、兔、犬、猴、实验用猪、实验用羊共 9 种。从实验动物携带微生物等级划分，省内生产的大鼠、小鼠、仓鼠是 SPF 级；豚鼠是普通级和 SPF 级；兔、犬、猴、实验用猪和实验用羊为普通级。目前，省内无 SPF 级兔和无菌级实验动物生产。

1.3.2 生产动物数量

2023 年，四川省实验动物生产量为 344.35 万只。从动物种类上看，小鼠生产量最大，为 280.73 万只，占全部实验动物生产总量的 81.53%；大鼠生产量为 29.81 万只，占 8.66%；仓鼠生产量为 18.73 万只，占 5.43%；兔生产量为 9.28 万只，占 2.70%；豚鼠生产量为 4.35 万只，占 1.26%；猴生产量为 0.39 万只，占 0.11%；实验用猪生产量为 0.95 万只，占 0.28%；比格

犬生产量为 0.11 万只，占 0.03%（图 1C）。按生产动物等级进行分析，普通级实验动物有 12.41 万只，占全部实验动物生产总量的 3.61%；清洁级实验动物有 0.56 万只，占 0.16%；SPF 级实验动物有 331.38 万只，占 96.23%；目前暂无无菌级实验动物生产。

1.3.3 部分单位的实验动物生产能力

2023 年，四川省实验动物年产量超过 100 万只的单位有 2 家，分别为成都药康生物科技有限公司和成都达硕实验动物有限公司。四川省实验动物生产数量位居前 6 位的单位见表 2。在大动物生产方面，四川格林豪斯生物科技有限公司年产出实验猴 600 只以上，四川养麝研究所年产出比格犬 600 只以上。

1.4 实验动物使用

1.4.1 使用动物种类

四川省使用的实验动物种类有小鼠（含裸小鼠）、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、犬、猴、实验用猪、实验用

表2 2023年四川省部分单位的实验动物生产能力

Table 2 Production capacity of selected laboratory animal facilities in Sichuan Province, 2023

序号 Number	单位名称 Facility name	实验动物生产范围 Production scope of laboratory animals	生产能力 Production capacity
1	成都达硕实验动物有限公司	普通级:小型猪、比格犬、豚鼠、兔 SPF级:大鼠、小鼠、豚鼠	>100万只
2	成都药康生物科技有限公司	SPF级:小鼠、大鼠	>100万只
3	成都生物制品研究所有限责任公司	SPF级:小鼠、仓鼠 清洁级:豚鼠	>30万只
4	简阳达硕动物科技有限公司	SPF级:大鼠、小鼠	>10万只
5	四川大学	SPF级:大鼠、小鼠	>5万只
6	四川省实验动物专委会养殖场	SPF级:小鼠、大鼠、豚鼠 普通级:兔、豚鼠	>5万只

猫和实验用羊等10种(其中,实验用猪、实验用猫和实验用羊已有四川省实验动物地方标准),部分单位还使用鸭、雪貂、树鼩等非标准化实验用动物。从使用动物微生物等级来看,各单位使用的大鼠、小鼠主要为SPF级,少量单位具备使用无菌级小鼠的能力(如四川省中医药科学院);普通级和SPF级豚鼠均有单位使用;使用的兔主要为普通级和SPF级;使用的犬、猴、实验用猪、实验用猫和实验用羊主要为普通级。

1.4.2 使用动物数量

2023年,四川省实验动物使用量为122.88万只。从实验动物使用总量上看,小鼠的使用量最大,达77.79万只,占全部实验动物使用总量的63.31%;大鼠使用量为17.91万只,占14.57%;仓鼠使用量为14.25万只,占11.64%;豚鼠使用量为5.04万只,占4.10%;兔使用量为5.51万只,占4.48%;犬使用量为0.72万只,占0.59%;猴使用量为0.28万只,占0.23%;实验用猪的使用量为0.65万只,占0.53%;其他动物的使用量为0.69万只,占0.55%(图1D)。

1.4.3 使用量前10位的单位情况

从各单位使用实验动物的情况来看,成都生物制品研究所有限责任公司使用的实验动物量最大,为22.43万只/年,占全省全年实验动物使用总量的18.26%,主要用于疫苗生产;其次是四川大学,使用实验动物9.54万只/年,占全省全年实验动物使用总量的7.77%,包含小鼠、大鼠、豚鼠、兔、犬、猴等,主要用于科学研究、教学等,详见表3。

2 四川省实验动物行业发展优势及存在的问题

2.1 发展优势

2.1.1 产业规模领先西部

近年来,四川省实验动物产业发展迅速,产业规模在西部地区领先。四川省实验动物许可证已发放153张,是重庆市(西部第二)的2.64倍和陕西省(西部第三)的3.56倍;实验动物生产数量为344.35万只,是重庆市(西部第二)21万只的16.40倍;实验动物使

表3 2023年四川省实验动物使用量前10位单位情况

Table 3 Top 10 facilities by laboratory animal usage in Sichuan Province, 2023

排名 Rank	单位名称 Facility name	使用实验动物种类 Laboratory animal species used	使用数量/万只 Usage quantity, ×10 ⁴
1	成都生物制品研究所有限责任公司	仓鼠、小鼠	22.43
2	四川大学	小鼠、大鼠、豚鼠、兔	9.54
3	成都华西海圻医药科技有限公司	小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、比格犬、小型猪	8.32
4	四川大学华西医院	大鼠、小鼠、犬、实验用猪、实验用羊、兔、猴、豚鼠	6.42
5	西南医科大学	小鼠、大鼠、兔、豚鼠	5.93
6	四川省中医药科学院	小鼠、大鼠、豚鼠、兔	5.07
7	四川科伦药业股份有限公司	猫、兔、豚鼠、小鼠	3.15
8	四川海思科制药有限公司	大鼠、小鼠、兔、豚鼠	3.13
9	四川省药品检验研究院	兔、豚鼠、大鼠、仓鼠、小鼠、犬、猫	2.95
10	成都中医药大学	大鼠、小鼠、兔、豚鼠	2.87

用数量为122.84万只,是重庆市(西部第二)46万只的2.67倍。在西部地区,仅四川省有年产量超过100万只的实验动物企业(共2家);四川省实验动物生产经济效益达到1.06亿元,是重庆市(西部第二)的3.1倍。

2.1.2 区域影响力不断增强

自2018年以来,四川省先后吸引维通利华(Charles River)、玛斯生物(MARSHALL)、美敦力(Medtronic, Inc.)等实验动物行业头部企业,以及药明康德、集萃药康、先导药物等上市企业落户成都天府国际生物城、成都医学城、新川创新科技园等生物医药园区。这些企业的加入形成了实验动物生产供应、外科手术模拟操作、临床医师技能培训、临床前研究外包服务(CRO)、新药研发安全性评价(GLP)等生物医药全链条服务体系。而且“四川造”实验动物已走出国门,远销至美国、韩国等国家,以及北京、上海、广东、江苏、香港、澳门等省市及地区,体现了四川省作为西部实验动物大省的辐射带动作用 and 不断增强的区域影响力。

2.1.3 综合效益不断显现

依托实验动物,各单位积极开展新药临床前药代及药效评价,提供基于重大疾病的动物模型、组织和细胞水平的新药筛选、作用机制研究及有效性评价,为化学药物、生物技术药物、基因治疗药物、中药复方及中药注射剂研发提供服务,产生了显著的社会效益。“十三五”期间,四川省疾病预防控制中心的生物安全防护三级实验室取得了高致病性动物病原微生物实验室资格证书,填补了本省高等级生物安全实验室的空白;成都威斯克生物医药有限公司利用实验动物,研发了重组新型冠状病毒蛋白疫苗(Sf9细胞)“威克欣”,为疫情防控提供了保障;全省实验动物销售实现经济效益超3亿元人民币,利用实验动物开展药物安全评价、动物实验外包模型服务等实现直接经济效益近9亿元人民币。

2.2 存在的主要问题

2.2.1 实验动物生产不能较好地满足实验动物使用需求

目前,四川省内部分单位存在针对SPF级兔、无菌级小鼠等实验动物的使用需求,但省内暂无相关单位生产相应级别的实验动物。而北京等发达地区已建立了全等级实验动物生产基地,能够较好地满足本地实验动物使用单位对不同等级实验动物的需求^[8]。目

前,四川省部分高等级实验动物种类只能从东部地区采购,从而增加了科研成本和时间成本。此外,常用实验动物生产韧性不强,在2020年新冠疫情暴发后,实验猴、犬、豚鼠等作为病毒研究、新药研发和疫苗检定不可或缺的“活的仪器”,省内需求激增,导致供应严重不足。如2022年,四川省豚鼠生产量为1.38万只,而使用量达4.65万只;比格犬生产量为1442只,而使用量高达8829只。部分使用单位因实验动物供应问题无法解决而不得不暂停实验。

2.2.2 实验动物技术创新水平有待提升

近年来,四川省增加了基因敲除大鼠、小鼠、豚鼠等功能性实验动物的生产,然而在利用这些功能性或者常规实验动物来研发实验动物新品种、构建人类疾病动物模型、开发实验动物新技术等方面,还有待进一步提升。云南省通过科研项目支持、建立技术规范、建立树鼩地方标准等方式,已成功开发树鼩作为实验用动物^[9-10];而四川省的实验动物创新尚没有持续稳定的科研项目支持。2019年新冠疫情暴发时,疫情防控、疫苗研发等科学研究急需开展,北京市率先完成了小鼠、猴感染新型冠状病毒的动物模型构建^[11];广东省研制了新型冠状病毒N蛋白表达菌株;河南省开发出具有高度生物安全性的拟严重急性呼吸综合征冠状病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)小鼠肺部炎症模型^[12];而四川省在利用实验动物技术开展重大疫病和传染病防控及机制研究等方面,还有待进一步加强。

2.2.3 实验动物安全管理任重道远

四川省实验动物单位较多,分布在成都、绵阳、雅安、泸州、自贡、宜宾、眉山等12个地市(州)^[12],并且实验动物行业涉及生物医药、教育科研、医疗卫生、农林化工等领域,但各地各单位的实验动物安全管理水平参差不齐。根据《中华人民共和国安全生产法》中“管行业必须管安全、管业务必须管安全、管生产经营必须管安全”的原则,以及《中华人民共和国生物安全法》中“病原微生物实验室应当采取措施,加强对实验动物的管理,防止实验动物逃逸,对使用后的实验动物按照国家规定进行无害化处理,实现实验动物可追溯。禁止将使用后的实验动物流入市场”等要求,在实验动物设施监督管理过程中发现,部分单位存在设施管理维护不及时、实验动物使用全流程不可追溯、未实质性开展涉及实验动物的项目审查、实验动物福利与伦理审查没有完全落实、

管理制度和操作规程修订更新不及时、执行记录不够全面等问题^[13-14]。上述管理中的薄弱环节都会影响实验动物行业的健康发展。

3 四川省实验动物行业发展对策建议

3.1 积极支持实验动物生产提质增效

一是针对四川省还不具备生产条件的实验动物,如无菌级小鼠、SPF级兔等进行优化布局,鼓励企业联合区域内高校、科研院所共建实验动物生产平台。科技厅通过后补助形式对这些共建平台进行支持。优先支持有屏障设施的生产单位通过设施新建或改建,建设无菌级小鼠、SPF级兔等高等级实验动物生产设施。二是对于目前生产SPF级大鼠及仓鼠、普通级豚鼠、犬、猴、实验用猪的实验动物相关生产单位,支持其对现有设施进行扩建,扩大相应实验动物的生产规模,为科学研究、药物开发、疫苗研制等提供充足的实验动物保障。

3.2 建立稳定的实验动物科技创新支持机制

一是建立实验动物科学技术创新发展体制与机制。加强省级层面的实验动物立法和实验动物系列标准修订,提高实验动物法制化、标准化管理水平,建立健全实验动物标准体系和资源研制、引进、保存与共享的长期维持机制,同时建立行业自律机制,实现行业自我管理^[1]。二是提升实验动物创新平台能级。目前,四川省尚无实验动物领域的国家级创新平台。反观国内生物医药大省,均建有高能级实验动物创新平台,如广东省大动物模型研究中心和国家新药创制孵化基地实验动物公共服务大平台,以及重庆国家生物产业基地实验动物中心等。三是设立实验动物科技创新专项。持续支持实验动物资源开发、质量控制、动物福利、动物模型研究等领域的新技术、新方法研究,不断提升四川省实验动物科技创新能力,支撑服务新质生产力发展。

3.3 高度注重实验动物安全管理

一是强化实验动物安全的全周期全过程管理。在国家及省级实验动物法律法规和制度修订过程中,实验动物全流程溯源管理将是安全管理规范的重点之一^[15]。围绕实验动物生产、销售、运输、饲养、实验、废弃物处置等过程,采用全球定位系统(global positioning system, GPS)、射频识别技术(radio frequency identification, RFID)、第五代移动通信(5th generation mobile communication, 5G)等现代信息技

术,实现信息化、全流程、全周期监管。二是定期组织开展实验动物设施风险隐患排查和治理。实验动物设施安全运行是动物实验成功的基本条件^[16],针对保障设施安全运行的消防器材、仪器设备、消毒用品、防护用具等,定期进行风险隐患排查和治理,以确保设施安全、稳定运行。三是完善管理制度体系。安全管理制度建设是实验动物安全稳定发展的重要保障。江苏省科技主管部门编制了《实验动物安全管理指导手册(试行)》,北京^[17]、江苏^[18]、江西^[19]、湖南^[20]等地还出台了突发实验动物生物安全事件应急预案。因此,出台相应的应急预案和指导手册,对进一步完善四川省实验动物安全管理制度体系具有重要意义。

[作者贡献 Author Contribution]

陈兵、邹弈星负责数据统计分析、文章撰写;王敬东进行文章写作指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 秦川,孔琪,钱军,等.实验动物科学技术是生命科学和健康中国建设的基础支撑条件[J].科技导报,2017,35(11):10-14. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.11.001.
QIN C, KONG Q, QIAN J, et al. Laboratory animal science and technology is strategically important to life science and health China construction[J]. Sci Technol Rev, 2017, 35(11):10-14. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.11.001.
- [2] 徐容,曹入双,杨茂,等.低碳水化合物饮食对小鼠肾脏和肝脏的影响[J].食品安全导刊,2021,7(27):91-94.
XU R, CAO R S, YANG M, et al. Effects of Low-carbohydrate diet on kidney and liver of mice[J]. China Food Saf Mag, 2021, 7(27):91-94.
- [3] 韦晓娟,杨阳,刘静.可植入式温差发电技术的动物实验研究[J].北京生物医学工程,2008,27(3):276-280. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3208.2008.03.014.
WEI X J, YANG Y, LIU J. Animal experiments on implanted thermal electricity generator[J]. Beijing Biomed Eng, 2008, 27(3):276-280. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3208.2008.03.014.
- [4] 苏瑞军,晋小婷,安全,等.太原市冬季大气PM_{2.5}暴露对小鼠脏器及炎症因子的影响研究[J].环境与健康杂志,2015,32(8):677-679. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2015.08.005.
SU R J, JIN X T, AN Q, et al. Effects of PM_{2.5} collected in winter of Taiyuan on organs weights and inflammatory cytokines expressions in mice[J]. J Environ Health, 2015, 32(8):677-679. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2015.08.005.
- [5] 董李晋川,黄红,刘斌,等.苏俄太空动物实验研究发展历程[J].中国实验动物学报,2022,30(4):557-567. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.015.
DONG L J C, HUANG H, LIU B, et al. A review of space animal experiments conducted by the former Soviet Union and Russia[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2022, 30(4):557-567. DOI:

- 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.015.
- [6] 李晓波, 付瑞, 王洪, 等. 实验大鼠仙台病毒抗体检测能力验证结果评价[J]. 实验动物科学, 2017, 34(1):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2017.01.001.
LI X B, FU R, WANG H, et al. Laboratory proficiency testing for rat Sendai virus antibody detection[J]. Lab Anim Sci, 2017, 34(1):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2017.01.001.
- [7] 孔琪, 李继平, 赵永坤. 实验动物资源是生物医药产业创新的重要支撑条件[J]. 科技导报, 2016, 34(11):12-13. DOI:CNKI:SUN:KJDB.0.2016-11-009.
KONG Q, LI J P, ZHAO Y K. Experimental animal resources are an important supporting condition for the innovation of biomedical industry[J]. Sci Technol Rev, 2016, 34(11):12-13. DOI: CNKI:SUN:KJDB.0.2016-11-009.
- [8] 李根平, 赵德明. 北京地区实验动物法规建设与实验动物行业发展关系的研究[J]. 实验动物科学, 2008, 25(6):33-35, 38. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008.06.009.
LI G P, ZHAO D M. Study on relationship between legislation making and industry development of Beijing laboratory animal[J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(6):33-35, 38. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008.06.009.
- [9] NIU D, WEI H J, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. Science, 2017, 357(6357): 1303-1307. DOI: 10.1126/science.aan4187.
- [10] 罕园园, 李娜, 代解杰. 云南省实验动物工作40年发展历程与思考[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 399-408. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.136.
HAN Y Y, LI N, DAI J J. History and countermeasure discovered from 40-year development of laboratory animals in Yunnan Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(5): 399-408. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.136.
- [11] YU P, QI F F, XU Y F, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19[J]. Anim Model Exp Med, 2020, 3(1):93-97. DOI: 10.1002/ame2.12108.
- [12] LU N, GU T X, TIAN X L, et al. Acetylshikonin inhibits inflammatory responses and Papain-like protease activity in murine model of COVID-19[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1):371. DOI: 10.1038/s41392-022-01220-7.
- [13] 邹弈星, 蒋佳, 王敬东. 四川省实验动物产业发展现状及对策思考[J]. 实验动物科学, 2013, 30(1):42-45. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2013.01.012.
ZOU Y X, JIANG J, WANG J D. The current situation and countermeasures in laboratory animal industry of Sichuan Province[J]. Lab Anim Sci, 2013, 30(1): 42-45. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2013.01.012.
- [14] 陈兵, 邹弈星, 姚凌云, 王敬东. 四川省实验动物管理政策分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(2): 209-213. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.110.
CHEN B, ZOU Y X, YAO L Y, et al. Research on management policies of laboratory animals in Sichuan Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(2): 209-213. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.110.
- [15] 漆重阳, 陈林, 艾曼, 等. 基于江苏省实验动物行政许可现状的安全管理对策[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1):79-85. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.083.
QI C Y, CHEN L, AI M, et al. Safety management countermeasures based on the status of laboratory animal administrative licensing in Jiangsu Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 79-85. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.083.
- [16] 魏著英, 窦英杰, 贾彩霞, 等. 屏障设施环境条件对实验动物生长和生理指标的影响[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2022, 53(5):555-560. DOI: 10.13484/j.nmgdxzbk.20220515.
WEI Z Y, DOU Y J, JIA C X, et al. Effects of facility environment on experimental animals and animal experiments[J]. J Inn Mong Univ Nat Sci Ed, 2022, 53(5): 555-560. DOI: 10.13484/j.nmgdxzbk.20220515.
- [17] 巩薇, 贺争鸣, 李根平. 北京市实验动物突发重大事件应急预案的制定[J]. 实验动物科学, 2008, 25(1):29-33. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008.01.009.
GONG W, HE Z M, LI G P. Formulation of emergency plan for laboratory animals in Beijing[J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(1):29-33. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2008.01.009.
- [18] 陆建玲, 单斌, 孙兴莲, 等. 江苏省突发实验动物生物安全事件应急预案的编制[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(6): 510-514. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.06.016.
LU J L, SHAN B, SUN X L, et al. Compilation of emergency response plan for sudden biosecurity incidents involving laboratory animals in Jiangsu Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2015, 35(6): 510-514. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2015.06.016.
- [19] 褚芳, 黄雪梅, 徐丽英, 等. 江西省实验动物突发重大疫情应急预案的制定[J]. 实验动物科学, 2011, 28(3):55-59. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.03.014.
CHU F, HUANG X M, XU L Y, et al. Formulation of emergency plan for sudden major epidemic situation of experimental animals in Jiangxi Province[J]. Lab Anim Sci, 2011, 28(3):55-59. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2011.03.014.
- [20] 刘美佟, 陈长, 张兆强, 等. 湖南省实验动物机构生物安全管理现状调查[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(2): 202-208. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.129.
LIU M T, CHEN Z, ZHANG Z Q, et al. Investigation on current biosafety management status in laboratory animal institutions in Hunan Province[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(2): 202-208. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.129.

(收稿日期:2024-04-15 修回日期:2024-06-03)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,洪怡)

【引用本文】

陈兵, 邹弈星, 王敬东. 基于行政许可的四川省实验动物管理现状与对策分析[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 560-566. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.055.

CHEN B, ZOU Y X, WANG J D. Analysis on current status and countermeasures for laboratory animal management in Sichuan Province based on administrative licensing[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(5): 560-566. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.055.



田金徽, 教授、博士生导师。现任兰州大学基础医学院副院长、甘肃省循证医学重点实验室副主任, 兼任中国康复医学会循证康复医学工作委员会第二届委员会副主任委员、全国医学文献检索研究会第九届理事会常务理事、中华医学会临床流行病学和循证医学分会指南学组委员及循证医学学组委员、甘肃省医学会临床流行病学和循证医学分会副主任委员、甘肃省康复医学会第二届检验医学专业委员会副主任委员、甘肃省药学会药物信息专委会副主任委员和甘肃省药学会药物经济学专委会副主任委员等。主要从事循证医学方法学研究、医学文献与数据挖掘、循证医学证据转化与利用, 以及生物信息学分析与孟德尔随机化研究等工作, 并且将网状Meta分析方法首次引入中医药、动物实验和诊断试验。相关研究成果被评为甘肃省科学技术进步奖一等奖1项、二等奖2项、三等奖1项, 以及中国药学会科学技术一等奖、中华中医药学会科学技术一等奖等, 个人获第九届甘肃省青年科技奖。以第一或通信作者发表SCI论文50余篇, 入选2023年和2024年全球前2%顶尖科学家榜单。同时是省级一流课程“医学文献检索”“临床科研思维训练与方法”和循证医学微专业负责人, 主编、副主编和参编教材及著作分别为4部、5部和13部, 获首届全国教材建设奖全国优秀教材二等奖1项、国家教学成果二等奖1项, 甘肃省教学成果一等奖1项, 甘肃省高校青年教师成才奖, 以及兰州大学隆基教学新秀奖、骨干奖和创新奖等。

动物实验证据整合方法研究的进展与挑战

郑卿勇^{1,2}, 李腾飞³, 许建国^{1,2}, 周泳佳³, 马智超⁴, 王娜⁵, 李莫兰⁵, 杨雯景⁵, 吴佩润⁴, 王海东⁶, 田金徽^{1,2}

(1. 兰州大学循证医学中心, 兰州大学基础医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省循证医学重点实验室, 兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学护理学院, 兰州 730000; 4. 兰州大学第二临床医学院, 兰州 730000; 5. 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000; 6. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

[摘要] 动物实验证据整合是生物医学研究中的关键环节, 为疾病机制的深入研究与新药开发等提供了重要的先验信息。目前, 动物模型在模拟人类疾病方面发挥着不可替代的作用, 但动物实验证据整合在实践中仍面临诸多挑战, 包括受重视程度不足、研究设计的异质性明显、高发表偏倚、与临床研究实践存在差距等。本文首先指出动物实验原始研究证据的现存问题, 包括动物模型的选择和适用性、动物实验研究设计的考量、动物实验证据转化的影响因素等方面; 然后介绍了多种动物实验证据整合方法的应用进展, 如系统评价与Meta分析、系统评价再评价/伞形综述、范围综述、证据图谱等; 最后探讨了目前动物实验证据整合面临的主要挑战以及针对性的改进策略, 旨在提高动物实验研究成果向临床实践转化的效率, 并推动循证医学的发展。未来, 通过不断优化原始实验研究方案与证据整合实践, 有望逐步构建一个更为科学、高效的动物实验证据综合环境, 为临床试验与人类健康事业作出更大的贡献。

[关键词] 动物实验; 证据整合; 研究进展; 循证医学

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0567-10



Advances and Challenges in the Research of Integration Methods of Animal Experimental Evidence

ZHENG Qingyong^{1,2}, LI Tengfei³, XU Jianguo^{1,2}, ZHOU Yongjia³, MA Zhichao⁴, WANG Na⁵, LI Molan⁵, YANG Wenjing⁵, WU Peirun⁴, WANG Haidong⁶, TIAN Jinhui^{1,2}

(1. Evidence-Based Medicine Center, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000,

[基金项目] 2023年中央财政转移支付地方项目“中医药循证能力建设”(2101704)

[第一作者] 郑卿勇(1998—), 男, 博士研究生, 研究方向: 循证医学与医学信息学。E-mail: easonzz@foxmail.com。ORCID: 0000-0002-9480-0169;

李腾飞(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 循证护理。E-mail: ltf980102@163.com。ORCID: 0009-0005-1168-3075

[通信作者] 田金徽(1978—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 网状Meta分析与卫生技术评估。E-mail: tjh996@163.com。ORCID: 0000-0002-3859-9587

China; 2. Key Laboratory of Evidence-based Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 3. School of Nursing, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4. The Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 5. The First Clinical School of Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 6. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

Correspondence to: TIAN Jinhui (ORCID: 0000-0002-3859-9587), E-mail: tjh996@163.com

[ABSTRACT] Integrating evidence from animal experiments is a critical component of biomedical research, providing essential prior information for in-depth investigations of disease mechanisms and new drug development. Animal models have played an irreplaceable role in simulating human diseases. However, the integration of evidence from animal experiments has faced numerous challenges, including insufficient emphasis, significant heterogeneity in study designs, high publication bias, and discrepancies with clinical research practices. This paper first identifies existing issues in the original research evidence from animal experiments, such as the selection and applicability of animal models, considerations in the design of experimental studies, and factors influencing the translation of animal experimental evidence. It then discusses various methods for integrating this evidence, including systematic review and meta-analysis, overview of systematic review/umbrella review, scoping review, and evidence mapping, while highlighting recent advancements in their application. Finally, the paper addresses the main challenges currently encountered in the integration of evidence from animal experiments and proposes targeted improvement strategies aimed at enhancing the efficiency of translating research outcomes into clinical practice and promoting the advancement of evidence-based medicine. By continuously optimizing original experimental research protocols and evidence integration practices, this work aims to establish a more efficient and scientific environment for the synthesis of evidence from animal experiments, ultimately contributing to clinical trials and human health.

[Key words] Animal experiments; Evidence integration; Research progress; Evidence-based medicine

在生物医学研究中，动物实验一直是推动科学发现和临床应用的基石^[1]。从基础研究到新药开发，动物模型的使用为理解复杂的生理过程、揭示疾病分子机制以及评估治疗方法提供了宝贵的先验信息^[2-3]。然而，随着科学的进步和社会伦理意识的提升，动物实验的合理性、必要性、透明度以及结果的解释面临更为严苛的审视^[4]。为应对这些挑战，动物实验的设计和必须遵循更高的标准，包括实验方案的周密策划、操作流程的专业规范、数据分析的严谨精确，以及研究报告的透明详尽。此外，实验结果的复现性要求也促使研究人员应采用标准化与共享原始数据的做法以增强动物研究的可信度，并促进科研数据的累积。总之，科研工作者需要不断探索提高动物实验的临床相关性、与证据可信度的更优方案，以减少由于物种间差异带来的复杂性影响，同时积极寻求更为科学的证据获取方法。

然而，随着动物实验数量激增，如何系统地评价与整合广泛的研究证据，成为该领域面临的又一项紧迫而重大的挑战^[5]。动物实验研究结果的证据整合，即通过系统评价（systematic review）、Meta分析、证据

图谱（evidence mapping）等方法对现有数据进行深入剖析与整合重构，已成为提升研究透明度和可靠性的关键手段。这不仅提高了动物实验科学证据对临床研究的指导价值^[5]，亦揭示了研究间的潜在差异，帮助科研人员更好地理解不同研究结果的可转换性与局限性。当然，在动物实验证据整合过程中，仍存在诸多挑战，如研究设计的异质性、高发表偏倚现象、与临床研究之间的实践转化差距等^[6-8]。

本文将全面评估动物实验研究证据整合的现状，深入探讨动物实验研究设计、数据处理与结果报告中遇到的主要挑战，提出可能的改进策略，并基于现有案例分析提高证据整合效率，以期为未来的动物实验研究提供参考和指导。

1 动物实验原始研究证据的现存问题

1.1 动物模型的选择和适用性

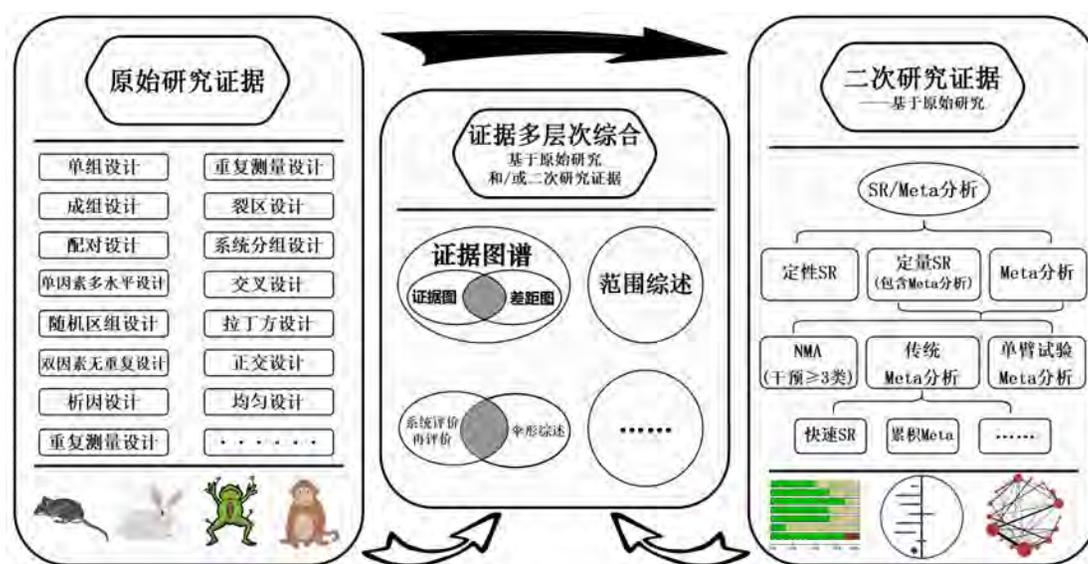
在生物医学与中医药研究中，选择合适的动物模型对于确保实验结果的有效性和转化潜力至关重要^[9-10]。生物学相关性是挑选模型时的首要条件，需要对疾病状态、目标器官、生理反应、药物代谢途径

等因素进行综合考量，从而增强研究结论的外推性。目前，在探索某种疾病机制或治疗方案的过程中，国内外研究者均广泛地开展了动物模型的选择与探索研究^[11-13]。此外，动物模型在预测临床效果方面同样展现出十分重要的能力，包括对药物在生物体内反应性的预测、不良反应的识别以及治疗效果的评估^[14]。尽管动物模型提供了宝贵的数据信息，但因其无法完全复制人类复杂的生物学过程，其实验结果仍存在诸多不确定性与偏差。

1.2 动物实验研究设计的考量

动物医学科学领域的研究设计类型繁多，包括单

组设计、随机区组设计、拉丁方设计、交叉设计与正交设计等^[15]（图1），实验设计的严谨性直接影响研究结论的准确性。同时，剂量选择的偏倚也是一个常见问题，不同剂量在动物体内可能会出现较大的药效与反应差异^[16]，而这些反应与人类的剂量反应曲线可能存在显著偏差。此外，标准化报告的低执行率阻碍了实验结果的解释，也降低了研究的透明度与可重复性。为解决这些问题，研究人员需要严格遵循既定的实验设计和报告指南^[17-18]，包括实验动物选择的合理性论证、详尽的方法论阐述，以及数据和分析方法的透明公开，这将有助于提升研究质量，减少结果解释的偏倚。



注：SR指系统评价；NMA指网状Meta分析。

Note: SR, systematic review; NMA, network meta-analysis.

图1 动物实验证据整合方法现状

Figure 1 Current methods for integrating evidence from animal experiments

1.3 动物实验证据转化的影响因素

动物实验证据转化过程中的主要影响因素包括生物学差异、实验设计的合理性、剂量选择和药效评估的复杂性、研究结果的可复现性、报告完整性^[19]，以及伦理和社会接受度挑战。另一个重要的影响因素是动物实验数据的多源性、分散分布，各实验室间可能采用不同的实验设计、操作流程准则、剂量给药、数据收集和分析方法，即使在相同的研究方向下也难以直接比较或汇总分析结果，这增加了获取一致结论的难度。此外，现阶段的动物研究数据通常分散在不同的出版物、数据库、特定会议与案例报告中，缺乏统一的数据存储与检索系统。故研究人员在收集不同来

源的实验证据时面临重大挑战，重要信息的遗漏风险显著增加。

为克服上述困难，研究人员正致力于探索新的策略和工具，如使用人源化动物模型^[20]、发展高通量筛选技术^[21]、应用系统生物学方法^[22]，以增强动物实验的预测价值。同时，需要制定通用的动物实验数据报告与记录准则，并建立高质量的动物实验数据库，以便跨研究领域的数据挖掘与比较分析。此外，加强国际合作和构建数据共享机制也将有助于提高动物实验数据的整合性与可用性，进而提升其对未来研究和临床应用的贡献，最终增强动物实验在生物医学研究中的转化能力。

2 动物实验证据整合方法的应用进展

21世纪初, *Lancet*、*Nature* 杂志均刊文强调了动物实验系统评价在启动新临床试验中的重要价值^[2,23]。随着循证医学理念的不断深化和普及, 国内外学者已探索并实践了多种动物实验证据整合的方法, 并积累了宝贵的经验。图2展示了2000—2023年多类证据整合方法在动物实验证据整合中的应用趋势, 可见系统评价与Meta分析文献数量显著增长, 2021

年达到峰值(4 006篇), 随后略有下降。其他方法如单臂试验Meta分析、累积Meta分析、定性系统评价/Meta整合、快速系统评价和证据图谱在近年来亦被广泛关注, 特别是定性系统评价/Meta整合和网状Meta分析自2018年后应用显著增加。此外, 动物实验的范围综述在2021年和2022年同样增势明显, 分别达到238篇和316篇。表1总结了几类常见的动物实验证据整合方法的应用特点, 以下作重点介绍。

表1 动物实验研究证据的主要整合方法概览

Table 1 Overview of main methods for synthesizing evidence from animal experiment studies

整合方法 Integration methods	应用特点 Application characteristics	实例参考 Examples
系统评价与Meta分析 Systematic review and meta-analysis	通过严谨的研究设计和方法学, 对现有的动物实验数据进行系统性综述与定量分析(部分), 以提供最高级别的证据。Meta分析可综合多个研究的结果, 对其进行定量整合, 揭示干预措施的总体效果	Perna A, et al/1996 ^[24]
单臂试验Meta分析 Meta-analysis of single-arm trials	通常用于关注单个群体中事件的发生率, 特别适用于处理稀有事件或样本量较小的研究	Alonso S, et al/2016 ^[25]
累积Meta分析 Cumulative meta-analysis	将研究资料作为连续性的统一体, 评估随时间累积研究结果的动态变化趋势	Inchui R, et al/2021 ^[26]
定性系统评价/Meta整合 Qualitative systematic review/meta-synthesis	关注研究结果的叙述性合成, 适用于研究设计差异过大或数据类型不适合定量分析的情境	Pommergaard H C, et al/2011 ^[27]
快速系统评价 Rapid review	高效、加速版的系统评价方法, 适用于紧急决策或时间敏感情况下的证据综合	Ciapponi A, et al/2011 ^[28]
网状Meta分析 Network meta-analysis	结合直接和间接证据, 综合多个比较组的结果, 评估不同干预措施之间的相对效果	Yao M, et al/2015 ^[29]
系统评价再评价/伞形综述 Overview of systematic reviews/ umbrella review	对已有的多个系统评价进行再评价, 部分会再次进行统计分析, 提供某一领域的全面证据概览	Hirst J A, et al/2014 ^[30]
范围综述 Scoping review	映射某一研究领域的文献分布, 识别研究的数量和特征, 揭示知识空白, 通常不进行质量评估和定量分析	Gardner E G, et al/2019 ^[31]
证据图谱 Evidence mapping	主要包括证据图与证据差距图, 其系统性地检索和分析现有证据, 通过表格或图形形式展示研究现状和证据差距, 支持决策制定和研究规划	Koch S E, et al/2022 ^[32] ; moola S, et al/2021 ^[33]

2.1 系统评价与Meta分析

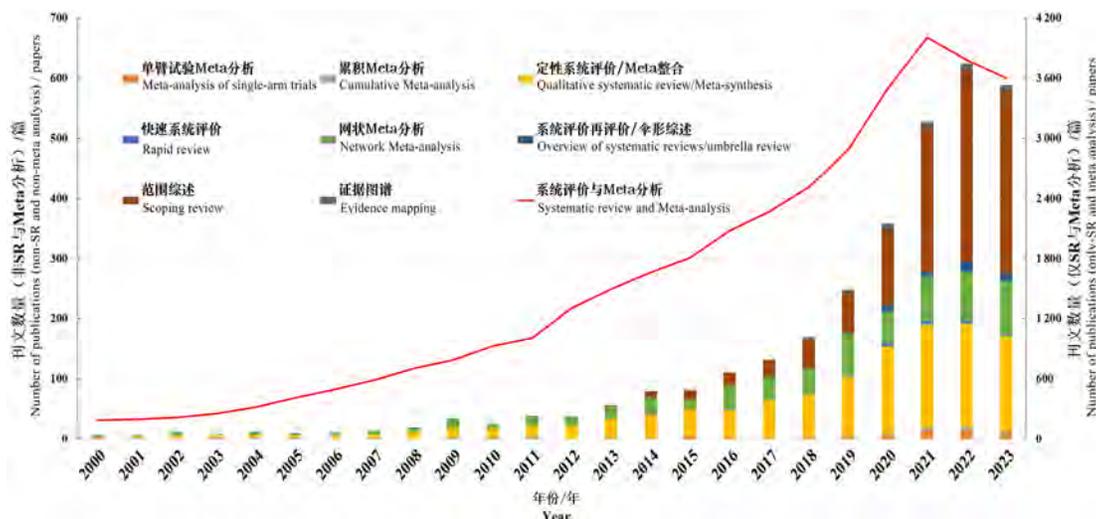
在循证医学领域中, 系统评价与Meta分析被普遍认为是提供最高级别证据的方法。其在动物实验研究中的应用同样至关重要, 能提供严谨的数据分析与证据整合方案。自1996年首篇动物实验系统评价文章^[24]发表后, 诸多学者在该领域纷纷开展了循证实践。目前, 在动物实验证据整合的实践中, 传统的干预性系统评价与Meta分析应用最为广泛。此外, 单臂试验Meta分析、累积Meta分析、定性系统评价、快速系统评价与网状Meta分析等方法也逐步得到应用, 以增强动物实验研究结果的解释能力和适用范围。

自2005年起, 国内学者开始关注动物实验系统评价, 引入相关概念并深入探讨了其在临床前研究中的

潜在优势与局限性^[34]。随后, 一系列的方法学研究^[35-37]推动了系统评价在临床前动物实验中的广泛应用。同时, Meta分析方法的应用也在中医药动物实验中得到扩展, 进一步推动了中医药现代化和国际化进程。至2017年, 针对中医药动物实验的系统评价报告指南正式出版^[38]。

2.1.1 单臂试验Meta分析

单臂试验Meta分析常用于关注单个群体中事件的发生率^[39], 在处理稀有事件或者在样本量较小的研究中尤为重要。因为在这类情况下, 单个研究往往难以产生具有说服力的结论。在动物实验证据中, 该方法尤其适用于评估特定事件(如疾病发生率、死亡率或治愈率)在不同研究中的频率分布。然而, 该方法的



注：SR指系统评价；本研究数量是基于中国知网（CNKI）与PubMed数据库的综合结果。

Note: SR, systematic review. The number of studies is based on a combined result from China National Knowledge Infrastructure (CNKI) and PubMed databases.

图2 动物实验各类型研究开展数量的分布趋势(2000—2023年)

Figure 2 Distribution trends of various types of animal experimental studies (2000-2023)

应用也需要考虑不同动物实验间潜在的异质性，包括研究设计、实验条件、动物种群等差异，这些都有可能影响结果的解释和应用。

实例分析：2016年，Alonso等^[25]基于单臂试验Meta分析方法，探索了坦桑尼亚牛中结核病、布鲁菌病和锥虫病的流行情况及潜在影响因素，提供了更为准确的风险估计。然而，由于样本量小、研究地域广、不同研究设计与诊断方法差异导致研究间的异质性较大，需要开展更大规模、更有力的流行病学研究来加强对人兽共患病和威胁公共卫生的风险进行评估和管理。

2.1.2 累积Meta分析

累积Meta分析将研究资料视为连续的统一体，旨在评估某领域证据随时间推移而发生的动态变化趋势^[40]，揭示某领域证据随新研究发布而逐步演进的情况。在动物实验证据整合背景下，累积Meta分析适用于跟踪和评价特定干预或治疗方法的效果一致性及其随时间的变化。

实例分析：Inchui等^[26]基于累积Meta分析发现，1990至2008年间爬行动物中衣原体感染呈上升趋势，随后总体稳定在略高于20%的水平。其中，澳大利亚爬行动物的衣原体感染率最高（68.6%，95% CI: 36.8~89.1），另外在物种分类中，鳄鱼的感染率相对较高（68.6%，95% CI: 32.5~89.1），但亚组分析的数据量有限，这增加了假阴性风险。

2.1.3 定性系统评价与Meta整合

定性系统评价与Meta整合侧重于对研究结果进行

叙述性合成，而非定量数据的整合。当研究设计差异过大或数据类型不适合定量分析时，定性系统评价是一类重要方法。定性系统评价强调对研究上下文的深入理解，包括实验设计、研究质量、动物种属差异及干预措施多样性等，总结研究间的共同主题和模式，识别研究领域中的缺口和未来研究方向。这种方法尤其适用于初步探索某一领域或研究结果过于复杂而难以量化的情境。

实例分析：Pommergaard等^[27]利用小鼠、大鼠、猪、犬、兔等多种动物构建临床结肠吻合口漏模型，并基于定性系统评价方法探讨了不同动物模型在结肠吻合口漏病因分析与预防措施上的差异。该研究表明，大鼠具有较强的抵抗腹腔感染能力，因而难以用于此类疾病的临床研究；相比之下，小鼠和猪由于其特性可能成为更合适的选择。

2.1.4 快速系统评价

快速系统评价（rapid review）是一种高效的系统评价方法，旨在短时间内快速整合现有证据，以应对紧急的临床问题或决策需求。此方法特别适用于需要迅速决策或在时间敏感情况下提供科学依据的情境，如公共卫生突发事件或临床实践中急需解决的问题。在动物实验领域，快速系统评价可用于紧急情况中的治疗策略评估或疾病暴发时的病理机制研究，其在追求效率的同时可能会对系统评价的严谨性构成挑战，但基于预先制定的计划和明确的方法，可以确保复现性与透明度，保持研究的可信度。

实例分析：在 COVID-19 流行期间，疫苗的安全性问题亟须证据支持。2021 年，Ciapponi 等^[28]通过快速系统评价评估了 38 项临床与非临床研究（包括 2 398 855 名孕妇与 56 只妊娠动物）的证据，未发现 COVID-19 疫苗及其组成成分在妊娠期间存在显著的安全性问题。这项研究为当时世界卫生组织的指导意义提供了强有力支撑，即孕妇在高风险暴露环境或面临重症风险增加的情况下可考虑接种 COVID-19 疫苗。

2.1.5 网状 Meta 分析

网状 Meta 分析（network meta-analysis）是在传统 Meta 分析的基础上发展而来，能够同时综合多个比较组之间的直接与间接证据^[41]。在动物实验研究中，面对多种不同的实验组合，网状 Meta 分析提供了一种全面且精确的方法来估计治疗效果。该方法不仅可以增强特定比较组的证据基础，还能评估不同治疗组之间的相对效果，并对多种治疗策略进行优劣排序。然而，目前在动物实验中运用网状 Meta 分析的案例较少，且主要集中在干预性实验的设计上。

实例分析：2015 年，Yao 等^[29]基于传统 Meta 分析与网状 Meta 分析方法评估了不同剂量姜黄素与安慰剂对脊髓损伤（spinal cord injury, SCI）大鼠的治疗效果。8 项纳入研究的汇总证据显示，姜黄素具有改善大鼠神经功能恢复与抗氧化的潜力，且在一定范围内，随剂量增加，疗效更为显著。但原始研究的整体方法学质量较差，仍需进一步验证。

2.2 系统评价再评价/伞形综述

系统评价再评价（overview of systematic reviews），也称为伞形综述（umbrella review），是一种高级别的证据整合方法，通常应用于已有多项系统评价存在的广泛研究基础主题。系统评价再评价方法旨在全面总结相关系统评价中的信息，以提供某一领域内的全面证据概览^[42]，或通过再次证据数据合并实现更具说服力的精确估计。在动物实验中，系统评价再评价能够帮助研究者和决策者快速把握某一疾病或治疗领域中临床前研究的趋势与结论，并识别需要进一步探索的方面。然而，该方法依赖于现有系统评价的质量水平，研究人员在开展动物领域的系统评价再评价时需对纳入研究进行严格的方法学质量审查，并采用适当的统计方法处理可能的偏倚和异质性。

实例分析：2014 年，Hirst 等^[30]基于系统评价再评价方法全面回顾了 31 篇干预性动物实验系统评价，重点关注卒中、脊髓损伤、脑出血等神经系统疾病，发现原始研究中随机化、分配隐藏与盲法设置对 Meta

分析合并结果的影响至关重要。汇总证据强调，临床研究的合理性应基于高质量的动物实验结果，不应让偏倚较大的动物研究影响后期人体临床研究的方向。

2.3 范围综述

范围综述（scoping review）旨在映射某特定领域研究文献的数量和特征，以识别和填补知识空白^[43]。与传统系统评价不同，范围综述通常不对纳入研究的质量进行严格评估，也不旨在提供合并效应量的定量分析，而是展示某研究领域的全貌特征。在动物实验证据整合中，范围综述尤其适用于初步探索一个主题方向，理解研究的分布情况，辨识关键变量和概念。通过这种文献调研，研究人员能够确定哪些区域已得到充分研究，哪些区域尚待深入探索或存在争议。

实例分析：一项针对动物宿主感染中东呼吸综合征冠状病毒（Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV）的范围综述^[31]中，研究团队采用 Arksey 和 O'Malley 提出的方法框架，制定了详尽的研究方案，筛选相关文献，并收集建模病毒传播动态的关键数据，以呈现该疾病在骆驼中的传播情况。结果显示，尽管大量观察性研究关注田间调查中的感染率，但是实验研究更侧重于提供有关疾病传播和病程特征的定量数据，这些数据对于理解病毒在自然条件下的传播至关重要。

2.4 证据图谱

证据图谱是基于系统评价理论，对某研究领域现有证据进行系统性检索、综合分析评价，并通过表格或图形呈现。这种新型的证据整合方法主要包括证据图（evidence map）和证据差距图（evidence gap map），其主要目的是系统揭示科研证据的现状与差距，从而支持决策制定和科学研究^[44-45]。

证据图通常基于特定的分类体系，将研究按照主题、研究设计、研究对象或其他关键维度进行组织和呈现。它展示特定领域内研究的性质、特点及数量，提供一个清晰的研究全景视图，通过整合和比较多方资源，明确不同证据的样本量与结论性信息。证据差距图则侧重于明确标示出现有证据基础上的缺口，即尚未被充分研究的领域或问题。通过可视化技术，证据差距图详细展示特定领域中的现有证据，重点评估和分析与疾病预防措施相关的证据，而不包括预防和预后等方面的证据^[45]。在动物实验领域，创建证据图谱能使研究者和资助机构更好地了解当前临床前研究的结构与差距，识别关键研究领域，并指导未来的实验设计和资金投入。这对于提高实验研究的透明度和

研究效率具有重要意义。

实例分析 1: 在对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) 相关的动物模型研究进行证据图分析时^[32], 研究者整理了不同类型的动物模型、使用的实验方法以及研究焦点 (如药物治疗、认知功能评估等)。证据图系统地展示了当前研究的主要集中领域及方法学多样性, 帮助研究者快速识别高频研究主题和潜在研究空白。此外, 这种整合分析揭示了某些研究方法在过去十年中的发展趋势, 为新入行的研究者指明了研究方法选择的方向。

实例分析 2: 在研究钩端螺旋体病 (leptospirosis) 的流行病学和风险因素时^[33], 研究团队创建了一种证据差距图, 这是全球首个针对单一疾病的证据差距图, 系统性地映射和识别研究空白。该证据差距图揭示了研究的地理分布不均以及动物研究与人类研究之间的差异。此外, 该图还揭示了高风险群体的研究相对不足, 这些群体包括农民和农业工人等与动物密切接触的职业人群。该图不仅帮助研究人员和决策者理解现有研究的分布情况, 还明确指引了未来的研究方向。

3 动物实验证据整合面临的主要挑战及其改进策略

3.1 动物实验证据整合工作需引起重视

动物实验在探究疾病机制、开发新药及进行安全性评估中提供了重要数据, 但其证据整合的重要性尚未得到充分重视。一方面, 部分从事临床前研究的学者尚未充分认识到证据整合在提高动物研究证据等级与可靠性方面的重要意义。另一方面, 在科研评价及政策制定中, 由于取证和用证水平不足, 动物实验证据整合的效果和应用范围受到限制。此外, 缺乏对动物实验二次证据科学有效性和相关性的充分认识, 导致相关研究资金的分配和研究人员的专业培训等方面存在不足, 进一步加剧了这一问题。

3.2 动物实验研究的局限性与异质性

动物实验的严谨性与科学性仍有待提升^[46], 报告水平整体欠佳。虽然 SYRCLE 工具^[4]、PREPARE^[47] 与 ARRIVE^[17] 报告规范为动物实验研究提供了详尽指导, 如对“随机化方法”的明确解释, 但在当前实践中, 随机分配被忽视、盲法实施不当、对照组设置不合理等问题仍普遍存在^[19,39,48]。这种不足可能导致实验结果的偏倚与不精确, 从而显著增加了动物实验结果向人类临床实践转化时的风险。

此外, 动物实验研究设计的异质性是另一项重要

挑战。各研究团队可能采用不同类型的动物模型、疾病条件、干预措施和结果测量方法, 这导致对同一问题的研究结果解释与比较存在困难^[49]。研究设计差异还体现在样本量、实验操作标准以及数据记录和分析方法上, 这些差异可能影响最终结论的科学性和准确性, 进而加剧了证据整合分析的难度。为提高动物实验证据整合的质量, 研究者应严格遵循动物实验研究报告标准^[17,47], 并对不同研究间的设计差异进行细致评估, 采取适当策略来处理这些差异。未来, 在动物实验的注册、实施和报告过程中, 应更加重视并严格执行上述关键因素, 以确保研究结果的有效性和可靠性, 提高其科学价值和临床应用潜力。

3.3 发表偏倚带来的挑战

早期, *Nature* 已刊文^[19] 强调, 相比于临床试验, 动物实验中存在的发表偏倚现象更为突出。多项系统评价^[50-51] 亦披露了动物研究间潜在的发表偏倚。因动物实验研究通常涉及较大的资源和时间成本, 研究者更倾向于发布阳性结果, 这种趋势导致发表的论文可能无法代表整个研究领域的真实情况, 从而进一步对二次证据整合造成乐观估计。为应对这一风险, 研究者需要采用严格的纳入与排除标准, 并使用透明、可重复的方法学工具与发表偏倚检测来确保纳入动物研究的质量与可信度。此外, 通过综合分析多项研究的结果, 即使用证据图谱能够提供更为全面的证据概览, 有助于揭示领域内真实的研究现状与未来的研究方向。

3.4 动物实验与临床研究的实践差距

动物实验和临床研究作为医学研究的两大支柱^[52], 都致力于推动医学科学的发展并改善人类健康, 但在实践中仍存在显著差异。这些差异表现在多个方面: 首先, 由于伦理、法规及社会接受度的限制, 一些复杂的临床问题可能无法在动物模型中得到完全模拟的研究条件; 其次, 多数系统评价^[53-54] 发现, 尽管动物实验在模拟疾病状态方面具有价值, 但其难以准确映射到同一疾病的临床研究中, 特别是在实验设计、结局指标及效应结果等方面存在差异。为弥补这一差距, 研究者需要努力提高动物实验的相关性和实用性, 建立标准化的实验核心指标集, 以促进动物实验与临床试验之间的对接, 确保研究成果能够更直接地指导临床研究设计与决策。例如, 可通过改进实验设计、增加样本量、使用更接近人类的动物模型等方法来提高研究成果的转化效率。此外, 加强跨学科合作变得日益重要, 有助于整合不同领域的知识和技

术,以促进从实验室到临床应用的有效过渡。

4 总结

动物实验作为生物医学研究的重要一环,在疾病机制探索、新药开发和治疗方法评估中发挥了关键作用。然而,动物实验证据的有效整合对于提升研究透明度、可靠性及临床相关性至关重要。选择适宜的动物模型是确保研究结果有效性和转化潜力的前提,研究设计需综合考虑疾病特性、生理反应和药物代谢途径等因素。同时,采用随机化方法、盲法实施和对照组设置等是减少偏倚、提高研究质量的重要方法。

系统评价和Meta分析是目前动物研究领域证据整合的主要方法,为深入分析和整合动物实验数据提供了严谨的方法学途径。此外,系统评价再评价/伞形综述、范围综述和证据图谱等方法不仅提升了动物实验科学证据对临床研究的指导价值,还有助于揭示不同研究结果的可转换性与局限性。尽管如此,动物实验证据整合过程中仍存在诸多挑战,包括研究者对该领域的重视程度不足、研究设计的异质性、数据共享难题、统计方法限制以及高发表偏倚等问题。此外,动物实验与临床研究之间仍存在一定的实践差距,这需要提升动物实验的相关性和实用性,并通过建立标准化的核心指标集以促进两者的有效衔接。

综上所述,本文全面审视了动物实验证据整合的研究进展、面临的挑战及可能的改进策略。动物实验证据整合是一项充满挑战的任务,通过不断优化原始实验研究方案与证据整合实践,有望在实现更高效、更科学的证据整合方面取得突破,提升动物实验在生物医学研究中的转化效能,为人类健康事业作出更显著的贡献。

[作者贡献 Author Contribution]

郑卿勇撰写并修改论文;

李腾飞、许建国和周泳佳负责数据整理与图表绘制;

马智超、王娜、李莫兰、杨雯景、吴佩润与王海东负责资料收集与检索;

田金徽构建论文框架,并指导核定文稿。

[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] 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. An overview of laboratory 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.

[2] SANDERCOCK P, ROBERTS I. Systematic reviews of animal experiments[J]. Lancet, 2002, 360(9333): 586. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)09812-4.

[3] 贺争鸣,邢瑞昌,方喜业,等.论实验动物福利、动物实验与动物实验替代方法[J].实验动物科学与管理,2005,22(1):61-64. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2005.01.021.
HE Z M, XING R C, FANG X Y, et al. Laboratory animal welfare, animal experiment and replacement method[J]. Lab Anim Sci Adm, 2005, 22(1): 61-64. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2005.01.021.

[4] HOOIJMANS C R, ROVERS M M, DE VRIES R B M, et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies[J]. BMC Med Res Methodol, 2014, 14:43. DOI: 10.1186/1471-2288-14-43.

[5] 陈匡阳,王亚楠,赵雅琴,等.国内动物实验系统评价/Meta分析研究的现状分析[J].中国循证医学杂志,2015,15(4):414-418. DOI: 10.7507/1672-2531.20150070.
CHEN K Y, WANG Y N, ZHAO Y Q, et al. Analyzing the systematic review/meta-analysis of animal studies published in Chinese journals[J]. Chin J Evid Based Med, 2015, 15(4):414-418. DOI: 10.7507/1672-2531.20150070.

[6] 尚志忠,姜彦彪,赵冰,等.动物实验Meta分析的数据处理[J].中国循证心血管医学杂志,2019,11(12):1437-1440,1445. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.12.06.
SHANG Z Z, JIANG Y B, ZHAO B, et al. Data processing of Meta-analysis in animal studies[J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2019, 11(12):1437-1440, 1445. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.12.06.

[7] HOOIJMANS C R, INTHOUT J, RITSKES-HOITINGA M, et al. Meta-analyses of animal studies: an introduction of a valuable instrument to further improve healthcare[J]. ILAR J, 2014, 55(3):418-426. DOI: 10.1093/ilar/ilu042.

[8] VESTERINEN H M, SENA E S, EGAN K J, et al. Meta-analysis of data from animal studies: a practical guide[J]. J Neurosci Methods, 2014, 221: 92-102. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.09.010.

[9] 曾茂贵,郑沁鈞.中药药理研究中候证动物模型的选择和应用[J].福建中医药,2007,38(3):60-62. DOI: 10.3969/j.issn.1000-338X.2007.03.043.
ZENG M G, ZHENG Q X. Selection and application of syndrome animal model in pharmacological research of traditional Chinese medicine[J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2007, 38(3):60-62. DOI: 10.3969/j.issn.1000-338X.2007.03.043.

[10] 胡凯燕,邢丽娜,姜彦彪,等.促进临床前动物实验系统评价发展,提高其成果的转化和利用[J].中国循证心血管医学杂志,2019,11(12):1423-1425. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.12.03.
HU K Y, XING L N, JIANG Y B, et al. Promoting the development of preclinical animal experimental systematic reviews, and improving the transformation and utilization of its results[J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2019, 11(12): 1423-1425. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2019.12.03.

[11] VAMATHEVAN J J, HALL M D, HASAN S, et al. Minipig and beagle animal model genomes aid species selection in pharmaceutical discovery and development[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 270(2): 149-157. DOI: 10.1016/j.taap.2013.04.007.

[12] 刘晓辰,付维力.骨关节炎动物模型的选择[J].中国组织工程研究,2020,24(11):1769-1776. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.1995.
LIU X C, FU W L. Selection of animal models of osteoarthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(11): 1769-1776. DOI: 10.

- 3969/j.issn.2095-4344.1995.
- [13] 中国研究型医院学会医学动物实验专家委员会. 自发性脑出血动物模型选择及临床前药物试验指南(2024年版)[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1):3-30. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.001.
Committee of Experts on Medical Animal Experiments, Chinese Research Hospital Association. Guidelines for the selection of animal models and preclinical drug trials for spontaneous intracerebral hemorrhage (2024 edition)[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1):3-30. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.001.
- [14] 吴玥, 王珏, 冯婷婷, 等. 基于动物模型的药物筛选数据库的建立[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6):778-786. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.06.010.
WU Y, WANG J, FENG T T, et al. Construction of a drug screening database based on animal models[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2023, 31(6):778-786. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.06.010.
- [15] 丁雪梅, 白春艳, 张晓娟, 等. 动物科学和动物医学专业常用的试验设计方法的选择[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(6):37-44. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2019.09.0261.
DING X M, BAI C Y, ZHANG X J, et al. Selection of commonly used experimental design methods in animal science and veterinary medicine[J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2020(6):37-44. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2019.09.0261.
- [16] 邹华, 田东波, 刘春磊, 等. 不同剂量红霉素在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化中的疗效观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(18):16-18, 199. DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2017.18.007.
ZOU H, TIAN D B, LIU C L, et al. Therapeutic effect of erythromycin in different doses on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2017, 27(18):16-18, 199. DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2017.18.007.
- [17] PERCIE DU SERT N, HURST V, AHLUWALIA A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research[J]. PLoS Biol, 2020, 18(7): e3000410. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000410.
- [18] PERCIE DU SERT N, 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.
- [19] LANDIS S C, AMARA S G, ASADULLAH K, et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research[J]. Nature, 2012, 490(7419):187-191. DOI: 10.1038/nature11556.
- [20] 胡锴克, 徐冶. 人源化动物模型的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2021, 42(1):42-44.
HU K K, XU Y. Research progress of humanized animal model [J]. J Jilin Med Univ, 2021, 42(1):42-44.
- [21] 路群, 顾觉奋. 药物高通量筛选技术应用研究进展[J]. 今日药学, 2010, 20(2):2-5, 15. DOI: CNKI:SUN:YAXU.0.2010-02-005.
LU Q, GU J F. Research progress on the application of drug Qualcomm screening technology[J]. Pharm Today, 2010, 20(2):2-5, 15. DOI: CNKI:SUN:YAXU.0.2010-02-005.
- [22] 袁顺, 王宁, 孟丹丹, 等. 系统生物学在中医证候模型评价方法中的应用与研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(10):1252-1257. DOI: 10.7661/j.cjim.20200904.335.
YUAN S, WANG N, MENG D D, et al. Application and progress of systems biology in evaluation of TCM syndrome models[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2020, 40(10):1252-1257. DOI: 10.7661/j.cjim.20200904.335.
- [23] POUND P, EBRAHIM S, SANDERCOCK P, et al. Where is the evidence that animal research benefits humans? [J]. BMJ, 2004, 328(7438):514-517. DOI: 10.1136/bmj.328.7438.514.
- [24] PERNA A, REMUZZI G. Abnormal permeability to proteins and glomerular lesions: a meta-analysis of experimental and human studies[J]. Am J Kidney Dis, 1996, 27(1):34-41. DOI: 10.1016/s0272-6386(96)90028-1.
- [25] ALONSO S, DOHOO I, LINDAHL J, et al. Prevalence of tuberculosis, brucellosis and trypanosomiasis in cattle in Tanzania: a systematic review and meta-analysis[J]. Anim Health Res Rev, 2016, 17(1):16-27. DOI: 10.1017/S146625231600013X.
- [26] INCHUAI R, WEERAKUN S, NGUYEN H N, et al. Global prevalence of chlamydial infections in reptiles: a systematic review and meta-analysis[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2021, 21(1):32-39. DOI: 10.1089/vbz.2020.2654.
- [27] POMMERGAARD H C, ROSENBERG J, SCHUMACHER-PETERSEN C, et al. Choosing the best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review[J]. Eur Surg Res, 2011, 47(3):173-181. DOI: 10.1159/000330748.
- [28] CIAPPONI A, BARDACH A, MAZZONI A, et al. Safety of components and platforms of COVID-19 vaccines considered for use in pregnancy: a rapid review[J]. Vaccine, 2021, 39(40):5891-5908. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.08.034.
- [29] YAO M, YANG L, WANG J, et al. Neurological recovery and antioxidant effects of curcumin for spinal cord injury in the rat: a network meta-analysis and systematic review[J]. J Neurotrauma, 2015, 32(6):381-391. DOI: 10.1089/neu.2014.3520.
- [30] HIRST J A, HOWICK J, ARONSON J K, et al. The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98856. DOI: 10.1371/journal.pone.0098856.
- [31] GARDNER E G, KELTON D, POLJAK Z, et al. A rapid scoping review of Middle East respiratory syndrome coronavirus in animal hosts[J]. Zoonoses Public Health, 2019, 66(1):35-46. DOI: 10.1111/zph.12537.
- [32] KOCH S E, DE KORT B J, HOLSHUIJSEN N, et al. Animal studies for the evaluation of in situ tissue-engineered vascular grafts - a systematic review, evidence map, and meta-analysis[J]. NPJ Regen Med, 2022, 7(1):17. DOI: 10.1038/s41536-022-00211-0.
- [33] MOOLA S, BERI D, SALAM A, et al. Leptospirosis prevalence and risk factors in India: evidence gap maps[J]. Trop Doct, 2021, 51(3):415-421. DOI: 10.1177/00494755211005203.
- [34] 熊玮, 魏强, 刘雪梅. 动物实验研究的系统评价简介[J]. 中国循证医学杂志, 2005, 5(2):161-163, 173. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2531.2005.02.016.
XIONG W, WEI Q, LIU X M. Introduction to systematic reviews of animal studies[J]. Chin J Evid Based Med, 2005, 5(2):161-163, 173. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2531.2005.02.016.
- [35] 赵霏, 唐晓宇, 寇城坤, 等. 动物实验系统评价/Meta分析的质量和报告特征[J]. 中国循证医学杂志, 2018, 18(8):871-877. DOI: 10.

- 7507/1672-2531.201803091.
ZHAO F, TANG X Y, KOU C K, et al. Methodological and reporting quality of systematic review/meta-analysis of animal studies[J]. *Chin J Evid Based Med*, 2018, 18(8):871-877. DOI: 10.7507/1672-2531.201803091.
- [36] 陈匡阳, 屈丽娜, 胡芳, 等. 动物实验系统评价/Meta分析检索策略报告情况调查[J]. *中国循证医学杂志*, 2016, 16(3):348-353. DOI: 10.7507/1672-2531.20160054.
CHEN K Y, QU L N, HU F, et al. The search strategy of systematic review/meta-analysis of animal research: a survey [J]. *Chin J Evid Based Med*, 2016, 16(3):348-353. DOI: 10.7507/1672-2531.20160054.
- [37] 许家科, 赵璐璐, 廖绪亮, 等. 循证构建动物实验系统评价制作流程[J]. *中国循证医学杂志*, 2017, 17(11):1357-1364. DOI: 10.7507/1672-2531.201707133.
XU J K, ZHAO L L, LIAO X L, et al. Systematic development of a standard process for systematic reviews of animal experimental studies[J]. *Chin J Evid Based Med*, 2017, 17(11): 1357-1364. DOI: 10.7507/1672-2531.201707133.
- [38] 赵冰, 胡凯燕, 曾宪涛, 等. 中医药动物实验系统评价的报告指南[J]. *中国循证医学杂志*, 2022, 8(5):508-516. DOI:10.7507/1672-2531.202201116.
ZHAO B, HU K Y, ZENG X T, et al. Reporting guideline for systematic reviews of animal experiments in the field of traditional Chinese medicine[J]. *Chin J Evid Based Med*, 2022, 8(5):508-516. DOI:10.7507/1672-2531.202201116.
- [39] 刘曼, 陈文松, 刘玉秀, 等. 单组率研究稀疏数据的Meta分析方法[J]. *中国循证儿科杂志*, 2020, 15(6):471-475. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5501.2020.06.016.
LIU M, CHEN W S, LIU Y X, et al. Meta-analysis method of sparse data in single group rate research[J]. *Chin J Evid Based Pediatr*, 2020, 15(6): 471-475. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5501.2020.06.016.
- [40] 赵景波. 累积Meta分析方法及其在临床医学研究中的应用[J]. *循证医学*, 2002, 2(3): 167-171. DOI: 10.3969/j.issn.1671-5144.2002.03.020.
ZHAO J B. Cumulative meta-analysis method and its application in research of clinical medicine[J]. *J Evid Based Med*, 2002, 2(3): 167-171. DOI: 10.3969/j.issn.1671-5144.2002.03.020.
- [41] SONG F J, LOKE Y K, WALSH T, et al. Methodological problems in the use of indirect comparisons for evaluating healthcare interventions: survey of published systematic reviews[J]. *BMJ*, 2009, 338: b1147. DOI: 10.1136/bmj.b1147.
- [42] GATES M, GATES A, PIEPER D, et al. Reporting guideline for overviews of reviews of healthcare interventions: development of the PRIOR statement[J]. *BMJ*, 2022, 378: e070849. DOI: 10.1136/bmj-2022-070849.
- [43] COLQUHOUN H L, LEVAC D, O'BRIEN K K, et al. Scoping reviews: time for clarity in definition, methods, and reporting [J]. *J Clin Epidemiol*, 2014, 67(12): 1291-1294. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2014.03.013.
- [44] SNILSTVEIT B, VOJTKOVA M, BHAVSAR A, et al. Evidence & Gap Maps: a tool for promoting evidence informed policy and strategic research agendas[J]. *J Clin Epidemiol*, 2016, 79:120-129. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2016.05.015.
- [45] 李艳飞, 李秀霞, 李睿, 等. 证据图谱的制作与报告[J]. *中国循证医学杂志*, 2020, 20(9): 1098-1103. DOI: 10.7507/1672-2531.202001079.
LI Y F, LI X X, LI R, et al. Generation and reporting of evidence mapping[J]. *Chin J Evid Based Med*, 2020, 20(9): 1098-1103. DOI: 10.7507/1672-2531.202001079.
- [46] 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.
- [47] SMITH A J, CLUTTON R E, LILLEY E, et al. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing[J]. *Lab Anim*, 2018, 52(2):135-141. DOI: 10.1177/0023677217724823.
- [48] ZHU X, LIU Q, CAO M Q, et al. Reporting quality and risk of bias assessment of animal research on Chaihu-Shugan-San for depression: a systematic review[J]. *Heliyon*, 2023, 9(8): e19232. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e19232.
- [49] MARTIĆ-KEHL M I, WERNERY J, FOLKERS G, et al. Quality of animal experiments in anti-angiogenic cancer drug development: a systematic review[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137235. DOI: 10.1371/journal.pone.0137235.
- [50] LIU J Y, DAI Y, HE Y X, et al. Effect of berberine on cognitive function and β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease models: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1301102. DOI: 10.3389/fphar.2023.1301102.
- [51] FU Z M, SU X J, ZHOU Q, et al. Protective effects and possible mechanisms of catalpol against diabetic nephropathy in animal models: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1192694. DOI: 10.3389/fphar.2023.1192694.
- [52] 翁鸿, 王颖, 李柄辉, 等. 系统评价与Meta分析的类型及制作步骤[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2019, 40(2):248-253. DOI: 10.16118/j.1008-0392.2019.02.022.
WENG H, WANG Y, LI B H, et al. Types and steps of systematic review and meta-analysis: a brief introduction[J]. *J Tongji Univ Med Sci*, 2019, 40(2): 248-253. DOI: 10.16118/j.1008-0392.2019.02.022.
- [53] MANDALIA K, MOUSAD A, WELBORN B, et al. Scaffold- and graft-based biological augmentation of rotator cuff repair: an updated systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies for 2010-2022[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2023, 32(9):1784-1800. DOI: 10.1016/j.jse.2023.03.031.
- [54] WU Y, LI T L, LI P C, et al. Effects of Shenmai injection against chronic heart failure: a meta-analysis and systematic review of preclinical and clinical studies[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1338975. DOI: 10.3389/fphar.2023.1338975.

(收稿日期:2024-06-03 修回日期:2024-08-08)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,干明红)

引用本文

- 郑卿勇, 李腾飞, 许建国, 等. 动物实验研究证据整合方法的进展与挑战[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 567-576. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.079.
- ZHENG Q Y, LI T F, XU J G, et al. Advances and challenges in the research of integration methods of animal experimental evidence [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 567-576. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.079.

动物实验与比较医学研究论文出版规范清单(2024年版)

《实验动物与比较医学》编辑委员会

[摘要] 动物实验与比较医学研究论文的规范性、透明性和完整性直接关系到该研究成果的可信度、可重复性和临床转化率。国际上用以规范动物实验研究及报告的指导性文件有 ARRIVE 指南等, 中国也已有较为完整的用于规范实验动物科技工作的相关法规条例和标准体系, 然而这些已有文件对中国学者开展动物体内实验研究论文写作及出版工作仍缺少具体、可行的操作指导。因此, 《实验动物与比较医学》编辑委员会在借鉴 ARRIVE 2.0 指南和中国法规条例及标准的基础上, 牵头制定了适合中国学者使用的动物实验与比较医学研究论文出版规范清单。该清单适用于作者撰稿及投稿时自查、同行专家评议时审查、期刊编辑出版前核查, 以及发表后的读者评价等, 可以有效促进中国实验动物与比较医学研究的规范化和高质量发展。

[关键词] 动物实验; 比较医学; 原创性论著; 出版规范; 检查清单

[中图分类号] R-332; Q95-33; G237.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)05-0577-06



Guideline Checklist for Publishing Research Papers on Animal Experimentation and Comparative Medicine in China (2024 Edition)

Editorial Board of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*

Correspondence to: ZHANG Junyan (ORCID: 0000-0001-6007-9062), E-mail: callar_zhang@163.com

[ABSTRACT] The standardization, transparency, and completeness of research papers in animal experimentation and comparative medicine research are crucial for ensuring the credibility, reproducibility, and clinical applicability of research findings. Internationally recognized guidelines, such as the ARRIVE guidelines, serve to standardize animal experimentation and reporting. In China, there is already a comprehensive framework of regulations and standards governing laboratory animal research. However, the practical guidance in these documents remains insufficient to effectively guide Chinese researchers in writing and publishing *in vivo* animal research papers. To address this gap, the Editorial Board of Laboratory Animals and Comparative Medicine has developed a checklist of publication standards tailored for Chinese scholars, informed by the ARRIVE 2.0 guidelines and Chinese regulations and standards. This checklist is applicable for authors to self-check during manuscript preparation and submission, for peer experts during the review process, for journal editors in pre-publication verification, and for readers to evaluate published works. It aims to effectively promote the standardization and high-quality development of laboratory animal and comparative medicine research in China.

[Key words] Animal experiments; Comparative medicine; Original research papers; Publication standards; Checklist

1 制订背景

实验动物与比较医学研究是生物医药等领域的基础支撑性工作。动物实验的规范性不仅决定着相关研究结果的可靠性、可重复性和可转化率, 而且体现了动物实验科技伦理的遵循程度。为了提高动物实验研究及其报告的科学性、规范性和透明性, 国外机构或

组织制定了包括 ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments)^[1] 在内的若干指南。2023—2024年, 《实验动物与比较医学》编辑部组织国内专家对 ARRIVE 2.0 指南进行了详细解读^[2-7], 受到了国内读者的广泛关注。但是, 由于国情及语言差异, 国内学者在动物实验与比较医学研究设计及论文写作过程中, 应用 ARRIVE 2.0 指南还存在一定的实际困难。

[基金项目] 国家重点研发计划“实验动物共性关键质量评价技术标准研究”(2022YFF0711000); 中国科学技术期刊编辑学会 2023 年翰笔计划医学中青年编辑科研项目“动物实验医学研究及报告规范化的国际对标(指南汉化推广)”(HBJH-2023-A16)

[通信作者] 张俊彦(1979—), 女, 硕士, 副编审, 研究方向: 医学期刊出版。E-mail: callar_zhang@163.com。ORCID: 0000-0001-6007-9062

2 制订依据

在中国,用以规范实验动物管理和动物实验研究的法律法规和标准体系已经较为完整。现有的国家法规条例包括2017年科学技术部修订的《实验动物管理条例》、2020年全国人民代表大会常务委员会审议后发布的《中华人民共和国生物安全法》、2023年国家六部委及中国科学院等机构联合发布的《科技伦理审查办法(试行)》等。此外,还有诸多的国家、地方、行业及团体标准,其中,国家标准分为强制性和推荐性两种:强制性国家标准包括《实验动物 遗传质量控制》(GB 14923—2022)、《实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测》(GB 14922—2022)、《实验动物 环境及设施》(GB 14925—2023)、《实验动物 配合饲料营养成分》(GB 14924.3—2010);推荐性国家标准包括《实验动物 动物实验通用要求》(GB/T 35823—2018)和《实验动物 福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等。上述法规、标准的发布和实施有效促进了中国实验动物生产和使用的规范化,但对于动物实验研究及论文出版工作仍缺乏具体、详细的可操作性指导。因此,《实验动物与比较医学》编辑委员会联合上海市实验动物学会、北京实验动物学学会、福建省实验动物学会、陕西省实验动物学会、青海省实验动物协会、山西省实验动物学会等的专家学者,在参考ARRIVE 2.0指南^[2-7]和国内相关法规、标准^[8-20]的基础上,拟订了一份可以用于规范实验动物与比较医学研究论文写作、投稿、审稿、出版的清单(表1),以便国内开展动物实验的研究人员和期刊编审者使用。

3 适用范围

需要说明,这是一份专门针对动物实验与比较医学研究论文(即基于动物体内实验的原创性研究论文,非文献综述及经验交流类论文)的中文审查清单,按照国内生物医学类期刊出版论文结构的先后顺序来罗列相关条目,并建议了各条目的遵从性级别(分为必要和推荐共两个等级),可供广大作者、审者、编者和读者使用。本清单的适用场景包括:(1)作者撰写论文及投稿前自查;(2)同行评议专家外审、编委终审时审查;(3)期刊编辑初审、加工、校对时核查;(4)发表后读者及相关机构评价;(5)研究人员在实验设计阶段参考。因此,使用者可对照本清单,在各条目前的“是”或“否”选项上打钩——必要条目应全部符合,推荐条目应尽可能符合,以此判断该动物实验研究是否规范且符合科技伦理,论文是否符合期刊出版要求,研究成果是否可信、可借鉴。

4 实施计划

本清单一经发表,将用于《实验动物与比较医学》期刊的作者投稿前自查、投稿后三审核查和出版前三校复查,敬请广大作者、审稿专家和编委知悉。同时,欢迎广大生物医学期刊工作者参考借鉴本清单,以共同促进中国实验动物与比较医学研究的规范化和高质量发展。

【作者贡献 Author Contribution】

本文属于集体成果,具体参与人员及其贡献详见文末名单。

【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] 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.
- [2] 张俊彦, 刘晓宇, 李焱, 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.
- [3] 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.
- [4] 陈国元, 卢晓, 白玉, 等. «动物研究: 体内实验报告»即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述(二)[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 323-331. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.042. CHEN G Y, LU X, BAI Y, et al. Explanation and elaboration of the ARRIVE guidelines 2.0—reporting animal research and *in vivo* experiments(II)[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3):323-331. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.042.
- [5] 刘晓宇, 卢选成, 师晓萌, 等. «动物研究: 体内实验报告»即ARRIVE 2.0指南的解释与阐述(三)[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4):446-456. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.039. LIU X Y, LU X C, SHI X M, et al. Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0—reporting animal research and *in vivo* experiments(III)[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4):446-456. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.039.
- [6] 李夏莹, 田永路, 刘晓宇, 等. «动物研究: 体内实验报告»即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述(四)[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(6):659-668. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.142. LI X Y, TIAN Y L, LIU X Y, et al. Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0—reporting animal research and *in vivo* experiments(IV)[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(6): 659-668. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.142.

表1 动物实验与比较医学研究论文的投稿自查、审稿核查和出版规范清单

Table 1 Checklist for submission, reviews, and publication standards of animal experimentation and comparative medicine research paper

论文结构 Paper structure	项目 Item	条目内容 Content	编号 No.	等级 Grade	备注 Note
题目及摘要 Title and Abstract	题目	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 体现动物实验或比较医学研究,如列出动物种类或模型类型	1.1	必要	中英文对照
	作者及单位	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 包含实验动物专门从业人员及专业机构	1.2(T)	推荐	作者贡献与责任相当
	摘要	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 包含研究目的、实验方法(含使用动物的品种品系及数量、动物模型建立及使用分组、检测或分析方法等关键信息)、主要结果和研究结论	1.3	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第1条;结构化长摘要,中英文对照
	关键词	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 包含实验动物相关信息,如动物种类或模型类型等	1.4	必要	中英文对照
前言 Preface	研究背景	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 充分表述研究背景或依据,包括以往研究进展、动物实验及本研究的必要性、所用动物种类及模型的选择理由等	2.1	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第2条
	研究目标	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 说明本研究类型、目标(解决什么科学问题或验证什么假设)、比较医学意义或实际应用价值	2.2	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第3条
材料与amp;方法 Materials and Methods	实验动物	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 描述使用动物的品种品系(含亚系)、数量、性别、年龄(或发育阶段、生理状态)、体重、微生物控制等级、动物来源单位及其生产许可证号(或野生动物驯养繁殖许可证)、健康或免疫状态、基因修饰状态(如基因型)等信息	3.1	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第8条
	饲养场所及条件	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 描述动物实验所在设施的单位名称及其使用许可证号、动物饲养和实验的环境设施条件(如普通环境/屏障环境/隔离环境、温度、湿度、光照等)、饲料及饮水	3.2	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第5条
	实验方案审查	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 陈述动物实验方案及过程的审批机构(如实验动物福利伦理委员会)名称及审批号	3.3	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第9条
	试剂及仪器	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 描述主要试剂和仪器的名称、规格/型号、来源(如厂家名称)等	3.4.1	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第9条
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供试剂(如抗体)和器械批号,以及特殊试剂的配制方法和关键仪器的设置参数	3.4.2(T)	推荐	
	研究设计	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 清晰表述实验分组,包括设置对照(如正常对照、模型对照、阴性及阳性处理对照)、说明分组原则(若有随机分组,需说明随机化分组的方法)和各组处理方法等	3.5.1	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第1和第4条
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 说明降低潜在影响因素(如手术操作人员,处理、采样及测量顺序,动物或笼具位置等)的策略(如标准化、随机化、均衡化、盲法等)	3.5.2(T)	推荐	参照 ARRIVE 2.0 关键第4条
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 说明每个实验及各组内实验单元、动物(包括性别比)、采集或分析样本的数量	3.5.3	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第2条
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 说明动物数/样本量的确定依据,包括生物统计软件或算法、效应量、变异性指标、检验效能或参考文献等	3.5.4(T)	推荐	
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 说明实验单元/动物纳入及排除标准,以及结果分析时数据的纳入及排除标准,需提前设定	3.5.5(T)	推荐	参照 ARRIVE 2.0 关键第3条
实验方法	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 说明如何采用盲法分析各组实验结果数据	3.5.6(T)	推荐	参照 ARRIVE 2.0 关键第5条	
	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 列出实验流程示意图	3.5.7(T)	推荐	中英文对照	
	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 详细描述关键的实验细节(含动物模型制作、评价及使用过程),包括使用材料、采用方法、操作步骤,以及处理时间和频次,给药名称、浓度、体积/剂量及途径,外科手术过程、麻醉剂名称及剂量/剂型等	3.6.1	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第9条;须有可重复性	
	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 描述照顾和护理动物的方法,包括为减轻动物痛苦或紧张而采取的干预性措施,如术前、术中、术后的镇静、镇痛、麻醉、护理和给药方法等	3.6.2	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第6条	
	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 说明实验及观测周期、人道终点设置标准、安乐死时机和方法等	3.6.3	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第9条和推荐第6条	

续表

论文结构	项目	条目内容	编号	等级	备注
Paper structure	Item	Content	No.	Grade	Note
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 说明各实验结果的观察或测量指标及其检测频率,需要时给出清晰定义	3.6.4	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第6条
	统计方法	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 选用合适的统计学分析方法,说明软件名称及版本、实验结果数据表示方法、组间及组内比较方法(参数或非参数检验)、显著性水平等	3.7	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第7条
结果 Results	实验结果	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 报告每个实验组剔除或缺失的动物数/样本量/数据量,并说明原因,以及各实验最终纳入统计分析的实验单元数、动物数、样本量或检测数据量	4.1.1	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第3和第6条
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 报告任何预期或非预期的不良事件,并分析原因	4.1.2(T)	推荐	参照 ARRIVE 2.0 推荐第6条
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 详细描述每个实验组的结果,包括定性描述和定量分析数据及统计学差异	4.1.3	必要	参照 ARRIVE 2.0 关键第10条
	图表呈现	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 列出反映实验结果的图和表,并标示其统计学意义及样本量,提供具有自明性的图/表标题和注解	4.2.1	必要	中英文对照
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供原始数据、原始照片、记录视频等更多证据	4.2.2(T)	推荐	用于审稿判断
讨论 Discussion	解析/科学阐释	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 结合本研究目标或假设、现有理论或其他文献来解释本研究结果的科学含义,说明本研究相比以往/他人研究的异同和优势,以及现有局限性(如有)和未来研究计划	5.1	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第7条
	可推广性/转化价值	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 讨论本研究结果推广至其他物种或其他实验条件的可能性,以及比较医学意义和转化为人体临床应用的价值	5.2(T)	推荐	参照 ARRIVE 2.0 推荐第8条
声明 Statements	科技伦理声明	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 文末列出动物实验伦理声明,包括审查机构及其他伦理委员会名称、审批号、遵循实验动物福利伦理相关法规、标准和指南等	6.1	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第4条;中英文对照
	作者贡献及利益冲突声明	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 文末列出所有作者的具体贡献,以及说明任何潜在的利益冲突,包括作者与利益相关单位的从属关系、该研究或产品涉及专利等相关信息	6.2	必要	参照 ARRIVE 2.0 推荐第11条;中英文对照
	数据共享声明	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 文末说明本研究更多数据的开放性获取平台和共享方式	6.3(T)	推荐	参照 ARRIVE 2.0 推荐第10条
	致谢	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 文末列出非作者的贡献人(如有)并经得被致谢人知情同意,若使用人工智能辅助工具也应列入致谢说明	6.4(T)	推荐	
参考文献 References	参考文献	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 引用必要、准确、充足的近年参考文献,其中最近3年的应占比50%以上	7.1	必要	尽量引用高质量的一手文献
证明材料 Supporting materials	科技伦理审查证明	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供实验动物福利伦理审批件,且获批项目名称、起止时间、实验人员、实验动物品种品系及数量、实验方法及为考虑动物福利的相关操作要点、审批通过的公章等信息与本文吻合	8.1	必要	需在实验开始前获得
	实验动物质量合格证明	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供实验动物生产许可证和实验动物质量合格证,且证书有效期限、动物种类、微生物和寄生虫学等级等信息与本文吻合	8.2	必要	如不能提供,需说明理由
	动物实验环境设施合格证明	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供实验动物使用许可证,且证书有效期限、使用动物种类、环境设施等级等信息与本文吻合	8.3	必要	如不能提供,需说明理由
	其他	是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供经济动物检疫合格证(如涉及)、野生动物驯养繁育许可证(如涉及)、境外来源的实验动物审批证明(如涉及)、基金支持证明文件(如涉及)	8.4.1	必要	按需提供
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供第一作者单位介绍信(盖章)	8.4.2	必要	可用期刊自定义模板,
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供作者贡献声明	8.4.3	必要	如实填报
		是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 提供利益冲突声明	8.4.4	必要	

- [7] 马政文, 李夏莹, 刘晓宇, 等. «动物研究: 体内实验报告»即 ARRIVE 2.0 指南的解释和阐述(五)[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(1):105-114. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.146. MA Z W, LI X Y, LIU X Y, et al. The interpretation and elaboration of animal research: experimental report *in vivo*, namely the guide of ARRIVE 2.0 (V)[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(1):105-114. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.146.
- [8] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 遗传质量控制: GB 14923—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022. State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal—Genetic quality control: GB 14923-2022[S]. Beijing: China Standards Press, 2022.
- [9] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测: GB 14922—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022. State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal—Microbiological and parasitological standards and monitoring: GB 14922-2022[S]. Beijing: China Standards Press, 2022.
- [10] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 环境及设施: GB 14925—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023. State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal—Environment and housing facilities: GB 14925-2023[S]. Beijing: China Standards Press, 2023.
- [11] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 配合饲料营养成分: GB 14924.3—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China; Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animals - Nutrients for formula feeds: GB 14924.3-2010[S]. Beijing: China Standards Press, 2010.
- [12] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 福利通则: GB/T 42011—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022. State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animals—General code of animal welfare: GB/T 42011-2022[S]. Beijing: China Standards Press, 2022.
- [13] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 动物实验生物安全通用要求: GB/T 43051—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023. State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal—General requirements for biosafety in animal experiment: GB/T 43051-2023[S]. Beijing: China Standards Press, 2023.
- [14] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 动物实验通用要求: GB/T 35823—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China; Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animals - General requirements for animal experiment: GB/T 35823-2018[S]. Beijing: China Standards Press, 2018.
- [15] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 福利伦理审查指南: GB/T 35892—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China; Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal—Guideline for ethical review of animal welfare: GB/T 35892-2018[S]. Beijing: China Standards Press, 2018.
- [16] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 术语: GB/T 39759—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Laboratory animal—Terminology: GB/T 39759-2021[S]. Beijing: China Standards Press, 2021.
- [17] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 质量控制要求: GB/T 34791—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China; Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal - Requirement for quality control: GB/T 34791-2017[S]. Beijing: China Standards Press, 2017.
- [18] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物机构 质量和能力的通用要求: GB/T 27416—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China; Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal institutions—General requirements for quality and competence: GB/T 27416-2014[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.
- [19] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 安乐死指南: GB/T 39760—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal—Guidelines for euthanasia: GB/T 39760-2021[S]. Beijing: China Standards Press, 2021.
- [20] 中国实验动物学会. 实验动物 动物实验报告指南: T/CALAS 5—2017[S]. 北京: 科学出版社, 2017. Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal—Guideline for animal experiment report: T/CALAS 5-2017[S]. Beijing: Science Press, 2017.

(收稿日期: 2024-09-29 修回日期: 2024-10-21)

(本文编辑: 丁宇菁, 富群华)

[引用本文]

《实验动物与比较医学》编辑委员会. 动物实验与比较医学研究论文出版规范清单(2024年版)[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 577-582. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.149. Editorial Board of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*. Guideline checklist for publishing research papers on animal experimentation and comparative medicine in China (2024 edition) [J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(5): 577-582. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.149.

《动物实验与比较医学研究论文出版规范清单（2024年版）》

制订专家组名单

执笔:

张俊彦(《实验动物与比较医学》编辑部)

修订:

白玉(北京诺和诺德医药科技有限公司)

包晶晶(西湖大学)

常在(清华大学生命科学学院)

陈国元(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)

戴建军(上海市农业科学院畜牧兽医研究所)

高静(上海交通大学医学院)

高巍(吉林大学)

韩凌霞(上海实验动物研究中心)

何远清(中国医学科学院系统医学研究院)

和占龙(中国医学科学院医学生物学研究所)

黄镇(福建中医药大学)

赖国旗(重庆医科大学)

郎廷元(重庆医科大学附属第一医院)

黎明(英威沃(上海)生物科技有限公司)

李文德(广东省科技合作研究促进中心)

刘晓宇(中国疾病预防控制中心职业卫生所)

刘忠华(华南农业大学)

卢晓(迪哲医药股份有限公司)

卢选成(中国疾病预防控制中心)

陆尔奕(上海交通大学医学院附属仁济医院)

罗小泉(江西中医药大学)

吕龙宝(中国科学院昆明动物研究所)

潘学营(上海益诺思生物技术股份有限公司)

庞晓斌(河南大学)

师长宏(空军军医大学)

陶元清(青海省实验动物中心)

王刚(广东省医学实验动物中心)

王可洲(山东第一医科大学)

王玉娥(西南大学)

谢淑武(上海实验动物研究中心)

闫明霞(复旦大学附属肿瘤医院)

杨利峰(中国农业大学)

杨玉琴(上海市第一人民医院)

于志锋(上海交通大学医学院附属第九人民医院)

张泉(扬州大学)

张笑人(广州医科大学附属肿瘤医院)

周晓辉(上海市公共卫生临床中心)

周正宇(苏州大学)

庄乐南(浙江大学)

卓振建(北京大学深圳研究生院)

审定:

陈洪岩(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)

陈民利(浙江中医药大学)

陈振文(首都医科大学)

代解杰(中国医学科学院医学生物学研究所)

丁玉强(复旦大学)

富群华(上海实验动物研究中心)

贺争鸣(中国食品药品检定研究院)

金帆(浙江大学医学院附属妇产科医院)

李垚(上海交通大学医学院)

刘恩岐(西安交通大学)

庞万勇(赛诺菲全球研发中心)

饶军华(广东省科学院动物研究所)

施爱民(南京医科大学)

宋国华(山西医科大学)

孙德明(国家卫生健康委科学技术研究所)

陶雨风(中国合格评定国家认可中心)

王健(上海市生物医药技术研究院)

王朝霞(上海交通大学)

魏强(中国医学科学院医学实验动物研究所)

吴宝金(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)

吴德国(中国科学院遗传与发育生物学研究所)

谢家骏(上海中医药大学)

徐彭(江西中医药大学)

徐平(上海吉辉实验动物饲养有限公司)

姚明(上海市肿瘤研究所)

应华忠(浙江省实验动物中心)

岳秉飞(中国食品药品检定研究院)

张周(中国科学院上海药物研究所)

郑和平(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院)

周聪颖(上海纽约大学)

朱德生(北京大学)

(按姓名拼音排序)

支持:

上海市实验动物学会

北京实验动物学学会

福建省实验动物学会

陕西省实验动物学会

青海省实验动物协会

山西省实验动物学会

浙江省实验动物行业协会

山东省实验动物学会

安徽省实验动物学会

江西省实验动物学会

江苏省实验动物协会

黑龙江省实验动物学会

广东省实验动物学会

上海市科技期刊学会

上海市生物医药行业协会实验动物专业委员会

中华医学人文培训工程专家委员会

中国研究型医院学会医学实验动物专家委员会



孙强，研究员，博士生导师，中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心非人灵长类研究平台主任。系国家杰出青年科学基金获得者、科技部中青年科技创新领军人才，并且荣获2018年谈家桢生命科学创新奖、2019年国务院政府特殊津贴、2020年药明康德生命化学研究奖-学者奖、2022年度上海市自然科学奖一等奖。同时是中国实验动物学会理事、灵长类实验动物专业委员会常务理事，上海市实验动物学会理事、生物安全专业委员会委员。长期致力于实验动物管理和模式动物构建及相关技术的研发工作，发表SCI论文22篇。自2004年起从事非人灵长类相关研究，获得中国首批“试管食蟹猴”，利用慢病毒转染和基因编辑技术先后构建了多种实验猴疾病动物模型，建立了基于精巢异种移植和激素注射的实验猴成熟加速技术，并在国际上首次得到体细胞克隆猴和胚胎干细胞高比例嵌合的食蟹猴。

NOD小鼠培育接力赛

孙强

(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 上海 200031)



[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] B [文章编号] 1674-5817(2024)05-0583-04

2024年第3期本专栏推出的《近交系小鼠培育及其背后的故事》^[1]一文中介绍了实验动物常用近交系小鼠的起源。为了延续这一话题，接下来本专栏将介绍几种具有特殊表型的实验小鼠的培育过程。其中，具有免疫缺陷表型的小鼠无疑是最常用的模式动物之一。虽然裸小鼠和SCID小鼠是最知名的两种自发突变免疫缺陷小鼠，但当下常用的免疫缺陷小鼠如NSG、NOG、NRC和B-NDG[®]都是以NOD小鼠为背景品系培育而成的^[2]。为更好地了解这些免疫缺陷小鼠，就有必要先了解和掌握NOD小鼠的特性。故本篇将给读者朋友们介绍一下NOD小鼠的主要生物学特性和其曲折的培育史。

1 NOD小鼠的生物学特性

NOD小鼠是少有的一个在美国之外通过近交培育成功的自发突变实验动物模型。NOD是non-obese diabetes的首字母缩写，中文意思为非肥胖糖尿病。即NOD小鼠为非肥胖糖尿病小鼠的简称。常见的糖尿病主要分两种类型，其中1型糖尿病是一种因遗传易感导致患病个体胰腺中产生胰岛素的 β 细胞受自身免疫攻击破坏而功能丧失，无法分泌胰岛素而形成的疾病^[3]。NOD小鼠就是一款自发1型糖尿病模型小鼠，其培育成功不仅为研究自身免疫性糖尿病和胰岛细胞损伤提供了不可替代的模型工具，同时也促进了1型糖尿病早发现、预防和临床治疗的研究进展^[4]。

NOD小鼠的糖尿病表型包括：具有糖尿病特征性胰岛炎（胰岛被白细胞浸润所致），胰岛 β 细胞选择性破坏，雌性小鼠12周龄左右时胰岛素含量显著下降（雄性则会晚几周发生），形成低胰岛素血症和高血糖血症。值得注意的是，NOD小鼠在糖尿病发病率上存在性别差异，雌性小鼠发病早，发病率高，30周龄时的发病率为90%~100%；而雄性NOD小鼠到30~40周龄时的发病率也只有40%~60%^[5]。

2 NOD小鼠的曲折培育史

2.1 始于自发白内障小鼠

20世纪70年代，总部位于日本大阪市的盐野义（Shionogi）制药公司着手研发和培育胰岛素依赖型糖尿病啮齿类动物模型的工作，并成立了项目团队。此前，在该公司位于油日（Abrahi）的实验动物中心工作的大藤博史（Hiroshi Ohtori）博士，正利用来自日本实验动物供应商CLEA株式会社的Jcl-ICR小鼠，开展自发白内障品系的培育工作。ICR小鼠源自Swiss封闭群小鼠。ICR这个名称源自Swiss品系小鼠的培育机构——美国癌症研究所（Institute of Cancer Research）的首字母缩写。这些ICR小鼠随后被转给商业育种公司，并且衍生出了类似Jcl-ICR（日本CLEA公司）和CD-1（美国Charls River公司）的商品化小鼠。到1966年，Jcl-ICR种群中出现了白内障表型。大藤博史以此为基础，期望通过近交繁育固定这个表型，并建

立一个自发白内障的近交系小鼠。这个工作到1975年得以完成,获得了一个常染色体显性遗传的自发白内障近交系,命名为CTS (Cataract Shionogi) [6]。

基于白内障与糖尿病的相关性,大藤博史在CTS小鼠培育过程中突发奇想:“能否在培育白内障小鼠的同时,通过监测血糖水平不同进而筛选得到自发糖尿病的小鼠模型呢?”于是,从CTS小鼠近交繁育的第6代开始,他与之后来到油日实验动物中心的吉田丰彦 (Toyohiko Yoshida) 一起,以空腹血糖水平为选育指标,对培育中的CTS小鼠进行高血糖和正常血糖分组繁育。如此繁育10代后,白内障性状在两组小鼠中都消失了,这说明血糖变化与这些小鼠的自发白内障没有相关性。之后,大藤博史离开了油日实验动物中心,吉田丰彦则继续这项血糖分组繁育糖尿病小鼠的工作。到第13代时,得到了两个血糖水平差异明显的亚系,其中正常血糖亚系小鼠的空腹血糖水平为100 mg/dL,高血糖亚系小鼠的空腹血糖水平为150 mg/dL。

2.2 意料之外的高尿糖小鼠

1973年,日本盐野义制药公司的糖尿病动物模型研发项目组因缺乏实质性进展,面临解散的命运。在项目组成立之初,因有丰富的动物饲养工作经验,被从油日调到总部的前田真作 (Jinsaku Maeda), 不得不又回到了油日实验动物中心。与此同时,原本在油日实验动物中心工作的吉田丰彦离开了油日,于是前田真作就接手了大藤博史和吉田丰彦培育的这两个空腹血糖值差异明显的亚系小鼠的饲养管理工作。此时,高血糖亚系小鼠已表现出较高的血浆葡萄糖水平和葡萄糖不耐受,其中雄性小鼠尤其明显,但并没有出现糖尿迹象。由于曾参与糖尿病项目攻关小组的关系,前田真作从这两个亚系中各抽取了几对小鼠,送到位于大阪的公司总部项目组,进一步做糖尿病表型的检查和评估工作。在总部的糖尿病模型项目组的吉野义弘 (Yoshihiro Tochino) 对这些小鼠进行了血糖和尿糖检查,发现其中一只来自正常血糖亚系的雌性小鼠存在多尿和尿糖阳性症状,而其余小鼠均没有多尿和糖尿。这是一个出乎意料的结果,因为与最初期望相反,不是在高血糖亚系,而是在正常血糖亚系中发现了高尿糖小鼠。

虽然这只小鼠来自正常血糖亚系,但其尿糖水平很高,且体重迅速减轻,很快死于酮症酸中毒。吉野义弘没有对发病的这只高尿糖小鼠进行生化和病理检查,但他在1975年的公司研讨会议上报告了上述发

现。很快这个消息被传到了油日实验动物中心。此前,前田真作曾发现血糖正常亚系小鼠中出现了多例新生小鼠死亡的事件,并将死亡原因归咎于饮水瓶漏水导致的笼盒内垫料过度潮湿。在听到吉野义弘报告的消息后,前田真作猜测垫料的过度潮湿可能是由小鼠多尿造成,于是把更多的小鼠送到大阪总部给吉野义弘检测。检测结果证实了前田真作的猜测,吉野义弘在更多的血糖正常亚系小鼠中发现了尿糖阳性个体,而在高血糖亚系中却没有发现。吉野义弘以前田真作的英文名 (Maeda) 和他自己的英文名 (Tochino) 首字母为这种在血糖正常的鼠群中出现尿糖的小鼠命名为“mt小鼠”。与此同时,油日实验动物中心的病理学家村岗义弘 (Yoshihiro Muraoka) 也首次在“mt小鼠”(第20代)的胰腺中发现了胰岛炎。1976年,吉野义弘和村岗义弘等在日本糖尿病协会近畿地区会议上介绍了“mt小鼠”。但由于是地方会议,这个工作并没有引起多少人注意。

2.3 NOD小鼠正式定名

1970年,因建立2型糖尿病模型闻名(1957年在名古屋大学培育了葡萄糖耐受不良和重度肥胖的KK小鼠)的近藤恭二 (Kyoji Kondo) 教授被任命为油日实验动物中心的科学顾问。近藤恭二的博士生牧野进 (Susumu Makino) 跟随导师一起来到了油日实验动物中心。随后,牧野进在近藤恭二的指导和要求下,一直从事这3项工作:(1)培育一种自发糖尿病小鼠品系;(2)以“mt小鼠”为基础群培育一个血糖正常品系小鼠;(3)用“mt小鼠”开展糖尿病相关的遗传分析。

1975年,牧野进在前田真作退休后开始全面接管“mt小鼠”。此时的“mt小鼠”已经近交繁育到了第20代,部分小鼠已经转到了无特定病原体 (specific pathogen-free, SPF) 的环境设施下饲养。到1980年,“mt小鼠”在牧野进手上又繁育了20代,自发胰岛炎和胰岛素依赖性的糖尿病性状已经完全固定下来(此时不仅仅是尿糖阳性的小鼠,而已是糖尿病小鼠),品系的名称也被他改为NOD。

2.4 NOD小鼠国际化

1981年,牧野进在日本举行的首届非肥胖糖尿病研讨会上介绍了NOD小鼠,使其被日本学界所知的同时,也导致了NOD小鼠的需求量与日俱增。为了满足日益增长的需求,日本盐野义公司命令油日实验动物中心扩大生产,同时还专门成立了NOD管理委员会来

决定NOD小鼠的分发和派送。同年,吉野义弘等在以色列举行的糖尿病动物模型专题研讨会上,向全世界科学家介绍了NOD小鼠。这使得NOD小鼠的知名度从日本扩展到了国外。

1982年,美国的杰克森(Jackson)实验室向日本盐野义公司提出引入NOD小鼠并在美国建立繁殖种群的申请,但被日本NOD管理委员会以生产能力不足为由拒绝了。之后,日本NOD管理委员会还做出NOD小鼠不供应国外的决定。但这直接导致美国糖尿病协会及其旗下学术期刊做出不接受日本NOD小鼠相关研究论文的回击。在这种压力下,日本盐野义公司最终与美国糖尿病协会达成合作协议。到1984年,NOD小鼠终于可以走出日本,并在美国和澳大利亚等国建立了新的繁殖种群。

NOD小鼠起源于日本商业公司引进的ICR小鼠即Jcl-ICR小鼠。由于ICR小鼠具有良好的繁殖性能,因此NOD小鼠也继承了这一优良品种的繁殖性能,平均窝产仔数可达9只。然而,由于糖尿病,大多数雌性NOD小鼠最多能生产两胎。此外需要注意的是,在不同微生物等级饲养条件下,糖尿病的发病率存在差异:SPF饲养条件下NOD小鼠的糖尿病发病率显著高于普通环境饲养的NOD小鼠^[7]。后续的研究表明,NOD小鼠除了血糖异常外,还存在多种免疫缺陷,如抗原递呈细胞免疫调节功能缺陷^[8]、T淋巴细胞库的调节缺陷^[9]、NK细胞功能缺陷^[10]、巨噬细胞产生的细胞因子缺陷^[11]、伤口愈合不良^[12]及缺乏溶血补体C5^[13]等,这也是其后来成为明星免疫缺陷动物背景品系的主要原因。

3 NOD小鼠培育过程的启示

从大藤博史脑洞大开地在CTS小鼠培育的同时开展糖尿病小鼠培育算起至NOD小鼠培育成功并为世人所知历经了15年。由于NOD培育早期的工作内容主要是以日文报道或发表,且主要在小范围内进行交流,多不为世人所知。牧野进是首位以第一作者身份发表NOD小鼠繁育英文论文的人^[14],令业界误以为他是这个小鼠品系的培育者。实际上,真实的NOD小鼠培育史是一个多人参与的接力赛,其间任何一个人放弃或不用心都可能会导致失败。可以说,这段历史既见证了日本实验动物科学的发展历程,也体现了科学家细心、耐心和富有责任心的品质,值得我们学习。而盐野义制药公司为NOD小鼠培育提供了相对宽松且积极

的科研环境,亦是功不可没,但科学无国界,实验动物资源的开放共享也是科学研究国际化合作的必然需要。此外,NOD小鼠并非来自预想中的高血糖亚系,说明科学实验结果往往会出人意料,并不总是按预期的方向发展,这也是科学的魅力所在。

致谢:本文得到了“中国科学院战略生物资源专项实验动物平台项目”(编号:KFJ-BRP-005)的支持。

【参考文献 References】

- [1] 孙强. 近交系小鼠培育及其背后的故事[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(3): 335-338. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.085.
SUN Q. Cultivation of inbred mice and the story behind it[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(3): 335-338. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.085.
- [2] NAGATANI, M, KODERA T, SUZUKI D, et al. Comparison of biological features between severely immuno-deficient NOD/Shi-*scid* *Il2rg*^{null} and NOD/LtSz-*scid* *Il2rg*^{null} mice. Exp Anim, 2019, 68(4): 471-482. DOI: 10.1538/expanim.19-0024.
- [3] GRATTONI A, KORBUTT G, TOMEI A A, et al. Harnessing cellular therapeutics for type 1 diabetes mellitus: progress, challenges, and the road ahead[J/OL]. Nat Rev Endocrinol, 2024[2024-10-15]. <https://www.nature.com/articles/s41574-024-01029-0>. DOI: 10.1038/s41574-024-01029-0.
- [4] AUBIN A M, LOMBARD-VADNAIS F, COLLIN R, et al. The NOD mouse beyond autoimmune diabetes[J]. Front Immunol, 2022, 13:874769. DOI: 10.3389/fimmu.2022.874769.
- [5] CHEN Y G, MATHEWS C E, DRIVER J P. The role of NOD mice in type 1 diabetes research: lessons from the past and recommendations for the future[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9:51. DOI: 10.3389/fendo.2018.00051.
- [6] MULLEN Y. Development of the nonobese diabetic mouse and contribution of animal models for understanding type 1 diabetes[J]. Pancreas, 2017, 46(4): 455-466. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000828.
- [7] WEN L, LEY R E, VOLCHKOV P Y, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes [J]. Nature, 2008, 455(7216): 1109-1113. DOI: 10.1038/nature07336.
- [8] RICHER M J, LAVALLÉE D J, SHANINA I, et al. Immunomodulation of antigen presenting cells promotes natural regulatory T cells that prevent autoimmune diabetes in NOD mice[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31153. DOI: 10.1371/journal.pone.0031153.
- [9] O'BRIEN R L, MATSUDA J, AYDINTUG M K, et al. A distinctive $\gamma\delta$ T cell repertoire in NOD mice weakens immune regulation and favors diabetic disease[J]. Biomolecules, 2022, 12(10): 1406. DOI: 10.3390/biom12101406.
- [10] BEILKE J N, MEAGHER C T, HOSIWA K, et al. NK cells are not required for spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36011. DOI: 10.1371/journal.pone.0036011.

- [11] SERREZE D V, GAEDEKE J W, LEITER E H. Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/It mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(20): 9625-9629. DOI: 10.1073/pnas.90.20.9625.
- [12] RAPP A E, BINDL R, RECKNAGEL S, et al. Fracture healing is delayed in immunodeficient NOD/scid-IL2R γ_c ^{null} mice[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0147465. DOI: 10.1371/journal.pone.0147465.
- [13] JOHANSSON A C, SUNDLER M, KJELLÉN P, et al. Genetic control of collagen-induced arthritis in a cross with NOD and C57BL/10 mice is dependent on gene regions encoding complement factor 5 and Fc γ RIIb and is not associated with loci controlling diabetes[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(6): 1847-1856. DOI: 10.1002/1521-4141(200106)31:6<1847:aid-immu1847>3.0.co;2-f.
- [14] MAKINO S, KUNIMOTO K, MURAOKA Y, et al. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice[J]. Jikken Dobutsu, 1980, 29(1): 1-13. DOI: 10.1538/expanim1978.29.1_1.

(收稿日期: 2024-10-03 修回日期: 2024-10-20)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 干明红, 丁宇菁)

[引用本文]

孙强. NOD 小鼠培育接力赛[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(5): 583-586. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.144.

书讯:《医学实验动物学》(第2版)教材出版



迄今为止, 几乎所有应用于人类临床的治疗方案在最初发展和测试时都离不开动物实验研究。医学动物实验在疾病防治、药物与医疗设备研发以及外科手术创新等方面不可或缺。动物实验不仅大大改善了人类和动物的健康, 而且帮助人们更深入地了解生物医学基础知识。目前, 我国大多数农业、生物和医学院校均开设了实验动物科学相关课程, 但不同院校的实验动物学课程体系相差较大, 使用教材的内容和质量也参差不齐。

为了给高等院校在读本科生及研究生们提供一本合适且实用的、包含先进技术的实验动物学教科书, 2008年西安交通大学刘恩岐教授、四川大学尹海林教授和南方医科大学顾为望教授等共同编写了《医学实验动物学》(第1版)。该教材经科学出版社出版后因需求量较大被重印了9次, 产生了较大的社会影响。然而, 随着生物医学的不断进步, 动物实验技术日新月异, 第1版教材的相关内容亟需更新以适应新的变化。此外, 如何根据3Rs原则及动物福利伦理最新要求, 更规范、更有效地开展动物实验研究, 以提高相关结果的临床转化效率, 也已成为生物医学教学及研究人员必须面对的一个基础问题。因此, 2024年6月, 刘恩岐教授和空军军医大学师长宏教授、重庆医科大学谭冬梅教授共同主编的《医学实验动物学》(第2版)(ISBN 978-7-03-077568-9)经科学出版社正式再版问世。

本书以第1版《医学实验动物学》为基础, 结合作者团队二十多年的实验动物学教学、动物实验研究和其他多本教材编写的诸多经验, 并且充分征询了使用实验动物进行生物医学研究的师生们的广泛意见, 经过较长时间的思考和总结后, 对教材内容做了全面更新。新教材保持了第1版简明扼要的特色, 突出理论教学、实验操作和技能培训, 系统涵盖了实验动物学基本知识和最新的动物实验技术; 同时, 为了更好地开展教学工作, 将第1版的8章内容扩展到12章, 包括: 实验动物在生物医学研究中的地位和作用、实验动物福利与伦理、常用实验动物种类及其生物学特性、实验动物遗传质量控制、实验动物微生物和寄生虫质量控制、实验动物环境和营养控制、动物实验设计、人类疾病动物模型、基因修饰动物制作及应用、实验动物饲养和管理、实验动物麻醉和安乐死, 以及动物实验技术等。

本书作为科学出版社推出的“十四五”普通高等教育研究生规划教材之一, 不仅是生物医学相关专业本科生和研究生的标准教科书, 也是从事动物实验研究、实验动物饲养及其他相关专业人士必备的参考书。欢迎对本书感兴趣的读者直接扫码获取更多信息。



(本刊副主编刘恩岐教授供稿)